

### 5.3.3 *Aplicación de la CE a las separaciones quirales y la determinación de purezas enantioméricas*

#### 5.3.3.1 *Introducción*

La aplicación de la CE a las separaciones quirales de principios activos (Dopa y Ketoprofeno) que se comercializan en forma enantioméricamente pura y la determinación de su pureza enantiomérica es el objetivo de este apartado<sup>13</sup>. El desarrollo de un método para este tipo de determinaciones exige la correcta elección del selector quiral y la posterior la optimización de la resolución del racémico. Posteriormente se investiga con mezclas sintéticas la posibilidad de determinar excesos enantioméricos elevados a partir de los métodos quirales propuestos.

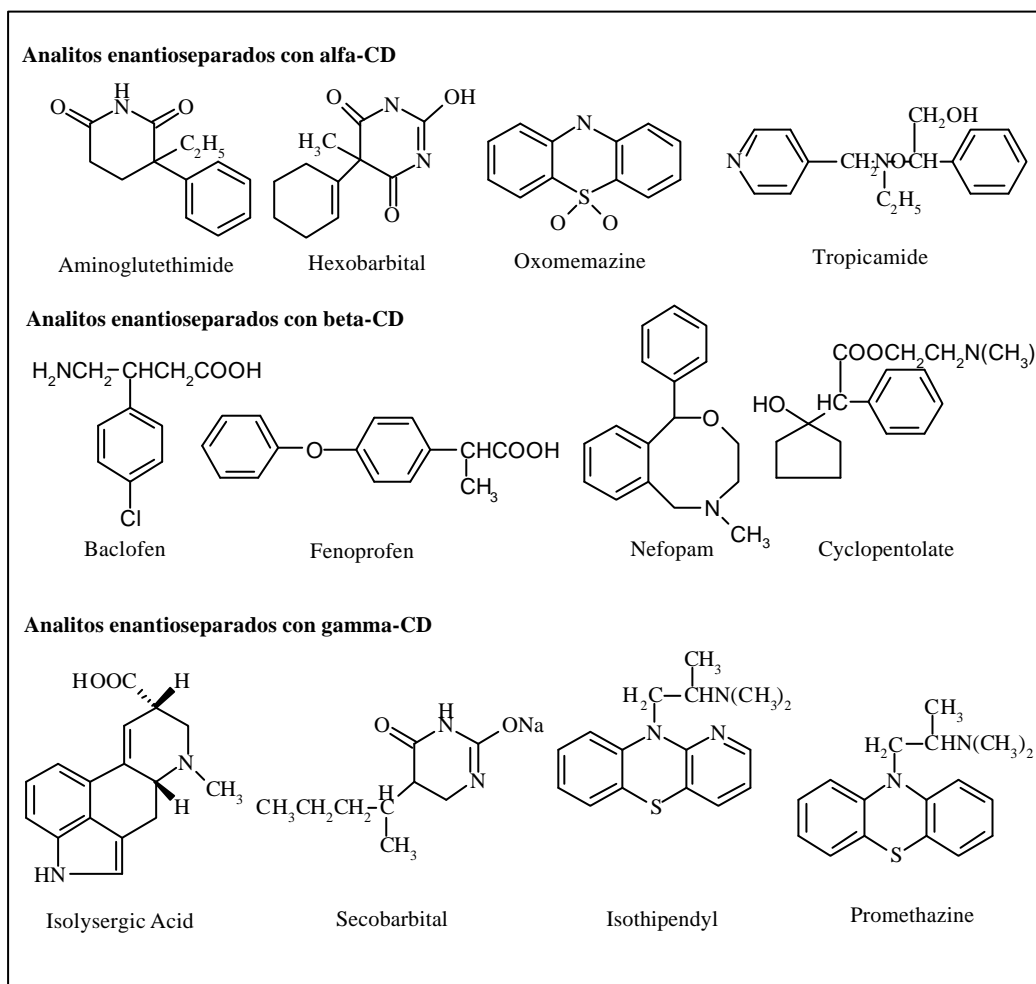
#### 5.3.3.2 *Elección del selector quiral*

Hasta la fecha, esta elección es empírica y se realiza mediante pruebas de ensayo y error que implican un coste en tiempo y dinero. Se ha revisado de forma crítica la experiencia acumulada en el campo de la electroforesis capilar quiral con el objetivo de generar pautas de comportamiento que permitan elegir al usuario el mejor selector en función de la estructura de su analito. Estos criterios de elección se han resumido en la tabla 5.5 y tienen como objeto reducir el número de experiencias iniciales.

**Tabla 5.5.** Algunas pautas para la correcta elección del selector quiral en CE

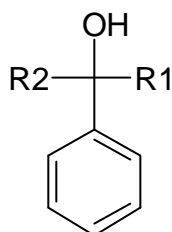
<b>Selector quiral</b>	<b>Tipo de estructuras o analitos</b>
<i>Ciclodextrinas naturales</i>	
$\alpha$ -CD	Analitos con un anillo aromático libre o poco funcionalizado
$\beta$ -CD	Analitos con un anillo aromático doblemente funcionalizado (estructura 4H) Analitos con dos anillos aromáticos u otros anillos de seis miembros
$\gamma$ -CD	Analitos con tres o cuatro anillos fusionados Analitos con un solo anillo muy sustituido
<i>Ciclodextrinas modificadas neutras</i>	
DM- $\beta$ -CD	Idem que $\beta$ -CD pero más universal
TM- $\beta$ -CD	Idem que $\beta$ -CD pero más universal
HP- $\beta$ -CD	Analitos con algún anillo aromático y/o un grupo hidroxilo soportado sobre el carbono quiral
<i>Ciclodextrinas modificadas cargadas</i>	
Aniónicas (CM-- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD)	Analitos neutros o catiónicos, en especial si presentan algún anillo aromático
Catiónicas (QA- $\beta$ -CD)	Analitos neutros o aniónicos
<i>Eteres coronas quirales (18C6H<sub>4</sub>)</i>	Aminas primarias
<i>Surfactantes quirales</i>	
Sales biliares	Analitos con una estructura rígida de anillos fusionados
<i>Complejos de intercambios de ligando</i>	Aminoácidos, aminoalcoholes o hidroxiácidos
Antibióticos macrocíclicos	
<i>Ansamicinas</i>	Analitos neutros y catiónicos, especialmente aquellos que posean un grupo amino
<i>Glicopéptidos</i>	Analitos neutros y aniónicos con un fragmento aniónico y un anillo aromático o un grupo carbonilo o amida próximo al carbono asimétrico.
Polisacáridos	
<i>Heparina</i>	Analitos con un anillo heterocíclico de nitrógeno y otro nitrógeno ionizable.

Las ciclodextrinas son los selectores quirales más utilizados y están constituidas por anillos de 6,7 u 8 miembros de D-glucopiranososa que forman una cavidad hidrofóbica. Esta cavidad puede albergar los enantiómeros de un analito en diferente extensión<sup>14</sup> y permitir así su enantioresolución. Esta inclusión no garantiza la resolución quiral pero es imprescindible por lo que el analista debe proponer condiciones experimentales que la favorezcan. Las CD naturales son capaces de incluir gran variedad de compuestos, en especial aquellos con algún anillo aromático. La  $\alpha$ -CD es la más adecuada para enantioresolver analitos con un solo anillo aromático sin sustituciones o con no más de un sustituyente. La  $\beta$ -CD es la ciclodextrina con mayor poder de enantioresolución, analitos con un anillo aromático doblemente sustituido dos anillos aromáticos fusionados o otros anillos de 6 miembros parecen adecuarse muy bien a las dimensiones de su cavidad. La  $\gamma$ -CD es la mejor opción para enantioseparar analitos con tres o cuatro anillos fusionados o para estructuras con un solo anillo muy sustituido. La siguiente tabla muestra la estructura de algunos analitos enantioresueltos mediante estas CDs.



**Figura 5.15.** Analitos enantioseparados mediante CDs naturales

Las ciclodextrinas modificadas donde algunas de los grupos hidroxilos se han derivatizado para dar grupos alquilo presentan un grado de simetría menor y son más estereoselectivas<sup>15</sup>. La Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\beta$ -CD(TM- $\beta$ -CD) y la Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -CD(DM- $\beta$ -CD) son dos CDs habituales y con una enantioselectividad generalmente complementaria a la de la  $\beta$ -CD. Por ejemplo, la DM- $\beta$ -CD ofrece excelentes resultados para la enantioseparación de drogas simpatomiméticas como la doxylamine o el isoproterenol que no se pueden separar en sus enantiómeros o la separación es insuficiente mediante  $\beta$ -CD<sup>16</sup>. Igualmente, la  $\beta$ -CD no es muy eficaz en la enantioseparación de ácido arilpropiónicos quirales mientras que la TM- $\beta$ -CD exhibe un gran poder de enantiodiscriminación para esta familia de principios activos<sup>17</sup>. La 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) es otra CD modificada habitual y especialmente útil para enantioseparar analitos que posean en su estructura algún anillo aromático y un grupo hidroxilo directamente soportado sobre el carbono asimétrico.

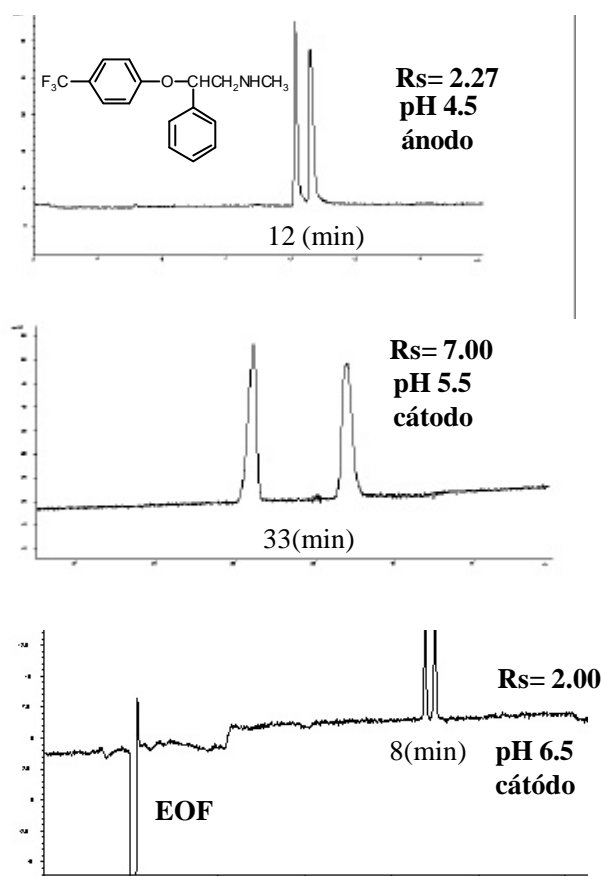


**Figura 5.16.** Subestructura que presentan gran parte de los analitos enantioseparados mediante HP- $\beta$ -CD.

Diversos antihipertensivos o broncodilatadores han sido enantioresueltos con esta CD y poseen esta subestructura. La enantioseparación de analitos con estructura tan diferente como la homatropine<sup>18</sup> o algún  $\alpha$ -hidroxiácido como el ácido mándelico<sup>19</sup> corroboran esta observación.

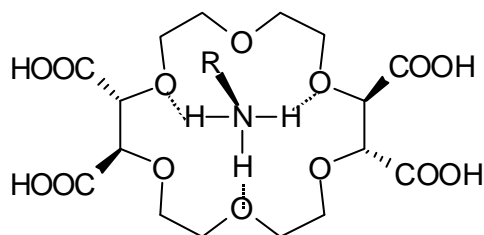
Las CD neutras sólo pueden enantioseparar analitos cargados y esto ha impulsado la síntesis de CD cargadas que destacan por el gran número de analitos de que son capaces de enantioresolver y por los elevados valores de resolución quiral que se obtienen. Destacamos, por su mayor uso, la carboxymethyl- $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD) y la sulfated- $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD), las dos aniónicas, y como CD catiónica, la 2-hydroxypropyl-trimethylamonio- $\beta$ -CD (QA- $\beta$ -CD, quaternary ammonium substituted).

Las ciclodextrinas aniónicas son adecuadas para la enantioseparación de analitos neutros o catiónicos que presenten en su estructura algún grupo apolar que favorezca la inclusión en la CD. Por el contrario las CDs catiónicas son adecuadas para enantioseparar analitos neutros o aniónicos. La figura 5.18 muestra la separación de una amina secundaria con CM- $\beta$ -CD y como la movilidad del complejo analito-CD es hacia el ánodo o el cátodo en función del pH debido a que se modifica la carga negativa del complejo y la magnitud del EOF.



**Figura 5.17.** Separación de la fluoxetina mediante 10 mM CM- $\beta$ -CD a diferentes pHs. 20 mM cítrico, 30 kV.

El (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18C6H<sub>4</sub>) es un selector eficaz para enantiodiscriminar analitos que contengan un grupo amina primaria<sup>20</sup>. Las aminas primarias se alojan dentro de la cavidad del éter a través de una interacción triple formada por puentes de hidrógeno.



**Figure 5.18.** Host-Guest Complex between a primary amine and 18C6H<sub>4</sub>

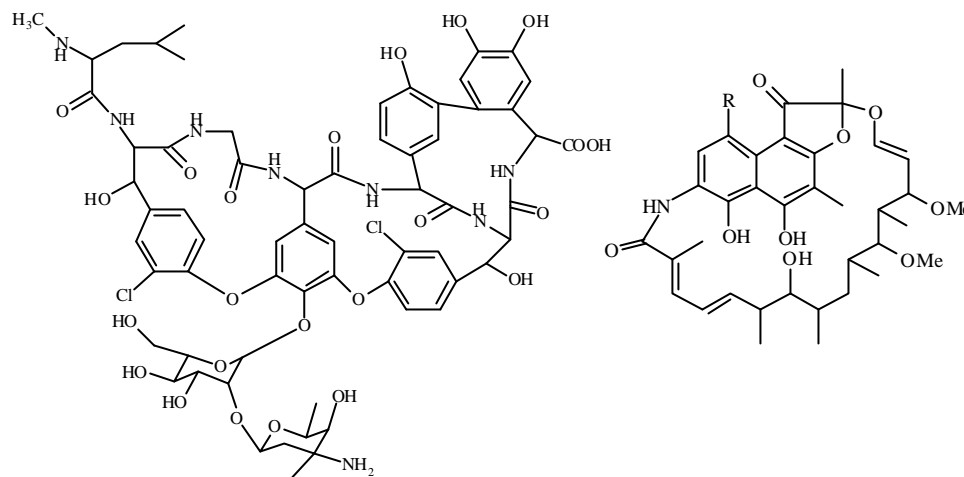
Otros analitos (ejemplos aminas secundarias o terciarias) pueden incluirse en la cavidad del éter pero no dar la interacción trípode para su enantioseparación. Estructuras donde el carbono asimétrico está totalmente sustituido son menos probables de ser enantioselectivas porque la complejación se ve estéricamente impedida.

La enantioseparación basada en el intercambio de ligandos consiste en la adición al BGE de un catión (básicamente Cu(II)) y dos ligandos bifuncionales quirales (tradicionalmente L-aminoácidos)<sup>21,22</sup>. El analito quiral desplaza a uno de estos ligandos para formar un complejo ternario. Los dos enantiómeros del analito forman complejos ternarios transitorios de diferente estabilidad y se posibilita así la separación quiral. En consecuencia, estos selectores sólo pueden usarse para aquellos analitos capaces de formar este tipo de complejos: aminoácidos, aminoalcoholes o hidroxiaácidos. En general, los problemas de detección relacionados con la gran absorptividad del BGE y la tendencia de ciertos analitos a dar separaciones poco eficientes como consecuencia de una cinética de intercambio de ligandos demasiado lenta son las mayores limitaciones de estos selectores.

Las sales biliares, que se han utilizado en esta memoria como tensioactivos en MEKC, presentan la característica de ser quirales tanto sus micelas pueden solubilizar en diferente extensión a los enantiómeros de un compuesto. El diltiazem, el lorazepam, el trimetoquinol son algunos de los compuestos enantioseparados mediante sales biliares<sup>23</sup>. Estos analitos presentan una estructura rígida de anillos fusionados (similar a la de las sales biliares) por lo que estos selectores son útiles para enantioseparar analitos policíclicos improbables de separar mediante otros selectores quirales<sup>7</sup>.

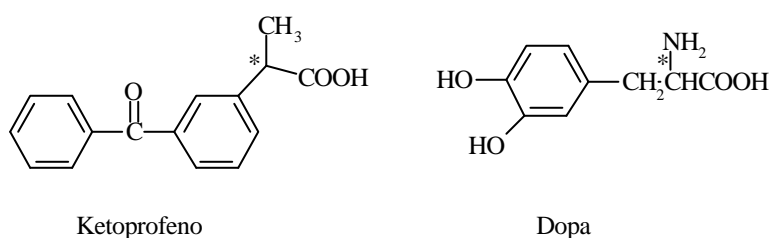
Otros selectores quirales de interés son los macrociclos antibióticos<sup>24</sup> y los polisacáridos<sup>25</sup> lineales que presentan la característica común de poseer un mecanismo de enantio-reconocimiento poco estudiado y la capacidad de enantioseparar analitos de muy diferente naturaleza. Los macrociclos antibióticos los podemos dividir en ansamicinas y glicopeptidos. La figura 5.20 muestra la estructura del rifamicin y de la vancomycin, los dos selectores más habituales de cada familia.

Las ansamicinas presentan un poder de enantiodiscriminación inferior al de los glicopeptidos. La rifamicina B se ha usado para enantioseparar compuesto neutros y catiónicos en especial aquellos con algún grupo amino. Los glycopeptide antibiotics son selectores más versátiles capaces de enantio-resolver e 500 selectantes distintos y proporcionar valores de enantio-resolución muy elevados ( $R_s > 20$ ). Los glycopeptides más habituales de esta familia son el vancomycin, el teicoplanin, el avoparcin y el ristocetin A. Estos selectores son anfotéricos aunque se han mostrado más eficaces para la separación de compuestos neutros y aniónicos y por tanto son complementarios respecto a las ansamicinas.



**Figura 5.19.** Izquierda: Estructura del vancomycin (antibiótico glicopeptico). Derecha: Estructura básica de las ansamicinas más habituales; rifamycin B ( $R=OCH_2CO_2H$ ) y rifamycin SV( $R=OH$ ).

Los polisacáridos lineales son una familia de selectores quirales que incluye neutros y cargados. Las dextrinas, dextranos y la heparina son ejemplo de estos selectores quirales. Destacamos por su mayor poder de enantioresolución, las maltodextrinas que se han mostrado útiles para enantioseparar una gran variedad de drogas<sup>26</sup> y la Heparina que es una mezcla heterogénea de cadenas de polisacáridos sulfatadas o capaz de enantioresolver diversos antihistaminicos (doxylamine, dimenthidene) o antimalarial drugs (primaquine, mefloquine)<sup>27</sup>. Estas estructuras poseen un anillo heterocíclico de nitrógeno y otro nitrógeno ionizable por lo que analitos con estas características son las más probables de ser enantioresueltas mediante este selector. Estas pautas fueron seguidas para seleccionar un selector quiral adecuado para separar los enantiómeros de la Dopa y del Ketoprofeno (figura 5.21).



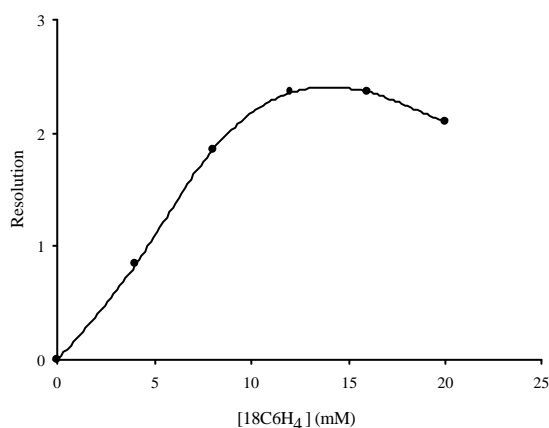
**Figura 5.20.** Estructura del ketoprofeno y de la Dopa. El astérisko se usa para mostrar el carbono asimétrico.

La Dopa posee un grupo aromático que favorece su inclusión dentro de la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas y la presencia de carga positiva en su estructura hace probable su interacción con una ciclodextrina aniónica. No obstante, ninguna de las ciclodextrinas neutras ensayadas (( $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, heptakis(2,3,6)-tri-*o*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina) consigue

separar los enantiómeros de la Dopa. Los resultados son también negativos con una ciclodextrina aniónica como la carboxymethyl- $\beta$ -ciclodextrina. Se ensaya el (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18C6H<sub>4</sub>) y se consigue resolver los enantiómeros de la Dopa obteniéndose un orden de migración levodopa, dextrodopa. El Ketoprofeno presenta una subestructura de anillo aromático doblemente sustituido que lo hacen adecuado para ser enantioseparado mediante  $\beta$ -CD o sus análogas metiladas. Los resultados demuestran que el analito se incluye dentro de las tres CDs pero que la  $\beta$ -CD y la DM- $\beta$ -CD no consigue separar sus enantiómeros (o la separación es muy reducida). Por contra, la TM- $\beta$ -CD proporciona unos resultados excelentes y se obtiene una buena resolución quiral siendo el R-Ketoprofeno el primer enantiómero en migrar.

### 5.3.3.3 Optimización de la resolución

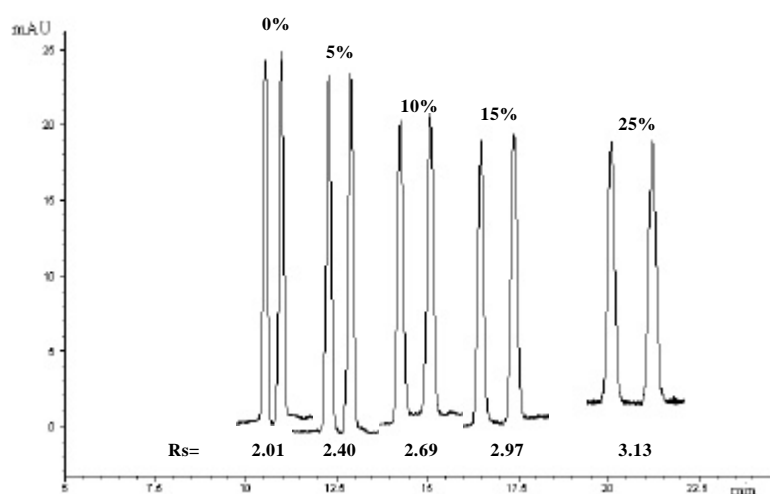
La pérdida de resolución causada por el ensanchamiento del pico del enantiómero mayoritario en muestras con un elevado exceso enantiomérico provoca que sea necesario optimizar la resolución en este tipo de determinaciones<sup>28</sup>. El valor de resolución quiral necesario depende de múltiples factores como: el valor del exceso enantiomérico, la eficiencia de la separación, la tendencia del pico a aparecer con colas a concentraciones elevadas, etc. Aproximadamente un valor de resolución de 3 suele ser adecuado para determinar purezas enantioméricas. Los factores que afectan a la resolución quiral deben ser estudiados y dependen de la naturaleza del selector quiral. En el anexo VI ha sido necesario optimizar la resolución enantiomérica de la Dopa conseguida con el 18C6H<sub>4</sub>. El primer parámetro que se estudio fue el efecto de variar la concentración de 18C6H<sub>4</sub> tal y como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 5.21** Variación de la resolución quiral de la Dopa con la concentración de éter corona



Como puede observarse, 12 mM proporciona la mejor separación y fue tomada como la concentración de 18C6H<sub>4</sub> para el resto de separaciones. El pH del BGE puede afectar a la resolución enantiomérica porque el 18C6H<sub>4</sub> es un ácido policarboxílico con valores de pK<sub>a</sub> entre 2.1 y 4.9. En nuestro caso variar el pH en el intervalo 2.5-4.5 condujo a valores de resolución parecidos y próximos a 2. El resto de experiencias se llevan a cabo a pH 2.5 porque proporciona una separación enantiomérica ligeramente superior. La presencia en el BGE de un solvente orgánico, como el metanol, hace variar la polaridad del medio y esto afecta en gran medida a los equilibrios Host-Guest. La adición al BGE de porcentajes de MeOH entre el 0-25% (figura 5.23) conduce a un aumento de la resolución quiral y de los tiempos de migración. Este aumento de la resolución se explica por una mayor inclusión del analito en la cavidad del éter. Esta inclusión se ve favorecida por la disminución de la polaridad del medio que intensifica las interacciones electrostáticas y favorece la complejación. En consecuencia, los tiempos de migración aumentan de 10 min (0% MeOH) hasta 20 min en un BGE conteniendo un 25% de MeOH. Se elige el 15 % de MeOH como el mejor porcentaje de modificador orgánico en un compromiso entre la resolución y el tiempo de análisis.

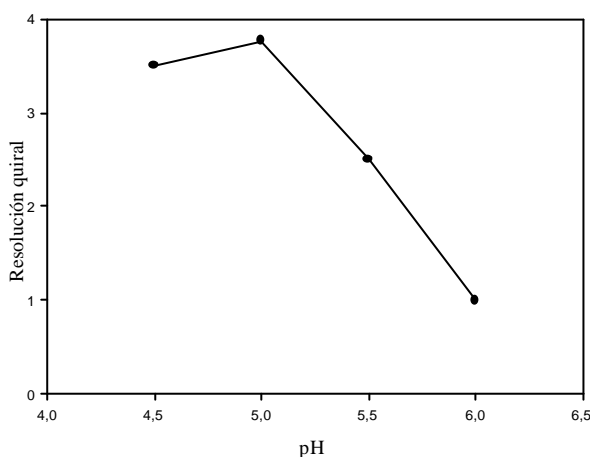


**Figura 5.22.** Variación de los tiempos de migración y de la resolución quiral de la Dopa al aumentar el porcentaje de metanol. 10 mM TRIS/ácido cítrico pH 2.5, 12 mM 18C6H<sub>4</sub>, 30kV.

Otro factor que influye en la enantioresolución es la temperatura del capilar por lo que se estudia su efecto en el intervalo de 15 a 35°C. En general, la constante de inclusión disminuye al aumentar la temperatura para los complejos Host-Guest y esto se refleja en la resolución<sup>29</sup>. Sin embargo, la reducción de la temperatura también conlleva un aumento de los tiempos de análisis porque disminuye la movilidad electroforética de los analitos. Con el fin de optimizar la resolución, se escoge 15 °C para futuras separaciones.

En las condiciones finalmente seleccionadas (pH 2.5, 12 mM 18C6H<sub>4</sub>, 15% MeOH, 15°C) se obtienen resoluciones de los enantiómeros de la Dopa próximas a 4. En este caso, el fármaco contiene otro principio activo, la benserazida, que en las condiciones de separación propuestas no interfiere y se separa en sus enantiómeros con una resolución de 9. Esto demuestra la potencialidad de este selector quiral para la enantioseparación de aminas primarias.

Para la optimización de la enantioseparación del Ketoprofeno racémico hay que tener en cuenta que este analito presenta un mecanismo de reconocimiento quiral ionoselectivo. Es decir, la ciclodextrina sólo puede discriminar una de las formas (neutras o ionizada) del analito. En este caso, sólo las formas neutras del Ketoprofeno pueden ser enantioseparadas y esto obliga a trabajar alrededor del pKa del analito. A pHs superiores no existe enantiodiscriminación mientras que a pHs inferiores aunque hay enantiodiscriminación no existe migración y por tanto la resolución quiral tampoco es posible<sup>30</sup>. En la figura 5.24 se puede observar como los mejores valores de resolución se obtiene a pH 5 que es aproximadamente el pKa del Ketoprofeno.



**Figura 5.23.** Variación de la resolución quiral del Ketoprofeno obtenida al modificar el pH del BGE. 60 mM acético/acetato 75mM TM-β-CD, 30 kV.

Otro parámetro útil para mejorar la resolución quiral mediante CDs es aumentar la concentración del electrolito de fondo. Como se puede observar en la siguiente tabla, variar la concentración del BGE de 40 a 80 mM provoca un aumento de la resolución y en general del tiempo de análisis. Esto se debe a que al aumentar la fuerza iónica del BGE se favorece las interacciones hidrofóbicas host-guest (el medio se vuelve más polar y el analito se incluye en mayor extensión en la cavidad apolar del la CD). En esta tabla, también puede observarse el efecto de variar la concentración de ciclodextrina. El aumento del selector quiral conduce a un aumento de la enantioresolución y del tiempo de análisis. En consecuencia, el resto de experiencias se llevan a cabo a una concentración intermedia de ciclodextrina.

**Tabla 5.6.** Valores de resolución y tiempos de migración del Ketoprofeno obtenidos al hacer variar la concentración del BGE (pH 5, 75 mM TM- $\beta$ -CD) o de la ciclodextrina (pH 5, 60 mM acético/acetato)

Concentración del BGE (mM)	Tiempo del R-Ketoprofeno (min)	Tiempo del S-Ketoprofeno (min)	Resolución
40	25.41	27.25	2.58
60	25.15	26.91	3.77
80	31.05	33.34	4.25
Concentración de la CD (mM)			
50	22.98	24.27	2.26
75	25.15	26.91	3.77
100	31.53	34.03	5.14

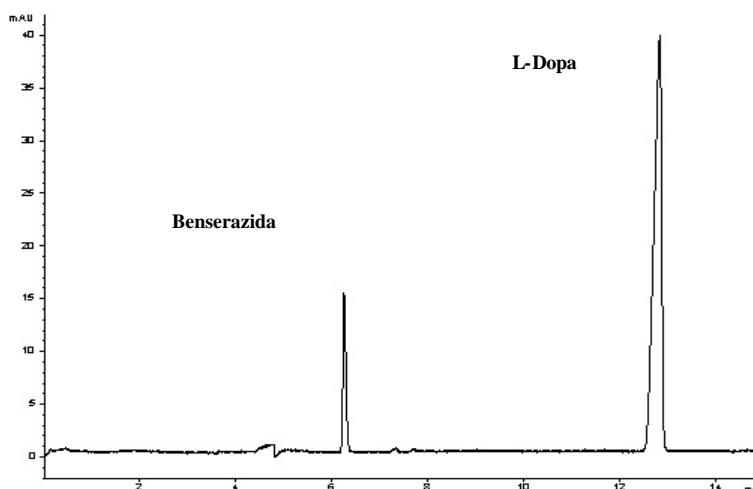
#### 5.3.3.4 Determinación de purezas enantioméricas

El análisis de la pureza enantiomérica de un producto implica la determinación de los dos enantiómeros en la muestra. En otras técnicas cromatográficas es habitual que los dos enantiómeros se determinen en la misma inyección. Sin embargo, esto no es frecuente en CE debido al menor intervalo lineal de respuesta del detector UV-Vis. El problema se resuelve con dos inyecciones distintas: una con una muestra muy concentrada para determinar el enantiómero minoritario y otra más diluida para determinar el mayoritario<sup>31</sup>. En esta tesis se propone una metodología distinta: por un lado, se determina el contenido total del analito en un medio aquiral y por otro lado la determinación del enantiómero minoritario se lleva a cabo en un medio quiral. Esta metodología presenta la ventaja que la separación de la muestra en condiciones aquirales permite proponer un método de análisis del fármaco y un ahorro de selector quiral. Posteriormente, la adición del selector quiral al medio, permite obtener el contenido del enantiómero minoritario. La relación entre estas dos determinaciones conduce al valor de la impureza enantiomérica (ei) definida como:

$$ei(\%) = \frac{m}{m + M} \times 100$$

Siendo m y M, el enantiomero minoritario y el mayoritario respectivamente.

En el anexo VI, la cantidad de Dopa total en el fármaco se determinó en un medio sin selector quiral y la separación obtenida se muestra en la continuación.



**Figura 5.24.** Electroferograma obtenido para el Madopar® 250. 10 mM TRIS/ Ácido Cítrico pH 2.5, 25°C, 30kV., 230 nm.

Alternativamente, la cantidad de Ketoprofeno se ha determinado en medio acirral aprovechando que al pH de trabajo el Ketoprofeno se separa del resto de excipientes que no están ionizados. El contenido de Ketoprofeno hallado por CE se compara con el encontrado por HPLC y se demuestra que ambos métodos proporcionan estadísticamente los mismos resultados.

Se evalúa entonces la posibilidad de determinar excesos enantioméricos elevados a partir de los métodos quirales propuestos. Este tipo de determinaciones exige no solo una buena resolución sino también una alta sensibilidad y ambos parámetros deben considerarse de forma conjunta. Es habitual que la pureza enantiomérica máxima determinable esté limitada por el límite de detección de un enantiómero en presencia del otro más que por el límite de detección de la técnica<sup>32</sup>. Este límite de detección conjunto, lo hemos denominado límite de detección relativo (RLD) y definido como:

$$RLD = \frac{LD_{\text{Min}}}{C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}} \times 100$$

Donde  $LD_{\text{Min}}$  es el límite de detección de la técnica para el enantiómero minoritario y  $C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}$  la concentración máxima del enantiómero mayoritario que se puede acompañar al minoritario sin que aparezcan problemas de resolución, solubilidad o alteraciones de la forma del pico provocados por

adsorción, sobrecarga etc. Para mezclas de excesos enantioméricos elevados, el RLD así definido, es una medida de la impureza enantiomérica mínima que puede ser detectada. Se puede observar que el RLD disminuye cuando menor sea la cantidad del enantiómero minoritario detectable y mayor la cantidad del enantiómero mayoritario que se pueda inyectar sin que aparezcan problemas de interferencia.

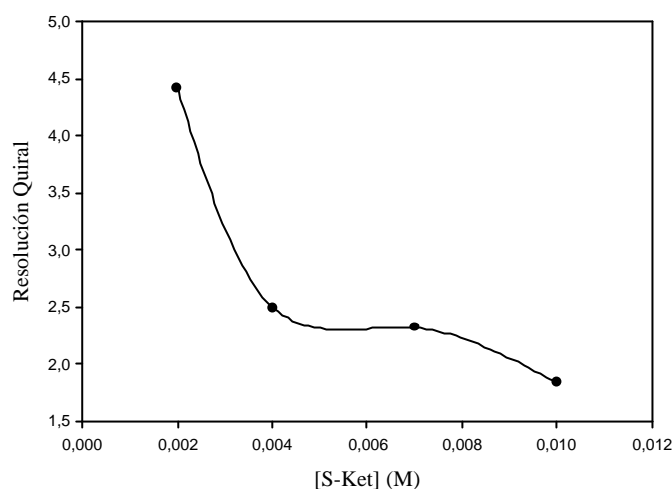
Por tanto, con el fin de reducir el límite de detección del enantiómero minoritario, se ha hecho uso de capilares de camino óptico extendido y la detección se ha llevado a cabo a 198 nm donde los analitos presentan una alta absorbancia. El límite de detección se estima a partir de los parámetros de la recta de calibrado para el analito en cuestión a bajas concentraciones.

La concentración máxima del enantiómero que puede ser inyectada ( $C_{Maj}^{Max}$ ) se determina en cada caso de forma ligeramente diferente. En el caso de la determinación de la pureza enantiomérica de la levodopa, se observó que a concentraciones elevadas de este analito, el pico aparece con cola y con pequeños picos adicionales que impiden la determinación de la dextrodopa. Se inyectaron disoluciones de levodopa en el intervalo 10-50 mM y los resultados mostraron que estos problemas son evidentes a partir de 10 mM por tanto se toma este valor como  $C_{Maj}^{Max}$ . Estos problemas han sido reportados en la literatura y son debidos a problemas de adsorción y sobrecarga del capilar<sup>33</sup>. La tabla 5.7 resume los límites de detección, los valores de  $C_{Maj}^{Max}$  y los RLD calculados en las diferentes determinaciones de purezas enantioméricas realizadas en esta tesis.

El RLD la determinación de la impureza de dextrodopa que acompaña a la levodopa se ve afectado por el orden de migración desfavorable de los enantiómeros ya que la impureza migra después del enantiómero mayoritario y se ve afectada por la cola del pico de levodopa. Parece por tanto, que la situación inversa, es decir la determinación de la impureza de levodopa que contiene la dextrodopa del suministrador debiera poseer un RLD menor. Efectivamente, en este caso obtenemos un límite de detección para la levodopa similar (como era esperable) mientras que el valor de  $C_{Maj}^{Max}$  se puede aumentar hasta 80 mM. Este valor es la solubilidad máxima hallada para la dextrodopa y no aparecen problemas de falta de resolución o interferencias.

Esta situación es similar a la hallada cuando se quiere determinar la impureza de R-Ketoprofeno que contiene una formulación oral de S-Ketoprofeno. En este caso, el orden de migración es más favorable porque el distómero migra antes que el eutómero. El valor de  $C_{Maj}^{Max}$  se determina preparando mezclas sintéticas de R-Ketoprofeno a una concentración igual a la de su límite de detección y concentraciones

crecientes de S-Ketoprofeno. La disminución de la resolución entre los dos enantiómeros al aumentar la concentración del activo se representa en la siguiente figura.



**Figura 5.25.** Disminución de la resolución quiral al aumentar la concentración del enantiómero activo. 60mM acético/acetato, pH 5, 75 mM TM-β-CD, 30 kV.

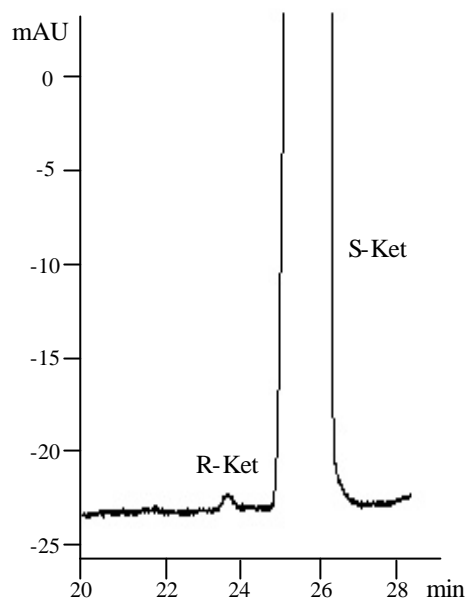
A una concentración de S-Ketoprofeno igual a 10 mM la resolución quiral está próxima a línea base y no se pueden preparar concentraciones superiores por falta de solubilidad del analito. Por tanto, se toma este valor como  $C_{Maj}^{Max}$ . Una vez más no existen problemas de interferencias y el valor de RLD viene limitado por un problema de resolución y de falta de solubilidad del enantiómero mayoritario.

**Tabla 5.7.** Límites de detección relativos (RLD), límites de detección del enantiómero minoritario, concentración máxima inyectable del mayoritario y valor de la impureza enantiomérica (ei) hallada en los diferentes productos analizados.

Determinación	LD <sup>min</sup> (mM) <sup>a</sup>	C <sub>Maj</sub> <sup>Max</sup> (mM)	RLD (%)	EI(%)
Dextrodopa contenida en Levodopa	0.011	10	0.1	0.5
Levodopa contenida en Dextrodopa	0.013	80	0.02	0.05
R-Ketoprofeno contenido en S-Ketoprofeno	0.005	10	0.04	0.1-0.3

Los valores de RLD encontrados en todos los casos son satisfactorios ya que el valor de la impureza quiral esperada en las muestras es siempre superior. Por tanto, los métodos desarrollados se aplican a la determinación de la pureza enantiomérica de las muestras reales y los resultados se muestran en la tabla

5.7. A modo de ejemplo se muestra el electroferogramas obtenido en el análisis quiral de la formulación oral de S-Ketoprofeno.



**Figura 5.26.** Impureza de R-Ketoprofeno en la solución oral de S-Ketoprofeno. Ver figura 5.32 para condiciones experimentales.

Este último método de análisis ha sido aplicado a muestras sometidas a un estudio de estabilidad. Este estudio debe realizarse previamente a la comercialización del fármaco y su objetivo es determinar el periodo de vida útil y proponer las mejores condiciones de almacenamiento del fármaco<sup>34</sup>. Las muestras del test se someten a diferentes condiciones de humedad, temperatura y luz con el objetivo de acelerar posibles reacciones de degradación. En este caso concreto, la finalidad del estudio es demostrar que no se produce ninguna inversión de configuración del S-Ketoprofeno de tal manera que el porcentaje del distómero se mantiene siempre inferior al 1% que es el porcentaje máximo de R-Ketoprofeno aceptado en la industria farmacéutica.

El análisis de las muestras incluidas en el test en condiciones aquirales y quirales muestra que el contenido de Ketoprofeno total se mantiene estable con el tiempo y que el tanto por ciento de impureza enantiomérica se mantiene entre el 0.1-0.3 %. El método propuesto ha sido validado siguiendo la metodología explicada en el punto 5.3.2 para poder ser usado en la industria como método alternativo al HPLC quiral que no puede ser aplicado en esta formulación oral debido a la interferencia de un excipiente (aroma de menta) en las condiciones de separación propuestas para HPLC.

## Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Reiss, D., Gygax, H., Kramer, JB., Canonica, S. *Environ Sci Technol* . 1997, 31, 1754-1760.
- <sup>2</sup> Hoigné, J., Kaschig, J., Kramer, JB., Canonica, S. *Environ Sci Technol*.1996, 30, 2227-2234.
- <sup>3</sup> March, J. Reactions. In: *Advanced Organic Chemistry*. 1985. John Wiley, 3<sup>a</sup> Ed., 1063-1065.
- <sup>4</sup> Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann E., Widmer M.H. *Anal. Chem*. 1991, 63, 1541-1547.
- <sup>5</sup> Nishi, H., Terabe, S. *J. Chromatogr A*. 1996, 735, 3-27.
- <sup>6</sup> Nishi, H. *J. Chromatogr A*. 1996, 735, 57-56.
- <sup>7</sup> British Pharmacopoeia. Vol. II, 1993, 753-755.
- <sup>8</sup> Mark Green, J. *Anal. Chem*. 1996, 68,305A-309A.
- <sup>9</sup> IUPAC recommendations. *Pure & Appl.Chem*. 1995, 67(4), 1699.
- <sup>10</sup> IUPAC,ISO & AOAC Int. *Pure & Appl.Chem*. 1995, 67(4), 649
- <sup>11</sup> The Fitness for Purpose of Analytical Methods-a laboratory guide to method validation and related topics. [www.vtt.fi/ket/eurachem/publications.htm](http://www.vtt.fi/ket/eurachem/publications.htm), 1998.
- <sup>12</sup> Guidance for the industry.Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.ICH, 1996.
- <sup>13</sup> Wan, H., Blomberg, L.G. *Electrophoresis*. 2000, 21,1940-1952.
- <sup>14</sup> Wren, S.A.C., Rowe, R.C. *J.Chromatogr. A*.1992, 603, 235.
- <sup>15</sup> Easton, C.J., Lincoln, S.F. *Chem. Soc. Rev*. 1996, 163-170.
- <sup>16</sup> Godel, h., Weinberger, R. Chiral Reconition Capillary Electrophoresis with Cyclodextrins. Hewlett-Packard Application note. 1995, publication number 12-5963-5502E.
- <sup>17</sup> Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., Pérez-Maseda, C. *J.Chromatogr A*. 1998, 793, 165-175.
- <sup>18</sup> Guttman, A. *Electrophoresis*.1995, 16, 1900.
- <sup>19</sup> Valko, I.E., Billiet, H.A.H., Frank, J., Luyben, K.Ch.M.A. *J.Chromatogr A*. 1994, 678, 139.
- <sup>20</sup> Kuhn, R. *Electrophoresis*. 1999, 20, 2605-2613.
- <sup>21</sup> Gassmann, E., Kuo, J., Zare,R. *Science*. 1985, 230, 813-814.
- <sup>22</sup> Desiderio, C., Aturki, Z., Fanali, S. *Electrophoresis*. 1994, 15, 864-869.
- <sup>23</sup> Camilleri, P. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2322-2330.
- <sup>24</sup> Armstrong, D.W., Nair, B.U. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2331-2342
- <sup>25</sup> Sutton, R.M.C., Sutton, K.L., Stalcup, A.M. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2297-2304.
- <sup>26</sup> D'Hulst,A., Verbeke,N.*J.Chromatogr*. 1992, 608, 275-287.
- <sup>27</sup> Stalcup, A.M, N.M.Agyei. *Anal.Chem*. 1994, 66,3054-3064.
- <sup>28</sup> Wan, H., Schmidt, S., Carlsson, L., Blomberg, L.G. *Electrophoresis*. 1999, 20, 2705-2714.
- <sup>29</sup> Schutzner,W., Fanali, S. *Electrophoresis*. 1992, 13, 687-690.
- <sup>30</sup> Chankvetadze, B. *Trend Anal Chem*. 1999, 18, 485-498.
- <sup>31</sup> Altria, K.D. *Chromatographia*. 1993, 35, 493-496.
- <sup>32</sup> Blaschke, G., Chankvetadze, B. *J.Chromatogr A*. 2000, 875, 3-25.
- <sup>33</sup> Fillet, M., Bechet,I., Chiap, P., Hubert, P., Crommen, J. *J. Chromatogr. A*. 1995, 717, 203-209.
- <sup>34</sup> ICH topic Q1A.Stability testing guidelines. ICH, 1995.



## 6. Conclusiones

De los trabajos incluidos en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales divididas para una más fácil comprensión según las diferentes problemáticas abordadas.

Las conclusiones más relevantes de los trabajos relacionados con la estabilidad del blanqueante óptico frente al hipoclorito son:

- La CE, en su modo capilar de zonas, se muestra como una técnica adecuada para seguir el proceso de oxidación de un blanqueante óptico con el hipoclorito e identificar los productos de reacción. La información generada por esta técnica junto con la de otras técnicas espectrofotométricas (UV-Vis y fluorescencia) permite proponer un esquema global para el proceso de oxidación coherente con la evolución de especies observadas.
- El proceso de oxidación del blanqueante implica varias etapas, unas de las cuales está catalizada por metales de transición y puede ser inhibida mediante el uso de un agente quelatante adecuado.
- Los productos finales de la oxidación son las especies fruto de la rotura oxidativa del doble enlace estilbénico y no se han obtenido evidencias de la formación de productos clorados perjudiciales para el medioambiente.

De los trabajos relacionados con la separación y análisis de alquilxantinas se concluye que:

- La electroforesis capilar de zonas no puede resolver una mezcla de ocho alquilxantinas debido a la presencia de xantinas neutras e ionizables en la mezcla. La resolución de la mezcla mejora con la adición al BGE de un tensioactivo (MEKC) o de una ciclodextrina cargada (CD-EKC).
- La cromatografía electrocinética micelar (MEKC) con ácido taurodeoxicólico permite la resolución completa de la mezcla y menores tiempos de análisis que MEKC con dodecilsulfatosódico o CD-EKC con carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina.

- El método desarrollado para el análisis de algunas alquilxantinas en fármacos es adecuado para determinar el contenido medio de los analitos en el lote pero también la uniformidad de contenido. La buena resolución obtenida, los cortos tiempos de análisis y la generación mínima de residuos son características del método que lo convierten en una alternativa ventajosa frente a otras técnicas convencionales.

La aplicación de la técnica a las separaciones quirales y determinación de excesos enantioméricos permite concluir que:

- La CE es una técnica muy versátil para la separación de compuestos quirales debido a la gran cantidad de selectores quirales disponibles cuya elección se realiza mediante pruebas de ensayo y error. Se desarrollan criterios relacionados con el tamaño, naturaleza eléctrica y presencia de algunos grupos funcionales o subestructuras en el analito que facilitan en gran medida esta selección.
- La elevada resolución quiral conseguida mediante CE permite determinar excesos enantioméricos elevados en productos farmacéuticos. No obstante también es necesario una sensibilidad suficiente y ambos parámetros deben evaluarse de forma conjunta.
- Se propone un límite de detección relativo que tiene en cuenta el límite de detección del método para el enantiómero minoritario y la concentración máxima del mayoritario que puede acompañarle sin que aparezcan problemas de resolución, interferencias o solubilidad y que expresa la impureza enantiomérica mínima detectable con el método propuesto.
- Los resultados encontrados en la determinación del exceso enantiomérico del Ketoprofeno haciendo uso de una ciclodextrina y de la Dopa utilizando un éter corona quiral demuestran que si la resolución, sensibilidad y orden de elución de los enantiómeros ha sido optimizada pueden determinarse impurezas enantioméricas inferiores al 0.1%.

De todo lo anterior se deduce, que la CE es una técnica válida para desarrollar métodos de análisis para compuestos de interés en el campo medioambiental y farmacéutico. En este último, la CE es adecuada para realizar ensayos habituales en el control de calidad de preparados farmacéuticos como: determinación de principios activos y impurezas relacionadas, determinación de la uniformidad de contenido o estudios de estabilidad. La CE es una técnica complementaria a la cromatografía de líquidos porque su criterio de separación es diferente al de esta y por tanto puede resultar exitosa en análisis complicados de llevarse a cabo mediante HPLC.

## STUDY OF THE STABILITY OF A STILBENE-TYPE FLUORESCENT WHITENING AGENT AGAINST HYPOCHLORITE

**Key Words:** optical brighteners, fluorescent whitening agent, detergent industry, complexating agents, fluorescence.

M. Blanco\*, L. Jiménez and I. Valverde

Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.

### **ABSTRACT**

*E,E*-[4,4N-*bis*(2-sulfostyryl)biphenyl] (DSBP) is a stilbene-type fluorescent whitening agent (FWA) widely used by the textile and detergent industries. UV and fluorescence spectrophotometries were used to examine its stability against hypochlorite, which may restrict its use and may have an adverse environmental impact because a considerable fraction of the FWA used during the washing process remains in the washing liquor and is discharged to the sewers. The degradation of this whitening agent is shown to be catalysed by several transition metal ions usually present in tap water. The catalytic effect decreases in the following sequence among the metal ions tested:  $\text{Fe}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} \bullet \text{Fe}^{3+}$ . The addition of an appropriate chelating agent such as Dequest® 2006 [diethylenaminepenta(methylenephosphonic) acid] in a 20:1 mole ratio completely inhibits the process; by contrast, other complex-forming agents such as EDTA accelerate it.

## **INTRODUCTION**

Fluorescent whitening agents (FWAs), also called optical brighteners, are fluorescent organic compounds of hydrophilic nature with a natural affinity for various substrates. These agents are used to obtain whiter, brighter fabrics, paper and plastics. They act by absorbing invisible light from the UV region and emitting it as light of a longer wavelength in the visible spectral region [1]. This ability to absorb UV light also makes them good candidates to photochemical transformation [2,3].

FWAs in general and stilbene-type agents in particular have been used by the textile and detergent industries since the 1940s. These optical brighteners possess one or two stilbene double bonds and are commercially available only in the *E* or *E,E* forms those with two double bonds as the other isomers exhibit little or no fluorescence.

The textile industry uses FWAs for optical brightening; the procedure involves immersing the fabric in a hot bath containing an appropriate agent. The brightener is adsorbed on the fabric via hydrophobic interactions and van der Waals bonds. In the detergent industry, FWAs and surfactants are universal ingredients of virtually all types of formulations. FWAs are currently being used in large amounts; in fact, the detergent industry alone used more than 20000 tons of stilbene-related brighteners in 1990 [4]. FWAs are added to detergent formulations in a proportion about 0.3% by weight in order to recover the fraction of FWA that is photodegraded with use of the fabric or washed out from the fibres during the washing process.

Hypochlorite is an oxidant for household and industrial use. In dilute solutions, it possesses destaining, deodorant, bleaching and disinfectant properties. Despite its widespread use, hypochlorite is an unstable oxidizing anion that decomposes via two different pathways, namely: disproportionation into chloride and chlorate ions, and decomposition into chloride ion and oxygen. These reactions are favoured by the presence of metal traces, high temperatures and sunlight [5].

The instability of FWAs against hypochlorite restricts the joint or successive use of the optical brightener and bleach. The two can concur in a washing bath provided a bleaching step is included in the process or the bleach is directly applied as a stain remover over the fabric. Consequently, the joint use of an FWA and a bleach can lead to a loss of white colour through degradation of the latter. In addition, one should bear in mind the problems posed by the products resulting from the degradation reaction between the brightener and the bleach. On the one hand, adsorption of the products by the fabric can lead to yellowing with the successive use of bleach; on the other, if the products are removed in the washing water [6], they can have a potential adverse environmental impact due to the small amounts of chlorinated organic compounds that are formed when hypochlorite reacts with organic compounds [7]. For these reasons, the action of hypochlorite on FWAs is an important issue for the detergent industry.

*E,E*-[4,4N-bis(2-sulfostyryl)biphenyl] (DSBP) is a FWA of the stilbene family with a high affinity for cotton and polyamide; it has a strong whitening effect and is more stable against hypochlorite than are all other stilbene-type optical brighteners. Its current worldwide consumption exceeds 3000 tones per year.

In this work, the stability of DSBP against hypochlorite in the presence and absence of metal ions was studied, and ways to avoid the resulting degradation were examined. Two spectroscopic techniques, fluorimetry and UV–Vis spectrophotometry, were used for this purpose. The high selectivity of the fluorimetric technique allowed changes in *E,E*-DSBP to be monitored with no interference from degradation products or hypochlorite. On the other hand, UV–Vis spectrophotometry was used as an available tool to obtain general, expeditious information in preliminary experiments.

## **EXPERIMENTAL SECTION**

### **Reagents and materials**

The optical brightener *E,E*-[4,4N-*bis*(2-sulfostyryl)biphenyl] (DSBP) was supplied by Ciba–Geigy AG in 82% purity and contained the inorganic salts used in its precipitation.

Experiments with metals involved the following salts: iron(III) nitrate, iron(II) ammonium sulphate, manganese(II) sulphate monohydrate and copper(II) sulphate pentahydrate; the first three were purchased from Merck and the last from Carlo Erba, all in pro-analysis grade.

Experiments with chelating agents involved the use of . EDTA (pro-analysis, Panreac), dipicolinic acid (99% pure, Aldrich), amino(*tris*methylenephosphonic) acid *N*-oxide (SequionCLR<sup>®</sup>, Giovanni Bozzetto), diethyleneaminepenta(methylenephosphonic) acid sodium salt (Dequest<sup>®</sup> 2066, Giovanni Bozzetto) and hydroxyethanediphosphonic acid (Dequest<sup>®</sup> 2010, Monsanto). Hypochlorite solutions were prepared by dilution of commercially available bleach the content of which in the anion was previously determined by redox titration with potassium iodide and sodium thiosulphate. Pro-analysis sodium carbonate (Merck), adjusted to pH 9 with HCl, was used as buffer. Milli-Q water from a Millipore water purifying system was employed throughout.

### **Apparatus**

The degradation process was monitored by using a Hewlett–Packard 8452A UV–Vis spectrophotometer, a flow-cell of 1 cm light path and a peristaltic pump. Fluorescence measurements were made on a Perkin Elmer LS50 fluorimeter, using a continuous system including a peristaltic pump, a Hellma fluorimetric flow-cell of 1 cm light path and a 30% beam attenuator at the detector entry.

## **Procedure**

Changes in the optical brightener fluorescence during its degradation with hypochlorite were monitored by using a continuous system through which a DSBP solution kept in the dark under constant stirring was propelled by the peristaltic pump to the flow-cell for measurement. The fluorescence of the solution was excited at 348 nm and the emission measured at 430 nm. The solution reaching the fluorimeter always contained the optical brightener, the metal and/or the chelating agent. This solution was allowed to circulate for 1000 s of hypochlorite, during this period of time the initial fluorescence measurement was made, at this moment the hypochlorite was added and the fluorescence decay with time was recorded. In order to avoid using too dilute DSBP solutions, the brightener possesses very strong fluorescence, a 30% beam attenuator was placed at the detector entry. The same continuous assembly was used to monitor the degradation process by UV-Vis spectrophotometry.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **UV-study of DSBP degradation**

A solution containing 50 mg/ml DSBP buffered at pH 9 with sodium carbonate was prepared and its UV-Vis spectrum recorded. A hypochlorite volume was then added to obtain a tenfold concentration in this anion and spectral changes in the solution with time were monitored. Figure 2 shows the initial spectrum for DSBP, which exhibits an absorption maximum at 348 nm; as can be seen, the addition of hypochlorite gives rise to a band (shoulder) at 290 nm (the absorption maximum of hypochlorite). With time, the absorption maximum of DSBP gradually shifts to shorter wavelengths and decreases in intensity. Within 24 h, the absorption band disappears and a new band peaking at 280 nm is observed. This reveals the instability of DSBP against hypochlorite and suggests the formation of new species.

The effect of pH on the rate of DSBP degradation was also studied. For this purpose, DSBP solutions of pH 8.3, 9.1 and 10.0 were used. The addition of the hypochlorite volume needed to obtain a 40 ppm concentration in it revealed the absence of significant changes in degradation rate at the three pH values studied. All subsequent experiments were thus carried out at pH 9.

Replicate experiments in the presence of metal traces were performed in order to determine whether the transition metals most frequently encountered in washing water caused any change in the rate of DSBP degradation. The three metals tested (Fe, Cu and Mn) led to the same final spectrum (Fig. 2); however, an increase in degradation rate was observed.

Iron(II) was found to be the most highly active metal in this respect: the spectrum obtained after 30 min in its presence was identical with that recorded after 24 h in its absence; this suggests a catalytic effect of the metals on the degradation of the optical brightener with hypochlorite.

The brightener photodegradation was also studied under identical conditions in the absence of hypochlorite. The UV-Vis spectrum for a DSBP solution buffered at pH 9 and exposed to light changed very similarly to that obtained in the presence of hypochlorite; the absorption at 348 nm decreased and the spectrum shifted to shorter wavelengths. However, the last spectrum, recorded 2 months after the solution was prepared, exhibited no well-defined maximum but only a broad band between 240 and 380 nm probably due to the presence of various intermediate species. No change in DSBP photodegradation rate with light was observed upon addition of the above-mentioned transition metals to the solution. In summary, these experiments suggest that DSBP is much more rapidly degraded by hypochlorite than by light; the former process is catalysed by the transition metals studied, the presence of which does not seem to affect the photodegradation rate of the optical brightener.

### **Fluorimetric study of DSBP degradation**



All experiments in this context were conducted by using the assembly described in the Experimental Section. In order to establish the best operating conditions, a 10 ppm solution of DSBP buffered at pH 9 was prepared and its excitation and emission spectra recorded; the excitation maximum appeared at 348 nm coinciding with the absorption maximum of DSBP and the emission maximum at 430 nm.

A buffered solution containing 10 mg/l DSBP at pH 9 was used to monitor the fluorescence intensity (with excitation at 348 nm and emission at 430 nm) prior to and after the addition of hypochlorite. The fluorescence loss observed upon addition of hypochlorite again testifies to the degradation of DSBP. Similar experiments conducted in the presence of the above-mentioned transition metals, added to the brightener solution, showed the degradation process to develop at a higher rate. The possibility of metal ions quenching the fluorescence of the FWA without actually causing degradation has been discarded because of the initial fluorescence measurement ( first 1000 seconds ). This measurement showed clearly that in all the experiments with or without metals the same fluorescence intensity is obtained for a solution of DSBP containing metals or not, as it can be seen in figure 3. Only when the hypochlorite was added a loss of fluorescence occurred.

The rate of DSBP degradation by hypochlorite was found to be dependent on the nature of the metal and its concentration. A comparative study of the metals tested showed that, on equal concentration of the metal, DSBP photodegradation was faster in the presence of Fe(II) than in that of Mn(II); on the other hand, Fe(III) and Cu(II) had a less marked, similar catalytic effect. Figure 3 illustrates the catalytic effect of the different metals; as can be seen, the fluorescence starts to decay almost immediately in the presence of 1 mg/l Fe(II).

In order to avoid or minimize this effect, the addition of biodegradable chelating agents forming stable complexes with hypochlorite and exhibiting an acceptable sequestering capacity was tested.

The chelating agent family most widely used by the detergent industry is that of phosphonic acid derivatives, which are proven efficient. In this work, five different agents were tested, three phosphonates (Sequion® CLR, Dequest® 2066 and Dequest® 2010), EDTA and dipicolinic acid. Dequest® 2066 was found to be the agent best stabilizing the fluorescence of DSBP in the presence of all the metals studied ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ ). The fluorescence decay curves for solutions containing Fe(II) and Dequest® 2066 (Fig. 4) were flat, which suggests a strong fluorescence stabilizing effect. These curves were even flatter than those obtained for a DSBP solution containing no metal and no chelating agent so these results reveal that in our experiences metal traces are present in the Milli-Q water, the buffer or the hypochlorite solution itself and catalyse the decomposition of DSBP by hypochlorite. Sequion® CLR provided intermediate results; thus, it stabilized the fluorescence of DSBP but decreased its intensity. On the other hand, Dequest® 2010 proved absolutely inappropriate as the degradation curves obtained in its presence were identical with those recorded for a DSBP solution containing Fe(II) but no chelating agent. This was probably the result of Dequest® 2010 being a poor complex-forming agent for transition metals, even though it is a suitable one for alkaline-earth metals. This behaviour was also observed in the presence of the other metals tested.

However, the addition of EDTA or dipicolinic acid to a DSBP solution containing Fe(II) not only failed to slow down the brightener degradation but rather accelerated it. The oxidation products of EDTA favour degradation of the FWA or quench its fluorescence. This is consistent with the fact that the fluorescence of a DSBP solution containing EDTA but no added metal remained stable in the absence of hypochlorite, the addition of which caused the fluorescence to rapidly decay.

A similar experiment conducted with dipicolinic acid showed it to be quite stable against hypochlorite<sup>8</sup>. Consequently, the increased degradation of DSBP by hypochlorite in the presence of Fe(II) and dipicolinic acid cannot be explained in simple terms.

The optimum chelating agent-to-metal ratio needed to avoid degradation of the brightener was also established. Experiments with Dequest® 2066 revealed that increasing the ratio decreased the fluorescence loss; specifically, a 20-fold molar excess of the chelating agent caused a 10% loss relative to the initial fluorescence (Fig. 5) and higher ratios provided no additional fluorescence stabilization. Experiments conducted in the presence of Fe(III), Mn(II) and Cu(II) revealed these ions to require lower chelating agent-to-metal ratios to achieve the same stabilizing effect; in fact, a 10:1 Dequest® 2066-to-metal ratio proved more than adequate.

Experiments with tap water in the presence and absence of  $10^{-4}$  M Dequest® 2066 revealed that DSBP degradation is inhibited by the chelating agent and that the brightener is in fact degraded in its absence. In figure 6, it can also be seen how the degradation of DSBP with hypochlorite is faster when the FWA is dissolved in tap water than in Milli-Q water. This faster degradation is because of the large amount of metals dissolved in tap water.

## **CONCLUSIONS**

The optical brightener DSBP is degraded by alkaline hypochlorite in the presence of transition metals (Fe, Cu and Mn); the catalytic effect on the process decreases in the sequence  $\text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \gg \text{Cu}^{2+} \bullet \text{Fe}^{3+}$ . The degradation can be avoided by using an appropriate complex-forming agent. Dequest® 2066 was found to be the most efficient of all tested in this respect; in a 20:1 ratio to the metal, it effectively avoids degradation of the brightener.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Henkel Ibérica, S.A. and to Spain's DGICYT (Project PB96-1180) for funding this research. Dr Jürgen Kaschig and Dr Johannes B. Kramer are also gratefully acknowledged for their valuable discussions and kind supply of the reagents.

## **REFERENCES**

1. Kirk- 4, 213, 1978.
2. S.Canonica, J.B. Kramer, J.Hoigné, J. Kaschig.. *Environ. Sci. Technol* **30**, 2227, 1996.  
amer, D.Reiss, H. Gygax, *Environ. Sci. Technol*, **31**, 1754, 1997..  
*Environ. Sci. Technol.*, ,
5. L.W.Smith . Proceedings of the Third World Confer  
and Exhibition on Detergents: Global Perspectives. A. Cohn (Ed.), AOCS Press,  
Champaign, IL (USA).
6. K.D. Bode. *Tenside Deterg* **12**, 69, 1975.
7. R.L. Jolley, J.H. Carpenter, *Water Chlorination: Enviromental Impact and Health E*  
4, *Book 1*, Chemistry and Water Treatment, Ann Arbor Science, Ann Arbor, 1981.
8. European Patent Application, Publication No. 0 653 482 A1, 1993..

## Figure 1

# DEGRADATION OF A STILBENE-TYPE FLUORESCENT WHITENING AGENT WITH HYPOCHLORITE. IDENTIFICATION OF THE DEGRADATION PRODUCTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

M. Blanco, L. Jiménez, and I. Valverde

*Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Facultat de Ci  
-08193 Bellaterra, Spain.*

*E-mail: [marcel.blanco@uab.es](mailto:marcel.blanco@uab.es)*

## ABSTRACT

E,E-[4,4'-bis(2-sulphostyryl)biphenyl] (E,E-DSBP) is a fluorescent whitening agent (FWA) of wide use in textile and detergent industries to whiten fabrics. When hypochlorite is used to bleach fabrics, DSBP is oxidized slowly at room temperature and at a higher rate at 60°C. In the presence of metal ions such as Fe, Cu, Mn the oxidation is highly accelerated. This oxidation at ambient temperature results from the cleavage of the stilbene bonds and involves the formation of several intermediates that evolve to form the final products. These intermediates form within minutes to hours at ambient temperature and the final products form within months, while at 60°C or in presence of the above transition metals, intermediates form within minutes and the final products within days. The final products of the oxidation are 4-sulphobenzaldehyde and 4,4N-bisaldehyde biphenyl and in an excess of hypochlorite their corresponding oxidized derivatives 4-sulphobenzoic acid and 4,4N-biphenyldicarboxylic acid. Despite the chlorinating ability of hypochlorite, the major degradation products formed are non-chlorinated.

*Keywords: Bleach, hypochlorite, detergent, fluorescent whitening agent, chlorinated*

*organics.*

## **Introduction**

Fluorescent whitening agents (FWAs), also called optical brighteners, used in detergents are organic water soluble compounds with a high affinity for cellulosic material. FWAs act by absorbing ultraviolet light and emitting visible light in the blue region [1]. This offsets natural yellowing in materials such as fabric, paper and soap and provides superior whites. However, the ability to absorb short-wavelength light also makes them good candidates for undergoing photochemical transformations [2,3].

FWAs contained in detergents at an average concentration of about 0.15% by weight serve to replace the textile FWAs, which are photodegraded during wearing or washed out during the washing process. Depending on the type of the FWA, the detergent composition and the washing temperature, a variable proportion of the optical brightener in the detergent from 20 to 95% is not adsorbed by fabrics and is then discharged with the wash liquor yielding sewage treatment plants. FWAs are partly retained by waste water purifying systems; a fraction, however, reaches natural waters and poses potential environmental hazards [4]

4,4'-Bis(2-sulphostyryl)biphenyl (DSBP) is a stilbene-type FWA commonly used in household detergents. In fact, DSBP world wide production in 1992 was estimated in 3000 t/year and is commercially available in its E,E form as the other isomers exhibit little or no fluorescence. DSBP, like the others stilbene-type optical brighteners, undergo degradation to a variable extent upon exposure to light or hypochlorite.

In fact, the photodegradation of DSBP has been studied since early seventies and

is still under evaluation [5,6]. The kinetics [7] and mechanism of photodegradation of DSBP in natural waters [8], suspension [9] and on metal oxides [10] have been reported. The photolysis of DSBP mainly leads to aldehydes formed upon cleavage of the stilbene groups and to alcohols from the addition of water to the stilbene double bond [6]. In, all these studies the presumption has been made that DSBP is discharged to the aquatic environment without any conversion.

Hypochlorite for domestic use (bleach) is a diluted solution (about 5% in weight) widely used as disinfectant and stain removal. It is known the ability of hypochlorite to yield chlorinated organic products, recently several studies have reported that about 3% of sodium hypochlorite in household use is converted into chlorinated organics [11,12].

In a previous study [13], DSBP was found to be in fact oxidized slowly by hypochlorite (compared with other stilbene-type FWAs) and in a higher rate in the trace presence of some transition metals such as Fe,Cu, Mn usually present in the tap water used in the washing process. It was also substantiated that this reaction can be avoided with the use of a suitable chelating agent. This oxidation is very likely to occur due to the successive use of detergent and bleach is a very common way of washing white fabrics. This oxidation starts during the washing process and may continue in waste waters. Taking into account the chlorinating ability of hypochlorite and the toxicity of chlorinated organics precisely identifying the degradation products and establishing the mechanism of the reaction can be of environmental significance. This degradation is also an important issue for the detergent industry because it leads to a loss of whiteness and the adsorption of the degradation products of the FWA by the fabrics can lead to yellowing [14].



In this work the aim was to identify the degradation products that have never been elucidated and the mechanism of reaction between DSBP and hypochlorite in presence and absence of metals in order to clarify the chemistry involved. Separation of the degradation products was possible by capillary zone electrophoresis (CZE) due to the negative charge present in the molecule.

## **Experimental section**

### *Reagents*

The optical brightener *E,E*[4,4*N*-*Bis*(2-sulphostyryl)biphenyl] (*E,E*-DSBP), its *E,Z* and *Z,Z* isomers, 2-sulphobenzaldehyde (aldehyde 1), 4,4*N*-bisaldehyde biphenyl (aldehyde 2), 2-sulphobenzoic acid (acid 1), 4,4*N*-biphenyldicarboxylic acid (acid 2) and 3-benzaldehyde-2*N*-sulphonic acid stilbene were supplied by Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland) and used as received. The purity of all was greater than 95%; by exception, the *E,E*-DSBP isomer was only 82% pure and accompanied by the inorganic salts used to precipitate it.

Ammonium iron(II) sulphate, sodium tetraborate and sodium carbonate (all pro-analysis reagents from Merck) were also used. Milli-Q water from a Millipore Water Purification system (Millipore, Molsheim, France) was used throughout.

### **Apparatus**

Electrophoretic separations were conducted on a <sup>3D</sup>Capillary Electrophoresis instrument from Hewlett–Packard (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector, an autoinjector and a capillary thermostating. Samples were injected in the hydrodynamic mode, using a pressure of 50 mbar on the injection vial for 5 s. Direct polarity (with the cathode next to the detector) was used throughout and electropherograms were recorded

m internal diameter fused silica capillary thermostated at 25 EC. A 20 mM sodium tetraborate solution adjusted to pH 9.3 with NaOH 0.1M was used as background electrolyte and a voltage of 30 kV was applied between both capillary ends. All pH measurements were made with a microPH 2001 pH-meter from Crison (Alella, Spain).

Fluorescence measurements were made on a Perkin Elmer LS50 fluorimeter, using a continuous system consisting of a peristaltic pump, a Hellma flow-cell of 1 cm light path and a 30% beam attenuator at the detector gate. The sample, under continuous stirring in the dark, was propelled to the measuring cell, where its fluorescence was excited at 348 nm and its emission measured at 430 nm. The beam attenuator was used in order to avoid using too dilute DSBP solutions (the brightener possesses very strong fluorescence).

### **Procedure**

Solutions containing 112 mg/l of *E,E*-DSBP and different amounts of hypochlorite with and without iron (II) were kept at room temperature or at 60 EC as required, away from light in order to avoid photodegradation. Several aliquots of these solutions were withdrawn at different times after preparation and injected into the electrophoretic capillary system which was previously conditioned by passing the background electrolyte for 10 min and equilibrated with an applied potential of 30 kV for 10 min. After each separation, the capillary was reconditioned by passing 1 M NaOH for 5 min and then 0.1 M for a further 10 min. Degradation products were identified by comparing the spectra and migration times of the peaks with those for pure standards.

For the experiments conducted with the fluorescence assembly, solutions containing 10 mg/l of DSBP buffered with sodium carbonate at pH=9 and 1 mg/l of the transition metal were used. This solution was allowed to circulate for 1000 seconds without hypochlorite, during which the initial fluorescence measurement was made; at that moment the hypochlorite was added and the fluorescence decay with time was recorded.

## **Results and discussion**

Preliminary experiments were carried out, monitoring the UV spectra of DSBP solutions exposed to hypochlorite buffered at pH 9 (washing baths are normally alkaline). The UV spectra of a DSBP solution (see figure 1) showed an absorption maximum at 348 nm that when hypochlorite was added gave rise to a band at 290 nm (UV maximum of hypochlorite). This spectrum evolved until the band of DSBP disappeared and a new band peaking at 280 nm was observed. These changes revealed the instability of DSBP against hypochlorite and suggested the formation of new species..

The initial tests in order to identify the oxidation products of DSBP with hypochlorite involved preparing a solution of 50 mg/l of DSBP and 50 mg/l of NaClO (molar ratio 1:6.5, pH 9) that was stored at room temperature. Aliquots of this solution were injected into the capillary electrophoresis system on different days over a 3-month period (results not shown). These tests revealed that the oxidation of DSBP involves the formation of several intermediates that evolves very slowly. However, we succeeded in identifying the derivatives aldehyde 1 and aldehyde 2 among other degradation intermediates. In order to expedite the process, we subjected the sample to accelerate aging by storing it at 60 EC in a stove. This increased temperature resulted in significantly simpler electropherograms than those obtained at room temperature and in a faster evolution of the intermediates.

Two degradation tests at 60 EC in the absence of light and metals were then performed: one at a 1:8 DSBP/hypochlorite molar ratio (112 mg/l of DSBP, 119 mg/l NaClO) and the other at a 1:24 one (112 mg/l of DSBP, 357 mg/l NaClO).

The electropherogram obtained for the initial 1:8 DSBP/hypochlorite solution approximately 30 min after preparation exhibited two small peaks (peaks 1,2) and three overlapped peaks (Figure 2) that were assigned to the initial brightener (E,E-DSBP), and two intermediate species with maximum absorption at 270, 320 nm. Afterwards, the species with maximum absorption at 320 nm, which was designated *intermediate I*, evolved to form that one with the UV maximum at 270 nm (*intermediate II*). Subsequent electropherograms (Figure 3) showed that the *intermediate II* also evolves and yields the derivatives aldehyde 1 and aldehyde 2 which were then partially oxidized to their corresponding acid derivatives (acid 1 and acid 2). No changes in these species was apparent from electropherograms recorded at longer times.

Degradation test in the presence of large excess hypochlorite revealed the formation of *intermediate II* to be much faster. The freshly prepared solution gave a main peak corresponding to *intermediate II* and weak signals corresponding to residual amounts of the E,E-DSBP and *intermediate I*. Subsequent electropherograms revealed that the degradation end products were the acid derivatives, accompanied by residual amounts of the aldehyde derivatives. However, a third minor species with maximum absorption at 236 nm and a migration time of 13 min was detected after one week that could not be identified. This species was only observed when the acid derivatives were present in solution.

These results show that the degradation rate depends on the hypochlorite

, for each identified species as a function of the time from preparation of the DSBP/hypochlorite solution. This corrected area is calculated by dividing integrated peak area by migration time in order to correct artificially changes in the peak area caused by different residence times of each analyte in the detection region. The evolution of E,E-DSBP has not been plotted because in both cases the oxidation of DSBP to *intermediate II* is almost complete in 30 minutes and this oxidation rate was still faster for the mixture with a excess of hypochlorite. *Intermediate I* and *II* are the initial species formed in the oxidation of DSBP with hypochlorite. The subsequent formation of aldehydes and acids is very unlikely to occur in waste waters because this oxidation is very slow at ambient

with Cu(II) and Fe(III). Note that fluorescence decay is only observed when hypochlorite is added to the solution containing DSBP and the metal. Therefore this decay can not be attributed to a metal quenching effect but to degradation of the FWA. These metals are present in the tap water used in a household laundry and then their effect on the product formation was studied.

When capillary electrophoresis is used to follow changes in a 1:8 DSBP/hypochlorite mixture containing 5 mg Fe<sup>2+</sup>/l, the above-mentioned catalysis is shown by the rapidly formation of intermediate II (probably preceded by the formation of intermediate I) which is responsible for the nearly instantaneous fluorescence decay

observed when a solution of DSBP and Fe(II) is supplied with hypochlorite. Subsequent electropherograms revealed that the room-temperature oxidation of this intermediate species is slower (only residual amounts of the aldehyde derivatives were found after one week) than in the degradation processes conducted at 60°C in the absence of metal. Therefore, the metal catalyzes the formation of *intermediate I* and *II* but plays no catalytic role in its subsequent oxidation. When the Fe(II)-containing solution was stored in a stove at 60 EC, the process led to the same end products as in the absence of metal.

### **Mechanism for the degradation of the brightener by hypochlorite**

The above described CZE experiments confirmed that the proposed aldehyde and acid derivatives are the end products of the oxidation of DSBP by hypochlorite. This oxidation takes place via a process that involves the formation of two intermediate species (*intermediate I and II*). Based on the UV and fluorescence spectroscopic results, and on the CZE migration times, we put forward a tentative structure for these species. We think *Intermediate I* and *II* are formed by epoxidation of the stilbene double bonds (via chlorohydrin and subsequent internal cyclization), the resulting epoxide undergoing opening in the alkaline medium to yield a vicinal diol. These reactions of hypochlorite and double bonds are well known and previously described [16]. In fact, peaks 1,2 in figure 2 can be assigned to residual epoxide derivative. These very small peaks might correspond to the two diastereomers potentially formed in the epoxidation of the double bonds depending on whether the electrophilic attack of Cl takes place on the same or opposite sides of the double bonds. The absorption maximum (similar to that for *intermediate II*) is consistent

L of hypochlorite solution (0.77 g/l) corresponding to one-half of the DSBP molar content. In these conditions CZE confirms that intermediate II is the specie instantaneously formed (the formation of intermediate I is so fast that is not detected). The fluorescence decayed abruptly after each addition and was very weak beyond the fourth (at a DSBP/hypochlorite ratio of 2:1); this indicates that virtually the whole brightener had reacted by that time and confirms the reaction of the two double bonds and the need for two hypochlorite molecules to form *intermediate II* (non-fluorescent).

The proposed structure of *intermediate II* is also consistent with the migration time for the species; this possesses the same negative charge as DSBP and a very similar size, so it must have a very similar electrophoretic migration time, as is indeed the case. Its absorption maximum (270 nm) is consistent with the proposed structure taking into account the loss of conjugation for these species: DSBP (348 nm), aldehyde 2 (300 nm), acid 1 (280 nm) and *intermediate II* (270 nm). This loss of conjugation explains why this intermediate is non-fluorescent. Moreover, if we take into account this structure for *intermediate II*, *intermediate I* may be the result of the reaction of only one of the stilbene bond to yield a diol. The UV maximum (320 nm) of *intermediate I* is coherent with the chemical structure when only one of the double bonds has reacted.



The end of the oxidation of DSBP ( aldehyde 2 and aldehyde 1 ) can be readily ascribed to oxidative cleavage of *intermediate II*. These aldehydes are subsequently oxidized to their corresponding acid derivatives by hypochlorite remaining in solution. The proposed species evolution, summarized in Figure 7, is supported by the fact that 8 molecules of hypochlorite are required for the complete oxidation of DSBP to the acid derivatives, consistent with the stoichiometry of eq. (1).

## **Conclusions**

DSBP is oxidated by hypochlorite and the formed products result from the cleavage of the stilbene double bonds. This oxidation is slow at ambient temperature and involves the formation of several intermediates. However at 60°C or in presence of low concentration of transition metals, the oxidation occurs in a high rate and two intermediate species (intermediate I and II) are rapidly formed. This intermediates evolve to form the final products of the oxidation (4-sulphobenzaldehyde and 4,4N-bisaldehyde biphenyl and in excess of hypochlorite their corresponding acids (4-sulphobenzoic acid and 4,4N-biphenyldicarboxylic acid ) are formed. Consequently, despite the chlorinating ability of hypochlorite the major degradation products formed are non-chlorinated.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Henkel Ibérica, S.A., and to Spain's DGICYT (Project PB96-1180) for funding this research. They also wish to thank Drs Jürgen Kaschig and Johannes B. Kramer for their valuable discussion and the kind supply of some reagents.

## REFERENCES

1. Kirk-Othmer Encyclopedia. 1978. 3<sup>a</sup> ed, vol 4: 213-226.
2. Meier H. 1992. Die Photochemie stilbenoider Verbindungen und ihre materialwissenschaftlichen Aspekte. *Angew Chem* 104:1425-1446.
3. Holt L, Milligan B. 1974. Fluorescent Whitening Agents- A survey (1974-82). *Text Res J* 44:181-184.
4. Poiger T, Field JA, Field TM, Giger W. 1996. Occurrence of fluorescent whitening agents in sewage and river water determined by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Environ Sci Technol* 30: 2220-2226.
5. Canonica S, Kramer JB, Reiss D, Gygax H. 1997. Photoisomerization kinetics of stilbene-type fluorescent whitening agents. *Environ Sci Technol* 31: 1754.-1760.
6. Kramer JB, Canonica S, Hoigné J, Kaschig J. 1996. Degradation of fluorescent whitening agents in sunlit natural waters. *Environ Sci Technol* 30: 2227-2234.
7. Kramer JB. 1996. Photodegradation of fluorescent whitening agents in sunlit natural waters. Ph. D Thesis. Swiss Federal Institute of Technology. Zurich. Switzerland. n.11934.
8. Poiger T, Günter Kari F, Giger W. 1999. Fate of fluorescent whitening agents in the

river Glatt. *Environ Sci Technol* 33: 533:539.

9. A.Stoll JM, M. Ulrich M, Giger W. 1998. Dynamic behaviour of fluorescent whitening agents in Greifensee: Field measurements combined with mathematical modeling of sedimentation and photolysis in waters. *Environ. Sci. Technol.* 32:1875-1881.

10. Kesselman-Truttmann JM, Hug JS. 1999. Photodegradation of 4,4'-Bis(2-sulfostyryl)biphenyl (DSBP) on metal oxides followed by in situ ATR-FTIR spectroscopy waters. *Environ Sci Technol* 33: 3171-3176.

11. Ong SK, DeGraeve GM, Silva-Wilkinson RA, McCabe JW, Smith WL. 1996. Toxicity and bioconcentration potential of adsorbable organic halides from bleached laundering in municipal wastewater. *Environ Toxicol Chem* 15(2): 138-143.

12. Smith WL. 1997. Hypochlorite Environmental Safety. Proceedings of the Third World Conference and Exhibition on Detergents: Global Perspectives. A. Cohn Editor, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

13. Blanco M, Jiménez L, Valverde I. 1999. Stability of a stilbene-type fluorescent whitening agent against hypochlorite. *Textil Research Journal* in press.

14. Milligan B, Holt L. 1974. Fluorescent whitening agents. I. Bis-4,4'-(4''-methoxy-6''-phenoxy-s-triazin-2''-ylamino)stilbene-2,2'-disulphonic acid: its photodecomposition in solution and on wool. *Aust J Chem* 27: 195-203.

15. Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien (A.I.S.E) Scientific Dossier. March 1997. Benefits and Safety Aspects of Hypochlorite Formulated in Domestic Products. Chapter 4:56-57.

16. March J. Reactions. 1985. In: *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley, 3<sup>rd</sup> Edition,

1063-1065.