

2.3.3 Sistema de detección

La detección es uno de los mayores retos de la técnica de CE, ya que el reducido diámetro interno de los capilares, la pequeña cantidad de muestra inyectada y el hecho que la detección se realiza en el mismo capilar obliga al uso de detectores sensibles y de respuesta rápida. En la tabla 2.1 se muestran algunas de las técnicas de detección utilizadas en CE, incluyendo algunas ventajas e inconvenientes. El detector UV-Vis con diodos en líneas como elemento fotosensible es el detector más usado debido a su universalidad, bajo coste, rapidez de medida y la gran cantidad de información espectral que genera aunque también presenta el inconveniente de una no elevada sensibilidad.

Tabla 2.1. Sistemas de detección en electroforesis capilar

Técnica	Comentarios
UV-VIS	- Universal - Amplia información espectral con DAD.
Fluorescencia	- Muy sensible - Se requiere fluoróforo o derivatización
Fluorescencia inducida por láser	- Muy sensible - Longitudes de onda disponibles limitadas - Precio elevado
Potenciometría	- Se requiere un electrodo selectivo de iones - Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje - Sensible siempre que no haya iones interferentes
Amperometría	- Altamente sensible y específico - Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje
Espectroscopia de masas	- Precio muy elevado - Interfase entre CE y MS complicada - Sensible y con información estructural

Un aspecto de la detección muy importante en el análisis cuantitativo es el hecho de que el área de pico en CE es función del tiempo de residencia del analito en el detector. Por tanto, es habitual relacionar la concentración del analito con el área corregida por el tiempo de migración. Con esto se consigue

compensar las variaciones de área de pico que se producen debido a la irreproducibilidad de los tiempos de migración.

2.3.3.1 Detección UV-Vis

Este detector, ampliamente usado en HPLC (técnica de la cual has sido adaptado) destaca por su universalidad ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm en el cual trabajan la mayoría de detectores. Además, en el caso de CE este tipo de detectores también puede ser aplicado a compuestos no absorbentes haciendo uso de una detección indirecta. La detección se realiza en el capilar, eliminando parte del recubrimiento de poliimida del capilar. La dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia del pequeño camino óptico que el capilar ofrece. Esto hace que el detector (figura 2.6) tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y para minimizar la luz dispersa que llega al monocromador.



Figura 2.6. Detección en CE mediante un detector de diodos en línea

La utilización de un detector de diodos en línea (DAD) en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas. La luz procedente de la lámpara de deuterio es enfocada en el capilar por medio de un sistema de lentes y tras pasar por el capilar es difractada hacia un detector de diodos en línea, cada uno de los cuales mide un cierto intervalo de longitudes de onda. Las ventajas que presenta el detector de diodos en línea son las siguientes: visualización del espectro UV- visible en todo momento del análisis, obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, identificación de compuestos y determinación de la pureza de pico³.

2.3.3.1.1 Detección directa

Es el modo de detección UV-Vis más usado y consiste en separar analitos absorbentes (con grupos cromóforos) en un BGE poco absorbente. La longitud de onda de referencia se coloca a longitudes elevadas donde ni el analito ni el BGE absorben y la longitud de onda de detección donde el analito absorba.

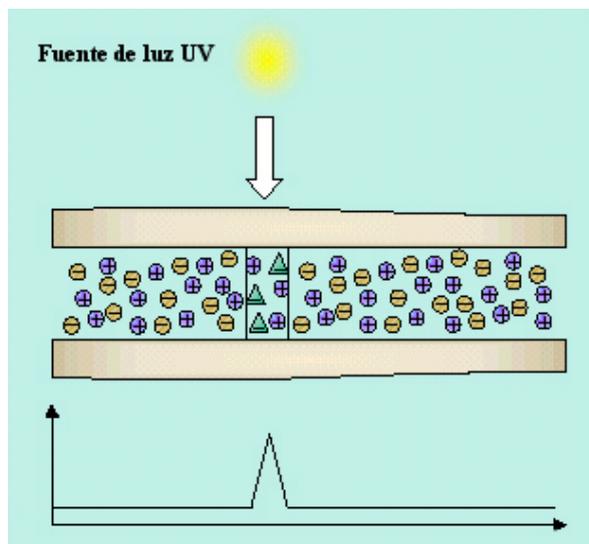


Figura 2.7. Esquema de la detección directa UV-Vis, donde r representa al analito y O los componentes del BGE.

De esta manera, el paso del BGE por el detector da una señal de cero (blanco instrumental) y el paso del analito se registra con una subida de absorbancia (pico positivo). Los BGEs más comunes en este tipo de fotometría se lista en la tabla 2.2. Todos ellos destacan por ser transparentes en la región del ultravioleta de tal manera que la detección por debajo de los 200 nm es posible. Esto palia en parte, la falta de sensibilidad relacionada con el reducido camino óptico (diámetro del capilar) ya que estas longitudes de onda los analitos son muy absorbentes. Existen algunos métodos que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico. Éstos son el uso de iluminación axial en lugar de perpendicular, utilizando una celda de flujo de alta detección o el uso de capilares con camino óptico extendido (capilares de burbuja), en los que el diámetro interno está aumentado de 3 a 5 veces en el punto de detección, sin que esto implique un aumento en la difusión del analito.

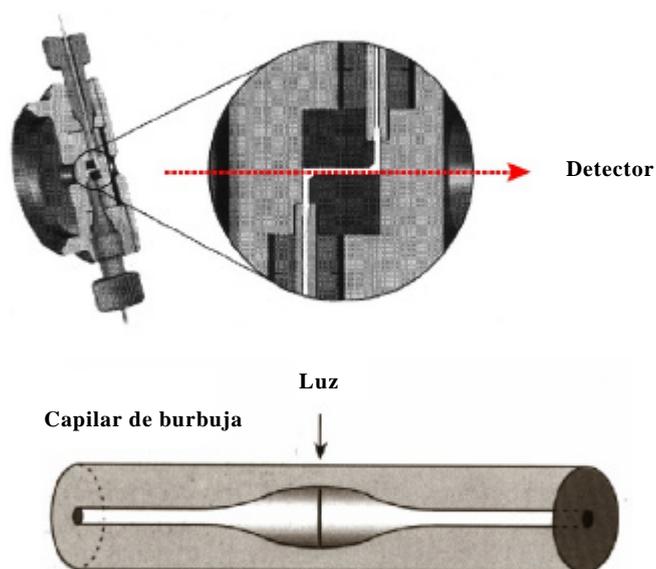


Figura 2.8. Celda de flujo de alta detección (esquema superior) y capilar de burbuja (esquema inferior).

2.3.3.1.2 Detección indirecta

Este modo de detección se emplea para determinar analitos no absorbentes, por ejemplo aniones y cationes inorgánicos, ácidos orgánicos de cadena corta o carbohidratos. Para ello se hace uso de un BGE que contenga algún compuesto cromóforo (*probe* o ion de monitorización), el caso más habitual es que el mismo tampón que constituye el BGE realice la función de *probe*. Se hace uso entonces de BGEs absorbentes tanto de naturaleza inorgánica como orgánica. En este tipo de fotometría, la longitud de onda de detección se coloca en el máximo de absorbancia del BGE y la de referencia se coloca a alguna longitud de onda donde éste no absorba. El paso del BGE por el detector provoca una señal elevada y constante que decae bruscamente cuando llega un analito a la zona de detección (figura 2.9) obteniéndose así picos negativos. La mayoría de software comerciales permiten convertir estos picos negativos en positivos o también existe la posibilidad de intercambiar las longitudes de detección y de referencia, respecto a lo anteriormente explicado, para de esta manera cambiar el signo de la señal.

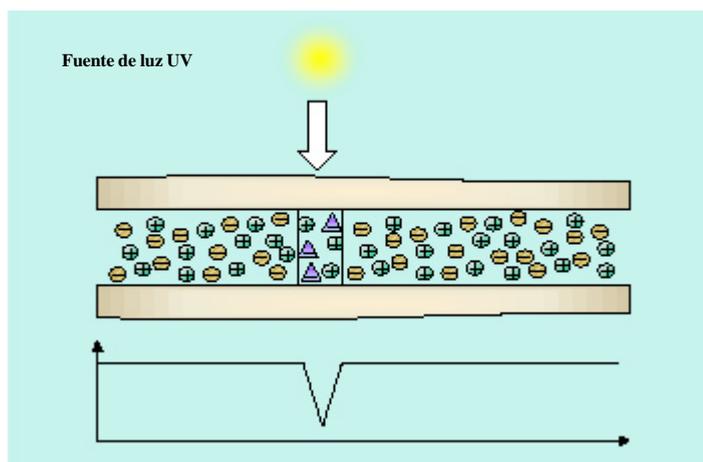


Figura 2.9. Esquema de la detección indirecta UV-Vis, donde r representa al analito y O los componentes del BGE

Un factor clave para obtener resultados de calidad en detección indirecta es ajustar la movilidad del BGE con la de los analitos. Diferencias de movilidad conducen a picos deformados (con cola o espalda) en un fenómeno denominado electrodispersión⁴. La figura 2.10 representa la movilidad de BGEs y analitos habituales en detección indirecta con lo que puede usarse para elegir las condiciones de separación más adecuadas para una familia de compuesto.

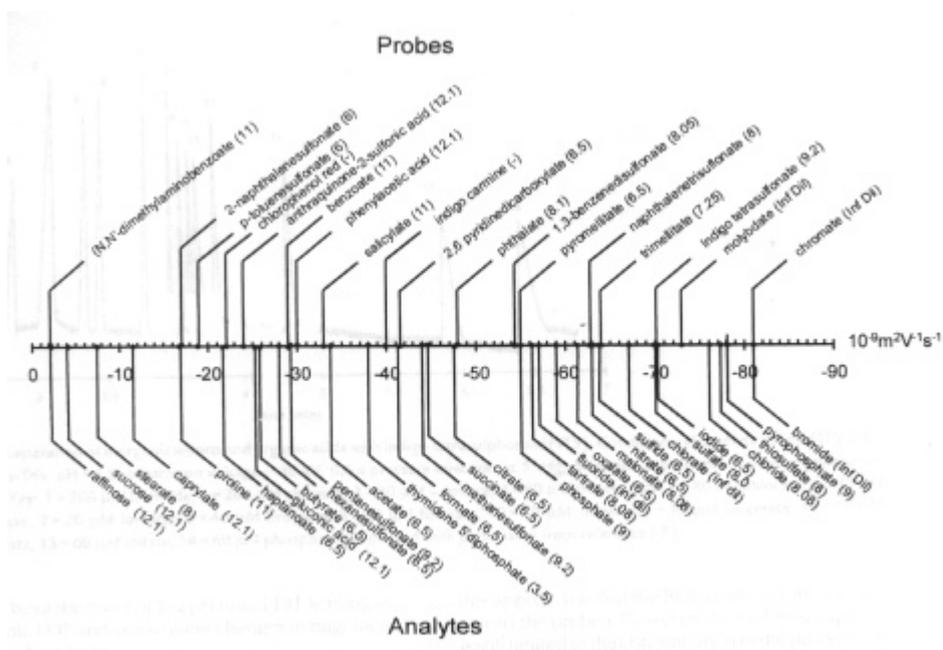


Figura 2.10. Movilidad de algunos *probes* y analitos habituales en detección indirecta. Entre paréntesis se indica el pH en el cual se han calculado esta movilidads.