

2 Electroforesis capilar (CE)

2.1 Introducción

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Como ya se ha comentado, la separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño (10-200 μm). El uso de estos capilares conlleva múltiples ventajas:

- Los capilares son anticonvectivos en sí mismos y, por tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.
- El calor generado al pasar la corriente eléctrica (efecto Joule), que daría lugar a problemas de gradientes de temperatura no uniformes, cambios locales de viscosidad, es fuertemente reducido, ya que la disipación de calor es muy efectiva.
- En consecuencia, pueden aplicarse altos voltajes y, por tanto, se consigue una reducción del tiempo de análisis y altas eficiencias.
- Se tiene la posibilidad de realizar la detección en columna.

Un esquema del instrumento utilizado en CE se muestra en la figura 2.1. La instrumentación básica es muy simple, constando de una fuente de voltaje, un capilar, recipientes de muestra y tampón, y un detector. Ésta puede ser mejorada gracias a la automatización, control de temperatura en muestras y capilar, muestreador automático, *software* para el tratamiento de datos, etc. Siguiendo el esquema de la figura 2.1 se puede observar como el capilar está en contacto con los viales de entrada (*inlet*) y salida (*outlet*), los cuales a su vez contienen los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial. El capilar está lleno con la misma solución contenida en ambos viales. A esta solución se le denomina electrólito de fondo (BGE, de *background electrolyte*) y constituye el medio de conducción de la corriente eléctrica. El BGE suele ser un tampón adecuado a las necesidades del tipo de muestra a analizar.

La muestra es inyectada en el interior del capilar reemplazando el vial de entrada por el de la muestra y posteriormente es reemplazado de nuevo por el vial de entrada para aplicar la diferencia de potencial entre ambos extremos del capilar. La separación tiene lugar a lo largo del tiempo y los distintos analitos son habitualmente detectados a través de la pared del capilar.

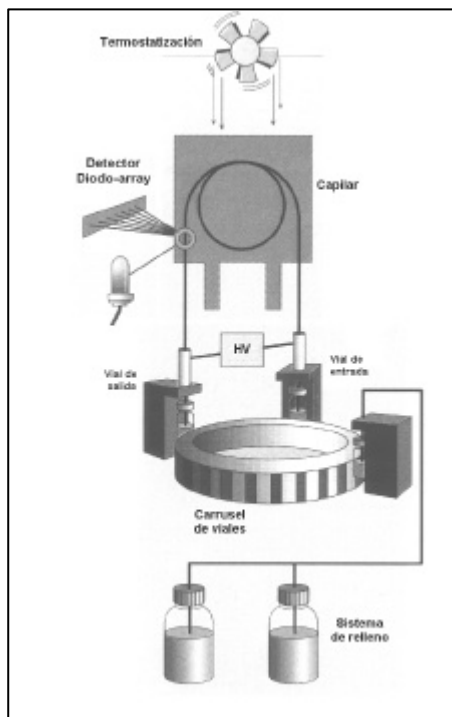


Figura 2.1 Esquema de un instrumento de electroforesis capilar

2.2 Fundamentos de la separación

La velocidad de un ión sometido a la acción de un campo eléctrico viene dada por la expresión:

$$v = \mu_{ep} E \quad (2.1)$$

donde μ_{ep} es la movilidad electroforética del ión, y E el campo eléctrico aplicado. μ_{ep} depende a su vez de la carga del ión (q), de su radio (r) y de la viscosidad de la solución (η), según la expresión:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2.2)$$

La velocidad con la que viaja un determinado ión es mayor cuanto mayor es su carga y menor su radio. Si la sustancia está presente en solución en diferentes formas en equilibrio dinámico (por ejemplo, debido a un equilibrio ácido-base), la movilidad electroforética es una combinación de las movilidades de las i posibles especies en equilibrio ponderada por la fracción molar de cada i especie (α_i).

$$\mu_{ep} = \sum_{i=0}^n \alpha_i \mu_i \quad (2.3)$$

No obstante la movilidad electroforética real no coincide con lo predicho por la ecuación 2.2 debido a la existencia del flujo electrosmótico (EOF). El EOF es el flujo de líquido en el interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de capilares de sílice fundida esta superficie de carga es generada por la ionización de los grupos silanol.

La carga en la superficie interna del capilar atrae hacia sí iones positivos que forman una capa adyacente fija por adsorción (capa de Stern), y una capa difusa y móvil, también positiva (capa de Gouy-Chapman). Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Estos iones, al estar solvatados, generan un movimiento global del fluido hacia el cátodo. Este movimiento del fluido constituye el EOF (figura 2.2).

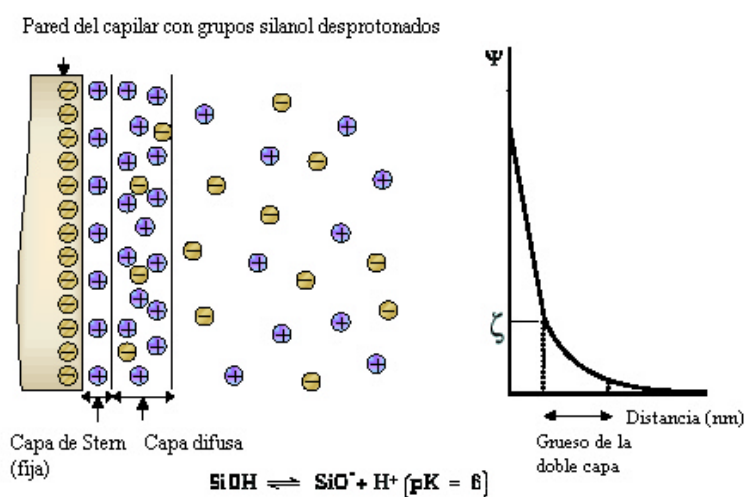


Figura 2.2 Formación de la doble capa electroquímica que genera el EOF.

La movilidad electrosmótica (μ_{eo}) viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi \eta} \tag{2.4}$$

donde η y ϵ son la viscosidad y la constante dieléctrica de la solución, respectivamente, y ζ el llamado potencial zeta. El potencial zeta es el potencial existente en el plano de separación de ambas capas, y depende esencialmente de la naturaleza y cantidad de iones en la superficie interna del capilar. Este potencial decrece de forma lineal dentro de la capa de Stern, pero decrece exponencialmente dentro de la capa difusa (figura 2.2).

El perfil del EOF es plano como consecuencia de que la doble capa es muy delgada y la fuerza conductora está uniformemente distribuida a lo largo de todo el capilar. El ensanchamiento de banda debido a la transferencia de masa es mínimo lo que permite obtener altas resoluciones en la separación. En los sistemas conducidos por presión (HPLC, por ejemplo) el perfil del flujo es parabólico, dando lugar a picos más anchos, como se aprecia en la figura 2.3.

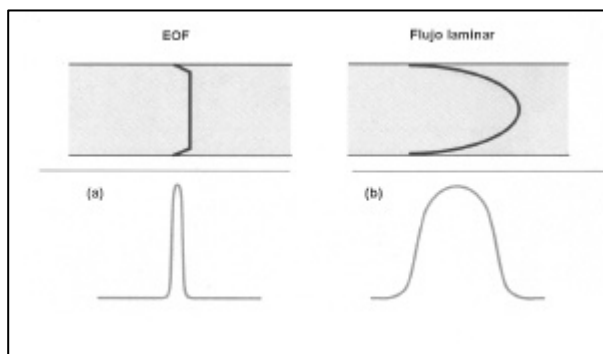


Figura 2.3. Perfil del flujo en CE (a) y HPLC (b)

El EOF puede controlarse de varias maneras; también puede ser suprimido e incluso invertido, en función de las necesidades de la separación. En el caso de que exista EOF se modifica la velocidad total con la que los iones se mueven a través del capilar de la forma:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_{ep})E \quad (2.6)$$

El termino $\mu_{eo} \pm \mu_{ep}$ se denomina movilidad aparente (μ_a) y puede calcularse a partir de datos experimentales según:

$$\mu_a = \frac{lL}{tV} \quad (2.7)$$

Siendo l la longitud efectiva medida desde el extremo del *inlet* a la ventana de detección, L la longitud total del capilar, t el tiempo de migración del analito y V el voltaje aplicado. Si el EOF es mayor que las movilidades electroforéticas (μ_{ep}) de los aniones, éstos se pueden separar en una misma inyección junto a los cationes y las moléculas neutras contenidas en la muestra. Todos ellos se mueven hacia el cátodo, si la carga de la pared del capilar es negativa. Los cationes son atraídos electroforéticamente hacia el polo negativo y a esta velocidad se le suma la del EOF, en el mismo sentido. Todas las moléculas neutras migran a la velocidad del EOF y, por último, los aniones migran con una velocidad igual a la diferencia entre la velocidad del EOF y sus velocidades electroforéticas hacia el ánodo. La diferencia en los tiempos de migración dentro del grupo de los cationes o dentro del de los aniones viene dada por la por la diferencia en sus movilidades electroforéticas. El esquema de movimiento de las diversas moléculas superpuesto con el del EOF se presenta en la figura 2.4.

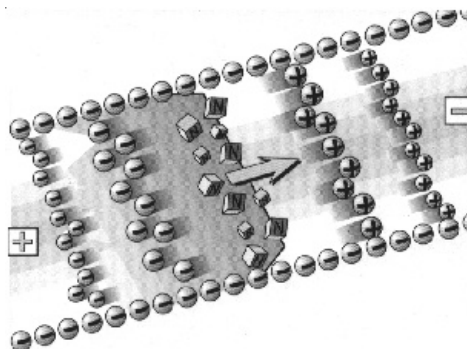


Figura 2.4. Movimiento de las especies en función de su relación carga-radio

2.3 Aspectos Instrumentales en CE

En el apartado 2.1.1 ha sido presentado un esquema básico de los instrumentos utilizados en CE. A continuación se van a describir con más detalle algunos aspectos instrumentales característicos de la técnica.

2.3.1 Capilares

Idealmente, los capilares deben disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV-VIS, ya que facilitarán la detección on-line, flexibles, robustos y de precio económico. Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones y por ello son los más ampliamente utilizados. Para aumentar su flexibilidad y resistencia son recubiertos de una capa externa de poliimida. Una pequeña sección del recubrimiento de poliimida (ventana de detección) es eliminada para hacer viable la detección. Esta sección del capilar es cilíndrica y sus dimensiones oscilan entre 50 y 100 cm de longitud y entre 10 y 200 μm de diámetro interno. Algunos capilares se derivatizan, funcionalizando las paredes internas con polímeros como el polivinilalcohol (PVA). Este recubrimiento reduce la adsorción de compuestos catiónicos. El análisis de aminas o proteínas en este tipo de capilares está libre de las colas de pico que aparecen en los capilares sin tratar químicamente¹. Además se suprime el EOF con lo que se mejora la reproducibilidad de los tiempos de migración. No obstante, estos capilares presentan la desventaja de una menor estabilidad frente al pH con lo que el intervalo de pH útil se reduce respecto a un capilar convencional. Aunque la sílice es el material más utilizado también se pueden utilizar otros materiales como el pyrex o el teflón.

2.3.2 Sistema de inyección

Las cantidades de muestra inyectadas en CE son muy pequeñas (del orden de los nanolitros), debido a las reducidas dimensiones del capilar. Las pequeñas cantidades inyectadas, son una ventaja de la técnica cuando se dispone de poca muestra. Sin embargo, resulta un inconveniente en cuanto al aspecto de la sensibilidad. Los pequeños volúmenes de muestras inyectados provoca que sea necesario un sistema de inyección diferente a los que se usan en otros métodos cromatográficos basados principalmente en jeringas o búcles de inyección. Los dos métodos de inyección más habituales en CE son la inyección electrocinética y la hidrodinámica. Estos métodos de inyección y sus variante han sido esquematizados en la figura 2.5.

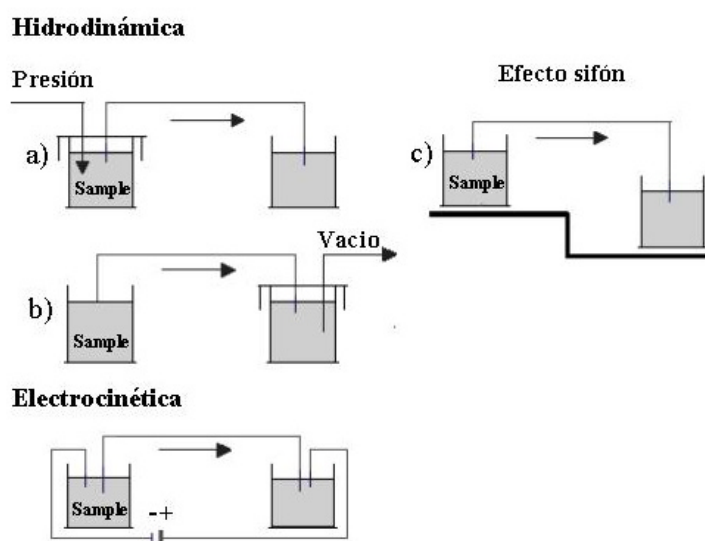


Figura 2.5. Esquema de los sistemas de inyección hidrodinámicos aplicando presión en el *inlet* (a), vacío en el *oulet* (b) o por diferencias de altura (c). Esquema del sistema inyección electrocinético

2.3.2.1 Inyección hidrodinámica

Es el modo de inyección más extensamente utilizado y se puede realizar : por aplicación de una presión en el *inlet*, realizando el vacío en el *oulet* o por efecto sifón, al elevar el vial de muestra respecto al vial de tampón situado en el extremo contrario al de inyección (figura 2.5). Instrumentalmente, la aplicación de presión en el *inlet* es la solución más sencilla y la que adoptan la mayoría de equipos. Este tipo de inyección presenta la ventaja que la cantidad de cada analito inyectada es independiente la movilidad electroforética de cada analito.

La presión aplicada y el tiempo que se aplica esta presión (tiempo de inyección) son los dos parámetros que controla el analista para variar el volumen de inyección (vol) que puede ser calculado según la ecuación de Hagen-Poiseuille.

$$\text{vol} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (2.8)$$

El volumen inyectado es función de la presión aplicada (ΔP), el tiempo de inyección (t), la viscosidad del capilar (η) y características del capilar como la longitud del capilar (L) o el diámetro interno (d). Valores de inyección próximos a 250 mbar x s (ejemplo 50 milibares durante 5 segundos) son habituales en CE. Con este sistema de inyección, la precisión del área de pico es del orden del 2% (medida como coeficiente de variación)².

2.3.2.2 Inyección electrocinética

En este modo de inyección el vial de muestra reemplaza al vial del *inlet* y a continuación se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, que suele ser de 3 a 5 veces inferior al utilizado en la separación, durante un tiempo determinado. Los diferentes solutos se introducen en el capilar por el efecto conjunto de su migración electroforética y del EOF, por lo que cada analito será inyectado en distinta cantidad en función de su movilidad electroforética. La cantidad de analito inyectada puede ser calculada según:

$$Q = \frac{(\mu_e - \mu_{eof}) V r^2 \rho C t}{L} \quad (2.9)$$

Donde μ_e es la movilidad electroforética del analito, μ_{eof} es la movilidad del EOF, V es el voltaje aplicado, t el tiempo de inyección, C la concentración del analito y r y L el radio y longitud del capilar respectivamente.

El hecho que la concentración de analito inyectado dependa de su movilidad electroforética es un inconveniente en el caso de querer determinar un analito de baja movilidad mientras que para analitos con una alta movilidad constituye un efectivo método de preconcentración. Una desventaja de este modo de inyección es que se ve afectado por la conductividad de la muestra. Es decir, si dos muestras tienen la misma concentración de un ión determinado pero presentan conductividades diferentes, la cantidad de ese ión inyectada será diferente para cada muestra. Debido a este fenómeno, este método de inyección no es habitual, aunque resulta muy útil cuando los capilares utilizados están rellenos de geles o de un medio demasiado viscoso donde la inyección hidrodinámica resulta menos efectiva.