

## 301. ELECTROFORESIS CAPILAR<sub>ICH</sub>

### INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar es un método de análisis físico basado en la migración, dentro de un capilar, de analitos cargados disueltos en una solución de electrolitos, bajo la influencia de un campo eléctrico de corriente continua (directa).

En esta sección se describen cuatro métodos de electroforesis capilar: *Electroforesis Capilar de Zona*, *Electroforesis Capilar en Gel*, *Isoelectroenfoque Capilar* y *Cromatografía Electrocinética Micelar*.

### PRINCIPIOS GENERALES

La velocidad de migración del analito en un campo eléctrico de intensidad  $E$  está determinada por la movilidad electroforética del analito y la movilidad electroosmótica de la solución amortiguadora dentro del capilar. La movilidad electroforética de un soluto ( $\mu_{ep}$ ) depende de las características del soluto (carga eléctrica, tamaño molecular y forma) y de las características de la solución amortiguadora en donde ocurre la migración (tipo y fuerza iónica del electrolito, pH, viscosidad y aditivos). La velocidad electroforética ( $v_{ep}$ ) de un soluto, suponiendo una forma esférica, es la siguiente:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \left( \frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

en donde  $q$  es la carga efectiva del soluto;  $\eta$  es la viscosidad de la solución de electrolitos;  $r$  es el radio de Stoke del soluto;  $V$  es el voltaje aplicado; y  $L$  es la longitud total del capilar.

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar lleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina flujo electroosmótico. Su velocidad depende de la movilidad

electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) que a su vez depende de la densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora.

La velocidad electroosmótica ( $v_{eo}$ ) está dada por la ecuación:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \left( \frac{\epsilon}{4\pi} \right) \left( \frac{\zeta}{\eta} \right)$$

en donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica de la solución amortiguadora;  $\zeta$  es el potencial zeta de la superficie del capilar; y los otros términos son los definidos anteriormente.

La velocidad del soluto ( $v$ ) está dada por la ecuación:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

La movilidad electroforética del analito y la movilidad electroosmótica pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, dependiendo de la carga del soluto. En electroforesis capilar normal, los aniones migrarán en la dirección opuesta al flujo electroosmótico y sus velocidades serán menores que la velocidad electroosmótica. Los cationes migrarán en la misma dirección del flujo electroosmótico y sus velocidades serán mayores que la velocidad electroosmótica. Bajo condiciones en las cuales hay una velocidad electroosmótica rápida con respecto a la velocidad electroforética de los solutos, tanto los cationes como los aniones se pueden separar en la misma corrida. El tiempo ( $t$ ) que tarda el soluto en migrar la distancia ( $l$ ) desde el extremo de inyección del capilar al punto de detección (longitud efectiva del capilar) es el siguiente:

$$72 \quad \mu = \frac{\mu}{\mu_{aa} + \mu_{bb}} = \frac{\mu(\mu)}{\mu(\mu_{aa} + \mu_{bb})}$$

73 en donde los otros términos son los definidos  
74 anteriormente.

75 En general, los capilares de sílice fundida sin  
76 recubrimiento con un pH por encima de 3 tienen  
77 carga negativa debido a los grupos silanol  
78 ionizados en la pared interna. Por consiguiente, el  
79 flujo electroosmótico va del ánodo al cátodo. El  
80 flujo electroosmótico debe mantenerse constante  
81 entre pruebas para obtener una buena  
82 reproducibilidad en la velocidad de migración de  
83 los solutos. Para algunas aplicaciones, puede ser  
84 necesario reducir o suprimir el flujo  
85 electroosmótico modificando la pared interna del  
86 capilar o cambiando la concentración, la  
87 composición y/o el pH de la solución  
88 amortiguadora.

89 Después de la introducción de la muestra dentro  
90 del capilar, cada ion del analito de la muestra  
91 migra dentro del electrolito de fondo como una  
92 zona independiente de acuerdo con su movilidad  
93 electroforética. La dispersión de la zona, o sea el  
94 extendido de cada banda de soluto es el resultado  
95 de fenómenos diferentes. En condiciones ideales,  
96 el ensanchamiento de la zona del soluto se debe  
97 solamente a la difusión molecular del soluto a lo  
98 largo del capilar (difusión longitudinal). En este  
99 caso ideal, la eficiencia de la zona, expresada  
100 como el número de platos teóricos ( $N$ ), está dada  
101 por:

$$102 \quad N = \frac{(\mu_{aa} + \mu_{bb}) \mu \mu}{2 \mu \mu}$$

103 en donde  $D$  es el coeficiente de difusión  
104 molecular del soluto en la solución  
105 amortiguadora.

106 En la práctica, otros fenómenos, como por  
107 ejemplo la disipación de calor, la adsorción de la  
108 muestra en la pared del capilar, las diferencias de

109 conductividad entre la muestra y la solución  
110 amortiguadora, la longitud de la zona de  
111 inyección, el tamaño de celda del detector y  
112 los recipientes de solución amortiguadora no  
113 nivelados, pueden contribuir  
114 significativamente a la dispersión de banda.  
115 La separación entre dos bandas (expresada  
116 por la resolución,  $R_s$ ) se puede obtener  
117 modificando la movilidad electroforética de  
118 los analitos, la movilidad electroosmótica  
119 inducida por el capilar y aumentando la  
120 eficiencia para la banda de cada analito del  
121 siguiente modo:

$$122 \quad R_s = \frac{\sqrt{\mu}(\mu_{aaa} - \mu_{bbb})}{4(\mu_{aa} + \mu_{bb})}$$

123 en donde  $\mu_{epa}$  y  $\mu_{epb}$  son las movilidades  
124 electroforéticas de los dos analitos a separar;  
125  $\mu_{ep}$  es la movilidad electroforética promedio  
126 de los dos analitos calculada como:

$$127 \quad \mu_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{aaa} + \mu_{bbb})$$

## 128 APARATO

129 Un aparato de electroforesis capilar se  
130 compone de una fuente de alimentación de  
131 corriente continua (directa) regulable, de alto  
132 voltaje; dos recipientes para las soluciones  
133 amortiguadoras que se mantienen en el  
134 mismo nivel y que contienen las soluciones  
135 anódica y catódica especificadas; dos  
136 conjuntos de electrodos (cátodo y ánodo)  
137 sumergidos en los recipientes de las  
138 soluciones amortiguadoras y conectados a la  
139 fuente de alimentación; un capilar de  
140 separación, generalmente de sílice fundida, a  
141 veces con una ventana de visualización  
142 óptica alineada con el detector, dependiendo  
143 del tipo de detector, con los extremos del  
144 capilar ubicados en los recipientes de las

145 soluciones amortiguadoras y el capilar lleno con  
146 una solución que se especifica en la monografía  
147 correspondiente; un sistema de inyección  
148 adecuado; un detector capaz de monitorear la  
149 cantidad de sustancia de interés que pasa a través  
150 de un segmento del capilar de separación en un  
151 tiempo dado, generalmente basado en la  
152 espectrofotometría de absorción (UV y visible),  
153 fluorimetría, o detección conductimétrica,  
154 amperométrica o espectrométrica de masas,  
155 dependiendo de las aplicaciones específicas, o  
156 incluso en la detección indirecta para detectar  
157 compuestos no fluorescentes y que no absorben  
158 luz UV; un sistema termostático capaz de  
159 mantener una temperatura constante dentro del  
160 capilar, recomendada para obtener una buena  
161 reproducibilidad de separación; un registrador y  
162 un integrador apropiado o una computadora.  
163 La definición del proceso de inyección y su  
164 automatización son críticos para realizar análisis  
165 cuantitativos precisos. Los modos de inyección  
166 incluyen la inyección por gravedad, presión o  
167 vacío o la inyección electrocinética. La cantidad  
168 de cada componente de muestra introducida  
169 electrocinéticamente depende de su movilidad  
170 electroforética, lo cual lleva a una posible  
171 discriminación al usar este modo de inyección.  
172 Se espera que el capilar, las soluciones  
173 amortiguadoras, el método de  
174 precondicionamiento, la solución muestra y las  
175 condiciones de migración estén especificadas en  
176 la monografía correspondiente. La solución  
177 electrolítica empleada se filtra para eliminar  
178 partículas y desgasificar para evitar la formación  
179 de burbujas que pueden interferir con el sistema  
180 de detección o interrumpir el contacto eléctrico  
181 en el capilar durante la prueba de separación.  
182 Para lograr un tiempo de migración reproducible  
183 de los solutos, es necesario desarrollar, para cada

184 método analítico, una rutina de enjuague  
185 riguroso.

## 186 ELECTROFORESIS CAPILAR DE 187 ZONA

### 188 Principio

189 En la electroforesis capilar de zona, los  
190 analitos se separan en un capilar que contiene  
191 únicamente una solución amortiguadora sin  
192 ningún medio anticonvectivo. En esta  
193 técnica, la separación ocurre debido a que los  
194 distintos componentes de la muestra migran  
195 como bandas discretas con velocidades  
196 diferentes. La velocidad de cada banda  
197 depende de la movilidad electroforética del  
198 soluto y del flujo electroosmótico en el  
199 capilar (ver Principios Generales). Se pueden  
200 usar capilares recubiertos para aumentar la  
201 capacidad de separación de las sustancias que  
202 se adsorben en las superficies de sílice  
203 fundida.

204 Este método de electroforesis capilar es  
205 apropiado para el análisis de moléculas  
206 pequeñas ( $PM < 2000$ ) y grandes ( $2000 <$   
207  $PM < 100\ 000$ ). Debido a la alta eficiencia  
208 lograda en la electroforesis capilar de zona se  
209 puede efectuar la separación de moléculas  
210 que presenten diferencias mínimas en su  
211 relación carga a masa. Este modo de  
212 separación también permite la separación de  
213 compuestos quirales por adición de  
214 selectores quirales a la solución  
215 amortiguadora de separación.

### 216 Optimización

217 La optimización de la separación es un  
218 proceso complejo en el que diversos  
219 parámetros de separación pueden  
220 desempeñar un papel importante. Los

221 principales factores que se deben considerar en el  
 222 desarrollo de las separaciones son los parámetros  
 223 instrumentales y de la solución electrolítica.

#### 224 **Parámetros Instrumentales**

##### 225 **VOLTAJE**

226 Un gráfico de calentamiento de Joule es útil para  
 227 optimizar el voltaje aplicado y la temperatura de  
 228 la columna. El tiempo de separación es  
 229 inversamente proporcional al voltaje aplicado.  
 230 Sin embargo, un aumento en el voltaje empleado  
 231 puede producir calor excesivo, dando lugar a un  
 232 aumento de temperatura y, como resultado, a  
 233 gradientes de viscosidad en la solución  
 234 amortiguadora dentro del capilar, lo cual  
 235 ensancha las bandas y disminuye la resolución.

##### 236 **POLARIDAD**

237 La polaridad del electrodo puede ser normal (el  
 238 ánodo en la entrada y el cátodo en la salida) y el  
 239 flujo electrosmótico se moverá hacia el cátodo.  
 240 Si la polaridad del electrodo se invierte, el flujo  
 241 electrosmótico queda lejos de la salida y solo los  
 242 analitos cargados con movilidades  
 243 electrosmóticas mayores que el flujo  
 244 electrosmótico pasarán hacia la salida.

##### 245 **TEMPERATURA**

246 El principal efecto de la temperatura se observa  
 247 en la viscosidad y conductividad eléctrica de la  
 248 solución amortiguadora afectándose, por lo tanto,  
 249 la velocidad de migración. En algunos casos, un  
 250 aumento en la temperatura del capilar puede  
 251 alterar la conformación de algunas proteínas,  
 252 modificando su tiempo de migración y eficiencia  
 253 de separación.

##### 254 **CAPILAR**

255 La longitud y diámetro interno del capilar  
 256 afectan el tiempo de análisis, la eficiencia de  
 257 las separaciones y la capacidad de carga. El  
 258 aumento de la longitud efectiva y de la  
 259 longitud total permiten disminuir los campos  
 260 eléctricos, a un voltaje constante, lo cual  
 261 aumenta el tiempo de migración. Para una  
 262 solución amortiguadora y un campo eléctrico  
 263 dados, la disipación de calor (por lo tanto, el  
 264 ensanchamiento de banda de la muestra)  
 265 depende del diámetro interno del capilar.  
 266 Este último también afecta el límite de  
 267 detección, dependiendo del volumen de  
 268 muestra inyectado en el capilar y del sistema  
 269 de detección usado.

270 La adsorción de los componentes de la  
 271 muestra en la pared del capilar limita la  
 272 eficiencia; por lo tanto, hay que considerar  
 273 métodos para evitar estas interacciones  
 274 cuando se desarrolla un método de  
 275 separación. En el caso específico de las  
 276 proteínas, se han diseñado varias estrategias  
 277 para evitar la adsorción en la pared capilar.  
 278 Algunas de estas estrategias (uso de pH  
 279 extremo y adsorción de aditivos de  
 280 soluciones amortiguadoras cargados  
 281 positivamente) solo necesitan la  
 282 modificación de la composición de la  
 283 solución amortiguadora para evitar la  
 284 adsorción de las proteínas. Otras estrategias  
 285 incluyen el recubrimiento de la pared interna  
 286 del capilar con un polímero unido  
 287 covalentemente a la sílice lo cual evita la  
 288 interacción entre las proteínas y la superficie  
 289 de la sílice negativamente cargada. Para este  
 290 propósito, se consiguen en el mercado  
 291 capilares listos para el uso con recubrimiento  
 292 de polímeros hidrófilos neutros, catiónicos y  
 293 aniónicos.

294 **Parámetros de la Solución Electrolítica**

295 TIPO DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA Y  
296 CONCENTRACIONES

297 Las soluciones amortiguadoras apropiadas para la  
298 electroforesis capilar tienen una capacidad  
299 amortiguadora adecuada en el intervalo de pH de  
300 elección y baja movilidad para minimizar la  
301 generación de corriente.

302 Para minimizar la distorsión de la banda es  
303 importante hacer coincidir la movilidad de los  
304 iones en la solución amortiguadora con la  
305 movilidad del soluto siempre que sea posible. Es  
306 importante el tipo de disolvente de la muestra  
307 empleado para lograr el enfoque de la muestra en  
308 la columna, lo que aumenta la eficiencia de  
309 separación y mejora la detección. Además, el  
310 aumento en la concentración de las soluciones  
311 amortiguadoras a un pH dado disminuye el flujo  
312 electroosmótico y la velocidad del soluto.

313 PH DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

314 El pH de la solución amortiguadora puede afectar  
315 la separación al modificar la carga del analito o  
316 aditivos y al cambiar el flujo electroosmótico.  
317 Para la separación de proteínas y péptidos, un  
318 cambio en el pH de la solución amortiguadora  
319 desde un valor superior al punto isoelectrico a un  
320 valor inferior al punto isoelectrico cambia la  
321 carga neta del soluto de negativa a positiva.

322 Un aumento en el pH de la solución  
323 amortiguadora generalmente aumenta el flujo  
324 electroosmótico.

325 DISOLVENTES ORGÁNICOS

326 Los modificadores orgánicos, como por ejemplo  
327 el metanol, el acetonitrilo y otros, se pueden  
328 agregar a la solución amortiguadora acuosa para  
329 aumentar la solubilidad del soluto o de otros  
330 aditivos o para afectar el grado de ionización de  
331 los componentes de la muestra. Estos

332 modificadores orgánicos agregados a la  
333 solución amortiguadora suelen disminuir el  
334 flujo electroosmótico.

335 ADITIVOS PARA SEPARACIONES  
336 QUIRALES

337 Para separar ▲enantiómeros,▲ se agrega un  
338 selector quiral a la solución amortiguadora de  
339 separación. Los selectores quirales más  
340 comúnmente usados son las ciclodextrinas,  
341 aunque en algunos casos se pueden usar  
342 éteres corona, algunos polisacáridos o  
343 incluso proteínas. Como el reconocimiento  
344 quiral depende de las distintas interacciones  
345 entre el selector quiral y cada uno de los  
346 enantiómeros, la resolución lograda para los  
347 compuestos quirales depende en gran medida  
348 del tipo de selector quiral usado. Mientras se  
349 desarrolla una separación dada, puede ser útil  
350 analizar las ciclodextrinas que tengan  
351 distintos tamaños de cavidad ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -  
352 ciclodextrina) o ciclodextrinas modificadas  
353 con grupos neutros (metilo, etilo,  
354 hidroxialquilo, etc.) o grupos ionizables  
355 (aminometilo, carboximetilo, sulfobutiléter,  
356 etc.). Al usar ciclodextrinas modificadas se  
357 deben tener en cuenta las variaciones de una  
358 partida a otra en el grado de sustitución de  
359 las ciclodextrinas, puesto que eso influirá en  
360 la selectividad. La resolución en la  
361 separación quiral también está controlada por  
362 la concentración del selector quiral, la  
363 composición y el pH de la solución  
364 amortiguadora y la temperatura de  
365 separación. Los aditivos orgánicos, como por  
366 ejemplo el metanol o la urea, también pueden  
367 afectar la resolución de la separación.

368 ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL

369 En la electroforesis capilar en gel, la separación  
 370 ocurre dentro de un capilar lleno con un gel que  
 371 actúa como un tamiz molecular. Las moléculas  
 372 con relaciones carga a masa similares se separan  
 373 de acuerdo con el tamaño molecular dado que las  
 374 moléculas más pequeñas se mueven más  
 375 libremente a través de la red del gel y, por lo  
 376 tanto, migran más rápido que las moléculas más  
 377 grandes. De esa forma, las diferentes  
 378 macromoléculas biológicas (por ejemplo, las  
 379 proteínas y los fragmentos de ADN), que a  
 380 menudo tienen relaciones carga a masa similares  
 381 se pueden separar por electroforesis capilar en gel  
 382 de acuerdo con su masa molecular.

### 383 **Características de los Geles**

384 En electroforesis capilar se usan dos tipos de  
 385 geles: los geles recubiertos permanentemente y  
 386 los geles recubiertos dinámicamente. Los geles  
 387 recubiertos permanentemente se preparan dentro  
 388 del capilar por polimerización de monómeros. Un  
 389 ejemplo de dicho gel es una poliacrilamida  
 390 entrecruzada. Este tipo de gel generalmente está  
 391 unido a la pared de sílice fundida y no se puede  
 392 eliminar sin destruir el capilar. Para el análisis de  
 393 proteínas bajo condiciones reductoras, la solución  
 394 amortiguadora de separación, por lo general,  
 395 contiene dodecilsulfato de sodio, y la muestra se  
 396 desnaturaliza por calor en una mezcla de  
 397 dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol o  
 398 ditiotreitól antes de la inyección. Cuando se  
 399 emplean condiciones no reductoras (por ejemplo,  
 400 durante el análisis de un anticuerpo intacto), no se  
 401 utilizan 2-mercaptoetanol y ditiotreitól. La  
 402 optimización de la separación en un gel  
 403 entrecruzado se obtiene modificando la solución  
 404 amortiguadora de separación (ver *Electroforesis*  
 405 *Capilar de Zona*) y controlando la porosidad del  
 406 gel durante la preparación del mismo. Para geles  
 407 de poliacrilamida entrecruzada, la porosidad se

408 puede modificar cambiando la concentración  
 409 de acrilamida y/o la relación del agente de  
 410 entrecruzamiento. Como regla general, al  
 411 disminuir la porosidad del gel se reduce la  
 412 movilidad de los solutos. Debido a la rigidez  
 413 de este tipo de gel, solo se puede usar la  
 414 inyección electrocinética.

415 Los geles recubiertos dinámicamente son  
 416 polímeros hidrófilos (es decir, poliacrilamida  
 417 lineal, derivados de celulosa, dextrano, etc.)  
 418 que se pueden disolver en soluciones  
 419 amortiguadoras acuosas de separación, dando  
 420 lugar a un medio de separación que también  
 421 actúa como tamiz molecular. Estos medios  
 422 de separación poliméricos son más fáciles de  
 423 preparar que los polímeros entrecruzados. Se  
 424 pueden preparar en un vial y llenar por  
 425 presión en un capilar de pared recubierta sin  
 426 flujo electroosmótico.

427 Si se reemplaza el gel antes de cada  
 428 inyección generalmente mejora la  
 429 reproducibilidad de la separación. La  
 430 porosidad de los geles recubiertos  
 431 dinámicamente se puede aumentar usando  
 432 polímeros de una masa molecular mayor (a  
 433 una concentración de polímero dada) o  
 434 disminuyendo la concentración de polímero  
 435 (para una masa molecular de polímero dada.)  
 436 Al disminuir la porosidad del gel se reduce la  
 437 movilidad del soluto para la misma solución  
 438 amortiguadora. Se pueden usar técnicas de  
 439 inyección hidrodinámica y electrocinética ya  
 440 que la disolución de estos polímeros en la  
 441 solución amortiguadora produce soluciones  
 442 de baja viscosidad.

### 443 **ISOELECTROENFOQUE CAPILAR**

#### 444 Principio

445 En isoelectroenfoque las moléculas migran  
 446 bajo la influencia del campo eléctrico,

447 siempre y cuando estén cargadas, en un gradiente  
448 de pH generado por anfolitos que tienen un  
449 intervalo amplio de valores de pI (ácidos  
450 poliaminocarboxílicos) disueltos en la solución  
451 amortiguadora de separación.

452 Los tres pasos básicos en el isoelectroenfoque  
453 capilar son la carga, el enfoque y la movilización.

#### 454 CARGA

455 Se pueden emplear dos métodos.

456 **Carga en un Solo Paso** - La muestra se mezcla  
457 con anfolitos y se introduce en el capilar por  
458 presión o vacío.

459 **Carga Secuencial** - Se introducen en el capilar  
460 una solución amortiguadora inicial, luego los  
461 anfolitos, luego la muestra mezclada con  
462 anfolitos, otra vez los anfolitos solos y finalmente  
463 la solución amortiguadora final. El volumen de la  
464 muestra debe ser suficientemente pequeño como  
465 para no modificar el gradiente de pH.

#### 466 ENFOQUE

467 Cuando se aplica voltaje, los anfolitos migran  
468 hacia el cátodo o el ánodo según su carga neta,  
469 creando un gradiente de pH desde el ánodo  
470 (menor pH) hasta el cátodo (mayor pH). Durante  
471 este paso los componentes a separar migran hasta  
472 que alcanzan el pH correspondiente a su punto  
473 isoeléctrico y la corriente cae a valores muy  
474 bajos.

#### 475 MOVILIZACIÓN

476 Si se requiere movilización para la detección,  
477 usar uno de los siguientes métodos. Se cuenta con  
478 tres métodos.

479 **Método 1** - La movilización se consigue durante  
480 el Enfoque, bajo la influencia del flujo  
481 electroosmótico cuando este flujo es  
482 suficientemente pequeño para permitir el enfoque  
483 de los componentes.

484 **Método 2** - La movilización se consigue por  
485 aplicación de presión positiva después del  
486 Enfoque.

487 **Método 3** - La movilización se consigue  
488 después del Enfoque, agregando sales al  
489 recipiente del cátodo o del ánodo,  
490 dependiendo del sentido elegido para la  
491 movilización, a fin de alterar el pH en el  
492 capilar cuando se aplica voltaje. Al cambiar  
493 el pH, las proteínas y anfolitos se movilizan  
494 hacia el recipiente que contiene las sales  
495 agregadas y pasan por el detector.

496 La separación lograda se expresa como  $\Delta pI$   
497 y depende del gradiente de pH  
498 ( $dpH/dx$ ), el número de anfolitos  
499 que tienen valores de pI  
500 diferentes, el coeficiente de  
501 difusión molecular (D), la  
502 intensidad del campo eléctrico  
503 (E) y la variación de la  
504 movilidad electroforética del  
505 analito en función del pH  
506 ( $-d\mu/dpH$ ):

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D (000/00)}{D (-00/000)}}$$

507

508

Optimización

509

510 Los principales parámetros que se deben  
511 considerar en el desarrollo de las  
512 separaciones son los siguientes:

513

VOLTAJE

514

Emplear campos altos desde 300 V/cm a  
515 1.000 V/cm durante el Enfoque.

516

CAPILAR

517 Según la estrategia de Movilización seleccionada  
518 (ver más arriba), el flujo electroosmótico se debe  
519 reducir o eliminar. Los capilares recubiertos  
520 tienden a reducir el flujo electroosmótico.

## 521 SOLUCIONES

522 El recipiente con la solución amortiguadora  
523 correspondiente al ánodo se llena con una  
524 solución de pH más bajo que el pI del anfolito  
525 más ácido y el recipiente del cátodo se llena con  
526 una solución que tiene un pH más alto que el pI  
527 del anfolito más básico. Frecuentemente se usa  
528 ácido fosfórico para el ánodo e hidróxido de  
529 sodio para el cátodo.

530 La adición de un polímero, como la  
531 metilcelulosa, a la solución del anfolito tiende a  
532 suprimir las fuerzas convectivas (si las hubiese) y  
533 el flujo electroosmótico por aumento de la  
534 viscosidad. Se dispone comercialmente de  
535 anfolitos que abarcan muchos intervalos de pH y  
536 que también se pueden mezclar para obtener un  
537 intervalo de pH ampliado. Los intervalos de pH  
538 amplios se usan para estimar el punto isoeléctrico  
539 (pI) mientras que los más estrechos se emplean  
540 para mejorar la exactitud. La calibración se puede  
541 llevar a cabo correlacionando el tiempo de  
542 migración con el punto isoeléctrico de una serie  
543 de marcadores estándar de proteínas. Durante el  
544 Enfoque, se puede evitar la precipitación de  
545 proteínas en su punto isoeléctrico, si fuera  
546 necesario, usando aditivos de soluciones  
547 amortiguadoras como por ejemplo glicerol,  
548 agentes tensoactivos, urea o amortiguadores  
549 zwitteriónicos.

550 Sin embargo, según las concentraciones, la urea  
551 puede desnaturalizar las proteínas.

## 552 CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA 553 MICELAR (CECM)

### 554 Principio

555 La separación se efectúa en una solución  
556 electrolítica que contiene un agente  
557 tensoactivo en una concentración por encima  
558 de la concentración micelar crítica (cmc). Las  
559 moléculas de soluto se distribuyen entre la  
560 solución amortiguadora acuosa y la fase  
561 pseudo-estacionaria compuesta por las  
562 micelas según el coeficiente de partición del  
563 soluto. Esta técnica se puede considerar un  
564 híbrido de electroforesis y cromatografía. Es  
565 una técnica que se puede usar para la  
566 separación de solutos neutros o cargados  
567 manteniendo la eficiencia, la velocidad y la  
568 aptitud del instrumento de electroforesis  
569 capilar. Uno de los agentes tensoactivos más  
570 ampliamente usados en CECM es el  
571 tensoactivo aniónico dodecilsulfato de sodio,  
572 aunque se han usado otros agentes  
573 tensoactivos, como por ejemplo las sales de  
574 cetiltrimetilamonio como tensoactivos  
575 catiónicos.

576 El mecanismo de separación es el siguiente.  
577 A pH neutro y alcalino, se genera un flujo  
578 electroosmótico fuerte que mueve los iones  
579 de la solución amortiguadora de separación  
580 hacia el cátodo. Si se usa dodecilsulfato de  
581 sodio como agente tensoactivo, la migración  
582 electroforética de la micela aniónica se  
583 produce en el sentido opuesto, hacia el  
584 ánodo. Como resultado, la velocidad general  
585 de migración de las micelas disminuye en  
586 comparación con el flujo general de la  
587 solución electrolítica. En el caso de solutos  
588 neutros, como el analito se puede repartir  
589 entre la micela y la solución amortiguadora  
590 acuosa y no tiene movilidad electroforética,  
591 la velocidad de migración del analito  
592 dependerá únicamente del coeficiente de  
593 partición entre la micela y la solución  
594 amortiguadora acuosa. En el



595 electroferograma, los picos correspondientes a  
 596 cada soluto sin carga están siempre entre el del  
 597 marcador del flujo electroosmótico y el de la  
 598 micela; y el tiempo transcurrido entre estos dos  
 599 picos se denomina ventana de separación. Para  
 600 los solutos con carga eléctrica, la velocidad de  
 601 migración depende del coeficiente de partición  
 602 del soluto entre la micela y la solución  
 603 amortiguadora acuosa y de la movilidad  
 604 electroforética del soluto en ausencia de micelas.  
 605 Dado que el mecanismo de solutos neutros o  
 606 débilmente ionizados en CECM es esencialmente  
 607 cromatográfico la migración del soluto y la  
 608 resolución se pueden racionalizar en términos del  
 609 factor de retención del soluto ( $k'$ ), también  
 610 conocido como cociente de distribución másica  
 611 ( $D_m$ ), que es el cociente entre el número de  
 612 moles de soluto en la micela y los moles en la  
 613 fase móvil. Para un compuesto neutro,  $k'$  se  
 614 calcula del siguiente modo:

$$615 \quad k' = \frac{Q_m - Q_0}{Q_0(I - Q_m/Q_{m0})} = Q \frac{Q_m}{Q_0}$$

616 en donde  $t_r$  es el tiempo de migración del soluto;  
 617  $t_0$   
 618 es el tiempo de análisis del soluto no retenido  
 619 obtenido al inyectar un marcador de flujo  
 620 electroosmótico que no entra a la micela (p. ej.,  
 621 metanol);  $t_{mc}$  es el tiempo de migración de la  
 622 micela medido al inyectar un marcador de micela,  
 623 como por ejemplo Sudán III, que migra  
 624 continuamente asociado con la micela;  $K$  es el  
 625 coeficiente de partición del soluto;  $V_S$  es el  
 626 volumen de la fase micelar; y  $V_M$  es el volumen  
 627 de la fase móvil.  
 628 La resolución entre dos solutos que migran cerca  
 629 ( $R_S$ ) es la siguiente:

$$630 \quad R_S = \frac{\sqrt{Q}}{4} \times \frac{Q - I}{Q} \times \frac{Q_m' - I}{Q_m' - I} \times \frac{I - (Q_0/Q_{m0})}{I + Q_m' \times (Q_0/Q_{m0})}$$

631 en donde  $N$  es el número de platos teóricos  
 632 para uno de los solutos;  $\alpha$  es la selectividad;  
 633  $k_a'$  y  $k_b'$  son los factores de retención para  
 634 ambos solutos, respectivamente ( $k_b' > k_a'$ ).  
 635 Ecuaciones similares, aunque no idénticas,  
 636 dan valores de  $k'$  y  $R_S$  para solutos con carga  
 637 eléctrica.

### 638 **Optimización**

639 Los principales parámetros a considerar en el  
 640 desarrollo de separaciones por CECM son los  
 641 parámetros instrumentales y de la solución  
 642 electrolítica.

### 643 **PARÁMETROS INSTRUMENTALES**

644 **Voltaje** - El tiempo de separación es  
 645 inversamente proporcional al voltaje  
 646 aplicado. Sin embargo, un aumento en el  
 647 voltaje podría generar calor excesivo,  
 648 aumentando los gradientes de temperatura y  
 649 de viscosidad de la solución amortiguadora  
 650 en la sección transversal del capilar. Este  
 651 efecto puede ser significativo con soluciones  
 652 amortiguadoras de alta conductividad, como  
 653 por ejemplo aquellas que contienen micelas.  
 654 La disipación insuficiente del calor ensancha  
 655 las bandas y disminuye la resolución.

656 **Temperatura** - Las variaciones en la  
 657 temperatura del capilar afectan el coeficiente  
 658 de partición del soluto entre la solución  
 659 amortiguadora y las micelas, la  
 660 concentración micelar crítica y la viscosidad  
 661 de la solución amortiguadora. Estos  
 662 parámetros contribuyen al tiempo de  
 663 migración de los solutos. El uso de un buen  
 664 sistema de enfriamiento mejora la  
 665 reproducibilidad del tiempo de migración  
 666 para los solutos.

667 **Capilar** - Al igual que en la Electroforesis  
 668 Capilar de Zona, la longitud y el diámetro

669 interno del capilar influyen sobre el tiempo de  
 670 análisis y la eficiencia de las separaciones. El  
 671 aumento de la longitud efectiva y de la longitud  
 672 total puede disminuir los campos eléctricos,  
 673 trabajando a un voltaje constante, aumenta el  
 674 tiempo de migración y mejora la eficiencia de la  
 675 separación. El diámetro  
 676 interno controla la disipación de calor, para un  
 677 amortiguador y campo eléctrico dados, y por  
 678 consiguiente ensancha las bandas de la muestra.

#### 679 PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN 680 ELECTROLÍTICA

681 **Tipo de Agente Tensoactivo y Concentración -**  
 682 El tipo de agente tensoactivo, al igual que la fase  
 683 estacionaria en cromatografía, afecta la  
 684 resolución ya que modifica la separación  
 685 selectivamente. El log  $k'$  de un compuesto neutro  
 686 aumenta linealmente con la concentración de  
 687 agente tensoactivo en la fase móvil. Cuando  $k'$  se  
 688 acerca al valor de

$$689 \sqrt{\frac{\mu_{\text{eff}}}{\mu_0}}$$

691 la resolución de la CECM alcanza su máximo. La  
 692 modificación de la concentración del agente  
 693 tensoactivo en la fase móvil cambia la resolución.  
 694 **pH de la Solución Amortiguadora -** El pH no  
 695 modifica el coeficiente de partición de los solutos  
 696 no ionizados, pero puede modificar el flujo  
 697 electroosmótico en capilares sin recubrimiento.  
 698 Una disminución en el pH de la solución  
 699 amortiguadora disminuye el flujo electroosmótico  
 700 y por lo tanto aumenta la resolución de los  
 701 solutos neutros en CECM, llevando a un aumento  
 702 del tiempo de análisis.

704 **Disolventes Orgánicos -** Se pueden agregar  
 705 modificadores orgánicos (metanol, propanol,  
 706 acetónitrilo, etc.) a la solución electrolítica para

707 mejorar la separación por CECM de  
 708 compuestos hidrófobos. La adición de estos  
 709 modificadores generalmente disminuye el  
 710 tiempo de migración y la selectividad de la  
 711 separación. Dado que la adición de  
 712 modificadores orgánicos afecta la  
 713 concentración micelar crítica, solo se puede  
 714 usar una concentración dada de un agente  
 715 tensoactivo con un cierto porcentaje de un  
 716 modificador orgánico para evitar inhibir o  
 717 alterar adversamente la micelización, que  
 718 daría como resultado la ausencia de micelas  
 719 y, por lo tanto, la ausencia de partición. La  
 720 disociación de micelas en presencia de un  
 721 alto contenido de disolvente orgánico no  
 722 siempre significa que la separación ya no  
 723 será posible dado que, en ciertos casos, la  
 724 interacción hidrófoba entre el monómero  
 725 tensoactivo iónico y los solutos neutros  
 726 forman complejos solvóforos que se pueden  
 727 separar electroforéticamente.

728 **Aditivos para Separaciones Quirales -**  
 729 Para la separación de enantiómeros usando  
 730 CECM, se incluye un selector quiral en el  
 731 sistema micelar, unido covalentemente al  
 732 agente tensoactivo o agregado al electrolito  
 733 de separación micelar. Las micelas que  
 734 tienen un grupo con propiedades de  
 735 discriminación quiral incluyen sales, *N*-  
 736 dodecanoil-*L*-aminoácidos, sales biliares, etc.  
 737 La resolución quiral también se puede lograr  
 738 usando discriminadores quirales, como por  
 739 ejemplo ciclodextrinas, agregados a las  
 740 soluciones electrolíticas que contienen  
 741 agentes tensoactivos quirales micelizados.

742 **Otros Aditivos -** La selectividad se puede  
 743 modificar agregando productos químicos a la  
 744 solución amortiguadora. También se emplea  
 745 la adición de varios tipos de ciclodextrinas a  
 746 la solución amortiguadora para reducir la

747 interacción de solutos hidrófobos con la micela,  
 748 aumentando la selectividad para este tipo de  
 749 compuesto. La adición de sustancias  
 750 modificadoras de las interacciones soluto-micela  
 751 por adsorción en las micelas se ha usado para  
 752 mejorar la selectividad de las separaciones en  
 753 CECM.  
 754 Estos aditivos pueden ser un segundo agente  
 755 tensoactivo (iónico o no iónico) que da lugar a la  
 756 formación de micelas mixtas, o cationes  
 757 metálicos que se disuelven en la micela y forman  
 758 complejos de coordinación con los solutos.

### 759 **Cuantificación**

760 Las áreas de los picos se dividen por el tiempo de  
 761 migración correspondiente para obtener el área  
 762 corregida a fin de compensar el cambio en el  
 763 tiempo de migración de corrida a corrida,  
 764 reduciendo la variación de la respuesta. Al dividir  
 765 las áreas de los picos por el tiempo de migración  
 766 también se compensan las distintas respuestas de  
 767 los constituyentes de la muestra que tienen  
 768 diferentes tiempos de migración. Cuando se usa  
 769 un estándar interno, hay que verificar que no  
 770 enmascare ninguno de los picos de la sustancia a  
 771 examinar.

### 772 **CÁLCULOS**

773 A partir de los valores obtenidos, calcular el  
 774 contenido del componente o componentes que se  
 775 están determinando. Cuando se indique, se  
 776 calcula el porcentaje de uno o más componentes  
 777 de la muestra a examinar determinando las áreas  
 778 corregidas del pico o picos como porcentaje de  
 779 las áreas totales corregidas de todos los picos,  
 780 excluyendo aquellos debidos a disolventes o  
 781 reactivos agregados (procedimiento de  
 782 normalización). Se recomienda usar un sistema  
 783 de integración automático (sistema integrador o  
 784 de adquisición y procesamiento de datos).

### 785 **APTITUD DEL SISTEMA**

786 Con el fin de verificar el comportamiento del  
 787 sistema de electroforesis capilar, se usan  
 788 parámetros de aptitud del sistema. La  
 789 elección de estos parámetros depende del  
 790 tipo de electroforesis capilar utilizado. Los  
 791 parámetros incluyen los siguientes: factor de  
 792 retención  $k'$  usado únicamente para la  
 793 Cromatografía Electrocinética Micelar, el  
 794 número aparente de platos teóricos ( $N$ ), el  
 795 factor de simetría ( $A_s$ ) y la resolución ( $R_s$ ).  
 796 Es de destacar que las expresiones teóricas  
 797 para  $N$  y  $R_s$  se han descrito en las secciones  
 798 anteriores, pero las ecuaciones más prácticas  
 799 que permiten la determinación de estos  
 800 parámetros de aptitud usando los  
 801 electroferogramas se describen a  
 802 continuación.

### 803 **Número Aparente de Platos Teóricos**

804 El número aparente de platos teóricos ( $N$ ) se  
 805 puede calcular a partir de la fórmula:

$$806 \quad N = 5,54(t_R/w_h)^2$$

807 en donde  $t_R$  es el tiempo de migración o  
 808 distancia a lo largo de la línea base entre el  
 809 punto de inyección y la perpendicular trazada  
 810 desde el máximo del pico correspondiente al  
 811 componente; y  $w_h$  es el ancho del pico a la  
 812 mitad de su altura.

### 813 **Resolución**

814 La resolución ( $R_s$ ) entre los picos de alturas  
 815 similares de dos componentes se puede  
 816 calcular a partir de la fórmula:

$$817 \quad R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{R1} + w_{R2})}$$

818  
 819

820  $\sigma_{i2} > \sigma_{i1}$

821 en donde  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de migración o  
 822 distancias a lo largo de la línea base, entre el  
 823 punto de inyección y las perpendiculares trazadas  
 824 desde el máximo de los dos picos adyacentes; y  
 825  $w_{h1}$  y  $w_{h2}$  son los anchos de los picos a la mitad de  
 826 su altura.

827 Cuando sea apropiado, la resolución ( $R_s$ ) también  
 828 se puede calcular midiendo la altura del valle ( $H_v$ )  
 829 entre dos picos parcialmente resueltos en una  
 830 preparación estándar, la altura del pico más  
 831 pequeño ( $H_p$ ), y calculando la relación pico a  
 832 valle:

$$\sigma/\sigma = \sigma_p/\sigma_v$$

#### Factor de Simetría

833

834

835

836

837 El factor de simetría de un pico ( $A_s$ ) se puede  
 838 calcular usando la fórmula:

$$\sigma_p = \sigma_{0,05}/2d$$

839

840 en donde  $w_{0,05}$  es el ancho del pico a una  
 841 veinteaava parte de su altura; y  $d$  es la distancia  
 842 entre la perpendicular trazada desde el máximo  
 843 del pico y el borde frontal del pico a una  
 844 veinteaava parte de su altura.

845 Otros parámetros de aptitud incluyen pruebas  
 846 para la repetibilidad del área (desviación estándar  
 847 de las áreas o del área/tiempo de migración) y  
 848 pruebas para la repetibilidad del tiempo de  
 849 migración (desviación estándar del tiempo de  
 850 migración). La repetibilidad del tiempo de  
 851 migración proporciona una prueba de la aptitud  
 852 de los procedimientos del lavado del capilar. Para  
 853 evitar la falta de repetibilidad del tiempo de  
 854 migración, una práctica alternativa consiste en  
 855 usar un tiempo de migración relativo al estándar  
 856 interno.

#### 857 Relación Señal-Ruido

858

859 Una prueba para verificar la relación señal-  
 860 ruido de una preparación estándar o para  
 861 determinar el límite de cuantificación puede  
 862 ser útil para la determinación de sustancias  
 863 relacionadas. El límite de detección y el  
 864 límite de cuantificación corresponden a una  
 865 relación señal-ruido de 3 y 10,  
 866 respectivamente. La relación señal-ruido  
 867 ( $S/N$ ) se calcula del siguiente modo:

$$S/N = 2H/h$$

868

869 en donde  $H$  es la altura del pico  
 870 correspondiente al componente pertinente en  
 871 el electroferograma obtenido con la solución  
 872 de referencia especificada, medido desde el  
 873 máximo del pico hasta la línea base  
 874 extrapolada de la señal observada sobre una  
 875 distancia igual a veinte veces el ancho del  
 876 pico a la mitad de su altura; y  $h$  es el  
 877 intervalo de ruido de fondo en un  
 878 electroferograma obtenido después de la  
 879 inyección de un blanco, observado sobre una  
 880 distancia igual a veinte veces el ancho del  
 881 pico a la mitad de su altura en el  
 882 electroferograma obtenido con la solución de  
 883 referencia prescrita y, de ser posible, situado  
 884 igualmente alrededor del lugar donde se  
 885 encontraría este pico.

886

887

888

889

890

891

892

893

894

