

Electroforesis Capilar

La electroforesis es un **método de separación especies eléctricamente cargadas** en solución, bajo la influencia de un **campo eléctrico**.

Electroforesis - Electroforesis Capilar

Características de la Electroforesis Capilar:

- Es una poderosa técnica para la separación eficiente de pequeñas y grandes moléculas
- Tiempo rápido de análisis
- Utiliza pequeñas cantidades de muestra
- Bajo Costo.

La Electroforesis Capilar (E.C.) incluye una familia de técnicas que involucran una gradiente diferencial o de equilibrio, que están basadas principalmente en los siguientes modos:

- **Electroforesis Capilar de Zona**
- **Isotacoforesis Capilar**
- **Enfoque Isolétrico Capilar**
- **Electroforesis capilar en gel (CGE)**
- **Cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC)**

Todos estos sistemas pueden ser ejecutados en el mismo instrumento de Electroforesis Capilar

Electroforesis Capilar de Zona

Utiliza una solución buffer (electrolito base) el cual conduce la corriente eléctrica y provee la capacidad tamponante. La muestra (mezcla de aniones, cationes y especies neutras) es introducida en uno de los extremos del tubo capilar, formando en un principio una zona aguda, bajo la aplicación de un campo eléctrico las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran en forma independiente con una velocidad específica, se separan en zonas, si existen diferencias en sus movilidades.

Isotacoforesis capilar (CITP)

Utiliza dos buffer uno de entrada o frontal (movilidad más alta) y otro de salida o terminal (movilidad más baja), la zona de la muestra se encuentra entre estos dos buffers similar a un sandwich.

En la separación se genera una gradiente de potencial.

Enfoque isoléctrico Capilar o isoelectroenfoque_(CIEF)

Está limitada a la separación de compuestos anfotéricos. En cada extremo se ponen reservorios con ácido fosfórico e hidróxido de sodio respectivamente.

La separación se lleva a cabo en una gradiente de pH

Electroforesis capilar en gel (CGE)

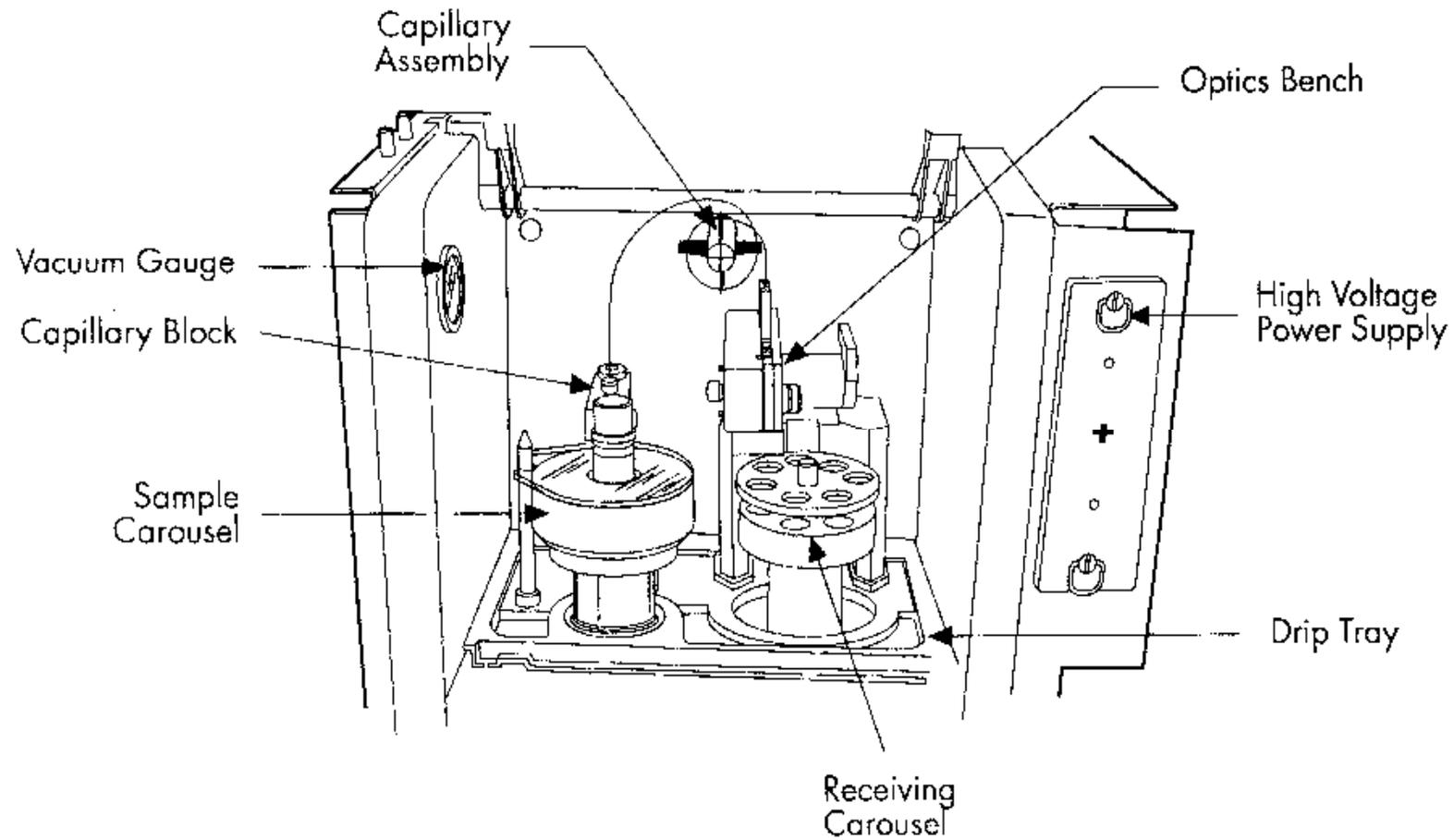
La CGE se lleva a cabo en una matriz formada por un polímero de acrilamida (poliacrilamida), que deja una serie de poros en los que se aloja el tampón y en los que se lleva a cabo la separación.

Cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC)

Este método, que combina la cromatografía y la electroforesis capilar, permite la separación de moléculas no cargadas. Es necesario añadir un elemento tensioactivo (dodecil sulfato sódico, SDS) en concentraciones lo suficientemente grandes como para que forme micelas.

Partes principales del Sistema de Electroforesis

Capilar – Depósitos para el buffer en el cátodo y en el ánodo – Electrodo – Sistema de inyección de la muestra – Detector – Fuente de poder



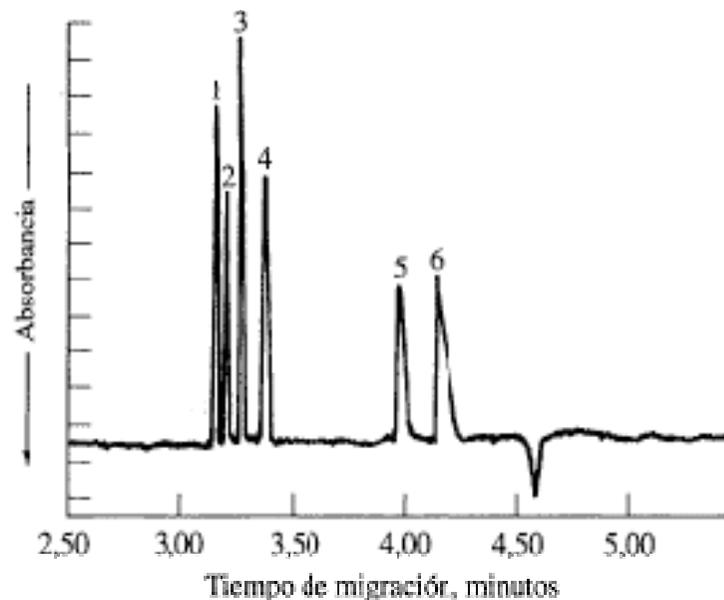
El tubo capilar se llena con el buffer, se aplica un campo eléctrico (voltaje hasta 30 kV), la muestra es inyectada por reemplazo de uno de los depósitos del buffer por el vial de la muestra, se introduce un volumen definido de ésta. El detector es ubicado en el sentido contrario al sitio de inyección.

La muestra es inyectada en el ánodo y el flujo electrosmótico (FE) es dirigido hacia el cátodo.

Los componentes de la muestra migran con velocidades distintas de acuerdo a su relación carga/masa

Los componentes son llevados al sistema de detección por el FE que es más alto que la velocidad de los iones.

- Si la electroforesis es efectuada en ausencia del FE, la inyección debe ser efectuada en el electrodo con el mismo signo que la especie a separar (cambio de polaridad)
- La mayoría de los instrumentos usan un sistema de absorbancia UV-Vis o fluorescencia.
- La respuesta del detector es registrada- Electroferograma
- Un computador conectado al detector permite la adquisición de datos y su interpretación.



Instrumentación

Inyección de la muestra:
hidrostática – electromigración - por presión

Detección

Los requerimientos más importantes para el diseño del detector son:

- Pequeño volumen en la celda de detección
- Pequeña contribución del ancho de peak
- Alta sensibilidad
- Gran rango dinámico
- Respuesta rápida
- Resistencia contra cambios de temperatura
- Selectividad
- Fiable y de fácil uso

Evaluación de la ejecución del detector

Para comparar el sistema de detección con respecto a su ejecución o para evaluar el mejor sistema de detección para una separación específica, se usan los siguientes criterios:

- sensibilidad (factor de respuesta)
- límite de detección (3 veces el ruido de la línea base)
- ruido (alta, baja y muy baja frecuencia)
- rango lineal o rango dinámico
- tiempo de respuesta

Modos de detección

UV/Vis -Fluorescencia – Conductividad – Electroquímico – espectrometría de masa

Lámparas UV/Vis: Mercurio(185,254, 280, 313, 365 nm),Se cambia a través de filtros y ventanas.

Cadmio(229nm),Cinc(214 nm), As(200nm)

DetECCIÓN INDIRECTA

- La detección indirecta es utilizada para iones pequeños, por su baja absorbilidad no pueden ser detectados por detección de absorbancia directa.
- El límite de detección no es más alto que dos órdenes de magnitud.
- Es más inestable que la detección directa. Puede observarse drifteo de la línea base, debido a la baja concentración del electrolito.

Reglas para una buena ejecución cuando se utiliza detección indirecta

- Buscar una absorbancia del coión visualizante cercana al límite más alto de linealidad del detector.
- La movilidad del coión debería ser cercana a la movilidad del par de iones que son más difícil de separar en la muestra.

- Para minimizar el calor de Joule seleccionar un contraión de baja movilidad
- El coión debe tener un amplio rango de absorbanza de manera de elegir una longitud de onda donde todos los componentes de la muestra posean muy baja absorptividad.

Sistemas electrolitos – detección indirecta

- Cromato ____ Aniones de alta movilidad
- Phtalato _____ aniones menos móviles
- Benzoato
- P-hidroxibenzoato

Columna Capilar

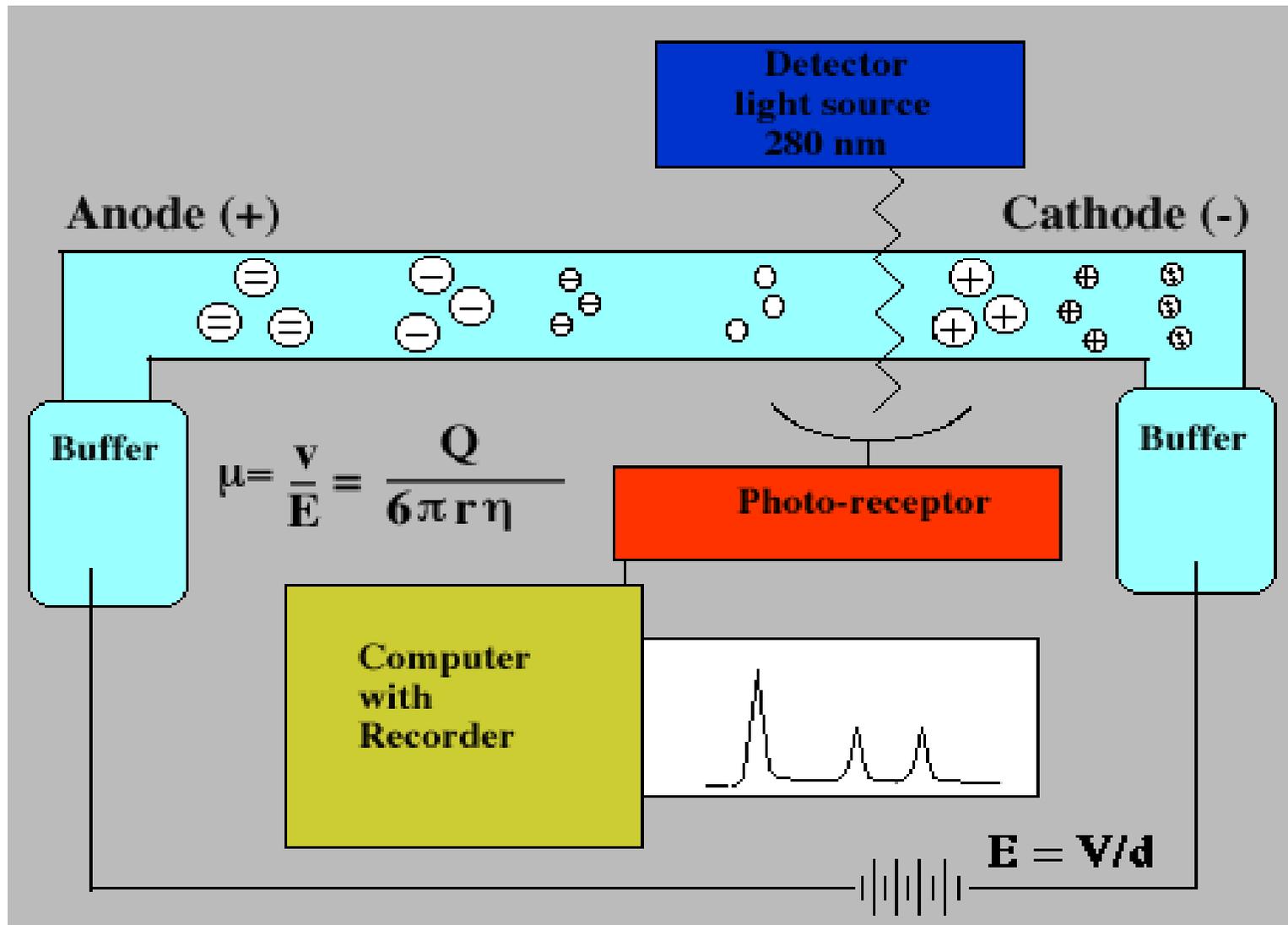
Composición

Dimensiones

Acondicionamiento

Almacenamiento

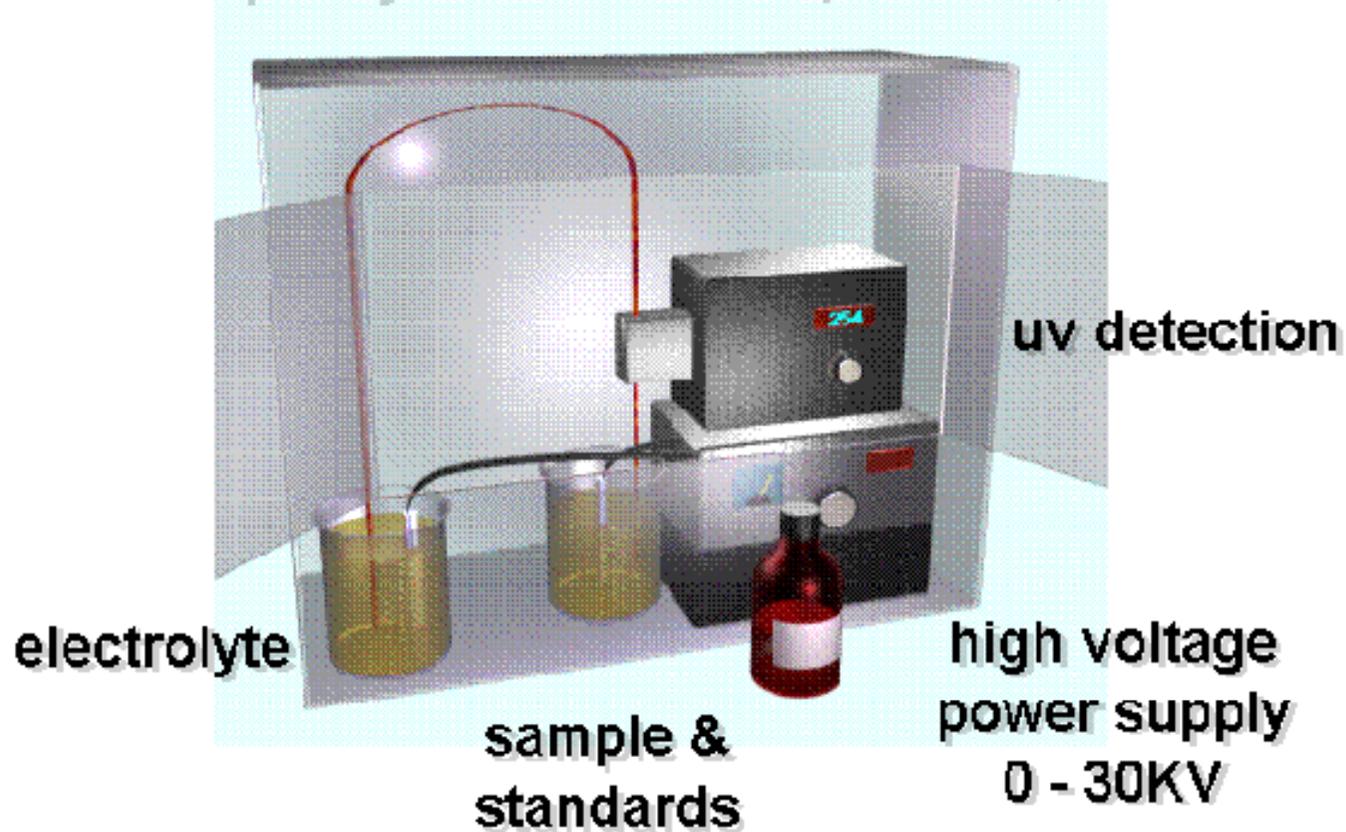
Sistema de Electroforesis Capilar en condiciones normales



Instrumentación

75 μ m x 60 cm
Silica Capillary

constant temperature
compartment, 20 - 30° C



Electroforesis

La separación por electroforesis está basada en diferencias en la velocidad del soluto en un campo eléctrico.

La velocidad de un ión está dada por:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

Donde v = velocidad del ion

μ_e = movilidad electroforética

E = Campo eléctrico aplicado

El campo eléctrico es función del voltaje aplicado y la longitud del capilar (en volts/cm).

La movilidad es determinada por la fuerza eléctrica que experimenta la molécula balanceada por su arrastre friccional a través del medio

$$\mu_e \propto \frac{\text{Fuerza eléctrica (FE)}}{\text{Fuerza Friccional (FF)}} \quad (2)$$

La fuerza eléctrica puede estar dada por:

$$\text{FE} = q \cdot E \quad (3) \quad \text{FF} = - 6 \pi \eta r v$$

q : carga del ión η : viscosidad de la solución r : radio del ión
 v : velocidad del ión

Durante la electroforesis se presenta un estado de equilibrio entre las fuerzas eléctrica y friccional.

Las fuerzas son **iguales** pero **opuestas**:

$$q \cdot E = 6 \pi \eta r v \quad (5)$$

Resolviendo para la velocidad y sustituyendo la ecuación (5) en la ecuación $v = \mu_e \cdot E$ (1), tenemos la ecuación que describe la movilidad.

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (6)$$

Alta movilidad: Especies pequeñas y altamente cargadas

Baja movilidad: Especies grandes y mínimamente cargadas

μ_e es una constante física y puede encontrarse en tablas.

Lo real es la "movilidad efectiva" y ésta se calcula experimentalmente ya que es altamente dependiente del pH (pK del soluto) y la composición del buffer de corrida.

Flujo electrosmótico (EOF)

- Es una consecuencia de la carga superficial en el interior de la pared del capilar.
- Controla la cantidad de tiempo que el soluto permanece en el capilar (flujo-movilidad).
- Longitud de capilar

- **Capilar de sílice fundido: Exceso de ionización – adsorción en la superficie del capilar**

- **EOF es controlado por los grupos silanoles (Si-OH) que pueden existir en forma aniónica (SiO⁻)**

El EOF es importante sobre pH 4.

Contraiones (cationes) ubicados cerca de la superficie para mantener el balance de carga, forma la doble capa y crea una diferencia de potencial cerca de la pared – “Potencial Z”-

La magnitud del EOF puede ser expresada en términos de velocidad o movilidad por:

$$\mathbf{VEOF = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad (7)}$$

$$\mathbf{\mu EOF = (\epsilon \zeta / \eta) \quad (8)}$$

donde :

VEOF= velocidad

μ EOF = movilidad del EOF

ζ = potencial Zeta ϵ = constante dieléctrica.

CE : Flujo de perfil plano (dispersión)

Cromatografía : Flujo laminar o parabólico

Control del EOF

Alto pH : El EOF puede ser muy rápido, puede causar la elusión del analito antes que la separación suceda.

Bajo pH: La pared cargada puede provocar adsorción de los solutos catiónicos.

El control del EOF se realiza por la alteración de la carga superficial del capilar o de la viscosidad del buffer.

Campo eléctrico

pH del buffer

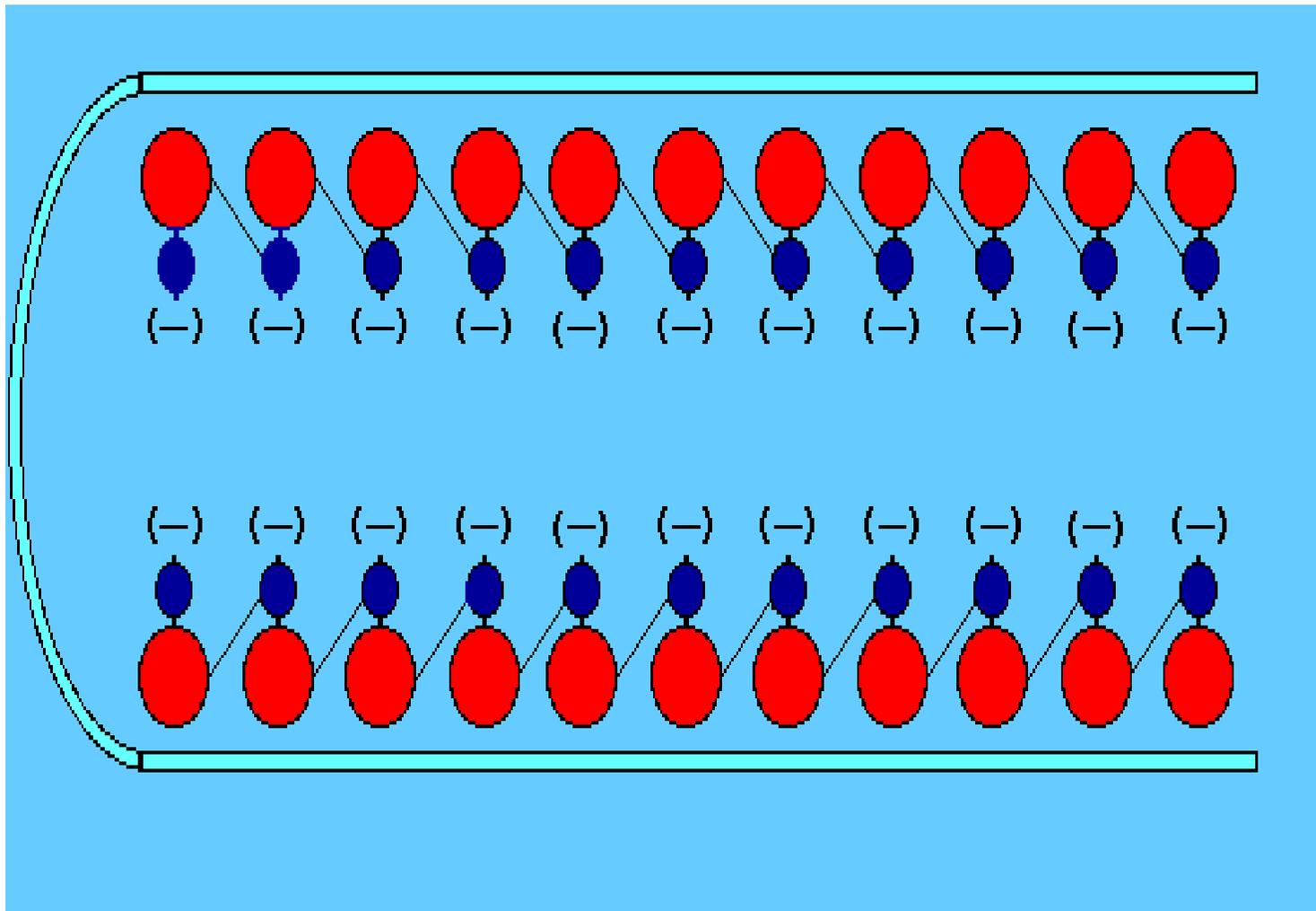
Fuerza iónica o concentración del buffer

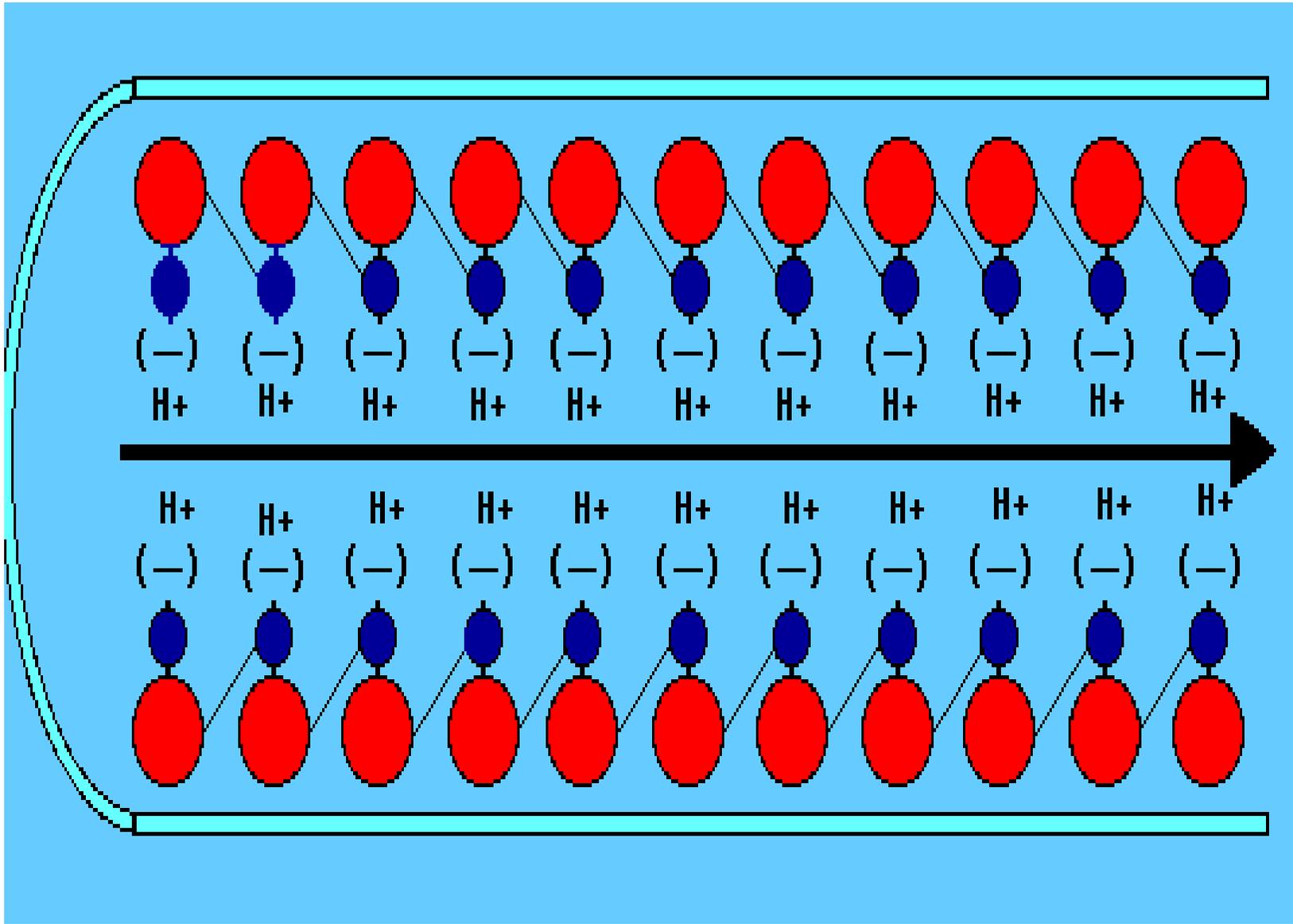
Temperatura

Modificaciones orgánicas

Surfactantes

- Polímeros hidrofílicos neutros
- Recubrimiento covalente





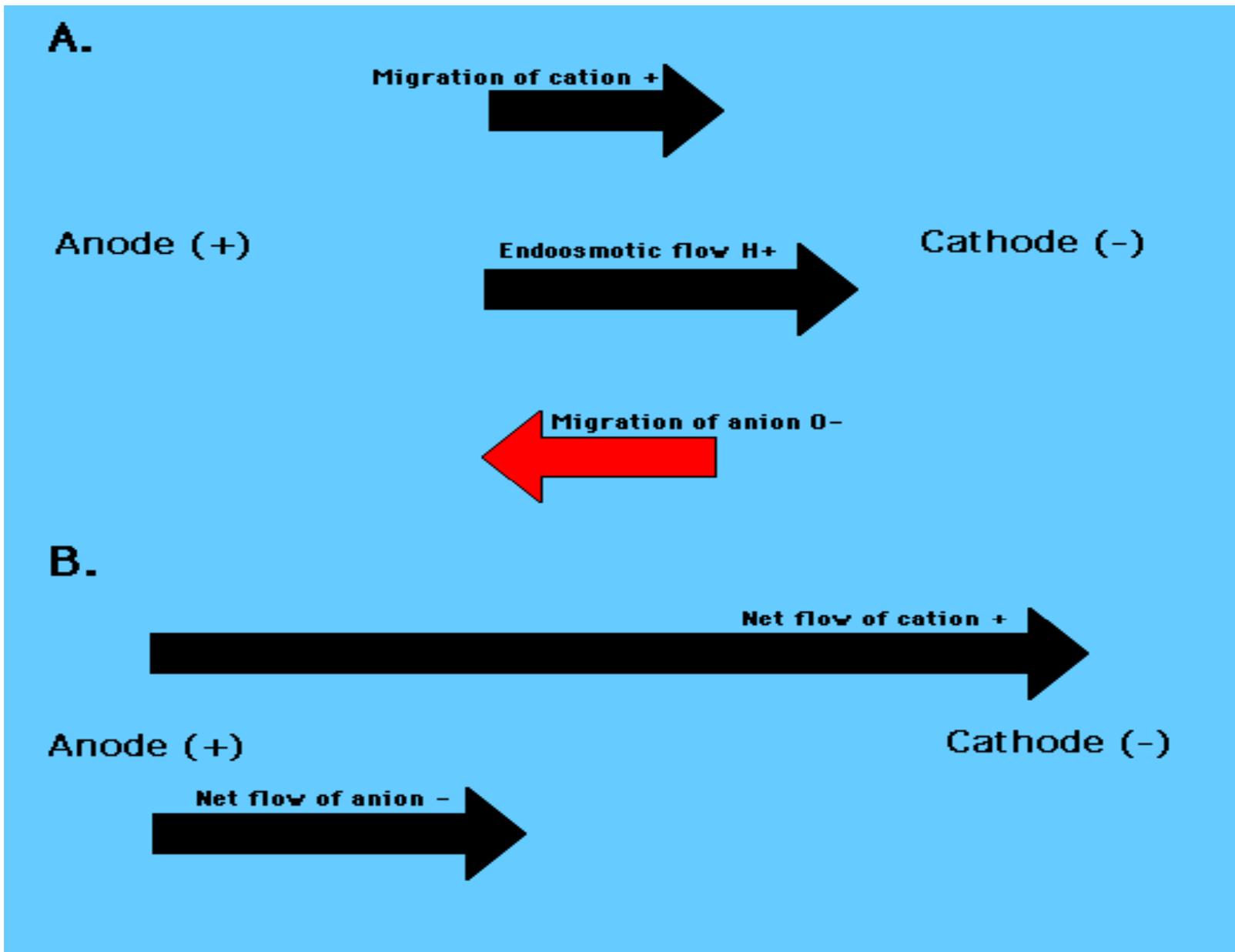
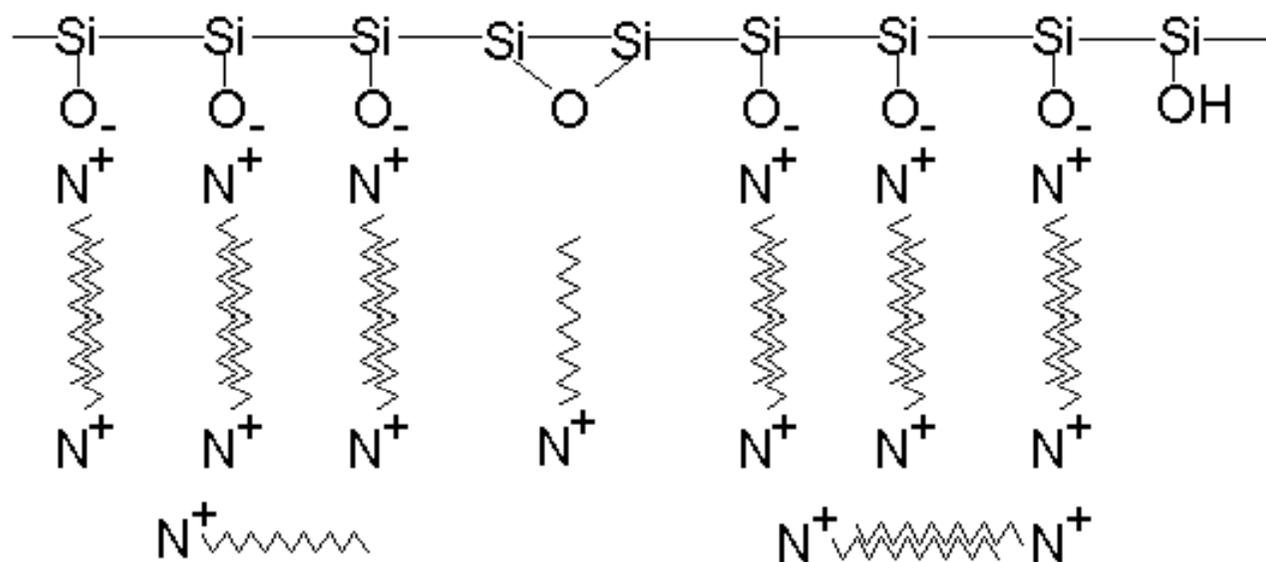
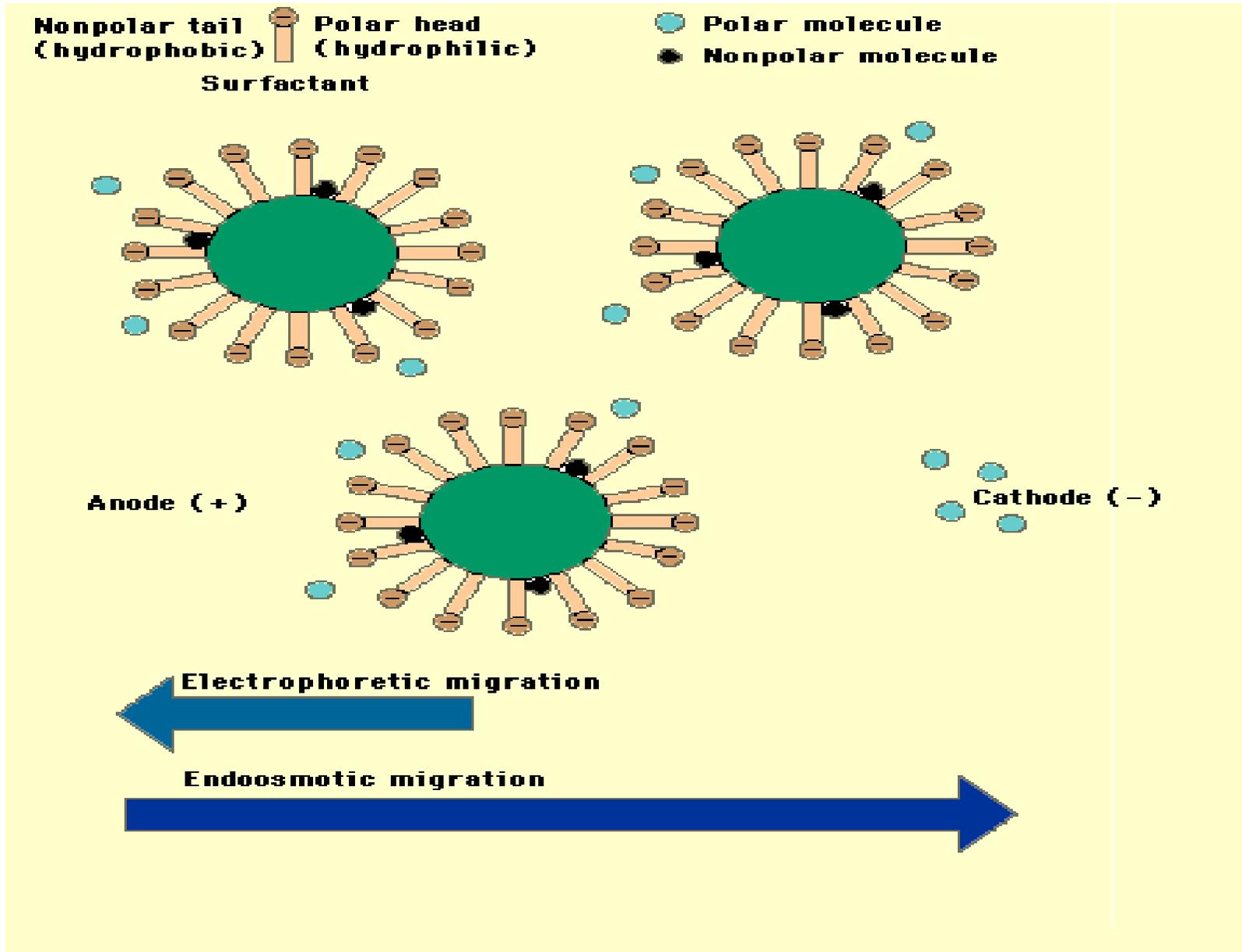


Figure 2
Influence of Quaternary Amine Surfactants
on EOF Reversal



Any Changes in this Dynamic Surface Equilibrium
 Due to Nitrogenous and/or Lipophilic Components in the
 Sample Matrix Will Change the Mobility of EOF.



🌐 Parámetros Analíticos

La CZE es la forma más simple.

Tiempo de migración

Movilidad

Dispersión de la zona del soluto

Eficiencia

Resolución

Movilidad y tiempo de migración:

El tiempo de migración es el tiempo requerido para que el soluto migre al punto de detección y está dado por el cociente de la distancia de migración y la velocidad.

Movilidad aparente del analito :

$$\mu_a = l / t E = l L / tV \quad (9)$$

Donde $\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$

V = voltaje aplicado

l = largo efectivo del capilar (al detector)

L = largo total del capilar

t = tiempo de migración

E= Campo eléctrico

En presencia de EOF, la medida de la movilidad se llama movilidad aparente (μ_a). La μ_e puede ser obtenida de la μ_a . La movilidad del EOF se puede medir en forma independiente, a través del uso de un marcador neutro que se mueve a una velocidad igual al EOF.

Marcadores: acetona, dimethyl sulfoxide (DMSO) etc

analito	TM	μ_a (cm ² /Vs)	μ_e (cm ² /Vs)
catión	38,4	3,05* 10⁻³	7,40*10⁻⁴
neutro	50,7	2,31* 10⁻³	2,31* 10⁻³
anión	93,1	1,26* 10⁻³	-1,05*10⁻³

$$\mu_a = l / t E = l L / tV \quad (9)$$

Donde $\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$

V = voltaje aplicado

l = largo efectivo del capilar (al detector)

L = largo total del capilar

t = tiempo de migración

E = Campo eléctrico

$$\text{Cación } \mu_a = lL / Vt = (50 * 58,5) / (25.000 * 38,4) = 3,05 * 10^{-3}$$

$$\text{Neutro } \mu_{EOF} = (50 * 58,5) / (25.000 * 50,7) = 2,31 * 10^{-3}$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} = (3,05 * 10^{-3}) - (2,31 * 10^{-3}) = 7,40 * 10^{-4}$$

Fuentes de amplitud de la zona:

a) Difusión longitudinal

-Define el límite fundamental de la eficiencia

b) Calor de Joule

-Permite una gradiente de temperatura y el flujo laminar

c) Longitud de la inyección

- Debería ser menor que la longitud de la zona controlada por la difusión

d) Adsorción de la muestra

- Interacción del analito con las paredes del capilar

a) Electrodispersión

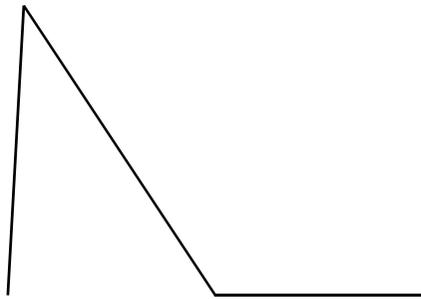
- Conductividades desiguales de la muestra y el buffer
- Solutos con conductividades más altas que el buffer
- Solutos con más baja conductividad que el buffer

b) Desnivel de los reservorios del buffer

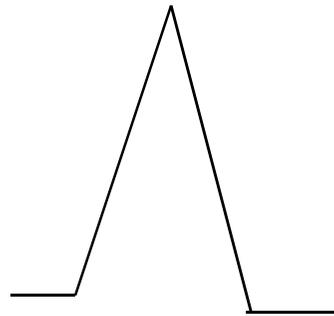
- Genera flujos laminares

c) Tamaño de la celda del detector

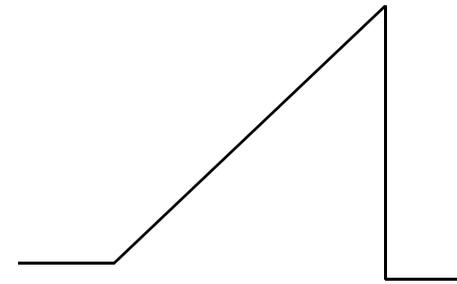
- Debería ser pequeño relativo al ancho de peak



B + +++ **B**
 +
 +



B ++ **B**
 ++
 ++



B +++ + **B**
 +
 +

Electrodispersión:

- Formas del peak sesgadas
- Alta conductividad (desenfoque) o baja conductividad de la muestra (enfoco)
- Estados isotacoforéticos temporales, debido al exceso de un ión determinado.

Sistema Electrolito

Requerimientos básicos:

- El buffer no debe tener efecto negativo en la separación
- Alta capacidad buffer y amplio rango de pH
- Pequeña variación del buffer con la temperatura
- En el caso de UV/Vis el buffer debe mostrar una baja absorbancia a la longitud de interés
- La movilidad del ión del buffer debería ser similar al analito para minimizar la dispersión electroforética.
 - La movilidad electroforética del contra-ión debería ser tan baja como sea posible para minimizar la generación de calor y utilizar altos voltajes.

Variables que afectan la eficiencia y selectividad que dependen de las siguientes propiedades del buffer:

* pH

* fuerza iónica

(la movilidad puede duplicarse si la fuerza iónica es incrementada 4 veces)

puede provocar:

aumento de la temperatura, cambios en la viscosidad

* Composición del buffer

aditivos: agentes complejantes, solventes orgánicos, surfactantes

Buffers	pK	Rango
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{CO}_2^-$	4,76	3,6-5,8
$\text{H}_3\text{PO}_4/ \text{H}_2\text{PO}_4^-$	2,12	1,5-3
$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$	7,21	5-8
$\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{PO}_4^{3-}$	12,67	11,5 - 13
Ácido cítrico/citrato	3,13/5,96/6,38	2-6
Borato-HCl	9,14 (12,73/13,8)	8,0-9,1
Borato-NaOH	9,14 (12,73/13,8)	9,2-11
CHES	10,4	9,4-11,4
TRIS	8	7,0-9,0

Análisis Químico

- ¿Cuál es la composición de la muestra?
- ¿Cuál es la concentración de los componentes de una muestra?

Comparación con una solución patrón – identificación -
cuantificación

- Fortificar la muestra
- Contrastar con otra técnica

“tener presente los siguientes parámetros y procedimiento”

- pH del buffer
- Fuerza iónica
- Pre-tratamiento del capilar
- Temperatura

Análisis cuantitativo:

área- altura

La C_x puede ser calculada por:

- estándar externo
- estándar interno

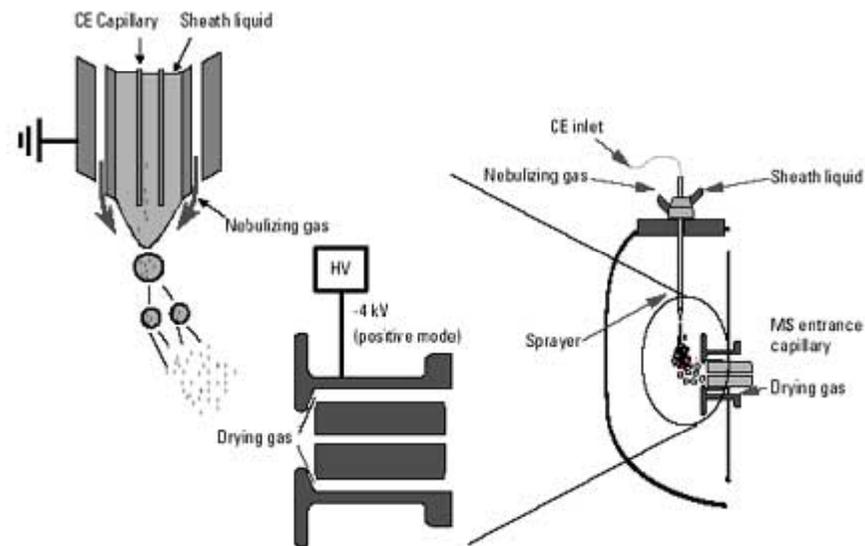
Validación: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad

CE-MS aumenta la utilidad de la separación a través de CE. El complemento con un espectrómetro de masa (MS) permite tener una información segura del peso molecular de un analito y también provee la información de su estructura que ayudan a la identificación de compuestos. Sin embargo todavía la interfase de las dos técnicas no es tan simple.

Como la EC se realiza a un **alto voltaje** hay todavía muchos aspectos que mejorar para disponer de una corriente estable para ambos, **la separación por CE y la ionización de MS**. Otro factor es el flujo en CE que no es suficientemente tan alto para mantener estable la ionización dentro de la fuente del espectrómetro de masa.

Entonces **se necesita un flujo de un líquido extra** que debe ser agregado al sistema de CE para obtener iones de los analitos en fase gaseosa.

Por tanto la interfase es crítica para obtener resultados eficientes en la separación a través de CE-MS con una interfase común.



CE-MS sprayer (image courtesy of [Agilent Technologies](#))

APLICACIONES

Separaciones de iones pequeños (inorgánicos y orgánicos) de alta y moderada movilidad

ANIONES

- Eliminación o inversión del FEO por recubrimiento de la pared del capilar con surfactantes catiónicos
- Análisis bajo polaridad reversa de los electrodos, con el ánodo como el lugar de la detección
- Hidróxido de dodecil-trimetilamonio; bromuro o hidróxido de trimetilamonio
(TTAB o TTA-OH), bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB), Bromuro o hidróxido de hexametonium, dietilentriamina.

Ejemplo 1:

$S_2O_3^{2-}$, Cl^- , I^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , ClO_3^- , CN^- , F^- , NO_3^-

Capilar, 70 cm ($L_d=62$) \times 75 μ m

electrolito: 5 mM cromato 0,5 mM TTAB

I. Hidrodinámica

V= - 20 kV

254 nm 4 minutos

Figure 4140: 4 Electropherogram of Typical Drinking Water; Milford, Mass.

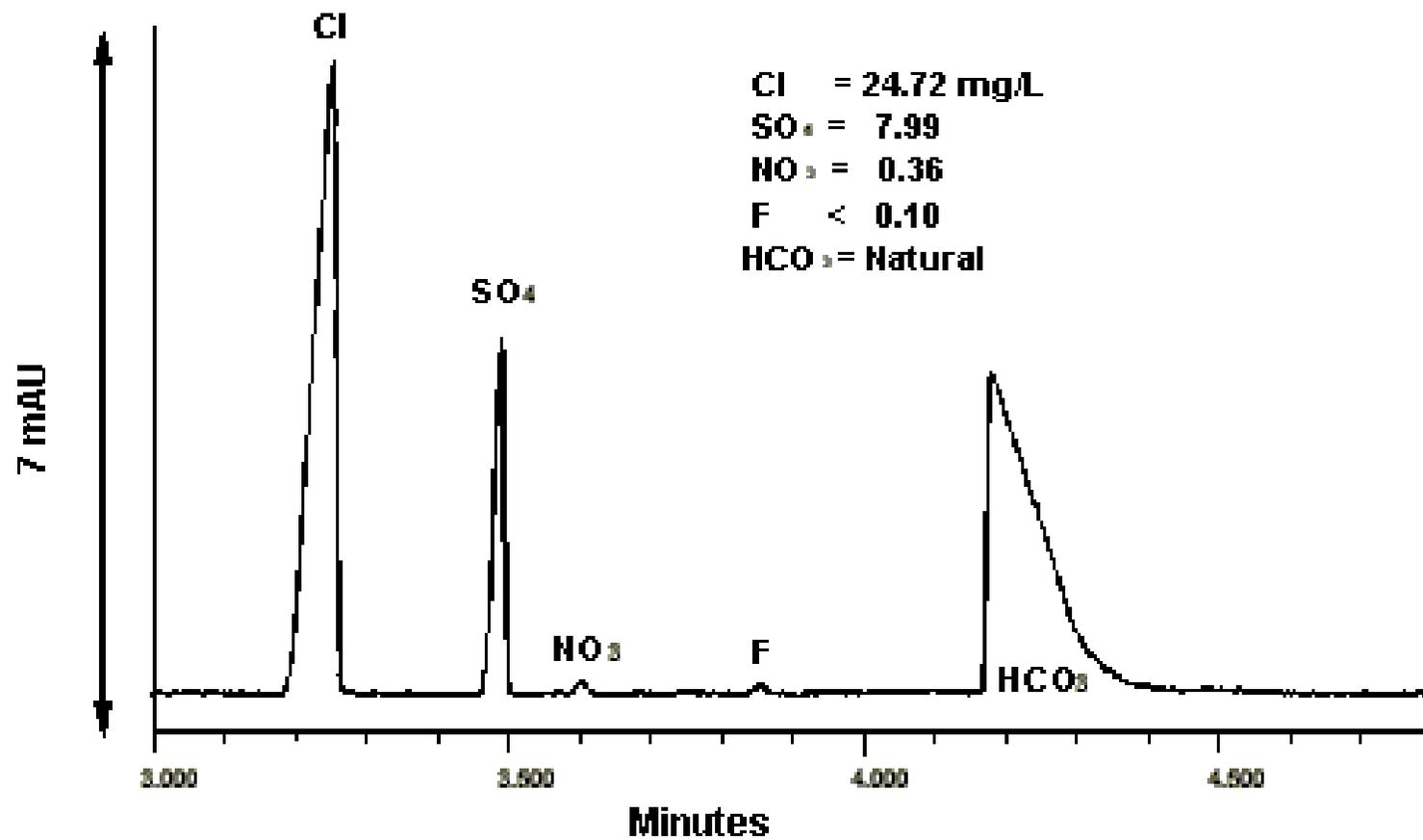
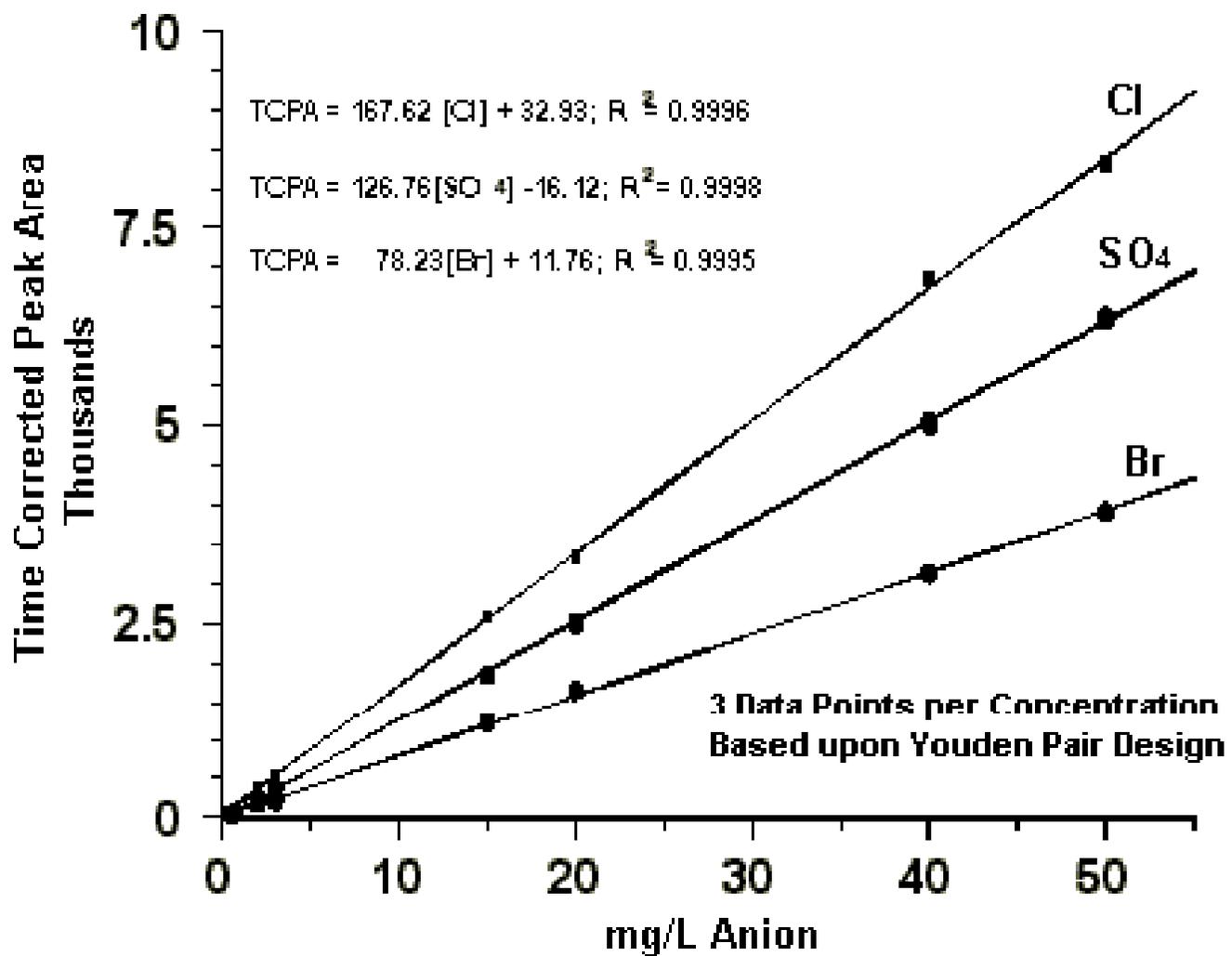


Figure 4140:5 Linearity Calibration Curve for Chloride, Bromide, and Sulfate



CATIONES

Metales alcalinos y alcalinotérreos - metales de transición

Se utilizan agentes complejantes débiles como:
ácido α -hidroxi-isobutírico (HIBA) + NICE-pak.

Separación de amonio: Utilización de éter corona como: 18-crown-6,
se incorpora al buffer solo o en combinación con un ácido orgánico.

Metales de transición:

Quelantes: EDTA, DTPA, NTA....

Detección: UV indirecta

Ejemplo 2

Separación de:

K^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Zn^{2+}
and Cu^{2+}

Capilar 60 cm x 75 μ m

Electrolito:

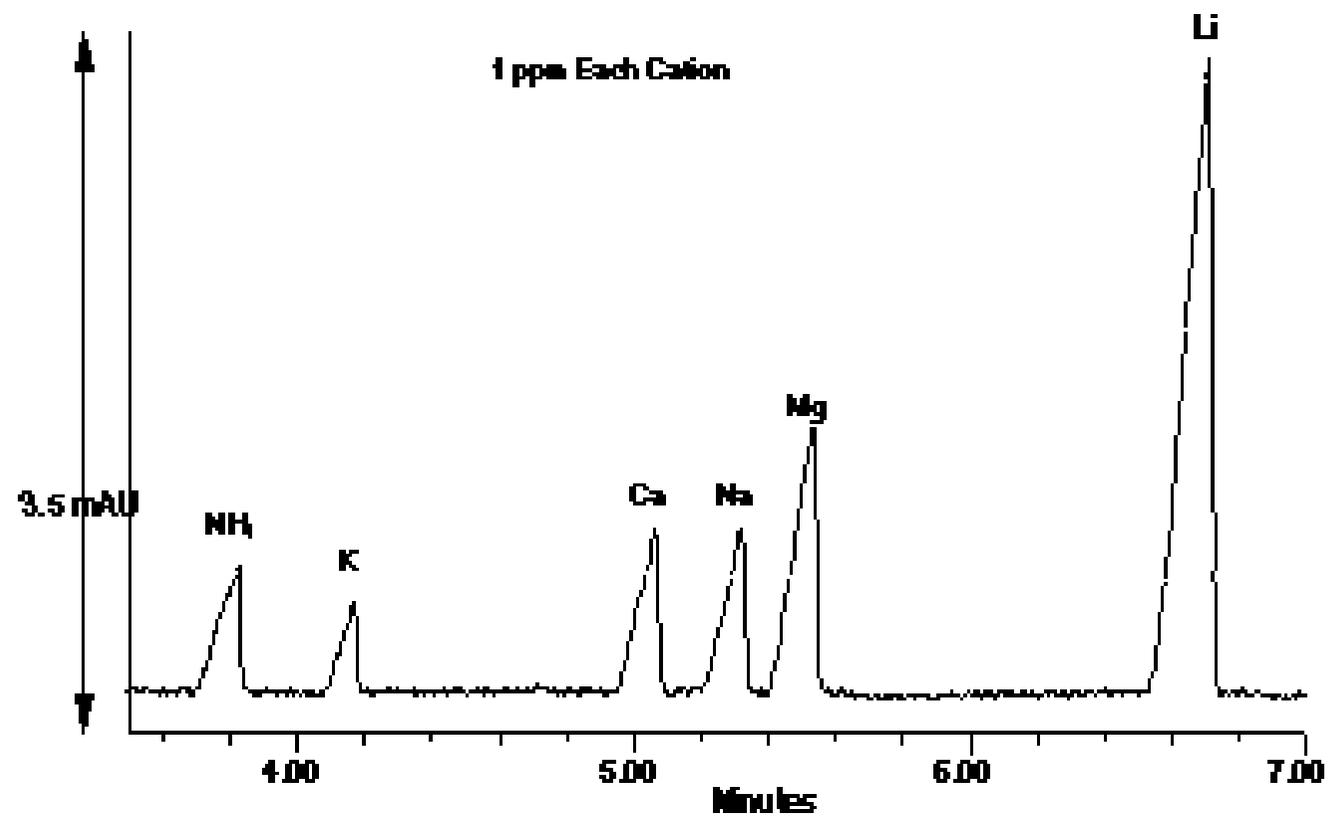
- creatinina 5 mM pH 4,4 con CH_3COOH - ácido α - hidroxibutírico (HIBA) 6,5 mM

Inyección hidrostática – 214 (185)nm

– 8 minutos

La adición de etilenglicol o metanol mejora el análisis.

Alkali and Alkaline Earth Cations



SULFONATOS Y ALQUILSULFONATOS

Detección UV indirecta y polaridad reversa usando electrolitos de baja movilidad.

Ejemplo 3.

C1-C7 alquilsulfonatos

Capilar 60 cm x 75 μm –
10 mM benzoato, 0,5 mM NICE-pak OFM Anion BT, pH 6,0

Inyección Hidrotática

V= 20 kV a 254 nm tiempo de corrida = 5,5 min.

ESPECIES ORGANOMETÁLICAS

Derivatización precapilar – Detección directa – detección indirecta
Eliminación del FEO por recubrimiento de poliacrilamida.

DROGAS Y PRODUCTOS NATURALES

Antibióticos - analgésicos – esteroides – flavonoides – vitaminas

Ejemplo 4 .

8 penicilinas

(amoxicillin, ampicillin, 6-aminopenicillanic acid, oxacillin,
cloxacillin, ticarcillin, nafcillin, dicloxacillin)

- Capilar 60x 75 μm
- Electrolito: NaH_2PO_4 a pH 9 ajustado con $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + **SDS** (sulfato dodecil sódico)
- Toma de muestra: Hidrostática
- V: 18 kV ;
- L.onda: 214 nm
- tiempo = 14 minutos

Ejemplo 5 Enalapril

Capilar de 57(LD=50) cm x 75 μ m
electrolito: - 80 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 8,5 + 100 mM SDS
V= 16 kV LO=254 nm Tiempo= 4 minutos

Ejemplo 6 Vitamina B6 y sus metabolitos

Capilar de 100 cm x 75 μ m
electrolito: 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 8,5 + 50 mM SDS
Inyección hidrostática V= 30 kV 200 nm 4 minutos

COMPUESTOS NEUTROS

Hidrocarburos alifáticos o aromáticos no pueden ser separados electroforéticamente
(Usar MEKC)

Herbicidas

Ejemplo 7 Atrazina y simazina

Capilar de 50 cm x 75 μm – 10 mM NaH_2PO_4 pH 8,5 + 25 mM SDS
pH 8 Inyección hidrostática V= 10 kV 225 nm
10 minutos

AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

Derivatización

Ejemplo 8. Aminoácido 23PTH

Capilar de 50(LD=30) cm x 50 μm

50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + NaH_2PO_4 -pH 9,0 + 100mM SDS

4,3 mM urea

Inyección hidrostática

V= 10,5 kV

Long. Onda 210 nm, corrida 30 minutos

Ejemplo 8 - 7 proteínas

- Capilar = 100cm x 50 μ m
- electrolito 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 9,5
- V 22 kV LO= 200 nm Tiempo=14 min

Después de cada corrida el capilar es lavado con NaOH 1 M y luego con el buffer

NUCLEÓTIDOS, OLIGONUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLÉICOS

Ejemplo 9 - Oligodeoxythymidylic acids $\text{pd}(\text{T})_{12-30}$

Capilar 40 (Ld=20) x 50 μ m
electrolito=Gel 75% en TRIS 50mM +50 mM ácido bórico + 7 mM urea
inyección electrocinética 1s,
4 kV; 260 nm 12 min

Amine Analysis

