

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Analítica**

**Grupo de investigación FQM-297 "Control Analítico,  
Ambiental, Bioquímico y Alimentario"**



**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ELECTROFORÉTICAS AVANZADAS**

presentada por

**Miguel Navarrete Casas**

para optar al grado de

**Doctor Europeo en Química**

**Granada, 2007**



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la beca predoctoral concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-297 "Control analítico, ambiental, bioquímico y alimentario" del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía, procedentes de diferentes proyectos, contratos y subvenciones de las Administraciones central y autonómica, plan propio de investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de la investigación.



**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ELECTROFORÉTICAS AVANZADAS**

por

**Miguel Navarrete Casas**

Visado en Granada a 21 de Septiembre de 2007

Fdo: Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez  
Catedrático del Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. D. Antonio Segura Carretero  
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor Europeo en Química.

Fdo: Miguel Navarrete Casas



El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y Director del grupo de investigación FQM-297 "Control analítico, ambiental, bioquímico y alimentario"

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral bajo el título: **"DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ELECTROFORÉTICAS AVANZADAS"**, que ha sido realizado bajo mi dirección y la del Dr. D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios que el grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y en los del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada; también, parcialmente, en las instalaciones de la Universidad de Bolonia (Italia) (Dipartimento di Agraria, sede de Bologna), reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que el doctorando D. Miguel Navarrete Casas pueda optar al grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 21 de Septiembre de 2007.



*A mí padrino y madrina...*  
*(porque ya queda poca gente tan buena como vosotros)*



Aunque posiblemente penséis que esta ha sido la parte más sencilla de escribir, dado la complejidad que supone plasmar en una memoria todo el estudio experimental llevado a cabo a lo largo de cuatro años de investigación, para mí, y aquellos que ya hayáis pasado por este trámite bien lo sabréis, ha resultado bastante complicado encontrar una manera corta pero a la vez representativa de todo mi agradecimiento para aquellas personas que de manera directa o indirecta han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral.

Por tanto agradecer:

A mis padres, a los que ni con un millón de gracias les podría agradecer todo el esfuerzo, sacrificio y paciencia con la que me han tratado no solo a lo largo de esta Tesis Doctoral sino a lo largo de toda mi vida (sois "maravillosos"). También a mis hermanos, Toni, Ricardo, Jose y Cristina (parecen los hermanos Pontípee), que aunque a día de hoy están muy lejanos geográficamente los siento más cerca de mí que nunca. Y como no a mi super-abuela, gracias a todos.

A mis Directores de Tesis, los doctores D. Alberto Fernández Gutiérrez, D. Antonio Segura Carretero y Dña. Carmen Cruces Blanco con los que he compartido tres años de mi vida, guiándome e ilustrándome, en el tortuoso camino de la investigación. Gracias por haber sido tan pacientes y comprensivos en el "particular" desarrollo con la que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral.

A tutto il dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, che in un modo o nell'altro mi hanno aiutato e guidato nel tempo che siamo stati assieme. Il professor Giovanni Dinelli, uno delle persone più professionale e simpatiche che ho mai conosciuto (e la sua sposa Lili). Alla Dra. Alessandra Bonetti (Ferrari), la

macchina piú bella della Italia, e non posso dimentecare alla Dra. Ilaria Marottí, Maurizio Minelli, Simone, Grazia, Rosanna e Roberta, grazie a tutti.

A mis compañeros del grupo de investigación FQM 297, el hecho de que se dibuje una sonrisa en mi cara mientras escribo esto lo dice todo, son tantísimos los buenos recuerdos que tengo guardados con cada uno de vosotros que necesitaría una página por cada uno para poder agradecerlos el haberos conocido. Por tanto "Jondi", "Trix", "Sonicá", "Deivid" (menos mal que no he dedicado esa página a cada uno porque sino...), "Alfonso", "Ale", "Botis", "Caravaca" gracias (espero no dejarme ninguno).

A mis amigos "de toda la vida", que a pesar de la distancia física establecida en estos dos últimos años siempre han estado "cerca", ayudándome, escuchándome, animándome, y demostrándome que por mucha que sea la distancia, hay cosas que nunca cambiarán. Así que Maikel (el que nunca falla), Chavi (partícipe de largas tertulias), Yeri (con "paquito" y "paquita"), Juandi (el pequeño "Gran Hombre"), soís de lo mejorcito que tengo.

Y por supuesto a "La banda del Bate", liderada por Tiger (sabio, justo, correcto e íntegro líder), David (el compañero leal de batallas que todo el mundo desearía tener), Corcu (el gran descubrimiento) y Mirentxu (la principal razón por la que me siento casi como en casa) gracias a todos, soís únicos.

Y por último agradecer, al grupo de investigación FQM-297 "Control analítico, ambiental, bioquímico y alimentario", Al Ministerio de Educación y Ciencia, al Plan Propio de Investigación de la UGR, así como las empresas partícipes en los resultados de la investigación que han hecho posible la realización de esta memoria.

## ***ÍNDICE***



---

## ***A.- OBJETO Y JUSTIFICACIÓN***

## ***B.- RESUMEN***

## ***C.- INTRODUCCIÓN***

### ***1. Técnicas de separación y su clasificación***

### ***2. La electroforesis capilar como técnica de separación***

#### ***2.1. Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar***

#### ***2.2. Principios básicos de separación***

#### ***2.3. Factores que afectan a la separación electroforética***

#### ***2.4 Modalidades de electroforesis capilar***

##### ***2.4.1 Electroforesis capilar en zona (CZE)***

##### ***2.4.2. Cromatografía Electrocinética (EKC)***

###### ***2.4.2.1. Separación por MEKC.***

###### ***2.4.2.2 Separación por CD-EKC.***

###### ***2.4.2.3 Separación por MEKC modificado con CD (CD-MEKC).***

##### ***2.4.3 Electroforesis capilar en gel (CGE)***

##### ***2.4.4 Isoelectroenfoque capilar***

##### ***2.4.5 Isotacoforesis capilar***

##### ***2.4.6 Electro cromatografía capilar (CEC)***

### ***3. Sistemas de detección en electroforesis capilar***

#### ***3.1. Detección con técnicas ópticas.***

##### ***3.1.1. Absorción UV-Visible.***

##### ***3.1.2. Fluorescencia.***

##### ***3.1.3. Fosforescencia.***

##### ***3.1.4. Quimioluminiscencia.***

##### ***3.1.5. Termoópticos.***

##### ***3.1.6. Índice de refracción.***

##### ***3.1.7. Dispersión Raman.***

#### ***3.2. Detectores electroquímicos.***

##### ***3.2.1 Detectores conductimétricos.***

##### ***3.2.2 Detectores potenciométricos.***

##### ***3.2.3 Detectores amperométricos.***

**3.3. Detección con espectrometría de masas.**

**3.3.1 Interfases**

**3.3.1.1 Ionización por electrospray (ESI)**

**3.3.2 Analizadores de masas**

**3.3.2.1 Tiempo de vuelo**

**D.- PARTE DOCUMENTAL Y EXPERIMENTAL. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.**

**Capítulo 1: Determinación de antiepilépticos en suero humano por Cromatografía Electrocinética Micelar con detección fotométrica directa.**

**Capítulo 2: Determinación de pesticidas aminados y metabolitos en aguas de riego mediante CE en la modalidad EKC-CD y detección por LIF.**

**Capítulo 3: Determinación de ácidos alifáticos en miel usando ECZ con modificadores de FEO, polaridad invertida y detección fotométrica directa.**

**Capítulo 4: Determinación de soja y maíz transgénicos Usando Reacción Competitiva en Cadena de la polimerasa acoplada a Electroforesis en Gel de agarosa o a Electroforesis Capilar en Gel con Detección Fotométrica.**

**Capítulo 5: CE-ESI-TOF-MS para la determinación de derivados alcaloides de los tropanos en un preparado farmacéutico de un extracto de una hoja de la Belladona.**

**E.- CONCLUSIONES**

***RESUMEN***



En la presente memoria se reúnen los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada "Desarrollo de metodologías electroforéticas avanzadas".

La estructura de la misma consiste en primer lugar en una INTRODUCCIÓN, en la que se definen en líneas generales, entre otras las diferentes metodologías electroforéticas empleadas (en zona, en medios micelares, en ciclodextrinas) y los sistemas de detección (UV, FIL y MS) acoplados y utilizados en los diferentes métodos que se han desarrollado.

Seguidamente se presentan los RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN de los mismos, los cuales se dividen en cada uno de los capítulos desarrollados en la Tesis, un total de cinco, que son definidos a continuación:

El objetivo fundamental del primer capítulo ha sido la puesta a punto de un método electroforético para antiepilépticos polares utilizando electroforesis capilar acoplada al sistema de detección más ampliamente utilizado en equipos comerciales, como es la espectroscopía de absorción molecular UV-Vis con detector de batería de diodos (DAD). Se ha desarrollado un método electroforético en la modalidad de EKC, más concretamente empleando medios micelares (MEKC) como pseudofase para la monitorización de cuatro antiepilépticos, como son: Etosuximida (Eto), Fenitoína (Fen), Primidona (Pri) y Carbamazepina (Cbz).

En el segundo capítulo se pone de manifiesto la gran capacidad y sensibilidad de la Electroforesis Capilar con detección por Fluorescencia Inducida por Láser (FIL), para el análisis de pesticidas aminados derivatizados con fluoresceína isotiocianato. Para ello, se han seleccionado 17 pesticidas y algunos de sus metabolitos, sin fluorescencia nativa a la longitud de onda de excitación del láser, pero con grupos amino primarios o secundarios, susceptibles de ser marcados por la fluoresceína isotiocianato,

de manera que puedan ser determinados por FIL a la longitud de onda de 488/520 nm. En este método de electroforesis capilar se utilizaron Ciclodextrinas como modificadores orgánicos del medio electroforético.

En el tercer capítulo de la memoria se ha desarrollado un método para el análisis de ocho ácidos alifáticos mediante CZE-UV con polaridad reversa y flujo electroosmótico (FEO) invertido. Estos compuestos han despertado gran interés por las funciones biológicas que pueden desempeñar, destacando su acción como antioxidantes naturales, y por el papel que juegan en la calidad de los alimentos y en sus propiedades organolépticas. El método desarrollado se ha aplicado al análisis de nueve muestras de miel, de las cuales ocho eran de origen multifloral y una unifloral.

En el cuarto capítulo se han propuesto dos metodologías, una en gel convencional y otra de electroforesis capilar en gel (CGE) con detección UV, para poder determinar genes transgénicos en cereales, concretamente en harina de soja y maíz, que han sido genéticamente modificados. El trabajo experimental descrito en este capítulo se ha desarrollado en colaboración con el Departamento de Ciencia y Tecnología Agroambiental de la Universidad de Bolonia.

El propósito del quinto capítulo ha sido establecer una metodología electroforética en zona con detección por espectrometría de masas para llevar a cabo el estudio de derivados alcaloides de los tropanos a partir de extractos de la hoja de la *Bella Dona*, vendido en farmacias, como un preparado útil como sedante entre otras funciones. Para dicho estudio se acopló a un equipo de electroforesis capilar un analizador de tiempo de vuelo (TOF), usando la ionización por electrospray como interfase para dicha asociación (ESI) lo que permitió la identificación de varios alcaloides.

***RIASSUNTO***



Nel presente riassunto vengono elencati i risultati ottenuti nel corso dello svolgimento della tesi dal titolo: "Desarrollo de metodologías electroforéticas avanzadas".

Nella parte introduttiva sono riportati, in termini generali, le diverse matrici studiate, le tecniche separative e i sistemi di rilevamento utilizzati (UV-DAD, FIL e MS).

I cinque capitoli successivi, qui di seguito brevemente riassunti, descrivono l'attività sperimentale effettuata per la messa a punto di metodi elettroforetici efficaci per l'analisi di composti specifici, ed i risultati ottenuti.

L'obiettivo principale del primo capitolo è stato quello di sviluppare un metodo elettroforetico per composti polari antiepilettici utilizzando l'elettroforesi capillare accoppiata ad un sistema di rilevamento ampiamente utilizzato nei laboratori analitici, come la spettroscopia ad assorbimento molecolare UV-vis con rilevatore DAD. I risultati ottenuti evidenziano come il metodo sviluppato, caratterizzato dall'utilizzo di mezzi micellari (MECK) come pseudofase, sia risultato efficace per il rilevamento di quattro sostanze antiepilettiche, tra cui etosuccimide (ETO), primidone (PRIMA), fenitoina (FEN) e carbamazepina (CHZ).

Nel secondo capitolo viene invece mostrata la potenzialità e la sensibilità dell'elettroforesi capillare con rilevamento a fluorescenza laser-indotta (FIL) per l'analisi di pesticidi amminici, attraverso una derivatizzazione pre-colonna con fluoresceina isotiocianato. A tal fine, sono stati analizzati 17 antiparassitari, normalmente utilizzati nella parte occidentale della regione di Almeria, ed alcuni dei loro derivati metabolici. Questi composti non presentano fluorescenza nativa ma possiedono gruppi amminici primari o secondari che possono reagire con la fluoresceina isotiocianato, in modo tale da poter essere rilevati con LIF alla lunghezza d'onda di 488/520 nm.

Nel terzo capitolo viene descritto la messa a punto di un metodo per l'analisi di otto acidi alifatici, presenti in campioni di miele, attraverso una separazione elettroforetica con rilevamento UV e flusso elettrosmotico (FEO) inverso. Questi composti sono di particolare interesse per le funzioni biologiche che possono svolgere e per il loro ruolo come antiossidanti naturali. Inoltre gli acidi alifatici hanno un ruolo fondamentale nel conferire al miele le sue caratteristiche organolettiche. Il metodo sviluppato è stato utilizzato per l'analisi di nove campioni, di cui otto multiflorali e uno uniflorale.

Nel quarto capitolo è stato messo a punto un metodo analitico al fine di controllare e verificare la presenza e la quantità di organismi geneticamente modificati in campioni di soia e mais trasformati per la resistenza all'erbicida Glyphosate (Roundup Ready). In particolare, i prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR quantitativa competitiva sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio e mediante elettroforesi capillare con rilevamento UV, allo scopo di confrontare l'efficacia dei due metodi. Il lavoro sperimentale descritto nel presente capitolo è stato svolto presso il gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Giovanni Dinelli del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali dell'Università di Bologna, Italia.

Infine, l'obiettivo del quinto capitolo è stato quello di sviluppare una metodologia per eseguire lo studio dei derivati alcaloidei del tropano, estratti da un preparato farmaceutico ottenuto con foglie di *Atropa belladonna*. In questo studio l'elettroforesi capillare è stata associata ad un rilevatore di tempi di volo (TOF), utilizzando come interfaccia la ionizzazione elettrospray (ESI).

***OBJETO***



El desarrollo de la electroforesis capilar como herramienta analítica constituye un campo de investigación fundamental y aplicado muy interesante que se está realizando en diferentes grupos de investigación dentro del área de la Química Analítica. Mediante esta técnica se pueden llevar a cabo la separación de sustancias de diferente naturaleza con tiempos de análisis cortos además de una elevada eficiencia y alta resolución. El empleo de detectores on-line permite realizar análisis empleando cantidades de muestra pequeñas y en algunos casos de manera totalmente automatizada.

El objetivo general de la presente memoria es la puesta a punto de un variado número de aplicaciones de la separación electroforética realizada con compuestos químicos de diferente naturaleza y diferente actividad y con muestras de diversa naturaleza para demostrar el potencial de la electroforesis capilar como herramienta analítica para resolver problemas analíticos actuales y generar una visión amplia de las posibilidades que ofrece esta técnica separativa en sus diferentes modalidades en uso y cuando se acopla a diversos sistemas de detección tanto ópticos como espectrométricos con la finalidad de conseguir mayor sensibilidad, selectividad e información estructural de los compuestos analizados.



## ***INTRODUCCIÓN***



## *1. Técnicas de separación y su clasificación.*

En la mayoría de los análisis, la medida debe estar precedida por una serie de pasos preliminares que son, sin duda, más laboriosos y lentos que el proceso final.

Existen muy pocas propiedades químicas o físicas que sean específicas de una sola especie química, por lo que las reacciones utilizadas y las propiedades medidas suelen estar compartidas por varios elementos o compuestos. Esta falta de especificidad dificulta el análisis y hace imprescindible la introducción de una etapa de separación y, por tanto, el empleo de técnicas de separación previas a la medición de la señal analítica, constituyendo una de las etapas más importantes del proceso analítico global.

Para llevar a cabo los procedimientos de separación, la Química Analítica dispone de numerosas técnicas que se basan en las diferencias existentes en las propiedades físico-químicas de los distintos componentes de una muestra.

Debido al gran número de técnicas de separación descritas, existen numerosos intentos de sistematización que resultan intuitivos y que, además, proporcionan una idea del funcionamiento de cada una y su interrelación.

De las distintas clasificaciones de las técnicas analíticas de separación, la más usada es aquella que permite la división de las mismas en dos grandes grupos:

1. Técnicas discontinuas: aquellas que no portan en sí mismas la detección o determinación de las especies separadas, es decir, la medición de la señal analítica se efectúa de manera discontinua respecto a la separativa. Tal es el caso de la precipitación, destilación o extracción líquido-líquido.

2. Técnicas continuas: aquellas que implican o pueden implicar la detección o determinación de las especies involucradas de manera continua después de ser separadas. Dentro de estas técnicas se encuentran dos grandes grupos, las cromatográficas y no cromatográficas. Dentro de estos grupos, las de mayor aplicación, hasta el momento, han sido las técnicas continuas cromatográficas tales como la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos, en las cuales, los sistemas de separación y detección están integrados, por lo que el cromatógrafo actúa globalmente como instrumento suministrando información cualitativa y cuantitativa. Dentro del grupo denominado técnicas continuas no cromatográficas, se encuentra una técnica de separación de enorme interés y desarrollo actual denominada **Electroforesis Capilar (CE)**.

Las razones por la cual esta técnica de separación ha cobrado tanto interés en los últimos años, se debe a que presenta enormes y excitantes posibilidades<sup>1</sup>, puesto que permite separaciones rápidas y eficaces de componentes cargados y no cargados que se encuentran presentes en pequeñas cantidades en una muestra problema. Además, de todas sus características, quizás las más sobresalientes sean la rapidez, versatilidad y bajo coste, factores que pueden llegar a ser muy importantes en campos como el análisis de alimentos<sup>2</sup>, biología molecular<sup>3</sup> o el análisis farmacéutico<sup>4</sup> y que la hacen competir muy favorablemente con las ya extensamente establecidas técnicas cromatográficas, especialmente, con la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

---

[1] P. Camilleri, *Chemical Comm.* 49(6) (1996) 1851.

[2] P. F. Canalon, *Journal of AOAC International*, 78(1) (1995) 12.

[3] R. T. Kennedy, M. D. Oates, B. R. Cooper, B. Nickerson, J. W. Jorgenson, *Science* 246 (1989) 57.

[4] K. D. Altria, *J. Chromatogr. A*, 844(1-2) (1999) 371.

## 2. La electroforesis capilar como técnica de separación

La técnica de separación, que actualmente denominamos como Electroforesis Convencional (*electro* = electricidad y *foros* = llevar), fue introducida, por primera vez, como herramienta analítica, por el químico sueco TISELIUS en 1930, aunque no fue hasta 1937<sup>5</sup> cuando se desarrolló el primer aparato denominado *celda electroforética*, por la cual recibió el Premio Nóbel en 1948.

Se puede decir que la electroforesis es una técnica de separación: "*en la que las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad, sentido y velocidad, bajo la acción de un campo eléctrico*".

Estas separaciones por electroforesis convencional, han sido y siguen siendo muy eficaces y de muy extensa aplicación, principalmente en la identificación o cuantificación de macromoléculas, especialmente proteínas, pero dichas separaciones presentan una serie de inconvenientes:

- Son técnicas lentas y laboriosas.
- Tienen tendencia a ser poco reproducibles.
- No permiten la automatización.

Para evitar todos estos inconvenientes asociados a los fenómenos de convección térmica que se producían por llevar a cabo las separaciones en disolución, surgió una alternativa que consistió en emplear *tubos capilares* de diámetros muy pequeños como celdas electroforéticas, dando lugar a una nueva forma de electroforesis que se denominó Electroforesis Capilar.

Las separaciones por electroforesis capilar están basadas en: "*las diferencias en la movilidad electroforética de las especies a separar en los*

---

[5] A. Tiselius, Trans. Faraday Soc., 33 (1937) 524.

*medios electroforéticos dentro de estos pequeños capilares*<sup>6-9</sup>. Esta técnica fue descrita, originalmente, como electroforesis libre, a finales de los años 60, concretamente en 1967 cuando HJERTÉN<sup>10</sup> utilizó capilares de 3 mm de diámetro interno empleando campos eléctricos altos. Pero no fue hasta 1974 cuando VIRTANEN<sup>11</sup> describió las ventajas de usar capilares con diámetros tan pequeños.

Todos estos primeros trabajos sobre EC se llevaron a cabo con instrumentación adaptada de la electroforesis convencional y no fue hasta 1979 cuando MIKKERS *y col.*<sup>12</sup>, emplearon capilares de teflón con diámetros internos de 200 µm para la electroforesis libre.

Pero a pesar de las ventajas que ya se vislumbraban del empleo de la electroforesis capilar en relación con la electroforesis convencional, estas publicaciones no despertaron gran interés y no fue hasta los trabajos de JORGENSON y LUCKACS<sup>13,14</sup>, en los que se empleaban capilares de diámetros de unos 75 µm hechos de cristal de pyrex, cuando se puede considerar el *comienzo de la electroforesis capilar*.

Los primeros estudios sobre los principios de funcionamiento de la técnica se deben a TSUDA *y col.*<sup>15</sup> incluyendo el efecto del pH, densidad de corriente en el flujo electroosmótico, relaciones entre el tamaño de la muestra, corriente y el voltaje con la eficacia.

---

[6] A. G. Ewing, R. A. Wallingford, T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 292.

[7] N. A. Guzmán, L. Hernández, B. G. Hoebel, *BioPharm.*, 2 (1989) 22.

[8] B. L. Karger, A. S. Cohen, A. Guttman, *J. Chromatogr.*, 492 (1989) 585.

[9] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Adv. Chromatogr.*, 29 (1989) 1.

[10] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967) 122.

[11] R. Virtanen, *Acta polytech. Scand.*, 123 (1974) 1.

[12] F. Mikkers, F. Everaerts, T. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 1.

[13] J. W. Jorgenson, K. D. Luckacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 209.

[14] J. W. Jorgenson, K. D. Luckacs, *Science* 222 (1983) 266.

[15] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, 264 (1983) 385.

La historia del desarrollo de la CE durante el último siglo, ha sido revisada por COMPTON y BROWNLEE<sup>16</sup> y se presenta en la tabla 1. Como se observa, la electroforesis capilar es una técnica muy reciente cuyo desarrollo final tuvo lugar en el año 1981, es decir, hace 26 años, aunque la aparición de los equipos comerciales se ha hecho disponible, de forma extendida desde hace unos 18 años.

Año	Investigadores	Desarrollo
1886	Lodge	Migración de H <sup>+</sup> en un tubo con gelatina de fenolftaleína.
1899	Hardy	Movimiento de globulinas en tubos en forma de U con corriente eléctrica.
1923	Kendall y Crittenden	Separación preparativa de isótopos en tubos en forma de U con agar.
1937	Tiselius	<i>Desarrollo del primer aparato para electroforesis convencional.</i>
1956	Porath	Electroforesis en columna usando polvo de celulosa.
1965	Tiselius	Electroforesis libre de partículas de virus en capilares rotatorios de 3 mm de d.i.
1967	Hjertén	<i>Descripción de la electroforesis capilar como electroforesis libre.</i>
1974	Virtanen	Demostración de las ventajas de emplear capilares de diámetros más pequeños.

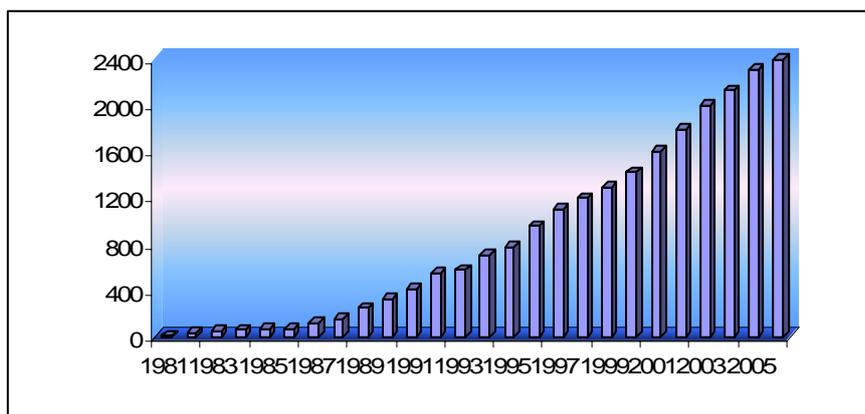
[16] S. Compton, R. Brownlee, *Biotechniques* 6 (1988) 432.

1979	Mikkers	<i>Electroforesis en capilares de teflón (&lt;200 <math>\mu\text{m}</math> d.i.)</i>
1981	Jorgenson y Luckacs	<i>Comienzo de la electroforesis capilar en capilares de pyrex (&lt;75 <math>\mu\text{m}</math> d.i.)</i>
1983	Hjertén	Adaptación de la SDS-PAGE a la electroforesis capilar en gel.
1984	Terabe	<i>Aparición del modo de cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC).</i>
1987	Cohen y Karger	Demostración de la eficacia de utilizar capilares de diámetros muy pequeños en la electroforesis capilar en gel.
1989		<i>Aparición del 1<sup>er</sup> instrumento comercial de electroforesis capilar.</i>

---

*Tabla 1. Desarrollo histórico de la electroforesis capilar .*

Sin embargo, a pesar de ser una técnica tan reciente, ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, como se demuestra por la evolución del número de publicaciones aparecidas acerca de esta técnica, desde sus comienzos hasta nuestros días (ver figura 1).



*Figura 1. Evolución del número de publicaciones sobre electroforesis capilar.*

Las razones para esta aplicación creciente de la técnica se deben a sus principales características, que son:

- Requerir cantidades de muestra y reactivos muy pequeñas.
- Trabajar con disoluciones tampón acuosas.
- Poder llevar a cabo las separaciones a temperatura ambiente, evitando problemas de descomposición o desnaturalización de las muestras.
- Presentar separaciones con una eficacia muy alta, al trabajar con capilares muy pequeños en los cuales se disipa muy bien el calor generado por aplicación de voltajes altos, lo que minimiza el ensanchamiento de los picos electroforéticos, obteniendo eficacias de 400.000 platos teóricos que compiten favorablemente con los que se consideran altos en la cromatografía líquida, es decir, unos 20.000 platos teóricos.
- Presentan tiempos de separación muy cortos al emplear voltajes altos y capilares cortos.

- Es fácilmente automatizable en distintas etapas del proceso, tanto en la inyección de la muestra como para la toma de datos, cuantificación y almacenamiento de los mismos.
- Puede ser aplicable a una gama muy amplia de analitos, en comparación con cualquier otra técnica de separación, por el hecho de existir distintos modos de aplicación de la electroforesis capilar.

A la vista de este desarrollo histórico de la CE, se puede afirmar que es una de las técnicas de separación de mayor expansión actualmente en los laboratorios analíticos y que posee un campo de investigación muy amplio.

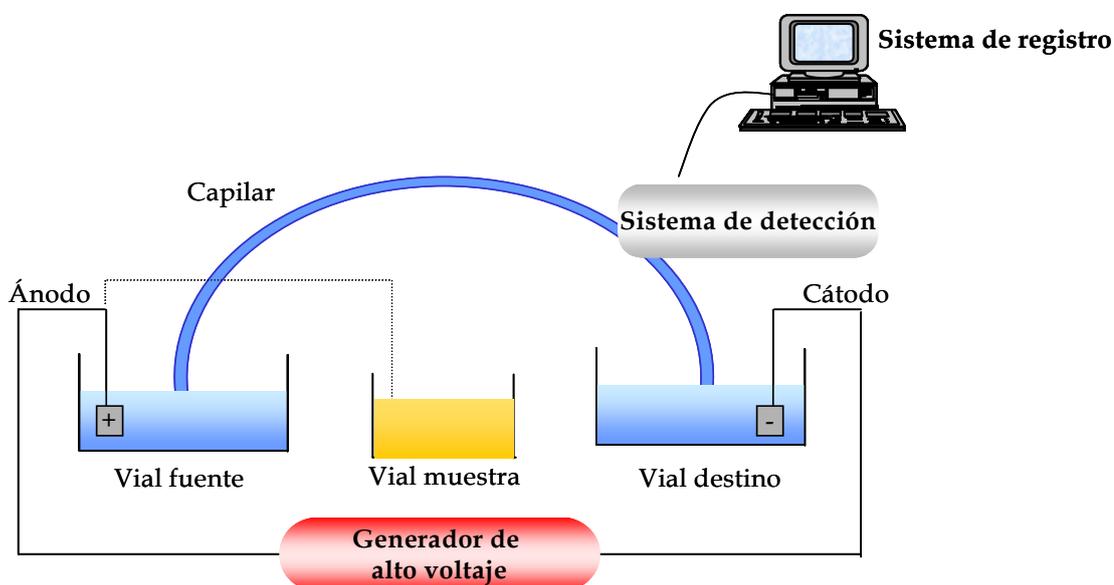
## **2.1. Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar**

Como se ha indicado anteriormente, la CE se basa en el movimiento bajo la acción de un campo eléctrico en un medio electroforético, normalmente acuoso, de las especies cargadas de una muestra. Por ello, los componentes básicos de un equipo de CE (Figura 2) son los siguientes:

- ✓ Generador de alto voltaje
- ✓ Viales fuente, destino y muestra
- ✓ Capilar
- ✓ Sistema de termostatación
- ✓ Sistema de inyección de la muestra
- ✓ Sistema de detección
- ✓ Sistema de registro

Este conjunto básico de componentes puede ser ampliado con otros como muestreadores automáticos, colectores de fracciones, diferentes softwares, los cuales marcan las diferencias entre unos instrumentos y otros<sup>17</sup>.

Como se observa en la figura 2, los extremos de un capilar lleno de disolución tampón se conectan a unos recipientes llenos de la misma disolución y en ellos existen unos electrodos conectados a un generador de alto voltaje.



*Figura 2. Componentes básicos de un equipo de CE.*

Si la muestra se coloca en el recipiente donde está el extremo anódico del capilar y es inyectada a través de uno de los sistemas de inyección (hidrodinámica o electrocinética), al aplicar un campo eléctrico a lo largo del líquido, los iones con carga positiva (cationes) migrarán hacia el electrodo con carga negativa (cátodo) y los iones con carga negativa (aniones)

[17] R. P. Oda, T. C. Spelsberg, J. P. Landers, LC-GC 12 (1994) 50.

migrarán hacia el electrodo con carga positiva (ánodo) con distintas velocidades que dependerán de su relación carga/tamaño. Ésta es la modalidad más sencilla, denominada electroforesis capilar en zona (CEZ).

## 2.2. Principios básicos de separación

De forma general y sin describir todavía las diferentes modalidades de electroforesis capilar, se puede decir que el movimiento de las especies químicas dentro del capilar es fruto de la acción simultánea de dos fenómenos denominados electromigración y electroósmosis.

a) *Electromigración*: Consiste en el movimiento neto de las especies que forman la muestra a través de la disolución reguladora dentro del capilar bajo la acción de un campo eléctrico. Gracias a este fenómeno se produce la separación de las especies cargadas debido a las diferencias en las *velocidades electroforéticas* de cada una de las especies la cual depende de su relación carga/tamaño. Estas velocidades electroforéticas son directamente proporcionales al campo eléctrico aplicado (V) e inversamente proporcionales a la longitud total del capilar ( $L_T$ ) y viene dada por la expresión:

$$V_e = \mu_e \cdot V/L_T$$

Debido al fenómeno de electromigración aparece lo que se denomina *movilidad electroforética* ( $\mu_e$ ), ésta será diferente para cada especie y viene dada por:

$$\mu_e = e / 6\pi\eta r$$

Para medir la velocidad y la movilidad electroforética es necesario conocer el tiempo que tarda un soluto en migrar desde el punto de inyección hasta el

detector. Este tiempo se denomina *tiempo de migración* y si sólo se diera el fenómeno de la electromigración, su expresión sería:

$$t_m = L_T / v_e = L_T^2 / \mu_e \cdot V$$

Conociendo este tiempo de migración ( $t_m$ ), voltaje aplicado (V) y longitud del capilar (L), se podrá calcular la velocidad y movilidad electroforética aparente, es decir, aquella que sólo tiene en cuenta el fenómeno de la electromigración, de cualquier analito mediante las siguientes expresiones:

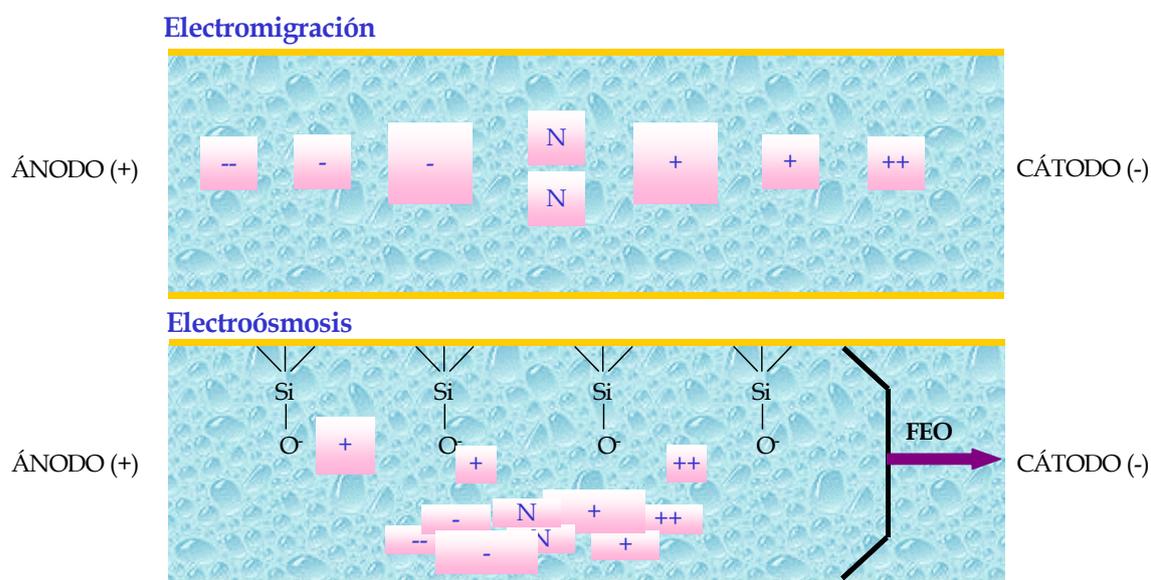
$$v_e = L_D / t_m$$

$$\mu_e = L_D / t_m \cdot (L_T / V)$$

Aunque, los valores reales se deben obtener teniendo en cuenta el otro fenómeno que ocurre en las separaciones electroforéticas de forma simultánea y que se denomina electroósmosis.

*b) Electroósmosis*: Consiste en el movimiento relativo de un líquido (disolución reguladora) con respecto a una superficie cargada (paredes del capilar), bajo la acción de un campo eléctrico y se conoce con el nombre de *flujo electroosmótico (FEO)*. Este flujo presenta un perfil de velocidades cuasi plano y es el motivo por el cual no se producen ensanchamientos en los picos electroforéticos, hecho que justifica las eficacias tan elevadas que se consiguen por esta técnica. Gracias a la existencia del FEO se produce la separación, por CE, incluso de especies no cargadas que migran a la misma velocidad y sentido que el flujo electroosmótico. A la vista de todas estas ecuaciones se puede deducir que, para cada uno de los componentes de una muestra, se puede calcular su tiempo de migración, velocidad electroforética y movilidad electroforética, de expresiones similares a las obtenidas por electromigración, con lo cual se pueden identificar los distintos picos de un electroferograma con los diferentes componentes de una muestra.

Un esquema de los efectos de estos dos fenómenos sobre el movimiento neto de las especies contenidas en una muestra se representa en la Figura 3.



*Figura 3. Movilidades electroforéticas y electroosmóticas en la separación de sustancias neutras y cargadas.*

Al existir los dos fenómenos de migración, la velocidad, movilidad y tiempo de migración real de una especie dada será la suma de ambas contribuciones.

### 2.3. Factores que afectan a la separación electroforética

La CE ha demostrado ser una técnica de separación que permite la resolución de mezclas muy complicadas, superando en muchos casos a la obtenida por cromatografía. Pero para ello, es necesario tener en cuenta los distintos factores que afectan a la separación, que se agrupan en tres grupos principales:

a) Factores relacionados con la dispersión

El ensanchamiento de los picos electroforéticos en CE se debe a un conjunto de factores tales como la difusión, adsorción y efecto térmico cuya combinación va a afectar, de forma aditiva, a la eficacia de la separación<sup>18,19</sup>.

El fenómeno de difusión está provocado por la existencia de gradientes de concentración que favorecen el transporte hacia las zonas de menor concentración de cada especie; en cambio, el fenómeno de adsorción se produce por la interacción entre los analitos cargados y disueltos en el medio electroforético y las paredes del capilar.

Sin embargo, se puede decir que el fenómeno que más afecta al ensanchamiento de los picos es el efecto térmico o efecto Joule que se origina por la aplicación de un voltaje a través de un capilar que contiene una disolución conductora, generándose un calor que puede no ser uniforme a lo largo de todo el sistema de separación. El hecho de que exista este efecto va a afectar considerablemente a la eficacia, tiempos de migración y respuesta del detector<sup>20,21</sup>. Debido a que la mayoría de estos factores dependen de la temperatura, el ensanchamiento de los picos electroforéticos se evita, en gran medida, llevando a cabo la termostatación del capilar, además de utilizar capilares de diámetros comprendidos entre 50 y 75  $\mu\text{m}$  para mantener una buena relación superficie/volumen y minimizar así, el efecto térmico.

b) Factores relacionados con el medio electroforético

Debido a que para que tenga lugar la separación en CE se aplica un campo eléctrico a la disolución que contiene la muestra, el medio

---

[18] S. Hjertén, *Electrophoresis* 11 (1990) 665.

[19] J. Liu, O. Shirota, M. V. Novotny, *Anal. Chem.*, (1992) 973.

[20] R. S. Rush, A. S. Cohen, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1346.

[21] A. Guttman, J. Horvath, N. Cooke, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 199.

electroforético tiene que ser tal que conduzca bien la corriente eléctrica. El más empleado es una disolución reguladora que presente una baja conductividad ya que el efecto térmico se minimiza. El tipo de disolución tampón elegido es de vital importancia en CE ya que va a determinar el comportamiento de los analitos, afectando enormemente propiedades tales como el pH, fuerza iónica y composición de la misma.

El pH, por ejemplo, es el factor que más afecta a la selectividad electroforética. En general, se puede decir, que para la separación de solutos catiónicos y asegurar su completa protonación, se debe trabajar a un pH de una o más unidades por debajo de su  $pK_b$ , mientras que si se trata de la separación de solutos aniónicos, para asegurar la ionización completa del compuesto, también se debe trabajar a un pH de una o más unidades por encima de su  $pK_a$ <sup>22</sup>. Además del pH, la fuerza iónica de la disolución tampón tiene efectos muy importantes en la movilidad de los solutos y, por tanto, en la eficacia, resolución y sensibilidad de un sistema de separación por CE<sup>23,24</sup>, por lo que habrá que llevar a cabo una optimización tanto del tipo, composición y concentración de la disolución tampón encaminada a la obtención de los resultados más óptimos.

Por último, aunque no por ello menos importante, los aditivos añadidos a las disoluciones tampón, tales como *agentes complejantes*, *disolventes orgánicos* o *modificadores orgánicos* (ciclodextrinas, micelas, microemulsiones,...etc) son de vital importancia para mejorar o, incluso facilitar, la separación electroforética.

Los *disolventes orgánicos* se añaden a la disolución tampón para alterar su polaridad y viscosidad, y como consecuencia de ello, modifican tanto el FEO como la movilidad electroforética de los analitos que componen una

---

[22] P. Bocek, M. Deml, P. Gebauer, V. Dolnid, VCH (1988) Weinheim, Alemania.

[23] H. J. Isaac, I. Z. Atamna, G. M. Myszchik, G. M. Janini, Chromatographia, 32 (1991) 155.

[24] K. Salomón, D. S. Burgi, J. C. Helmer, J. Chromatogr., 13 (1991) 679.

muestra. Además, hay casos en los que la adición de disolventes orgánicos es imprescindible debido a que los analitos objeto de estudio no son solubles directamente en la disolución tampón acuosa y la presencia de estos disolventes en el medio electroforético es obligada<sup>25,26</sup>.

Una de las mayores desventajas de la CE es su inherente falta de selectividad para la separación de determinados compuestos tales como iones inorgánicos<sup>27</sup>, compuestos quirales<sup>28</sup>, nucleósidos y oligonucleósidos<sup>29</sup>,...etc. Esta carencia puede subsanarse mediante la adición de sustancias al medio electroforético que tengan capacidad complejante, es decir, *agentes complejantes* dando lugar a la formación de complejos con boratos, formación de pares iónicos, complejos con metales o complejos de inclusión, mediante el empleo de ciclodextrinas<sup>30,31</sup>, éteres corona<sup>32,33</sup> o calixarenos<sup>34</sup>. Para mejorar la aplicabilidad de la CE se han estudiado otros medios electroforéticos denominados *modificadores orgánicos*, entre los que se pueden destacar las *micelas*, cuya utilización da lugar a un modo de electroforesis capilar denominado cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) introducida por TERABE<sup>35</sup>. Las *microemulsiones* fueron introducidas por WATARAI<sup>36</sup> y presentan mayores ventajas con respecto a las micelas, sobre todo por su mayor poder de solubilización de los analitos y

---

[25] A. D. Tran, S. Park, P. J. List, O. T. Huynh, R. R. Ryall, P. A. Lane, J. Chromatogr., 542 (1991) 459.

[26] K. Sarnini, E. Kenndler, J. Chromatogr., 792(1-2) (1997) 3-11.

[27] D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, Anal. Chem., 63 (1991) 179.

[28] P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelsen, R. Zare, Anal. Chem., 59 (1987) 44.

[29] A. S. Cohen, S. terabe, J. Smith, B. Karger, Anal. Chem., 59 (1987) 1021.

[30] S. Fanali, J. Chromatogr., 474 (1989) 447.

[31] H. Nishi, J. Chromatogr., 792(1-2) (1997) 327.

[32] F. S. Stover, J. Chromatogr., 368 (1986) 476.

[33] S. Fanali, J. Chromatogr., 792(1-2) (1997) 227.

[34] L. Arce, A. Segura, A. Ríos, C. Cruces, A. Fernández, M. Varcárcel, J. Chromatogr. A, 816(2) (1998) 243.

[35] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984) 111.

[36] H. Watarai, Chem. Lett., (1991) 391.

los *fluidos supercríticos*<sup>37</sup> que dan lugar a separaciones muy rápidas y muy selectivas.

c) Factores operacionales

Hasta ahora se ha mencionado, en distintos momentos, que existen una serie de variables que se deben seleccionar cuidadosamente para minimizar los efectos del ensanchamiento de los picos electroforéticos y, por tanto, la mejora en la resolución obtenida en la separación.

Los factores operacionales más importantes a estudiar en una separación electroforética son el campo eléctrico aplicado, las características del capilar empleado en la separación y la temperatura del sistema.

El flujo electroosmótico es directamente proporcional al *campo eléctrico* (E) aplicado y éste, a su vez, viene dado como el cociente entre el voltaje (V) y la longitud total del capilar ( $L_T$ ), como se ha mencionado anteriormente, por lo que cambiando el voltaje se podrá modificar fácilmente el flujo electroosmótico. En general, un aumento en el voltaje aumenta el FEO y reduce los tiempos de migración, obteniendo tiempos de análisis más cortos<sup>38</sup>.

Sin embargo, habrá que llegar a una solución de compromiso, pues al trabajar con voltajes muy elevados, los análisis serán cortos pero darán lugar a una mayor producción de calor que si no se disipa rápidamente, alterará la viscosidad de la disolución tampón y, por tanto, los tiempos de migración serán menos reproducibles e incluso se podría producir la descomposición de la propia muestra a analizar.

A pesar de estos inconvenientes, debido a que el empleo de voltajes altos da lugar a que se acorten los tiempos de migración y los picos se estrechen,

---

[37] C. R. Yonker, R. D. Smith, J. Chromatogr., 517 (1990) 573.

[38] G. M. MacLaughlin, J. A. Nolan, J. L. Lindahl, R. H. Palmieri, K. W. Anderson, C. Morris, J. A. Morrison, T. J. Bronzert, J. Liq. Chrom., 15 (1992) 961.

lo mejor es mantener los voltajes de trabajo a unos valores en los cuales el calor que se produzca se pueda disipar simultáneamente y se obtengan buenos resultados de resolución. Los valores límite más frecuentes de trabajo en CE son: voltajes de 30 kV, intensidades de corriente de 300  $\mu$ A y potencias de hasta 6 W.

Como es de suponer, la parte más importante de un instrumento de CE es el capilar y, por tanto, las *características del capilar* serán unos de los parámetros operacionales que habrá que seleccionar antes de llevar a cabo un análisis. Las características que definen un capilar son: diámetro interno, externo y longitud total, afectando principalmente al tiempo de migración, resolución, disipación del calor generado y sensibilidad de la detección.

Generalmente, los materiales usados para la fabricación de los capilares utilizados en CE son el teflón, pirex o la sílice fundida, siendo éste último el más empleado por presentar una buena transparencia a la luz UV y una alta conductividad térmica, aunque el inconveniente es su fragilidad, que queda subsanada mediante el recubrimiento con polímeros de poliamida de espesores comprendidos entre 10-30  $\mu$ m.

En general, el *diámetro interno* no debe ser muy grande para que de disipe bien el calor generado dentro del capilar, al igual que le ocurre al *diámetro externo*. Los diámetros internos suelen oscilar entre 10-100  $\mu$ m, los externos entre 190-375  $\mu$ m

En cuanto a la *longitud del capilar*, ésta se encuentra relacionada con factores tales como el espaciado de los picos electroforéticos y los tiempos de migración. Así, concretamente, si doblamos la longitud de un capilar, el tiempo de migración aumenta considerablemente pero, a su vez, se obtendrá una resolución mucho mejor. Por tanto, para separar solutos en tiempos lo

más cortos posibles y con la mejor resolución, se deberán emplear capilares cortos, de longitudes inferiores a 100 cm<sup>39</sup>.

Dependiendo de estas características, el volumen de muestra introducido en el capilar de separación puede llegar a ser de 1 µL, cuando se trabaja con capilares de 50 µm de diámetro externo y una longitud de 50 cm.

En todo momento estamos relacionando los parámetros de separación con la temperatura del sistema, por lo que el control de la temperatura será fundamental durante el tiempo que dure la separación, para asegurar una buena repetibilidad de los tiempos de migración y una buena precisión en el área de los picos electroforéticos<sup>40</sup>. Si el calor que se va generando por aplicación de voltajes elevados se disipa bien, se pueden utilizar voltajes altos y aumentar la eficacia y resolución de la separación, así como acortar los tiempos de análisis.

Se ha visto que el calor generado se disipa mejor mediante el empleo de capilares estrechos conjuntamente con un buen sistema de enfriamiento de los capilares, para asegurar la eliminación del exceso de calor y evitar así los problemas que ello conlleva. En general, la temperatura más habitual en las separaciones electroforéticas es la cercana a la temperatura ambiente, siendo el rango aceptable entre 20–50 °C.

## 2.4 Modalidades de electroforesis capilar

Para aumentar la resolución y, por tanto, la selectividad de la determinación así como para mejorar la aplicabilidad, se puede emplear en electroforesis capilar distintos modos o modalidades de separación entre los que se pueden destacar:

---

[39] J. W. Jorgenson, ACS. Symp. Ser., 335 (1987) 182.

[40] R. J. Nelson, A. Paulus, A. S. Cohen, A. Guttman, B. L. Karger, J. Chromatogr., 480 (1989) 111.

### 2.4.1 Electroforesis capilar en zona (CZE)

La CZE fue introducida por Hjertén en 1985 y es el modo de CE más empleado, debido a su simplicidad y poder de separación, presentando la limitación de ser útil sólo para la separación de especies cargadas.

En CZE se utiliza un capilar lleno de una disolución electrolítica que suele ser una disolución reguladora<sup>41,42</sup>. En esta disolución, los analitos se separan basándose en las diferencias entre sus movilidades electroforéticas, que están relacionadas con su relación carga/tamaño, a un pH determinado. La dirección y la velocidad de migración de los analitos están determinadas por los fenómenos de electrofomigración y electroósmosis<sup>43</sup>. La electroósmosis se origina por la ionización de los grupos silanoles de la pared interna del capilar de sílice fundida. Estos grupos, a un pH superior a 4, empiezan a estar ionizados, por lo que atraen eléctricamente a los iones con carga positiva de la disolución reguladora formando una doble capa eléctrica. Los iones de la disolución reguladora en la región móvil de la doble capa migran juntos hacia el cátodo cuando se aplica un campo eléctrico e inducen un flujo electroosmótico de todo el líquido del capilar. Si la velocidad del flujo electroosmótico hacia el cátodo es mayor que la velocidad de migración electroforética de los analitos aniónicos hacia el ánodo, entonces los aniones y los cationes migrarán en el mismo sentido y podrán ser separados en un mismo análisis (Figura 4).

Hay numerosas aplicaciones de este modo de separación, destacando el análisis de compuestos iónicos solubles en el medio electroforético,

---

[41] J.W. Jorgenson, Trends Anal. Chem. 3 (1984) 51.

[42] K. Altria, C. Simpson, Anal. Proc. 23 (1986) 453.

[43] J.H. Knox, J. Chromatogr. A. 680 (1994) 3.

incluyendo aniones y cationes inorgánicos<sup>44- 48</sup>, moléculas pequeñas contenidas en productos farmacéuticos o biomoléculas grandes<sup>49- 53</sup> y en numerosos campos de la Química Analítica<sup>58- 64</sup>.

- 
- [44] M.P. Harrold, M.J. Wajtusik, J. Riviello, R. Henson, J. Chromatogr. 640 (1993) 463.  
[45] P.Y. Jandik, W.R. Jones, J. Chromatogr. 546 (1991) 431.  
[46] J. Xu, P. Che, Y. Ma, J. Chromatogr. A 749 (1996) 287.  
[47] M.A. Friedberg, M.E. Hinsdale, Z.K. Shihabi, J. Chromatogr. A 781 (1997) 491.  
[48] K.E. Ferslew, A.N. Hagardorn, M.T. Harrison, W.F. McCormick, Electrophoresis 19 (1998) 6.  
[49] R. Lehmann, M. Koch, W. Voelter, H.U. Haring, H.M. Liebich, Chromatographia 45 (1997) 390.  
[50] R.D. Macfarlane, P.V. Bondarenko, S.L. Cockrill, I.D. Cruzado, W. Doss, C.J. Mcneal, A.M. Spiekerman, L.K. Watkins, Electrophoresis 18 (1997) 179.  
[51] C.R. Jolliff, C.R. Blessum, Electrophoresis 18 (1997) 1781.  
[52] Y. Henskens, J. De Winter, M. Pedelharing, G. Ponjee, Clin. Chem. 44 (1998) 1184.  
[53] J. Bienvenue, M.S. Graziani, F.A. Rpin, H. Bernon, C. Blessur, C. Marchetti, G. Roighetti, M. Somenzini, G. Vega, F. Agulli, Clin. Chem. 44 (1998) 1184.  
[54] D. Kaniansky, M. Masár, V. Madajová, J. Marák, J. Chromatogr. A 677 (1994) 179.  
[55] E. Dabek-Zlotorzynska, J.F. Dlouhy, N. Houle, M. Piechowski, S. Ritchie, J. Chromatogr. A 706 (1995) 459.  
[56] I. Recio, M. Ramos, L. Amigo, J. Dairy Res. 64 (1997) 525.  
[57] S. Pozdniakova, A. Padaruskas, G. Schwedt, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 41.  
[58] L. Arce, A.S. Carretero, A. Ríos, C. Cruces, A. Fernández, M. Valcárcel J. Chromatogr. A, 816 (1998) 243.  
[59] Ch.W. Klampfl, J. Agr. Food Chem. 47 (1999) 987.  
[60] T. Soga, I. Tajima, D.N. Heiger, American Lab. 2000 Agilent Technologies N. 5968-9463E.  
[61] J.M.L. Gallego, J.P. Arroyo, Anal. Lett. 35 (2002) 2105.  
[62] L. Cavani, C. Ciavatta, O.E. Trubetskaya, O.I. Reznikova, G.V. Afanaseva, O.A. Trubetskoj, J. Chromatogr. A 983 (2003) 263.  
[63] A. Bendini, M. Bonol, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, T.G. Toschi, J. Chromatogr. A 985 (2003) 425.  
[64] S. Cortacero Ramirez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Hernáinz Bermúdez, A. Fernández Gutiérrez, Trends Anal. Chem., 22 (2003) 440.  
[65] S. Cortacero Ramírez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Hernáinz Bermúdez, A. Fernández Gutiérrez, Proceeding of the 29th EBC Congress, 97 (2004) 993, ISBN 90-70143-22-4.

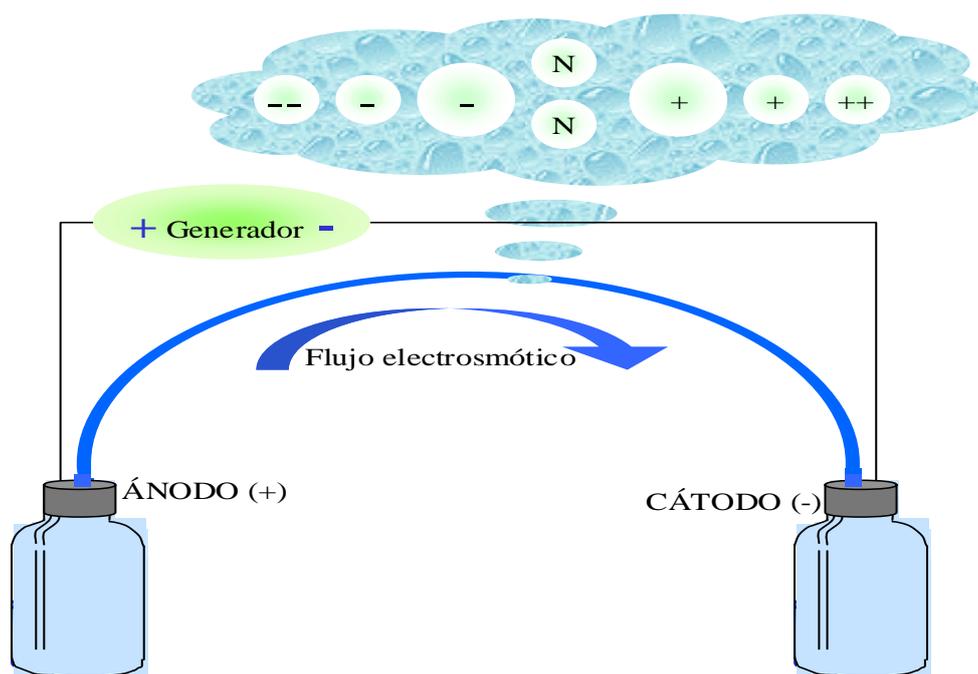


Figura 4. Representación esquemática de la migración de especies en CZE.

#### 2.4.2. Cromatografía Electrocinética (EKC)

Desde los trabajos con capilares de Mikkers *y col.* en 1979<sup>12</sup> la electroforesis capilar ha presentado una resolución mayor y en menor tiempo que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) pero presentaba la limitación de ser aplicable sólo a solutos iónicos o cargados. Este hecho cambió cuando Terabe<sup>66</sup> desarrolló el modo de aplicación denominado EKC.

La EKC constituye otra modalidad de trabajo en CE definida por Terabe como: "*un método de separación analítico que emplea la técnica experimental de la CZE en combinación con los principios básicos de la cromatografía*"<sup>67</sup>. En EKC, además de la disolución reguladora de separación empleada en CZE (fase acuosa), se añade un componente denominado pseudofase que origina la existencia de un fenómeno cromatográfico al

[66] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.

[67] S. Terabe, *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 129.

existir dos fases (la fase acuosa y la pseudofase) entre las cuales se distribuye el soluto. El fenómeno electrocinético, que incluye tanto la electromigración como la electroósmosis, provoca el transporte de la pseudofase y los analitos dentro del capilar<sup>67,68</sup>.

Los modos de separación en EKC pueden clasificarse según la naturaleza de la pseudofase empleada:

Se han empleado tensioactivos aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos y catiónicos<sup>69-73</sup>, polímeros micelares<sup>74-77</sup>, tensioactivos poliméricos<sup>78</sup> y micelas cargadas *in situ*<sup>79,80</sup> como pseudofases micelares en cuyo caso se habla de EKC micelar (MEKC). Otras pseudofases utilizadas son las microemulsiones<sup>81-83</sup>, las fases macrocíclicas y macromoleculares<sup>84</sup>, las vesículas<sup>85</sup>, los resorcarenos<sup>86</sup>, los dendrímeros<sup>87</sup>, los iones poliméricos<sup>88</sup>, los calixarenos<sup>58</sup>, las ciclodextrinas<sup>89-92</sup>, las proteínas<sup>93</sup>, los antibióticos

- 
- [68] J.P. Quirino, S. Terabe, J. Chromatogr. A, 856 (1999) 456.  
[69] S. Takeda, S. Wikida, M. Yamane, K. Higashi, S. Terabe, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 135.  
[70] N. Matsubara, S. Terabe, Chromatographia, 34 (1992) 493.  
[71] K. Koezuka, H. Ozaki, N. Matsubara, S. Terabe, J. Chromatogr. B, 689 (1997) 3.  
[72] D. Crosby, Z. El Razzi, J. Liq. Chromatogr., 16 (1993) 2161.  
[73] S. Takeda, S. Wikida, M. Yamane, K. Higashi, S. Terabe, J. Chromatogr. A, 781 (1996) 11.  
[74] J. Wang, I. M. Warner, Anal. Chem. 66 (1994) 37773.  
[75] C.P. Palmer, S. Terabe, J. Microcol. Sep., 8 (1996) 115.  
[76] K.T. Tellman, C. P. Palmer, Electrophoresis, 20 (1999) 152.  
[77] I. Peric, E. Kenndler, Electrophoresis, Review, 24 (2003) 2924.  
[78] H. Ozaki, A. Ichihara, S. terabe, J. Chromatogr. A, 709 (1995) 3.  
[79] J.T. Smith, Z. El Razzi, J. Microcol. Sep., 6 (1994) 127.  
[80] Y. Mechref, Z. El Razzi, J. Chromatogr. A, 724 (1996) 285.  
[81] L. Vomastova, I. Miksik, Z. Deyl, J. Chromatogr. B, 681 (1996) 107.  
[82] S. Terabe, N. Matsubara, Y. Ishihama, Y. Okada, J. Chromatogr. A, 608 (1992) 23.  
[83] S.H. Hansen, Electrophoresis, Review, 24 (2003) 3900.  
[84] S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka, T. Ando, J. Chromatogr. A, 332 (1985) 217.  
[85] M. Hong, B. S. Weekly, S. J. Greib, J. P. Foley, Anal. Chem., 70 (1998) 1394.  
[86] K. Baechmann, A. Bazzanella, K.Y. Han, R. Arenque, V. Bohmer, W. Vogt, Anal. Chem., 67 (1995) 1722.  
[87] N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Hosoya, K. Kimata, T. Arai, S. Terabe, Chem. Lett., 9 (1992) 959.  
[88] S. Terabe, T. Isemura, Anal. Chem., 62 (1990) 650.  
[89] H. Nishi, S. Terabe, J. Chromatogr. A, 694 (1995) 245.  
[90] I.S. Curie, J. Chromatogr. A, 792 (1997) 297.  
[91] V. Poinot, C. Bayle, F. Couderc, Electrophoresis, Review, 24 (2003) 4047.  
[92] C. Foulon, C. Danel, C. Vaccher, S. Yous, J.P. Bonte, J.F. Goossens, J. Chromatogr. A, 1035 (2004) 131.

macrocíclicos<sup>94</sup>, los polisacáridos<sup>95</sup> y los alcaloides. Estos otros modos de EKC se suelen describir añadiendo o anteponiendo las siglas del compuesto empleado como pseudofase al término EKC, como por ejemplo, EKC con ciclodextrinas (CD-EKC).

Indicar que aunque inicialmente se desarrolló EKC para extender la aplicabilidad de la CZE a solutos neutros, EKC también se ha aplicado a solutos cargados (aniónicos y catiónicos) obteniendo algunas separaciones que en ocasiones no era posible conseguir utilizando CZE<sup>96-100</sup>.

#### *2.4.2.1. Separación por MEKC.*

El carácter hidrófobo de muchos compuestos orgánicos puede relacionarse con su actividad biológica, con su bioacumulación en los seres vivos o con su absorción en suelos. Por tanto, el análisis de compuestos orgánicos hidrófobos es interesante en disciplinas como el diseño de fármacos, la toxicología o el control ambiental<sup>101,102</sup>.

Debido a la poca solubilidad en agua de los compuestos orgánicos hidrófobos, para llevar a cabo su separación empleando una técnica electroforética es necesario emplear sistemas de EKC con pseudofases relativamente hidrófobas que interaccionen con este tipo de compuestos. En este sentido, se han empleado sistemas micelares de relativa hidrofobicidad que tienen capacidad de interaccionar con este tipo de solutos. Como se

---

[93] D.K. Lloyd, A. F. Aubry, E.D. Lorenzi, J. Chromatogr. A, 792 (1997) 349.

[94] D.W. Armstrong, U. B. Nair, Electrophoresis, 18 (1997) 2331.

[95] G. Gübitz, M. G. Schmid, J. Chromatogr. A, 792 (1997) 179.

[96] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando, J. Chromatogr. A, 348 (1985) 39.

[97] C. Luang, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, Anal. Chem., 66 (1994) 1646.

[98] M.G. Khaledi, S.C. Smith, J.K. Strasters, Anal. Chem., 63 (1991) 1820.

[99] J.E. Palmer, J. Chromatogr. A, 1036 (2004) 95.

[100] S.A. Shamsi, Electrophoresis, Review, 23 (2002) 4036.

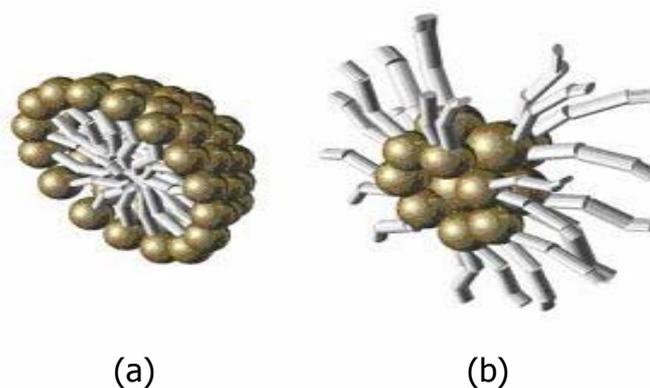
[101] L. Golberg (ed.), Structure-Activity Correlation as a Predictive Tool in Toxicology. Hemisphere, Washington D. C. (1983).

[102] C. Hansch, en Ariens, E.J. (Ed.), Drug Design, Vol. 1, Academic Press, New York (1971).

acaba de comentar en el apartado anterior, cuando se emplean micelas como pseudofase en EKC se habla de técnicas MEKC. A continuación, se hará un estudio más detallado de esta modalidad de trabajo en CE y de cómo puede modificarse la selectividad de separación con el propósito final de realizar la separación de compuestos orgánicos neutros de diferente hidrofobicidad.

Este modo de trabajo fue introducido por primera vez por Terabe *y col.* en 1984<sup>66</sup> y aunque en un principio se concibió para ampliar el campo de aplicación de la CZE a compuestos neutros, con posterioridad se ha utilizado para separar tanto solutos neutros como cargados.

Las micelas (Figura 5) son agregados que se forman añadiendo a la disolución reguladora de separación, tensioactivos a una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC). Así se pueden formar micelas normales en las cuales el carácter hidrófobo se encuentra en el interior (cola) y el hidrófilo en el exterior (cabeza) y micelas inversas que ocurre justamente al contrario.



*Figura 5. Representación de la estructura de la micela normal (a) e inversa (b).*

Estas micelas se mueven a diferente velocidad que el flujo electroosmótico. En esta situación, la separación de analitos neutros se

produce por el reparto de éstos entre la fase acuosa y la fase micelar. Se creará un intervalo de elución comprendido entre el tiempo correspondiente al flujo electroosmótico ( $t_0$ ) y el tiempo de migración de la micela ( $t_{ps} = t_m$ ) de manera que todos los analitos migrarán entre estos dos límites dependiendo de su reparto entre la fase acuosa y la fase micelar. A modo de ejemplo, en la Figura 6 se muestra el principio de separación de un soluto neutro en un sistema de MEKC con micelas aniónicas. En esta figura, se observa que los solutos (N), que no tienen afinidad por el sistema micelar, migrarán a la misma velocidad que el flujo electroosmótico de manera que cuando pasen por la ventana de detección originarán un pico que se registrará a un tiempo de migración correspondiente a  $t_0$ . Por otro lado, las micelas aniónicas migrarán hacia el ánodo de modo que si la velocidad del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad de migración de las micelas en sentido contrario, éstas pasarán por la ventana de detección transcurrido un cierto tiempo. Si se inyecta un soluto (T) que esté totalmente incluido en las micelas, conocido como marcador micelar, la señal correspondiente a este soluto aparecerá a un tiempo de migración  $t_m$ . Entre este intervalo de tiempos de migración aparecerán los picos correspondientes a los otros solutos dependiendo de su reparto entre las fases acuosa y micelar. Así, un soluto que se distribuye entre la fase acuosa y micelar fluirá a un tiempo de migración intermedio entre  $t_0$  y  $t_m$  que se ha denominado  $t_r$  en la figura.

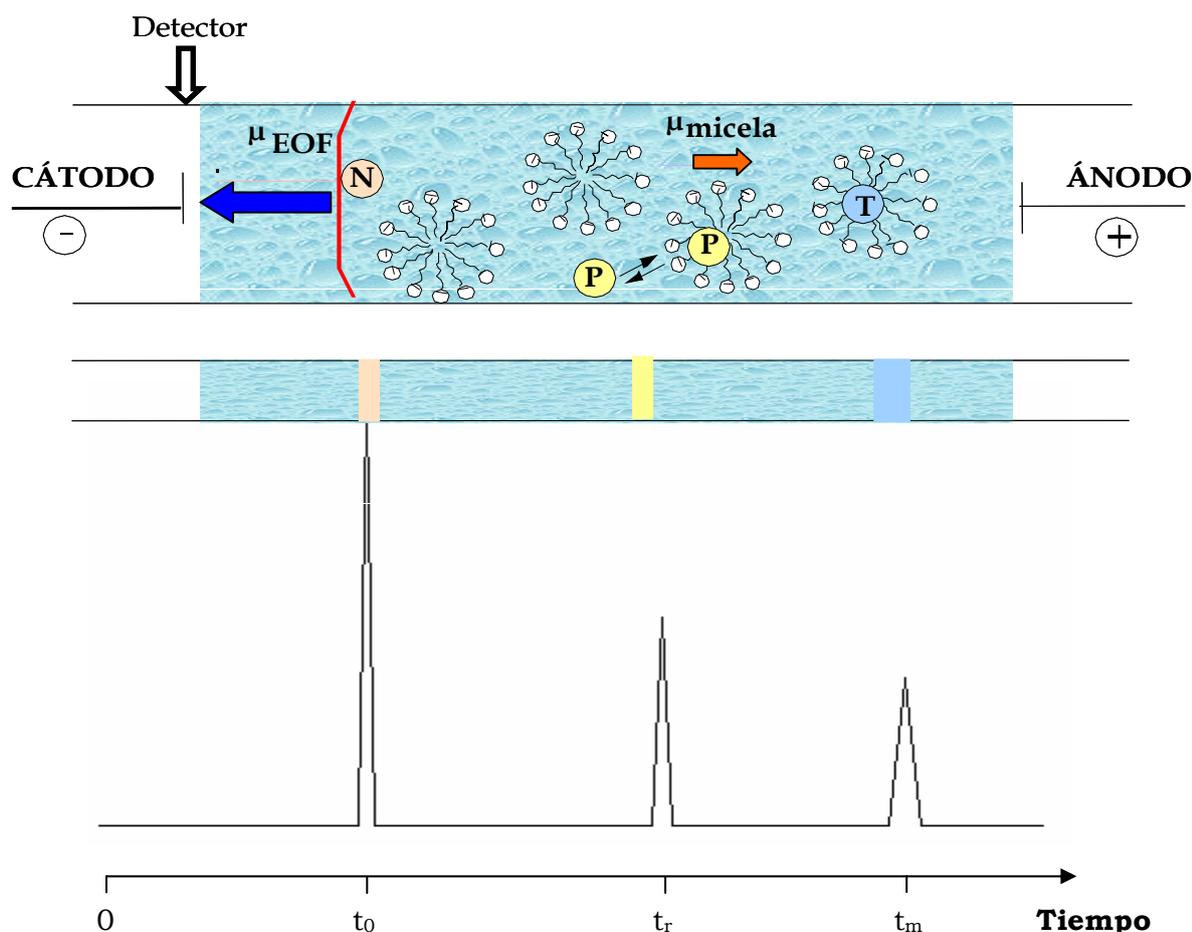


Figura 6. Principio de separación de solutos neutros en MEKC en presencia de un tensioactivo aniónico.

El control de la selectividad de separación en MEKC puede hacerse principalmente cambiando el tipo de tensioactivo o haciendo mezclas de distintos tensioactivos. Además, debido a la estructura dinámica de las micelas (las micelas están en equilibrio con los monómeros de tensioactivo), la agregación de los tensioactivos y el tamaño de las micelas está influenciado por cambios en la concentración micelar, el pH, la temperatura, la fuerza iónica de la disolución electrolítica y la adición de modificadores orgánicos<sup>103,104</sup>.

[103] K. Otsuka, S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography in Molecular Biotechnology*, Vol. 9, (1998) 253.

[104] M.L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I. E. Valkó, H. Sirén, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 13.

De los distintos tipos de tensioactivos empleados (aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos o poliméricos) los más utilizados son los tensioactivos de cadena alquilada aniónicos, siendo el más ampliamente utilizado el dodecilsulfato sódico (*SDS*)<sup>106</sup>. La popularidad del SDS se debe a su elevada solubilidad en agua, baja CMC, pequeña absorptividad molar en el ultravioleta incluso a bajas longitudes de onda, disponibilidad y bajo coste. Este tensioactivo forma micelas de relativa hidrofobicidad que proporcionan una selectividad adecuada para muchas mezclas de solutos. Para este tensioactivo, se forman micelas esféricas en agua por encima de su CMC de 8.1 mM hasta que por encima de 70 mM las micelas cambian a una forma elipsoidal. El número de agregación para estas micelas esféricas en agua y a la CMC es aproximadamente de 60<sup>107</sup>. Sin embargo, al añadir un electrolito la CMC disminuye debido a una reducción de las repulsiones electrostáticas entre los grupos de cabeza cargados aniónicamente favoreciendo la formación de la micela. Por otro lado, los alcoholes influyen en el valor de la CMC causando una disminución o un aumento de su valor dependiendo del porcentaje de disolvente añadido. Además, los alcoholes de cadena larga tienden a disminuir la CMC al emplear concentraciones crecientes debido a que se incorporan en las micelas y reducen la repulsión electrostática entre los grupos de cabeza cargados.

#### 2.4.2.2 Separación por CD-EKC.

Las ciclodextrinas (CD) (Figura 7a) son oligosacáridos cíclicos consistentes en seis, siete u ocho unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas por enlace alfa, correspondiendo a los nombres  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina respectivamente, aunque estas CD's fueron las primeras y son las más utilizadas, existe en el

---

[105] R.D. Holland, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1140.

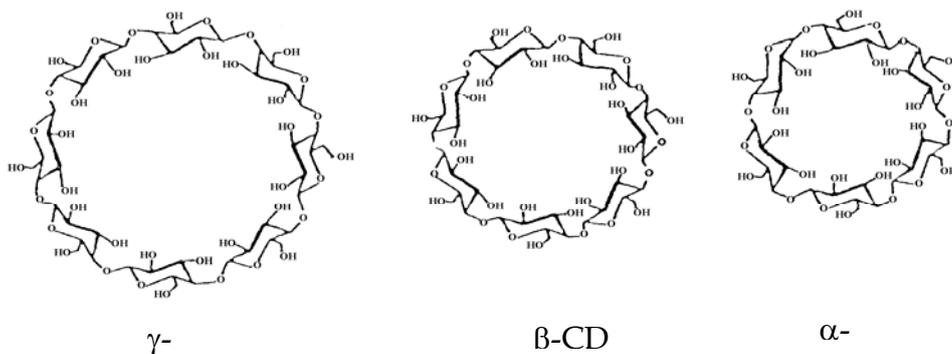
[106] M.A. García, J.C. Díez-Masa, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 345.

[107] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 89.

mercado otro número considerable de ellas con diferentes sustituyentes que le dan diferente solubilidad y les aportan otras características.

La cavidad interna de las CD's tiene carácter hidrofóbico por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con grupos aromáticos y alquílicos. El aumento de la selectividad debido al uso de las ciclodextrinas se atribuye, normalmente, a su capacidad para incluir selectivamente una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas en su cavidad hidrofóbica.

La estabilidad de los complejos de inclusión formados con ciclodextrinas depende de factores como los enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, efectos del disolvente y tamaño y forma de las moléculas. La efectividad en el uso de las CD's para aumentar la selectividad depende del tamaño y geometría de la molécula invitada, con respecto a las dimensiones de la cavidad de la CD.



*Figura 7a. Estructura química de las ciclodextrinas.*

Su característica forma de toroide (Figura 7b) se debe a la conformación tipo C1 de los residuos individuales de glucosa y sus enlaces en posición  $\alpha$ -1,4<sup>108, 109</sup>.

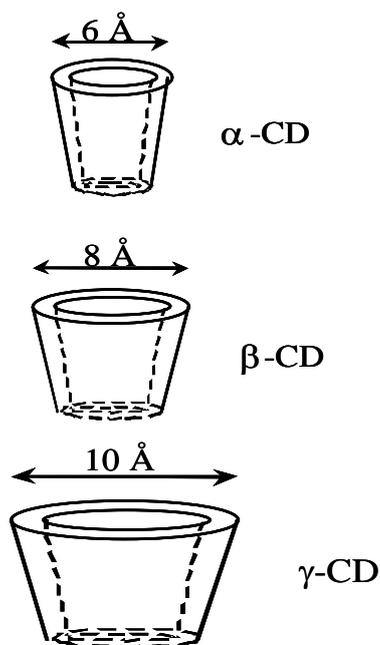


Figura 7b. Estructura funcional y propiedades estructurales de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD.

El desarrollo y comercialización en los últimos años de numerosos derivados de ciclodextrina (obtenidos a partir de las ciclodextrinas nativas) ha permitido: (i) aumentar la solubilidad en agua de las ciclodextrinas; (ii) establecer diferentes enlaces con los analitos, lo cual puede favorecer la complejación por inclusión; (iii) analizar compuestos quirales neutros e (iv) invertir el orden de migración de dos enantiómeros para facilitar el control de pureza enantiomérica de un soluto<sup>110, 111</sup>.

[108] J.H. Fendler, Che. Eng. News (1984) 25.

[109] W. Saenger, Agnew. Chem. Int., Ed. Engl. 19 (1980) 344.

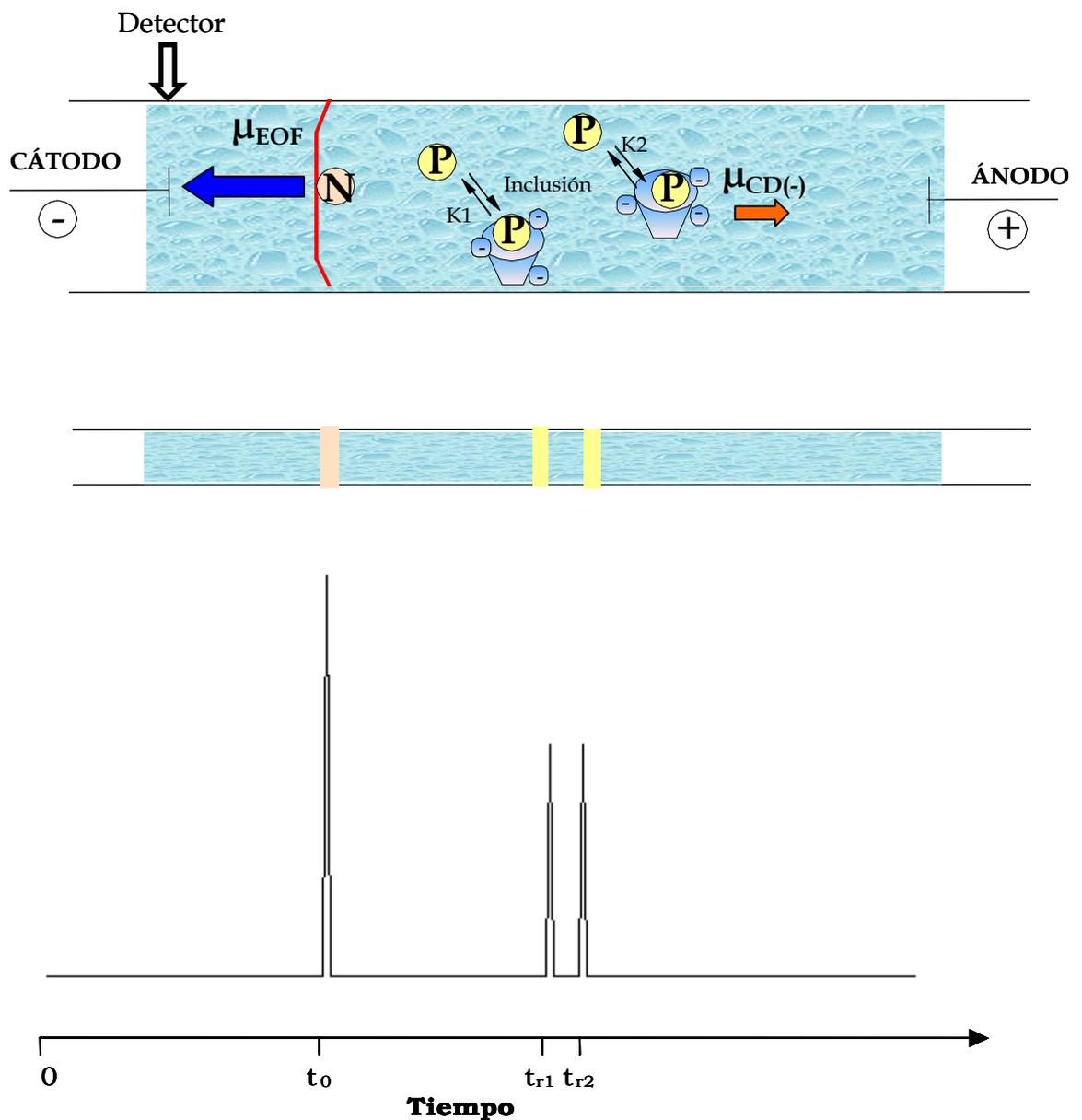
[110] S. Fanali, J. Chromatogr. A, 792 (1997) 227.

[111] S. Fanali, J. Chromatogr. A, 875 (2000) 89.

El empleo de derivados cargados de las ciclodextrinas ha permitido separar especies neutras sin la necesidad de emplear sistemas micelares que les proporcionen movilidad en un sistema electroforético.

Como ejemplo, en la Figura 8 se muestra la separación de un soluto neutro por CD-EKC en presencia de una ciclodextrina aniónica. Los solutos neutros (N) que no interaccionan con las ciclodextrinas se moverán a la misma velocidad de migración que el flujo electroosmótico dando lugar a un pico a  $t_0$ . Sin embargo, si el soluto neutro (P) interacciona con la ciclodextrina aniónica que migra hacia el ánodo, se moverá a diferente velocidad que el flujo electroosmótico. Si la velocidad de migración del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad de migración en sentido contrario de la ciclodextrina aniónica, el soluto neutro (P) pasará por la ventana de detección después que el flujo electroosmótico. Por tanto, de forma general, el principio de separación en CD-EKC se basa en la formación de complejos de inclusión de diferente estabilidad entre cada analito y las ciclodextrinas.

Aunque los analitos interaccionan con la cavidad interna hidrófoba de las ciclodextrinas en función de su hidrofobicidad, también intervienen enlaces secundarios entre el analito y los grupos hidroxilo o hidroxilos modificados del anillo de la ciclodextrina que pueden estabilizar el complejo de inclusión formado. Como los grupos hidroxilos primarios y secundarios están unidos a carbonos asimétricos, estas interacciones pueden ser selectivas y por tanto favorecer la separación<sup>111</sup>.



*Figura 8. Principio de separación de dos solutos neutros ( $P$  y  $P_1$ ) en CD-EKC en presencia de una ciclodextrina aniónica.*

Este modo de separación ha experimentado un notable desarrollo desde su introducción en 1984 y el número de aplicaciones en distintos campos del análisis es muy numeroso, debido, principalmente, a que permite la

separación de moléculas tanto cargadas como neutras y que aumenta considerablemente la selectividad de las separaciones en CE<sup>112-114</sup>.

#### 2.4.2.3 Separación por MEKC modificado con CD (CD-MEKC).

Existen muchos ejemplos de la utilización de ciclodextrinas en separaciones electroforéticas<sup>115-118</sup> en los distintos modos de electroforesis capilar pero especialmente en el modo de MEKC, debido a que, originalmente, las CD's eran eléctricamente neutras y no afectaban a la electromigración. Esto significa que, por si solas, no pueden utilizarse como medio electroforético, a menos, como se ha comentado anteriormente, que se les introduzca un grupo iónico en la molécula. Además, su parte externa es hidrofílica y, por tanto, se puede asumir con seguridad que las CD's no interaccionan con las micelas utilizadas en el modo MEKC y las que estén en contacto con la disolución micelar se encontrarán como otra fase que migra a una velocidad idéntica a la del conjunto de la disolución siendo capaces de solubilizar selectivamente ciertos tipos de solutos dependiendo de su tamaño, forma e hidrofobicidad.

El principio de separación en un sistema MEKC modificado con ciclodextrinas (CD-MEKC) se basa en el reparto diferencial de los compuestos entre la fase micelar, las ciclodextrinas y la fase acuosa. Como ejemplo, en la Figura 9 se muestra el principio de separación de un soluto neutro en un sistema CD-MEKC empleando micelas aniónicas y ciclodextrinas neutras. En

---

[112] S.H. Edwards, S.A. Shamsi, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1320.

[113] C. Garcia-Ruiz, R. Andres, J.L. Valera, F. Laborda, M.L. Marina, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 17.

[114] Y. Martin-Biosca, C. Garcia-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3216.

[115] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 474 (1989) 447.

[116] L. Ali, V.K. Gupta, H.Y. Aboul-Enein, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003)1360.

[117] B. Zhang, I.S. Krull, A. Cohen, D.L. Smisek, A. Kloss, B. Wang, A.J. Bourque, *J. Chromatography A*, 1034 (2004) 213.

[118] C.Q. Zhang, X.L. Lin, Y.H. Wei, C.F. Zhu, *Analytical Letters* 37 (2004) 293.

este caso, los solutos (N), que migran a la misma velocidad que el flujo electroosmótico originarán un pico a un tiempo de migración  $t_0$  y los solutos (T) que se incorporan totalmente al sistema micelar y que no interaccionan con la ciclodextrina darán lugar a un pico a un tiempo de migración  $t_m$ . Los solutos (P) que interaccionan con las ciclodextrinas neutras del sistema experimentarán un reparto diferencial entre la fase acuosa y micelar al existir una tercera fase, las ciclodextrinas, mostrando un pico a un tiempo de migración  $t_r$ . La selectividad de separación en estos sistemas se modificará cambiando el tipo o concentración de ciclodextrina o tensioactivo.

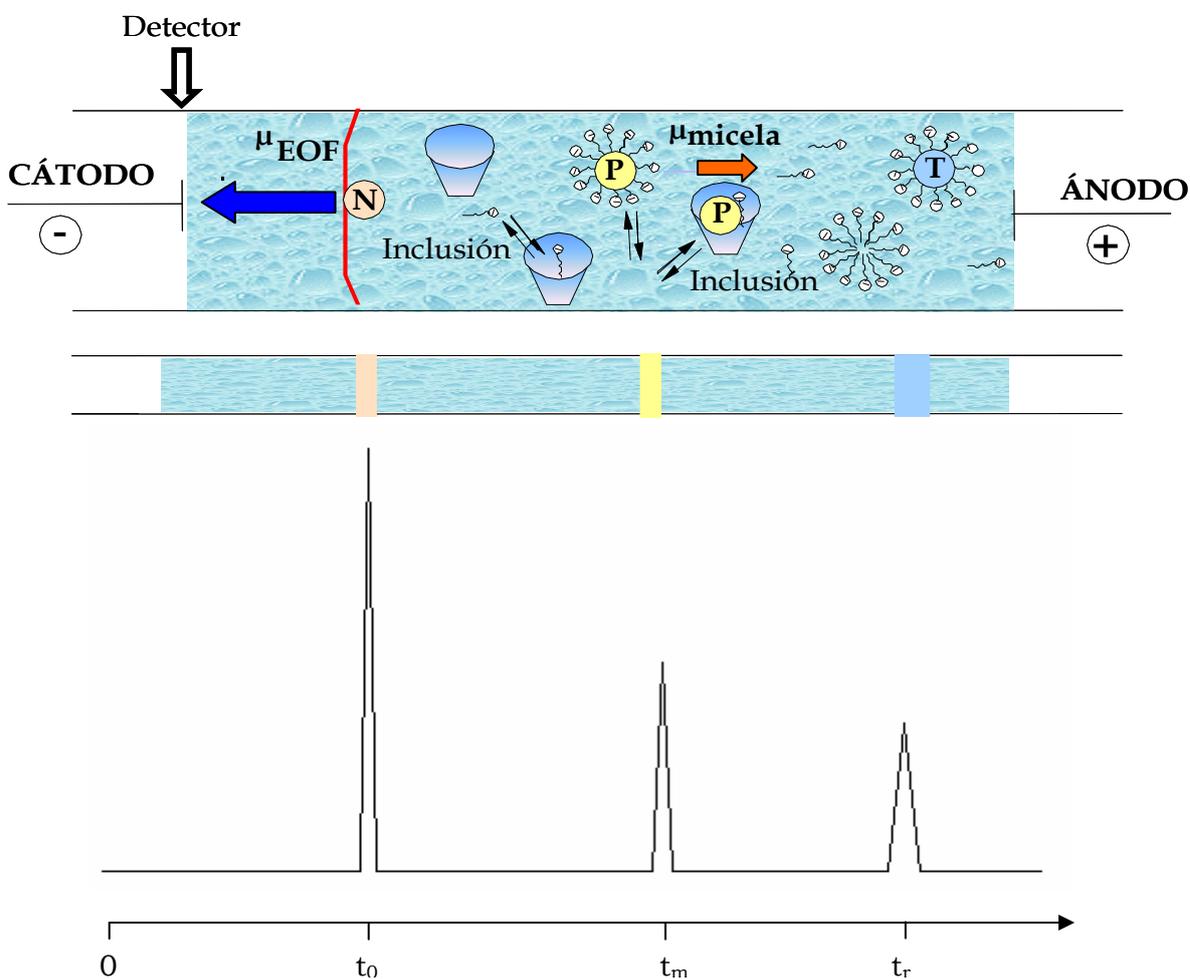


Figura 9. Principio de separación de solutos neutros en CD-MEKC en presencia de un tensioactivo aniónico y una ciclodextrina neutra.

### 2.4.3 Electroforesis capilar en gel (CGE)

La electroforesis capilar en gel opera usando capilares rellenos de gel. El mecanismo de separación en CGE se basa en las diferencias de movilidad de los componentes de la muestra debido a su tamaño molecular para migrar a través de los poros del gel que rellena el capilar, es decir, esta separación está basada en un tamizado o criba molecular. Como el principio de

separación en este caso es el tamaño, este modo será particularmente apropiado para separar moléculas cargadas que tengan diferentes tamaños.

Emplear este modo de separación conlleva ciertas ventajas:

- ✓ Se previene la adsorción del soluto a las paredes del capilar
- ✓ Son medios anticonvectivos
- ✓ El uso de los geles ayuda a eliminar el FEO
- ✓ Se minimiza la difusión del soluto

Según las características y tamaño de los componentes de una mezcla, se han de emplear distintos geles. Los dos tipos fundamentales de geles que se emplean en CGE son los geles físicos, dentro de los cuales destaca la agarosa; y los geles químicos, que se preparan por polimerización de la acrilamida en presencia de agentes que produzcan enlaces cruzados para dar una matriz de poliacrilamida. Estos geles de poliacrilamida pueden ser entrecruzados y lineales.

Esta modalidad electroforética está siendo ampliamente utilizada para la secuenciación de ADN <sup>119,120,121</sup>.

---

[119] D. Y. Chen, H. R. Harke, N. J. Dovichi. "Two-Label Peak-Height Encoded DNA sequencing by capillary gel electrophoresis: Three examples". *Nucleic Acids. Res.* 20 (1992) 4873-4880.

[120] S. Bay, H. Starke, J. Z. Zhang, J. F. Elliot, L. D. Coulson, N. J. Dovichi. "Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing of a template from the malaria genome by use of 4%T, 5%C polyacrylamide and two-color peak-height encoded fluorescence detection". *J. Capillary Electrophoresis.* 1 (1994) 121-126.

[121] T. Manabe, N. Chen, S. Terabe, M. Yohda, L. Endo. "Effects of linear polyacrylamide concentrations and applied voltages on the separation of oligonucleotides and DNA sequencing fragments by capillary electrophoresis". *Anal. Chem.* 66 (1994) 4243-4252.

#### 2.4.4 Isoelectroenfoque capilar

Como su propio nombre sugiere, el modo o modalidad de separación llamado isoelectroenfoque capilar (CIEF) separa los analitos atendiendo a las diferencias entre sus puntos isoeléctricos.

Generalmente, este modo electroforético se emplea para separar analitos de carácter anfótero, como las proteínas o los polipéptidos<sup>122-,123,124</sup>. Los anfóteros son compuestos anfóteros que pueden existir como aniones o cationes dependiendo del pH de la disolución en la que se encuentren. El pH al cual el anfótero es neutro se denomina punto isoeléctrico y se representa por pI. A un valor de pH menor del pI el anfótero se encuentra como catión, y por encima del pI, como anión.

Es decir, a modo de resumen, podemos decir que la separación por CIEF se basa en la migración electroforética de sustancias anfóteras en un gradiente de pH. Para realizar una separación empleando este principio, el extremo anódico del capilar tendrá que estar sumergido en una disolución ácida, mientras que el catódico, en una solución básica. Cuando se aplica un campo eléctrico, la presencia de los anfóteros en el interior del capilar, provoca un gradiente de pH. Los componentes cargados de la muestra, migran entonces a través del capilar hasta que lleguen a una región donde el pH sea igual que su pI, momento en el que se convierten en especies neutras y, por lo tanto, cesan de migrar. El resultado final serán una serie de zonas estrechas donde se agrupan ("enfocan") los solutos hasta conseguir una condición de estado de equilibrio.

---

[122] P. G. Righetti, C. Gelfi. "Isoelectric focusing in capillaries and slab gels: A comparison". J. Cap. Elec. 1 (1994) 27-35.

[123] C. Schwer. "Capillary isoelectric focusing: a routine method for protein analysis?". Electrophoresis. 16 (1995) 2121-2126.

[124] A. B. Chen, C. A. Rickel, A. Flanigan, G. Hunt, K. G. Moorhouse. "Comparison of ampholytes used for slab gel and capillary isoelectric focusing of recombinant tissue-type plasminogen activator glycoforms". J. Chromatogr. A. 744 (1996) 279-284.

Una vez que los solutos están enfocados en dichas zonas, hay que movilizarlos para que pasen a través del detector y obtener así el correspondiente electroferograma.

#### *2.4.5 Isotacoforesis capilar*

La isotacoforesis capilar (CITP) fue la primera variante de la electroforesis capilar que estuvo disponible comercialmente, aunque posteriormente su uso quedó algo estancado. Este modo puede ser empleado para separar especies iónicas, pero no es posible realizar la separación de aniones y cationes durante un mismo análisis. Se fundamenta en que las bandas de la muestra se desplazan en el interior del capilar de separación entre dos disoluciones tampón de diferente conductividad eléctrica, el llamado electrolito frontal y electrolito terminal. Es decir, la principal característica de este modo de electroforesis capilar es que tiene lugar en un sistema de tampón discontinuo. Se consigue que los distintos iones que componen la muestra sean acelerados o frenados hasta conseguir bandas estrechas donde se concentran cada uno de ellos, que se desplazan a la misma velocidad a través del capilar.

CITP opera normalmente con supresión del FEO, cosa que se consigue aumentando la viscosidad del medio, separando el capilar de los recipientes de la disolución tampón usando membranas semipermeables, o bien, revistiendo los capilares de sílice fundida.

La principal aplicación de este modo electroforético es como sistema de preconcentración de muestra previo a la separación por otros modos de CE

125-,126,127,128,129 , aunque también existen numerosas aplicaciones que llevan a cabo separaciones electroforéticas empleando este modo <sup>130-131</sup>.

#### 2.4.6 *Electrocromatografía capilar (CEC)*

La electrocromatografía capilar (CEC) es una técnica de separación híbrida que combina características tanto de CE, como de HPLC. Como consecuencia de esto, no puede ser estrictamente considerada como un modo de electroforesis capilar, aunque normalmente puede operar usando una instrumentación similar a la de CE.

En CEC el capilar es empaquetado con una fase estacionaria cromatográfica, con "fritas" en ambos extremos, que puede retener los solutos por medio de equilibrios de distribución normales asociados a cromatografía.

Como el líquido está en contacto tanto con las paredes de sílica, como con las partículas de sílica de la fase estacionaria, se genera flujo electroosmótico. Así, la CEC se ve favorecida por el perfil de flujo plano del FEO, el cual proporciona alta eficacia de separación. El mecanismo de

---

[125] H. Okamoto, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa. "Simultaneous determination of metal ions, amino acids, and other small biogenic molecules in human serum by capillary zone electrophoresis with transient isotacopheresis preconcentration". *J. Sep. Science*. 28 (2005) 522-528.

[126] M. Mazereu, U. R. Tjaden, N. J. Reinhoud. "Single capillary isotacopheresis-zone electrophoresis: current practice and prospects, a review" *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 686-697.

[127] L. Krivankova, P. Gebauer, P. Bocek. "Some practical aspects of utilizing the on-line combination of isotacopheresis and capillary zone electrophoresis" *J. Chromatogr. A.* 716 (1995) 35-48.

[128] D. T. Witte, S. Nagard, M. Larsson. "Improved sensitivity by on-line isotacopheretic preconcentration in the capillary zone electrophoretic determination of peptide-like solutes". *J. Chromatogr. A.* 687 (1994) 155-166.

[129] N. A. Guzmán, M. A. Trebilcock, J. P. Advis. "The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass spectrometry". *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 997-1015.

[130] A. Zgola-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak, J. Zembrzuska, M. Franska, R. Franski, Z. Lukaszewski. "Isotacopheretic determination of carboxylic acids in biodegradation samples". *J. Chromatogr. A.* 1068 (2005) 327-333.

[131] T. K. Natishan. "Recent progress in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis". *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technolog.* 28 (2005) 1115-1160.

separación en CEC depende en gran medida de la naturaleza de la muestra. Las moléculas neutras se separan en base a mecanismos puramente cromatográficos, mientras que los ácidos y las bases se separan por una combinación de mecanismos cromatográficos y electroforéticos.

Se puede decir que este modo de CE es una cromatografía líquida en la cual se sustituye la bomba de alta presión por un generador de alto voltaje, que se basa en procesos electroforéticos e interacciones con la fase estacionaria que pueden ser por adsorción, partición y gel permeable en un capilar estrecho y relleno.

Existe ya un gran número de interesantes aplicaciones desarrolladas en los laboratorios de investigación analítica <sup>132-,133,134,135,136,137</sup>.

### ***3. Sistemas de detección en electroforesis capilar***

La separación en CE se produce al migrar los solutos a través del capilar, después de la aplicación de un determinado voltaje, pero posteriormente es necesario determinar y cuantificar los componentes que se han separado.

En los últimos años las metodologías y las aplicaciones electroforéticas han progresado de un modo espectacular, sin embargo la principal limitación ha sido la posibilidad en cuanto al acoplamiento de diferentes sistemas de

---

[132] R. Sakaguchi, Y. Kato, A. Ito, T. Tsuda, T. Yoshida. "Preparation of red blood cell column for capillary electrochromatography". *Analytical Sciences*. 21 (2005) 453-456.

[133] A. De Rossi, C. Desiderio. "Application of reversed phase short end-capillary electrochromatography to herbicides residues analysis". *Chromatographia*. 61 (2005) 271-275.

[134] L. Yang, E. Guihen, J. D. Holmes, M. Loughran, G. P. O'Sullivan, J. D. Glennon. "Glod nanoparticle-modified etched capillaries for open-tubular capillary electrochromatography". *Anal. Chem.* 77 (2005) 1840-1846.

[135] Z. Aturki, G. D'Orazio, S. Fanali. "Rapid assay of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase capillary electrochromatography". *Electrophoresis*. 26 (2005) 798-803.

[136] K. Ohyama, M. Wada, G. A. Lord, Y. Ohba, M. N. Nakashima, K. Nakashima, S. Akiyama, C. K. Lim, N. Kuroda. "Capillary electrochromatography of caffeine and its metabolites in rat brain microdialysate". *Electrophoresis*. 26 (2005) 812-817.

[137] T. Yokoyama, M. Zenki, M. Macka, P. R. Haddad. "Enhancement of separation capability of inorganic ions by capillary electrochromatography". *Bunseki Kagaku*. 52 (2005) 107-120.

detección a la separación electroforética, debido principalmente a las pequeñas dimensiones del capilar utilizado así como los pequeños volúmenes de muestra usados que hacen que la sensibilidad en la detección de las zonas ocupadas por los solutos de interés se vea afectada por la dispersión en la detección on-line, provocando alteraciones en la señal que, en ocasiones, son cruciales para la efectividad de la detección.

De forma general, cuando se acopla un detector a un sistema de separación, éste debe cumplir una serie de condiciones para el buen funcionamiento como son:

- ✓ Presentar una buena sensibilidad.
- ✓ Proporcionar límites de detección bajos. Para ello es necesaria la combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo.
- ✓ A veces es necesario que el detector presente una determinada selectividad a una serie de analitos o a uno determinado, evitando así posibles interferencias en la señal por parte de otras sustancias presentes en la muestra.
- ✓ La respuesta del detector debe ser rápida, ante un cambio en la concentración de analito.
- ✓ La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- ✓ Proporcionar señales fiables. Esto implica principalmente que las señales deben ser reproducibles y estables en el tiempo.
- ✓ Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito. La señal de fondo no debe perturbar la señal correspondiente a los analitos y conviene que sea lo más pequeña y/o constante posible.

✓ Proporcionar cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, es decir que presente un amplio intervalo lineal. Además, sería deseable que la relación entre la señal y la concentración fuera lineal.

Todas estas razones comentadas influyen en gran medida en los sistemas de detección que se acoplan a estos equipos y además, los detectores que se pueden acoplar a CE deben ser sensibles a pequeñas cantidades de muestra y compatibles con las dimensiones físicas del capilar, aún en detrimento de otras cualidades.

Hasta ahora, se han adaptado una gran variedad de técnicas de detección a la electroforesis capilar con diferente éxito. En la Tabla 2 se muestran los distintos sistemas de detección y el rango de los límites de detección alcanzados en dicho acoplamiento.

### **3.1. Detección con técnicas ópticas.**

En este tipo de técnicas se incluyen aquellos sistemas de detección basados en la interacción de algún tipo de radiación con los analitos. Estos detectores se sitúan habitualmente antes del final de la columna capilar, empleando una porción de ésta como célula de detección. Este hecho supone una ventaja ya que la eficacia de la separación no se ve afectada, por el contrario su mayor desventaja radica en que, en muchos casos, la sensibilidad se ve comprometida por el tamaño del capilar.

#### *3.1.1. Absorción UV-Visible.*

Los métodos basados en la absorbancia de la luz UV/Visible son los más utilizados en equipos comerciales de CE, debido a su posibilidad para

determinar un gran número de compuestos y grupos funcionales y su facilidad de manejo, a pesar de que su sensibilidad es mucho menor que la de otros sistemas de detección<sup>138</sup> ya que ésta depende del diámetro interno de la columna capilar y de las absorbtividades molares de los analitos. Su sencillez y relativo bajo coste son sus principales ventajas.

TÉCNICAS ÓPTICAS		
Métodos	Límites de detección (M)	Ventajas y desventajas
<i>Espectrofotométricas</i>		
Directa	$10^{-13} - 10^{-15}$	Universal (excepto para sustancias que carecen de cromóforos)
Indirecta	$10^{-12} - 10^{-15}$	
<i>Espectrofluorimétricas</i>		
Directa	$10^{-15} - 10^{-17}$	Sensible y selectiva, normalmente requiere derivatización de muestras, no universal
Indirecta	$10^{-14} - 10^{-16}$	Universal, usualmente requiere derivatización de muestras
Derivatización Pre-columna	$10^{-18} - 10^{-21}$	Extremadamente sensible y selectiva, usualmente requiere derivatización de muestras, no universal
Derivatización Post-columna	$10^{-17}$	Sensible, usualmente requiere derivatización de muestras
Inducida por láser (FIL)	$10^{-18} - 10^{-20}$	Extremadamente sensible y selectiva, usualmente requiere derivatización de muestras, no universal
Espectroscopía Raman	$10^{-15}$	La fluorescencia como mayor inconveniente. Ofrece información estructural
Índice de refracción	$10^{-14} - 10^{-16}$	Control exhaustivo de la temperatura

[138] C. Cruces-Blanco, *Electroforesis Capilar*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Almería, (1998).

<b>TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS</b>		
Amperometría	$10^{-18} - 10^{-19}$	Muy sensible
Conductimétrica	$10^{-15} - 10^{-16}$	Poca sensibilidad, universal, requiere electrónica especial
<b>OTRAS TÉCNICAS</b>		
Espectrometría de masas	$10^{-16} - 10^{-17}$	Sensible, ofrece información estructural
Técnicas radioquímicas	$10^{-17} - 10^{-19}$	

*Tabla 2. Sistemas de detección en CE y rangos de límites de detección alcanzados.*

Existen diferentes formas de trabajar con esta modalidad de detección como son, la modalidad directa en la que la molécula objeto de análisis es el cromóforo; la indirecta que se emplea cuando los compuestos analizados no poseen grupos cromóforos en su molécula o absorben poca intensidad de luz como para ser detectados de forma directa.

La descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación de este sistema de detección junto con referencias de las numerosas aplicaciones existentes en relación a la misma, serán recogidas en capítulos sucesivos.

### *3.1.2. Fluorescencia.*

Estos detectores presentan como principal ventaja su elevada sensibilidad, pudiéndose alcanzar los menores límites de detección cuando se emplea fluorescencia inducida por láser (LIF). La desventaja de este sistema está en que el número de compuestos que presentan propiedades

fluorescentes no es amplio, siendo necesario recurrir a procesos de derivatización o detección indirecta para analitos no fluorescentes.

La descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación necesarios para llevar a cabo una determinación empleando LIF como sistema de detección en CE se recoge en el Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral, donde se ha empleado como sistema de detección.

### *3.1.3. Fosforescencia.*

El acoplamiento de la fosforescencia a la electroforesis capilar a temperatura ambiente es otra técnica que está emergiendo en los últimos años para el análisis de una amplia variedad de compuestos. Uno de los inconvenientes que se pueden presentar a la hora de usar esta forma de detección es que el número de compuestos que presentan fosforescencia nativa en disolución acuosa es muy limitado, además de la necesidad de mantener las disoluciones a medir libres de oxígeno para evitar así la atenuación molecular. Es también de vital importancia el hecho de que la fosforescencia a temperatura ambiente presenta unos tiempos de vida mayores que la fluorescencia, por lo cual, los problemas debidos a la dispersión y fluorescencia se pueden evitar empleando la detección a tiempo resuelto. En esta técnica de detección se pueden utilizar hasta tres modos diferentes: fosforescencia directa en la cual el propio analito en estudio es el encargado de producir fosforescencia; atenuada o indirecta en la que el analito, no fosforescente, interacciona con un compuesto fosforescente dando lugar a una disminución en la señal, y la sensibilizada en la que el analito se detecta indirectamente por la fosforescencia emitida por un

aceptor, después de la excitación el analito actúa como donador de energía cediéndola a un aceptor<sup>139</sup>.

#### *3.1.4. Quimioluminiscencia.*

La quimioluminiscencia (CL) se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o infrarrojo cercano) producida en el transcurso de una reacción química. Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Una ventaja de las técnicas CL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. Sin embargo el número de componentes que emiten quimioluminiscencia es bastante limitado

El uso analítico de la CL está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar diversos compuestos. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, la CL y la bioluminiscencia (BL) se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo.

Las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la CL como sistema de detección, combinada con CE como método previo de separación, proporcionando una selectividad y sensibilidad analítica excelentes y permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas<sup>140</sup>.

---

[139] J. Kuijt, Phosphorescence detection in capillary electrophoresis, doctoral thesis, Vrije universiteit (2003) Amsterdam.

[140] A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, N.A. Guzmán, Cp. 15: Chemiluminescence Detection in Capillary Electrophoresis, Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Eds. A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, Marcel Dekker, Inc. (2001).

### *3.1.5. Termoópticos.*

Estos detectores se basan en el fenómeno de la refracción fototérmica (PTR). Estos procesos se generan al excitar con una radiación, una porción discreta del capilar, provocando que parte de esa radiación sea absorbida por los analitos, que de inmediato sufren cambios térmicos. Estos cambios modifican ligeramente el índice de refracción en el punto de la columna capilar irradiada<sup>141</sup>.

### *3.1.6. Índice de refracción.*

Este sistema de detección consiste en medir la cantidad de luz refractada después de pasar a través de un soluto que se encuentre dentro de un capilar en relación con la variación cuando sólo hay disolución reguladora dentro de dicho capilar. La detección se produce por la diferencia entre el índice de refracción de la disolución con el analito separado y el de la disolución reguladora.

El número de publicaciones, al igual que el sistema de detección anterior, es, muy limitado, existiendo referencias en la determinación de carbohidratos<sup>142</sup> y proteínas<sup>143</sup>.

### *3.1.7. Dispersión Raman.*

En este tipo de sistema de detección la muestra es excitada mediante una fuente de luz monocromática intensa que provoca variaciones en la frecuencia e intensidad de radiación dispersada posteriormente. La sensibilidad de este tipo de detección puede verse incrementada utilizando

---

[141] A. Sánchez Arribas, Tesis doctoral, Universidad Autónoma (2003) Madrid.

[142] S. Suzuki, S. Honda, Electrophoresis, Review, 24 (2003) 3577.

[143] X.Z. Wu, J.Q. Wu, J. Pawliszyn, LC GC North America, Review, 19 (2001) 526.

espectroscopía Raman resonante, de superficie aumentada o la unión de ambos. Con este tipo de sistema de detección se consigue una valiosa información vibracional del analito en estudio lo que la hace una potente técnica de identificación<sup>144</sup>.

### 3.2. Detectores electroquímicos.

Esta modalidad de detección se basa en el estudio de las sustancias electroactivas en disolución, apoyándose en los principios de la conductimetría, potenciometría, amperometría o voltamperometría.

#### 3.2.1 Detectores conductimétricos.

En los detectores conductimétricos se mide la conductividad entre dos electrodos inertes sobre los que se aplica un potencial constante. Dado que cualquier ión produce un cambio en la conductividad, este modo de detección tiene un carácter universal. Esto implica que no sea en absoluto selectivo y se limite su uso a muestras de composición conocida. Por otro lado, tiene como desventaja que la conductividad es directamente proporcional al área de los electrodos e inversamente proporcional a la distancia entre ellos, lo que significa que la señal está muy influenciada por el volumen de la célula de detección<sup>145</sup>.

El número de publicaciones de este sistema de detección en CE es también muy limitado, ciñéndose, fundamentalmente a la determinación de aniones y cationes inorgánicos<sup>146-148</sup>.

---

[144] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, New York (1994): Academic Press.

[145] T. Capees, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 103.

[146] V. Pacakova, P. Coufal, K. Stulik, B. Gas, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003)1883.

[147] J. Tanyanyiwa, S. Leuthardt, P.C. Hauser, *Electrophoresis, Review*, 23 (2002) 3659.

### 3.2.2 Detectores potenciométricos.

La detección del analito se basa en su capacidad para transferirse de la disolución a través de una membrana. Este proceso genera una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, que es proporcional a la concentración de analito. Las membranas no son completamente selectivas y tienen respuestas a varios iones en diferentes rangos de concentración, siendo esta característica la que permite que puedan emplearse como detectores en métodos de separación. Aunque la señal potenciométrica es independiente del volumen de la célula de detección, no es fácil la fabricación de electrodos con membranas de un diámetro similar al de los capilares y su alineación con la salida de éstos.

El número de publicaciones de este sistema de detección en CE se reduce, fundamentalmente, al análisis de aniones y cationes inorgánicos además del análisis de compuestos de interés farmacéutico y biomédico<sup>149</sup>.

### 3.2.3 Detectores amperométricos.

Son los detectores electroquímicos que se utilizan más frecuentemente. El sistema de medida consta habitualmente en un electrodo de trabajo situado a la salida de la columna capilar, otro de referencia y un tercero auxiliar, conectados a un potenciostato. La detección amperométrica consiste, por tanto, en medir la corriente resultante de la oxidación o reducción de sustancias electroactivas, a un potencial constante, en la superficie del electrodo de trabajo. Este sistema se puede utilizar siempre que un compuesto pueda oxidarse o reducirse o experimentar ambos procesos, por lo que no es universal. Sin embargo, puede discriminar entre sustancias

---

[148] A. Padarauskas, *Rev. Anal. Chem.*, 20 (2001) 271.

[149] A.B. Wang, Y.Z. Fang, *Electrophoresis, Review*, 21 (2000) 1281.

electroactivas (detectables) y no electroactivas (no detectables) e, incluso, seleccionando adecuadamente el potencial aplicado, entre sustancias electroactivas que tengan en la suficiente diferencia en sus potenciales redox.

### 3.3. Detección con espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es el único sistema de detección que permite la identificación de compuestos desconocidos, por lo que la combinación de una técnica de separación de alta eficacia, como es la CE, con la espectrometría de masas como sistema de detección da lugar a una herramienta muy útil en el análisis de muestras complejas<sup>150</sup>.

Un esquema de lo que sería el acoplamiento de cualquier técnica separativa con la espectrometría de masas se muestra en la siguiente figura:

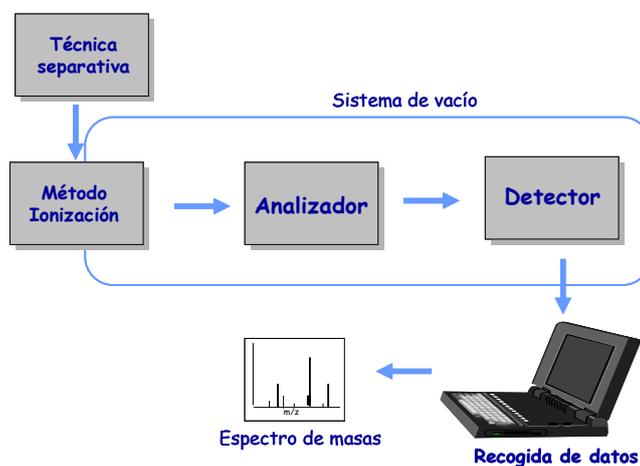


Figura 10. Esquema de un acoplamiento entre una técnica separativa y MS.

[150] J. Hernández Borges, C. Simó, A. Cifuentes. "Principios de Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas: Aplicación al análisis de pesticidas". *Cromatografía y Técnicas afines* 24(2) (2003) 45-59.

Lógicamente, la técnica separativa se coloca al inicio del esquema, seguida de la interfase, en la cual se produce la ionización de los analitos. Después los iones en fase gaseosa son transportados al analizador de masas, y una vez analizados, se detectan, se registran y procesan los datos a través de un sistema informático.

El siguiente esquema nos muestra que, tanto el método de ionización, como el analizador, pueden ser de varios tipos.

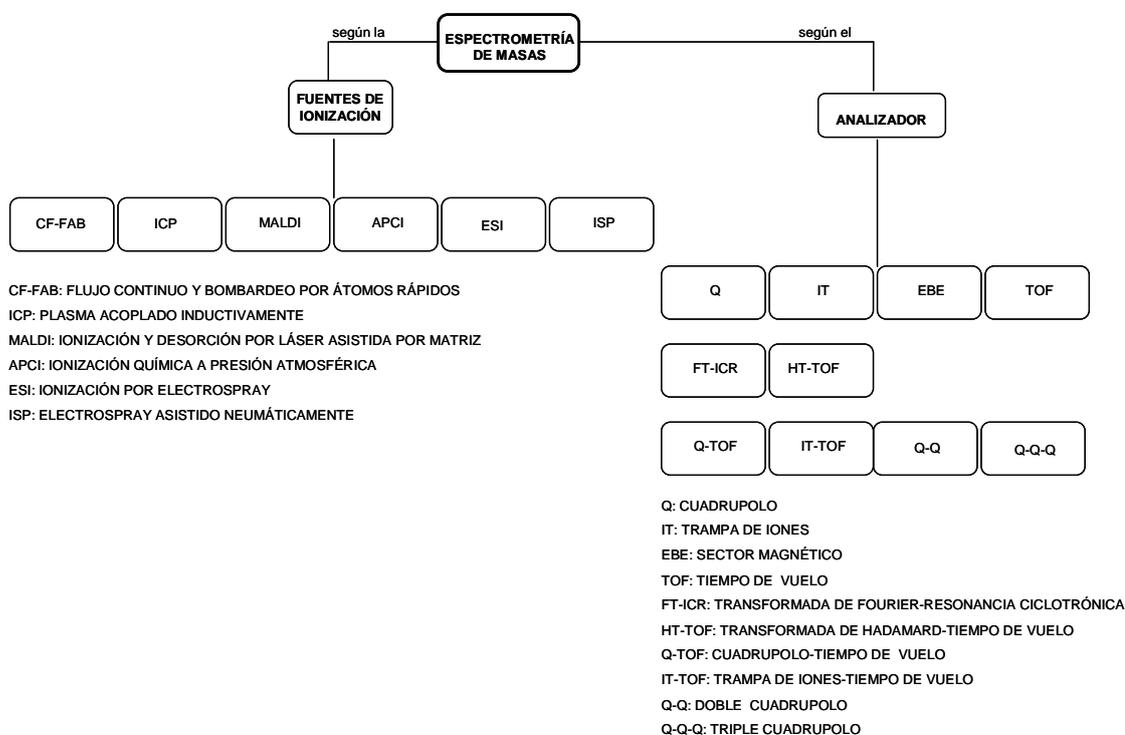


Figura 11. Clasificación de las fuentes de ionización y analizadores empleados en espectrometría de masas.

### *3.3.1. Interfases*

Las técnicas de separación empleadas trabajan en fase líquida, mientras que en un espectrómetro de masas las sustancias para ser analizadas deben entrar en fase gaseosa. Esto obliga a la utilización de una adecuada interfase.

A pesar de la variedad de interfases desarrolladas la más utilizada actualmente es la interfase ESI. Esta interfase permite un análisis eficaz de compuestos polares, lábiles, y/o de compuestos con un alto peso molecular (normalmente hasta 100000 Da). Por otro lado, es fácil de implementar, es sensible y puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones.

#### *3.3.1.1. Ionización por electrospray (ESI)*

En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo. La muestra con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente. El disolvente se va evaporando (desolvatación) de las microgotas formadas y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. Como consecuencia, las gotas se encogen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí debido al campo electrostático que se aplica entre la salida del capilar y la entrada al equipo MS ( $\pm 2-5$  kV). En cierto momento, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión de la superficie que mantiene unidas las gotas en forma esférica, y las pequeñas gotas se rompen (el punto donde se pronostican que las gotas se romperán se llama límite de Rayleigh, pero la ruptura se suele producir un poco antes de que se alcance dicho punto). Debido a fuerzas de repulsión coulombica aumenta la tensión superficial de las microgotas y éstas acaban "explotando" ("explosiones de Coulomb"),

formándose así una serie de pequeñas gotas cargadas que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que finalmente se forman iones cargados desnudos que pasan a fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado<sup>151,152</sup>.

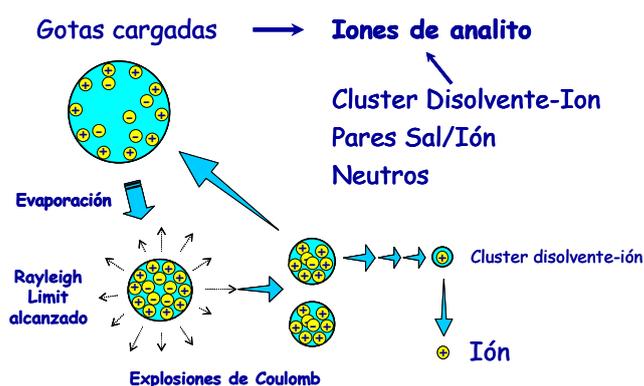


Figura 12. Proceso de formación del electrospray.

En el acoplamiento CE-ESI-MS la incompatibilidad del flujo procedente del capilar de separación (de hasta 100 nl/min), con el flujo necesario para la formación de un electrospray estable (1-200  $\mu$ l/min) se soluciona mediante el empleo de un líquido adicional. Se requieren emplear como disoluciones tampón compuestos volátiles que se evaporen con facilidad evitando el incremento del ruido de fondo y la obstrucción y contaminación del sistema de detección.

[151] C. Simó, A. Cifuentes. "Electroforesis Capilar: Detección mediante espectrometría de masas" en "Electroforesis capilar: aproximación según la técnica de detección". Ed. Univ. Granada. (2005) Pp 409-438.

[152] R. Martin Smith. "Instrumentation" en "Understanding Mass Spectra. A basic approach". Ed. K. L. Busch. John Wiley & Sons, Inc. (1999) 1-40.

En el acoplamiento HPLC-ESI-MS al contrario que en CE el problema es el empleo de flujos muy elevados (hasta 2-3ml/min) por lo que se recomienda utilizar un divisor de flujo.

### *3.3.2. Analizadores de masas*

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transferencia de los iones procedentes del capilar desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas.

En el acoplamiento llevado a cabo entre CE y MS en el desarrollo experimental de esta memoria se ha utilizado el analizador de tiempo de vuelo (TOF).

#### *3.3.2.1. Tiempo de vuelo*

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) separa masas sin un campo magnético. El TOF discrimina en función de la distinta velocidad que adquieren los iones en el interior del analizador en función de su relación  $m/z$ <sup>153</sup>.

El siguiente esquema nos muestra las partes que posee el MicroTOF empleado para llevar a cabo parte del desarrollo experimental de la presente memoria.

---

[153] K. A. Rubinson, J. F. Rubinson. "Espectrometría de masas" en "Análisis Instrumental". Ed. Pearson Education S. A. Madrid. (2000) Pp 522-577.

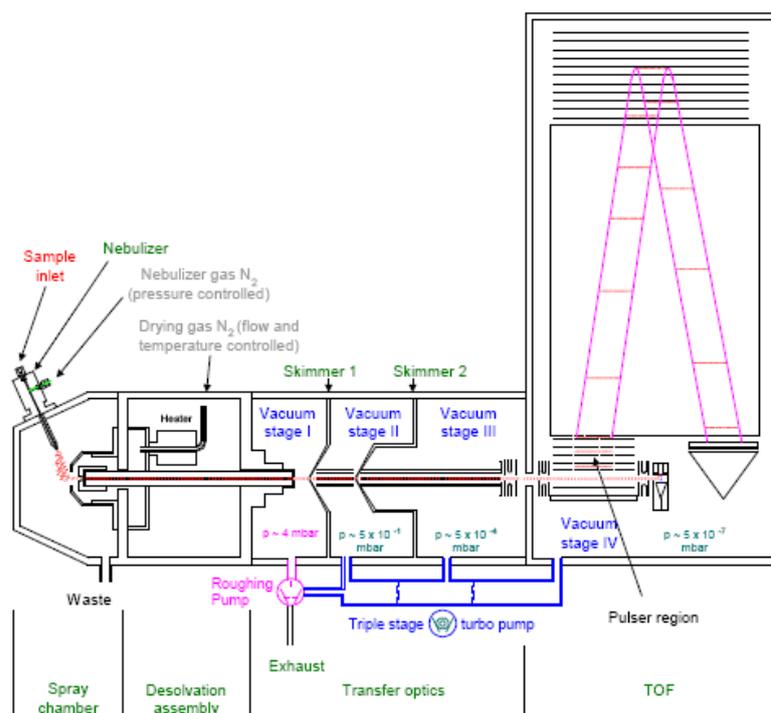


Figura 13. Esquema detallado de las partes de las que consta un ESI-MicroTOF.

La muestra disuelta entra en la cámara de nebulización donde tiene lugar la formación del electrospray. Los iones formados atraviesan la unidad de desolvatación, que separa las zonas a presión atmosférica de la primera zona a alto vacío, y que consta de un calentador del gas de secado y un capilar de cristal. Se llega a través de ella a la zona de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que están a alto vacío, separados entre sí por varios skimmers. Los dos hexapolos son los que transfieren los iones hasta la zona de alto vacío, mientras que las lentes (1-5) enfocan o dirigen dichos iones.

La zona de aceleración ortogonal contiene dos de las últimas lentes mencionadas anteriormente (lentes 4 y 5) y acelera los iones hacia el tubo de vuelo aplicando un campo eléctrico intermitente.

En función de su masa, los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector. Detrás del mismo hay zonas de tensión que repelen los iones que le llegan; lógicamente, se repelen los iones pequeños con más facilidad.

El detector es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor; cada uno de ellos trabaja como un multiplicador de electrones independiente. También hay un detector de referencia.

Este analizador de tiempo de vuelo (TOF) es relativamente nuevo y está ofreciendo resultados muy satisfactorios. Es rápido y sensible, permite la determinación de masas exactas empleando TIP (True Isotopic Pattern) para el análisis en dos dimensiones, y da óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos procesos rutinarios de re-calibración. Es decir, aporta una mayor fiabilidad de los resultados aplicando un método analítico casi bidimensional: combinando la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica.

Algunas de sus especificaciones más notables son:

- El rango de masas que puede analizar en modo estándar es 50-3000 m/z.
- Resolución: 10000 en modo normal MicrOTOF y 15000 en modo MicrOTOF focus.
- Exactitud: 3 ppm con calibración interna y 5 ppm con calibración externa.



## CAPITULO 1

***DETERMINACIÓN DE ANTIEPILÉPTICOS EN SUERO HUMANO POR  
CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELAR CON DETECCIÓN  
FOTOMÉTRICA DIRECTA***



El proceso de monitorización de drogas antiepilépticas ha sido el área de la Toxicología clínica que más rápidamente ha crecido en estos últimos años debido a la continua y reciente aparición de un gran número de estas drogas. La posibilidad de medir la concentración de estos fármacos en suero ha contribuido en gran medida al uso apropiado de éstos. Para un gran número de fármacos, la ventana entre un abastecimiento de niveles terapéuticos adecuado y la sobredosis tóxica es muy delgada. Debido a esto determinados antiepilépticos no son usados para tratamientos en pacientes que no tienen una monitorización continua. En este aspecto, la precisión asociada al análisis cuantitativo es muy crítica.

Las razones de la importancia de llevar a cabo la monitorización de antiepilépticos<sup>154</sup> en pacientes son:

- Los efectos terapéuticos y tóxicos de estos fármacos se relacionan mejor con su concentración sérica que con la dosis administrada.
- La mayoría de los fármacos antiepilépticos tienen un estrecho margen terapéutico y requieren por tanto ajustes de dosis para mantener la concentración sérica dentro del rango adecuado así como evitar efectos tóxicos.
- La monitorización puede disminuir el tiempo requerido para alcanzar el tratamiento óptimo de las crisis.
- Muestran una gran variabilidad interindividual dosis/concentración plasmática.
- Su uso es especialmente útil para documentar fallos terapéuticos.

Los métodos utilizados usualmente para la monitorización de antiepilépticos son:

---

[154] J.P. Landers. Handbook of capillary electrophoresis. 2nd edición. CRC PRESS LLC (2000)

- Espectrofotometría, que fue el primer método usado para el análisis cuantitativo de fármacos.
- Métodos cromatográficos, siendo éstos los únicos suficientemente específicos y sensibles para medir todos los fármacos usados habitualmente y sus metabolitos de una manera simultánea si bien el gasto en reactivos y columnas es caro por lo que su uso en rutina es cuestionable.
- Técnicas de inmunoensayo, que tienen la ventaja de ser rápidas y sensibles. En general, el método inmunológico más comúnmente usado para medir la concentración de antiepilépticos es el de inmunofluorescencia polarizada (FPIA)<sup>155</sup>.

Es complicado decir, por lo menos a día de hoy, que la CE va a sustituir esta metodología clínica descrita anteriormente debido a su alta capacidad y conveniencia para llevar a cabo la monitorización, pero si se puede afirmar que en determinados casos puede llegar a complementarse con la misma. Además, la aparición continua cada año de nuevos antiepilépticos unido a que muchos de ellos no pueden ser determinados por ensayos inmunológicos hacen de la CE la herramienta adecuada para poder realizar la monitorización de estos antiepilépticos.

Los cuatro antiepilépticos estudiados en este capítulo I son analitos que no presentan fácilmente carga por lo que es necesario recurrir a una metodología electroforética basada en el uso de modificadores orgánicos. En concreto se utilizó una metodología basada en el uso de medios micelares (MEKC) como pseudofase, lo cual permite, como se verá posteriormente, la separación en un tiempo razonablemente corto de los cuatro antiepilépticos objeto de estudio en función de su tendencia a permanecer en la micela o en la disolución.

---

[155] B.Gómez-Serrano, J. Tejeiro-Martínez. REV NEUROL CLIN, 1 (2000) 326-338

Por otro lado la presencia de grupos cromóforos en la estructura de los cuatro antiepilépticos facilita su determinación mediante el uso de detector fotométrico a 220 nm. En este caso se utilizó un detector de batería de diodos implementado en un equipo de electroforesis capilar comercial.

Los detectores basados en espectroscopia de absorción molecular son indiscutiblemente los más usados como sistemas de detección en CE por varias razones como son:

- ▶ El coste de estos detectores es bastante más bajo comparado a otros sistemas de detección (FIL ó MS).
- ▶ La mayoría de los compuestos existentes absorben, en mayor o menor medida, en la región del UV. Por ejemplo la mayoría de las moléculas orgánicas pueden ser detectadas en un rango de longitudes de onda comprendido entre 195-210 nm.
- ▶ Cabe destacar también que con este tipo de detección no es necesario, en la mayoría de los casos, llevar a cabo modificaciones químicas de la muestra previas a su análisis.

Pero como era de suponer, en este también CE-Uv no todo son ventajas, también presenta una serie de inconvenientes como son:

- ◆ El nivel de sensibilidad es más bajo si lo comparamos con otras modalidades de detección, este es el principal problema de esta técnica. Esto es debido al pequeño paso de luz de los capilares empleados en esta técnica de separación (cuyos diámetros internos son menores de 100  $\mu\text{m}$ , generando problemas principalmente para analitos con baja absorptividad molar) y a la propia naturaleza intrínseca de este tipo de sistema de detección.
- ◆ Realizar la detección en los rangos de longitudes de onda descritos anteriormente (195-210 nm), supone un problema ya que existe un

gran número de interferentes, existe absorción de radiación por los componentes ópticos del instrumento e incluso de los propios constituyentes del aire; esto dificulta la identificación de los analitos objeto de estudio.











La metodología analítica desarrollada en este capítulo ofrece un amplio abanico de ventajas para el análisis de estas drogas antiepilépticas, aunque su uso no está todavía totalmente explotado en los laboratorios de análisis clínicos. Algunas de estas ventajas, respecto a otras técnicas analíticas que actualmente se utilizan en el control de este tipo de drogas, son descritas a continuación:

- ▶ La preparación de la muestra es mucho más simple comparada con HPLC o CG, ya que solo fue necesaria una simple centrifugación del suero.
- ▶ La simplificación del instrumental del equipo en CE es otra de las ventajas con respecto a HPLC, especialmente en lo que se refiere a tiempos de estabilización de señal, purga de bombas, que hacen que el tiempo real de análisis sea bastante más reducido.
- ▶ El tiempo de separación en el método establecido ha sido de 10 min, bastante más reducido que para HPLC que para la separación de estos cuatro antiepilépticos necesita del orden de 40 min.
- ▶ Bajo coste del análisis debido al poco volumen de reactivo usado, a lo que se suma también el bajo importe de los mismos y de varios de los componentes del equipo de CE, como por ejemplo los capilares de sílice.
- ▶ Volúmenes de inyección de muestra reducidos ( $10^{-9}$  nL), de manera que podrán llevarse a cabo varias inyecciones cuando se trabajen con volúmenes de suero limitados.

## CAPITULO 2

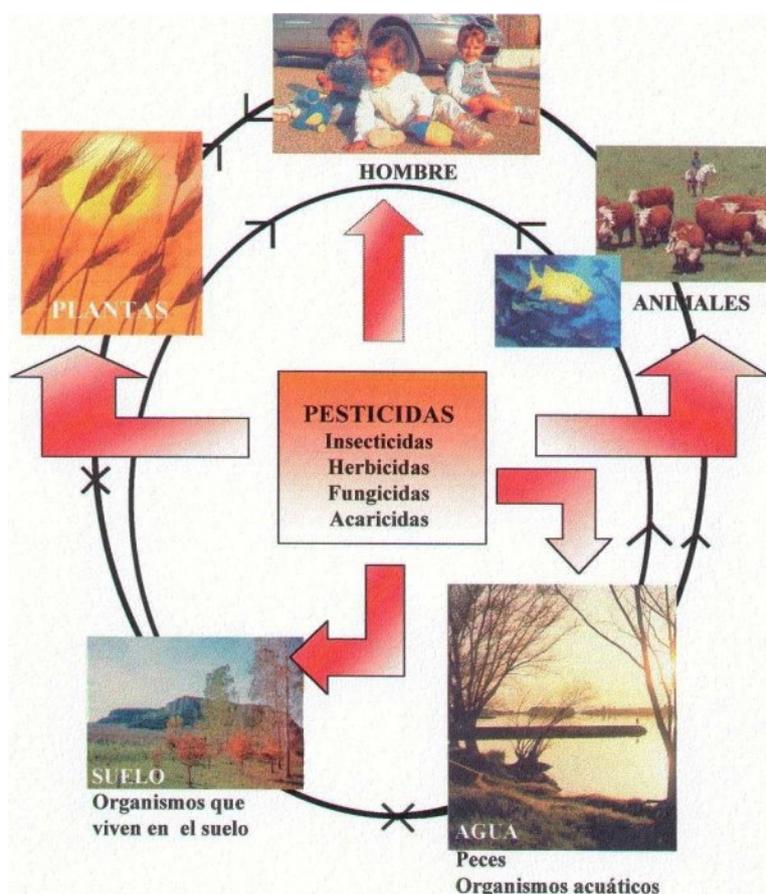
***DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS AMINADOS Y METABOLITOS EN AGUAS DE REGADÍO MEDIANTE CE EN LA MODALIDAD EKC-CD Y DETECCIÓN POR LIF***



Aunque los pesticidas suelen estar diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como son la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna. La permanencia en el ambiente favorece la incorporación a las cadenas tróficas, la acumulación en los tejidos grasos humanos y animales y la biomagnificación.

La contaminación de los cursos de agua se produce en forma directa por la aplicación de pesticidas en las aguas, por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos. Es igualmente importante la contribución indirecta producida por lixiviación (infiltración) de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, el aumento de la intoxicación humana, la pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos). Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para el ambiente como por ejemplo los polinizadores. Además de destruir recursos genéticos y farmacológicos conocidos y otros aún no desvelados, el empobrecimiento de la biodiversidad puede conducir a la proliferación de las especies antagónicas de aquellas extinguidas, provocando nuevos desequilibrios ecológicos y nuevas plagas. Un efecto adverso adicional proviene de los envases y contenedores vacíos.

Los factores mencionados forman un ciclo cerrado que se retroalimenta y refuerza profundizando los efectos adversos, como puede verse en la figura que sigue a continuación.



*Figura 14. Ciclo de cualquier pesticida*

La persistencia (resistencia química a la degradación) de los pesticidas favorece la contaminación de las aguas, la incorporación a suelos, vegetales y animales comestibles, los que al ser consumidos actúan como transportadores de los pesticidas facilitando su acumulación en los organismos vivos. Asimismo, mediante los residuos y desechos producidos, los plaguicidas o sus metabolitos vuelven al agua, al suelo, a la flora y fauna provocando el reforzamiento del ciclo, la pérdida de biodiversidad y la degradación de todos los recursos.

Desde el punto de vista analítico los pesticidas son contaminantes que se encuentran habitualmente a bajas concentraciones y por lo tanto son necesarias adecuados procedimientos de preconcentración y/o el uso de técnicas analíticas extremadamente sensibles.

Por estas razones en el trabajo experimental que se muestra en este capítulo se ha elegido el sistema de detección para CE más sensible del que se dispone hoy en día como es la Fluorescencia Inducida por Láser (FIL) (ver tabla de la página 68).

La desventaja de este sistema de detección es que el número de longitudes de onda es limitado (el láser de argón disponible tiene unas longitudes de onda de excitación y emisión de 480/520 nm) por lo que ha sido necesario la derivatización de éstos con fluoresceína isotiocianato (FITC), un marcador de aminas primarias y secundarias, así el método propuesto en un principio se limita a pesticidas con este tipo de grupos funcionales.

En lo que respecta a la metodología electroforética a utilizar, en un principio se pensó que sería posible desarrollar la electroforesis capilar en zona, debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula de FITC, pero fue necesaria la adición de un modificador orgánico, como son las ciclodextrinas, para permitir la adecuada separación de estos pesticidas. Por lo tanto la metodología empleada fue una CD-EKC.

El objeto del trabajo se cumplió realizando las experiencias y analizando resultados, de forma que se puede afirmar que la técnica propuesta presenta una gran aplicabilidad en este campo de análisis debido a que dispone de una instrumentación automatizada, relativamente simple, unos tiempos de análisis cortos, una preparación de la muestra muy sencilla y una gran sensibilidad.

















De los resultados de la investigación llevada a cabo en este capítulo acerca de la potencialidad de la CE en la modalidad CD-EKC con detección por FIL para la determinación de pesticidas, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Se establecieron las limitaciones en cuanto a aplicabilidad y las ventajas en cuanto a sensibilidad del detector de FIL.
- Se realizó una exhaustiva búsqueda de todos los pesticidas que presentaban grupos aminos, tanto primarios como secundarios, obteniendo un total de 17 pesticidas.
- Se propone una reacción de marcado de los grupos aminados de los diferentes analitos objeto de estudio, usando FITC, en la que se disminuye bastante los tiempos de derivatización con respecto a lo presente en bibliografía (pesticidas (50 µg/L), 100 mM carbonato sódico (pH 8),  $4 \times 10^{-5}$  M de FITC y 10% acetona).
- Se ha hecho un estudio de los parámetros instrumentales y variables experimentales que afectan a la separación electroforética en esta metodología (15mM borato sódico/HCl (pH 9), 20% acetona, 10 s inyección (0.5 p.s.i.), 25 kV, 25 °C).
- Se ha puesto de manifiesto la utilidad de la técnica de separación empleada con detección inducida por láser, al proponer una determinación cuantitativa de 6 pesticidas aminados pertenecientes a dos familias.
- La primera familia está formada por el glifosato (GLY), glufosinato (GLU) y su principal metabolito, el AMPA, aplicados para combatir la aparición de malas hierbas en amplios

terrenos de cultivo y la segunda familia es la de las anilinas: anilina (AN), 3-cloroanilina (3-ClAN) y m-toluidina (3-MeAN), todas ellas metabolitos de pesticidas muy utilizados como son, las fenilureas, carbamatos y anilidas, siendo estos metabolitos incluso más tóxicos que los propios pesticidas de los que provienen.

- Se ha desarrollado una metodología dentro de esta técnica de separación, la Cromatografía Capilar Electrocinética usando ciclodextrinas (CD-EKC), permitiendo la determinación cuantitativa de 6 de los 17 analitos estudiados, siendo una metodología compleja pero a la vez selectiva, que ayuda a la mejor resolución de los analitos en estudio.
- Se pone de manifiesto la aplicabilidad de la técnica y del método desarrollado, llevando a cabo el análisis de aguas de riego de dos puntos geográficos diferentes de nuestra Comunidad oriental, aguas de riego provenientes de la vega de Granada y aguas de riego provenientes de zonas agrarias cercanas a Almería.

## CAPITULO 3

***DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ALIFÁTICOS EN MIEL USANDO ECZ CON MODIFICADORES DE FEO, POLARIDAD INVERTIDA Y DETECCIÓN FOTOMÉTRICA DIRECTA***



La miel es un fluido dulce y viscoso producido por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas. Las abejas lo recogen, transforman y combinan con sustancias propias y lo almacenan en los panales donde madura. Las características físicas, químicas y organolépticas de la miel vienen determinadas por el tipo de néctar que recogen las abejas

Existen diversas referencias históricas a esta sustancia. Además de las citas bíblicas, muchos otros pueblos, como los antiguos egipcios o los griegos, por ejemplo, se referían a la miel como un producto sagrado, llegando a servir como forma de pagar los impuestos. En excavaciones egipcias con más de 3.000 años fueron encontradas muestras de miel todavía perfectamente conservadas en vasijas ligeramente tapadas. También existen registros prehistóricos en pinturas rupestres de la utilización de la miel.

Son conocidas diversas variedades de miel que dependen de la flor utilizada como fuente de néctar y del tipo de abeja que la produjo, pero como éstas la fabrican en cantidad cerca de tres veces superior de lo que necesitan para sobrevivir, siempre fue posible, primeramente, recogerse el exceso de ésta para el ser humano y más tarde realizarse la domesticación de las abejas para el fin específico de obtener su miel, técnica conocida como apicultura.

Según su origen vegetal, existen diferentes variedades de miel entre las que destacan:

- Miel de flores: la producida por las abejas a partir del néctar de las flores. Se distinguen muchas variedades:
  - monofloral: predominio del néctar de una especie. Las más usuales son de castaño, romero, tomillo, brezo, naranjo o

azahar, tilo, acacia, eucalipto, lavanda o cantueso, zarzamora, alfalfa, etc.

- multifloral («mil flores»): del néctar de varias especies vegetales diferentes, y en proporciones muy variables de la sierra o de montaña, y del desierto (varadulce, mezquite, gatun), que son tipos especiales de mil flores.
- Miel de mielada o mielato, miel de rocío o miel de bosque: es la producida por las abejas a partir de las secreciones dulces de pulgones, cochinillas y otros insectos chupadores de savia, normalmente de pinos, abetos, encinas, alcornoques y otras plantas arbustivas.

La miel tiene sus cualidades reconocidas y utilizadas por los seres humanos desde tiempos remotos, como alimento y para endulzar. Sus efectos funcionales son debidos a su composición química entre las que destacan numerosos compuestos bioactivos. Entre estos compuestos destacan los ácidos alifáticos que se encuentran en una abundancia relativa bastante elevada.

Estos compuestos presentan fácilmente carga por lo que en principio son unos buenos candidatos para su determinación electroforética mediante electroforesis capilar en zona (CEZ). Concretamente en el trabajo experimental desarrollado en este capítulo se ha llevado a cabo la determinación de 8 ácidos alifáticos presentes en 8 mieles multiflorares y una unifloral. El hecho de que presenten carga negativa obliga a invertir la polaridad de los electrodos en el instrumento de electroforesis capilar para facilitar su paso por la ventana de detección.

Usar “polaridad invertida” quiere decir que la inyección se lleva a cabo en el extremo negativo (cátodo), mientras que el detector se coloca en el

extremo positivo (ánodo). Con la inversión de la polaridad, se consigue que los analitos con carga negativa (como es el caso de los ácidos alifáticos al pH de trabajo) migren hacia el electrodo positivo, con lo que la atracción hacia el mismo podría hacer que el análisis requiriese menos tiempo que con la polaridad normal.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que no sólo con invertir la polaridad sería viable este método, ya que el FEO tendería hacia el sentido opuesto al que nos interesa (donde se sitúa el detector UV-Vis) e impediría que los analitos atravesasen el capilar. Por ello, hubo que modificar la superficie del capilar para hacer factible el desarrollo del método aquí descrito.

De manera general, podemos decir que el control del FEO tiene una gran relevancia en este tipo de separaciones en CE. Para controlarlo, se han utilizado muchas estrategias, como son: cambios en las propiedades físico-químicas de la disolución reguladora, modificaciones de la superficie del capilar, o aplicación de un voltaje radial externo al capilar<sup>156</sup>. Centrándonos en los cambios en la superficie del capilar, se han utilizado recubrimientos tanto permanentes<sup>157</sup> como dinámicos<sup>158</sup>. Cuando el capilar no está recubierto permanentemente y la polaridad está invertida, se debe de añadir un surfactante para disminuir, suprimir o incluso invertir el FEO. Los surfactantes catiónicos probados en el capítulo presente fueron, CTAB, TTAB y HDB, siendo este último un surfactantes de diferente naturaleza, el cual fue seleccionado para desarrollar el trabajo experimental.

---

[156] C. S. Lee, D. McManigill, C. T. Wu, B. Patel. "Factors affecting direct control of electroosmosis using an external electric-field in capillary electrophoresis". *Anal. Chem.* 63(15) (1991) 1519-1523.

[157] I. Rodriguez, S. F. Y. Li. "Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis". *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 1-26.

[158] J. Horvath, V. Dolnik. "Polymer wall coatings for capillary electrophoresis". *Electrophoresis* 22 (2001) 644-655.

En cuanto al sistema de detección empleado, se utilizó la espectrofotometría molecular puesto que los ácidos alifáticos estudiados tienen grupos cromóforos, con todas las ventajas e inconvenientes de este sistema y que ya se comentaron al comienzo del Capítulo 1.













Tras los resultados mostrados en el trabajo que constituye este capítulo 3, queda demostrada la potencialidad de la metodología analítica desarrollada en este capítulo para la separación de 8 ácidos alifáticos presentes en diferentes muestras de miel. Queremos indicar que estas muestras fueron cedidas por la Denominación de Origen Miel de Granada a través de los Laboratorios Apinevada.

Por último destacar varias de las ventajas que presenta la metodología desarrollada:

- La ventaja mas destacable es la que realza la versatilidad y rapidez de la electroforesis capilar y de la metodología en particular ya que permite la inyección directa de las diferentes muestras de miel usadas sin ningún tipo de preparación previa, es decir, sin necesidad de llevar a cabo ninguna extracción de los ácidos como paso anterior a la inyección, lo cual genera un ahorro en los costes de los análisis y disminuye significativamente los tiempos necesarios para llevar a cabo la determinación de los mismos.
- Se ha llevado a cabo un riguroso estudio de diferentes modificadores de flujo electroosmótico conducentes a la obtención de un método desarrollado a pH 8 con prácticamente una anulación total del flujo electroosmótico.
- Además, la velocidad con la que se lleva a cabo la separación analítica de los 8 ácidos alifáticos objeto de estudio es también destacable (<13min). Esto es debido a la inversión de la polaridad de los electrodos y al uso de surfactantes para modificar el FEO, lo cual hacen que la migración sea mucho más rápida.



## CAPITULO 4

***DETERMINACIÓN DE SOJA Y MAÍZ TRANSGÉNICOS USANDO REACCIÓN COMPETITIVA EN CADENA DE LA POLIMERASA ACOPLADA A ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA O A ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL CON DETECCIÓN FOTOMÉTRICA***



La necesidad de controlar y verificar la presencia y la cantidad de organismos genéticamente modificados (OGN) en los cultivos y en los productos derivados de éstos, ha desencadenado en una mayor búsqueda de métodos analíticos capaces de detectar, identificar y cuantificar el ADN en plantas genéticamente modificadas.

Han sido elaborados diferentes métodos basados en la detección de ADN modificado, bien usando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o bien la detección de proteínas usando inmunoensayos como el método ELISA. Todos estos métodos varían en fiabilidad, eficiencia y reproducibilidad, en combinación con diferentes niveles de costes, complejidad y velocidad.

Por otro lado no existe ningún método que sea aplicable siempre y en cada una de las circunstancias. A medida que los productos genéticamente modificados vayan incrementando y entrando en el mercado mundial, será de especial importancia poder monitorizar niveles bajísimos de material genéticamente modificado e identificar aquellos genotipos transformados, de forma que pueda determinarse la pureza de las semillas y verificar de cara al consumidor si se trata o no de un producto OGM.

Considerando el potencial impacto económico que supondrá la entrada masiva de estos productos modificados genéticamente, parece de especial importancia que la determinación analítica usada para determinar la presencia o no de organismos genéticamente modificados en los alimentos y productos no transformados venga realizada por metodologías analíticas estandarizadas y validadas.

El método de la PCR es ampliamente usado para incrementar la cantidad del gen, en este caso modificado, pero hasta ahora no existen competidores específicos para la determinación del gen resistente al herbicida glifosato

para maíz, si existiendo para el caso de la soja. Por otro lado la sensibilidad de la electroforesis en gel es bastante limitada para la determinación de cantidades bajas de estos genes a pesar de la PCR previa.

Por lo tanto los objetivos fundamentales de la presente investigación han sido:

- Puesta a punto de la técnica PCR cuantitativa-competitiva convencional para detectar la soja y maíz transgénicos, lo que les proporciona resistencia al herbicida glifosato, en base a los límites impuestos en la reglamentación vigente (0,5%) y desarrollando un competidor específico para maíz.
- Acoplamiento de la técnica de la PCR competitiva con la detección de los productos modificados genéticamente mediante Electroforesis Capilar en gel (CGE) usando un detector de espectroscopia de absorción molecular UV, para poner de manifiesto la potencialidad de esta técnica analítica tanto en resolución como en sensibilidad.





















En primer lugar se ha llevado a cabo un método PCR cuantitativo (QC-PCR) para detectar DNA de soja y maíz resistentes al herbicida glifosato (Roundup®). Debido a que no existía ningún método QC-PCR para la cuantificación de maíz transgénico, se ha desarrollado un competidor de DNA para transgénicos.

Los estándares internos fueron calibrados llevando a cabo co-amplificaciones de mezclas conteniendo soja y maíz transgénicos. Las aplicaciones fueron llevadas a cabo en harina de soja y maíz para demostrar su aplicabilidad a muestras que contienen genes resistentes al glifosato.

Por otro lado se ha demostrado el éxito del acoplamiento de la técnica de PCR cuantitativa con la detección de los productos amplificados por electroforesis capilar. La Electroforesis Capilar en Gel (CGE) presenta ventajas evidentes respecto a la electroforesis en gel de agarosa, las cuales se describen a continuación:

- En electroforesis capilar se obtienen separaciones más reproducibles.
- La mayor reproducibilidad obtenida en electroforesis capilar es otra de las ventajas respecto a la separación en gel de agarosa, debido a la mayor automatización en las diferentes fases de la determinación.
- La detección cuantitativa de la amplificación de ADN modificado en electroforesis capilar resulta más precisa que la detección cuantitativa indirecta en gel de agarosa mediante colorantes como el bromuro de etilo, ya que la detección llevada a cabo en el interior del capilar se produce de manera directa a través del detector UV.

- Además de todo lo indicado anteriormente, en la electroforesis capilar a diferencia de la electroforesis en gel de agarosa se evita el uso de compuestos altamente tóxicos, como es el caso del bromuro de etilo.

Pero no todo son ventajas, ya que económicamente hablando, todavía el coste de la instrumentación en CE es muy elevado si se compara con el coste de la instrumentación de la electroforesis en gel de agarosa.

## CAPITULO 5

***CE-ESI-TOF-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE DERIVADOS ALCALOIDES  
DE LOS TROPANOS EN UN PREPARADO FARMACÉUTICO DE UN EXTRACTO  
DE UNA HOJA DE LA BELLADONA***



La importancia en la actualidad de la Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de productos de origen natural usados para combatir diversas enfermedades. Es un tipo de medicina alternativa a la medicina convencional, aunque muchos preparados naturales contienen las mismas moléculas activas o fármacos usados en la medicina convencional, diferenciándose en la fuente de origen, en el que para unos son las plantas y para otros los productos sintéticos.

La planta objeto de estudio en el presente capítulo es la belladona, cuyo nombre científico es *Atropa Belladonna*. Éste es un arbusto perenne, miembro de la familia Solanaceae y nativo de Europa, norte de África, y oeste de Asia. Debido a sus propiedades medicinales, estas plantas han sido objeto de creencias, leyendas y fábulas de todo tipo. Fueron utilizadas en el antiguo Egipto como narcótico, luego por los sirios para "alejar los pensamientos tristes", pero se difunde su uso en secreto por las brujas de la Edad Media. Su nombre vulgar, Belladona, deriva del uso doméstico que hacían las damas italianas, que se frotaban un fruto de belladona debajo de los ojos para que la mujer luciera hermosa.

El motivo por el que la Belladona presenta características medicinales radica en su composición química, la cual es muy rica en alcaloides, principalmente en hiosciamina y escopolamina, que son alcaloides derivados del tropano. Éstos aportan propiedades anticolinérgicas que actúan bloqueando el paso de ciertos impulsos nerviosos al sistema nervioso central por inhibición de la producción de acetilcolina, un neurotransmisor (sustancia que transporta señales entre las células nerviosas y los músculos). Por lo tanto entre sus aplicaciones medicinales se utiliza como sedante y se está estudiando su efecto beneficioso sobre trastornos del sistema nervioso, como el parkinson. También se utiliza para el tratamiento de la bronquitis

asmática, la tos irritativa y los cólicos renales o los dolores de menstruación (en general, todos aquellos trastornos de origen espasmódico).

Por todo lo mencionado anteriormente, en el presente capítulo se ha desarrollado un método para la determinación simultáneamente de 7 alcaloides de gran interés presentes en un preparado farmacéutico de un extracto de hojas de Belladona. La metodología de separación usada ha sido al igual que en capítulos anteriores la electroforesis capilar en zona, pero en este caso el sistema de detección usado es la espectrometría de masas (MS). Para llevar a cabo la caracterización de los analitos objeto de estudio, a un equipo de electroforesis capilar se acopló un analizador de tiempo de vuelo (Time-Of-Flight) (TOF), usando la ionización por electroespray (ESI) como interfase para dicha asociación.

La electroforesis capilar genera una separación basada en la relación carga tamaño que es complementaria a las técnicas cromatográficas y que con la detección mediante la espectrometría de masas, cuya detección se basa en la masa de los compuestos, genera información bidimensional sobre la muestra a analizar facilitando el análisis de muestras complejas, como son los extractos vegetales. Por lo tanto, el acoplamiento entre CE y MS lo convierte en una técnica muy potente capaz de desarrollar métodos baratos y que generan información analítica muy útil.

En lo que respecta a este acoplamiento quizás lo más problemático es la interfase puesto que estamos acoplando una técnica que trabaja con medios líquidos y volúmenes muy bajos con una técnica que trabaja en medio gaseoso, además de la necesidad de cerrar el circuito eléctrico. Todos estos problemas se pueden solucionar utilizando interfases comerciales como la de electroespray (ESI) con flujo adicional, que ha sido la utilizada en este capítulo. Además en la mayoría de los casos es necesario utilizar tampones

compuestos de electrolitos suficientemente volátiles para reducir la señal de fondo y que no supriman la eficiencia de la ionización.

En lo que respecta a los analizadores de masas, hoy día es posible el acoplamiento de la electroforesis capilar con diferentes detectores de masas, si bien los más utilizados son la trampa de iones, cuadrupolo y el tiempo de vuelo. En este capítulo hemos optado por el tiempo de vuelo por una serie de razones inherentes como son una elevada sensibilidad y la posibilidad de llevar a cabo la identificación de compuestos mediante el uso de masas exactas y distribución isotópica de cada compuesto, lo cual permite la asignación casi inequívoca de los compuestos analizados en muestras complejas.

Por tanto se ha desarrollado por primera vez un método (CE-ESI-TOF-MS) rápido y sencillo para la determinación de los analitos descritos anteriormente.

































Queda demostrada la potencialidad de la metodología analítica desarrollada en este capítulo, tras los resultados mostrados en el trabajo descrito previamente, para la separación de 7 alcaloides derivados del tropano presentes en un preparado farmacéutico de un extracto de la hoja de Belladona.

La metodología CE-ESI-TOF-MS desarrollada permite la caracterización de alcaloides tropanos, para la que se usó un tampón acetato amónico 60 mM a pH 8.5 conteniendo 5% de isopropanol. El líquido adicional usado en la interfase ESI-TOF-MS ha sido una mezcla de isopropanol/agua 50:50 (v/v) con la presencia de 0.5 % de ácido fórmico.

Con esta metodología los compuestos identificados en los extractos de belladona han sido: (1) Tropina ( $[M+H]^+$ exp. 142.1226 m/z), (2) Belladomina ( $[M+H]^+$ exp. 543.3231 m/z), (3) Noriosciamina ( $[M+H]^+$ exp. 276.1594 m/z), (4) Apoptropina ( $[M+H]^+$ exp. 272.1644 m/z), (5) Hiosciamina ( $[M+H]^+$ exp. 290.1752 m/z), (6) 6 $\beta$ -hiosciamina ( $[M+H]^+$ exp. 306.1699 m/z) y (7) Escopolamina ( $[M+H]^+$ exp. 304.1544 m/z).

La potencialidad de dicha metodología se basa en el acoplamiento entre la CE como técnica analítica de separación y MS como sistema de detección, ya que se combinan la rapidez del análisis, el alto poder de resolución, el consumo muy pequeño de muestra y disolventes proporcionados por la CE, con la selectividad del análisis y la información estructural que proporciona la espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

Además de todas estas ventajas descritas anteriormente, añadir que el analizador usado (TOF) es rápido, sensible y resolutivo por lo que, permite la determinación de masas exactas empleando TIP (True Isotopic Pattern) para el análisis en dos dimensiones y da óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos procesos rutinarios de re-calibración; es decir,

aporta una mayor fiabilidad de los resultados dando al analista la masa de los analitos con un error mínimo (casi total certeza) que permita estar seguros de la fórmula molecular y ayude a comprender las posibles vías de fragmentación de los mismos y con ello las posibles estructuras.



## ***CONCLUSIONES***



Las principales conclusiones derivadas de la investigación descrita en la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Se han llevado a cabo un variado número de aplicaciones llevando a cabo la separación de compuestos químicos de diferente naturaleza con diferente actividad y en muestras de diversa naturaleza demostrando el potencial de la electroforesis capilar como herramienta analítica para resolver problemas analíticos actuales, consiguiendo de esta manera tener una visión más amplia acerca de las posibilidades que ofrece esta técnica separativa en sus diferentes modalidades para el análisis y determinación de una gran variedad de compuestos cuando es acoplada a estos sistemas de detección.
2. Se han usado diversas metodologías electroforéticas de separación, tanto en zona libre como usando diversos modificadores orgánicos, micelas y ciclodextrinas, que demuestra la versatilidad de la técnica en su aplicación a un variado número de clases de analitos y de matrices.
3. La técnica de separación CE ha sido utilizada acoplada a varios sistemas de detección, de las cuales sólo tres de ellas son claramente comerciales, la detección por UV-Visible, FIL y MS. El gran interés de acoplar esta técnica de separación, que presenta importantes ventajas con respecto a otras técnicas de separación, a diferentes sistemas de detección es conseguir mejoras de sensibilidad, punto débil de esta técnica, además de la obtención de una información extensa y variada de la matriz en estudio.
4. Se ha puesto a punto un método electroforético rápido y sencillo para la determinación y cuantificación simultánea de cuatro antiepilépticos, etosuximida, primidona, fenitoína y carbamacepina en suero humano.

Los volúmenes de muestra necesarios para llevar a cabo la aplicación fueron del orden de 100  $\mu\text{L}$  y como tratamiento previo a dicha aplicación únicamente se centrifugaron y decantaron las muestras antes de ser diluidas en el tampón de separación constituido por 5.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /3.2 mM borax a pH 9.5, conteniendo 55 mM de SDS y 3.5 % (v/v) de acetona. El análisis ha sido desarrollado en solo 10 min a través de una metodología electroforética basada en el uso de modificadores orgánicos. En concreto se utilizó una metodología basada en el uso de medios micelares (MEKC) como pseudofase con detección uv-DAD a 220 nm.

5. Se ha desarrollado un método electroforético muy sensible usando ciclodextrinas como modificadores orgánicos y detección fluorimétrica para el análisis y cuantificación de pesticidas aminados y metabolitos de gran aplicación en la agricultura. Dicho método conlleva un proceso de derivatización precolumna con fluoresceína isotiocianato (FITC) y el empleo de un láser de ión argón cuya radiación se produce a 488 nm y de un filtro de emisión a 520 nm. Se estudiaron las diferentes variables que afectan a la derivatización como son pH, concentración de FITC, tiempo de reacción y temperatura. También las variables que afectaron a la separación como son concentración de la disolución reguladora de separación, pH, voltaje aplicado y tiempo de inyección. Se obtuvo un límite de detección de 0.45-3.48  $\text{ng/mL}^{-1}$  y una desviación estándar relativa comprendida entre 0.26-2.08% (para un nivel de concentración de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).
6. Se ha descrito un método para la determinación rápida de 8 ácidos alifáticos presentes comúnmente en miel mediante un método electroforético de flujo electroosmótico invertido y detección UV. Se añadieron a la disolución reguladora surfactantes policatiónicos como

HDB, CTAB, TTAB para cubrir dinámicamente la superficie inerte del interior del capilar y causando un flujo electroosmótico anódico, conocido como flujo co-electroosmótico. La composición de la disolución reguladora óptima con la que se llevó a cabo la separación electroforética consistía en 50 mM de fosfato sódico ajustado a pH 8 con 1 M de hidróxido sódico, 25 % de 2-propanol y 0,001% de HDB. Las condiciones instrumentales de separación y detección fueron: -20 kV de voltaje, inyección hidrodinámica de 15 s de duración y detección UV a 220 nm. Por último la aplicabilidad del método ha sido demostrada para la determinación de ácidos alifáticos en diferentes tipos de mieles sin llevar a cabo ningún tipo de pre-tratamiento previo sobre las muestras.

7. Se han usado dos técnicas analíticas como son la Electroforesis en gel de agarosa y la Electroforesis Capilar para determinar ADN transgénico resistentes a la acción de herbicida glifosato (Roundup®) en soja y maíz. Puesto que no se había publicado hasta el momento ningún sistema para la cuantificación del maíz transgénico-RR se ha desarrollado un competidor específico para ADN transgénico. En cambio, para el caso de la soja fue usado un competidor comercial. Los estándares internos fueron calibrados llevando a cabo co-amplificaciones de mezclas conteniendo soja y maíz transgénicos. Se llevaron a cabo aplicaciones en harina de soja y maíz para demostrar su aplicabilidad a muestras que contienen genes resistentes al glifosato. Uno de los puntos a destacar en el presente trabajo fue comparar la detección de productos derivados de la QC-PCR por gel de agarosa y electroforesis capilar en gel (CGE) con detección ultravioleta. La CGE permite la detección precisa de transgénicos incluso por debajo del punto de equivalencia cosa que no es posible

en la electroforesis en gel de agarosa debido a la baja sensibilidad en la cuantificación de ADN genéticamente modificado.

8. Por último, se ha desarrollado un método electroforético en zona nuevo, rápido y fácil para la separación y determinación de alcaloides derivados del tropano en *Atropa Belladonna*. Además se ha utilizado el acoplamiento entre la electroforesis capilar y un analizador de tiempo de vuelo (TOF), usando como interfase la ionización por electrospray (ESI) para llevar a cabo la determinación de esos compuestos alcaloides en un preparado farmacéutico elaborado con el extracto de la hoja de *Belladonna*. Para mejorar la resolución, sensibilidad, tiempo de análisis y anchura de pico se ha llevado a cabo una investigación sistemática de los parámetros de separación. La separación electroforética óptima se ha llevado a cabo usando una solución alcalina 60 mM de acetato amónico a pH 8,5 a la que se añadió un 5% de isopropanol. Además fue necesario llevar a cabo una optimización de las condiciones del electrospray para obtener análisis fiables y reproducibles. Compuestos tan importantes como tropina, belladonina, nor-hiosciamina, hiosciamina, apotropina, 6 $\beta$ -hidroxihioscinamina y escopolamina han sido determinados simultáneamente, bajo las condiciones optimizadas, usando el potencial basado en el uso de masas exactas y distribución isotópica que nos permite el analizador de tiempo de vuelo.

## ***CONCLUSIONI***



Al termine di questa ricerca è possibile riassumere i principali risultati ottenuti nei seguenti punti:

L'elettroforesi capillare si è rivelata uno strumento analitico ad elevata versatilità, in quanto in grado di separare analiti di diversa natura e struttura. L'enorme potenzialità offerta da questa tecnica separativa è supportata anche dalla possibilità di utilizzare diversi sistemi di rilevazione (UV, FIL, MS) a seconda delle caratteristiche del composto da analizzare.

Sono state messe a punto diverse tecniche di separazione tra cui l'elettroforesi in soluzione libera e con l'aggiunta di additivi nel tampone di separazione (ciclodestrine, solventi organici, micelle). Obiettivo di questa fase della ricerca è stato quello di verificare la versatilità di questa tecnica nell'analisi dei diversi composti.

Le diverse tecniche elettroforetiche sono state poi utilizzate in accoppiamento a diversi sistemi di rilevazione. In particolare, in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati detector UV-DAD, sorgenti laser per misure di fluorescenza laser-indotta (FIL) e spettrometri di massa (MS). Il vantaggio di poter utilizzare l'elettroforesi capillare associata a sistemi di rilevazione differenti è legato alla possibilità di migliorare la sensibilità della tecnica, ottenendo così una quantità maggiore di informazioni riguardanti la matrice studiata.

Si è poi messo a punto un metodo elettroforetico veloce e semplice per determinare e quantificare, nell'ambito di una stessa analisi, quattro sostanze antiepilettiche (etosuccimide, primidone, carbamazepina e fenitoina) nel siero umano. Per l'analisi si è scelto di utilizzare una separazione elettroforetica basata sull'uso di modificatori organici, come sono i mezzi micellari, con rilevamento UV-DAD a 220 nm. Il volume di siero umano necessario per l'analisi è stato di 100  $\mu$ L; 10 minuti la durata della corsa elettroforetica. Il

campione non ha richiesto particolari procedure preliminari di preparazione, ma solamente una centrifugazione, seguita da decantazione dei campioni.

Uno studio dettagliato è stato poi effettuato per poter sviluppare un metodo elettroforetico adatto per l'analisi e la quantificazione di pesticidi amminici, largamente diffusi in agricoltura, e dei loro derivati metabolici. Questo metodo richiede un processo di derivatizzazione con la fluoresceina isotiocianato (FITC), l'utilizzo di ciclodextrine come modificatori organici e la separazione e il rilevamento mediante elettroforesi capillare con fluorescenza laser-indotta (CE-LIF). In particolare, è stato utilizzato un laser argon di 488 nm di radiazione e un filtro di emissione a 520 nm. Per l'ottimizzazione del metodo sono state studiate sia le variabili che interessano il processo di derivatizzazione (pH, concentrazione di FITC, tempo di reazione e temperatura), sia le variabili coinvolte nella separazione elettroforetica (concentrazione del buffer di separazione, pH, voltaggio applicato e tempo di iniezione). I risultati ottenuti mostrano un limite di rilevamento compreso tra 0.45 e 3.48 ng/mL; i valori di deviazione standard, a concentrazioni di 50 µg/L, sono invece compresi tra 0,26 e 2,08 %.

Ulteriori studi sono stati effettuati per sviluppare un metodo rapido avente come obiettivo quello di rilevare la presenza di otto acidi alifatici normalmente presenti in campioni di miele. Si è scelto di utilizzare un metodo elettroforetico a flusso invertito, con rilevamento UV a 220 nm. Per la separazione elettroforetica è stato utilizzato come buffer una soluzione elettrolitica composta da sodio fosfato 50 mM, portata ad un valore di pH=8.0 con idrossido di sodio 1 M, ed addizionata con 2-propanolo al 25% e HDB allo 0.001%. La superficie interna del capillare è stata dinamicamente rivestita da tale soluzione, generando così un flusso denominato "flusso co-elettrosmotico". Sono stati infine ottimizzati diversi parametri della separazione elettroforetica, tra cui il voltaggio da applicare e il tempo di

iniezione idrodinamica: i risultati migliori si sono ottenuti con un valore di voltaggio di -20 kV e con un tempo di iniezione di 15 secondi.

Un ulteriore studio ha riguardato il rilevamento e la quantificazione di sequenze di DNA transgenico in campioni di mais e soia trasformati per la resistenza all'erbicida Glyphosate (Roundup Ready - RR). Innanzitutto, è stata messa a punto una tecnica molecolare di tipo quantitativa-competitiva basata sull'utilizzo della reazione a catena (PCR) per la rintracciabilità e la quantificazione di soia e mais RR in campioni contenenti diverse percentuali di DNA transgenico. Per la determinazione quantitativa di soia RR con QC-PCR è stata utilizzata una sequenza commerciale, mentre, non essendo disponibile un competitore specifico per l'evento transgenico investigato in mais, è stato necessario costruirne uno. Gli amplificati ottenuti in seguito a QC-PCR sono stati visualizzati mediante le tecniche di elettroforesi su gel di agarosio e di elettroforesi capillare, allo scopo di confrontare l'efficacia dei due metodi. I risultati ottenuti dimostrano che l'elettroforesi capillare consente di ottenere limiti di rilevamento per la quantificazione del DNA transgenico significativamente più bassi rispetto al rilevamento ottenuto con l'elettroforesi su gel di agarosio.

Infine, è stato sviluppato un nuovo metodo elettroforetico, semplice e rapido, per separare e determinare, in preparati farmaceutici ottenuti da estratti fogliari di *Atropa belladonna*, composti alcaloidei derivati dal tropano. Per tali analisi è stata utilizzata l'elettroforesi capillare collegata ad un analizzatore del tempo di volo (TOF), usando come interfaccia la ionizzazione per elettrospray (ESI). Per ottimizzare risoluzione, sensibilità, tempo d'analisi e larghezza dei picchi dell'elettroferogramma, è stata effettuata una analisi sistematica dei parametri di separazione. Come soluzione elettrolitica si è scelto di utilizzare un buffer composto da acetato di ammonio 60 mM (pH=8,5) e da isopropanolo al 5%. Infine è stato necessario ottimizzare il

flusso e la composizione dell'elettrospray per ottenere risultati riproducibili. La messa a punto dei diversi parametri e l'utilizzo del potenziale basato sull'uso delle masse esatte e della distribuzione isotopica fornite dal TOF, ha permesso di rilevare, in uno stesso campione, i diversi derivati del tropano, tra cui tropina, belladonnina, dl-iosciamina, 1-iosciamina, apotropina, 6-idrossiosciamina e scopolamina.