

⟨1053⟩ ELECTROFORESIS CAPILAR

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante electroforesis capilar. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* ⟨1052⟩, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque* ⟨1054⟩, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* ⟨1055⟩, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida)* ⟨1056⟩ y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* ⟨1057⟩.

INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar es un método de análisis físico basado en la migración, dentro de un capilar, de analitos cargados disueltos en una solución de electrolitos, bajo la influencia de un campo eléctrico de corriente continua (directa). En esta sección se describen cuatro métodos de electroforesis capilar: *Electroforesis Capilar de Zona*, *Electroforesis Capilar en Gel*, *Isoelectroenfoque Capilar* y *Cromatografía Electrocinética Micelar*.

PRINCIPIOS GENERALES

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

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

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

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar lleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina flujo electroosmótico. Su velocidad depende de la movilidad electroosmótica (μ_{eo}) que a su vez depende de la densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora. La velocidad electroosmótica (v_{eo}) está dada por la ecuación:

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

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

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

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

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

$$t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

en donde los otros términos son los definidos anteriormente.

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

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

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})(Vl)}{2DL}$$

en donde D es el coeficiente de difusión molecular del soluto en la solución amortiguadora.

En la práctica, otros fenómenos, como por ejemplo la disipación de calor, la adsorción de la muestra en la pared del capilar, las diferencias de conductividad entre la muestra y la solución amortiguadora, la longitud de la zona de inyección, el tamaño de celda del detector y los recipientes de solución amortiguadora no nivelados, pueden contribuir significativamente a la dispersión de banda. La separación entre dos bandas (expresada por la resolución, R_s) se puede obtener modificando la movilidad electroforética de los analitos, la movilidad electroosmótica inducida por el capilar y aumentando la eficiencia para la banda de cada analito del siguiente modo:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}$$

en donde μ_{epa} y μ_{epb} son las movilidades electroforéticas de los dos analitos a separar; $\bar{\mu}_{ep}$ es la movilidad electroforética promedio de los dos analitos calculada como:

$$\bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{epb} + \mu_{epa})$$

APARATO

Un aparato de electroforesis capilar se compone de una fuente de alimentación de corriente continua (directa) regulable, de alto voltaje; dos recipientes para las soluciones amortiguadoras que se mantienen en el mismo nivel y que contienen las soluciones anódica y catódica especificadas; dos conjuntos de electrodos (cátodo y ánodo) sumergidos en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y conectados a la fuente de alimentación; un capilar de separación, generalmente de sílice fundida, a veces con una ventana de visualización óptica alineada con el detector, dependiendo del tipo de detector, con los extremos del capilar ubicados en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y el capilar lleno con una solución que se especifica en la monografía correspondiente; un sistema de inyección adecuado; un detector capaz de monitorear la cantidad de sustancia de interés que pasa a través de un segmento del capilar de separación en un tiempo dado, generalmente basado en la espectrofotometría de absorción (UV y visible), fluorimetría, o detección conductimétrica, amperométrica o espectrométrica de masas, dependiendo de las aplicaciones específicas, o incluso en la detección indirecta para detectar compuestos no fluorescentes y que no absorben luz UV; un sistema termostático capaz de mantener una temperatura constante dentro del capilar, recomendada para obtener una buena reproducibilidad de separación; un registrador y un integrador apropiado o una computadora.

La definición del proceso de inyección y su automatización son críticos para realizar análisis cuantitativos precisos. Los modos de inyección incluyen la inyección por gravedad, presión o vacío o la inyección electrocinética. La cantidad de cada componente de muestra introducida electrocinéticamente depende de su movilidad electroforética, lo cual lleva a una posible discriminación al usar este modo de inyección.

Se espera que el capilar, las soluciones amortiguadoras, el método de acondicionamiento, la solución muestra y las condiciones de migración estén especificadas en la monografía correspondiente. La solución electrolítica empleada se filtra para eliminar partículas y desgasificar para evitar la formación de burbujas que pueden interferir con el sistema de detección o interrumpir el contacto eléctrico en el capilar durante la prueba de separación. Para lograr un tiempo de migración reproducible de los solutos, es necesario desarrollar, para cada método analítico, una rutina de enjuague riguroso.

Cambio en la redacción:

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

Principio

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

Este método de electroforesis capilar es apropiado para el análisis de moléculas pequeñas (PM < 2000) y grandes (2000 < PM < 100 000). Debido a la alta eficiencia lograda en la electroforesis capilar de zona se puede efectuar la separación de moléculas que presenten diferencias mínimas en su relación carga a masa. Este modo de separación también permite la separación de compuestos quirales por adición de selectores quirales a la solución amortiguadora de separación.

Optimización

La optimización de la separación es un proceso complejo en el que diversos parámetros de separación pueden desempeñar un papel importante. Los principales factores que se deben considerar en el desarrollo de las separaciones son los parámetros instrumentales y de la solución electrolítica.

Parámetros Instrumentales

VOLTAJE

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

POLARIDAD

La polaridad del electrodo puede ser normal (el ánodo en la entrada y el cátodo en la salida) y el flujo electroosmótico se moverá hacia el cátodo. Si la polaridad del electrodo se invierte, el flujo electroosmótico queda lejos de la salida y solo los analitos cargados con movilidades electroosmóticas mayores que el flujo electroosmótico pasarán hacia la salida.

TEMPERATURA

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

CAPILAR

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

La adsorción de los componentes de la muestra en la pared del capilar limita la eficiencia; por lo tanto, hay que considerar métodos para evitar estas interacciones cuando se desarrolla un método de separación. En el caso específico de las proteínas, se han diseñado varias estrategias para evitar la adsorción en la pared capilar. Algunas de estas estrategias (uso de pH extremo y adsorción de aditivos de soluciones amortiguadoras cargados positivamente) solo necesitan la modificación de la composición de la solución amortiguadora para evitar la adsorción de las proteínas. Otras estrategias incluyen el recubrimiento de la pared interna del capilar con un polímero unido covalentemente a la sílice lo cual evita la interacción entre las proteínas y la superficie de la sílice negativamente cargada. Para este propósito, se consiguen en el mercado capilares listos para el uso con recubrimiento de polímeros hidrófilos neutros, catiónicos y aniónicos.

Parámetros de la Solución Electrolítica

TIPO DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA Y CONCENTRACIONES

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

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

PH DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

El pH de la solución amortiguadora puede afectar la separación al modificar la carga del analito o aditivos y al cambiar el flujo electroosmótico. Para la separación de proteínas y péptidos, un cambio en el pH de la solución amortiguadora desde un valor superior al punto isoeléctrico a un valor inferior al punto isoeléctrico cambia la carga neta del soluto de negativa a positiva. Un aumento en el pH de la solución amortiguadora generalmente aumenta el flujo electroosmótico.

DISOLVENTES ORGÁNICOS

Los modificadores orgánicos, como por ejemplo el metanol, el acetonitrilo y otros, se pueden agregar a la solución amortiguadora acuosa para aumentar la solubilidad del soluto o de otros aditivos o para afectar el grado de ionización de los componentes de la muestra. Estos modificadores orgánicos agregados a la solución amortiguadora suelen disminuir el flujo electroosmótico.

ADITIVOS PARA SEPARACIONES QUIRALES

Para separar [▲]enantiómeros, [▲](USP 1-Ago-2020) se agrega un selector quiral a la solución amortiguadora de separación. Los selectores quirales más comúnmente usados son las ciclodextrinas, aunque en algunos casos se pueden usar éteres corona, algunos polisacáridos o incluso proteínas. Como el reconocimiento quiral depende de las distintas interacciones entre el selector quiral y cada uno de los enantiómeros, la resolución lograda para los compuestos quirales depende en gran medida del tipo de selector quiral usado. Mientras se desarrolla una separación dada, puede ser útil analizar las ciclodextrinas que tengan distintos tamaños de cavidad (α , β o γ -ciclodextrina) o ciclodextrinas modificadas con grupos neutros (metilo, etilo, hidroxialquilo, etc.) o grupos ionizables (aminometilo, carboximetilo, sulfobutiléter, etc.). Al usar ciclodextrinas modificadas se deben tener en cuenta las variaciones de una partida a otra en el grado de sustitución de las ciclodextrinas, puesto que eso influirá en la selectividad. La resolución en la separación quiral también está controlada por la concentración del selector quiral, la composición y el pH de la solución amortiguadora y la temperatura de separación. Los aditivos orgánicos, como por ejemplo el metanol o la urea, también pueden afectar la resolución de la separación.

ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL

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

Características de los Geles

En electroforesis capilar se usan dos tipos de geles: los geles recubiertos permanentemente y los geles recubiertos dinámicamente. Los geles recubiertos permanentemente se preparan dentro del capilar por polimerización de monómeros. Un ejemplo de dicho gel es una poliacrilamida entrecruzada. Este tipo de gel generalmente está unido a la pared de sílice fundida y no se puede eliminar sin destruir el capilar. Para el análisis de proteínas bajo condiciones reductoras, la solución amortiguadora de separación, por lo general, contiene dodecilsulfato de sodio, y la muestra se desnaturaliza por calor en una mezcla de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol o ditiotreitól antes de la inyección. Cuando se emplean condiciones no reductoras (por ejemplo, durante el análisis de un anticuerpo intacto), no se utilizan 2-mercaptoetanol y ditiotreitól. La optimización de la separación en un gel entrecruzado se obtiene modificando la solución amortiguadora de separación (ver *Electroforesis Capilar de Zona*) y controlando la porosidad del gel durante la preparación del mismo. Para geles de poliacrilamida entrecruzada, la porosidad se puede modificar cambiando la concentración de acrilamida y/o la relación del agente de entrecruzamiento. Como regla general, al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad de los solutos. Debido a la rigidez de este tipo de gel, sólo se puede usar la inyección electrocinética.

Los geles recubiertos dinámicamente son polímeros hidrófilos (es decir, poliacrilamida lineal, derivados de celulosa, dextrano, etc.) que se pueden disolver en soluciones amortiguadoras acuosas de separación, dando lugar a un medio de separación que también actúa como tamiz molecular. Estos medios de separación poliméricos son más fáciles de preparar que los polímeros entrecruzados. Se pueden preparar en un vial y llenar por presión en un capilar de pared recubierta sin flujo electroosmótico. Si se reemplaza el gel antes de cada inyección generalmente mejora la reproducibilidad de la separación. La porosidad de los geles recubiertos dinámicamente se puede aumentar usando polímeros de una masa molecular mayor (a una concentración de polímero dada) o disminuyendo la concentración de polímero (para una masa molecular de polímero dada.) Al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad del soluto para la misma solución amortiguadora. Se pueden usar técnicas de inyección hidrodinámica y electrocinética ya que la disolución de estos polímeros en la solución amortiguadora produce soluciones de baja viscosidad.

ISOELECTROENFOQUE CAPILAR

Principio

En isoelectroenfoque las moléculas migran bajo la influencia del campo eléctrico, siempre y cuando estén cargadas, en un gradiente de pH generado por anfólitos que tienen un intervalo amplio de valores de pI (ácidos poliaminocarboxílicos) disueltos en la solución amortiguadora de separación.

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

CARGA

Se pueden emplear dos métodos.

Carga en un Solo Paso—La muestra se mezcla con anfólitos y se introduce en el capilar por presión o vacío.

Carga Secuencial—Se introducen en el capilar una solución amortiguadora inicial, luego los anfólitos, luego la muestra mezclada con anfólitos, otra vez los anfólitos solos y finalmente la solución amortiguadora final. El volumen de la muestra debe ser suficientemente pequeño como para no modificar el gradiente de pH.

ENFOQUE

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

MOVILIZACIÓN

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

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

Método 2—La movilización se consigue por aplicación de presión positiva después del *Enfoque*.

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

La separación lograda se expresa como ΔpI y depende del gradiente de pH (dpH/dx), el número de anfolitos que tienen valores de pI diferentes, el coeficiente de difusión molecular (D), la intensidad del campo eléctrico (E) y la variación de la movilidad electroforética del analito en función del pH ($-d\mu/dpH$):

$$\Delta pI = 3\sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

Optimización

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

VOLTAJE

Emplear campos altos desde 300 V/cm a 1000 V/cm durante el *Enfoque*.

CAPILAR

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

SOLUCIONES

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

La adición de un polímero, como la metilcelulosa, a la solución del anfolito tiende a suprimir las fuerzas convectivas (si las hubiese) y el flujo electroosmótico por aumento de la viscosidad. Se dispone comercialmente de anfolitos que abarcan muchos intervalos de pH y que también se pueden mezclar para obtener un intervalo de pH ampliado. Los intervalos de pH amplios se usan para estimar el punto isoeléctrico (pI) mientras que los más estrechos se emplean para mejorar la exactitud. La calibración se puede llevar a cabo correlacionando el tiempo de migración con el punto isoeléctrico de una serie de marcadores estándar de proteínas. Durante el *Enfoque*, se puede evitar la precipitación de proteínas en su punto isoeléctrico, si fuera necesario, usando aditivos de soluciones amortiguadoras como por ejemplo glicerol, agentes tensoactivos, urea o amortiguadores zwitteriónicos. Sin embargo, según las concentraciones, la urea puede desnaturalizar las proteínas.

CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELAR (CECM)

Principio

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

El mecanismo de separación es el siguiente. A pH neutro y alcalino, se genera un flujo electroosmótico fuerte que mueve los iones de la solución amortiguadora de separación hacia el cátodo. Si se usa dodecilsulfato de sodio como agente tensoactivo, la migración electroforética de la micela aniónica se produce en el sentido opuesto, hacia el ánodo. Como resultado, la velocidad general de migración de las micelas disminuye en comparación con el flujo general de la solución electrolítica. En el caso de solutos neutros, como el analito se puede repartir entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y no tiene movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá únicamente del coeficiente de partición entre la micela y la solución amortiguadora acuosa. En el electroferograma, los picos correspondientes a cada soluto sin carga están siempre entre el del marcador del flujo electroosmótico y el de la micela; y el tiempo transcurrido entre estos dos picos se denomina ventana

de separación. Para los solutos con carga eléctrica, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y de la movilidad electroforética del soluto en ausencia de micelas.

Dado que el mecanismo de solutos neutros o débilmente ionizados en CECM es esencialmente cromatográfico la migración del soluto y la resolución se pueden racionalizar en términos del factor de retención del soluto (k'), también conocido como cociente de distribución másica (D_m), que es el cociente entre el número de moles de soluto en la micela y los moles en la fase móvil. Para un compuesto neutro, k' se calcula del siguiente modo:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_{mc})} = K \left(\frac{V_S}{V_M} \right)$$

en donde t_r es el tiempo de migración del soluto; t_0 es el tiempo de análisis del soluto no retenido obtenido al inyectar un marcador de flujo electroosmótico que no entra a la micela (p. ej., metanol); t_{mc} es el tiempo de migración de la micela medido al inyectar un marcador de micela, como por ejemplo Sudán III, que migra continuamente asociado con la micela; K es el coeficiente de partición del soluto; V_S es el volumen de la fase micelar; y V_M es el volumen de la fase móvil.

La resolución entre dos solutos que migran cerca (R_S) es la siguiente:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_b'}{k_b' + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}} \right)}{1 + k_a' \times \left(\frac{t_0}{t_{mc}} \right)}$$

en donde N es el número de platos teóricos para uno de los solutos; α es la selectividad; k_a' y k_b' son los factores de retención para ambos solutos, respectivamente ($k_b' > k_a'$).

Ecuaciones similares, aunque no idénticas, dan valores de k' y R_S para solutos con carga eléctrica.

Optimización

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

PARÁMETROS INSTRUMENTALES

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

Temperatura—Las variaciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre la solución amortiguadora y las micelas, la concentración micelar crítica y la viscosidad de la solución amortiguadora. Estos parámetros contribuyen al tiempo de migración de los solutos. El uso de un buen sistema de enfriamiento mejora la reproducibilidad del tiempo de migración para los solutos.

Capilar—Al igual que en la *Electroforesis Capilar de Zona*, la longitud y el diámetro interno del capilar influyen sobre el tiempo de análisis y la eficiencia de las separaciones. El aumento de la longitud efectiva y de la longitud total puede disminuir los campos eléctricos, trabajando a un voltaje constante, aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de la separación. El diámetro interno controla la disipación de calor, para un amortiguador y campo eléctrico dados, y por consiguiente ensancha las bandas de la muestra.

PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN ELECTROLÍTICA

Tipo de Agente Tensoactivo y Concentración—El tipo de agente tensoactivo, al igual que la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución ya que modifica la separación selectivamente. El $\log k'$ de un compuesto neutro aumenta linealmente con la concentración de agente tensoactivo en la fase móvil. Cuando k' se acerca al valor de

$$\sqrt{t_{mc}/t_0}$$

la resolución de la CECM alcanza su máximo. La modificación de la concentración del agente tensoactivo en la fase móvil cambia la resolución.

pH de la Solución Amortiguadora—El pH no modifica el coeficiente de partición de los solutos no ionizados, pero puede modificar el flujo electroosmótico en capilares sin recubrimiento. Una disminución en el pH de la solución amortiguadora disminuye el flujo electroosmótico y por lo tanto aumenta la resolución de los solutos neutros en CECM, llevando a un aumento del tiempo de análisis.

Disolventes Orgánicos—Se pueden agregar modificadores orgánicos (metanol, propanol, acetonitrilo, etc.) a la solución electrolítica para mejorar la separación por CECM de compuestos hidrófobos. La adición de estos modificadores generalmente disminuye el tiempo de migración y la selectividad de la separación. Dado que la adición de modificadores orgánicos afecta la concentración micelar crítica, solo se puede usar una concentración dada de un agente tensoactivo con un cierto porcentaje de un modificador orgánico para evitar inhibir o alterar adversamente la micelización, que daría como resultado la ausencia de

micelas y, por lo tanto, la ausencia de partición. La disociación de micelas en presencia de un alto contenido de disolvente orgánico no siempre significa que la separación ya no será posible dado que, en ciertos casos, la interacción hidrófoba entre el monómero tensoactivo iónico y los solutos neutros forman complejos solvóforos que se pueden separar electroforéticamente. **Aditivos para Separaciones Quirales**—Para la separación de enantiómeros usando CECM, se incluye un selector quiral en el sistema micelar, unido covalentemente al agente tensoactivo o agregado al electrolito de separación micelar. Las micelas que tienen un grupo con propiedades de discriminación quiral incluyen sales, *N*-dodecanoil-L-aminoácidos, sales biliares, etc. La resolución quiral también se puede lograr usando discriminadores quirales, como por ejemplo ciclodextrinas, agregados a las soluciones electrolíticas que contienen agentes tensoactivos aquirales micelizados.

Otros Aditivos—La selectividad se puede modificar agregando productos químicos a la solución amortiguadora. También se emplea la adición de varios tipos de ciclodextrinas a la solución amortiguadora para reducir la interacción de solutos hidrófobos con la micela, aumentando la selectividad para este tipo de compuesto. La adición de sustancias modificadoras de las interacciones soluto-micela por adsorción en las micelas se ha usado para mejorar la selectividad de las separaciones en CECM. Estos aditivos pueden ser un segundo agente tensoactivo (iónico o no iónico) que da lugar a la formación de micelas mixtas, o cationes metálicos que se disuelven en la micela y forman complejos de coordinación con los solutos.

Cuantificación

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

CÁLCULOS

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

APTITUD DEL SISTEMA

Con el fin de verificar el comportamiento del sistema de electroforesis capilar, se usan parámetros de aptitud del sistema. La elección de estos parámetros depende del tipo de electroforesis capilar utilizado. Los parámetros incluyen los siguientes: factor de retención k' usado únicamente para la *Cromatografía Electrocinética Micelar*, el número aparente de platos teóricos (N), el factor de simetría (A_s) y la resolución (R_s). Es de destacar que las expresiones teóricas para N y R_s se han descrito en las secciones anteriores, pero las ecuaciones más prácticas que permiten la determinación de estos parámetros de aptitud usando los electroferogramas se describen a continuación.

Número Aparente de Platos Teóricos

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

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

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

Resolución

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

$$R_s = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$$

$t_{R2} > t_{R1}$

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

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

$$p/v = H_p/H_v$$

Factor de Simetría

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

$$A_s = w_{0,05}/2d$$

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

Otros parámetros de aptitud incluyen pruebas para la repetibilidad del área (desviación estándar de las áreas o del área/tiempo de migración) y pruebas para la repetibilidad del tiempo de migración (desviación estándar del tiempo de migración). La repetibilidad del tiempo de migración proporciona una prueba de la aptitud de los procedimientos del lavado del capilar. Para evitar la falta de repetibilidad del tiempo de migración, una práctica alternativa consiste en usar un tiempo de migración relativo al estándar interno.

Relación Señal-Ruido

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

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

en donde H es la altura del pico correspondiente al componente pertinente en el electroferograma obtenido con la solución de referencia especificada, medido desde el máximo del pico hasta la línea base extrapolada de la señal observada sobre una distancia igual a veinte veces el ancho del pico a la mitad de su altura; y h es el intervalo de ruido de fondo en un electroferograma obtenido después de la inyección de un blanco, observado sobre una distancia igual a veinte veces el ancho del pico a la mitad de su altura en el electroferograma obtenido con la solución de referencia prescrita y, de ser posible, situado igualmente alrededor del lugar donde se encontraría este pico.