

Desarrollo de Método para la Determinación de Componentes Mayoritarios en Digeridos de Roca Mediante Electroforesis Capilar con Detección Indirecta UV-Visible

Tesinista: Juan Antonio Aspromonte

Director: Dr. Leonardo G. Gagliardi

Asesor experimental: Lic. Marcos Tascon



Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos

División Química Analítica

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

2014

Índice

1.- Objetivos	4
2.- Introducción	5
2.1.- <i>Interés en la determinación de cationes inorgánicos por medio de la electroforesis capilar</i>	5
2.2.- <i>Principios de la electroforesis capilar</i>	10
2.2.1.- <i>Flujo electrosmótico</i>	11
2.2.2.- <i>Consecuencias y ventajas del EOF</i>	12
2.2.3.- <i>Dispersión</i>	13
2.2.4.- <i>Calentamiento Joule</i>	14
2.2.5.- <i>Largo de inyección</i>	14
2.2.6.- <i>Interacción con las paredes del capilar</i>	15
2.2.7.- <i>Electrodispersión</i>	15
2.2.8.- <i>Resolución</i>	16
2.2.9.- <i>Electroforesis capilar en zonas</i>	17
2.2.10.- <i>Detección UV indirecta</i>	18
2.2.11.- <i>Formulación del BGE</i>	22
3.- Parte experimental	27
3.1.- <i>Instrumental</i>	27
3.1.1.- <i>Inyección</i>	28
3.1.2.- <i>Capilar</i>	30
3.1.3.- <i>Acondicionamiento</i>	30
3.1.4.- <i>Termostatación</i>	31
3.1.5.- <i>Fuente de alto voltaje</i>	32
3.1.6.- <i>Sistema de Detección</i>	32
3.1.7.- <i>Detección multiseñal</i>	33
3.1.8.- <i>Software</i>	33
3.1.9.- <i>Materiales y reactivos empleados</i>	35
3.2.- <i>Procedimiento</i>	35
3.2.1.- <i>Selección de la longitud de onda del detector</i>	36
3.2.3.- <i>Consideraciones generales de la preparación de soluciones</i>	36
3.2.4.- <i>Acondicionamiento del capilar</i>	37
3.2.5.- <i>Preparación de patrones</i>	38

3.2.6.- Preparación de BGE	38
3.2.7.- Optimización de la inyección	39
3.2.8.- Composición en solvente orgánico	39
3.2.9.- Variación del diámetro interno del capilar	39
3.2.10.- Pretratamiento de muestras reales	40
4.- Resultados y discusiones	41
4.1.- Elección de las longitudes de onda del detector	41
4.2.- Acondicionamiento del capilar	43
4.3.- Preparación de patrones	45
4.4.- Preparación de BGE	45
4.4.1.- Preparación de BGE con toluidinas como cromóforo	47
4.4.2.- Optimización de la inyección	52
4.4.3.- Optimización de la composición en solvente orgánico	54
4.4.4.- Evaluación del BGE con p-toluidina	56
4.4.5.- Preparación de BGE con piridinas como cromóforo	57
4.4.6.- Evaluación del BGE con piridinas y ajuste del voltaje aplicado	62
4.4.7.- Variación del diámetro interno del capilar	65
4.5.- Tratamiento y ensayo de una muestra real	66
4.6.- Anomalías aparentes del sistema	68
4.6.1.- Picos de sistema	68
4.6.2.- Ausencia de picos de hierro y aluminio	69
5.- Conclusiones	70
6.- Referencias	71

1.- Objetivos

Los objetivos de la presente tesina son:

- Formular un medio de separación (BGE) adecuado para la separación y cuantificación de ciertos iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3}) mediante electroforesis capilar en zonas utilizando detección indirecta UV-Vis, en condiciones de elevada fuerza iónica.
- Aplicar el medio separativo formulado sobre analitos de interés geológico. Centrándose en los denominados como mayoritarios en tales muestras.
- Desarrollar un método para compatibilizar las condiciones químicas de las muestras geológicas digeridas con las condiciones requeridas por la técnica de electroforesis capilar.
- Ensayar la aplicabilidad del método desarrollado para analizar muestras reales de origen geológico, centrándose en la cuantificación de los iones mayoritarios que permitan la caracterización y clasificación del material geológico.

Regresar al índice

2.- Introducción

2.1.- Interés en la determinación de cationes inorgánicos por medio de la electroforesis capilar

La electroforesis es un método de separación definido por el movimiento diferencial de especies cargadas (iones) a través de un campo eléctrico aplicado. En el caso de la electroforesis capilar (CE) se aplica el mismo principio dentro de un capilar que contiene la solución que actúa como medio de separación, midiéndose los tiempos de migración (tiempo que tarda un analito en recorrer el capilar hasta el detector).

La CE comenzó a desarrollarse como técnica experimental en 1967 por Hjertén, quien demostrara la posibilidad de separar proteínas, ácidos nucleicos e iones inorgánicos. En la década del 80, Jorgenson publica un sistema simple de electroforesis capilar constituido por un capilar de sílice fundida, una fuente de alto voltaje y un detector UV-visible. Hacia 1988 surgen los primeros equipos comerciales y los primeros simposios exclusivos de esta técnica.

El principal impulso que ha tenido la técnica es su potencial sensibilidad y bajo costo, tanto instrumental como operacional, presentando una alta eficiencia principalmente en medios acuosos. Esto ha llevado a que su principal aplicación se haya volcado a sub-disciplinas de la biología molecular y la química biológica, clínica y ambiental, permitiendo la separación y cuantificación de biomoléculas en variados sistemas, incluyendo muestras tan complejas como citoplasmas, plasmas, sueros o tejidos; abriendo nuevos caminos en las áreas de metabolómica, genómica, proteómica, etc. Sin ir más lejos, la electroforesis capilar ha sido la herramienta analítica que, en combinación con el método de PCR, ha permitido la secuenciación del genoma humano. Por otro lado, se ha implementado como análisis de rutina en la industria, principalmente en la farmacéutica, donde es usada para la determinación de la pureza de reactivos y productos entre otros usos.

Sin embargo, si se compara la cantidad de publicaciones y técnicas desarrolladas en electroforesis capilar con las de otras técnicas separativas tales como cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de gases, puede verse que no son mayores aunque su crecimiento es exponencial, expandiéndose hacia los más diversos campos. Claramente su potencial es muy alto, pero aun presenta un largo camino por recorrer para poder ofrecer tantas soluciones estandarizadas a los problemas analíticos separativos como ocurre con las otras técnicas. Así mismo, la alta eficiencia que ha presentado la electrofo-

resis capilar en el campo de biología molecular y la química biológica ha desviado la atención de otras áreas en donde su aplicación puede resultar de gran interés, por ejemplo en el análisis de muestras inorgánicas.

El uso de CE para la separación de mezclas de iones inorgánicos data de comienzos de la década de los 90 [1-7]. Si bien en los pocos trabajos publicados en estos casos se han reportado separaciones de mezclas conteniendo una diversidad importante de especies inorgánicas, el objeto de los mismos siempre ha sido demostrar las capacidades separativas de la técnica o de alguna variante en particular, pero poco se ha reportado sobre su aplicación práctica al análisis de iones inorgánicos en muestras reales. A pesar de ello estas pocas publicaciones demuestran claramente las ventajas de la electroforesis sobre otras técnicas separativas específicas para iones, tal como la cromatografía de intercambio iónico, contando entre otras ventajas su muy menor costo operativo.

En todos los casos reportados, las concentraciones de los analitos y la fuerza iónica de las soluciones analizadas son muy inferiores a las del BGE, por lo que los problemas que pueda acarrear la situación contraria (elevada fuerza iónica de las muestras) no son considerados en los artículos mencionados y se deberán tratar cuidadosamente.

En el campo de la geología y la geoquímica, el análisis químico de los componentes inorgánicos mayoritarios (>1% p/p), minoritarios (1%-0,1% p/p) y elementos traza (<0,1%) resulta de gran interés. Las determinaciones cuantitativas en materiales geológicos normalmente se llevan a cabo luego de algún tipo de tratamiento, generalmente una digestión completa del material empleando ácidos, oxidantes y/o eliminación de sílice con ácido fluorhídrico.

Actualmente los elementos traza se analizan indefectiblemente mediante equipos de espectrometría de masas en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) dado que es el único método que alcanza los límites de detección requeridos para su cuantificación. Estos elementos constituyen la huella dactilar y pueden proveer valiosa información geocronológica sobre cada uno de los minerales que componen la roca. Sin embargo, para ello es imprescindible conocer primeramente el tipo de roca que se está tratando, lo cual queda definido por la composición de los elementos mayoritarios, ya que estos guardan una relación estequiométrica en la composición, mientras que los traza y minoritarios corresponden a diferentes sustituciones en la estructura. Los elementos considerados mayoritarios son: Ca, Mg, Na, K, Fe, Al, Ti, Mn, Si, P, C. Otros autores separan de este grupo al Ti, Mn, P y C como minoritarios [8].

Existe una cierta variedad de métodos para analizar “mayoritarios”, entre los cuales se incluyen desde las volumetrías clásicas e individuales para cada uno de ellos, espectrofotometrías (Si, Fe, P), fotometría de llama (Na, K, Ca, Mg), ICP con detección óptica y fluorescencia de rayos X (FRX) [9-11]. Las dos últimas son las más utilizadas ya que permiten determinar todos los elementos mayoritarios y minoritarios en un mismo análisis. Sin embargo estas cuentan con desventajas. Al igual que ICP-MS, ICP tiene un elevado costo en insumos (por ej., los costos asociados al Argón por hora de uso rondan alrededor de los \$1000). El costo operativo de los equipos de FRX es extremadamente bajo, pero su uso requiere de un tratamiento de muestra especial y específico, que consiste en la fusión alcalina para la formación de una perla vítrea en mezclas metaborato de litio y bórax para cada muestra y para cada uno de los patrones de calibración. Además, se observan fuertes interferencias de la matriz con diversos iones que agregan errores a los resultados y se requiere correcciones para obtenerlos con una precisión aceptable. Incluso para algunas matrices es imprescindible el uso del método de calibración del estándar interno, lo cual implica preparar una serie de perlas de calibración por cada muestra.

Luego de una digestión con mezclas ácidas, oxidantes o eventualmente ácido fluorhídrico, ocho de los componentes mayoritarios quedan en solución como especies catiónicas, el fósforo bajo la forma aniónica, mientras que el resto son eliminados (Si, C). Dado que la CE ofrece ventajas para el análisis de cationes, su potencial aplicación para llevar a cabo análisis de este tipo de muestras se pone en evidencia; sin embargo no se han encontrado en bibliografía artículos que reporten haber separado compuestos inorgánicos en este tipo de muestras mediante CE, convirtiéndolo en un interesante desafío analítico, tanto para la optimización de la separación por detección indirecta como para la determinación y cuantificación de los mismos, aprovechando las ventajas de la CE anteriormente mencionados.

Al igual que cualquier otra técnica para el análisis de micromuestras, el punto más débil es el límite de detección, pero para el caso de elementos mayoritarios no representaría inconvenientes. El costo operativo es muy bajo, se pueden analizar soluciones acuosas sin requerimiento de solventes orgánicos en cantidades considerables y, dado que es una técnica separativa, cada ion es separado de la matriz disminuyendo o eliminando estas interferencias.

Una limitación que presenta este método es que la fuerza iónica de las soluciones a analizar deben ser inferiores a la fuerza iónica del medio de separación. En el caso ideal

los iones del BGE están a cargo del transporte de cargas y, por tanto, del establecimiento del campo eléctrico, mientras que las bandas de los analitos migran en condición de dilución infinita en dicho campo. Cuando la concentración de los iones en la solución problema se eleva estos dejan de migrar como entidades invisibles y, en su lugar, toman parte activa en el transporte de carga y circulación de corriente. Esto se traduce en que los iones, en lugar de migrar en forma de banda con una velocidad característica similar a la de dilución infinita, la banda toma un perfil de concentraciones triangular y se ensancha mucho más de lo habitual. Este fenómeno se denomina electrodispersión y en muestras diluidas existe como pequeña contribución a la dispersión total. Pero en un caso extremo de concentración, el comienzo de la banda puede llegar al detector sin que el final de la banda abandone el punto de inyección, y su elevada señal se superpone a la señal del resto de los analitos que puedan encontrarse a concentraciones menores. En un sentido aún más estricto, no se trata sólo de fuerza iónica sino de capacidad de cada especie para conducir carga, lo cual involucra efectivamente la concentración de cada ión, y también su movilidad, conductividad iónica y/o su coeficiente de difusión, todas magnitudes matemáticamente vinculadas. Por ejemplo, la conductividad iónica del protón es unas 8 veces mayor a la conductividad iónica del ion sodio, con lo cual, el ion hidrógeno tendrá aproximadamente la misma capacidad de conducir carga (habitualmente dado por el número de transporte, t) que el sodio a concentración 8 veces más elevada.

Esta situación impone condiciones a las soluciones a analizar. Por un lado el requisito mencionado para la fuerza iónica de las muestras a inyectar puede implicar tener que diluir para compatibilizar la fuerza iónica de los digeridos con la fuerza iónica del BGE de separación. Diluir la muestra va en detrimento de la detección de los componentes más diluidos.

Por otra parte implica restricciones para los valores de pH de las muestras a inyectar. La concentración de protones no podrá ser muy elevada a fin de evitar la electrodispersión. Pero cuando el pH no es lo suficientemente bajo no se garantiza la solubilidad de todos los iones ($\text{pH} < 1$ e $I > 0,1 \text{ M}$).

Existen diferentes clasificaciones para las rocas según la norma que se utilice, obteniéndose distintos gráficos de clasificación, como por ejemplo Total Alkali Silica (TAS) suele utilizarse para rocas ígneas. Esta clasificación se establece a partir de la composición en dos especies: SiO_2 y $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$; y se complementa con el índice de peralcalinidad para diferenciar entre ciertas especies no diferenciables sólo por TAS. Este índice se encuentra definido por la siguiente relación [12]:

$$PI = \frac{[Na_2O + K_2O]}{[Al_2O_3]}$$

Otras clasificaciones posibles involucran relaciones de la composición en K_2O , Na_2O y CaO respecto de la alúmina. Así es que, por ejemplo, pueden clasificarse como:

Ultrapotásicas: $\frac{K_2O}{Na_2O} > 3$

Peralcalinas: $\frac{[K_2O + Na_2O]}{[Al_2O_3]} > 1$

Peraluminosas: $\frac{[K_2O + Na_2O]}{[Al_2O_3]} < 1$

Resumiendo, los elementos principales a determinar serán K, Na, Ca y Al, si se trabaja con muestras tratadas libres de Si. No obstante, la determinación de otros elementos pueden permitir la aplicación de otras normas que complementen a las antedichas y brindarán una información más detallada de la misma.

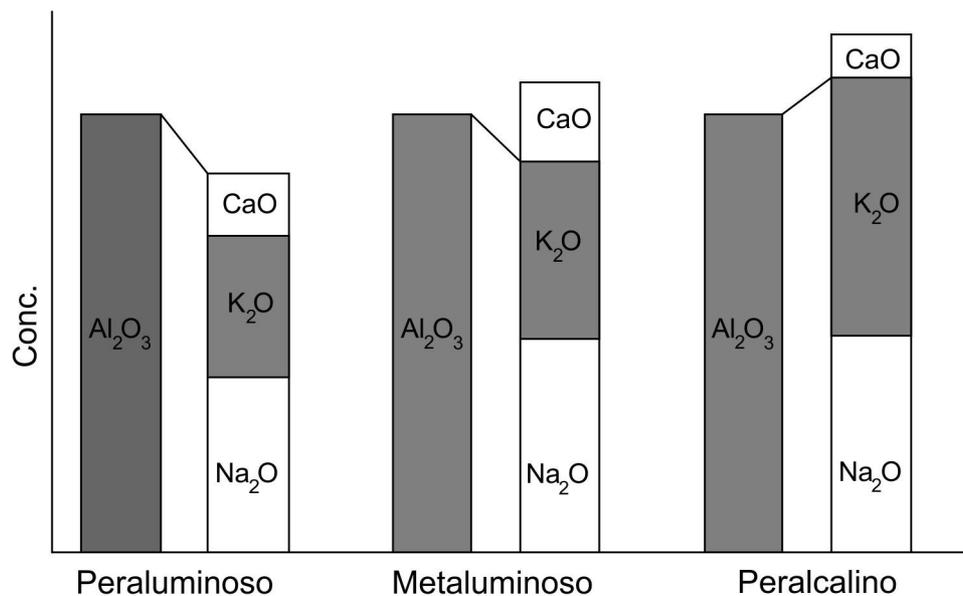


Fig. 1: Ejemplo gráfico de clasificación química de rocas. [12]

[Regresar al índice](#)

2.2.- Principios de la electroforesis capilar

La separación electroforética se basa en las diferentes velocidades de los solutos iónicos en un medio dado (conocido como electrólito de soporte) dentro un campo eléctrico externo, dada por:

$$v = \mu_e E$$

Donde μ_e es la movilidad electroforética, E el campo eléctrico aplicado y v la velocidad del ión.

El campo eléctrico puede expresarse en función de voltaje aplicado y el largo del capilar, dos parámetros directamente medibles:

$$E = \frac{V}{L}$$

Si se toma el voltaje aplicado V en volts y el largo del capilar L en cm, el campo eléctrico tendrá unidades de volts/cm.

La movilidad, para un dado ión en un dado medio, es una constante característica del ión y es directamente proporcional a la fuerza eléctrica FE e inversamente proporcional a la fuerza de fricción experimentada por el ión en el medio:

$$\mu_e \propto \frac{FE}{FF}$$

Expresando la fuerza eléctrica a partir de las leyes de la electrostática como:

$$FE = qE$$

Con q carga del ión.

Y aproximando la fuerza de fricción con la ecuación de Stokes-Einstein, considerando iones esféricos:

$$FF = -6\pi\eta r v$$

Donde η es la viscosidad de la solución, v la velocidad del mismo y r el radio del ión, el cual se puede reemplazar por el radio de Stokes.

Si se considera que durante la electroforesis se tiene un estado estacionario, en donde ambas fuerzas se encuentran balanceadas (iguales y opuestas):

$$qE = 6\pi\eta r v$$

Y si se reemplaza la velocidad en esta expresión por la de $v = \mu_e E$, se obtiene una ecuación que describe la movilidad electroforética a partir de parámetros físicos:

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

Analizando esta ecuación puede verse que iones pequeños y de cargas altas tendrán movilidades altas. Así mismo, las movilidades son independientes del campo eléctrico, y por lo tanto del voltaje aplicado y la longitud del capilar.

Regresar al índice

2.2.1.- Flujo electroosmótico

El flujo electroosmótico (EOF) es un flujo neto del seno del líquido a lo largo del capilar como consecuencia del efecto del campo eléctrico sobre las cargas superficiales del interior del capilar. Éste afecta al tiempo de migración de los analitos en el capilar, definiendo una movilidad aparente que involucra la movilidad del analito (efectiva), descrita anteriormente, y una nueva componente que denominaremos como movilidad del EOF. Por lo tanto, la movilidad aparente es:

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

Donde μ_a es la movilidad aparente, μ_e la movilidad efectiva y μ_{EOF} la movilidad del flujo electroosmótico.

Por lo tanto, el EOF es un parámetro de gran importancia, ya que afecta directamente las movilidades y por lo tanto los tiempos de migración.

Se puede describir el EOF a partir del modelo de doble capa cargada, pudiéndose definir en función de la constante dieléctrica o permitividad de la solución ϵ , el potencial zeta de las paredes ζ , y la viscosidad de la solución η , según la ecuación siguiente:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{\eta}$$

El potencial zeta está determinado principalmente por la carga superficial de la pared del capilar y ésta a su vez está determinada por el pH (debido a los silanoles de la superficie), por lo tanto la magnitud del EOF varía con el pH.

A altos valores de pH, donde los silanoles se encuentran desprotonados, el EOF es significativamente mayor que a bajos valores de pH, donde los silanoles se hallan protonados. Según el pH en el que se trabaje se pueden obtener diferencias en el EOF incluso superiores a un orden de magnitud, por lo que el pH es un parámetro fundamental en la separación electroforética.

Dado que el potencial zeta es dependiente de la fuerza iónica, ésta también afecta al EOF. Al aumentar la fuerza iónica del medio, se comprime la doble capa y disminuye el potencial zeta, por lo que se reduce el EOF a mayor fuerza iónica.

Por otro lado, se debe considerar también el efecto de la viscosidad, la cual es considerablemente afectada por la temperatura, por lo que ésta constituye otro factor importante si se desea obtener una reproducibilidad aceptable. La variación de la viscosidad con la temperatura es propia de la composición de la solución utilizada como electrólito soporte y deberá ser controlada en cada caso en particular.

Todas las mencionadas son variables experimentales que siempre se deben controlar considerando una compleja red de relaciones de compromiso. El pH, la fuerza iónica, la concentración y tipo de buffer, etc; no sólo controlan del EOF sino que también establecen las condiciones químicas de las especies a separar, la corriente que se establecerá y consecuentemente el calor generado y la pérdida de eficiencia, entre otros factores.

Regresar al índice

2.2.2.- Consecuencias y ventajas del EOF

En el caso de las cromatografías, los flujos que se establecen son hidrodinámicos, es decir que se establecen a partir de la aplicación de una diferencia de presión. El perfil de velocidades de este tipo de flujos es parabólico, lo cual produce un ensanchamiento longitudinal de las bandas cromatográficas debido a la diferencia de velocidades entre los distintos puntos de la sección transversal de los tubos o canales de conducción del flujo. Pero en el caso de las electroseparaciones el EOF tiene como principal característica su perfil plano de velocidades, conocido como “flujo pistón” y que, a diferencia de los flujos hidrodinámicos, producen una dispersión prácticamente nula de las bandas, lo cual constituye la base de la elevada eficiencia de las técnicas electroseparativas.

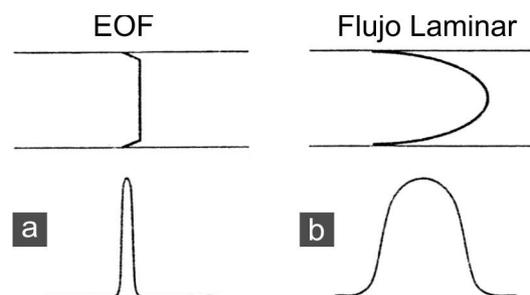


Fig. 2: Perfiles de flujo a) EOF; b) laminar; presentados junto con las dispersiones asociadas a ellos. [39]

En CE el ensanchamiento de bandas queda definido fundamentalmente por la difusión longitudinal, con lo cual, se pueden alcanzar eficiencias que, en términos de número de platos teóricos, suele ser entre 10 y 30 veces mayores que los alcanzados por HPLC.

En el caso de capilares de sílice desnuda y a valores de pH no muy ácidos ($\text{pH} > 4$), la pared se encuentra cubierta por iones móviles positivos, que se desplazarán conjuntamente hacia el cátodo definiendo un EOF neto que irá desde el polo positivo hacia el negativo. Esto implica que los analitos catiónicos presentarán una mayor movilidad aparente ya que el EOF tiene el mismo sentido que su propia movilidad electroforética. Por el contrario las especies aniónicas, que presentarán movilidad electroforética en sentido opuesto al del EOF, disminuirán y hasta invertirán su movilidad aparente, respecto de su movilidad propia (electroforética) en el campo eléctrico. Por lo tanto, aplicando voltaje positivo en el extremo del inyector puede ocurrir que lleguen hasta el detector especies de ambos tipos de cargas: primero las catiónicas, luego las neutras que migran con el EOF, y luego algunas de las aniónicas cuya movilidad electroforética propia no es muy elevada y son “arrastradas” por el EOF hacia el detector. Sin embargo, las especies de carga negativa que posean movilidades superiores a las del EOF migrarán hacia el extremo de inyección y no alcanzarán el detector.

Regresar al índice

2.2.3.- *Dispersión*

Como se ha visto la separación electroforética está basada en las diferencias de movilidad de los analitos y la resolución entre analitos está determinada por el proceso dispersivo.

La dispersión puede entenderse como la propagación de la zona de analito por las diferencias en velocidades dentro de dicha zona. Puede definirse como el ancho de pico en la base, W_b . Así para un pico Gaussiano:

$$w_b = 4\sigma$$

Donde σ es la desviación estándar, en un pico gaussiano corresponde al ancho a media altura o $w_{1/2}$.

Diferentes factores pueden ser de importancia en los fenómenos dispersivos pero en su mayoría son fácilmente controlables y pueden evitarse si se trabaja adecuadamente. Pueden mencionarse a modo de ejemplo la dispersión por gradientes de temperatura (calentamiento por efecto Joule), el largo de la inyección, fenómenos de interacción entre los analitos y las paredes del capilar, diferencias en la conductividad entre el electrolito soporte y los analitos, y todo fenómeno que aleje al sistema de la condición ideal propuesta primeramente.

Claramente estos fenómenos deben ser controlados para obtener una buena resolución, por eso describiremos brevemente los más relevantes de ellos.

Regresar al índice

2.2.4.- Calentamiento Joule

Se entiende por calentamiento Joule al calor generado por el pasaje de una corriente a través de una resistencia. El aumento de temperatura producido está relacionado directamente al producto del voltaje y la corriente (potencia), por lo que está determinado por el voltaje aplicado, las dimensiones del capilar y la conductividad del medio.

Generalmente la potencia generada es menor a los 5 W/m, con incrementos de temperatura entre 10 y 70 °C, llegando incluso a temperaturas mayores si no se controla la temperatura adecuadamente. Un incremento general de la temperatura puede no ser problemático pero sí lo es la formación de un gradiente de temperatura.

Otra característica del uso de capilares vinculada al calentamiento Joule es la sección transversal pequeña, en general se utilizan capilares de 50 o 75 μm , que restringe la circulación de corriente a pocos microamperes, lo que contribuye a disminuir el calentamiento y evitar gradientes de temperatura.

Para lograr una buena disipación de calor cuando se trabaja a potencias menores a 7 W/m es suficiente el uso de un sistema de ventilación por aire. Sin embargo, los cambios en la temperatura ambiente y en la eficiencia de disipación del calor pueden ocasionar cambios entre 2 y 3 % en la movilidad de los iones, debido a cambios en la viscosidad del medio, e incluso se puede ver afectada la inyección debido a estos cambios.

Regresar al índice

2.2.5.- Largo de la inyección

En términos de la dispersión, el largo de la inyección debe ser minimizado. Sin embargo la disminución excesiva de la inyección conlleva a la pérdida de detectabilidad y reproducibilidad.

Se considera que idealmente el largo de la inyección no debe ser mayor que la desviación estándar debido a la difusión, siendo ésta proporcional al coeficiente de difusión; por lo que analitos más pequeños necesitan inyecciones más pequeñas que las macromoléculas, que poseen coeficientes de difusión menores. En general este parámetro debe ser ensayado en cada caso en particular.

Regresar al índice

2.2.6.- Interacción con las paredes del capilar

Las interacciones con las paredes del capilar pueden causar la pérdida de analitos por adsorción o bien coqueo de los picos esperados. La principal causa es la interacción iónica de la pared con carga negativa y los analitos catiónicos. La gran relación área/volumen que resulta beneficiosa en la disipación térmica, constituye ahora un inconveniente ya que incrementa la posibilidad de interacciones adsorptivas de los analitos.

Estas interacciones son uno de los principales problemas en las separaciones que involucran proteínas o moléculas de gran tamaño que se ven favorecidas por interacciones hidrofóbicas. No obstante, es importante considerarlas en otros sistemas en donde puedan ocurrir aunque no tengan un efecto tan importante sobre la dispersión como en los mencionados.

Regresar al índice

2.2.7.- Electrodispersión

Diferencias en las conductividades del electrólito soporte y el analito pueden causar una concentración o dispersión de analito en la zona de migración, una isotacoforesis temporal por exceso de un cierto ión o sesgar el pico correspondiente.

Cuando el analito posee una mayor movilidad que el electrólito soporte, el frente de la zona de migración se vuelve más difuso y la parte posterior se vuelve más aguda. Por el contrario, si el analito posee una movilidad menor que el electrólito soporte, la parte frontal de la zona de migración se vuelve más aguda y la posterior más difusa.

Estas distorsiones pueden explicarse considerando el campo eléctrico en cada zona. Por ejemplo, cuando la zona de migración posee una movilidad mayor (menor resistividad de la solución, por lo tanto menor caída de potencial) que el electrólito soporte, al avanzar el analito en la dirección de migración, se encuentra con una mayor caída de potencial al entrar en la zona de electrólito soporte, por lo que el analito se aleja de la zona de migración, difundiéndose hacia el electrólito soporte. En la parte posterior de la zona de migración, el analito también se encuentra con un incremento en la caída de potencial pero en la misma dirección que la migración, por lo que el analito es empujado hacia la zona de migración, dándole una forma aguda. Resumiendo, la parte frontal es difusa y la posterior aguda.

Si se analiza a partir de los tiempos de migración se dice que este último caso es un coleo, mientras que el caso opuesto sería un frenteo. En el siguiente esquema se ilustran las posibles situaciones, notar que la escala de tiempo va de derecha a izquierda.

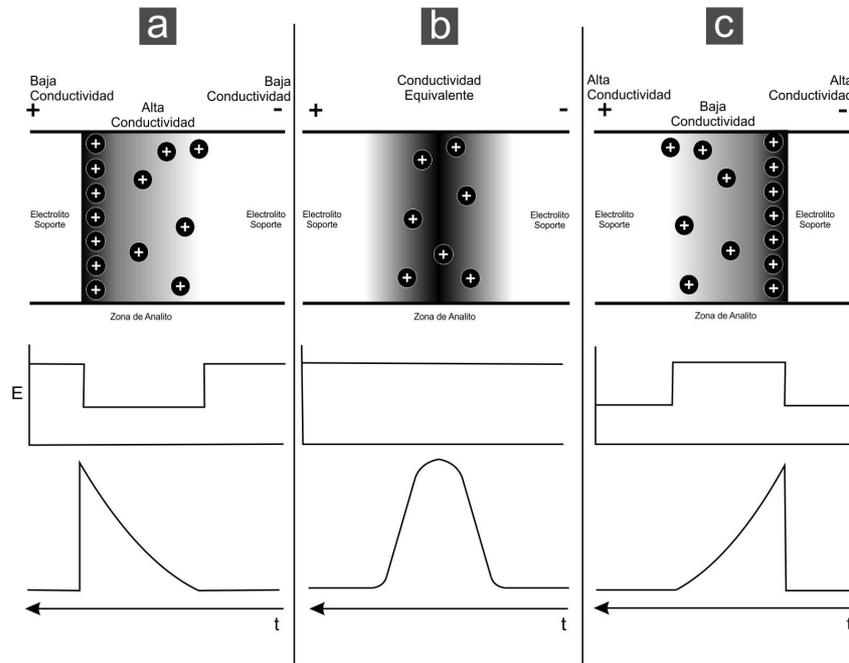


Fig. 3: Electrodispersión a) frenteo; b) simétrico; c) coleo. [39]

Los efectos electrodispersivos pueden ser mínimos en sistemas en los que predominan otros fenómenos dispersivos, pero son de suma importancia cuando se trabaja con analitos cuyas movilidades difieren mucho unas de otras. En el caso de analitos inorgánicos, la electrodispersión es un tema central para alcanzar una buena resolución.

Regresar al índice

2.2.8.- Resolución

La separación de dos analitos sucesivos estará determinada por las diferencias en migración entre ellos (a mayor diferencia estarán más resueltos) y los procesos dispersivos (la dispersión perjudica la resolución). Por lo tanto, se define la resolución de dos analitos consecutivos 1 y 2 como:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

con t_1 y t_2 tiempos de migración, y w_1 y w_2 ancho en la base de los analitos correspondientes.

Un valor de R de 1,5 corresponde a la resolución completa; valores mayores indican que la separación es completa y transcurre un cierto tiempo entre analitos.

Dado que los tiempos pueden escribirse en términos de las movilidades, la resolución puede escribirse empleando las relaciones expuestas anteriormente y encontrar que:

$$R = \frac{1}{4\sqrt{2}} \Delta\mu \left(\frac{V}{D(\mu_{prom} + \mu_{EOF})} \right)^{1/2}$$

Esta ecuación se conoce como resolución teórica y no necesariamente se cumple en todos los sistemas, ya que fue deducida a partir de las ecuaciones anteriores las cuales corresponden a modelos idealizados.

Sin embargo, de esta ecuación debe observarse que al aumentar la diferencia de potencial (voltaje) no se obtiene un incremento lineal de la resolución. El voltaje debe ser cuadruplicado para obtener una resolución del doble, lo cual nos descarta este parámetro como un buen control de la resolución.

Regresar al índice

2.2.9.- Electroforesis capilar en zonas (CZE)

La CE se puede utilizar bajo varias modalidades: electroforesis capilar en zonas (CZE), cromatografía electrocinética miscelar (MECK), isotacoforesis capilar (CITP), electroforesis capilar en gel (CGE), isoelectroenfoque capilar (CIEF) y electrocromatografía capilar (CEC); pero dada su versatilidad y simplicidad, el modo más utilizado es el de electroforesis capilar en zonas (CZE) el cual basa la separación en función de las movilidades de los iones libres en solución.

Las aplicaciones de la CZE son de las más variadas, desde macromoléculas hasta iones inorgánicos. Encontrándose en literatura principalmente su uso en el análisis de amino ácidos, péptidos, enantiómeros, estudios conformacionales en proteínas e iones inorgánicos.

La CZE se puede considerar como el modo más simple de electroforesis debido a que el capilar sólo contiene electrólito soporte para la corrida y sobre éste se inyecta la muestra. En este modo, la separación ocurre debido a diferencias de migración entre analitos de una muestra, generando zonas discretas en las que se halla cada componente.

Debido a que no es el único modo en el cual se tienen zonas definidas de migración, suele llamársele modo de tubo abierto (open-tube) o de solución libre (free solution), haciendo referencia a que no se posee una fase estacionaria ni aditivos al electrólito soporte que afecten a la separación, como es el caso de otros modos.

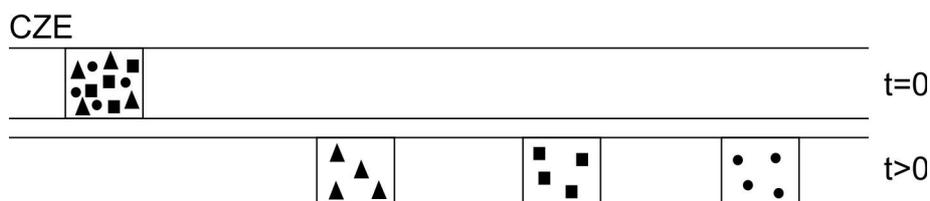


Fig. 4: Esquema de separación electroforética en zonas. [39]

Las consideraciones teóricas que se han explicado anteriormente son perfectamente válidas para este modo operacional, siempre considerando las limitaciones propias de las suposiciones realizadas.

Para mejorar la resolución es muy importante controlar la selectividad del sistema. Para ello pueden encontrarse situaciones en las que el agregado de aditivos al electrólito soporte pueda mejorar considerablemente la separación, ya sea agregando un equilibrio de partición con ciertos compuestos o bien impidiendo las interacciones no deseadas de los analitos con, por ejemplo, las paredes del capilar. Es así que en ciertos casos el agregado de aditivos se vuelve necesario y, si bien no llega a ser la situación de MECK, se aleja mucho de la situación ideal de CZE. No obstante, en estos casos se considera como un sistema de CZE con ciertas variantes, pero el estudio teórico del sistema se vuelve muy dificultoso y se debe estudiar cada caso en particular, siendo muy difícil predecir el comportamiento del sistema en estudio.

Regresar al índice

2.2.10.- Detección UV indirecta

El sistema de detección más utilizado en electroforesis capilar es la absorción en la región del ultra violeta y el visible (UV-visible)

La detección por absorción de luz se basa en la ley de Lambert-Beer para la absorción de radiación, la cual determina la absorbancia en función de la naturaleza del compuesto y su concentración:

$$A = -\log T = \epsilon l c$$

donde A es la absorbancia, T la transmitancia, epsilon la absortividad molar, l el camino óptico y c la concentración molar.

La razón principal del uso de esta forma de detección es por la simplicidad instrumental a la hora de adaptar los detectores convencionales UV-visibles utilizados en otros sistemas y el hecho de que permite el acoplamiento directo sobre la columna, por lo que se puede utilizar como detección en columna (on-column). Para esto se debe remover la pe-

lícula de poliimida para obtener una ventana que sea acoplable a la abertura del detector, utilizando sólo un alineador para tal fin. Así, el camino óptico obtenido equivale al diámetro interno del capilar, lo cual evita la dispersión que originaría una celda de detección convencional pero disminuye el camino óptico, por lo que se deben tomar varios recaudos en las demás partes que componen el detector, fuente lumínica, fotodetector, alineador, luz espúrea y amplificador. Estos se encuentran preestablecidos instrumentalmente y serán descritos en la sección instrumental.

Generalmente, se utiliza un electrólito soporte que no presente absorción en la misma región de absorción que el analito en estudio y se obtienen picos correspondientes al paso del analito por la ventana de detección, pero en el caso de analitos no absorbentes, como iones inorgánicos, este sistema no es aplicable. Con el objetivo de poder realizar determinaciones de analitos no absorbentes sin necesidad de desarrollar un nuevo instrumental o realizar derivatizaciones u otras manipulaciones sobre las muestras, se ha propuesto realizar una detección indirecta.

La posibilidad de utilizar este modo fue propuesta primeramente por Hjerten y colaboradores y luego demostrada por Foret, Kuhr y Yeung [13]. El método se basa en el desplazamiento físico de moléculas de un cromóforo constituyente del electrólito soporte por las del analito, por lo que al llegar a la ventana del detector, se observa una disminución de la absorción UV-visible, obteniéndose picos negativos. En electroforesis capilar se utiliza un componente cromóforo con carga de igual signo que el analito que lo desplazará, manteniendo la electroneutralidad.

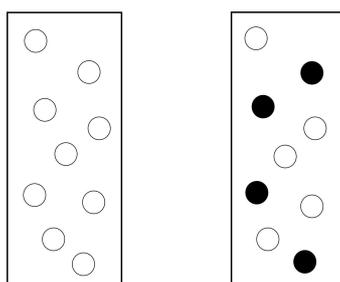


Fig. 5: Mecanismo esquemático de detección indirecta. Izquierda: la fase móvil contiene un cromóforo que genera una respuesta de absorción. Derecha: cuando los analitos (círculos negros) ingresan en la zona del detector, desplazan a las moléculas cromóforas y la absorción disminuye, se obtiene un pico negativo. [14]

Con el objetivo de evitar la dispersión de los analitos, se debe garantizar un electrólito soporte cromóforo con movilidad similar a la del analito. Si el co-ión cromóforo posee una movilidad mayor a la del analito, se observará coleo en el pico correspondiente. Por el

contrario, si el co-ión cromóforo posee una movilidad menor, se observará fronteo del pico correspondiente.

Para evitar compromisos de detectabilidad, se debe seleccionar un co-ión cromóforo que absorba a una longitud de onda tal que el analito posea un absorbancia mínima o nula. Esto no suele ser un problema en el caso de cationes inorgánicos, pero puede serlo para aniones.

Un parámetro de gran importancia es el coeficiente de transferencia (TR), el cual se define como el número de moléculas del electrólito soporte desplazadas por cada molécula de analito:

$$TR_i = \frac{-dC_{crom}}{dC_i}$$

O en términos de las movilidades:

$$TR = \left(\frac{z_a}{z_b} \right) \frac{\mu_b (\mu_a + \mu_c)}{\mu_a (\mu_b + \mu_c)}$$

donde a es el analito, b y c los co- y contra-ión del electrólito soporte respectivamente; z es la valencia de las respectivas especies y μ sus movilidades. A mayor TR, se tendrá un desplazamiento más efectivo. Puede verse que el TR óptimo se obtiene para un co-ión cromóforo con carga 1 y cuando su movilidad es mayor que la del analito.

Otro parámetro de utilidad es el de reserva dinámica (DR), definido como la relación de la señal respecto del ruido de fondo. Un mayor DR implica una señal de fondo más estable.

$$DR = \frac{s}{\sigma} = \frac{\text{señal}}{\text{ruido}}$$

Con estos dos parámetros (TR y DR) puede encontrarse una expresión para la concentración del límite de detección (C_{limit}) en función de la concentración del ión cromóforo (C_{crom}), según [15]:

$$C_{limit} = k \frac{C_{crom}}{DRTR}$$

Donde el valor de k se selecciona entre 2 ó 3 dependiendo del nivel de significancia deseado. Puede observarse que el límite de detección depende de la concentración de co-ión cromóforo, siendo menor a menor concentración de cromóforo. Por otro lado, para

obtener un límite de detección bajo, se requiere un DR y TR elevados, lo que implica una señal de fondo más estable y un desplazamiento de moléculas más efectivo.

Por otro lado puede analizarse la situación de compromiso que se genera entre el número de platos teóricos y la resolución. El primero se incrementa considerablemente si el flujo electrosmótico va en la misma dirección que los analitos (co-EOF), incrementando la detectabilidad; pero esto compromete la resolución (ver ecuaciones de N y R). Así, para mejorar la resolución se debería trabajar en condiciones de flujo electrosmótico invertido o nulo.

En la mayoría de los casos esto no es necesario y se debe intentar maximizar el N, ya que las diferencias en movilidades entre analitos son suficientes para garantizar una buena resolución del sistema. No obstante, en el caso de cationes inorgánicos, esta regla general no se cumple y garantizar la resolución puede no ser tan simple.

Como se ha visto, se debe tener un co-ión en el electrólito soporte cuya movilidad sea similar a la del analito a fin de obtener picos simétricos. Esta condición difícilmente se cumpla para todos los analitos de una muestra en simultáneo. Como se explicara anteriormente, las asimetrías de los picos obtenidos están relacionadas con las diferencias en conductividad de la zona de migración del analito y las zonas circundantes a ésta:

$$\Delta \kappa = \left(\frac{C_{\text{analito}}}{\mu_{\text{analito}}} \right) (\mu_{\text{co-ión}} - \mu_{\text{analito}}) (\mu_{\text{contra-ión}} - \mu_{\text{analito}})$$

A esta relación se le debe agregar la consideración de la concentración del co-ión cromóforo del electrólito soporte, ya que será la relación entre conductividades la que determine el grado de asimetría. Por lo tanto, al aumentar la concentración de co-ión cromóforo en el electrólito soporte, se disminuye la asimetría [16].

El único inconveniente que presenta la conclusión anterior es que, como se ha dicho en secciones anteriores, un incremento desmedido de la concentración conlleva a un calentamiento Joule que podría generar dispersión por temperatura. Así mismo, puede ser que se supere el rango lineal de respuesta del detector, lo que disminuiría la detectabilidad. Por otro lado, el ruido de la señal también se incrementa al aumentar la concentración del co-ión cromóforo del electrólito soporte, con su consecuente aumento del límite de detección.

Regresar al índice

2.2.11.- Formulación del BGE apropiado para nuestro sistema

Como en detección indirecta el electrólito soporte (BGE) es el responsable de la detección, separación y resolución de los analitos, su preparación es fundamental en el desarrollo de este método.

Un BGE apropiado debe contener una especie catiónica cromófora que será la desplazada por los analitos no absorbentes; éste debe poder utilizarse en una concentración suficientemente elevada para garantizar una fuerza iónica comparable a la de la muestra pero manteniendo un DR y TR aceptables, que posea carga unitaria y con movilidad cercana a la de los analitos. Por otro lado, el BGE debe poder mantener a los cationes en solución durante el análisis pero sin llegar a pH extremos y debe permitir una resolución aceptable de los analitos de interés. Por último, dado que el número de componentes del BGE está relacionado con la cantidad de picos de sistema (autopicos), se desea mantener la composición de la solución de electrólito soporte lo más simple posible.

Así es que, para el caso de cationes, Shi y Fritz [17] propusieron el uso de un cromóforo catiónico y un complejante débil que a su vez acidifique el medio, generando una situación de estabilidad para los analitos catiónicos, evitando la interacción con las paredes del capilar o la posible formación de compuestos insolubles como ocurre a pH elevados.

Otros autores [18] proponen el uso de una concentración determinada del cromóforo y el complejante, y realizan el ajuste de acidez por medio de un tercer componente. En estos casos, el comportamiento del sistema se vuelve difícil de predecir. En la práctica, al tener un mayor número de componentes en el BGE, se observan un mayor número de picos propios del sistema (autopicos) que pueden afectar a la resolución de algún otro pico del sistema [19].

Al incorporarse un complejante o cualquier otro componente, debe considerarse que las movilidades electroforéticas de los iones no dependen únicamente de su carga, masa y dimensiones físicas, sino que depende fuertemente de las interacciones que puede presentar con los componentes del BGE. Si las movilidades de los cationes libres son muy similares entonces la adición de un complejante al BGE permite modificar las movilidades, ya que los cationes formarán complejos a velocidades diferentes [20].

En el siguiente gráfico se muestran los tiempos de migración en función del pH al seleccionar un BGE determinado, en este caso UV-cat-1 de Waters como cromóforo e HIBA como agente complejante. Puede apreciarse que a medida que aumenta el pH, los tiempos de migración disminuyen debido al aumento del EOF. El pH también afecta los equili-

brios de complejación, lo cual puede analizarse a partir de la comparación de las pendientes, y ésta también afecta al cambio en los tiempos de migración. En el caso de especies que no forman un complejo estable, su variación depende sólo del cambio que ocurre en el EOF. Resumiendo, se tiene una relación de compromiso entre la variación del EOF y la complejación de las especies al seleccionar un determinado pH de trabajo.

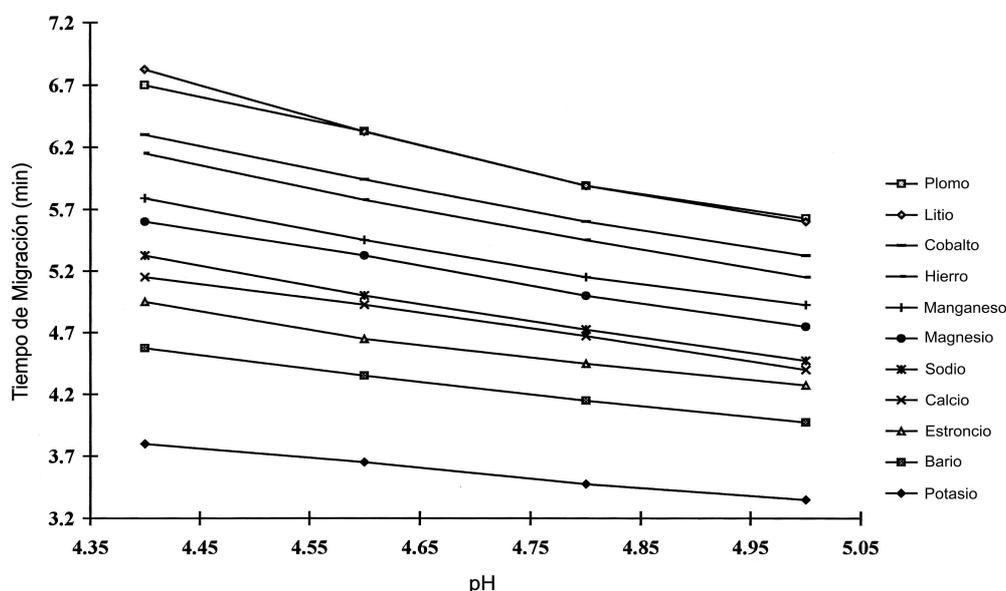


Fig. 9: Efecto del pH sobre los tiempos de migración de varios cationes metálicos inorgánicos. BGE 5 mM UV-cat1, 6,5 mM HIBA. El pH natural era de 4,4 y se aumentó con N,N-dietilaminoetanol [21].

Por otro lado, la naturaleza del complejante será también un factor determinante en la resolución del sistema. Agentes complejantes fuertes y de gran tamaño molecular en comparación a los cationes inorgánicos, que presentan elevadas constantes de estabilidad, pueden complejar muy eficientemente a prácticamente todos los cationes presentes en la solución, sin trasladar a su tamaño total el tamaño del ión central; por lo tanto se obtiene una separación de complejos cargados con cargas similares, por lo que se tiene una muy pobre resolución.

Comparando los resultados obtenidos por diferentes autores [17, 18, 22], puede determinarse que en el caso de trabajar con ácido láctico, se encuentra un pH óptimo de trabajo entre 4,5 y 4,7. Este resultado es algo esperable si se considera que todas las especies cromóforas ensayadas presentan pKa de protonación muy elevados respecto de este pH por lo que se encuentran mayoritariamente bajo su forma catiónica y, por otro lado, el pKa del ácido láctico es 3,8 por lo que a estos pH de trabajo se encuentra considerablemente disociado que es la especie que actúa como complejante; por lo tanto, se tendrá una pro-

porción aceptable, tanto de co-ión cromóforo como de ligando complejante. En general, la ventana de pH de trabajo estará dada por los pKa de los compuestos utilizados; debiendo ser mayor al pKa de este tipo de complejantes y menor al del cromóforo.

Como ya se mencionara, Shi y Fritz [17, 22] obtuvieron una separación de metales alcalinos, alcalinotérreos, metales de transición y tierras raras mediante CE empleando detección indirecta probando diferentes cationes orgánicos, empleando diferentes co-iones cromóforos hallaron los mejores resultados para 4-metilbencilamina, feniletilamina, bencilamina, p-toluidina y UV-Cat1 de Waters.

Por otro lado estos autores ensayaron diferentes complejantes, llegando a obtenerse una muy buena separación de 27 cationes con bajos límites de detección usando ácido láctico como complejante. Por su parte Lin et al [18] estudiaron el rol del agente complejante, probando distintos complejantes en un BGE cuyo cromóforo era a base de imidazol, hallando una buena separación al trabajar con los ácidos carboxílicos: malónico, succínico, glicólico, láctico o ácido hidroxisobutírico (HIBA).

Sin embargo, cabe destacar que el objeto de estos trabajos ha sido el de demostrar la capacidad separativa. En ellos siempre se utilizaron muestras sintéticas con iones a bajas concentraciones (1 mg/l máximo), sin grandes diferencias de concentración entre analitos, y de fuerzas iónicas muy bajas. En términos generales, los electroferogramas obtenidos están resueltos, pero ante un leve aumento en la concentración de alguno de los analitos se pierde la separación de algunos de ellos.

Basándose en estos resultados se han desarrollado algunos trabajos de aplicación de estas técnicas, los cuales requieren un pretratamiento de muestras no muy exhaustivo y se han aplicado con cierto éxito a algunos sistemas como aguas, combustibles y alimentos [23-29], donde la determinación de diferentes cationes inorgánicos brinda información característica sobre la calidad; aunque el número de analitos determinados es mucho menor respecto a los trabajos antes mencionados.

La principal complicación que se presenta en estos trabajos de aplicación es la diferencia de concentraciones que presentan los analitos de interés y fuerza iónica general de las muestras provenientes de digestiones de rocas, por lo que se debe modificar el BGE para poder obtener una separación aceptable. Para esto, se ha propuesto la incorporación de un nuevo equilibrio de complejación al existente utilizando una pequeña cantidad de un éter de corona (18-crown-6) que permite alojar en su interior a los cationes en diferente proporción según la naturaleza del mismo, variando el orden de elución y permitiendo la separación de los analitos no resueltos.

Esto generó un cambio en el orden de migración de los analitos y un incremento en el tiempo general de la separación, pero sin presentar grandes mejoras en cuanto a la dispersión de los analitos más concentrados. Por otro lado, el uso de éteres corona, vuelve al sistema poco predecible debido a la complejidad extra que se incorpora al sistema separativo, por lo que los aspectos teóricos desarrollados anteriormente ya no describen al sistema de manera muy certera; a su vez estos compuestos elevan el costo operacional, volviendo la técnica no tan atractiva para un análisis de rutina.

Sin embargo, las muestras provenientes de digeridos de rocas presentan características diferentes a las soluciones sintéticas, e incluso a las muestras reales analizadas por estos autores; lo cual puede traer inconvenientes técnicos en el análisis mediante CE, debiendo tenerse en cuenta ahora que la fuerza iónica será muy elevada, que se producirá electrodispersión, y que el pH de la muestra inyectada no podrá ser tan bajo como el utilizado normalmente para mantener los iones en solución.

Dado que el agregado en baja proporción de un solvente orgánico, metanol o acetoni-trilo, suele mejorar las separaciones, se propone adicionar una cantidad baja de alguno de estos. Se puede hallar un análisis detallado de los efectos de añadir solventes orgánicos en los medios separativos en electroforesis capilar [17, 30-32] los cuales demuestran que al aumentar la concentración de fase orgánica en general aumenta el tiempo de migración en forma no lineal, aumentando el tiempo de interacción de analitos catiónicos inorgánicos con el complejante, mejorando así su separación.

En secciones anteriores se ha visto que la concentración de cromóforo se debe mantener superior a la de los analitos para mantener niveles de dispersión aceptables. Por lo tanto, en lugar de utilizar las bajas concentraciones reportadas por otros autores, se trabajará en concentraciones mucho mayores, dando una fuerza iónica comparable a la de la muestra de digeridos de origen geológico.

Tomando como referencia los trabajos citados anteriormente, se plantea el uso de aminas como cromóforos y ácido láctico como complejante, ya que son de los compuestos que presentan las mejores separaciones. Otro compuesto utilizado como cromóforo y que ha presentado una buena respuesta es el imidazol, por lo que puede asumirse que otros heterociclos podrían utilizarse como buenos cromóforos, por ejemplo las piridinas; pero éstas no han sido ensayadas en ningún trabajo previo.

Por lo tanto la preparación del BGE consistirá en preparar una solución de una dada concentración de cromóforo en agua con un cierto agregado de solvente orgánico y el ácido láctico necesario para obtener el pH deseado, éste último se adicionará en dos etapas,

una fracción antes de disolver el cromóforo y otra luego para ajustar el pH monitoreándolo por medio de un pHmetro con electrodo de membrana de vidrio.

Respecto a este punto se debe considerar que es el ácido láctico quien regulará el pH a partir de seleccionar una dada concentración de cromóforo, por lo tanto la concentración de ácido láctico dependerá de la naturaleza de éste.

En los trabajos antes citados se han desarrollado soluciones BGE de baja fuerza iónica y la solubilidad de las especies en el medio no debía ser tenida en cuenta. En nuestro caso, el cual tiene como característica una elevada fuerza iónica, la solubilidad será un factor fundamental, por lo que al proponer trabajar con uno u otro cromóforo se deberá ensayar su límite superior de concentración y hallar la concentración óptima de trabajo en función de esto.

Regresar al índice

3.- Parte experimental

3.1.- Instrumental

El diseño del instrumental empleado en electroforesis es relativamente simple. Consta de un capilar contenido en un casete, donde se llevará a cabo la separación; dos electrodos junto a los extremos del capilar, que permitirán aplicar la diferencia de potencial responsable de la separación; un sistema de detección, por ejemplo un detector UV-visible como el descrito anteriormente; un sistema de termostatación para el capilar, pudiendo ser por aire o por líquido; y un sistema automatizado, compuesto por un carrusel y elevadores, que permite seleccionar y colocar los viales de muestra y electrólito soporte, según corresponda, en los extremos del capilar y los electrodos. A continuación se presenta un esquema simple del equipo descrito, con un detector UV-visible con termostatación por aire.

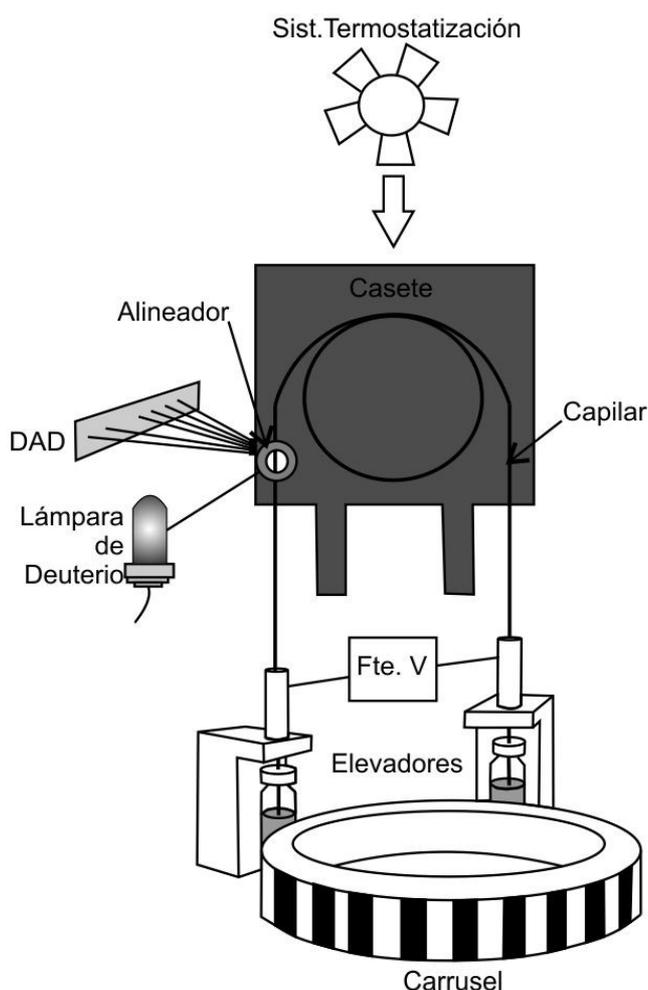


Fig. 6: Esquema de un equipo de electroforesis capilar HP G1600 como el empleado en este trabajo. [39]

El sistema así descrito opera en cinco pasos generales: 1) se llena el capilar con solución de electrólito soporte y se coloca otro vial de electrólito soporte a la salida del capilar; 2) se coloca el vial de muestra en la entrada del capilar y se inyecta una pequeña cantidad de solución a analizar generalmente aplicando una determinada presión durante un tiempo definido ; 3) se retira este vial y se coloca el de electrólito soporte; 4) se aplica un cierto voltaje para producir la separación; 5) a medida que transcurre la separación los analitos irán pasando por la ventana del detector y se obtendrá la respuesta correspondiente.

Este esquema de funcionamiento es general y es preciso detallar algunos de sus pasos para evitar resultados inapropiados, aun considerando que gran parte del funcionamiento está automatizado.

Regresar al índice

3.1.1.- Inyección

En electroforesis capilar sólo se inyecta un volumen muy pequeño a fin de evitar la pérdida de eficiencia. Si bien en muchos casos la comparación en volúmenes entre la inyección y el total del capilar puede generar la idea de que se está en condiciones de una inyección lo suficientemente pequeña, dado el pequeño diámetro que poseen los capilares utilizados (50 – 75 μm) una sobrecarga de muestra está directamente vinculada al largo de la inyección, siendo éste el parámetro crítico.

El principal problema causado por la sobrecarga es sobre la resolución, ya que implica la separación de bandas significativamente más grandes desde el comienzo en relación a la distancia de separación entre bandas. Por otro lado, si la sobrecarga es muy grande, se pueden crear zonas heterogéneas importantes que ocasionan diferencias de conductividad en una dada zona con los consecuentes cambios en la corriente producida al aplicar el voltaje.

Existen varios modos de inyección: electrocinética, hidrostática o hidrodinámica. Nos limitaremos a una breve explicación del modo hidrodinámico, por ser el de mayor uso y más ampliamente aceptado en la literatura dada su simplicidad y reproducibilidad, siempre que se utilice un equipo automatizado de inyección.

La inyección hidrodinámica consta de la aplicación de una cierta presión por un cierto tiempo sobre la solución a inyectar que se encuentra en el extremo de entrada del capilar. De este modo la cantidad de solución inyectada es casi independiente de la

matriz, puede calcularse el volumen de inyección a partir de la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L}$$

donde ΔP es la diferencia de presión entre los extremos del capilar, d es el diámetro interno del capilar, t el tiempo durante el que se aplica la presión, η es la viscosidad de la solución de electrólito soporte dentro del capilar y L el largo total del capilar. A partir de esta ecuación puede calcularse el largo de la inyección si se divide por la sección del capilar.

El largo de la inyección debe reducirse tanto como la sensibilidad del método lo permita. Sin embargo, la reproducibilidad de la inyección puede verse afectada si los tiempos de inyección son muy cortos debido dificultades inherentes al control instrumental.

En la ecuación de Hagen-Poiseuille se puede ver que el volumen inyectado, depende de la viscosidad (η) de la solución de electrólito soporte que se encuentra en el capilar por lo que es importante mantener la temperatura estable durante la inyección. El volumen inyectado puede variar en 2 o 3 % por cada °C de cambio en el capilar durante la inyección. No obstante, el volumen total del capilar es mucho mayor el de inyección y estas variaciones suelen ser despreciables si la temperatura no varía demasiado.

Otro aspecto importante de la inyección hidrodinámica es que se debe evitar la sobrecarga por efecto "sifón", es decir por diferencias de alturas entre la entrada y la salida. Para ello se debe inyectar contra un vial con solución de electrólito soporte cuyo nivel debe ser igual al de la muestra a inyectar. Si se desea trabajar con un volumen menor de muestra se pueden utilizar micro-viales, los cuales mantienen un nivel apropiado pero reducen el diámetro del vial significativamente.

Por último, la cantidad que puede ingresar al capilar por efecto de la capilaridad, llamado inyección cero, no suele ser grande y sólo se debe tener en cuenta en casos muy específicos de alta capilaridad y grandes concentraciones.

Para poder optimizar la inyección se debe considerar el volumen inyectado es proporcional a la presión aplicada y el tiempo (Hagen-Poiseuille) y por lo tanto existen relaciones de presión y tiempo que darían un volumen de inyección equivalente, sin embargo esto no se cumple. La razón de este comportamiento radica en una cuestión meramente instrumental: el control de la presión y el tiempo no son equivalentes. Aplicar tiempos cortos de inyección puede acarrear problemas en el desarrollo de la presión,

principalmente si la presión es relativamente elevada, por ejemplo en un tiempo corto puede no desarrollarse la diferencia de presión deseada y obtener una inyección de menor volumen. Afortunadamente aun si ésta es la situación, se tiene una reproducibilidad aceptable entre inyecciones en condiciones iguales. Sin embargo debe optimizarse la condición adecuada a cada equipo con el que se trabaje, ensayando diferentes posibilidades, ya que cada uno tiene sus propias limitaciones.

Regresar al índice

3.1.2.- Capilar

Idealmente un capilar debe ser química y eléctricamente inerte, transparente en la región del UV-visible, flexible, robusto y económico. Siguiendo estas cualidades es que se suelen utilizar capilares de sílice fundida recubiertas con poliimida. El principal punto en contra del uso de este material es que la poliimida no es transparente al UV-visible, por lo que se debe remover parte de esta cubierta para generar una ventana, pero al hacerlo se genera una zona extremadamente delicada que puede quebrarse muy fácilmente.

Para remover la cubierta de poliimida se pueden emplear varios sistemas de remoción mecánicos pero el más utilizado por simplicidad es el quemado de la zona que se alineará con el detector. Para ello se debe proteger el resto del capilar con papel de aluminio y, luego de quemar la zona expuesta, se deben limpiar los residuos de la combustión. Claramente una vez quemada la poliimida esta zona ya no será flexible y, debido a su extrema fragilidad, se deberá manipular con cautela.

Dado que el detector no se encuentra exactamente al final del capilar, se definen dos largos: el efectivo (l) y el total (L). Donde l corresponde al largo desde el extremo de inyección hasta la ventana de detección y L como la longitud total del capilar.

Los capilares más utilizados en electroforesis capilar son los de 50 o 75 μm de diámetro interno, con largos que varían según su uso desde 10 hasta 100 cm de largo efectivo. El largo total suele ser unos 5 cm mayor, dependiendo de la configuración del equipo que se emplee.

Regresar al índice

3.1.3.- Acondicionamiento

Con el objetivo de obtener una superficie reproducible entre análisis del capilar, se debe utilizar un protocolo inicial desactivación de la superficie interna del capilar y entre análisis un protocolo de limpieza. La activación consiste en una renovación de la

superficie interna que en el caso de capilares de sílice desnuda (sin recubrimientos) habitualmente implica desengrasar la superficie por circulación de acetona, y luego un realizar un decapado superficial por circulación durante algunos minutos de una solución acuosa de NaOH 1 M. Esto se realiza sólo la primera vez, luego de instalar en el casete un capilar nuevo.

Luego, entre análisis se hace una limpieza menos exhaustiva que dependerá de las muestras y los BGE que se hayan utilizado en cada análisis. Normalmente se utiliza una secuencia en la cual se hace circular aplicando una presión de 1000 mbar (máxima diferencia de presión aplicable en la mayoría de los equipos comerciales) sobre el vial de entrada y descartando la salida por varios minutos. Por ejemplo, podría utilizarse primeramente una solución de NaOH 0,1M, seguido de una limpieza con H₂O para remover el NaOH remanente y finalmente se hace circular la solución de electrólito soporte hasta remover toda el agua y llenar el capilar con esta solución para poder realizar la inyección y posterior análisis. Generalmente con sólo repetir el último paso de esta secuencia entre muestras se logra suficiente reproducibilidad, no obstante debe optimizarse en cada caso y puede ser necesario el agregado de alguna instancia extra de lavado.

Debe considerarse que existe una cierta histéresis en la carga de la pared del capilar. Por lo que si se tiene una diferencia importante de pH entre dos instancias de acondicionamiento, se deberá utilizar un mayor tiempo para lograr un equilibrio en la protonación o desprotonación de la pared del capilar.

Este punto se desarrollará con más detenimiento en la sección de acondicionamiento para el sistema propuesto en particular ya que presenta ciertas peculiaridades.

Regresar al índice

3.1.4.- Termostatación

Como ya se ha mencionado anteriormente resulta de suma importancia el control de la temperatura en todo el capilar a fin de evitar la dispersión que ocasionaría el calentamiento por efecto Joule. Comercialmente se encuentran disponibles dos opciones de termostatación: por aire o por líquido (agua desionizada o líquidos no conductores generalmente de la familia de los freones). Ambos sistemas poseen buenas eficiencias a potencias menores a 5 W/m.

Regresar al índice

3.1.5.- Fuente de alto voltaje

Las diferencias de potencial aplicadas requieren de una fuente de corriente continua que provea el voltaje necesario de manera estable ($\pm 0,1\%$) durante todo el tiempo que requiera el análisis. En general se utiliza una fuente bipolar con el fin de poder aplicar voltajes positivos o negativos en la entrada según lo que se desee analizar, y que permiten modular el voltaje hasta los 30 kV con corrientes de hasta 300 mA.

En algunos casos la fuente permite trabajar en gradientes o en modo de corriente o potencia continua, de modo que se varía el voltaje aplicado a lo largo del análisis.

Regresar al índice

3.1.6.- Sistema de detección

La detección en electroforesis capilar puede ser por varios medios, UV-visible, fluorescencia, masas o conductividad sin contacto acoplado capacitivamente (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector, C4D). De estos detectores, el detector UV-visible es el más general y el más ampliamente utilizado .

Este detector presenta dos puntos clave en su diseño, uno es el enfoque preciso que se requiere para evitar que la luz pase a través del vidrio del capilar y se observe una gran contaminación lumínica con luz espúrea, y el otro es mantener el capilar alineado y enfocado en la zona de la ventana, a la vez que se debe evitar la manipulación excesiva debido a su alta fragilidad. Estos dos puntos se resuelven utilizando un alineador con una rendija de un ancho determinado por el diámetro interno del capilar, estos mantienen la ventana del capilar en una posición fija para evitar que se quiebren y a la vez evitan el paso de luz por fuera del capilar o las paredes de éste.

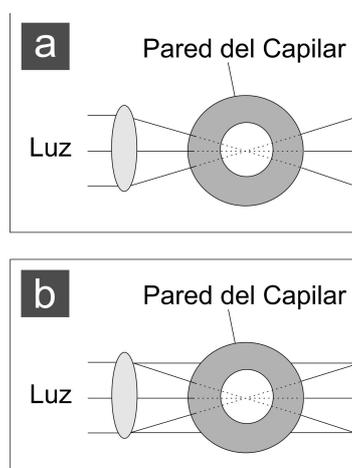


Fig. 7: Esquema de alineador; a) correcto, la luz sólo pasa por el centro del capilar; b) incorrecto, la luz pasa también por las paredes del capilar. [39]

Regresar al índice

3.1.7.- *Detección multi-señal*

La detección UV-visible se puede realizar utilizando un arreglo de diodos (DAD). Éste consiste en un sistema de lentes acromáticas que enfocan la luz en el capilar y luego se dispersa utilizando una red de difracción. El arreglo de diodos colecta todas las longitudes de onda dispersadas, cada diodo se encarga de coleccionar una región pequeña del total del espectro y luego se procesan los datos de todos los diodos.

Si se cuenta con un arreglo de diodos como detector, éste puede realizar barridos de espectros en cada punto (el volumen de datos coleccionados es muy grande) o bien puede monitorear varias longitudes de onda en simultáneo (se obtiene un volumen de datos fácilmente manipulable). Esto resulta de especial interés cuando dos especies no resueltas poseen máximos de absorción en diferentes zonas del espectro, por lo que pueden ser detectadas en simultáneo si se monitorean las longitudes de onda del máximo de cada especie en simultáneo en canales diferentes. Por otro lado, permite hallar la longitud onda óptima de trabajo sin necesidad de repetir el ensayo tantas veces como longitudes de onda se deseen ensayar.

Regresar al índice

3.1.8.- *Software*

Debido a que hay un gran número de variables acopladas entre sí que se deben considerar simultáneamente para poder realizar una predicción estimativa de la separación, se requeriría el armado de complejos sistemas de ecuaciones que resultarían poco prácticos. El Peakmaster 5.3 Complex es un freeware desarrollado por el Grupo de Procesos de Separación por Electromigración de la Charles University in Prague que cuenta con una amplia base de datos y permite seleccionar diferentes componentes y concentraciones en el BGE, así como varios analitos a diferentes concentraciones estimativas. El software calcula los tiempos de migración y las dispersiones, permitiendo obtener una simulación de la corrida electroforética (prediciendo incluso picos propios del sistema), a partir de datos de movilidades, voltajes aplicados, constantes de protonación y largos de capilar. La simulación permite elegir entre electroferogramas obtenidos por detección conductimétrica, UV-directa o UV-indirecta, siendo estos últimos los que esperamos obtener en nuestros experimentos, en donde se tendrán picos invertidos.

Además de la simulación, este software permite realizar el cálculo de parámetros importantes del BGE con gran facilidad, como son su fuerza iónica, el pH, la capacidad

amortiguadora (Se define la capacidad amortiguadora (capacidad buffer) de una solución como la cantidad de ácido o base fuerte que puede neutralizar antes de sufrir una variación en su pH), etc. lo que reduce significativamente los tiempos de trabajo.

Aunque el software no genera una simulación perfecta y falla principalmente en la predicción de las dispersiones, y por lo tanto en la resolución (principalmente por ser un proceso muy complejo desde el punto de vista teórico de estos sistemas), resulta de gran utilidad para descartar posibles composiciones que no conducirían a una separación apropiada y permite obtener el orden de migración de los analitos en el sistema de manera muy sencilla y eficaz. Debe considerarse que este software no permite predecir el flujo electrosmótico (EOF) ni el ruido de las líneas de base ya que dependen de condiciones instrumentales propias de cada equipo.

El tratamiento matemático en el que se basa este programa es extenso Su desarrollo se puede hallar en la bibliografía de los autores del software en cuestión [33-36].

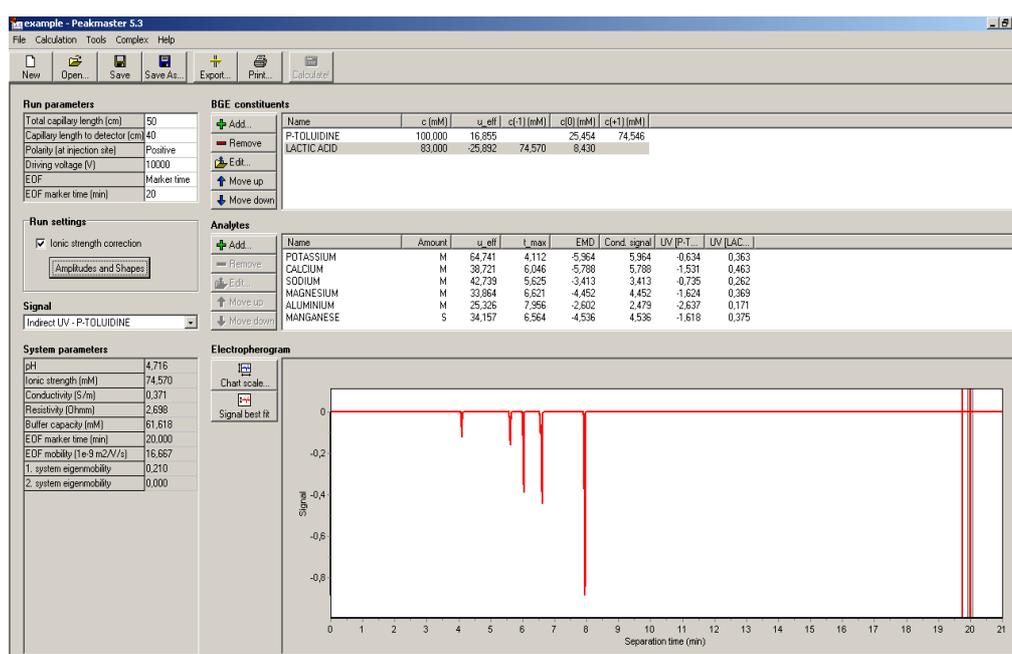


Fig. 8: Pantalla del software Peakmaster 5.3 Complex a modo de ejemplo.

[Regresar al índice](#)

3.1.9.- Materiales y reactivos empleados

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar Hewlett-Packard G6100-AX (USA) que equivale a lo descrito anteriormente, con su correspondiente software controlador HP-Chemstation. Los capilares fueron de sílice fundida recubiertos en poliimida tanto de 75 μm como 50 μm , marca Agilent (USA). Los viales fueron en su mayoría de vidrio con capacidad de 1000 μL con tapa para CE marca Agilent (USA).

Las soluciones fueron preparadas con agua provista por un sistema de purificación MilliQ Millipore Simplicity 185 (USA). Se utilizaron reactivos químicos de grado analítico o superior: Metanol Merck o Baker (USA); p-toluidina, o-toluidina, m-toluidina, 2-metilpiridina, 3-metilpiridina y 4-metilpiridina Flucka Chemicka (Suiza); 2,4,6-trimetilpiridina Carlo Erba (Italia); Ácido láctico Baker (USA); cloruro de sodio y cloruro de aluminio hexahidratado Anedra (USA); cloruro de potasio AnalQuim (Argentina); sulfato de magnesio heptahidratado Biopack (Argentina); cloruro de calcio, sulfato de manganeso monohidratado y sulfato férrico amoniacal dodecahidratado Mallinckrodt (USA).

Los reactivos sólidos fueron pesados a la décima de miligramos utilizando una balanza analítica Ohaus Adventurer Pro (USA). Para facilitar la dilución de los reactivos se sonicó hasta disolución en un sonicador Bransonic 5 (USA) o en un Cole-Parmer 8890 (México). El pH de las soluciones fue medido con un pHmetro Fisher Scientific Accumet Research AR25 (USA), con electrodo combinado de vidrio Schott Blue line 11 pH, agitando con agitador magnético Thermoline Cimarec (USA). Por último, se utilizaron filtros de nylon con poros de 25 μm para todas las soluciones preparadas.

Regresar al índice

3.2.- Procedimiento

El procedimiento consiste en una serie de etapas sucesivas. Primeramente se deberá seleccionar la longitud de onda de trabajo para cada composición de BGE, analizando los espectros del cromóforo constituyente del BGE. Luego se deberá hallar el acondicionamiento apropiado para el sistema, realizando las consideraciones pertinentes a los BGE propuestos. Seguidamente se deberán preparar los BGE, haciendo uso del software Peakmaster para predecir los comportamientos del sistema. Con uno de los BGE preparados, se deberá optimizar el largo de la inyección, la composición y naturaleza del solvente orgánico que se adicione y, en caso de ser necesario, el diámetro interno del capi-

lar. Finalmente se deberán ensayar todas las composiciones de BGE que se consideren apropiadas a partir de los resultados de la simulación por software.

Todos los ensayos deberán realizarse con patrones que contengan los analitos de interés previo al ensayo de una muestra real, la cual deberá ser preacondicionada resuspendiéndose en el BGE que se utilizará para el análisis.

Regresar al índice

3.2.1.- Selección de longitudes de onda de trabajo

Normalmente se seleccionaría la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del constituyente cromóforo del BGE, pero como ya se explicara anteriormente, al elevar la concentración de éste se eleva el ruido en el detector y las señales indirectas se pierden. Un modo simple de solucionar este problema es buscar una longitud de onda que permita la detección con absorbancias menores.

Haciendo uso del arreglo de diodos, y gráficos de absorptividades versus longitudes de onda (espectros) de las especies que absorben, pueden seleccionarse varias longitudes de onda en las que se debería obtener una respuesta aceptable. Como mínimo tomaremos el máximo de absorción y dos longitudes de onda a las que la absorción no sea máxima pero presente absorción. Las longitudes de onda de mínimos pueden resultar útiles para descartar algunos posibles ruidos electrónicos, ya que en tal caso estas líneas también se verán afectadas, cuando no debieran observarse cambios apreciables sobre ellas.

Regresar al índice

3.2.3.- Consideraciones generales para la preparación de soluciones

En las técnicas electroforéticas, la pureza de las soluciones a utilizar constituye un factor importante para disminuir el límite de detección. Pequeñas partículas en suspensión y micro-burbujas pueden aumentar el ruido de la línea de base, dificultando la identificación de picos. Incluso, partículas suspendidas, pueden causar una obstrucción en el capilar y micro-burbujas de aire pueden formarse durante el mezclado de soluciones y como, debido al calentamiento Joule, la solubilidad de los gases durante la corrida electroforética disminuye, las burbujas de gas pueden producir un cortocircuito en el capilar. Por ello, se debe realizar un cuidadoso filtrado y desgasificación de todas las soluciones a utilizar.

El filtrado se debe realizar de tal forma que ninguna partícula del material filtrante llegue a la solución. Es por esto que los papeles de filtro se deben evitar. Las soluciones

deberán ser filtradas con filtros de membrana de nylon con diámetro de poro de 0,22 μm ó 0,45 μm , en pequeños volúmenes, lo suficiente para llenar los viales que se utilizarán.

En cuanto a la desgasificación, basta con sonicar la solución ya filtrada, sumergiendo los viales en un baño ultrasónico, teniendo el cuidado necesario para no contaminar la solución durante la manipulación.

Regresar al índice

3.2.4.- Acondicionamiento del capilar

Como ya se ha explicado en términos generales, es necesario acondicionar el capilar entre corridas con el fin de garantizar la reproducibilidad de la técnica. Existen ciertos pasos preestablecidos que corresponden a un acondicionamiento y activación de la pared del capilar, que no dependen del tipo de BGE o muestra que se utilicen.

Al tomar un nuevo capilar o uno que ha estado almacenado, se debe realizar un acondicionamiento de 5 etapas:

1. Solución de ácido clorhídrico 0,1M, 15 min
2. Agua milliQ, 20 min
3. Hidróxido de sodio 0,1M, 15 min
4. Agua milliQ, 20 min
5. Solución de electrólito soporte (BGE), 30 min

La primera operación tiene por propósito remover los cationes multicargados y sustancias orgánicas como aminas, amino-ácidos, proteínas y algunos surfactantes de las paredes del capilar.

El lavado con agua que se realiza a continuación remueve las sustancias catiónicas remanentes y al ácido. No se recomienda disminuir el tiempo de esta operación.

Luego se realiza la activación de la superficie del capilar con una solución alcalina. Los grupos silanoles se hidrolizan y la disociación tiene lugar en esta etapa. En esta etapa también se remueven especies aniónicas.

El lavado con agua que se realiza a continuación remueve los remanentes de hidróxido y forma una capa difusa.

Finalmente, el lavado con electrólito, acondiciona la superficie del capilar con las condiciones necesarias para el análisis.

Las condiciones analíticas logradas en acondicionamiento difieren de las presentes en el análisis debido al alto voltaje aplicado. Esto no sólo afecta la formación de la doble capa eléctrica, sino que también influencia las condiciones de detección. En general se

recomienda realizar primero un análisis sin inyección de muestra bajo las mismas condiciones (voltaje, tiempo, etc.) que se utilizarán luego para el análisis de la muestra. La línea de base obtenida permitirá evaluar todo el sistema. Si la línea de base es estable luego de la sección inicial (aproximadamente 40 segundos) el capilar puede ser considerado apto para realizar el análisis.

Por otro lado, es necesario el lavado entre análisis. El objetivo del lavado es remover los remanentes de la muestra inyectada que no hayan llegado hasta el detector durante la corrida analítica, restableciendo las condiciones apropiadas en la pared del capilar. Generalmente, si las muestras no contaminan las paredes del capilar, el lavado con BGE por 2 ó 3 minutos resulta suficiente. Puede considerarse como un criterio válido de acondicionamiento la reproducibilidad de los tiempos de migración de los componentes conocidos de una muestra o del EOF.

Regresar al índice

3.2.5.- Preparación de patrones

Los patrones a preparar se seleccionan en función del conocimiento de una muestra provista por el Centro de Investigaciones Geológicas (CIG) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP. La misma había sido tratada por digestión ácida con ácido fluorhídrico y posteriormente resuspendida en ácido clorhídrico, Los cationes mayoritarios eran: potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro (III) y aluminio; y en menor medida manganeso.

Se utilizan diferentes sales (cloruros y sulfatos) de estos componentes mayoritarios para preparar las soluciones patrón. Las mismas se preparan en unidades de concentración de partes por millón (mg/l) ya que es así como se encuentran reportadas en las bibliografías citadas, tanto de electroforesis capilar como de geología y geoquímica.

El solvente utilizado será el BGE que se utilice en el análisis. De esta forma se evita una inyección de agua, que generaría una zona considerablemente diferente a la que se encuentra en el resto del capilar, y por otro lado, se puede trabajar con una solución de fuerza iónica más elevada.

Regresar al índice

3.2.6.- Preparación de BGE

Primeramente se simula el uso de diferentes cationes cromóforos por medio del software Peakmaster. Se selecciona una serie de aminas considerando que deben poseer

un pKa mayor al pH de trabajo para que se encuentren en su forma catiónica, así se seleccionan la orto-, meta- y para-toluidinas. En una segunda etapa se evalúa el uso de un grupo de piridinas: 2-, 3- y 4-metilpiridina y 2,4,6-trimetilpiridina.

Regresar al índice

3.2.7.- Optimización de la inyección

Se debe hallar la inyección apropiada para el BGE evaluado; esto es, inyectar el mayor volumen que sea posible sin que sea afectada la resolución de los picos cuya separación se vea más comprometida. Con objeto de esto se realiza una sucesión de inyecciones variando las presiones y los tiempos de aplicación de la misma, dentro de los intervalos operacionales normales del equipo empleado que nos aseguren reproducibilidad. El equipo utilizado, Hewlett-Packard HPCE3D, permite utilizar presiones de inyección entre 1 mbar y 50 mbar, aunque se sabe que presiones por debajo de 10 mbar resultan excesivamente bajas y en ocasiones resulta insuficiente para vencer las resistencias naturales al movimiento del fluido, aumentando la incidencia de inyecciones fallidas o de volúmenes menores. Por otro lado, para tiempos menores a 3 segundos, la variabilidad de la rampa de aumento y de disminución de presión, que suelen durar una fracción de segundo, comienza a tener una incidencia relevante sobre la variabilidad o reproducibilidad total de los volúmenes de inyección. Por lo tanto se deben ensayar presiones entre 10 y 50 mbar con tiempos mayores a 3 segundos pero no muy prolongados (la inyección sería muy grande).

Regresar al índice

3.2.8.- Composición en solvente orgánico

Se ha sugerido, y en algunos casos se ha llegado a comprobar, que el uso de mayores composiciones de solvente orgánico puede mejorar las resoluciones. Incluso se han observado sistemas donde el uso de acetonitrilo en lugar de metanol presenta ciertas mejoras [30-32].

Por ello se optimiza la composición de solvente orgánico usando una serie de patrones corridos con un BGE conteniendo metanol o acetonitrilo en diferentes composiciones.

Regresar al índice

3.2.9.- Variación del diámetro interno del capilar

Empíricamente se ha observado en reiteradas ocasiones que al trabajar con diámetros internos menores se logran resultados ligeramente mejores en cuanto a estabilidad del

sistema y resolución, aunque la disminución del camino óptico va en detrimento del límite de detección. Debe considerarse también que en detección indirecta, con un menor camino óptico se disminuye el ruido; por lo que se genera una situación de compromiso entre la disminución del ruido y de la señal.

Por lo tanto, en caso de necesitar mejorar la estabilidad de la línea de base o disminuir el ruido de ésta, el uso de un capilar de menor diámetro interno puede resultar una solución viable.

Regresar al índice

3.2.10.- Pretratamiento de muestras reales

La muestra provista por el CIG (centro de investigaciones geológicas de la UNLP) consiste en 0,1000 gr de roca tratada de la siguiente manera: primero es suspendida en 1,00 ml de ácido nítrico concentrado y 1,00 ml de ácido perclórico concentrado. Seguidamente se le adiciona ácido fluorhídrico (5,0 ml) y se lleva a vapores perclóricos, se repite el procedimiento y se lleva a sequedad completa. Por último se disuelve el producto final en 5,0 ml de solución de ácido clorhídrico concentrado y se lleva a volumen final de 100,0 ml en agua bidestilada. Con este procedimiento se eliminan principalmente los silicatos, quedando como principales constituyentes: calcio, magnesio, sodio, potasio, aluminio y hierro; en menor medida puede encontrarse manganeso.

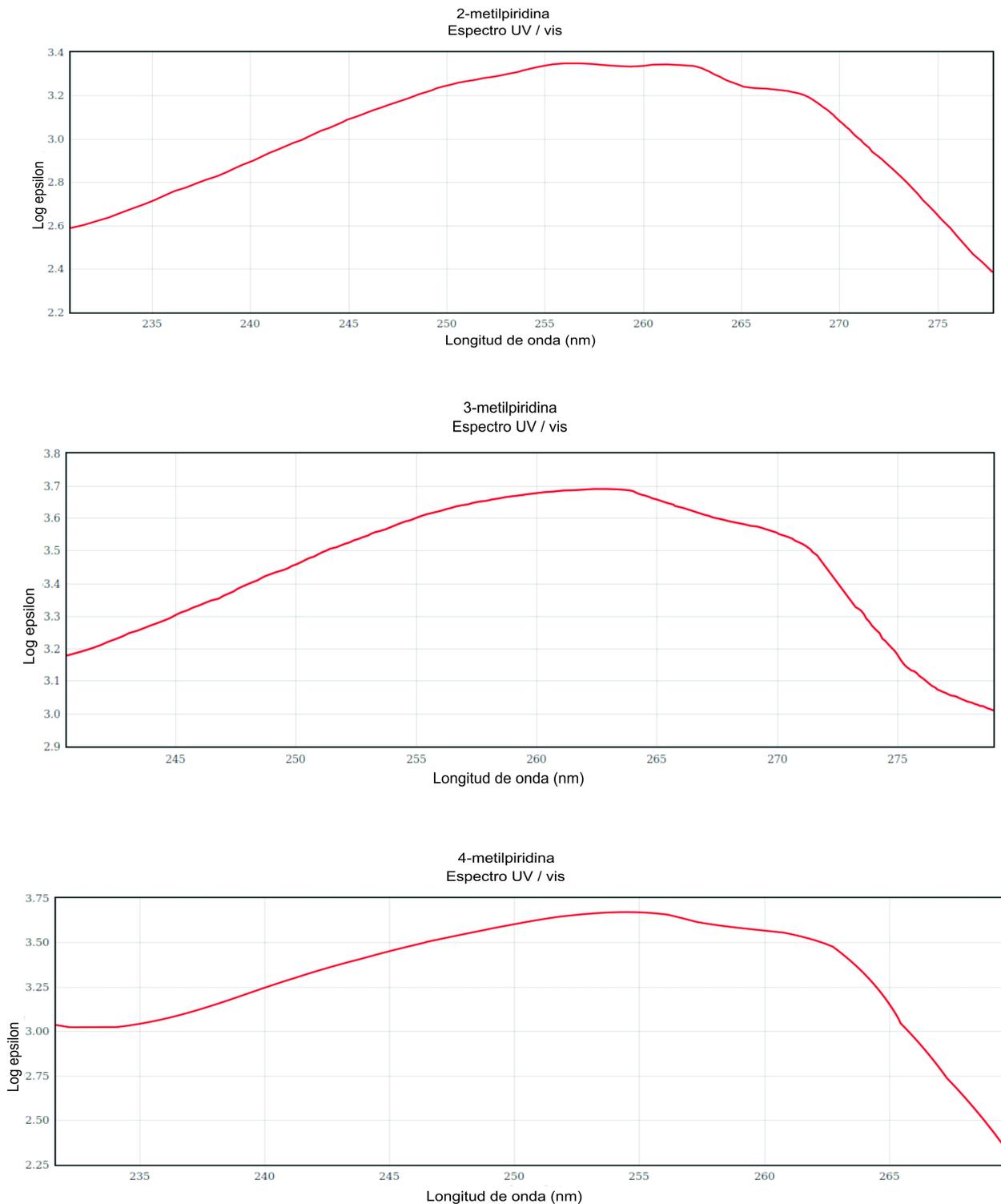
Dado que en estas condiciones la muestra no es apropiada para su análisis por la técnica propuesta, se requiere de un acondicionamiento previo, es decir se debe llevar la muestra a un medio apropiado. Se propone para esto utilizar como medio para la muestra real el BGE que se vaya a utilizar.

Regresar al índice

4.- Resultados y discusiones

4.1.- Elección de las longitudes de onda de detección

A continuación se presentan los espectros de absorción de los componentes cromóforos de los distintos BGE.



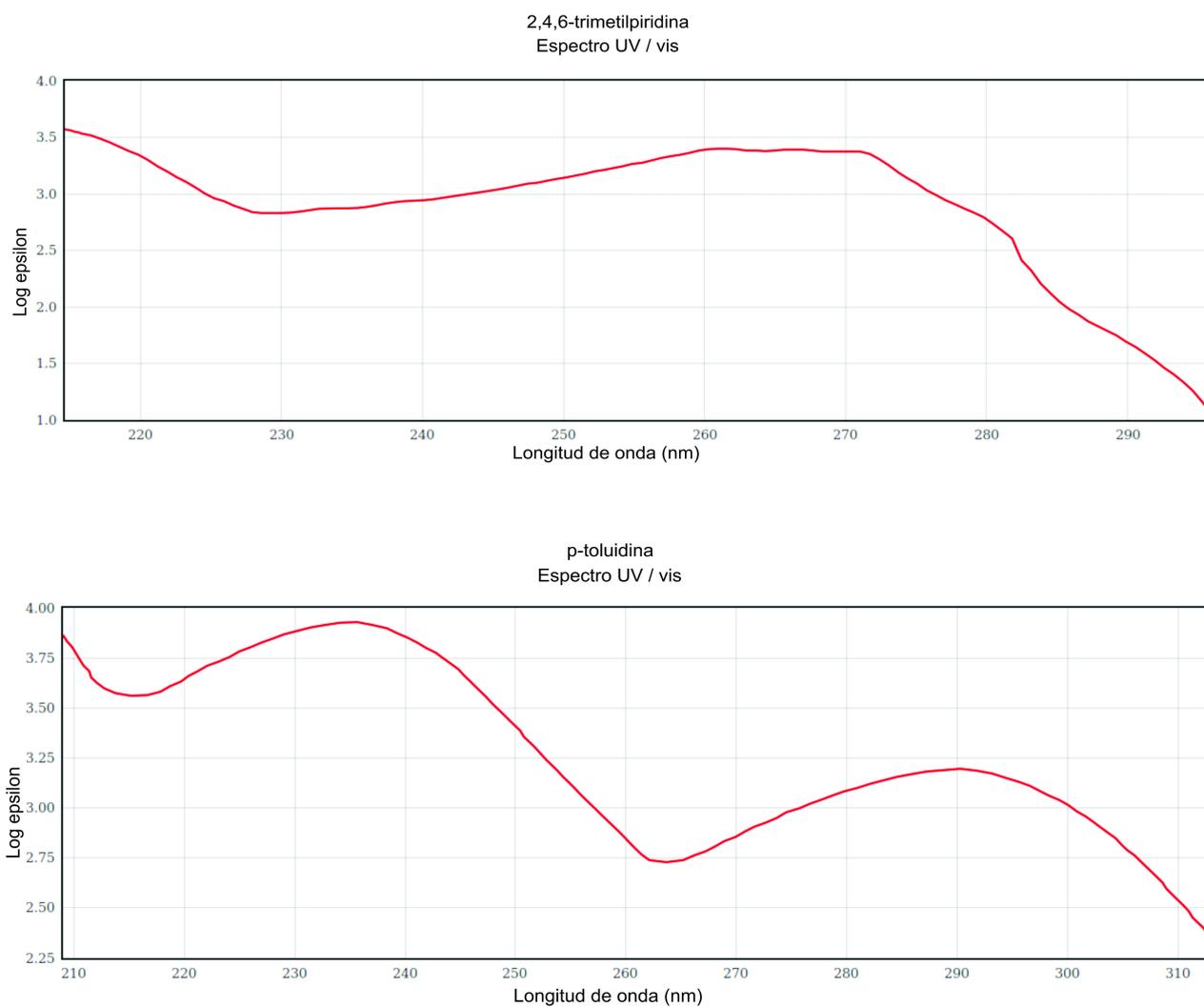


Fig. 10: Espectros de absorción UV-vis 1) 2-metilpiridina; 2) 3-metilpiridina; 3) 4-metilpiridina; 4) 2,4,6-trimetilpiridina; 5) p-toluidina. [37]

El detector de arreglo de diodos del que se dispone permite monitorear 5 longitudes de onda en simultáneo. Por lo tanto, se seleccionan las siguientes longitudes de onda (nm) para cada cromóforo:

- p-toluidina: 215 nm, 254 nm, 265 nm, 290 nm, 350 nm. Resultando 254 nm la más útil para el análisis.
- 2,4,6-trimetilpiridina: 215 nm, 230 nm, 254 nm, 265 nm, 280 nm. Resultando 230 nm la más útil para el análisis.
- 2-metilpiridina: 245nm, 255nm, 260nm, 265nm, 270nm. Resultando 265 nm la más útil para el análisis.
- 3-metilpiridina: 245 nm, 254 nm, 263 nm, 270 nm, 280 nm. Resultando 270 nm la más útil para el análisis.
- 4-metilpiridina: 235 nm, 245 nm, 255 nm, 260 nm, 265 nm. Resultando 235 nm la más útil para el análisis.

Regresar al índice

4.2.- Acondicionamiento del capilar

En el caso particular de nuestro sistema, se encuentra que se alcanza un acondicionamiento aceptable para el primer uso del capilar si se lo acondiciona con solución de hidróxido de sodio 0,1M durante 5 minutos, seguido de 6 minutos con agua milliQ y finalmente 10 minutos de enjuague con BGE.

Luego del primer análisis y entre análisis se debe incorporar una etapa más previa al lavado con hidróxido de sodio, se debe realizar un lavado con metanol, con la particularidad de que todo el electrodo debe estar sumergido durante la limpieza. El tiempo de limpieza óptimo encontrado fue de 6 minutos, pudiendo ser mayor si no se obtiene una buena reproducibilidad en las líneas de base o en la corriente registrada.

Esta etapa, que escapa de los acondicionamientos típicos, tiene por objetivo remover de manera sencilla restos de muestra y, sobretodo, BGE que se haya descompuesto luego de la aplicación del voltaje. El uso de metanol responde a una necesidad específica en la limpieza por el uso de anilinas y piridinas sustituidas, pero presenta una gran ventaja en el tiempo de lavado, ya que fluye con mayor facilidad que el agua (su viscosidad es menor) por lo tanto a igual presión y tiempo se obtiene un flujo mayor y, en el caso particular de las composiciones de BGE con las que se trabaja, resulta muy eficiente como solvente.

En el caso particular de la anilinas sustituidas, en las condiciones altamente oxidativas en la que se encuentra al aplicar sobre el vial de entrada el potencial requerido (10 kV) o mayor que sea necesario para la separación, se producen productos de oxidación propios de una reacción sobre el anillo, el cual es más susceptible a la oxidación que el metilo lateral, por lo que se generan colorantes polinucleares complejos, quinonas y productos de ruptura del anillo. Así mismo, es conocida la reacción de polimerización de estas especies al aplicar un potencial oxidativo sobre ellas, lo cual genera un producto coloreado que al depositarse sobre el electrodo posee un efecto pasivante de la superficie [38].

Esto genera dos inconvenientes, la degradación paulatina del BGE y la adsorción de ciertos productos sobre el electrodo. En este caso se observaron depósitos de un producto coloreado rojizo. Por lo tanto, es necesario reemplazar el BGE que se utilice en la entrada entre análisis y se deberá retirar todo resto de productos de la oxidación. Si esto no se realiza adecuadamente, el método se vuelve irreproducible y se encuentran variaciones aleatorias, por ejemplo el voltaje aplicado puede no ser efectivo, se pierde la capacidad amortiguadora y nuevas especies se incorporan al sistema de manera incontrolada.

Afortunadamente, se pudo corroborar que la degradación del BGE no es significativa sobre la separación hasta luego de un cierto tiempo, el cual resulta mayor al tiempo de análisis (mayor al tiempo del EOF) por lo que es suficiente con retirar todo resto de productos de degradación al finalizar la separación para no afectar los próximos análisis. Para esto basta con utilizar el lavado con metanol, garantizando que el electrodo quede completamente sumergido al elevar el vial de entrada, para disolver los productos que puedan haber quedado adsorbidos sobre la superficie de platino.

Si entre operaciones analíticas no se utilizará el capilar por varias horas, el capilar debe ser almacenado con agua en su interior y libre de restos de muestra o BGE. Para ello se lava tanto el capilar como el electrodo con metanol, siguiendo el procedimiento anterior, y a continuación se hace circular agua por un tiempo equivalente. Luego se dejará el capilar con los extremos sumergidos en agua para evitar el posible escurrimiento y secado del capilar.

El capilar tiene una vida útil limitada. Si la eficiencia de separación empeora y aumenta el ruido, deberá considerarse la posibilidad de que la superficie del capilar sea la responsable y el acondicionamiento ya no resulte apropiado. En ese caso será necesario cambiar el capilar.

Regresar al índice

4.3.- Preparación de patrones

La preparación consistió en el pesaje de una masa determinada de cada sal y su posterior disolución en un medio apropiado para su disolución y análisis, es decir en el mismo BGE que se utilizará para la separación. Esto último simplifica el sistema, ya que la inyección de la muestra no ingresará al capilar una zona con una composición distinta excepto por la presencia de los analitos.

La cantidad en masa que se debe adicionar de una dada sal para obtener una concentración final en mg/l está dada por:

$$m_{sal}(mg) = C(mg/l) V_{final}(ml) \frac{M_{sal}(g/mol)}{M_{cación}(g/mol)} 10^{-3}$$

Con m_{sal} la masa de la sal que se debe adicionar, C la concentración que se desea, V_{final} el volumen final que se desea preparar, M_{sal} el peso molecular de la sal y $M_{cación}$ el peso molecular del catión. Todo en las unidades expresadas entre paréntesis.

$V_f=25$ ml y $C_{c/analito}=10$ mg/l

Analito	Sal	M_{sal}	$M_{analito}$	m_{sal} (mg)
K	KCl	74,55	39,1	0,48
Na	NaCl	58,44	22,99	0,64
Ca	CaCl ₂	110,99	40,08	0,69
Mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,48	24,31	2,53
Mn	MnSO ₄ ·H ₂ O	169,02	54,94	0,77
Al	AlCl ₃ ·6H ₂ O	241,43	26,98	2,24
Fe	Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	482,19	55,85	2,16

$V_f=25$ ml y $C_{c/analito}=25$ mg/l

Analito	Sal	M_{sal}	$M_{analito}$	m_{sal} (mg)
K	KCl	74,55	39,1	1,19
Na	NaCl	58,44	22,99	1,59
Ca	CaCl ₂	110,99	40,08	1,73
Mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,48	24,31	6,34
Mn	MnSO ₄ ·H ₂ O	169,02	54,94	1,92
Al	AlCl ₃ ·6H ₂ O	241,43	26,98	5,59
Fe	Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	482,19	55,85	5,40

Tabla 1: Preparación de patrones a partir de las distintas sales, en concentraciones de 10 y 25 mg/l, en todos los casos llevados a volumen con el BGE correspondiente al análisis que se realizara.

[Regresar al índice](#)

4.4.- Preparación de BGE

Se probaron concentraciones variables de cada una de las aminas, entre 20 hasta 200 mM, agregando la concentración necesaria de ácido láctico en cada caso para obtener un pH entre 4,5 y 4,7. Gracias a la base de datos de que dispone el software no es necesario realizar el cálculo de pH y de concentraciones de cada especie en la solución final, ya que al ingresar las concentraciones esto se calcula de manera automática.

Cromóforo	C(mM)	Ác.lác. (mM)	Lactato (mM)	Co-ión (mM)	pH	C. Buffer (mM)	l (mM)
p-toluidina (pKa=5,091)	20,000	16,000	14,324	14,303	4,741	12,965	14,324
	50,000	41,000	36,727	36,705	4,722	31,559	36,727
	100,000	83,000	73,915	73,892	4,730	61,720	74,570
	150,000	125,000	112,589	112,565	4,715	91,086	112,589
	200,000	165,000	149,380	149,356	4,731	120,491	149,380
o-toluidina (pKa=4,394)	20,000	7,500	6,676	6,656	4,732	12,175	6,676
	50,000	19,000	17,004	16,983	4,737	30,721	17,004
	100,000	40,000	35,803	35,780	4,719	63,359	35,803
	150,000	60,000	53,941	53,919	4,727	94,914	53,941
	200,000	80,000	72,148	72,126	4,733	126,342	72,148
m-toluidina (pKa=4,683)	20,000	11,000	9,832	9,812	4,742	14,158	9,832
	50,000	28,000	25,141	25,121	4,742	35,384	25,141
	100,000	58,000	52,137	52,115	4,728	71,044	52,137
	150,000	91,000	81,527	81,502	4,701	107,268	81,527
	200,000	120,000	108,040	108,015	4,715	141,854	108,040
2-metilpiridina (pKa=6,20)	20,000	22,000	19,491	19,468	4,693	6,359	19,491
	50,000	55,000	48,807	48,782	4,677	15,433	48,807
	100,000	108,000	97,420	97,396	4,726	27,844	97,420
	150,000	162,000	146,265	146,241	4,719	41,172	146,265
	200,000	215,000	194,943	194,919	4,732	53,295	194,943
3-metilpiridina (pKa=4,91)	20,000	20,000	17,704	17,681	4,692	9,453	17,704
	50,000	50,000	44,503	44,478	4,691	22,633	44,503
	100,000	99,000	88,954	88,930	4,711	43,521	88,954
	150,000	149,000	134,010	133,985	4,701	4,704	134,010
	200,000	199,000	179,126	179,101	4,701	84,355	179,126
4-metilpiridina (pKa=6,08)	20,000	22,000	19,365	19,340	4,670	6,860	19,365
	50,000	54,000	48,309	48,286	4,710	15,571	48,309
	100,000	107,000	96,590	96,564	4,729	29,296	96,590
	150,000	160,000	144,936	144,912	4,734	42,754	144,936
	200,000	215,000	193,770	193,744	4,705	58,024	193,770
2,4,6- trimetilpiridina (pKa=6,688)	20,000	22,500	19,854	19,830	4,678	5,817	19,854
	50,000	56,000	49,629	49,603	4,671	13,962	49,629
	100,000	110,000	99,169	99,145	4,723	24,480	99,169
	150,000	165,000	148,799	148,774	4,713	36,485	148,799
	200,000	220,000	198,436	198,411	4,708	48,459	198,436

Tabla 2: Cálculos realizados con software Peakmaster para diferentes cromóforos a distintas concentraciones.

Para las simulaciones se fijaron largos totales de capilar de 50 cm, con un largo efectivo de 41 cm; y el voltaje aplicado se fijó en 10 kV. Esto último se seleccionó considerando la alta corriente que se produciría por trabajar con BGE de fuerzas iónicas elevadas.

Haciendo uso de la base de datos del software, se seleccionaron los mismos analitos que se utilizaron en los patrones a excepción del hierro (III), del que no se dispone suficiente información en la base de datos del software ni en bibliografía como para su incorporación a dicha base de datos, particularmente sobre constantes de formación de complejos entre hierro y los distintos ligandos. Con la información disponible fueron simuladas las separaciones para las diversas condiciones descritas.

Regresar al índice

4.4.1.- Preparación de BGE con toluidinas como cromóforos

A continuación (figura 11) se muestran los electroferogramas simulados utilizando p-toluidina en diferentes concentraciones y ácido láctico como complejante y regulador del pH. El potasio, sodio, calcio, magnesio y aluminio fueron seleccionados en concentración M (media), y el manganeso en concentración S (pequeña).

Puede observarse que a medida que se incrementa la concentración de la p-toluidina el sistema se resuelve en mayor medida. Si se realiza la misma simulación para la m-toluidina y la o-toluidina (figura 12), puede verse que la resolución sólo es aceptable a concentraciones superiores a 150 mM para la o-toluidina y 100 mM en el caso de la m-toluidina y la p-toluidina.

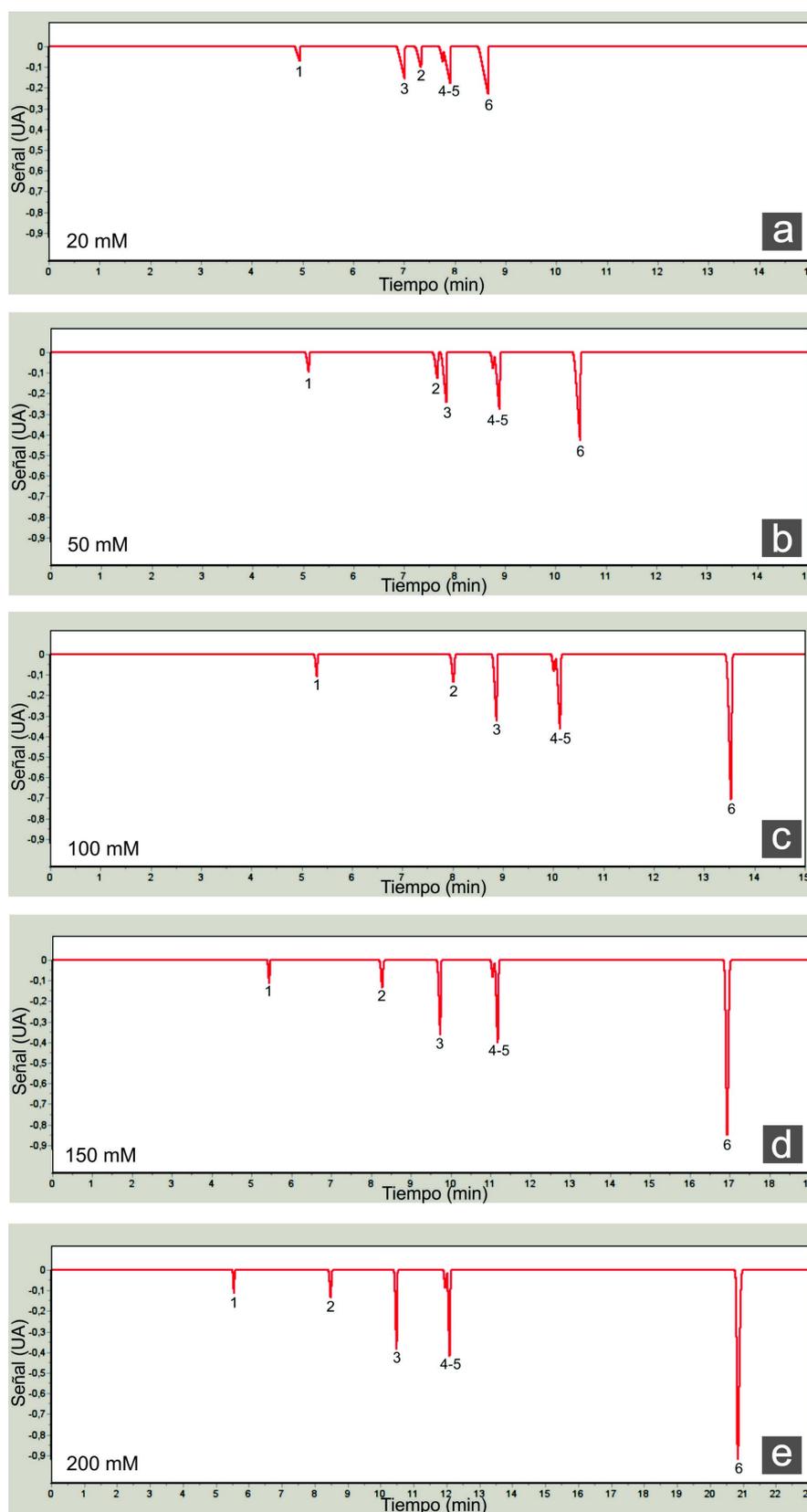
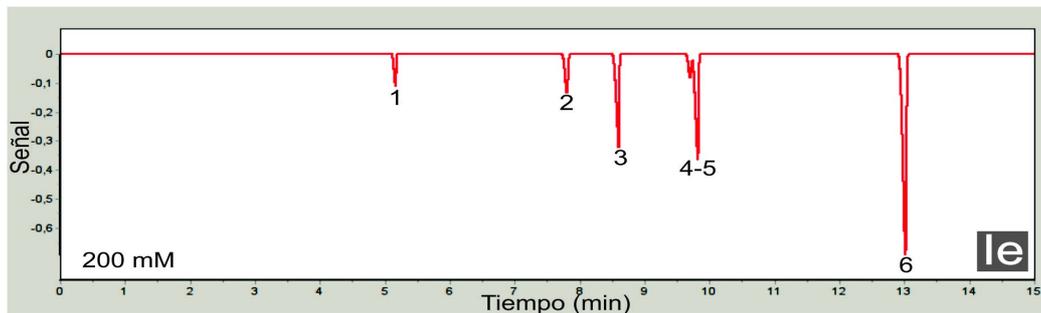
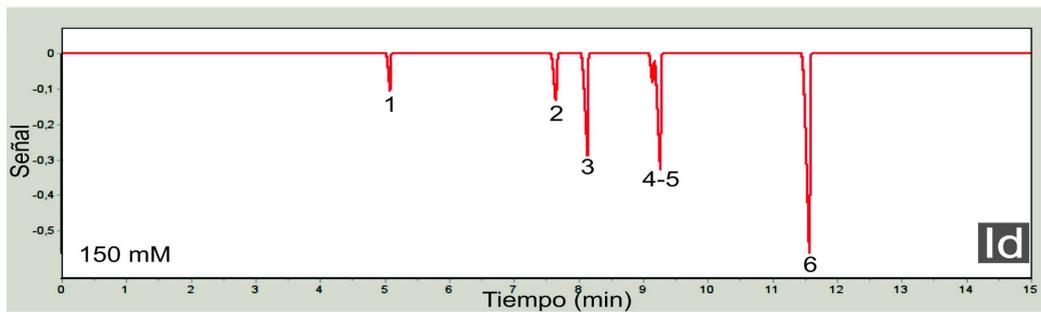
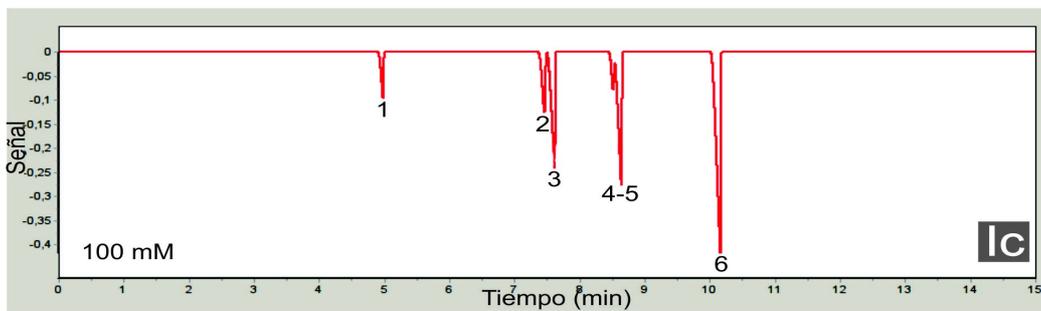
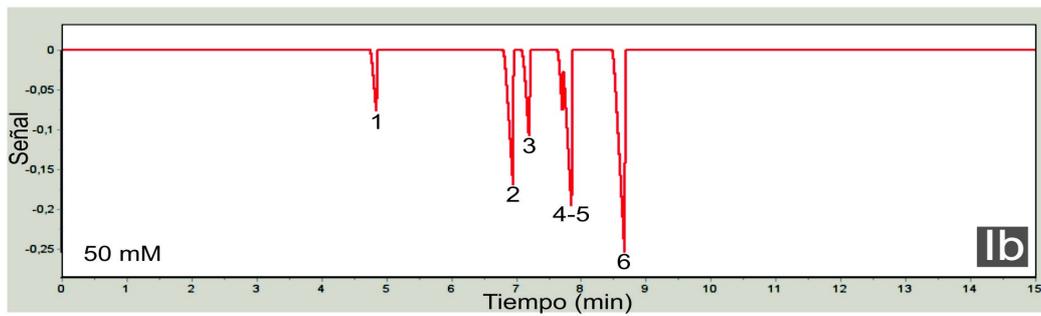
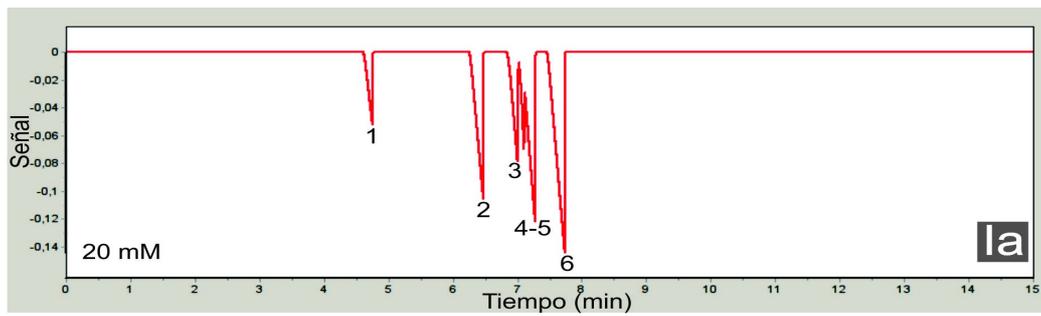


Fig. 11: Simulaciones de electroferogramas para un BGE compuesto por p-toluidina y ácido láctico. a) 20 mM p-toluidina, 16 mM ác. Láctico; b) 50 mM p-toluidina, 41 mM ác. Láctico; c) 100 mM p-toluidina, 83 mM ác. Láctico; d) 150 mM p-toluidina, 125 mM ác. Láctico; e) 200 mM p-toluidina, 165 mM ác. Láctico. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4 y 5) magnesio/ manganeso; 6) aluminio.



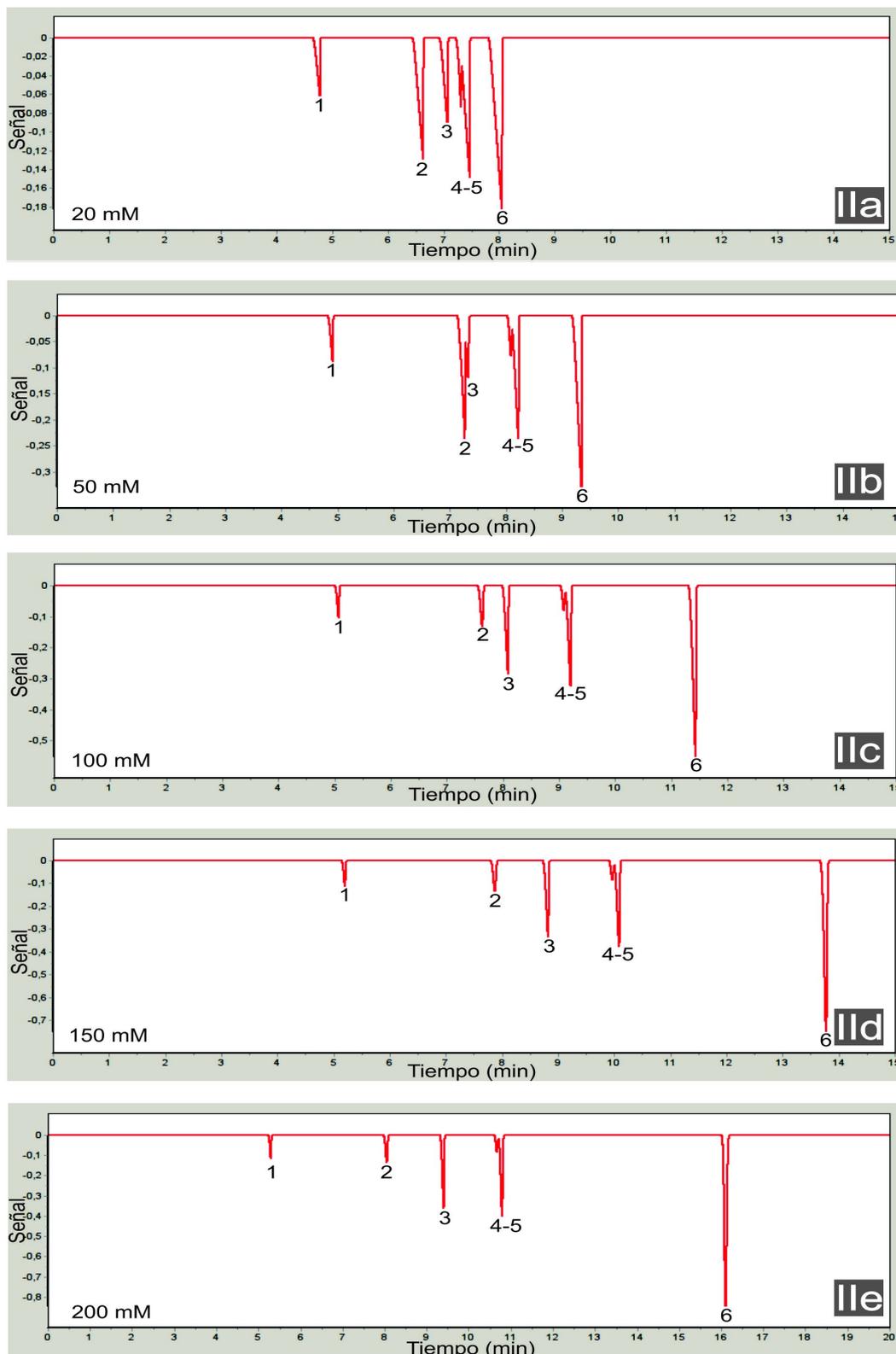


Fig. 12: Simulaciones de electroferogramas para un BGE compuesto por I) a) 20 mM o-toluidina, 7,5 mM ácido Láctico; b) 50 mM o-toluidina, 19 mM ácido Láctico; c) 100 mM o-toluidina, 40 mM ácido Láctico; d) 150 mM o-toluidina, 60 mM ácido Láctico; e) 200 mM o-toluidina, 80 mM ácido Láctico. II) a) 20 mM m-toluidina, 11 mM ácido Láctico; b) 50 mM m-toluidina, 28 mM ácido Láctico; c) 100 mM m-toluidina, 58 mM ácido Láctico; d) 150 mM m-toluidina, 91 mM ácido Láctico; e) 200 mM m-toluidina, 120 mM ácido Láctico. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4 y 5) magnesio/ manganeso; 6) aluminio.

Por lo tanto, en una primera instancia, se intentaron preparar soluciones 100 mM , 150 mM y 200 mM (según corresponda) de cada una de las aminas antedichas, adicionando el volumen necesario de cada una de ellas a un vaso de precipitados con agua miliQ y 5 %v/v (composición final) de metanol. Para facilitar la disolución se sonica y luego se adiciona el ácido láctico desde pipeta hasta alcanzar el pH deseado, monitoreándolo con un pHmetro.

El volumen requerido para una dada concentración final de un componente líquido para 25,0 ml de solución final se calcula a partir de:

$$V(\mu l) = \frac{C(mM)25 M(g/ml)}{\rho(ml/g)}$$

En el caso de un componente sólido, la masa requerida para el mismo volumen final que antes está dada por:

$$m(mg) = 25 C(mM) M(g/mol) 10^{-3}$$

Con V volumen, C concentración, M peso molecular, ρ densidad y m masa, todo en las unidades indicadas entre paréntesis.

	Estado	PM (g/mol)	ρ (g/ml)
m-toluidina	líquido	107,17	0,984
p-toluidina	sólido	107,17	0,998
o-toluidina	líquido	107,17	0,9619
Ác. láctico	líquido	90,08	1,357

$V_{\text{final}}=25\text{ml}$	C(mM)	V(μ l)	Ác. láct (mM)	$V_{\text{ác láct}}(\mu$ l)	pH
m-toluidina	100	272,3	58	96,3	*
	150	408,4	91	151,0	*
	200	544,6	120	199,1	*
o-toluidina	150	402,7	60	99,6	*
	200	536,9	80	132,8	*

$V_{\text{final}}=25\text{ml}$	C(mM)	m(mg)	Ác. láct (mM)	$V_{\text{ác láct}}(\mu$ l)	pH
p-toluidina	100	267,93	83	137,7	4,73
	150	401,89	125	207,4	*
	200	535,85	165	273,8	*

Tabla 3: Preparación de 25,0 ml de BGE de p-toluidina, m-toluidina y o-toluidina. El volumen de ácido láctico es estimativo, ya que se utilizó para ajustar el pH, sin embargo las diferencias en estos no son significativas. El pH fue medido con un electrodo de vidrio durante el agregado del ácido. * insolubles.

Se encontró en la práctica que la o-toluidina y m-toluidina agregadas tal como es habitual para las aminas, sobre la solución con una cierta cantidad de ácido que en este caso láctico e incluso luego habiendo agregado también el modificador orgánico (c.s.p. 5% v/v de metanol), forman una fase inmiscible que no se logra dispersar por sonicación ni por otros medios mecánicos. En el caso de p-toluidina también se hallaron problemas de solubilidad pero para concentraciones mayores a 100 mM, por lo que sólo se pudo ensayar el uso de p-toluidina a dicha concentración.

Las primeras medidas experimentales se realizaron entonces con un BGE compuesto por p-toluidina 100 mM con ácido láctico como complejante y compuesto buffer, a pH 4,7 y con metanol 5 %v/v. Utilizando un patrón de 4 analitos: potasio, sodio, calcio y magnesio de 10 mg/l en cada uno de ellos. Los picos fueron identificados primeramente a partir de la predicción teórica simulada por software.

En esta primera instancia no se trabajó con una muestra sintética que involucrara más analitos a fin de realizar una primera evaluación sencilla antes de proceder al análisis de muestras más complejas o reales, por ejemplo: se debe hallar la inyección apropiada, encontrar condiciones de estabilidad de la línea de base según la composición, ensayos preliminares de las condiciones de acondicionamiento, etc.

Regresar al índice

4.4.2.- Optimización de la inyección

Se realizaron inyecciones a distintas combinaciones de presiones de entre 10 y 50 mbar y tiempos entre 5 y 10 segundos.

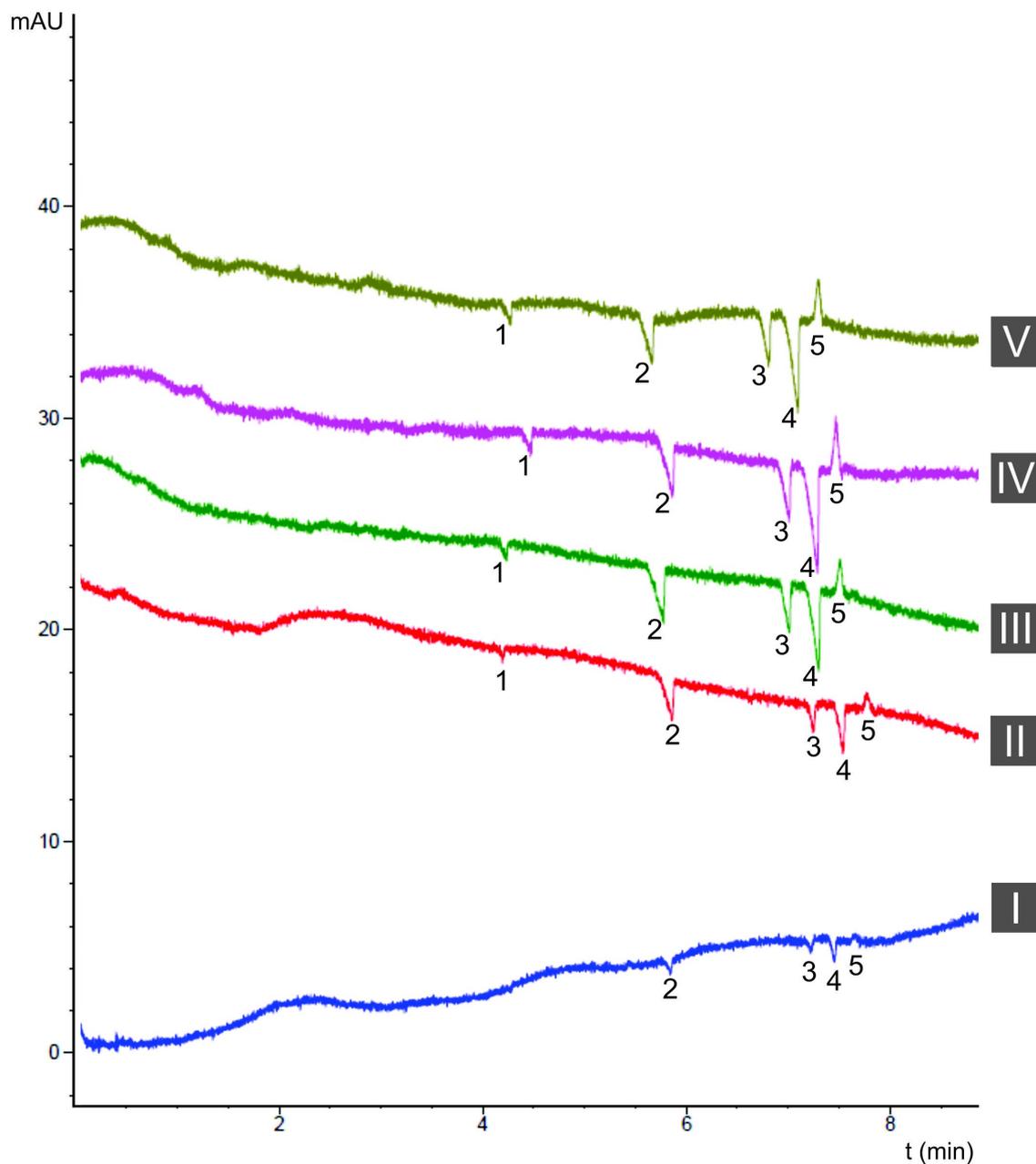


Fig. 13: Presión y tiempo de inyección: I) 10 mbar por 5 s; II) 10 mbar por 10 s; III) 20 mbar por 10 s; IV) 30 mbar por 10 s; V) 50 mbar por 5 s. BGE p-toluidina 100 mM; ácido láctico pH=4,7; metanol 5 %v/v; V=10 kV; L=50 cm; l=41 cm; id=75 μ m; λ =254 nm. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4) magnesio; 5) pico de sistema.

mbar X s	Señal/Ruido
10 X 5	0,00
10 X 10	3,20
20 X 10	3,63
30 X 10	4,29
50 X 5	3,75

Tabla 4: Relación señal/ ruido para el potasio en las diferentes inyecciones

Cuando se aplican presiones de 10 mbar no se obtuvo una respuesta aceptable para el potasio (pico 1). En el caso del opuesto en relación a las cantidades inyectadas, cuando se inyectó a 50 mbar por 5 segundos se observó falta de reproducibilidad. Estas limitaciones se deben a cuestiones meramente instrumentales. Dados estos resultados y esta última consideración, se optó por trabajar con inyecciones de 30 mbar por 10 segundos, ya que genera la mejor relación señal-ruido y es reproducible.

Regresar al índice

4.4.3.- Optimización de la composición en solvente orgánico

Para evaluar las posibles mejoras por la incorporación del solvente orgánico en nuestro sistema se procedió a preparar dos grupos de BGE con la misma composición base de p-toluidina optimizada anteriormente, un grupo conteniendo distintas composiciones de metanol y otro con distintas composiciones de acetonitrilo.

Se ensayaron 3 concentraciones de metanol (incluyendo la de 5 %v/v ya ensayada) y 2 de acetonitrilo, todas por duplicado. Así mismo, se preparó un BGE sin solvente orgánico.

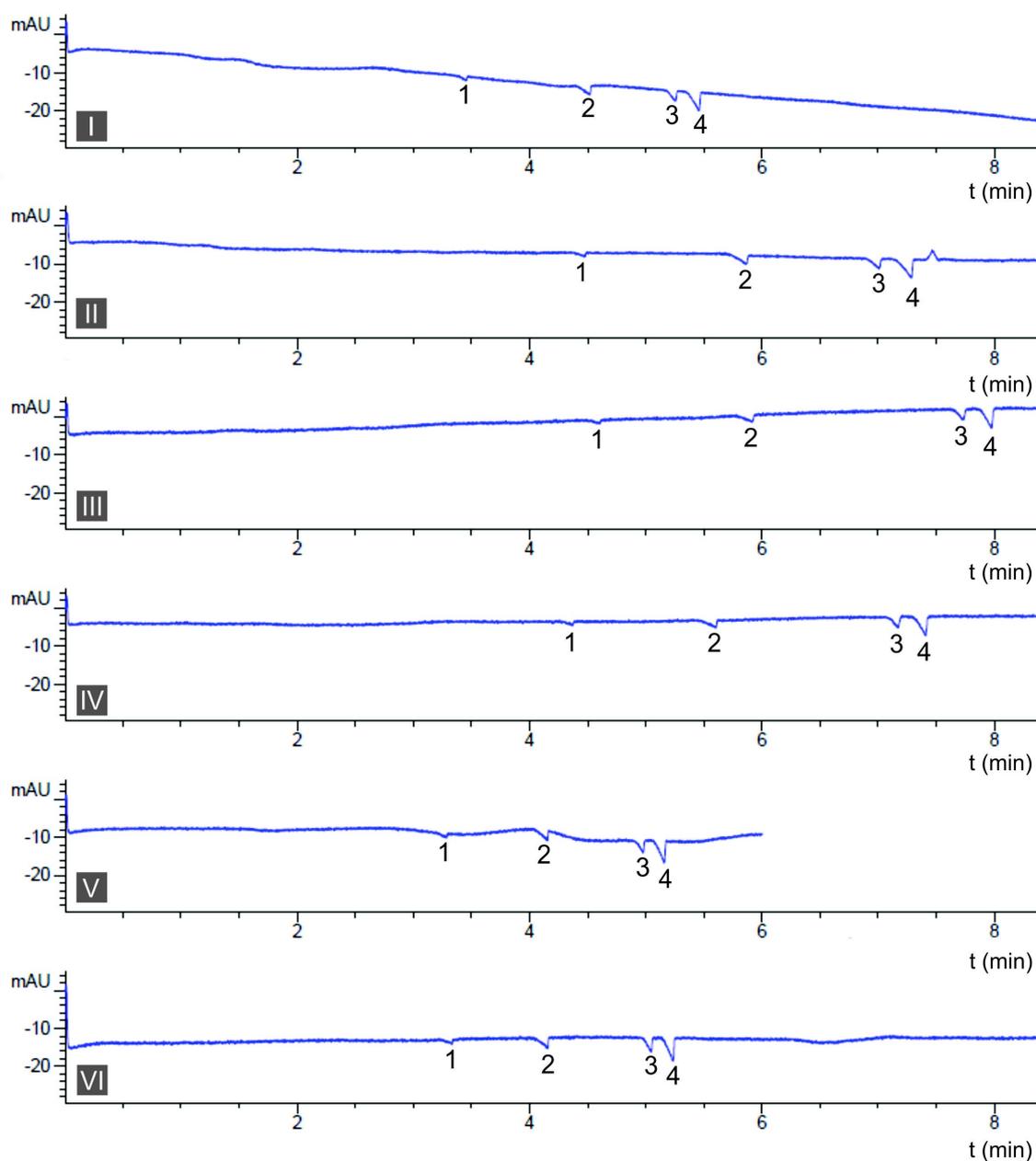


Fig. 14: BGE p-toluidina 100mM y ácido láctico pH=4,7; V=10 kV; L=50 cm; l=41 cm; id=75 μ m; λ =254 nm; Inyección 30 mbar, 10 segundos. I) Sin fase orgánica; II) 5% metanol; III) 15% metanol; IV) 25% metanol; V) 15% acetonitrilo; VI) 25% acetonitrilo. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4) magnesio.

Para comparar cada una de las posibilidades, se analizaron los tiempos totales de análisis y la dispersión del magnesio (ancho en la base), la cual resulta de interés ya que se encuentra en la misma zona de migración en la que se hallaría el manganeso por lo que debe ser la mínima posible.

%svte orgánico	W_b (min)	t_{total} (min)
0 %	0,23	5,58
5 % metanol	0,14	7,31
15 % metanol	0,15	8,00
25 % metanol	0,15	7,44
15 % acetonitrilo	0,10	5,16
25 % acetonitrilo	0,14	5,26

Tabla 5: Dispersión del magnesio y tiempos totales de análisis para diferentes composiciones de fase orgánica en el BGE.

El análisis sin fase orgánica presenta una dispersión mayor y tiempos de análisis aceptables, aunque se obtiene una línea de base con una marcada deriva, lo cual dificulta la medición. En el caso de acetonitrilo 15 % no se obtiene una línea de base estable. En el resto de los casos los resultados obtenidos son similares, incluso comparables a los obtenidos en los ensayos primeros con metanol 5 %, y aunque puede observarse que los tiempos totales de análisis varían, estos no son tan distintos unos de otros; pudiendo considerarse como situaciones casi equivalentes. Por otro lado, se observa una mayor adsorción de productos de la descomposición oxidativa del BGE sobre el electrodo al utilizar acetonitrilo. A partir de estos resultados es que en adelante optaremos por preparar soluciones BGE con la menor composición de metanol, ya que composiciones mayores no mejoran la eficiencia. La composición de solvente orgánico será entonces metanol 5 %v/v.

Regresar al índice

4.4.4.- Evaluación del BGE con *p*-toluidina

Si ahora se utiliza un patrón con todos los analitos que pueden estar presentes en las muestras de interés, esto es potasio, sodio, calcio, magnesio, manganeso, aluminio y hierro, a concentraciones mayores a las ensayadas previamente (ahora serán 25 mg/l) a fin de que sean más similares a las soluciones reales, se puede evaluar el BGE utilizando las mejores condiciones halladas en los experimentos anteriores.

Para la preparación de esta nueva muestra sintética se utilizó como solvente el mismo BGE en el que se realizará el análisis, primeramente debido a la alta fuerza iónica que presenta esta muestra y su disolución en agua no resulta posible en las concentraciones deseadas, además se evita inyectar una fase tan distinta a la de corrida.

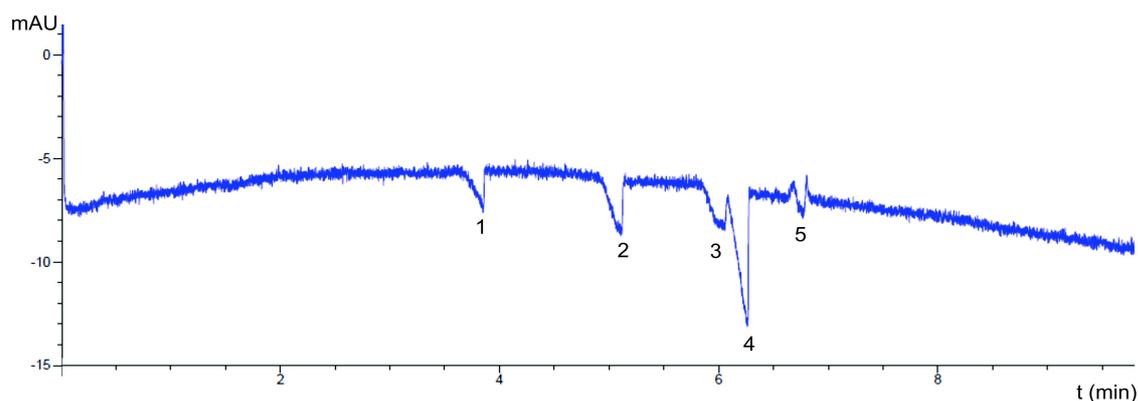


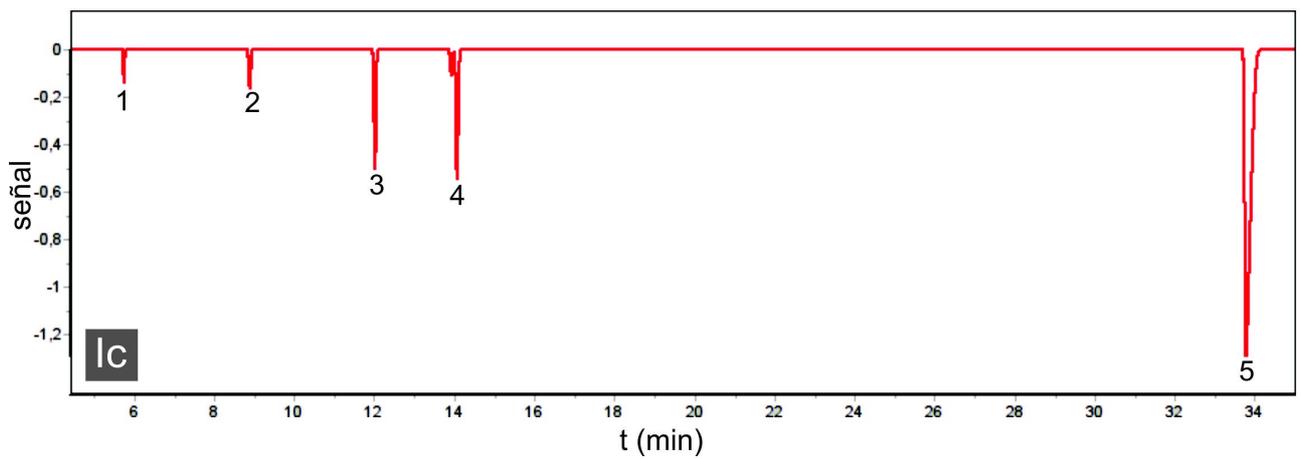
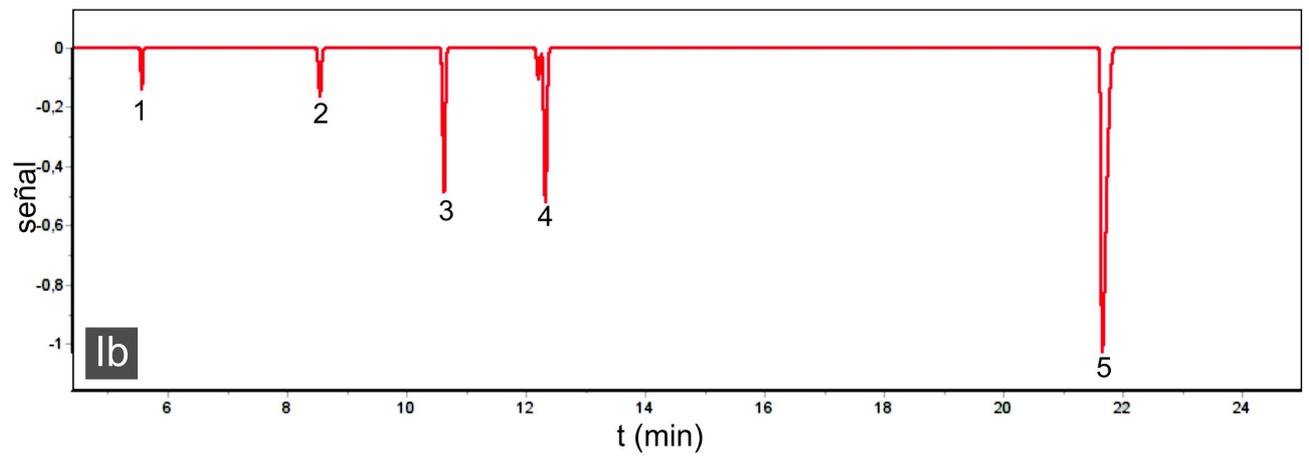
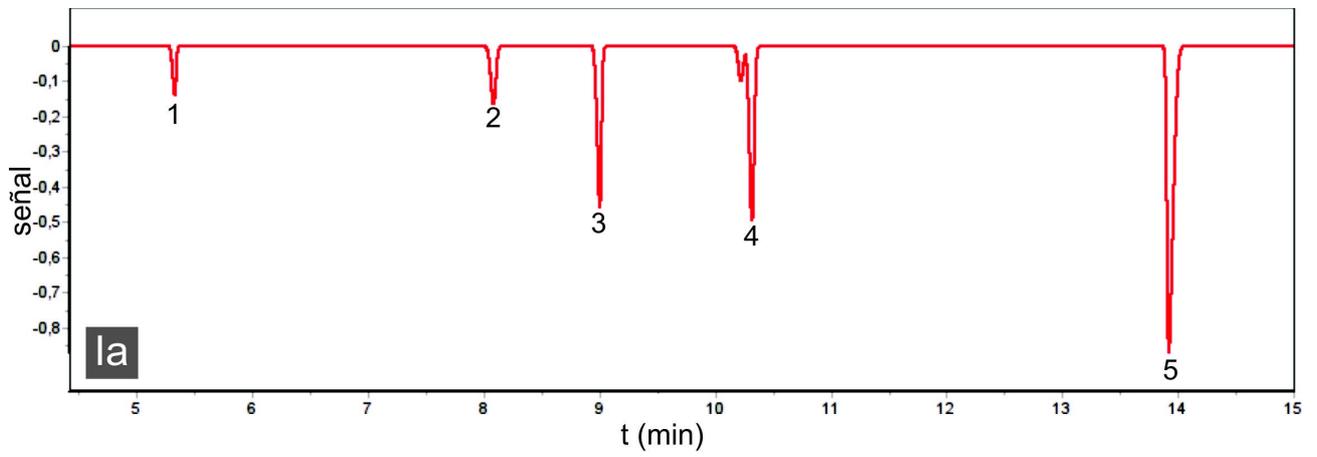
Fig. 15: BGE p-toluidina 100 mM, ácido láctico pH=4,7, metanol 5 %; V=10 kV; L=50 cm; l=41 cm; id= 75 μ m; λ =254 nm; Inyección 30 mbar, 10 segundos. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4) magnesio/ manganeso 5) pico de sistema.

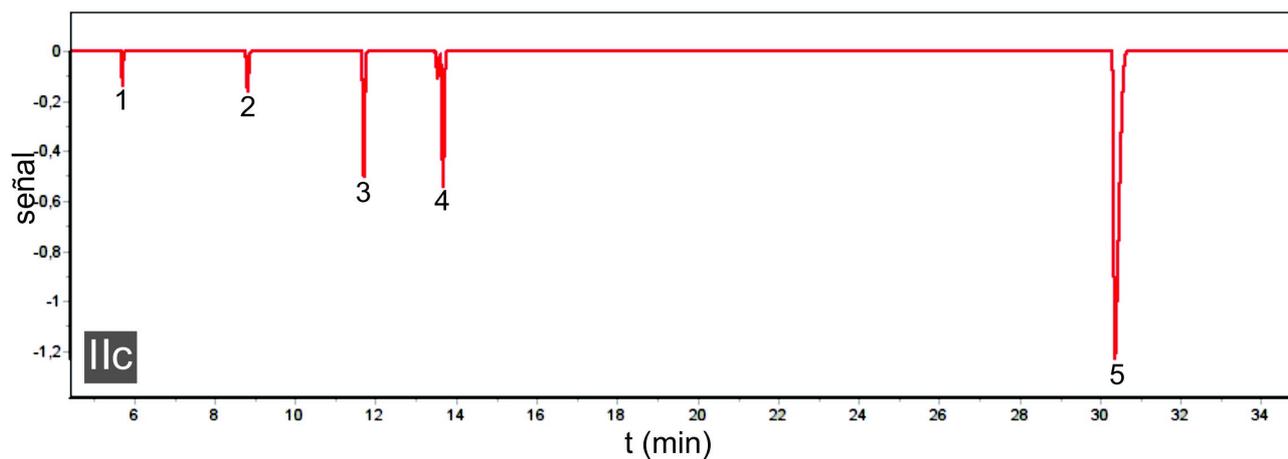
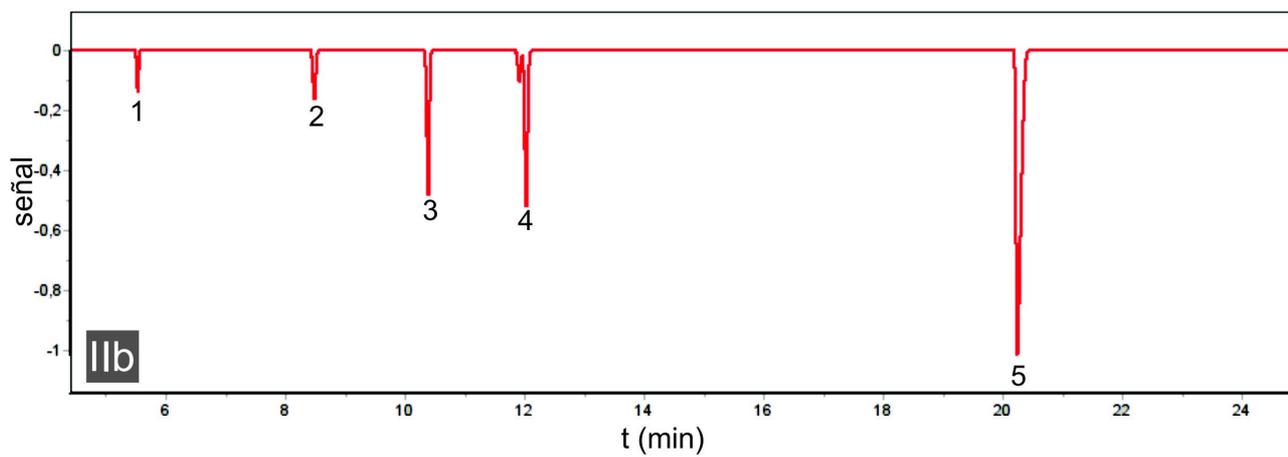
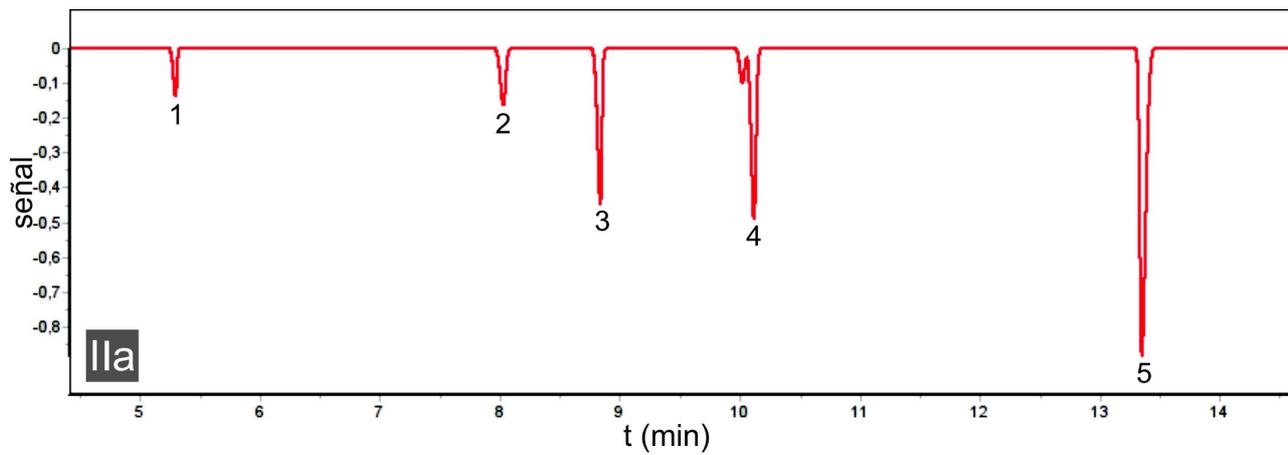
Se observa que al incorporarse los analitos faltantes, el sistema no presenta la misma estabilidad. La zona más conflictiva es la correspondiente al calcio/ magnesio/ manganeso ya que no se resuelve completamente. Además, los tiempos de migración han variado respecto a los observados anteriormente.

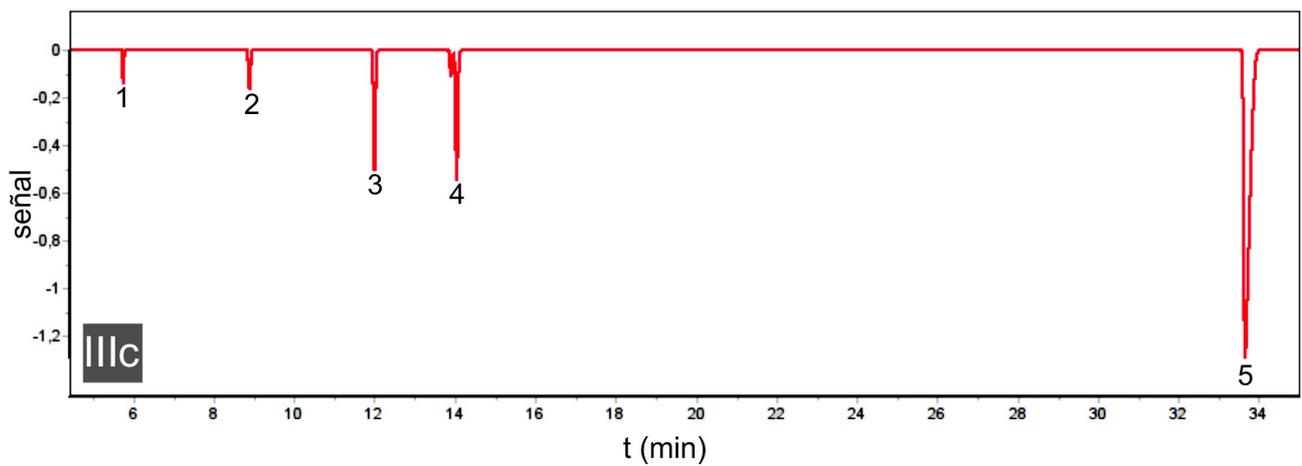
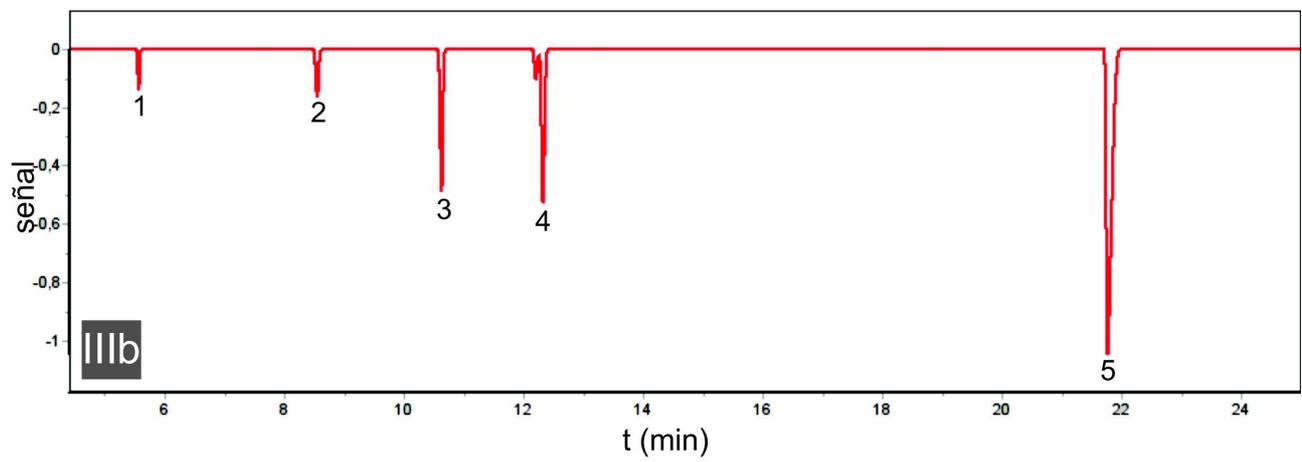
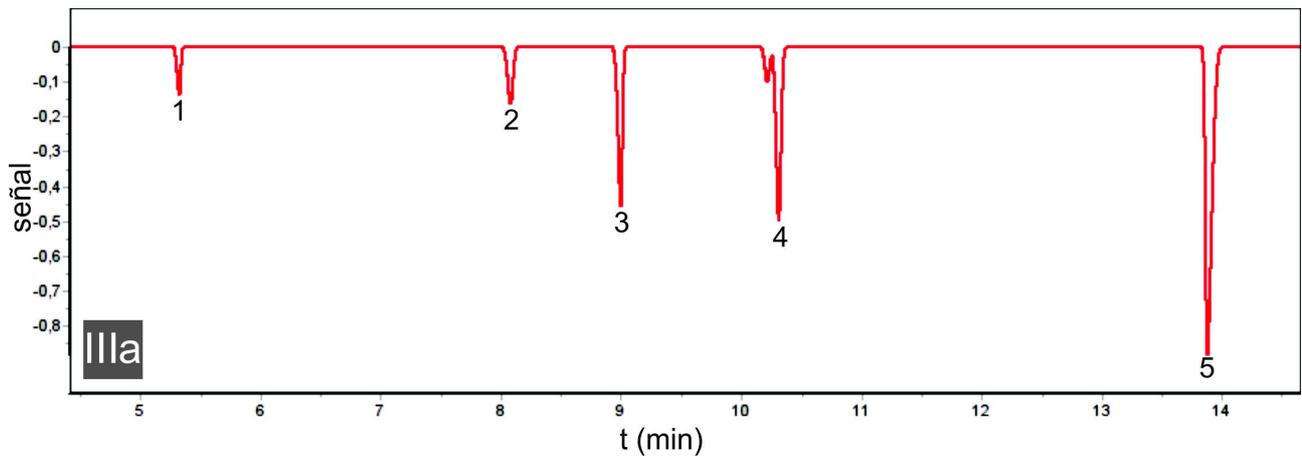
Regresar al índice

4.4.5.- Preparación de BGE con piridinas como cromóforo

A continuación se muestran los electroferogramas simulados utilizando 2-, 3- y 4-metilpiridina y 2,4,6-trimetilpiridina en diferentes concentraciones con ácido láctico como complejante. Dado que ya quedó demostrado con el uso de la p-toluidina que a mayores fuerzas iónicas se mejoraría la separación, se procedió a utilizar concentraciones de las especies absorbentes iguales o mayores a la ensayada anteriormente. Por lo tanto se probaron concentraciones de 100, 200 y 300 mM para cada caso, simulándose con iguales parámetros que la Fig. 11.







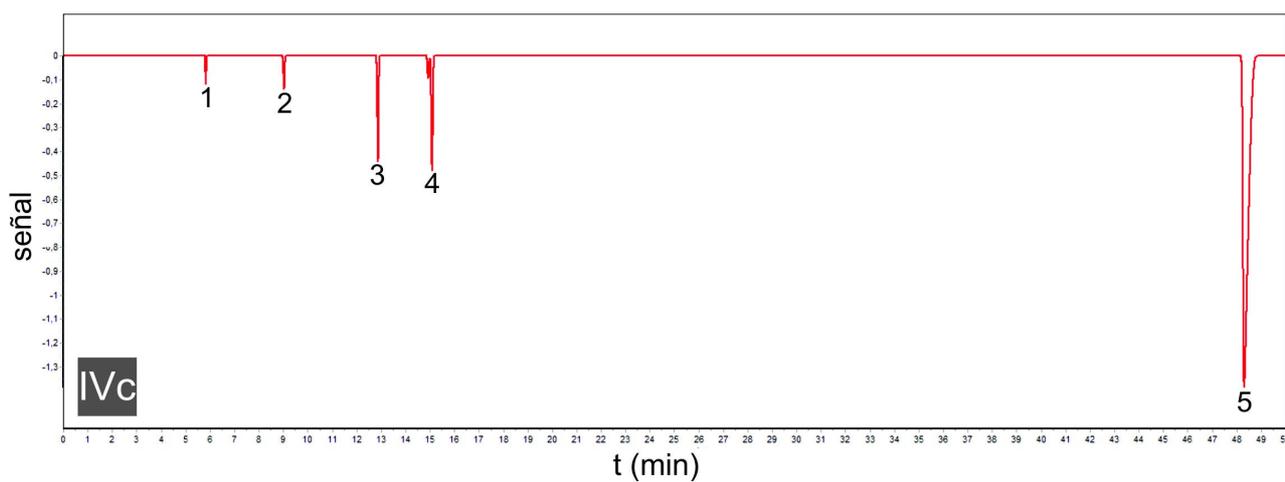
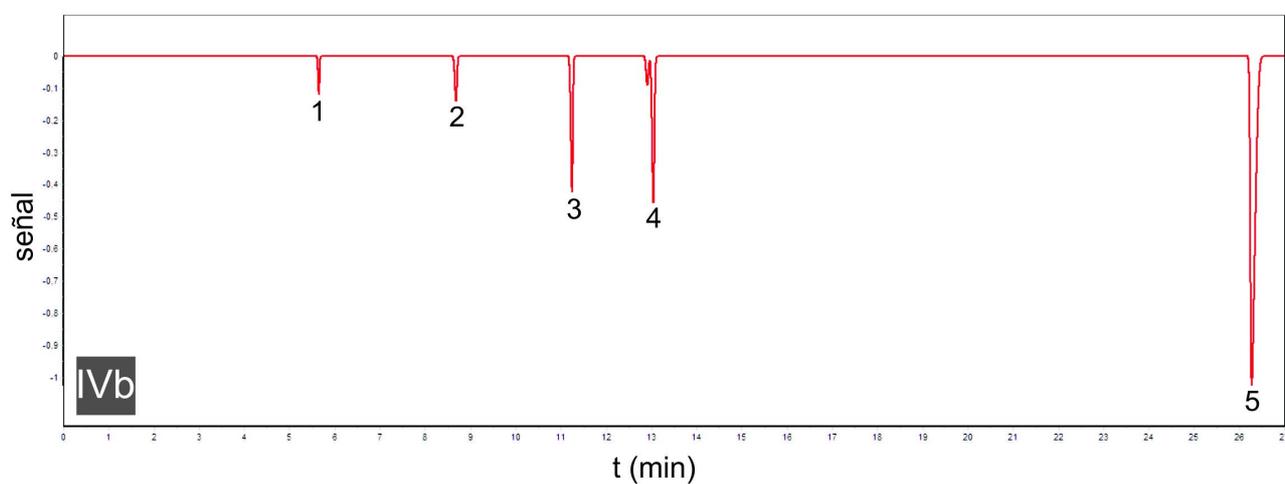
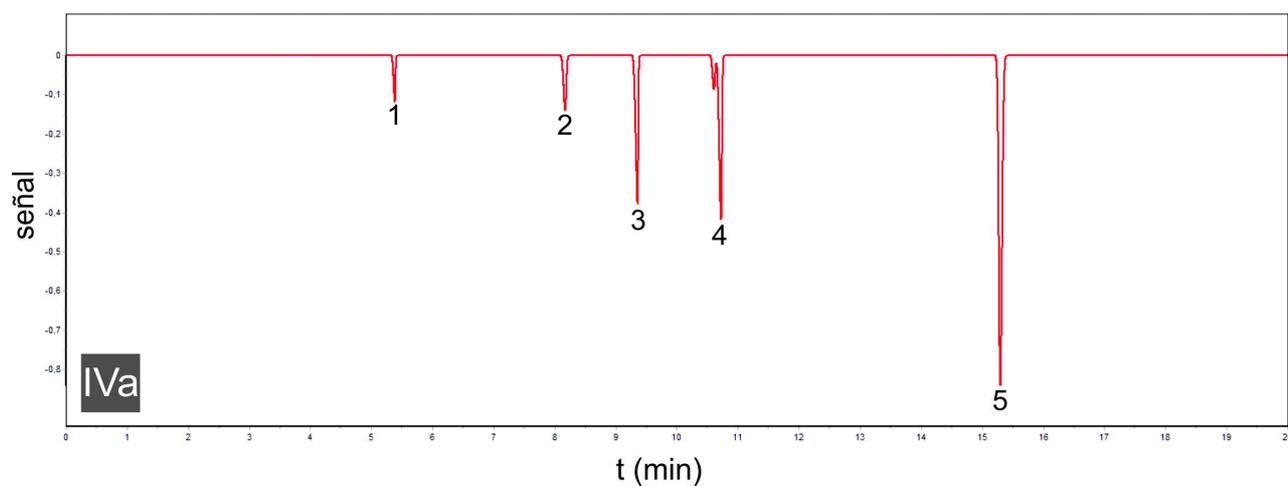


Fig. 16: Simulación en peakmaster: I) 2-metilpiridina a) 100 mM, b) 200 mM, c) 300 mM; II) 3-metilpiridina a) 100 mM, b) 200 mM, c) 300 mM; III) 4-metilpiridina a) 100 mM, b) 200 mM, c) 300 mM; IV) 2,4,6-trimetilpiridina a) 100 mM, b) 200 mM, c) 300 mM. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4) manganeso/ magnesio; 5) aluminio.

En todos los casos a medida que se incrementa la concentración del cromóforo, el software estima mejoras en la resolución, aunque ésta ya es aceptable desde la menor de las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, se prepararon soluciones 100, 200 y 300 mM de cada una de estas piridinas, adicionando el volumen necesario de cada una de ellas a un vaso de precipitados con agua miliQ y 5 %V/V (concentración final) de metanol. Para facilitar la disolución se sonica y luego se adiciona el ácido láctico desde pipeta hasta alcanzar el pH deseado, monitoreándolo con un pHmetro.

	Estado	PM (g/mol)	ρ (g/ml)
2-metilpiridina	líquido	93,13	0,943
3-metilpiridina	líquido	93,13	0,957
4-metilpiridina	líquido	93,13	0,957
2,4,6-trimetilpiridina	líquido	121,18	0,917
Ác. láctico	líquido	90,08	1,357

$V_{\text{final}}=25\text{ml}$	C(mM)	V(μl)	Ác. láct (mM)	$V_{\text{ác láct}} (\mu\text{l})$	pH
2-metilpiridina	100	246,9	108	179,2	4,5
	200	493,8	215	356,8	4,6
	300	740,7	325	539,4	4,7
3-metilpiridina	100	243,3	99	164,3	4,7
	200	486,6	199	330,2	4,7
	300	729,9	300	497,9	4,7
4-metilpiridina	100	243,3	107	177,6	4,7
	200	486,6	215	356,8	4,7
	300	729,9	320	531,1	4,7
2,4,6-trimetilpiridina	100	330,4	110	182,5	4,5
	200	660,7	220	365,1	4,5
	300	991,1	330	547,6	-

Tabla 6: Preparación de 25,0 ml de BGE de 2-metilpiridina, 3-metilpiridina, 4-metilpiridina y 2,4,6-trimetilpiridina. El volumen de ácido láctico es estimativo, ya que se utilizó para ajustar el pH, sin embargo las diferencias en estos no son significativas. El pH fue medido con un electrodo de vidrio durante el agregado del ácido.

Se encontró que la 2,4,6-trimetilpiridina en concentraciones superiores a 200 mM forma una fase inmiscible que no se logra dispersar por sonicación u otros medios mecánicos, persistiendo incluso luego del agregado de ácido láctico. Por lo que esta piridina a tales concentraciones fue descartada.

Regresar al índice

4.4.6.- Evaluación del BGE con piridinas y ajuste del potencial aplicado

Dado que las condiciones instrumentales, por ejemplo tiempo de inyección o acondicionamiento, ya han sido estudiadas y es lógico esperar resultados iguales o muy simila-

res, se procedió a utilizar el patrón completo de 7 analitos: potasio, sodio, calcio, magnesio, manganeso, aluminio y hierro, 25 mg/l de cada uno.

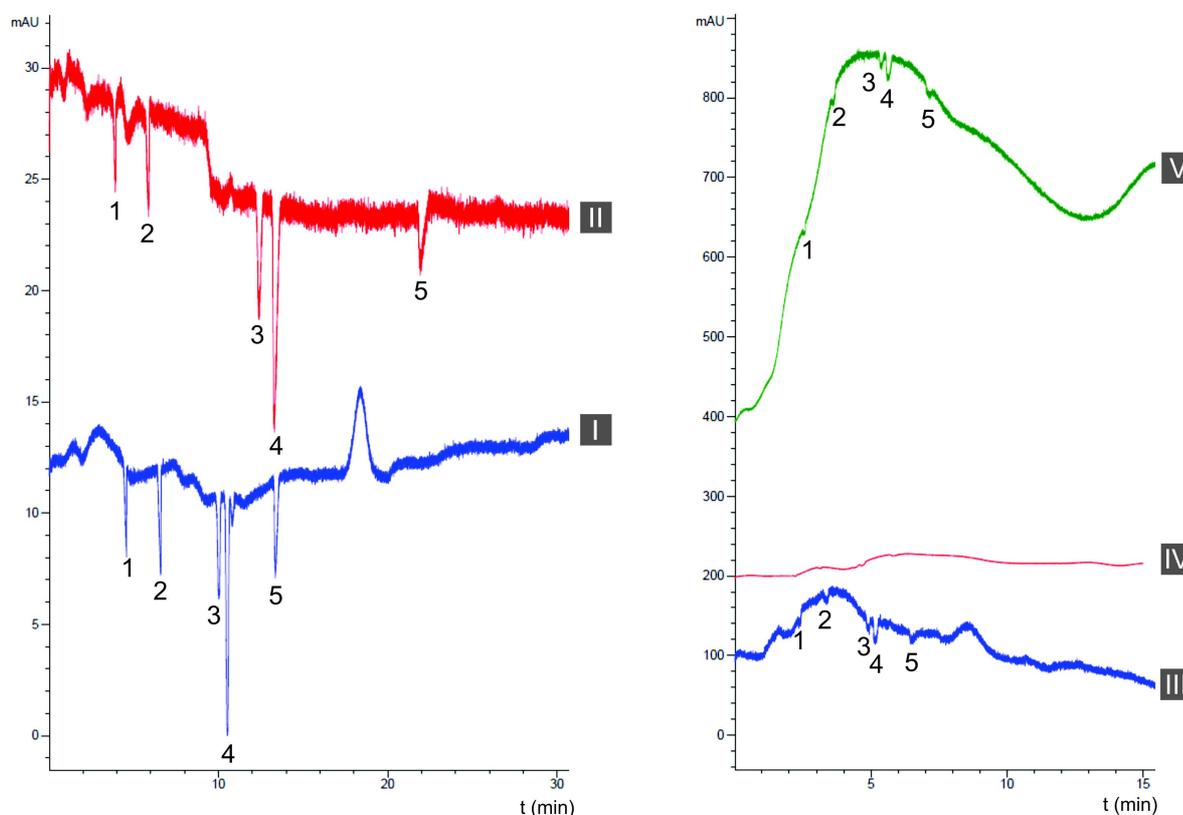


Fig. 17: I) 2,4,6-trimetilpiridina 100 mM y ácido láctico pH=4,5; $\lambda=230$ nm; V=10 kV; II) 2,4,6-trimetilpiridina 200 mM y ácido láctico pH=4,5; $\lambda=230$ nm; V=7 kV; III) 2-metilpiridina 100 mM y ácido láctico pH=4,5; $\lambda=265$ nm; V=7 kV; IV) 3-metilpiridina 100 mM y ácido láctico pH=4,7; $\lambda=270$ nm; V=7 kV; V) 4-metilpiridina 100 mM y ácido láctico pH=4,7; $\lambda=235$ nm; V=7 kV. L=39,6 cm; l=31,1 cm; id=75 μ m. Inyección 30 mbar, 10 segundos. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio; 4) magnesio/ manganeso, 5) pico de sistema.

Los voltajes aplicados no pudieron ser de 10 kV en todos los casos debido a la elevada corriente generada (limitación instrumental). No obstante en estos electroferogramas puede observarse que las metilpiridinas (2-, 3- y 4-metilpiridina) no presentan una línea de base estable, lo que afecta sensiblemente al análisis. Esta misma situación se corroboró a las diferentes concentraciones e incluso al variar el voltaje de corrida, por lo que serán descartadas como posibles constituyentes del BGE.

Por otro lado, la 2,4,6-trimetilpiridina constituye un cromóforo potencialmente útil. En principio se pueden observar 4 de los 5 analitos esperados, no siendo resueltos el magnesio y el manganeso. Puede observarse que en el caso de concentración 200 mM se mejora la resolución del calcio y el magnesio, pero a su vez aumenta el ruido y la inestabilidad

de la línea de base; y al realizar replicados se ha observado una muy baja reproducibilidad, presentando cambios repentinos en la línea de base de manera aleatoria.

La estabilidad de la línea de base puede mejorar al disminuir el potencial aplicado. Por lo tanto se ensayaron los BGE compuestos por 2,4,6-trimetilpiridina 100 y 200 mM en iguales condiciones que antes pero aplicando 5 kV.

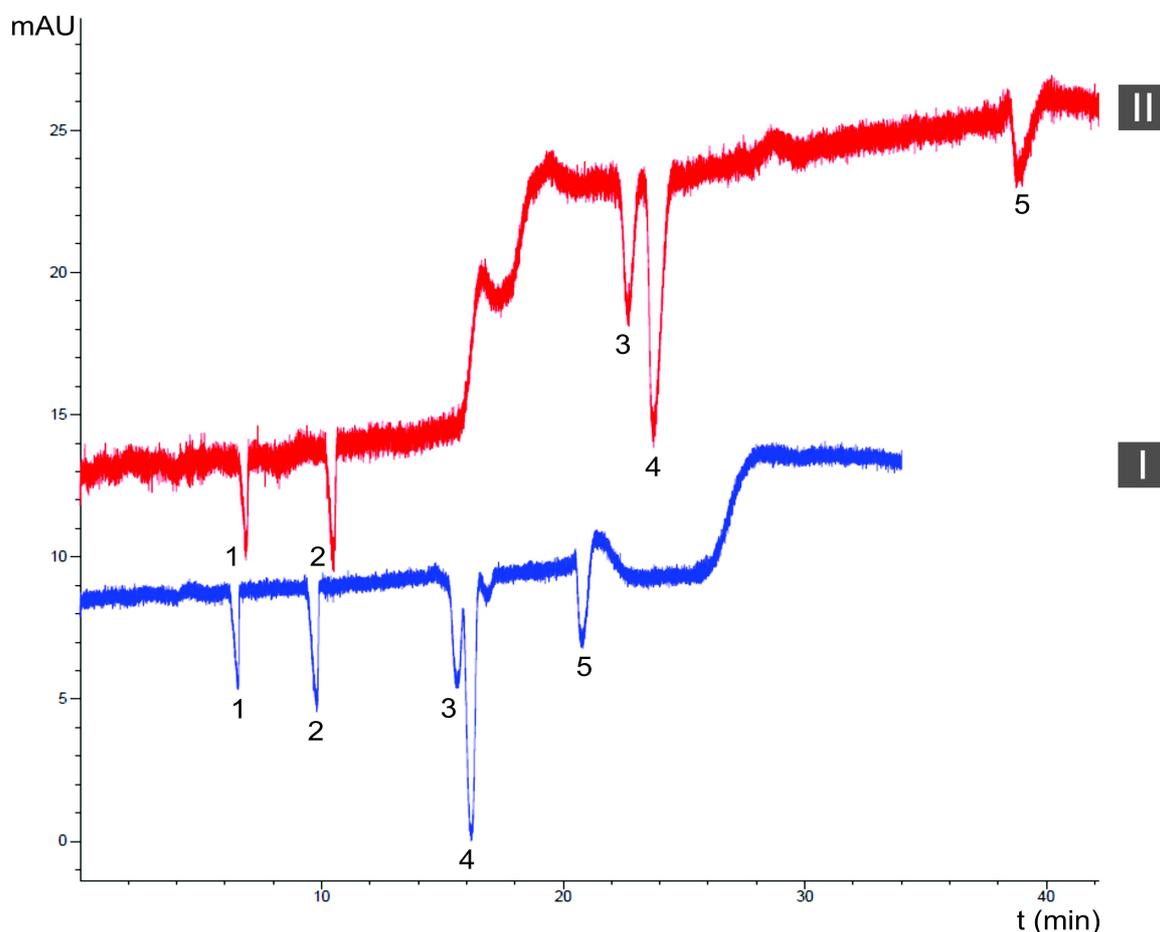


Fig. 18: I) 2,4,6-trimetilpiridina 100 mM; II) 2,4,6-trimetilpiridina 200 mM. Condiciones e identificación de picos iguales a la Fig. 17, excepto $V=5$ kV.

Puede observarse que, si bien se tiene una menor resolución entre el calcio y el magnesio, en el caso de concentración 100 mM la línea de base resulta más estable. A su vez se ha observado que la reproducibilidad es mayor a concentración 100 mM que a 200 mM. Por su parte la resolución entre calcio y magnesio ha disminuido pero aún serían cuantificables.

Regresar al índice

4.4.7.- Variación del diámetro del capilar

Seleccionando la 2,4,6-trimetilpiridina como cromóforo en concentración 100 mM con ácido láctico como complejante a pH 4,5 se realizó el mismo ensayo utilizando ahora un capilar de longitudes similares pero de 50 μm de diámetro interno.

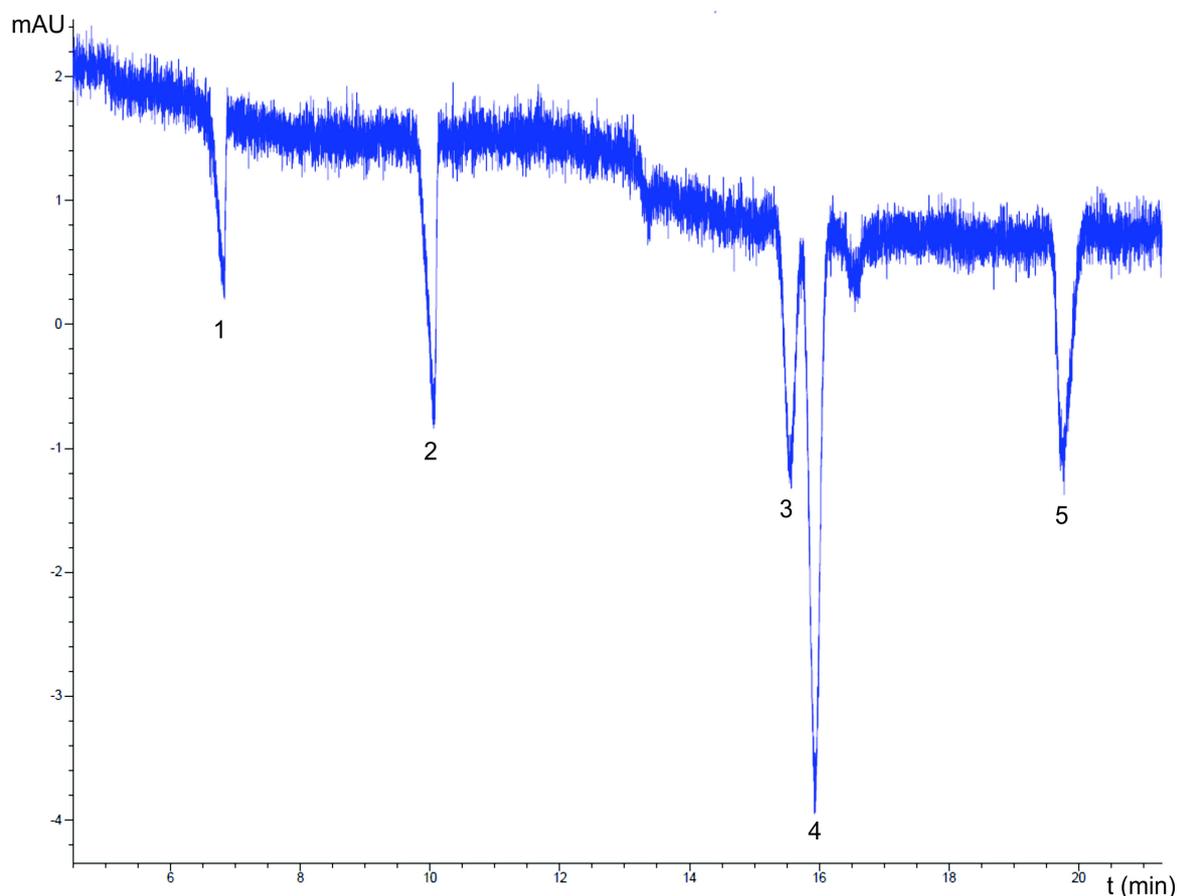


Fig. 19: 2,4,6-trimetilpiridina 100 mM con ácido láctico pH 4,5 y metanol 5 %. Condiciones e identificación de picos iguales a la Fig. 18, excepto $\text{id} = 50 \mu\text{m}$.

id	50 μm	75 μm
Señal/Ruido _K	19,20	10,00
t_{Ca} (min)	15,57	15,60
t_{Mg} (min)	15,94	16,20
w_{bCa} (min)	0,16	0,57
w_{bMg} (min)	0,39	0,65
$\text{Rs}_{\text{Ca-Mg}}$	1,35	0,98

Tabla 7: Relación señal-ruido del potasio y resolución del par calcio-magnesio correspondientes a la Fig. 18-I (75 μm) y la Fig. 18 (50 μm).

Puede observarse ahora que la línea de base es más estable e incluso ha aumentado la resolución entre calcio y magnesio, y ha mejorado la relación señal/ruido marcadamente; por lo que la disminución del diámetro interno del capilar sería favorable si se utiliza

este BGE. Es posible que para diámetros mayores, al generarse corrientes mayores y, por ende mayor generación de calor, se forme un perfil de temperaturas y viscosidades más pronunciado, afectando la resolución.

Regresar al índice

4.5.- Tratamiento y ensayos con muestra real

Dado que tanto en el caso del BGE preparado con p-toluidina 100 mM como en el preparado con 2,4,6-trimetilpiridina 100 mM se obtuvieron resultados similares y, hasta cierto punto, aceptables, se deberán ensayar sobre el análisis de una muestra real.

Como la muestra se encuentra disuelta en el medio ácido, primeramente se deberá secar y posteriormente suspender, disolver y, de ser necesario, diluir en el BGE a utilizar. Para ello se colocaron 5,00 ml de la solución ácida en una cápsula de porcelana y se calentó en platina bajo campana hasta sequedad. Luego se disolvió el sólido obtenido en 5,00ml del BGE constituido por p-toluidina 100 mM, metanol 5 %V/V y ácido láctico pH 4,7. Una porción fue separada para su análisis, otra fue diluida 50 veces en BGE y una tercera se diluyó 100 veces, a modo exploratorio. Estas muestras tratadas fueron inyectadas y corridas en las mismas condiciones que las halladas con los patrones.

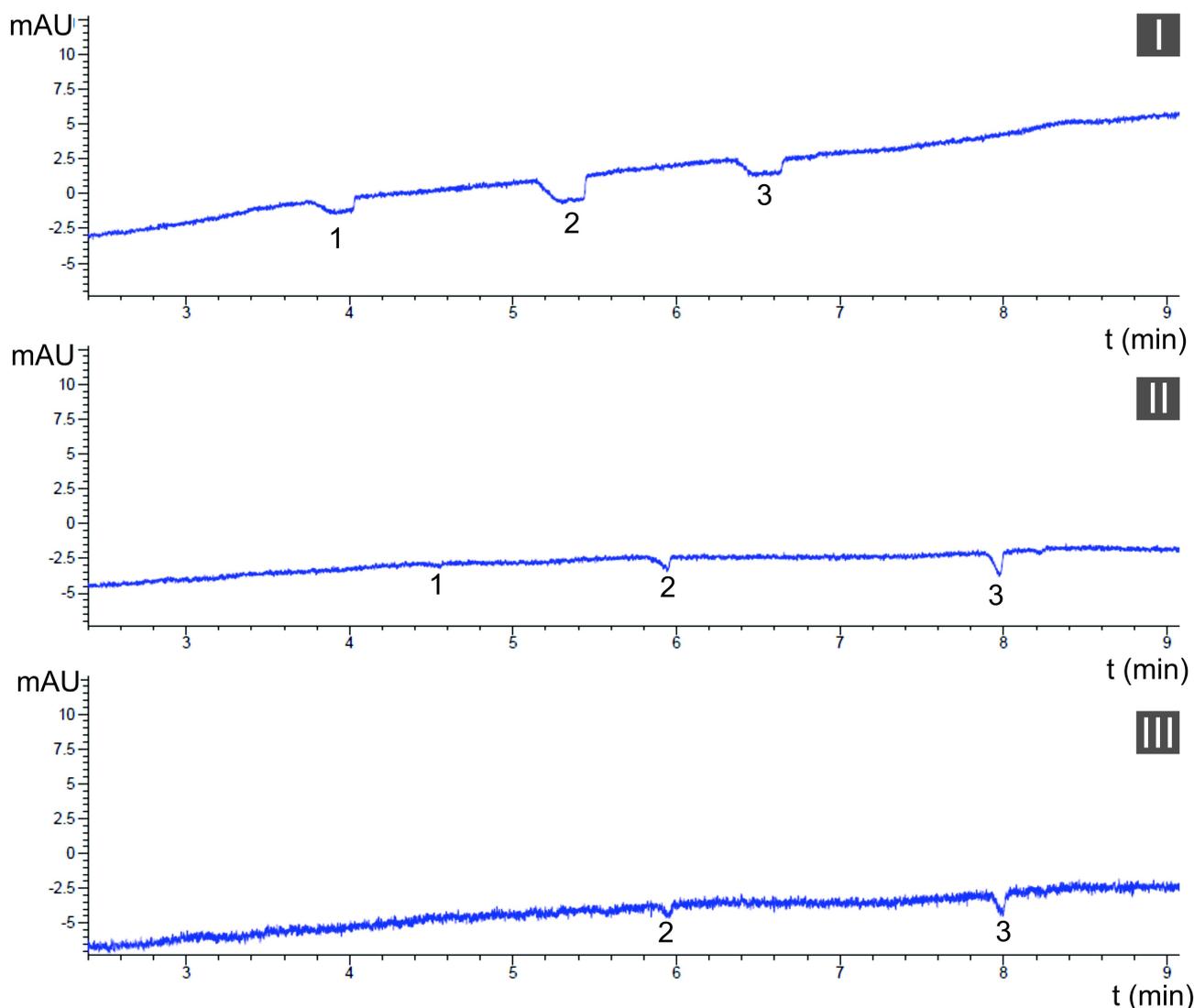


Fig. 20: BGE p-toluidina 100 mM y ácido láctico pH=4,7; V=10 kV; L=50 cm; l=41 cm; id=75 μ m; λ =254 nm; Inyección 30 mbar, 10 segundos. I) muestra en BGE sin diluir; II) muestra en BGE diluida 1:50; III) muestra en BGE diluida 1:100. 1) potasio; 2) sodio; 3) calcio.

En el caso de la muestra sin diluir se puede observar que se tienen tres picos bien definidos pero claramente sobrecargados (muy dispersos), por lo que se debe realizar una dilución. En el caso de la dilución 1:50 se ve que las intensidades de los picos no son muy buenas y en lugar de haber tres picos ahora sólo se observan dos, por lo que probablemente esta dilución sea muy elevada para esta muestra, por lo tanto ocurre lo mismo con la dilución 1:100. En ninguno de los dos casos es posible realizar la integración.

A pesar de que estas diluciones no son apropiadas, dada la baja respuesta obtenida y comparándolo con las pruebas sobre patrones realizadas anteriormente, puede asumirse que una menor dilución no presentaría inconvenientes, así se verían los tres analitos que se observaban en la muestra en BGE sin diluir y sería posible integrar los picos obtenidos a fin de cuantificarlos.

Por otro lado, no fue posible ensayar la muestra utilizando el BGE compuesto por 2,4,6-trimetilpiridina 100 mM debido a limitaciones instrumentales ajenas al método en cuestión. Sin embargo fue posible pretratar la muestra de la misma forma que se realizó con el otro BGE hasta el punto de obtener una solución en este medio que a priori sería aceptable para el ensayo electroforético.

Regresar al índice

4.6.- Anomalías aparentes del sistema

4.6.1.- Picos de sistema

Hasta aquí se ha podido observar en todos los electroferogramas un pico hacia el final que no ha sido tenido en cuenta ni explicado. Para poder explicarlo debidamente, se debe considerar la existencia de picos de sistema (o autopicos).

En principio un sistema presentará tantos picos de sistema como constituyentes tenga el BGE, por lo tanto a mayor número de constituyentes más dificultosa se vuelve la predicción del sistema y mayor probabilidad de que exista una interferencia en el análisis. Esto último respalda aún más la premisa de mantener el BGE lo más simple posible.

Al menos uno de los picos de sistema es muy cercano a cero, habitualmente llamado zona de inyección. Esta zona de inyección suele ser utilizada como marcador del flujo electrosmótico, debido a que no posee movilidad electroforética. Sin embargo se debe considerar que la posición de este pico no es equivalente a la de un marcador de flujo neutro, pudiendo ser considerablemente distinto.

Si un BGE es considerablemente ácido o alcalino, o si contiene múltiples co-iones o un constituyente multivalente, se encontrarán uno o varios picos muy alejados de las posiciones de los mencionados anteriormente, es decir que pueden interferir seriamente en el análisis. En este caso el problema se divide en dos situaciones posibles [19]:

- 1) Si no existe un analito con una movilidad igual a la del sistema, el BGE muestra una zona denominada de sistema moviéndose con la velocidad electroforética correspondiente a la del sistema propiamente dicho. Cuando el detector muestra una respuesta a los constituyentes del BGE (como nuestro caso de detección indirecta), puede obtenerse un pico fácilmente confundible con un analito, sin embargo se trata de un falso pico o de sistema.
- 2) Si existe un analito cuya movilidad es igual a la del sistema, se produce un efecto de resonancia. Esto causa que, en detección indirecta, se tenga una señal amplifi-

cada en el analito. Afortunadamente, las señales de resonancia son fácilmente identificables ya que presentan una forma en zigzag. De estar presentes deben descartarse del análisis ya que el analito bajo esta condición ya no es cuantificable.

En nuestro caso no se han observado picos de resonancia, el último pico que se observa no se corresponde con lo esperado para la zona de inyección y no se tiene un BGE muy ácido. Por lo tanto, para este pico debe considerarse la posibilidad de la presencia de un co-ión proveniente de una impureza en alguno de los reactivos o bien una especie comigrante que se forme a partir de un componente del BGE no considerado, introducido en la preparación como una impureza. Esta última opción pareciera ser la más apropiada, ya que este pico varía al variar la concentración de analitos y no se observa en el BGE sin muestra o si se inyecta sólo hierro o aluminio, por lo que tampoco es uno de estos analitos.

Dado que este pico se encuentra presente al trabajar tanto con cualquiera de los dos BGE desarrollados, esta impureza debe haber sido introducida a partir de componentes en común, como puede ser el ácido láctico, el agua milliQ, el metanol o alguna especie arrastrada desde los filtros de nylon.

No obstante, la explicación de estos picos de sistema no suele ser muy detallada en la literatura y no abarca todos los posibles casos, por lo tanto los mecanismos por los que ocurren son motivo de investigaciones actuales y no es posible ahondar más sobre la naturaleza de estos.

Regresar al índice

4.6.2.- Ausencia de picos de hierro y aluminio

Como se mencionara antes, existen al menos tres especies más en la muestra real que no se han observado hasta aquí, resulta entonces interesante el estudio de al menos dos de éstas, aluminio y hierro(III), ya que el manganeso puede considerarse como no resuelto del magnesio.

Si se inyecta una solución de aluminio o hierro(III) no se observan picos. Para poder explicar esto se debe considerar en qué "forma" se encuentran estos metales, cuál es la configuración (valencia y formación de especies coordinadas) que presentan en las condiciones de corrida (potencial oxidativo y pH del BGE). Esto se puede analizar a partir de los diagramas de potencial vs pH, llamados diagramas de Pourbaix, los cuales corresponden a un medio acuoso, lo cual no es el caso estricto del BGE (principalmente debido a la presencia del complejante) pero pueden servir como base a la discusión.

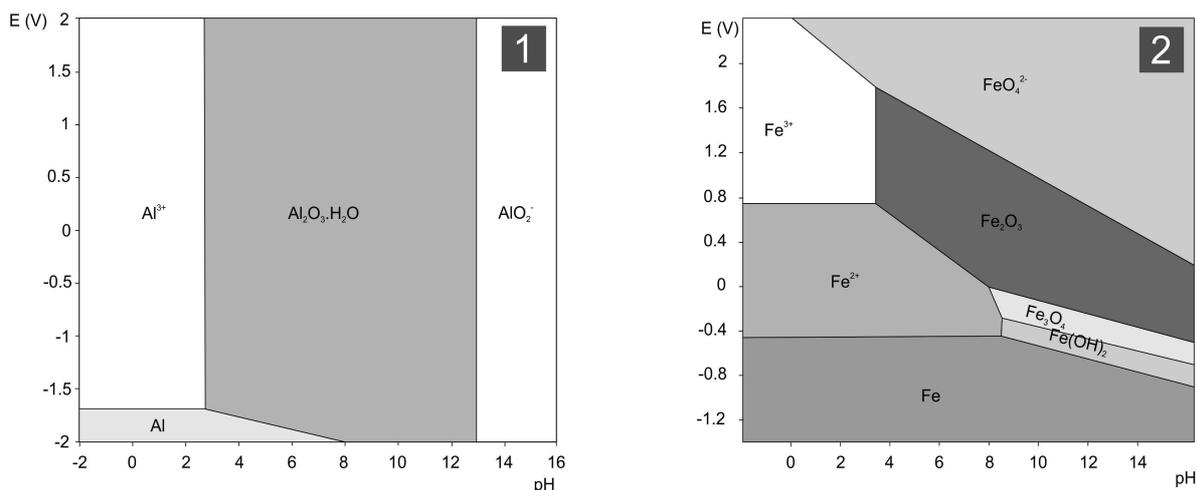


Fig. 21: Diagramas de Pourbaix. 1) Aluminio; 2) Hierro.

Puede observarse en estos gráficos que la condición de pH fijada por el BGE es superior a aquella en la que el aluminio se encuentra libre en solución como Al(III) y aún mayor a la del Fe(III), por lo que no se tendría estas especies durante el análisis.

Por otro lado, algunos autores han sugerido que la complejación del aluminio y el hierro (III) es tan lenta que podría no ser efectiva, por lo que la zona correspondiente al analito se volvería difusa, debido a las diferencias en movilidad de las distintas especies, y no se observarían en las corridas electroforéticas en que se utilice ácido láctico como complejante [22].

Se podría considerar la posibilidad de disminuir el pH hasta el punto en el que alguno de estos metales se encuentre libre en solución en una proporción cuantificable, pero en tales condiciones el BGE ya no serviría, pues se estaría en una condición de pH menor al pKa del ácido láctico y no se tendría anión lactato suficiente para formar complejos y permitir la separación. Por lo tanto debería ensayarse otro complejante cuyo pKa sea menor al del láctico y que posea equilibrios de complejación suficientemente rápidos con los analitos de interés.

Regresar al índice

5.- Conclusiones

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un sistema de electroforesis capilar de aplicación en el campo de la geoquímica, para determinar componentes mayoritarios en rocas. El principal desafío consistió entonces en la preparación del medio separativo y el acondicionamiento de la muestra para su análisis.

Si bien se desarrolló un medio separativo apropiado para varios de los analitos de interés, no todos pudieron separarse adecuadamente. Sin embargo, aquellos que fueron separados resultan de gran interés en la clasificación de rocas ya que se aplican a ciertas normas ampliamente utilizadas. En cuanto al acondicionamiento de la muestra, se pudo encontrar un método simple para su pretratamiento; lo cual, combinado con el método separativo propuesto, nos permitiría cuantificar estos analitos en muestras reales de manera sencilla y, si se lo compara con otras técnicas utilizadas actualmente, a muy bajo costo.

Por otro lado, se planteó un desafío analítico ya que el número de publicaciones relacionadas a la determinación de cationes inorgánicos por electroforesis capilar con detección indirecta es muy escaso y este método sólo ha sido aplicado en escasas ocasiones y con éxito relativo sobre muestras reales, situándose la mayor parte de las publicaciones en demostrar la posibilidad de su uso pero no su aplicación, sin haberse planteado hasta el presente su posible uso en condiciones como en las de este trabajo. Logramos hallar condiciones de trabajo en las que el sistema responde de manera aceptable en situaciones reales de alta fuerza iónica y se sentaron las bases para futuras investigaciones y desarrollos en el área, dando un nuevo impulso a este método separativo.

Desafortunadamente, no fue posible la aplicación del método sobre las muestras en su totalidad debido a limitaciones de índole instrumental. Tampoco fue posible realizar los ensayos utilizando las dos composiciones de BGE que mostraron buenos resultados, aunque se pudo ensayar positivamente ambas composiciones para el pretratamiento de la muestra.

Así mismo, se planteó una posible explicación complementaria a la ya existente sobre la separación y detección de los analitos hierro y aluminio, que permitiría abrir nuevas posibilidades de desarrollo para obtener resultados cuantificables de un mayor número de especies en este tipo de muestras.

Regresar al índice

6.- Referencias

- [1] Timerbaev J. *Sep. Sci.* 2008, 31, 2012–2021.
- [2] Timerbaev *Electrophoresis* 2007, 28, 3420–3435.
- [3] Pacakova, Coufal, Stulik, *Gas Electrophoresis* 2003, 24, 1883–1891.
- [4] Malik, Ashok Kumar *Capillary Electrophoresis* 2008, 384, 21-42.
- [5] Timerbaev J. *Chromatogr. A.* 1997, 792, 495–518.
- [6] Timerbaev *Electrophoresis* 2002, 23, 3884–3906.
- [7] Timerbaev *Electrophoresis* 2004, 25, 4008–403.
- [8] Ossaka, Kakegawa, Oi, Mukaida J. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1994, 183, 2, 235-244.
- [9] Mikelić, Oreščanin, Barišić *Journal of Geochemical Exploration* 2013, 128, 1–13.
- [10] Schlegel, Lisker, Dörr, Jochmann, Schubert, *Spiegel Zeitschrift der Deutschen Gesellschaft für Geowissenschaften*, 2013, 164, 1, 173-186.
- [11] Bošnjak, Casiot, Duić, Fazinić, Halamić, Sipos, Santo, Dadić *Journal of Geochemical Exploration* 2013, 126–127, 55–66.
- [12] D'Elia, Paez, *Apuntes de Cátedra de Petrología I UNLP* 2010.
- [13] Khaledi, *High-performance capillary electrophoresis*, *Chem. Analysis*, 146, Wiley 1998.
- [14] Yeung *Acc. Chem. Res.* 1989, 22, 125-130.
- [15] S.F.Y. Li, *Capillary electrophoresis*, *J. Chrom.* 1993, 52.
- [16] Kuhr, Yeung *Anal. Chem.* 1988, 60, 1832.
- [17] Shi, Fritz *Journal of Chromatography* 1993, 640, 473-479.
- [18] Lin, Lee and Y.C. Chert, *Journal of Chromatography A* 1993, 654, 167.
- [19] Stedry, Jaros, *Gas Journal of Chromatography A* 2002, 960, 187-198 .
- [20] Chiari *Journal of Chromatography A* 1998, 805, 1–15.
- [21] Weston, Brown, Heckenberg, Jandik, Jones J. *Chromatogr.* 1992, 602, 249–256.
- [22] Shi, Fritz *Journal of Chromatography* 1994, 671, 429-435.
- [23] Tangen, Lund, Frederiksen J. *Chromatography A* 1997, 767, 311-317.
- [24] Doan, Kubáň, Kubáň, Kiplagat, Boček *Eletrophoresis* 2011, 32, 3-4, 464–471.
- [25] Fercher, Haller, Smetanab, Vellekoop *Analyst* 2010, 135, 965-970.
- [26] Piovezan, Costa, Jager, de Oliveira, Micke *Analytica Chimica Acta* 2010, 673, 2, 200–205.
- [27] Sarazin, Delaunay, Costanza, Eudes, Gareil *Talanta* 2013, 103, 301–305.
- [28] Shi, Gao, Feng, Lu J. *Chromatogr. Sci.* 2012, 50, 6, 547-552.
- [29] Rovio, Sirén, Sirén *Food Chemistry* 2011, 124, 3, 1194–1200.
- [30] Fujwara, Honda *Anal. Chem.* 1987, 59, 487.

- [31] Van Orman, Liversidge, McIntire, Olefirowicz, Ewing J. Microcol. Sep. 1990, 2, 176.
- [32] Schwer, Kenddler, Anal. Chem. 1991, 63, 1801.
- [33] Stedry, M. Jaros, K. Vcelakova, B. Gas, Electrophoresis 2003, 24, 536–547 .
- [34] Stedry, Jaros, Hruska, Gas, Electrophoresis 2004, 25, 3071-3079 .
- [35] Jaros, Hruska, Stedry, Zuskova, Gas, Electrophoresis 2004, 25, 3080-3085 .
- [36] Hruška, Štědrý, Včeláková, Lokajová, Tesařová, Jaroš, Gaš, Electrophoresis 2006, 27, 4610-4617.
- [37] Talrose, Stern, Goncharova, Messineva, Trusova, Efimkina, Yermakov, Usov, Leskin NIST web-book 2011, 69.
- [38] Thyssen, Hochfeld, Kessel, Meyer, Schultze Synthetic Metals 1989, 29, 357-362.
- [39] Jorgenson, High performance capillary electrohporesis, Hewlett-Packard Co 1992.

Regresar al índice

Dedico esta página final a agradecer a todos los que de una forma u otra han estado presentes a lo largo de mi carrera.

Agradezco al Dr. Gagliardi por permitirme realizar el presente trabajo de tesina, por su constante apoyo y asesoría, no sólo en lo vinculado a la materia sino a diferentes aspectos de la vida en general.

Al Lic. Tascon por su incondicional compañía a lo largo de este trabajo y sus valiosas opiniones que exceden ampliamente la vida académica.

A la Dra. Castells y todo el grupo del LIDMA por permitirme el espacio de trabajo y el apoyo constante que me permitió no sólo llevar adelante esta tesina sino además conocer a un gran grupo de compañeros que exceden al ámbito académico.

Al Dr. Osorio por tantas horas compartidas y tanta ayuda brindada con tanto desinterés, en quien he encontrado un amigo.

A mi hermana Lara, no sólo por el apoyo moral, sino por el técnico en cuanto a la edición de este trabajo final.

A todos mis compañeros y amigos por todo el apoyo moral y emocional que me han brindado a lo largo de estos años de estudio y vida universitaria.

Al Pelo de Einstein por tantas horas juntos tratando de hacer de éste un mundo más justo.

A mi familia por inculcarme el valor del trabajo, el esfuerzo y el amor hacia lo que se hace, y por siempre respaldarme de manera incondicional.

"No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas"

Séneca, filósofo romano (4aC-65dC)