

Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos

Mario Chopin Doroteo*

* Laboratorio de Tejido Con-juntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacio-nal de Rehabilitación.

Dirección para correspondencia:
 Mario Chopin Doroteo
 Tel: (55)59991000, ext. 14701.
 E-mail: bemmarcd@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado
 en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras claves: Técnica analítica, electroforesis capilar, movilidad electroforética.

Key words: Analytical techni-que, capillary electrophoresis, electrophoretic mobility.

Resumen

La electroforesis capilar es una técnica analítica utilizada en diferentes áreas de la investigación, como en la biotecnología, la farmacia y la medicina, la cual permite la separación de diferentes analitos como iones, biomoléculas y células. Esta técnica permite obtener resultados en un corto tiempo, una alta eficiencia de separación y una alta sensibilidad con un mínimo consumo de muestra. La separación se basa en las diferentes movilidades electroforéticas adquiridas por los analitos dentro del capilar al aplicar un campo eléctrico.

Abstract

Capillary electrophoresis is an analytical technique used in several research fields of biotechnol-ogy, pharmaceutical, and medical, it allows the separation of different types of analytes such as ions, biomolecules, and cells. This technique provides results in shorter time, high separation efficiency, high detection sensitivity and minimum sample consumption. The separation is based on the different electrophoretic mobilities acquired by analytes into the capillary while the electric field is applied.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos (iones, péptidos, proteínas, carbohidratos, esteroides, ácidos nucleicos, vitaminas, fármacos, células, etcétera)^{1,2} provenientes de las diferentes áreas de la biotecnología, la industria farmacéutica, la clínica, la alimentaria y la ambiental, entre otras. Parte de la versatilidad y eficacia de esta técnica se debe a que combina elementos de otras técnicas analíticas; por ejemplo, utiliza detectores de alta sensibilidad como en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el uso de capilares de sílice fundida (SiO₂), como en la cromatografía de gases (GC). Además, estos capilares permiten la aplicación de altos campos eléctricos (100-500 V/cm) con una alta eficiencia para la disipación del calor, evitando los efectos adversos del calentamiento de Joule,³ y permiten la detección *in situ*, debido a la baja absorción de la radiación UV/vis y a la baja fluorescencia. Estos capilares están recubiertos de un polímero (poliamidas) que les confiere alta flexibilidad facilitando su manipulación.

Los grupos silanol (Si-OH) de la superficie del ca-pilar a pH \geq 3 son ionizados, por lo que la pared del capilar presentará carga negativa (Si-O⁻). De acuerdo con la teoría de la doble capa eléctrica, en la pared del capilar se formará una primera capa (capa fija) de contraiones (cationes) que son atraídos por la carga negativa del capilar, seguida por una segunda (capa móvil), que se compone principalmente de cationes que están adyacentes a la capa fija y, hacia el centro del capilar, el número de cationes y aniones son equivalentes (*Figura 1c*). Al aplicar un campo eléctrico, el exceso de cationes de la capa móvil establece un flujo neto de migración hacia el polo negativo (cátodo), generando el flujo electroosmótico, que se refiere a la migración de un líquido (solución amortiguadora) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) al aplicar un campo eléctrico. La movilidad del flujo electroosmótico (μ_{feo}) está en función de la viscosidad (η) de la solución amortiguadora, la constante dieléctrica del medio (ϵ) y del potencial zeta (ζ) que se genera por la diferencia de cargas entre las capas (ecuación 1):³

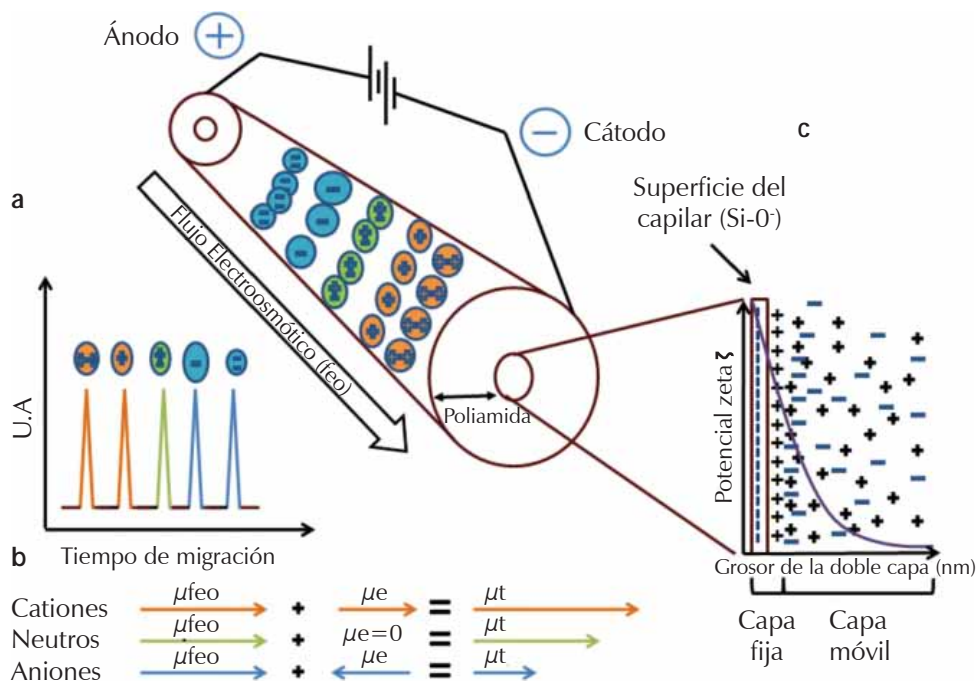


Figura 1. a) Separación relación carga-masa, b) Movilidad total de los analitos μ_t , c) Representación de la doble capa eléctrica.

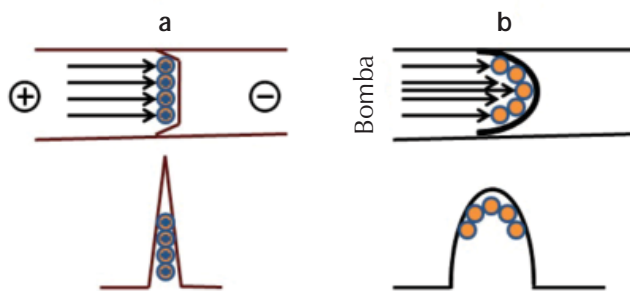


Figura 2. a) Flujo electroosmótico EC, b) Flujo laminar HPLC.

$$\mu_{feo} = \varepsilon\zeta/4\pi\eta \quad (1)$$

La migración de los analitos dentro de un campo eléctrico (movilidad electroforética μ_e) está determinada por la fuerza del campo eléctrico y la carga del analito; sin embargo, esta velocidad disminuye de acuerdo con la ley de Stokes, conforme se incrementan las fuerzas de fricción (viscosidad del amortiguador) y radio iónico de los analitos.³

La movilidad total (μ_t) de los analitos dentro del capilar es la suma vectorial de μ_{feo} y μ_e , por lo que en los procesos de separación de electroforesis capilar de zona, donde se involucra principalmente la relación carga/masa de los analitos, los cationes de la muestra adquieren mayor μ_t seguido por los analitos

neutros, y los aniones serán los que presenten menor μ_t (Figuras 1a y 1b).

Debido al principio de separación y a los detectores de alta sensibilidad (UV/vis, arreglo de diodos, fluorescencia inducida por láser y espectrometría de masas), la EC ofrece varias ventajas, tales como:⁴

- Alta eficiencia, debido a que la aplicación del campo eléctrico sobre el capilar genera el flujo electroosmótico (feo), que permite la separación con un perfil casi plano, obteniendo picos más angostos y simétricos comparados con los obtenidos con el flujo laminar que se obtiene al usar presión, como en HPLC (Figura 2).
- Excelente resolución, obteniendo platos teóricos mayores a 10^5 .
- Límites de detección de hasta ppm, dependiendo del analito y detector utilizado.
- Mínimo tratamiento de muestras.
- Mínimo consumo de muestras (nL) y reactivos.
- Tiempos de análisis rápidos que oscilan de 5 a 60 min.

La EC se utiliza para el análisis y la separación de una amplia gama de analitos en diferentes matrices, debido que dentro de la EC están involucradas una familia de técnicas como:^{5,6}

- Electroforesis capilar de zona (separación en relación con la masa/carga de los analitos).

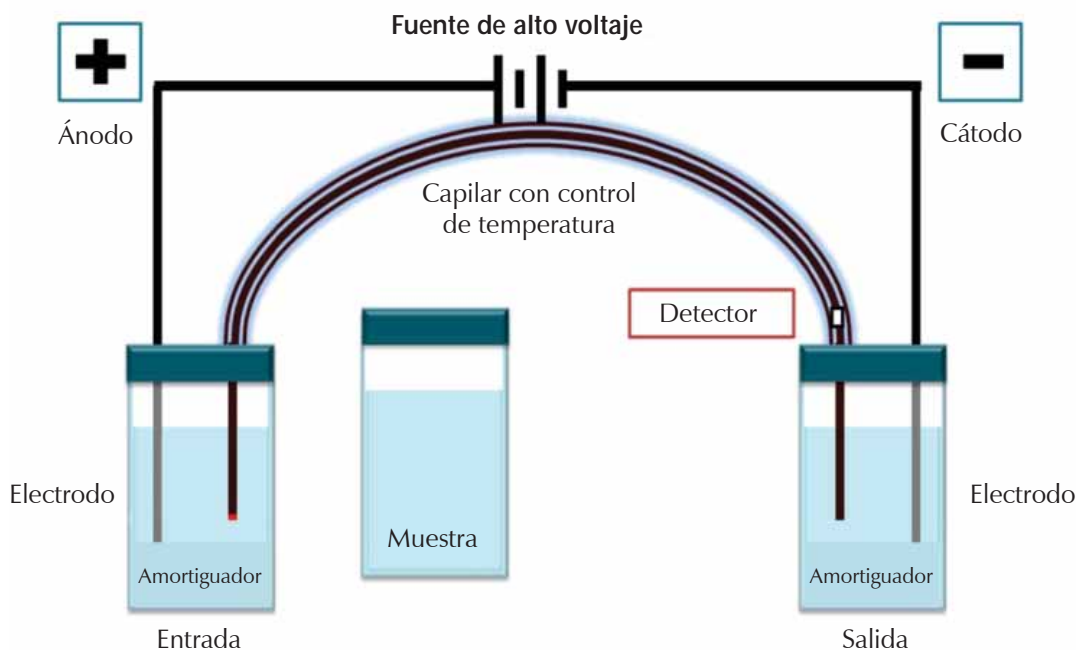


Figura 3. Representación de los elementos del sistema de EC.

- Electroforesis capilar en gel (separación por peso molecular).
- Electroforesis capilar no acuosa (separación de compuestos insolubles en agua).
- Isoelectroenfoco capilar (separación por punto isoeléctrico).
- Cromatografía electrocinética capilar (separación con base en la interacción de los analitos con selectores quirales, por ejemplo, ciclodextrinas).
- Cromatografía electrocinética micelar (separación con base en el coeficiente de partición de los analitos entre las micelas y el solvente).
- Cromatografía electrocinética de microemulsión (separación con base en la interacción de los analitos con las diferentes fases de la microemulsión).

En cada una de estas variantes de EC se utilizan soluciones amortiguadoras (fosfatos, boratos, citratos, tris, etcétera), que se introducen dentro del capilar mediante presión para acondicionarlo y llenarlo de esta solución amortiguadora de separación. Cuando el capilar se encuentra lleno y acondicionado con la solución amortiguadora, se inyecta la muestra de forma hidrodinámica (aplicando presión) o electrocinética (aplicando un campo eléctrico). Posterior a la inyección de la muestra se realiza la migración y separación de los analitos dentro del capilar por la acción del campo eléctrico. La separación de los analitos se basa en la diferencia de relación carga/masa y por la afinidad a

los diferentes aditivos (surfactantes, ciclodextrinas, aminas, solventes orgánicos, etcétera) de la solución amortiguadora, así como de la viscosidad del sistema y, por ende, de la temperatura de separación. La temperatura a la cual se realizan las separaciones varía de 10 a 60 °C, dependiendo de las características de la muestra.

La detección de los analitos se realiza dentro del capilar, removiendo una sección del polímero permitiendo el paso de luz hacia el detector. Los factores principales que pueden afectar la eficiencia de la separación de los analitos son el calor de Joule generado, la absorción de la muestra a las paredes, la concentración de los analitos en la muestra, la fuerza iónica, el pH de las soluciones amortiguadoras, la temperatura, etcétera.⁴ Por lo cual es necesario realizar una optimización del método considerando el costo-beneficio de cada una de las variables.

La automatización de la EC ha permitido el desarrollo de métodos rápidos y eficientes incluidos en diferentes guías regulatorias como son: *Food and Drug Administration (FDA)*, *European Pharmacopoeia (EP)*, *United States Pharmacopoeia (USP)*, *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)*, entre otras.

De manera general, el sistema de electroforesis capilar cuenta con los siguientes elementos (*Figura 3*):

- Capilar (compartimiento donde se realiza la separación).

- Reservorios con solución amortiguadora (donde se sumergen los electrodos y el capilar).
- Reservorios (donde se colocan las muestras).
- Electrodos (para generar el ánodo y el cátodo).
- Fuente de alto voltaje (generadora del campo eléctrico).
- Sistema de inyección de muestra (hidrodinámica y electrocinética).
- Sistema de control de temperatura (por convección de aire o líquido).
- Detector (conectado a un sistema de adquisición de datos).

La EC es una técnica cuyo número de publicaciones, de acuerdo con la base de datos de ScienceDirect® de 1990-2011, fue de 30,169. Estas publicaciones pertenecen a las áreas de la química (34.7%), la bioquímica, la genética y la biología molecular (33.5%), la medicina (6.5%), la farmacología (5.5%), la ingeniería química (3.9%), la agricultura y las ciencias biológicas (3.3%) y otras (12.6%). De acuerdo con esta misma base de datos, las publicaciones en México en este mismo periodo fueron de 98. Estos datos nos mues-

tran que la EC es un área de oportunidad en la que se puede trabajar para el desarrollo de métodos con alta eficiencia de separación, que es una de las ventajas que ofrece esta técnica.

Bibliografía

1. Kostal V, Katzenmeyer J, Arriaga E. Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Chem* 2008; 80: 4533-4550.
2. Franco T, Federica B, Jennifer P. Current role of capillary electrophoretic/electrokinetic techniques in forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388: 1359-1364.
3. Yan X. Tutorial: Capillary electrophoresis. *The chemical educator*. 1996; 1 (2): 1-14.
4. Wätzig H, Günter S. Capillary electrophoresis. A high performance analytical separation technique. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (6): 724-738.
5. Suntornsuk L. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis a survey on recent application. *J Chromatogr Sci* 2007; 45: 559-577.
6. Singh B. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. *J Pharm Educ Res* 2011; 2 (2): 2-36.