

Carolina Simó, Coral Barbas¹, Alejandro Cifuentes*

Resumen

En este artículo se presenta una revisión de los diferentes trabajos que han aparecido en la bibliografía sobre el análisis de polímeros empleando electroforesis capilar (CE). Para ello, se describen primero los principios de funcionamiento de esta nueva técnica analítica, la instrumentación, los diferentes modos en que puede ser utilizada y su comparación con otras técnicas analíticas de separación. A continuación se describen las aplicaciones más representativas de CE en el análisis de polímeros sintéticos.

Electroforesis capilar: descripción de la técnica

La Electroforesis Capilar (CE) es un conjunto de técnicas de separación basadas en la diferente movilidad electroforética de las sustancias en disolución bajo la acción de un campo eléctrico¹⁻³. Se puede decir de esta técnica que combina el poder de separación de la electroforesis convencional⁴ con el concepto de automatización propio de

*Dpto. de Caracterización de Alimentos, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid

¹Dpto. Ciencias Básicas, Facultad de CC. Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid

* Tel. 91-5622900; Fax 91.5644853;

E-mail: iqaoc29@fresno.csic.es

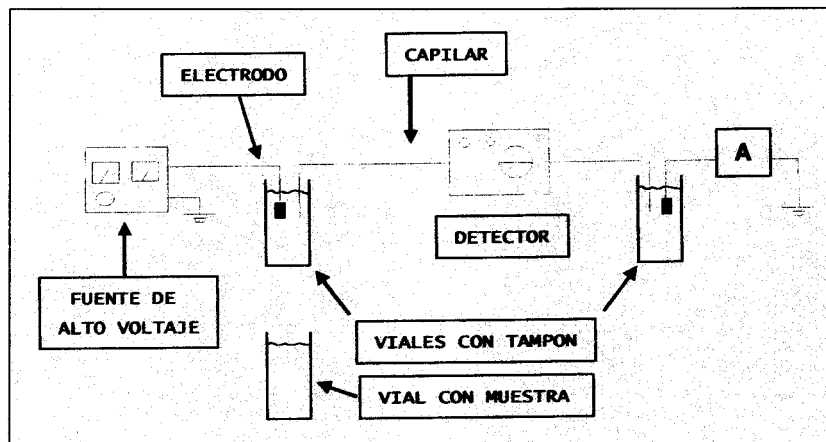


Figura 1: Instrumentación básica en un equipo de electroforesis capilar

la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Las principales características de la CE son las siguientes:

- ✓ Elevada rapidez de análisis (los tiempos por análisis son, en general, inferiores a los 30 minutos).
- ✓ Elevadas eficacias de separación (normalmente en el intervalo de 10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de columna, dependiendo del tipo de analito y de las condiciones de separación).
- ✓ Se requieren pequeños volúmenes de muestra (unos pocos microlitros) ya que los volúmenes inyectados son del orden de nanolitros.
- ✓ Tiene una gran variedad de aplicaciones (desde iones metálicos hasta partículas, incluyendo péptidos, proteínas, fragmentos de DNA, fármacos, células, etc).
- ✓ La técnica está en la actualidad totalmente automatizada, lo que hace posible la separación y análisis de muestras sin la constante atención del operador.

Instrumentación

En la Figura 1 se muestra un esquema

de la instrumentación básica requerida en un equipo de electroforesis capilar. La separación de los analitos se lleva a cabo en el interior del capilar, normalmente de sílice fundida. Sus dimensiones oscilan entre 25-100 μm de diámetro interno y 25-100 cm de longitud. Estos capilares de sílice son frágiles, de modo que vienen con un recubrimiento polimérico externo (poliimida) que les aporta flexibilidad y resistencia. La sílice fundida presenta unas características físico-químicas especialmente buenas cuando se utilizan sistemas de detección espectrofotométricos UV-Visible, ya que es prácticamente transparente a la radiación en esta franja del espectro. Además, el pequeño espesor de la pared, favorece la disipación del calor generado por efecto Joule. Por otro lado, las cargas negativas de los silanoles pueden originar fenómenos parasitarios de adsorción principalmente de sustancias con densidad de carga positiva elevada, pudiéndose llegar a producir incluso adsorciones irreversibles a la sílice de algunos de estos compuestos. Para disminuir estos problemas se pueden llevar a cabo recubrimientos de naturaleza polimérica normalmente neutra e hidrófila sobre la

pared interna del capilar con poliacrilamida, poli-vinilalcohol, polietilenglicol, etc.

El capilar se encuentra termostatzado para así mantener la temperatura constante de un análisis a otro dentro de unos límites conocidos, disipando el calor que se genera por efecto Joule. De este modo se mejora la reproducibilidad.

El interior del capilar se rellena de una disolución reguladora o tampón, la misma que se encuentra en los viales en los cuales se introducen los extremos del capilar y los electrodos. Durante la inyección el recipiente de tampón de entrada se sustituye por uno que contiene la muestra, pudiéndose aplicar vacío, presión o una diferencia de potencial (inyección por electromigración en este último caso) para introducir un pequeño volumen (nanolitros) de la muestra dentro del capilar. Una vez hecha la inyección el vial de muestra es sustituido de nuevo por el vial con el tampón de separación, aplicándose a continuación un campo eléctrico para que comience la separación. En los equipos de CE, las fuentes de alimentación de corriente continua suministran normalmente potenciales eléctricos de entre 0 y 30 KV. Debido a la conductividad del tampón de separación, se produce una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Las sustancias que han sido inyectadas previamente se desplazan y se separan en su interior debido a esta diferencia de potencial, hasta llegar al punto de detección.

La detección se realiza en columna (sobre el mismo capilar), en la denominada ventana de detección. En este punto, se elimina del capilar el recubrimiento de poliimida. Este tipo de detección en continuo ha permitido la automatización de la técnica, eliminando los volúmenes muertos al prescindir de conexiones (aumentando de este modo la eficacia de las separaciones) y proporcionando la posibilidad de llevar a cabo análisis cuantitativos. Por otro lado el pequeño paso óptico (25-100 mm) disminuye la sensibilidad en los sistemas de detección espectrofotométricos en los que dicho parámetro, el paso óptico, esta implicado.

El sistema de detección más utilizado es el detector UV-Vis (de filtros, con red de difracción o con fila de diodos), seguido de los detectores de fluorescencia inducida por láser y espectrometría de masas.

La señal del detector se envía a un convertidor analógico/digital y se almacena

y procesa en un ordenador obteniendo el electrofograma de la separación.

Principios de funcionamiento

La pared interna del capilar tiene grupos silanoles, que en contacto con el tampón de separación se ionizan adquiriendo carga negativa como se muestra en la Figura 2. El grado de ionización se controla principalmente mediante el pH del tampón de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones acuosas de pH superior a 2-3). La pared cargada negativamente atrae a los iones con carga positiva del tampón creando una doble capa eléctrica. Esta doble capa tiene dos zonas; una compacta próxima a la pared del capilar, y en la cual las interacciones que se dan entre los grupos cargados negativamente de la sílice y los contraiones del tampón son tan grandes que compensan la agitación térmica; y otra zona más alejada de la pared, denominada difusa, con interacciones más débiles con los silanoles cargados, pudiéndose producir agitación térmica.

Bajo la acción del campo eléctrico, las cargas positivas de la zona difusa se desplazan hacia el cátodo y arrastran con ellas el agua de solvatación que llevan asociada. El resultado de este fenómeno es un movimiento global del tampón del interior del capilar hacia el cátodo y viene determinado por la movilidad electroosmótica, μ_{eo} :

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \xi}{4\pi \eta}$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del tampón, η la viscosidad del tampón y ξ (potencial zeta) se puede definir de forma aproximada como el potencial que se genera entre el exceso de carga negativa de la superficie del capilar y el exceso de carga positiva de la doble capa. Este último factor va a determinar la magnitud del flujo electroosmótico. Dicho flujo electroosmótico va a desplazar con la misma velocidad a todas las sustancias en el interior del capilar ya que se trata de una propiedad del sistema, es decir, no va a introducir selectividad y por tanto no permite la separación de dichas sustancias.

Una de las características más importantes de este flujo del tampón dentro del capilar es que se trata de un flujo con perfil prácticamente plano, lo que proporciona elevadas eficacias, como se verá más abajo.

Además, bajo la presencia de un campo eléctrico, las sustancias cargadas su-

fren el proceso de electromigración, por el cual, los analitos con carga en el interior del capilar tienden a desplazarse hacia su polo correspondiente. Dichos iones se ven sometidos por un lado a una fuerza originada por el campo eléctrico y por otro a una fuerza de rozamiento que se opone a la eléctrica. Utilizando la aproximación de Stokes en la que se considera la partícula como una esfera rígida, la expresión de la fuerza de rozamiento (F_r) que una sustancia en movimiento sufre en cualquier medio viene dada por la ecuación $F_r = 6 \pi \eta r_p v_e$, siendo r_p el radio de esta partícula, η la viscosidad del medio y v_e la velocidad con la cual se desplaza. Por otro lado, la partícula con carga al estar bajo la acción de un campo eléctrico, se ve sometida a una fuerza eléctrica: $F_e = q E$, donde q es la carga de la partícula en el campo eléctrico E . El campo eléctrico es el valor resultante de dividir el voltaje aplicado por la longitud total del capilar.

Ambas fuerzas se igualan, $F_r = F_e$, de modo que la partícula adopta un movimiento rectilíneo uniforme, cuya velocidad tiene la siguiente expresión:

$$v_e = \frac{q}{6 \pi \eta r_p} E$$

la magnitud que resulta de esta ecuación es la denominada movilidad electroforética, μ_e :

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

La movilidad electroforética es el parámetro que gobierna la selectividad del sistema de separación a través de la relación q/r_p en el modo de electroforesis capilar en zona libre, que es el de uso más generalizado (como se verá más abajo pueden existir otros parámetros que, en función del modo de electroforesis capilar que se utilice, controlen dicha selectividad como por ejemplo la hidrofobicidad, el punto isoeléctrico de las sustancias, etc). La relación q/r_p , está directamente relacionada con la relación carga/masa de las sustancias, es decir, para un grupo de sustancias con la misma carga eléctrica, las sustancias con un tamaño molecular mayor tendrán una relación q/r_p menor y por tanto su movilidad electroforética μ_e será menor, pudiendo ser separadas de aquellas sustancias de tamaño más pequeño, y por tanto con mayor movilidad electroforética μ_e .

En capilares sin un recubrimiento interno neutro que elimine el efecto de las

cargas negativas del capilar y por tanto $\mu_{eo} = 0$, se dan simultáneamente la migración electroforética y la migración electroosmótica de los componentes de la muestra como se puede ver en la Figura 2. Normalmente el valor de la movilidad electroosmótica proporcionada por el capilar, es superior a la movilidad electroforética de las sustancias que son analizadas. Así pues, la velocidad que van a adoptar las sustancias dentro del capilar va a ser suma o resta (según vayan en el mismo sentido o en sentidos contrarios, lo que dependerá de la carga eléctrica de las sustancias) de estos dos factores:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_e)E$$

El tiempo de migración t_m de la sustancia cargada vendrá dado por la expresión:

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{eo} \pm \mu_e)E}$$

donde l es la longitud del capilar desde el extremo de inyección hasta el punto de detección.

Características de la electroforesis capilar con respecto a otras técnicas

A diferencia de la electroforesis en placa, en CE se pueden aplicar potenciales muy elevados, ya que la disipación del calor generado por el efecto Joule es mucho más eficaz debido a la alta relación superficie externa/volumen de los capilares de sílice empleados. Características de la técnica ya comentadas como la detección en columna, evitan los procesos intermedios que deben realizarse para realizar la detección en las técnicas electroforéticas en placa, como es la tinción; de este modo aumenta la rapidez, y sencillez tanto del análisis per se como de la exactitud en el análisis cuantitativo por CE.

La principal técnica analítica de separación comparable con la electroforesis capilar es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En general, los tiempos de análisis son más cortos en CE y proporciona mayores eficacias que HPLC. Estas mayores eficacias de CE se deben, entre otros factores, al perfil de flujo plano que se observa en esta técnica. Este perfil del flujo del tampón plano es el resultado del empleo de un potencial eléctrico como fuerza motora en la separación. Mientras que el originado por las bombas de impulsión de la fase móvil en HPLC es un perfil de flujo parabólico. En la Figu-

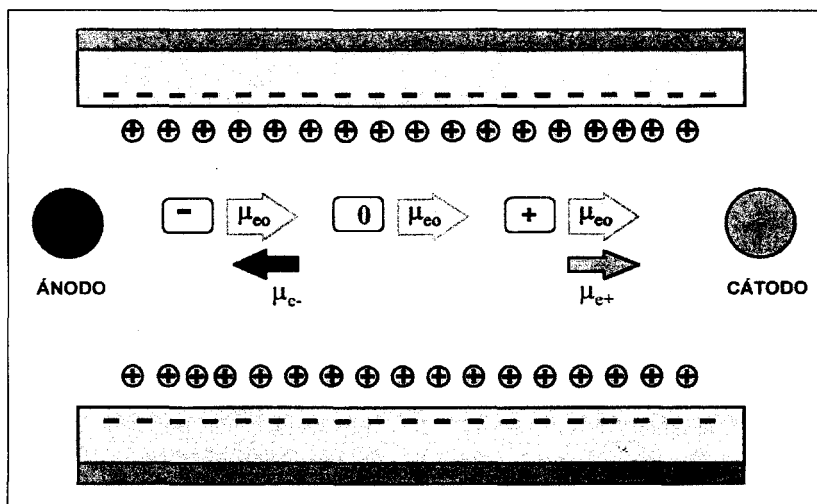


Figura 2: Separación electroforética por CZE de tres tipos de sustancias: con carga positiva (+), neutra (0) y con carga negativa (-).

ra 3 se muestran de forma esquemática ambos perfiles de flujo con los picos que teóricamente originarían. Por último, en CE, la reproducibilidad en el análisis cuantitativo es menor, pero se necesitan menores cantidades de muestra. En general, estas dos técnicas, al estar basadas en mecanismos de separación diferentes, son consideradas complementarias.

Modos de CE

Las distintas modalidades de electroforesis capilar se diferencian principalmente en la naturaleza del medio de separación que se introduce en el interior del capilar y también en las características de los analitos que serán objeto de separación por esta técnica, siendo la instrumentación prácticamente la misma (Figura 1) para todas ellas. A continuación vamos a realizar una breve descripción de todas las diferentes modalidades que actualmente existen de electroforesis capilar.

Electroforesis en zona libre (CZE)

Además de ser la primera modalidad de electroforesis desarrollada, es hoy en día, la más utilizada⁵⁻⁷. En el interior del capilar se encuentra únicamente el tampón de separación, por lo tanto se van a poder separar sustancias neutras y cargadas positiva y negativamente cuando las magnitudes del flujo electroforético (en el caso de las cargadas) y electroosmótico sean adecuadas como ya se ha comentado en el apartado "principios de funcionamiento".

Según este criterio, los compuestos

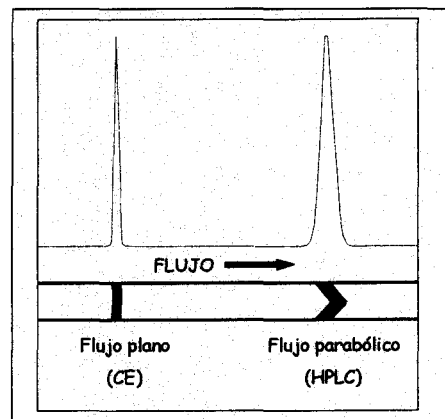


Figura 3: Perfiles de flujo en las técnicas de CE y HPLC.

con mayor densidad de carga positiva y menor radio, serán los eluidos en un menor tiempo. Al aumentar el valor del campo eléctrico, el tiempo de migración de los compuestos va a disminuir. Existe un valor óptimo de este campo en el cual se van a obtener los tiempos de análisis más cortos con una eficacia adecuada. A partir de este valor comienzan a aparecer fenómenos relacionados con la generación de calor por efecto Joule que disminuyen la eficacia de la separación.

La CZE tiene una serie de limitaciones, que en algunos casos se consiguen superar con el empleo de otras modalidades de CE:

1. No se van a poder separar compuestos sin carga eléctrica o con distinta masa molecular pero con la misma relación carga/masa (por ejemplo fragmentos de DNA, complejos proteína-dodecil sulfato sódico, etc).

2. Se pueden producir adsorciones sobre la superficie del capilar de especies con una densidad de carga positiva elevada. Estas adsorciones van a influir negativamente en el proceso de separación.
3. Por último, y común a todos los modos de CE, se obtienen coeficientes de variación en el análisis cuantitativo que se sitúan entre el 2 y 5% en muestras reales.
4. La sensibilidad de la técnica no permite el análisis de trazas.

Isotacoforesis capilar (CITP)

La muestra se inyecta entre un tampón que se denomina frontal con una movilidad superior a la del componente de la muestra más rápido, y un tampón terminal cuya movilidad es inferior a la del compuesto más lento de esta muestra. En CITP, las sustancias se separan en función de su movilidad electroforética (μ_e). Con la aplicación de una diferencia de potencial, los analitos se distribuyen en bandas que migran entre el tampón frontal y el terminal dentro del capilar, todos ellos con una misma velocidad v_{ITP} (de ahí el prefijo isotaco).

$$v_{ITP} = E_1\mu_1 = E_2\mu_2 = E_i\mu_i$$

Se produce un equilibrio entre las movilidades efectivas de cada analito y el campo eléctrico de la banda electroforética correspondiente. Antes de llegar a este estado estacionario, las sustancias se encuentran fuera de sus bandas electroforéticas, y por lo tanto con un campo E_i distinto al del equilibrio. De este modo la velocidad de los analitos va modificándose hasta llegar a una zona del capilar en la que su potencial haga que el correspondiente analito adquiera la velocidad del equilibrio v_{ITP} . Este modo de electroforesis a pesar de ser la menos utilizada, tiene su principal campo de aplicación en la preconcentración de muestras. Al inyectar la muestra diluida y aplicar el voltaje, la zona se concentra en la interfase con el tampón frontal. Su preconcentración dependerá de las características del analito que se quiere preconcentrar, la fuerza iónica de la muestra y la del tampón frontal.

Isoelectroenfoque capilar (CIEF)

La técnica CIEF es una herramienta importante en el área de la bioquímica analítica aplicada fundamentalmente a la separación de péptidos y proteínas,

como se demostró en los primeros trabajos publicados por Hjertén y Zhu⁹. En el capilar se introduce una mezcla de anfólitos de diferentes valores de pH. A este tampón se le añade la muestra (los péptidos y/o proteínas a separar). Al aplicar un campo eléctrico se establece primero un gradiente de pH por parte de los anfólitos dentro del capilar, que se distribuye desde el ánodo con pHs bajos hasta el cátodo, con valores de pH alto^{10,11}. Los péptidos o proteínas con carga positiva o negativa bajo la influencia del campo eléctrico se desplazan en el capilar hacia el cátodo o ánodo respectivamente, hasta llegar a aquella zona del capilar en la cual el pH del tampón es igual a su punto isoelectrónico, es decir, llegan a un valor de pH en el que el número de sus cargas positivas se iguala al de negativas. En este punto del capilar el analito deja de migrar al tener una carga eléctrica global cero. Cuando todos los componentes han alcanzado su punto isoelectrónico, se aplica normalmente presión sobre el capilar para proceder a su elución y detección.

Los capilares empleados en esta modalidad tienen un recubrimiento interno que disminuye o elimina el flujo electroosmótico, ya que la existencia de dicho flujo impediría en la mayoría de los casos la formación del gradiente de pHs.

Como ya se ha comentado, este tipo de CE tiene su aplicación fundamental en la separación de proteínas y péptidos¹², al presentar estas sustancias carácter anfotérico y presentar como una de sus propiedades la del punto isoelectrónico.

Cromatografía electrocinética micelar capilar (MEKC)

Esta modalidad de CE, también deno-

minada electroforesis capilar con micelas, surgió como solución a la separación de compuestos sin carga eléctrica, aunque de hecho, se puede emplear también en la separación de sustancias cargadas.

Se emplean soluciones tamponadoras con un tensioactivo en concentraciones superiores a la micelar crítica, a partir de la cual se forman micelas. Estas micelas tienen una naturaleza hidrofóbica en su interior e hidrofílica en el exterior. Su naturaleza puede ser muy variada: aniónica, neutra, catiónica, zwitteriónica (doblemente iónica). En función de esta naturaleza, las micelas migrarán hacia el cátodo o el ánodo.

Las micelas se comportan, en términos cromatográficos, como fases pseudo-estacionarias que se desplazan a lo largo de la columna^{13,14}. Los analitos con densidad de carga nula van a interactuar con las micelas en función de su coeficiente de partición específico, que dependerá de sus características químicas. El tiempo que el analito esté dentro de la micela hará que se retarde más o menos con respecto al resto de sustancias neutras (que también interactuarán específicamente con las micelas), lo que permitirá su separación.

En la Figura 4 se muestra la separación de tres sustancias neutras con distinta afinidad por las micelas. El compuesto T interacciona irreversiblemente con las micelas del tampón (su coeficiente de reparto es por tanto muy elevado). El tiempo de migración de la sustancia T (t_m) será el mismo que el de las micelas, que dependerá de la magnitud de μ_{eo} y μ_{em} (movilidad electroforética de la micela). La sustancia P interacciona parcialmente con las micelas. Su tiempo de migración (t_p) dependerá tanto de las movilidades electroforética y electroosmótica como del coeficiente

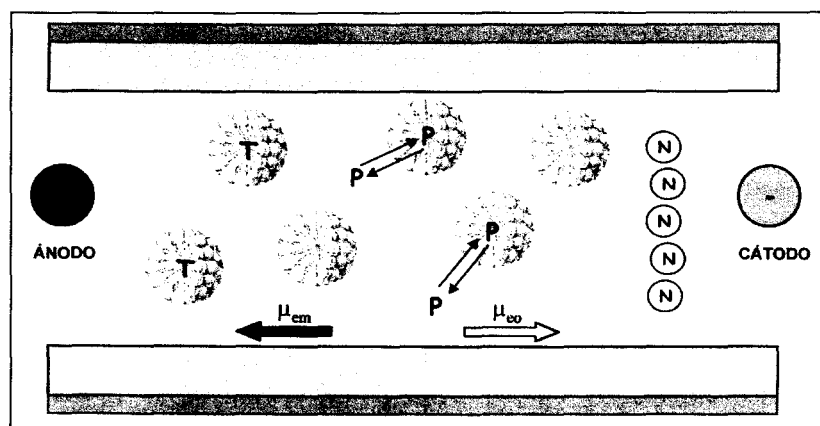


Figura 4: Separación por MEKC de tres compuestos neutros de diferente naturaleza: N, P y T.

de reparto del compuesto entre la disolución tamponadora y la micela. El compuesto N no interacciona con las micelas. Al no tener carga, la única fuerza impulsora que hace que llegue hasta el punto de detección es la movilidad electroosmótica del tampón y tiene un tiempo de migración t_0 (que corresponde con el tiempo del flujo electroosmótico, lo que sería equiparable al tiempo del volumen muerto en HPLC). La diferencia entre los tiempos t_m y t_0 se denomina ventana de separación. Las sustancias neutras que se separen mediante MEKC van a presentar unos tiempos de migración comprendidos entre t_m y t_0 , lo que en cierta medida limita el poder de separación de esta técnica.

Electrocromatografía capilar (CEC)

Este tipo de CE se denomina de esta forma debido a su gran similitud con la cromatografía de líquidos. Al igual que ocurre con la técnica MEKC, su desarrollo se debe fundamentalmente a los trabajos de investigación realizados para la separación de compuestos sin carga eléctrica por CE¹⁵.

El capilar se rellena de partículas de sílice que pueden estar recubiertas o no de una fase estacionaria. El tampón que actúa de fase móvil, se mueve al aplicar un campo eléctrico, siendo su velocidad proporcional al flujo electroosmótico, $v_{eo} = \mu_{eo} E$. Las sustancias neutras empujadas por el flujo electroosmótico interactúan con dicha fase estacionaria de forma específica (en la misma forma a como lo hacen en HPLC) lo que origina su separación.

Esta técnica está en la actualidad en el principio de su desarrollo y una de las principales limitaciones que debe solventar es la corta vida media de los capilares rellenos. Estos capilares, además de ser laboriosos de preparar y caros, dan lugar frecuentemente a la formación de burbujas en su interior como resultado de la aplicación del campo eléctrico, lo que inutiliza su empleo para posteriores análisis.

Electroforesis capilar en gel (CGE)

En este tipo de CE, el relleno del capilar consiste en un gel que va a actuar como tamiz molecular. La aplicación fundamental de esta técnica va a ser la separación de compuestos que posean una relación carga/masa igual, pero con masas moleculares diferentes^{16,17}, como por ejemplo fragmentos de DNA, polisacáridos, complejos SDS-proteí-

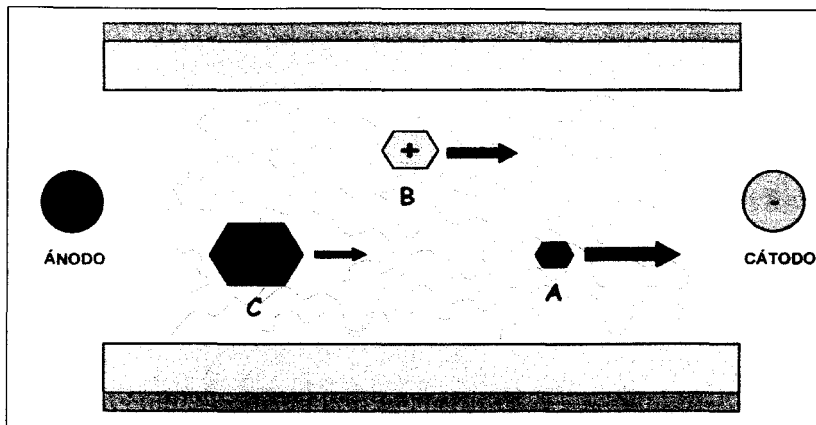


Figura 5: Separación por CGE de las sustancias A, B y C con diferente tamaño molecular e igual relación carga/masa.

nas, polímeros iónicos. En este modo de CE, las moléculas de menor tamaño molecular atraviesan los poros del gel con una mayor facilidad, y por lo tanto presentan un menor tiempo de migración, que las de mayor tamaño como se puede ver en la Figura 5.

Los gels de poli(acrilamida) entrecruzada fueron los primeros en ser utilizados, pero debido a los problemas que presentaban en cuanto a la falta de reproducibilidad, baja resistencia y durabilidad, se han sustituido por las denominadas redes poliméricas. Se trata de polímeros no entrecruzados de naturaleza hidrófila que se disuelven en la disolución tamponadora en una concentración normalmente superior a la denominada concentración de entrecruzamiento, por encima de la cual se forma una red que actúa como tamiz molecular (si bien según otros autores no es necesario llegar a dicha concentración de entrecruzamiento para obtener un efecto de tamiz molecular, como han demostrado Barron y col¹⁸). Los polímeros más empleados para este fin son principalmente: poli(acrilamida) lineal, poli(etilenglicol), poli(vinilalcohol), metilcelulosa, etc.

Análisis de polímeros por CE

La separación mediante electroforesis capilar de biopolímeros tales como proteínas, péptidos o fragmentos de DNA es hoy en día generalizada¹⁹⁻²¹, corroborando las magníficas posibilidades que esta técnica analítica posee, en términos de velocidad de análisis, elevadas eficacias y bajo consumo de muestra, en las separaciones de estas sustancias según su diferente tamaño molecular, relación carga/masa, etc.

Estos mismos aspectos pueden ser de utilidad para caracterizar polímeros sintéticos, en los que es bien sabido que propiedades tales como su tamaño y dispersión molecular afectan enormemente a su eficacia en determinadas aplicaciones. La electroforesis capilar se ha utilizado también con este fin, es decir, para obtener una rápida información que ayude a la caracterización de este tipo de macromoléculas, habiéndose aplicado al análisis de muy diferentes polímeros sintéticos. Estas aplicaciones se han llevado a cabo fundamentalmente en tres modos de electroforesis capilar (electroforesis capilar en zona libre (CZE o FSCE), electroforesis capilar empleando gels o redes poliméricas (CGE) y electroforesis capilar con micelas (MEKC)), describiéndose a continuación los ejemplos, que en opinión de los autores, son más representativos.

Polímeros analizados por CZE

Las separaciones de polímeros sintéticos realizadas por CZE se caracterizan porque los polímeros analizados deben presentar carga eléctrica (negativa o positiva) y diferente relación carga/masa. Una de las primeras aplicaciones de este modo de electroforesis capilar ha sido el análisis de partículas poliméricas. Así, se ha llevado a cabo la separación de nanoesferas de poliestireno funcionalizado con grupos sulfato y carboxilato, de diámetros comprendidos entre los 39 y los 700 nm dentro de capilares de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno²². También por CZE se han separado partículas de látex funcionalizadas con diferentes grupos ionizables (sulfato o carboxilato) y con tamaños comprendidos entre 0.03 μm

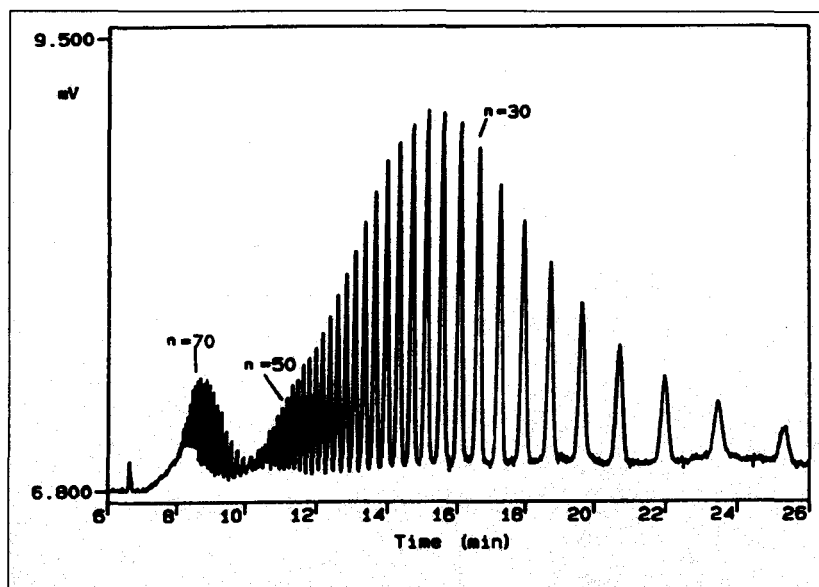


Figura 6: Separación de oligómeros PEG derivatizados con anhídrido ftálico

y 1.16 μm de diámetro empleando capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno²³. En ambas aplicaciones se utilizó un detector de absorción de ultravioleta operando a 254 nm y voltajes de separación en torno a los 30 kV, lo que proporcionó tiempos de análisis inferiores a los 5 minutos para la mayoría de las separaciones.

Dentro de la separación de partículas poliméricas por CZE se encuentra el trabajo realizado por Mc Cormick²⁴ en el que lleva a cabo la separación de partículas de sílice coloidal de entre 5 y 500 nanómetros de tamaño. Según el autor, la rapidez de estas separaciones ($t < 20$ min) evita posibles interferencias en el análisis debido a reacciones de agregación de estos sistemas coloidales, si bien las eficacias que se obtuvieron en estas separaciones fueron muy bajas. También por CZE se ha llevado a cabo la separación de partículas composite formadas por polianilina coloidal y poli(N-vinilpirrolidona) de aquellas formadas por sílice coloidal y poli(N-vinilpirrolidona)²⁵, aunque en este caso los autores mencionan que la posible agregación entre dichas partículas parece ser la responsable de la poca reproducibilidad que obtienen entre separaciones. En ese mismo trabajo los autores no pudieron separar las partículas composite formadas de sílice coloidal y poli(N-vinilpirrolidona), de las partículas formadas por polipirrol y poli-vinil alcohol. La necesidad de que el polímero o polímeros a separar por CZE presenten carga eléctrica, origina que en algunas aplicaciones se lleve a cabo la reacción de los polímeros con una sus-

tancia que les proporcione carga eléctrica previo a su análisis por CZE. Este es el caso de la separación de polímeros de polietilenglicol realizada por Bullock²⁶, previa reacción con anhídrido ftálico, lo que permitió la separación por CZE de estos polímeros con pesos moleculares desde 1000 hasta 3500 en tiempos de análisis inferiores a los 30 minutos como se muestra en la Figura 6. También se han desarrollado procedimientos que permiten derivatizar los denominados polímeros Jeffamine (poli(oxalquilen) diamina) con un agente fluorescente como el 2,3 naftalendialdehído, lo que permite monitorizar la separación empleando fluorescencia inducida por láser²⁷. Mediante este procedimiento ha sido posible separar en menos de 15 minutos 30 oligómeros de poli(oxietileno) diamina con un peso molecular promedio en peso de 600 que difieren en tamaño entre sí sólo en un grupo $-\text{CH}_2-$.

Otra interesante aplicación de CZE en el análisis de polímeros sintéticos es el trabajo realizado por Pesak y col.²⁸ en el que muestran que es posible llevar a cabo la separación de dendrímeros de fenilacetileno terminados con butilésteres en su periferia, de aquellos dendrímeros de fenilacetilenos terminados en ácido carboxílico, lo que permite seguir la transformación de uno en otro mediante un proceso termolítico en estado sólido, así como la síntesis de estas moléculas dendríticas.

El empleo de CZE ha permitido también llevar a cabo el seguimiento de la liberación controlada de fármacos desde diferentes sistemas copoliméricos for-

mados por poli(vinilpirrolidona-co-hidroxietilmetacrilato). Mediante esta técnica se observó que la composición del copolímero controlaba la velocidad de liberación del fármaco (hormona de crecimiento) y que además era posible analizar simultáneamente la disolución del polímero y la liberación del fármaco, estando ambas relacionadas²⁹.

Polímeros analizados por CGE

En este caso la separación de las sustancias se consigue debido al efecto de tamiz molecular que aporta un gel covalentemente anclado a la pared del capilar o un polímero disuelto en el tampón de separación. Los geles covalentemente anclados a la pared del capilar, normalmente de poli(acrilamida) entrecruzada, fueron los que inicialmente se utilizaron en CE para obtener un efecto de tamiz molecular. Su aplicación al análisis de polímeros ha sido escasa; una de estas aplicaciones ha sido la del análisis de cadenas de poliácido acrílico (conteniendo desde 7 a 14 unidades) según su masa molecular mediante CGE acoplada a un espectrómetro de masas³⁰. Sin embargo, este tipo de geles ha caído en desuso (debido a los múltiples problemas de estabilidad y reproducibilidad que originaban) siendo actualmente sustituidos por polímeros no entrecruzados (p.ej., derivados de celulosa, de poli(acrilamida), de poli(vinilalcohol), dextrano) que disueltos en el tampón de separación originan el mismo fenómeno de tamiz molecular. Una de las primeras aplicaciones de CGE con un polímero disuelto en el tampón de separación fue la presentada por Poli y Schure³¹. En este trabajo, los autores emplearon hidroxetilcelulosa como aditivo al tampón de separación para conseguir la diferenciación de ocho poliestirensulfonatos según su peso molecular (el cual iba desde 1800 hasta 1200000) en un tiempo de análisis de 10 minutos. Los autores compararon CGE con otra técnica clásica para la caracterización de polímeros, como es la cromatografía de exclusión molecular (SEC) y encontraron que CGE proporcionaba mejores resultados en términos de resolución, eficacia, mayor intervalo de pesos moleculares analizable y una velocidad de análisis tres veces superior a la proporcionada por SEC.

CGE también se ha utilizado como CZE para el análisis de partículas obtenidas a partir de polímeros sintéticos. Así, en el trabajo realizado por Radko y col.³², llevan a cabo la separación de partícu-

las de poliestirencarboxilato de poliestireno según su tamaño (comprendido entre 2.8 y 10.3 μm) en un medio tampoador que contiene poliácridamida lineal. Las partículas fueron previamente derivatizadas con isotiocianato de fluoresceína para llevar a cabo su detección mediante fluorescencia inducida por láser y demostraron que el límite del tamaño de partícula analizable por CGE está en torno a 10 μm como resultado de la fluctuación de la fluorescencia observada debido a fenómenos de dispersión de luz.

En CGE, al igual que en CZE es necesario que los polímeros a analizar presenten carga eléctrica; el problema radica en que muchos de los polímeros sintéticos no presentan carga eléctrica y por tanto no podrían ser analizados mediante este modo de CE. Para solucionar este problema una de las principales estrategias es la de modificar el polímero antes de su análisis por CGE. Así, Wallingford³³ llevó a cabo el análisis de polietilenglicoles (PEG) y de detergentes no iónicos previa reacción con anhídrido ftálico, obteniendo el correspondiente derivado ftalato de las moléculas de PEG con carga negativa y un grupo cromóforo para su detección por UV a 280 nm. Barry y col³⁴ analizaron los mismos compuestos utilizando como agente derivatizante 1,2,4 anhídrido bencenotricarboxílico, transformando las macromoléculas neutras en compuestos con carga negativa y grupo cromóforo usando detección UV a 210 nm. Un ejemplo de las buenas posibilidades de este procedimiento es la separación obtenida por Wallingford³³ al separar 120 oligómeros de una mezcla de PEG 1000, 3350 y 4600 como derivados ftalato-PEG mediante CGE. En este caso el límite de pesos moleculares que pudieron ser analizados fue de 4600 debido a la disminución en la sensibilidad de la detección UV con el tamaño molecular que normalmente aparece tanto en CGE como en SCE. Además, debido a que Wallingford utilizó columnas capilares rellenas con gel de poliácridamida entrecruzada covalentemente unido a la pared del capilar, el método presentó como principales limitaciones los largos tiempos de análisis (casi 90 min) junto con una baja estabilidad y durabilidad de este tipo de columnas rellenas de gel. Estas limitaciones fueron posteriormente superadas por el trabajo de Barry y col³⁴ al utilizar dextrano disuelto en el tampón de separación como tamiz molecular.

También por CGE se ha podido llevar a cabo el análisis de polímeros sintéticos

inorgánicos con elevada carga eléctrica, como son los polímeros de fosfatos condensados³⁵ o policationes de 2-vinil piridina³⁶ utilizando respectivamente poliácridamida lineal y polimaltotriosa disueltos en el tampón de separación como tamiz molecular. El análisis de los polímeros de fosfatos condensados, debido a su casi nula absorbancia en el rango de UV normalmente empleado para la detección, se llevó a cabo utilizando detección UV indirecta. Esto se consiguió añadiendo ácido piromélico al tampón de separación para obtener una absorbancia de fondo muy elevada a 254 nm, observándose entonces los polímeros inorgánicos como picos negativos en los electroforegramas.

Polímeros analizados por MEKC

Como se ha mencionado más arriba, la separación de sustancias por CZE o por CGE implica que estas sustancias deban llevar carga eléctrica, de modo que el campo eléctrico ejerza un efecto selectivo sobre ellas (según su diferente relación carga/masa o su diferente tamaño molecular). La particularidad de MEKC es que permite separar polímeros sin carga eléctrica en función de su diferente hidrofobicidad o incorporar este parámetro, la hidrofobicidad, a la separación que se haría según la específica relación carga/masa o tamaño de las sustancias con carga. Como ya se ha comentado más arriba, este efecto se consigue añadiendo al tampón de separación un detergente (normalmente dodecilsulfato sódico, SDS) con el que interacciona de forma distinta cada polímero según su diferente hidrofobicidad, facilitando esta diferente interacción su separación.

Hasta la fecha el empleo de MEKC no está muy extendido en el análisis de polímeros sintéticos, si bien ya se ha demostrado su potencial a través de varias aplicaciones. Así, Bullock demostró en 1993²⁶ las posibilidades de esta técnica al llevar a cabo la separación de una serie de oligómeros de Triton X que iban desde 1 hasta 46 unidades en menos de 20 minutos utilizando SDS en el tampón de separación. La interacción hidrófoba que se establece entre los diferentes polímeros neutros de Tritón X y la fase pseudoestacionaria formada por el detergente SDS cargada negativamente permiten separar estas macromoléculas. Más recientemente Gallardo y col³⁷ demostraron por primera vez las posibilidades de MEKC para caracterizar y monitorizar la síntesis de copolímeros neutros obtenidos de la

polimerización radical de N-vinilpirrolidona (VP) y 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Los resultados obtenidos por MEKC se compararon con los obtenidos por cromatografía de exclusión molecular (SEC), proporcionando ambas técnicas similar información, si bien la obtenida por MEKC fue más precisa al proporcionar separaciones con mayor resolución que SEC en similares tiempos de análisis. Estos resultados han permitido la aplicación de MEKC para el seguimiento de la liberación de ciclosporina (un fármaco utilizado para evitar los rechazos en los transplantes de órganos) desde matrices copoliméricas formadas a partir de VP-HEMA, demostrando tanto en ensayos in-vitro³⁸ como in vivo³⁹ que la composición del polímero utilizado controla la velocidad de liberación del fármaco.

Un ejemplo del efecto simultáneo que la hidrofobicidad y relación carga/masa de algunos polímeros iónicos tiene sobre la selectividad de la separación, es el trabajo realizado por Gyorffy y col⁴⁰. En este trabajo los autores demuestran que no es posible obtener una buena separación por CZE de diferentes polímeros de N-vinilpirrolidona-co-ácido maleico incluso a muy diferentes pHs de separación, probablemente como resultado de la similar relación carga/masa de estas macromoléculas. La adición de SDS al tampón permite la separación de estos polímeros por MEKC como resultado del efecto hidrófobo (a través de la interacción polímero-SDS) sobre la selectividad de la separación.

Bibliografía

1. J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs. *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1305.
2. W.G. Kuhr. *Anal. Chem.* 62 (1990) R403-R414.
3. A.S. Cohen, A. Paulus, B.L. Karger. *Chromatographia*. 24 (1987) 15-24.
4. A. Tiselius. *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937) 524-531.
5. A.G. Ewing, R.A. Wallingford, T.M. Olefirowicz. *Anal. Chem.* 61:4 (1989) 292A-303A.
6. J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs. *Science*. 222 (1983) 266-272.
7. A.S. Green, J.W. Jorgenson. *J. High Resol. Chromatogr.* 7 (1984) 529-531.
8. J. Pospichal, P. Gebauer, P. Bocek. *Chem. Rev.* 89 (1989) 419-430.

9. S. Hjertén, M. Zhu. *J. Chromatogr. A* 346 (1985) 265-270.
 10. X. Liu, Z. Susic, I.S. Krull. *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 165-190.
 11. J.R. Mazzeo, I.S. Krull. *Biochromatography* 10 (1991) 638-645.
 12. T.J. Pritchett. *Electrophoresis*. 17 (1996) 1195-1201.
 13. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando. *Anal. Chem.* 57 (1985) 834-841.
 14. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, Ando, A. Teiichi. *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.
 15. J.H. Knox, I.H. Grant. *Chromatographia*. 24 (1987) 135-142.
 16. A.S. Cohen, B.L. Karger. *J. Chromatogr. A* 397 (1987) 409-417.
 17. A. Guttman, A.S. Cohen, D.N. Heiger, B.L. Karger. *Anal. Chem.* 62 (1990) 137-141.
 18. A.E. Barron, D.S. Soane, H.W. Blanch. *J. Chromatogr. A* 652 (1993) 3-16.
 19. *Capillary Electrophoresis. Theory and Practice*, P.D. Grossman, J.C. Colburn (Eds), Academic Press, San Diego, 1992.

20. *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, P.G. Righetti (Ed), CRC Press, Boca Raton, 1996.
 21. A. Cifuentes, H. Poppe, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2362.
 22. B.B. VanOrmann, G. L. McIntire, *J. Microcol. Sep.*, 1 (1989) 289-293.
 23. H.K. Jones, N.E. Ballou, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2484-2490.
 24. R.M. McCormick, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 939-952.
 25. J. Janca, S.L. Hen, M. Spirkova, J. Stejskal, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997) 303-306.
 26. J. Bullock, *J. Chromatogr.* 645 (1993) 169-177.
 27. L.N. Amankwa, J. Scholl, W.G. Kuhr, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2189-2193.
 28. D.J. Pesak, J.S. Moore, T.E. Wheat, *Macromolecules* 30 (1997) 6467-6482.
 29. A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, C. Montenegro, M. Rebuelta, A. Gallardo, C. Elvira; *J. San Román. J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 11 (2000) 993-1005.
 30. F. Garcia, J.D. Henion, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 985-990.

31. J.B. Poli, M.R. Schure, *Anal. Chem.* 64 (1992) 896-904.
 32. S.P. Radko, M.M. Garner; G. Caifa; A. Chrambach, *Anal. Biochem.* 223 (1994) 82-87.
 33. R.A. Wallingford, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2541-2548.
 34. J.P. Barry, D.R. Radtke, W.J. Carlton, R.T. Anselmo, J.V. Evans, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 13-19.
 35. T. Wang, S.F. Li, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 159-165.
 36. C.F. Welch, D.A. Hoagland, *Polym. Prepr.* 39 (1998) 771-771.
 37. A. Gallardo, A. Rocío Lemus, J. San Román, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa. *Macromolecules* 32 (1999) 610-617.
 38. A. Gallardo, F. Fernández, P. Bermejo, M. Rebuelta, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, *J. San Román. Biomaterials* 21 (2000) 915-921.
 39. J. San Román, A. Gallardo, F. Fernández, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, P. Bermejo, M. Rebuelta, A. López-Bravo. *J. Control. Release*, En prensa.
 40. E. Gyorffy, J. Pato, A. Horvath, *Electrophoresis* 19 (1998) 295-299.

BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN

Revista de Plásticos Modernos

Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid Telf. 91 561 34 41
 Delegación Cataluña: Luis Puig Arcos - Plaza Alfonso X El Sabio, 7 - 08025 Barcelona
 Telf.: 93 436 76 21 - Fax: 93 436 02 26 E. mail: ICTAV54@FRESNO.csic.es

Deseo suscribirme a su revista en las siguientes condiciones:

España: 1 año 7.000 ptas. (42,07) Euros

A este precio se incrementará el 16% de I.V.A.

Ceuta, Melilla, Canarias 1 año 7.000 ptas.

Europa 1 año 61 Euros (10.150 ptas)

Resto países: 1 año 70 \$ USA

Correo aéreo América, África y Oceanía, consultar importe.

Empresa

Nombre y Apellidos

C.I.F. ó N.I.F.

Dirección

.....

Población

D.P. Provincia

Teléfono.....Fax

..... a de de 2.000

Firma

MARQUE UNA X EN LA MODALIDAD DE PAGO ELEGIDA

Cheque nominativo adjunto a nombre de REVISTA DE PLASTICOS MODERNOS

Cheque a recepción de factura

Domiciliación Bancaria (recibos a la vista)

Banco/Caja

Dirección

.....

Población

D.P. Provincia

Titular de la cuenta

Nº cuenta corriente

Clave Entidad Oficina D.C.

Para su comodidad, envíelo por Fax"

91 564 48 53