

1. CARACTERÍSTICAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La electroforesis capilar en zona (CZE) es la modalidad más utilizada a causa de su simplicidad operacional y versatilidad. El intervalo de aplicaciones de la CZE es diverso y las áreas de aplicación pueden ir desde problemas relacionados con la separación de especies pequeñas [1,2] hasta la separación de especies de gran volumen [3,4]. Esto, junto con el hecho que se requieren pequeños volúmenes de muestra, ha despertado una gran expectación en diferentes campos, tal como lo demuestra el incremento de publicaciones realizadas en el área de la bioquímica y biotecnología, industria farmacéutica, análisis clínicos ó medio ambiente [5-14].

El capilar y los viales se llenan con un electrolito con capacidad amortiguadora. La muestra, que está formada por un conjunto de aniones y cationes, se introduce dentro de este sistema ocupando una única zona o franja. Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman parte del sistema. A causa de la alta concentración del electrolito comparada con la concentración de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia serán influidas principalmente por el electrolito mientras que la influencia de la muestra podrá ser despreciada. Cuando haya transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra migrarán cada uno a su velocidad y se separarán en diferentes zonas, según la movilidad de cada analito.

Los principales factores que pueden afectar la separación de los compuestos de interés cuando se utiliza esta modalidad de CE son la composición, la concentración y el pH del electrolito, y el voltaje aplicado [15-25]. Estas variables serán estudiadas en el apartado 3º, donde se realizará un estudio preliminar de separación de diversos herbicidas fenoxiácidos. Un ejemplo de como varía la separación de los analitos en función del electrolito se puede encontrar en el trabajo de *Farran et al.* [16], en el cual analizan herbicidas fenoxiácidos y fenilureas empleando dos electrolitos diferentes (fosfato y el borato). Los autores observan que los mejores resultados se consiguen utilizando el tampón fosfato como electrolito, ya que se obtiene una mayor eficacia y un menor tiempo de análisis. En este mismo trabajo se estudió la influencia del voltaje aplicado en la separación observándose una disminución del tiempo de migración al aumentar el voltaje, así como un empeoramiento en la separación. Un estudio similar puede encontrarse también en la separación de los once fenoles catalogados por la EPA como prioritarios [17]. En este caso también se evaluó la influencia del pH del electrolito y el tiempo de inyección. Los autores

concluyen que para conseguir la separación completa entre un par de estos compuestos, es necesario que las diferencias de los valores de pK_a o de movilidades sean suficientemente grandes, es decir, si estos dos parámetros son muy similares para los dos analitos a separar, no se conseguirá la separación completa.

Para que la diferencia entre los valores de movilidad ó de pK_a entre los diferentes compuestos a separar sea lo suficientemente grande, se pueden añadir modificadores orgánicos [18-22]. Los disolventes orgánicos se adicionan al electrolito en concentraciones que van desde el 5% al 40% v/v, con la finalidad de alterar su polaridad y viscosidad. Este proceso afecta tanto a la movilidad electroosmótica como la movilidad electroforética de los analitos. *Masselter y Zemann* [18] estudiaron la influencia de diferentes disolventes orgánicos (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol y acetonitrilo) en la separación de compuestos fenólicos y observaron una mejoría de la eficacia de separación de estos compuestos en todos los casos sin variar el orden de migración. Otro ejemplo se encuentra en el trabajo de *Kok et al.* [21], en el cual se estudió la separación de compuestos naftalenos sulfonatos con CZE. En este caso, los autores observaron cómo el tipo de disolvente orgánico empleado influía en gran medida sobre los resultados finales: comprobaron que la adición de metanol no implicaba la separación de los compuestos estudiados, mientras que la adición de acetonitrilo hacía posible su separación.

Otra alternativa para conseguir mejorías en la separación es añadir agentes complejantes como las ciclodextrinas (CD) [23-31]. Estos compuestos son oligosacáridos cíclicos que están formados por seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de glucosa, y forman un cono con una cavidad hidrófoba y una superficie hidrófila. La profundidad de la cavidad y la solubilidad de estas especies pueden modificarse por derivatización. Básicamente las CD son neutras y forman complejos con los compuestos a separar, lo cual modifica sus movilidades electroforéticas.

1.2. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

Una de las principales ventajas de la EC es que requiere una instrumentación relativamente simple: una fuente de alto voltaje, un capilar cuyos extremos se encuentran sumergidos, junto con dos electrodos, en dos viales que contienen una disolución amortiguadora, un detector y un sistema de adquisición de datos (ver figura 1).

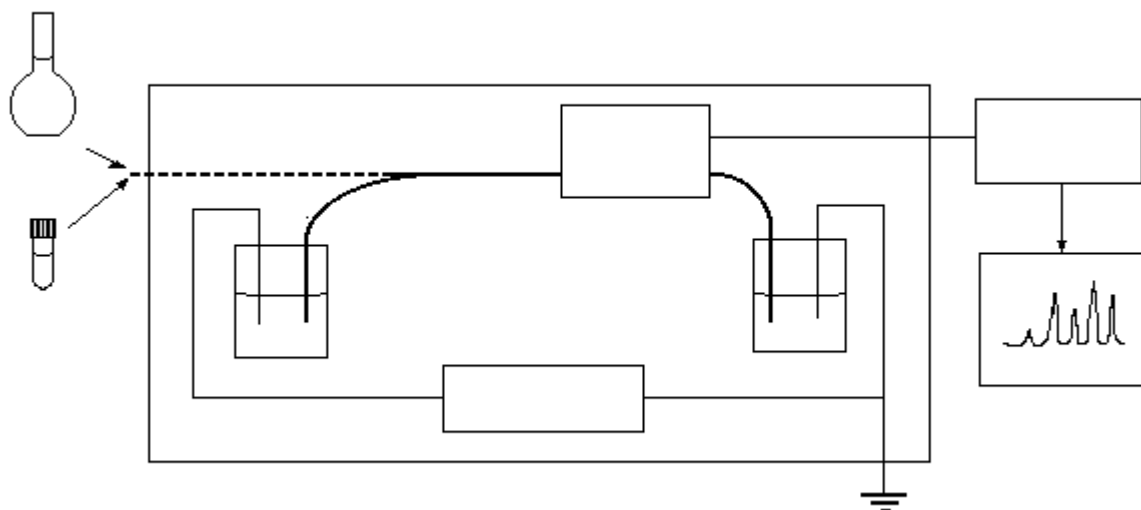


Figura 1: Esquema de un sistema de EC.

La *fente de potencial* normalmente es capaz de proporcionar entre 0 y ± 30 kV. Es una fuente de corriente continua conectada a dos electrodos de platino inmersos en un electrolito. En la presente memoria se ha trabajado en polaridad positiva, aplicando el voltaje al electrodo del vial de entrada, y conectando el electrodo sumergido en el vial de salida a tierra. La intensidad de corriente máxima se establece entre 500 y 1000 μ A por razones de seguridad [32].

Las *columnas* de EC son capilares de sílice fundida de diámetros internos entre 10 y 100 μ m (habitualmente 50 μ m) cubiertas con poliamida para darle flexibilidad y disminuir su fragilidad. El pequeño diámetro facilita la disipación del calor generado por la resistencia eléctrica del electrolito dentro del capilar. La sílice fundida es un conductor de calor mejor que cualquiera de los otros materiales usados para fabricar capilares de diámetro pequeño (teflón, pyrex).

Los *recipientes del electrolito*: Durante las separaciones, los extremos del capilar están colocados en dos recipientes que contienen una disolución del electrolito, el mismo con el que se

ha llenado la columna. Junto con otras condiciones, la composición del electrolito define el método de análisis. Ambos recipientes contienen el mismo electrolito y su nivel ha de ser el mismo en los dos para evitar cualquier flujo debido a un desequilibrio hidrostático. Al introducir el electrolito en el capilar, es frecuente que se formen burbujas de aire, que pueden provocar fluctuaciones en la línea de base e interrumpir la corriente eléctrica. Para evitar este problema, el electrolito es desgasificado mediante cualquiera de las técnicas usadas en HPLC: burbujeando He, por sonicación o por microfiltración en vacío.

1.3. INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Para preservar las elevadas eficacias teóricas de la EC, el sistema de inyección no debería introducir un ensanchamiento de zona significativo. Por esto, los métodos de inyección empleados evitan el posible ensanchamiento de zona debido a la conexión con válvulas de inyección. Existen diferentes sistemas de inyección en EC, que se basan en aplicar un gradiente de voltaje (electrocinética) o un gradiente de presión (hidrodinámica o hidrostática) entre los dos extremos del capilar. En todos los casos, para introducir la muestra dentro del capilar se cambia el vial de entrada por un vial con muestra y se aplica la inyección durante 10-30 segundos [33] introduciéndose en el capilar un volumen de muestra del orden de nanolitros.

1.3.1. Inyección hidrodinámica.

La introducción de la muestra al capilar mediante una diferencia de presión entre los dos extremos de la columna es el método más convencional de inyección. Tal y como se muestra en la figura 2, existen diferentes formas de producir una presión superior al extremo del capilar en contacto con la disolución de la muestra: por *flujo gravitatorio* de la disolución electrolítica mediante la elevación del vial con la muestra, mediante la aplicación de *presión* sobre la muestra, y por *succión* de la muestra mediante aplicación de vacío al vial de salida. Esta última técnica es la que se ha utilizado en la parte experimental de la memoria. La cantidad de muestra inyectada por gravedad se puede calcular a partir de la expresión:

$$w = \rho \cdot g \cdot r^4 \cdot h \cdot C \cdot t_i / 8 \cdot \eta \cdot L \quad (1)$$

donde ρ es la densidad de la muestra, g la constante de la aceleración gravitacional, r el radio del capilar, h la diferencia de alturas, C la concentración de la muestra, t_i el tiempo de inyección, η la viscosidad de la disolución y L la longitud del capilar.

La cantidad de muestra inyectada por presión o succión se puede calcular a partir de la ley de Poiseuille:

$$w = r^4 \cdot P \cdot C \cdot t_i / 8 \cdot \eta \cdot L \quad (2)$$

donde P es la diferencia de presión a través del capilar.

Figura 2: *Sistemas de inyección de la muestra en EC (el vial de la izquierda corresponde a la disolución problema): hidrodinámica (A, B, C) o electrocinética (D).*

Este tipo de inyección no depende de la movilidad electroforética de los solutos ni de la composición de la disolución de la muestra. El volumen de muestra inyectada viene definido por las dimensiones del capilar, la viscosidad del electrolito, la presión aplicada y el tiempo. También se ha de controlar con precisión la temperatura del capilar, ya que la viscosidad del electrolito puede verse afectada y variar la cantidad de muestra que se inyecta.

Por otro lado, uno de los problemas que puede haber en los sistemas electroforéticos desde el punto de vista de la inyección es la inyección espontánea. Este tipo de inyección incontrolada se debe a la diferencia de la altura entre el vial que contiene la muestra y el electrolito. Se ha de tener en cuenta que los niveles de líquido de estos dos viales sean iguales, ya que si no puede desarrollarse un flujo hidrodinámico y afectar la señal de respuesta, la eficacia de separación o la repetibilidad de los tiempos de migración.

También pueden surgir problemas de inyección incontrolada cuando se sumerge el capilar dentro del vial de la muestra. Algunos de estos efectos los han tratado *T.T Fishman et al* [34] en su estudio sobre la inyección espontánea en técnicas que utilizan capilares de pequeño diámetro interno. Para poder observar todos los efectos asociados a este proceso, los autores emplearon técnicas de videomicroscopía en sistemas de CE. Comprobaron que la formación de una diferencia de presión interfacial entre la gota que se arrastra cuando se saca el capilar del vial de muestra y el electrolito que hay dentro del capilar es el efecto dominante en el proceso de inyección espontánea. También comprobaron que la cantidad de muestra introducida mediante este proceso depende del tiempo y de la presión de vapor que hay alrededor del capilar.

En gran parte de los instrumentos de CE la diferencia de presión se utiliza, además de para introducir la muestra, para renovar el electrolito del capilar, ya que normalmente se ha de cambiar después de un número determinado de análisis si se quiere conseguir repetibilidad en el tiempo de migración de las especies a determinar.

También es posible interrumpir la separación una vez se han obtenido los picos de interés aplicando una diferencia de presión lo suficientemente alta como para limpiar el capilar. En la bibliografía existen diversos trabajos que estudian el efecto provocado por el paso de electrolito a través del capilar después de cada análisis y aplicando una diferencia de presión elevada [35], obteniéndose mejores repetibilidades cuando el electrolito se renueva después cada réplica que cuando no se renueva. Actualmente existen instrumentos comerciales que disponen de sistemas mecánicos para que el electrolito pueda renovarse de forma automática [36].

1.3.2. Inyección electrocinética.

La inyección electrocinética está basada en el hecho de que el voltaje puede causar movimientos electroforéticos y electroosmóticos. Se introduce un extremo del capilar en el vial que contiene la muestra y el otro extremo en el vial que contiene el electrolito, y se aplica un voltaje elevado durante un breve periodo de tiempo. En este caso, los compuestos se introducen en el capilar por la acción conjunta de la migración y del efecto de la movilidad electroosmótica. Si el voltaje se aplica solamente durante un periodo de tiempo corto, la muestra se introducirá principalmente por el movimiento electroforético.

La cantidad de soluto inyectado mediante electromigración se determina a partir de la ecuación:

$$w = \mu \cdot t_i \cdot V_i \cdot C / L \quad (3)$$

donde μ es la movilidad de cada componente de la muestra y V_i el voltaje de inyección.

Desde el punto de vista instrumental, el sistema de inyección electrocinética es más simple que el sistema de inyección hidrodinámica. Además, todos los sistemas CE están preparados para poderla aplicar, ya que la misma fuente de voltaje que se hace servir para realizar el proceso de separación se puede utilizar en la aplicación del campo eléctrico necesario para la inyección de la muestra.

En este sistema de inyección, la cantidad inyectada es función de la movilidad electroosmótica de cada componente individual de la muestra. Este hecho genera algunas objeciones importantes, como la posibilidad que se discriminen algunas especies iónicas (las especies con más movilidad serán inyectadas en mayor cantidad) o bien que varíe la cantidad de muestra inyectada en función de la conductividad del medio. Por tanto, la matriz de la muestra influye en esta modalidad de inyección. Todos estos fenómenos hacen que se considere la inyección electrocinética menos reproducible que la inyección hidrodinámica. En el trabajo de *Fung et al.* [37] se comparan estas dos modalidades de inyección, y se realiza un amplio estudio de análisis de aniones orgánicos e inorgánicos en agua de lluvia. Los autores concluyen que la cantidad de análito inyectada depende de la movilidad de los aniones y de la fuerza iónica de la muestra. También se demuestra que la utilización de un estándar interno optimiza la precisión de este tipo de inyección, aunque no llega a ser tan buena como la de la inyección hidrodinámica. Los límites de detección de los compuestos estudiados mediante la inyección electrocinética son aproximadamente cinco veces más bajos que los conseguidos con la hidrodinámica. En la

bibliografía se pueden encontrar otros trabajos que comparan los resultados analíticos obtenidos utilizando las dos modalidades de inyección [12,13,38]. En todos los casos, la precisión de los resultados es superior en la inyección hidrodinámica.

La inyección electrocinética se puede utilizar como sistema de preconcentración si la conductividad de la muestra es más baja que la del electrolito, y si se escoge adecuadamente la polaridad del voltaje de inyección. Este proceso es posible debido a que el campo eléctrico es más alto en el punto de inyección que dentro del capilar, lo cual hace aumentar la cantidad de muestra inyectada [39]. Se ha de tener en cuenta que los iones de la muestra que tengan carga opuesta a los analitos de interés no se introducirán dentro del capilar si no lo hacen por electroosmosis. Además, los analitos de interés migrarán a diferentes velocidades y se inyectarán en más cantidad aquellos que tengan mayor movilidad. En el trabajo de *Wojtusik et al.* [40] se estudian diferentes factores que afectan el análisis de iones a nivel de trazas cuando se aplica la inyección electrocinética. En este trabajo se comenta que el hecho de inyectar hidrodinámicamente una pequeña cantidad de agua antes de la inyección electrocinética puede aumentar la cantidad de muestra inyectada, ya que se incrementa el campo eléctrico en el punto de inyección.

Muchas aplicaciones que determinan aniones inorgánicos a bajos niveles de concentración utilizan la inyección electrocinética como modalidad de inyección [11,38,40-47]; un ejemplo es la monitorización de estos compuestos en aguas que provienen del circuito primario y secundario de centrales nucleares [41,45].

1.4. PROPIEDADES DEL CAPILAR

El rápido desarrollo de las diferentes técnicas de CE ha sido posible gracias a la disponibilidad de capilares de diámetro pequeño. La condición de que los capilares sean de diámetro pequeño (25-100 μ m) es un requisito necesario para la buena disipación del calor por efecto Joule. Capilares con diámetros superiores a 150 μ m dificultan la utilización de campos eléctricos lo suficientemente grandes como para mover las especies iónicas en la dirección del electrodo correspondiente.

El material que constituye el capilar ha de tener una serie de propiedades: ha de ser químicamente y eléctricamente estable, transparente a la luz ultravioleta y flexible. Desde el punto de vista práctico, la sílice fundida es el material que más se utiliza para fabricar estos capilares. Para poder aumentar la flexibilidad de los capilares confeccionados con este material y manipularlos más fácilmente, se protegen con una capa externa de poliamida. Pero este recubrimiento no es transparente a la luz ultravioleta, lo cual provoca que se tenga que eliminar unos milímetros de la parte del capilar que actuará como celda de detección.

Hay diferentes sistemas para eliminar esta porción de poliamida; *el método térmico* es la forma más simple, ya que consiste en eliminar este recubrimiento mediante una llama. Únicamente se ha de mantener en contacto el capilar sobre la llama durante unos segundos, de esta forma se descompone el recubrimiento de poliamida. Los residuos se eliminan después con un trozo de papel suave humedecido con metanol. Se ha de tener mucho cuidado al manipular el capilar una vez se ha eliminado la porción del recubrimiento, ya que en este punto es muy frágil. Uno de los inconvenientes más grandes de este método es que el exceso de calor de la llama podría hacer disminuir la homogeneidad del capilar y aumentar su fragilidad. Para evitarlo se han desarrollado sistemas que permiten controlar mejor la exposición del capilar al calor [33]. Estos sistemas constan de un filamento eléctrico que permite ajustar la temperatura para evitar un calentamiento excesivo. *El método químico* utiliza reactivos químicos para eliminar la porción de poliamida, como por ejemplo el ácido sulfúrico concentrado caliente (100 °C). *El método mecánico* es el único capaz de eliminar el recubrimiento de poliamida sin afectar negativamente la pared del capilar, ya que en este caso se utiliza un enformador especial [49]. En cambio, los otros dos métodos pueden afectar más o menos la superficie del capilar.

A pesar de sus inconvenientes, el método térmico predomina en los usuarios de capilares con recubrimiento de poliamida (es el método utilizado en esta memoria). El método químico y el mecánico se utilizan en aquellos casos en los que la temperatura puede afectar la estructura del capilar, como por ejemplo en los capilares que tienen el interior recubierto con polímeros.

Un parámetro importante en la reproducibilidad de los resultados de los análisis es la forma física que tienen los extremos de los capilares [25]. En la bibliografía encontramos trabajos que estudian la influencia de esta forma física en la eficacia de separación, por ejemplo *Cohen y Grushka* [50] presentan un estudio de como la forma física del extremo de inyección de los capilares afecta la calidad de la inyección. *Martínez* [51] demuestra como un capilar que tenga el extremo de inyección cerrado con inclinación puede provocar picos con colas y resultados poco reproducibles.

El acondicionamiento del capilar antes de utilizarlo afecta directamente la reproducibilidad de los resultados. Experimentalmente se ha comprobado que cuando se utilizan capilares de sílice fundida, un acondicionamiento inicial a pH alcalinos es suficiente para obtener un valor constante de movilidad electroosmótica y una reproducibilidad satisfactoria de los tiempos de migración. *Lambert et al.* [52] presentaron un estudio referente a los efectos sobre la movilidad electroosmótica resultantes de acondicionar inicialmente el capilar a pH alcalino o a pH ácido. De estos resultados se deduce que no es recomendable realizar acondicionamientos de capilares a valores de $\text{pH} < 6$, ya que para estos valores se observa mayor inestabilidad de la movilidad electroosmótica. Además, cuando el acondicionamiento se hace a pH ácido, las movilidades son menores que cuando se realiza a pH alcalino. La conclusión final de este trabajo es que una disolución de pH alcalino, por ejemplo, una disolución de hidróxido de sodio a pH 12, es el mejor sistema de acondicionamiento para conseguir una movilidad electroosmótica constante y reproducible. Actualmente hay muchos autores que utilizan esta forma para acondicionar un capilar nuevo [1,21,53-60], aunque se encuentran muchas variaciones en la manera de hacerlo. *Lin et al.* [55] presentan una modalidad que combina el pH alcalino con altas temperaturas (60 °C). La secuencia que presentan es la siguiente: 10 minutos con NaOH 1M a 60 °C, 10 minutos con NaOH 0,1M y 5 minutos con agua desionizada. En cambio, *Wu et al.* [53] utilizan otra modalidad con NaOH 0,1M durante 60 minutos, seguido de 20 minutos de agua desionizada.

Las condiciones en que se mantienen los capilares cuando no se utilizan son también importantes para aumentar la reproducibilidad de los resultados. En general, se recomienda mantenerlos con aire, sin ninguna disolución, si no se ha de utilizar durante un largo periodo de tiempo, para evitar la formación de cristales, precipitaciones del electrolito o la generación de algas [61]. Para secarlos con aire, normalmente se tiene la precaución de pasar primero agua desionizada, seguido de un disolvente orgánico como el metanol o acetonitrilo y finalmente la corriente de aire.

En los capilares de sílice fundida la dirección de la movilidad electroosmótica es hacia el electrodo negativo, lo cual provoca que se puedan separar de manera rápida los analitos catiónicos, aunque puede resultar bastante negativo para la separación de los analitos aniónicos, que podría requerir una dirección de la movilidad electroosmótica en sentido contrario. Para conseguir esta reversión del flujo se adiciona al electrolito sales de amonio que contienen largas cadenas alquílicas. *Reijenga et al.* [62] evaluaron la efectividad en el cambio de dirección de la movilidad electroosmótica cuando se añaden diferentes aditivos al electrolito; de todos los aditivos empleados solamente el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) causó la reversión de la movilidad electroosmótica hacia el electrodo positivo. Actualmente este aditivo, junto con el bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB), es de los más utilizados para cambiar la dirección del flujo en la determinación de aniones inorgánicos [42,43,45,63-66].

En CE también se utilizan capilares que contienen recubrimientos internos, sobretodo para poder analizar compuestos con tendencia a interaccionar con la sílice fundida. Básicamente los recubrimientos se clasifican en dos grandes grupos: dinámicos y permanentes. En el primer caso, el recubrimiento se consigue adicionando al capilar sustancias como surfactantes o polímeros hidrofílicos lineales [18,67,68]. Dos de las principales ventajas de estos recubrimientos son la regeneración continua y la fácil preparación, ya que solamente se han de disolver en el electrolito, aunque también tienen el inconveniente que a veces es difícil conseguir resultados reproducibles a causa de los cambios que se generan en la superficie interna del capilar. Por otro lado, los recubrimientos permanentes dan resultados más reproducibles, aunque para prepararlos se necesita enlazar covalentemente un polímero a la superficie del capilar. Actualmente se dispone de una amplia gama comercial de recubrimientos permanentes, como por ejemplo recubrimientos hidrofílicos, ligeramente hidrofílicos, moderadamente hidrófobos o altamente hidrófobos [69]. Pudiéndose llegar a eliminar la movilidad electroosmótica con polímeros de viscosidad elevada, el único requisito es que sean polímeros neutros solubles en agua, como por ejemplo la metilcelulosa o la poliacrilamida (PAA).

Los capilares recubiertos se han empleado para determinar proteínas y DNA, y para separar otros compuestos que tienen gran facilidad para quedarse absorbidos en la pared interna de los capilares sin recubrimiento [15,70-73]. Un ejemplo de aplicación de los capilares con recubrimientos puede encontrarse en el trabajo de *Jinno et al.* [72], en el cual se determinan un grupo de drogas tóxicas, entre las cuales hay diferentes barbitúricos, utilizando PAA como recubrimiento. La aplicación del método desarrollado a una muestra de orina en la cual se han adicionado las drogas tóxicas permite determinarlas sin interferencias de la matriz de la muestra.

1.5. SISTEMA DE DETECCIÓN

Tal y como se ha comentado anteriormente, en general la detección se realiza directamente sobre el capilar, lo cual significa que el mismo capilar actúa como celda de detección. El tipo de detector escogido dependerá de los analitos a determinar y, siempre que se pueda, se escogerá aquel que proporcione una sensibilidad elevada para todos los compuestos. Igual que en cromatografía de gases o en cromatografía líquida, existen diferentes detectores que se pueden utilizar en la técnica de CE. A continuación se comentan las principales ventajas y limitaciones de los sistemas de detección más utilizados.

El detector ultravioleta-visible (UV-Vis) es uno de los más empleados en CE, sobretodo a causa de su carácter universal [46,57,59,67,74-79]. En la bibliografía se pueden encontrar aplicaciones de CE con detección UV-Vis para determinar una amplia variedad de compuestos, como por ejemplo, drogas [57], triazinas [59], fenoles [67], bifenilos policlorados (PCBs) [76], plaguicidas organofosforados [78], etc. En la mayoría de estos trabajos la longitud de onda escogida para hacer la detección UV-Vis no es la óptima para cada uno de los compuestos a determinar. Por ejemplo, en el trabajo de *Masselter y Zemann* [67] se determinan compuestos fenólicos en muestras acuosas empleando el detector de absorbancia UV-Vis. La longitud de onda escogida es de 214 nm, que aunque no es el valor óptimo para todos los analitos, representa un compromiso entre las longitudes de onda óptimas de todos los compuestos fenólicos presentes en el estudio, siendo la que proporciona la mayor sensibilidad considerando el sistema global de los compuestos a determinar.

También se utiliza el detector de absorbancia UV-Vis para determinar compuestos que no contienen grupos cromóforos. En este caso el electrolito, o alguna sustancia que se adiciona, absorbe la radiación y el compuesto de interés se determinará por la disminución de absorbancia. Esta detección se llama detección UV-Vis indirecta, y uno de los campos donde más se ha empleado es en la determinación de aniones y cationes inorgánicos [2,8,64-66,80-83]. *P.R. Buchberger et al.* [64] muestran en su trabajo un estudio para optimizar la detección indirecta para el caso de aniones de bajo peso molecular. Los autores evalúan diferentes electrolitos altamente sensibles a la radiación UV-Vis en función de las absorptividades molares y los tiempos de migración. Una de las condiciones que los autores remarcan a la hora de escoger el electrolito es que la movilidad de éste sea lo más similar posible a la de los analitos a separar, para que los picos obtenidos sean lo más simétricos posible. Además, siempre se escogerá el electrolito que tenga mayor absorptividad molar, lo cual le proporcionará mayor sensibilidad. Otro trabajo que también refleja la importancia de la composición del electrolito es el que presentan *Jandik et al.* [81]. En este caso, el estudio está centrado en la determinación de los aniones inorgánicos más

comunes (fluoruro, cloruro, bromuro, nitrito, nitrato, sulfato, fosfato y carbonato) y escogen el cromato como electrolito por tres razones: tiene una movilidad similar a la de los compuestos a separar, tiene una absorptividad elevada y tiene un espectro de absorción UV-Vis amplio. Otras aplicaciones de la detección indirecta se encuentran en la determinación de cationes. *Aupiais* [80] presenta todo un estudio para optimizar la detección indirecta en la determinación de cationes. Se estudia la detección de 39 cationes, y se comprueba que la altura de los picos obtenidos depende de la relación de movilidades de cada catión con la movilidad del ion cromóforo empleado.

El sistema UV-Visible, a pesar de la estabilidad y la facilidad de operación, presenta algunos inconvenientes ya que opera a una única longitud de onda. Puede pasar que no sea la óptima para todos los compuestos incluidos en el estudio, lo cual lleva asociado la consecuente pérdida de sensibilidad. La introducción del detector de diodos en fila (DAD) ha resuelto este problema, ya que permite adquirir al mismo tiempo el espectro de cada uno de los analitos en una mismo análisis. También puede identificar estos compuestos a través del espectro correspondiente y por comparación con espectros de patrones. Todo esto ha hecho que sea uno de los detectores más empleados en los últimos años en diferentes campos [53,71,84]. Un ejemplo de aplicación de estos detectores se encuentra en el trabajo de *Lee et al.* [84], en el cual determinan simultáneamente 5 ditiocarbamatos. En realidad, los autores solamente consiguen separar tres de estos compuestos, ya que dos eluyen al mismo tiempo de migración, pero gracias a que se obtienen los espectros de los diocarbamatos y a la utilización de técnicas quimiométricas, llegan a cuantificar todos los compuestos estudiados.

Una alternativa a la detección UV-Visible es la detección de fluorescencia. En la bibliografía se encuentran trabajos que recogen diferentes estudios de aplicaciones de CE con detección de fluorescencia [85]. Los casos más sencillos son aquellos en que los compuestos de interés tienen características fluorescentes, como por ejemplo la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) [30,86,87]. *Brown et al.* [30] presentan un ejemplo de aplicación de este detector en el cual determinan estos compuestos en muestras de suelos contaminados de diferentes procedencias. El método desarrollado, que incluye la extracción de fluidos supercríticos mediante CO₂, es muy sensible, ya que llega a detectar niveles inferiores a ppb's. A pesar de la gran selectividad de este detector, tiene el inconveniente de que hay pocas aplicaciones en las que los compuestos de interés presenten fluorescencia. Este problema puede ser superado teniendo en cuenta que se puede recurrir a la derivatización de los solutos de interés con moléculas fluorescentes [88,89,90].

La aplicación de la técnica de CE con detección de fluorescencia es ampliamente utilizada en los campos bioquímica y clínico [91-95]. Un ejemplo lo encontramos en el trabajo de *Bergquist et al.* [95], en el cual estudian el análisis de diez aminoácidos en pacientes de Alzheimer. También comprueban como los aminoácidos varían la concentración en función de la edad y del grado de enfermedad de los pacientes, y concluyen que la CE junto con la detección de fluorescencia, puede ser considerada como una herramienta analítica clínica útil.

Igual que en la detección UV-Vis, también se puede optar por utilizar la detección de fluorescencia indirecta, en la cual la especie fluorescente se adiciona al electrolito. Un ejemplo de este tipo de detección se encuentra en el trabajo de *Chao y Whang* [96], en el cual se determinan los once fenoles prioritarios adicionando fluoresceína al electrolito. La aplicabilidad del método propuesto se demuestra analizando diferentes materiales de referencia certificados y aguas residuales industriales de procedencias diversas.

Normalmente tanto la detección UV-Vis como la de fluorescencia se llevan a cabo dentro del mismo capilar. De esta manera se tiene la ventaja de no crear volúmenes muertos, pero lleva asociado el inconveniente de que como los capilares son de diámetro pequeño, hay una sensibilidad limitada. Para evitar esta problemática se han desarrollado diferentes diseños de capilares que amplían la zona de detección, entre los cuales destacan los capilares en forma de Z y los capilares de burbuja [30,97,98].

Otro tipo de detección utilizada en la CE es la detección electroquímica. De todos los detectores electroquímicos posibles, los más utilizados han sido los conductimétricos y los amperométricos. Los conductimétricos se han empleado sobretodo para determinar pequeños iones inorgánicos y ácidos carboxílicos. Un ejemplo de aplicación de este tipo de detección se encuentra en la separación de ácidos carboxílicos en muestras de vinos negros comerciales (Cabernet Sauvignon) realizada por *Huang et al.* [99]. Hay diferentes diseños para los detectores conductimétricos, por un lado los de tipo en columna (*on-column*), que no tienen pérdidas de eficacia, y por otro lado los de final de columna (*end-column*), que se pueden acoplar a cualquier instrumento de CE sin necesidad de hacerle modificaciones, a la vez que pueden actuar conjuntamente con otros detectores, como los UV-Vis, aumentando de esta forma el poder analítico de la técnica. Un ejemplo de actuación conjunta de un detector UV-Vis y un detector de conductividad de final de columna se encuentra en el trabajo de *Klampfl et al.* [100], en el cual determinan aniones inorgánicos y ácidos carboxílicos en muestras de cerveza de diferentes países. Los autores observan que la detección conductimétrica es más atractiva para los aniones que tienen una movilidad diferente de la del electrolito, mientras que la detección UV-Vis indirecta es la recomendada para aquellos que tienen la movilidad similar a la del electrolito.

Concluyen que la utilización simultánea de los dos tipos de detección aumenta el poder de determinación de aniones con movilidades diferentes.

La detección amperométrica también ha estado utilizada en CE [14,101,102,103]. Una de las principales ventajas es su gran selectividad, ya que solamente detecta aquellos compuestos electroactivos al voltaje aplicado, facilitando la determinación en aquellas situaciones en que los compuestos de interés se han de estudiar en matrices más o menos complejas, como son los fluidos corporales. Un ejemplo de este sistema de detección se encuentra en la determinación de catecolaminas [104], como los neurotransmisores dopamina, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol y catecol, compuestos de gran interés a causa de su importancia en la transmisión de impulsos nerviosos. Son fácilmente separables mediante CE; normalmente utilizando fosfato sódico a pH=6 se consigue una buena separación para la mayoría de catecoles y catecolaminas. *Hadwiger et al.* [103] muestran en su trabajo la optimización de la separación y detección de los enantiómeros del isoproterenol en muestras de plasma empleando pequeños volúmenes de muestra. Los autores comprueban como utilizando un detector UV-Vis los límites de detección son excesivamente altos para determinar estos compuestos en el plasma; en cambio, un detector amperométrico disminuye los límites de detección en tres órdenes de magnitud y llega a niveles de ppb's.

El hecho de que con los sistemas de detección nombrados hasta ahora no se puedan identificar los analitos de manera inequívoca, y que en los últimos años hayan aparecido diferentes interfases que posibilitan el acoplamiento entre la CE y la espectrometría de masas (MS), ha supuesto un incremento en el uso de este tipo de detección [105-115]. Una de las interfases más utilizadas en CE-MS es el electrospray, que requiere un flujo mínimo más grande que el desarrollado en la parte de separación mediante CE. Para conseguirlo, normalmente se añade un disolvente orgánico (normalmente acetonitrilo, metanol, acetona o isopropanol), que se mezcla con el eluyente del capilar, formando así un sistema adecuado para la operación del electrospray. En general, se aumenta el grado de sensibilidad si se utilizan electrolitos más volátiles (como por ejemplo el ácido acético) a niveles bajos de concentración, y se minimizan los compuestos no volátiles. Por otro lado, el uso de tensioactivos, como por ejemplo el SDS, incrementa la intensidad de la señal de fondo, y presenta una de las mayores barreras en el acoplamiento de la técnica MECC con la MS [109].

Uno de los campos de aplicación donde más aceptación ha tenido este tipo de detección ha sido el biológico [105-110,115]. Un ejemplo se encuentra en el trabajo de *Takada et al.* [108], en donde se demuestra la posibilidad de acoplar un sistema de microdiálisis con CE-MS para analizar *in vivo* el ácido γ -aminobutírico directamente del cerebro de una rata. También se

encuentran ejemplos que estudian el aumento de sensibilidad de los sistemas CE-MS, como el trabajo de *Thompson et al.* [105], en el que mediante un paso previo de ITP los autores llegan a conseguir un factor de preconcentración de 100. Otros ejemplos de aplicación de este sistema de detección se pueden encontrar también en el campo medioambiental [111,112,114]. *Tsai y Her* [111] observan que la composición del electrolito es una de las variables críticas a la hora de utilizar CE-MS, a la vez que demuestra el potencial de esta técnica determinando el contenido de pentaclorofenol en una muestra de pasta de papel. Otro ejemplo es el trabajo de *Otsuka et al.* [114], en el que se demuestra la aplicabilidad de CE-MS para determinar herbicidas enantioméricos. En este caso la selectividad de la separación viene dada por el uso de ciclodextrinas. Los autores concluyen que empleando un método de ionización negativo se pueden separar los compuestos sin utilizar otras medidas especiales.

1.6. PRINCIPIOS DE SEPARACIÓN

1.6.1. Flujo electroosmótico.

En EC, además de las moléculas de soluto cargadas, la disolución tampón también se desplaza por el capilar bajo la influencia de un campo eléctrico. Este fenómeno se denomina flujo electroosmótico (v_{eo}) [116]. Al trabajar con polaridad positiva, de forma que el polo positivo o ánodo se encuentra en el extremo del capilar donde se realiza la inyección de la muestra, el flujo electroosmótico va del polo positivo al negativo, es decir, que el tampón se mueve del vial de entrada a través del capilar hacia el detector y el vial de salida.

La pared del capilar está constituida por un entramado de grupos silanol Si-OH (ver figura 3), con un pK_a que se encuentra alrededor de 5. Esto hace que al trabajar con soluciones amortiguadoras básicas se encuentre cargada negativamente con grupos silanoato Si-O⁻, y que los H⁺ u otras cargas positivas libres de la disolución se sitúen cerca de las cargas negativas de la pared formando una doble capa. Al aplicar una diferencia de potencial, las cargas libres (positivas y negativas) se moverán hacia los polos contrarios. Como las cargas negativas de la pared del capilar no pueden moverse, existe un flujo resultante de cargas positivas hacia al polo negativo. Los cationes como el H⁺ se encuentran solvatados con moléculas de agua. Esto hace que con su desplazamiento se desplace también todo el seno de la disolución tampón, creando el flujo electroosmótico.

Figura 3: Representación de la pared del capilar.

Una característica única del flujo electroosmótico es que presenta un perfil de distribución plano, el cual solamente se desvía pocos nm de la pared, de forma que proporciona la misma velocidad a todos los solutos, sea cual sea su posición a la columna. Debido a este hecho, el flujo electroosmótico no contribuye de manera significativa al ensanchamiento de banda por

difusión longitudinal, como sí que lo hace el perfil parabólico que se obtiene en HPLC cuando el líquido se impulsa por presión hidrostática.

La velocidad electroosmótica viene dada por la expresión:

$$v_{eo} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{4 \eta} \right) E = \mu_{eo} (V/L) \quad (4)$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del medio, ζ es el potencial zeta (que se crea entre la pared interna y la disolución), η es la viscosidad del líquido, E es el campo eléctrico, μ_{eo} es la movilidad electroosmótica, V es el voltaje aplicado y L es la longitud de la columna.

1.6.2. Flujo electroforético.

Bajo la acción de un campo eléctrico, los solutos iónicos se desplazan a través de la columna debido a dos razones: por un lado, ya se ha comentado que el flujo electroosmótico arrastra todo el seno de la disolución y por tanto, también los solutos iónicos. Por otro lado, la propia carga de un soluto hace que éste muestre una movilidad por sí mismo, llamada flujo electroforético. La movilidad electroforética de un soluto (μ_{ef}) es función de su carga (q), del radio (r , asumiendo una geometría esférica) y de la viscosidad del medio (η), según la ecuación:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6 \eta r} \quad (5)$$

La movilidad electroforética es análoga a la movilidad electroosmótica y tiene las mismas unidades ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). La velocidad electroforética viene dada por la expresión:

$$v_{ef} = \mu_{ef} E = \mu_{ef} (V/L) \quad (6)$$

Cuando se introduce una muestra en la columna y se aplica una diferencia de potencial, cada uno de sus componentes tendrá una movilidad total que dependerá de las velocidades electroosmóticas y electroforéticas:

$$v_T = v_{eo} + v_{ef} \quad (7)$$

Si definimos el tiempo de migración como:

$$t_m = L_d/v_T = L \cdot L_d / \mu_T \cdot V \quad (8)$$

donde L_d es la longitud de la columna hasta el detector, vemos que podemos calcular los valores de los flujos a partir de valores experimentales.

1.6.3. Separación de analitos.

La separación se basa en las diferencias de las movilidades electroforéticas de los solutos iónicos, que harán que los analitos migren a través del capilar y lleguen al detector a tiempos diferentes.

Figura 4: Esquema de la Electroforesis Capilar en Zona (CZE).

La movilidad electroosmótica es normalmente superior a la movilidad electroforética de los solutos iónicos inyectados, haciendo que sea posible separar cationes y aniones en una sola inyección de la muestra. En polaridad positiva, los cationes son atraídos hacia el cátodo y sus velocidades aumentan por el flujo electroosmótico.

Los compuestos neutros no pueden ser separados mediante CZE debido a que no muestran movilidad electroforética. El procedimiento más utilizado es crear un sistema micelar en el tampón que transporte a los analitos, de forma que los compuestos neutros son separados según su interacción con las micelas.

Este procedimiento analítico es un híbrido entre la electroforesis y la cromatografía y fue introducido para *Terabe et al.* en 1984 [117, 118]. Recibe los nombres de electroforesis capilar en fase micelar abreviado como MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography) o MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography). Es la principal técnica analítica utilizada en esta memoria y será estudiada en profundidad en los próximos capítulos.

1.7. FENÓMENOS DE DISPERSIÓN

Durante la inyección, separación y detección de la muestra, las zonas de cada analito se dispersan y provocan un ensanchamiento de los picos del electroferograma. Las causas de esta dispersión son múltiples y afectan de manera relevante a la separación de los compuestos.

a) Dispersión debida a la inyección.

Si se supone que durante la inyección la muestra entra perpendicularmente al capilar y que se difunde radialmente de manera muy rápida, se obtiene un frente rectangular de concentraciones a lo largo de una longitud w_{inj} . Bajo estas condiciones ideales, la dispersión debida a la inyección viene dada por la varianza del frente rectangular σ_{inj}^2 :

$$\sigma_{inj}^2 = w_{inj}^2 / 12 \quad (9)$$

En la inyección real, la difusión radial no es instantánea ni la entrada del capilar es perfectamente perpendicular a su eje, y por tanto el perfil de entrada de la muestra puede alterar en parte este frente rectangular e introducir dispersiones adicionales [119].

A parte de estas causas, algunos autores han encontrado dispersiones importantes durante la retirada y acoplamiento del capilar que han atribuido a diferencias de tensiones superficiales, de densidades o de viscosidades entre la muestra y el tampón, a presiones de inmersión o a turbulencias [120].

b) Dispersión debida a la separación.

Debido a la existencia de gradientes axiales de concentración en la interfase tampón-analito, la difusión de la muestra es inevitable. Si esta fuera la única causa de dispersión, los picos tendrían un perfil gaussiano [121] con una varianza de dispersión de los picos dada por:

$$\sigma_D^2 = 2 \cdot D \cdot t \quad (10)$$

donde D es el coeficiente de difusión. Durante el tiempo de inyección también se produce esta difusión, y por tanto se debería añadir t_{inj} a t para estimar de forma más correcta el valor de la dispersión del pico debido a este efecto.

El calentamiento por el efecto Joule de la disolución de dentro del capilar provoca un perfil radial de temperaturas que no es plano y que, debido al efecto de la temperatura sobre la

movilidad, mueve con diferentes velocidades los analitos según su disposición radial, pudiendo provocar una dispersión extra de los picos dada para la expresión:

$$\sigma_T^2 = 2 \cdot D_T \cdot t \quad (11)$$

donde D_T es el coeficiente de dispersión de Taylor, que depende de diversos factores como son la intensidad de la corriente o la conductividad del tampón [122, 123].

Otro factor que puede contribuir al ensanchamiento de las zonas es la adsorción de los analitos [124], pero si la pared del capilar tiene carga negativa y el peso molecular de los analitos no es demasiado elevado la adsorción de aniones no es importante.

La causa principal que puede introducir fenómenos de asimetría en los picos es la diferencia de movilidades entre la muestra y los iones del tampón que se encuentran cerca de la muestra. Este hecho origina una diferencia de conductividad entre la zona del analito y la zona inmediata al tampón que da lugar a un ensanchamiento de la base del pico. Este ensanchamiento es directamente proporcional a la concentración del analito (anión) y depende de las movilidades del analito, del contra-anión y del contra-cation del tampón [125, 126, 127].

Estos estudios muestran que para minimizar el efecto de asimetría es necesario operar con tampones muy conductivos con concentraciones de analitos bajas. Cuando la movilidad de los contra-aniones del tampón es superior, en valor absoluto, a la del analito, la asimetría se presenta al final, dando picos con cola («tailing») mientras que si se da la situación contraria, la asimetría se encuentra al inicio del pico («fronting»).

La diferencia de pH entre la muestra y el tampón también puede producir ensanchamientos de zona si el pH afecta de forma importante a la movilidad [124].

c) Dispersión debida a la detección.

Las dispersiones debidas a la detección dependen básicamente del diseño del detector, lo cual impide su optimización cuando se trabaja con aparatos comerciales. Sin embargo, estas dispersiones generalmente son muy bajas y tienen poco efecto sobre la dispersión total.

Durante la detección se necesita extraer información de un volumen determinado del capilar, por tanto es necesario una abertura lo suficientemente ancha como para abarcar una determinada región de la ventana de detección. Esta abertura sobre la que se encuentra el capilar

introduce una dispersión similar a la dada por la expresión 9 y, aunque puede ser optimizada [128], en los detectores utilizados es fija.

La constante de tiempo seleccionada en el filtro del detector es otro valor que puede distorsionar la detección del pico [129]. Hay autores que recomiendan un intervalo de constantes de tiempo entre 0.1 y 2 segundos para unas buenas condiciones de análisis.

d) Concentración debida al efecto “stacking”.

El efecto “stacking” permite concentrar la muestra dentro del capilar mientras se está realizando la separación de los compuestos y tiene lugar cuando la conductividad de la muestra inyectada es menor que la del tampón que se utiliza para la separación.

Bajo estas condiciones, una vez se ha acabado de inyectar la muestra y se ha aplicado el voltaje, el campo eléctrico en la zona de la muestra (E_m) es más grande que en la zona del tampón (E_t) debido a que la diferencia de potencial en las zonas es inversamente proporcional a su conductividad (ley de Ohm). Por lo tanto, se cumple que:

$$E_m / E_t = \gamma_R \quad (12)$$

donde γ_R es la relación de conductividades entre el tampón y la muestra en cada momento. Como consecuencia de este efecto, la velocidad de los analitos en la zona de la muestra aumenta respecto a la velocidad de los iones dentro del tampón y provoca una concentración en la zona delantera de la interfase muestra-tampón hasta que se llega a un equilibrio de conductividades. Este efecto se estudiará con detenimiento en el capítulo 4.

e) Dispersión total.

La varianza total de un pico, en unidades de longitud al cuadrado, es aditiva [130,123,124] y se puede expresar como la suma de las varianzas de todos los fenómenos referidos en este apartado:

$$\sigma^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{stack}^2 + \sigma_D^2 + \sigma_T^2 + \sigma_{asim}^2 + \sigma_{detec}^2 + \sigma_{otros}^2 \quad (13)$$

Esta expresión muestra que la dispersión de un pico es un fenómeno complejo de modelizar y que en todas las etapas del análisis mediante CE hay una contribución a la

dispersión. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta qué factores son los predominantes de cara a minimizar su valor.

1.8. CALENTAMIENTO POR EFECTO JOULE

Al conectar un capilar, con una disolución conductiva en su interior, a una diferencia de potencial elevada se produce un paso de corriente eléctrica que calienta la disolución y la muestra por efecto Joule.

Este calentamiento aumenta la conductividad eléctrica de la disolución, las movilidades de las especies, la anchura de los picos y hasta puede afectar la operatividad del aparato bajo condiciones críticas. Debido a todos estos efectos el control de este fenómeno es necesario, particularmente en el caso que se quiera utilizar tampones considerablemente conductivos.

Diversos autores [122,127] modelizan la conductividad eléctrica de la disolución (?) mediante un modelo lineal respecto a la temperatura:

$$\sigma = \sigma_0 (1 + K_T (T - T_0)) \quad (14)$$

El valor σ_0 es la conductividad de la disolución reguladora a la temperatura de referencia T_0 , T es la temperatura de calentamiento y K_T es la variación relativa de la conductividad con la temperatura.

Suponiendo esta variación lineal hay autores que han desarrollado modelos complejos que permiten obtener los perfiles radiales de temperaturas, temperaturas máximas y condiciones críticas [122,131]. Del desarrollo de estos modelos se desprende que el calentamiento es proporcional a la potencia eléctrica que se genera dentro del capilar e independiente (excepto para K_T) del tipo de disolución utilizada.

2. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

2.1. INSTRUMENTACIÓN

Equipo 1: EC-UV.

Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC), Barcelona.

Equipo ISCO (Lincoln, NE, EE.UU.) modelo 3850 que consta de un detector UV *on-column* modelo ISCO CV con lámpara de deuterio que posibilita la obtención de longitudes de onda entre 190 y 360 nm. Equipado con un módulo de inyección para vacío (0.5 psi) y para electromigración (5KV) y con una fuente de voltaje que opera entre 0 y 30KV. Se usa una columna de sílice fundida Supelco de 50 μ m de DI, de 60 cm de longitud total (40 de la zona de inyección al detector). Habitualmente se inyecta mediante vacío durante 20seg. Los datos de la detección se adquirieron con un integrador Spectra-Physics SP-4270 (San José, CA, EE.UU.) o con el software de Varian Star Workstation (Sugar Land, TX, EE.UU.).

Equipo 2: Espectrofotómetro UV-Vis.

Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC), Barcelona.

Equipo Shimadzu modelo UV240 de doble haz con luz de tungsteno en la zona del visible y de deuterio en la zona del ultravioleta, con celdas de detección de sección rectangular de un centímetro de camino óptico.

Equipo 3: HPLC-DAD.

Laboratorio de Análisis de la empresa Cequisa, Barcelona.

Equipo Merk-Hitachi (Darmstadt, Alemania) que consta de una bomba modelo L-6200, detector de diodos modelo L-3000, con lámpara de deuterio que posibilita la detección de longitudes de onda entre 200 y 360 nm., y autoinyector modelo L-7200. La columna utilizada es una C-18 de Merck de 4 mm de diámetro interno y 12.5 cm de longitud. Los datos se adquirieron con el software D-6000 también de Merck.

Equipo 4: Aparato Suntest

Departamento de Química Ambiental del CID-CSIC. Barcelona.

Equipo HERAUS (Hanan, Alemania), equipado con una lámpara de arco de xenón. El rango de longitud de onda de trabajo es entre 300 y 800 nm, y la potencia de la lámpara es ajustable entre 400 y 765 W/m².

Equipo 5: Microtox

Escola Politècnica Superior de la Universitat de Girona

Equipo de Microtox Corporation (Carlsbad, CA, USA) modelo 500, que consta del analizador Microtox, un sistema de recogida y tratamiento de datos, y un reactivo luminiscente. El analizador es un fotómetro con control de temperatura que mide la luz emitida por los microorganismos que forman parte del reactivo luminiscente.

2.2. REACTIVOS

a) *Patrones.*

Los patrones de herbicidas, fenurón, monurón, diurón, monolinurón, linurón, 2,4-DP, 2,4-D, 2,4,5-T y 2,4-DB se obtuvieron de Riedel-de-Haën (Esebre, Alemania). Los patrones de los productos de degradación utilizados en el capítulo 5 (3,4-dicloroanilina, 4cloroanilina, 3,4-diclorofenol, 4clorofenol), se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). En todos los casos se prepararon disoluciones madres de 1.000 ppm en metanol. Las disoluciones de trabajo fueron diluidas en agua.

b) *Tensioactivos.*

El tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania), y el tensioactivo catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) de Aldrich (Steinheim, Alemania).

c) *Electrolitos.*

Las sales de fosfato e hidrogeno fosfato sódico, el ácido cítrico y el citrato sódico fueron suministrados por Merck, mientras que el tetraborato sódico y el hidróxido sódico provenían de Panreac (Barcelona, España). Todos estos reactivos eran de calidad analítica.

d) *Disolventes.*

El metanol provenía de Promochem (Wesel, Alemania), y el acetonitrilo de Romil (Leicester, UK), los dos de grado HPLC. El 1-butanol se obtuvo de Panreac, y el 1-pentanol, 1-hexanol y 1heptanol fueron suministrados por Sigma (St. Louis, USA). El diclorometano se obtuvo de Merck. Todas las disoluciones se realizaron con agua desionizada obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q y fueron filtradas con filtros de 0'45 µm (LIDA, Kenosha, USA) antes de su utilización.

3. ESTUDIO PRELIMINAR DE ANÁLISIS DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS MEDIANTE CZE

3.1. OBJETIVOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Antes de comenzar a realizar estudios de separación de moléculas aniónicas y neutras mediante MECC, se ha realizado un pequeño estudio de separación de herbicidas fenoxiácidos (moléculas aniónicas) mediante CZE.

Con este estudio se pretende tener un primer contacto con la Electroforesis Capilar y observar las variaciones producidas al modificar parámetros básicos de la técnica como son la concentración del tampón o el voltaje aplicado. Los resultados nos servirán como referencia para el capítulo 2º, donde se aplica el sistema MECC en la resolución de mezclas de compuestos aniónicos y neutros conjuntamente.

Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 1.3 del capítulo 2º, con la excepción de que en este caso no se adicionará ningún tensioactivo a la disolución tampón. Los herbicidas fenoxiácidos utilizados son el 2,4-DP, 2,4-D, 2,4,5-T y 2,4-DB, y sus estructuras químicas están descritas en el apartado 1.4 del capítulo 2º.

3.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Movilidad electroosmótica.

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración del tampón y del voltaje aplicado en la separación de los herbicidas fenoxiácidos, se realizaron diversos experimentos para determinar los valores de flujo electroosmótico y electroforético, de eficacia (N) y de resolución (Rs).

El flujo electroosmótico fue determinado a partir del tiempo de migración del fenol (t_{eo}) según la ecuación:

$$\mu_{eo} = \frac{L_d \cdot L}{t_{eo} \cdot V} \quad (15)$$

siendo V el potencial aplicado, L la longitud de la columna capilar y L_d la distancia hasta el detector.

El uso del fenol como marcador de t_{eo} ha sido documentado previamente por *Lukacs et al.* [132]. Tiene un pKa de 10 a 25°C, y al pH de trabajo, pH = 7, es una molécula totalmente neutra.

La influencia de la concentración del tampón y el voltaje en μ_{eo} se muestra en la siguiente tabla:

V	μ_{eo}		
	F.I = 0,01M	F.I = 0,02M	F.I = 0,04M
15	3,32	3,60	2,74
20	4,79	4,92	3,80
25	6,24	5,91	4,81
28	6,83	6,78	5,64

Tabla 1. Efecto de la fuerza iónica (F.I., mol/l) y el voltaje (V, KV) en la movilidad electroosmótica (μ_{eo} , 10^{-8} , $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$).

En concordancia con otros autores [133,134], se observa que el uso de un tampón más concentrado provoca una disminución de μ_{eo} . Estos resultados contradicen las ecuaciones que definen μ_{eo} ya que:

$$\eta_{eo} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \eta} \quad (16)$$

donde ϵ es la concentración dieléctrica del tampón, ζ es el valor del z-potencial de la pared del capilar y η es la viscosidad.

Por lo tanto η_{eo} depende de 3 constantes y debería ser independiente de la concentración del tampón. La variación observada experimentalmente es justificada por algunos investigadores [135] como el resultado de la variación del z-potencial de la pared del capilar (ζ): la diferencia de concentración de aniones en la disolución tampón y en la pared del capilar disminuye cuando se incrementa la fuerza iónica, provocando una disminución de ζ y de η_{eo} .

Con respecto a la influencia del potencial (V) en el flujo electroosmótico, se observa un incremento de η_{eo} al aumentar V debido, principalmente, al efecto Joule [136]: el calentamiento del tampón provoca una disminución de su viscosidad y, según la ecuación (16), un aumento de η_{eo} .

3.2.2. Movilidad electroforética.

Utilizando un potencial de 25KV y fuerzas iónicas de 0.01, 0.02 y 0.04M, se procedió a la separación de los cuatro herbicidas fenoxiacidos. Los valores de los tiempos de retención (t_R) y las movilidades electroforéticas (η_{ep}) calculadas según la ecuación

$$\eta_{ep} = \frac{L_d \cdot L}{V \cdot (t_R - t_{eo})} \quad (17)$$

para las tres concentraciones de tampón, se describen en la siguiente tabla:

	t_R			η_{ep}		
	F.I = 0,01M	F.I = 0,02M	F.I = 0,04M	F.I = 0,01M	F.I = 0,02M	F.I = 0,04M
2,4-DB	9,52	10,31	14,37	-2,11	-2,10	-2,07
2,4-DP	9,77	10,61	14,89	-2,22	-2,21	-2,17
2,4,5-T	9,89	10,75	15,13	-2,27	-2,26	-2,21
2,4-D	10,23	11,16	15,86	-2,40	-2,39	-2,33

Tabla 2. Efecto de la fuerza iónica (F.I., mol/l) en los tiempos de retención (t_R , seg.) y en las movilidades electroforéticas ($\eta_{ep} \cdot 10^{-8}$, $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$).

Se observa un ligero aumento de μ_{ep} al incrementarse la fuerza iónica, mientras que en los tiempos de retención se observan unos aumentos importantes. Estos incrementos de t_R son debidos principalmente a la disminución de μ_{eo} que provoca el aumento de la concentración del tampón, ya que la movilidad total del analito (μ) viene definida como:

$$\mu = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (18)$$

y el tiempo de retención del analito como:

$$t_R = \frac{L_d \cdot L}{V \cdot \mu} \quad (19)$$

3.2.3. Resolución y eficacia.

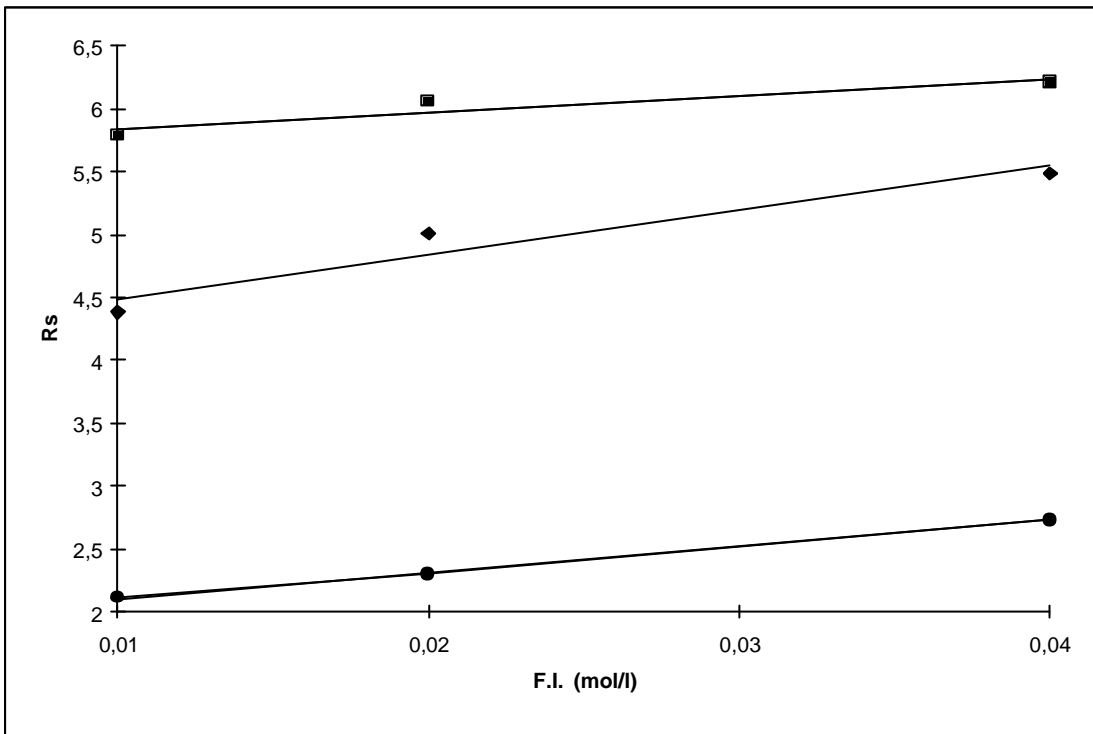
La resolución (Rs) y el número teórico de platos (N) fueron calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$N = 16 \cdot t_R / w \quad (20)$$

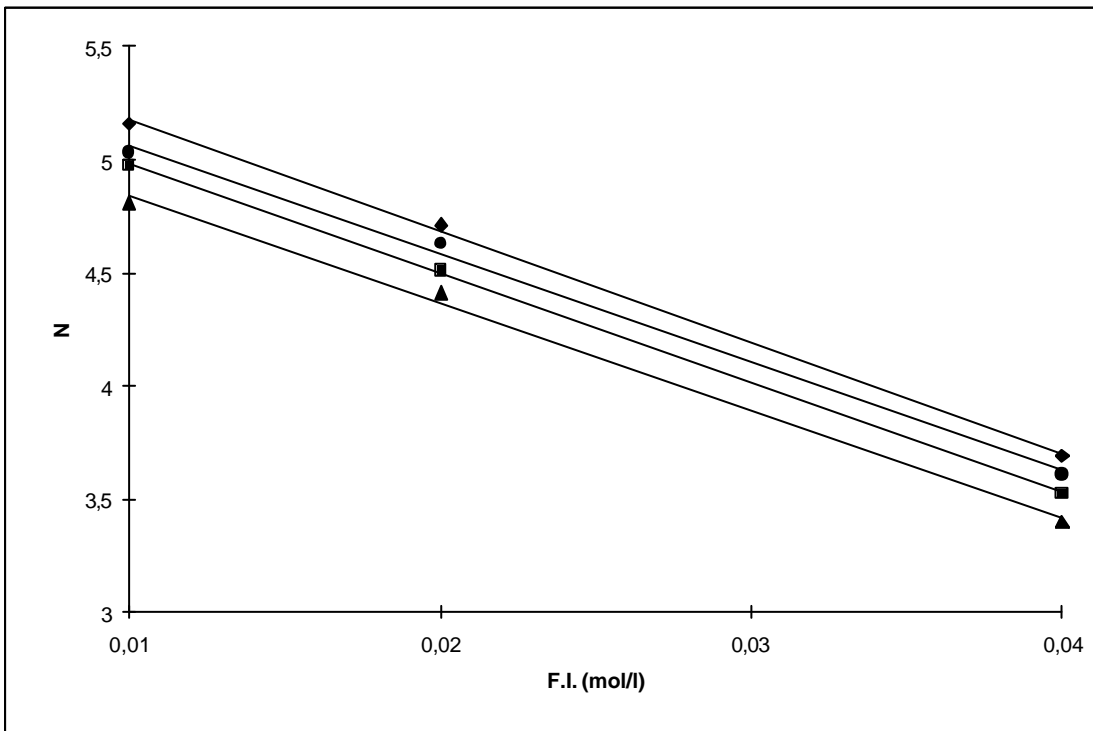
$$Rs = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{(w_1 + w_2)} \quad (21)$$

donde w es la anchura del pico en la línea de base.

Los resultados se muestran en las gráficas 1 y 2.



Gráfica 1 : Resolución (R_s) de los compuestos estudiados utilizando diversas fuerzas iónicas (F.I.). ? R_s entre el 2,4-DB y el 2,4-DP ? R_s 2,4-DP y el 2,4,5-T | R_s 2,4,5-T y el 2,4-D



Gráfica 2 : Eficacia (N , 10^5) de los compuestos estudiados utilizando diversas fuerzas iónicas (F.I.). ? 2,4-D | 2,4,5-T ? 2,4-DP ? 2,4-DB

Se observa que la disminución de la concentración del tampón aumenta N pero disminuye R_s . Esto significa que si utilizamos una movilidad electroosmótica alta (una concentración de tampón baja) obtendremos picos muy estrechos pero mal resueltos, mientras que incrementando la concentración de tampón aumentaremos la resolución entre los picos pero disminuyendo la eficacia y aumentando el tiempo de retención [137].

En nuestro caso, las mejores condiciones para la separación de los compuestos estudiados es la utilización de una fuerza iónica de 0.02M, lo cual permite obtener buenas resoluciones en un tiempo de análisis corto.

Bajo estas condiciones seleccionadas (0.02M de tampón fosfato a pH=7 y un potencial de 25KV) se obtuvo la separación de los cuatro herbicidas con una buena resolución en 10 minutos. Las rectas de calibrado fueron lineales en el rango de concentración entre 10-100 ppm y los límites de detección fueron del orden de 1.5 ppm con una relación señal-ruido de 3. Los coeficientes de variación fueron de 3.5% para las áreas y de 1.0% para el tiempo de migración y para 10 determinaciones.

3.3. APLICACIÓN EN MUESTRAS REALES

Finalmente se realizó una aplicación del método en la determinación del 2,4-DB, 2,4-DP, 2,4,5-T y 2,4-D en muestras del río Ebro dopadas con 0.2 ppm de cada uno de los herbicidas.

Los experimentos de recuperación fueron realizados de forma similar a los expuestos por Hamann y Kettrup [48]: una determinada cantidad de patrón se adicionó a 100 ml de la muestra de agua y acidificada a pH=2 con ácido fosfórico. La muestra se extrajo con 3 porciones sucesivas de 10 ml de cloruro de metileno y agitada durante 10 minutos. Las fases orgánicas se evaporaron a sequedad mediante un rotavapor en vacío y con un baño de 40°C de temperatura.

Los residuos se disolvieron en 1 ml de metanol y se inyectaron en el aparato de electroforesis Capilar. En la siguiente figura se muestra uno de los electroferogramas obtenidos.

Figura 5: electroferograma correspondiente a una muestra de agua del río Ebro dopada con los herbicidas 2,4-DB (1), 2,4-DP (2), 2,4,5-T (3) y 2,4-D (4). Utilizando una fuerza iónica de 0.02M y un voltaje de 25KV.

BIBLIOGRAFIA

1. M.B. Amran, M.D. Lakkis, F. Lagarde, M.J.F. Leroy, J.F. López-Sánchez, G. Rauret, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 345 (1993) 420.
2. S.M. Cousins, P.R. Haddad, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 397.
3. A. Monclus, M. Rodríguez, I. Massana. *LC-GC International*, 9 (1996) 79.
4. P. Blatny, C.H. Fisher, A. Rizzi, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 717 (1995) 157.
5. L.A. Holland, N.P. Chetwyn, M.D. Perkins, S.M. Lunte, *Pharmaceutical Research*, 14 (1997) 372.
6. Z. El Rassi, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2465.
7. F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, F.P. Smith, *Forensic Sci. Int.*, 92 (1998) 75.
8. A.R. Timerbaev, *Electrophoresis*, 18 (1997) 185.
9. V. Pacáková, K. Stulík, *J. Chromatogr. A*, 789 (1997) 169.
10. E. Dabek-Zlotorzynska, E.P.C. Lai, A.R. Timerbaev, *Anal. Chim. Acta*, 359 (1998) 1.
11. H. Nguyen, S.L. Tamisier-Karolak, M. Czok, R. Laugier, P. Cardot, *Anallisis*, 23 (1995) 82.
12. M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 669 (1994) 217.
13. M.T. Galceran, M.C. Carneiro, *Chromatographia*, 39 (1994) 581.
14. C.D. Gaitonde, P.V. Pathak, *J. Chromatogr. A*, 514 (1990) 389.
15. R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1993.
16. A. Farran, O. Hernanz, *Quím. Anal.*, 12 (1993) 205.
17. G. Li, D.C. Locke, *J. Chromatogr. B*, 669 (1995) 93.
18. S.M. Masselter and A.J. Zemmann, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1047.
19. X. Liu, H. Frank, *J. High Resol. Chromatogr.*, 21 (1998) 309.
20. K. Bächmann, B. Göttlicher, I. Haag, W. Hensel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 716.
21. S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, A. Th. Brinkman, O. Zerbinati, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
22. X. Song, W.L. Budde, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 7 (1996) 981.
23. G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 179.
24. K.L. Kuo, Y.Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A*, 768 (1997) 334.
25. J.C. Reijenga, B.A. Ingelse, F.M. Everaerts, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 371.
26. I.S. Lurie, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 297.
27. B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 269.
28. L. Ossicini, S. Fanali, *Chromatographia*, 45 (1997) 428.
29. C.X. Zhang, F. von Heeren, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2070.
30. S. Brown, J.H.T. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 287.

31. A.L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1726.
32. *Handbook of Laboratory Safety*. 2nd. Ed. Pg521, Ed. by Norman E. Steere. CRC Press, Inc. 1971. Boca Raton.
33. P. Jandik, G. Bonn, *Capillary Electrophoresis of small molecules and ions*. VCH Publishers, Inc. 1993 New York.
34. H.A. Fishman, N.M. Amudi, T.T. Lee, R.H. Scheller, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2318.
35. I.E. Valkó, H. Sirén, M.L. Riekkola, *J. Microcolumn Separations*, 8 (1996) 421.
36. D.N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*, Hewlett-Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E, 1992.
37. Y.S. Fung, K.M. Lau, *Talanta*, 45 (1998) 641.
38. Boden, M. Darius, K. Bächmann, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 311.
39. R.L. Chieng, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489 A.
40. M.J. Wojtusik, M.P. Harrold, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 411.
41. G. Bondoux, P. Jandik, W.R. Jones, *J. Chromatogr.*, 502 (1992) 79.
42. M. Jimidar, C. Hartmann, N. Cousement, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 706 (1995) 479.
43. F. Guan, H. Wu, Y. Luo, *J. Chromatogr. A*, 719 (1996) 427.
44. Th. Ehmman, K. Bächmann, L. Fabry, H. Rüfer, S. Pahike, L. Kotz, *Chromatographia*, 45 (1997) 301.
45. J. Farré, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 47 (1998) 630.
46. M. Arellano, J. Andrianary, F. Dedieu, F. Couderc, Ph. Puig, *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 321.
47. A. Padarauskas, V. Olsauskaite, G. Schwedt, *J. Chromatogr. A*, 800 (1998) 369.
48. R. Hamann and A. Kettrup. *Chemosphere*, 16 (1987) 527-536.
49. R.M. McCormick, R.J. Zagursky, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 750.
50. N. Cohen, E. Grushka, *J. Chromatogr. A*, 684 (1994) 323.
51. D. Martínez. «Aplicación de la electroforesis capilar a la determinación de compuestos de interés medioambiental». Tesis Doctoral. Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, 1999.
52. W.J. Lambert, D.L. Middleton, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1585.
53. Q. Wu, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *Chromatographia*, 34 (1992) 25.
54. K.D. Altria, I. Gill, J.S. Howells, C.N. Liscombe, R.Z. Williams, *Chromatographia*, 40 (1995) 527.
55. C.E. Lin, W.C. Lin, W.C. Chiou, *J. Chromatogr. A*, 705 (1995) 325.
56. J. Havel, P. Janos, P. Jandik, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 127.
57. G.N.W. Leung, H.P.O. Tang, T.S.C. Tso, T.S.M. Wan, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 141.
58. M.S. Moosavi, R.M. Cassidy, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 293.
59. R.C. Martínez, E.R. Gonzalo, J.D. Álvarez, J.H. Méndez, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4437.

60. H. Fabe, M.D. Blanchin, E. Julien, C. Segonds, B. Mandrou, N. Bosc, *J. Chromatogr. A*, 722 (1997) 265.
61. Informació Tècnica, Helwett-Packard Española S.A., Barcelona, España, 1996.
62. J.C. Reijenga, G.U.A. Aben, T.P.E.M. Verheggen, F.M. Everaerst, *J. Chromatogr.*, 260 (1983) 241.
63. M. Jimidar, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, 294 (1994) 165.
64. W. Buchberger, S.M. Cousing, P.R. Haddad, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 313.
65. E.D. Zlotorzynska, J.F. Dlouhy, *J. Chromatogr. A*, 685 (1994) 145.
66. M.M.R. Boom, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 675.
67. S.M. Masselter, A.J. Zemann, *J. Chromatogr. A*, 693 (1995) 359.
68. A. Zemann, D. Volgger, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3243.
69. Informació Comercial de Supelco, Bellefonte, PA, USA, 1998.
70. S.V. Ermakov, L. Capelli, P.G. Righetti, *J. Chromatogr. A*, 744 (1996) 55.
71. U. Jegle, R. Grimm, H. Godel, R. Schuster, G. Ross, T. Soga, *LC-GC Inter.*, 10 (1997) 176.
72. K. Jinno, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi, *Chromatographia*, 46 (1997) 309.
73. H. Burt, D.M. Lewis, K.N. Tapley, *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 265.
74. J.H. Knox, K.A. McCormack, *Chromatographia*, 38 (1994) 207.
75. A. Rigol, J.F.L. Sánchez, G. Rauret, *Quím. Anal.*, 13 (1994) 11.
76. I. Benito, J.M. Saz, M.L. Marina, J.J. Barbero, M.J. González, J.C.D. Masa, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 77.
77. M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 319.
78. M. Aguilar, A. Farran, C. Serra, M.J. Sepaniak, K.W. Whitaker, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 201.
79. J. Riu, I. Schönsee, D. Barceló, C. Ràfols, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 405.
80. J. Aupiais, *Chromatographia*, 44 (1997) 303.
81. P. Jandik, W.R. Jones, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 431.
82. F. Foret, S. Fanali, M. Nardi, P. Bocek, *Electrophoresis*, 11 (1990) 780.
83. F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Bocek, *J. Chromatogr.*, 470 (1989) 299.
84. A.W.M. Lee, W.F. Chan, F.S.Y. Yuen, C.H. Lo, R.C.K. Chan, Y. Liang, *Anal. Chim. Acta*, 339 (1997) 123.
85. C.E. MacTaylor, A.G. Ewing, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2279.
86. C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2026.
87. O.H.J. Szolar, R.S. Brown, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3004.
88. D.S. Stegehuis, U.R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr.*, 591 (1992) 341.
89. W.C. Brumley, V. Kelliher, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 20 (1997) 2193.
90. Y. Mechref, Z. El Rassi, *Electrophoresis*, 18 (1997) 220.
91. I. Rodríguez, Y. Zhang, H.K. Lee, S.F. Li, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 287.

92. K. Katsuragi, K. Kitagishi, T. Mizuguchi, T. Nagashima, M. Kinoshita, H. Kumada, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 307.
93. C.A. Piggee, J. Muth, E. Carrilho, B.L. Karger, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 367.
94. X.C. Le, Y. Zhang, N.J. Dovichi, C.A. Compston, M.M. PLCIC, R.J. Beever, O. Hindsgaul, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 515.
95. J. Bergquist, S.D. Gilman, A.G. Ewing, R. Ekman, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3512.
96. Y.C. Chao, C.W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 229.
97. J.R. Chervet, R.E.J. Van Soest, M. Ursem, *J. Chromatogr.* 543 (1991) 439.
98. Nota Tècnica Helwett-Packard: *DAD in Capillary Electrophoresis-Part1: Using HP Extended Ligh Path Capillaries*. Waldbronn, Germany, 1995.
99. X. Huang, J.A. Luckey, M.J. Gordon, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 767.
100. C.W. Klampfl, M.U. Katzmayr, *J. Chromatogr. A*, 822 (1998) 117.
101. M. van Bruijnsvoort, S.K. Sanghi, H. Poppe, W.Th. Kok, *J. Chromatogr. A*, 737 (1997) 203.
102. A. Hilmi, J.H.T. Luong, A.L. Nguyen, *J. Chromatogr. A*, 761 (1997) 259.
103. M.E. Hadwiger, S.R. Torchia, S. park, M.E. Biggin, C.E. Lunte, *J. Chromatogr. B*, 681 (1996) 241.
104. A.M. Fermier, M.L. Gostkowski, L.A. Colon, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1661.
105. T.J. Thompson, F. Foret, P. Vourus, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 900.
106. A.J. Tomlinson, L.M. Benson, R.P. Oda, W.D. Braddock, *J. High Resol. Chromatogr.*, 17 (1994) 729.
107. A.J. Tomlinson, S. Naylor, *J. Liquid Chromatogr.*, 18 (1995) 3591.
108. Y. Takada, M. Yoshida, M. Sakairi, H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 9 (1995) 895.
109. S.M. Lunte, D.M. Radzik, *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Ltd, Oxford, U.K, 1996.
110. A.J. Tomlinson, S. Naylor, *Biomed. Chromatogr.*, 10 (1996) 325.
111. C.Y. Tsai, G.R. Her, *J. Chromatogr. A*, 743 (1996) 315.
112. D. Wycherley, M.E. Rose, K. Giles, T.M. Hutton, D.A. Rimmer, *J. Chromatogr. A*, 734 (1996) 339.
113. J.F. Banks, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2255.
114. K. Otsuka, C.J. Smith, J. Grainger, J.R. Barr, D.G. Patterson, N. Tanaka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 817 (1998) 75.
115. F. Tagliaro, S. Turina, P. Pisi, F.P. Smith, M. Marigo, *J. Chromatogr. B*, 713 (1998) 27.
116. D.R. Baker *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, Inc. 1995. New York.
117. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikama, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
118. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834.

119. V. Martí, Projecte Fi de Carrera, Universitat Politècnica de Catalunya, 1992.
120. E. Grushka, R.M. McCormick, *J. Chromatogr.* 471 (1989), 421-429.
121. N. Dyson, «Chromatographic Integration Methods», *Royal Society of Chemistry*, Letchworth, 1991.
122. W.A. Gobie, C.F. Ivory, *J. Chromatogr.* 516 (1990), 191.
123. F. Foret, M. Deml, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 452 (1988), 601.
124. S. Hjerten, *Electrophoresis* 11 (1990), 665.
125. F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th. P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1970), 11.
126. F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th. P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1979), 1.
127. J.O.N. Hinckley, *J. Chromatogr.*, 109 (1975), 209-217.
128. T. Wang, R.A. Hartwick, P.B. Champlin, *J. Chromatogr.* 462 (1989), 147.
129. K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.* 480 (1989), 91.
130. J.C. Sternberg, *Adv. Chromatographic* 2 (1966), 202.
131. J.F. Brown, J.O.N. Hinckley, *J. Chromatogr.* 109 (1975), 218.
132. K.D. Lukacs and J.W. Jorgenson. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 8 (1985) 407.
133. G.J.M. Bruin, J.P. Chang, R.H. Kuhlman, K. Zegers, J.C. Kraak and H. Poppe, *J. of Chromatogr.*, 471 (1989) 429.
134. K.D. Altria and C.F. Simpson. *Anal. Proc.* 23 (1986) 453.
135. W. Kuhr, *Anal. Chem.* 62 (1990), 403.
136. F. Foret, M. Deml and P. Bocek. *J. Chromatogr.* 452 (1988), 601.
137. J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302.ç

