

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DE MECC

MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY (MECC) es una nueva técnica de separación desarrollada a partir de CZE y basada en principios tanto cromatográficos como electroforéticos, capaz de separar compuestos aniónicos y neutros conjuntamente: mientras que para los compuestos neutros el fundamento de la separación es similar al de la cromatografía líquida, para los compuestos aniónicos la separación está basada principalmente en sus diferentes movilidades electroforéticas [1, 2, 3].

En la cromatografía líquida convencional, la fase estacionaria permanece inmovilizada en una columna mientras que la fase móvil es forzada a pasar a través de esta fase estacionaria. Cuando una muestra se introduce en la columna, los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria en una relación que determina su factor de capacidad, mientras que la fase móvil fluye continuamente a través de la columna. Sin embargo, en cromatografía no es esencial que una de las partes esté rígidamente fijada en la columna. Lo importante es que el movimiento relativo de las dos fases entre las cuales el soluto está distribuido sea satisfactorio para realizar la separación [4]. Por lo tanto, un sistema cromatográfico puede consistir en un desplazamiento entre dos fases, como sucede en MECC, en lugar del sistema clásico de una fase móvil que es forzada a pasar a través de una fase inmovilizada.

Las dos fases tampoco necesitan ser heterogéneas entre ellas si el proceso de distribución del soluto es correcto; esto puede suceder entre un solvente y una pseudofase como una micela u otros tipos de moléculas [5].

En MECC a la solución tamponada característica del sistema CZE se le añade un tensioactivo iónico a una concentración superior a la de su concentración micelar crítica (CMC), de forma que los monómeros de surfactante tienden a formar micelas. Estas micelas son estructuras dinámicas y en equilibrio con los monómeros y desempeñan el papel de la fase estacionaria mientras que la disolución tampón equivale a la fase móvil [5].

El tipo de surfactante que se utiliza puede ser tanto aniónico como catiónico, y algunos autores han utilizado mezclas de éstos con tensioactivos neutros con la finalidad de modificar la densidad de carga de la micela según su conveniencia [6,8]. Destacan entre los tensioactivos aniónicos el dodecilsulfato sódico (SDS, el más utilizado en MECC) y el tetradecilsulfato sódico

(STS) [9]. Entre los catiónicos los más utilizados son el cloruro y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAC, CTAB) [10].

La parte experimental de este trabajo se realizó utilizando SDS, y en unos experimentos puntuales, TTAB.

1.2. OBJETIVOS

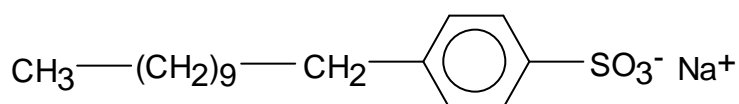
En este capítulo se estudiará a fondo los fundamentos de la técnica analítica MECC y a partir de estos conocimientos se desarrollará un método de análisis capaz de separar de forma rápida y efectiva una mezcla de compuestos aniónicos y neutros.

Para ello, primero se realizará una descripción teórica y general de la técnica (apartado 2) para después estudiar, teórica y experimentalmente las diferentes variables que pueden influir en los tiempos de retención, en la resolución y en la eficacia de los compuestos analizados (apartado 3), como son la concentración, el tipo de surfactante, la fuerza iónica o el pH.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado 3 se definirá el método de análisis adecuado, se procederá a su validación, se realizarán algunas aplicaciones prácticas en muestras de formulaciones comerciales de herbicidas, y finalmente se compararán estos resultados con los obtenidos mediante HPLC (apartado 4).

1.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

- Voltage: $V = 20\text{KV}$.
- Longitud de la columna: $L_{\text{TOT}} = 60\text{cm}$. $L_{\text{DET}} = 40\text{cm}$.
- Composición de la disolución del tampón: $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$.
- Fuerza iónica: 0,02M y 0,04M.
- pH=7.
- Volumen de inyección: 50nl.
- Tipo de surfactante: dodecilsulfonato sódico (SDS). Surfactante aniónico de fórmula



- Concentración de surfactante: entre 0,02 y 0,10M.
- Longitud de onda: $\lambda = 210\text{nm}$.

La instrumentación analítica utilizada es la misma que la utilizada en el capítulo anterior.

Las condiciones experimentales que se han descrito son las condiciones generales para todos los ensayos realizados. En el caso que en un determinado ensayo algún parámetro experimental no coincida con los descritos, será detallado en el apartado en el que se hable sobre este ensayo.

1.4. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE TRABAJO

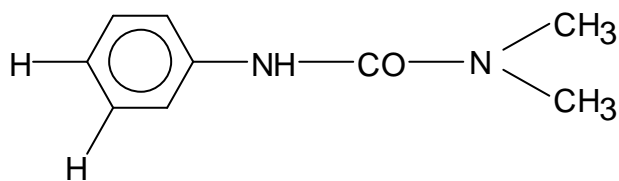
Para el estudio de la técnica MECC se escogieron mezclas de herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos. Se eligieron estos tipos de herbicidas porque son dos de las familias de herbicidas más utilizadas en la agricultura [11], porque las mezclas de estos tipos de compuestos son comunes en formulaciones comerciales [12], y porque actualmente no existe ninguna técnica analítica capaz de determinar conjuntamente y de una forma rápida, simple y efectiva estos dos tipos de compuestos.

La determinación de herbicidas se viene realizando principalmente mediante cromatografía de gases [13]. Sin embargo, el problema de la inestabilidad térmica de las fenilureas y la baja presión de vapor de los fenoxiácidos provoca necesariamente el empleo de la derivatización de las muestras. El análisis resulta más simple mediante la cromatografía líquida de alta resolución utilizando columnas de fase reversa, y en el caso de los compuestos fenoxiácidos acidificando también los eluyentes [14]. Pero en ninguno de los dos casos es posible separar los dos tipos de compuestos en un mismo cromatograma.

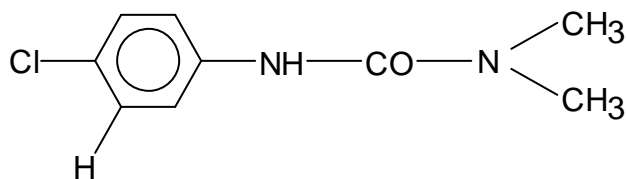
Los herbicidas utilizados fueron los siguientes:

Herbicidas fenilureicos:

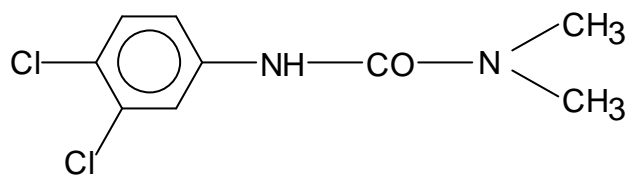
Fenurón



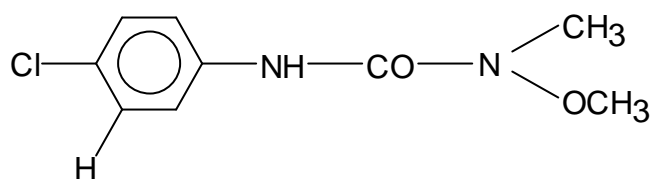
Monurón



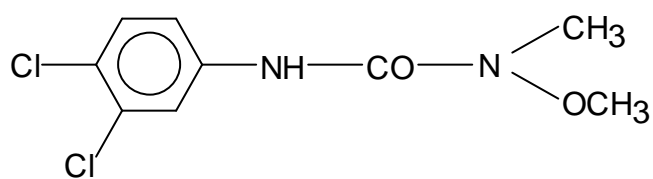
Diurón



Monolinurón

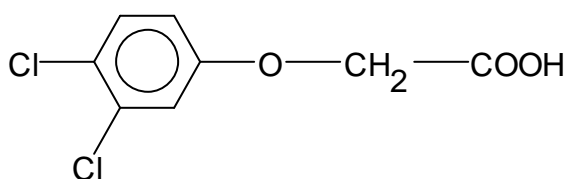


Linurón

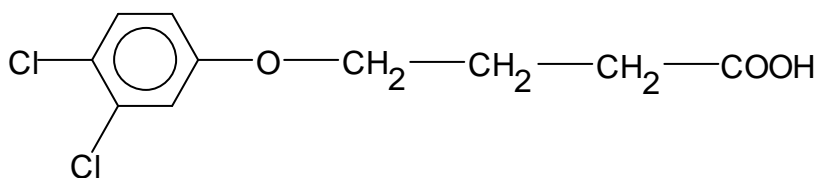


Herbicidas fenoxiácidos:

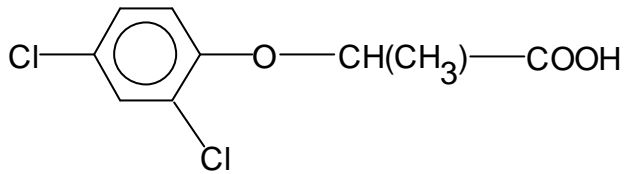
2,4-D



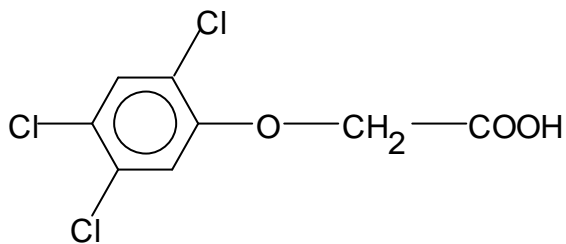
2,4-DB



2,4-DP



2,4,5-T



Primero se realizó una disolución de 1000 ppm en metanol de cada uno de estos herbicidas para después realizar la mezcla de los nueve compuestos en una concentración de 50 ppm y disueltos en agua (disolución de trabajo). En cada análisis se inyectaron 50 nl de esta disolución.

A la disolución de trabajo también se le adicionó un colorante denominado Sudan III en una concentración de 50 ppm con la finalidad de conocer el tiempo de retención de la micela (t_{mc}), ya que diversos autores [5,15] han demostrado que las moléculas de Sudan III están completamente solubilizadas en la fase micelar, y por lo tanto, su tiempo de retención coincide con el de la micela.

Finalmente comentar que el metanol existente en la disolución de trabajo, y que proviene de las disoluciones concentradas de 1000 ppm, fue aprovechado para determinar el tiempo de elución de la fase móvil (t_{e0}): el metanol tiene la característica de permanecer totalmente solubilizado en la fase acuosa cuando se adiciona a una disolución micelar de SDS [15], y aunque no es detectado mediante radiación ultravioleta, es posible observar su señal debido al cambio que provoca en el índice de refracción de la disolución.

2. DESCRIPCIÓN TEÓRICA DE LA TÉCNICA MECC

2.1. APLICACIÓN A COMPUESTOS NEUTROS

2.1.1. Descripción del sistema.

En la siguiente figura se esquematiza la migración de un compuesto neutro en MECC, utilizando un surfactante aniónico como el SDS. En este caso, por encima de su CMC los monómeros de surfactante forman micelas de forma esférica con los grupos hidrófobos orientados hacia el interior y los grupos cargados hacia el exterior.

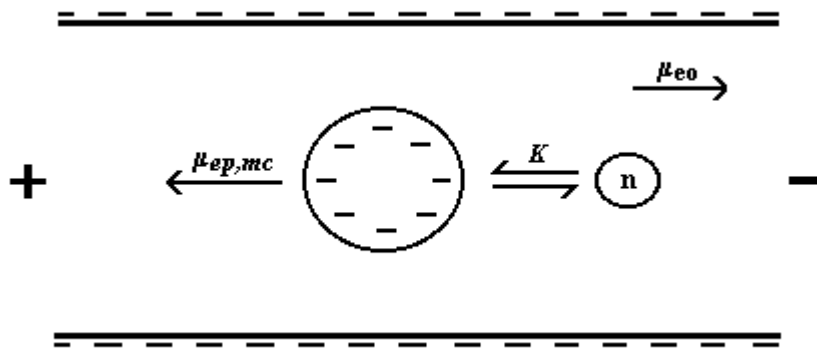


Figura 1. Interacción de un soluto neutro (n) con una micela aniónica en MECC

donde

μ_{eo} : es la movilidad electrosmótica.

$\mu_{ep,mc}$: es la movilidad electroforética de la micela.

K : es la constante de distribución del soluto entre la fase acuosa y la fase micelar.

El sistema está compuesto por una fase micelar cargada negativamente y una fase acuosa. Al aplicar un campo eléctrico se crea un flujo de la fase acuosa hacia el cátodo que corresponde a la movilidad electrosmótica (μ_{eo}), y el fenómeno es similar al ya explicado en CZE.

Las micelas, al estar cargadas negativamente, tienen una componente de su movilidad dirigida hacia el ánodo que equivale a la movilidad electroforética de la micela ($\mu_{ep,mc}$).

Como la movilidad total de la micela (μ_{mc}) equivale a [15,16]:

$$\mu_{mc} = \mu_{eo} + \mu_{ep,mc} \quad (1)$$

y μ_{eo} es mayor que $\mu_{ep,mc}$, la movilidad total de la micela estará dirigida hacia el cátodo pero, lógicamente, su velocidad será menor que la de la fase acuosa. Los solutos neutros de una mezcla son entonces separados en base a su relativa afinidad por las dos fases. Especies hidrófobas tenderán a estar fuertemente asociadas con las micelas y eluirán más tarde que especies hidrófilas, las cuáles permanecerán principalmente en la fase acuosa. Todas las especies eluirán entre un tiempo mínimo de retención al cual sale la fase acuosa y que llamaremos t_{eo} , y un tiempo máximo de retención que corresponde al tiempo que tarda la micela en llegar al detector y que llamaremos t_{mc} . Estos dos parámetros, t_{eo} y t_{mc} , pueden ser medidos experimentalmente y sus valores junto al tiempo de retención del soluto nos determinan el factor de capacidad, k' , y la constante de distribución, K , de cada una de las especies. Estos dos parámetros serán estudiados en próximos apartados.

2.1.2. Ecuaciones principales.

A partir de la figura 1 se deduce que la movilidad de un soluto neutro (μ_s) dependerá de la movilidad de la fase micelar, μ_{mc} , y la de la fase acuosa, μ_{eo} . La influencia de μ_{mc} y μ_{eo} en μ_s dependerá del porcentaje de soluto tanto en el interior como en el exterior de la micela:

$$\mu_s = x_{s(mc)} \cdot \mu_{mc} + x_{s(aq)} \cdot \mu_{eo} \quad (2)$$

donde

$x_{s(mc)}$: es la fracción molar de soluto en la fase micelar.

$x_{s(aq)}$: es la fracción molar de soluto en la fase acuosa..

Sustituyendo la ecuación (1) en (2) obtenemos que:

$$\mu_s = x_{s(mc)} \cdot \mu_{eo} + x_{s(aq)} \cdot \mu_{eo} + x_{s(mc)} \cdot \mu_{ep,mc} \quad (3)$$

como $\mu_{eo} = x_{s(mc)} \cdot \mu_{eo} + x_{s(aq)} \cdot \mu_{eo}$ la ecuación (3) se convierte en:

$$\mu_s = \mu_{eo} + x_{s(mc)} \cdot \mu_{ep,mc} \quad (4)$$

El factor de capacidad, k' , se define como:

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (5)$$

donde

n_{mc} : son los moles de soluto en la fase micelar.

n_{aq} : son los moles de soluto en la fase acuosa.

Las fracciones molares de soluto las podemos expresar en función de k' [5]:

$$x_{s(mc)} = \frac{n_{mc}}{n_{mc} + n_{aq}} = \frac{k' \cdot n_{aq}}{k' \cdot n_{aq} + n_{aq}} = \frac{k'}{k' + 1} \quad (6)$$

$$x_{s(aq)} = \frac{n_{aq}}{n_{mc} + n_{aq}} = \frac{1}{1 + k'} \quad (7)$$

Sustituyendo (6) en (4) obtenemos que [17]:

$$t_s = t_{eo} + \frac{k'}{1 + k'} t_{ep,mc} \quad (8)$$

De esta ecuación se deduce que:

1. Si el soluto es muy hidrófilo, k' es muy pequeña y $\frac{k'}{1 + k'} \approx 0$. La ecuación (8) queda como $t_s \approx t_{eo}$ y el soluto es eluido al mismo tiempo que el frente de la fase móvil (t_{eo}).

2. Si el soluto es muy hidrófobo, k' será muy grande y $\frac{k'}{1 + k'} \approx 1$. La ecuación (8) se reduce a $t_s \approx t_{eo} + t_{ep,mc} \approx t_{mc}$ que equivale a la ecuación (1). El soluto estará totalmente solubilizado en la fase micelar, y por lo tanto, su movilidad será la misma que la de la micela (t_{mc}). El tiempo de retención del soluto será el mismo que el de la micela: $t_r = t_{mc}$.

3. Para compuestos con una hidrofobicidad intermedia, el tiempo de elución estará comprendido entre t_{eo} y t_{mc} . A este intervalo de tiempo ($t_{mc} - t_{eo}$) se le denomina ventana de elución, y, como se explicará más adelante, resulta de gran importancia en la optimización del análisis.

Sustituyendo las expresiones de k' (6) y (7) en la ecuación (2), obtenemos que [17]:

$$t_r = \frac{1}{1 + k'} t_{eo} + \frac{k'}{1 + k'} t_{mc} \quad (9)$$

Como $u = E \cdot \mu$ y $E = \frac{V}{L}$

donde

- μ : la velocidad del soluto.
- μ : la movilidad del soluto.
- l : la distancia recorrida por el soluto.
- t : su tiempo de elución.
- E : el campo eléctrico aplicado.
- V : el potencial aplicado.
- L : la longitud de la columna.

Obtenemos que:

$$t_r = \frac{L \cdot l}{t \cdot V} \quad (10)$$

Sustituyendo esta expresión en la ecuación (9), obtenemos que:

$$\frac{1}{t_r} = \frac{1}{1 + k'} \frac{1}{t_{eo}} + \frac{k'}{1 + k'} \frac{1}{t_{mc}} \quad (11)$$

Despejando k' [15]:

$$k' = (t_r - t_{eo}) / (t_{eo} \cdot (1 - \frac{t_r}{t_{mc}})) \quad (12)$$

Y despejando t_r :

$$t_r = (1 + k') / (1 + (\frac{t_{eo}}{t_{mc}} \cdot k')) t_{eo} \quad (13)$$

Esta última ecuación es básica para la comprensión y resolución de una mezcla de compuestos mediante MECC: para unas condiciones de trabajo determinadas, t_{eo} y t_{mc} constantes, nos relaciona el tiempo de elución de un soluto con su factor de capacidad.

2.2. APLICACIÓN A COMPUESTOS ANIÓNICOS

2.2.1. Descripción del sistema.

El modelo correcto para describir el comportamiento de un compuesto que puede existir tanto en su forma aniónica como en su forma neutra, ha de asumir que la migración de este compuesto está formada por la migración de su forma disociada y de su forma no disociada, tanto en la fase micelar como en la acuosa.

Los diferentes parámetros que regulan la migración de este tipo de compuestos, pueden ser esquematizadas en el siguiente dibujo [18]:

Figura 2. Interacción de un soluto aniónico (A^- / HA) con una micela aniónica en MECC

donde

μ_{e0} : es la movilidad electrosmótica.

$\mu_{ep,mc}$: es la movilidad electroforética de la micela.

K_a : es la constante de acidez del compuesto HA.

K_{HA} : es la constante de distribución del compuesto HA entre las dos fases.

K_{A^-} : es la constante de distribución del compuesto A^- entre las dos fases.

μ_{A^-} : es la movilidad electroforética del compuesto A^- .

Suponiendo que en las condiciones de trabajo el compuesto está totalmente ionizado, como es el caso de los compuestos utilizados en la parte experimental de este estudio, podemos eliminar todas las variables relacionadas con la especie HA. El esquema resultante será similar al obtenido al referirnos a compuestos neutros. La diferencia básica entre los dos modelos reside en que en el caso de los compuestos iónicos no podemos explicar su movilidad únicamente como causa de su interacción con la fase micelar, si no que se ha de tener en cuenta su movilidad electroforética negativa en la fase acuosa.

Por lo tanto, la movilidad de un compuesto aniónico estará formada por la movilidad de la fase micelar y su propia movilidad en la fase acuosa.

2.2.2. Ecuaciones principales.

La ecuación básica que describe el movimiento de una especie aniónica en MECC es la siguiente [1]:

$$k' = \frac{x_{A^-}(mc) \cdot \mu_{mc}}{x_{A^-}(aq) \cdot \mu_{A^-(aq)}} \quad (14)$$

donde:

$x_{A^-}(mc)$: es la fracción molar del compuesto A^- en el interior de la micela.

μ_{mc} : es la movilidad de la micela.

$x_{A^-}(aq)$: es la fracción molar del compuesto A^- en la fase acuosa.

$\mu_{A^-(aq)}$: es la movilidad del compuesto A^- en la fase acuosa.

La movilidad del anión A^- en la fase acuosa es equivalente a la movilidad que tendría el anión A^- realizando el ensayo sin micelas, es decir, utilizando la técnica CZE. A esta movilidad la llamaremos μ_0 .

Realizando los mismos pasos que los realizados para compuestos neutros, llegamos a la ecuación [18]:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \cdot (1 - \frac{t_r}{t_{mc}})} \quad (15)$$

Donde t_0 es el tiempo que necesitaría el compuesto aniónico para llegar al detector en el supuesto que se realizara el ensayo sin micelas (CZE) y t_r , igual que en el caso de los compuesto neutros, equivale al tiempo necesario para que el compuesto aniónico A^- llegue al detector en las condiciones normales de trabajo (MECC).

μ_0 puede ser subdividida en:

$$\mu_0 = \mu_{eo} \cdot \mu_{ep, A^-(aq)} \quad (16)$$

siendo $\mu_{ep, A^-(aq)}$ la movilidad electroforética del anión A^- cuando se encuentra en la fase acuosa.

Sustituyendo las ecuaciones (1) y (16) en la ecuación (14) obtenemos que:

$$s \cdot x_{A^?}(mc) \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep(mc) \cdot x_{A^?}(aq) \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep,A^?(aq) \quad (17)$$

como

$$\frac{1}{1 + k'} \cdot x_{A^?(mc)} \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot x_{A^?(aq)} \cdot \frac{1}{1 + k'} \quad (18)$$

$$s \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot x_{A^?(mc)} \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep(mc) \cdot x_{A^?(aq)} \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep,A^?(aq) \quad (19)$$

y sustituyendo las ecuaciones (6) y (7) en (19), obtenemos que [19]:

$$s \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot \frac{k}{1 + k'} \cdot ep(mc) \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep,A^?(aq) \quad (20)$$

De esta última ecuación se deduce que:

1. Si el compuesto es muy hidrófilo, lo cual sería lógico por su carácter iónico, k' es muy pequeña:

$$\frac{1}{1 + k'} \approx 1 \quad \text{y} \quad \frac{k}{1 + k'} \approx 0$$

La ecuación (20) queda como:

$$s \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot \frac{1}{1 + k'} \cdot ep,A^?(aq) \cdot \frac{1}{1 + k'} \approx 0$$

que equivaldría a realizar el análisis sin micelas.

2. Si el compuesto es muy hidrófobo estará mayoritariamente solubilizado en la fase micelar; k' será muy grande y

$$\frac{1}{1 + k'} \approx 0 \quad \text{y} \quad \frac{k}{1 + k'} \approx 1$$

La ecuación (20) queda como

$$t_s \quad ? \quad ?_{eo} \quad ? \quad ?_{ep(mc)} \quad ? \quad ?_{mc}$$

el compuesto saldría al mismo tiempo que la micela.

3. En el caso que el compuesto no fuera aniónico, $\mu_{ep.A^-}(aq) = 0$ y la ecuación resultante coincidiría con la ecuación (8), la cual nos define la movilidad de un compuesto neutro.

4. Para compuestos aniónicos con una hidrofobicidad intermedia, el tiempo de elución estará comprendido entre t_0 y t_{mc} y vendrá definido por la ecuación (20).

Finalmente remarcar que las ecuaciones desarrolladas tanto en este apartado como en el 2.1 se han realizado teniendo en cuenta una serie de suposiciones [18]:

- Que la movilidad de la micela no es alterada cuando el analito se asocia a ella.
- Que no se producen equilibrios químicos secundarios con componentes del tampón.
- Que los posibles efectos de los compuestos iónicos en el potencial de la pared del capilar, y por lo tanto en el flujo electroosmótico, son inapreciables.

2.3. RESOLUCIÓN

La ecuación fundamental que describe la resolución de un par de solutos en MECC es la siguiente [15]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{1 + k'_2} \cdot \frac{1 - (t_{eo}/t_{mc})}{1 - (t_{eo}/t_{mc}) \cdot k'_1} \quad (21)$$

donde

k'_1 y k'_2 : son los factores de capacidad de los compuestos 1 y 2.

α : es la selectividad.

N : es el número teórico de platos.

Si los picos están lo suficientemente cercanos podemos suponer que $k'_1 \approx k'_2$ y la ecuación anterior queda como [15]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \frac{1 - (t_{eo}/t_{mc})}{1 - (t_{eo}/t_{mc}) \cdot k'} \quad (22)$$

Si t_{mc} tiende a infinito el último término de la ecuación se convierte en la unidad obteniéndose la siguiente expresión:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \quad (23)$$

la cual coincide con la ecuación que define la resolución en la cromatografía convencional [4].

Suponiendo que N [20,14] y α [21,22] son independientes de k' podemos expresar la resolución en función de la función $f(k')$:

$$f(k') = \frac{k'}{1 + k'} \cdot \frac{1 - (t_{eo}/t_{mc})}{1 - (t_{eo}/t_{mc}) \cdot k'} \quad (24)$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot f(k') \quad (25)$$

La dependencia de $f(k')$ con k' se muestra en la siguiente figura para diferentes valores de t_{e0}/t_{mc} [15].

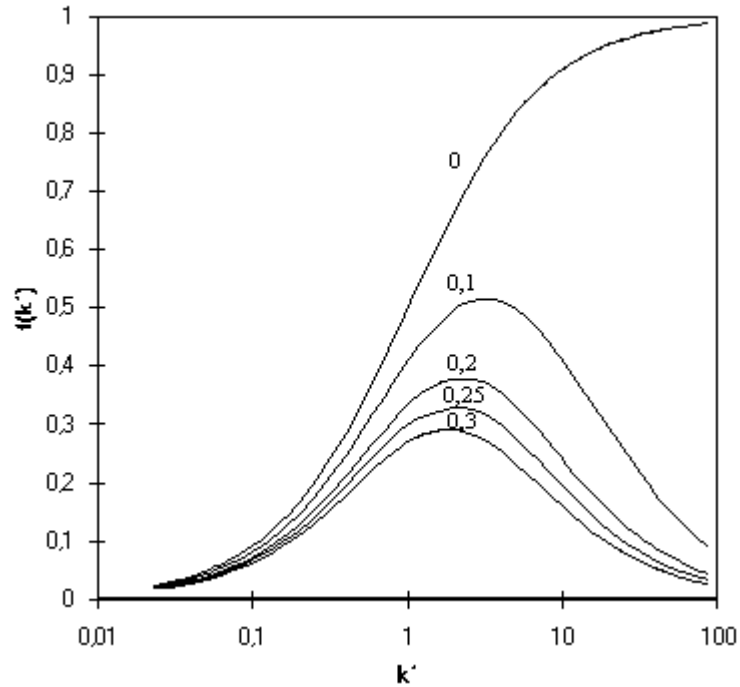


Figura (3): dependencia de $f(k')$ con el factor de capacidad (k') y para diferentes valores de t_{e0}/t_{mc}

El valor de $t_{e0}/t_{mc}=0$ corresponde a la cromatografía convencional, donde el aumento del factor de capacidad equivale a un aumento de la resolución. En MECC, como puede verse en la figura anterior, para un valor de t_{e0}/t_{mc} existe un valor óptimo de k' que maximiza la resolución [15,23,24]. Este valor no ha de ser necesariamente el valor mas alto posible, como sucede en la cromatografía clásica.

Como k' es proporcional a la relación entre el volumen de la fase micelar y la fase acuosa (ecuación (5)), puede ser fácilmente ajustada variando la concentración micelar, y por lo tanto el volumen de la fase micelar, hasta conseguir el valor que de una resolución óptima.

La disminución t_{e0}/t_{mc} también influye decisivamente en la resolución, provocando, como puede verse en la figura (3), una disminución de ésta. La relación t_{e0}/t_{mc} es independiente del voltaje o la intensidad [15] de la corriente pero decrece al aumentar la concentración de surfactante (apartado 3.1.2) o al adicionar determinados disolventes orgánicos en la disolución tampón (capítulo 3).

J.P.Foley [20] obtuvo el valor de k' que daba la máxima resolución, suponiendo N y ϕ independientes de la concentración de surfactante. Para ello derivó e igualó a cero la ecuación (22) y obtuvo la siguiente expresión:

$$k' \phi (R_s \text{ máx.}) \propto \sqrt{t_{mc} / t_{eo}} \quad (26)$$

Esta ecuación ha sido deducida suponiendo que t_{eo}/t_{mc} es independiente de la concentración de surfactante. Experimentalmente se demostrará (apartado 3.1.2) que esta aproximación no es totalmente correcta y que existe una marcada relación entre t_{eo}/t_{mc} y c_{surf} .

Sustituyendo la ecuación 26 en la ecuación 33 (apartado 3.1) llegamos a que la concentración de surfactante que da una resolución máxima es [20]:

$$c_{surf.} (R_s \text{ máx.}) \propto \frac{\sqrt{t_{mc} / t_{eo}}}{K \cdot v} \propto CMC \quad (27)$$

donde:

K : es el valor medio de las constantes de distribución de los dos solutos entre las fases micelar y acuosa.

v : es el volumen molar parcial de la fase micelar.

Esta ecuación muestra que la $c_{surf.}$ que proporciona una resolución máxima entre dos picos está esencialmente predeterminada y puede ser calculada a partir del valor medio de sus constantes de distribución y de cuatro parámetros relacionados con el sistema MECC/surfactante: t_{mc} , t_{eo} , v y CMC.

2.4. EFICACIA

El número de platos teóricos de una columna, N, viene determinado por la siguiente ecuación [4]:

$$N = 5.54 \cdot (t_r / w_h)^2 \quad (28)$$

donde:

t_r : el tiempo de retención.

w_h : la anchura del pico en la mitad de la altura del pico.

y la altura equivalente a un número teórico de platos (H) está relacionado con N por:

$$H = L / N \quad (29)$$

siendo L la longitud de la columna.

Despreciando los procesos de dispersión no relacionados con la columna (principalmente la inyección y la detección), H queda definido por la ecuación [21,22,27]:

$$H = H_A + H_S + H_{M,m} + H_{M,c} \quad (30)$$

donde:

H_A : es la contribución a H de la difusión axial.

H_S : es la contribución a H de la transferencia de masa en la fase pseudoestacionaria.

$H_{M,m}$: equivale a la resistencia de la transferencia de masa en la fase móvil.

$H_{M,c}$: es la resistencia "intracolumna" a la transferencia de masa.

El efecto que tienen estos cuatro términos definirá el número de platos de la columna. A continuación se describirá cada uno de ellos para, finalmente, estudiar los factores principales que pueden influir en la eficacia del pico.

a) Contribución a H de la difusión axial (H_A).

A partir de la ecuación de Einstein que define la difusión axial (σ_A) en cromatografía:

$$\sigma_A^2 = 2Dt_r \quad (31)$$

donde:

- D: es el coeficiente de difusión molecular del soluto en una disolución de surfactante.
 t_r : es el tiempo de retención.

y teniendo en cuenta que:

$$H = ? / L \quad (32)$$

Sepaniak M.J. y Cole R.O. [21] dedujeron la expresión que describe H_A en MECC:

$$H_A = 2DR / (V_{eo} + V_{ep,mic} (1-R)) \quad (33)$$

siendo R la relación de retención del soluto.

Esta ecuación indica que al aumentar D y R aumenta H_A y por lo tanto disminuye la eficacia de la columna. Debido a la relación directa existente entre el voltaje aplicado y los términos de velocidad de la ecuación anterior, un aumento del voltaje ha de provocar una disminución de H_A .

Independientemente de esto, los autores anteriormente citados justificaron experimentalmente que H_A es significativo para voltajes pequeños ($V < 5KV$), mientras que para voltajes medios o elevados, como los utilizados en la parte experimental de este trabajo (25KV), H_A prácticamente no influye en la dispersión.

b) Contribución a H de la transferencia de masa en la fase pseudoestacionaria (H_S).

Varios autores, Sepaniak M.J. [21] y Terabe S. [22], demostraron que la escasa influencia de H_S en H. Comparando MECC con la cromatografía líquida, el tamaño micelar debería ser análogo al espesor de la fase estacionaria de la columna de cromatografía.

En la cromatografía líquida, contra menor es el espesor de la columna, menor es la resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria. En MECC, debido a las pequeñas dimensiones de las micelas (el radio de una micela de SDS es de aproximadamente 20 Å), H_S ha de ser un término prácticamente insignificante.

c) Contribución a H de la resistencia de la transferencia de masa en la fase móvil ($H_{M,m}$).

En la cromatografía líquida, la resistencia de la transferencia de masa en la fase móvil es reducida al disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria de la columna. Contra menor son estas partículas, la “distancia de difusión” entre partículas también es menor. Contra menor es la distancia de difusión interpartícula mejor es la cinética de transferencia de masa de la fase móvil y, por lo tanto, menor es el valor de H [28].

El parámetro análogo en MECC de la distancia interpartícula de la cromatografía sería la distancia intermicelar, la cual disminuye al aumentar la concentración de surfactante. El resultado sería que un aumento de la concentración de surfactante ha de provocar un incremento en la eficacia.

Esta deducción realizada sobre la influencia de $H_{M,m}$ en H ha sido discutida por Terabe S. [22]. Según este autor, el promedio de la distancia intermicelar es de 10 nm. para una disolución 0.05M de SDS. Este valor tan pequeño da unos valores de $H_{M,m}$ despreciables en el valor global de H . Terabe S. afirma que el efecto del incremento de la concentración micelar en la eficacia, es debido al decrecimiento de la relación entre las concentraciones de los solutos y las micelas.

d) Resistencia “intracolumna” a la transferencia de masa ($H_{M,c}$).

Una ventaja de MECC y CZE sobre otras formas de electroforesis es la habilidad de los capilares utilizados para limitar la carga térmica electroforética [1] y disipar eficientemente el exceso de calor.

Sin embargo, cuando la energía calorífica dispersada por unidad de longitud de columna es demasiado grande (cuando el voltaje o la intensidad de la corriente son demasiado altas), se produce un gradiente transversal de temperatura en el interior del capilar [1]. En estas condiciones, la temperatura de la fase móvil es mayor en el centro del capilar que cerca de la pared, donde el incremento de temperatura es amortizado por la temperatura exterior al capilar. En general, contra menor es el diámetro del capilar, menor es el gradiente de temperatura.

Como la movilidad electroforética aumenta al aumentar la temperatura [1], los compuestos analizados en estas condiciones tendrán unos perfiles de velocidad dispersivos que provocarán un incremento considerable de los valores de $H_{M,c}$.

Las variables que causarán un incremento de $H_{M,c}$ serán:

- un voltaje excesivamente alto.

- una concentración de tampón o de tensioactivo excesivamente alta.
- una columna capilar excesivamente ancha.

Otro efecto de dispersión térmica que puede ocurrir en MECC, pero no en CZE, está relacionado con la dependencia del valor de la CMC con la temperatura: en el caso del SDS la CMC se incrementa desde aproximadamente $8,4 \times 10^{-3}$ M a 25°C hasta aproximadamente $9,8 \times 10^{-3}$ M a 55°C [21].

La temperatura de la superficie del capilar depende del calor disipado y son, normalmente, decenas de grados centígrados por encima de la temperatura ambiente [1], lo cual significa que para una concentración de SDS constante, un incremento de la temperatura del capilar decrecerá la concentración micelar, e incrementará $H_{M,m}$ debido al aumento de la distancia intermicelar de difusión. Cuando se utilizan concentraciones de surfactante cerca de su CMC este factor puede ser significativo en el valor total de la eficacia.

e) Conclusiones.

De todo lo dicho anteriormente se deduce que los factores que influyen en la eficacia en MECC son complejos y difíciles de precisar, y que dentro de esta dificultad y a partir de todo lo explicado en las páginas anteriores, podemos afirmar que $H_{M,m}$ y $H_{M,c}$ son los factores que influyen decisivamente en la eficacia. Las condiciones de trabajo que minimizan estos dos factores son:

- Utilizar concentraciones de tensioactivos altas que provoquen una disminución de la distancia intermicelar y por lo tanto de $H_{M,m}$, pero teniendo en cuenta que concentraciones de tensioactivos excesivamente altas provocarán gradientes de temperatura (debido al aumento excesivo de la intensidad de la corriente) y un aumento de $H_{M,c}$.

- No utilizar voltajes y fuerzas iónicas excesivamente altas que originen, como en el caso anterior, un gradiente de temperatura transversal en el interior del capilar y un aumento de $H_{M,c}$.

- Utilizar capilares de diámetros internos pequeños (50-100 μm) para minimizar el gradiente de temperatura y por lo tanto $H_{M,c}$.

3. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES

3.1. CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE.

En los apartados 1.1.2 y 1.2.2 se demostró la influencia del factor de capacidad k' en los tiempos de retención de un soluto. Las ecuaciones (12) y (15) muestran como variando el valor de k' se consigue una modificación de los tiempos de retención.

A su vez k' puede ser controlada experimentalmente mediante la variación de la concentración de surfactante. Para deducir e interpretar las expresiones que relacionan k' y la concentración de surfactante, antes hemos de definir la constante de distribución de un compuesto entre la fase micelar y la fase acuosa, K :

$$K = \frac{x_{mc}}{x_{aq}} \quad (34)$$

donde

x_{mc} : es la fracción molar de soluto en la fase micelar.

x_{aq} : es la fracción molar de soluto en la fase acuosa.

x_{mc} y x_{aq} los podemos expresar en función de los moles de soluto en la fase micelar (n_{mc}) y en la fase acuosa (n_{aq}) [15]:

$$x_{mc} = \frac{n_{mc}}{(C_{surf} - CMC) + n_{mc}} \quad (35)$$

$$x_{aq} = \frac{18 \cdot n_{aq}}{1000} \quad (36)$$

La CMC corresponde a la concentración micelar crítica: concentración de tensioactivo por encima de la cual se forman micelas. Esta concentración coincide también con la de monómero de tensioactivo existente en la disolución cuando la concentración de tensioactivo total es superior a la CMC. Por lo tanto $(c_{surf} - CMC)$ equivaldrá a la concentración de tensioactivo que está formando micelas.

Si definimos V_{mc} y V_{aq} como los volúmenes de la fase micelar y acuosa, podemos expresar a k' como

$$k' = K \cdot \frac{V_{mc}}{V_{aq}} \quad (37)$$

sustituyendo las ecuaciones (35) y (36) en (37) y reorganizando la ecuación resultante llegamos a:

$$k' = K \cdot \frac{v \cdot (c_{surf} - CMC)}{1 + v \cdot (c_{surf} - CMC)} \quad (38)$$

donde v es el volumen molar parcial del surfactante. A bajas concentraciones micelares el segundo término del denominador de la ecuación anterior es despreciable y obtenemos que [15]:

$$k' = K \cdot v \cdot (c_{surf} - CMC) \quad (39)$$

El valor de la CMC es particular para cada tensioactivo y pueden producirse ligeras variaciones con la temperatura, la fuerza iónica o la adición de disolventes orgánicos. Lógicamente, es independiente de la concentración de surfactante. K y v también son independientes de la concentración de surfactante. La única variable experimental que puede influir en K es la temperatura, según la ecuación termodinámica [15]:

$$\ln K = -\frac{v \Delta H^\circ}{RT} + \frac{v \Delta S^\circ}{R} \quad (40)$$

donde

$v \Delta H^\circ$: es el cambio de entalpía asociado a la solubilización micelar.

$v \Delta S^\circ$: es el correspondiente cambio de entropía.

T : es la temperatura de trabajo.

Por lo tanto, la ecuación (39) nos proporciona una relación lineal entre la concentración de tensioactivo utilizada y el factor de capacidad de un soluto y, según las ecuaciones (12) y (15), también con su tiempo de retención (suponiendo despreciable el incremento de la temperatura producido por el aumento de la c_{surf}).

Todo lo dicho hasta ahora nos hace presumir que la variable experimental básica en MECC es la concentración de surfactante utilizada. Esta suposición será discutida teórica y experimentalmente en los próximos apartados.

3.1.1. Influencia de la concentración de surfactante en los tiempos de retención.

Los resultados obtenidos experimentalmente demuestran que el incremento de la concentración de surfactante causa un aumento de los tiempos de retención de los solutos (gráficas 1, 2, 3 y 4), lo cual es lógico ya que aumenta la concentración micelar y la probabilidad de interacción soluto-micela. El tiempo de permanencia del soluto en el interior de la micela es mayor y por lo tanto queda más retenido.

Para los compuestos neutros se observa un aumento de los tiempos de retención mayor que para los aniónicos debido a que la repulsión electrostática existente entre la micela y el compuesto aniónico causa una interacción menor.

En los compuesto aniónicos también se observa que a concentraciones de SDS menores de 0,07M los picos del 2,4-D y 2,4,5-T no se separan, mientras que, como ya vimos en el capítulo 1, cuando estos compuestos se analizan mediante CZE se separan perfectamente. De ésto se deduce que para compuestos iónicos la adición de tensioactivos no necesariamente conlleva un aumento de la resolución de los picos, pudiendo pasar, como en este caso, todo lo contrario.

El orden de elución de los compuestos aniónicos sin la presencia de micelas es el siguiente:

2,4-DB - 2,4-DP - 2,4,5.T - 2,4-D

mientras que adicionando el surfactante con $c_{\text{surf.}} < 0,07\text{M}$ el orden de elución es:

2,4-DP - (2,4-D+2,4,5-T) - 2,4-DB

y adicionando tensioactivo con $c_{\text{surf.}} > 0,07\text{M}$:

2,4-DP - 2,4-D - 2,4,5-T - 2,4-DB

Por lo tanto:

si $c_{surf.} = 0$ $?(2,4,5-T) > ?(2,4-D)$
 si $c_{surf.} < 0,04M$: $?(2,4,5-T) = ?(2,4-D)$
 si $c_{surf.} > 0,04M$: $?(2,4,5-T) < ?(2,4-D)$

Para el 2,4-DB también se observa un comportamiento diferente al realizar el análisis con y sin surfactante. Como es el más hidrófobo de los cuatro compuestos aniónicos (tabla 1), en presencia de micelas es el que interacciona con mayor fuerza con ellas provocando que su movilidad pase a ser la menor.

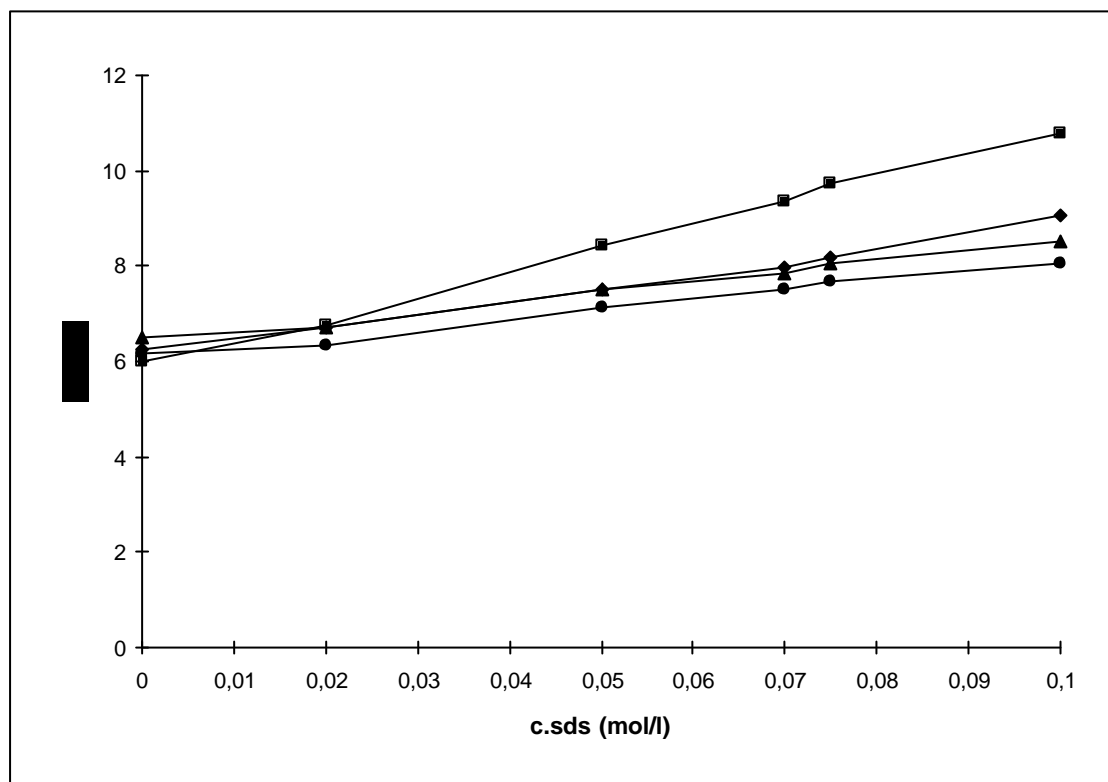
Como puede verse en la tabla 1, el orden de elución de los compuestos aniónicos coincide con el de su solubilidad en agua. Para los compuestos neutros la excepción son el monurón y el monolinurón: el monolinurón, aún siendo más soluble en agua que el monurón, tiene un tiempo de retención mayor. Es posible que sea debido a algún tipo de interacción secundaria entre la superficie micelar y la molécula de monolinurón.

	tiempo (min)	solub. (g/l)
Fenurón	7,33	3,85
Monurón	11,04	0,23
Monolinurón	12,33	0,74
Diurón	15,10	0,08
Linurón	15,92	0,04
2,4-DP	7,51	2,20
2,4-D	7,86	0,62
2,4,5-T	7,97	0,28
2,4-DB	9,36	0,04

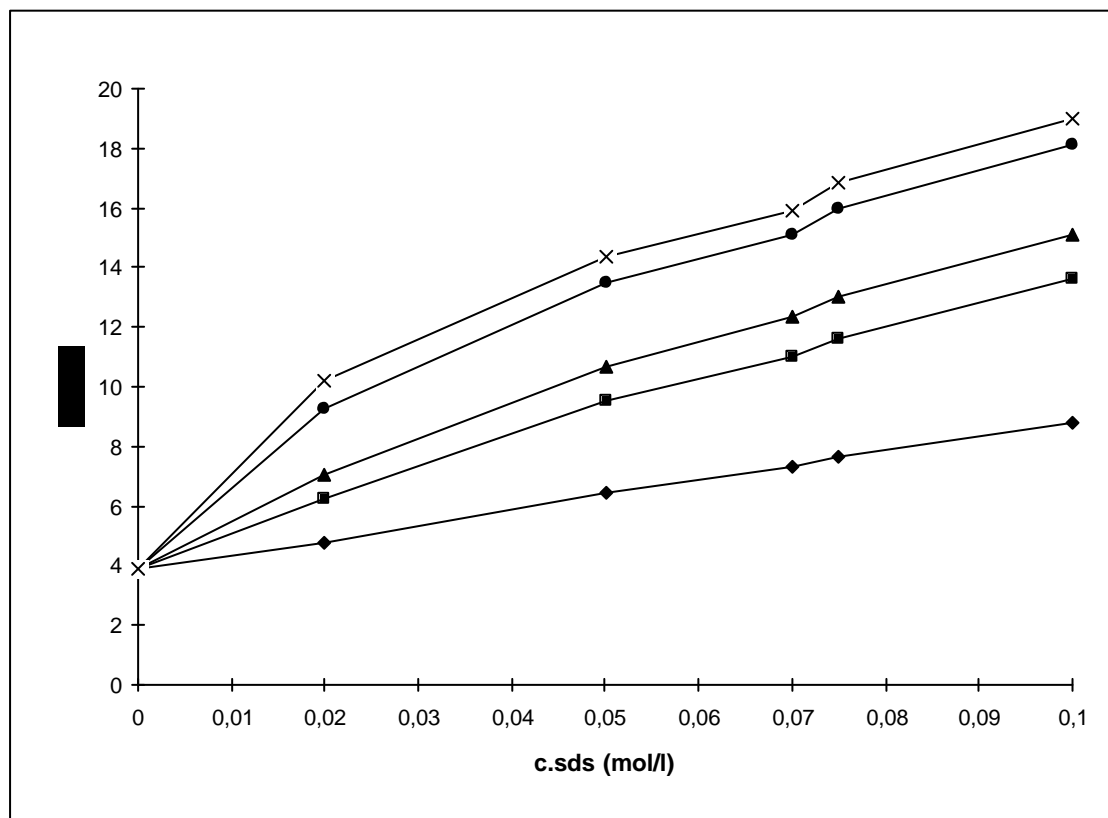
Tabla 1. Relación entre los tiempos de retención y las solubilidades en agua [7] de los compuestos analizados. $c_{surf.}=0.07M$, $F.I.=0.02M$.

Por lo tanto, a partir de los valores de solubilidad en agua podemos aproximar el orden de elución de los solutos aniónicos por una parte, y de los neutros por otra. Intentar deducir el orden de elución global, aniónicos y neutros conjuntamente, a partir de las solubilidades no es correcto, ya que las fuerzas que actúan sobre los dos tipos de compuestos cuando se está realizando el análisis son diferentes. Por ejemplo, el 2,4-DB y el Linurón tienen solubilidades similares pero sus tiempos de elución son muy diferentes, ya que las interacciones electrostáticas entre la carga negativa del 2,4-DB y las de la superficie micelar provocan que su tiempo de permanencia en la fase micelar sea inferior que el del Linurón, y por tanto, que eluya más rápidamente que éste.

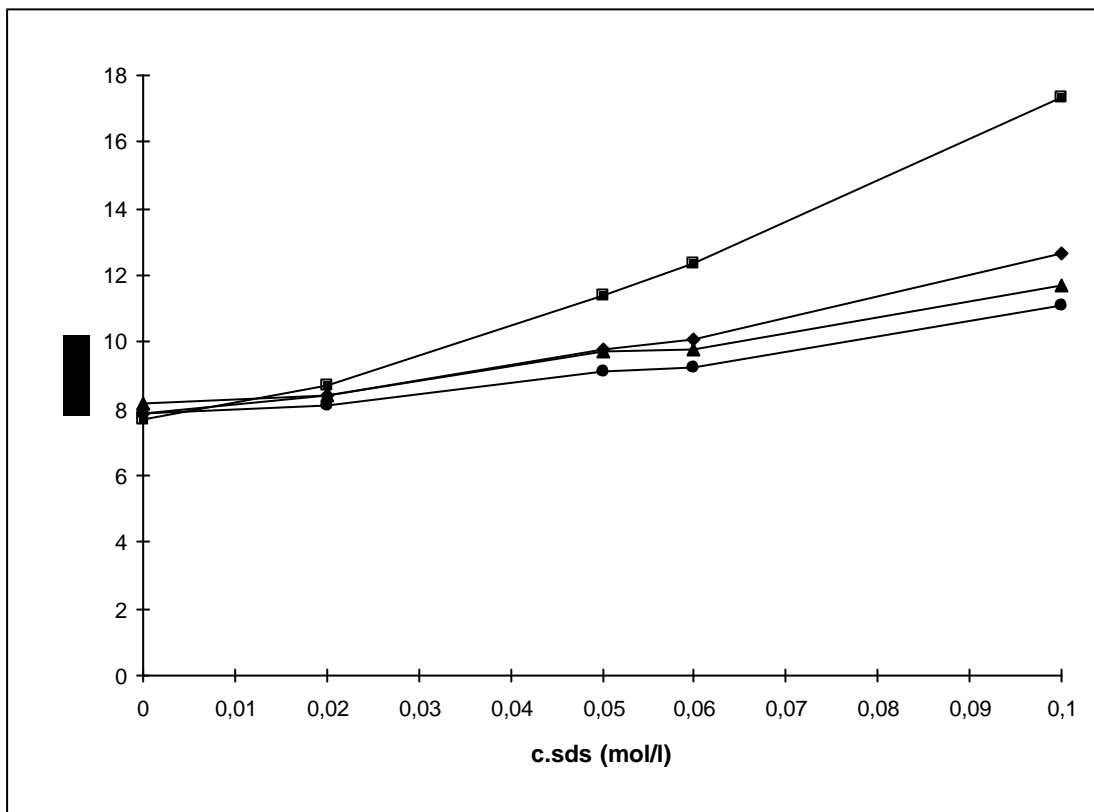
Otro resultado experimental destacable es el tiempo de elución del Fenurón, el cual es menor que el de los compuestos aniónicos. Esto es debido a su alta solubilidad en agua (tabla 1) considerablemente mayor que la de cualquiera de los solutos iónicos estudiados.



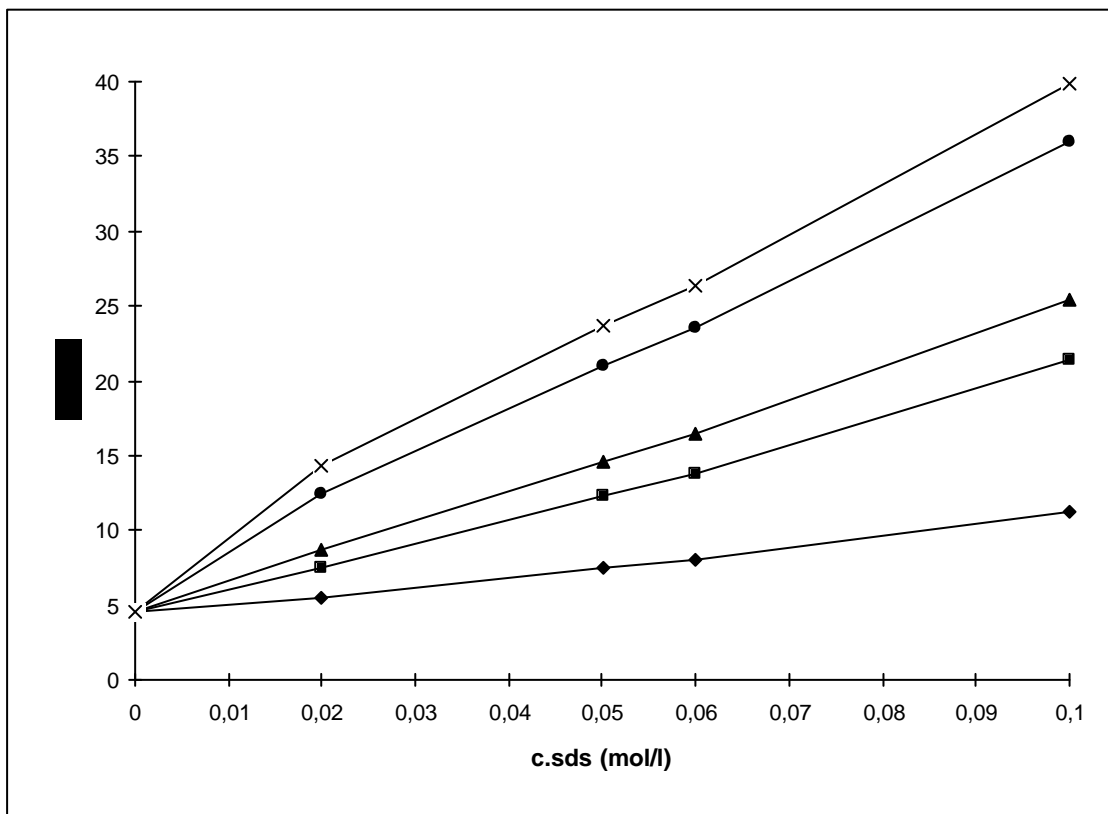
Gráfica 1: tiempo de elución de los compuestos aniónicos con diferentes concentraciones de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. ? 2,4-DP ? 2,4-D ? 2,4,5-T | 2,4-DB



Gráfica 2: tiempo de elución de los compuestos neutros con diferentes concentraciones de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. ? Fenurón | Monurón ? Monolinurón ? Diurón ? Linurón.



Gráfica 3: tiempo de elución de los compuestos aniónicos con diferentes concentraciones de SDS y con una fuerza iónica de 0.04M. Otras condiciones similares a la gráfica 1.



Gráfica 4: tiempo de elución de los compuestos neutros con diferentes concentraciones de SDS y con una fuerxza iónica de 0.04M. Otras condiciones similares a la gráfica 2.

3.1.2. Influencia de la concentración de surfactante en t_{eo} y t_{mc} .

Los resultados experimentales de la tabla 2 muestran que t_{eo} permanece prácticamente invariable mientras que t_{mc} aumenta al aumentar c_{surf} .

$c_{surf.}$	F.I. = 0.02M			F.I. = 0.04M		
	t_{eo}	t_{mc}	t_{mc} / t_{eo}	t_{eo}	t_{mc}	t_{mc} / t_{eo}
0,02M	4,36	16,00	3,66	4,70	24,40	5,42
0,05M	4,40	17,08	3,88	4,88	33,60	7,13
0,07M	4,43	18,09	4,10	4,76	40,53	8,89
0,10M	4,41	21,25	4,82	4,91	52,25	10,64

Tabla 2. Variación de t_{eo} y t_{mc} con la concentración de surfactante y con la fuerza iónica.

t_{eo} está relacionado con la viscosidad de la disolución, η , según las expresiones [30,31]:

$$V_{eo} \propto \frac{\eta}{E} \quad (41)$$

$$t_{eo} \propto \frac{L}{V_{eo}} \quad (42)$$

donde:

η : corresponde a la permitividad de la disolución.

L : es el potencial del capilar.

E : la fuerza del campo eléctrico.

Como el aumento de la concentración de surfactante provoca un incremento lineal de la viscosidad [30], también ha de causar, según las ecuaciones anteriores, un aumento de t_{eo} . Experimentalmente, y en el rango de concentraciones de surfactante estudiadas, no se observó este incremento, mientras que al realizar un ensayo puntual con una concentración de SDS de 0,20M y F.I.=0.02M sí que se observó un incremento significativo con t_{eo} =5,32 min. Este comportamiento es debido a que hasta valores próximos a 0.10M, el aumento de la viscosidad causada por el incremento de $c_{surf.}$ es compensado por el calentamiento de la disolución debido al efecto Joule. A concentraciones superiores este equilibrio no se produce y se incrementa la viscosidad.

Con respecto a t_{mc} , el incremento observado experimentalmente ha de ser causado por un aumento de la velocidad electroforética de la micela, V_{ep} , ya que:

$$t_{mc} \propto \frac{L}{V_{eo} \cdot V_{ep}} \quad (43)$$

y V_{eo} permanece constante, ya que está relacionado con t_{eo} según la ecuación (42) y t_{eo} permanece constante al variar la concentración de surfactante (tabla 2).

V_{ep} viene definido por [31]:

$$V_{ep} \propto \frac{2 \cdot \psi_{mc}}{3 \cdot a} \cdot f(a) \cdot E \quad (44)$$

donde $f(a)$ depende de la forma de la partícula. Para partículas esféricas $a = r$ y $f(a) = 1,5$ siendo "a" el radio de la partícula. ψ_{mc} es el potencial de la superficie de la micela.

El signo negativo de V_{eo} en la ecuación (41) nos indica que V_{eo} y V_{ep} tienen sentidos contrarios.

Otro efecto que provoca el aumento de la concentración de surfactante es un incremento de la relación t_{mc}/t_{eo} , tal y como puede verse en la tabla 2. Un valor alto de t_{mc}/t_{eo} es importante para obtener una buena resolución (apartado 2.3) y para extender la ventana de elución del análisis [32], n, ya que una de las limitaciones que tiene la técnica analítica MECC es que el número de picos que pueden ser separados está limitado entre t_{eo} y t_{mc} (ventana de elución). El valor de n viene definido por siguiente ecuación:

$$n \approx 1 \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln \frac{t_{mc}}{t_{eo}} \quad (45)$$

siendo N el promedio de la eficacia de los picos. Como N suele ser superior a 100.000 platos teóricos, la mayor o menor extensión del rango t_{mc}/t_{eo} será el factor determinante del número de picos potencialmente resueltos mediante MECC.

3.1.3. Cálculo de los factores de capacidad y las constantes de distribución.

Mediante las ecuaciones (12) y (15) se determinaron los factores de capacidad de los plaguicidas estudiados para diferentes concentraciones de tensioactivo y fuerza iónica. A partir de estos valores y teniendo en cuenta la relación lineal entre k' y c_{surf} , definida en la ecuación (39):

$$k' = K.v.(c_{surf} - CMC) \tag{39}$$

se calcularon las constantes de distribución de cada uno de estos compuestos.

Las representaciones gráficas entre k' y c_{surf} para valores de fuerza iónica de 0.02M y 0.04M se exponen en las gráficas 5, 6, 7 y 8. La pendiente de las rectas obtenidas corresponderá al producto del volumen molar parcial del surfactante por la constante de distribución del compuesto estudiado. El volumen molar parcial del surfactante usado para los cálculos, 0.247 l/mol, fué tomado de Shinoda [33]. A partir del valor de la concentración de surfactante para $k'=0$ se podrá calcular su CMC bajo las condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	ecuación de la recta	r²
Fenurón	y = -0,071+17,275x	0,996
Monurón	y = -0,195+58,675x	0,998
Monolinurón	y = -0,277+85,531x	0,998
Diurón	y = -0,579+216,854x	0,999
Linurón	y = -0,919+321,299x	0,999
2,4-DP	y = -0,018+5,559x	0,998
2,4-D	y = -0,024+5,693x	0,996
2,4,5-T	y = -0,033+7,872x	0,996
2,4-DB	y = -0,076+17,366x	0,998

Tabla 3. Rectas de regresión y coeficientes de regresión obtenidos al aplicar la ec. (39) con una fuerza iónica de 0,02M.

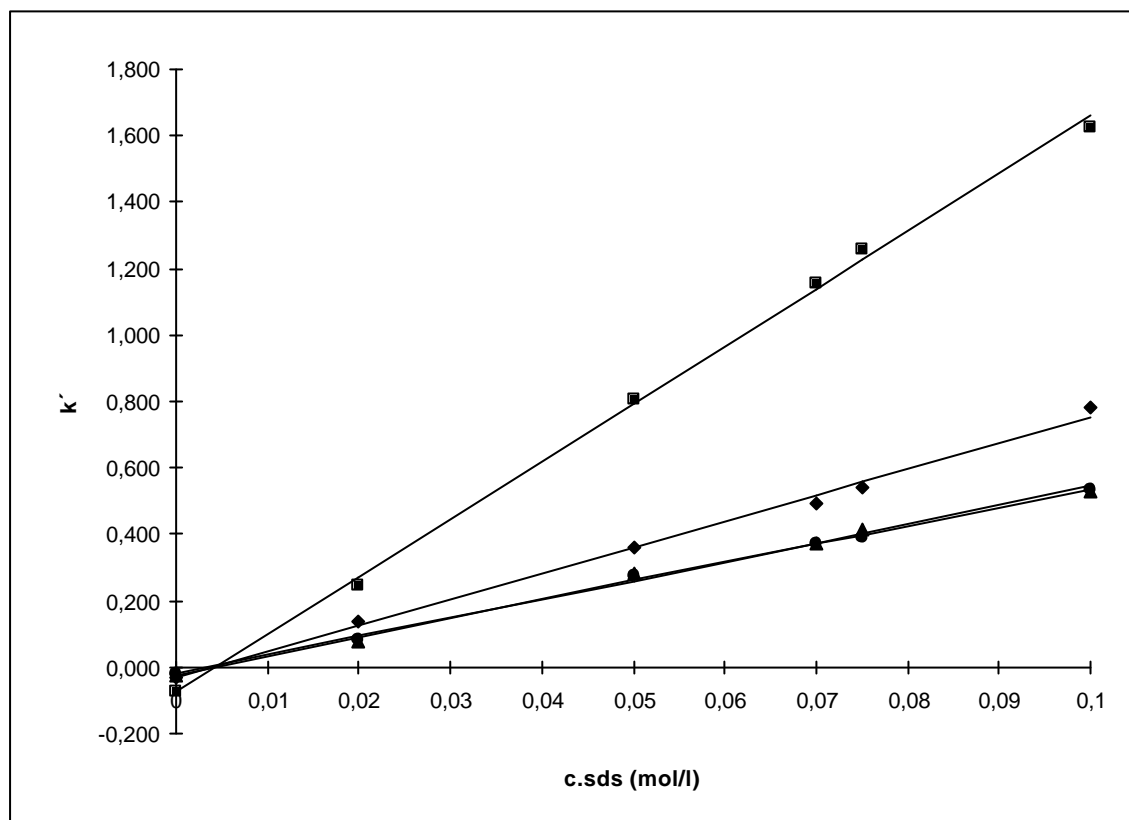
	ecuación de la recta	r²
Fenurón	y = -0,048+16,827x	0,999
Monurón	y = -0,277+58,394x	0,998
Monolinurón	y = -0,302+84,351x	0,999
Diurón	y = -0,939+214,353x	0,998
Linurón	y = -1,177+313,642x	0,999
2,4-DP	y = -0,022+5,494x	0,999
2,4-D	y = -0,022+6,529x	0,996
2,4,5-T	y = -0,032+8,701x	0,999
2,4-DB	y = -0,087+19,602x	0,999

Tabla 4. Rectas de regresión y coeficientes de regresión obtenidos al aplicar la ec. (39) con una fuerza iónica de 0,04M

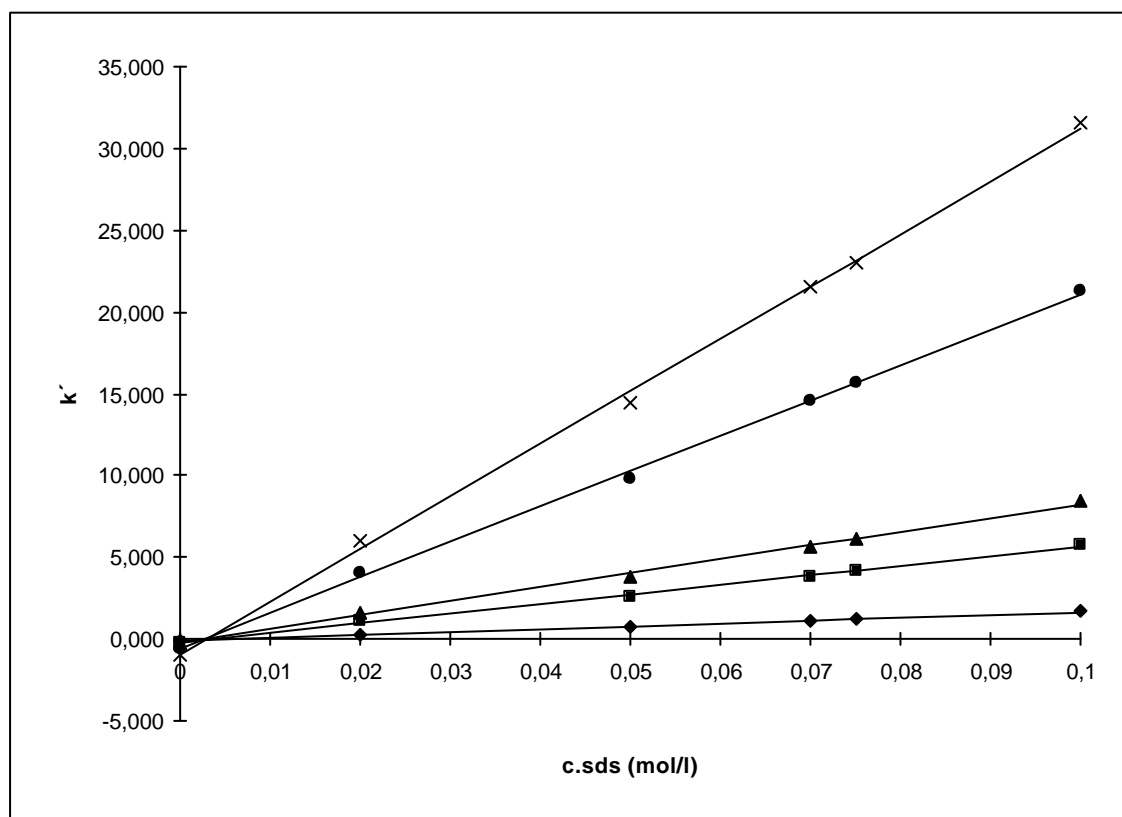
	I = 0,02M	I = 0,04M	Valor medio
Fenurón	69,9	68,1	69,0
Monurón	237,5	236,4	237,0
Monolinuró	345,9	341,5	343,7
Diurón	878,0	867,8	872,9
Linurón	1300,8	1269,8	1285,1
2,4-DP	22,5	22,2	22,4
2,4-D	23,0	26,4	24,6
2,4,5-T	31,9	35,2	33,5
2,4-DB	70,3	79,4	74,6

Tabla 5. Constantes de distribución de los compuestos analizados.

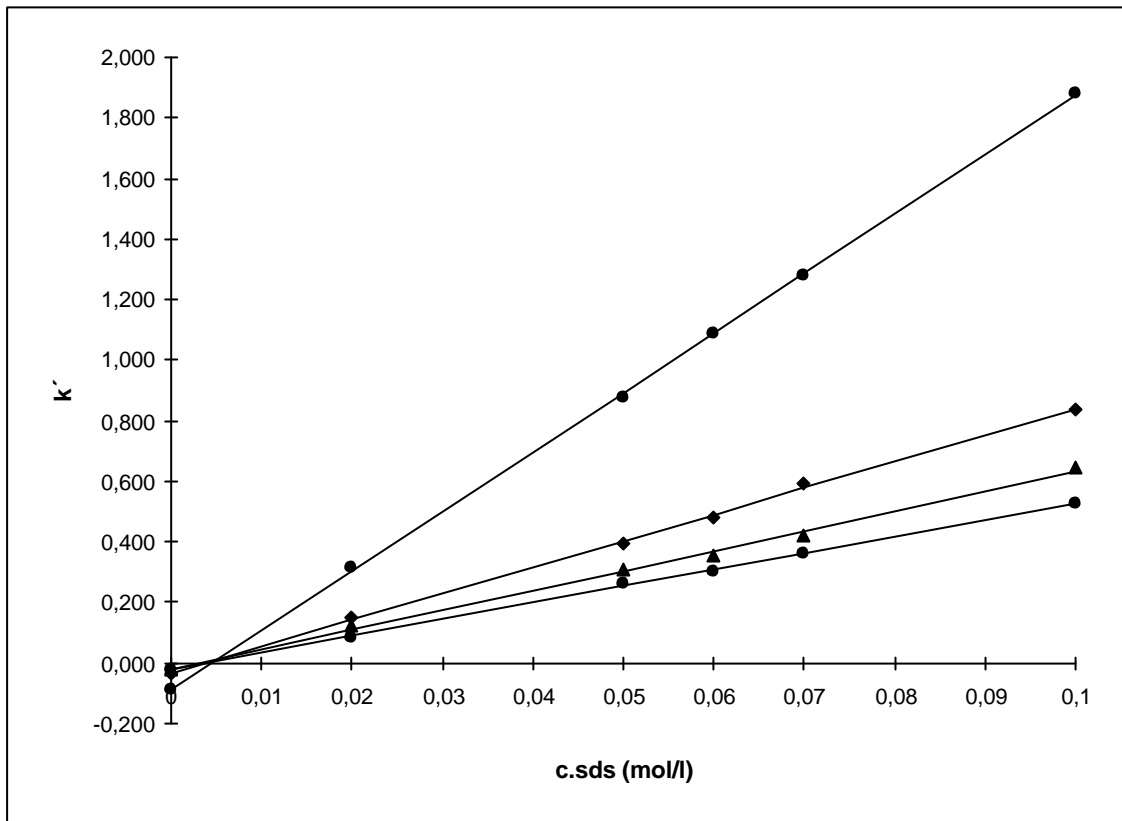
El valor medio de la CMC obtenido fué de 3.82 mM. Este valor es menor que el dado en la bibliografía de 8.1 mM en agua, debido a que la CMC es reducida con la adición de electrolitos [25,29]. El resultado obtenido es acorde con los resultados obtenidos por otros autores (Khaledi [18], Terabe [15]) en condiciones experimentales similares.



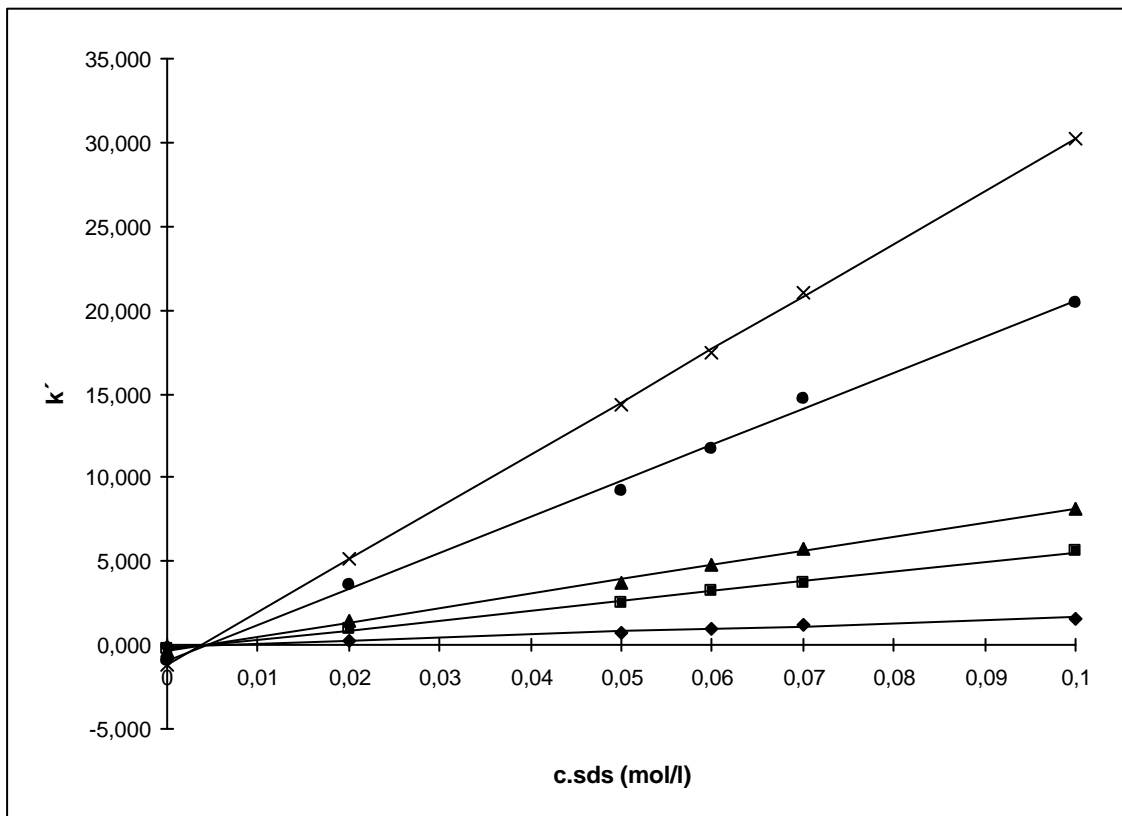
Gráfica 5: Coeficientes de distribución de los compuestos aniónicos con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. Otras condiciones similares a la gráfica 1.



Gráfica 6: Coeficientes de distribución de los compuestos neutros con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. Otras condiciones similares a la gráfica 2.



Gráfica 7: Coeficientes de distribución de los compuestos aniónicos con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0,04M. Otras condiciones similares a la gráfica 1.



Gráfica 8: Coeficientes de distribución de los compuestos neutros con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0,04M. Condiciones similares a la gráfica 2.

3.1.4. Influencia de la concentración de surfactante en la eficacia.

Los resultados obtenidos para una fuerza iónica de 0.02M, a diferentes concentraciones de SDS y utilizando la ecuación (28) para el cálculo de N están representados en las gráficas 9 y 10.

Para los compuestos neutros, la gráfica 10 nos indica que en MECC la concentración de surfactante influye decisivamente en la eficacia: hasta una determinada concentración su aumento provoca un incremento importante de N, y a partir de esta concentración N se mantiene constante o decrece. Esto significa que para una determinada eficacia de separación de un compuesto existe un valor de c_{surf} óptimo.

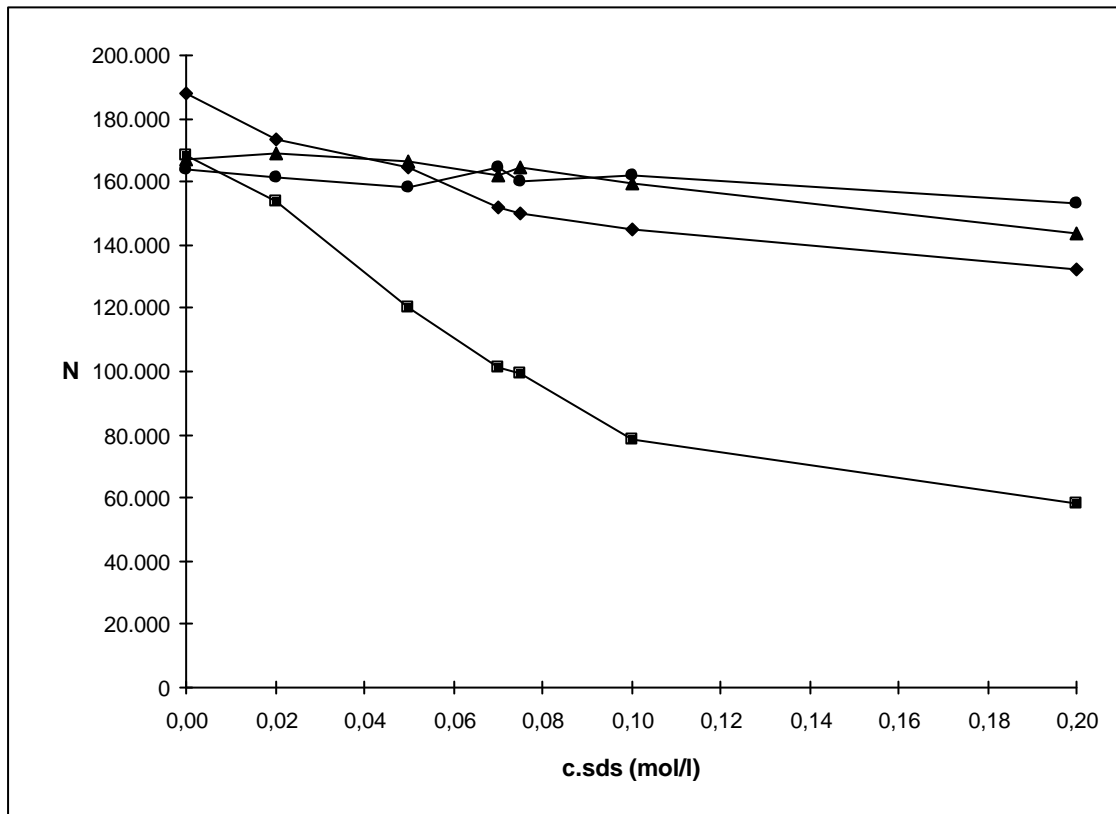
En nuestro caso, y refiriéndonos a los compuestos neutros, para concentraciones de tensioactivo superiores a 0,07M el aumento de la eficacia es poco significativo mientras que los tiempos de elución se incrementan notablemente. Para concentraciones mas altas de 0,10M la eficacia comienza a disminuir de forma que a $c_{\text{surf}}=0,20\text{M}$ los valores de N son similares a los obtenidos con $c_{\text{surf}}=0,05\text{M}$.

Sepaniak M. J. [21] dio una explicación al hecho de que para concentraciones bajas de surfactante el efecto en la eficacia sea importante, mientras que con valores más altos no se observe esta relación o el efecto sea negativo. Según este autor, la resistencia intermicelar a la transferencia de masa ($H_{M,m}$) es un factor significativo en la altura total de platos H y disminuye al incrementarse la concentración de surfactante (apartado 2.3). Como la eficacia es inversamente proporcional a H, la disminución de H provoca el aumento de N, tal y como se observó experimentalmente. Sin embargo, a concentraciones más altas el intercambio calorífico de la columna capilar no es suficiente para impedir que se forme un gradiente de temperatura transversal a la columna, provocando un factor de dispersión térmico ($H_{M,c}$) que influye negativamente: en estas condiciones, cuanto mayor es la concentración de tensioactivo, mayor es este factor de dispersión y menor es la eficacia.

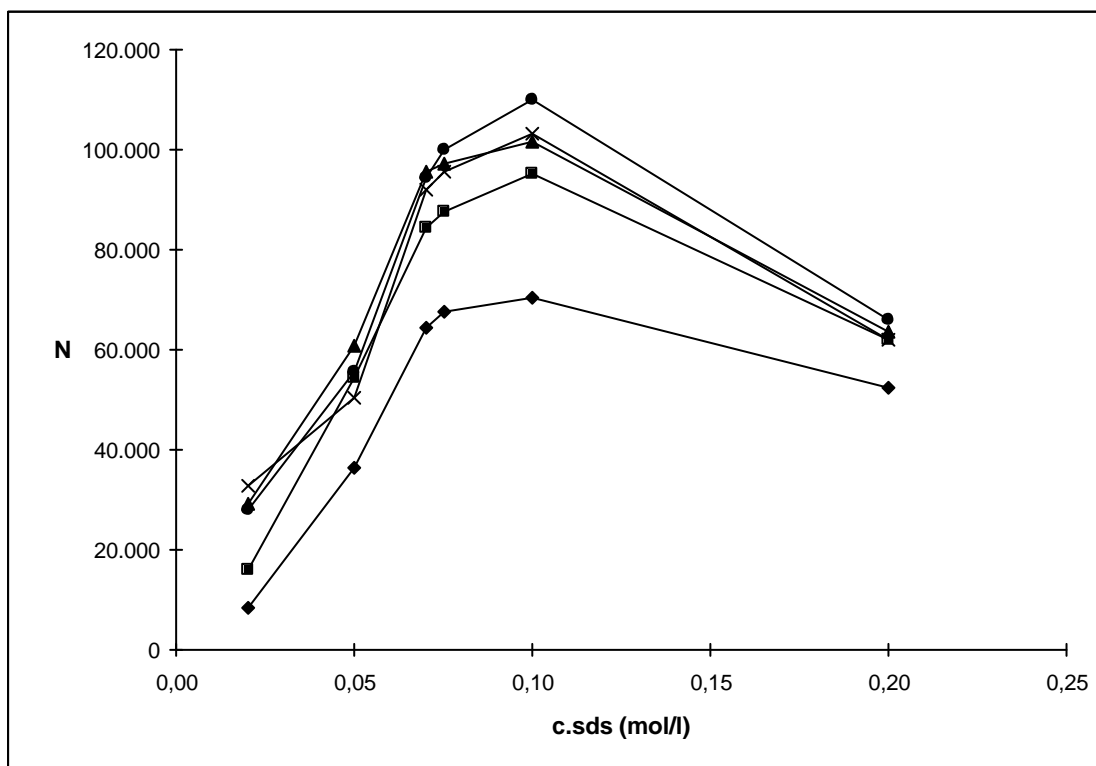
En los compuestos aniónicos el comportamiento es diferente (gráfica 9): en los compuestos más hidrófobos (2,4,5-T y 2,4,-DB) se observa una disminución de la eficacia con respecto al análisis sin micelas (CZE), mientras que en los más hidrófilos la disminución es más suave (2,4-D y 2,4,5-T) o inapreciable (2,4-DP).

Como ya se explicó en el apartado 2.3, la técnica analítica MECC tiene unos factores de dispersión adicionales con respecto a CZE que provocan que las eficacias obtenidas, en general,

sean menores que en CZE. En compuestos hidrófilos como el 2,4-DP, como la interacción con las micelas es mínima la concentración de surfactante no influye en su eficacia. En cambio, para compuestos más hidrófobos como el 2,4-DB, donde la interacción micelar es importante, el aumento de la concentración de surfactante conlleva un incremento de los efectos de dispersión propios de MECC y una disminución de la eficacia, de tal forma que para este compuesto la eficacia disminuyó de $N=168.590$ para $c_{\text{surf.}}=0$ hasta $N=58.536$ con $c_{\text{surf.}}=0,20\text{M}$.



Gráfica 9: Número de platos de los compuestos aniónicos con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. Otras condiciones similares a la gráfica 1.



Gráfica 10: Número de platos de los compuestos neutros con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0.02M. Otras condiciones similares a la gráfica 2.

3.1.5. Influencia de la concentración de surfactante en la resolución.

Con respecto a los compuestos neutros, en todo el rango de concentraciones de surfactante y de fuerza iónica estudiados, la resolución (Rs) siempre ha sido más que suficiente para conseguir una separación óptima. De todas formas, a partir de los resultados obtenidos podemos confirmar el aumento de Rs provocado por el incremento de $c_{surf.}$:

$c_{surf.}$	Rs.1	Rs.2
0,02	3,93	5,02
0,05	11,18	5,62
0,07	14,44	7,04
0,08	14,89	7,78
0,10	16,00	8,04
0,20	17,20	9,00

Tabla 6. Resolución entre los picos del Monurón y Monolinurón (Rs.1) y Diurón y Linurón (Rs.2) para diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0,02M.

Con respecto a los compuestos aniónicos, el comportamiento de Rs es similar al observado en los compuestos neutros. En este caso la concentración de surfactante fue fundamental para poder separar los picos del 2,4-D y el 2,4,5-T: utilizando concentraciones superiores a 0,07M la mezcla quedaba totalmente resuelta.

$c_{surf.}$	Rs.1	Rs.2	Rs.3
0,02	2,18	0	8,01
0,05	6,91	0	14,24
0,07	7,87	1,52	18,70
0,08	7,78	2,29	18,42
0,10	7,51	8,33	34,35
0,20	8,20	12,03	39,25

Tabla 7. Resolución entre los picos del 2,4-DP y 2,4-D (Rs.1), 2,4-D y 2,4,5-T (Rs.2) y 2,4,5-T y 2,4-DB (Rs.3) con diferentes conc. de SDS y con una fuerza iónica de 0,02M.

A partir de los resultados tanto de los compuestos neutros como los aniónicos, se deduce que el intervalo óptimo de trabajo ha de ser entre una concentración superior a 0,07M, para obtener una Rs correcta en los compuestos aniónicos, y una inferior a 0,10M para no aumentar prohibitivamente los tiempos de retención de los compuestos neutros más hidrófobos.

A continuación se muestran algunos electroferogramas obtenidos a diferentes concentraciones de surfactante y de fuerza iónica (figuras 4, 5, 6 y 7), donde se puede observar la influencia de estos parámetros experimentales en la eficacia y la resolución. De ellos deducimos que utilizando una concentración de surfactante de 0,075M, con una fuerza iónica de 0.02M, obtenemos los mejores resultados, ya que se consigue una separación completa de los picos del 2,4-D y 2,4,5-T mientras que los picos del Fenurón y 2,4,5-T no se superponen, como ocurre con una concentración de 0.10M.

Figura 4: electroferograma correspondiente a una disolución de 50ppm de Fenurón (1), 2,4-DP (2), 2,4-D (3), 2,4,5-T, (4), 2,4-DB (5), Monurón (6), Monolinurón (7), Diurón (8) y Linurón (9) utilizando una concentración de surfactante (SDS) de 0.05M y una fuerza iónica de 0.02M.

Figura 5: electroferograma correspondiente a una disolución de 50ppm de Fenurón (1), 2,4-DP (2), 2,4-D (3), 2,4,5-T, (4), 2,4-DB (5), Monurón (6), Monolinurón (7), Diurón (8) y Linurón (9) utilizando una concentración de surfactante (SDS) de 0.075M y una fuerza iónica de 0.02M.

Figura 6: electroferograma correspondiente a una disolución de 50ppm de Fenurón (1), 2,4-DP (2), 2,4-D (3), 2,4,5-T, (4), 2,4-DB (5), Monurón (6), Monolinurón (7), Diurón (8) y Linurón (9) utilizando una concentración de surfactante (SDS) de 0.10M y una fuerza iónica de 0.02M.

Figura 7: electroferograma correspondiente a una disolución de 50ppm de Fenurón (1), 2,4-DP (2), 2,4-D (3), 2,4,5-T, (4), 2,4-DB (5), Monurón (6), Monolinurón (7), Diurón (8) y Linurón (9) utilizando una concentración de surfactante (SDS) de 0.05M y una fuerza iónica de 0.04M.

3.2. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Para estudiar la influencia de la fuerza iónica (F.I.) se realizaron ensayos de separación de la mezcla de trabajo a valores de 0,01, 0,02, 0,04 y 0,06M y con una concentración de surfactante de 0,05M. Los resultados demostraron que al aumentar F.I. también lo hacían los tiempos de retención tanto de los compuestos aniónicos como de los neutros (gráficas 11 y 12), y que este incremento era más acusado en los compuestos con tiempos de elución altos, es decir, en compuestos asociados básicamente con la fase micelar.

Todo ello indica que el efecto producido por la variación de la concentración del tampón influye principalmente en la fase micelar: origina un aumento de la concentración micelar (y por lo tanto una disminución de la CMC del surfactante) debido a la disminución de la repulsión electrostática entre las partes iónicas de las moléculas de surfactante que forman la micela [36]. El aumento de la concentración micelar causará una disminución de los tiempos de elución de los solutos y de la micela (t_{mc}) y un aumento de sus coeficientes de distribución:

F.I.	Fenurón	Monurón	Monolin.	Linurón	Diurón	2,4-DP	2,4-D	2,4,5-T	2,4-DB
0,01M	0,644	2,528	3,012	9,280	13,821	0,213	0,221	0,334	0,748
0,02M	0,749	2,629	3,821	9,791	14,416	0,277	0,280	0,358	0,806
0,04M	0,790	2,773	4,001	10,121	15,011	0,300	0,306	0,392	0,876
0,06M	0,886	3,093	4,518	11,801	17,017	0,335	0,347	0,441	1,281

Tabla 8. Coeficientes de distribución obtenidos a diferentes fuerzas iónicas y con una concentración de SDS de 0.05M.

Por otra parte, t_{eo} también aumenta considerablemente. Este aumento es justificado por algunos autores [39,40] como el resultado de la variación del potencial zeta de la pared del capilar. La diferencia de concentración de aniones en la disolución del capilar y en la pared decrece cuando se incrementa la fuerza iónica, provocando una disminución de la movilidad electrosmótica.

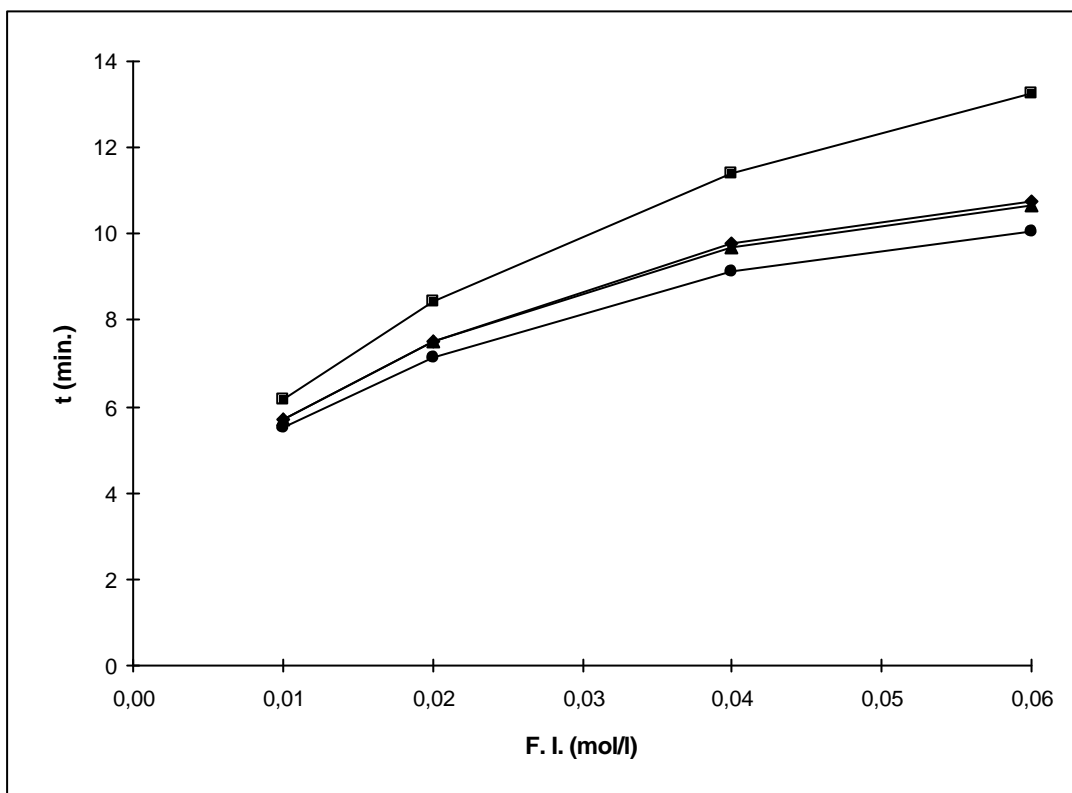
F.I.	t_{eo}	t_{mc}	I (?A)
0,01M	3,62	10,54	13
0,02M	4,40	17,08	22
0,04M	4,71	29,35	44
0,06M	5,30	31,04	68

Tabla 9. Variación de t_{eo} , t_{mc} y la intensidad de corriente (I) a diferentes fuerzas iónicas y con una concentración de surfactante de 0.05M.

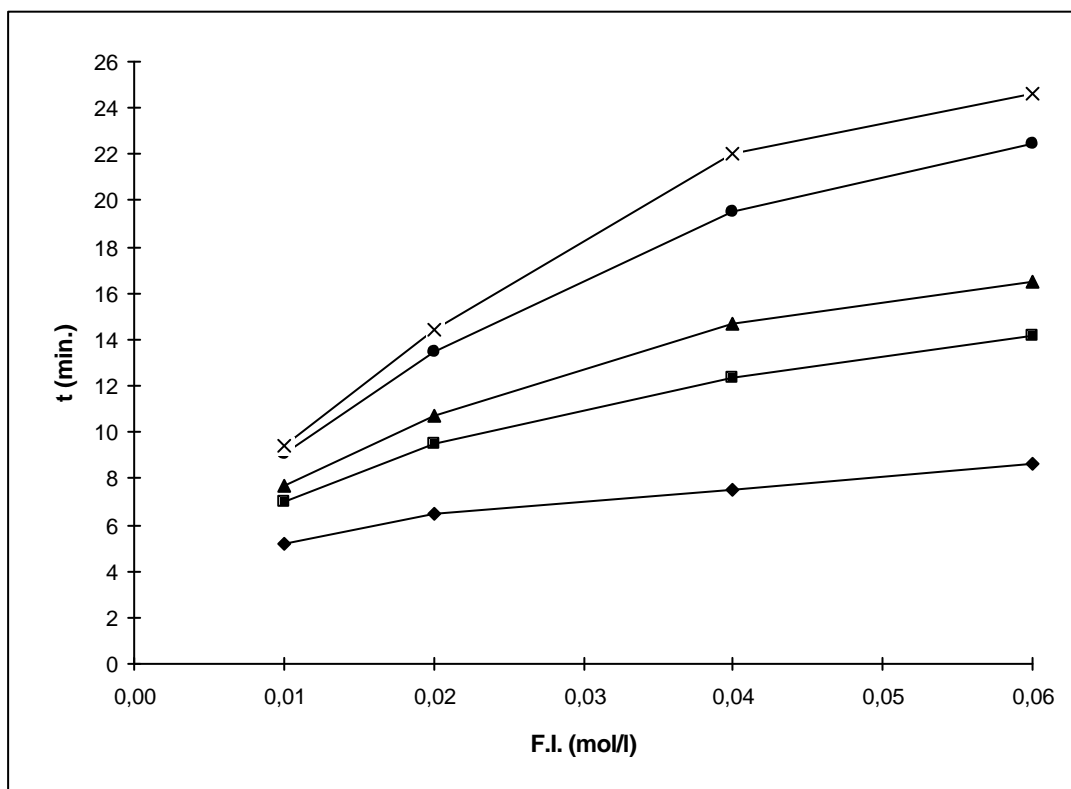
Los resultados experimentales descritos en las gráficas 11 y 12 demuestran también que hasta valores de 0,04M el aumento de la F.I. mejora la separación de la mezcla, pero esta mejoría no es tan acusada como la que se produce con la concentración de surfactante. En cambio, los tiempos de retención aumentan alarmantemente. Para valores superiores a 0,04M la intensidad de la corriente toma valores tan altos que provoca pérdidas de resolución y de eficacia debido al efecto Joule [41].

Por lo tanto, la fuerza iónica óptima ha de ser como máximo 0,04M y como mínimo un valor que asegure la movilidad electroosmótica del sistema. En este margen de valores se tomó 0,02M como valor óptimo ya que con 0,04M aumentaba considerablemente los tiempos de retención sin obtener a cambio una mejoría importante de la resolución de la mezcla, tal y como se observa en la figura 7, y se descartó el valor de 0,01M por tener una intensidad de corriente demasiado baja.

* Finalmente comentar que también se realizaron estudios sobre la influencia del tipo de tampón (tampón fosfato, citrato y borato) y el pH (entre pH=5 y pH=11) en el sistema descrito, manteniendo constante la fuerza iónica y la concentración de surfactante. Los resultados no fueron significativos en ninguno de los casos estudiados y no se detallarán los resultados obtenidos.



Gráfica 11: tiempo de elución de los compuestos aniónicos con diferentes fuerzas iónicas y con una conc. de SDS de 0.05M. Otras condiciones similares a la gráfica 1.



Gráfica 12: tiempo de elución de los compuestos neutros con diferentes fuerzas iónicas y con una concentración de SDS de 0.05M. Otras condiciones similares a la gráfica 2.

3.3. TIPO DE SURFACTANTE. SURFACTANTES CATIONICOS.

Una vez desarrollada la técnica MECC utilizando tensioactivos aniónicos y viendo su potencial de separación en compuestos neutros y aniónicos, se examinó la posibilidad de utilizar tensioactivos cationicos en la separación de la mezcla de plaguicidas, estudiando sus ventajas e inconvenientes con respecto a los aniónicos.

En la bibliografía existen bastantes referencias de utilización de este tipo de tensioactivos en MECC. Principalmente para la separación de compuestos neutros [34, 35] cationicos [36] o mezclas de ambos [37]. Los mecanismos de separación en estos casos son similares a los descritos para compuestos neutros y aniónicos utilizando tensioactivos aniónicos.

La separación de compuestos aniónicos con tensioactivos cationicos es más problemática, ya que si sus pK 's son inferiores a 4.5 pueden existir interacciones electrostáticas de estos compuestos con la superficie micelar o la pared del capilar, la cual también estará cargada positivamente (figura 8), e impedirán su separación o elución. Si el pK es superior a 5 la separación se puede facilitar reduciendo el pH de la disolución tampón para disminuir la carga negativa de los analitos. Se debe tener en cuenta que el pH de la disolución tampón puede disminuir hasta un mínimo de 4, ya que por debajo de este valor los grupos silanol de la pared del capilar se protonan y desaparece la movilidad electroosmótica.

Algunos autores [32,26] han utilizado también tensioactivos cationicos para modificar el sentido de la movilidad electroosmótica, pero a concentraciones inferiores a su CMC para impedir la formación de micelas.

a) Descripción teórica del sistema.

Cuando se utilizan tensioactivos cationicos, el sistema de separación descrito en apartados 2.1.1 y 2.2.1 sufre un cambio importante:

Las moléculas de surfactante son atraídas electrostáticamente hacia los grupos cargados negativamente de la pared del capilar, formando una primera capa hidrofóbica. Esta primera capa de surfactante neutraliza la carga negativa de la superficie del capilar, y a través de sus cadenas no polares interacciona con otras cadenas no polares de moléculas de surfactante libres formando una doble capa de tensioactivo [34, 38].

En esta doble capa los grupos positivos de la segunda capa están orientados hacia la fase acuosa. La carga neta de la pared es positiva y el flujo electroosmótico cambia de sentido

dirigiéndose hacia el ánodo, mientras que la movilidad electroforética de la micela, la cual está cargada positivamente, se dirige hacia el cátodo.

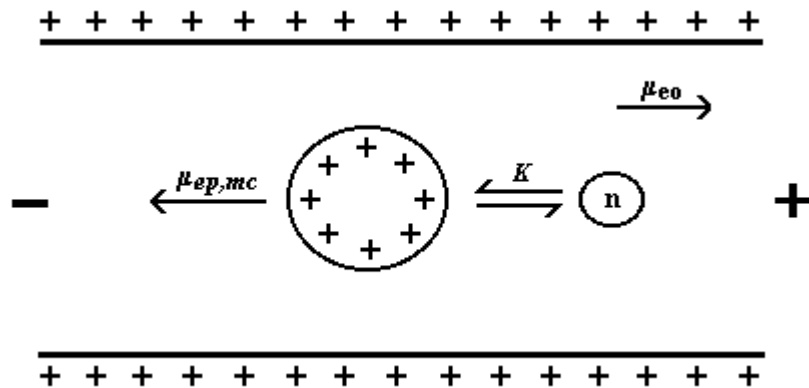


Figura 8. Interacción de un soluto neutro (n) con una micela

Todas las expresiones descritas en los apartados anteriores, y deducidas a partir de un sistema formado por un tensioactivo aniónico, pueden ser extrapoladas a los tensioactivos catiónicos.

b) Condiciones experimentales.

- Fuerza iónica: 0,02M
- Tipo de surfactante: Tetradeciltrimetilamonio bromuro (TTAB).
- Concentración de surfactante: 0,02M, 0,04M
- Longitud de onda: 240 nm.

La longitud de onda utilizada fue diferente a la utilizada en los anteriores ensayos debido a que a 210 nm. no se consiguió una línea de base estable.

Todas las demás condiciones de trabajo fueron similares a las descritas anteriormente, con la excepción de la polaridad del campo eléctrico que se tuvo que invertir.

c) Resultados.

En las dos concentraciones de surfactante estudiadas se obtuvieron resultados similares: mientras que los compuestos neutros se lograban separar con facilidad, los compuestos aniónicos salían todos al mismo tiempo y al final del electroferograma.

El orden de elución de los compuestos neutros fue el mismo que el obtenido al utilizar tensioactivos aniónicos, y los tiempos de elución fueron considerablemente inferiores. Con respecto a los compuestos aniónicos, las interacciones electrostáticas entre estos compuestos y la pared del capilar y la micela provocaron que éstos eluyeran más tarde que los neutros.

(Se intentó separarlos bajando el pH hasta 4,5 pero no se obtuvo ningún resultado interesante ya que sus pK's están entre 2,5 y 3 y a pH=4,5 están totalmente ionizados).

d) Conclusiones.

Las conclusiones son claras: la utilización de tensioactivos catiónicos puede ser interesante si solamente quisiéramos separar los compuestos neutros, y sobre todo en el caso hipotético de querer separar una mezcla de compuestos neutros y catiónicos.

En nuestro caso, al tener una mezcla problema formada por solutos aniónicos y neutros, este tipo de surfactante no nos proporciona resultados adecuados. A continuación se muestra un electroferograma obtenido con una concentración de surfactante de 0.02M e inyectando 10 ppm de la mezcla de plaguicidas.

Figura 9: electroferograma correspondiente a una disolución de 10ppm de Fenurón (1), Monurón (2), Monolinurón (3), Diurón (4), Linurón (5) y 2,4-DP + 2,4-D + 2,4,5-T + 2,4-DB (6), utilizando una conc. de surfactante (TTAB) de 0.02M, una fuerza iónica de 0.02M.

4. APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA TÉCNICA MECC.

4.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS.

a) Definición de las condiciones de trabajo óptimas.

A partir de los resultados obtenidos en los anteriores apartados llegamos a la conclusión de que el método analítico correcto es el siguiente:

- Tipo de surfactante: SDS
- Concentración de surfactante: 0,075M
- Tipo de tampón: Fosfatos
- Fuerza iónica: 0,02M
- pH: 7.0
- Longitud de la columna: $L_{TOT} = 60\text{cm}$. $L_{DET} = 40\text{cm}$.
- Voltaje: 20KV
- Volumen de inyección: 50nl

b) Reproducibilidad.

Con objeto de evaluar la precisión del método utilizado, se llevó a cabo el cálculo de la reproducibilidad realizando una serie de 10 inyecciones de la mezcla de plaguicidas a una concentración de 10 ppm. Con las áreas y los tiempos de retención obtenidos se realizó el cálculo de las desviaciones estándar (tabla 10).

Los resultados, tanto de las áreas como de los tiempos, están entre un 1% y un 2.5% de desviación estándar. Si aceptamos un 2% como valor máximo admitido, se observa que los resultados obtenidos en los compuestos neutros están cercanos a este máximo o lo sobrepasan, mientras que en los compuestos aniónicos los resultados son correctos.

Podemos resumir diciendo que los resultados son aceptables en compuestos aniónicos, mientras que en los compuestos neutros son “discutibles”.

	$\%_{tr}$	$\%_a$
Fenurón	1,3%	1.3%
Monurón	1.7%	1.7%
Monolinurón	1.6%	1.7%
Diurón	1.8%	2.5%
Linurón	1.9%	2.1%
2,4-DP	1.1%	1.1%
2,4-D	1.0%	0.9%
2,4,5-T	0.9%	1.0%
2,4-DB	1.1%	1.2%

Tabla 10. Desviaciones estándar de las áreas ($\%_a$) y de los tiempos de retención ($\%_{tr}$) de los compuestos analizados.

c) Límite de detección.

Se definió el límite de detección como la concentración de un compuesto que proporciona una altura del pico del electroferograma 2 veces superior al ruido de fondo del sistema. Los valores obtenidos, descritos en la tabla 11, son considerablemente más altos que los originados por otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida (apartado 4.3).

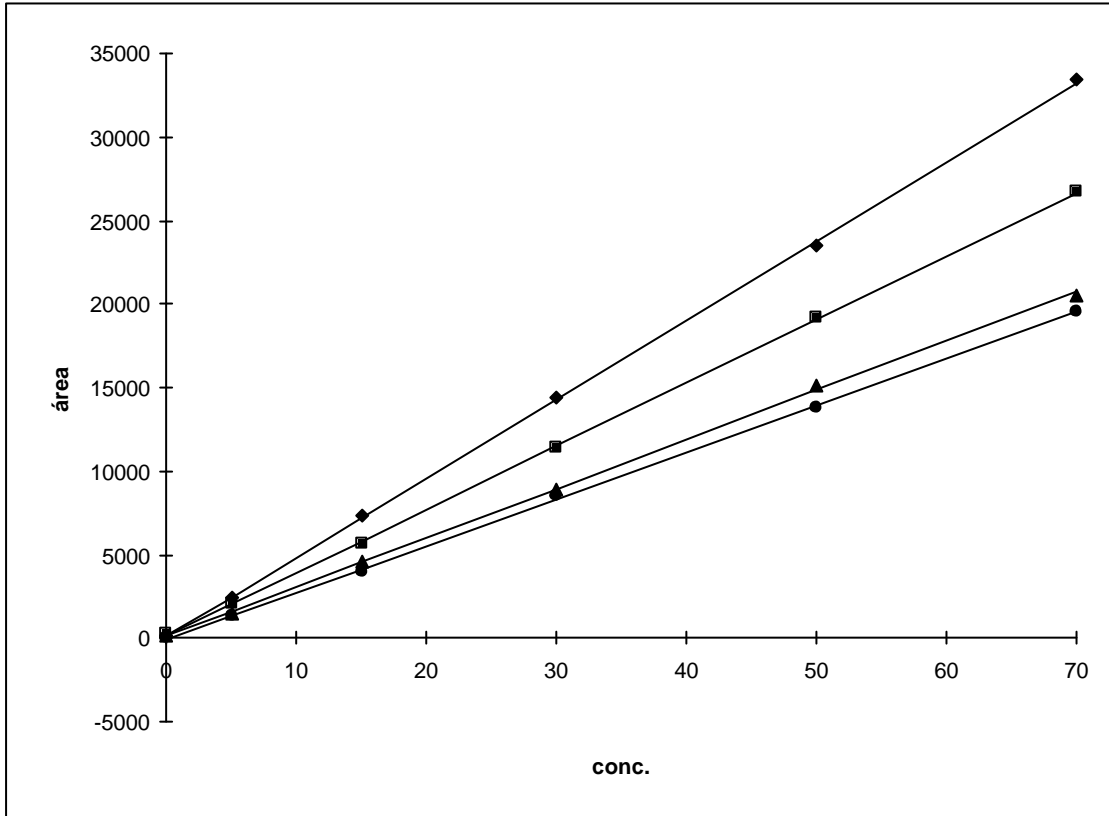
	límite de detección
Fenurón	1.42
Monurón	1.35
Monolinurón	1.35
Diurón	1.25
Linurón	1.35
2,4-DP	1.20
2,4-D	0.95
2,4,5-T	1.04
2,4-DB	1.11

Tabla 11. Límites de detección (mg/l) de los diferentes compuestos analizados.

d) Linealidad del método.

Se estudió la linealidad del método inyectando la mezcla de plaguicidas a diferentes concentraciones: 5 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 50 ppm y 70 ppm.

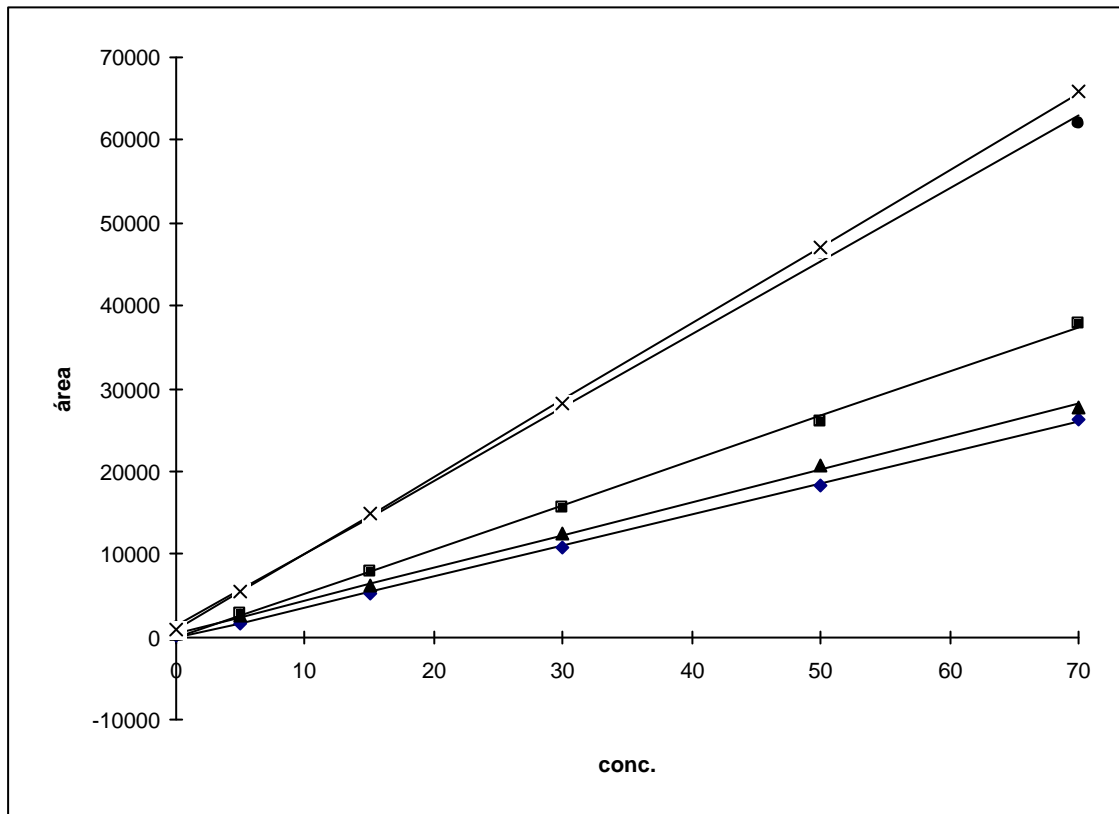
Los resultados se describen en las gráficas 13 y 14 y en las tablas 12 y 13 y confirman una linealidad correcta del método, dado que en todos los casos se obtienen coeficientes de regresión (r) superiores a 0.999.



Gráfica 13: Rectas de regresión de los compuestos aniónicos.
 ? 2,4-DP ? 2,4-D ? 2,4,5-T | 2,4-DB

	ecuación de la recta	r ²
2,4-DP	$y = -36.7 + 279.4x$	0.9998
2,4-D	$y = 129.9 + 249.1x$	0.9995
2,4,5-T	$y = 105.9 + 473.7x$	0.9998
2,4-DB	$y = 137.3 + 379.1x$	0.9999

Tabla 12. Valores de las rectas y los coeficientes de regresión de los compuestos aniónicos analizados.



Gráfica 14: Rectas de regresión de los compuestos neutros.
? Fenurón | Monurón ? Monolinurón ? Diurón ? Linurón.

	ecuación de la recta	r^2
Fenurón	$y = -183.3+373.1x$	0.9994
Monurón	$y = -6.9+532.7x$	0.9990
Monolinurón	$y = 266.4+395.5x$	0.9992
Diurón	$y = 866.4+880.7x$	0.9993
Linurón	$y = 513.1+926.2x$	0.9999

Tabla 13. Valores de las rectas y los coeficientes de regresión de los compuestos neutros analizados.

4.2. ANÁLISIS DE FORMULACIONES COMERCIALES DE HERBICIDAS.

El sistema analítico desarrollado se utilizó para analizar dos muestras comerciales: “2,4-D 40% líquido acuoso soluble” y “Diurón 80% polvo mojable”. Las muestras provienen de la empresa Cequisa. Se eligieron estas aplicaciones prácticas debido a que las concentraciones de los principios activos que se han de analizar son lo suficientemente elevadas como para que el alto límite de detección de la técnica MECC no provoque problemas en el análisis. También se tiene la ventaja de que los resultados obtenidos pueden ser contrastados con los obtenidos mediante HPLC en el laboratorio de control de calidad de la empresa suministradora de las muestras.

La primera muestra está formada por una disolución del herbicida 2,4-D en propilenglicol metil-eter y a una concentración del 40%, además se adiciona un 5% de un tensioactivo para aumentar la penetrabilidad del producto en la planta. La segunda muestra corresponde a una sustancia sólida formada en un 80% por Diurón; el 20% restante son humectantes que consiguen que el principio activo quede en suspensión cuando se diluye en agua para su posterior aplicación, dispersantes que impiden que el producto se compacte y cargas inertes (sílices, carbonatos...) que completan el volumen.

La muestra se preparó de forma similar a la mezcla de estándares utilizada anteriormente (apartado 1.4): primero se hizo una disolución de 1000 ppm en metanol con cada uno de estos herbicidas para después realizar una disolución de 50 ppm en agua (disolución de trabajo). En cada análisis se inyectaron 50 nl de esta disolución.

Los resultados obtenidos aplicando el método descrito en el apartado anterior, y cuantificando según la recta de calibrado correspondiente, fueron:

2,4-D	40.38%
Diurón	80.22%

En las figuras (10) y (11) se muestran los electroferogramas obtenidos en este análisis.

Figura 10: Análisis de una muestra Diurón 80% comercial mediante MECC.

Figura 11: Análisis de una muestra de 2,4,-D 40% comercial mediante MECC.

Para realizar los análisis de las dos muestras comerciales mediante HPLC, se tomaron como referencia los siguientes métodos oficiales:

Diurón:

E.P.A. Manual of Chemicals Methods for Pesticides and Devices, 3ª edición. Método “Diurón EPA-2”.

Fase móvil: metanol : agua 80:20
Longitud de onda: 254 nm.
Volumen de inyección: 20 µl
Columna: LiChrospher 100, RP-18 (5 µm), 10cm long., 0.45cm d.i.
Flujo: 1 ml/min.
Conc. de la muestra: 60 ppm

2,4-D:

Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International, 16ª edición, Volumen I, Capítulo 7, pág. 63, method 978.05: 2,4-D in Pesticide Formulations.

Fase móvil: 20% acetonitrilo + 80% agua, pH=2 con H₃PO₄
Longitud de onda: 280 nm.
Volumen de inyección: 20 µl
Columna: LiChrospher 100, RP-18 (5 µm), 10cm long., 0.45cm d.i.
Flujo: 1 ml/min.
Conc. de la muestra: 100 ppm

En ambos casos las muestras se prepararon realizando una disolución de 1000 ppm en metanol de cada una de las muestras iniciales, y diluyendo estas disoluciones con la fase móvil correspondiente hasta la concentración final descrita. Los estándares utilizados para realizar las dos cuantificaciones se prepararon de forma similar.

Los resultados obtenidos de su cuantificación fueron los siguientes:

2,4-D	40.01%
Diurón	80.45%

En las figuras (12) y (13) se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos en estos análisis.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos mediante HPLC, y confirman la viabilidad de MECC en el análisis rutinario de muestras comerciales o de productos técnicos de plaguicidas. En el apartado siguiente se compararán las dos técnicas y se razonarán las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

Figura 12: Análisis de una muestra comercial de Diurón 80% mediante HPLC.

Figura 13: Análisis de una muestra comercial de 2,4-D 40% mediante HPLC.

4.3. COMPARACION ENTRE MECC Y HPLC.

Para llevar a cabo este estudio comparativo se analizaron distintos parámetros característicos de ambas técnicas para el caso de los dos pesticidas presentes en las formulaciones comerciales analizadas en el apartado 4.2, lo que permitió comparar el comportamiento de pesticidas aniónicos (2,4-D) y neutros (Diuron) en MECC y HPLC.

Entre los distintos parámetros estudiados, aquellos que presentan unas diferencias más significativas y que, por lo tanto, precisan de un análisis más profundo para determinar las causas de las mencionadas diferencias y su repercusión en el análisis, son la eficacia, la sensibilidad y el coste económico.

a) Eficacia

En la Tabla 14 se muestran los valores de eficacia, como número de platos teóricos (N) calculados según la expresión:

$$N = 16 (t_r / w)^2$$

donde t_r es el tiempo de retención o de migración del soluto, y w la anchura del pico en la base.

Producto	HPLC	MECC
2,4-D	1.800	160.000
Diurón	10.000	92.000

Tabla 14. Número de platos obtenidos en el análisis de dos muestras comerciales mediante MECC y HPLC.

Al comparar los valores de N obtenidos se puede observar que, de forma general, éstos son mayores para MECC que para HPLC.

Como es sabido, la eficacia de un sistema es atribuible a su perfil de flujo. Dado que el flujo de la fase móvil es controlado de forma distinta en cada técnica [38], mediante la acción mecánica de una bomba en HPLC y eléctricamente en MECC, los perfiles de flujo son también distintos. En HPLC el perfil es parabólico y, como consecuencia de su contribución al ensanchamiento de los picos, la eficacia teórica que se puede llegar a conseguir es limitada. En MECC, donde predomina la difusión longitudinal, el perfil es plano, lo que se traduce en picos más estrechos y, por lo tanto, eficacias mayores.

Si se profundiza un poco más en las diferencias de eficacia observadas en la Tabla 12, se puede observar que mientras para el compuesto aniónico (2,4-D) la eficacia conseguida mediante MECC es unas 100 veces superior a la obtenida para HPLC, la diferencia no es tan elevada para el caso del compuesto neutro (Diuron). Dado que la adición de micelas a un sistema de electroforesis capilar aumenta el ensanchamiento de banda en la columna de separación debido a cinéticas de adsorción-desorción [22], las diferencias observadas entre los dos pesticidas pueden ser debidas a una diferente capacidad de interacción con la fase micelar. Así, los compuestos neutros, que interaccionan fuertemente con las micelas, presentarán eficacias menores que los compuestos aniónicos cuya interacción con la micela se verá en parte impedida por efectos de repulsión eléctrica entre dos moléculas cargadas negativamente.

Por otro lado, la configuración instrumental es otra de las causas de las diferentes eficacias observadas en los dos sistemas, ya que la presencia de acoplamientos, juntas y conectores en los aparatos de HPLC hace disminuir su eficacia, mientras que en los sistemas de electroforesis capilar, este problema prácticamente no existe.

b) Sensibilidad

Es conocido que, cuando se utilizan detectores ópticos, la sensibilidad en HPLC tiende a ser mejor que en MECC.

Si comparamos los valores de los límites de detección, calculados para una relación señal / ruido de 2, presentados en la Tabla 15, podemos observar que aunque el sistema MECC es capaz de detectar cantidades menores, los límites de detección dados en unidades de concentración son mayores.

Producto	HPLC		MECC	
	mg/l	ng	mg/l	ng
2,4-D	0.30	6.0	1.04	0.052
Diurón	0,20	4,0	1,25	0.062

Tabla 15. Límites de detección obtenidos mediante HPLC y MECC.

Estas diferencias son debidas a que tanto el camino óptico de la celda de detección como el volumen de inyección son menores en MECC que en HPLC.

En MECC, donde la detección tiene lugar “on-column”, el camino óptico viene determinado por la anchura del capilar (50-100 μ m). Aunque se han descrito diferentes metodologías con el objetivo de solucionar esta limitación [42], como el uso de capilares con un ensanchamiento en la zona de detección, la iluminación axial [43], celdas en forma de Z [44] o celdas de multireflexión [45], el balance entre el aumento de sensibilidad obtenido y la complejidad y los costes adicionales asociados a estos métodos, hace que su uso sea limitado.

En cuanto al volumen de muestra inyectado, en MECC es del orden de nl mientras que en HPLC es del orden de μ l. De todas formas, este hecho que provoca una pérdida de sensibilidad en MECC, tiene su lado positivo, ya que en casos específicos donde se dispone de poca cantidad de muestra la posibilidad de efectuar un análisis a partir de volúmenes pequeños representa una gran ventaja.

c) Coste económico

La diferencia económica entre realizar un mismo análisis mediante HPLC o MECC es importante.

Al realizar un cálculo aproximado de los gastos necesarios para poder trabajar 8 horas diarias durante un mes para los dos sistemas, suponiendo:

- un flujo de 1 ml/min en el sistema HPLC
- un precio de una columna de HPLC de 20.000 pts
- un precio unitario de 2.900 pts/litro de disolvente
- un gasto de 10 ml diarios de fase móvil en MECC
- un precio de una columna de MECC de 4.000 pts
- una duración de las columnas de HPLC y MECC de 2 meses

se obtiene que utilizando el sistema HPLC se gastarían 37.840 pts, mientras que utilizando MECC el gasto sería de 2.580 pts, lo que significa un incremento económico anual de 423.120 pts al trabajar con HPLC con respecto a hacerlo con MECC.

d) Conclusiones.

El HPLC, al tener un límite de detección más alto, es una técnica más aconsejable para análisis de muestras con bajas concentraciones.

Para muestras en las que el límite de detección no es un parámetro determinante y fundamental, MECC tiene la ventaja de poseer, además de una mejor eficacia, unos gastos económicos considerablemente inferiores a los obtenidos mediante HPLC.

El HPLC tiene todas las ventajas que lleva consigo el ser una técnica ampliamente utilizada y estudiada: una extensa bibliografía, aplicaciones con cualquier tipo de detectores y columnas, soluciones de problemas prácticos, etc. Mientras que MECC tiene todas las desventajas de ser una técnica relativamente nueva: una bibliografía modesta y algunos problemas técnicos y analíticos aún sin resolver (acoplamiento de un detector de masas, resolución de mezclas muy hidrófobas, etc.).

5. BIBLIOGRAFÍA.

1. Khaledi M.G., *Handbook of Capillary electrophoresis*, cap.3, CRC Press, U.S.A., 1994
2. Sepaniak M.J., Powell A.E., Swaile D.F., Cole R., *Capillary Electrophoresis, Teory and practice*, cap. 6, Academic Press, San Diego, U.S.A., 1992.
3. Muitselaar P.G., Otsuka K., Terabe S., *J. Chromatogr.* 780 (1997), 41.
4. Snyder L.R., Kirkland J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, J Wiley Ed. 1979.
5. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T., *Anal. Chem.* 56 (1984), 111.
6. Cai J., Ziad R., *J. Chromatogr.* 608 (1992), 31.
7. Referencia 18 del artículo 1º.
8. Ahuja E.S., Nielsen K.R., Foley J.P., Little E.L., *Anal. Chem.* 67 (1995), 26.
9. Rasmussen H.T., Goebel L.K., McNair H.M., *J. Chromatogr.* 517 (1990), 549.
10. Trenerry V.C., Robertson J., Wells R.J., *J. Chromatogr.* 708 (1995), 169.
11. *European Directory of Agrochemical Products*, part 2, Herbicides. Royal Society of Chemistry, 1984.
12. Generalitat de Catalunya, dept. d'Agricultura Ramaderia i Pesca. *Guia d'herbicides i fitoreguladores*, 1987, Barcelona.
13. D. Barceló, *Chromatographia* 25 (1988), 928.
14. Hamman R., Kettrup A., *Chemosphere* 16 (1987), 527.
15. Terabe S., Otsuka K., Ando T., *Anal. Chem.* 57 (1985), 834.
16. Ghowsi K., Foley J.P., Gale R.J., *Anal. Chem.* 62 (1990), 2714.
17. Nielsen K.R., Foley J.P., *J. Chromatogr.* 686 (1994), 283.
18. Khaledi M.G., *Anal. Chem.* 63 (1991), 1820.
19. Wu Q., Claessens H.A., Cramer C.A., *Chromatographia* 34 (1992), 25.
20. Foley J.P., *Anal. Chem.* 62 (1990) 1302.
21. Sepaniak M.J., Cole R.O., *Anal. Chem.* 59 (1987), 472.
22. Terabe S., Otsuka K., Ando T., *Anal. Chem.* 61 (1989), 251.
23. Balchunas A.T., Sepaniak M.J., *Anal. Chem.* 60 (1988), 671.
24. Balchunas A.T., Sepaniak M.J., *Anal. Chem.* 59 (1987), 1466.
25. Burton D.E., Sepaniak M.J., Maskarinec M.P., *J. Chromatogr. Science* 25 (1987), 514.
26. Tsuda T., *J. High Resol. Chromatogr.* 10 (1987), 622.
27. Davis J.M., *Anal. Chem.* 61 (1989), 2455.
28. Berthod A., *J. Chromatogr.* 780 (1997), 191.
29. Rosen M. J., *Surfactants and Interfacial Phenomena*, New York, 1978, cap. 3, pág. 83.
30. Terabe S., Utsumi H., Otsuka K., *J. High Resol. Chromatogr.* 9 (1986), 666.

31. Gorse J., Balchunas A.T., Swaile D.F., Sepaniak M.J., *J. High Resol. Chromatogr.* 11 (1988), 554.
32. Kaneta T., Tanaka S., Taga M., Yoshida H., *Anal. Chem.* 64 (1992), 798.
33. Shinoda K., Soda T., *J. Phys. Chem.* 67 (1963), 2072.
34. Crosby D., El Rassi Z., *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993), 2161.
35. Morin P., Villard F., Quinsac A., Dreux M., *J. High Resol. Chromatogr.* 15 (1992), 271.
36. Michaelsen S., Moller P., Sorensen H., *J. Chromatogr.* 608 (1992), 363.
37. Wallingford R., Ewing A., *J. Chromatogr.* 441 (1988), 299.
38. Terabe S., *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Bekman Instruments, U.S.A., vol.3, 1993.
39. Kuhr W., *Anal. Chem.* 62 (1990), 403.
40. Kuhr W., Monning C., *Anal. Chem.* 64 (1992), 389.
41. Muijselaar P., Claessens H.A., Cramers C.A., *J. Chromatogr.* 696 (1995), 273.
42. Li S.F.Y., *Capillary Electrophoresis. Principles and applications*. Journal of Chromatography Library, ed. Elsevier, vol.52, Amsterdam, 1993.
43. Grant I.H., Steuer J., *J. Microcol. Sep.* 2 (1990), 74.
44. Xi X., Yeung E.S., *Appl. Spectrosc.* 45 (1991), 1199.
45. Taylor J.A., Yeung E.S., *J. Chromatogr.* 550 (1991), 831.