

# Electroforesis capilar

LUIS ENRIQUE MENDOZA

POSTGRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
MÉRIDA VENEZUELA  
NOVIEMBRE 2006

# Electroforesis capilar

## AGENDA

RESUMEN

TIPOS DE ELECTROFORESIS

EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA

SEPARACIÓN DE MUESTRAS

FENOMENOS DE DISPERSIÓN

ELECTROFEROGRAMA

VENTAJAS-DESVENTAJAS

# Electroforesis capilar

## RESUMEN

El termino electroforesis se emplea para describir la migración de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis constituye una técnica de separación basada en diferentes velocidades (movilidad) de un conjunto de solutos (sustancia), sometidos a la acción del campo eléctrico.

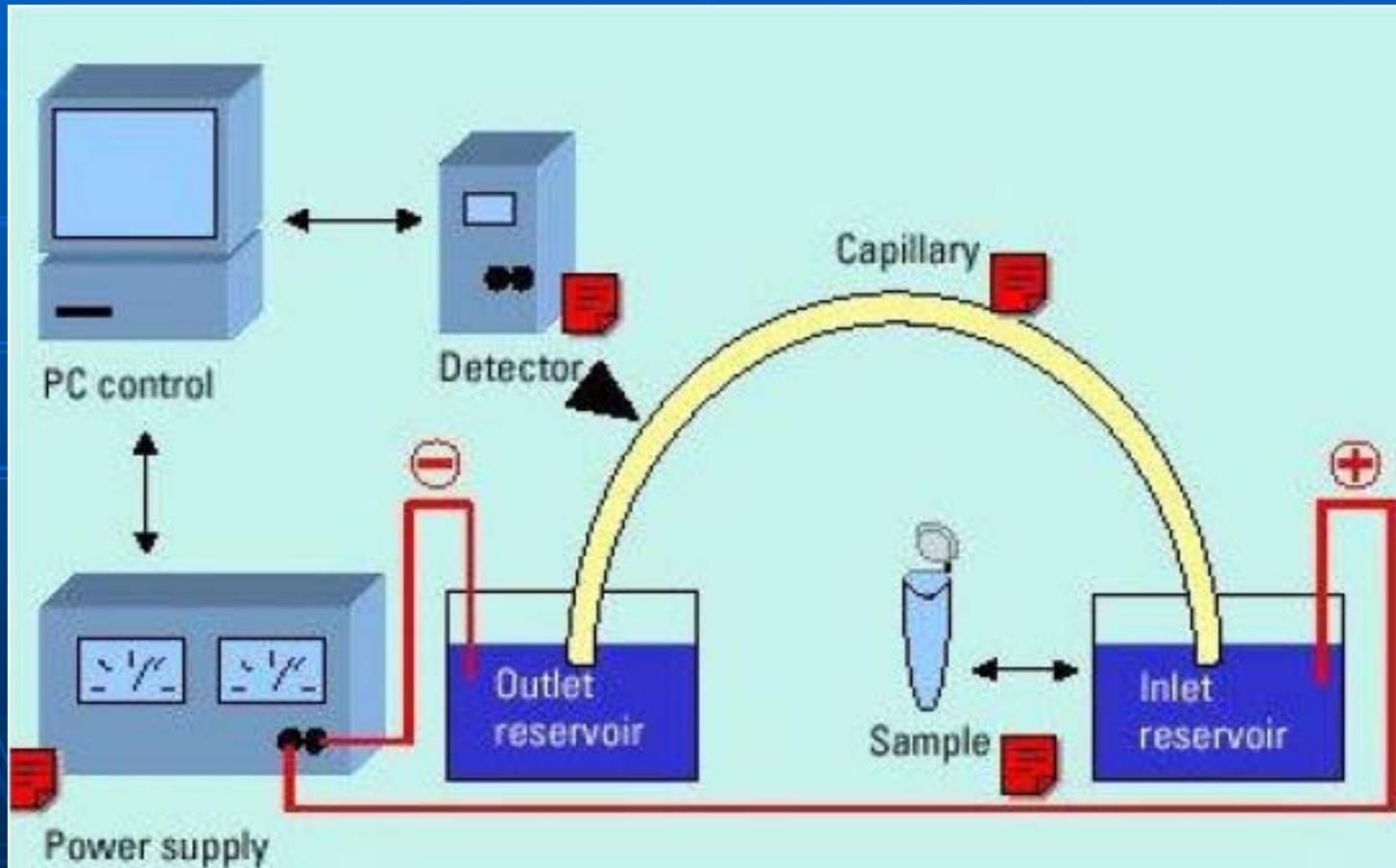
# Electroforesis capilar

## TIPOS DE ELECTROFORESIS

- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC).
- Isotacoforesis.
- Isoelectroenfoque.
- Electroforesis capilar en gel (CGE).
- Electroforesis capilar en zona (CZE).

# Electroforesis capilar

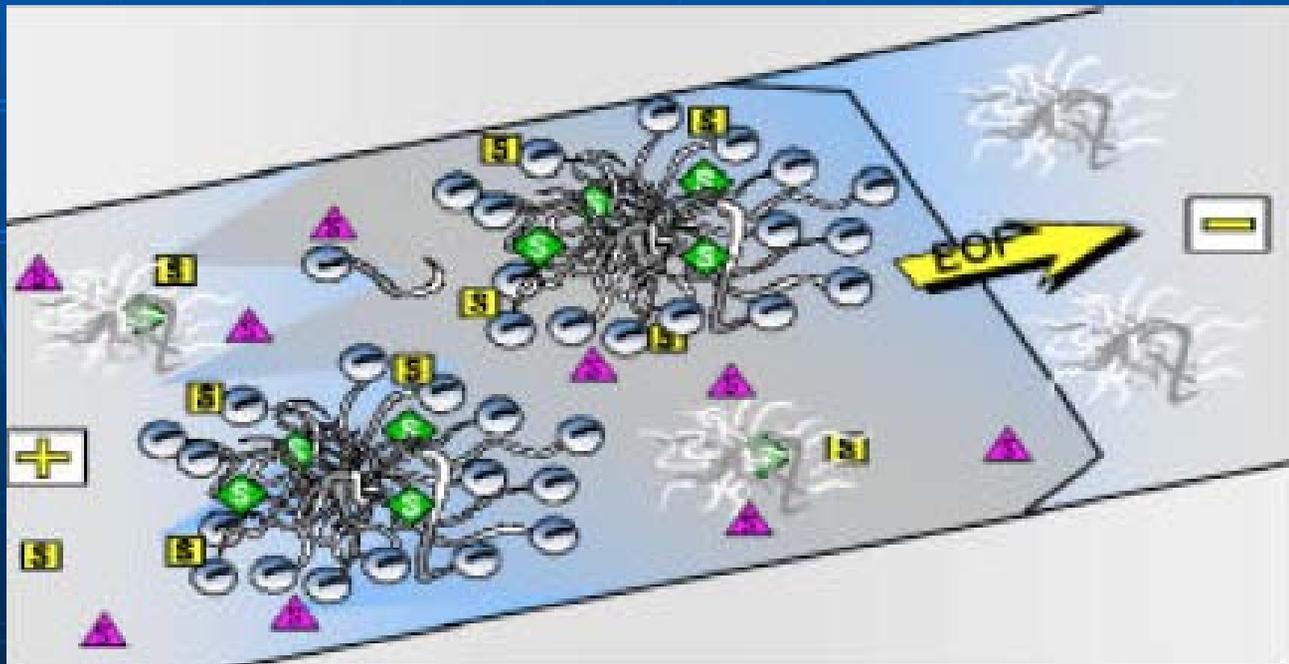
## COMPONENTES BÁSICOS EC.



# Electroforesis capilar

## CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC).

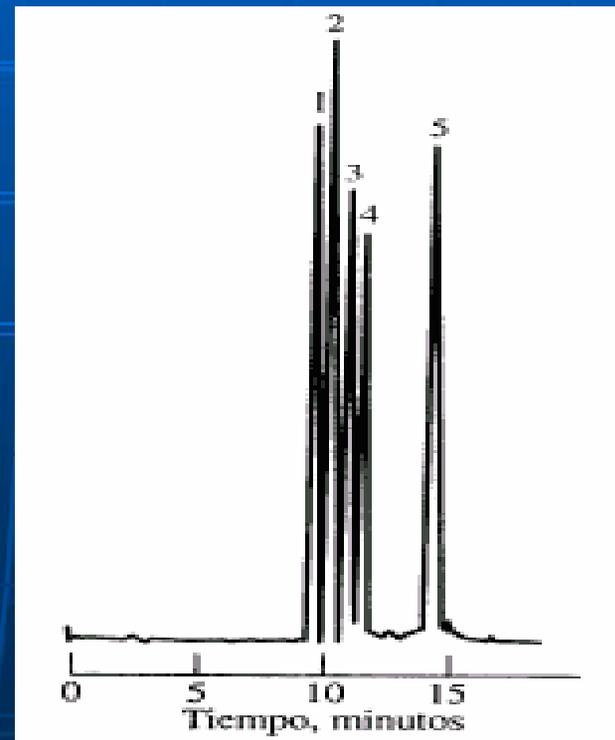
la separación es basada en la afinidad de los analitos entre micelas – tensioactivo (anionicos,cationicos) - electrolito.



# Electroforesis capilar

## ISOTACOFORESIS.

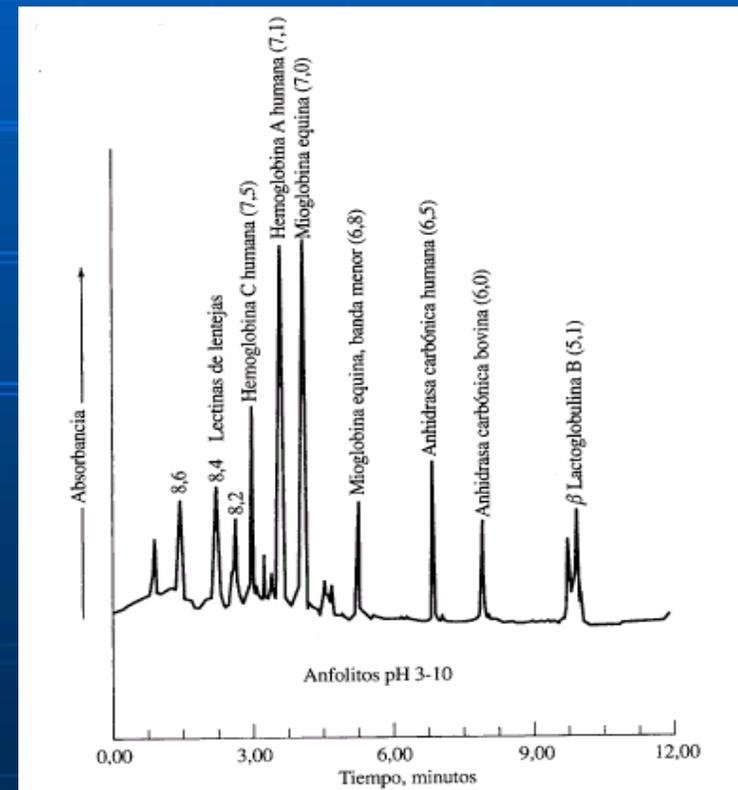
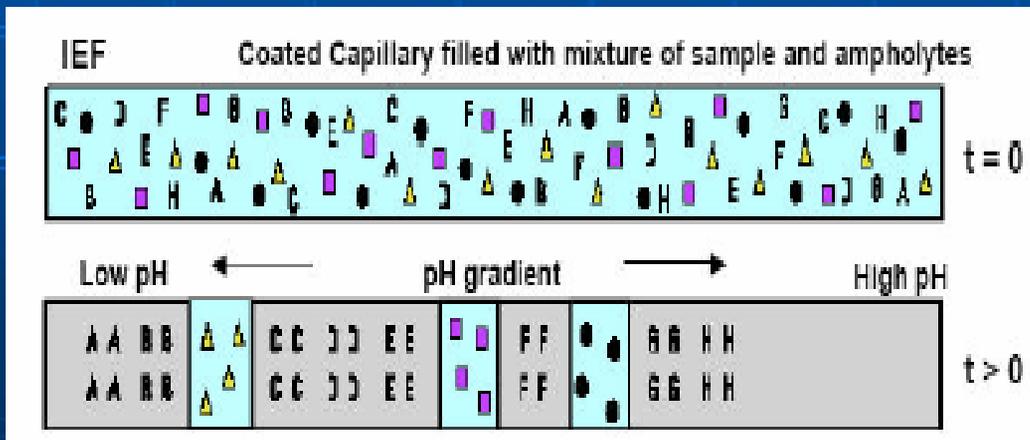
Electroforesis igual velocidad., la sustancia es ordenada según su movilidad. Separa solo una sustancia



# Electroforesis capilar

## ISOELECTROENFOQUE.

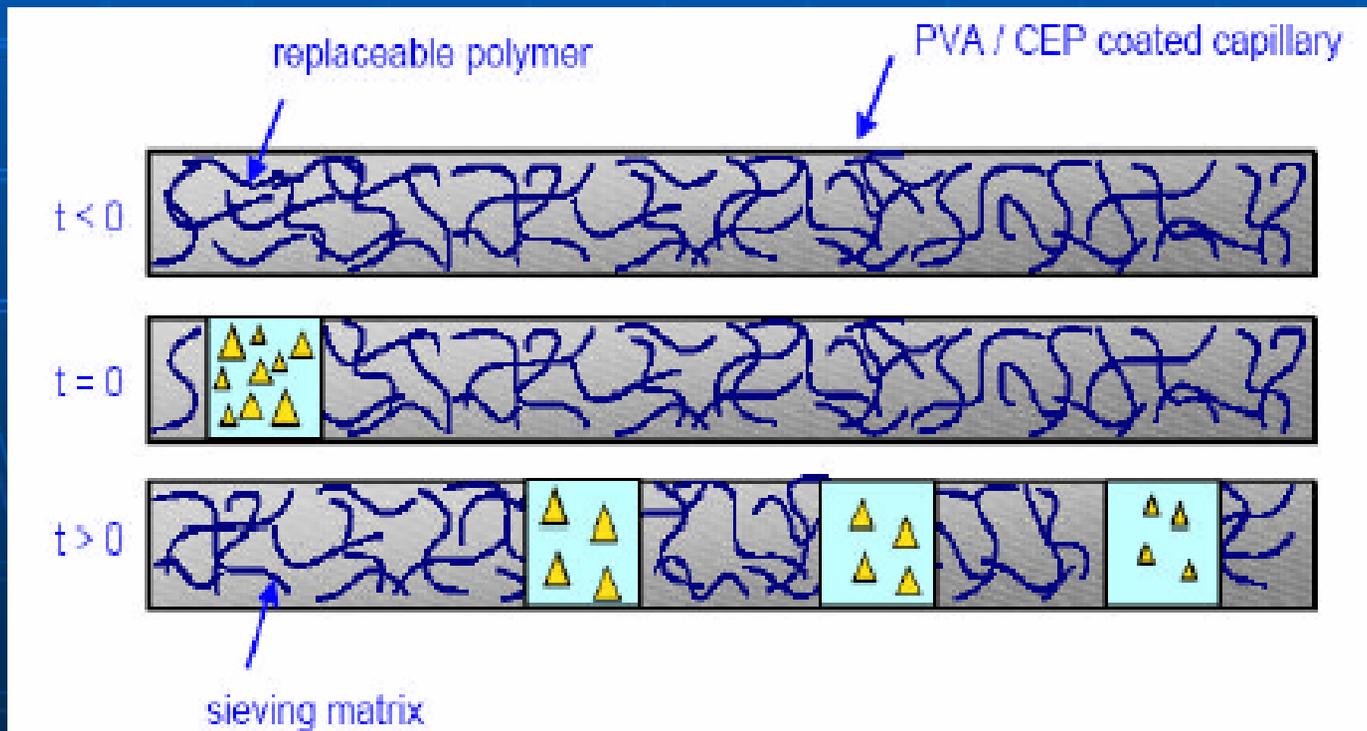
La separación es basada en el punto Isoelectrico de cada analito.  
Especies anfóteras (glicina).



# Electroforesis capilar

## ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL

La separación es basada en el tamaño de las moléculas.  
Polímeros (monómeros-molécula química sencilla).

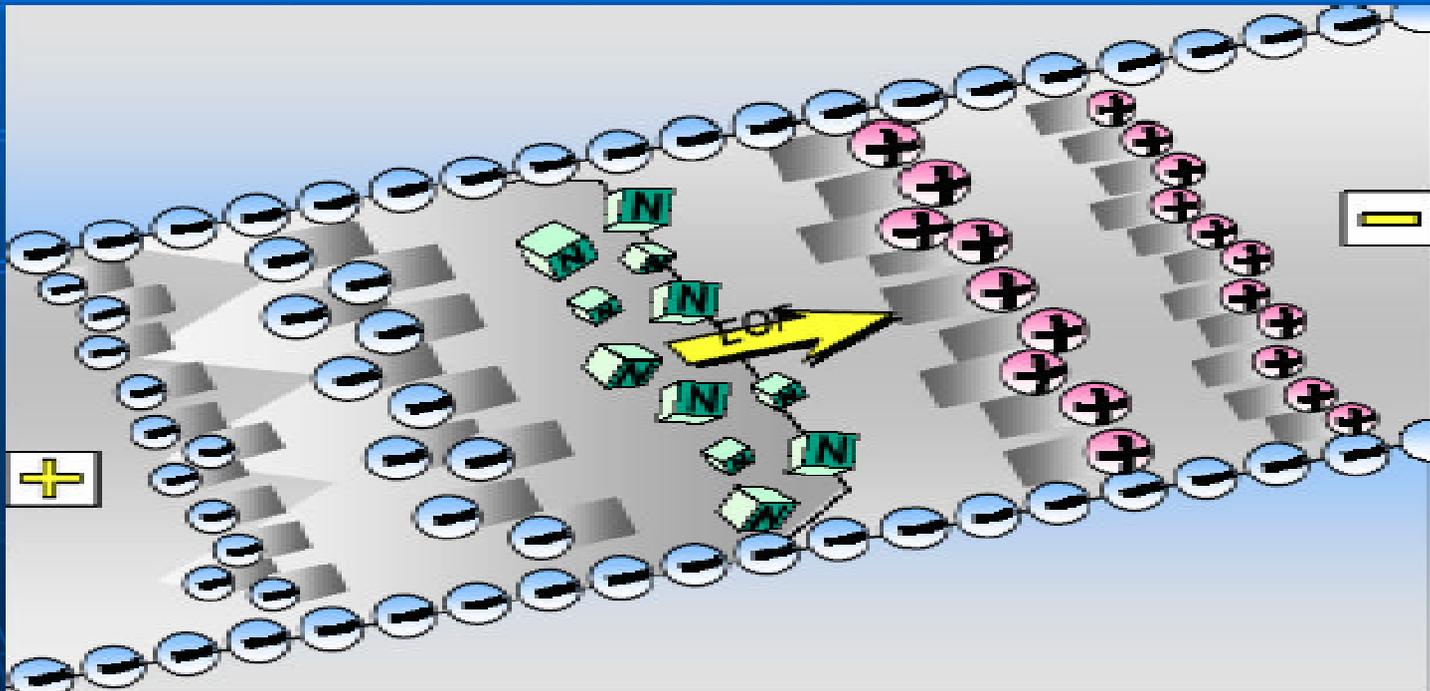


# Electroforesis capilar

## ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA

Separación en función carga/masa.

Separación de iones + y -.



# Electroforesis capilar en zona

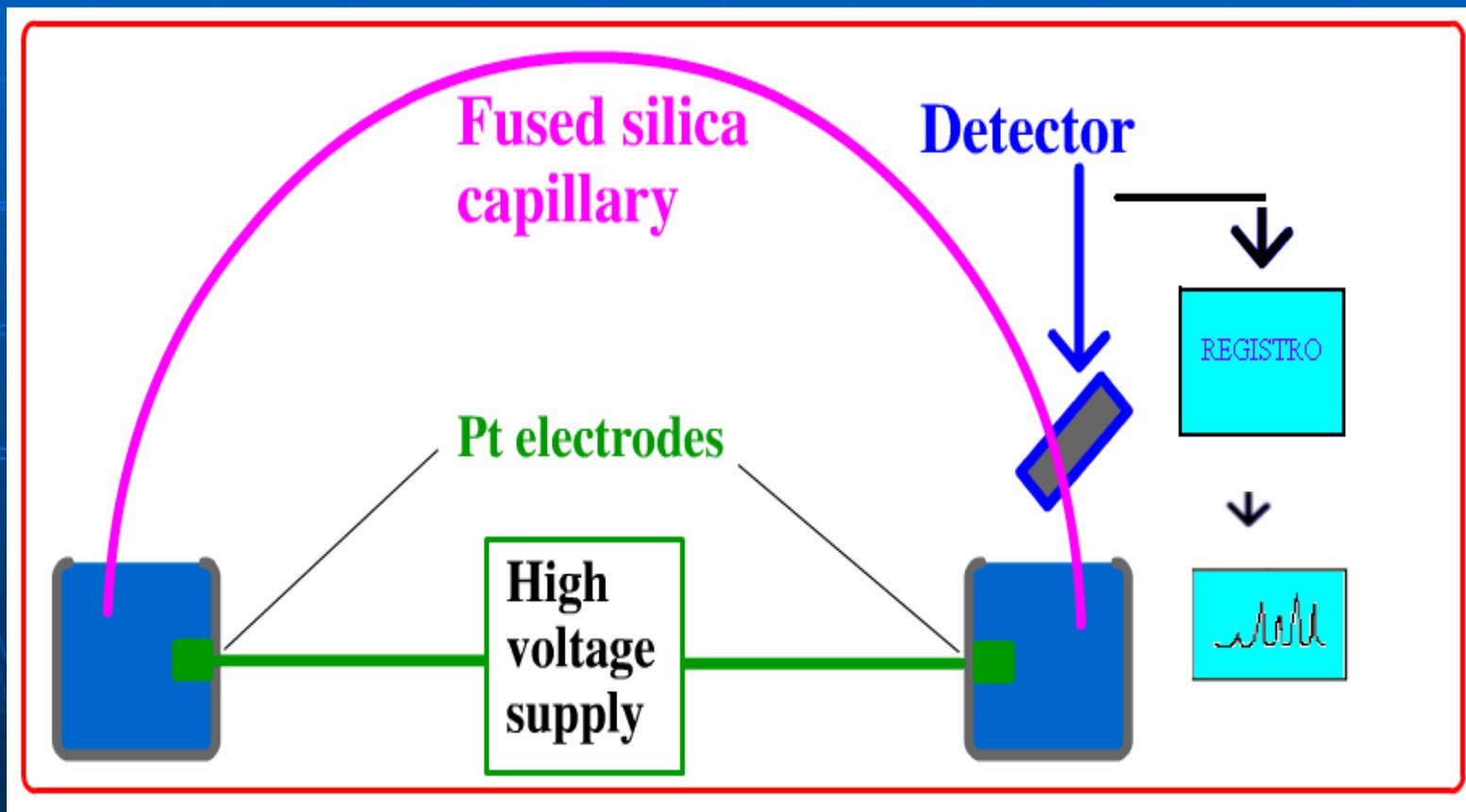
## POR QUE UTILIZAR ?

Una técnica de separación de sustancias basado en las características de sus velocidades (movilidad) de un conjunto de solutos (sustancia), sometidos a la acción del campo eléctrico. Requiere una cantidad de muestra relativamente pequeña.

También por su gran versatilidad y simplicidad de operación.

# Electroforesis capilar en zona

## COMPONENTES DEL DISPOSITIVO:



# Electroforesis capilar en zona CAPILAR

Capilar de sílice.

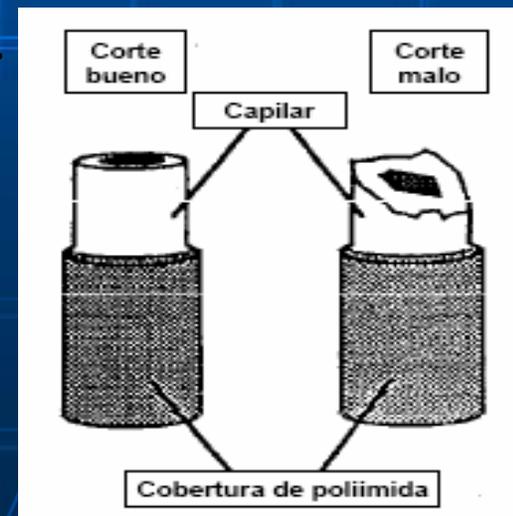
Diámetro interno de 25-100  $\mu\text{m}$ .

Cobertura de polimida.

Permeabilidad a la luz ultravioleta y visible.

Químicamente y eléctricamente estable.

Longitud 50-100 cm.

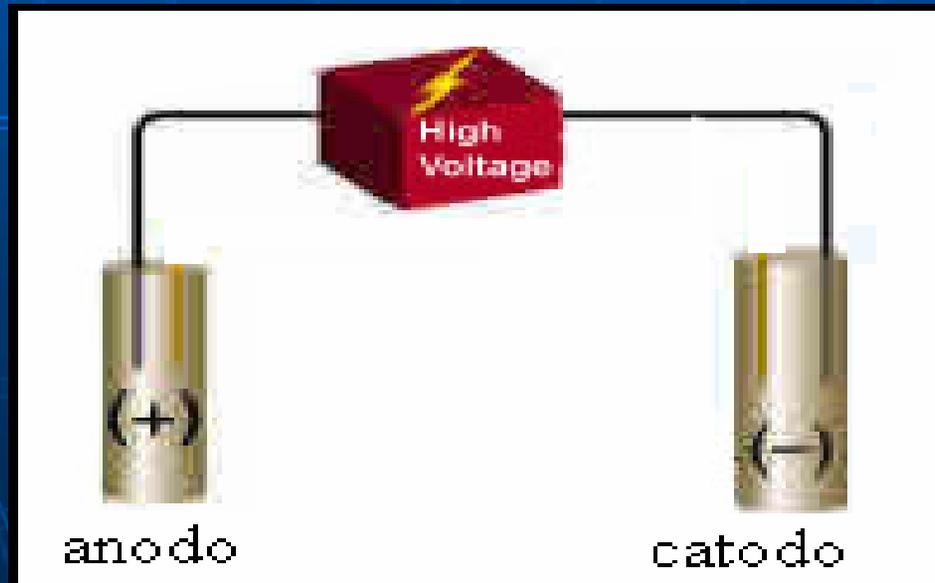


# Electroforesis capilar en zona

## FUENTE DE PODER

La migración empieza una vez se aplica el voltaje.  
Corriente 10-200  $\mu\text{A}$ .

Tensión 20-40Kv constantes, con el fin de obtener una alta reproducibilidad en los tiempos de migración.



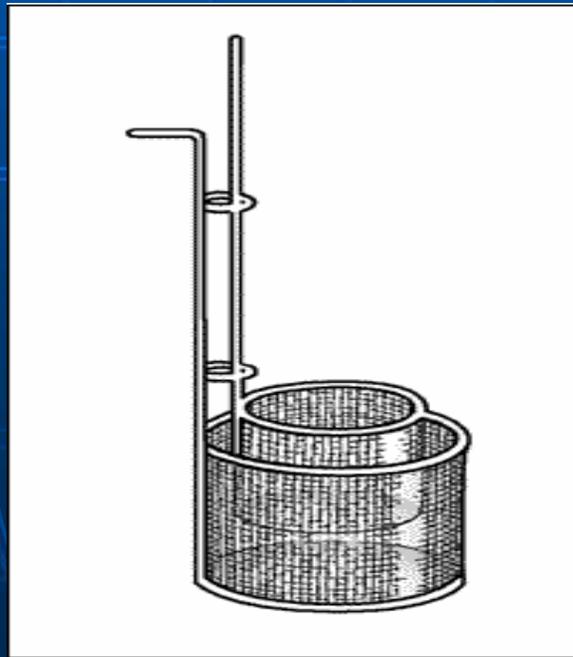
# Electroforesis capilar en zona

## ELECTRODOS Y VIALES

Electrodos de platino, teflón o carbón.

Viales, llamados recipientes electrodicos.

Material cristal.



Electrodo platino.

# Electroforesis capilar en zona

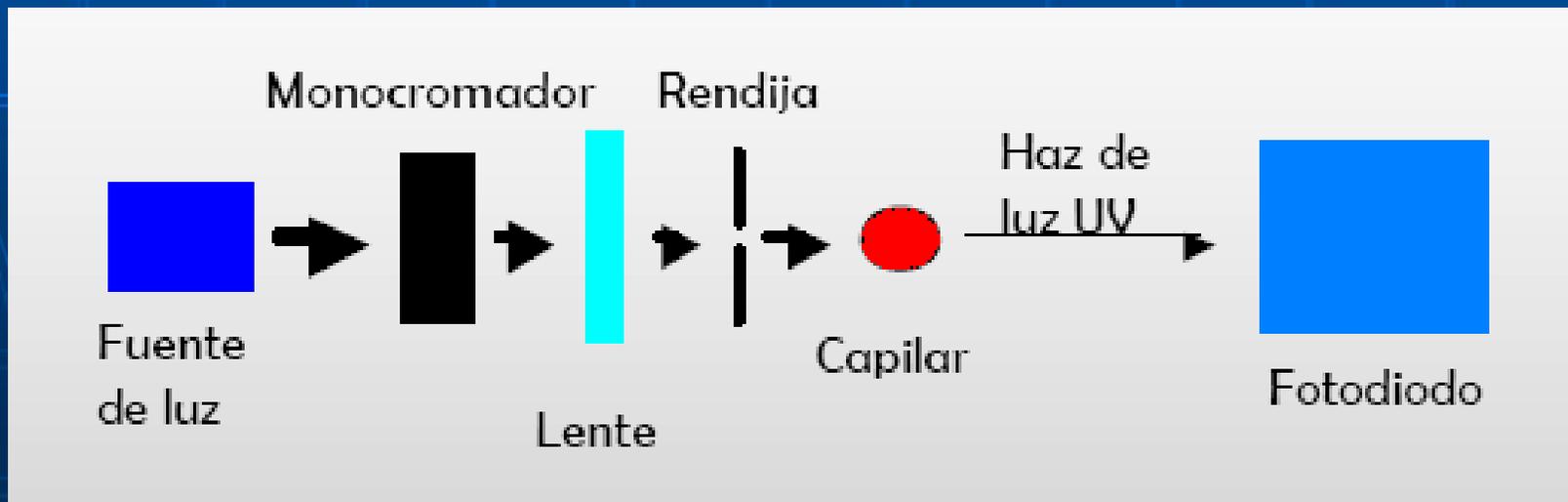
## SISTEMA DE DETECCIÓN

Se utiliza el detector UV-vis.

Detección en columna.

Debe eliminarse polimida del capilar.

Longitud de la onda aprox 240nm.



# Electroforesis capilar en zona

## ELECTROLITOS

Citrato 3.06pKa (movilidad), Fármaco, analgésico.

Citrato 5.40pKa.

Fosfato 2.12pKa, PH 2.5.

Borato 4.75pKa, PH 9.3.

Acetato 4.75pKa. PH 5.5-6.5.

El PH del electrolito es clave en la separación, ya que determina el grado de movilidad de los diferentes analitos.

# Electroforesis capilar en zona

## MUESTRA

Preparación de 0.1-10nL.

Muestras: vino, sustancia química, tejido.

Los tintes deben tener un espectro de excitación y emisión en relación con la longitud de onda del infrarrojo.

Tintes fluorescentes: plata, cromo, bromuro de etidio.

# Electroforesis capilar en zona

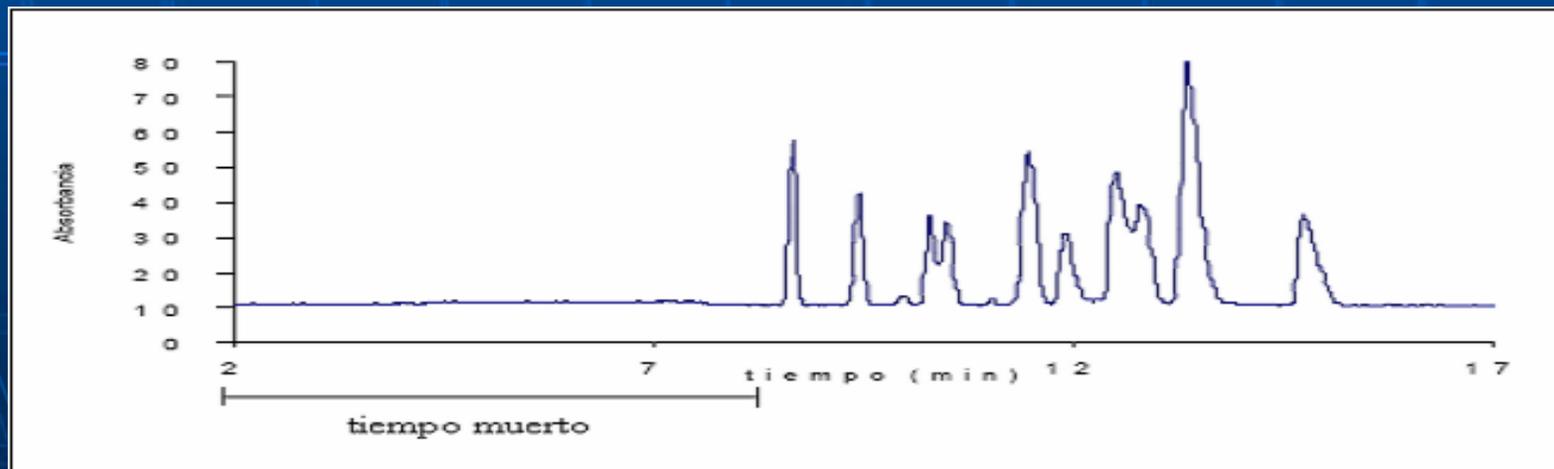
## TIEMPO DE ANÁLISIS

Aplicación de la muestra aprox 10-30 segundos.

Tiempo de total aprox 20-30 minutos.

Tiempo muerto depende de la sustancia.

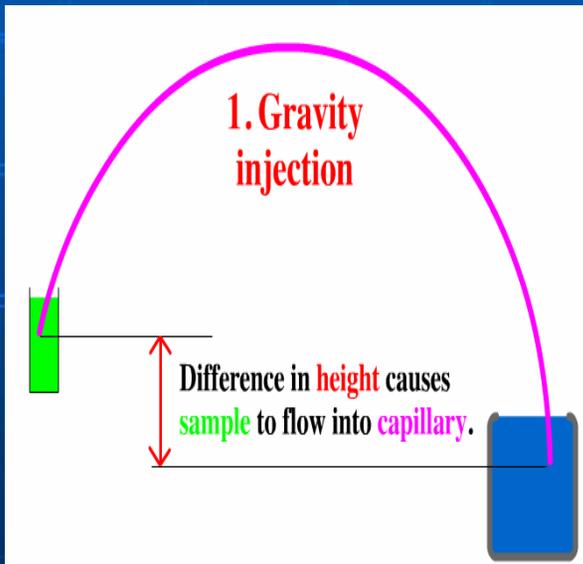
Tiempo muerto: es el tiempo en el cual no se produce respuesta alguna.



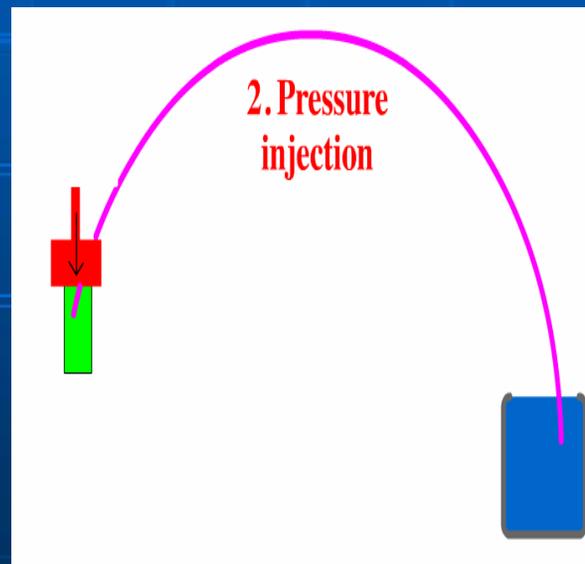
# Electroforesis capilar en zona

## INYECCIÓN DE LA MUESTRA

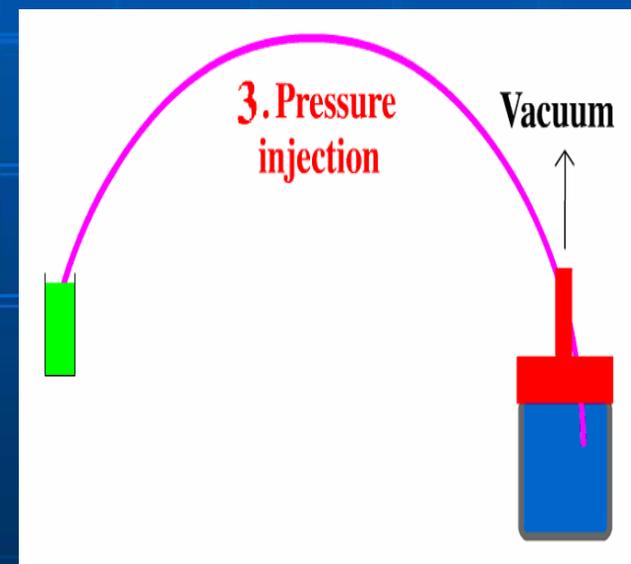
**Inyección hidrodinámica:** se basa en introducir la muestra por diferencia de presión.



Efecto sifón



inyección de presión.



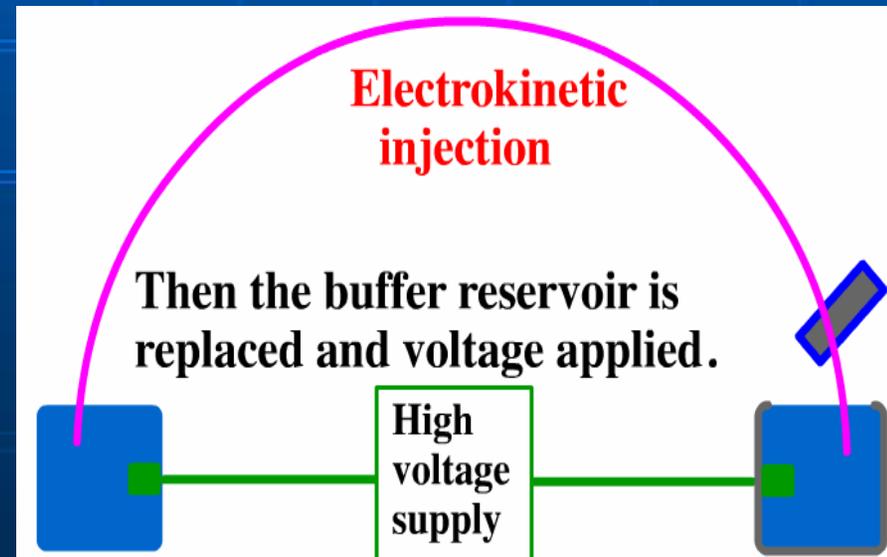
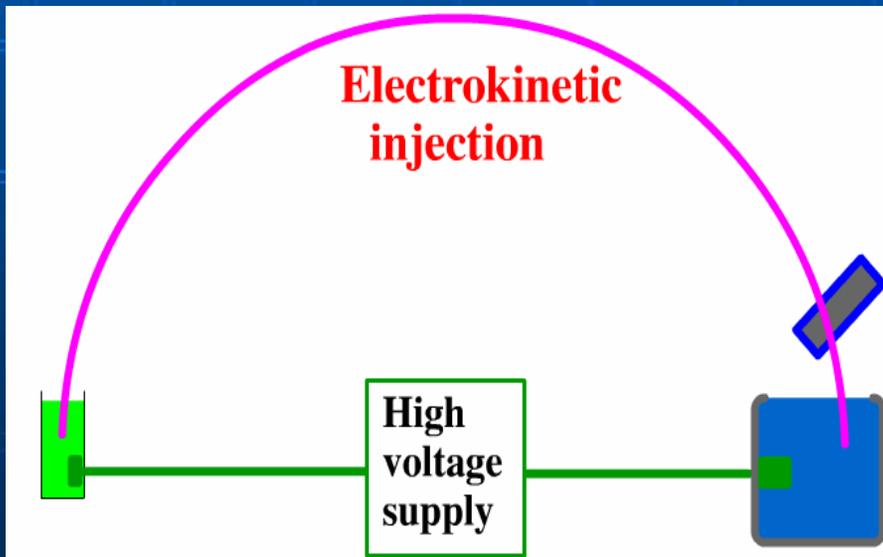
Vacio.

# Electroforesis capilar en zona

## INYECCIÓN DE LA MUESTRA

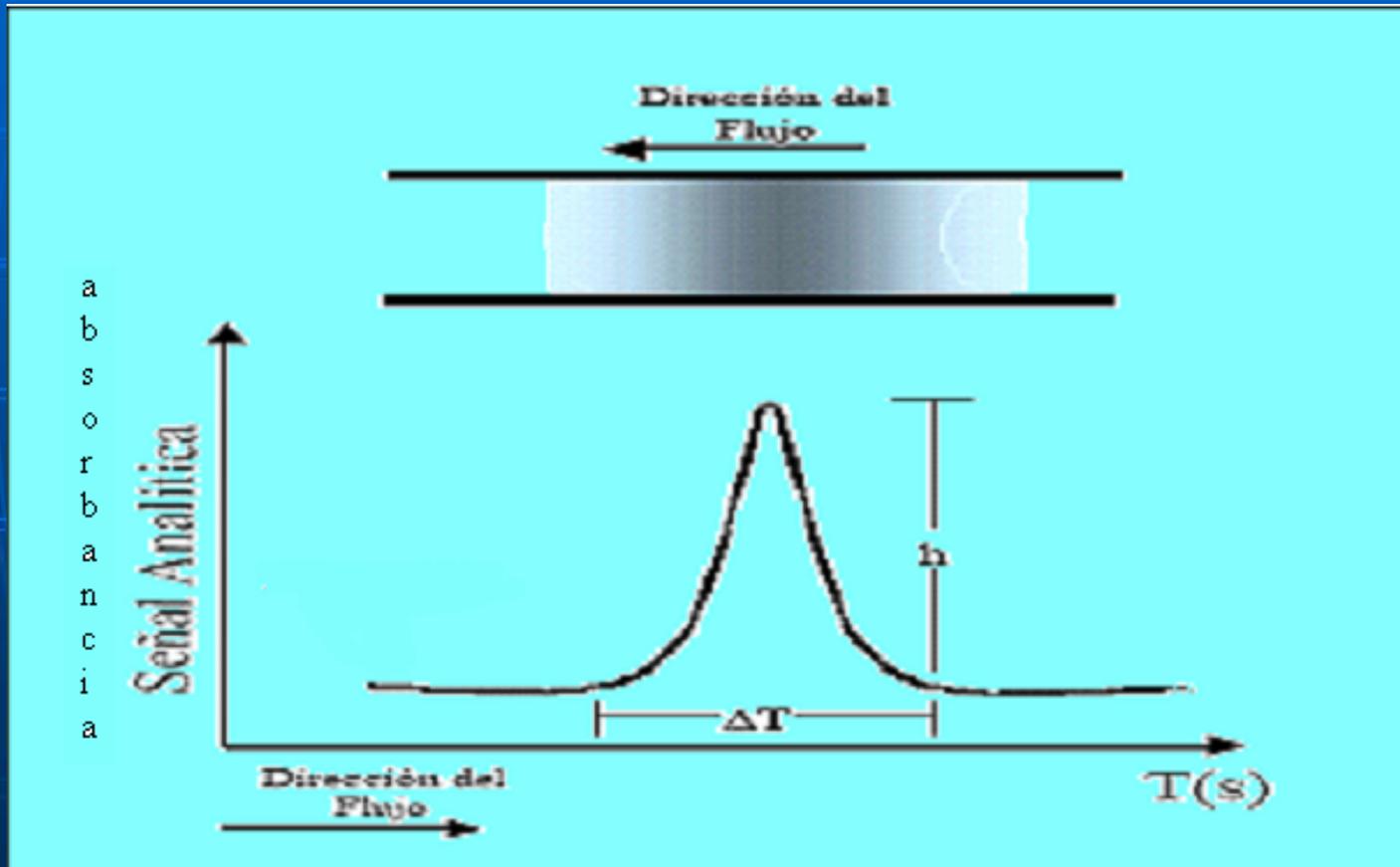
**Inyección electrocinética:** se basa en la diferencia de potencial entre los extremos del capilar.

La cantidad de iones depende de la movilidad de ellos.



# Electroforesis capilar en zona

## DETECCIÓN DE PICOS



Detección de picos debido a la absorbancia

# Electroforesis capilar en zona

## ELECTROFEROGRAMA

Representación grafica de la concentración de cada una de las sustancias presentes en la muestra.

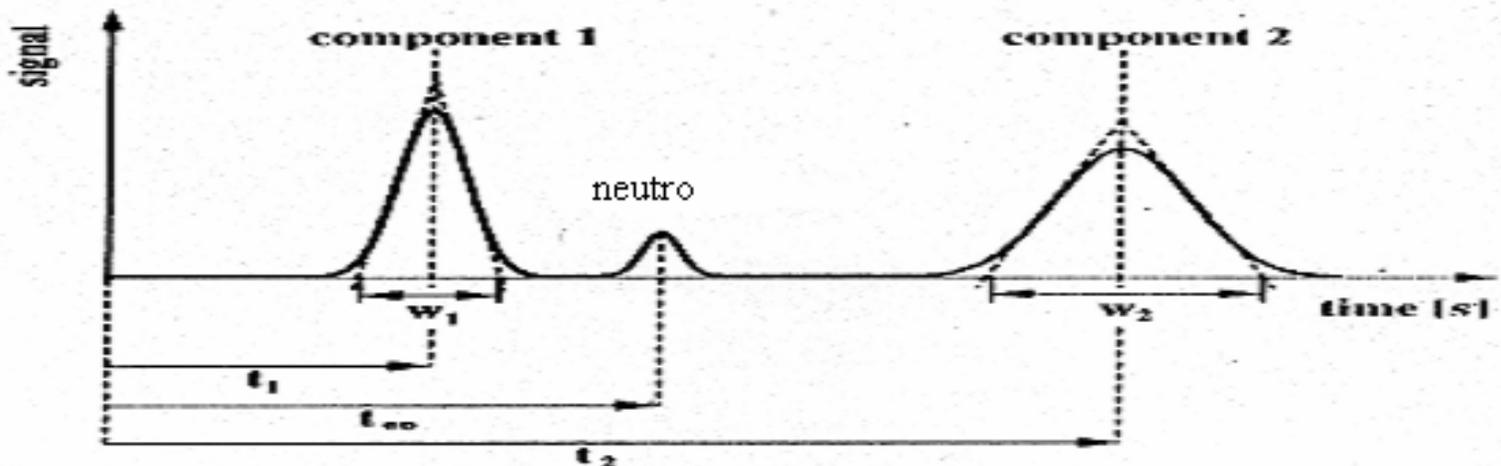
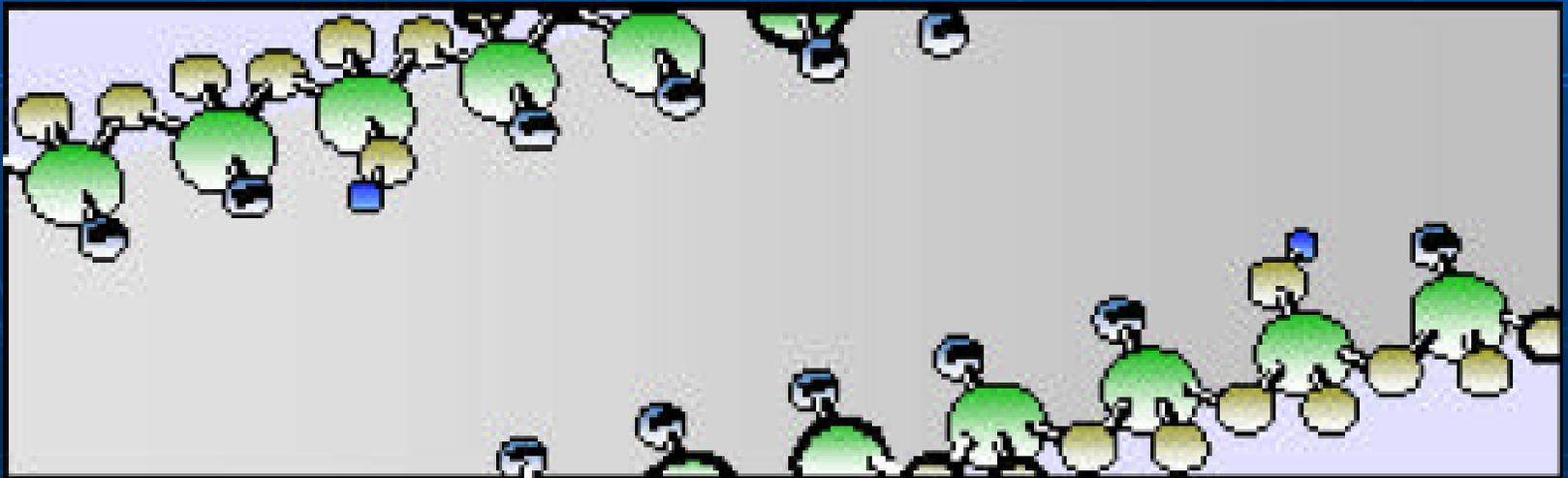


Fig. 2.6. Schematic diagram of a capillary electrophoretic separation.  $t_1$  migration time of component 1,  $t_2$  migration time of component 2,  $t_{eo}$  migration time of EOP marker,  $w_1$  temporal peak width of component 1 and  $w_2$  temporal peak width of component 2

# Electroforesis capilar en zona

## PRINCIPIO DE SEPARACIÓN

La pared del capilar esta constituida por un entramado grupo de silanol Si-OH, esto hace que el capilar inicialmente este cargado negativamente, silanoato Si-O en sus paredes, los H y otras cargas positivas libres se sitúen cerca de las cargas negativas de la pared formado una doble capa.

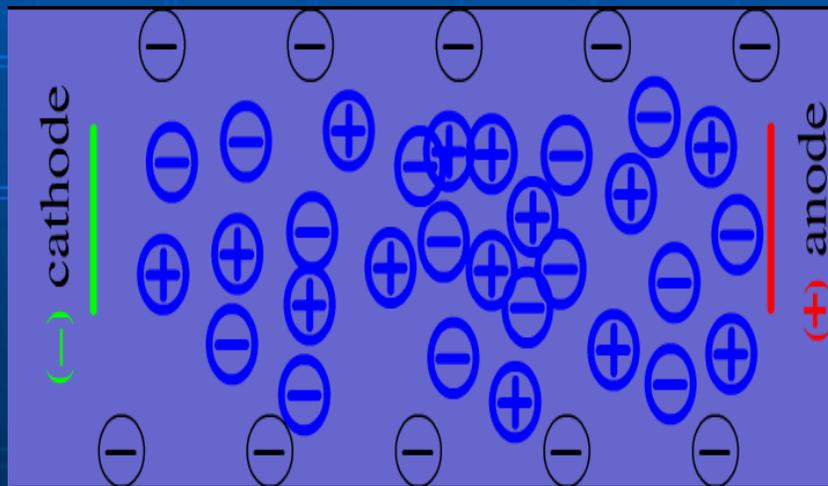


Capilar con la pared cargada negativamente

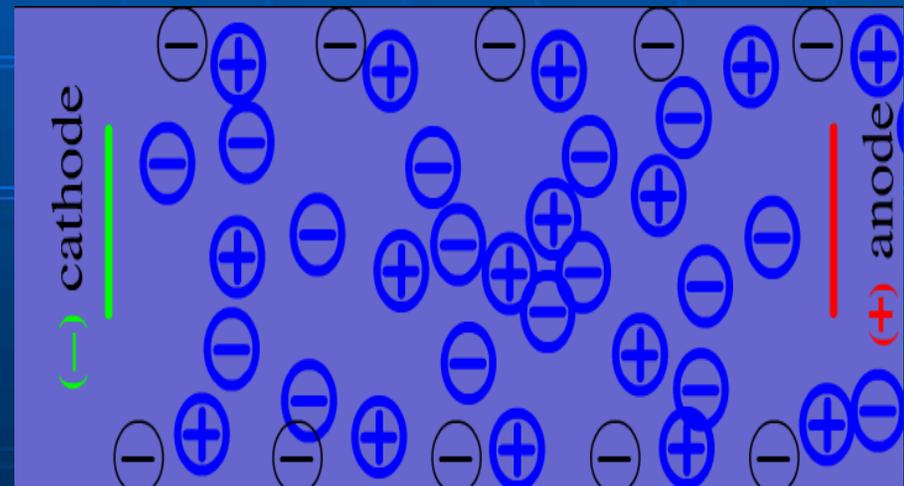
# Electroforesis capilar en zona

## PRINCIPIO DE SEPARACIÓN

**Flujo electroforético:** Es producido por la carga eléctrica de cada partícula existente en el interior del capilar, y por lo tanto produce el efecto doble capa.



Capilar con pared cargada -



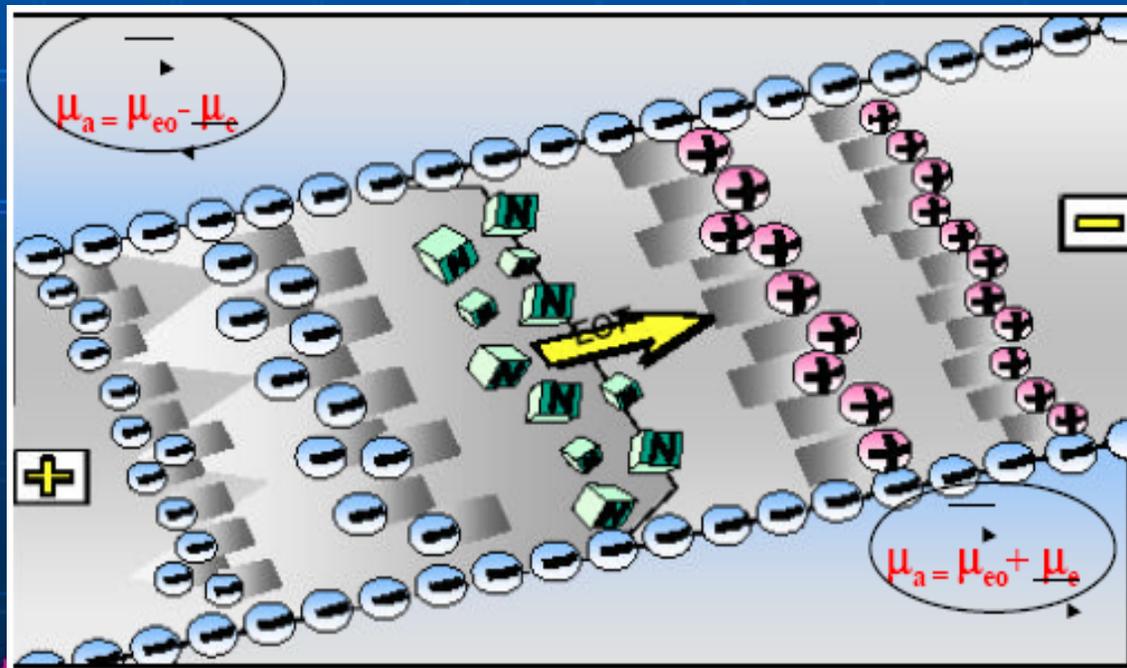
Efecto doble capa

# Electroforesis capilar en zona

## PRINCIPIO DE SEPARACIÓN

**Flujo electroosmótico:** flujo debido a la fuente de tensión.

**Flujo total:** flujo electroosmótico  $\pm$  flujo electroforético.



la propia carga de un soluto hace que éste muestre una movilidad por si mismo.

Flujo total

# Electroforesis capilar en zona

## SEPARACIÓN DE ANALITOS

Se basa en las diferentes movilidades electroforéticas de los solutos iónicos que harán que los analitos migren a través del capilar y lleguen a detector a diferentes tiempos.

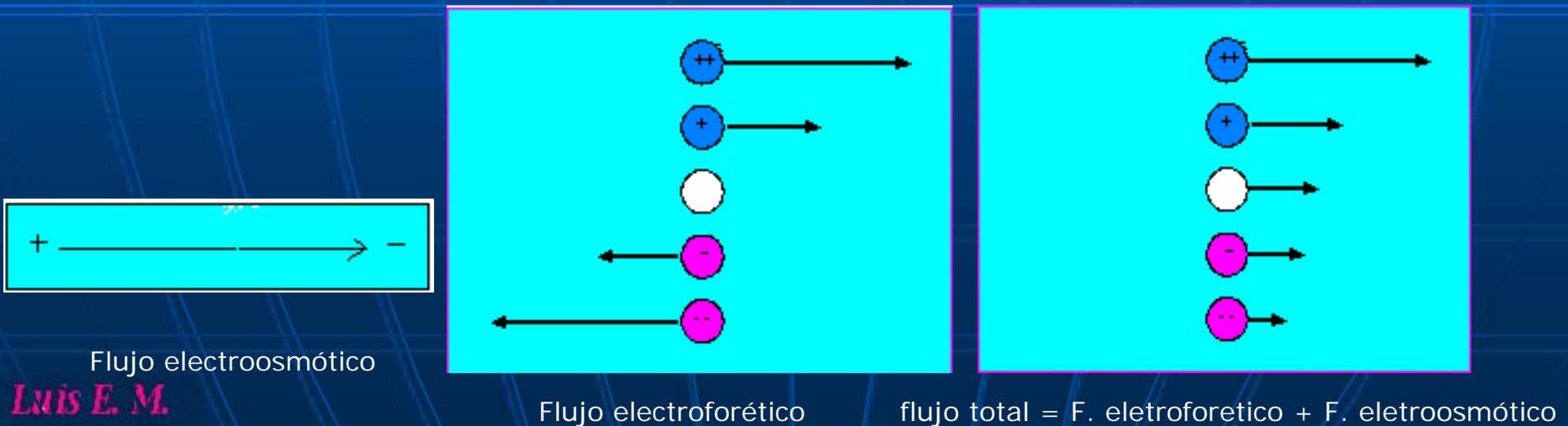


# Electroforesis capilar en zona

## SEPARACIÓN DE ANALITOS

La movilidad electroosmótica es mayor que la electroforética haciendo que sea posible separar aniones y cationes en una sola inyección de la muestra.

Las partículas neutras son separadas debido a que no poseen movilidad electroforética.



Flujo electroosmótico

Flujo electroforético

flujo total = F. eletroforetico + F. eletroosmótico

# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSION

Las causas de dispersión son múltiples y afectan de manera relevante a la separación.

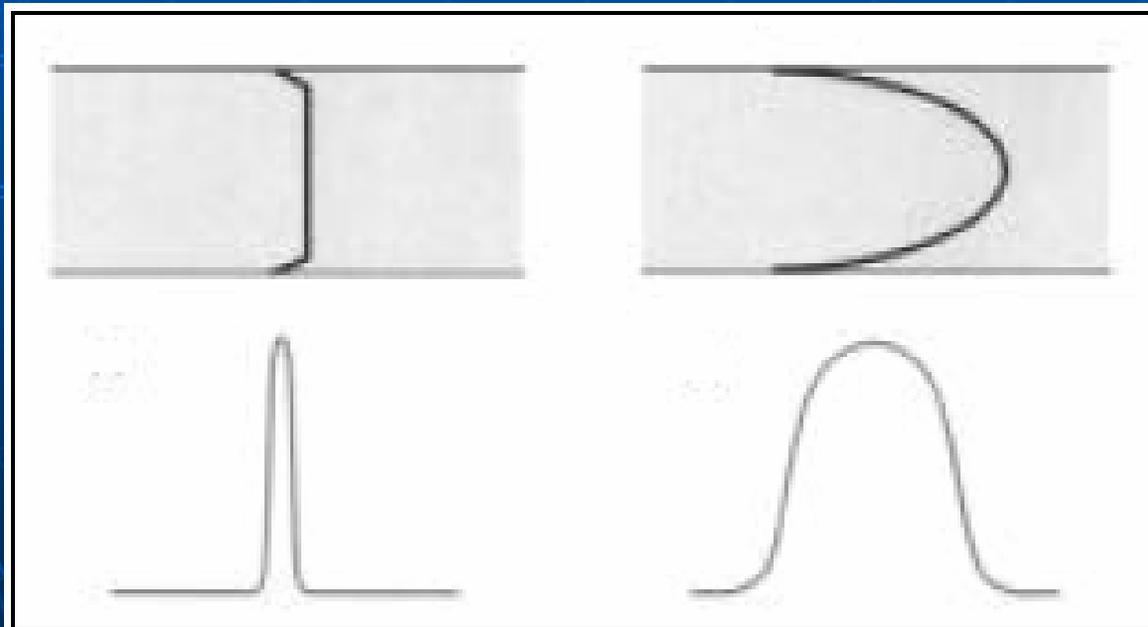
- Debido a la inyección de la muestra.
- Debido a la separación.
- Debido a la detección.

# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSION

Debido a la inyección de la muestra

La inyección debería hacerse en columna.



# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSIÓN

Debido a la separación de la muestra

Difusión entre el tampón-analito (ensanchamiento de pico).



Ideal

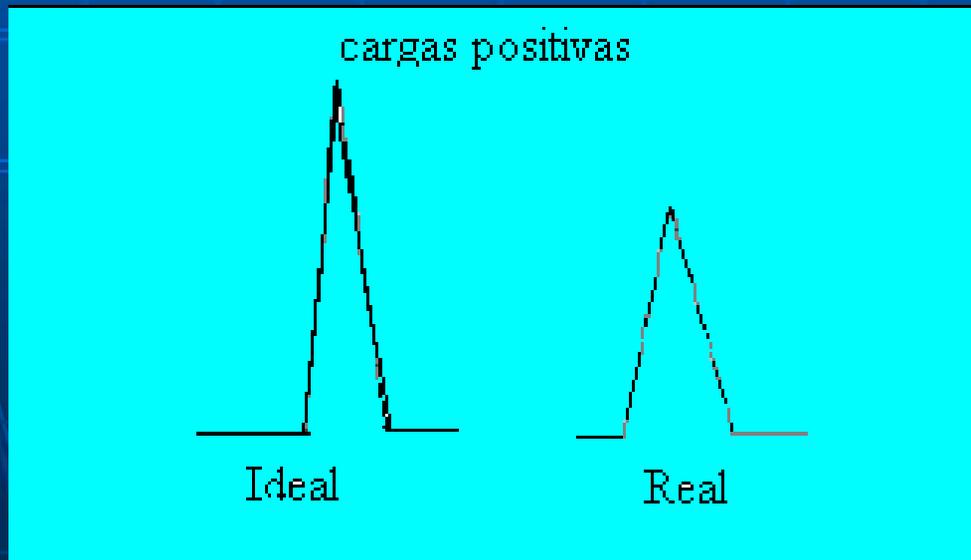
real

# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSIÒN

Debido a la separación de la muestra

Absorción de analitos, debida a la carga negativa del capilar.

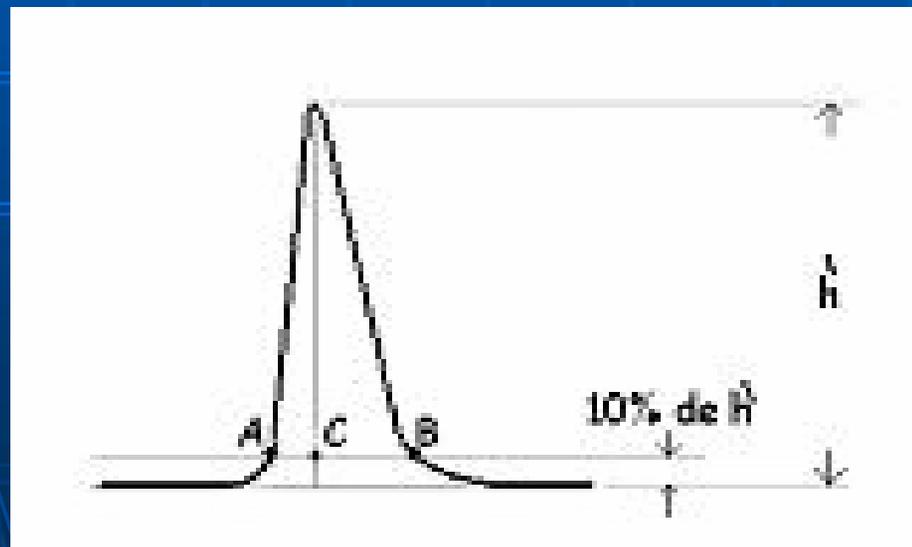


# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSIÓN

Debido a la detección de la muestra

Asimetría de la diferentes movilidades (ensanchamiento  
basa del pico).



Dispersión por detección

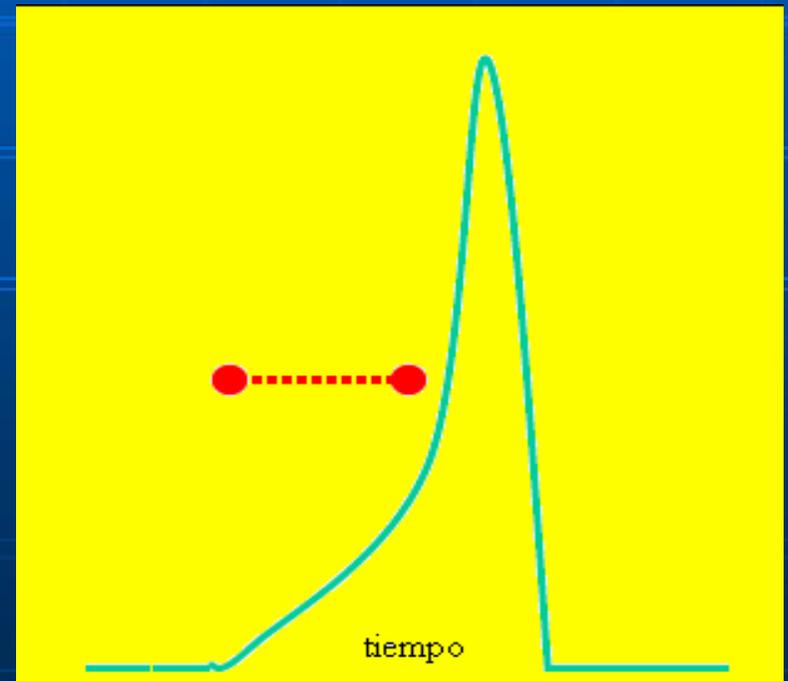
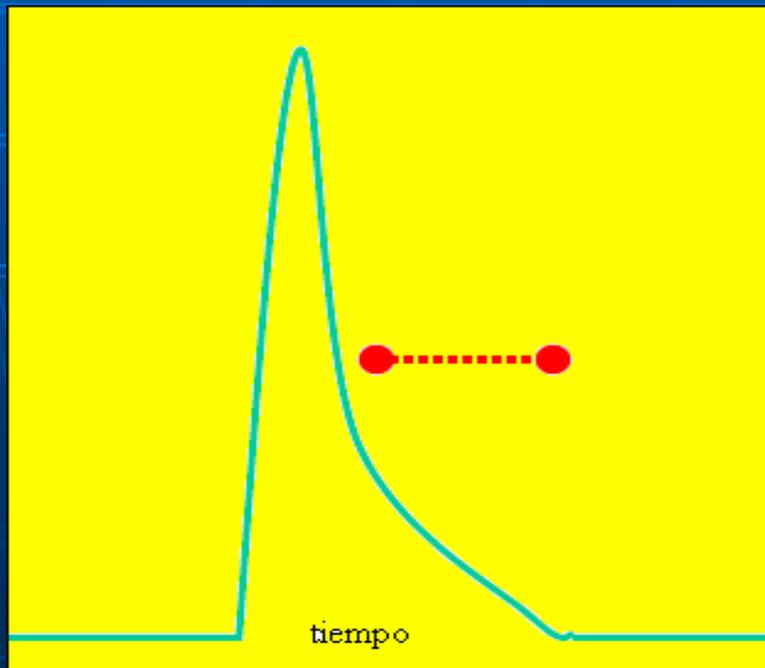
# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSION

Debido a la detección de la muestra

Tailing.

Frinting.

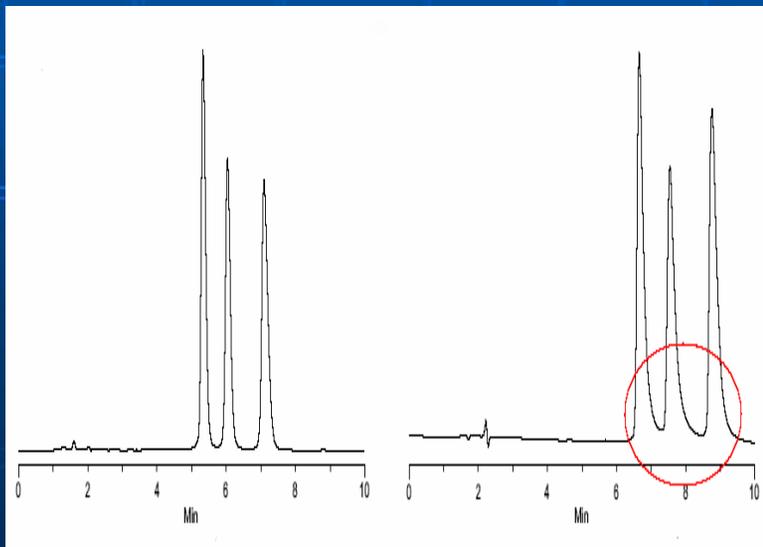


# Electroforesis capilar en zona

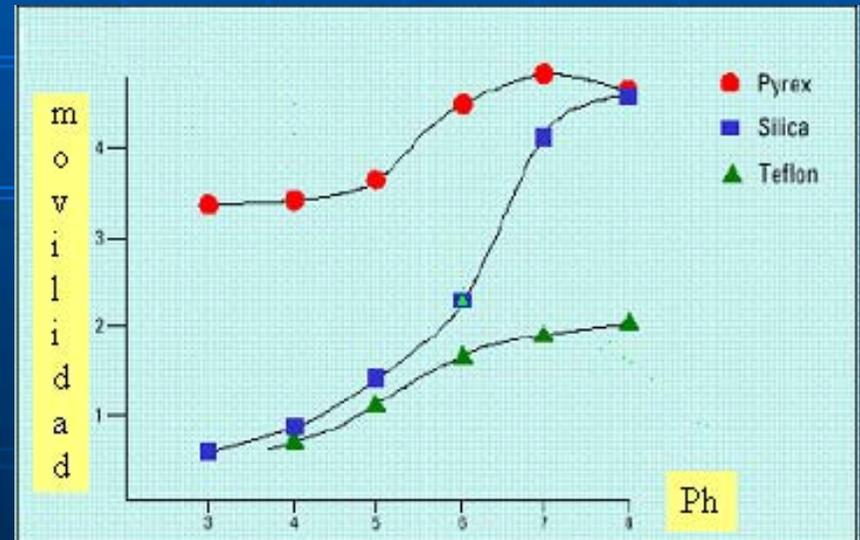
## FENOMENO DE DISPERSIÓN

Debido a la variación de PH del tampón

El PH afecta de forma importante a la movilidad.



Variación con PH aumentado



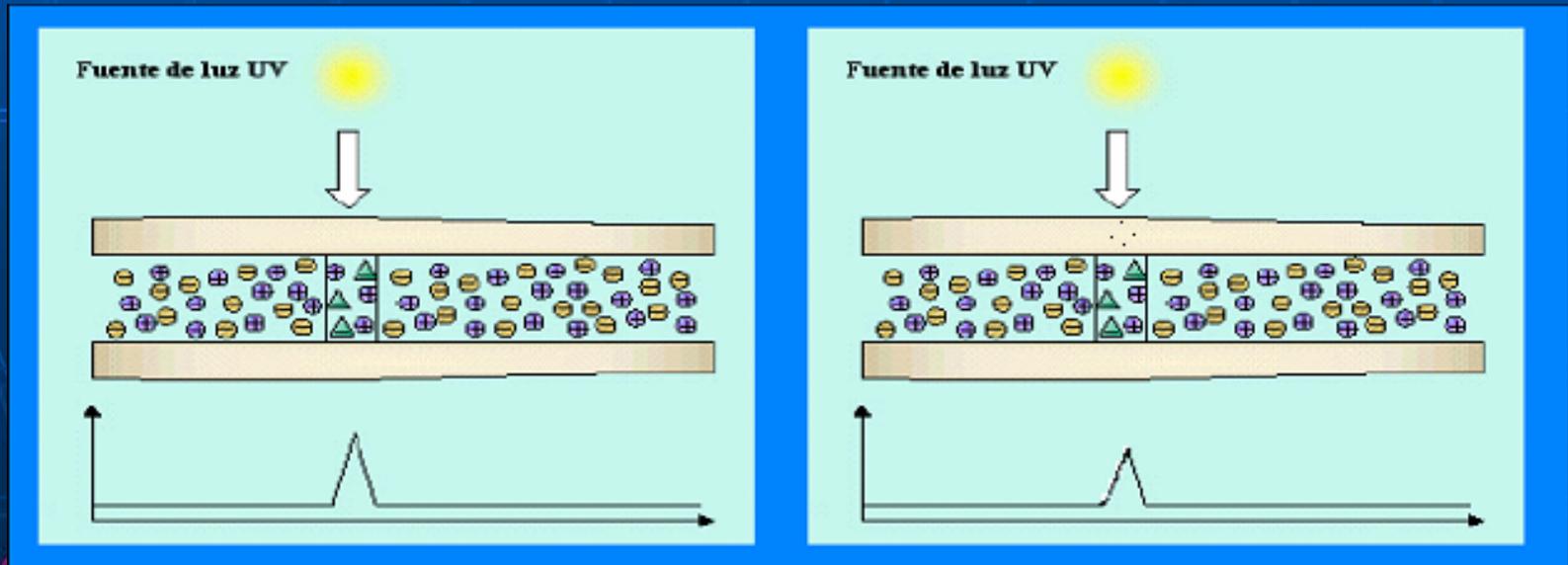
movilidad dependiente del PH

# Electroforesis capilar en zona

## FENOMENO DE DISPERSION

Debido a la detección.

Depende del diseño del detector.  
Tiene poco efecto en la dispersión.



# Electroforesis capilar en zona

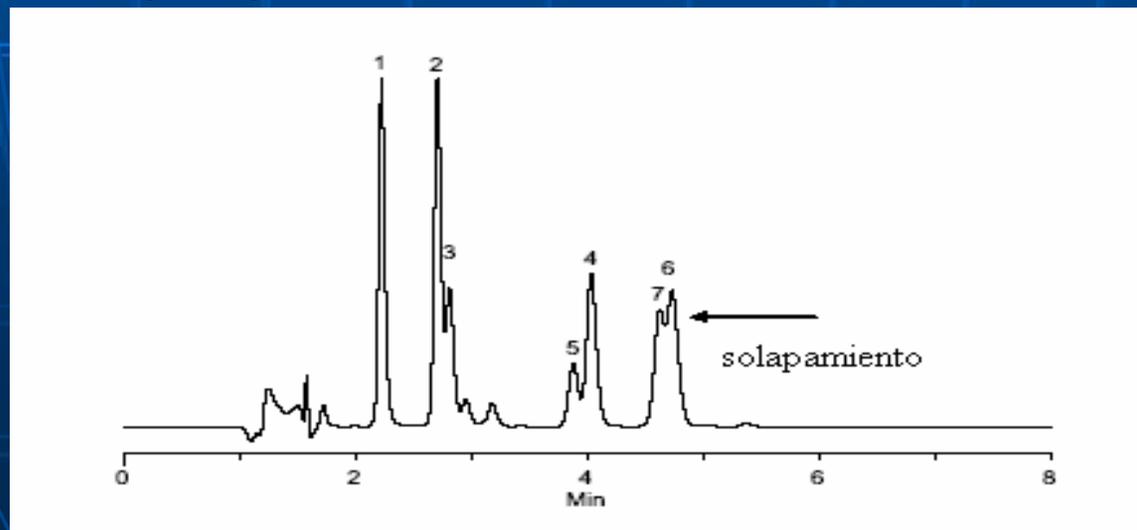
## FENOMENO DE DISPERSIÓN

### Solapamiento de picos

Debido a la movilidad de las partículas.

Calibración del detector.

Capilares mal preparados.

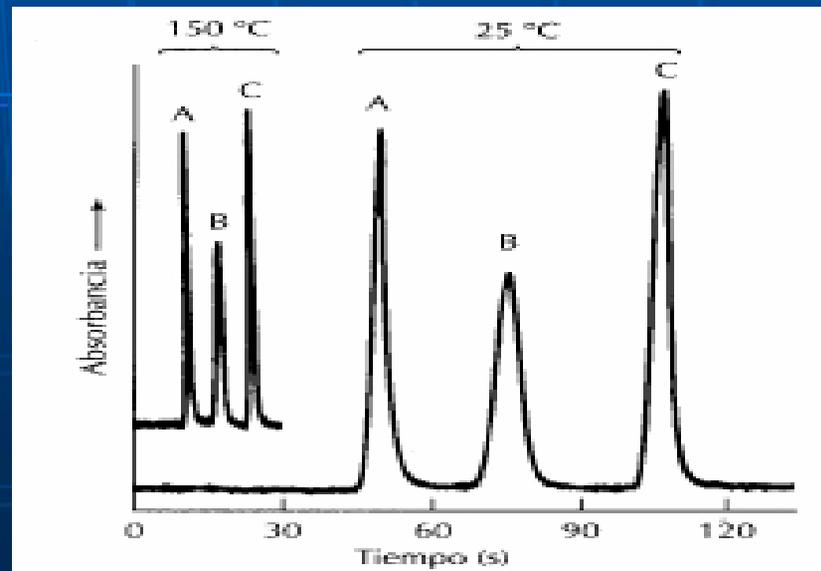


# Electroforesis capilar en zona

## DISMINUCIÓN DEL TIEMPO

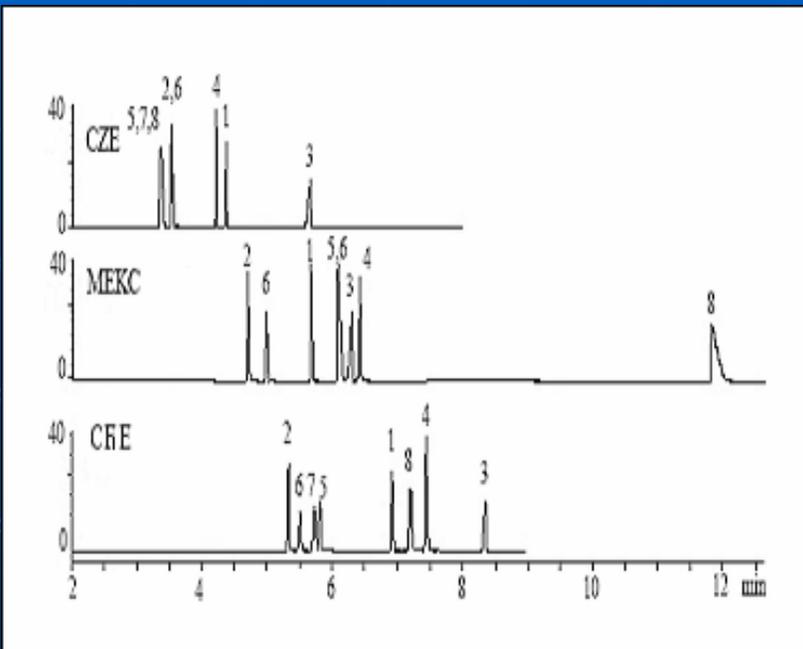
Debido a la temperatura

Disminución del tiempo de análisis cuando se eleva la temperatura 25 -150 grados centígrados.



# Electroforesis capilar en zona

## VENTAJAS



Mejor disipación de calor.  
Automatización sencilla, rápida.  
Inyección de volúmenes de  
muestras pequeños.

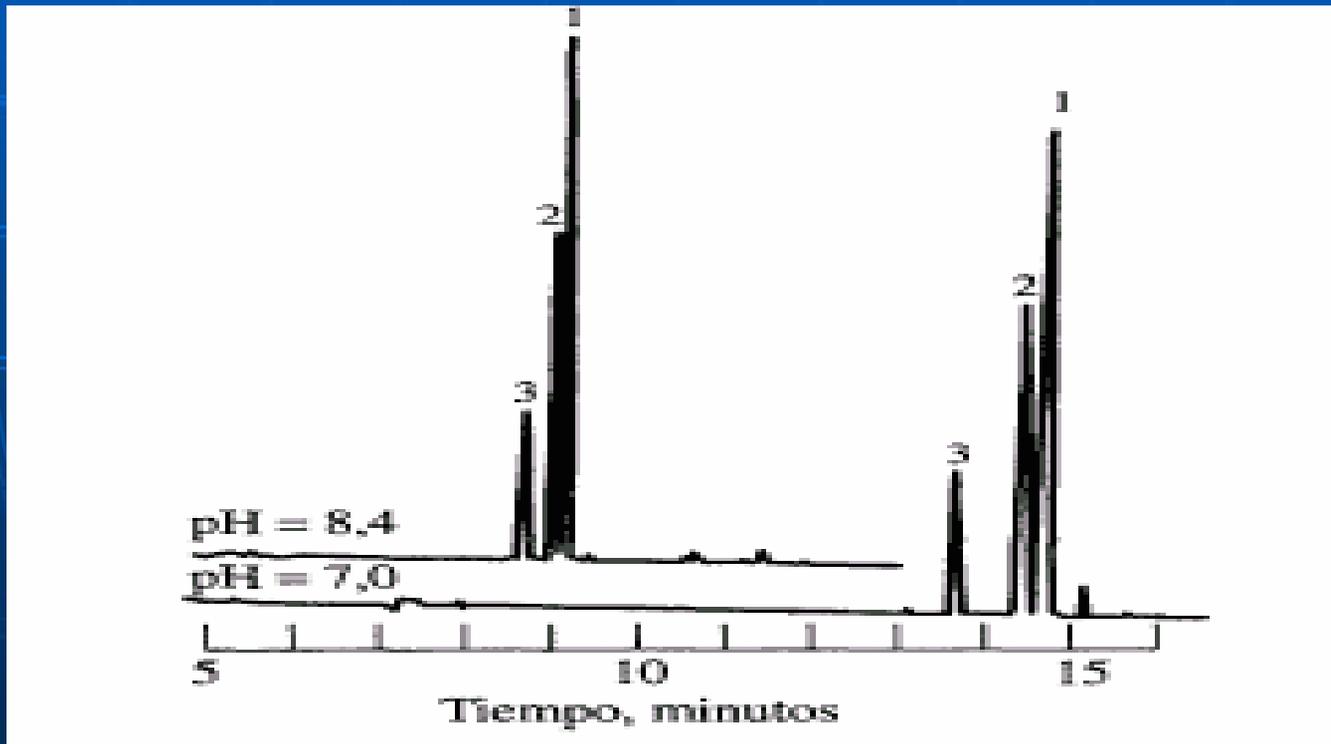
Disminución del tiempo de análisis.

**Desventaja:** la vulnerabilidad a el cambio de sus componentes.

# Electroforesis capilar en zona

## VENTAJA O DESVENTAJA

Depende de la aplicación y de la muestra.



Variación de PH

# Electroforesis capilar en zona

## APLICACIONES

Farmacéuticos.

Clínicos.

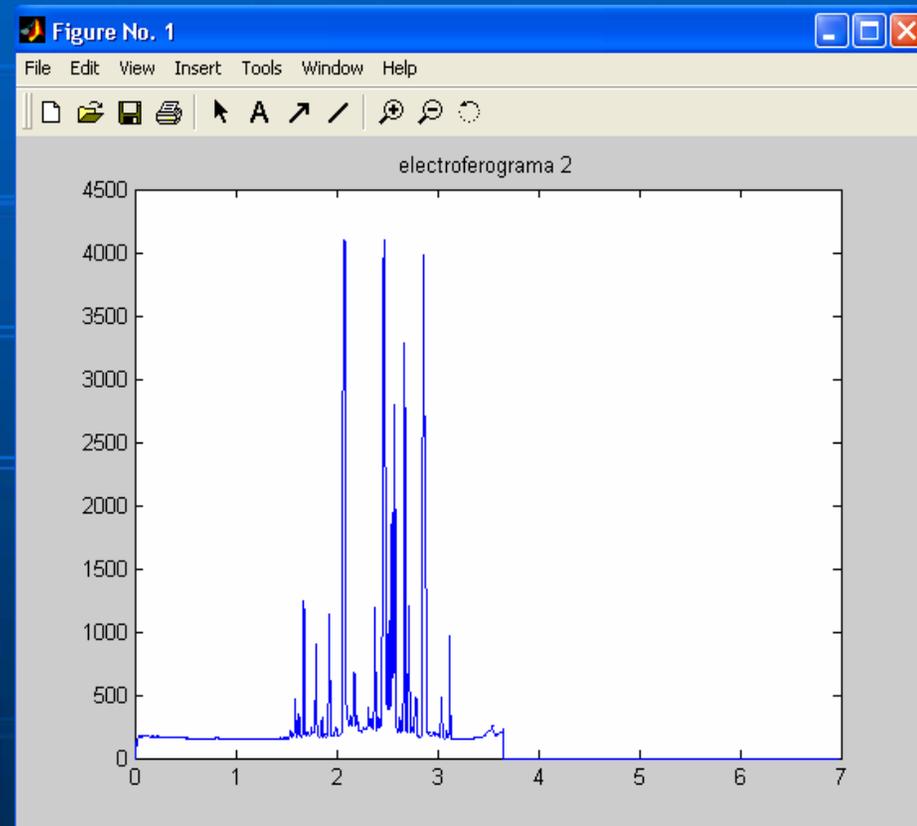
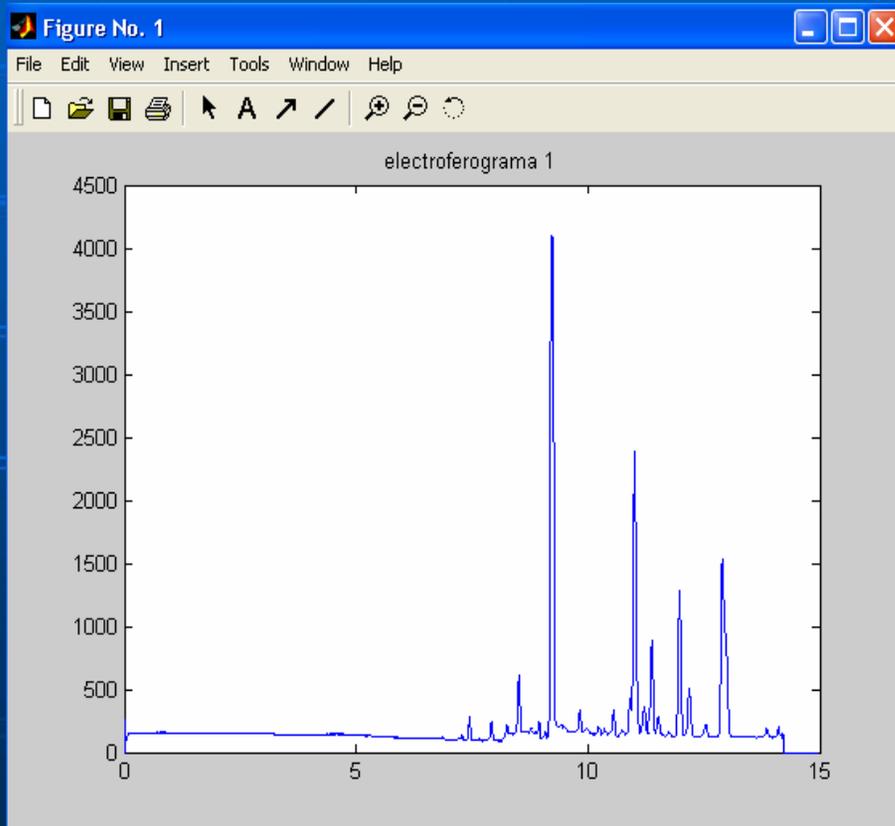
Bioquímicas.

Alimentarios.

Ambiental.

# Electroforesis capilar en zona

## ELECTROFEROGRAMAS



Electroferogramas datos originales

# Electroforesis capilar en zona

## BIBLIOGRAFIA

<http://www.ce-resources.com/cecon.html>

BRAITHWAITE, A. y SMITH, F.J., "*Chromatographic Methods*", 5th ed., Chapman & Hall, London, 1996.

VALCÁRCEL CASES, M. y GÓMEZ HENS, A., "*Técnicas Analíticas de Separación*", Reverté, Barcelona, 1990

[www.uclm.es](http://www.uclm.es)

[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)

PREGUNTAS?

GRACIAS