



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Elektroforesi Kapilarraren Aplikazioak

Josu Lopez-Gazpio

**EUSKARAREN ARLOKO ERREKTOREORDETZAREN
SARE ARGITALPENA**

ISBN: 978-84-9082-229-6

Liburu honek UPV/EHUko Euskararen Arloko Errektoreordetzaren dirulaguntza jaso du

Elektroforesi kapilarraren aplikazioak

Josu Lopez-Gazpio

HITZAURREA

Elektroforesi kapilarraren oinarriak ikasmateriala izan zen elektroforesi kapilarrari buruz idatzitako lehen gidaliburua. Euskararen arloko Errektoreordetzari esker, lan horrek jarraipena izan du; esku artean duzun *Elektroforesi kapilarraren aplikazioak*, hain zuzen ere. Ikasmaterial hau besteren jarraipena da, baina ez dut esango bigarren zatia denik. Lehen liburuan landutako kontzeptu asko berrikusi ditut, eta funtsezkoak direnak laburtu. Elektroforesi kapilarraren garapen historikoari karga kendu diot, eta benetan analistarentzat interesgarriak izan daitezkeen datuak azpimarratu nahi izan ditut.

Espero dut lagungarria izatea Kimika Analitikoa edo antzeko irakasgaiak ikasi behar dituzten ikasleentzat, eta gai hori irakasten duten irakasleentzat ere baliagarria izatea nahiko genuke. Era berean, elektroforesi kapilarrarekin lan egin behar dutenek baliabide osagarri bat aurkituko dute hemen.

Ikasmaterialaren lehen zatian, oinarriak eta kontzeptu orokorrak laburtu ditut. Esan daiteke aurreko ikasmaterialaren laburpen praktiko bat dela lehen zatia. Bigarren zatian, zenbait elektromigrazio teknika azaldu eta deskribatu ditut. Azken zatian, ikuspuntu praktikoari eutsi diot: instrumentazioa erabiltzeko aholkuak eta metodoen garapenerako gomendioak. Azken zatian, nire doktoretasian zehar izan ditudan arazo esperimentalen konponbideak eta galderen erantzunak biltzen saiatu naiz. Era berean, metodoen garapenerako lehen pausoak laburtzen dira.

Nire helburua bete dudalakoan nago, baina, berriro ere, irakurleek izango dute azken hitza.

Josu Lopez-Gazpio

Esker ona Euskararen arloko Errektoreordetzari, ikasmaterialak sustatzeko egiten duen lanagatik.

Doktore-tesia gauzatzeko emandako laguntza eskertzen diot Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailari. Era berean eskertzen dut UPV/EHUK *Doktorego ondoko prestakuntza-programetan sartu arte doktore berriak kontratatze*ko deialdiaren bidez emandako laguntza.

UPV/EHUK antolatutako Euskarazko ikasmaterialgintza sustatzeko 2014ko deialdian parte hartu du lan honek.

Aurkibidea

| | |
|---|----|
| I. zatia: Elektromigrazio-tekniken oinarriak | 1 |
| 1. Elektromigrazio-tekniken oinarriak | 3 |
| 1.1. Sarrera | 3 |
| 1.2. Elektroosmosia | 6 |
| 1.3. Elektroforesia | 10 |
| 2. Instrumentazioa eta banaketen kalitatea | 15 |
| 2.1. Instrumentazioa | 15 |
| 2.2. Lagina injektatzeko sistemak | 18 |
| 2.3. Detektagailuak | 19 |
| 2.4. Banaketen kalitatea | 20 |
| II. zatia: Elektromigrazio-teknika motak | 27 |
| 3. Zonako elektroforesi kapilarra | 29 |
| 3.1. Sarrera | 29 |
| 3.2. Zonako elektroforesi kapilarra | 32 |
| 3.3. Banaketan eragina duten faktoreak | 37 |
| 4. Kromatografia elektrozinetiko mizelarra | 43 |
| 4.1. Oinarri teorikoa | 43 |
| 4.2. Mizelak eta surfaktanteak | 48 |
| 4.3. Banaketan eragina duten faktoreak | 50 |
| 4.4. Mikroemultsioak | 51 |
| 5. Elektroforesi kapilar ez-akuosoa | 55 |
| 5.1. Sarrera | 55 |
| 5.2. Disolbatzaile organikoak eta gehigarriak | 55 |
| 5.3. Kromatografia elektrozinetiko mizelar ez-akuosoa | 58 |
| 6. Beste elektromigrazio-teknika batzuk | 65 |
| 6.1. Elektrokromatografia kapilarra | 65 |
| 6.2. Fokatze isoelektriko kapilarra | 66 |
| 6.3. Isotakoforesi kapilarra | 68 |
| 6.4. Elektroforesi kapilarra geletan | 70 |
| III. zatia: Metodoen garapena | 75 |
| 7. Aholku praktikoak | 77 |
| 7.1. Sarrera | 77 |
| 7.2. Kapilarrak | 77 |
| 7.3. Kapilarraren aurre-egokitzea eta mantentzea | 79 |

| | |
|---|----|
| 7.4. Injekzioa | 81 |
| 7.5. Beste aldagai batzuk | 82 |
| 7.6. Barne-patroia eta azalera normalizatua | 83 |
| 7.7. Beste aholku batzuk | 84 |
| 8. Metodoen garapena | 89 |
| 8.1. Lehen erabakiak | 89 |
| 8.2. Hasiera | 90 |
| 8.3. Elektrolitoaren aukeraketa | 91 |
| 8.4. CZE metodoen optimizazioa | 92 |
| 8.5. MEKC metodoen optimizazioa | 93 |

I. ZATIA

Elektromigrazio- tekniken oinarriak

Elektromigrazio-tekniken oinarriak

1.1. Sarrera

Elektroforesi fenomenoaz aztertzearen lehen saiakuntza XIX. mendearen hasieran kokatzen da. Esperimentua F. F. Reuss Moskuko Unibertsitateko irakasleak egin zuen, eta, esperimentu haiekin, korrante elektrikoaren ondorioz gertatutako partikula kargadunen mugimendua ari zen ikusten Reuss: elektroforesia. Haren ikerketaren ondorioak bi urte geroago plazaratu zituen (Reuss, 1809), eta huraxe izan zen, hain zuzen ere, elektroosmosiari eta elektroforesiari buruzko lehen artikulua (Righetti, 2009).

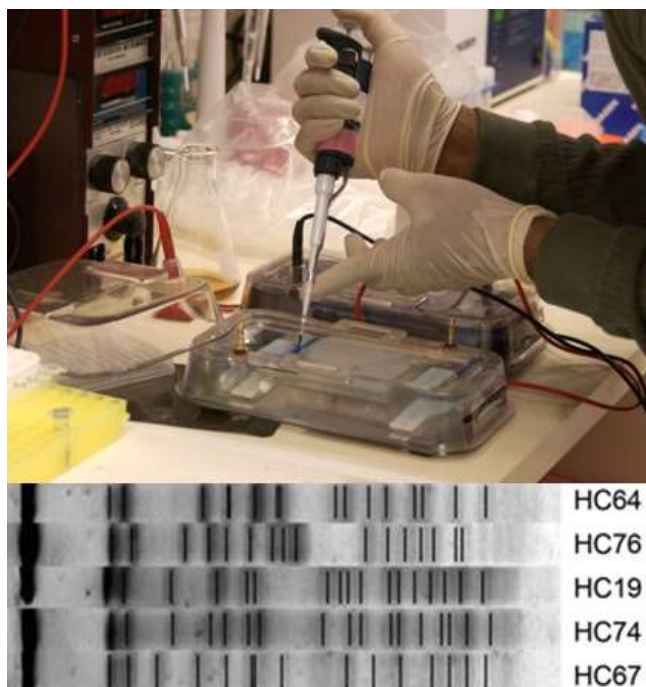
XIX. mendean aurrera, sakonago aztertu zuten eremu elektrikoaren eraginez disolbatutako partikulek jasaten zuten migrazioa, besteak beste, J. W. Hittorf, H. von Helmholtz, O. Lodge eta F. Kohlrausch zientzialariek (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Egun “elektroforesi” deritzon banaketa-teknikaren lehen pausoak eman zituzten azken bi ikertzaileek, sistematikoki aztertu baitzuten hainbat ioiren migrazioa (Lodge, 1886; Kohlrausch, 1897).

Lodgeren eta Kohlrauschen ideietan oinarrituta, 1937an, A. Tiseliusen odol-serumaren hainbat proteina banatzea lortu zuen, fronte mugikorren elektroforesia erabiliz (MBE, *moving boundary electrophoresis*), eta horretarako erabilitako ekipoen berri eman zuen (Tiselius, 1937). Tiseliusen Kimikako Nobel saria jaso zuen, 1948an, elektroforesiaren garapenean egindako ikerketengatik eta serumean dauden proteina konplexuak aztertzeagatik (Nobel Foundation, 2013). Tiseliusen ekipoen deskribapen zehatza bibliografian aurkitu daiteke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Konposatu kargadunek eremu elektrikoaren eraginpean duten migrazioan oinarritzen da elektroforesia. Migrazio horri esker banatzen dira. MBE oinarritutako lehen metodoek eraginkortasuna hobetzeko aldaketak izan zituzten, eta horrela garatu ziren paperetan eta geletan egindako elektroforesi-teknikak. Geletan egindako elektroforesia asko erabiltzen da egun ere, batez ere biologian

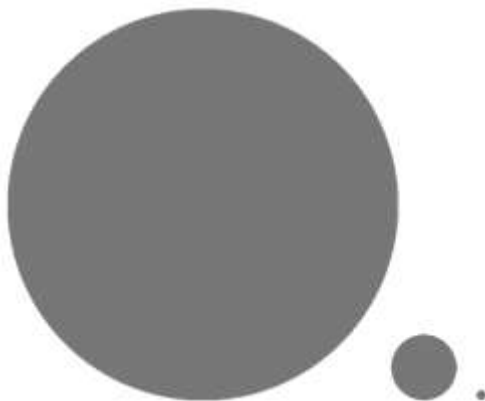
eta biokimikan (1.1. irudia). Geletan egindako elektroforesiaren desabantaila nagusia Joule efektua da; izan ere, efektu horren ondorioz askatzen den beroa xahutzeko gaitasuna mugatua denez, tenperatura-gradienteak sortzen dira sisteman. Horren ondorioz, zona elektroforetikoak zabaldu, eta banaketa okerragoak lortzen dira. Joule efektuaren eraginez, geletan egindako elektroforesian zaila izaten da 10 kV baino potentzial-diferentzia handiagoak erabiltzea.

Efektu horri konponbidea emateko, S. Hjertén-ek —elektroforesi kapilarraren aitak— elektroforesia hodi estuetan egitea proposatu zuen, 1967an (Hjertén, 1967). 3 mm inguruko barne-diametroko hodi zuzen bat erabili zuen eremu elektriko handiagoak aplikatu ahal izateko. Urte batzuk geroago, 1974an, Virtanenek frogatu zuen hodi are finagoak —kapilarrak, alegia— erabiltzeak abantaila gehiago ekartzen zituela (Virtanen, 1974). 1979an, Mikkersek eta haren lankideek (Mikkers *et al.*, 1979), Virtanen eta Hjertén aitzindarien lanetan oinarrituta, 200 µm-ko diametroko tefloizko hodietan anioi organikoen eta ez-organikoen banaketa elektroforetikoak egitea lortu zuten, bereizmen handiko zonako elektroforesi izenpean (HPZE, *high-performance zone electrophoresis*).



1.1. irudia. Banaketa elektroforetikoaren aurretik, gelean kargatzen da nahastea, mikropipeta erabiliz (goiko irudia). Irudia: Maggie Bartlett, NHGRI, jabego publikoan. Beheko irudian ikus daitekeen gelean, 5 kanal agertzen dira, banaketa elektroforetikoaren ondoren agertu diren zonekin. Zona horietako bakoitza konposatu bati dagokio, eta ezkerretik eskuinerako migrazioa gertatu da, eremu elektrikoa aplikatu denean. Irudia: jabego publikoan.

Zonako elektroforesi kapilarra (CZE, *capillary zone electrophoresis*) garatu izanaren merezimendua Jorgensoni eta Lukacsi aitortu behar zaie. 1981ean, banaketa elektroforetikoko arrakastatsua lortu zuten, lehen aldiz, 75 μm -ko barne-diametroko kapilarra (1.2. irudia) erabiliz (Jorgenson eta Lukacs, 1981). 80-100 cm luze ziren pyrex-beirazko kapilarrak erabiliz, hainbat aminoazido banatzea lortu zuten.



1.2. irudia. Elektroforesian erabilitako kapilarren barne-diametroaren bilakaera (eskalan irudikatuak): Hjerténeen kapilarra (3 mm, ezkerrean), Virtanenen kapilarra (500 μm , erdian), eta Jorgensonen eta Lukacsen kapilarra (75 μm , eskuinean). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

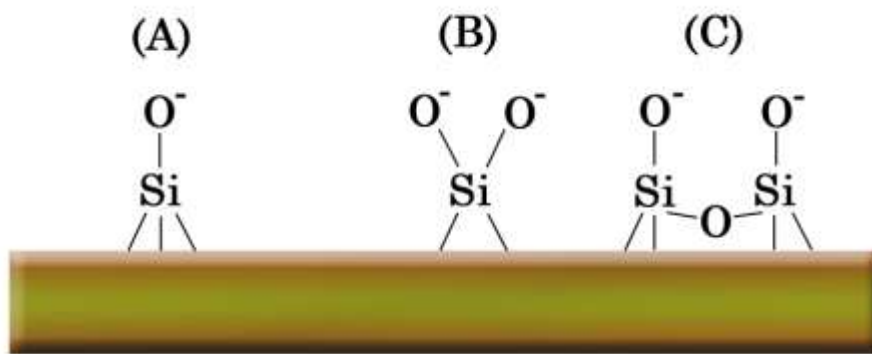
Hurrengo mugarri garrantzitsua S. Terabek jarri zuen, kromatografia elektrokinetiko mizelarra (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*) deskribatu zuenean. Izan ere, CZEren kasuan, molekulak karga/masa erlazioaren arabera banatzen direnez, teknika hori ezin da erabili konposatu neutroak banatzeko, haien karga nulua baita. Elektroforesi kapilarraren historiako aurrerapausorik erabakigarrienetako bat eman zuen Terabek; hain zuzen ere, 1984ean eta 1985ean argitaratutako bi ikerlanetan (Terabe *et al.*, 1984; Terabe *et al.*, 1985), elektroforesi kapilarra erabiliz konposatu neutroak banatzea lortu baitzuen (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Une horretatik aurrera, oso azkar garatu zen teknika, eta, azken hamarkadan, banaketa-teknika eraginkor bilakatu da elektroforesi kapilarra. Gainera, CE ekipoa masa-espektrometria (MS, *mass spectrometry*) detektagailuekin akoplatzea lortu zenean eta merkatuan lehen CE-MS ekipoa agertu zirenean, argi geratu zen analisi-teknika boteretsua zela elektroforesi kapilarra. Egun, luze eta zabal erabiltzen da hainbat esparrutan: ikerkuntzan eta garapenean, farmakologian, elikagaien analisisan, kutsatzaileen kuantifikazioan, kalitate-kontrolan,

proteomikan, metabolomikan, genomikan, hainbat aplikazio analitikotan, eta abar (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

1.2. Elektroosmosia

Elektromigrazio-tekniketan erabiltzen diren silize urtuzko kapilarren barne-paretetan badira silanol (-SiOH) taldeak. Ingurunearen pH-a basikoa bada, silanol-taldeek karga negatiboa dute, $-\text{SiO}^-$ eran daudelako. Jotzen da 4-5 silanol-talde daudela nanometro karratuko normalean erabiltzen diren kapilarretan eta, ikusi denez, nagusiki badira hiru silanol-talde mota (1.3. irudia).

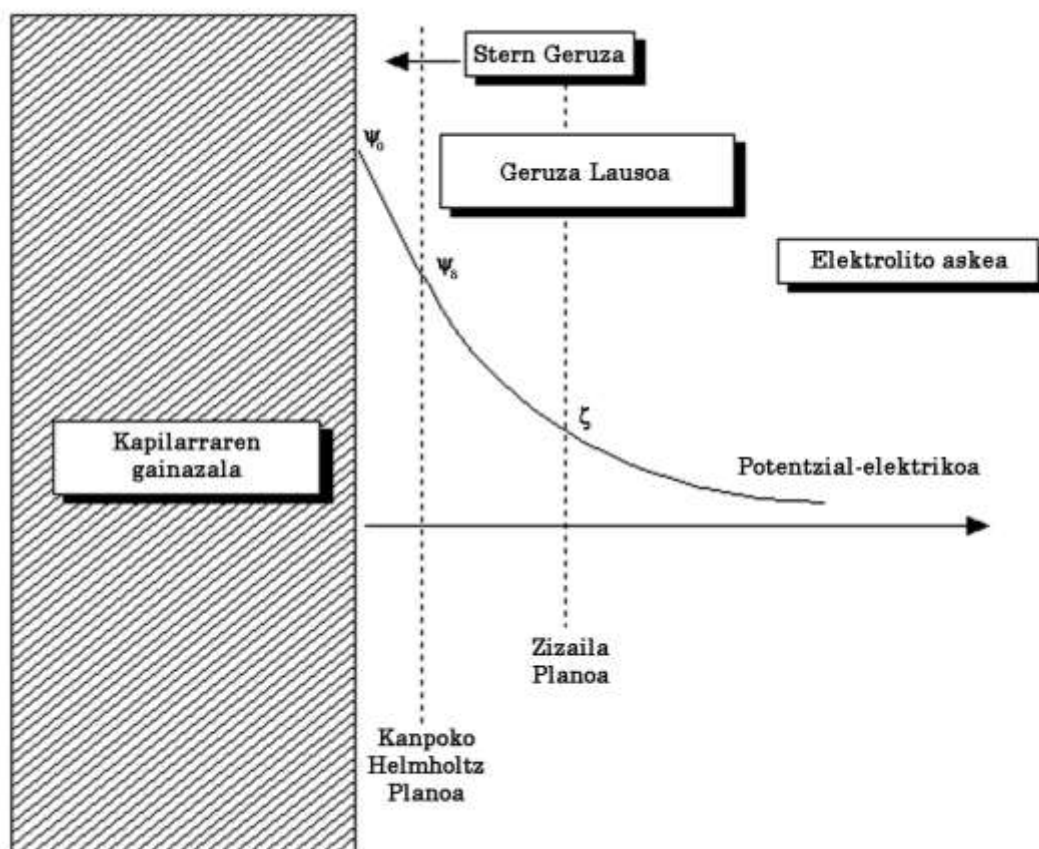


1.3. irudia. Kapilarren gainazaleko silanol-talde motak: (A) isolatuak, (B) geminalak eta (C) bezinalak. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Kapilarren barne-gainazalean dauden silanol-talde ionizatuak karga negatiboa ematen diote gainazalari, eta karga horrek kapilarren barneko elektrolito-disoluzioan dauden ioi positiboak erakartzen ditu. Kontrako kargek geruza elektrikoa bikoitz mehe bat sortzen dute —1-10 nm-koa, gutxi gorabehera—. Eremu elektrikoa aplikatzen denean, paretaren inguruan pilatuta dauden katioiek katodoranzko —hau da, elektrodo negatiboranzko— desplazamendua dute. Haiekin batera, katodorantz mugiaraziko dute elektrolito-disoluzio guztia. Fenomeno horri elektroosmosia deritzo, eta agertzen den higidura-fronte uniforme fluxu elektroosmotikoa da (EOF, *electroosmotic flow*).

EOFa, elektroforesi fenomenoarekin batera, elektromigrazio-tekniketan funtsezkoa da. Gainera, kontuan izan behar da fluxu elektroosmotikoak kapilarrean dauden molekula guztien gain duela eragina; alegia, banatu nahi diren ioietan, molekuletan eta banaketa-disoluzioan dauden beste konposatu guztietan.

Silanol-taldeak pH basikoan ionizatzen dira, baina silanolaren ionizazio-konstantearen (K_a) araberakoa izango da, noski. Silanol-talde mota bat baino gehiago dagoenez, pK_a -ren balioa tartea bat da, eta ez balio finitua. Balio hori 2-9 artean dago (Sandoval eta Chen, 1996), eta, ondorioz, EOFak ere antzeko joera du: pH < 2 denean, fluxua ia nulua da, eta, pH > 9 denean, silanol-talde guztiak ionizatuta daudela jo daiteke, eta, hortaz, fluxu-abiadura maximoa izango da. Tarteko pH-etan lan egiten bada, fluxu-abiadura balio maximoaren eta minimoaren artean egongo da.



1.4. irudia. Geruza elektriko bikoitzaren irudikapen eskematikoa. Hiru zona nagusiak ikus daitezke: Stern geruza, geruza lausoa eta elektrolito askea. Geruza lausoaren eta elektrolito askearen arteko muga ez da plano baten bidez adierazi, muga hori lausoa baita. Irudia: jabego publikoan.

Kapilarraren barne-paretaren inguruan sortzen den geruza elektriko bikoitzaren deskribapen matematikoa eta beste xehetasun guztiak bibliografian jasota daude (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013), baina garrantzitsua da laburpen orokorra argi izatea. Negatiboki kargatutako kapilarraren gainazalaren inguruan, hiru zona bereizten dira: 1) Stern geruza, 2) geruza lausoa, eta 3) elektrolito askea (1.4. irudia). Stern geruza gainazaletik gertuen dagoen geruza da. Geruza

horretan, katioi-kontzentrazioa altua izateaz gainera, gainazalari estuki lotuta daude katioiak: geruza higiezina dela jotzen da. Stern geruzaren ondoren, geruza lausoa dago, eta, han ere, katioien kontzentrazioa anioiena baino handiagoa da, baina aldea txikiagoa da. Geruza lausoari esker agertzen da EOFa; izan ere, eremu elektrikoaren eraginpean, geruza lausoaren zati bat kontrako karga duen elektrodorantz higitzen hasten da. Higitzen hasten den geruza lausoko planoari zizaila-planoa deritzo. Geruza lausoaren amaieran, katioien eta anioien kontzentrazioa berdina da, eta ez da nabaritzen kargatutako silize gainazalaren eragina. Geruza lausoaren mugimenduaren eraginez higitzen da, hortaz, elektrolito-disoluzioa.

Jarraian, abiadura elektroosmotikoaren ohiko adierazpena ekarriko da zuzenean (Ghosal 2004). Esan den moduan, bibliografian aurkitu dezake irakurleak geruza elektriko bikoitzaren deskribapen matematiko osoa eta (1.1) adierazpenaren lorpena (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

$$v_z(\mathbf{x}) \approx v_\infty = v_{EOF} = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} E_z \quad (1.1)$$

Helmholtz-Smoluchowski ekuazioa deritzo ekuazio horri, Hermann von Helmholtzek (Helmholtz, 1879) eta Marian von Smoluchowskik (Smoluchowski, 1903) egindako ikerketa aitzindarien omenez. Ekuazioan, gainazalarekiko paraleloa den norabidean fluidoak duen abiadura (v_z , m s^{-1}) definitzen da. Abiadura hori nulua da zizaila-planoan, eta fluidoaren barnean du balio maximoa: horixe da EOFaren abiadura (v_{EOF} , m s^{-1}). Bestalde, ε disoluzioaren permitibitatea da ($\text{C}^2 \text{N}^{-1} \text{m}^{-2}$), E_z eremu elektrikoaren balioa (V m^{-1}), ζ zizaila-planoko potentzial elektrikoa (V) eta η disoluzioaren biskositatea ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Abiaduraren eta eremu elektrikoaren arteko proportzionaltasun konstanteari mugikortasuna (μ , $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) deritzo —kasu honetan, mugikortasun elektroosmotikoa (μ_{EOF})—, hau da:

$$v_{EOF} = \left(-\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right) E = \mu_{EOF} \cdot E \quad (1.2)$$

Hortaz, (1.3) adierazpenean agertzen den moduan definitzen da mugikortasun elektroosmotikoa:

$$\mu_{EOF} = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (1.3)$$

(1.3) ekuazioa, dena den, geruza elektriko bikoitz estuetan bakarrik betetzen da; gainerako kasuetan, deskribapen konplexuagoak ageri dira bibliografian (Ghosal,

2004). Hala ere, IUPACren gomendioetan, adierazpen hori onartzen da mugikortasun elektroforetikoaren definiziotzat (Riekkola *et al.*, 2004).

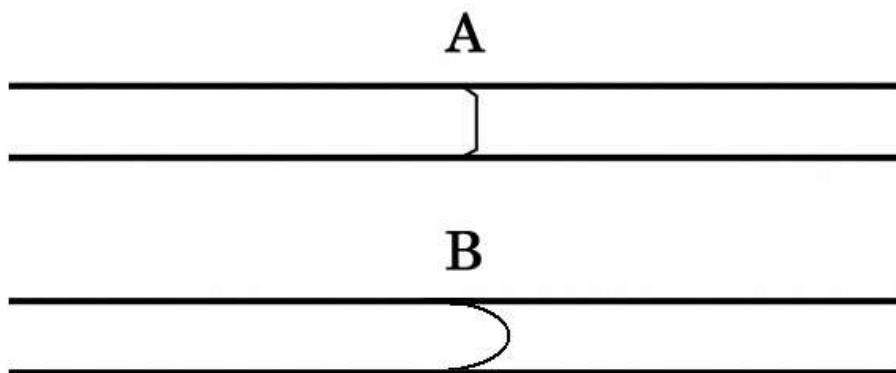
1.2.1. Fluxu elektroosmotikoaren abiadura-profila

Matematikoki frogatu daiteke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013) honela idatz daitekeela kapilarraren gainazaletik edozein distantziatara dagoen fluidoaren abiadura kalkulatzeko adierazpena:

$$v_z(x) = -\frac{\sigma^*}{\kappa\eta} E_z (1 - e^{\kappa x}) \quad (1.4)$$

non σ^* gainazaleko karga-dentsitatea den (C m^{-2}) —alegia, azalera unitateko dagoen karga— eta κ geruza elektriko bikoitzaren konstantea (m^{-1}). Bestalde, $1/\kappa$ erlazioa (m) Debye luzera da, geruza lausoaren luzerarekin lotzen den parametroa.

Elektroforesi kapilarrean erabiltzen diren kapilarren gainazaleko karga-dentsitatea $0,01 \text{ C m}^{-2}$ dela onartuz eta (1.4) ekuazioko beste aldagaiei ohiko balioak esleituz, abiadura maximoaren % 99 lortzen da, kapilarraren gainazaletik 14 nm-ra. Ondorioz, $50 \mu\text{m}$ -ko diametroa duen kapilarraren kasuan, $v_z = v_{EOF}$ da kapilarraren diametroaren % 99,95en. Horregatik, elektroforesi kapilarren kasuan, fluxua laua dela onartzen da, kromatografia likidoan ez bezala (1.5. irudia). Fluxu elektroosmotikoa laua izateak azaltzen du elektromigrazioan oinarritutako tekniketari oinarritutako banaketari sakabanatzea baxua izatea, eta elektroforesi kapilarren abantaila esanguratsuenetako bat da.



1.5. irudia. A: fluxu elektroosmotikoaren abiadura-profila (fluxu laua), eta B: higidura hidrodinamikoari dagokion profila (fluxu parabolikoa). Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

1.3. Elektroforesia

Positiboki kargatutako partikula bat E eremu elektriko batean jartzen denean, polo negatiborantz zuzendutako indar elektriko (F_e , N) sortzen da:

$$F_e = q \cdot E \quad (1.5)$$

non q partikularen karga elektriko den (C). Partikula fluido batean murgilduta badago, higiduraren aurkakoa den marruskadura-indarra (F_m , N) jasango du, (1.6) adierazpenaren bidez lortzen dena,

$$F_m = f_t \cdot v_e \quad (1.6)$$

non f_t (kg s^{-1}) marruskadura translazionalaren koefizientea den, eta v_e (m s^{-1}) partikularen abiadura elektroforetikoa. Partikula esferikoen kasuan, f_t Stokesen Legearen bidez lortzen da (1.7). Lege horrek partikularen erradioarekin (R , m) eta fluidoaren biskositatearekin (η , $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) lotzen du f_t parametroa.

$$f_t = 6\pi\eta R \quad (1.7)$$

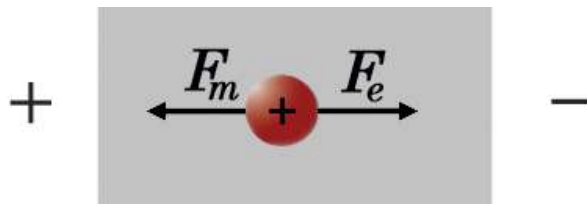
(1.6) eta (1.7) elkartuz, marruskadura-indarraren adierazpen hau lortzen da:

$$F_m = 6\pi\eta R v_e \quad (1.8)$$

Partikula horren gain eragina duten indarrak definitu ondoren (1.6. irudia), Newtonen Bigarren Legea aplikatu behar da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013):

$$v_e = \frac{qE}{6\pi\eta R} = \left(\frac{q}{6\pi\eta R} \right) \cdot E \quad (1.9)$$

Horixe da, hain zuzen ere, abiadura elektroforetikokoaren definizioa.



1.6. irudia. Fluido batean murgilduta eta eremu elektriko baten eraginpean dagoen partikula positibo baten gaineko indarrak. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Bestalde, kontuan hartuko dugu mugikortasun elektroforetikoa μ_e ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) definizioa; alegia, abiaduraren eta aplikatutako eremu elektrikoaren arteko proportzionaltasuna. Mugikortasun elektroosmotikoaren kasuan egindakoaren antzera, hauxe da mugikortasun elektroforetikoa:

$$v_e = \mu_e \cdot E \quad (1.10)$$

Hortaz, (1.11) adierazpenean agertzen den moduan definitzen da mugikortasun elektroosmotikoa:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (1.11)$$

Azken adierazpen hori oso garrantzitsua da elektroforesian oinarritzen diren teknketan. (1.11) ekuazioan ikusten denez, ioien mugikortasun elektroforetikoa q/R erlazioaren arabera da, fluido berean daudenean. Horri esker, hain zuzen ere, beren kargaren eta tamainaren arabera banatu daitezke partikulak, elektroforesi fenomenoan oinarrituz. Beste zenbait ondorio garrantzitsu ere aipatu behar dira: 1) molekula neutroen mugikortasun elektroforetikoa nulua da —karga nulua baitute—, eta 2) anioien —ioi negatiboen— mugikortasun elektroforetikoa negatiboa da. Azken hori egia da; izan ere, partikula negatibo batentzat, kalkulu guztia berdina da, baina indarren noranzkoa aurkakoa da. Hortaz, anioiek polo positiborantz migratzeko joera dute.

Efektu batzuek eragina dute elektroforesian; besteak beste, partikulen tamainak, atzerapen-indarrak, erlaxazio-efektuak, indar ionikoak, pH-ak eta disoziazio-mailak. Efektu horien guztien deskribapen zehatza bibliografian aurkitu dezake interesa duen irakurle orok (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Bibliografia

GHOSAL, Sandip: *Fluid Mechanics of Electroosmotic Flow and its Effect on Band Broadening in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 25(2), 214-228, 2004.

HELMHOLTZ, Hermann von: *Studien über Elektrische Grenzschichten*, *Annalen der Physik und Chemie*, 243(7), 337-382, 1879.

HJERTÉN, Stellan: *Free Zone Electrophoresis*, *Chromatographic Reviews*, 9(2), 122-143, 147-219, 1967. Ph.D. thesis.

JORGENSEN, James W.; LUKACS, Kryn DeArman: *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries: Preliminary Data on Performance*, Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications, 4(5), 230-231, 1981.

KOHLRAUSCH, Friedrich: *Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen*, Annalen der Physik und Chemie, 298(10), 209-239, 1897.

LODGE, Oliver: British Association Report, Birmingham Meeting, 389-413, 1886.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUKo Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

MIKKERS, F. E. P.; EVERAERTS, F. M.; VERHEGGEN, P. E. M.: *High-Performance Zone Electrophoresis*, Journal of Chromatography, 169, 11-20, 1979.

NOBEL FOUNDATION, *The Nobel Prize in Chemistry 1948*, nobelprize.org, 2013 (2015/VII/16).

REUSS, Ferdinand Friedrich: *Notice sur un Nouvel Effet de L'électricité Galvanique*, Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou, 2, 327-347, 1809.

RIEKKOLA, Marja-Liisa; JÖNSSON, Jan Ake; SMITH, Roger M.: *Terminology for Analytical Capillary Electromigration Techniques (IUPAC Recommendations, 2003)*, Pure and Applied Chemistry, 76(2), 443-451, 2004.

RIGHETTI, Pier Giorgio: *Happy Bicentennial, Electrophoresis!*, Journal of Proteomics, 73(2), 181-187, 2009.

SANDOVAL, Junior E.; CHEN, Shiaw-Min: *Method for the Accelerated Measurement of Electroosmosis in Chemically Modified Tubes for Capillary Electrophoresis*, Analytical Chemistry, 68(17), 2771-2775, 1996.

SMOLUCHOWSKI, Marian von: *Contribution à la Théorie de l'Endosmose Électrique et de Quelques Phénomènes Corrélatifs*, Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie, 8, 182-200, 1903.

TERABE, Shigeru; OTSUKA, Koji; ANDO, Teiichi: *Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary*, Analytical Chemistry, 57(4), 834-841, 1985.

TERABE, Shigeru; OTSUKA, Koji; ICHIKAWA, Kunimichi; TSUCHIYA, Akihiro; ANDO, Teiichi: *Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*, Analytical Chemistry, 56(1), 111-113, 1984.

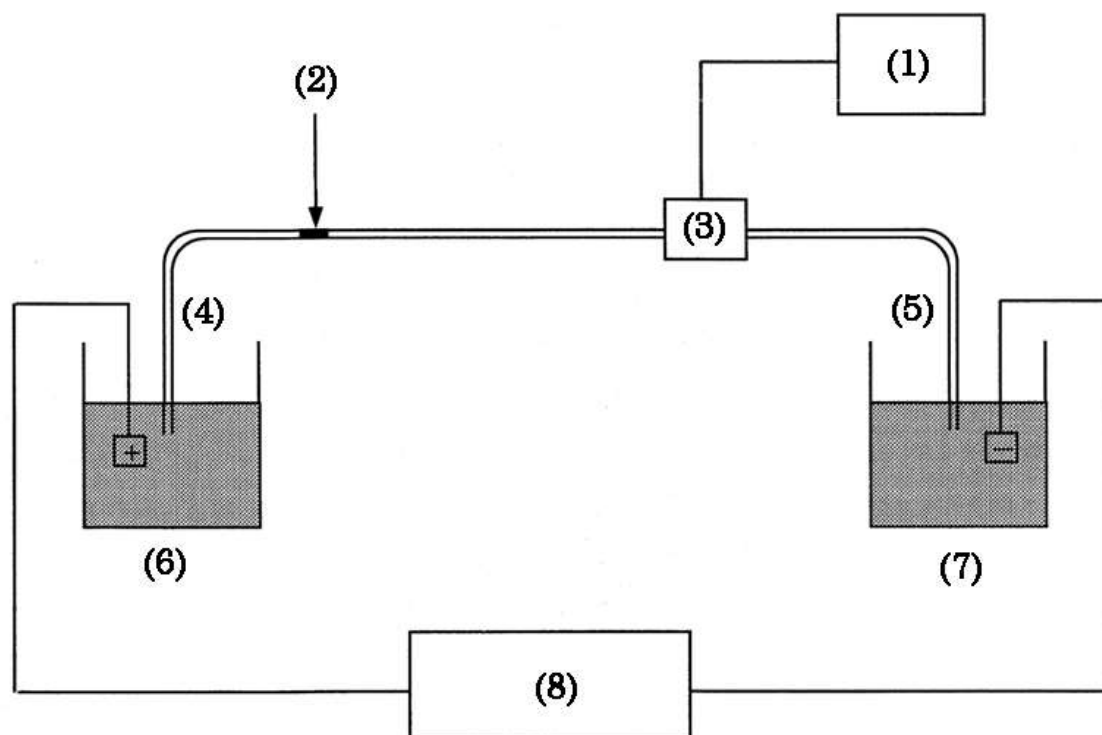
TISELIUS, Arne: *A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures*, Transactions of the Faraday Society, 33, 524-531, 1937.

VIRTANEN, Rauno: *Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection*, Acta Polytechnica Scandinavica, 123, 1-67, 1974. Ph.D. thesis.

Instrumentazioa eta banaketen kalitatea

2.1. Instrumentazioa

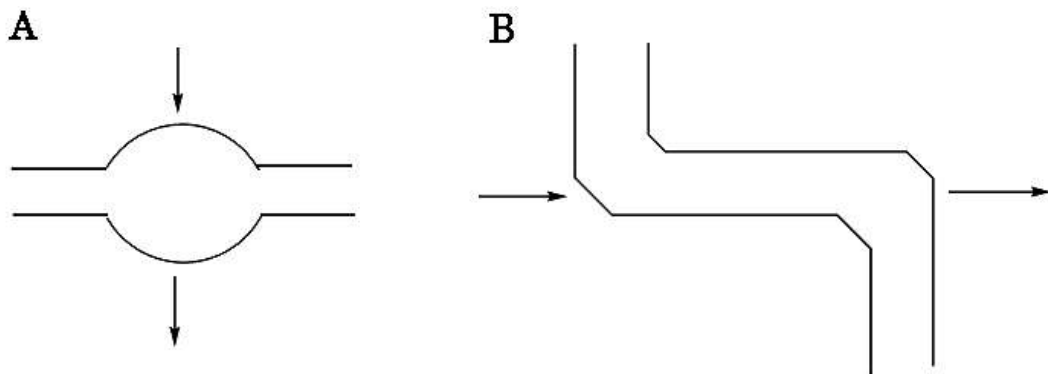
Elektroforesi kapilarra egiteko ekipoen deskribapenari dagokionez, ezaugarri instrumental garrantzitsuenen laburpena egingo dugu (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). 2.1. irudian ikus daiteke instrumentazioaren eskema orokorra.



2.1. irudia. Elektroforesi-ekipo baten eskema: 1) ekipoa kontrolatzen duen ordenagailua, 2) kapilarrean injektatu den lagina, 3) detektagailua, 4) kapilarrearen sarrera edo *inleta*, 5) kapilarrearen irteera edo *outleta*, 6) sarrerako elektrodoa eta elektrolito-disoluzioa (BGE) duen biala, 7) irteerako elektrodoa eta BGE duen biala, eta 8) goi-tentsioko iturria. Irudia: jabego publikoan.

Elektromigrazio-teknikaren bat aplikatu nahi denean, egin beharreko lehendabiziko gauza da ekipoan kapilarra jartzea. Horretarako, ekipoak duen kasetean jartzen da zutabe kapilarra, biribilduta. Kasete horrek agerian uzten du kapilarraren mutur bakoitza, eta, horrela, kasetea ekipoan sartzen denean, elektrodoetako batean sartuta geratzen da kapilarraren mutur bakoitza. Behin kaseta jarrita, kapilarraren zati txiki bat agerian geratzen da elektrodoaren muturretik, 1-2 mm ingurukoa. Zutabe kapilar arruntenak silize urtua erabiliz egiten dira, kimikoki eta elektrikoki egonkorak, nahiko gogorrak, malguak, eta merkeak direlako (Buszewski *et al.*, 2013). Hala ere, beste zenbait material ere erabiltzen dira, hala nola pyrex beira eta tefloia. Kapilar mota ugari aurkitu daitezke merkatuan, baina, normalean, 50-100 cm luze izaten dira. Barne-diametroari dagokionez, 25-100 μm -koak izaten dira.

Detektagailuaren posizioan, kapilarrek eliminatua dute poliimidazko estaldura, kapilarra zeharkatzen ari diren konposatuak detektatu ahal izateko. Detektagailuaren sentikortasuna handitzeko, burbuila bat izaten dute kapilarrek (*bubble-cell*), detektagailuaren izpia pasatzen den tokian. Beste kapilar batzuek, berriz, Z forma izaten dute (*z-cell*) puntu horretan, eta helburu bera du (2.2. irudia).

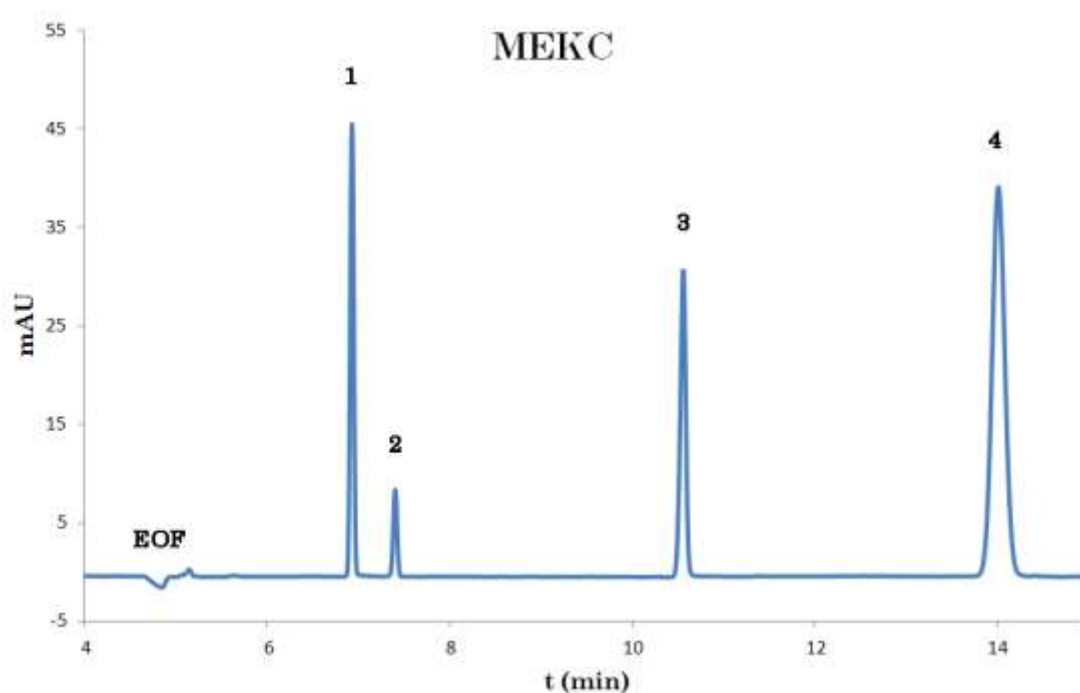


2.2. irudia. Detekzio-zelda motak: A) burbuila erakoa, eta B) Z formakoa. Geziak detektagailutik datorren izpia adierazten du. Irudia: jabego publikoan.

Esan den moduan, ekipoaren elektrodo batean murgilduta dago kapilarraren mutur bakoitza: elektrodo bati *inlet* deritzo, lagina injektatzen baita handik, eta besteari, *outlet*. Fluxu elektroosmotikoaren noranzkoa sarrerako elektrodetik irteerako elektrodorakoa izango da, normalean. Bestalde, gogoratu sarrerako elektrodoa positiboa dela polaritate normala erabiltzen denean, eta irteerakoa, negatiboa. Alderantzizko polaritatea erabiltzen bada, elektrodoen zeinua alderantzizkoa izango da, eta fluxu elektroosmotikoa ere alderantzizkoa izatea

eragingo du horrek. Elektrodo bakoitza bial batean dago murgilduta, eta, bial horretan, elektrolito-disoluzioa edo disoluzio erregulatzailerak jartzen da, zirkuitua itxi eta potentzial-diferentzia aplikatzean korronea sortzeko.

Potentzial-diferentzia aplikatzeko, goi-tentsioko iturri bat du ekipoak, eta oinarritzko elementuetako bat da. Goi-tentsioko iturri arruntek 30 kV-ra arteko potentzial-diferentziak aplika ditzakete, eta 200-300 μA -ko korronea elektrikoak lortu ohi dira. Goi-tentsioko iturria bi elektrodotara konektatzen da, fluxu elektroosmotikoa elektrodo batetik bestera joan dadin. Egungo ekipo gehienek aukera ematen dute potentzial-diferentzia konstantean, korronea elektriko konstantean edo potentzia konstantean lan egiteko. Dena den, ohikoena potentzial-diferentzia konstanteko aukera erabiltzea da. Goi-tentsioko iturriak eskaintzen duen beste aukera interesgarri bat da potentzial-diferentzia gradientek aplikatu ahal izatea. Gradientek erabiltzen direnean, banaketa elektroforetikoa zehar aplikatu nahi den eremu elektriko programatu daiteke (Felhofer *et al.*, 2010).



2.3. irudia. Kromatografia elektrozinetiko mizelarra (MEKC) erabiliz lortutako elektroferograma. Analgesiko baten analisiari dagokio, eta argi ikus daitezke laginean aurkitu diren konposatuak: 1) parasetamola, 2) kafeina, 3) azido azetilsalizilikoa, eta 4) azido salizilikoa. EOFaren iritsiera ere ikus daiteke. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Laginaren injektzioa —hurrengo atalean aztertuko da sakonago— ekipoak egiten du, era automatikoan, eta, horretarako, lagina duen bialarekin ordezkutzen da sarrerako elektrodoan dagoen biala. Lagina injektatu ondoren, potentzial-

diferentzia aplikatzen da, eta, horrela, mugikortasun elektroforetikoaren arabera banatu ahal izango dira laginean dauden konposatu guztiak. Analito bakoitzak aurrera egingo du kapilarrean, *inlet*-etik *outlet*-era, bere abiadura totalaren arabera. Irteerako elektrodora iritsi aurretik, detektagailutik pasatuko dira, eta, han, kontzentrazioarekiko proportzionala den tontor bat emango dute. Tontor guztiak ekipoari konektatutako ordenagailura iristen dira, eta seinale multzo hori elektroferograma bihurtuko da (2.3. irudia).

2.2. Lagina injektatzeko sistemak

Elektroforesi kapilarrean, lagin kantitate oso txikiak injektatzen dira, 1-50 nL ingurukoak —kapilarraren eduki totalaren % 1-2—. Lagina kapilarrean kuantitatiboki sartzeko, badira hiru injekzio mota (Mayer, 2001; Poole, 2003): 1) hidrodinamikoa, 2) elektrozinetikoa, eta 3) hidrostatikoa. Azkena ez da aztertuko; izan ere, egun merkatuan dauden ekipo gehienek ez dute aukera hori ematen —injekzio hori ekipo zaharrek zuten—. Egun gailendu diren injekzio-sistemak, hortaz, injekzio hidrodinamikoa eta elektrozinetikoa dira.

Injekzio hidrodinamikoari dagokionez, injekzio motarik ohikoena da, eta presio-diferentziaren ondorioz sartzten da lagina kapilarrean. Presio-diferentzia lortzeko, badira bi sistema: 1) sarrerako muturrean presioa aplikatzea, edo 2) irteerako muturrean hutsa egitea. Zehaztasun optimoa lortzeko, ez dira erabili behar injekzio-denbora motzak —1-2 segundokoak, adibidez, laburregiak izan ohi dira—, eta barne-patroia erabiltzea gomendatzen da, erreproduzigarritasuna handitu nahi bada; bereziki, analisi kuantitatiboan. Injekzioan erabiltzen diren presio-diferentzia arruntenak 25-100 mbar eta 5 segundora artekoak izaten dira, baina denbora luzeagoak ere arruntak dira; are gehiago, prekontzentrazio-teknikak erabiltzen badira (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Injekzio elektrozinetikoaren kasuan, potentzial-diferentzia aplikatzen da, lagina kapilarrean sar dadin. Banaketa elektroforetikoan beharrezkoa den baino potentzial-diferentzia txikiagoa erabili ohi da —3-5 aldiz txikiagoa—, eta 10-30 segundoz aplikatzen da. Laginean dauden konposatuak fluxu elektrosmotikoari eta mugikortasun elektroforetikoari esker sartzten dira kapilarrean. Injekzio elektrozinetikoaren abantaila azpimarragarria da; esate baterako, disoluzio oso biskosoen kasua. Banaketa-disoluzioak gel biskosoak direnean, injekzio hidrodinamikoa aplikatzeak kaltea egin diezaioke kapilarrari, eta, ondorioz, injekzio elektrozinetikoa aukera hobea izaten da.

2.3. Detektagailuak

Elektromigrazio-tekniketan erabiltzen diren kapilarren dimentsio txikiak direla eta, erronka handia izan da analitoak detektatzeko gai diren sistema egokiak garatzea. Detektagailuek ahalik eta detekzio-muga baxuenak izan behar dituzte, hau da, *sentikortasun* (*sensitivity*) egokia izan behar dute. Detekta daitekeen analito kopuru minimoarekin erlazionatzen da sentikortasuna, eta seinale/zarata (S/N) erlazioaren bidez kalkulatzen da. Detektagailuaren *selektibitateak* (*selectivity*) ere egokia izan behar du, eta analito mota detektagarriekin erlazionatzen da. Detektagailu bat zenbat eta espezifikagoa izan, orduan eta mugatuagoa izango da haren erabilera, baina selektibitatea hobea izango da, eta interferentzia gutxiago egongo dira. Azkenik, detektagailuaren tarte dinamikoa (*dynamic range*) zein den jakitea ere garrantzitsua da. Tarte dinamikoak adierazten digu analitoarein zer kontzentraziotarako erabil daitekeen detektagailua era kuantitatiboan. Detektagailuaren erantzuna lineala bada, *linealtasuna* deritzo ezaugarri horri, eta, linealtasuna galtzen den kontzentrazioetik gora, detektagailuaren eraginkortasuna eskasagoa da (Poole, 2003).

Hiru ezaugarri nagusi horietaz gainera, beste zenbait ere aipatzen dira bibliografian (Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005); adibidez, detektagailuaren erantzunak azkarra izan behar duela analito-kontzentrazioaren aldaketarekiko; ez duela kaltetu behar banaketa elektroforetikoen bereizmena; seinale fidagarriak eman behar dituela, eta abar. Detekzio-sistemak hiru talde nagusitan sailkatu ohi dira: sistema optikoak, sistema elektrokimikoak eta sistema espektrometrikokoak (Poole, 2003; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). 2.1. taulan jaso da detektagailu mota bakoitzarekin lor daitekeen detekzio-muga.

2.1. taula. Elektroforesi-tekniketan erabiltzen diren detekzio-sistemak eta haiei dagozkien detekzio-mugak (Swinney eta Bornhop, 2000; Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005).

| Detekzio-sistema | Detekzio-muga (mol L ⁻¹) |
|---|---------------------------------------|
| UV-Vis espektrofotometria | |
| Zuzena | 10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁷ |
| Ez-zuzena | 10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁶ |
| Laserez induzitutako fluoreszentzia (LIF) | |
| Zuzena | 10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻¹³ |
| Ez-zuzena | 10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁷ |
| Eroankortasuna | 10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁸ |
| Potentziometria | 10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁸ |
| Amperometria | 10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹ |
| Masa-espektrometria | 10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁹ |

Detekzio-sistema optikoak dira ekipo komertzialetan ohikoenak, eta, haien artean, ultramore-ikusgai (UV-Vis) detektagailua da ezagunena. Ultramore-detektagailua unibertsala da, eta konposatu organiko askoren kuantifikazioa egiteko erabiltzen da, konposatu organiko gehienek ultramorearen xurgatzen baitute 195-210 nm-ko uhin-luzeran. Silize urtuzko kapilarren kasuan, nahikoa da poliimidazko estaldura kentzea detektagailua erabili ahal izateko; izan ere, silizeak ez du argirik xurgatzen ultramore-eremuan. Kapilarrari aldaketak egiten zaizkio detekzio-zeldan, sentikortasuna hobetzeko asmoz. Ultramore-detektagailu mota asko badiren arren, lerrokatutako diodoen detektagailua (DAD) izaten dute egun merkatuan dauden ekipo gehienek. DADaren bidez, aldi berean erregistratzen da xurgapen-espektro guztia, eta horrek analitoen identifikazioa eta kuantifikazioa errazten du. Beste detekzio-sistemei buruzko xehetasunak bibliografian aurkitu ditzake irakurleak (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

2.4. Banaketen kalitatea

Elektromigrazioan oinarritzen diren banaketak konposatuen mugikortasun desberdinei esker lortzen dira. Potentzial elektrikoa aplikatu ondoren, eremu elektrikoa agertzen da kapilarrean, eta injektatutako laginean dagoen konposatunahastea banatu egingo da. Analito bakoitzari bere mugikortasunaren arabera den zona —edo banda— bat dagokio kapilarrean. Bi konposatu banatuko diren ala ez jakiteko, bakoitzari dagokion zonaren zabalera eta migrazio-denbora ebaluatu behar dira. Zona bakoitzaren zabalera hainbat prozesuren ondorioa da; *band broadening mechanisms* deritze prozesu horiei; alegia, banden hedapen edo sakabanatze-mekanismoak. Banden sakabanatzearen iturriak asko dira: 1) Joule efektuz sortutako tenperatura-gradienteak, 2) luzetarako difusioa, 3) laginaren injekzioa, 4) konposatuen eta kapilarraren gainazalaren arteko interakzioa, 5) elektrodispertsioa, 6) detekzioa, eta abar (Kanoatov *et al.*, 2012; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Oro har, bandaren hedapenari dagokion bariantza totala, σ_T^2 , efektu horien guztien bariantzen batura gisa adierazten da, eta konposatuaren zona elektroforetikoren zabalarekin lotuta dago.

$$\sigma_T^2 = \sigma_{Joule}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{int}^2 + \sigma_{elek}^2 + \sigma_{det}^2 + \dots \quad (2.1)$$

Batugai horiek aurreko zerrendan aipatu diren sei iturriei dagozkien bariantzak dira, zerrendan dauden ordenan idatzita. Azter ditzagun lehen bi efektuen xehetasunak. Joule efektuaren kasuan, potentzial-diferentzia handiak aplikatzen direnean ekoizten den beroak tenperatura-gradienteak sortzen ditu; fluidoan

biskositatea aldatzen du, eta, ondorioz, banden zabalera gertatzen da (Poole, 2003). Banaketa onak lortzeko, ahalik eta eremu elektriko handienak aplikatu behar dira, baina Joule efektuak muga jartzen dio erabil daitekeen eremu elektriko maximoari. Neurri handi batean, elektromigrazio-teknikak kapilar oso meheetan aplikatuz gero, era eraginkorrago batean xahutzen da beroa, eta horrek aurrerapauso izugarria ekarri zuen elektroforesiaren esparruan.

Luzetarako difusioari dagokionez, bere tontor elektroforetikoaren zabalerarekin lot daiteke konposatu baten hedapena. Baldintza idealetan —hau da, beste hedapen-prozesurik ez badago—, onar daiteke analitoen luzetarako difusioa dela zonak sakabanatzeko arrazoi bakarra. Izan ere, difusio erradiala ez da garrantzitsua, fluxu elektroosmotikoaren higidura-profil lauari esker, eta konbekzio-hedapena ere arbuiagarria da, kapilarraren propietateak direla eta. Luzetarako difusioa konposatu bakoitzaren propietateen menpekoea da; aipatu den difusio molekularren koefizientean barneratuta daude propietate horiek. Adibidez, molekula handiek difusio motelagoak izaten dituzte, eta, hortaz, luzetarako difusioari dagokion zona-hedapen txikiagoa izaten dute. Banaketa-disoluzioaren biskositateak ere badu eragina, eta baita tenperaturak ere. Dena den, ez da ahaztu behar difusioa analitoaren abiadurarekin erlazionatuta dagoela, eta, ondorioz, analito horrek duen abiadura-elektroforetikoak eta fluxu elektroosmotikoaren abiadurak ere funtsezko zeresana izango dute (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

2.4.1. Eraginkortasuna

Banaketa elektroforetikoaren eraginkortasuna, kromatografikoena bezala, plater teorikoaren kopuruaren (N) arabera adierazten da.

$$N = \left(\frac{L_D}{\sigma} \right)^2 \quad (2.2)$$

Plater teorikoaren altuera baliokidea (H , m) honela definitzen da:

$$H = \frac{L_D}{N} \quad (2.3)$$

Gas- edo likido-kromatografian ez bezala, elektroforesi kapilarrean, detektagailua ez dago zutabearen edo kapilarraren amaieran, lehenago baizik. Ondorioz, migrazio-denbora, analitoen abiadura, plater teorikoak, eta abar,

detektagailuraino dagoen distantziarekiko (L_D , m) kalkulatu dira, eta ez kapilarraren luzera totalarekiko (L_T , m). Bariantzaren kontribuzio bakarra luzetarako difusioa dela joz, ekuazio hau lortzen da:

$$N = \frac{\mu_T V L_D}{2 D L_T} = \frac{\mu_T E L_D}{2 D} \quad (2.4)$$

non μ_T mugikortasun totala den ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), D difusio molekularren koefizientea ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) eta V aplikatutako potentzial-elektroikoa (V). Bestalde, plater teorikoen kopurua elektroferograma batetik esperimentalki lortzeko, kromatografian ohikoak diren ekuazio hauek erabili behar dira:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_m}{W_b} \right)^2 \quad (2.5)$$

non $W_{1/2}$ tontorraren altueraren erdian neurtutako zabalera den —luzera, bolumen edo denbora unitatetan adierazita— eta t_m analitoaren migrazio-denbora. Adierazpenean W_b ere agertzen da; izan ere, puntu batean baino gehiagotan neur daiteke tontorraren zabalera, eta, oinarrian neurtutako zabalera dela adierazteko, W_b erabiltzen da (*baseline width*).

Oro har, esperimentalki neurtutako N balioa teorikoa baino txikiagoa izaten da, hau da, praktikan, eraginkortasun okerragoa lortzen da. Horren arrazoia zera da: lehenago aipatu ditugun bariantzaren beste kontribuzioak ez direla kontuan hartzen. Ekuazio orokorrak bibliografian aurkitu daitezke (Poole, 2003; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013), baina hurbilketa egokia da hemen aurkeztutako ekuazioa erabiltzea.

2.4.2. Selektibitatea

Selektibitatea (α) banaketa elektroforetikoen kalitatea adierazteko beste parametroetako bat da (Buszewski *et al.*, 2013). Sistema elektroforetikoen selektibitatea honela definitzen da:

$$\alpha = \frac{t_{m,2} - t_{EOF}}{t_{m,1} - t_{EOF}} \quad (2.6)$$

non $t_{m,i}$ analitoen edo fluxu elektroosmotikoaren migrazio-denbora den (min). Bestalde, selektibitatea mugikortasunaren funtzioan ere idatz daiteke:

$$\alpha = \frac{\Delta\mu_T}{\mu_{T,BBZ}} \quad (2.7)$$

non $\Delta\mu_T = \mu_{T,1} - \mu_{T,2}$ den, eta $\mu_{T,BBZ}$ bi analitoen mugikortasunen batezbestekoa den. Selektibitatea bi analitoen mugikortasun-diferentziarekin erlazionatua dago, eta bi konposatuak banatu ahal izango diren ala ez adierazten du.

2.4.3. Bereizmena

Elektromigrazio-tekniketan, bereizmenaren (R) definizioa kromatografian erabiltzen denaren parekoa da, eta bi analito zenbateraino banatu diren azaltzen du. IUPACren arabera, adierazpen honek definitzen du bereizmena (IUPAC, 1997):

$$R = \frac{t_{m,2} - t_{m,1}}{(W_{b,1} + W_{b,2})/2} = \frac{2(t_{m,2} - t_{m,1})}{W_{b,1} + W_{b,2}} \quad (2.8)$$

non t ondoz ondoko bi tontorren migrazio-denbora den (min), eta W_b tontor horietako bakoitzaren zabalera oinarrian (min). Bestalde, bereizmena honela ere adieraz daiteke (Grossman eta Colburn, 1992):

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu_T}{\mu_{T,BBZ}} \right) = \frac{1}{4} N^{1/2} \alpha \quad (2.9)$$

(2.9) ekuazioan parentesi artean dagoen atala selektibitatearen definizioa da. Hortaz, adierazpenak argi uzten du bereizmenak baduela selektibitatearekin lotutako atal bat (α) eta eraginkortasunarekin lotutako beste bat (N). Selektibitateari dagokion kontribuzioa estuki lotua dago elektroforesi-banaketaren parametroekin, eta eraginkortasunari dagokiona, berriz, ekipoaren ezaugarriekin.

Bibliografia

BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

FELHOFER, J. L.; BLANES, L.; GARCIA, C. D.: *Recent Developments in Instrumentation for Capillary Electrophoresis and Microchip-Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 31(15), 2469-2486, 2010.

FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Alberto; SEGURA CARRETERO, Antonio; CARRASCO PANCORBO, Alegría: *Fundamentos Teóricos y Técnicas de Separación*. In FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Alberto; SEGURA CARRETERO, Antonio: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005.

GROSSMAN, Paul J.; COLBURN, Joel C.: *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, 1992.

IUPAC: *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.*, Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

KANOATOV, Mirzo; RETIF, Coraline; CHERNEY, Leonid T.; KRYLOV, Sergey N.: *Peak-Shape Correction to Symmetry for Pressure-Driven Sample Injection in Capillary Electrophoresis*, *Analytical Chemistry*, 84(1), 149-154, 2012.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

MAYER, B. X.: *How to Increase Precision in Capillary Electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, 907(1-2), 21-37, 2001.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

SWINNEY, Kelly; BORNHOP, Darryl J.: *Detection in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 21(7), 1239-1250, 2000.

II. ZATIA

Elektromigrazio- teknika motak

— 3 —

Zonako elektroforesi kapilarra

3.1. Sarrera

Badira elektroforesi kapilar izenarekin ezagutzen diren hainbat elektromigrazio-teknika mota. Ikasmaterial honetan aztertuko diren teknika nagusien laburpena 3.1. taulan ikus daiteke.

Bibliografian, teknika horien sailkapenak aurkitu daitezke, baina irizpide honi jarraituko diogu (Jimidar, 2008):

(A) Fronte mugikorren elektroforesia (MBE)

(B) Egoera geldikorreko elektromigrazio-teknikak:

- Isotakoforesi kapilarra (CITP)
- Fokatze isoelektroko kapilarra (CIEF)

(C) Zonako elektromigrazio-teknikak:

- Elektroforesi kapilarra geletan (CGE)
- Disoluzio askean egindakoak: CZE, NACE, MEKC eta NAMEKC
- Elektrokromatografia kapilarra (CEC)

Ikuspegi orokor bat ematearren, fronte mugikorren elektroforesia, MBE, aztertua dugu dagoeneko. Tiseliusen garatu zuen MBE, 1930eko hamarkadan. Egun, zaharkitua dago teknika hori, eta ia ez da erabiltzen; hortaz, ez dugu gehiago sakonduko. Egoera geldikorreko elektromigrazio-tekniken kasuan, CITP eta CIEF dira ezagunenak. Ohiko elektroforesi-ekipoetan egin daitezke, eta, oro har, kapilarrean dagoen gradiente baten arabera banatzen dira injektatu diren konposatuak. CITPn, zona desberdinetara migratzen dute mugikortasun

desberdinak dituzten konposatuek, eta, ondoren, eraginkortasun handiarekin banatu daitezke. CIEFren kasuan, aldiz, pH gradientea erabiltzen da, eta puntu isoelektrikoaren arabera banatzen dira konposatuak. Azken hori oso teknika erabilgarria da konposatu ioniko zwitterionikoak banatzeko; besteak beste, proteinak, peptidoak eta aminoazidoak.

3.1. taula. Elektromigrazio-teknika moten laburpena (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013).

| Teknika | Konposatuak banatzeko arrazioa | Aplikazio garrantzitsuenak |
|---------------------|--|--|
| CZE ^a | Karga/tamaina erlazioa | Ioia eta konposatu ionizagarriak |
| NACE ^b | Karga/tamaina erlazioa | Ioia eta konposatu ionizagarriak (ingurune organikoan) |
| MEKC ^c | Mizelekin duten interakzioa | Konposatu neutroak eta kargatuak |
| NAMEKC ^d | Mizelekin duten interakzioa | Konposatu neutroak eta kargatuak (ingurune organikoan) |
| CEC ^e | Fase geldikorrarekin duten interakzioa | Konposatu neutroak eta kargatuak |
| CIEF ^f | Puntu isoelektrikoa | Proteinak eta konposatu zwitterionikoak |
| CITP ^g | <i>Sandwich</i> eran dauden ioien mugikortasun motak | Ioien prekontzentrazioarako |
| CGE ^h | Karga eta tamaina (baina ez karga/tamaina erlazioa) | Makromolekula biologikoak, DNA, proteinak |

^a*Capillary zone electrophoresis (Zonako elektroforesi kapilarra).*

^b*Nonaqueous capillary electrophoresis (Elektrokroforesi kapilar ez-akuosoa).*

^c*Micellar electrokinetic chromatography (Kromatografia elektrozinetiko mizelarra).*

^d*Nonaqueous micellar electrokinetic chromatography (Kromatografia elektrozinetiko mizelar ez-akuosoa).*

^e*Capillary electrochromatography (Elektrokromatografia kapilarra).*

^f*Capillary isoelectric focusing (Fokatze isoelektriko kapilarra).*

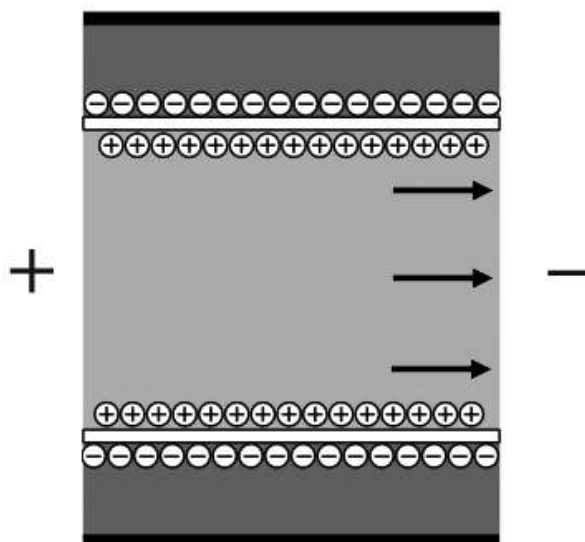
^g*Capillary isotachopheresis (Isotakoforesi kapilarra).*

^h*Capillary gel electrophoresis (Elektroforesi kapilarra geletan).*

Dena den, zonako elektromigrazioan oinarritzen diren teknikak dira ezagunenak eta analisisian gehien erabiltzen direnak. Hiru azpitalde garrantzitsu bereizten dira: geletan egindakoak, disoluzio askean egindakoak eta kromatografian oinarritzen direnak.

Geletan egindako elektroforesi kapilarrari dagokionez (CGE), kapilarra poliakrilamida edo agarosa gelarekin betetzen da, polimero-sarea osa dadin. Sare horri esker, tamainaren arabera banatu daitezke injektatutako konposatuak, bahe batean gertatzen den antzera. Nagusiki, biomolekulak banatzeko erabiltzen da CGE; esate baterako, proteinak, polinukleotidoak eta DNA zatiak.

Disoluzio askean egindako elektroforesia da, zalantzarik gabe, teknika motarik arruntena. Oro har, elektrolito-disoluzio batekin betetzen da kapilarra, BGE delakoa (*background electrolyte*). Disoluzio hori akuosoa edo ez-akuosoa izan daiteke, mizelak izan ditzake, eta baita beste hainbat gehigarri ere. Elektrolito-disoluzioaren konposaketaren arabera, hainbat modutara egin daiteke elektroforesia disoluzio askean. Teknikarik arruntenak CZE eta MEKC dira, eta, neurri txikiagoan, ohikoak dira haien aldaera ez-akuosoa ere; alegia, NACE eta NAMEKC. Kapitulu honetan eta hurrengo bietan, elektromigrazio-teknika horiek aztertuko dira, zehaztasun guztiekin.



3.1. irudia. Fluxu elektroosmotikoaren noranzkoa, polaritate normala aplikatzen denean. Anodoa positiboki kargatutako elektrodoa da, eta katodoa, berriz, negatiboki kargatutakoa. Irudia: jabego publikoan.

Azkenik, zonako elektromigrazio-teknikekin batera sailkatzen da elektrokromatografia kapilarra (CEC). MEKC teknikaren kasuan gertatzen den moduan, CEC teknikak ere kromatografia eta elektromigrazioa elkartzen ditu. MEKCren kasuan, BGEan migratzen ari diren mizelak erabiltzen dira interakzio kromatografikoa lortzeko. Horregatik esan ohi da ez dela benetako kromatografia bat, baina, CECen kapilarrean paketatuta dauden partikula solidoei —edo

erdisolidoei— esker, benetako banaketa kromatografiko bat lortzen da. 6. kapituluaz aztertuko ditugu CECen oinarriak, sakonago.

3.2. Zonako elektroforesi kapilarra

Elektromigrazio-teknika sinpleenaren kasuan, hau da, zonako elektroforesi kapilarrean (CZE), elektroforesi fenomenoak eta fluxu elektroosmotikoak bakarrik dute eragina konposatuen banaketan. CZEN, kapilarra elektrolito-disoluzioarekin betetzen da, eta sarrerako elektrodoan injektatzen da lagina (*inlet*). Ondoren, potentzial-diferentzia jakin bat aplikatzen da sarrerako eta irteerako elektrodoen artean, konposatuak mugikortasun elektroforetikoen arabera banatu daitezke.

Ikuspuntu praktikotik, EOFaren abiadura nahiko azkarra bada, aldi berean banatu eta detekta daitezke katioiak eta anioiak. Gogoratu molekula guztietan duela eragina fluxu elektroosmotikoak eta, polaritate normala aplikatzen bada, fluxua anodotik katodora mugituko dela, hau da, elektrodo positibotik negatibora (3.1. irudia).



3.2. irudia. Fluxu elektroosmotikoak kapilarrean dauden partikula guztiak eramaten ditu aurrera, eskailera mekaniko bat balitz bezala. Vetter eta McGowan ikertzaileek proposatu zuten fluxu elektroosmotikoa eskailera mekanikoaren analogiarekin azaltzea (Vetter eta McGowan, 2001). Irudia: jabego publikoan.

Lagina anodoan injektatu, eta katodorantz desplazatzen da. Ondoren, seinalea ematen du katodoaren aurretik kokatuta dagoen detektagailuan. Partikula kargatuek elektroforesia eta partikula guztiek elektroosmosia jasango dutenez (3.2. irudia), bi fenomeno horien batura izango da azkenean izango duten abiaduraren erantzulea. Bi efektuak kontuan hartzen dituen mugikortasunari mugikortasun totala edo itxurazko mugikortasuna deritzo (*apparent mobility*).

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \mu_e \quad (3.1)$$

Era berean, abiadura totalak edo itxurazko abiadurak konposatuaren abiadura erreala adierazten du.

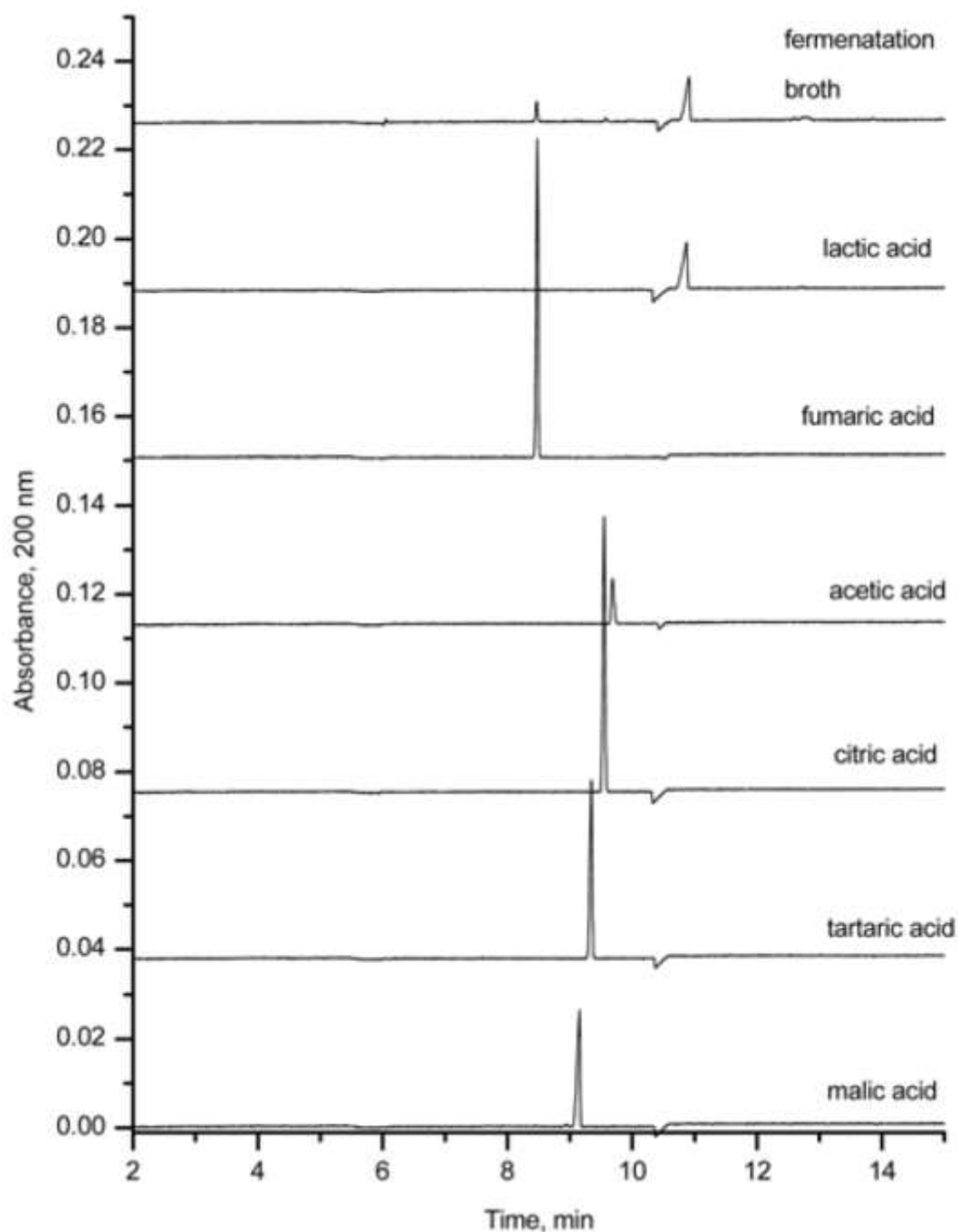
$$v_T = v_{EOF} + v_e \quad (3.2)$$

Katioien mugikortasun elektroforetikoa positiboa denez, mugikortasun totala positiboa da, eta fluxuari dagokiona baino azkarragoa. Izan ere, EOFaren abiadura eta abiadura elektroforetikoa *batu* egiten direnez, katioiak dira lehenak detektagailura iristen.

Anioien kasuan, aldiz, mugikortasun elektroforetikoa negatiboa da, eta, hortaz, EOFa baino mantsoagoak dira. Izan ere, abiadura elektroforetikoa *kendu* egin behar zaio fluxuaren abiadurari. Horretaz gainera, anioiaren mugikortasuna fluxuarena baino handiagoa bada, lehena gailenduko da; abiadura totala negatiboa izango da, eta ioi hori ez da inoiz detektagailura iritsiko. Horregatik, EOFaren abiadura *nahiko azkarra* bada bakarrik detekta daitezke aldi berean katioiak eta anioiak. 3.3. irudian, hainbat azido organikoren banaketa elektroforetikoa ikus daitezke, CZE bidez.

Azkenik, ohartu zaitez konposatu neutroen kasuan mugikortasun elektroforetikoa nulua denez abiadura totala fluxuaren abiadura dela. Ondorioz, konposatu neutroak ezin dira banatu CZE bidez. Anioien eta katioien kasuan, aldiz, bere ezaugarrien araberako mugikortasun elektroforetikoa du bakoitzak, eta, ondorioz, abiadura totala desberdina da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

CZEn eta, oro har, elektromigrazio-teknika guztietan garrantzitsua den beste parametro bat migrazio-denbora da. Migrazio-denbora (t_m , s) solutu batek detektagailura iristeko behar duen denbora da, eta solutuaren abiadura totalarekin (v_t , m s⁻¹) eta detektagailurainoko distantziarekin (L_D , m) lotzen da (Poole, 2003; Buszewski *et al.*, 2013).



3.3. irudia. Sorgoaren (*Sorghum sp.*) hartiduran azido laktikoaren ekoizpena kontrolatzeko metodoan lortutako zenbait elektroferograma, CZE teknikaren bidez lortuak. Irudian, banan-banan injektatu diren hainbat azido organikoren patroiak ikus daitezke. Metodo elektroforetikoa bera erabiliz, hartidura gertatzen ari den likidoaren lagin bat analizatu dute (lehen elektroferograma), eta, patroien tontorrekin konparatuz, hartidura-prozesuan azido laktikoa eta fumarikoa (bigarren eta hirugarren elektroferogramak, hurrenez hurren) ekoizten direla ondorioztatu dute. Erabilitako baldintza elektroforetikoak: 0,5 M den fosfato-disoluzio erregulatzailerak, (pH 6,25) eta 0,5 mM den sodio zetiltrimetilamonio bromuro surfaktante mizelarra. Irudia: jabego publikoan (Schober *et al.*, 2009).

Abiaduraren definiziotik,

$$v_T = \frac{L_D}{t_m} \quad (3.3)$$

ekuazioa idatz daiteke. Abiaduraren ordezt mugikortasuna idatziz, adierazpen honetara iristen gara:

$$\mu_T E = \frac{L_D}{t_m} \quad (3.4)$$

non E ($V\ m^{-1}$) eremu elektrikoa den. Ondoren, eremu elektrikoaren ordezt, haren definizioa ordezkaturko dugu, (3.5) ekuazioan azaltzen den moduan,

$$E = \frac{V}{L_T} \quad (3.5)$$

non V potentzial-diferentzia (volt) den, eta L_T kapilarraren luzera totala (m). Ondoren, (3.4) eta (3.5) adierazpenak elkartuz, ekuazio hau lortzen da:

$$\mu_T E = \frac{L_D}{t_m} \rightarrow \mu_T \frac{V}{L_T} = \frac{L_D}{t_m} \rightarrow \mu_T = \frac{L_D L_T}{t_m V} \quad (3.6)$$

Azken ekuazio hori oso garrantzitsua da; izan ere, parametro esperimentalen funtzioan jartzen du mugikortasuna. Baina azken pauso bat eman behar da mugikortasun elektroforetikoa lortzeko, azken hori determinatu nahi izaten baitugu normalean. Konposatu baten mugikortasun elektroforetikoa lortzeko, EOFari dagokion kontribuzioa kendu behar zaio mugikortasunari. Horretarako, konposatu neutroek eskaintzen duten informazioa erabiltzen da, eta, konposatu neutrorik ez badago, gehitu egiten da —markatzaile deritzona—, EOFaren abiadura kalkulatzeko. Izan ere, konposatu neutro bati aplikatzen badiogu (3.6) adierazpena, mugikortasun elektroosmotikoa kalkulatzeko ari gara, hau da,

$$\mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} \quad (3.7)$$

non t_{EOF} fluxu elektroosmotikoari dagokion migrazio-denbora den. Guztia adierazpen bakarrean elkartzen bada:

$$\mu_e = \mu_T - \mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_m V} - \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} = \frac{L_D L_T}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (3.8)$$

Azter dezagun adierazpen hori adibide simple batekin, formula horren erabilera praktikan jartzeko (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Demagun anioi bat, katioi bat eta konposatu neutro bat banatu nahi direla CZE teknikaren bidez. Horretarako, BGE egoki bat aukeratu, eta 60 cm-ko kapilarra eta 30 kV-eko potentzial-diferentzia aplikatu da. Jakina da kapilarraren mutur katodikotik 8,5 cm-ra dagoela detektagailua, hau da, $L_D = 51,5$ cm dela.

Elektroferograman, hiru tontor hauek erregistratu direla joko dugu: 10 s, 25 s eta 45 s-an, hain zuzen ere. Konposatu bakoitzaren mugikortasun elektroforetikoa lortzeko, (3.8) ekuazioa aplikatuko dugu. Lehenik eta behin, elektroforesiaren teoriari jarraituz, katioia izango da azkarrena, eta, hortaz, haren migrazio-denbora 10 s da. Neutroa da hurrengoa, 25 s dituela, eta, azkena, anioia, 45 s-ko migrazio-denbora duela. Beraz, konposatu neutroaren migrazio-dembora erabiliz, EOFaren mugikortasuna lor daiteke:

$$\mu_{EOF} = \frac{L_D L_T}{t_{EOF} V} = \frac{51,5 \cdot 60}{25 \cdot 30.000} = 4,12 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Konposatu neutroaren mugikortasun elektroforetikoa nulua dela gauza jakina da, alegia:

$$\mu_{e,neutroa} = 0 \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Ondoren, katioiaren eta anioiaren mugikortasun elektroforetikoak kalkula daitezke:

$$\mu_{e,katioia} = \frac{L_D L_T}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) = \frac{51,5 \cdot 60}{30.000} \left(\frac{1}{10} - \frac{1}{25} \right) = 6,18 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

$$\mu_{e,anioia} = \frac{L_D L_T}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) = \frac{51,5 \cdot 60}{30.000} \left(\frac{1}{45} - \frac{1}{25} \right) = -1,83 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Gogoan izan anioien mugikortasun elektroforetikoa negatiboa dela, eta neutroena, nulua. Beste alde batetik, konposatu neutro baten mugikortasun totala eta mugikortasun elektrosmotikoa kointzidenteak dira. Oro har, gogoratu ordena honetan iritsiko direla konposatuak detektagailura, azkarrenetik mantsoenera: 1)

katioi txiki eta oso kargatuak, 2) tamaina handiagoko eta karga txikiagoko katioiak, 3) banatu gabe geldituko diren konposatu neutroak, 4) tamaina handiko eta karga txikiko anioiak, eta 5) anioi txiki eta oso kargatuak.

Konposatu markatzaileen inguruan, beste ohar bat aipatu behar da. Zenbait kasutan, mugikortasun elektroforetiko jakin bat duen konposatu bat erabil daiteke markatzaile neutroaren orde. Analisi kualitatiboa egiten denean erabiltzen den barne-patroia izan daiteke markatzaile hori, adibidez. Halakoetan, EOFaren migrazio-denboraren orde referentziako konposatuaren migrazio-denbora erabil daiteke (3.8) ekuazioan; mugikortasun erlatibo deritzo era horretan lorturiko mugikortasunari.

3.3. Banaketan eragina duten faktoreak

CZE banaketa egokiak lortzeko, beharrezkoa da solutuen mugikortasun elektroforetikoa eta fluxu elektroosmotikoa kontrolatzea. Horretarako, garrantzitsua da kontuan hartzea banden hedapenean eragina duten faktoreak — 2. kapituluaz aztertuta, laburki—, mugikortasun elektroforetikoa eragina duten faktoreak eta EOFa kontrolatzeko mekanismoak. Guztiei buruzko azalpen sakonagoak bibliografian aurkitu daitezke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013), eta, hortaz, atal garrantzitsuenen laburpena bakarrik egingo da segidan.

3.3.1. Mugikortasun elektroforetikoa kontrola

Konposatu baten mugikortasun elektroforetikoa aurrez ikusitako (1.11) adierazpenaren bidez definitzen da; hortaz, adierazpen horretan dauden aldagaiek eragin handia izango dute. Partikularen tamainari dagokionez, frogatu daiteke proportzionaltasuna badagoela partikula esferikoen marruskadura-koefizientearen eta masa molekularren artean. Jakina, egoera idealizatua da molekulak esfera solido zurruntzat hartzea, baina, hasierako hurbilketa moduan, egokitzen har daiteke.

Bestalde, (1.11) adierazpena partikula esferiko zurrunetan bakarrik betetzen da. Gainera, bermatu behar da BGE diluituan dagoela partikula; alegia, partikularen ingurunearen indar ionikoa nulua dela. Praktikan, ioiak eta molekulak kontzentrazio finituko elektrolito-disoluzioan daude, eta ingurunean aurkako karga duten ioiek partikulak inguratzen dituzte. Ondorioz, inguruneak eragin nabarmena du mugikortasun elektroforetikoa. Aurkako kargako ioiek

laino lauso moduko bat eratzen dute, eta, horren ondorioz, beste bi indar agertzen dira migratzen ari den partikularen gain (Landers, 2007; Poole, 2003): atzerapen-indarra eta erlaxazio-indarra. Bi indar horiek partikulen mugikortasun elektroforetiko teorikoak aldatzen dituzte (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Ingurunearen indar ionikoak funtsezko zeresana du partikulen mugikortasun elektroforetikoan. Mugikortasun elektroforetikoaren eta ingurunearen indar ionikoaren arteko erlazioaren deskribapena Friedlek eta haren lankideek lortu zuten (Friedl *et al.*, 1995). Eredu teoriko orokorrakoak ere aurkitu daitezke bibliografian (Ibrahim *et al.*, 2012), hala nola Debye-Hückel-Onsager eredua, baina ekuazioak konplexuagoak dira, eta hainbat aldagai hartzen dituzte kontuan. Analisi teoriko horiek erabiliz, uler daiteke zer eragin duen indar ionikoak mugikortasun elektroforetikoan, eta, ondorioz, bide errazagoa eta arrazionalagoa eskaintzen du elektromigrazioan oinarritutako banaketak optimizatzeko. Dena den, indar ionikoaren eragina oso konplexua denez, kasu gehienetan, ezinezkoa da azalpen teoriko sinpleetara mugatzea, eta esperimentera aztertu behar izaten da (Lopez-Gazpio eta Millán 2013).

Amaitzeko, beste efektu garrantzitsu bat ere aztertzeke dago oraindik: pH-aren ondorioz azidoek eta baseek duten disoziazioa. Jakina denez, azido eta base gehienek disoziazio-erreakzioak izaten dituzte. Esaterako, HA azidoa uretan disolbatzean, zati bat A^- moduan dago. Argi dago HA eta A^- espezieen mugikortasun elektroforetikoa desberdina dela, karga desberdina baitute. Haren mugikortasun elektroforetikoa nulua da, ez baitu kargarik. Ondorioz, funtsezkoa da jakitea oreka ezkerrera edo eskuinera desplazatuta dagoen ala ez, mugikortasun elektroforetikoaren balioa ezagutzeko. Oro har, oreka-erreakzioak direla-eta konposatu batek zenbait espezie eman ditzakeen arren, tontor elektroforetiko bakarra ikusiko dugu detektagailuan. Horren arrazoa honako hau da: oreka-prozesuak azkarragoak izaten dira banaketa gertatzeko behar den denborarekin konparatuta, eta konposatu bakarra balitz bezala migratzen du (Allison *et al.*, 2010). Analisi sakonagoa eta ekuazioen garapena bibliografian aurkitu dezake interesa duen irakurleak (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

3.3.2. EOFaren kontrola

Esan den bezala, EOFaren abiadura kontrolatzea da CZE banaketa arrakastatsua lortzeko bigarren atal garrantzitsua da; izan ere, kontrolik gabeko fluxu elektroosmotikoak nabarmen eragiten du banatu nahi diren konposatuen mugikortasunean. Argi dago, elektroosmosi-abiadura kontrolatzeko, (1.3) adierazpenean azaltzen diren parametroak kontrolatu edo alda daitezkeela; alegia,

geruza elektriko bikoitzaren zabalera —edo kapilarraren gainazalaren karga-dentsitatea— eta kapilar barneko fluidoaren biskositatea edo konstante dielektrikoa.

Zeta potentzialari dagokionez, funtsezko zeregina du EOFaren abiaduran, eta ingurunearen pH-ak ere badu eragina silanol taldeen ionizazioan. pH-ak eta banaketa-disoluzioaren indar ionikoak eragin zuzena izaten dute zeta potentzian eta, ondorioz, fluxu elektroosmotikoan. pH-a egoki finkatzearen garrantzia dela eta, disoluzio erregulatzaileak —pH-a finko mantentzeko gaitasuna dutenak— erabil daitezke pH-a kontrolatzeko (3.2. taula). Oro har, pH-a 2-3 baino txikiagoa bada, ia nulua izaten da EOFaren abiadura. Aldiz, pH-a 8-10 baino handiagoa bada, abiadura maximoak lortzen dira.

3.2. taula. Elektroforesi-tekniketan erabiltzen diren disoluzio erregulatzaileak (Jiménez *et al.*, 2005)

| Disoluzio erregulatzailea | pH tartea |
|---|-----------|
| $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ | 1,5-3,0 |
| Azido azetiko/azido formikoa | 1,9-2,2 |
| Azido zitrikoa/zitratoa | 2,0-6,0 |
| Ftalatoa/HCl | 2,2-3,8 |
| Glizina/HCl | 2,3-3,6 |
| Trimetilamina/azido formikoa | 3,0-6,0 |
| $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ | 4,0 |
| Azido zitrikoa/fosfato disodikoa | 5,0-7,0 |
| $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ | 6,9-8,0 |
| TRIS | 7,0-9,0 |
| Boratoa/HCl | 8,0-9,1 |
| $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ | 8,0-10,0 |
| CHES | 8,5-10,5 |
| Azido borikoa/boraxa | 8,7-9,2 |
| Boraxa/NaOH | 9,2-11 |
| Karbonatoa/bikarbonatoa | 10-10,7 |

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometanoa; CHES: azido 3-(ziklohexilamino)etanosulfonikoa.

Badira geruza elektriko bikoitzaren zabalera kontrolatzeko beste bi era. Alde batetik, banaketa-disoluzio elektrolitikoaren ioi-kontzentrazioa —edo indar ionikoa— handitzen bada, geruza bikoitza finagoa izango da. Beste alde batetik, fluidoaren permitibitatea txikituz, geruza bikoitz estuagoak lor daitezke. Horretarako, normalean, disolbatzaile organikoak gehitzen zaizkio banaketa-disoluzioari. Disolbatzaile organiko ugari aztertu izan dira, hala nola metanola, propanola, azetonitriloa, tetrahidrofuranoa, dimetilsulfoxidoa, dimetilformamida,

eta abar. Konposatu organikoen proportzioa handia bada edo banaketa-disoluzioa guztiz organikoa bada, elektroforesi kapilar mota horrek izen berezia hartzen du: elektroforesi kapilar ez-akuosoa (NACE).

Gainazaleko karga-dentsitatearen kontrolari dagokionez, kapilarraren gainazaleko karga-dentsitatea aldatzea da EOFa kontrolatzeko sistemarik erabiliena. Silanol-taldeei esker sortzen den gainazal kargadunaren propietateak aldatzeko, gainazala dinamikoki eralda daiteke elektrolito-disoluzioan dauden gehigarrien bidez, gainazala estal daiteke polimero-geruza bati esker, edo aldaketa kimikoak sor daitezke, besteak beste. Silanol-taldeak estaliz, fluxu elektroosmotikoa murriztea, eliminatzea edo haren noranzkoa aldatzea lor daiteke. Beste kasu batzuetan, aztertu nahi diren konposatuen eta kapilarraren gainazalaren arteko interakzioa minimizatzeko blokeatzen da gainazaleko karga. Beste zenbaitetan, ordea, fluxu elektroosmotikoa areagotuko duten teknikak behar izaten dira. Estaldura dinamikoei eta kimikoki lotutako estaldurei buruzko xehetasun gehiago bibliografian aurkitu daitezke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Azkenik, EOFaren kontrolerako, beste zenbait prozedura ere erabil daitezke; haien artean, oso arrunta da biskositatearen bidezko kontrola. Elektrolito-disoluzioari disolbatzaile organikoak gehituz lor daiteke hori ere; izan ere, aurrez aipatu den permitibitatearen aldaketaz gainera, disolbatzaile organikoek nabarmenki aldatzen dute disoluzioaren biskositatea. Dena den, zaila da aurrez esatea zer aldaketa sortuko den disolbatzaile organiko bat gehitzean, eta, normalean, esperimentalki aztertu behar izaten da.

Ekipoaren tenperatura kontrolatzea ere garrantzitsua da; izan ere, eragina izaten du fluidoaren biskositatean —biskositatea % 2-3 alda daiteke °C bakoitzeko—. Kapilarra bera ere material batez baino gehiagoz egina izan daiteke —tefloia, pyrex beira, silize urtua, besteak beste—, eta horrek fluxu elektroosmotikoa alda dezake, desberdina izaten baita kapilarraren gainazaleko karga-dentsitatea.

Bibliografia

ALLISON, Stuart A.; PEI, Hongxia; BAEK, Saerom; BROWN, Jocelyn; LEE, Min Y.; NGUYEN, Vu; TWAHIR, Umar T.; WU, Hengfu: *The Dependence of the Electrophoretic Mobility of Small Ions on Ionic Strength and Complex Formation*, *Electrophoresis*, 31(5), 920-932, 2010.

BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

FRIEDL, Werner; REIJENGA, Jetse C.; KENNDLER, Ernst: *Ionic Strength and Charge Number Correction for Mobilities of Multivalent Organic Anions in Capillary Electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, 709, 163-170, 1995.

IBRAHIM, Amal; ALLISON, Stuart A.; COTTET, Hervé: *Extracting Information from the Ionic Strength Dependence of Electrophoretic Mobility by Use of the Slope Plot*, Analytical Chemistry, 84(21), 9422-9430, 2012.

JIMÉNEZ, Lourdes Arce; CARRETERO, Antonio Segura; RAMÍREZ, Sonia Cortacero: *Aspectos Prácticos para el Desarrollo de Metodologías Analíticas mediante Electroforesis Capilar*. In GUTIÉRREZ, Alberto Fernández; CARRETERO, Antonio Segura (Ed.): *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005.

JIMIDAR, M. Ilias: *Theoretical Considerations in Performance of Various Modes of CE*. In AHUJA, Satinder; JIMIDAR, M. Ilias: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2008.

LANDERS, James P.: *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2007.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

SCHOBBER, T. J.; BEAN, S. R.; WANG, D.: *Capillary Electrophoresis as a Tool for Evaluating Lactic Acid Production from Sorghum*, Cereal Chemistry, 86(2), 117-221, 2009.

VETTER, Andrew J.; MCGOWAN, Garrett J.: *The Scalator – An Analogy for Explaining Electroosmotic Flow*, Journal of Chemical Education, 78(2), 209-211, 2001.

— 4 —

Kromatografia elektrozinetiko mizelarra

4.1. Oinarri teorikoa

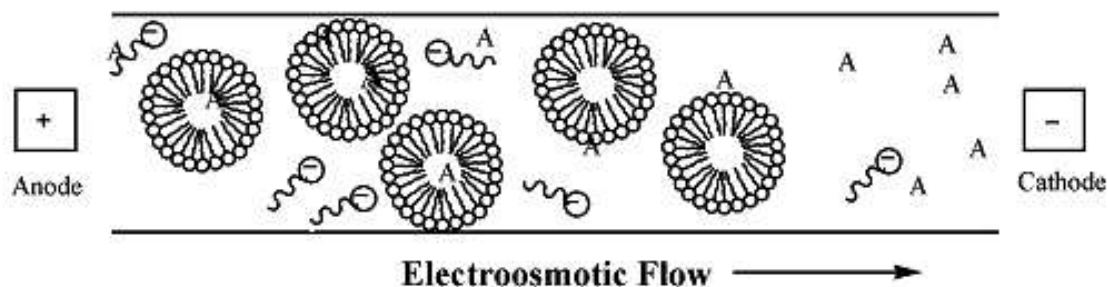
Aurreko kapituluaz azaldu den bezala, konposatu neutroak ezin dira banatu CZE bidez, abiadura total bera baitute molekula neutro guztiek. Kromatografia elektrozinetiko mizelarra (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*) deritzon teknikak, berriz, ioiak eta molekula neutroak banatzeko aukera ematen du. Horregatik, MEKC teknikak era nabarmenean zabaltzen ditu elektroforesi kapilarraren aplikazioak. MEKC eta CZE aldaeren arteko desberdintasun nagusia zera da: MEKCn, mizelak osatzeko gai den surfaktante tentsoaktibo bat du BGE disoluzioak —surfaktanterik arruntena sodio dodezilsulfatoa (SDS) da—. Surfaktantea kontzentrazio nahiko handian gehitu behar izaten da, kontzentrazio mizelar kritiko (CMC, *critic micelle concentration*) delakoa baino kontzentrazio handiagoan, disoluzioan mizelak osa daitezten. Analito neutroek mizelekin dituzten interakzioak bereizgarriak direnez konposatu bakoitzarentzat, beste kontribuzio bat gehitu behar da mugikortasun totalean. Horren ondorioz, analito neutroek beste abiadura total bat izaten dute, eta haien banaketa lor daiteke.

Banaketa-disoluzioan dauden mizelek bigarren fasea osatzen dute, fase sasigeldikorra deritzona; izan ere, ikuspuntu kromatografikotik esan daiteke *mugitzen ari den fase geldikorra* dela. Hala ere, IUPACk dioenez, MEKC ez da guztiz bateragarria kromatografiaren definizioarekin (Riekkola *et al.*, 2004); hitzaren adiera hertsian, behintzat. Ondorioz, esan daiteke elektroforesiaren eta likido kromatografiaren arteko metodo hibrido bat dela MEKC teknika.

Banaketaren funtsari dagokionez, ohikoena surfaktante moduan sodio dodezilsulfatoa (SDS) erabiltzea da. SDS molekulek, 8-9 mM baino kontzentrazio handiagoan badaude, mizelak eratzen dituzte ur-disoluzioan daudenean. Mizela horiek anionikoak dira, eta, ondorioz, mugikortasun elektroforetikoa negatiboa izaten dute —*outletetik inleterako* noranzkoan migratzen dute—. Baina, EOFaren

mugikortasuna nahiko handia bada, mizelen abiadura totala *inletetik outleterako* izango da. Mizelen mugikortasuna (μ_{mc} , $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), hortaz, nahiko motela izango da, baina detektagailurantz mugituko dira EOFarekin batera, sarrerako elektrodetik irteerakora migratuz.

Laginarekin batera kapilarrera injektatu diren molekulek interakzioa izan dezakete mizelekin, hainbat eratarata, baina, nagusiki, interakzio hidrofoboak eta elektrostatikoak —analitoek karga dutenean— dira. Oro har, sendoenetik ahulenera sailkatuta, hiru eratarata gerta daitezke interakzioak: 1) analitoa mizelaren barruan sar daiteke, 2) kosurfaktante moduan SDS molekulekin batera gera daiteke, edo 3) mizelatik kanpo interakzioa izan dezake geruzarekin (4.1. irudia). Mizelen abiadura mantsoa denez, analitoek zenbat eta interakzio sendoagoa izan mizelekin, orduan eta abiadura mantsoagoa izango dute, eta, ondorioz, migrazio-denbora handiagoa (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).



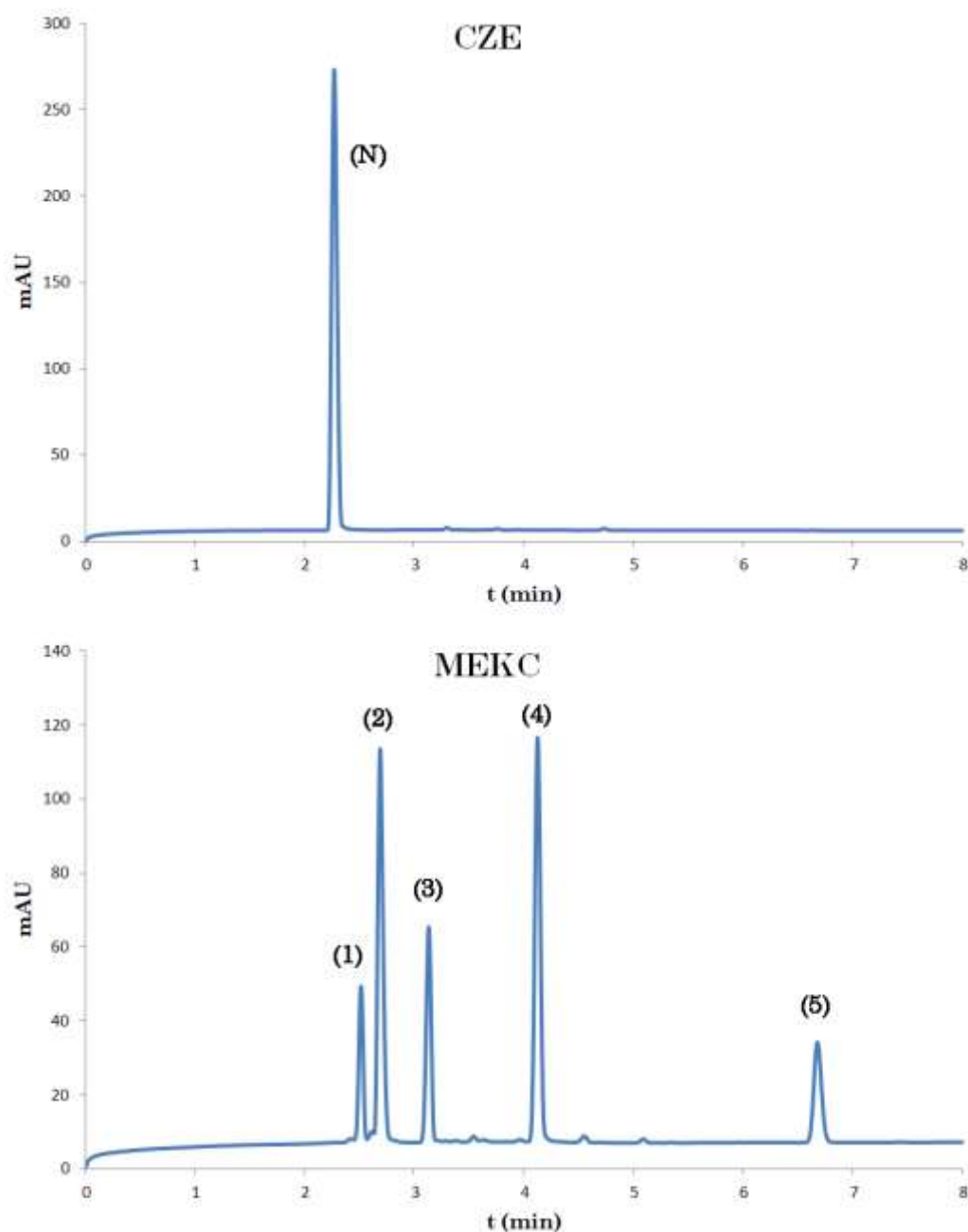
4.1. irudia. MEKCreko irudikapena. Analitoen (A) eta mizelen arteko interakzio motak ikus daitezke. Irudia: jabego publikoan.

Interakzio oso sendoa duten konposatuak mizelekin batera mugituko dira nagusiki, eta haien abiadura total bera izango dute. Horrelako konposatuak abiadura mizelarra lortzeko erabiltzen dira —Sudan III, adibidez—; izan ere, mizelen migrazio-denbora ($t_{mc} = t_m$), bera dute. Interakziorik ez duten konposatuak, berriz, EOFarekin batera migratuko dute ($t_{eof} = t_m$), eta fluxuaren markatzaile gisa erabiltzen dira —metanola, esaterako—. 4.2. irudian, argi eta garbi azaltzen da CZE eta MEKC tekniken arteko desberdintasuna, konposatu guztiak mizelekin duten interakzioaren arabera nola banatzen diren ikus baitaiteke.

MEKC teknikan, prozesu kromatografikoari jarraitzen dio banaketak; alegia, bigarren fasearekiko duten afinitatearen arabera migratzen dute analitoek. Horregatik, kromatografian erabiltzen diren antzeko adierazpenak baliagarriak dira MEKC aplikatzen denean, baina aldaketa batzuekin. Kromatografian, ahalmen-faktorea (k') (4.1) ekuazioaren bidez lortzen da,

$$k' = \frac{t_m - t_0}{t_0} \quad (4.1)$$

eta konposatu bakoitzak fase geldikorrarekiko duen afinitatea kuantifikatzen du.



4.2. irudia. Lagin beraren analisia, CZE eta MEKC tekniken bidez. CZEren kasuan, 5 konposatuak neutroak direnez, tontor bakarra ikusten da, (N) guztiek abiadura total bera baitute. MEKC erabiltzean, berriz, ikus daiteke ondo banatu direla konposatu guztiak. Ezaugarri elektroforetikoko guztiak berdinak dira, baina, MEKCren kasuan, SDS surfaktantea gehitu da banaketa-disoluzioan. Konposatuaren identifikazioa: 1) kafeina, 2) 4-metil-3-penten-2-ona, 3) nitrobenzenoa, 4) bentzalazetona, eta 5) bentzofenona. Ezaugarri elektroforetikokoak: 20 mM sodio tetraborato dekahidratatua, 25 mM SDS (MEKC), % 10 azetonitriloa, 25 kV-eko potentzial-diferentzia, eta 8 s-ko eta 45 mbar-eko injekzio hidrodinamikoa. Kapilarraren luzera totala 50 cm-koa da. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Kromatografia elektrozinetiko mizelarrean, mizelen migrazioa ahalmen-faktorean sartu behar da, fase mizelarra mugitu egiten delako. Hortaz, ahalmen-faktorea honela definitzen da (Terabe, *et al.*, 1984):

$$k' = \frac{t_m - t_{EOF}}{t_{EOF} \cdot (1 - t_m/t_{EOF})} \quad (4.2)$$

Kontuan izan (4.1) eta (4.2) adierazpenak berdinak direla mizelen migrazio-denborak infinitura jotzen duenean. Ahalmen-faktorea esperimenterki lortzeko, EOFaren eta mizelen abiaduraren konposatu markatzaileak behar dira, (4.1) ekuazioa aplikatu ahal izateko. Ahalmen-faktoreak adierazten du zenbat denbora dagoen solutu jakin bat mizelarekin interakzioan eta interakziorik gabe. Analito guztiak, batez beste, mizelaren abiadura migratzen ari dira $k'/(1+k')$ denboraz, eta $1/(1+k')$ denboraz EOFarekin batera. Gogoan izan, analito batek zenbat eta interakzio sendoagoa izan mizelekin, orduan eta mantsoagoa izango dela haren abiadura totala. Esate baterako, konposatu baten ahalmen-faktorea 1,2 bada, denboraren 5/11 —% 45,4— mizelekin batera doa, eta denbora totalaren 6/11 —% 54,6—, fluxu elektroosmotikoaren abiadura berean. Jakina, hori batez bestekoa da, prozesua orekako baita. Analito neutroen kasuan, honela berridatzi behar da mugikortasun totala MEKC banaketan kasurako:

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \frac{k'}{1+k'} \mu_{mc} \quad (4.3)$$

Konposatu kargatuaren kasuan, berriz, kontuan izan behar da mugikortasun elektroforetikoa ere baduela, eta, ondorioz, mugikortasun totalak hiru kontribuzio ditu (Ferguson *et al.*, 1998):

$$\mu_T = \mu_{EOF} + \frac{1}{1+k'} \mu_e + \frac{k'}{1+k'} \mu_{mc} \quad (4.4)$$

Ahalmen-faktorea ezaugarri fisiko eta kimiko askoren menpe dago, baina, molekula neutroen kasuan, konposatuaren oktanol/ur partizio-koefizientearekin, K_{ow} , lot daiteke. Koefiziente horrek molekularen hidrofobotasuna adierazten du, eta, neurri batean, efektu hori da mizelekiko interakzioaren erantzule nagusia (Lamalle *et al.*, 2012).

Oktanol/ur partizio-koefizienteak duen lotura zuzena erraz frogatu daiteke, hainbat konposatu MEKC bidez banatuz. Banaketa egin ondoren, bibliografian bilatu daiteke konposatu bakoitzaren K_{ow} , eta, ondoren ahalmen-faktorea *vs* K_{ow} grafikoa irudikatu. Bi datu multzoen balio logaritmikoak irudikatuz gero, ikusten da zuzen batera doitzen direla. Bestalde, alderantziz ere planteatu daiteke

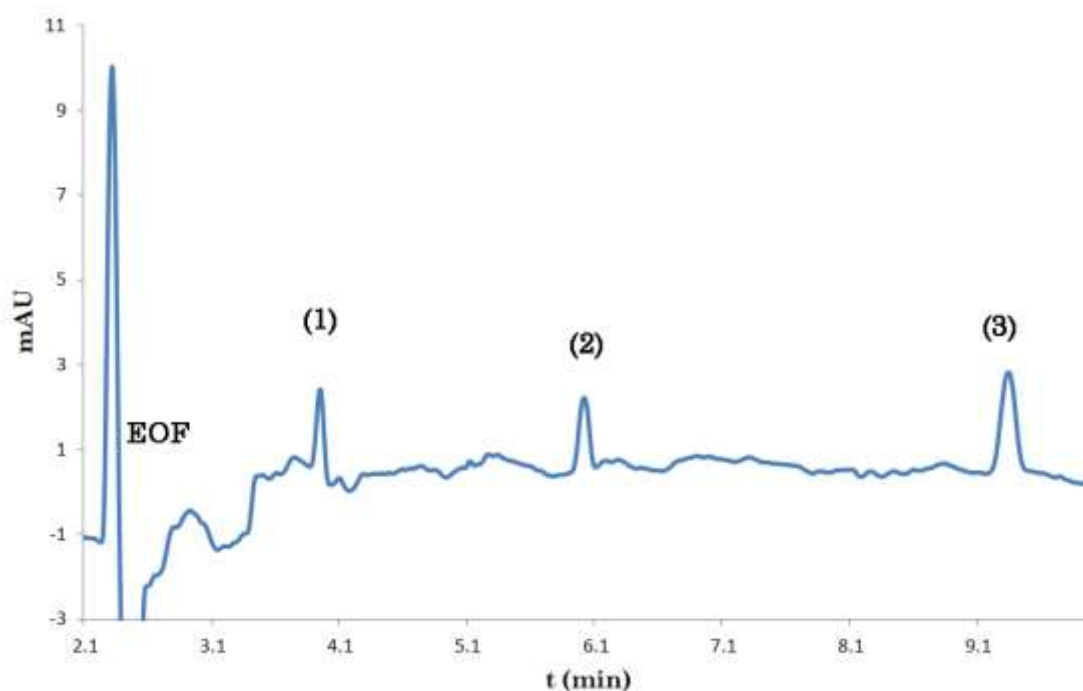
esperimentua: kalibratu bat eraikitzen da K_{ow} ezaguna duten konposatuekin (4.3. irudia), eta, ondoren, analito ezezagunen K_{ow} kalkula daiteke (4.4. irudia).

Bereizmenari dagokionez, (4.5) ekuazioa aplikatu behar da MEKC teknikan, eta likido kromatografian erabiltzen denaren parekoa dela ohartu (Terabe *et al.*, 1985).

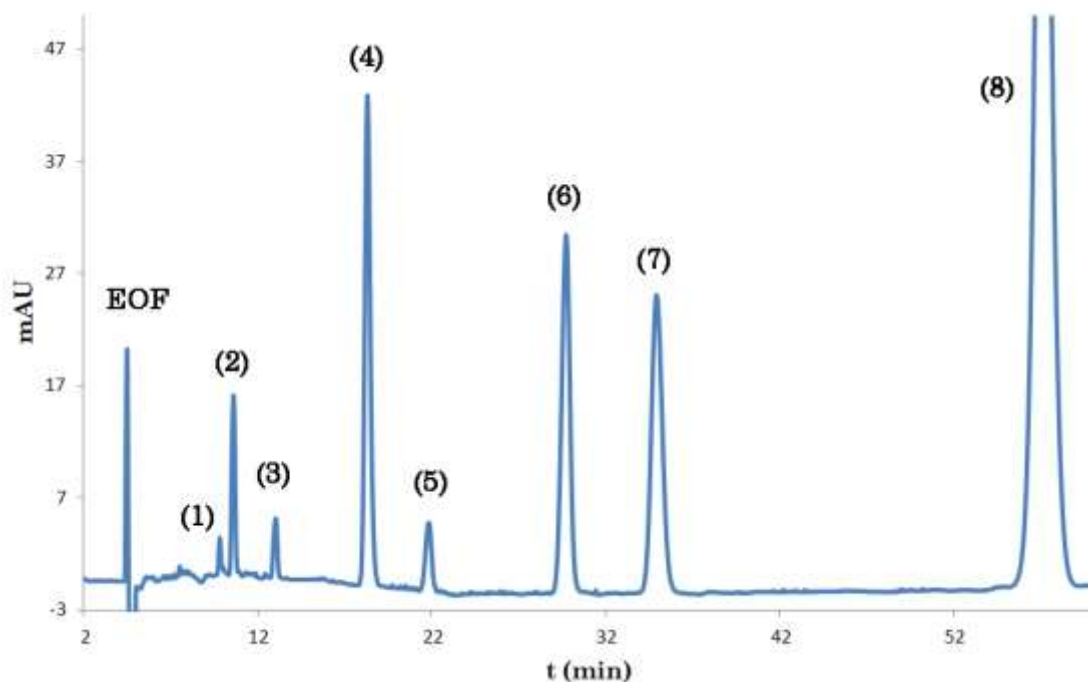
$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left(\frac{1 - (t_{EOF}/t_{mc})}{1 + (t_{EOF}/t_{mc})k'_1} \right) \quad (4.5)$$

non N plater teorikoen kopurua den, eta α bi konposatuen arteko selektibitatea, hau da, k_2/k_1 .

Oro har, MEKC erabiliz lortutako eraginkortasuna —normalean, $N < 200.000$ — CZEEn lortzen dena baino urriagoa bada ere, banaketa oso onak lortzen dira (Perrett, 2010). Gainera, MEKC erabiltzeak CZEek dituen abantaila gehienak mantentzen dituzenez, erabilgarria da konposatu kargadunak zein neutroak dituzten nahaste konplexuak analizatzeko; adibidez, metabolomikan (Guillo *et al.*, 2004) eta analisi kimikoan (Buszewski *et al.*, 2013).



4.3. irudia. Bentzenoaren (1), toluenoaren (2) eta etilbentzenoaren (3) banaketa kromatografia elektrozinetiko mizelarrez. Migrazio-denborak lotura zuzena du K_{ow} balioarekin, eta frogatuta geratzen da mizela-analito interakzioa hidrofoboa dela. Ezaugarri elektroforetikoak: 50 mM sodio tetraboratoa (pH 9,3), 50 mM SDS eta % 4 metanola. Detekzioa 210 nm-an egin da, eta 30 kV-eko potentzial-diferentzia aplikatu da. Irudia: J. Pérez eta A. Egaña (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013)



4.4. irudia. Bentzeno (1), tolueno (3) eta etilbentzeno (5) patroiak erabiliz beste zenbait konposaturen K_{ow} balioa lortzeko erabilitako banaketa elektroforetikoa: (2) 2,7-dihidroxinaftalenoa, (4) 1-naftola, (6) naftalenoa eta (7) bentzofenona. Fenantrenoa (8) erabili da ahalmen-faktorea kalkulatzeko beharrezkoa den mizelen migrazio-denbora lortzeko. Irudia: J. Pérez eta A. Egaña (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

4.2. Mizelak eta surfaktanteak

Azaldu den bezala, surfaktanteak molekula anfifilikoak dira: hidrokarburo isats hidrofoboa dute, eta buru polar edo ionikoa. Alde batetik, buru polarraren karga motaren arabera taldekatu daitezke: ez-ionikoak, anionikoak, kationikoak eta zwitterionikoak bereizten dira. Bestetik, isats hidrofoboaren arabera sailkatu daitezke: hidrokarburoak, behazun-gatzak (*bile salts*) eta fluorokarbonoak izan daitezke. Oro har, surfaktante guztien ezaugarri komuna da mizelak —alegia, agregatu molekularrak— osatzeko gai direla, aurrez aipatu den CMC kontzentrazioetik gora daudenean (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Ur-disoluzioan, hainbat faktorek eragina dute bai CMCn eta baita osatutako mizelen tamainan ere; esate baterako, hidrokarburo isats motak, kontraioiak, elektrolito-disoluzioaren ezaugarriek, tenperaturak, eta abar. Surfactantearen kontzentrazioa CMC baino 1-10 aldiz handiagoa denean, mizela esferikoak osatzen dituzte surfaktante ioniko gehienek. Aldiz, kontzentrazioa handiagoa bada edo gehigarri organikorik edo bestelakorik badago elektrolito-disoluzioan, mizela elipsoidalak osatzen dituzte (Poole, 2003). Azken horiei esker ere, MEKC banaketa

eraginkorrak lor daitezke, ingurune ez-akuosoko elektroforesi kapilarraren kasuan gertatzen den bezala.

Teorikoki surfaktante asko eskuragarri dauden arren, gutxi batzuk bakarrik erabiltzen dira MEKCn (4.1. taula). Oro har, bost taldetan sailkatzen dira: anionikoak —sulfato, sulfonato eta karbonatoak—, behazun-gatzak, kationikoak —amonio-talde koaternarioak dituztenak—, zwitterionikoak eta ez-ionikoak. MEKCn, 10-200 mM kontzentrazio tartean erabili ohi dira fase sasigeldikorra osatu eta analizatu nahi diren konposatuak banatzeko. Normalean, pH basikoan lortzen den EOFaren abiadura mizelen migrazio-abiadura baino handiagoa izaten da, eta, hortaz, EOFaren noranzko berean migratzen dute mizelek. Surfaktante kationikoen kasuan, interakzioa izan dezakete kapilarraren barne-gainazalean dauden silanol-taldeekin, eta, hortaz, EOFa elimina dezakete. Aldiz, surfaktante-kontzentrazioa are handiagoa bada, EOFaren noranzkoa aldatzea ere gerta daiteke (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

4.1. taula. MEKCn erabiltzen diren surfaktanteen laburpena (Poole, 2003; Terabe, 2004; Buszewski *et al.*, 2013). Datuak ur-disoluzioen kasurako dira.

| Mota | Izena | Laburdura | CMC | Agregazio zenbakia |
|-----------------|---|-----------|-------|--------------------|
| Anionikoak | Sodio dodezilsulfatoa | SDS | 8,1 | 62 |
| | Sodio tetradezilsulfatoa | STS | 2,1 | 138 |
| | Sodio dodekanosulfonatoa | | 7,2 | 54 |
| | Sodio N-lauril-N-metiltauratoa | | 8,7 | – |
| | Sodio N-dodekanoil-L-balinatoa | | 5,7 | – |
| | Potasio perfluoroheptanoatoa | | 28 | – |
| Kationikoak | Dodeziltrimetilamonio kloruroa | DTAC | – | – |
| | Dodeziltrimetilamonio bromuroa | DTAB | 14 | 50 |
| | Zetiltrimetilamonio kloruroa | CTAC | 1,3 | – |
| | Zetiltrimetilamonio bromuroa | CTAB | 0,92 | 61 |
| Ez-ionikoak | Polioxietilen(23)dodekanola | Brij 35 | 0,1 | – |
| | Polioxietilen(20)sorbitanmonolauratoa | Tween 20 | 0,95 | – |
| | Oktilglukosidoa | | – | – |
| | n-Dodezilmaltosidoa | | 0,16 | – |
| | Triton X-100 | | 0,24 | – |
| Zwitterionikoak | Dodezildimetilamino-3-propanosulfonatoa | SB-12 | 3,3 | 55 |
| | 3-[(3-kloramidopropil)dimetilamonio]-1-propoanosulfonatoa | CHAPS | 8 | 10 |
| Behazun-gatzak | Sodio kolatoa | | 13-15 | 2-4 |
| | Sodio deoxikolatoa | | 4-6 | 4-10 |
| | Sodio taurokolatoa | | 10-15 | 5 |
| | Sodio taurodeoxikolatoa | | 2-6 | – |

Surfaktanterik arruntena SDS da, eta 10-50 mM kontzentrazio tartean erabiltzen da, nahiz eta 100 mM artekoak ere posible diren. Kontzentrazio handiagoetan Joule efektuz ekoiztako beroak arazoak eragin ditzake. Analitoen eta mizelen arteko selektibitatea aldatzeko, beste zenbait surfaktante erabil daitezke. Era berean, interakzio mota ugari eragin, eta selektibitatea aldatzeko surfaktante-nahasteak ere erabil daitezke. Esate baterako, surfaktante neutro bat desegokia da analito neutro bat banatzeko —ez legoke interakziorik—, baina, surfaktante ioniko bat gehitzen bada disoluzioan, karga netoa izango duen mizela eratuko da. Horretaz gainera, bi surfaktanteen kontzentrazioak aldatuz, karga desberdineko mizelak osa daitezke. Surfaktante mistoak erabilia, asko zabaltzen da MEKCren erabilera (Buszewski *et al.*, 2013).

4.3. Banaketan eragina duten faktoreak

Surfaktante motaren eraginaz gainera, beste hainbat aldagai ere kontrolatu behar dira MEKC banaketa arrakastatsuek lortzeko. Segidan, garrantzitsuenen laburpena egingo da.

Azaldu den moduan, gehigarri mota asko erabil daitezke MEKC banaketa analitikoetan. Ziklodextrinak (CD, *cyclodextrins*) oligosakarido makroziklikoak dira, eta, barnean dituzten atal hidrofoboeri esker, konplexuak osa ditzakete. Disoluzioan dagoen konposatu jakin batek interakzio espezifikoak izan ditzake CDaren atal hidrofoboarekin. Interakzio espezifiko horiek eratzeko gaitasuna dela eta, ziklodextrinak sarritan gehitzen dira elektrolito-disoluzioan; esate baterako, konposatu oso hidrofoboaren banaketa hobetzen duelako. CDek badute beste abantaila nagusi bat; izan ere, optikoki aktiboa den egitura dutenez ziklodextrinek, enantiomeroen banaketak lor daitezke, CD-MEKC delakoaren bidez. Gehien erabiltzen diren ziklodextrinak β -CD eta γ -CD dira, eta 10-40 mM tarteko kontzentrazioan gehitzen dira (Bald eta Kubalczyk, 2013).

Disolbatzaile organikoak gehitzea ere oso ohikoa da MEKCn. Oro har, EOFaren abiadura mantsotzen dute disolbatzaile organikoek, eta, hortaz, eluzio-leihoa zabaltzen da —alegia, EOFaren migrazio-denboratik mizelen migrazio-denborara dagoen tarte—. Horretaz gainera, analitoen eta mizelen arteko interakzioak alda ditzakete disolbatzaile organikoek, eta, beraz, baita selektibitatea ere (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Beste aukera bat BGEen pare ionikoak osatzeko gai diren erreaktiboak gehitzea da —gehienetan, tetraalkilamonio gatzak—. Gatz horiek pare ioniko kationikoak dira, eta baliagarriak dira konposatu ionikoen banaketa hobetzeko: katioien migrazio-denborak laburtzen dituzte, eta anioienak, aldiz, luzatu.

Elektrolito-disoluzioaren pH-a kontrolatzea ere funtsezkoa da MEKC analisiak egiterakoan, CZEren kasuan gertatzen den bezala. pH-ak abiadura elektroinetikoak eta konposatuen kargak aldatzen ditu; esate baterako, pH-a 5 baino txikiagoa bada, SDS mizelen abiadura ia nulua da, eta, 5 azpitik, mizelen abiaduraren noranzkoa aldatu egiten da —mizelen abiadura elektroforetikoa EOFaren abiadura baino handiagoa delako— (Bald eta Kubalczyk, 2013). Ondorioz, pH-aren eragina kontuan hartzea eta aztertzea beharrezkoa da, MEKC metodo egokia prestatu nahi bada. Dena den, zaila izaten da aurrez esatea nolakoak izango diren MEKCn mizelen eta analitoen artean gertatzen diren interakzioak.

Edonola ere, informazio gehiago eskuratzeko, gomendatzen da M. Silva-k argitaratutako berrikuspen-artikuluak irakurtzea, MEKCk azken urteotan izandako garapenaren ñabardura guztiak zehatz-mehatz ezagutu nahi badira (Silva 2007, Silva 2009, Silva 2011, Silva 2013).

4.4. Mikroemultsioak

Mikroemultsioak disoluzio egonkorak dira, likido disolbaezin baten tanta nanometrikoak sakabanatuak dituztenak. Mikroemultsioak MEKCn erabiltzen dira, BGE moduan, eta, kasu horietan teknikak dituen berezitasunak direla eta, MEEKC deritze (*microemulsion electrokinetic chromatography*); alegia, mikroemultsio kromatografia elektroinetikoak. Oro har, MEEKCn erabiltzen diren mikroemultsioak olio-tanten ur-dispersioak izaten dira. Mikroemultsioa lortzeko, beste hiru osagai gehitu behar dira BGEa izango den ur-disoluzio elektrolitikoan: (1) ur-disolbagarritasun eskasa duen disolbatzaile organikoa —oktanoa, heptanoa, oktanoa, dietil eterra, eta abar—, (2) karga duen surfaktantea —SDS, esaterako— eta (3) kosurfaktantea —butanola, tetrahidrofuranoa, 2-etoxietanola, eta abar— (Poole, 2003).

Disolbatzaile organikoak tanta nanometrikoak eratzen ditu ur-disoluzioan, eta surfaktantearen isats hidrofoboa tanta horren kanpoko geruzan kokatzen da. Surfaktanteari eta kosurfaktanteari esker, tanta egonkorak osa daitezke. Nolabait esateko, barruan tanta organikoak dituzten *mizelak* dira. Dena den, tanta egonkorak osatzeko, hiru osagaien —disolbatzaile organikoaren, surfaktantearen eta kosurfaktantearen— kontzentrazio jakinak erabili behar dira, tarte mugatu estu baten barruan. MEEKCn arruntena den mikroemultsioa honako hau da: % 0,8 (w/w) n-oktanoa, % 6,6 (w/w) n-butanola, % 3,3 (w/w) SDS eta % 89,3 (w/w) 10-20 mM den borato edo fosfato disoluzio erregulatzaila —pH 8,5-9,5 tartean—(Poole, 2003). Bibliografian argitaratu diren berrikuspenetan ikus daitezke beste

mikroemultsio batzuk (Mahuzier *et al.*, 2003), baina aipatutako hori dute oinarri gehienek.

MEKCn gertatzen den bezala, ur-disoluzioan edo olio-tanten barruan egoteko duten joeraren arabera banatzen dira konposatu neutroak. Konposatu kargadunen kasuan, mugikortasun elektroforetikoak eta tantekin izan ditzaketen interakzioak eragina dute abiaduran. Garrantzitsua da kontuan hartzea surfaktanteak eta kosurfaktanteak dutela eragin handiena selektibitatean, eta, neurri txikiagoan, disolbatzaile organikoak.

MEEKC eta MEKC egokiak izaten dira konposatu berak analizatzeko, baina MEEKC gomendagarriagoa da analito oso hidrofoboek kasurako. Horretaz gainera, MEEKC banaketan eraginkortasuna MEKC banaketena baino handiagoa da, kasu batzuetan; nagusiki, masa-transferentzia handiagoa gertatzen delako mikroemultsioen tantei esker (Yu *et al.*, 2012). MEEKC teknika, gainera, erabilgarria da matrizearen hauspeaketak sor ditzakeen arazoak murrizteko (Poole, 2003), eta, hortaz, bateragarriagoa da matrize konplexuekin. Oro har, esan behar da MEEKC aukera interesgarria dela ur-disolbagarritasun eskasa duten konposatuak aztertzeke; esate baterako, zenbait bitamina eta droga. Gainera, badira mikroemultsioak optimizatzeko aukera asko; izan ere, disolbatzaile organiko, surfaktante eta kosurfaktante asko daude eskuragarri (Mahuzier *et al.*, 2003).

Bibliografia

BALD, Edward; KUBALCZYK, Pawel: *Micellar Electrokinetic Chromatography*. In BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal (Ed.): *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

FERGUSON, P. D.; GOODALL, D. M.; LORAN, J. S.: *Systematic Approach to Links between MEKC and Reversed-Phase HPLC*, Analytical Chemistry, 70(19), 4054-4062, 1998.

GUILLO, Christelle; BARLOW, David; PERRETT, David; HANNA-BROWN, Melissa: *Micellar Electrokinetic Chromatography and Data Alignment Analysis: A New Tool in Urine Profiling*, Journal of Chromatography A, 1027(1-2), 203-212, 2004.

LAMALLE, Caroline; SERVAIS, Anne-Catherine; FRADI, Ines; CROMMEN, Jacques; FILLET, Marianne: *Micellar Electrokinetic Chromatography Systems for the Separation of Mixtures of Charged and Uncharged Compounds*, Journal of Separation Science, 35(15), 1933-1939, 2012.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

MAHUZIER, P.-E.; PRADO, M.S.A.; CLARK, B.J.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; ALTRIA, K.D.: *An Introduction to the Theory and Application of Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, LC-GC Europe, 2-7, 2003.

PERRETT, David: *200 Years of Electrophoresis*, Chromatography Today, 4-7, Dec. 2010.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

RIEKKOLA, Marja-Liisa; JÖNSSON, Jan Ake; SMITH, Roger M.: *Terminology for Analytical Capillary Electromigration Techniques (IUPAC Recommendations, 2003)*, Pure and Applied Chemistry, 76(2), 443-451, 2004.

SILVA, Manuel: *MEKC: An Update Focusing on Practical Aspects*, Electrophoresis, 28(1-2), 174-192, 2007.

SILVA, Manuel: *Micellar Electrokinetic Chromatography: Methodological and Instrumental Advances Focused on Practical Aspects*, Electrophoresis, 30(1), 50-64, 2009.

SILVA, Manuel: *Micellar Electrokinetic Chromatography: A Practical Overview of Current Methodological and Instrumental Advances*, Electrophoresis, 32(1), 149-165, 2011.

SILVA, Manuel: *Micellar Electrokinetic Chromatography: A Review of Methodological and Instrumental Innovations Focusing on Practical Aspects*, Electrophoresis, 34(1), 141-158, 2013.

TERABE, Shigeru: *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Analytical Chemistry, 241A-246A, 2004.

TERABE, Shigeru; OTSUKA, Koji; ANDO, Teiichi: *Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary*, Analytical Chemistry, 57(4), 834-841, 1985.

TERABE, Shigeru; OTSUKA, Koji; ICHIKAWA, Kunimichi; TSUCHIYA, Akihiro; ANDO, Teiichi: *Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*, Analytical Chemistry, 56(1), 111-113, 1984.

YU, Lishuang; CHU, Kedan; YE, Hongzhi; LIU, Xianxiang; YU, Lishuang; XU, Xueqin; CHEN, Guonan: *Recent Advances in Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, Trends in Analytical Chemistry, 34, 140-151, 2012.

— 5 —

Elektroforesi kapilar ez-akuosoa

5.1. Sarrera

Elektromigrazio-teknika klasikoetan, disolbatzaile akuoso edo hidroorganikoak erabiltzen dira, baina badira disolbatzaile ez-akuosoeekin lor daitezkeen banaketa elektroforetikoak ere. Elektromigrazio mota jakin horri elektroforesi kapilar ez-akuosoa (NACE, *non-aqueous capillary electrophoresis*) deritzo, eta garrantzi handiko banaketa mota bat da. NACEren lehen aplikazioa 1984an argitaratu zuten Walbroehlek eta haren lankideek (Walbroehl *et al.*, 1984), eta azetonitriloa erabili zuten ura ordezkatzeko. Hasiera batean, ingurune ez-akuosoa lan egitea nekeza izan zen, muga instrumentalak zirela eta, baina, 1994tik hona, asko ugartu dira NACEri buruzko ikerkuntzak (Szumski eta Buszewski, 2013).

NACE teknika aplikatzearen abantailak honako hauek dira: 1) selektibitatea areagotzea, 2) uretan disolbagarritasun urria duten edo disolbaezinak diren konposatuak banatu ahal izatea, 3) eskala handiko elektroforesi kapilarra egin ahal izatea, 4) interakzio polarrak erabiltzea, 5) eraginkortasuna hobetzea —plater teoriko kopurua handitzen delako—, 6) Joule efektuaren ondorioak murriztea eta, ondorioz, potentzial-diferentzia handiagoak aplikatu ahal izatea, eta 7) fluoreszentzia areagotzea —zenbait kasutan bakarrik gertatuko da hori, eta, jakina, detekzioa fluoreszentziaz egiten denean bakarrik izango du eragina— (Szumski eta Buszewski, 2013; Kenndler, 2014).

5.2. Disolbatzaile organikoak eta gehigarriak

Sistema akuosoeekin alderatzen denean, elektroforesi ez-akuosoa abantaila handiak eskaintzen ditu; izan ere, disolbatzaile organiko bat edo haien

konbinaketak erabil daitezke disolbatzaile moduan. Horrek aukera ematen du ezaugarri oso desberdinak dituzten nahasteak lortzeko, eta, ondorioz, selektibitatea kontrolatzeko bideak zabaltzen ditu. Bestalde, uretan banezinak diren konposatu askok pK_a aldaketa nabarmenak jasan ditzakete ingurune organikoan, eta, beraz, NACE bidez banatu daitezke. Aldaketa horiek kontrolatzeko, garrantzitsua da disolbatzaile organikoen azido-base ezaugarriak ulertzea (5.1. taula).

5.1. taula. Disolbatzaile organikoen sailkapena, azido-base ezaugarrien arabera (Kolthoff, 1974; Szumski eta Buszewski, 2013).

| Ezaugarriak | Azidoa | Basikoa | Adibideak |
|----------------------|--------|---------|---|
| Anfiprotikoa | | | |
| Neutroa | | | Metanola (MeOH), glizerola, <i>tert</i> -butil alkohola |
| Protogenikoa | | | Azido azetikoa, azido formikoa, azido sulfonikoa |
| Protofilikoa | | | Formamida (FA), N-metil-azetamida, N-metilformamida (NMF) |
| Aprotikoa | | | |
| Neutroa | | | Dimetilsulfoxidoa (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofuranoa (THF) |
| Dipolar protogenikoa | | | Azetonitriloa (ACN), azetona, nitrobenzenoa |
| Dipolar protofilikoa | | | Benzenoa, karbono tetrakloruroa, hidrokarburo alifatikoak |

5.1. taulan jasotako informazioari erreparatuz, NACEn gehien erabiltzen diren disolbatzaile organikoak anfiprotiko neutroak —metanola, (MeOH)—, aprotiko dipolar protogenikoak —azetonitriloa, ACN— eta anfiprotiko protogenikoak —formamida, (FA)— dira. Disolbatzaile puru gehienak erabiliz agertzen da fluxu elektroosmotikoa elektroforesiko kapilarrean, eta hori behar-beharrezkoa da, elektromigrazioa gertatuko bada. Arrazoi praktikoak direla eta, NACEn erabili ahal izateko, honako baldintza hauek bete behar dituzte disolbatzaile ez-akuosok: 1) biskositate baxua izatea, 2) lurrinkortasun baxua izatea, 3) ultramore-absortzio urria izatea —ultramore-detektagailua erabili behar denean behintzat—, 4)

toxikoak ez izatea, eta 5) banaketa-disoluzioan ezinbestekoa den elektrolittoa disolbatzeko gai izatea, besteak beste. 5.2. taulan laburbildu dira NACE aplikazioan ohikoenak diren disolbatzaileen beste zenbait ezaugarri fisikokimiko. Bereziki garrantzitsuak dira biskositateei eta konstante dielektrikoei dagozkien datuak, baina baita bi horien arteko erlazioa ere —gogoratu bi parametro horien arteko zatiketa agertzen dela EOFa zuzentzen duen Helmholtz-Smoluchowski ekuazioan—. Jakina, hori ez da fluxu elektroosmotikoan eragina duen faktore bakarra; esaterako, zeresan handia du kapilarraren eta banaketa-disoluzioaren arteko zeta-potentzialak ere, baina disolbatzailearen arabera da hori ere.

5.2. taula. Elektroforesi kapilarrean ohikoak diren disolbatzaileen ezaugarri fisikokimikoak (Poole, 2003).

| Disolbatzailea | Irakite-puntua (°C) | Biskositatea , η (cP) | Konstante dielektrikoa, ϵ | ϵ/η |
|----------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Ura | 100 | 0,89 | 78,39 | 88,1 |
| Metanola | 64,7 | 0,545 | 32,70 | 60,0 |
| Azetonitriloa | 81,6 | 0,341 | 37,5 | 110,0 |
| Formamida | 210,5 | 3,30 | 111,0 | 33,6 |
| NMF | 180 | 1,65 | 182,4 | 110,5 |
| DMF | 153 | 0,802 | 36,71 | 45,8 |
| THF | 66 | 0,46 | 7,58 | 16,5 |

Bestalde, pH-a ur-inguruneetarako prestatuta dauden elektrodoekin neurtzen denez, pH* erabiltzen da —itxurazko pH-a— disolbatzaile organikoen kasuan. Bibliografia espezializatuan aurkitu daiteke pH-ak eta pH*-ak fluxu elektroosmotikoan duten eraginaren analisisia (Porras eta Kenndler, 2004).

Atalaren hasieran aipatu den bezala, konposatu hidrofoboek disolbagarritasuna areagotzeko erabili ohi da NACE —uretan guztiz disolbaezinak diren analitoak ezin dira banatu zonako elektroforesi kapilarra erabiliz—. Baina hori ez da arrazoi bakarra. NACEk eskaintzen duen beste abantaila garrantzitsu bat selektibitatearen kontrola da. Gogoratu bi konposaturen arteko banaketaren kalitatearen adierazle dela selektibitatea, zeina mugikortasun elektroforetikoa eta elektroosmotikoa oinarritzen den, azken finean. Analitoak azido edo base ahulak badira —analito gehienak horrelakoak izaten dira—, beren pK_a -ren arabera izango da selektibitatea. Disolbatzaile organikoek analitoen pK_a aldatzeko gaitasuna dutenez, banaketa elektroforetikoen selektibitatea asko alda daiteke disolbatzaile eta disolbatzaile konbinaketa bat baino gehiago erabiliz.

Beti ere, disolbatzailea aukeratzerakoan, kontuan izan behar da, banaketa gerta dadin, analitoak karga izan behar duela edo interakzioa izan behar duela gehigarri

kargadun batekin. Beraz, kargarik ez duten konposatuen banaketa lortzeko, gehigarriak jartzen dira banaketa-disoluzio elektrolitikoan. Ur-ingurunean konposatu neutroen eta hidrofoboaren banaketarako surfaktante mizelarrak erabiltzen diren arren —kromatografia elektrokinetiko mizelar deritzon aldaeraren kasua, hain zuzen ere—, konplexuagoa da ingurune ez-akuosoan. Izan ere, disolbatzaile organiko gehienetan, mizelak ezin dira osatu, ahulegiak baitira surfaktante molekulen eta hidrokaburo kateen arteko interakzio hidrofoboak. Mizelak osatzeko gai diren disolbatzaile organiko bakarrenetakoak formamida eta poli(etilenglikola) dira; aurrerago aztertuko dira kasu zehatz horiek, kromatografia elektrokinetiko mizelar ez-akuosoari (NAMEKC, *non-aqueous micellar electrokinetic chromatography*) dagokion atalean. Ohar bitez irakurleak bibliografian, zenbaitetan behinik behin, NACEren barruan sailkatzen dela NAMEKC teknika; alegia, ez direla bereizten.

NACEri dagokionez, analito neutroen banaketa lortzeko, espezie ioi-parekatzaileak (*ion-pairing species*) erabiltzen dira; adibidez, tetrahexilamonio bromuroa (THA) (Tjordelund eta Hansen, 1998). Beste gehigarri garrantzitsu batzuk ere ohikoak dira; esaterako, amonio gatzak, metal alkalinoen ioiak, zenbait anioi —perkloratoa, nitratoa, bromuroa eta kloruroa, kasurako—, Brij, koronaterak, kinina, tetraalkilamonio gatzak —aipatutako THAz gainera—, azido kanforsulfonikoak, eta abar. Aipatutako gehigarriek interakziosolbofobikoak, elektrostatikoak eta emaile-hartzaile motakoak ematen dituzte, analito neutroak banatu ahal izateko. Aipatu behar da NACEn gertatzen diren interakzioak CEn gertatzen direnak baino askoz ere konplexuagoak direla; irakurleak bibliografia espezializatura jo beharko du argibide gehiago eskuratzeko (Riekkola *et al.*, 2000; Szumski eta Buszewski, 2013; Kenndler, 2014).

5.3. Kromatografia elektrokinetiko mizelar ez-akuosoa

Ur-ingurunean CZEren kasuan gertatzen den bezala, NACE erabiliz ere karga/tamaina erlazioaren arabera banatzen dira analitoak; hortaz, ionizatu gabe dauden konposatuak ezin dira banatu. Hala ere, NACEren beste aplikazio bat molekula neutroak banatu ahal izatea da. Kasu horretan, kargarik ez duten molekulekin interakzioak izateko gai den gehigarri bat jarri behar da BGEan. Aurrez aipatu den bezala, mizelak gehitzen badira, kromatografia elektrokinetiko mizelar ez-akuoso (NAMEKC) deritzo teknikari. Teknikaren oinarriak MEKCren antzekoak dira, baina disolbatzaile organikoa erabiltzen da.

Analito neutroek interakzioak izan ditzakete kargatutako surfaktante monomeroekin edo agregatuekin, eta, horrela, banatu egin daitezke. R. M. Seifar-

ek eta haren lankideek konposatu hidrofoboak banatzea lortu zuten, SDS surfaktantea eta ur/azetonitrilo nahasteak erabiliz; horri esker frogatu ahal izan zuten *sasimizelak* osatzen direla azetonitrilo-kontzentrazio altuetan ere, eta, zentzu zorrotzean mizelak ez badira ere, konposatu neutroak banatu daitezke haiei esker (Seifar *et al.*, 1997). Aipatutako ikerketa hori NAMEKC teknikaren garapenaren abiapuntutzat har daiteke; izan ere, lehen aldiz frogatu zen azetonitriloa ez zela gai surfaktante mizelak guztiz suntsitzeko, ezta disolbatzaile organikoko kontzentrazio handietan ere. Geroago, Linek eta haren lankideek sei p- arilazetofenona banatu zituzten, BGE moduan formamida eta potasio hidrogenofosfata, K_2HPO_4 , erabiliz (Lin *et al.*, 1999). Lan horiekin, zera frogatu zuten: banaketa arrakastatsuak egitea posible zela formamida disolbatzaile organikoa eta SDS surfaktante mizelarra erabiliz. Ikertzaile horien beste ikerketa batean (Lin *et al.*, 2002), hiru surfaktante aztertu zituzten NAMEKC teknika aplikatzeko —kasu horretan ere, formamida zen disolbatzailea—, baina, berriz ere, SDS izan zen emaitza eraginkorrek eman zituen surfaktante bakarra. 1999an, zera frogatu zen: konposatu ez-ionikoen banaketa posible zela metanol % 70-100 disolbatzaileak erabiliz (Li eta Fritz, 1999). Ikerketa berean, adierazi zuten bi parametro dituela ingurune ez-akuosoan banaketa lortzeko mekanismoak; alde batetik, analitoaren eta surfaktantearen arteko interakzioa, eta, bestetik, ingurune elektroforetikoen konstante dielektrikoa/biskositatea erlazioa.

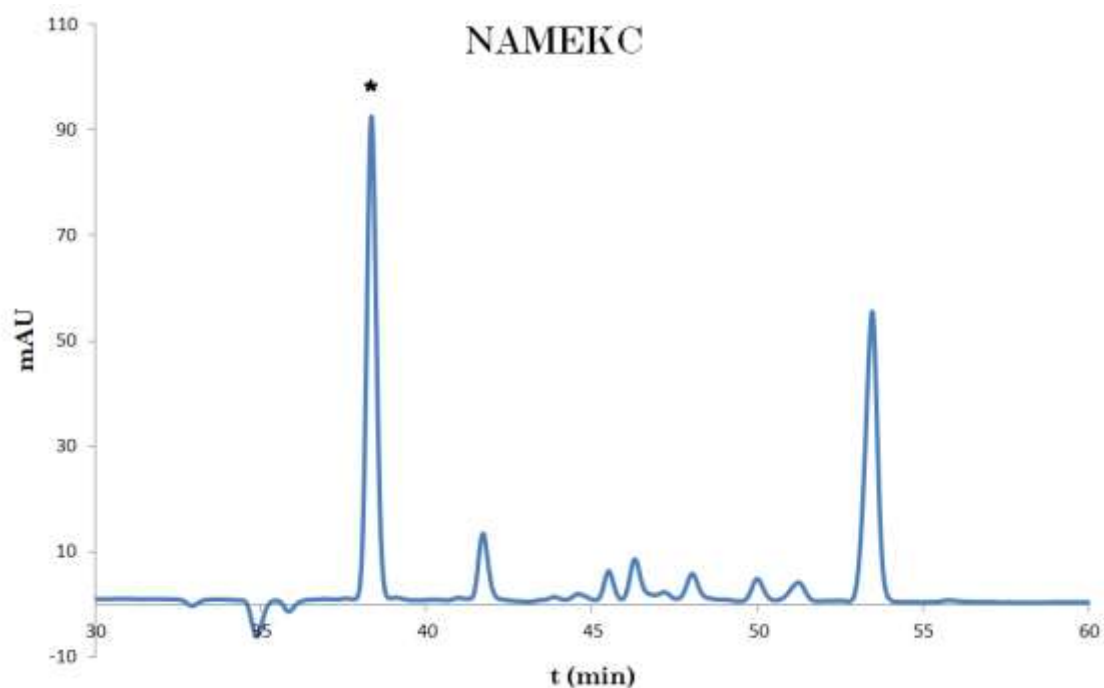
Dena den, azaldu den gisara, mizela egonkorrek osatzeko, kohesio-indar handiko disolbatzaileak behar dira; alegia, disolbatzaile anfiprotiko protofilikoak —formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida eta N,N-dimetilazetamida dira literaturan gehien aipatzen direnak, eta eraginkorrenak (Nozal *et al.*, 2006)—. Aipatzekoa da, bestalde, Gottik eta haren lankideek lortutako musketa nitroaromatikoen banaketa (Gotti *et al.*, 2005). Kasu horretan, metanol:ur 85:15 nahastea erabili zuten, azido zitrikoa elektrolito moduan, eta sodio taurodeoxikolato surfaktantea.

Esan bezala, disolbatzaile organiko gehienetan dauden indar hidrofoboak direla eta, mizelek ez dute egitura egonkorrik osatzen. Hala ere, badira disolbatzaile organiko batzuk —formamida eta polietilenglikola, esaterako— mizelekin bateragarriak direnak. Beste kasu batzuetan, benetako mizelen orde, agregatuak eratzen dira, eta, zenbaitetan, banaketa onak lor daitezke analitoek agregatu horiekin dituzten interakzioei esker ere. 5.3. taulan jasota daude bibliografiako berrikuspenetan deskribatu diren disolbatzaile organiko eta surfaktanteen konbinaketa batzuk.

5.3. taula. NAMEKCn erabili diren disolbatzaileen eta surfaktanteen adibideak (Lopez-Gazpio *et al.*, 2012; Felhofer *et al.*, 2013; Szumski eta Buszewski, 2013)

| Disolbatzailea(k) | Surfaktantea(k) |
|----------------------------|--|
| Azetonitriloa | Tween 20, azido kanforsulfonikoa, tetrahexilamonio perkloratoa |
| Azetonitriloa eta metanola | SDS, sodio kolatoa, tetrametilamonio bromuroa |
| Metanola | SDS, Brij 35, sodio kolatoa, sodio tetradezil sulfatoa |
| Formamida | SDS, dietilhexil sodio sulfosukzionatoa |
| Formamida eta metanola | Sodio kolatoa |

Analito-surfaktante interakzioei dagokienez, konplexu samarrak dira NAMEKCn; izan ere, mota askotakoak izan daitezke: interakzio solbofobikoak, elektrostatikoak —ioi-ioi, ioi-dipolo edo dipolo-dipolo—, eta emaile-hartzaile interakzioak (Felhofer *et al.*, 2013). Disolbatzaile organikoen nahasteak eta hainbat surfaktante erabil daitezkeenez, BGE mota asko erabil daitezke NAMEKCn, beharren arabera.



5.1. irudia. Perfume baten analisia, NAMEKC teknikarekin lortua. Disolbatzaile organikoa formamida da, eta fosfatoa gehitu da elektrolito gisa. Analisi kuantitatiboa egiteko erabili den barne-patroiari dagokio izartxo markaturiko tontorra. Irudia: J. Lopez-Gazpio (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Aipatu diren ikerketek NAMEKC teknikaren garrantzia adierazten dute, eta garrantzitsua da kontuan hartzea NAMEKCK badituela elektroforesi kapilarraren abantailak, hala nola eraginkortasuna, zehaztasuna eta automatizazioa. Horretaz gainera, CE ekipoak HPLCKoak baino sinpleagoak dira erabilerari dagokionez, eta kontsumo txikiagoa du. Azkenik, kasu askotan, muga bat izaten da analitoen ur-disolbagarritasun eskasa, eta ezin izaten da elektroforesi kapilarra erabili; hortaz, NAMEKC metodoak garatzea bereziki interesgarria da konposatu oso hidrofoboak elektroforesi bidez banatu ahal izateko (5.1. irudia).

Bibliografia

FELHOFER, Jessica L.; CHUMBIMUNI-TORRES, Karin Y.; MORA, Maria F.; HABY, Gabrielle G.; GARCÍA, Carlos D.: *Critical Evaluation of the Use of Surfactants in Capillary Electrophoresis*. In GARCÍA, Carlos D.; CHUMBIMUNI-TORRES, Karin Y.; CARRILHO, Emanuel (Ed.): *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis*, Wiley, Hoboken, 2013.

GOTTI, R.; FIORI, J.; MANCINI, F.; CAVRINI, V.: *Analysis of Neutral Nitromusks in Incenses by Capillary Electrophoresis in Organic Solvents and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Electrophoresis*, 26, 3325-3332, 2005.

KENNDLER, Ernst: *A Critical Overview of Non-Aqueous Capillary Electrophoresis. Part I: Mobility and Separation Selectivity*, *Journal of Chromatography A*, 1335, 16-30, 2014.

KOLTHOFF, I. M.: *Acid-Base Equilibriums in Dipolar Aprotic Solvents*, *Analytical Chemistry*, 46(13), 1992-2003, 1974.

LI, J.; FRITZ, J. S.: *Nonaqueous Media for Separation of Nonionic Compounds by Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 20, 84-91, 1999.

LIN, Jin-Ming; NAKAGAWA, Masamitsu; UCHIYAMA, Katsumi; HOBBO, Toshiyuki: *Determination of Critical Micelle Concentration of SDS in Formamide by Capillary Electrophoresis*, *Chromatographia*, 50(11), 739-744, 1999.

LIN, Jin-Ming; NAKAGAWA, Masamitsu; UCHIYAMA, Katsumi; HOBBO, Toshiyuki: *Comparison of Three Different Anionic Surfactants for the Separation of Hydrophobic Compounds by Nonaqueous Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 23(3), 421-425, 2002.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; GARCIA-ARRONA, Rosa; OSTRA, Miren; MILLÁN, Esmeralda: *Optimization and Validation of a Nonaqueous Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of Polycyclic Musks in Perfumes*, *Journal of Separation Science*, 35, 1344-1350, 2012.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

PORRAS, Simo P.; KENNDLER, Ernst: *Capillary Zone Electrophoresis in Non-Aqueous Solutions: pH of the Background Electrolyte*, Journal of Chromatography A, 1037, 455-465, 2004.

RIEKKOLA, Marja-Liisa; JUSSILA, Matti; PORRAS, Simo P.; VALKÓ, István E.: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 892, 155-170, 2000.

SEIFAR, Reza M.; KRAAK, Johan C.; KOK, Wim Th.: *Mechanism of Electrokinetic Separations of Hydrophobic Compounds with Sodium Dodecyl Sulfate in Acetonitrile-Water Mixtures*, Analytical Chemistry, 69(14), 2772-2778, 1997.

SZUMSKI, Michal; BUSZEWSKI, Boguslaw: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*. In BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal (Ed.): *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

TJORNELUND, Jette; HANSEN, Steen Honoré: *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis of Drugs: Properties and Application of Selected Solvents*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 38, 139-153, 1999.

WALBROEHL, Yvonne; JORGENSON, James W.: *On-Column UV Absorption Detector for Open Tubular Capillary Zone Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 315, 135-143, 1984.

— 6 —

Beste elektromigrazio-teknika batzuk

6.1. Elektrokromatografia kapilarra (CEC)

Elektrokromatografia kapilarrak (CEC, *capillary electrochromatography*) elektroforesi kapilarraren eta likido-kromatografiaren ezaugarriak elkartzen ditu. Banaketa analitoek fase geldikorrarekin duten interakzioan oinarritzen denez, ohiko teknika kromatografikoetatik gertuago dago elektromigrazio-tekniketarik baino. Hala ere, elektroforesi ekipoetan egiten denez, elektromigrazio-teknikekin batera sailkatu ohi da. CECn erabiltzen diren kapilarrek zona paketatua eta zona librea izaten dituzte. Kapilarraren zona paketatuan, bada fase geldikor bat, baina, likido kromatografian ez bezala, potentzial-diferentziak mugiarazten du fase mugikorra elektrokromatografia kapilarrean. Hori da abantaila nagusia; alegia, elektromigrazio-tekniketan ikusi dugun abiadura-profil laua lortzen da, eta banaketan eraginkortasuna hobetzen da. Kapilarraren zona paketatua likido-kromatografian erabiltzen diren antzeko silize-partikulekin lortzen da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Instrumentazioari dagokionez, ohiko elektroforesi-ekipoetan egin daitezke CEC banaketak, aldaketa handirik gabe.

Fluxu elektroosmotikoa erabiltzen denean paketatutako kapilar batean banaketa analitikoak lortzeko, kontuan hartu behar dira hiru ezaugarri hauek: alde batetik, abiadura eta kapilarraren zabalera independenteak dira; hortaz, presio bidezko fluxua erabiltzen denean baino abiadura uniformeagoak lortzen dira CECn. Bestetik, CECn, fluxu-abiadura independentea da kapilarraren partikulen tamainarekiko, eta zutabeak ez du aurkako presiorik sortzen. Azkenik, paketatzea osatzen duten partikulen inguruan ere geruza elektriko bikoitza agertzen da. Oro har, aipatu diren hiru ezaugarri horiek efektu mesedegarria dute analitoen banden zabalera mekanismoetan.

Ezaugarri horiek direla eta, konposatu neutroen banaketa-mekanismoa likido-kromatografian gertatzen denaren parekoa da, eta, konposatu ionikoetan, kromatografiaren eta elektromigrazioaren arteko zerbait gertatuko da (Schmid,

2012; Breadmore *et al.*, 2013). Kapilar paketatua erabiltzen den arren, fluxu elektroosmotikoa agertzen da, eta, profil lauari esker, 40 milioi plater teoriko baino gehiago lor daitezke (Dittmann eta Rozing, 1996). Desabantaila nagusia burbuilak agertzea da, banaketaren kalitatea kaltetzen baitu. Arazo horri irtenbidea eman zaio, neurri batean, elektrodoetan dauden *inlet* eta *outlet* bialak gas-iturri bati esker presurizatuz —2-12 mbar inguruko presioa aplikatzen da— (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Oro har, CEC teknika erabiltzen denean, bi aldagairen ondorioa da konposatuen mugikortasuna: fase geldikorraren ezaugarriak eta fase mugikorraren ezaugarriak. Fase geldikorraren ezaugarriei dagokienez, aipatzekoak dira, esate baterako, kapilarra paketatzeko erabili den materiala, poroen tamaina, kimikoki lotutako ligandoak dauden ala ez eta partikulen dentsitatea. Fase mugikorraren ezaugarrietan, berriz, kontuan hartu behar dira, besteak beste, disoluzio erregulatzailaren pH-a, elektrolito-kontzentrazioa, disolbatzaile organikorik gehitu den eta beste gehigarririk ba ote dagoen.

Disolbatzaile organikoekin lotuta, ingurune organikoan CEC egitea ere lortu da; izan ere, abantaila garrantzitsuak ditu. Esaterako, ur-disolbagarritasun txikia duten analitoen banaketa elektrokromatografikoa, selektibitate ugarietako banaketak eta banaketan interakzio polarrak erabiltzea lor daiteke ingurune organikoko CECren kasuan (Szumski, 2013).

Bibliografian aurkitu daiteke kapilarrak paketatzeko teknikei eta materialei buruzko informazio osagarria (Poole, 2003); izan ere, ikasmaterial honen mailatik kanpo geratzen dira hainbat xehetasun. Edonola ere, azaldu behar da zutabe paketatu oso desberdinak daudela CECn erabiltzeko. Dena den, Szumskik azaltzen du CEC teknikak ez duela izan espero zitekeen arrakasta (Szumski, 2013), eta argudioen artean aipatzen du, besteak beste, ezjakintasun praktiko nahiko handia dagoela CEC teknikaren inguruan.

6.2. Fokatze isoelektriko kapilarra (CIEF)

Fokatze isoelektriko kapilarra (CIEF, *capillary isoelectric focusing*) bereizmen handiko elektromigrazio-teknika bat da, eta peptidoak eta proteinak banatzeko erabiltzen da, nagusiki (Markuszewski *et al.*, 2013). 3. kapituluan azaldu den sailkapenaren arabera, egoera geldikorreko elektromigrazio-teknika bat da, orain arte aztertu direnak ez bezala. Teknikaren funtsa honako hau da: konposatuak puntu isoelektrikoaren (pI, *isoelectric point*) arabera banatzen dira. Horregatik da oso aproposa molekula anfoteroen analisirako; esate baterako, proteinak, peptidoak eta aminoazidoak.

Molekula anfotero edo anfolito deritzen konposatuek karga positiboa edo negatiboa izan dezakete, ingurunearen pH-aren arabera. Puntu isoelektrikoari dagokion pH-an, ordea, nulua da konposatu horien karga totala. CIEF aplikatzen denean, pH gradientea osatzen da kapilarrean. Katodoan disoluzio basikoa eta anodoan azidoa jartzen bada —normalean, 20-40 mM den sodio hidroxidoa eta azido fosforikoa, hurrenez hurren—, potentzial-diferentzia aplikatzean, anfolitoen migrazioa gertatzen da, $pH = pI$ betetzen den kapilarraren zonaraino (Hjertén, 1992). Puntu horretaraino migratzen dute; izan ere, konposatuaren karga netoa nulua den tokian amaitzen da migrazioa. Hain zuzen ere, anfolitoa bere puntu isoelektrikoari dagokion pH-a duen zonara iristean, karga total nulua izaten du, eta, hortaz, mugikortasun elektroforetikoa ere bai. Ondorioz, konposatua bertan fokatzen dela esaten da (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Ondoren, fokatutako konposatuak detektagailua dagoen aldera mugiarazi behar dira, mobilizazio deritzon etaparen bidez.

Oro har, CIEF teknikak bi aldaera nagusi ditu: etapa bakarrekota eta etapa anitzekota. Etapa anitzeko CIEFren kasuan (*multi-step*), konposatu guztiak kapilarreko zonetan fokatu direnean, disoluzio guztia mugiarazten da, presio hidraulikoari edo ioien gehikuntzari esker, eta konposatu guztiak detektagailurantz eramaten dira. Presio hidraulikoaren ordez, bi elektrodotan disoluzio basikoa edo azidoa jarrita ere lor daiteke likidoaren migrazioa (Tang eta Lee, 1997). Etapa anitzeko CIEF aplikatzeko, guztiz eliminatu behar da EOFa, eta, horretarako, estaldurak erabili ohi dira kapilarrean —% 1-2 poliakrilamida, adibidez—.

Etapa bakarreko CIEFren kasuan (*single-step*), aldi berean gertatzen dira fokatzea eta mobilizazioa. Kasu horretan, fokatutako zonen garraioa edo mobilizazioa etapa bakarreko CIEFren kasuan azaldu denaren antzekoa da —hau da, presio hidraulikoari edo ioien gehikuntzari esker lortzen da—. Hala ere, bi pausoak aldi berean gertatzen direnez —fokatzea eta zonen garraioa—, ez da beharrezkoa EOFa elimintzeko neurriak hartzea. Azaldu behar da, zer CIEF mota aukeratzen den, desberdina dela elektroforesi-ekipoaren konfigurazioa, eta baita erabili beharreko metodologia ere. Laginaren prestaketari, injekzioari eta fokatze-teknikei buruzko xehetasun praktikoko guztiak bibliografian jasota daude (Markuszewski *et al.*, 2013).

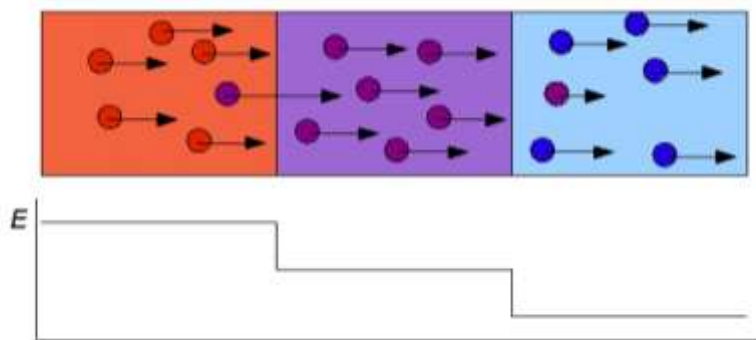
CIEF teknikak arrakasta handia izan du proteinen eta beste konposatu batzuen puntu isoelektrikoak determinatzeko metodoetan (Thomassen *et al.*, 2013); izan ere, proteinen puntu isoelektrikoa 0,03 pH unitatetako prezisioarekin determina daiteke fokatze isoelektrikoari esker (Slais eta Friedl, 1994). Era berean, beste metodoen bidez banatu ezin diren —edo banatzen zailak diren— proteinen analisisian, analisi arrakastatsuak lortu dira CIEF bidez; esaterako,

immunoglobulinak eta hemoglobinak. Disoluzio biologiko diluituen analisisan ere ikusi da egokia dela CIEF teknika.

6.3. Isotakoforesi kapilarra (CITP)

Isotakoforesi kapilarra (CITP, *capillary isotachopheresis*) partikula kargatuak banatzeko erabiltzen den elektromigrazio-teknika bat da. Oro har, ioiak banatzen dira disoluzio erregulatzaile ez-jarraitu batekin. CITP beste analisi-teknika batzuekin elkartu daiteke; esate baterako, NMR, HPLC, CZE eta MS.

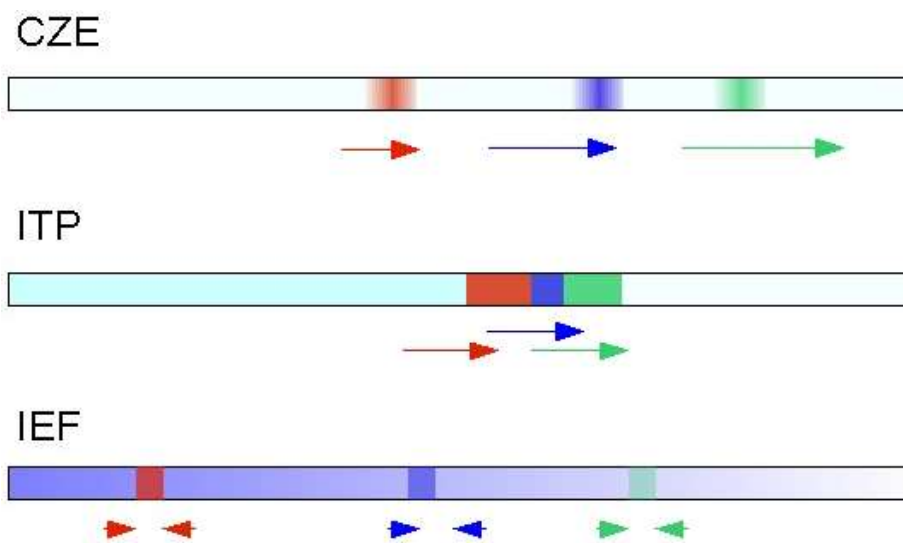
Oinarri teorikoei dagokienez, ioiak mugikortasun elektroforetikoen arabera banatzen dira, era eraginkor batean, baina kontuan izan behar da ezin direla aldi berean banatu katioiak eta anioiak. Kasu horretan, beste eroankortasun elektriko bateko bi disoluzio erregulatzaile erabiltzen dira banaketa-disoluzio gisa. Lagina bi disoluzio horien artean injektatzen da, eta *sandwich* moduan geratzen da. Kapilarraren lehen zatian dagoen elektrolitoak (*leading electrolyte*) detektatu nahi diren ioien karga bera izan behar du, baina aztertu nahi diren ioiek baino mugikortasun elektroforetikoa handiagoa. Amaierako elektrolitoak (*terminating electrolyte*) detektatu nahi diren ioien karga bera izan behar du, baina detektatu nahi diren ioiak baino mugikortasun elektroforetikoa txikiagoa (Poole, 2003; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).



6.1. irudia. Zona bakoitzaren eroankortasun elektriko desberdina denez, korrante elektriko konstante mantentzeko eremu elektrikoak desberdina izan behar du zona bakoitzean. Ioiek abiadura konstantez migratzen dutenez, eremu elektriko egokiko zonan kokatzen dira. Ioi bat gehiegi azkartu eta hurrengo zonan sartzen bada, moteldu egiten da, eta dagokion zonara itzultzen da berririo, eta alderantziz. Irudia: jabego publikoan.

Esaterako, anioiak analizatu nahi badira, disoluzio erregulatzaileak anioi bat izan beharko du hasierako elektrolito (*leading electrolyte*) moduan, eta analizatu nahi diren anioiena baino handiagoa izan behar du anioi horren mugikortasun eraginkorrak. Era berean, aztertu nahi diren anioiak baino mugikortasun eraginkor txikiagoa izan behar du amaierako elektrolitoak.

Ondoren, potentzial-diferentzia aplikatzen da, baina korrante konstantea izatea da baldintza. Egoera geldikorrera iristean molekulen abiadurak konstantea izan behar duenez, konposatu bakoitza eremu elektriko jakin bateko zonan kokatuko da, eta, ondorioz, analito guztiek mugikortasunaren arabera zonan osatuko dituzte. Zona batean dagoen analitoa hurrengoa dagoen zonan sartzen bada, haren abiadura aldatu egiten da, eremu elektrikoa desberdina baita zona horretan, eta bere mugikortasunari dagokion zonara itzultzen da berriz (6.1 irudia). Prozesu hori behin eta berriz errepikatzen da, harik eta ioi guztiak banatzen diren arte (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Garrantzitsua da kontuan hartzea, ioi bakoitzak mugikortasun desberdina badu ere, oro har, multzoa bere osotasunean abiadura jakin batean mugitzen dela. 6.2. irudian ikus daitezke CZE, CITP eta CIEF elektromigrazio-tekniken arteko desberdintasunak.



6.2. irudia. Zonako elektroforesi kapilarra (CZE), isotakoforesi kapilarra (ITP edo CITP) eta fokatze isoelektriko kapilarra (IEF edo CIEF). Irudia: jabego publikoan.

Zona edo eremu horietako bakoitzean dagoen konposatuaren kontzentrazioak konstantea izan behar du, eta, ondorioz, zenbaitetan, zonak estutu egin behar dira, kontzentrazioa konstante mantentzeko. CITPn gertatzen den efektu berezi hori sarritan erabiltzen da beste elektromigrazio-tekniketan —adibidez, MEKC, CZE,

CGE—. Horrela, prekontzentrazio-teknika gisa erabiltzen da isotakoforesi kapilarra, analitoak pilatzeko eta, ondoren, beste elektromigrazio-teknika baten bidez era eraginkorrago batean banatzeko (Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Bestalde, garrantzitsua da azaltzea kontuan hartu behar dela CITP bidez banaketa egokiak lortzeko aztertu nahi diren konposatuen mugikortasun elektroforetiko eraginkorra. Mugikortasun elektroforetikoa hainbat faktoreren menpe dago (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013); besteak beste, disoziazio-maila, pK, ingurunearen pH-a eta temperatura, ioien solbatazioa, erlaxazio-efektua, ioien erradioa eta tamaina, disolbatzailearen konstante dielektrikoa, eta ingurunearen biskositatea. Efektu horiek guztiak kontuan hartu behar dira, eta metodoen optimizazioan ere garrantzitsuak dira.

Detekzioari dagokionez, CITPn lortzen diren seinale edo isotakofrogramak oso bereziak dira. Ioi guztien zonak ia elkarren segidan daudenez, seinaleak eskailera modukoak izaten dira. Analisi kuantitatiboan, eskailera-maila bakoitzaren zabalera hartzen da kontuan.

Isotakoforesia etengabe garatzen ari den teknika bat da, eta, kasu askotan, beste teknikak ez dituzten ezaugarriak eskaintzen ditu. Garrantzitsuenen artean, honako hauek aipatzen dira bibliografian (Kosobucki eta Buszewski, 2013): (1) lagina prestatzea erraza da CITP erabili behar denean; (2) solidoen analisisan ere nahikoak izaten dira laginak prestatzeko teknika sinpleak; (3) nahikoa dira lagin bolumen oso txikiak; (4) disolbatzaile kantitate txikiak erabili behar dira; beraz, teknika *berdea* da; (5) analisi-denbora txikiak —15-20 minutukoak— behar izaten dira; (6) oro har, teknika merkea da. Desabantailen artean, azpimarratu behar da zaila dela hasierako eta amaierako elektrolitoak aukeratzea.

6.4. Elektroforesi kapilarra geletan (CGE)

Geletan egindako elektroforesi kapilarra (CGE, *capillary gel electrophoresis*) ez da asko erabiltzen kimika analitikoan, baina oso garrantzitsua da aplikazio biologikoetan. Proteinak, azido nukleikoak eta bestelako makromolekulak tamainaren arabera banatzeko erabiltzen da normalean, eta abantaila asko eskaintzen ditu, ohiko gel-elektroforesiarekin alderatzen bada (Zhu *et al.*, 2012). Oro har, teknikaren funtsa sinplea da: desnaturalizatutako proteinak edo beste konposatuak tamainaren arabera banatzen dira, bahe polimeriko bati esker.

CGEn, kapilarrak hainbat gel erabiliz betetzen dira, hala nola poliakrilamida, agarosa, hidroxialkilzelulosa eta polibinilalkohola. SDSa ere gehitzen da, konposatuek SDSarekin duten interakzioaren arabera hobeto banatzeko, baina,

banaketa-disoluzioaren izaera biskosoa dela eta, tamainaren arabera banatzen dira konposatuak (Poole, 2003). Aipatutako polimeroek bahe-lana egiten dute, eta, ondorioz, konposatuen migrazio-abiadura aldatzen da. Kargadun konposatuak kapilarrean dagoen polimero-sarean sartzen direnean, oztopoak izaten dituzte aurrera jarraitzeko. Tamaina txikieneko konposatuak azkarrago mugitu daitezke, baina handienak motelagoak dira. Abiaduraren arabera iristen dira detektagailura, eta, horri esker, makromolekulak banatzeko teknika aproposa da CGE.

CGEk lotura zuzena du gel-elektroforesi tradizionalarekin —1. kapituluaz azaldu da—; izan ere, banaketa-mekanismoak antzekoak dira. Hala ere, kapilarrean egiten denean, baditu zenbait abantaila. CGEren automatizazio maila askoz ere handiagoa da, eta, hortaz, analisi gehiago egin daitezke denbora berean. Bestalde, kapilarrean Joule efektuaren eragina txikiagoa denez (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013), 10-100 aldiz handiagoak diren potentzial-diferentziak aplikatu daitezke CGEn. Teknikak automatizazio-maila handia eskaintzen badu ere, desabantaila nagusia kapilarren iraupena da. Gelak oso biskosoa izaten dira, eta zaila izaten da kapilarrak ondo garbitzea. Arazo horri irtenbide partziala eman zaio polimero linealen garapenarekin, erabiltzen errazagoak baitira. Azken horiek, gainera, injekzio elektrozinetikoaz gainera hidrodinamikoak ere onartzen dute, eta kapilarra gutxiago kaltetzen da (Fernández Gutiérrez *et al.*, 2005).

Bereizmenari eta eraginkortasunari dagokionez, CGE eta CZE parekoak dira; izan ere, zonen banaketan oinarritzen diren teknikak dira biak. Selektibitatearen kasuan, CZE gertatzen den moduan, aldaketa asko egin daitezke CGEn, aztertu nahi diren konposatuen banaketa egokia lortzeko. Hautatzaile kiralak, ioiak eta beste agente konplexatzaile batzuk gehitu daitezke disoluzioan, selektibitatea aldatzeko. Gehigarri horiek, disoluzio erregulatzailean ez ezik, gelean dagoen polimeroari kimikoki lotuta ere egon daitezke.

Bibliografia

BREADMORE, Michael C.; SHALLAN, Aliaa I.; RABANES, Heide R.; GSTOETTENMAYR, Daniel; KEYON, Aemi S. Abdul; GASPAS, Andras; DAWOD, Mohamed; QUIRINO, Joselito P.: *Recent Advances in Enhancing the Sensitivity of Electrophoresis and Electrochromatography in Capillaries and Microchips (2010-2012)*, *Electrophoresis*, 34(1), 29-54, 2013.

DITTMANN, M. M.; ROZING, G. P.: *Capillary Electrochromatography – A High Efficiency Micro-Separation Technique*, *Journal of Chromatography A*, 744, 63-74, 1996.

FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Alberto; SEGURA CARRETERO, Antonio; CARRASCO PANCORBO, Alegría: *Fundamentos teóricos y Técnicas de Separación*. In FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Alberto;

SEGURA CARRETERO, Antonio: *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005.

HJERTÉN, Stellan: *Isoelectric Focusing in Capillaries*. In GROSSMAN, Paul J.; COLBURN, Joel C.: *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, 1992.

KOSOBUCKI, Przemyslaw; BUSZEWSKI, Boguslaw: *Isotachophoresis*. In BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal (Ed.): *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUKo Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

MARKUSZEWSKI, Michal J.; BUJAK, Renata; DAGHIR, Emilia: *Capillary Isoelectric Focussing*. In BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal: *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

SCHMID, M. G.: *Chiral Metal-Ion Complexes for Enantioseparation by Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography: A Selective Review*, Journal of Chromatography A, 1267, 10-16, 2012.

SLAIS, K.; FRIEDL, Z.: *Low-Molecular-Mass pI Markers for Isoelectric Focusing*, Journal of Chromatography A, 661(1-2), 249-256, 1994.

SZUMSKI, Michal: *Electrochromatographic Methods: Capillary Electrochromatography*. In BUSZEWSKI, Boguslaw; DZIUBAKIEWICZ, Ewelina; SZUMSKI, Michal (Ed.): *Electromigration Techniques: Theory and Practice*, Springer, Heidelberg, 2013.

TANG, Qing; LEE, Cheng S.: *Effects of Electroosmotic Flow on Zone Mobilization in Capillary Isoelectric Focusing*, Journal of Chromatography A, 781(1-2), 113-118, 1997.

THOMASSEN, Yvonne E.; VAN EIKENHORST, Gerco; VAN DER POL, A.; BAKKER, Wilfried A. M.: *Isoelectric Point Determination of Live Polioviruses by Capillary Isoelectric Focusing with Whole Column Imaging Detection*, Analytical Chemistry, 85(12), 6089-6094, 2013.

ZHU, Zaifang; LU, Joann J.; LIU, Shaorong: *Protein Separation by Capillary Gel Electrophoresis: A Review*, Analytica Chimica Acta, 709, 21-31, 2012.

III. ZATIA

Metodoen garapena

— 7 —

Aholku praktikoak

7.1. Sarrera

Analisi jakin bat egiteko elektromigrazio-teknikak erabiltzea erabakitzen denean, beste hainbat aldagai hartu behar dira kontuan. Metodoaren garapenerako eman beharreko pausoak, noski, lortu nahi den helburuaren araberrakoak izango dira. Oro har, metodo sendoak garatzeko arauari jarraitu behar zaio: metodoa zenbat eta sinpleagoa izan, orduan eta erabilgarriagoa izango da. Kapitulu honetan, elektroforesi kapilarrean eragin handiena duten aldagaiak aztertu eta deskribatuko dira, eta metodoen garapenerako lehen pausoak zein diren azalduko.

7.2. Kapilarrak

Kapilar egokia aukeratzea funtsezkoa da banaketa arrakastatsua lortzeko. Oro har, kapilarren materialak geldoa izan behar du kimikoki eta elektrikoki, argi ultramoreari gardena —ultramore-ikusgai detektagailua erabiltzen bada, behintzat—, sendoa, malgua eta, ahal dela, merkea. 2. kapituluan azaldu den moduan, silize urtuak betetzen ditu baldintza horiek guztiak, eta, hortaz, elektroforesirako kapilarrak egiteko materialik arruntena da. Hala ere, elektromigrazio-tekniken erabilera-esparru zabala dela eta, beste zenbait material ere erabiltzen dira, hala nola pyrex beira eta tefloia (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Kapilarren materiala, barne-diametroa eta luzera dira finkatu beharreko aldagairik garrantzitsuenak.

Kapilarren luzerari dagokionez, aukera asko dago merkatuan eskuragarri; arruntenak 50-100 cm luze izaten dira, baina badira luzera handiago zein

txikiagoak. Oro har, ahalik eta kapilarrik motzena erabili behar da; izan ere, horrela, laburragoa izango da analisi-denbora, eta potentzial-diferentzia handiagoak aplika daitezke. Difusio-arazoak ere murriztu egiten dira kapilar motzetan, baina, analisi konplexuen kasuan, kapilar luzeak behar izaten dira.

Kapilarren barne-diametroaren kasuan, arruntenak 25-100 μm -koak dira. Oro har, barne-diametro txikia duten kapilarrek modu eraginkorragoan xahutzen dute beroa, eta, hortaz, analitoen zonak gutxiago zabaltzen dira. Kasu askotan, kapilarren barne-diametroa handitu nahi bada, elektrolito-disoluzioaren kontzentrazioa txikitu behar izaten da. Kapilarren barne-diametroa aukeratzeko, bi efektu kontrajarri hauek hartu behar dira kontuan: alde batetik, barne-diametroa handia bada, detektagailuaren sentikortasuna hobea da. Bestetik, barne-diametroa handitzen den neurrian, Joule efektuz eratzen den beroa ez da ondo xahutzen; korrontea egonkortzea zailagoa da, eta, ondorioz, errepikakortasun-arazoak ager daitezke.

Kapilarren barne-paretak ere funtzio garrantzitsua du. Gehienetan, estaldurarik gabeko silize urtuzko kapilarrek erabiltzen dira, baina badira hainbat aukera, eskuragarri. Nagusiki, analitoek adsortzio-arazoak dituztenean planteatu behar izaten da estaldura bereziren bat erabiltzea. Literaturan, hainbat estaldura mota deskribatu dira (Poole, 2003; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Bi talde handitan sailkatzen dira: estaldura dinamikoak (*dynamic coating*) eta estaldura iraunkorrak (*permanent coating*). Oro har, zer estaldura erabiltzen den, fluxu elektroosmotikoaren kontrola, eliminazioa edo noranzko-aldaketa lor daiteke.

Estaldura dinamikoak dagokienez, elektrolito-disoluzioan dauden gehigarrien bidez lortzen dira (Poole, 2003). Estaldura dinamikoak adsortzio fisikoan oinarritzen dira, eta, zer gehigarri mota erabiltzen den, bost talde nagusi bereizten dira: 1) metal kationikoak, 2) alkilaminak eta diaminak, 3) beste molekula eta surfaktante kationiko batzuk, 4) polimero neutroak eta ionikoak, eta 5) polielektrolitoak. Bibliografian aurkitu dezake irakurleak bost talde horiei buruzko informazio osagarria (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

Estaldura iraunkorrak lortzeko, estaldura horiek lotura kimikoa —gehienetan kobalentea— izan behar dute kapilarren gainazalarekin. Hidrolisi-erreakzioak direla-eta lotura kobalenteak apurtu daitezkeen arren, oro har, kimikoki lotutako estaldurek denbora gehiago irauten dute. Kasu gehienetan, estaldura iraunkorrek silanizazio-erreakzioak dituzte oinarritzat. Hain zuzen ere, kapilarren gainazaleko silanol-taldeek organosilanoekin erreakziona dezakete, eta Si-O-Si loturak osatu. Organosilano mota asko erabil daitezke, hala nola organotrialkoxisilanoak eta organosilano halogenatuak (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Kimikoki lotutako estaldurek zenbait desabantaila ere badituzte; esaterako, silanizazio-erreakzio bidez lortutako geruzek egonkortasun eskasa dute ingurunearen pH-a alkalinoa denean.

Detekzioaren kasuan, jakina denez, analitoak kapilarrean bertan detektatzen dira. Kapilar arruntei kanpoko poliimida-gainestaldura kentzen zaie detektagailua dagoen puntuan, baina badira beste bi aukera detekzioaren sentikortasuna hobetzeko. 2. kapituluaz azaldu den moduan, kapilarrek burbuila bat izan dezakete (*bubble-cell*) detektagailuaren izpia pasatzen den tokian. Beste kapilar batzuek, berriz, Z forma izaten dute (*z-cell*) puntu horretan, eta helburu bera du. Oro har, burbuila motako kapilarrekin lortutako sentikortasuna hiru aldiz handiagoa izatera irits daiteke, eta ekipoak ez du beste sistema berezirik behar. Z formako detektagailuen kasuan, berriz, interfase berezi bat gehitu behar zaio ekipoari. Lortutako sentikortasuna hamar aldiz handiagoa izatera irits daiteke (Sänger-Van de Griend, 2008).

7.3. Kapilarren aurre-egokitzea eta mantentzea

Beharrezkoa da zenbait egokitze-tratamendu egitea analisi batean erabili behar den kapilarrari. Oro har, hiru tratamendu egin behar dira emaitza egokiak eta errepikakorrak lortzeko: lehen aldiz erabili aurretik egin beharrezkoa, eguneroko tratamendua, eta injekzio batetik bestera egin beharrezkoa. Jakina, literaturan hainbat tratamendu aurkitu badaitezke ere, segidan, oinarritzko prozedurak deskribatuko dira.

Kapilar berria erosi eta lehen aldiz erabili baino lehen, behar-beharrezkoa da barne-pareta aktibatzea. Estaldurarik gabeko silizezko kapilarren kasurako, prozedura orokor asko proposatu dira. Oro har, guztietan, NaOH pasarazi behar da silanol-taldeak aktiba daitezen (Sänger-Van de Griend, 2008). Hiru hauek egokiak dira:

- a) 1 M NaOH (30 min), ura (15 min), lehortu (5 min);
- b) MeOH (5-10 min), 1 M NaOH (5-10 min), ura (5-10 min), elektrolito-disoluzioa (20 min); edo
- c) 1 M NaOH (5 min), ura (5 min), elektrolito-disoluzioa (20-30 min).

Beti ere, aztertu behar da ba ote dagoen beste aholku zehatzik erositako kapilar jakin horrentzat; esate baterako, zenbait gainestaldura hondatu egin daitezke sodio hidroxidoarekin. Era berean, ingurune organikoko CE egin behar denean, ez da gomendatzen ur-disoluzioak pasaraztea.

Bigarren aurre-egokitze tratamendua egunero egin behar dena da. Hain zuzen ere, errutinako analisiak aurrera eraman behar direnean, funtsezkoa da kapilarra bere onera ekartzea egunaren hasieran. Tratamenduaz gainera, lehen injekzio bat egitea ere aholkatzen da, ekipoa prest egon dadin analisirako. Egokitzeari dagokionez, prozedura orokor hauetako bati jarraitzea proposatzen da (Altria, 1996; Ahuja, 2008):

a) 0,1 M NaOH (10 min), ura (10 min), elektrolito-disoluzioa (10 min); edo

b) 0,1 M NaOH (15 min), ura (10 min), lehortu (5 min).

Oro har, prozedura gehienek 0,1 M den NaOH pasaraztea proposatzen dute. Dena den, elektroforesia ingurune azidoan egin behar denean, gomendatzen da % 10 den azido fosforikoa pasaraztea sodio hidroxidoaren ordeztuz, pH aldaketaren arazoak saihesteko.

Bestalde, egun berean egiten diren injekzioen artean ere, beharrezkoa da kapilarra garbitzea (*pre-run rinsing*). Etapa horri kapilarra aurre-egokitzea ere baderitza (*preconditioning*). Pauso hori laburra da, baina behar-beharrezkoa, EOF errepikakorrek eta konstanteak lortu nahi badira. Deskribatutako prozedurak pauso hauetan oinarritzen dira:

a) MeOH edo azetonitriloa (2 min), 0,1 M NaOH (2 min), elektrolito-disoluzioa (2 min); edo

b) 0,1 M (2-3 min), elektrolito-disoluzioa (2-3 min).

Kasu horretan ere, BGE azidoak erabili behar direnean, azido fosforikoa pasarazi behar da sodio hidroxidoaren ordeztuz. Edonola ere, kontuan izan proposatutako denborak matrizearen araberakoak izango direla. Matrize konplexuen kasuan, denbora luzeagoak aholkatzen dira, kapilarra ondo garbitzeko. Zenbait egilek (Altria, 1996) aholkatzen dute analisi bakoitzaren ondoren ere garbiketa egitea, 2-3 minutuz ura pasaraziz (*post-run*).

Garbiketak disolbatzaile organikoekin egiten direnean, maiz kontrolatu behar da kapilarraren egoera; izan ere, disolbatzaile batzuek —azetonitriloa eta formamida, besteak beste— kapilarraren poliimida-gainestaldura honda dezakete. Gainestaldura hondatzen bada, poliimida-arrastoek buxadura eragin dezakete kapilarra elektrodetik ateratzerakoan.

Kapilarra gordetzeko ere, komeni da tratamendua egitea. Egun batetik bestera gordetzeko, BGE pasarazi behar da (10 min). Gainera, BGE duen bial batean

murgildu behar da kapilarraren mutur bakoitza, ondo manten dadin egun batetik bestera. Denbora luzez gorde behar denean, aldiz, NaOH eta ura erabili behar dira, eta, ondoren, haizea pasaraziz lehortu behar da. Azaldu diren aurre-egokitze eta mantentzea eginez gero, asko luza daiteke kapilarraren bizitza erabilgarria, eta hobe izango da analisisen errepikakortasuna.

Kapilarraren bi muturrak maiz kontrolatu behar dira. Erositako kapilarrek poliimida-gainestalduraren zati bat kendua izaten dute muturretan, baina muturretako poliimida kaltetu egin daiteke analisi askoren ondoren. Hori zaintzea beharrezkoa da, BGEan disolbatzaile organikoak daudenean, batez ere; esaterako, azetonitriloa.

Kapilarraren historia ezagutzea ere interesgarria da; izan ere, zenbait konposatu barne-paretetan adsorba daitezke. Konposatu horiek behin betiko eralda dezakete kapilarra, eta migrazio-abiadurak alda daitezke. Aholku interesgarria da kapilar bakoitza BGE mota bakarrarekin erabiltzea eta BGE azidoak eta basikoak kapilar berarekin ez erabiltzea.

7.4. Injekzioa

2. kapituluan azaldu dira zer sistema dituzten elektroforesi kapilarreko ekipoek laginak injektatzeko, eta zehatz-mehatz aztertuta daude bibliografian (Poole, 2003; Lopez-Gazpio eta Millán, 2013). Injekzioaren atal praktikoari eutsiz, azaldu behar da ekipoen automatizazio-maila handiari esker, % 1eko zehaztasuna lortzen dela injekzioaren pausoan. Oro har, injekzio hidrodinamikoa da injekzio motarik arruntena, eta, bestelako arrazoirik ez badago, hori izango da aukeratu beharreko sistema. Beste aukera bat injekzio elektrozinetikoa erabiltzea da, baina erreproduzigarritasun eskasagoak lortu ohi dira. Injekzioaren zehaztasuna hobetzeko, zenbait ohar hartu behar dira kontuan. Segidan laburtuko dira bibliografian jasota dauden aholkuetako batzuk (Altria, 1996; Sanger-Van de Griend, 2008):

a) Injekzio-denbora: zehaztasun egokia lortzeko, 5-10 segundoko injekzio-denborak erabili behar dira. 3 segundo azpiko injekzioekin, zehaztasun-arazoak ager daitezke, eta injekzio-denbora luzeek, aldiz, banda zabalegiak agertzea eragin dezakete.

b) Barne-patroia: zenbait kasutan, gomendagarria da barne-patroia erabiltzea, injekzioan gerta daitezkeen aldaketak kontrolatzeko. Barne-patroia, gainera, baliagarria izan daiteke kuantifikazio-prozesuaren zehaztasuna hobetzeko,

kromatografian gertatzen den bezala. Aurrerago, barne-patroiari buruzko xehetasun gehiago deskribatuko dira.

c) Biskositatea: tenperatura-aldaketak direla eta, bialen biskositatea alda daiteke. Ondorioz, injektatutako lagin kantitateak alda daitezke, eta zehaztasuna galtzen da. Oro har, ekipoek badituzte tenperatura-kontrolerako sistemak, baina ziurtatu behar da lagin guztiak tenperatura berean daudela.

d) Bialen maila: bialen likido-maila desberdina bada —esate baterako, bi elektrodoetan dauden bialena—, fluxu hidrodinamikoa sortzen da, eta injekzio-arazoak ager daitezke. Arretaz begiratu behar da bial guztiek likido-maila bera izatea eta disolbatzailearen lurrunketarik ez gertatzea.

7.5. Beste aldagai batzuk

Segidan, edozein elektromigrazio-metodo aplikatu behar denean jarraitu beharreko zenbait aholku biltzen dira, eta, era berean, zaindu beharreko ekipoaren elementuak aipatuko dira.

a) Elektrodoak: oso garrantzitsua da elektrodoak sarritan garbitzea. Kapilarraren elektrodoa orratz baten modukoa da; orratza hutsa dago, eta handik pasatzen da kapilarraren muturra. Askotan ikusten dira hauspeakin-pilaketak kanpoko aldean, batez ere *inlet* elektrodoan. Gomendatzen da gutxienez astean behin garbitzea elektrodo hori (Sänger-Van de Griend, 2008). Elektrodoa garbitzeko, pauso hauei jarraitu behar zaie: 1) kapilarra elektrodetik atera, 2) ur destilatua pasarazi, 3) metanola edo azetona pasarazi, 4) aire konprimatua erabiliz elektrodoa lehortu, 5) buxadurarik ba ote dagoen aztertu, eta 6) kapilarra berriro elektrodoan sartu.

Buxadurarik badago, prozedura hauetakoren bati jarraitu behar zaio, kalteraren arabera: 1) elektrodoa metanoletan sartu, eta ultrasonikazioa aplikatu, 15-30 minutuz, 2) buxada kentzen saiatu, burdin hari fin batekin edo kapilar zahar batekin, kontu handiz. Buxadura larrien kasuan, bi prozedura hauek erabiltzea gomendatzen dut, baina betiere kontu handiz, bai baitago elektrodoa hondatzeko arriskua. Elektrodoaren orratzaren barruan poliimida-buxadura badago, orratza erre daiteke metxero batekin, poliimida kiskaltzeko. Ondoren, lehenago aipatutako garbiketak egin behar izaten dira, metanolarekin edo hari fin batekin. Kasurik larrienetan bakarrik, elektrodoaren plastikozko zatiak kendu (elektrodoak torloju txiki batzuk ditu horretarako), eta nahaste kromikoan utz

daiteke elektrodoaren orratza —ordu batzuk—. Adi azken prozedura horrekin; izan ere, buxadura oso larrien kasuan bakarrik egin behar da. Hori saihesteko, egokiagoa da elektrodoen garbiketa zorrotza egitea.

b) Temperatura: CE ekipoek temperatura mantentzeko sistemak izaten dituzte, baina, normalean, kapilarraren kaseta dagoen zona bakarrik egoten da termostatizatuta. Laginen bialak dauden tokiak temperatura kontrolik ez badu, desberdina izan daiteke kapilarraren eta laginen temperatura, eta, ondorioz, biskositateak desberdinak dira. Normalean, 20-50 °C-ko temperaturan egin daitezke analisiak, baina, beste arrazoirik ezean, giro-temperaturan lan egin ohi da.

c) Bialak aldatzea: gomendagarria da BGE duten bialak sarritan aldatzea; izan ere, elektrolisi-erreakzioen ondorioz eratzen diren azpiproduktuek erreproduzigarritasun-arazoak eragin ditzakete. Ez dago zehazki finkatuta zenbat analisi egin daitezkeen BGE bial berak erabiliz, baina, 5. injekzioetik aurrera, migrazio-denboren aldaketak gerta daitezke.

7.6. Barne-patroia eta azalera normalizatua

Elektroforesi kapilarrean oinarritzen diren tekniketean, ezinbestekoa da barne-patroia erabiltzea, zehaztasuna hobetzeko (Hasemann *et al.*, 2007). Barne-patroiari esker, kontrolatu ezin daitezkeen parametroetan gertatzen diren aldakuntzak zuzendu daitezke; esaterako, injekzio-bolumena, temperatura, biskositatea, bialen likido-maila desberdinak, disolbatzailearen lurrunketa, eta abar (Mayer, 2001). Bestalde, aipatu den bezala, barne-patroiak analitoen antzeko migrazio-denbora izan behar du, fluxu elektroosmotikoan gertatzen diren aldakuntzak era egokiagoan orekatzeko. Bibliografian frogatuta dago barne-patroiak hobekuntza adierazgarriak ekartzen dituela zehaztasun aldetik; adibidez, % 10eko RSDtik (RSD, *relative standard deviation*) % 1eko RSDra hobetzea lortu zen zehaztasuna (Schaeper eta Sepaniak, 2000), eta injekzioaren errepikakortasuna % 1,88-2,38 RSDra murriztea lortu (Boonkerd *et al.*, 1994).

Azalera normalizatuen erabilerari dagokionez, kontuan hartu behar da elektroforesi kapilarrean abiadura desberdina duela analito bakoitzak detektagailutik igarotzerakoan, gainerako kromatografia-teknikekin gertatzen ez den bezala. Horren arrazoia zera da: detektagailua kapilarrean bertan dago. Beste tekniketean, aldiz, zutabearen amaieran dago detektagailua; alegia, banaketa gertatu ondoren. Ezaugarri horren ondorioz, elektroforesian, analito berak seinale

desberdinak ematen ditu, analitoaren abiadura aldatzen bada. 4. kapituluaren azaldu den moduan, tenperaturaren eta fluxu elektroosmotikoaren aldakuntzen ondorioz gerta daiteke abiadura-aldaketa hori, besteak beste (Altria, 1996). Azalera normalizatua kalkulatzeko, pikoaren azalera bere migrazio-denborarekin zatitzen da, $A_{n,i} = A_i/t_{m,i}$ formularen bidez (Altria, 1993). Bibliografian azaltzen den gisara (Mayer, 2001) beti ez da beharrezkoa azalera normalizatuak erabiltzea, zenbaitetan ez baitute hobekuntzarik ekartzen —kalterik ere ez—, eta antzeko balioak lortzen dira azalera normalizatuarekin edo haiek gabe (Altria eta Fabre, 1995). Beste kasu batzuetan, aldiz, nahitaez erabili behar dira azalera normalizatuak; hain zuzen ere:

- 1) migrazio-denborearen aldakuntza handia denean (Altria, 1993),
- 2) ezpurutasunak azalaren erlaziotik kuantifikatu nahi direnean (Altria, 1996),
- 3) banaketa kiraletan (Altria *et al.*, 1998), eta
- 4) azalaren konparaketa egin nahi denean elektroferograma berean (Pruñonosa *et al.*, 1992).

Azalera normalizatuen eta barne-patroiaren erabilera aldi berean egiteko, analitoaren azalera normalizatuaren eta barne-patroiaren azalera normalizatuaren erlazioarekiko irudikatzen da analitoaren kontzentrazioa kalibraketan; alegia, $A_{n,i}/A_{n,bp} = (A_i/t_{m,i}) / (A_{bp}/t_{m,bp})$. Adibide bat azaltzarren, demagun balio hauek lortzen direla $C_i = 10$ mg/L kontzentrazioko estandar-disoluzio baten analisiari dagokion kromatograman:

- analitoaren azalera: 10 unitate arbitrario;
- analitoaren migrazio-denbora: 5 min;
- barne-patroiaren azalera: 20 unitate arbitrario; eta
- barne-patroiaren migrazio-denbora: 8 min.

Kasu horretan, A_n/A_{bp} erlazioa $(10/5)/(20/8) = 0,8$ izango da. Kalibraketa zuzena irudikatzeko, hortaz, 0,8 balioa dagokio $C_i = 10$ mg/L kontzentrazioari.

7.7. Beste aholku batzuk

Kapituluari amaiera emateko, bibliografian jasotako zenbait gomendio laburtuko dira (Altria, 1996), baita esperientzia pertsonaletik ikasi ditudan prozedura batzuk ere. Analista orok jarraitu beharrekoak, emaitza arrakastatsu eta errepikakorrek lortzeko:

- 1) Erabili kalitate oneko errektiboak. Erabili gutxienez bi aldiz destilatutako ura eta HPLCra ko maila duten disolbatzaileak.
- 2) Gorde BGE disoluzioak modu egokian. pH-a doitzea beharrezkoa bada, egiaztatu pH-a egokia dela, analisiekin hasi aurretik. Beste aukera bat da BGEa pH-a doitu gabe prestatzea eta erabili behar den une berean doitzea. Elektrolito-disoluzioak hozkailuan gorde behar izaten dira. Kontuz SDS duten disoluzioekin; izan ere, hauspeakinak osa daitezke.
- 3) Elektroforesi-ekipoan injektatu behar diren disoluzio guztiak iragazi egin behar dira. Iragazki mota asko daude merkatuan; beraz, ziurtatu egokia dela aztertu nahi den analitoekin eta laginekin erabiltzeko. Beste arrazoirik ezean, 0,45 mikrako nylonezko iragazkiak erabil daitezke, baina kontuz.
- 4) Zaindu eta gorde kapilarrek modu egokian. Aurrez aipatu dira kapilarren tratamendurako prozedurak. Denbora luzez erabili behar ez bada, ziurtatu ekipoan bertan airea pasaraziz lehortu dela.
- 5) Sistema martxan jarri aurretik, egin zuri baten analisisa. Normalean, lehen injektzio bat behar du, ekipoak egonkortzeko.
- 6) Detektagailuko UV lanparak denbora behar du egonkortzeko; beraz, analisiak egin aurretik, beharrezkoa da 15-30 minutuz berotzen uztea.
- 7) Utzi laginen eta elektrolito-disoluzioen tenperatura egonkortzen; bereziki, hozkailuan gorde badira.
- 8) Garbitu sarritan ekipoa batez ere elektrodoena. Sarritan, gatzen hauspeakinak agertzen dira elektrodoan, eta kapilarra edo elektrodoak honda daitezke.
- 9) Egin sarritan zurien analisisa. Gomendagarria da, bestalde, konposatu ezagun bat injektatzea, pikoia beti migrazio-denbora berean erregistratzen dela kontrolatzeko.
- 10) Egin materialaren garbiketa zorrotza, beste edozein teknika analitikotan bezala.
- 11) Aldatu, sarritan, BGE duten bialak, elektrolito-disoluzioak hondatu egiten baitira elektrolisiaren ondorioz, pixkanaka.

12) Kontuan izan zer metodorekin erabili den kapilar bakoitza. BGE desberdinak erabili behar badira aldi berean, erabili kapilar desberdinak.

Bibliografia

AHUJA, Satinder; JIMIDAR, M. Ilias: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2008.

ALTRIA, Kevin D.: *Essential Peak Area Normalisation in Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 35, 177-182, 1993.

ALTRIA, Kevin D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Humana Press, New Jersey, 1996.

ALTRIA, Kevin D.; FABRE, H.: *Approaches to Optimisation of Precision in Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, 40, 313-320, 1995.

ALTRIA, Kevin D.; McLEAN, R.: *Development and Optimisation of a Generic Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method to Support Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18, 807-813, 1998.

BOONKERD, S.; DETAEVERNIER, M.R.; MICHOTTE, Y.: *Use of Capillary Electrophoresis for the Determination of Vitamins of the B Group in Pharmaceutical Preparations*, Journal of Chromatography A, 670, 209-214, 1994.

HASEMANN, P.; TER BALK, M.; WÄTZIG, H.: *Analysis of Substances to be Used as Internal Standards in MEKC*, Electrophoresis, 28, 1798-1804, 2007.

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

MAYER, B.X.: *How to Increase Precision in Capillary Electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 907, 21-37, 2001.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

PRUÑONOSA, J.; OBACH, R.; DIEZ-GASCÓN, A.; GOUESCLOU, L.: *Comparison of High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Capillary Electrophoresis for the Determination of Cicletanine in Plasma*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 581, 219-226, 1992.

SÄNGER-VAN DE GRIEND, Cari E.: *General Considerations to Improve Performance of CE Methods*. In AHUJA, Satinder; JIMIDAR, M. Ilias: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2008.

SCHAEFER, J.P.; SEPANIAK, M.J.: *Parameters Affecting Reproducibility in Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 21, 1421-1429, 2000.

— 8 —

Metodoen garapena

8.1. Lehen erabakiak

CE metodo bat garatzen hasi aurretik, edozein metodo kromatografikorekin gertatzen den moduan, aztertu nahi diren konposatuei buruzko datuak lortu behar dira. Metodo sendo bat garatu nahi bada, hainbat erabaki hartu behar dira laborategian sartu aurretik. Oro har, ondo ezagutu behar dira CE instrumentuaren aplikazioak eta erabilera, eta literatura zientifikoan dagoen informazioa aztertu behar da. Kasu askotan, lehen parametroak finka daitezke analito horiek edo antzekoak direnak analizatzeko metodoak oinarritzat hartuta. Metodo bat zerotik hastea benetan lan izugarria izan daiteke. Metodoaren helburuak ere argi finkatu behar dira: metodoa kuantitatiboa den, kualitatiboa den, eta abar. Metodoric egokiena elektromigrazio-teknikak direla erabaki bada, kontuan izan behar da aldaera asko dituela elektromigrazioak —ikasmaterialaren II. zatian aztertu dira—. Oso modu orokorrean, 8.1. taulako informazioa lagungarria izan daiteke lehen erabakia hartzerakoan.

8.1. taula. Elektromigrazio-teknikak: lehen erabakia hartzeko informazioa.

| Teknika | Analitoak |
|-------------|--|
| CZE | Konposatu organiko txiki ionizagarriak, ioi ez-organikoak. |
| MEKC | Konposatu organiko txiki ionizagarriak edo neutroak. |
| CEC | Konposatu organiko txiki ionizagarriak edo neutroak. |
| CGE | Proteinak, peptidoak, oligonukleotidoak, RNA, DNA |
| CIEF | Proteinak, peptidoak. |
| CITF | Ioi txikiak (aurre-kontzentrazioarako). |
| NACE/NAMEKC | Uretan disolbatu ezin diren konposatuak. |

8.2. Hasiera

CE teknikak aplikatu aurretik, garrantzitsua da aztertu nahi diren konposatuaren ezaugarri fisiko-kimiko batzuk ezagutzea. Gehienak erraz lor daitezke literatura zientifikoan, eta lagungarriak dira metodoen garapenerako. Sarean bilaketak egiteko, lagungarria da <https://scholar.google.es> bilatzailea erabiltzea. Beharrezkoak dira, besteak beste (Altria, 1996):

- 1) Konposatuaren ur-disolbagarritasuna.
- 2) Konposatua disolbatzeko egokiak diren disolbatzaileak. Ur-disoluzioan disolbatadin beharrezkoa den disolbatzaile organiko kantitate txikiena. Hasieran, gomendagarria da disolbatzaile organikorik ez erabiltzea eta beharrezkoa izanez gero gehitzea.
- 3) Konposatuaren pK_a .
- 4) Ultramore-ikusgai espektroari buruzko informazioa (detekziorako), detektagailuko uhin-luzera finkatzeko.

Datu horiek HPLC metodoak garatzeko ere behar izaten dira; hortaz, elektromigrazio-tekniken kasuan, antzeko prozedura bati jarraitu behar zaio. Oro har, metodoen garapenerako, 10 puntu hauetan zerrendatu diren aldagaiak optimizatu eta finkatu behar izaten dira (ordena honetan egitekoak):

- 1) Elektrolito mota/BGE
- 2) Kapilarraren dimentsioak
- 3) Tenperatura
- 4) Detektagailuaren uhin-luzera
- 5) Laginaren kontzentrazioa/diluzioak
- 6) Potentzial-diferentzia / korrontea
- 7) Egokitze-zikloak
- 8) Injekzioa mota
- 9) Zehaztasuna optimizatu
- 10) Sentikortasuna optimizatu

Puntu horietako batzuk aurreko kapituluan azaldu dira jada (kapilarraren dimentsioak, tenperatura, egokitze-zikloak, injekzioa). Segidan, guztietan zailena izan daitekeen erabakiari buruzko argibideak emango dira: elektrolitoaren aukeraketa eta, horrekin batera, CE teknika mota (Lopez-Gazpio eta Millán, 2013).

8.3. Elektrolitoaren aukeraketa

CEn erabiltzen diren elektrolito-disoluzioak, BGE, oso sinpleak izan daitezke, eta bi osagai bakarrik izan: elektrolitoa eta disolbatzailea. Beste kasu askotan, osagai asko izan ditzakete —surfaktantea, disolbatzaile organikoak eta beste hainbat gehigarri—, eta beharrezkoa izan daiteke pH-a doitzea (8.2. taula). Betiere, garrantzitsua da egiaztatzea BGEEn disolbagarria dela, lehen injekzioa egin aurretik analitoarentzat espero den kontzentrazioan. Horrela ez bada, gerta daiteke kapilarrean hauspeatzea, eta, orduan, analisisa ez da posible izango.

8.2. taula. Elektrolito-disoluzioaren osagaietako batzuk (Altria, 1996).

| Aldagaia | Tartea | Efektua, handitzen denean |
|-------------------------|--------------|--|
| Elektrolitoa | 5-200 mM | Korrontea eta EOFa handitu. |
| pH-a | 1,5-11,5 | EOFa handitu, azidoen ionizazioa handitu, baseen ionizazioa txikitu. |
| Surfaktantea | 10-200 mM | Atxikipena handitu, EOFa txikitu, selektibitate-aldaketak. |
| Disolbatzaile organikoa | % 1-30 (v/v) | Disolbagarritasuna handitu, EOFa txikitu (azetonitriloaren kasuan izan ezik), selektibitatea aldatu. |
| Urea | 1-7 M | Migrazio-denborak handitu, konposatu hidrofoboaren disolbagarritasuna handitu. |
| Ioi-parekatzaileak | 1-20 mM | Selektibitatea aldatu, ioien karga txikitu. |
| Aminak | 1-50 mM | Gainazal-karga txikitu. |
| Ziklodextrinak | 1-100 mM | Biskositatea handitu, EOFa txikitu, konplexuak osa daitezke. |
| Surfaktante kationikoak | 1-20 mM | EOFaren noranzkoa aldatu. |

Oro har, lehen pausuan, hiru talde hauetakoren batean sailkatu behar da aztertu nahi den analitoa:

- 1) Analito kationikoa: CZE, A disoluzioa.
- 2) Analito anionikoa: CZE, B disoluzioa.
- 3) Analito neutroa: MEKC, C disoluzioa.

Analito neutroak eta anioiak/katioiak aldi berean kuantifikatu nahi badira, jakina, C disoluziora jo behar da. Bibliografiaren arabera (Altria, 1996; Poole, 2003; Sanger-Van de Griend, 2008), hasierako A, B eta C disoluzio horiek desberdinak izan daitezke. Segidan, haietariko batzuk proposatzen dira:

A disoluzioa:

- 1) 25 mM sodio dihidrogenofosfato, pH = 2,5 (azido fosforikoarekin doitu).

B disoluzioa:

- 1) 25 mM borax (sodio tetraborato dekahidratatua), pH = 9,0 edo pH = 9,3.

C disoluzioa:

- 1) 25 mM borax, 25 mM SDS, pH = 9,3.
- 2) 20 mM sodio hidrogenofosfato, 10 mM borax, 50 mM SDS.
- 3) 30 mM borax, 40 mM SDS, pH = 9,2.

B eta C disoluzioak erabiltzen direnean, seinale negatibo bat erregistratu ohi da elektroferogramaren hasieran: EOFa iritsi dela adierazten du. Bestalde, hasierako baldintza moduan, parametro hauek aholkatzen dira, baina, jakina, oso gomendio orokorrak dira, eta kasuan kasu aztertu beharrekoak:

- 1) Analisi-denbora: 30 min.
- 2) Potentzial-diferentzia: 25 kV, 30 kV.
- 3) Kapilarra: 56 cm-ko luzera eraginkorra (50 μm -ko barne-diametroa).
- 4) Detektagailuko uhin-luzera: 200 nm.
- 5) Temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$.

Hasierako baldintza horiek guztiak kontuan hartuta, analitoen seinaleak elektroferograman erregistratu badira, metodoa optimizatzeko unea da. Segidan, CZE eta MEKC metodoen garapena aztertuko da, sakonago; izan ere, gehien erabiltzen diren teknikak dira, eta erabilera anitzekoak.

8.4. CZE metodoen optimizazioa

Azaldu den moduan, CZE teknikari esker, konposatu ionizagarri asko analiza daitezke. Aurreko atalean, A eta B disoluzioak proposatu dira katioien eta anioien analisirako, hurrenez hurren. Oro har, gomendatzen da borax- eta fosfato-disoluzio erregulatzaileak erabiltzea, hau da, pH-ari dagokionez, 2-9 tartea aztertzea.

Aipatutako horietaz gainera, beste hainbat elektrolito-disoluzio erabil daitezke — batzuk prestatuta eros daitezke—. 3. kapituluko, 3.2. taulan, hainbat disoluzio erregulatzaile jasota daude. Oro har, aholkatzen da aztertu nahi den analitoaren pK_a -ren inguruan egotea BGEaren pH balioa —edo unitate bat handiagoa (Altria, 1996)—. Elektroferograman analito guztien seinaleak erregistratu badira, hainbat aldagai egokitu behar dira CZEen, metodoa optimizatzeko. CZEko banaketa karga/tamaina erlazioan oinarritzen da, eta hainbat eratara alda daiteke erlazio hori. Besteak beste, elektrolito-disoluzioaren parametro hauek analitoen karga eraginkorra alda dezakete:

- 1) pH-a,
- 2) indar ionikoa,
- 3) konplexuen eraketa, eta
- 4) ioi-parekatzaileak.

Elektrolitoaren kontzentrazioari dagokionez, aholkatzen da kontzentrazio txikiarekin hasia —25 mM inguru—, eta, banaketa egokia ez bada, pixakanaka handitzea. Proba bakoitzean, 25 mM inguru gehitu daiteke kontzentrazioa, esate baterako.

8.5. MEKC metodoen optimizazioa

MEKC metodoak erabilera askokoak dira; izan ere, konposatu neutroak, anioiak eta katioiak aldi berean banatzeko erabil daitezke. Lehenik eta behin, azaldu behar da MEKC metodoak eta HPLCn oinarritutakoak antzekoak direla; beraz, likido-kromatografian eskarmentua duen analista erraz ohitzen da MEKCn oinarritutako metodoetara.

8.3. atalean azaldu den moduan, aholkatzen da hasierako baldintza hauek finkatzea: 30 mM borax, 40 mM SDS eta pH = 9,2. Hasieran, egokia da 25-30 kV-eko potentzial-diferentzia eta 3 segundoko injekzio hidrodinamikoa —50 mbar— aplikatzea. Kapilarrari dagokionez, 56 cm-ko luzera eraginkorra eta 50 μ m-ko barne-diametroa duena erabil daiteke, luzera laburragoak ere egokiak izan badaitezke ere (Poole, 2003). Harrigarria badirudi ere, proposatutako metodo hori —edo oso antzekoak— egokia da bibliografian dauden MEKC analisisien % 30 egiteko, gutxi gorabehera (Palmer, 2003).

Oro har, 4. kapitulan azaldu den bezala, MEKC banaketak analitoen ahalmen-faktorearen (k') araberakoak dira. Hortaz, ahalmen-faktoreak aztertu behar dira, banaketak optimizatzeko. Aipatutako elektrolito-disoluzio orokorrarekin lehen

injekzioa egin ondoren, hiru kasu gerta daitezke: 1) banaketa optimoa lortzea, 2) ahalmen-faktoreak txikiegiak izatea, edo 3) ahalmen-faktoreak handiegiak izatea.

Analitoen ahalmen-faktoreak txikiegiak badira, tontor gehienak elektroferogramaren hasieran pilatuko dira, eta ez dira banatuko. Kasu horretan, proposamen hauek aholkatzen dira (Palmer, 2003):

- 1) Surfaktante-kontzentrazioa handitu. Kontuan izan, Joule efektua dela eta, zaila dela 150 mM baino kontzentrazio handiagoekin lan egitea.
- 2) pH-a edo elektrolitoa aldatu, konposatuen ionizazioa saihesteko.
- 3) Ioi-parekatzailearen bat gehitu.
- 4) Surfaktante kationikoa erabili, SDSren ordeez.
- 5) Tenperatura aldatzea edo gehigarri organikoak gehitzea aztertu.

Analitoen ahalmen-faktoreak handiegiak badira, migrazio-denborak luzeegiak izango dira, eta, gainera, posible da tontorren arteko bereizmena eskasa izatea. Normalean, horixe gertatzen da konposatu hidrofoboek kasuan; izan ere, oso interakzio sendoak dituzte mizelekin. Azaldu den bezala, SDS mizelekiko interakzioa zenbat eta handiagoa izan, orduan eta handiagoa da ahalmen-faktorea. Puntu hauek aztertu behar dira (Palmer, 2003):

- 1) Surfaktante-kontzentrazioa txikitu. Kontuan izan 20 mM dela ohiko kontzentrazio txikiena, CMCtik gorako kontzentrazioa behar delako mizelak osatzeko.
- 2) Disolbatzaile organikoak gehitu. Azetonitriloa eta metanola % 20-30 kontzentrazioaraino gehitu daitezke. Azetonitriloak eragin txikia du EOFean, baina metanolak EOFa txikitzen du.
- 3) Behazun-gatzak gehitu.
- 4) Ziklodextrinak erabili, 10-30 mM tartean.

Ahalmen-faktore egokiak lortu ondoren, selektibitatea optimizatu behar izaten da; izan ere, migrazio-denbora egokian egon daitezke analitoak, baina gerta daiteke tontorrek ondo bereizi gabe egotea. Aholku hauek proposatzen dira selektibitatea optimizatzeko (Altria, 1996):

- 1) Kapilarraren dimentsioak aldatu —luzera edota barne-diametroa—.
- 2) Aplikatutako potentzial-diferentzia aldatu.
- 3) EOFa aldatu —pH-a aldatuz, edo gehigarriekin—.
- 4) Beste surfaktante bat erabili.

Bibliografia

ALTRIA, Kevin D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Humana Press, New Jersey, 1996

LOPEZ-GAZPIO, Josu; MILLÁN, Esmeralda: *Elektroforesi Kapilarraren Oinarriak*, EHUko Argitalpen Zerbitzua, Leioa, 2013.

PALMER, C. P.: *Method Development for Micellar Electrokinetic Chromatography*, Chromatographia Supplement, 57, S333-S337, 2003.

POOLE, Colin F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

SÄNGER-VAN DE GRIEND, Cari E.: *General Considerations to Improve Performance of CE Methods*. In AHUJA, Satinder; JIMIDAR, M. Ilias: *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2008.