

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Departament d'Enginyeria Química E.T.S.E.I.B.

**ANÀLISI I CONTROL DE CIANURS I
PRODUCTES RELACIONATS
PRESENTS EN AIGÜES RESIDUALS I
DISSOLUCIONS DE PROCESSOS
INDUSTRIALS MITJANÇANT
ELECTROFORESI CAPIL·LAR**

Autor: Vivenç Martí i Gregorio
Director: Fernando Canal Bienzobas

Barcelona, novembre de 1996

PRIMERA PART:

FONAMENTS I METODOLOGIA

CAPÍTOL 1:

FONAMENTS DE L'ANÀLISI PER ELECTROFORESI CAPIL.LAR

1.1. INSTRUMENTACIÓ EN ELECTROFORESI CAPIL.LAR

L'esquema general d'un aparell d'electroforesi capil.lar es representa a la figura 1.1.

La instrumentació fonamental d'aquests aparells consta d'un tub capil.lar (1) amb un detector on-column intercalat (2) i els extrems sumergits en dos recipients (3) que contenen una dissolució reguladora de pH (tampó) que està en contacte amb una font contínua d'alt voltatge (4) mitjançant uns elèctrodes.

L'aparell també consta d'un sistema d'injecció que permet introduir discontinuament la mostra a analitzar (5) i d'un sistema per introduir diferents electròlits dins del capil.lar (sistema de "flushing") (6).

L'anàlisi de la mostra mitjançant aquest aparell es realitza, un cop s'ha acondicionat i estabilitzat degudament el capil.lar, separant del recipient adequat (3) un extrem del capil.lar, injectant la mostra, tornant a sumergir l'extrem en el recipient i aplicant el voltatge de separació.

Un cop s'ha injectat la mostra i s'ha aplicat el voltatge, els components de la mostra es van separant segons les seves mobilitats elèctriques i van passant per una finestra oberta davant del detector el qual envia els senyals a un sistema de recollida de dades (7) i dóna lloc a un registre de pics, similar als obtinguts en HPGC i en HPLC, que s'anomena electroforograma (8).

Els capil.lars més utilitzats són de sílica fosa amb diàmetres interns de 50 o 75 μm , longituds típiques entre 50 i 120 cm i un recobriment de poliimida que els fa elàstics. En alguns casos estan recoberts interiorment per compostos que modifiquen la mobilitat de les espècies.

Els sistemes comercials de detecció més utilitzats en l'electroforesi capil.lar són els basats en l'absorció UV-visible (WAJ 84) i en la fluorescència (YWL 92). Els detectors d'absorció més flexibles utilitzen làmpades de deuteri, que permeten variar la longitud d'ona dins del rang de l'UV proper (190 a 360 nm), i els de fluorescència utilitzen làmpades similars a les d'absorció o làsers d'Ar⁺ o d'He-Cd.

Les fonts de voltatge que normalment s'utilitzen són regulables, de polaritat reversible i poden donar entre 0 i ± 30 KV per tal de fer migrar adequadament les espècies.

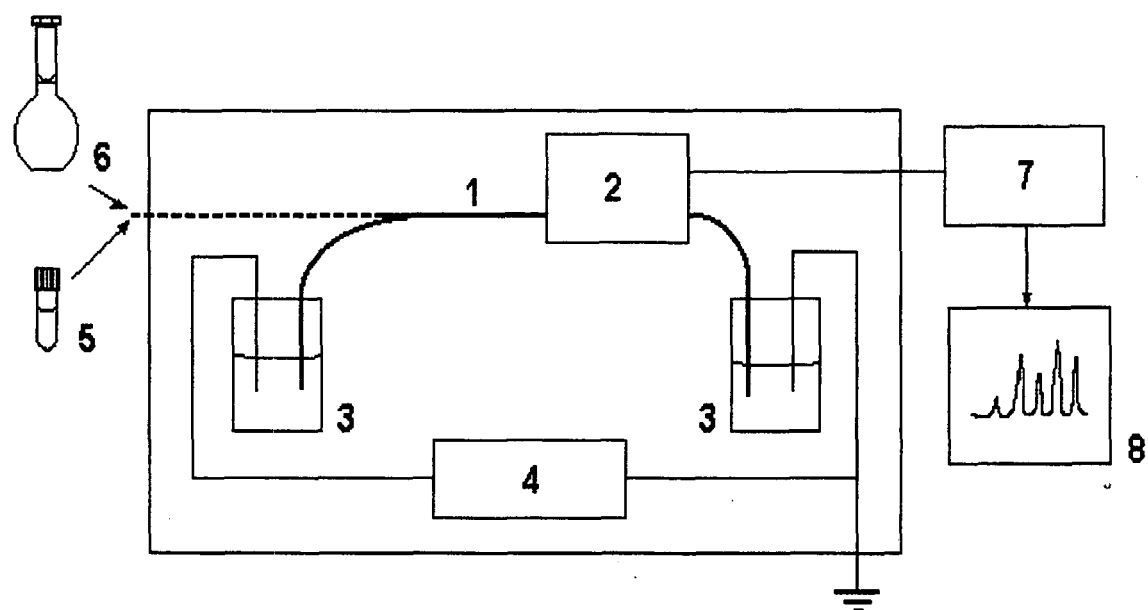


Figura 1.1. Esquema d'un aparell d'electroforesi capil·lar.

Els mètodes d'injecció en CE es poden dividir, a grans trets, en aquells que utilitzen gradients de voltatge (electrocinètics) i els que utilitzen gradients de pressió per introduir la mostra. A part d'aquests mètodes, se n'han utilitzat d'altres que, o bé no permeten operar amb els capil·lars típics en CE (TSU 87), o bé són poc precisos (TMD 91).

Els mètodes electrocinètics d'injecció basen la introducció de la mostra en la mobilitat dels seus components en aplicar un camp elèctric durant el temps d'injecció (DFB 85)(WAE 87) i estan incorporats en la major part d'instruments comercials.

En aquests mètodes, el nombre de mols introduïts en el capil·lar no és representatiu de la mostra (HGZ 88) i, tot i que és possible minimitzar aquests efectes (LEY 92), és recomenable limitar la seva utilització a casos on no es pot utilitzar cap altra alternativa (CGE, per exemple).

Els mètodes basats en gradients de pressió no tenen aquest inconvenient i utilitzen o bé la pressió hidrostàtica creada per desnivells entre l'entrada i la sortida del capil·lar (ROJ 88) o bé bombes de buit (SMB 89) per introduir la mostra.

El mètode comercial més extès és la utilització d'una bomba de buit amb un cicle constant en el què es pot variar el temps d'injecció (de zero a uns

minuts) i aplicar una diferència de pressió més gran i més ràpida que en el cas d'utilitzar pressió hidrostàtica. La precisió del senyal que s'obté en injectors comercials (Models ISCO 3140 i Spectra-Physics 1000) és de l'ordre del 2-3 %.

El "flushing" del capil·lar es realitza amb bombes de buit (SMB 89) o sistemes de pressió, que acostumen a ser diferents dels d'injecció, o bé utilitzant xeringues adaptades a blocs (ROD 89).

L'ús d'alts voltatges en aquesta instrumentació fa necessari incorporar a l'aparell sistemes de protecció (9) i de seguretat per evitar accidents i un sistema de refrigeració que ajudi a evacuar el calor generat per efecte Joule dins del capil·lar. Els sistemes de refrigeració utilitzats es basen en la circulació forçada de l'aire, a temperatura ambient o termostatitzat, mitjançant ventiladors o en la utilització de circuits tancats de refrigerants líquids en contacte amb el capil·lar.

A part d'aquesta instrumentació fonamental, alguns autors utilitzen esquemes que permeten la programació del voltatge (TSY 93), pH i composició del tampó (CHY 92), la modificació de la mobilitat amb camps elèctrics radials (GHG 91) o la recol·lecció contínua de la mostra a la sortida del capil·lar (HUZ 90).

1.2. PARÀMETRES ANALÍTICS DE L'ELECTROFORESI CAPIL.LAR

El principal objectiu de l'electroforesi capil.lar (CE) és l'anàlisi eficaç dels components d'una mostra mitjançant les dades proporcionades en utilitzar unes dissolucions i en aplicar unes variables sobre una instrumentació.

El coneixement dels fonaments de la tècnica analítica passa, doncs, per estudiar el tipus de dades que s'obtenen en les anàlisis i les diferents variables que influeixen sobre aquestes dades.

A la introducció es van comparar diverses alternatives d'anàlisi de cianurs i es va constatar que en les noves tècniques a desenvolupar es requereixen, principalment, rapidesa elevada i LOD baixos. En un mètode analític com CE, a part d'aquestes característiques, calen altres que es poden mesurar i delimitar a través paràmetres de qualitat, que s'obtenen a partir de dades directes de l'anàlisi efectuada. Les característiques, paràmetres i requeriments més remarcables en CE apareixen a la taula I.1.

Aquesta taula mostra que és possible trobar un paràmetre analític que ens avalui cadascuna d'aquestes característiques (veure referències pel seu càlcul) i establir un requeriment o una restricció d'aquest paràmetre que permeti avaluar la bondat d'un mètode d'anàlisi. Els valors dels requeriments s'han escollit tenint en compte les limitacions de la tècnica CE.

Els anteriors paràmetres analítics es poden calcular a partir de les dades que proporciona l'electroforograma (figura 1.2) (DYS 91).

Pels 5 primers paràmetres tabulats, excepte pel cas dels LOD, s'escolleix com a senyal analític l'àrea del pic (**A**) que dona l'electroforograma, ja que és poc sensible a distorsions del pic i té un interval de linealitat més gran que l'altura (DYS 91). Mitjançant rèpliques i calibratges adequats amb patrons de diferents concentracions s'obté el càlcul de la desviació estàndard del senyal (s_{senyal}) i dels pendents de la regressió lineal del senyal respecte a la concentració ($m_{\text{analít}}$) a partir dels quals es poden obtenir la precisió, la sensibilitat, la selectivitat i el rang d'aplicació del mètode analític.

Característica	Paràmetre analític	Referència	Requeriment
PRECISIÓ	RSD _{senyal}	(MCR 87)	< 5%
EXACTITUD	Percentatge d'error	(MCR 87)	< 5%
LOD	C _{LOD} (Senyal/ Soroll = 2)	(POS 84)	< 50-500 ppb CN ⁻
SENSIBILITAT	m _{analit} / s _{senyal}	(SKL 92)	Alta
RANG D' APLICACIÓ	Interval linealitat	(POS 84)	El més ample possible
INTERFERENTS	Selectivitat	(SKL 92)	Alta
RAPIDESA	Freqüència d'anàlisi	(SKL 92)	> 3-4 mostres/h
RESOLUCIÓ	R _s	(DYS 91)	> 1.5
EFICÀCIA	N	(DYS 91)	> 10000

Taula I.1 Característiques i requeriments dels paràmetres de qualitat per un anàlisi per CE.

A partir dels valors de concentració de les mostres, comparats amb els valors reals o presos com a reals, es pot calcular l'exactitud del mètode.

El càlcul dels LOD es pot realitzar de diferents formes donant lloc a diversos conceptes de límits de detecció (AMC 87). El mètode emprat en aquesta memòria es basa en la mesura del promig de l'amplada màxima del soroll (de pic a pic) sobre un electroforograma i establir per a quina concentració de cada analit l'altura del pic (h) és el doble d'aquest soroll (DYS 91)(POS 84). Aquest valor és conservatiu i, per tant, permet assegurar la detecció del pic.

La resta dels paràmetres analítics presents a la taula I.1. fan referència a la separació dels compostos.

La freqüència d'anàlisi vé donada per l'invers del temps de detecció de l'últim pic d'interès que surt en l'electroforograma.

La resolució (R_s) permet avaluar la separació entre pics consecutius i es defineix com:

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (W_{b2} + W_{b1}) \quad (1.1)$$

On cada W_b representa l'amplada del pic a la base expressada en unitats de temps. Amb un valor de $R_s=1.5$ es considera que els pics es separen fins la línia de base.

El valor de W_b no s'obté directament d'un electroforograma sinó a través del valor de W_h , que és la amplada a mitja altura del pic (figura 1.2). Si el pic es gaussià, aquestes dues amplades es relacionen segons l'expressió (DYS 91):

$$W_b = 1.699 W_h \quad (1.2)$$

L'eficàcia d'un pic (N) ve definida per:

$$N = (t / \sigma')^2 = (L_d / \sigma)^2 \quad (1.3)$$

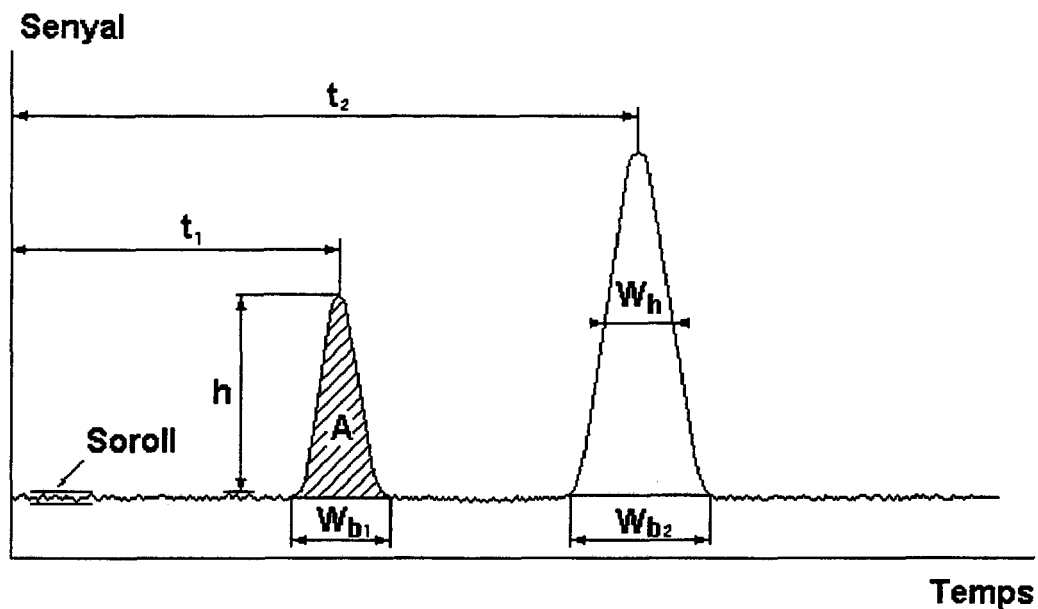


Figura 1.2. Principals dades obtingudes en un electroforograma

on σ' , i σ són les desviacions estàndard del pic en unitats de temps i espai respectivament. Si el pic és gaussià, es compleix que:

$$\sigma = 0.425W_h \quad (1.4)$$

Un aspecte important és que h , A i σ són interdependents i és compleix que A/h és proporcional a σ , per tant el valor d' h també depèn de l'eixamplament del pic.

Quan els pics que s'obtenen són asimètrics, existeix una diferència de temps τ entre el temps de detecció (moda del pic) i el temps pel qual l'àrea del pic escombrada és el 50%. Si es considera que el pic es pot modelar mitjançant una combinació de pic gaussià i corba exponencial (pic gaussià modificat exponencialment) la dispersió gaussiana σ'^2 es veu augmentada en un valor τ^2 , per tant, el fenomen de l'asimetria augmenta l'amplada del pic i disminueix la seva altura (DYS 91).

Com a conclusió, s'observa que els paràmetres analítics depenen d'un conjunt de dades subministrades en les anàlisis que cal estudiar amb més profunditat. A grans trets, aquestes dades es poden dividir en aquelles que fan referència a temps i amplades de pics (t_d , σ), que es veuran influïdes per la separació (injecció, migració i dispersió) dels compostos de la mostra, i les que fan referència al senyal (A , soroll, h) que dependran de la detecció i també dels fenòmens de separació. Efectuant aquesta divisió es pot realitzar un estudi de quines són les variables instrumentals que influeixen sobre aquestes dades i finalment sobre el paràmetres analítics.

En el següent apartat s'exposaran exclusivament principis teòrics sobre la separació mitjançant l'electroforesi capil·lar en zona lliure (CZE) que és la única modalitat de CE utilitzada en tota la memòria.

1.3. PRINCIPIS DE SEPARACIÓ EN CZE

1.3.1. INJECCIÓ DE LA MOSTRA

La primera operació que influeix en la separació és la injecció. Si la injecció es realitza utilitzant gradients de pressió (tal i com s'ha realitzat en tota la memòria), la mostra es mou en règim laminar i segons un perfil radial de velocitats de tipus parabòlic. El volum que s'introdueix en el capil·lar V_{inj} ve donat per l'expressió:

$$V_{inj} = \phi R_i^2 \Delta P t_{inj} / 8 \eta L \quad (1.5)$$

on ϕ és la secció del capil·lar, R_i és el radi intern del capil·lar, t_{inj} el temps d'injecció, ΔP la diferència de pressions mitjana del cicle d'injecció entre els extrems del capil·lar, η la viscositat de la dissolució i L la longitud total del capil·lar.

La quantitat de mostra (n) que entra en el capil·lar es relaciona amb V_{inj} mitjançant l'expressió:

$$n = C_a V_{inj} \quad (1.6)$$

on C_a és la concentració de l'analit en la mostra.

1.3.2. MIGRACIÓ DELS COMPOSTS

En aplicar una diferència de potencial a una dissolució (tampó i mostra) que es troba dins del capil·lar per tal de realitzar la separació, les seves espècies iòniques es converteixen en portadores del corrent elèctric (DIR 80) i es mouen segons dos efectes ben diferenciats: l'electroforesi i l'electroosmosi.

L'electroforesi es deu al fet que els ions de la dissolució es veuen sotmesos a una força electrostàtica en actuar sobre ells un camp elèctric.

Aquesta força es contrarresta amb la força de fregament deguda a la viscositat del medi i s'obté una velocitat uniforme que és directament proporcional al camp elèctric aplicat. Si solament existeix aquest efecte, aquesta constant de proporcionalitat reb el nom de mobilitat electroforètica (μ_{ef}) i està directament relacionada amb la conductivitat equivalent de l'ió.

Aquest tipus de mobilitat depèn principalment del tamany i de la càrrega neta de l'ió així com de la viscositat, temperatura i força iònica de la dissolució en la què es mou (CWY 90).

L'altre fenomen que es produeix dins d'un capil·lar en aplicar un camp elèctric és l'electroosmosi i es deu a l'existència d'un gradient radial de ions que interaccionen amb les parets de l'interior del capil·lar. L'efecte del camp elèctric sobre aquesta distribució provoca un moviment global de tota la dissolució en forma d'un perfil radial de velocitats pràcticament pla (RIW 65).

La constant de proporcionalitat entre el camp i la velocitat de la dissolució creada per aquest fenomen reb el nom de mobilitat electroosmòtica (μ_{eo}) i es relaciona amb η , la constant dielèctrica del medi (ϵ) i el potencial zeta del sistema dissolució-capil·lar (ζ) mitjançant l'equació de Smoluchowski (JAB 93).

$$\mu_{eo} = - \epsilon\zeta/\eta \quad (1.7)$$

A part d'aquestes variables, la temperatura, la força iònica, el pH i el tipus de dissolució també afecten indirectament al valor de μ_{eo} .

En una separació realitzada mitjançant CZE els efectes electroforètic i electroosmòtic es superposen i resulta una mobilitat total μ_t sobre cada espècie que és la suma algèbrica de μ_{ef} i μ_{eo} . La velocitat de cada espècie (v) ve donada per:

$$v = (\mu_{ef} + \mu_{eo})E \quad (1.8)$$

on E és el camp elèctric aplicat, en aquest cas la relació entre el voltatge i la longitud total del capil·lar (L). Per tal de poder moure un compost cap el detector, cal que v sigui positiva, i per tant es podran detectar compostos amb

mobilitat total negativa aplicant potencials negatius o compostos amb mobilitat total positiva aplicant potencials positius (AGU 90).

El principal factor que determina la utilització d'una d'aquestes configuracions és la mobilitat electroosmòtica, donat que no discrimina el tipus d'espècies i els dona la mateixa velocitat. Si el capil·lar no es modifica, la mobilitat electroosmòtica és positiva, per tant si es volen detectar anions es pot necessitar la modificació del valor de μ_{eo} .

La mobilitat total es pot calcular a partir de l'expressió (1.8) tenint en compte que E és constant i que

$$v = L_d / t_d \quad (1.9)$$

On L_d és la longitud de detecció i t_d el temps de migració. Utilitzant la mateixa expressió per un compost neutre és possible calcular el valor de μ_{eo} i, coneixent μ_t , esbrinar els valors de μ_{ef} per cada ió. En el capítol 2 s'exposen amb major detall les variables que influeixen sobre la mobilitat dels analits.

1.3.3. DISPERSIÓ I CONCENTRACIÓ DELS COMPOSTOS

Durant la injecció, separació i detecció de les mostres, les zones de cada analit es dispersen i provoquen un eixamplament dels pics de l'electroforograma. Les causes d'aquesta dispersió són múltiples i afecten de manera important als paràmetres analítics de la separació dels compostos.

1.3.3.1. Dispersió deguda a la injecció

Si es suposa que durant la injecció la mostra entra perpendicularment al capil·lar i que es difon radialment de manera molt ràpida s'obté un pols rectangular de concentracions al llarg d'una longitud w_{inj} (donada pel quocient V_{inj} / ϕ). Sota aquestes condicions ideals, la dispersió deguda a la injecció en el

cas de que no hi hagi fenòmens de concentració ve donada per la variància del pols rectangular σ_{inj}^2 :

$$\sigma_{inj}^2 = w_{inj}^2 / 12 \quad (1.10)$$

En la injecció real aplicant pressions, la difusió radial no és instantània ni l'entrada del capil·lar és perfectament perpendicular al seu eix i per tant el perfil d'entrada de la mostra pot alterar en part aquest pols rectangular introduint dispersions addicionals (MAR 92).

A part d'aquestes causes, alguns autors han trobat dispersions importants durant la retirada i l'acoblament del capil·lar que han atribuït a diferències de tensions superficials, de densitats o de viscositats entre la mostra i el tampó, a pressions d'inmersió o a turbulències (GRM 89).

1.3.3.2. Dispersió deguda a la separació

En l'electroforesi capil·lar, el fet que la mostra durant la separació es mogui segons un perfil de velocitats pla i no ho faci segons un perfil radial parabòlic típic d'altres tècniques d'anàlisi que utilitzen gradients de pressió (HPLC, HPGC) redueix la dispersió de les zones i provoca que generalment s'obtinguin registres amb els pics més estrets. Tot i així, hi ha diverses causes que contribueixen a l'eixamplament dels pics que s'obtenen a l'electroforograma.

Donada l'existència de gradients axials de concentració en la interfase tampó-analit, la difusió de la mostra és inevitable. Si aquesta fos l'única causa de dispersió, el pic tindrien un perfil gaussià (DYS 91) amb una variància de dispersió dels pics donada per:

$$\sigma_D^2 = 2 \cdot D \cdot t_d \quad (1.11)$$

on D és el coeficient de difusió. Durant el temps d'injecció també es produeix la difusió, i per tant caldria afegir t_{inj} a t_d per tal d'estimar de forma més correcta el valor de la dispersió del pic deguda a aquest efecte.

L'escalfament per efecte Joule de la dissolució de dins del capil·lar provoca un perfil radial de temperatures que no és pla i que, degut a l'efecte de la temperatura sobre la mobilitat, mou amb diferents velocitats els analits segons la seva posició radial, podent provocar una dispersió extra dels pics donada per l'expressió:

$$\sigma^2_T = 2 \cdot D_T \cdot t_d \quad (1.12)$$

on D_T és l'anomenat coeficient de dispersió de Taylor que depèn d' E , de R_i , de la conductivitat del tampó i d'altres factors que s'estudiaran posteriorment (GOI 90)(FDB 88).

Un altre factor que pot contribuir a l'eixamplament de les zones és l'adsorció dels analits (HJE 90), però si la paret del capil·lar té una càrrega negativa i el pes molecular dels analits no és gaire elevat (com és el cas de l'aplicació que s'ha desenvolupat) l'adsorció d'anions no és important.

La causa principal que pot introduir fenòmens d'asimetria en els pics és la diferència de mobilitats entre la mostra i els ions del tampó que es troben prop de la mostra. Aquest fet origina una diferència de conductivitats entre la zona de l'analit i la zona immediata al tampó que dona lloc a un eixamplament de la base del pic. Aquest eixamplament és directament proporcional a la concentració de l'analit (anió) i a la longitud de detecció i depèn de les mobilitats de l'analit, del contra-anió i del contra-catió del tampó (MEV 79a)(MEV 79b)(HJE 90).

Aquests estudis mostren que per minimitzar l'efecte d'asimetria cal operar amb tampons molt conductius amb concentracions d'analits baixes. Quan la mobilitat dels co-anions del tampó és superior, en valor absolut, a la de l'analit, l'asimetria es presenta al final, donant pics amb cua ("tailing") mentre que si es dona la situació contrària, l'asimetria es troba a l'inici del pic ("fronting").

La diferència de pH entre la mostra i el tampó també pot produir eixamplaments de zona si el pH afecta de manera important a la mobilitat (HJE 90).

1.3.3.3. Dispersió deguda a la detecció

Les dispersions degudes a la detecció depenen bàsicament del disseny del detector, la qual cosa impedeix la seva optimització quan es treballa amb aparells comercials. Però, d'altra banda aquestes dispersions generalment són molt baixes i, per tant, tenen poc efecte sobre la dispersió total.

Durant la detecció es necessita extreure informació d'un volum finit del capil·lar, per tant cal una escletxa suficientment ampla per agafar una determinada regió de la finestra de detecció. L'obertura d'aquesta escletxa sobre la que es troba el capil·lar introdueix una dispersió similar a la donada per l'expressió (1.10) i, tot i que és optimitzable (WHC 89), en els detectors utilitzats és fixa.

La constant de temps (o el temps de pujada, RT) seleccionada en el filtre del detector és un altre valor que pot distorsionar la detecció del pic segons la variància (OTT 89). Hi ha autors que recomanen un interval de constants de temps entre 0.1 i 2 s per unes bones condicions d'anàlisi.

1.3.3.4. Concentració deguda a l'efecte "stacking"

L'efecte "stacking" permet concentrar la mostra dins del capil·lar mentre s'està realitzant la separació dels compostos i té lloc quan la conductivitat de la mostra injectada és menor que la del tampó que s'utilitza per la separació.

Sota aquestes condicions, un cop acabada d'injectar la mostra i en aplicar el voltatge de separació, es compleix que el camp elèctric en la zona de la mostra (E_m) és més gran que el de la zona del tampó (E_t) degut a que la diferència de potencial en les zones és inversament proporcional a la seva conductivitat (llei d'Ohm) (fig. 1.3a). Així doncs, en qualsevol moment es compleix:

$$E_m/E_t = \gamma_R \quad (1.13)$$

on γ_R és la relació de conductivitats entre el tampó i la mostra en cada moment. Com a conseqüència d'aquest efecte, la velocitat dels analits en la zona de la mostra augmenta respecte la velocitat dels ions dins del tampó i provoca una concentració en la zona davantera de la interfase mostra-tampó (fig. 1.3b) fins que s'arriba a un equilibri de conductivitats.

El mecanisme de concentració basat en l'efecte "stacking" és complex donat que la relació de camps de l'expressió (1.13) va disminuint al llarg de la separació, ja que els voltants de la mostra es van concentrant fins arribar a conductivitats similars a les del tampó. Així doncs, l'anterior expressió marca el factor de concentració màxim que es pot aconseguir.

Com més gran sigui el temps de contacte entre la mostra i la zona de baixa conductivitat més proper a γ_R serà el factor de concentració que s'assolirà. Entre els factors que afavoreixen un temps de contacte gran i una conductivitat baixa de la zona es poden citar la similitud entre les mobilitats de l'analit i els anions del tampó (AGM 93) i l'amplitud de la mostra injectada en el capil·lar.

Temps d'injecció excessius, però, poden disminuir l'eficàcia dels pics per influir notablement en la seva amplada i en les mobilitats (donat que baixen el corrent elèctric que circula pel capil·lar), i poden afectar la linealitat de la calibració (BEA 93) i introduir pics indesitjables del sistema deguts a concentracions de les zones (GTB 92).

Tot i que és beneficiós operar amb un valor de γ_R elevat, un augment excessiu d'aquest paràmetre poc provocar dispersions de pics degut a perfils de velocitat laminars creats per pressions de camps elèctrics no uniformes (BUC 91).

L'efecte "stacking", doncs, fa disminuir la zona inicial d'injecció w_{inj} (1.10) en un factor γ_R però introdueix dispersions per efectes laminars. El valor de dispersió creat per ambdós efectes vé donat per:

$$\sigma_{inj}^2 + \sigma_{stack}^2 = (w_{inj}^2 / 12\gamma_R^2) + (R_i \Delta v)^2 t_d / 24D \quad (1.14)$$

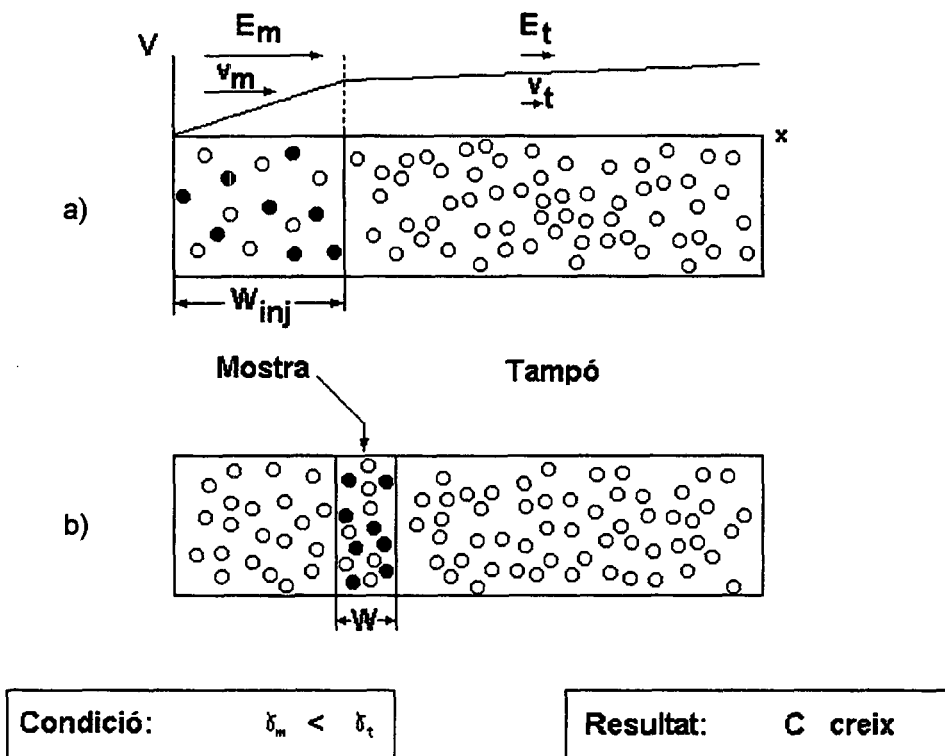


Figura 1.3. Esquema de l'efecte "stacking" a) Immediat a l'aplicació de V b) En equilibri

on Δv és la diferència entre la velocitat electroosmòtica local i la velocitat electroosmòtica de l'eix del capil·lar. Aquest valor augmenta amb w_{inj} i γ_R , i per tant hi ha un valor òptim de γ_R que, sota condicions típiques, es troba al voltant de 10.

1.3.3.5. Dispersió total

La variància total d'un pic, en unitats de longitud al quadrat, és additiva (STE 66)(FDB 88)(HJE 90) i, es pot expressar com la suma de les variàncies de cadascun dels fenòmens referits en aquest capítol:

$$\sigma^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{stack}^2 + \sigma_D^2 + \sigma_T^2 + \sigma_{asim}^2 + \sigma_{detec}^2 + \sigma_{altres}^2 \quad (1.15)$$

L'anterior expressió mostra que la dispersió d'un pic és un fenomen complex de modelitzar. Tal i com s'ha vist, en totes les etapes de l'anàlisi per CE hi ha una contribució a la dispersió, per tant cal tenir en compte quins factors són els predominants de cara a minimitzar el seu valor.

L'efecte "stacking" és l'únic que pot contribuir a disminuir aquesta amplada a través de la selecció d'un valor de γ_R adequat segons l'expressió (1.14) i, per tant, permet millorar l'altura, l'eficàcia (expressió 1.3) i la resolució (expressió 1.1) dels pics encara que hi hagi altres factors que augmentin la dispersió.

1.4. PRINCIPIS DE DETECCIÓ EN ELECTROFORESIS CAPIL.LAR

En aquest apartat s'exposen els fonaments de detecció directa per absorció UV en l'electroforesi capil.lar. També es fa referència a la detecció indirecta, ja sigui utilitzant la mateixa tècnica d'absorció com mitjançant fluorescència, que es desenvolupa experimentalment en el capítol 6. L'estudi d'aquests principis ens ha de permetre la optimització de les condicions de detecció per tal d'assolir els millors LOD.

1.4.1. DETECCIÓ DIRECTA

1.4.1.1. Àrea del pic

La detecció de compostos per absorció UV es basa en l'absorbància (A_{bs}) dels compostos i ve donada per l'expressió de Lambert-Beer (SKL 92):

$$A_{bs} = \epsilon_a b C_a \quad (1.16)$$

On b , ϵ_a , i C_a són el camí òptic, l'absortivitat molar i la concentració total de cada analit. El valor d' ϵ_a de cada analit depèn principalment de la longitud d'ona (λ).

Segons alguns autors (FFO 89), el camí òptic a través de la secció recta d'un capil.lar cilíndric depèn del radi intern de la columna capil.lar (R_i) i ve donat per :

$$b = 1.2R_i \quad (1.17)$$

La detecció a través de la secció del capil.lar és el mètode comercial més extès, tot i que hi ha mètodes desenvolupats per autors que permeten millorar el camí òptic, i per tant el senyal, de manera notable (AGM 93).

Els mols d'analit (n) injectats inicialment dins del capil·lar es poden obtenir, en tot moment, a partir de la concentració de cadascun d'ells al llarg de capil·lar utilitzant l'expressió:

$$n = \phi \int C dx \quad (1.18)$$

On ϕ és la secció del capil·lar, C és la concentració de l'analit en cada punt i x és la variable longitud del capil·lar. Per tant seria desitjable obtenir un senyal d'àrea que fos proporcional a aquesta expressió.

En el cas real d'integració dinàmica, el detector mostreja el senyal d'absorbància en el temps (t) i el tradueix en una mesura de comptes, depenent de la constant K de l'aparell d'adquisició de dades, que dóna lloc al valor d'àrea de pic (A) en l'electroforograma. Aquest valor es pot relacionar amb la concentració en cada punt amb l'expressió (1.16).

$$A = K \int A_{\text{abs}} dt = K \epsilon_a b \int C dt \quad (1.19)$$

Si es compara (1.19) amb (1.18) s'observa que cal una expressió en funció de la variable x enlloc de t per tal d'avaluar els mols dels compostos injectats. Aquesta transformació es pot realitzar a partir de la velocitat de cada pic (1.9), suposada constant.

$$dt = t_d dx / L_d \quad (1.20)$$

i, per tant, s'obté l'expressió de l'àrea en funció del número de mols injectats utilitzant (1.9) i (1.20):

$$A = K \epsilon_a b t_d n / \phi L_d \quad (1.21)$$

Així doncs, l'àrea que s'obté en l'electroforograma és directament proporcional als mols de compost, però també depèn de l'invers del cabal de

dissolució ($\phi \cdot L_d / t_d$) que passa pel detector, al igual que succeeix en HPLC (DYS 91) (POS 84).

Si es vol una mesura independent del temps de detecció, cal corregir els anteriors valors a àrees corregides A_n (HCZ 89)(ZJH 95):

$$A_n = A \phi L_d / t_d \quad (1.22)$$

Al llarg de la memòria s'ha utilitzat el valor A / t_d (àrea normalitzada amb el temps) com a mesura del senyal, donat que té la mateixa variabilitat que (1.22).

Substituint en (1.21) el número de mols en funció de la concentració de l'analit C_a i el volum injectat V_{inj} (veure (1.6)), s'arriba a una expressió que té una dependència similar a la llei de Lambert-Beer:

$$A_n = K V_{inj} \epsilon_a b C_a = K V_{inj} A_{abs} \quad (1.23)$$

Aquesta expressió permet avaluar el pendent de la recta de regressió (m_{analit}) entre el valor d' A_n i la concentració de l'analit, C_a . S'observa que aquest pendent depèn dels mateixos paràmetres que la llei de Lambert-Beer, de la injecció i del mètode d'adquisició de dades. Observi's que els fenòmens de concentració o dispersió no afecten ni a A ni a A_n .

La precisió de l'àrea A dependrà principalment de la precisió del volum injectat i de la precisió del temps de detecció (normalment $RSD \approx 1\%$), mentre que la precisió d' A_n serà independent de la precisió del temps. La precisió del volum injectat (RSD 2-3% o més) dependrà dels paràmetres exposats en (1.5) d'entre els quals cal tenir en compte la temperatura i la precisió del cicle d'injecció.

La sensibilitat de l'anàlisi es podrà millorar mentre s'augmentin els valors que afecten a m_{analit} sense augmentar la desviació estàndard d' A_n , per tant aquest paràmetre depèn principalment de la precisió en la injecció i de la concentració de l'analit.

A concentracions elevades de mostra es pot produir una desviació de la relació lineal entre la concentració i el valor d' A_n deguda a canvis en l'índex

de refracció que afectaran al rang d'aplicació. Els fenòmens de concentració dins del capil·lar ("stacking") poden disminuir aquest interval de linealitat.

1.4.1.2. Soroll

Tota mesura analítica consta d'una part no desitjada que degrada l'exactitud, la precisió i la sensibilitat de les anàlisis que s'anomena soroll. L'origen del soroll és divers i, a efectes pràctics, es pot dividir el soroll total en soroll químic, S_q , (associat a les dissolucions que circulen pel capil·lar) i soroll instrumental, S_i , (SKL 92)(WAH 92).

$$S_t^2 = S_q^2 + S_i^2 \quad (1.24)$$

El soroll químic es modela directament proporcional a l'absorbància del tampó (WAH 92):

$$S_q = kA_{bsT} \quad (1.25)$$

La constant de proporcionalitat, k , augmenta amb el voltatge i depèn de la interacció entre el tampó i la columna. El seu valor s'associa amb la fluctuació relativa de la concentració del tampó quan passa pel detector.

Altres factors que poden afectar el soroll són les vibracions del capil·lar (per origen mecànic o degudes a l'alt voltatge) que fan variar el camí òptic i, per tant, el senyal de fons.

El soroll mesurat depèn del valor de temps de pujada (RT) o constant de temps del filtre del detector. Cal seleccionar un valor de RT suficientment elevat per "retallar" el soroll i al mateix temps evitar dispersions importants en la mesura dels pics. En el nostre cas s'ha utilitzat un temps de pujada de 0.8 s que es troba dins d'aquest interval recomanat per evitar dispersions altes.

Generalment els valors de soroll mínim per detecció directa oscil·len entre 10^{-4} (WAJ 84) i $2 \cdot 10^{-5}$ A.U. (soroll instrumental del detector utilitzat).

1.4.1.3. Altures de pic

L'altura del pic electroforogràfic, h , és el valor màxim d'absorbància mesurat en comptes quan l'analit passa davant del detector. Com el senyal depèn de l'expressió de Lambert-Beer, els factors que afecten a h són els mateixos que afecten a (1.16) units als fenòmens de dispersió, que fan baixar l'altura del pic.

El valor d' h és sensible als fenòmens de dispersió i concentració referits en apartats anteriors, donat que afecten a la concentració màxima del pic. El fenomen de "stacking" resulta totalment favorable donat que augmenta el valor d' h mantenint amplades de pic raonables.

1.4.2. DETECCIÓ INDIRECTA

Tot i que les tècniques de detecció indirectes que es poden utilitzar en CE són diverses, les més exteses són l'absorció indirecta i l'emissió fluorescent indirecta, que s'han desenvolupat experimentalment en el capítol 6 pel cas dels cianurs i els fonaments de les quals s'exposen a continuació.

Els fonaments de la quantització de la mostra mitjançant detecció indirecta es basen en la disminució del senyal analític degut al desplaçament d'un compost que dona senyal (cromòfor) per part dels analits integrants de la mostra (figura 1.4.). El mecanisme d'aquest desplaçament en CE, a diferència d'altres tècniques analítiques com l'HPLC, es deu a l'efecte combinat de diferència de mobilitats i de concentració de càrregues elèctriques durant la injecció i la separació (YEU 89).

1.4.2.1. Relació de transferència (TR)

En detecció indirecta es defineix el valor TR (transfer ratio) com els mols de cromòfor desplaçats per mol d'analit (YEK 91).

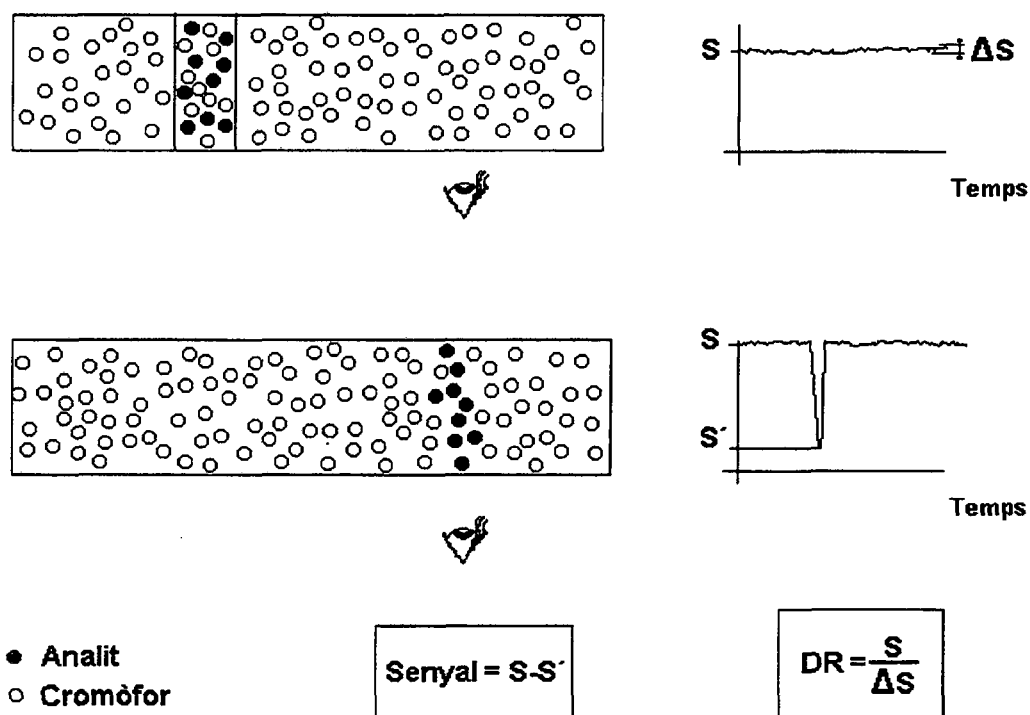


Figura 1.4 Esquema dels fonaments de la detecció indirecta.

Si abans del desplaçament el cromòfor té una concentració C_c i després té una nova concentració C_c' degut al desplaçament d'una concentració C_a d'analit, s'obté:

$$TR = (C_c - C_c') / C_a \quad (1.26)$$

El valor de TR creix quan més properes siguin les mobilitats de l'analit i del cromòfor fins a un màxim donat pel quocient entre la càrrega del analit i la càrrega del cromòfor, per tant cal que aquest últim tingui una càrrega elèctrica baixa. Les baixes concentracions d'altres anions de la dissolució reguladora (OH^- , etc) i de l'analit també milloren TR.

1.4.2.2. Senyal d'absorció indirecta

L'absorció del cromòfor, present al tampó en una concentració C_c , vindrà donada (de forma anàloga a (1.16)) per:

$$Abs_c = \epsilon_c b C_c \quad (1.27)$$

on ϵ_c és l'absortivitat molar del cromòfor. Un cop s'ha produït el desplaçament del cromòfor per part de l'analit, s'obindrà una absorció donada per:

$$Abs_c' = \epsilon_c b C_c' + \epsilon_a b C_a \quad (1.28)$$

Donat que aquesta tècnica s'aplica a analits que tenen una ϵ_a molt petita el segon terme de (1.28) és negligible.

Per tant la diferència de senyals del tampó i cromòfor entre abans i després del desplaçament té un valor:

$$Abs_c - Abs_c' = TR \epsilon_c b C_a \quad (1.29)$$

que mostra que si TR és constant s'obté una mesura proporcional a la concentració de l'analit, C_a . A partir d'aquesta expressió es pot arribar a una similar a la (1.23) que en aquest cas mostraria com el pendent depen de l'absortivitat del cromòfor i de TR.

1.4.2.3. Senyal d'emissió fluorescent indirecta

La intensitat d'emissió de radiació fluorescent mesurada I_a depèn de la quantitat de llum absorbida segons (SKL 92):

$$I_a = K \Phi_a (I_0 - I) \quad (1.30)$$

on K és una constant que depèn de l'instrument, Φ_a és el rendiment quàntic d'emissió fluorescent, i I_0 i I són la intensitat incident i transmesa respectivament. La diferència d'aquests dos últims termes pot desenvolupar-se en sèries de potències de la llei de Beer. Si l'absorbància és suficientment petita (menys de 0.05 U.A.), s'obté la relació lineal útil per realitzar la detecció directa:

$$I_a = 2.303I_0\Phi_a K\varepsilon_a bC_a \quad (1.31)$$

La tècnica de fluorescència indirecta utilitza un bon fluoròfor (cromòfor fluorescent) amb valors de Φ_f i ε_f elevats. Pel cas de la detecció del fluoròfor sol i desplaçat per la mostra i de manera anàloga al cas de l'absorbància s'obtindria:

$$I_f = 2.303I_0\Phi_f K\varepsilon_f bC_f \quad (1.32)$$

$$I_f' = 2.303I_0Kb[\Phi_f\varepsilon_f C_f' + \Phi_a\varepsilon_a C_a] \quad (1.33)$$

on C_f i C_f' són les concentracions de fluoròfor abans i després del desplaçament.

Si l'analit no és fluorescent i/o no absorbeix, es pot negligir novament el segon terme del parèntesi i l'expressió per la disminució del senyal de fluorescència degut al desplaçament del fluoròfor per la mostra vindrà donada per:

$$I_f - I_f' = 2.303TRI_0\Phi_f K\varepsilon_f bC_a \quad (1.34)$$

Si es realitzen els desenvolupaments oportuns, s'obté una expressió per l'àrea corregida del tipus:

$$A_n = K^*V_{inj}I_0\Phi_f\varepsilon_f bTRC_a \quad (1.35)$$

on K^* engloba les constants de proporcionalitat del sistema. En aquest cas, a part dels valors de Φ_f i ε_f pel fluoròfor, la intensitat d'excitació I_0 és un paràmetre important pel senyal.

Al igual que en les tècniques directes, l'altura del pic electroforogràfic, h , en detecció per absorció indirecta i emissió fluorescent indirecta estarà relacionada directament amb les expressions respectives (1.29) i (1.34).

En realitzar la detecció estàtica per fluorescència apareix l'efecte "bleaching" que es deu a que un analit fluorescent pot reabsorbir ell mateix part de la radiació que emet, aconseguint-se un rendiment quàntic inferior. En les mesures dinàmiques es pot evitar en gran part aquest efecte, permetent que el senyal que s'obté pugui ser més gran que el de la mesura estàtica de fluorescència en cubetes en funció de la velocitat de l'analit. Així doncs, un factor important per tal d'obtenir un bon senyal I_f és que el fluoròfor es mogui ràpidament per tal de reduir el "bleaching" que es produeix en el fenomen de fluorescència.

1.4.2.4. Reserva dinàmica (DR)

Un altre paràmetre d'interès en detecció indirecta és la **DR** (dynamic reserve) que mesura la relació entre el senyal de fons **S** (I_f ó A_{bs_c} segons la tècnica de detecció) i la variació del senyal de fons ΔS , que no és més que la mesura de soroll de pic a pic :

$$DR = S/\Delta S \quad (1.36)$$

Interessa que el valor de DR sigui el més alt possible per la qual cosa caldrà aconseguir un senyal elevat amb un soroll el més baix possible. Les variables que afecten el soroll són les mateixes que les exposades en l'apartat 1.4.1.2. Cal destacar que en el cas de detecció indirecta la concentració de cromòfor serà un factor important en el soroll (YEK 91).

1.4.2.5. Concentració límit i LOD en detecció indirecta

La concentració límit detectable, C_{lim} , es defineix com aquella concentració d'analit en la que s'obté un senyal igual al soroll ΔS . Això implica com a cas genèric de detecció indirecta:

$$C_{lim} = C_a \cdot \Delta S / (S - S') \quad (1.37)$$

on S i S' representen els senyals abans i després del desplaçament. Utilitzant les expressions (1.26)(1.27)(1.29) i (1.36) per l'absorció indirecta i (1.26)(1.32)(1.34) i (1.36) per l'emissió per fluorescència indirecta s'arriba a l'expressió:

$$C_{lim} = C / (DR \cdot TR) \quad (1.38)$$

que indica que operar amb concentracions de fluoròfor o cromòfor (C) baixes i amb valors de TR i DR alts permet detectar petites concentracions d'analit.

Donat que en aquesta memòria s'ha definit el LOD com aquella concentració on el senyal equival a 2 cops el soroll, hi ha una relació directa entre LOD i C_{lim} .

$$LOD = 2 \cdot C_{lim} \quad (1.39)$$

1.5. ESCALFAMENT PER EFECTE JOULE

En connectar un capil·lar, amb una dissolució conductiva en el seu interior, a una diferència de potencial elevada es produeix un pas de corrent elèctric que escalfa la dissolució i la mostra per efecte Joule.

Aquest escalfament augmenta la conductivitat elèctrica de la dissolució i les mobilitats de les espècies, l'amplada dels pics i fins i tot pot afectar l'operativitat de l'aparell sota condicions crítiques. Per tots aquests efectes l'estudi d'aquests fenòmens és necessari, particularment en el cas que es vulguin utilitzar tampons considerablement conductius.

Diversos autors (GOI 90)(HIN 75) modelitzen la conductivitat elèctrica de la dissolució (γ) mitjançant un model lineal respecte a la temperatura:

$$\gamma = \gamma_0 (1 + K_1(T - T_0)) \quad (1.40)$$

El valor γ_0 és la conductivitat de la dissolució reguladora a la temperatura de referència T_0 , T és la temperatura d'escalfament i K_1 és la variació relativa de la conductivitat amb la temperatura.

Suposant aquesta variació lineal hi ha autors que han desenvolupat models complexos que permeten obtenir els perfils radials de temperatures, temperatures màximes i condicions crítiques (GOI 90).

Es pot arribar a un model igualment vàlid suposant una temperatura radial promig uniforme en règim estacionari dins del capil·lar. Si s'escolleix una temperatura de referència (T_0) i es realitza un balanç d'energia entre el calor generat per efecte Joule i el calor que s'utilitza per escalfar la dissolució s'obté:

$$E^2 \gamma \pi R_i^2 L = 2 \pi R_i L U (T - T_0) \quad (1.41)$$

On U és el coeficient de transmissió global de calor entre l'interior i l'exterior de la columna. Tenint en compte que γ també depèn de $T - T_0$

finalment obtenim l'expressió de l'augment promig de temperatura dins del capil·lar (MAR 92):

$$T-T_0 = 1 / [(K_L Bi / \gamma_0 (ER_i)^2) - K_1] \quad (1.42)$$

$$\text{on} \quad Bi = 2UR_i / K_L \quad (1.43)$$

Com que γ depèn de T , el propi escalfament farà augmentar γ i, conseqüentment, provocarà una generació extra de calor (1.41) que suposarà un nou augment de temperatura (efecte autotèrmic) (BRH 75)(HIN 75). Sota condicions crítiques, l'efecte autotèrmic és suficientment important com per què l'escalfament prossegueixi fins l'ebullició de la dissolució de l'interior del capil·lar amb la conseqüent interrupció del corrent elèctric. Aquest punt d'inestabilitat es pot observar en (1.42), donat que les condicions crítiques anul·laran el denominador i provocaran un disparament de la temperatura que vindrà donat per:

$$(E.R_i)_{\text{critic}} = [K_L Bi / K_1 \gamma_0]^{1/2} \quad (1.44)$$

Si en els models d'altres autors (GOI 90) es fa el mòdul de Biot (**Bi**) menor que 0.1 s'arriba a la mateixa expressió (1.44), per tant el model de promig radial uniforme serà vàlid sota aquestes condicions.

Si es vol saber el valor de $T-T_0$, es pot estimar aquest valor a partir de la conductància elèctrica **C** de la dissolució dins del capil·lar. Aquesta variable es relaciona amb la conductivitat de la mostra segons l'expressió:

$$C = I / V = \gamma \pi R_i^2 / L \quad (1.45)$$

on **I** és el corrent elèctric que travessa la columna per un voltatge aplicat. La variació de **C** a l'interior d'un capil·lar es deu exclusivament a canvis en la temperatura de la dissolució reguladora (no existiran gradients importants de

concentració al llarg del capil·lar i la resta de factors serà la mateixa que quan mesurem estàticament la conductivitat).

Si anomenem C_0 a la conductància quan l'escalfament per efecte Joule no és important (a voltatges baixos) i fem la relació entre C i C_0 s'obté:

$$C / C_0 = \gamma / \gamma_0 \quad (1.46)$$

D'on es pot calcular l'augment de temperatura dins del capil·lar a partir de (1.40) com:

$$(T - T_0) = (1/K_1)[(C/C_0) - 1] \quad (1.47)$$

Observi's que totes les variables es poden mesurar a partir d'un assaig o per regressió lineal de la conductivitat en funció de la temperatura. Un cop s'han calculat els valors de temperatura, es pot observar com es veu afectada la mobilitat de diferents compostos a partir del model lineal de variació amb la temperatura proposat per alguns autors (BRH 75)(HIN 75).

$$\mu = \mu_0(1 + K_2(T - T_0)) \quad (1.48)$$

Si a més es vol conèixer el valor de Bi del sistema de refrigeració, es pot derivar una expressió a partir de (1.41) i (1.43) que permet obtenir aquest valor fent la regressió lineal de la potència ($V.I$) en funció de l'augment de temperatura.

$$VI = \pi K_L BiL(T - T_0) \quad (1.49)$$

L'escalfament, doncs, és proporcional a la potència elèctrica que es genera dins del capil·lar i independent (excepte per K_L) del tipus de dissolució utilitzat.

1.6. CONCLUSIONS

Com a conclusió d'aquest capítol es poden establir una sèrie de variables operatives de la instrumentació (V , λ , t_{inj}), del tampó i de la mostra que són les que més influeixen en les dades analítiques obtingudes i, en últim terme, en els paràmetres de qualitat d'una separació electroforètica. Les interrelacions directes (+), inverses (-) o nul·les (0) entre les variables i els paràmetres apareixen a la taula I.2 (LI 93)(JAB 93).

Variables	t_d	σ	A_n	Soroll	h
V	-	+/-	0	+	+/-
λ	0	0	+/-	+/-	+/-
t_{inj}	0*	+	+	0	+
Tampó					
Tipus d'espècies	+/-	+/-	0**	+/-	+/-
Conc. espècies	+/-	+/-	0**	+	+/-
Mostra					
Concentració	0	+	+	0	+
Conductivitat	0	+	0	0	-

* Si t_{inj} no és excessiu

** Mentre sigui químicament compatible

Taula I.2. Interrelacions entre les principals variables i els paràmetres analítics en CE

Aquesta taula resulta útil per l'elecció de variables que permetin desenvolupar una metodologia d'anàlisi correcta. La resta de variables instrumentals (L , L_d , RT , etc) s'agafaran com a fixes i s'escolliran valors típics o recomenats utilitzats en les anàlisis.

1.7. REFERÈNCIES

(AGM 93) M. Albin, P. D. Grossman, S. E. Moring, *Anal. Chem.* 65, (1993), 489 A-497 A.

(AGU 90) M. Aguilar, *Química Analítica* 9, (1990), 129-143.

(AMC 87) Analytical Methods Committee, *Analyst* 112, (1987), 199-204.

(BEA 93) J. L. Beckers, M. T. Ackermans, *J. Chromatogr.* 629, (1993), 371-378.

(BUC 91) D. S. Burgi, R. L. Chien, *Anal. Chem.* 63, (1991), 2042-2047.

(BRH 75) J. F. Brown, J. O. N. Hinckley, *J. Chromatogr.* 109, (1975), 218-224.

(CHY 92) Huan-Tsung Chang, E. S. Yeung, *J. Chromatogr.* 608, (1992), 65-72.

(CWY 90) Y. F. Cheng, S. Wu, D. Y. Chen, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* 62, (1990), 496-503.

(DFB 85) M. Deml, F. Foret, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 320, (1985), 159-165.

(DIR 80) M. Díaz Peña, A. Roig Muntaner, "Química Física", Alhambra, Madrid, 1980.

(DYS 91) N. Dyson, "Chromatographic Integration Methods", Royal Society of Chemistry, Letchworth, 1991.

(FDB 88) F. Foret, M. Deml, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 452, (1988), 601.

(FFO 89) F. Foret, S. Famali, L. Ossicini, P. Bocek, *J. Chromatogr.* 970, (1989), 299-308.

(GHG 91) K. Ghowski, R. J. Gale, *J. Chromatogr.* 559, (1991), 93-101.

- (GOI 90) W. A. Gobie, C. F. Ivory, J. Chromatogr. 516, (1990),191-198.
- (GRM 89) E. Grushka, R. M. McCormick, J. Chromatogr. 471, (1989), 421-429.
- (GTB 92) P. Gebauer, W. Thormann, P. Bocek , J. Chromatogr. 608,
(1992), 47-57.
- (HCZ 89) X. H. Huang, W. F. Coleman, R. N. Zare, J. Chromatogr.480, (1989),
95-99.
- (HGZ 88) X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare, Anal. Chem. 60, (1988), 375
-382.
- (HIN 75) J. O. N Hinckley, J. Chromatogr.109, (1975), 209-217.
- (HJE 90) S. Hjertén, Electrophoresis,11, (1990), 665-690.
- (HUZ 90) X. Huang, R. N. Zare, J. Chromatogr. 516, (1990),185-189.
- (JAB 93) P. Jandik, G. Bonn, "Capillary Electrophoresis of Small Molecules and
Ions", VCH, New York, 1993.
- (LEY 92) T. T. Lee, E. S. Yeung, Anal. Chem. 64,(1992), 3045-3050.
- (LI 93) S. F. Y. Li, " Capillary Electrophoresis, principles, practice and
applications", Elsevier, Amsterdam,1993.
- (MAR 92) V. Martí, Projecte Fí de Carrera, Universitat Politècnica de
Catalunya,1992.
- (MCR 87) D. McCormick, A. Roach "Measurement, statistics and computation
ACOL", John Wiley, Chichester, 1987.
- (MEV 79a) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen,
J.Chromatogr.169,(1970),11-20.

- (MEV 79b) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M Verheggen, J.Chromatogr. 169, (1979),1-10.
- (OTT 89) K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. 480, (1989), 91-94.
- (POS 84) C. F. Poole, S. A. Schuette, "Contemporary practice of chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1984.
- (RIW 65) C. L. Rice, R. Whitehead, J. Phys. Chem. 69, (1965), 4017-4021.
- (ROD 89) V. Rohlicek, Z. Deyl, J. Chromatogr. 480, (1989), 289-293.
- (ROJ 88) D. J. Rose, J. W. Jorgenson, Anal. Chem. 60, (1988), 642-646.
- (SKL 92) D. A. Skoog, J. L. Leary, "Análisis Instrumental", Mc Graw-Hill, Madrid, 1992.
- (SMB 89) H. E. Schwartz, M. Melera, G. Brownlee, J. Chromatogr. 480, (1989),129-133.
- (STE 66) J. C. Sternberg, Adv. Chromatographic 2, (1966), 202-289.
- (TMD 91) J. Tehrani, R. Macomber, L. Day, J. High Resolut. Chromatogr. 14, (1991), 10-14.
- (TSU 87) T. Tsuda, J. of High Resolution Chromatogr. & Chromatogr. Communications 10, (Nov. 1987), 622-624.
- (TSY 93) H. Tsung Chang, E. S. Yeung, J. Chromatogr. 632, (1993), 149-155.
- (WAE 87) R. A. Wallingford, A. G. Ewing, Anal. Chem. 59, (1987), 678-681.
- (WAH 92) T. Wang, R. Hartwick, J. Chromatogr. 607, (1992),119-125.
- (WAJ 84) Y. Walbroehl, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 315,(1984),135-138.

(WHC 89) T. Wang, R. A. Hartwick, P. B. Champlin, J. Chromatogr. 462, (1989), 147-152.

(YEU 89) E. S. Yeung, Acc. Chem. Res. 22, (1989), 125-130.

(YEK 91) E. S. Yeung, W. G. Kuhr, Anal. Chem. 63, (1991), 275 A-282 A.

(YWL 92) E. S. Yeung, P. Wang, W. Li, R. W. Giese, J. Chromatogr. 608, (1992), 73-79.

(ZJH 95) H. W. Zhang, L. Jia, Z. D. Hu, J. Chromatogr. A, 704, (1995), 242-249.