

INTRODUCCIÓ





CAPÍTOL I

*Introducció a l'ús de solvents orgànics
en tècniques de separació d'elevada
eficàcia: cromatografia de líquids i
electroforesi capil·lar*

1.1 ÚS DE SOLVENTS ORGÀNICS EN CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS

1.1.1 RESSENYA HISTÒRICA DE LA CROMATOGRAFIA



La paternitat de la *cromatografia* s'atribueix al botànic rus Mikhail Semenovic Tsvet [Михаил Семенович Цвет] (1872-1919) [1,2], en la investigació dels pigments vegetals, especialment la clorofil·la. En els seus experiments utilitzava una columna de vidre en què la fase estacionària era un sòlid adsorbent (sílice, alumina, magnèsia, carbó vegetal, carbonat de calci, sacarosa...) i una fase mòbil líquida (principalment, èter de petroli). Dels diferents colors visualitzats en la columna durant el procés de separació dels pigments prové el nom de *cromatografia* (del grec, *khroma*, color; *graphos*, escriptura), denominació ja utilitzada el 1906 [3]. Aquesta modalitat de cromatografia es coneixeria, anys més tard, amb el nom de *cromatografia d'adsorció*, modalitat en què les substàncies pateixen una certa retenció en contacte amb la superfície d'un sòlid.

L'escassa comprensió i acceptació del treball de Tsvet pels seus coetanis va mantenir la cromatografia oblidada fins que el químic nord-americà Leroy Sheldon Palmer (1897-1944) va usar aquesta tècnica en l'estudi dels pigments de la llet l'any 1922, i va donar a conèixer les investigacions de Tsvet a la comunitat internacional. El 1931 els austríacs Edgar Lederer (1908-1988) i Richard Kuhn (1900-1967) van impulsar l'ús de les tècniques cromatogràfiques en aplicar-les a l'estudi de la luteïna del rovell de l'ou i de separació de carotens.

L'any 1941 els bioquímics britànics Archer J.P. Martin (1910-2002) i Richard L.M. Synge (1914-1994) van desenvolupar una tècnica cromatogràfica que permetia separar aminoàcids utilitzant una fase estacionària de sílice impregnada amb aigua i tractada amb un indicador, i una fase mòbil de cloroform amb una mica d'etanol [4]. Havia nascut la *cromatografia de partició* o *repartiment*, en què les substàncies es distribueixen entre dos líquids en funció de les seves propietats, tècnica que reportaria a Martin i Synge l'any 1952 el premi Nobel de Química. L'any 1952, de la mà del mateix Martin i el britànic Anthony Trafford James (1922-), es va dur a terme la primera separació cromatogràfica usant un gas com a fase mòbil [5], naixent així la *cromatografia de gasos*, que es desenvoluparia

ràpidament. Per tal d'aconseguir una tècnica cromatogràfica que permetés la separació de substàncies no volàtils amb una resolució tan bona com l'obtinguda en cromatografia de gasos, es va reduir la grandària de partícula del rebliment de les columnes cromatogràfiques, augmentant així la superfície de contacte entre la fase estacionària i la fase mòbil. Donada la baixa permeabilitat d'aquest empaquetament, es va fer necessari introduir a pressió la fase mòbil dins de la columna, donant lloc a la *cromatografia líquida d'alta resolució* (HPLC).

1.1.2 CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS

1.1.2.1 Introducció

Les tècniques cromatogràfiques es basen en la diferent distribució dels anàlits en funció de la seva naturalesa entre una *fase mòbil* i una *fase estacionària* de diferent polaritat. Si la fase mòbil és un gas, tenim la *cromatografia de gasos*, i si és un líquid, la *cromatografia de líquids*. En aquesta darrera tècnica, tal i com es resumeix a la Taula 1.1 quan l'element de separador és una columna, la fase estacionària pot ser un líquid, un sòlid o una fase enllaçada. La fase mòbil que conté la mescla d'anàlits a separar es fa passar a través de la fase estacionària immiscible amb la fase mòbil, que es manté fixada dins de la columna. Aquells anàlits que són prou retinguts per la fase estacionària es desplacen lentament a través de la columna amb el flux de la fase mòbil, i aquells que presenten una baixa interacció amb la fase estacionària s'elueixen ràpidament. Com a conseqüència d'aquesta mobilitat diferencial els anàlits de la mostra se separen en bandes que es poden analitzar qualitativament i quantitativa. La diferència de polaritat entre les dues fases mòbils té un paper fonamental en la separació dels anàlits de la mostra. Així si la fase mòbil és menys polar que la fase estacionària parlem de cromatografia en *fase normal*, i si és a l'inrevés, *fase invertida*. Aquesta nomenclatura respon a qüestions històriques, donat que el pare de la cromatografia, Mikhail Tsvet, en els seus primers experiments va usar una fase estacionària més polar que la fase mòbil. En l'actualitat, però, la modalitat de fase invertida té un camp d'aplicació molt més ampli que la normal, i en aquesta tesi només farem referència a la cromatografia de líquids en fase invertida. Quan la composició de la fase mòbil es manté constant durant tot el procés de separació, aquesta es produeix en *mode isocràtic*, mentre que si la composició de la fase mòbil varia de forma programada la separació s'anomena *en gradient*.

Taula 1.1 Classificació dels mètodes de cromatografia de líquids en columna.

<i>Mètode específic</i>	<i>Fase mòbil</i>	<i>Fase estacionària</i>	<i>Tipus d'equilibri</i>
Líquid-líquid, o repartiment	Líquid	Líquid adsorbit sobre un sòlid	Distribució entre líquids immiscibles
Líquid-fase enllaçada		Espècies orgàniques enllaçades a una superfície sòlida	Distribució entre un líquid i una superfície enllaçada
Líquid-sòlid, o adsorció		Sòlid	Adsorció
Bescanvi iònic		Resina de bescanvi iònic	Bescanvi iònic
Exclusió per grandària		Líquid en els intersticis d'un sòlid polimèric	Distribució/exclusió

1.1.2.2 Solvents usats com a fase mòbil en cromatografia de líquids

1.1.2.2.1 Criteris d'elecció dels solvents

En l'elecció del solvent adequat per a la preparació de fases mòbils en HPLC s'han de considerar tres factors fonamentals: les propietats físiques del solvent, les propietats químiques, especialment en relació amb la seva compatibilitat amb el sistema cromatogràfic i en aspectes de salut i seguretat, i els efectes d'aquestes propietats en el procés cromatogràfic, com ara la separació cromatogràfica, els límits de detecció i la reproductibilitat analítica.

1.1.2.2.2 Fortalesa del solvent

Les *sèries eluotròpiques* i els *paràmetres de polaritat* van ser desenvolupats per proporcionar al cromatografista una referència *a priori* de la velocitat relativa d'elució dels anàlits en funció de la fase mòbil utilitzada.

Les *sèries eluotròpiques* van ser pioneres en l'estudi de la fortalesa dels solvents i els seus efectes en la retenció dels anàlits. Aquestes sèries empíriques van ser inicialment definides pels suports de fase estacionària sense derivatitzar més usats en aquell moment, bases d'alúmina i sílice, de fase normal. Per a cada solvent i suport específic, es va fer la mitjana dels temps de retenció d'un ampli ventall d'anàlits, tot assignant a aquell solvent concret un determinat valor eluotròpic [6]. Si l'eluent és poc polar (p.ex. un hidrocarbur

alifàtic) és molt difícil que desplaci les molècules de l'anàlit adsorbit a la fase estacionària polar (p.ex. sílice o alumina), i el solvent es classifica com a *feble*. Per altra banda un solvent polar, *fort* (p.ex. metanol), competeix pels llocs actius, deixant menys temps a l'anàlit per adsorbir-se en la fase estacionària i, com a conseqüència, s'elueix més ràpidament. Si la fase estacionària és apolar (p.ex. hidrocarbur alifàtic), el solvent apolar serà el considerat com a fort, i el polar com a feble. Cal tenir present que els valors eluotrópics es basen en equilibris d'adsorció sòlid-líquid, i aquest no sol ser un procés majoritari en cromatografia de líquids en fase invertida. Per tal de poder aplicar aquest concepte en el cas de suports de cromatografia en fase invertida (p.ex. C₁₈), s'han dut a terme estudis d'adsorció en sòlids apolars per a un nombre limitat de solvents [7]. La utilitat dels valors eluotrópics resideix en que permeten l'estimació aproximada de la composició d'una determinada fase mòbil necessària per aconseguir que els temps de retenció d'uns determinats anàlits siguin acceptables. Malauradament, les equacions que ens permeten conèixer amb major precisió la composició de fase mòbil més adequada per a un determinat problema analític són força complexes [8].

Al contrari que amb els valors eluotrópics, els *paràmetres de polaritat* [9] deriven de valors d'equilibris de distribució entre dos líquids. Per tant, reflecteixen millor els processos que es duen a terme en la interacció de l'anàlit amb les fases estacionària i mòbil en cromatografia de líquids en fase invertida. A més, com a primera aproximació, el valor de polaritat d'una mescla de solvents es pot expressar com la suma de la contribució individual dels solvents que formen la mescla [10,11]. Com a contrapartida, tenen una baixa aplicació en separacions basades en processos d'adsorció.

1.1.2.2.3 Viscositat

La viscositat, des d'un punt de vista simplificat i pràctic, pot ser considerada com la resistència que un fluid oposa a avançar a través d'un camí constrictiu. En cromatografia de líquids, la caiguda de pressió d'un líquid a través de la columna és proporcional a la llargada de la columna, la velocitat del flux i la viscositat del líquid, i inversament proporcional als valors quadràtics del diàmetre de partícula i el radi de la columna [12]. Així, doncs, per a una columna que tingui uns valors de longitud, radi i diàmetre de partícula determinats, com menor sigui la viscositat de la fase mòbil i la velocitat del flux, menor serà la caiguda de la pressió i, conseqüentment, menor el desgast de la bomba cromatogràfica. A més, cal tenir en

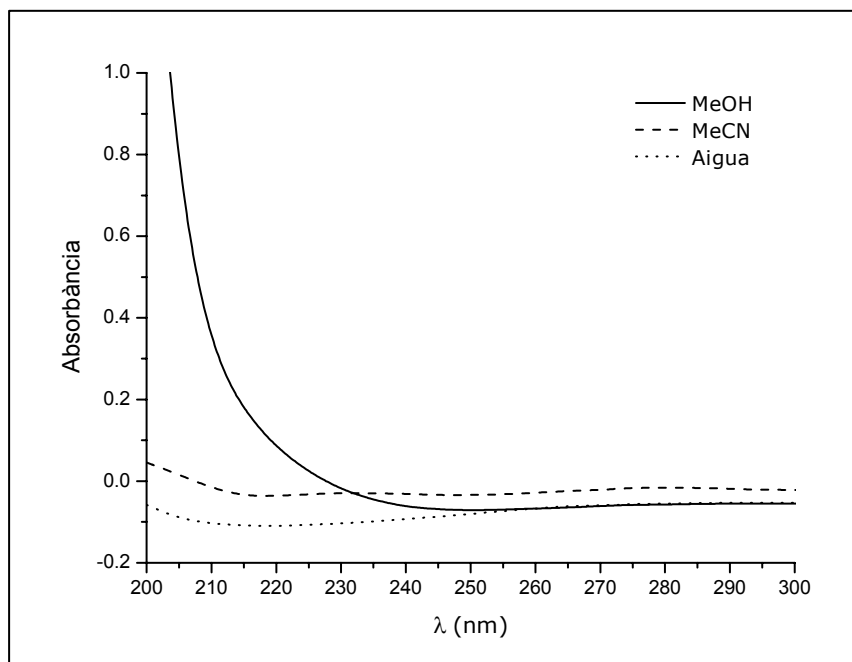
compte que solvents de baixa viscositat són desitjables perquè, tal i com prediu l'equació de Knox [13,14], un increment de la viscositat de la fase mòbil disminueix l'eficiència cromatogràfica.

El MeCN quan s'usa com a modificador orgànic en fases mòbils hidroorgàniques presenta l'avantatge en relació a altres solvents que la seva viscositat màxima només és un 20% superior a la de l'aigua pura. Si ho comparem amb el MeOH, la viscositat d'una mescla hidroorgànica que contingui un 45% en volum de MeOH té una viscositat 1.8 cops superior a la de l'aigua pura [15].

1.1.2.2.4 Propietats òptiques dels solvents

Els detectors UV-Vis són molt comuns en cromatografia de líquids, i és un aspecte a tenir en compte les longituds d'ona operatives de cadascun dels solvents. A tal efecte es defineix el *UV cut-off* com la longitud d'ona a la qual l'absorbància del solvent en una cel·la de 1 cm (prenent l'aire com a referència) és igual a la unitat. Un solvent que presenti un *UV cut-off* superior a la longitud d'ona de detecció dels anàlits presentarà una absorbància massa alta per permetre una adequada detecció dels anàlits. Si la fase mòbil és una mescla de solvents en què el solvent minoritari presenta un *cut-off* desfavorable, és possible que augmenti sensiblement el nivell de soroll en el senyal de detector, provocant un augment en els límits de detecció i una disminució de la sensibilitat.

En la Figura 1.1 es mostren els espectres d'absorbància del MeOH, MeCN i aigua en funció de la longitud d'ona de la radiació incident. El MeCN té unes propietats espectroscòpiques excel·lents, donat que presenta una absorció pràcticament negligible en UV, fins i tot a 200 nm (<0.05 unitats d'absorbància). El MeOH, a diferència del MeCN, té un *UV cut-off* al voltant de 205 nm, i l'absorbància és significativa per valors de longitud d'ona inferiors a 225 nm. En canvi, a valors superiors a 230 nm la contribució a l'absorbància del MeOH és pràcticament nul·la.

**Figura 1.1**

Espectres d'absorbància del MeOH, MeCN i aigua usant cubetes de 1 cm de quars i l'aire com a referència.

Espectrofotòmetre UV-160A de Shimadzu (Kioto, Japó).

1.1.2.2.5 Solvents orgànics adequats en RP-HPLC: Acetonitril i metanol

Com hem vist anteriorment, tant el MeCN com el MeOH reuneixen les propietats imprescindibles que han de tenir els solvents candidats a ser fase mòbil en cromatografia de líquids en fase invertida:

- ✓ Tenen una viscositat acceptable (0.37 i 0.60 mPa/s a 20°C, respectivament [16]).
- ✓ Són transparents en un ampli interval de longituds d'ona UV (*cut-off* < a 205 nm), i permeten usar un detector d'índex de refracció (n_D^{20} de 1.3441 i 1.3284, respectivament [16]).
- ✓ Punt d'ebullició relativament elevat (82 i 65 °C a pressió atmosfèrica, respectivament [16]).
- ✓ Inert respecte la majoria d'anàlits.
- ✓ Es poden obtenir ultrapurs amb relativa facilitat i a un preu assequible.
- ✓ Bona solubilitat en totes les proporcions amb l'aigua, alcohols, èters, acetones i derivats benzènics.

D'entre aquests dos modificadors orgànics destacats, el MeOH té l'inconvenient de produir mesclades amb l'aigua de viscositat relativament elevada, provocant un augment de la pressió del sistema comparativament més alta que pel MeCN.

Tant el MeOH com el MeCN són nocius per a la salut i el medi ambient. Ambdós són inflamables, tòxics per ingestió, inhalació i contacte amb la pell, especialment el MeOH, que pot ocasionar efectes molt greus i irreversibles [17]. Cal manipular-los acuradament amb els equips de protecció individuals, minimitzar el volum de residus generats i tractar-los adequadament, i treballar en laboratoris ben ventilats. A la Taula 1.2 es mostren els valors límits ambientals d'exposició professional a agents químics segons la legislació vigent de l'Estat Espanyol.

Taula 1.2 Valors límits ambientals d'exposició professional a Espanya (2006) [18]

Agent químic	VLA-ED		VLA-EC	
	ppm ^a	mg·m ⁻³ ^b	ppm ^a	mg·m ⁻³ ^b
Metanol	200	266	250	333
Acetonitril	40	68	60	102

VLA-ED: Valor límit ambiental d'exposició diària (40 hores setmanals)

VLA-EC: Valor límit ambiental d'exposició de curta durada (<15 min per jornada laboral)

^a mL de l'agent químic per m³ d'aire

^b mg de l'agent químic per m³ d'aire, a 20°C i 101.3 kPa

1.1.2.3 Fases mòbils hidroorgàniques reguladores del pH

Les solucions aquoses que contenen un àcid i la seva base conjugada tenen tendència a modificar poc el seu pH en afegir-hi petites quantitats d'àcids o de bases. Aquesta propietat es coneix com a *efecte amortidor* i les solucions que es comporten d'aquesta manera s'anomenen *solucions amortidores* o *solucions tampó*. L'acció amortidora és especialment important si l'àcid i la base són presents en concentracions equimolars, i en aquest cas el pH de la solució és igual al valor de pK_a de l'àcid [19]. En aquestes condicions, el pH d'una solució amortidora no varia en diluir la solució per a un solvent donat.

L'ús de solucions amortidores o tampons és molt estès en el control dels processos químics [20]. En cromatografia líquida d'alta resolució en fase invertida (RP-HPLC) la separació dels compostos que tenen propietats àcid/base depèn directament del pH de la fase mòbil. En escollir una determinat sistema amortidor, cal tenir en compte que la concentració de la parella amortidora àcid/base conjugada ha de ser significativament superior (>10 vegades) a la concentració de qualsevol altra espècie present en el sistema i que tingui grups funcionals ionitzables, i que a aquesta concentració el tampó sigui compatible amb el sistema

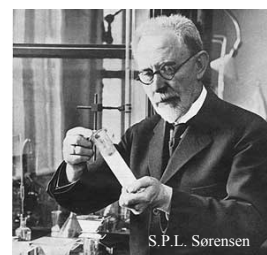
cromatogràfic usat. És a dir, principalment, que no presenti cap interferència en el sistema de detecció, que sigui soluble en la fase mòbil escollida i que no reaccioni amb altres elements del sistema.

La mesura del pH en cromatografia de líquids és un aspecte delicat i controvertit. Alguns cromatografistes prenen el pH de la solució amortidora aquosa, abans d'addicionar-hi el solvent orgànic, com el pH de la fase mòbil. Altres mesuren el pH directament en la fase mòbil hidroorgànica. En la majoria dels casos aquests dos valors de pH no són coincidents, i això pot portar a error i confusió si el cromatografista no indica quin tipus de procediment ha seguit en la mesura del pH [21]. La informació obtinguda en mesurar el pH en la solució aquosa és *a priori* incompleta en la interpretació del pH de la fase mòbil hidroorgànica, donat que en addicionar un modificador orgànic a una solució amortidora aquosa el pH varia en funció del volum i tipus de solvent orgànic afegit, i la concentració i la naturalesa del tampó utilitzat. Sovint no es dóna prou importància a la mesura correcta del pH en mesclures hidroorgàniques, malgrat els nombrosos estudis publicats al respecte [20,22-27] i la proposta per part de la IUPAC de procediments de mesura del pH i solucions estàndard de referència [28-34]. La importància de la correcta mesura del pH en fases mòbils hidroorgàniques, que fa uns anys semblava ser només un objecte d'estudi per part d'un grup reduït d'investigadors, s'està estenent a la comunitat científica internacional que treballa amb aquest tipus de cromatografia. A tall d'exemple, recentment s'han publicat articles en revistes d'àmplia difusió, que tracten la cromatografia a nivell generalista, sobre la interpretació del pH en fases mòbils hidroorgàniques [35,36], la selecció del tampó i de la capacitat amortidora [37,38] i la correcta preparació dels tampons [39,40].

1.1.3 LA MESURA DEL pH

1.1.3.1 Definició teòrica del pH

La definició del pH com el logaritme negatiu de la concentració de protons va ser encunyada pel bioquímic danès S.P.L. Sørensen el 1909 [41], per tal d'indicar amb simplicitat les baixes concentracions de H^+ en reaccions enzimàtiques en medi aquós. Uns anys més tard, el



mateix Sørensen va adonar-se que els elèctrodes que feia servir per mesurar el pH responien a l'activitat de l'ió hidrogen (a_{H}), més que no pas a la seva concentració. Així el pH va ser definit com [42]:

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}} \quad (1.1)$$

L'activitat de l'ió hidrogen, i consegüentment el pH, són valors adimensionals. L'activitat es relaciona amb la concentració de H^+ en la solució mitjançant el *coeficient d'activitat* (γ), i el valor de pH d'una mateixa solució pot ser diferent en funció de l'escala de concentració emprada. Les dues escales de concentració acceptades per la IUPAC en la definició del pH són la molalitat (m , mols d'ió hidrogen per kg de solvent) i la molaritat (c , mols d'ió hidrogen per litre de solució). Això comporta dues definicions del pH, una per a cada escala de concentració:

$$\text{pH}_m = -\log \left(\frac{m_{\text{H}} \gamma_{m,\text{H}}}{m^0} \right) \quad (1.2)$$

$$\text{pH}_c = -\log \left(\frac{c_{\text{H}} \gamma_{c,\text{H}}}{c^0} \right) \quad (1.3)$$

on $\gamma_{m,\text{H}}$ i $\gamma_{c,\text{H}}$ són els coeficients d'activitat de l'ió hidrogen en les dues escales, i m^0 i c^0 són constants arbitràries que representen les condicions de l'estat estàndard, numèricament equivalents a $1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ i $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, respectivament. Aquestes constants arbitràries són necessàries per assegurar la adimensionalitat del terme logarítmic. Malgrat que l'escala de molalitat té l'avantatge de ser independent de la temperatura, donat que relaciona masses i no volums, en química analítica se sol usar més l'escala de molaritat degut a la major simplicitat que representa en la preparació de solucions. Si la solució és prou diluïda com per poder menystenir la contribució de la massa dels soluts a la massa total de la solució, i s'assumeix que el volum de la solució és igual a la massa del solvent dividida per la seva densitat (ρ , $\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}$), llavors les escales de pH es poden interconvertir mitjançant l'expressió:

$$\text{pH}_c = \text{pH}_m + \log \left(\frac{\rho}{\rho^0} \right) \quad (1.4)$$

on ρ^0 és una constant arbitrària de valor $1 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tenint en compte que la densitat de l'aigua és molt propera a $1 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$, d'aquesta equació es desprèn que les dues escales de pH en medi aquós són pràcticament idèntiques. Les diferències van de 0.001 unitats de pH a 0°C fins a 0.02 unitats a 100°C [43]. Lògicament això no es compleix en el cas de solvents orgànics i mescles hidroorgàniques que tinguin una densitat significativament diferent de $1 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$. A la Taula 1.3 es mostren alguns valors de densitat de mescles de MeOH i MeCN amb aigua i el terme logarítmic de ρ/ρ^0 . A tall d'exemple, es pot observar que en mescles hidroorgàniques que continguin un 50% en volum de MeOH o MeCN la diferència entre aquestes dues escales serà menor a 0.05 unitats de pH.

Taula 1.3 Densitats de mescles de MeOH i MeCN amb aigua a 25°C [44].

% (v/v)	MeOH		MeCN	
	$\rho \text{ (kg}\cdot\text{dm}^{-3})$	$\log (\rho/\rho^0)$	$\rho \text{ (kg}\cdot\text{dm}^{-3})$	$\log (\rho/\rho^0)$
0	0.995	-0.002	0.995	-0.001
10	0.983	-0.008	0.983	-0.007
20	0.969	-0.014	0.968	-0.014
30	0.955	-0.020	0.950	-0.022
40	0.939	-0.027	0.931	-0.031
50	0.921	-0.036	0.908	-0.042
60	0.901	-0.045	0.885	-0.053
70	0.878	-0.057	0.859	-0.066
80	0.852	-0.070	0.829	-0.081
90	0.822	-0.085	0.802	-0.096
100	0.787	-0.104	0.782	-0.107

Donat que el pH es defineix en termes logarítmics d'activitat, aquest depèn de l'estat estàndard de l'activitat. Aquest estat estàndard representa les condicions en què el coeficient d'activitat de l'ió hidrogen es considera igual a la unitat. Així, en l'estat estàndard, l'activitat de l'ió hidrogen esdevé, numèricament, igual a la concentració. En aigua, l'estat estàndard de l'activitat de l'ió hidrogen és el de dilució infinita. Però en un solvent diferent de l'aigua, com pugui ser el cas d'una mescla hidroorgànica usada com a fase mòbil en cromatografia de líquids, poden escollir-se dos estats estàndard diferents:

- ✓ Dilució infinita de l'ió hidrogen en la pròpia fase mòbil (la mescla hidroorgànica).
- ✓ Dilució infinita de l'ió hidrogen en aigua.

L'elecció d'un o altre estat estàndard condueix a dues escales de pH diferents, una relativa a cada solvent concret (^spH) i una altra relativa a l'aigua (^wpH). Particularment, l'escala ^spH

en medi aquós s'expressa com ${}^w\text{pH}$. La notació per distingir aquestes dues escales és la recomanada per la IUPAC [29,33], segons la qual el superíndex a l'esquerra indica el solvent (w , aigua, o s , solvent orgànic o hidroorgànic) en què es duen a terme les mesures de pH, i el subíndex a l'esquerra fa referència al solvent en què el coeficient d'activitat a dilució infinita té un valor unitari (w o s). L'escala ${}^s\text{pH}$ és diferent per a cada solvent i composició, donat que presenta un estat estàndard diferent per a cada solvent (l'ió hidrogen en el solvent concret a dilució infinita). Només permet, doncs, comparar acideses en un mateix solvent en particular. En canvi, l'escala ${}^w\text{pH}$ permet comparar les acideses de solucions en diferents solvents, perquè l'estat estàndard (aigua a dilució infinita) pot ser el mateix en tots aquests solvents.

La transferència d'un mol d'ions a dilució infinita des d'aigua fins a un solvent s , també a dilució infinita, requereix un treball que pot ser mesurat per un canvi en l'energia lliure ($\Delta_w^s G_H^0$). Aquest canvi d'energia lliure és negatiu quan l'ió hidrogen és més estable en el solvent s en l'aigua i, lògicament, és positiu quan és més estable en l'aigua. El canvi d'energia lliure pot considerar-se proporcional al logaritme del coeficient d'activitat [20,25], indicat com ${}^w\gamma_H^0$ d'acord amb la nomenclatura proposada per la IUPAC [33], que relaciona el coeficient d'activitat de l'ió hidrogen a l'estat estàndard en aigua amb el coeficient d'activitat a l'estat estàndard en el solvent s :

$$\Delta_w^s G_H^0 = 2.303 RT \log {}^w\gamma_H^0 \quad (1.5)$$

Aquest *coeficient d'activitat de transferència* (${}^w\gamma_H^0$) rep el nom d'*efecte primari del medi*, i el seu logaritme determina el desplaçament de l'escala de ${}^w\text{pH}$ en relació a l'escala ${}^s\text{pH}$, donat que les dues escales estan relacionades per l'equació:

$${}^w\text{pH} = {}^s\text{pH} - \log {}^w\gamma_H^0 \quad (1.6)$$

on ${}^w\gamma_H^0$ té un valor unitari quan el solvent és aigua.

Aquestes definicions de pH, tal i com reconeix la IUPAC [28-34], només són teòriques, perquè el coeficient d'activitat d'un únic ió és immesurable. Per tal de poder mesurar experimentalment el pH necessitem, doncs, una definició operacional del pH.

1.1.3.2 Definició operacional de pH

La mesura del pH es duu a terme mitjançant mètodes potenciomètrics. Llavors el procediment de mesura i les diferents contribucions de potencial que s'estableixin en el sistema potenciomètric dependran, entre d'altres, del tipus d'elèctrode sensible a l'activitat de l'ió hidrogen.

1.1.3.2.1 Elèctrode d'hidrogen

El pH d'una solució s'obté comparant la força electromotriu generada per la solució problema en una determinada cel·la potenciomètrica amb la força electromotriu d'una o més solucions estàndard de referència de pH conegut. La IUPAC classifica aquestes solucions estàndard en primàries i secundàries, en funció de la traçabilitat, reproductibilitat i incertesa del mètode d'assignació [34]. Un estàndard primari ha de ser definit seguint les millors qualitats metrològiques acceptades, i el seu valor no ha de ser expressat en referència a altres estàndards. En contraposició, els estàndards secundaris presenten un valor obtingut per comparació amb un altre estàndard. Els estàndards primaris de pH són solucions aquoses amortidores el pH de les quals ha estat assignat en un interval de temperatures compreses entre 0 i 50°C a partir de mesures en cel·les sense transferència, anomenades cel·les de Harned, seguint la convenció Bates-Gugenheim. L'adopció d'aquesta convenció permet calcular el coeficient d'activitat de l'ió clorur, que és immesurable, mitjançant la teoria de Debye-Hückel en solucions de baixa força iònica ($I < 0.1 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) [45]. La cel·la de Harned [46] està integrada per un elèctrode d'hidrogen i un elèctrode de referència de Ag/AgCl, i pel seu disseny no pot generar cap potencial d'unió líquida (Figura 1.2). La cel·la de Harned es defineix per:



L'aplicació de l'equació de Nernst, corregida a una pressió parcial de H_2 de 1 atm (101325 Pa), a la reacció que té lloc espontàniament:



dóna lloc a l'expressió de la diferència de potencial de la cel·la E_1 en termes de molalitat:

$$E_1 = E^\circ - \left(\frac{RT}{F} \ln 10 \right) \log \left(\frac{m_H \gamma_H}{m^0} \frac{m_{Cl} \gamma_{Cl}}{m^0} \right) \quad (1.9)$$

Donat que $a_H = \frac{m_H \gamma_H}{m^0}$, l'Eq. 1.9 es pot escriure com:

$$p(a_H \gamma_{Cl}) = -\log(a_H \gamma_{Cl}) = \frac{E_1 - E^\circ}{\frac{RT}{F} \ln 10} + \log \left(\frac{m_{Cl}}{m^0} \right) \quad (1.10)$$

on E^0 és la diferència de potencial estàndard de la cel·la de Harned i γ_{Cl} és el coeficient d'activitat de l'ió clorur.

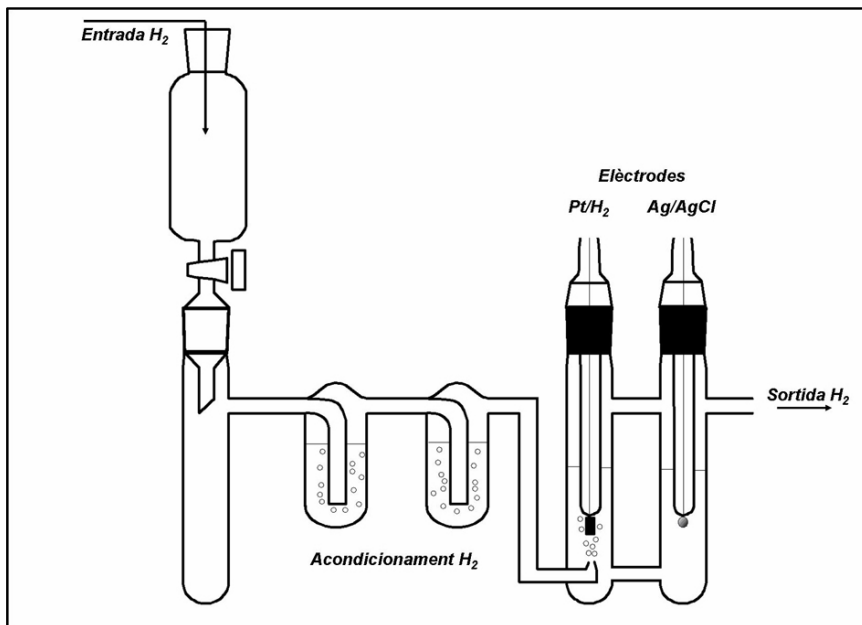


Figura 1.2
Representació esquemàtica d'una cel·la de Harned.

A continuació, i a grans trets, es resumeix la metodologia a seguir en la mesura del pH usant la cel·la de Harned [34]. En primer lloc s'obté la diferència de potencial estàndard del sistema (E^0) omplint la cel·la amb una solució de HCl de concentració coneguda (p.ex. $0.01 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$),

i es relaciona el potencial obtingut amb els valors calculats de l'activitat dels ions H^+ i Cl^- presents en la solució. En aquest cas particular, l'Eq. 1.9 esdevé:

$$E_{Ia} = E^{\circ} - \left(\frac{2RT}{F} \ln 10 \right) \log \left(\frac{m_{HCl}}{m^0} \gamma_{\pm HCl} \right) \quad (1.11)$$

on $\gamma_{\pm HCl}$ és el coeficient iònic mitjà del HCl, que podem trobar tabulat a la bibliografia [47] a una concentració de $0.01 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ per temperatures compreses entre 0 i 60°C .

Un cop conegut E^0 , ja es pot omplir la cel·la de Harned amb les solucions amortidores de pH desconegut, i el potencial de la cel·la es mesura com a mínim a 3 concentracions diferents d'ió clorur (provinent, normalment, de KCl). D'aquests potencials es calcula el valor de la funció d'acidesa $p(a_H \gamma_{Cl})$ de l'Eq. 1.10, i per extrapolació es calcula el valor de la funció d'acidesa a contribució zero dels clorurs a la força iònica $p(a_H \gamma_{Cl})^0$:

$$-\log(a_H \gamma_{Cl}) = -\log(a_H \gamma_{Cl})^0 + S m_{Cl} \quad (1.12)$$

on S és una constant empírica dependent de la temperatura [34]. Llavors, un cop conegut el valor de $-\log(a_H \gamma_{Cl})^0$, només ens resta conèixer el valor de $\log \gamma_{Cl}^0$ per poder determinar el pH. A tal efecte, utilitzarem la teoria de Debye-Hückel i la convenció de Bates-Guggenheim:

$$\log \gamma_{Cl}^0 = - \frac{A I^{1/2}}{1 + a B I^{1/2}} \quad (1.13)$$

on A és una constant dependent de la temperatura, a és la distància de màxima aproximació dels ions (paràmetre de grandària dels ions) i I és la força iònica. S'assumeix que aB té un valor constant de $1.5 (\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1})^{-1/2}$ per totes les temperatures compreses entre 5 i 50°C . Els valors de A es troben tabulats [34].

En un bany termostatitzat es pot mesurar simultàniament la diferència de potencial de dues cel·les de Harned, una amb la solució de HCl de referència (E_{Ia} , Eq. 1.11) i l'altra amb la solució problema (E_I , Eq. 1.9), expressat en termes de:

$$\Delta E = E_1 - E_{1a} = \left(\frac{RT}{F} \ln 10 \right) \log \left(\frac{m_H \gamma_H}{m^0} \frac{m_{Cl} \gamma_{Cl}}{m^0} \right) - \log \left[\left(\frac{m_{HCl}}{m^0} \right)^2 \gamma_{\pm HCl}^2 \right] \quad (1.14)$$

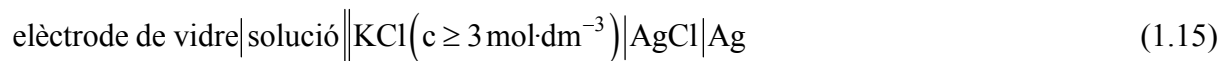
Aquesta expressió és independent de la diferència de potencial estàndard de la cel·la i, consegüentment, no requereix fer l'assumpció que el potencial estàndard de reducció de l'elèctrode d'hidrogen té un valor de nul ($E_{(H^+|H_2)}^0 = 0$) a totes les temperatures.

A la referència [34] podem trobar solucions amortidores estàndards, primàries i secundàries, amb la seva composició i valors de pH a diferents temperatures.

1.1.3.2.2 Elèctrode de vidre

1.1.3.2.2.1 Definició de l'elèctrode de vidre

En el treball rutinari de laboratori les mesures de pH no es realitzen amb cel·les de Harned, donada la seva complexitat, cost econòmic i perillositat de l'hidrogen. En lloc de l'elèctrode d'hidrogen, s'usa l'*elèctrode de vidre*, que consisteix en un bulb de parets primes d'un vidre especial dins del qual hi ha un elèctrode de referència intern immers en una solució (HCl). En introduir l'elèctrode de vidre en una solució s'estableix un equilibri entre els ions hidrogen que es troben a la superfície externa i hidratada del bulb de vidre i els que es troben a la solució a mesurar. Com més gran sigui la concentració d'ions hidrogen en aquesta solució, més en passaran a la capa hidratada i, per tant, més positivament és carregarà l'elèctrode de vidre. La capa hidratada actua com una membrana selectiva d'ions que permet tan sols el pas dels protons [19]. En la determinació del pH l'elèctrode de vidre es combina amb un elèctrode de referència, normalment de Ag/AgCl (Figura 1.3):



Aquest pont salí de KCl es troba a l'elèctrode de referència, i té la funció de minimitzar el potencial d'unió líquida que s'estableix entre la solució que conté aquest elèctrode i la solució a mesurar. El potencial d'unió líquida és la diferència de potencial que es genera quan dues

solucions d'electròlits de diferent composició es posen en contacte, degut a la diferent velocitat de difusió dels ions. L'ús d'una solució salina saturada com a pont salí, els cations i anions de la qual tingui velocitats de difusió molt semblants, minimitza aquest potencial. Així el potencial de la cel·la (E) és la suma dels potencials de l'elèctrode de vidre, l'elèctrode de referència i el potencial d'unió líquida (E_j). La força electromotriu global d'aquest sistema d'elèctrodes ve donada per l'equació:

$$E = E^0 + E_j - g \text{ pH} \quad (1.16)$$

on idealment $g = (RT/F) \ln 10$, i R és la constant dels gasos ideals, T és la temperatura termodinàmica i F és la constant de Faraday. El símbol recomanat per fer referència al terme $(RT/F) \ln 10$ és k , però per tal d'evitar confusions amb el factor de la retenció cromatogràfica usarem g . El valor de experimentalment determinat de g pot ser lleugerament inferior al calculat teòricament, donant lloc a una resposta subnernstiana [34]. E^0 és la suma del potencials estàndard de l'elèctrode de vidre i de l'elèctrode de referència.

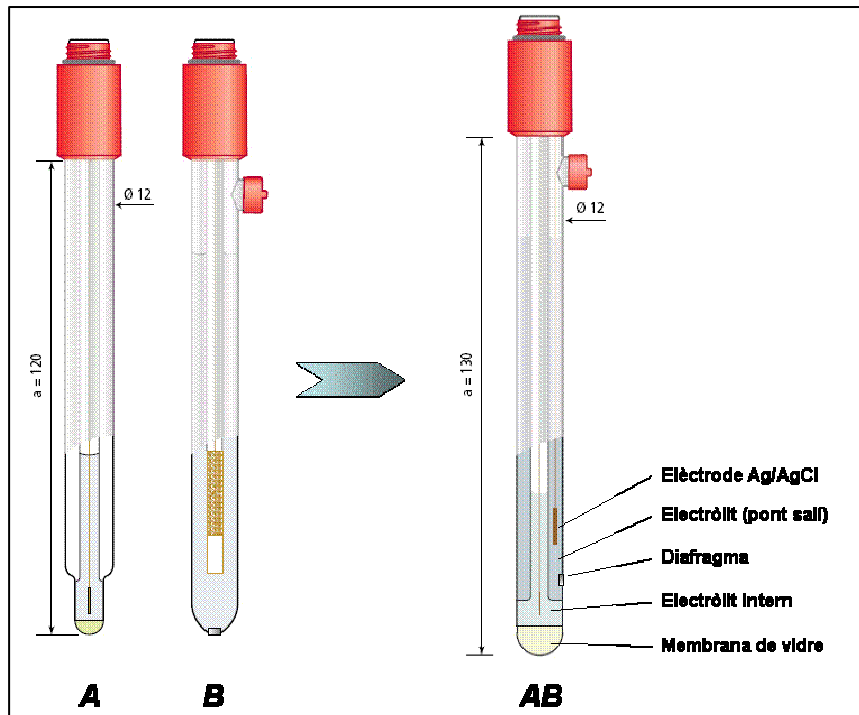


Figura 1.3

Representació esquemàtica d'un elèctrode de vidre (A), un elèctrode de referència Ag/AgCl (B), i un elèctrode combinat de vidre -elèctrode de vidre + Ag/AgCl- (AB). (imatge extreta de www.crison.es).

El potencial de l'elèctrode de vidre depèn de la temperatura. Per tant, tant el procés de calibratge com la mesura del pH de les solucions s'han de dur a terme a temperatura controlada.

El potencial d'unió líquida varia en funció de:

- ✓ La composició de les solucions d'electròlits que formen la unió líquida. Per a un determinat elèctrode combinat de vidre, l'electròlit del pont salí que es troba en contacte amb la solució sempre serà el mateix, però la solucions estàndard de pH utilitzades en el calibratge i les solucions problema seran diferents.
- ✓ La geometria i l'element d'unió entre les dues solucions (ceràmica, diafragma, fibra...)

A més, l'element d'unió pot patir obstruccions parcials i adsorcions durant el seu ús prolongat. Donat que aquests efectes poden produir errors en una magnitud indeterminada, es fa necessari un procediment de calibratge especialment adequat en funció de la mostres problema.

1.1.3.2.2.2 Mesura del pH en solució aquosa

Habitualment l'elèctrode combinat de vidre es calibra utilitzant dues solucions estàndard de pH conegut (pH_{S1} i pH_{S2}), normalment de pH 4 i 7. Existeixen altres procediments menys freqüents, amb un sol estàndard i amb múltiples estàndards, que es troben explicats a [34]. En el procediment de calibratge es determina el valor experimental de g , i assumeix que els potencials d'unió líquida de l'elèctrode combinat són pràcticament iguals en mesurar els estàndards i les mostres. Així, el pH d'un solució problema (pH_X) es pot expressar en termes de:

$$\text{pH}_X = \text{pH}_{S1} - \frac{E_X - E_{S1}}{g} \quad (1.17)$$

on E_X és el potencial de cel·la de la solució problema, E_{S1} i E_{S2} els potencials de les solucions estàndard, i g respon a la relació:

$$g = \frac{E_{S1} - E_{S2}}{\text{pH}_{S2} - \text{pH}_{S1}} \quad (1.18)$$

Cap dels procediments de calibratge pot corregir la variació del potencial d'unió líquida entre els diferents estàndards i la solució problema ($\Delta E_J = E_{JX} - E_{JS}$). D'aquesta forma, la variació d'aquest potencial introdueix un error intrínsec al mètode en la mesura del pH. Aquest error només pot ser evitat en cel·les que no tinguin unió líquida, com és el cas de la cel·la de Harned, però pot ser minimitzat usant solucions d'electròlit a l'elèctrode de referència d'elevada concentració amb cations i anions de mobilitat semblant (ions equitransferents), típicament KCl de concentració superior a $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquest error també es minimitza si l'electròlit d'ions equitransferents, la solució estàndard i la solució problema estan preparades en el mateix solvent.

1.1.3.2.2.3 Mesura del pH en solvents orgànics i hidroorgànics

Aquest mateix procediment, descrit per al calibratge i mesura del pH en medi aquós, pot ser aplicat a solvents orgànics i hidroorgànics. El pH de la mostra, seguint la nomenclatura de la IUPAC anteriorment comentada, pot expressar-se com:

$${}^s\text{pH}_X = {}^s\text{pH}_{S1} - \frac{{}^sE_X - {}^sE_{S1}}{g} \quad (1.19)$$

i

$$g = \frac{{}^sE_{S1} - {}^sE_{S2}}{{}^s\text{pH}_{S2} - {}^s\text{pH}_{S1}} \quad (1.20)$$

En aquest cas, també es considera que el potencial d'unió líquida en la mesura dels estàndards i de la solució problema és pràcticament igual ($\Delta {}^sE_J = {}^sE_{JX} - {}^sE_{JS} \approx 0$). Aquest procediment requereix assignar valors de referència ${}^s\text{pH}_S$ a solucions estàndard (primàries o secundàries) preparades en un solvent de la mateixa composició que la solució problema. Malauradament no hi ha gaire valors de ${}^s\text{pH}_S$ a la literatura per mesclades solvent orgànic/aigua, que són, majoritàriament, les fases mòbils utilitzades en cromatografia de líquids. Trobem alguns valors de ${}^s\text{pH}_S$ proporcionats per la IUPAC en mesclades MeOH/aigua i MeCN/aigua de solucions d'hidrogenftalat de potassi $0.05 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i altres solucions amortidores en MeOH al 50% (p/p) [30,32,33]. De Ligny i col. han proposat valors de ${}^s\text{pH}_S$ per tampons d'oxalat i

succinat a diferents composicions de MeOH en aigua [48-52], i Barbosa i col. han proposat valors de ${}^s\text{pH}_S$ de referència en mescles MeCN/aigua [53-56]. Cal tenir en compte que aquests valors estàndard de pH es troben en l'escala de molalitat, i que es poden convertir a l'escala de molaritat mitjançant l'Eq. 1.4.

Si en lloc de l'escala ${}^s\text{pH}$, com es comentava anteriorment, s'usa l'escala ${}^w\text{pH}$ per mesurar el pH en un solvent no aquós o hidroorgànic, es pot definir el pH d'una solució problema com:

$${}^s\text{pH}_X = {}^w\text{pH}_{S1} - \frac{{}^sE_X - {}^wE_{S1}}{g} \quad (1.21)$$

i

$$g = \frac{{}^wE_{S1} - {}^wE_{S2}}{{}^w\text{pH}_{S2} - {}^w\text{pH}_{S1}} \quad (1.22)$$

En aquest cas també s'assumeix que la contribució del potencial d'unió líquida al potencial de la cel·la és constant. Aquesta assumptió és intrínseca a la mesura del pH en qualsevol solvent, bé sigui aigua, un solvent orgànic o una mescla hidroorgànica, perquè no podem mesurar la contribució del potencial d'unió líquida en la mesura del pH. Donat que les mobilitats dels ions que generen aquest potencial depenen dels solvents, l'error provocat pel potencial d'unió líquida ha de ser major en l'escala ${}^w\text{pH}$ que no pas en la ${}^s\text{pH}$, ja que en la primera escala el calibratge es realitza en un solvent i la mesura en un altre, mentre que en la segona tot el procés es porta terme en solvents de la mateixa composició. Aquest error s'ha quantificat en 1-2 mV per alguns solvents orgànics purs [43].

La diferència en el potencial d'unió líquida entre les mostres en un determinat solvent (orgànic o hidroorgànic) i els estàndards en aigua introdueix, a més de l'efecte del medi $\log {}^s\gamma_{\text{H}}^0$ (Eq. 1.5), un altre terme de variació en la relació entre les escales ${}^w\text{pH}$ i ${}^s\text{pH}$. Per poder determinar la diferència entre aquestes dues escales per a un solvent determinat, havent calibrat el sistema amb solucions estàndard aquoses, s'ha de mesurar el ${}^w\text{pH}$ d'un o més estàndards dels quals es tingui coneixement exacte dels seus corresponents valors de ${}^s\text{pH}$. Aquesta diferència de valors de pH, definida com a δ [20,25,28,31], inclou l'efecte del medi

i les diferències dels potencials d'unió líquida entre la solució problema mesurada en el solvent (${}^s E_{JX}$) i els estàndards de calibratge aquosos (${}^w E_{JS}$):

$$\delta = \bar{E}_j - \log {}^s \gamma_{\text{H}}^0 = {}^w \text{pH} - {}^s \text{pH} \quad (1.23)$$

on:

$$\bar{E}_j = \frac{{}^s E_{JX} - {}^w E_{JS}}{g} \quad (1.24)$$

En cromatografia de líquids conèixer els valors d'aquest paràmetre δ és molt útil, perquè permet calibrar de forma senzilla el sistema d'elèctrodes amb estàndards aquosos, mesurar el pH de la fase mòbil en l'escala ${}^w \text{pH}$, i transformar aquests valors de pH als corresponents en l'escala ${}^s \text{pH}$. Cal tenir en compte que és el ${}^s \text{pH}$ el valor que es relaciona directament amb la constant termodinàmica de dissociació d'anàlits ionitzables, i és el valor de pH que permet obtenir la concentració de protons un cop calculat el coeficient d'activitat corresponent mitjançant les equacions de Debye-Hückel. D'aquí la importància del paràmetre δ , donat que el calibratge en medi aquós és molt més senzill, pràctic i universal que no pas el calibratge en un solvent determinat.

En el cas de mescles MeOH/aigua, Bates [20] va recopilar valors de δ obtinguts per dos autors diferents usant un elèctrode d'hidrogen [57,58], per tant, sense cap potencial d'unió líquida. Aquests valors de δ són força coincidents amb els obtinguts recentment en el nostre grup de recerca amb un elèctrode de vidre [59]. Això ens indica que la contribució de les diferències dels potencial d'unió líquida al paràmetre δ és molt baixa en el cas d'elèctrodes de vidre convencionals dissenyats per minimitzar aquest tipus de potencial. Per exemple, un pont salí de KCl de $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ experimenta en aigua uns potencials d'unió líquida de l'ordre de 1 mV, és a dir, 0.02 unitats de pH. Lògicament aquest potencial generat en el calibratge en medi aquós és compensat pel corresponent a la unió líquida entre el pont salí i el solvent, de tal forma que s'estima que l'error introduït per la suma d'aquests dos potencials d'unió líquida és menor de 0.01 unitats de pH [60]. Els valors disponibles de δ per mescles MeOH/aigua han estat representats en funció de la fracció en volum de MeOH (ϕ_{MeOH}) en el solvent hidroorgànic, donant lloc a l'equació [59]:

$$\delta = \frac{0.09\phi_{\text{MeOH}} - 0.11\phi_{\text{MeOH}}^2}{1 - 3.15\phi_{\text{MeOH}} + 3.51\phi_{\text{MeOH}}^2 - 1.35\phi_{\text{MeOH}}^3} \quad (1.25)$$

Els valors de δ per mescles MeCN/aigua només han estat determinats amb elèctrodes de vidre. Per tant, a diferència de les mescles MeOH/aigua, no podem relacionar aquests valors amb els obtinguts usant un sistema d'elèctrodes que pel seu disseny no presenti cap potencial d'unió líquida. En qualsevol cas, aquests valors de δ poden ser estimats en funció de la fracció en volum de MeCN (ϕ_{MeCN}) fins al 60% de modificador orgànic mitjançant l'equació [44,60]:

$$\delta = \frac{-0.446\phi_{\text{MeCN}}^2}{1 - 1.316\phi_{\text{MeCN}} + 0.433\phi_{\text{MeCN}}^2} \quad (1.26)$$

Així la diferència entre ${}^{\text{s}}\text{pH}$ i ${}^{\text{w}}\text{pH}$, representada pel valor de δ , és un valor constant que només depèn de la composició de la fase mòbil. En canvi, com es veurà detalladament, la diferència entre ${}^{\text{w}}\text{pH}$ i ${}^{\text{s}}\text{pH}$ (o ${}^{\text{s}}\text{pH}$) depèn no només de la composició de la fase mòbil, sinó també de la naturalesa del tampó utilitzat [44,61].

1.2 ÚS DE SOLVENTS ORGÀNICS EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

1.2.1 RESSENYA HISTÒRICA DE L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR



S'entén per *electroforesi* el moviment de molècules o partícules carregades elèctricament en un medi conductor, normalment aquós, sota la influència d'un camp elèctric. El bioquímic suec Arne W.K. Tiselius (1902-1971) va usar per primer cop l'any 1937 l'electroforesi com a tècnica analítica per separar proteïnes en funció de la seva diferent velocitat de migració en solució en aplicar un camp elèctric [62], descobriment que li comportà el premi Nobel de Química de 1948. Aquests estudis inicials en solució lliure posaven de manifest la distorsió produïda per fenòmens convectius en la solució. Per tal d'evitar-los, tradicionalment l'electroforesi es duia a terme en medis no convectius, com era el cas de l'agarosa o gels de poliacrilamida. Simon Raymond i Lewis Weintraub van introduir el 1959 l'electroforesi de gel de poliacrilamida [63], i d'aleshores ençà ha estat àmpliament utilitzada com a tècnica de separació de macromolècules d'interès biològic. Els problemes fonamentals d'aquesta tècnica, però, són una baixa resolució i uns temps d'anàlisi massa llargs, deguts a la viscositat del medi i la inconveniència d'aplicar potencials elevats.

Els fenòmens de convecció en la solució també poden minimitzar-se si la solució i els anàlits s'introdueixen dins d'un capil·lar. La calor generada en la solució en aplicar un potencial, l'efecte Joule, pot dissipar-se amb facilitat en un capil·lar, donada l'elevada àrea superficial del capil·lar en relació al volum de solució que conté. D'aquesta forma, degut a la minimització dels corrents convectius d'origen tèrmic a l'interior del capil·lar, es redueix l'amplada de banda en la migració dels anàlits, tot permeten l'aplicació de camps elèctrics elevats que redueixin el temps d'anàlisi. A finals dels anys 50 Stellan Hjertén (Universitat d'Uppsala, Suècia) va usar per primer cop aquesta tècnica, aconseguint la separació de petits ions inorgànics i macromolècules en un tub d'uns 5 mm de diàmetre [64,65]. El tub, fet de polimetil-metacrilat, rotava sobre el seu eix horitzontal per tal d'estabilitzar les zones de migració davant de la influència de la gravetat i la convecció. Però la primera demostració real del vertader potencial de l'electroforesi capil·lar no es va posar de manifest fins el 1981, quan James W. Jorgenson i Krynn D. Lukacs (Universitat de North Carolina, NC, EEUU) van aconseguir altes eficiències de separació aplicant elevats camps elèctrics a un capil·lar de 75

µm de diàmetre intern [66]. D'aleshores ençà l'electroforesi capil·lar s'ha consolidat com una tècnica de separació potent i aplicable a la resolució de mescles d'anàlits de diferents característiques.

1.2.2 PRINCIPIS DE L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR ZONAL

1.2.2.1 Fonament

L'*electroforesi* és un mètode de separació d'una mescla d'anàlits en solució basat en les seves diferents velocitats de migració en ser sotmesa la solució a l'acció d'un camp elèctric. Les velocitats i les direccions de migració dels ions depenen de la seva grandària i de les magnituds i signes de les seves càrregues. Els cations, carregats positivament, migren cap a l'elèctrode carregat negativament (el càtode), i els anions, carregats negativament, migren cap a l'elèctrode carregat positivament (l'ànode). Un ió més petit migrarà més de pressa que un ió més gran de la mateixa càrrega, i per a dos ions de la mateixa grandària migrarà amb més velocitat l'ió de major càrrega. Les molècules neutres no es veuran directament influïdes pel camp elèctric. Per tant, els components de mescles de compostos químics poden ser separats per electroforesi en funció de les diferències de càrrega i grandària que presenten. En electroforesi capil·lar, sota la influència del camp elèctric, les molècules de la solució iònica amortidora de pH es desplacen a través del capil·lar, degut a l'electroosmosi. El flux electroosmòtic del tampó es mou cap a l'elèctrode negatiu i arrossega amb ell els soluts, bé siguin iònics o neutres.

En l'electroforesi, els compostos es mouen cap al càtode o l'ànode com a conseqüència de la influència del camp elèctric aplicat. En absència de cap altre influència, teòricament, els compostos migraran a través del medi conductor com a zones estretes que no es difonen o s'obren. L'*electroforesi zonal* es refereix a la migració de les molècules d'un determinat anàlit interpretades com a zones més o menys estretes que no pateixen un eixamplament degut a la difusió. En realitat, hi pot haver una certa difusió longitudinal de les molècules components de la mostra, donat que es produeix en una direcció paral·lela a la migració dels anàlits. I també pot produir-se una difusió radial dels anàlits, perpendicular a la direcció de migració. El grau de dispersió de les molècules estarà influït pel coeficient de difusió dels anàlits. Normalment, com més petita sigui la molècula major serà el seu coeficient de difusió. La

difusió radial i longitudinal, però, no causa un eixamplament de zona significatiu, donat que la velocitat de difusió de les molècules en el líquid és relativament petita comparada amb la velocitat de migració dels anàlits a través del líquid. En canvi, la difusió convectiva o tèrmica contribueix significativament a l'eixamplament de zona. L'efecte Joule produït en la transmissió del corrent elèctric a través d'una solució conductora escalfa localment la solució i genera difusió convectiva. Les molècules en el centre del capil·lar, més calent i menys viscos, migren més ràpidament que les que es troben a prop de les parets del capil·lar, més fred. Si es redueix el diàmetre intern del capil·lar hi haurà una menor diferència radial de temperatura, que produirà una menor difusió convectiva, zones més estretes i millors separacions de les zones. A més, en reduir el diàmetre del tub es produeix un augment de la resistència elèctrica, i per tant tindrem menys intensitat de corrent per a un voltatge determinat i, conseqüentment, menys efecte Joule. A més, una disminució del radi del tub genera un augment de la relació superfície interna/volum, de tal forma que es produeix una millor dissipació de la calor a causa de la gran superfície que pot dissipar la calor.

1.2.2.2 Sistema d'electroforesi capil·lar

Un sistema d'electroforesi capil·lar està format per un capil·lar, normalment de sílice fosa, submergit en els seus dos extrems en vials que contenen una solució d'electròlit, una font d'elevat voltatge i un sistema detector. A la Figura 1.4 es mostra esquemàticament un sistema d'electroforesi capil·lar.

L'electroforesi s'aconsegueix omplint el vial d'entrada, el capil·lar i el vial de sortida amb una solució d'electròlit, normalment un tampó aquós. L'entrada del capil·lar s'introdueix dins del vial de mostra, s'introdueix la mostra al capil·lar electrocinèticament o a pressió, i l'entrada del capil·lar es torna a posar dins el vial d'entrada, i llavors s'aplica el camp elèctric entre els vials d'entrada i de sortida. Tal i com migren els anàlits a través del capil·lar, són detectats i s'enregistren a l'electroferograma.

La composició de la solució tampó és una de les variables més importants en electroforesi capil·lar, i petits canvis en el pH o en la concentració del tampó poden causar canvis significatius en els intervals de migració dels anàlits. Per tant, és important que els

vials de sortida i d'arribada, així com el capil·lar, estiguin nets i completament amarats d'una mateixa solució tampó de condicions controlades i perfectament conegudes.

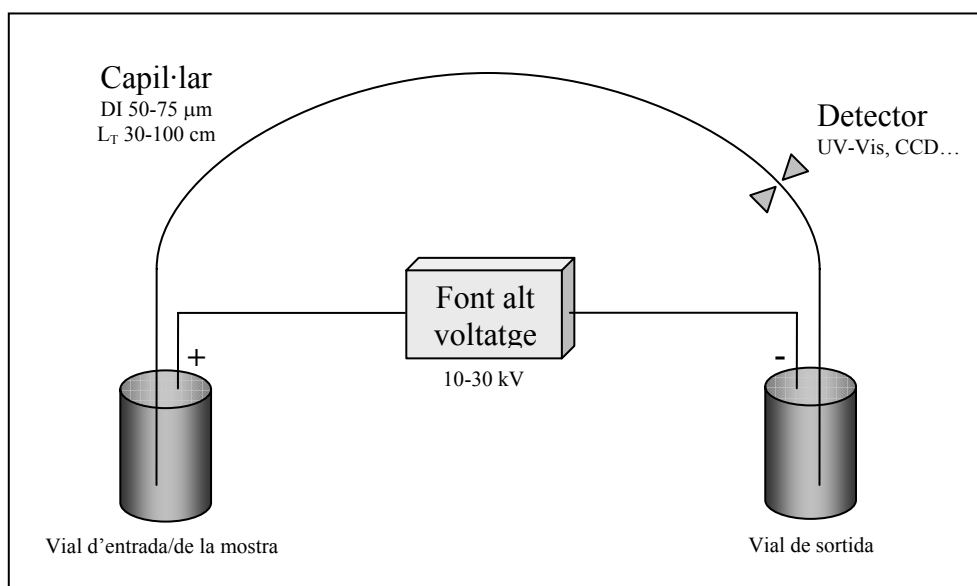


Figura 1.4 Representació esquemàtica d'un equip d'electroforesi capil·lar.

1.2.2.3 El flux electroosmòtic

En electroforesi capil·lar, a més dels soluts, la solució tampó iònica es desplaça a través del capil·lar sota la influència del camp elèctric. Aquest fenomen rep el nom de *flux electroosmòtic*. En introduir un tampó dins un capil·lar, la superfície interna del capil·lar es carrega elèctricament. Aquest fenomen pot ser degut a la ionització de la superfície del capil·lar o l'adsorció d'ions del tampó en el capil·lar. En el cas dels capil·lars de sílice fosa, els grups silanol (Si-OH) presents a la superfície s'ionitzen negativament a grups silanoat (Si-O⁻) a pH superior a 3. El pK_a dels grups silanol en medi aquós té un valor estimat de 5.3 [67]. Aquesta ionització pot ser forçada fent passar una solució bàsica (NaOH o KOH) a través del capil·lar abans de fer-hi circular la solució tampó. Els grups silanoat, negativament carregats, atreuen els cations del tampó, creant una capa fixa de cations a la paret interna del capil·lar. Aquests cations no creen una densitat elèctrica suficient per neutralitzar totes les càrregues negatives, i es forma una segona capa catiònica. La capa catiònica fermament adsorbida pels grups silanoats rep el nom de capa fixa, mentre que la segona capa, més allunyada dels Si-O⁻ és la capa mòbil. En aplicar un camp elèctric, la capa mòbil de cations és atreta cap al càtode,

carregat negativament. Donat que aquests cations estan solvatats, arrosseguen la solució tampó amb ells, generant el flux electroosmòtic.

Les espècies carregades se separen en funció de les diferents mobilitats electroforètiques que presenten, i tendeixen a migrar cap a l'elèctrode de càrrega oposada al solut. Així, en un mode normal d'operació en què els analits migren cap al càtode, si no hi hagués flux electroosmòtic els anions de la mostra migrarien cap al vial que conté l'ànode sense passar pel detector. Afortunadament, el flux electroosmòtic del tampó normalment és més intens que les mobilitats electroforètiques dels soluts carregats negativament, i són arrossegats a través del capil·lar cap al detector. D'aquesta forma, els soluts aniònics es desplacen a través del capil·lar a una velocitat inferior al flux electroosmòtic, els soluts neutres a la mateixa velocitat i els carregats positivament es mouen més ràpidament degut a la influència del flux electroosmòtic i de la mobilitat electroforètica. El flux electroosmòtic permet, doncs, aplicant una sola metodologia separar els cations dels anions, i també ions del mateix tipus però amb relacions càrrega/grandària significativament diferents poden ser separats en temps relativament curts. A la Figura 1.5 es mostra una representació esquemàtica simplificada del fonament del flux electroosmòtic en un capil·lar de sílice fosa.

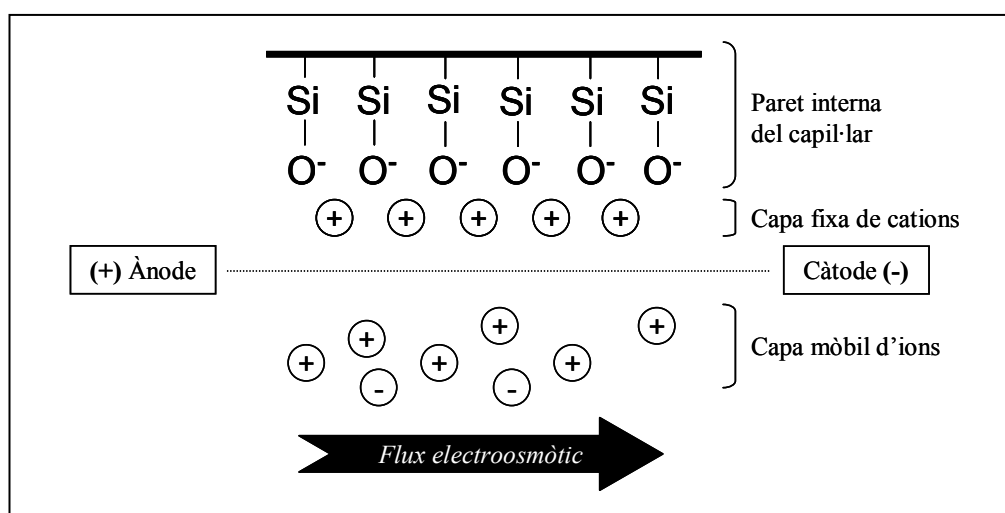


Figura 1.5 Representació esquemàtica del fonament del flux electroosmòtic

Per tal de mantenir el balanç de càrrega, una capa de cations se situa adjacentment a la paret del capil·lar, carregada negativament, formant una doble capa elèctrica. La Figura 1.6 mostra esquemàticament aquesta doble capa d'acord amb el model de Gouy-Chapman amb les modificacions proposades per Stern i Grahame. Adsorbides a la paret del capil·lar trobem

una capa de cations sense solvatar, formant el pla intern de Helmholtz (PIH). Aquesta és la distància mínima a què un catió sense solvatar pot apropar-se a la paret interna del capil·lar, carregada negativament. A una distància lleugerament superior a la del PIH, trobem el pla extern de Helmholtz (PEH), que representa la distància de màxima aproximació a la paret del capil·lar dels cations solvatats. L'espai comprès entre la paret del capil·lar i la PEH representa la porció compacta de la doble capa elèctrica, i rep el nom de capa de Stern. La doble capa difosa s'estén des del PEH fins al si de la solució. En aplicar un determinat voltatge els cations de la doble capa, més enllà del pla de lliscament, migren cap al càtode (elèctrode negatiu), arrossegant amb ells les seves respectives esferes de solvatació. Com a resultat, el si de la solució també migra cap al càtode, generant el flux electroosmòtic.

Degut a la presència de grups silanoat la paret del capil·lar ostenta un determinat potencial negatiu (ψ_0). Aquest potencial disminueix linealment en les dues regions de la capa de Stern (paret del capil·lar-PIH i PIH-PEH). Més enllà del PEH el potencial (ψ_d) disminueix exponencialment fins arribar a un valor de 0 en el si de la solució. El potencial al pla de lliscament rep el nom de *potencial electrocinètic* o *potencial zeta* (ζ).

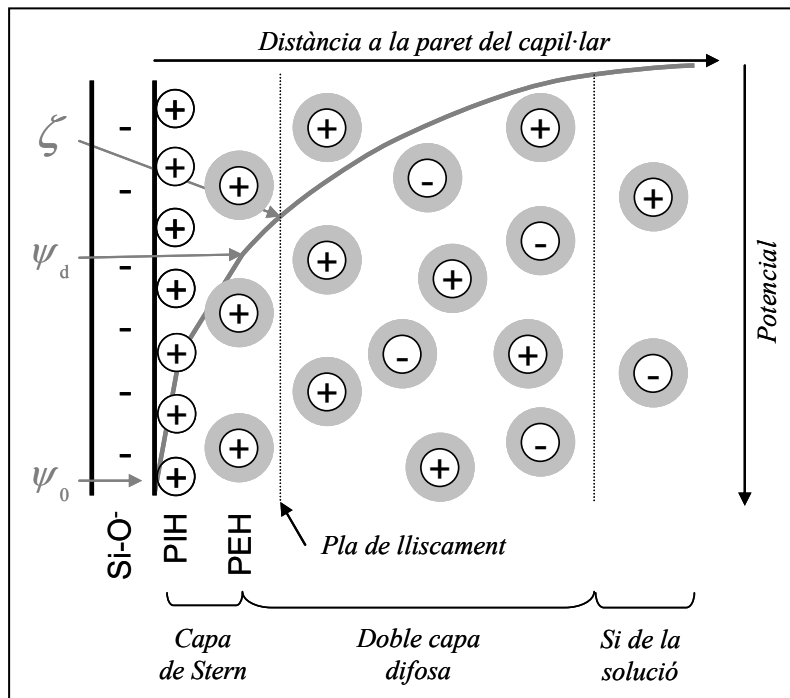


Figura 1.6

Il·lustració esquemàtica de la doble capa elèctrica i la variació del potencial en funció de la distància a la paret del capil·lar.

La importància d'aquest potencial electrocinètic rau en el fet que el flux electroosmòtic n'és proporcional. El potencial zeta és directament proporcional al gruix de la doble capa [68], i

inversament proporcional a la constant dielèctrica de la solució d'electròlit. El gruix de la doble capa és inversament proporcional a la concentració del tampó (una concentració de tampó de $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ produeix una capa d'aproximadament 1 nm de gruix [69]). ζ és positiu si el potencial s'incrementa des del si de la solució a la interfase, i és negatiu si succeeix el contrari. Donat que no hi ha informació fidedigna sobre la viscositat i la permitivitat del medi de la doble capa en les immediacions del pla de lliscament, el càlcul del potencial electrocinètic depèn de la metodologia emprada. Tanmateix, si se segueixen les mateixes suposicions per la permitivitat i la viscositat tots els fenòmens electrocinètics han de donar un mateix valor de potencial electrocinètic [70]. Si la relació permitivitat-viscositat es considera independent del camp elèctric de la doble capa, aquest potencial (ζ) pot relacionar-se amb la *mobilitat electroosmòtica* (μ_{eo}) mitjançant l'equació de Smoluchowski [71-73]:

$$\mu_{\text{EOF}} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} \quad (1.27)$$

on ε_0 és la *permitivitat en el buit* (constant física fonamental), ε_r és la *permitivitat relativa* (normalment la del solvent pur) i η és la *viscositat dinàmica* del solvent. ε_r és la relació entre la força del camp elèctric en el buit i en el solvent, anteriorment anomenada *constant dielèctrica*. El producte de la permitivitat en el buit i la permitivitat relativa ($\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0$) rep el nom de *permitivitat* (ε) [70]. Cal fer notar que la mobilitat electroosmòtica depèn només de les característiques del tampó, és a dir, permitivitat, viscositat, pH i concentració (que influeixen sobre el potencial zeta), i és independent del camp elèctric aplicat.

Experimentalment la mobilitat electroosmòtica es defineix per la relació entre la *velocitat electroosmòtica* (v_{EOF}) i el camp elèctric (E):

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} \quad (1.28)$$

El camp elèctric considerat és la diferència de potencial aplicada entre els dos extrems del capil·lar dividida per la longitud total del capil·lar. La velocitat electroosmòtica pot determinar-se mesurant la velocitat de migració d'un marcador (anàlit neutre) des de l'extrem

d'injecció del capil·lar fins al detector. Les unitats de la mobilitat electroforètica solen ser $m^2V^{-1}s^{-1}$.

El front del flux electroosmòtic és relativament pla en comparació amb el flux laminar que s'obté en HPLC, donat que el camp elèctric que genera el flux electroosmòtic és uniforme al llarg del capil·lar. Degut a la resistència de fricció, el flux electroosmòtic en les immediacions de la paret del capil·lar és més lent que el flux que circula en la resta del tub (Figura 1.7).

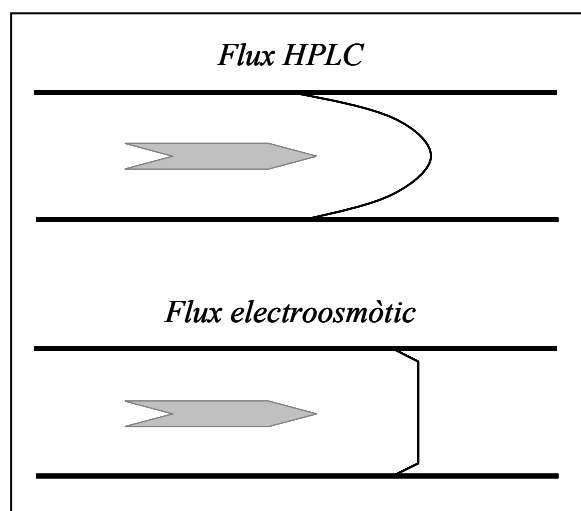


Figura 1.7

Representació esquemàtica dels front del flux d'un solvent obtingut a pressió (HPLC) i electroosmòticament.

Un augment del voltatge aplicat incrementa la velocitat del flux electroosmòtic, perquè implica un augment del camp elèctric. A més, voltatges elevats proporcionen elevades eficiències en la separació dels anàlits. Cal tenir en compte, però, que elevats voltatges també provoquen un escalfament del capil·lar produït per l'efecte Joule. Donat que en produir-se un calor excessiu disminueix sobtadament la resistència del tampó al pas del corrent, el màxim voltatge que pot ser aplicat per a unes determinades condicions experimentals pot determinar-se en el punt de trencament de la linealitat de la llei d'Ohm. El voltatge màxim que es pot aplicar també depèn de la longitud del capil·lar i del seu diàmetre intern. Com més curt sigui el capil·lar menor serà el voltatge màxim aplicable, i un menor diàmetre intern del capil·lar augmentarà la resistència i disminuirà la intensitat del corrent.

En augmentar el pH s'incrementarà el nombre de grups silanol desprotonats i, conseqüentment, augmentarà el valor del potencial zeta i amb ell la mobilitat electroosmòtica

(Eq. 1.27). A pH inferior a 2 no hi ha flux electroosmòtic en un capil·lar de sílice fosa perquè els grups silanol es troben totalment protonats. A més, el pH del tampó és clau en el grau d'ionització dels soluts i, consegüentment, sobre les seves mobilitats electroforètiques. Normalment s'escull el tampó que proporcioni la millor separació possible, i no necessàriament el que confereixi una òptima velocitat electroosmòtica.

Quan la temperatura del capil·lar està completament controlada, un augment de la força iònica o concentració de tampó disminuirà el flux electroosmòtic perquè reduirà el valor del potencial electrocinètic. Així, baixes concentracions de solució tampó són recomanables perquè proporcionen menors temps d'anàlisi, però cal evitar concentracions excessivament baixes perquè poden provocar eixamplaments i asimetries de pics. A més, es poden produir diferències de conductivitat entre el solut i la solució tampó que l'envolta, causant una distorsió en el camp elèctric generat. Aquesta distorsió pot provocar pics amples i oblics. Com a norma general, la concentració del tampó ha de ser 10 vegades superior a la dels anàlits [74], normalment de 10 a 100 mmol·L⁻¹.

Un augment de la temperatura provoca un increment del flux electroosmòtic a causa del descens en la viscositat del tampó, però alhora provoca un descens en la permitivitat del medi, fet que podria provocar una reducció del flux electroosmòtic. En qualsevol cas, però, l'efecte produït per la disminució de la viscositat és més important que el de la disminució de la constant dielèctrica, sent el resultat net un increment del flux electroosmòtic amb la temperatura.

1.2.2.4 Mobilitat electroforètica

Un ió que migra sota l'efecte d'un camp elèctric (E) experimental dues forces oposades: la força elèctrica (F_E) i la força de fricció al desplaçar-se (F_F). Si la velocitat de migració es manté constant en el temps, aquestes dues forces han de tenir la mateixa magnitud. Així:

$$(F_E = z e E) = (f v_{EP} = F_F) \quad (1.29)$$

on z és el nombre de càrregues elementals de l'ió, e és la càrrega elemental, f el coeficient de fricció i v_{EP} és la velocitat electroforètica de migració de l'ió. D'aquesta igualtat es desprèn que:

$$v_{EP} = \frac{z e E}{f} \quad (1.30)$$

Si definim la mobilitat electroforètica com la velocitat de migració de l'ió per unitat de camp elèctric, tenim:

$$\mu_{EP} = \frac{v_{EP}}{E} = \frac{z e}{f} \quad (1.31)$$

El coeficient de fricció augmenta amb la grandària de l'ió amb la viscositat de la solució d'electròlit suport. Si considerem que l'ió és una partícula esfèrica rígida de radi r que es desplaça immersa en un medi continu de viscositat η , el coeficient de fricció pot ser estimat mitjançant la llei de Stokes, i l'Eq. 1.31 pot expressar-se com [72]:

$$\mu_{EP} = \frac{z e}{6 \pi \eta r} \quad (1.32)$$

Els coeficients de fricció de partícules d'altres formes, com seria el cas d'el·lipsoides oblates o prolates (aplatades o allargades, respectivament, en la direcció de l'eix polar), poden estimar-se utilitzant models de fricció més complexos.

La mobilitat electroforètica d'un anàlit mesurada experimentalment és la *mobilitat efectiva* (μ_{Eff}). La mobilitat efectiva depèn del grau d'ionització de l'anàlit, per tant del pH, i de la força iònica de solució també. Quan l'anàlit es troba totalment ionitzat, en una solució d'electròlit de força iònica determinada, podem mesurar la *mobilitat real* (μ_{Act}). I finalment la *mobilitat absoluta* (μ_{Abs}) es correspon a la mobilitat de l'anàlit totalment ionitzat a dilució infinita, és a dir, en una hipotètica solució de força iònica zero.

1.2.2.5 Mobilitat electroforètica observada

La *velocitat electroforètica observada* (v_{OBS}) és la suma de la velocitat electroosmòtica del solut (v_{EP}) i la velocitat del flux electroosmòtic (v_{EOF}):

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (1.33)$$

v_{OBS} per a un anàlit pot ser mesurada experimentalment dividint la longitud efectiva del capil·lar pel seu corresponent temps de migració.

En electroforesi capil·lar en mode normal (és a dir, amb el detector situat a prop del càtode i el flux electroosmòtic desplaçant-se cap al detector) les velocitats observades dels anions són menors que el flux electroosmòtic ($v_{OBS,Anions} < v_{EOF}$, donat que $v_{EP,Anions} < 0$). Al contrari, les velocitats observades dels cations seran majors que la velocitat electroosmòtica ($v_{OBS,Cations} > v_{EOF}$, ja que $v_{EP,Cations} > 0$). Finalment, donat que els soluts neutres es mouen a través del capil·lar amb el flux electroosmòtic, les seves velocitats observades coincidiran amb la velocitat electroosmòtica ($v_{OBS,Neutres} = v_{EOF}$).

Si es reordena l'Eq. 1.33 per conèixer la velocitat electroforètica d'un anàlit i es té en compte el camp elèctric aplicat, la mobilitat electroforètica (μ_{EP}) experimental d'un anàlit pot calcular-se com:

$$\mu_{EP} = \left(\frac{L_{Eff}}{t_m} - \frac{L_{Eff}}{t_{nm}} \right) \frac{L_{Tot}}{V} \quad (1.34)$$

on L_{Eff} és la longitud efectiva del capil·lar (distància entre l'extrem d'injecció de l'anàlit i la finestra del detector), t_m i t_{nm} és el temps invertit per l'anàlit i un marcador neutre, respectivament, a recórrer la longitud efectiva del capil·lar, L_{Tot} és la longitud total del capil·lar i V és el voltatge aplicat entre els dos extrems del capil·lar.

1.2.3 LA SOLUCIÓ AMORTIDORA EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR ZONAL

1.2.3.1 Introducció

La solució amortidora juga un paper central en electroforesi capil·lar zonal (CZE). Les seves propietats conductores del corrent elèctric fan possible la migració dels anàlits iònics, i la seva composició condiciona la velocitat del flux electroosmòtic. El solvent, el tipus de solució amortidora de pH i la seva força iònica condiciona la solubilitat dels anàlits, la seva velocitat de migració, separació, eficiència i aspecte dels pics .

1.2.3.2 Control del pH

El pH és una propietat fonamental del sistema amortidor en CZE. Del pH depèn el grau d'ionització dels anàlits amb propietats àcid/base i, conseqüentment, la seva velocitat de migració electroforètica. A més, el pH també té una gran influència sobre la ionització dels grups silanol de la paret interna del capil·lar de sílice fosa, condicionant així la velocitat del flux electroosmòtic.

Si considerem la definició teòrica del pH ($\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$) i de la constant d'acidesa de l'espècie amortidora ($K_a = (a_{\text{H}^+} a_{\text{A}^-})/a_{\text{HA}}$), el pH es pot expressar en termes de:

$${}^s\text{pH} = {}^s\text{p}K_a + \log \frac{a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}} \quad (1.35)$$

on ${}^s\text{pH}$ és el valor de pH de la solució amortidora i ${}^s\text{p}K_a$ és el logaritme negatiu de la constant d'acidesa de l'espècie amortidora (${}^s\text{p}K_a = -\log {}^sK_a$), ambdós valors en el solvent s , prenent com a estat estàndard el mateix solvent s a dilució infinita. a_{HA} és l'activitat de la forma àcida de la solució amortidora i a_{A^-} és l'activitat de la base conjugada. En solució aquosa, donada la baixa concentració de la solució amortidora, se sol fer l'aproximació que els coeficients d'activitat de les espècies amortidores són pràcticament unitaris, i així l'Eq. 1.35 es pot escriure com:

$${}^w\text{pH} = {}^w\text{p}K_a + \log \frac{c_A}{c_{\text{HA}}} \quad (1.36)$$

on ${}^w\text{pH}$ i ${}^w\text{p}K_a$ són els valors aquosos del pH de la solució amortidora i del $\text{p}K_a$ de l'espècie amortidora, i c_{HA} i c_A són les concentracions analítiques de l'àcid i de la base conjugada, respectivament. L'Eq. 1.36 es coneix amb nom d'equació de Henderson-Hasselbalch [74], i s'usa per calcular les concentracions d'àcid i base conjugada necessàries per preparar un tampó d'un pH determinat. Per poder aplicar aquesta equació necessitem tenir uns valors fiables de $\text{p}K_a$ en la solució de treball. La capacitat amortidora d'una solució és màxima quan el seu valor de pH coincideix amb el $\text{p}K_a$ de les espècies amortidores (en aigua, c_{HA} i c_A), i la capacitat amortidora es considera acceptable dins de l'interval de pH comprès entre una unitat inferior i superior al seu corresponent valor de $\text{p}K_a$.

Els canvis de temperatura afecten les constants d'equilibri del sistema amortidor i, conseqüentment, el pH de les solucions amortidores. Aquesta variació del pH en funció de la temperatura és de l'ordre d'un descens de 0.1 unitats de pH per cada 10° d'augment de temperatura [74].

1.2.3.3 Paper dels cations i dels anions

En relació als cations que formen part de la solució amortidora, Issaq i col. [75,76] van dur a terme experiments en què s'estudiava la mobilitat electroforètica i electroosmòtica d'acetats de liti, sodi, potassi, rubidi i cesi. D'aquest estudi es va concloure que la mobilitat augmentava a mesura que disminuïa el radi iònic cristal·lí del catió ($\mu_{\text{Li}^+} > \mu_{\text{Na}^+} > \mu_{\text{K}^+} > \mu_{\text{Rb}^+} > \mu_{\text{Cs}^+}$). Com més petit és el radi cristal·lí dels ions, major és el seu radi hidrodinàmic (és a dir, el radi de l'ió en solució, considerant les molècules de solvent de l'esfera interna de solvatació), donat que el camp elèctric produït per la càrrega d'un ió es proporcional a la relació càrrega/radi. I com més gran sigui l'esfera de solvatació de l'ió, més molècules de solvent seran arrossegades a través del capil·lar amb el flux electroosmòtic. En el cas del Rb^+ i el Cs^+ s'observa una dràstica disminució de la mobilitat electroosmòtica en relació a l'observada per la resta de cations, probablement deguda a l'adsorció d'aquests cations de gran grandària a la paret interna del capil·lar.

Issaq i col. [77] també van estudiar l'efecte dels anions del tampó usant diferents sals de sodi (acetat, tetraborat, citrat, dihidrogenfosfat, hidrogencarbonat, nitrat i nitrit) de la mateixa concentració. En funció de la càrrega i la grandària de l'anió es produeix una major o menor intensitat de corrent elèctric a través del capil·lar, influint no només en el flux electroosmòtic i els temps de migració dels anàlits, sinó també la resolució i la selectivitat.

1.2.3.4 Efecte de la concentració del tampó en la mobilitat

L'any 1975, basant-se en arguments teòrics, Wieme [78] va suggerir que la mobilitat electroforètica hauria de ser inversament proporcional a l'arrel quadrada de la força iònica (I). Aquesta hipòtesi va ser validada experimentalment per Issaq i col. [76]. En incrementar la concentració del tampó, tant la mobilitat electroforètica com l'electroosmòtica es redueixen, de forma lineal i proporcional a $I^{-1/2}$.

Depenent del solvent utilitzat per a la preparació de la solució amortidora (aigua, metanol, acetonitril...) el grau de disminució de la mobilitat electroforètica en funció de l'invers de l'arrel quadrada de la força iònica és diferent [79].

1.2.4 SOLVENTS ORGÀNICS EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

1.2.4.1 Introducció

Els solvents orgànics en aplicacions electroforètiques són essencialment utilitzats en les anàlisis de compostos orgànics que presenten una baixa solubilitat en medis aquosos. Les propietats fisicoquímiques d'aquest tipus de solvents també poden ser útils per aconseguir una determinada separació i selectivitat dels anàlits que en medis aquosos no seria possible.

Un criteri àmpliament utilitzat en la classificació dels solvents és el de la permitivitat relativa (constant dielèctrica). Els solvents que tenen un valor de $\epsilon_r > 30$ són habitualment anomenats *solvents polars*, i aquells pels quals $\epsilon_r < 30$, *solvents apolars*. Pels primers

l'aparellament iònic dels soluts es considera negligible, i la força d'un àcid en aquests solvents es pot descriure mitjançant un valor numèric que és independent de la base amb la qual reacciona. Pels segons els parells iònics tenen un paper dominant, i l'acidesa del solut depèn de la base amb la qual reacciona. Un *parell iònic* està format per dos ions de signe contrari que es mantenen units per atraccions de tipus electroestàtic. Aquests ions poden trobar-se en contacte directe o separats per una o més molècules de solvent o altres molècules neutres. En aquests darrers casos, qualsevol ió del parell pot intercanviar-se amb una altre ió lliure en la solució o amb un altre ió que formi un altre parell iònic feble.

Un altre criteri de classificació dels solvents no aquosos es basa en el seu caràcter donador o acceptor de protons. Els *solvents apròtics* són compostos orgànics que no participen en equilibris amb protons, i els que sí ho fan reben el nom de *solvents pròtics*. Així, un solvent com l'acetonitril d'elevada permitivitat relativa ($\epsilon_r = 35.95$ a 25°C [80]) i incapaç de formar ponts d'hidrogen (malgrat que sí pot acceptar-los) es classifica com a solvent polar apròtic. A més, podem dividir cadascuna d'aquestes subclasses en funció de les propietats àcid/base del solvent, obtenint així solvents protogènics (donadors de protons), protofílics (acceptors de protons) o amfipròtics (donadors i acceptors de protons). Els fenòmens d'*homoconjugació* i *heteroconjugació* prenen rellevància en solvents que tinguin poca habilitat per formar ponts d'hidrogen. Es defineix l'homoconjugació com l'associació entre una base i el seu àcid conjugat a través d'un pont d'hidrogen ($B \dots HB^+$ o $AH \dots A^-$). Per altra banda, l'heteroconjugació consisteix en l'associació entre una base i l'àcid conjugat d'una altra base mitjançant un pont d'hidrogen ($B' \dots HB^+$ o $A'H \dots A^-$). Malgrat que aquesta és la terminologia més usada per la comunitat científica, la IUPAC considera més apropiats els termes *homoassociació* i *heteroassociació* per referir-se a aquests fenòmens [70].

Una discussió més detallada sobre la classificació dels solvents pot trobar-se a la bibliografia [80-85].

1.2.4.2 Solvents usats en electroforesi capil·lar

Els solvents orgànics aptes per a l'electroforesi capil·lar són, majoritàriament, els mateixos que s'usen en HPLC. L'objectiu és aconseguir una bona resolució electroforètica, i

els solvents orgànics (purs o mescles) permeten influir sobre les mobilitats efectives dels soluts, mitjançant el seu efecte sobre les mobilitats reals i les constants de dissociació (pK_a , parells iònics...) dels anàlits. Els factors principals en l'elecció d'un determinat solvent orgànic són:

- i. Miscibilitat amb l'aigua, en cas de treballar en solvents hidroorgànics, o estabilitat química davant de la humitat ambiental quan es treballa amb solvents purs i atmosfera no seca.
- ii. Solubilitat suficient dels anàlits, de les espècies amortidores de pH i/o de l'electròlit suport.
- iii. Químicament inert davant del tampó i dels anàlits.
- iv. Propietats físiques apropiades per a la tècnica (elevada temperatura d'ebullició, baixa viscositat, elevada permitivitat...).
- v. Baixa toxicitat.
- vi. Disponibilitat comercial a alta puresa i baix cost.

La Taula 1.4 mostra alguns solvents, juntament amb les seves propietats físiques fonamentals, aptes per electroforesi capil·lar.

Taula 1.4 Propietats físiques d'alguns solvents aptes per a electroforesi capil·lar a 25°C.

Solvent	b.p. (°C)	f.p. (°C)	ρ (g·cm ⁻³)	ϵ_r	η (cP)
Aigua	100.0	0.0	0.9971	78.30	0.8903
Metanol	64.6	-97.8	0.7866	32.70	0.5445
Etanol	78.3	-114.5	0.7851	24.55	1.089
Acetonitril	81.6	-44.9	0.7768	35.95	0.3409
<i>N,N</i> -dimetilformamida	153	-61	0.9443	36.71	0.796
Dimetilsulfòxid	189	18.5	1.0958	46.7	1.96
Acetona	56.2	-94.6	0.7850	20.70	0.3040
1,4-dioxà	101.3	11.8	1.0269	2.209	1.196
Tetrahidrofurà	66	-108.5	0.8811	7.58	0.460
Nitrometà	101.2	-28.6		36.3	0.614

b.p.: punt d'ebullició; f.p.: punt de fusió; ϵ_r : permitivitat relativa; η : coeficient de viscositat

Font: [80,86]

1.2.4.3 Influència dels solvents orgànics en la mobilitat dels ions

1.2.4.3.1 Mobilitat absoluta

La mobilitat absoluta es troba determinada, a més de per la càrrega, per la grandària i forma de l'ió solvatat (radi de Stokes) i per la viscositat del solvent. A diferència de la mobilitat real, la mobilitat a dilució infinita (força iònica nul·la) no es veu afectada per la permitivitat relativa del medi. Conceptualment no hi ha altres ions presents en el medi i, conseqüentment no es forma cap atmosfera iònica al voltant de l'ió que en retardi la migració. La regla empírica de Walden [87] ens dóna una idea de l'efecte de la viscositat del medi en la mobilitat absoluta d'un ió. Aquesta regla empírica estableix que per a una determinada temperatura el producte de la viscositat del solvent i la conductivitat límit equivalent de l'ió és constant i, per tant, independent del solvent usat. Aplicant aquesta regla a l'electroforesi, es pot reescriure en termes de viscositat i mobilitat absoluta, que no és altra cosa que la mobilitat límit:

$$\mu_{i,\text{abs}} \eta = \text{constant} \quad (1.37)$$

La regla de Walden és una aproximació simplificada, que no té en compte la solvatació de l'ió i que considera el solvent com un medi continu. Aquesta regla es compleix bé en el cas d'ions relativament grans amb baixa densitat de càrrega (p.ex. tetraalquilamoni). En aquests casos l'ió es troba poc solvatat, i el seu radi de Stokes és relativament constatat i independent del solvent. Donat que el coeficient de fricció és proporcional al radi de solvatació de l'ió, la regla de Walden es compleix correctament. A mesura que disminueix la grandària de l'ió l'efecte de la solvatació és més pronunciat, el radi de solvatació varia notablement en funció del solvent, i la regla és menys obeïda [88]. La Taula 1.5 mostra els productes de Walden d'ions de tetraalquilamoni en diferents solvents.

Taula 1.5 Productes de Walden d'ions de tetraalquilamoni en diferents solvents a 25°C [89].

Solut	$\mu_{\text{Abs},i} \eta \text{ (} 10^{-12} \text{NV}^{-1}\text{)}$				
	Aigua	Metanol	Acetonitril	Formamida	Nitrometà
Tetrametilamoni	40.94	39.31	33.44	43.94	34.69
Tetraetilamoni	29.66	34.56	30.14	35.73	30.32
Tetrabutylamoni	17.84	22.28	21.81	22.38	21.67

Porras i col. han dut a terme un estudi comparatiu molt interessant de les mobilitats absolutes de diferents anions i cations en aigua i solvents orgànics (acetonitril, metanol, *N,N*-dimetilformamida, etanol i formamida) [90]. La Figura 1.8 mostra les finestres de mobilitat (diferència entre la mobilitat de l'ió que migra a major velocitat i l'ió que migra més lentament) de diferents anions i cations de la mateixa càrrega en els solvents estudiats. En general, doncs, es conclou que l'ús de solvents orgànics no augmenta la selectivitat i la separació dels anàlits en electroforesi capil·lar respecte l'ús de solvents aquosos. Això no significa que en casos concrets l'ús d'aquest tipus de solvents pugui ser profitós, especialment si hi contribueixen altres mecanismes de separació com la formació de parells iònics o l'heteroconjugació.

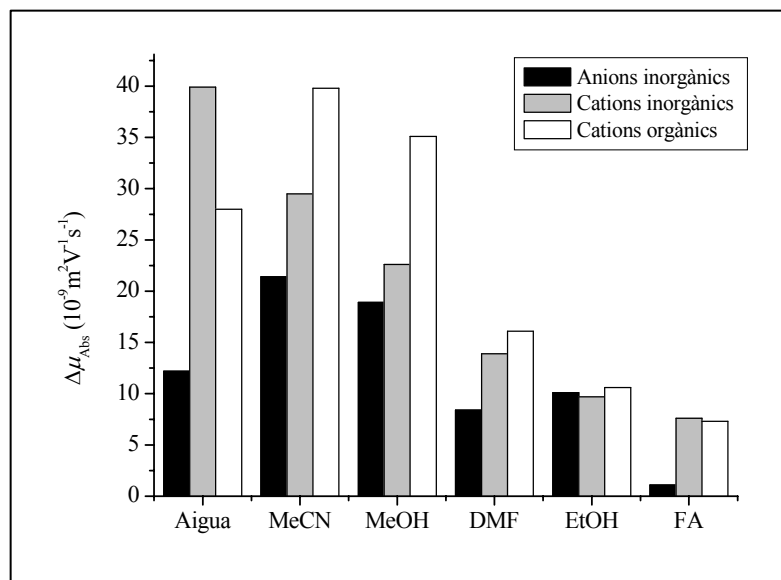


Figura 1.8

Finestres de mobilitat de diferents ions en aigua, acetonitril (MeCN), metanol (MeOH), *N,N*-dimetilformamida (DMF), etanol (EtOH) i formamida (FA). Els ions estudiats i l'ordre de mobilitat són: Anions inorgànics: $\text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{I}^- < \text{Br}^-$
 Cations inorgànics: $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Ag}^+ < \text{K}^+ \sim \text{NH}_4^+ < \text{Ta}^+ < \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+$
 Cations orgànics: $(\text{C}_5\text{H}_{11})_4\text{N}^+ < (i\text{-C}_5\text{H}_{11})_4\text{N}^+ < (\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+ < (\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{N}^+ < (\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+ < (\text{CH}_3)_4\text{N}^+$.

1.2.4.3.2 Mobilitat real

Malauradament no existeixen a la bibliografia gaires valors de mobilitats d'ions en solvents orgànics a diferents valors de força iònica. Cal tenir en compte, però, que la reducció de la mobilitat en augmentar la força iònica del tampó pot variar notablement en funció del tipus de solvent utilitzat. A la bibliografia [79] trobem, per exemple, que cations orgànics que presenten diferències notables en la mobilitat absoluta en aigua, metanol i acetonitril, a mesura que augmenta la força iònica del medi les seves mobilitats reals van apropant-se cada cop més.

1.2.4.4 Variació del pK_a dels anòlits

La constant de dissociació d'un anòlit amb propietats àcid/base, en relació amb el pH de la solució tampó, condiciona el seu grau d'ionització i, conseqüentment, la seva velocitat de migració. Com ja hem vist anteriorment, els valors de pK_a poden variar substancialment en substituir l'aigua per un solvent orgànic. L'aigua estabilitza els cations i els anions, mentre que els solvents orgànics poden presentar un comportament totalment diferent. Normalment, els solvents orgànics estabilitzen els anions pitjor que l'aigua. Així en el cas d'àcids neutres (bases aniòniques) el pK_a augmentarà en substituir l'aigua per un solvent orgànic. Aquesta tendència és molt menys clara en el cas d'àcids catiónics, donat que el solvent orgànic ha d'estabilitzar la forma àcida protonada (BH^+) i el protó dissociat (H^+). A la bibliografia podem trobar exemples de la variació del pK_a d'àcids catiónics orgànics (bases neutres) [91-94] i neutres (bases aniòniques) [95] en metanol i acetonitril.

1.2.4.5 Variació del flux electroosmòtic

La magnitud del flux electroosmòtic depèn (Eq. 1.27) de les propietats en el si de la solució (viscositat, η , i permitivitat relativa, ϵ_r) i del potencial elèctric a les proximitats de la paret del capil·lar (potencial zeta, ζ). η i ϵ_r són propietats inherents dels solvents i de la seva temperatura, i poden diferir notablement en funció del solvent escollit. ζ depèn de la densitat de càrrega a la superfície del capil·lar. En els capil·lars de sílice la càrrega superficial es deu principalment a la dissociació dels grups silanol, i secundàriament a la possible adsorció d'ions a la paret del capil·lar. Els silanols són àcids febles i, per tant, el seu grau de dissociació dependrà del pH de la solució. Els grups silanol de la paret del capil·lar són heterogenis, i en funció de la seva naturalesa presenten forces àcides lleugerament diferents. Així, en aigua, el grau d'ionització del capil·lar varia aproximadament entre pH 2, sense càrrega, i 8, completament carregat negativament. En metanol aquest interval de valors s_pH estaria comprès entre 7 i 13, i en acetonitril entre 17 i 23 [90]. Si el pH és molt àcid el flux electroosmòtic pot arribar a invertir-se, és a dir, a fluir des del càtode cap a l'ànode. En aigua, aquest punt anomenat de càrrega zero, s'assoleix $pH < 1.5$. En solvents orgànics aquest punt s'assoleix lògicament a valors més alts de pH, per exemple al voltant de s_pH 7 pel metanol [96].

1.2.4.6 Mesura del pH

Per tal que una determinada solució amortidora de pH pugui ser considerada com estàndard primari de la IUPAC en un determinat solvent és condició indispensable que la permitivitat relativa del solvent sigui superior a 35, per tal que l'àcid clorhídric i el clorur de sodi o de potassi utilitzats en la determinació de E^0 en la cel·la de Harned estiguin completament dissociats [97]. Aquesta condició no es compleix pel metanol ($\epsilon_r = 32.66$ a 25°C [86]), però sí per l'acetonitril ($\epsilon_r = 35.94$ a 25°C [86]). En acetonitril, però, l'àcid clorhídric té un caràcter feble ($\text{p}K_a = 8.9$ a 25°C [98]) i, a més, donada la seva poca capacitat estabilitzadora d'anions pot donar lloc a fenòmens d'homoconjugació i heteroconjugació. Per tant, és difícil de trobar estàndards primaris de pH que compleixin les especificacions de la IUPAC disponibles per solvents orgànics.

De Ligny i col. han introduït solucions estàndards de pH en metanol, principalment d'àcid oxàlic/oxalat, àcid salicílic/salicilat i àcid succínic/succinat, tenint en compte la dissociació incompleta de les sals en aquest solvent [49,50,99].

L'absència de solucions de pH de tipus estàndard primari per a la majoria de solvents orgànics no impedeix que es puguin trobar solucions tampó que siguin aptes per a calibrar l'elèctrode de vidre d'un pH-metre. Les solucions de calibratge més comunes es preparen a partir de l'àcid pícric (2,4,6-trinitrofenol) o del 2,6-dinitrofenol i de les seves respectives sals de tetraalquilamoni. Els anions d'aquests fenols tenen una gran deslocalització de la càrrega, que minimitza els fenòmens d'homoconjugació. Les seves constants de dissociació han estat determinades per mètodes conductimètrics, potenciomètrics o espectrofotomètrics. Un cop el sistema d'elèctrodes ha estat calibrat amb aquestes solucions, es pot determinar per valoració potenciomètrica les constants de dissociació d'altres àcids i bases en solvents orgànics. Cal emprar un elèctrode de referència, típicament de calomelans, en què l'habitual solució aquosa de KCl ha estat substituïda per una altra de perclorat de tetraalquilamoni en el solvent orgànic. Per a més informació de la mesura del pH en medis orgànics en electroforesi capil·lar consulteu [97].

Així, doncs, el pH en solvents orgànics es pot mesurar utilitzant un elèctrode de vidre calibrat amb una solució apropiada de pH conegut i amb un elèctrode de referència que

contingui un electròlit totalment dissociat dissolt en el solvent orgànic de treball. Aquesta metodologia, que és la més acurada per conèixer el pH d'una solució en medi orgànic, no és gaire utilitzada en electroforesi capil·lar zonal donades les exigències de control i manteniment de la puresa química del sistema (solvents i electròlits). Per tal que els potencials d'elèctrode siguin constants cal protegir el sistema de la humitat ambiental i altres impureses que alterarien les propietats del solvent. A més, la composició del solvent ha de ser idèntica en la mostra problema, la de la solució de calibratge, l'electròlit intern i l'electròlit del pont salí.

La forma més pràctica d'ajustar el pH en solvents orgànics, quan coneixem el pK_a de l'espècie amortidora, és a través de l'equació de Henderson-Hasselbalch (Eq. 1.36). Així el pH pot ajustar-se dins de l'interval en què la solució presenta una bona capacitat amortidora ($pK_a \pm 1$) variant la relació àcid/base conjugada. Aquesta equació, però, no és universalment vàlida per tots els solvents orgànics i sistemes amortidors. Per poder-la utilitzar l'equilibri àcid/base ha de ser el principal, i altres equilibris de formació de parells iònics, heteroconjugació i homoconjugació han de ser menystenibles.

1.3 REFERÈNCIES

- [1] E.M. Senchenkova, Michael Tswett. The Creator of Chromatography., Davankov, V.A. & Ettre, L.S., Moscow, 2003.
- [2] G. López Cueto, in Lliçó inaugural curs 2004/2005, Universitat d'Alacant, Alacant, 2004.
- [3] M. Tswett, Ber. Deuts. Bot. Ges. 24 (1906) 384.
- [4] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J. 35 (1941) 1358.
- [5] A.T. James, A.J.P. Martin, Biochem. J. 50 (1952) 679.
- [6] B.L. Karger, L.R. Snyder, C. Horváth, An Introduction to Separation Science, Wiley, New York, 1973.
- [7] K. Karch, I. Sebestian, I. Halász, H. Engelhardt, J. Chromatogr. 122 (1976) 171.
- [8] M.D. Palamareva, H.E. Palamarev, J. Chromatogr. A 477 (1989) 235.
- [9] L.R. Snyder, J. Chromatogr. A 92 (1974) 223.
- [10] D.C. Luehrs, D.J. Chesney, K.A. Godbole, J. Chromatogr. A 627 (1992) 37.
- [11] R.S. Higgins, S.A. Klinger, High Purity Solvent Guide, 3rd edition, Burdick & Jackson, Muskegon, MI, 1990.
- [12] U.D. Neue, HPLC Columns: Theory, Technology and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [13] J.H. Knox, Chromatogr. Newsletter 2 (1973) 1.
- [14] J.H. Knox, J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 352.
- [15] P.C. Sadek, The HPLC Solvent Guide, 2nd edition., John Wiley and Sons, Inc., New York, 2002.
- [16] V.R. Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography, 1a ed. anglesa, Wiley, 1988.
- [17] International Chemical Safety Cards, International Program on Chemical Safety. International Labour Organization. 2005.
<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/index.htm>
- [18] Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2006, Instituto Nacional para la Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. <http://www.mtas.es/insht/practice/vlas.htm>.

- [19] O. Budevsky, *Fonaments de l'Anàlisi Química*, 1a edició, Universitat de Barcelona, Barcelona, 1993.
- [20] R.G. Bates, *Determination of pH: Theory and Practice*, second ed., Wiley, New York, 1973.
- [21] B.A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 491.
- [22] I.M. Kolthoff, P.J. Elving, E.B. Sandell, *Treatise on Analytical Chemistry, Part I*, vol. 1, Interscience, New York, 1959.
- [23] L. Šůcha, S. Kotrlý, *Solution Equilibria in Analytical Chemistry*, Van Nostrand Reinhold, London, 1972.
- [24] I.M. Kolthoff, P.J. Elving, E.B. Sandell, *Treatise on Analytical Chemistry, Part I*, vols. 1 and 2, 2nd ed., Wiley, New York, 1979.
- [25] R.G. Bates, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 10 (1981) 247.
- [26] E.P. Serjeant, *Potentiometry and Potentiometric Titrations*, Wiley, New York, 1984.
- [27] H. Galster, *pH Measurement, Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation*, VCH, Weinheim, 1991.
- [28] H.M.N.H. Irving, H. Freiser, T.S. West, *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature*, Pergamon Press, Oxford, 1978.
- [29] T. Mussini, A.K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 865.
- [30] S. Rondinini, P.R. Mussini, T. Mussini, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 1549.
- [31] H. Freiser, G.H. Nancollas, *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1987*, 2nd ed., Blackwell, Oxford, 1987.
- [32] P.R. Mussini, T. Mussini, S. Rondinini, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 1007.
- [33] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1997*, 3rd ed., Blackwell, Oxford, 1998, http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/.
- [34] R.P. Buck, S. Rondinini, A.K. Covington, F.G.K. Baucke, C.M.A. Brett, M.F. Camões, M.J.T. Milton, T. Mussini, R. Naumann, K.W. Pratt, P. Spitzer, G.S. Wilson, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 2169.
- [35] G.W. Tindall, J.W. Dolan, *LC·GC Eur.* Desembre (2002) 2.
- [36] G.W. Tindall, J.W. Dolan, *LC·GC North Am.* 20 (2002) 1028.
- [37] G.W. Tindall, J.W. Dolan, *LC·GC Eur. Gener* (2002) 2.
- [38] G.W. Tindall, J.W. Dolan, *LC·GC North Am.* 20 (2002) 1114.
- [39] G.W. Tindall, J.W. Dolan, *LC·GC Eur.* Febrer (2003) 2.

- [40] G.W. Tindall, J.W. Dolan, LC·GC North Am. 21 (2003) 28.
- [41] S.P.L. Sørensen, Biochem. Z. 21 (1909) 131.
- [42] S.P.L. Sørensen, K. Linderstrøm-Lang, Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 15 (1924) 1.
- [43] M. Rosés, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 283.
- [44] M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 982 (2002) 1.
- [45] R.G. Bates, E.A. Guggenheim, Pure Appl. Chem. 1 (1960) 163.
- [46] H.S. Harned, B.B. Owen, The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions, Reinhold, New York, 1958.
- [47] R.G. Bates, R.A. Robinson, J. Solution Chem. 9 (1980) 455.
- [48] C.L. De Ligny, P.F.M. Luykx, Rec. Trav. Chim. 77 (1958) 154.
- [49] C.L. De Ligny, P.F.M. Luykx, M. Rehbach, A.A. Wieneke, Rec. Trav. Chim. 79 (1960) 713.
- [50] C.L. De Ligny, P.F.M. Luykx, M. Rehbach, A.A. Wieneke, Rec. Trav. Chim. 79 (1960) 699.
- [51] W.J. Gelsema, C.L. de Ligny, A.G. Remijnse, H.A. Blijleven, Rec. Trav. Chim. 85 (1966) 647.
- [52] T. Mussini, A.K. Covington, F. Dal Pozzo, P. Longhi, S. Rondinini, Z.-Y. Zou, Electrochim. Acta 28 (1983) 1593.
- [53] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Anal. Chim. Acta 283 (1993) 320.
- [54] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Microchim. Acta 116 (1994) 131.
- [55] J. Barbosa, S. Butí, V. Sanz-Nebot, Talanta 41 (1994) 825.
- [56] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Fresenius' J. Anal. Chem. 353 (1995) 148.
- [57] C.L. De Ligny, M. Rehbach, Rec. Trav. Chim. 79 (1960) 727.
- [58] R.G. Bates, M. Paabo, R.A. Robinson, J. Phys. Chem. 67 (1963) 1833.
- [59] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 911 (2001) 191.
- [60] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 5193.
- [61] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 947 (2002) 47.
- [62] A. Tiselius, Trans. Faraday Soc. 33 (1937) 524.
- [63] S. Raymond, L. Weintraub, Science 130 (1959) 711.
- [64] S. Hjertén, Arkiv. Kemi 13 (1958) 151.
- [65] S. Hjertén, Chromatogr. Rev. 9 (1967) 122.
- [66] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298.
- [67] C. Schwer, E. Kenndler, Anal. Chem. 63 (1991) 1801.

- [68] H.H. Lauer, D. McManigill, *Anal. Chem.* 58 (1986) 166.
- [69] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
- [70] A.D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology* (Golden Book) 2nd edition, Blackwell Science, Oxford, 1997.
- [71] M. Smoluchowski, M. Graetz, *Handbuch der Electricität und des Magnetismus*, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1921.
- [72] M.L. Riekkola, J.Å. Jönsson, R.M. Smith, *Pure Appl. Chem.* 76 (2004) 443.
- [73] T.S. Stevens, H.J. Cortes, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1365.
- [74] G.M. Janini, H.J. Issaq, in N.A. Guzman (Editor), *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, p. 119.
- [75] I.Z. Atamna, C.J. Metral, G.M. Muschik, H.J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr.* 13 (1990) 2517.
- [76] H.J. Issaq, I.Z. Atamna, G.M. Muschik, G.M. Janini, *Chromatographia* 32 (1991) 155.
- [77] I.Z. Atamna, C.J. Metral, G.M. Muschik, H.J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr.* 13 (1990) 3201.
- [78] R.J. Wieme, in E. Heftman (Editor), *A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1975.
- [79] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 31.
- [80] A.K. Covington, T. Dickinson, in A.K. Covington, T. Dickinson (Editors), *Physical Chemistry of Organic Solvent Systems*, Plenum Press, London, 1973, p. 1.
- [81] R.G. Bates, in J.F. Coetzee, C.D. Ritchie (Editors), *Medium Effect and pH in Non-aqueous Solvents*, Marcel Dekker, New York, 1969, p. 45.
- [82] E.J. King, in A.K. Covington, T. Dickinson (Editors), *Physical Chemistry of Organic Solvent Systems*, Plenum Press, London, 1973, p. 331.
- [83] I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni, in I.M. Kolthoff, P.J. Elving (Editors), *Treatise on Analytical Chemistry, Part I, Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 1979, p. 239.
- [84] A.P. Popov, H. Caruso, in I.M. Kolthoff, P.J. Elving (Editors), *Treatise on Analytical Chemistry, Part I, Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 1979, p. 303.
- [85] I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni, in I.M. Kolthoff, P.J. Elving (Editors), *Treatise on Analytical Chemistry, Part I, Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 1979, p. 349.
- [86] Y. Marcus, *The Properties of Solvents*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.

- [87] R.A. Robinson, R.H. Stokes, *Electrolyte Solutions*, Dover Publications, New York, 2002.
- [88] S.P. Porras, E. Kenndler, *Electrophoresis* 25 (2004) 2946.
- [89] X. Subirats, S.P. Porras, M. Rosés, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 246.
- [90] S.P. Porras, E. Kenndler, *Electrophoresis* 26 (2005) 3203.
- [91] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 259.
- [92] S.P. Porras, P. Jyske, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 149.
- [93] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *Chromatographia* 53 (2001) 290.
- [94] S.P. Porras, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5061.
- [95] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 22 (2001) 3798.
- [96] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 24 (2003) 1485.
- [97] S.P. Porras, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455.
- [98] K. Izutsu, *Acid-Base Dissociation Constants in Dipolar Aprotic Solvents*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1990.
- [99] C.L. De Ligny, A.A. Wieneke, *Rec. Trav. Chim.* 79 (1960) 268.

