



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 217**

51 Int. Cl.:  
**G01N 27/26** (2006.01)  
**G01N 27/447** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00980902 .1**  
96 Fecha de presentación : **30.11.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1257812**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

54 Título: **Método para la detección fotométrica de iones utilizados en sondas de electroforesis capilar, procedimiento de fabricación y utilización de estas sondas.**

30 Prioridad: **30.11.1999 US 168427 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.07.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.07.2009**

73 Titular/es:  
**ELECTRIC POWER RESEARCH INSTITUTE**  
**P.O. Box 10412**  
**Palo Alto, California 94303, US**

72 Inventor/es: **Yengoyan, Leon, S. y**  
**Frattini, Paul, L.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 323 217 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la detección fotométrica de iones utilizados en sondas de electroforesis capilar, procedimiento de fabricación y utilización de estas sondas.

5

**Breve descripción de la invención**

Esta invención se refiere en general a sondas para electroforesis capilar y a un método de electroforesis capilar. Más en particular, la presente invención se refiere a un tipo de nuevas sondas de electroforesis capilar que comprenden compuestos de ácidos carboxílicos vinílogos y derivados, un método de electroforesis capilar que las emplea, y la utilización de estas sondas en electroforesis capilar.

10

**Antecedentes de la invención**

En muchos procesos industriales se requiere agua ultrapura que es agua con baja concentración de especies iónicas. Por ejemplo, se requiere agua ultrapura en la elaboración de dispositivos semiconductores para producir dispositivos libres de defectos. Otras industrias que requieren agua ultrapura son las industrias farmacéuticas, agrícolas, químicas y de alimentación. El agua ultrapura es requerida también en reactores nucleares, en particular para prevenir la corrosión. El seguimiento de especies iónicas en agua en reactores de agua ligera (LWR) tales como reactores de agua a presión (PWR) y reactores de agua a ebullición (BWR) es esencial en el control de la corrosión. El seguimiento de especies iónicas en instalaciones de energía nuclear debe ser capaz de detectar concentraciones muy bajas, en algunas aplicaciones concentraciones tan bajas como partes por trillón (ppt).

15

20

La detección conductométrica y fotométrica ha sido empleada para detectar la presencia de especies iónicas en agua. Actualmente, virtualmente todas las instalaciones nucleares utilizan Cromatografía de Iones en-línea (IC) para el seguimiento de rutina de especies iónicas. El elevado coste de consumibles junto con los grandes volúmenes de muestreo que se requieren y los largos tiempos de análisis inherentes al seguimiento por IC constituyen incentivos considerables para impulsar el desarrollo de medidas alternativas o metodologías de seguimiento.

25

Una metodología alternativa es la Electroforesis Capilar (CE) que emplea volúmenes de eluyente 10 a 100 veces más bajos y proporciona un orden del tiempo de medida más rápido en magnitud (típicamente) de menos de tres minutos comparado con los 15 a 30 minutos o más para IC. Además, la CE requiere tres a seis órdenes de magnitud menos de muestra de analito, lo que es particularmente atractivo para el análisis del agua de reactor nuclear, dados los crecientes costes de agua de radiación. La electroforesis capilar (CE) es capaz también de separaciones simultáneas de cationes de metal de transición cosa que no hace fácilmente la cromatografía de iones (IC). Una discusión general sobre la CE se puede encontrar en el libro de texto "Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions", Peter Jandik, Gunther Bonn, 1993, Capítulo 3 en particular.

30

35

Se ha concentrado mucho esfuerzo en el desarrollo de sistemas CE. Jones y col. describen en la Patente 5.566.601 una técnica para separar, identificar y medir iones en solución por electroforesis de zona capilar, que proporciona sensibilidad mejorada y resolución de especies iónicas. El método supone la introducción de una muestra que contiene especies iónicas en un capilar de hueco estrecho con un electrolito vehículo que contiene un anión seleccionado absorbente de luz visible o UV o sonda. Se aplica un potencial eléctrico a través de la columna capilar haciendo que los iones eluyan según su movilidad. Tanto los iones que absorben ultravioleta (UV) como los iones transparentes a UV se pueden detectar y determinar cuantitativamente por seguimiento fotométrico UV/visible. Esto sugiere la utilización como anión de absorción de luz de uno seleccionado entre molibdato, tungstato, ferrocianuro, ferricianuro, bromuro, yoduro y dicromato como ejemplos.

40

45

Como ha sido discutido en la bibliografía, un aspecto de desarrollo de sistemas de CE ha puesto el énfasis en la selección de la sonda utilizada en CE. Cuando se trata de la detección de especies inorgánicas o especies orgánicas de bajo peso molecular (es decir, "especies de interés" o analito) que carecen de absorbancia apreciable, la detección de CE se lleva a cabo típicamente por detección indirecta utilizando un electrolito de fondo (BGE) que contiene una especie que absorbe UV - citado también como sonda. El analito transparente a UV se detecta por desplazamiento de la sonda por el analito.

50

55

Se ha sugerido que son importantes una serie de factores en la selección de la sonda. Primero se considera la movilidad electroforética ( $\mu$ ) de la sonda que deberá ser muy similar a las movilidades de los analitos de interés. En segundo lugar, se considera la concentración mínima detectable,  $c_{lim}$ , del sistema CE, que se establece por la siguiente ecuación:

60

$$c_{lim} = C_m / (TR \times DR) \quad (1)$$

donde  $C_m$  es la concentración de la sonda, TR es la relación de transferencia, y DR es la reserva dinámica que es una medida de la relación de la señal a ruido para una señal dada. La relación de transferencia es el número de equivalentes de los iones de la sonda que se desplazan por cada equivalente de iones de analito. Por ejemplo, un ácido piromélico de sonda común, cuando está totalmente ionizado, tiene una relación de transferencia de 0,25 para iones monovalentes y 0,5 para iones divalentes. La reserva dinámica es dada por la relación:

65

## ES 2 323 217 T3

$$DR = (\varepsilon \cdot L \cdot c_m) / AN \quad (2)$$

donde  $\varepsilon$  es la capacidad de absorción de la sonda, L es la longitud del trayecto de la luz a través del capilar, y AN es el nivel de ruido de absorbancia que es una función de la longitud de onda del detector. Sustituyendo la reserva dinámica (DR) de la Ecuación 2 en la Ecuación 1. se obtiene la siguiente expresión para la concentración mínima detectable:

$$c_{lim} = AN / (\varepsilon \cdot L \cdot TR) \quad (3)$$

Una discusión general de estos principios y ecuaciones se puede encontrar en "Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions" Peter Jandik, Gunther Bonn, 1993, Capítulo 3, y particularmente en las páginas 134-150.

Se han indicado muchas sondas en las técnicas anteriores. Por ejemplo la Patente estadounidense número 5.128.005 señala el empleo de ión cromato. La Patente estadounidense número 5.156.724 señala la utilización de una amina que absorbe UV o compuesto de sulfato heterocíclico. La Patente estadounidense número 5.104.506 indica el empleo de una sal cromato y una sal alquílica de amonio cuaternario. Otra sonda que ha sido utilizada en la técnica anterior para detección indirecta en CE es el compuesto aromático ácido piromelítico.

En general, se han discutido una serie de criterios para una sonda de éxito en la técnica anterior. Específicamente, es importante cotejar la movilidad del analito con la movilidad de la sonda. Una capacidad de absorción molar alta de la sonda también es importante. La longitud de onda del detector a la que se exhibe una alta capacidad de absorción molar por la sonda es otro criterio importante. Por ejemplo, es beneficioso para la longitud de onda del detector tener un valor que reduce al mínimo el AN, y que evita el conflicto con las bandas de absorbancia de los analitos. Por último, la solubilidad de la sonda de anión es importante cuando se utilizan modificadores de flujo electro-osmótico (EOF) inverso para evitar la precipitación. Para las sondas con baja capacidad de absorción molar, se requieren concentraciones de sonda más altas para obtener una concentración mínima del analito detectable satisfactoria. Las concentraciones de la sonda más altas pueden dar lugar a problemas potenciales por precipitación "inducida por la sonda" de los modificadores de EOF dinámicos dentro del capilar. Una discusión general de estos y otros criterios se pueden encontrar, por ejemplo, en "Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis" (Desarrollos recientes en la separación de iones inorgánicos e iones orgánicos pequeños) de James S. Fritz; *J. of Chromatography A*. 884 (2000) 261-275; y Philip Doble, Miroslav Macka, Paul R. Haddad, en "Design of background electrolytes for indirect detection of anions by capillary electrophoresis" (Diseño de electrolitos de fondo para detección indirecta de aniones por electroforesis capilar). *Trends in Analytical Chemistry* volumen 19, número 1, 2000, páginas 10-17.

Aunque se ha concentrado un gran esfuerzo en el desarrollo de sondas, las sondas de técnicas anteriores disponibles hasta la fecha no son enteramente satisfactorias. Al contrario de los criterios deseados, como se ha discutido antes, muchas de las sondas de técnicas anteriores presentan una fuerte absorbancia en el espectro UV cercano, es decir, la longitud de onda de detección, y ésta es la región misma donde los analitos o especies de interés presentan también una fuerte absorbancia. Esta similitud de la absorbancia de los analitos de interés hace difícil la detección indirecta de analitos. Además, el ruido de absorbancia es elevado en estas longitudes de onda, con lo que decrece la reserva dinámica. Además, la concentración mínima detectable  $c_{lim}$  es, frecuentemente, demasiado alta para muchas aplicaciones en semiconductores, energía nuclear y otras industrias debido la mayoría de las veces a una capacidad de absorción molar  $\varepsilon$  baja a longitudes de onda de detección óptimas por otro lado. Además, las sondas multi-ionizadas tales como ácido piromelítico tienen relaciones de transferencia bajas que conducen a concentraciones mínimas detectables más altas. Adicionalmente, estas sondas son típicamente útiles para detectar solamente una pequeña gama de analitos, y no sirven para un amplio intervalo de aplicaciones. Según esto, resulta de interés el desarrollo continuado de sondas mejoradas y métodos CE.

La Patente japonesa 10197481 describe la utilización de un marcador oligopéptido de enfoque isoeléctrico El marcador es un oligopéptido que está conectado a un colorante fluoróforo a través de un radical de cisteína,

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método de detección indirecta de iones en una muestra utilizando electroforesis capilar, que comprende la introducción de la muestra en una capilar lleno de una solución de electrolito de fondo que comprende un o más compuestos de sonda de electroforesis capilar y un agente tampón que contiene agua, aplicación de un campo eléctrico a lo largo del citado capilar para hacer que los iones de la muestra se muevan a lo largo de dicho capilar a una región de detección y se separen entre sí a lo largo del citado capilar, y detectar los iones indirectamente por detección fotométrica ultravioleta por medida de una reducción de la absorbancia debida al desplazamiento de los compuestos de la sonda por los iones, donde los citados uno o más compuestos de la sonda comprenden al menos un compuesto ácido carboxílico vinílico o derivados catiónicos o aniónicos del mismo, donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonílicos a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

La presente invención proporciona también un aparato de electroforesis capilar para llevar a cabo el método anterior, comprendiendo el aparato: un capilar lleno con solución de electrolito de fondo que comprende uno o más compuestos sonda de electroforesis capilar y un agente tampón que contiene agua, una fuente eléctrica configurada para aplicar un campo eléctrico a lo largo del citado capilar para hacer que los iones se muevan y se separen entre sí a lo largo del citado capilar en una región de detección, y un detector configurado para detectar los iones por detección fotométrica ultravioleta indirecta, donde los citados uno o más compuestos de sonda comprenden al menos un compuesto ácido carboxílico vinílico o derivados catiónicos o aniónicos del mismo, donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

La presente invención proporciona también la utilización de un compuesto ácido carboxílico vinílico o un derivado catiónico o aniónico del mismo como solución de electrolito de fondo en la detección indirecta de iones en una muestra por electroforesis capilar por medida de un decrecimiento en la absorbancia debido al desplazamiento de los compuestos ácido carboxílico vinílicos por los iones donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

En general, un objeto de la presente invención es la utilización de una clase de nuevas sondas de electroforesis capilar.

Los autores de la presente invención han descubierto una nueva clase de sondas de electroforesis capilar que comprenden uno o más compuestos de ácido carboxílico vinílico. En particular, los compuestos de ácido carboxílico vinílicos de la presente invención se definen como compuestos que contienen uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno. Preferiblemente, los compuestos de ácido carboxílico vinílicos de la presente invención son compuestos cíclicos. Los compuestos ácido carboxílico vinílicos de la presente invención incluyen además tautómeros, en particular tautómeros ceto-enólicos. Los compuestos de ácido carboxílico vinílicos de la presente invención incluyen además compuestos donde la conjugación antes mencionada se obtiene a través de una o más formas de resonancia estabilizadas de un compuesto aromático, Los compuestos de ácido carboxílico vinílicos de la presente invención pueden ser, alternativamente, compuestos catiónicos, esto es, estar cargados positivamente por empleo de grupo(s) cargado(s) positivamente. En un ejemplo, el compuesto catiónico incluye derivados éster catiónicos de los compuestos de ácido carboxílico vinílicos. En otro ejemplo, el compuesto catiónico incluye derivados amida catiónica de los compuestos de ácido carboxílico vinílicos.

Según esto, la presente invención proporciona un método de detección de iones en agua por electroforesis capilar donde se introduce agua en un capilar lleno con un electrolito de fondo que tiene agua que contiene especies absorbentes de ultravioleta o sonda que comprende uno o más compuestos ácido carboxílico vinílicos. Se aplica una tensión eléctrica a lo largo del capilar para hacer que los iones presentes en el agua se muevan a lo largo del capilar y se separen. Los iones desplazan las especies que absorben UV y se detectan indirectamente por un detector fotométrico de luz visible/UV.

La presente invención proporciona también un aparato de electroforesis capilar en el que se colocan un electrolito de fondo que contiene una o más sondas o, alternativamente, una combinación de una o más sondas y un tampón en el capilar, y una o más sondas que comprenden uno o más compuestos de ácidos carboxílico vinílicos.

#### Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá mejor con la siguiente descripción detallada leída en unión de los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un aparato de electroforesis capilar que puede emplearse con la sonda de electroforesis capilar y método de la presente invención.

La Figura 2 es un electroforograma que muestra la separación de cinco aniones por electroforesis capilar (CE) utilizando un agente tampón de ácido escuárico según un modo de realización de la presente invención.

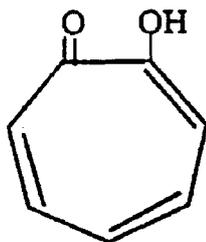
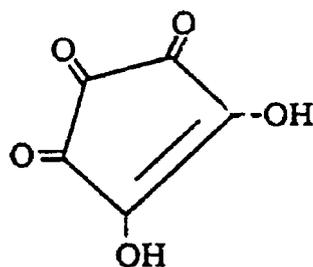
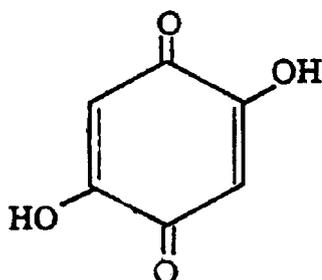
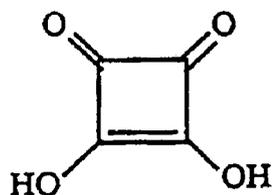
#### Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto una nueva clase de especies absorbentes de UV o sondas para ser utilizadas en electroforesis capilar (CE) y un método que emplea las mismas. Hay que señalar que los términos sonda y especie absorbente de UV son sinónimos y se pueden utilizar intercambiabilmente a lo largo de la presente descripción. En particular, las sondas de electroforesis capilar para utilizarlas en la presente invención comprenden uno o más compuestos de ácido carboxílico vinílico. La adecuabilidad de estos compuestos como sondas en electroforesis capilar (CE) ha sido inesperada. En particular los compuestos de ácido carboxílico vinílicos se definen como compuestos que contienen uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno. Una descripción general de compuestos de ácido carboxílico vinílicos se puede encontrar en G.V.Perez y Alice L Perez, en "Organic Acids without a Carboxylic Acid Functional Group" (Ácidos orgánicos sin grupo funcional ácido carboxílico) *J. of Chemical Education*, Vol, 77,

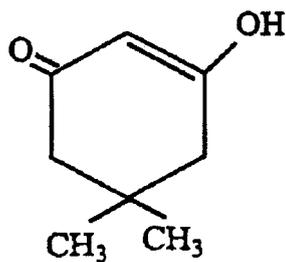
No. 7, Julio 2000, páginas 910-915. Preferiblemente, los compuestos carboxílicos vinílogos de la presente invención son compuestos cíclicos. Se comprenderá también por parte de los especialistas en la técnica que los compuestos de ácido carboxílico vinílogos de la presente invención incluyen tautómeros de otras estructuras que han sufrido tautomerización ceto-enólica. Se deberá comprender también por los especialistas en la técnica que los compuestos de ácido carboxílico vinílogos de la presente invención incluyen estructuras aromáticas. Como se describe también luego, los compuestos de ácido carboxílico vinílogos de la presente invención pueden ser aniónicos y catiónicos. Esto permite la detección de analitos tanto aniónicos como catiónicos.

Los compuestos de ácido carboxílico vinílogos de la presente invención son conjugados. La conjugación puede tomar dos formas. Primero, la conjugación puede tener lugar a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno, es decir, conjugación lineal. Alternativamente, la conjugación puede tener lugar a través de un sistema aromático cuando una o más estructuras de resonancia estabilizadas de los compuestos aromáticos son ácidos carboxílicos vinílogos. Puede haber también conjugación lineal y aromática en compuestos que contienen heteroátomos. Cuando tiene lugar la conjugación a través de un sistema aromático o un sistema hetero-aromático, los compuestos adecuados según la presente invención producirán estructuras de resonancia estabilizadas.

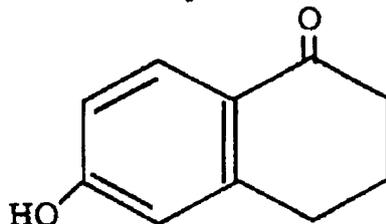
Ejemplos representativos de sondas de la presente invención que comprenden compuestos de ácido carboxílico vinílogos incluyen, pero no se limita solo a ellos, los siguientes compuestos: 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (ácido escuárico); 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona; 4,5-dihidroxi-4-ciclopenteno-1,2,3-triona (ácido crocónico); 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrienona (tropolona); 6-hidroxi-1-tetralona y 5,5-dimetil-1,3-ciclohexadiona (dimedona). Estos compuestos están representados por:



5



10

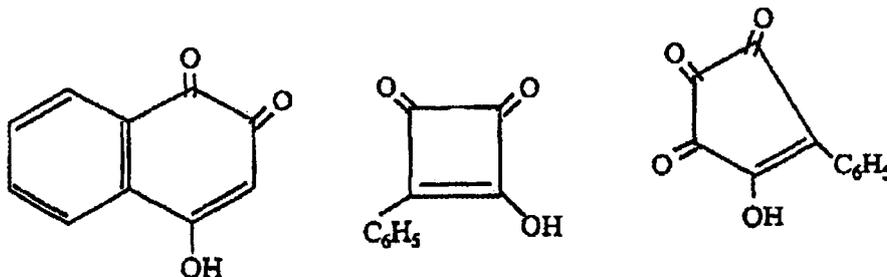


15

20

Los compuestos de la invención incluyen sustitución periférica que no altera el cromóforo-UV ácido carboxílico vinílico como muestra el siguiente ejemplo:

25

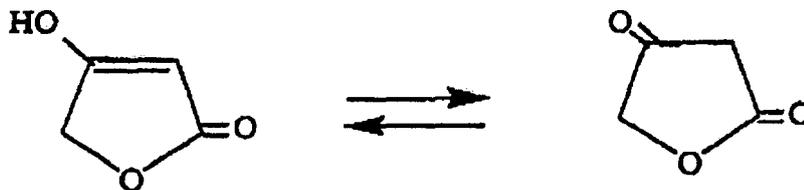


30

35

Otros ejemplos de compuestos que entran dentro de la definición de la presente invención incluyen además: 5,6-dihidroxi-5-ciclohexeno-1,2,3,4-tetraona (ácido rodizónico); 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 3-oxogulofuranolactona; 2,2-dimetil-1,3-dioxano; 4,6-diona-4-cetobutirolactama; tetrahydrofuran-2,4-diona; 2,3-dihidroxi-2-cicloprofeneno (ácido déltico) y ácido úrico. Como se ha descrito antes, los modos de realización de la invención incluyen tautómeros, en particular tautómeros ceto-enólicos. Un ejemplo de un equilibrio de tautomerización ceto-enólica de acuerdo con la presente invención es la dada a continuación:

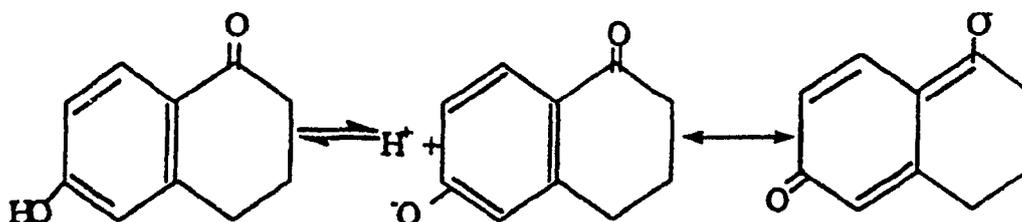
45



50

Además, como se ha descrito antes, un modo de realización de la presente invención incluye la conjugación a través de una estructura aromática donde el ácido carboxílico vinílico es una forma de resonancia estabilizada. Un ejemplo de ella es la mostrada a continuación:

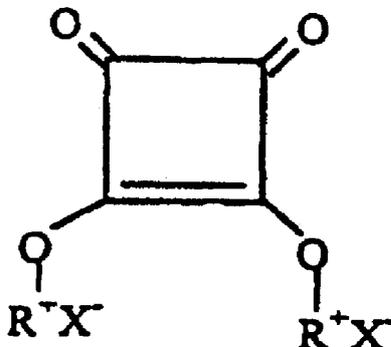
60



65

## ES 2 323 217 T3

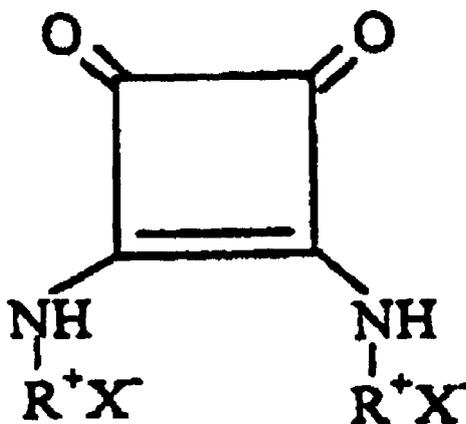
Resulta de particular ventaja que los compuestos de ácido carboxílico vinílicos puedan cargarse positivamente de manera alternativa empleando un grupo cargado positivamente. Entre los ejemplos de tales derivados de ácido carboxílico vinílicos se incluyen derivados de éster catiónico de los compuestos ácido carboxílico vinílicos. Un ejemplo de tales compuestos de derivados éster es un derivado éster de escuarato representado por



$X^-$  es un contra-ión ionizable

$R^+$  es un grupo catión orgánico

En otro modo de realización el derivado de ácido carboxílico vinílico incluye derivados de amida catiónica de los compuestos ácido carboxílico vinílicos. Un ejemplo de tales compuestos derivados de amida es un derivado amida de escuarato, representado por:



$X^-$  es un contra-ión ionizable

$R^+$  es un grupo catión orgánico

Las sondas utilizadas en la presente invención pueden combinarse con un agente tampón para proporcionar el electrolito de fondo (BGE) de la electroforesis capilar. El BGE incluye la sonda con el agente tampón. Entre los ejemplos de agente tampón adecuados para utilizarlos en la presente invención se incluyen, sin que quede limitado solo a ellos, base tris, aminas y bases orgánicas. Las sondas están normalmente presentes en el BGE en una concentración en el intervalo de aproximadamente 2 a 5 mM, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 2,5 a 3,5 mM. El BGE tiene en general un pH en el intervalo de aproximadamente 7 a 10, sin embargo puede ser tan bajo como 2-3.

El BGE puede incluir también un modificador de flujo dinámico electro-osmótico además de la sonda; esto, sin embargo, no es necesario. Un modificador de flujo actúa para detener o invertir el flujo electro-osmótico EOF del electrolito vehículo. Entre los ejemplos de modificadores de flujo dinámicos para utilizarlos con la presente invención se incluyen: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB). El BGE puede incluir también un disolvente orgánico que sea miscible con el agua del agente tampón. Estos disolventes pueden ser metanol, etanol y acetona, como ejemplos.

## ES 2 323 217 T3

Como una ventaja particular, la presente invención proporciona medidas de electroforesis capilar (CE) mejoradas, y permite la aplicación de CE a nuevos campos que hasta ahora no estaban disponibles debido a las limitaciones de los niveles de detección. Estas nuevas industrias incluyen las de química del agua para energía nuclear y las aplicaciones de química del agua del procesamiento de semiconductores: Específicamente, las sondas de compuestos ácido carboxílico vinílicos de la presente invención poseen movilidad ( $\mu$ ) que son comparables a los analitos de interés. Su capacidad de absorción molar es alta. La relación de transferencia puede ser más alta (es decir  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{PMA}^{4-}$ ). El ruido de absorción es más bajo a longitudes de onda más altas, y la interferencia del analito es más baja a longitud de onda más alta. Además desaparecen los problemas de precipitación de EOF.

Un ejemplo de especies de analito de anión de interés detectadas por la presente invención incluyen bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, sulfato, fosfato y similares incluyendo aniones orgánicos de bajo peso molecular. En un modo de realización alternativo, el compuesto ácido carboxílico vinílico está cargado positivamente y es adecuado para detección de analitos catión tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Otra ventaja significativa es que las sondas utilizadas en la presente invención presentan altas capacidades molares de absorción en la región del espectro UV lejano del detector fotométrico. Como se ha descrito antes en los Antecedentes, uno de los aspectos insatisfactorios de las sondas de técnicas anteriores es su fuerte capacidad de absorción en la región similar de absorción del analito. En contraste con ello, las sondas utilizadas en la presente invención presentan una capacidad de absorción más alta en una región UV más lejana que la mayoría de los analitos y esto proporciona una detección y sensibilidad del sistema de CE incrementadas. En general, los compuestos de ácido carboxílico vinílicos utilizados en la presente invención presentan capacidad de absorción molar a longitudes de onda de aproximadamente 270 nm y más alta. En un modo de realización donde la sonda es ácido escuárico (SQ) por ejemplo, se encuentra que el SQ presenta una capacidad de absorción molar alta a una longitud de onda de aproximadamente 270 nm. En otro ejemplo donde la sonda es 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona (BZ), se encuentra que la BZ presenta una capacidad de absorción molar alta a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm. Como se muestra después en los experimentos, estos valores de longitud de onda son mucho más altos que en las sondas convencionales tales como ácido piromelítico (PMA) que presenta típicamente una capacidad de absorción molar alta a una longitud de onda de aproximadamente 214 nm. Hay que señalar que no es precisamente el valor de la longitud de onda lo que es significativo; es el hecho de que las sondas de la presente invención presentan una elevada capacidad de absorción molar a estas longitudes de onda más altas. Por ejemplo, el PMA muestra alguna capacidad de absorción molar a 270 nm, sin embargo es una fracción de su valor y no proveerá el nivel de detección y/o sensibilidad alcanzada por la presente invención. Por ejemplo, como se muestra después en los experimentos, el cromato, una sonda convencional, presenta también capacidad de absorción molar a 270 nm y más alto, pero de nuevo su valor es una fracción de la exhibida por las sondas de la invención a esta longitud de onda. Al ser más alta la capacidad de absorción molar presentada por las sondas de la invención a longitud de onda de detección más alta, se puede realizar la operación con mayor reserva dinámica con capacidad de absorción molar más alta ya que el AN decrece al incrementarse la longitud de onda. Como se muestra en la ecuación 1 y en la ecuación 2 anteriores, una mayor es la reserva dinámica (DR) dará por resultado una concentración detectable mínima  $c_{\text{lim}}$  más baja y producirá así un dispositivo y método de electroforesis capilar (CE) más sensibles. Además, como se ha descrito antes, esta longitud de onda de detección más alta de las sondas de la invención está por encima de la longitud de onda absorbente de los analitos, y de esta manera las sondas de la invención no tienen los problemas de interferencias que se han visto con las sondas de técnicas anteriores.

La presente invención se puede llevar a cabo en un sistema de electroforesis capilar (CE) tal como el ilustrado en el diagrama esquemático de la Figura 1. El sistema CE 10 incluye dos reservorios 11, 12 que están llenos de la misma solución BGE que el capilar 13 que se extiende entre los dos reservorios. Se aplica una tensión alta a lo largo del capilar por una fuente de tensión adecuada 14. Los capilares tienen por lo general un diámetro interno pequeño, típicamente 5-100 micrómetros para permitir la disipación de calor. Los capilares están hechos generalmente de sílice fundida. Los iones se separan sobre la base de sus movilidad electroforéticas netas. Se coloca una estructura de detector, en la presente invención, de UV/luz visible, a lo largo del capilar. La estructura de detector comprende por lo general una fuente de luz 17 que dirige un haz a través del capilar a un detector 18. La luz es absorbida por los iones pasando entre la fuente de luz 17 y el detector 18. La señal de salida depende del grado de absorción de la luz por los iones y la longitud del trayecto de la luz a través del electrolito. El capilar se llena con el BGE que contiene la sonda y un agente tampón que contiene agua, y los iones se separan basándose en su carga relativa y volumen de hidratación. En un modo de realización, se emplean capilares de sílice fundido, se produce una doble capa eléctrica en la superficie del capilar debido a la atracción de cationes cargados positivamente en el BGE a los grupos silanol ionizados sobre la pared del capilar- En la presencia de un campo eléctrico, los cationes en la porción difusa de esta doble capa se mueven hacia el cátodo y arrastran el líquido en volumen con el electrolito con ellos, produciendo un flujo electro-osmótico catódico. Alternativamente, se puede utilizar un flujo capilar anódico que se prepara por utilización de recubrimiento estático de modificador de EOF dinámico para producir un flujo electro-osmótico anódico.

La mayor parte de los iones analito de interés no absorben luz y no pueden detectarse por el detector fotométrico. Por esta razón se utiliza detección fotométrica indirecta. Los iones del analito transparente a UV se detectan como zonas de absorción decrecida o vacíos debido al desplazamiento de las especies de absorción de ultravioleta de la sonda por los iones del analito transparentes a UV. Este proceso de detección fotométrica indirecta es bien conocido; sin embargo, como se ha descrito antes, las sondas de técnicas anteriores utilizadas para detección indirecta no tienen capacidad de absorción molar en el UV suficientemente alta para que se puedan detectar iones del analito a las bajas concentraciones requeridas en el ensayo de agua en aplicaciones en que se necesita agua ultrapura.

Los autores de la presente invención han encontrado que, para conseguir la detección de aniones inorgánicos a niveles muy bajos, por ejemplo del orden de 500 ppt, el flujo electro-osmótico catódico debe ser invertido, preferiblemente sin empleo de modificadores en el BGE. En un modo de realización de la presente invención esto se consigue por tratamiento de la superficie interior del capilar para enmascarar el grupo silanol libre por aplicación de un recubrimiento.

5 Los capilares de flujo electro-osmótico inverso para ser utilizados en la presente invención están comercializados por Metachem, Los Angeles, California.

En un modo de realización ejemplo de la presente invención la sonda preferida es el ácido escuárico (SA). Las características que hacen ventajoso al SA incluyen: a) una capacidad de absorción más alta que el ácido piromelítico a 270 nm, b) movilidad electroforética comparable a aniones inorgánicos de peso molecular bajo, c) relación de transferencia doble para escurato completamente ionizado comparado a la del ácido piromelítico completamente ionizado, y d) longitud de onda del detector más alta en la absorbancia del máximo.

## 15 Parte experimental

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para comprobar la nueva sonda de CE y el método. Los siguientes experimentos se proporcionan con propósitos explicativos e ilustrativos únicamente, y no han de considerarse como limitativos del alcance de la presente invención en ningún caso. Se ensayaron diversos aspectos como se muestra a continuación en las secciones tituladas.

### Sistema CE

Los experimentos se llevaron a cabo con el aparato de electroforesis capilar. El aparato llevaba incluido un capilar de 75 micras con una longitud efectiva de 35 cm y una longitud total de 43 cm con superficie de paredes positiva (EOF (flujo electro-osmótico, EOF, anódico)). Se empleó ácido escuárico en un BGE, con base tris añadida y la concentración del ácido escuárico era 2,5 mM y dando un pH de BGE de aproximadamente 8,0. El BGE se filtró a través de membrana de 0,45 micras. Las inyecciones fueron electrocinéticas (5 a 15 segundos a -10KV) e hidrodinámicas (a 3-10 segundos a 12 psi (1 psi = 0,000703 kg/cm<sup>2</sup>)) con una tensión de operación de -25 KV que generaba aproximadamente 11-12  $\mu$ amperios en todas las marchas con una intensidad de campo de 581 voltios/cm. El capilar se mantuvo a 25°C. La detección se siguió indirectamente con una fijación de la longitud de onda para absorbancia máxima de aproximadamente 270 nm.

Se llevaron a cabo análisis de iones utilizando un analito con matriz de sales de 5 aniones teniendo cada sal concentraciones en ppb como las mostradas en la Tabla 1.

TABLA 1

Compuesto analito	Concentración (ppb)
Cloruro de sodio (Cl <sup>-</sup> )	160
Bromuro de sodio (Br <sup>-</sup> )	160
Sulfato de sodio (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	160
Fluoruro de sodio (F <sup>-</sup> )	80
Fosfato disódico (HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	320

Los resultados del análisis se ilustran en el electroforograma de la Figura 2, y muestra la separación de todos los aniones dentro de los dos minutos y medio tras la inyección, con señales del máximo considerablemente más altas que el fondo. Las condiciones del ensayo fueron: escurato de tris 2,5 mM, pH 8, inyección hidrodinámica 10 segundos, -25 KV, 25°C, detector a 270 nm, corriente 7,1  $\mu$ amperios, utilizando un sistema de electroforesis capilar (CE) Spectrophoresis 1000. El orden de elución de los iones es Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, F<sup>-</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>. Aunque se observa un corrimiento de la línea de referencia, otros resultados muestran líneas de referencia estables y este método no-optimizado aparece reproducible y seguro.

Las sondas de CE y el método de la presente invención pueden emplearse con cualquier tipo adecuado de sistema de electroforesis capilar (CE). Dadas las directrices de la presente invención, cada sistema CE puede hacerse óptimo utilizando experimentación de rutina por los especialistas en esta técnica; y puede incluir, por ejemplo, a) optimización de la longitud del capilar y longitud eficaz para resolución del pico para hacer máxima la separación, tensión de conducción con corriente mínima b) optimización de la concentración de BGE y diámetro capilar para señal-a-ruido,

## ES 2 323 217 T3

y examen del efecto del pH sobre la sensibilidad de BGE c) optimización de la tensión de inyección electrocinética y tiempo de aplicación de la tensión e inyección hidrodinámica d) optimización del agente tampón de inyección para transporte del analito a la interfase de BGE vía disposición isotacoforética, e) empleo de geometrías de detector de célula de burbuja en "L" o "Z" para obtener un incremento en la señal del detector por un factor de 2 a 10, f) obtención de máximos tipo identificables positivamente utilizando patrones de agente tampón de analitos individuales, g) eliminación de la contaminación de dióxido de carbono del aire empleando suministro de muestra en-línea desde fuentes de agua de alta pureza, y h) estudio del efecto de contra-ión de la sonda.

### 10 *Movilidades experimentales*

Se evaluaron experimentalmente las movilidades de ciertos compuestos de ácido carboxílico vinílogos. Específicamente, se midieron experimentalmente ácido escuárico y 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona, junto con sondas convencionales, ión cromato y ácido piromelítico. Estos compuestos representan una alta relación carga a masa calculada. Se utilizó un capilar que tenía EOF anódico. Estos compuestos tienen excelente flujo co-electro-osmótico, Cada compuesto se operó en presencia del marcador neutro, alcohol bencílico. El agente tampón utilizado fue cloruro de tris 20 mM a pH 8,0. El agente tampón de la muestra para cromato y ácido piromelítico fue también agente tampón cloruro de tris 20 mM, pH 8. Dado que el ácido escuárico y la 2.5-dihidroxi-1,4-benzoquinona son ácidos, cada muestra se neutralizó con NaOH 0,1 M a pH de 7,0. El trabajo anterior mostró que estos dos compuestos tenían una electroforesis pobre si se utilizaba agente tampón cloruro de tris para disolver las muestras ya que el pH es aún ácido haciendo que el frente de inyección se deteriore durante la marcha experimental.

Las movilidades se calcularon como sigue:

$$u^{\text{observada}} = eof + u^{\text{verdadera}}$$

donde  $u^{\text{verdadera}}$  es la movilidad real de la sonda en las condiciones establecidas, la movilidad observada  $u^{\text{observada}}$  y eof (flujo electro-osmótico) se calculan con la ecuación:

$$u^{\text{observada}} = (I)(L)/(V)(t)(60)$$

donde  $l$  es la longitud efectiva del capilar,  $L$  es la longitud total del capilar,  $V$  es la tensión a través del capilar y  $t$  es el tiempo en minutos para que pasen las muestras la ventana del detector. El eof se calcula por la misma ecuación y el tiempo se obtiene a partir del marcador neutro (alcohol bencílico) y las movilidades verdaderas se calculan como diferencia entre  $u^{\text{obs}}$  y eof. Las movilidades tienen signo negativo por convención debido a que el flujo osmótico y migración de la sonda son hacia el ánodo para ambos.

Las verdaderas movilidades se muestran en la Tabla 2 siguiente:

TABLA 2

Movilidades verdaderas (cm <sup>2</sup> /voltio segundo)	
cromato	-7,96 x 10 <sup>-4</sup>
piromelítico	-6,12 x 10 <sup>-4</sup>
ácido escuárico	-5,45 x 10 <sup>-4</sup>
2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona	-2,01 x 10 <sup>-4</sup>

Comparando las movilidades de la sonda experimental con la bibliografía, los valores se pueden utilizar solamente en el sentido general ya que las movilidades de las sondas son una función del pH, agente tampón y efectos de la concentración iónica del agente tampón. En la Tabla 3 se muestra una breve comparación y las sondas se enumeran en orden decreciente de movilidades,

# ES 2 323 217 T3

TABLA 3

5	Experimentos de los autores de la invención	Soga <sup>1</sup>	Haddad <sup>2</sup>
	cromato	cromato	cromato
10	PMA	PMA	PMA
	escuarato		
15	benzoquinona		

Soga<sup>1</sup>: Tomoyoshi Soga, Gordan Ross, *J. of Chrom, A*, 767, páginas 223-230

Hddad<sup>1</sup>: Philip Doble, Miroslav Macka, Paul R. Haddad, *Trends en Analytical Chemistry*, Vol. 19, No. 1 (2000), páginas 10-17

PMA es ácido piromelítico y benzoquinona es 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona

Como queda demostrado en lo anterior, las sondas utilizadas en la presente invención presentan suficientes movilidades para aniones de movilidad baja y alta, teniendo al mismo tiempo la ventaja añadida de presentar una alta capacidad de absorción molar en la región del espectro de UV lejano del detector donde hay menos interferencia con otros analitos absorbentes y donde el detector muestra una línea de referencia más estable produciendo una mejor relación señal a ruido. En la siguiente Tabla 4 se muestra una comparación de la capacidad de absorción molar y valores de longitud de onda para sondas de la presente invención comparando con las sondas convencionales.

TABLA 4

Sonda	Capacidad molar de absorción ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Longitud de onda (nm)
Acido escuárico	26,942	270
benzoquinona	30,347	320
PMA	23,088	214
	2,577	270
cromato	5,089	205
	4.585	274
	5.864	374
-acido trimésico	37.144	209
ácido orto-ftálico	13.812	208

Aunque algunas de las sondas convencionales tienen una alta capacidad de absorción molar, deberá tenerse en cuenta, como se ha descrito antes, que es alta en la región UV donde tiene lugar la interferencia con el espectro de absorción de los analitos.

### Ruido de evaluación como una función de la longitud de onda con sondas de absorción

Estas sondas, dos de la presente invención y una convencional, se ensayaron para evaluar el ruido del detector. Se bombeó PMA a una concentración de 7,3 mg/100 de cloruro de tris (pH = 8,0) a capilares de 75 micras después de llevar a cero al instrumento con el agente tampón solo. La solución de la sonda se hizo pasar muy lentamente a través de la solución lo que produjo una absorbancia de 0,02548. Este ruido de línea de referencia se midió repetido con ácido escuárico y 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona con una absorbancia similar de la magnitud mostrada en la Tabla 5.

TABLA 5

Sonda	Longitud de onda medida (nm)	Absorbancia inicial	Concentración (mg/100 ml)
PMA	214	0,02548	7,3
Acido escuárico	270	0,03187	3,6
Benzoquinona	320	0,03290	4,5

El ruido se evaluó a lo largo de un período de 15 minutos por medida de la señal de amplitud baja y alta como función de la tensión. El ruido para la sonda PMA convencional es aproximadamente el doble que el de las sondas de la invención ácido escuárico y benzoquinona. Estos resultados confirman que el detector capilar, como un espectrofotómetro, es menos ruidoso a longitud de onda más alta en la región ultravioleta, y por tanto las sondas de la invención proporcionan esta ventaja adicional cuando se emplean a longitudes de onda más altas.

#### *Ruido y desplazamiento de detector de evaluación*

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar ruido y desplazamiento del detector a cuatro longitudes de onda. No se utilizaron sondas. Se llenó un capilar con agua desionizada (DI) con muy bajo flujo para evitar calentamiento de la ventana del capilar. La absorbancia se fijó a cero a 0,02 AUFS. La longitud de onda inicial fue a 214 nm durante 7 minutos y se fijó entonces a 254 nm con puesta a cero automática durante otros 7 minutos, y entonces se volvió a fijar a 270 nm con puesta a cero automática durante otros 7 minutos, y por último a 320 nm. A cada longitud de onda hubo un desplazamiento hacia abajo de la absorbancia a medida que se iba de 214 a 320 nm, pero el desplazamiento decrecía a cada nueva fijación de la longitud de onda.

Se encontró que el ruido evaluado a las cuatro longitudes de onda era a 214 nm el doble de los valores de longitudes de onda 254, 270 y 320 nm. Según esto, las sondas de la invención que presentan una capacidad de absorción molar alta a longitudes de onda más altas se utilizan a longitudes de onda que tienen un menor desplazamiento del detector.

Como se deduce de los resultados anteriores, ha sido desarrollada una sonda mejorada útil para electroforesis capilar (CE). En resumen, las sondas de la invención presentan una movilidad que es substancialmente equiparable a los iones de interés. Las sondas de la invención presentan una elevada capacidad molar de absorción y relaciones de transferencia más altas, lo que representa un gran potencial para mejorar la sensibilidad más allá de la técnica existente; y además amplían mucho la utilidad de la electroforesis capilar (CE) a nuevas industrias y aplicaciones que requieren concentraciones de analito detectables a mínimos más bajos. Además, las sondas de la invención permiten longitudes de ondas de detección más altas que dan valores de absorbancia más altos que proporcionan el doble beneficio de ruido de absorbancia (AN) más bajo y menos interferencia con la absorbancia de los analitos. Por último, las sondas de la invención son menos tendentes a precipitar adversamente modificadores de EOF de flujo anódico porque su alta capacidad de absorción molar permite su uso a baja concentración.

La descripción anterior de modos de realización específicos y ejemplos de la presente invención se ha presentado con el propósito de ilustración y descripción. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a unos cuantos modos de realización específicos, la descripción es ilustrativa y no ha de entenderse como limitativa de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección indirecta de iones en una muestra utilizando electroforesis capilar, que comprende:

5 introducción de una muestra en un capilar (13) lleno de una solución de electrolito de fondo que comprende uno o más compuestos sonda de electroforesis capilar y agente tampón que contiene agua;

10 aplicación de un campo eléctrico (14) a lo largo del citado capilar para hacer que los iones de la muestra se muevan a lo largo del citado capilar a una región de detección (11) y para separarlos entre sí a lo largo del citado capilar; y

detección de iones indirectamente por detección fotométrica ultravioleta (18) midiendo el el decrecimiento de la absorbancia debida al desplazamiento de los compuestos de la sonda por los iones,

15 que se **caracteriza** porque dichos uno o más compuestos de la sonda consisten en al menos un compuesto ácido carboxílico vinílico o derivados catiónicos o aniónicos del mismo, donde el citado compuesto de ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales enólicos en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

20 2. El método según la reivindicación 1 donde el citado compuesto carboxílico vinílico es un tautómero ceto-enólico.

3. El método según la reivindicación 1 donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de un grupo aromático.

25 4. El método según la reivindicación 1 donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico es un análogo heteroatómico de un tautómero ceto-enólico.

30 5. El método según la reivindicación 1 donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de un grupo aromático hetero-atómico.

35 6. El método según la reivindicación 1 donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico se selecciona entre: 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona, 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona; 4,5-dihidroxi-4-ciclopenteno-1,2,3-triona; 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrienona; 5,6-dihidroxi-5-ciclohexano-1,2,3,4-tetraona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 3-oxo-1-gulofuranolactona; 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona; 4-cetobutiro lactama; 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona; tetrahidro-furan-2,4-diona; 6-hidroxi-1-tetralona; 2,3-dihidroxi-2-ciclopropen-1-ona y ácido úrico.

40 7. El método según la reivindicación 1 donde el citado derivado es un derivado éster catiónico o un derivado de amida catiónica.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde el citado capilar tiene un interior que se trata para invertir el flujo electro-osmótico catódico.

45 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde el citado uno o más compuestos de la sonda se seleccionan de manera que se pueden detectar iones de diferente peso molecular en la citada muestra.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde los citados iones son aniones.

50 11. El método según la reivindicación 10 donde el citado capilar es un capilar anódico y el flujo anódico de los citados aniones tiene lugar dentro del citado capilar.

55 12. El método según la reivindicación 10 donde la citada solución de electrolito de fondo incluye un modificador de flujo electro-osmótico y flujo anódico de los citados aniones tiene lugar dentro del citado capilar, y donde las citadas una o más sondas son de capacidad de absorción molar suficientemente alta para que su concentración sea suficientemente baja para evitar la precipitación del modificador dentro del capilar.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde el compuesto ácido carboxílico vinílico está cargado positivamente y los citados iones son cationes seleccionados entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ .

60 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 donde la solución del electrolito de fondo tiene un pH en el intervalo de 2 a 10.

65 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 donde el agente tampón se selecciona entre una base tris, una amina, y una base orgánica.

16. El método según la reivindicación 1-15 donde la solución de electrolito de fondo comprende además un modificador de flujo electro-osmótico dinámico y/o un disolvente orgánico.

## ES 2 323 217 T3

17. El método según la reivindicación 16 donde el modificador de flujo electro-osmótico es bromuro de cetiltrimetilamonio o bromuro de didodecildimetilamonio.

5 18. El método según la reivindicación 16 donde el disolvente orgánico se selecciona entre metanol, etanol y acetona.

19. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18 donde el compuesto ácido carboxílico vinílico tiene una concentración de aproximadamente 2 a 5 mM.

10 20. Un aparato de electroforesis capilar para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, aparato que comprende;

15 un capilar (13) lleno con una solución de electrolito de fondo que comprende uno o más compuestos de sonda de electroforesis capilar y un agente tampón que contiene agua:

una fuente eléctrica (14) configurada para aplicar un campo eléctrico junto al citado capilar para hacer que los iones se muevan y para separarlos entre sí a lo largo del citado capilar a una región de detección (11) y

20 un detector (18) configurado para detectar los iones por detección fotométrica ultravioleta indirecta,

que se **caracteriza** porque los citados uno o más compuestos de la sonda comprenden al menos un compuesto ácido carboxílico vinílico o derivados catiónicos o aniónicos del mismo, donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales enol en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

25 21. El aparato de electroforesis capilar según la reivindicación 20 donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico se selecciona del grupo que consiste en 3,4-dihidroxi-3-ciclobutano-1,2-diona; 2,5-dihidroxi-1,4-benzo-quinona; 4,5-dihidroxi-4-ciclopenteno,-1,2,3,4-triona; 5,6-dihidroxi-5-ciclo-hexano-1,2,3,4-tetraona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 3-oxo-1-gulofurano-lactona; 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona; 4-cetobutirolactama, 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona; tetrahidrofuran-2,4-diona; 6-hidroxi-1-tetralona; 2,3-dihidroxi-2-ciclopropen-1-ona; y ácido úrico.

22. El aparato de electroforesis capilar según la reivindicación 21 donde el citado derivado es un derivado de éster enol catiónico o un derivado de enol amida catiónica.

35 23. El aparato de electroforesis capilar según cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde el agente tampón se selecciona de una base tris, una amina y una base orgánica.

40 24. El aparato de electroforesis capilar según cualquiera de las reivindicaciones 20-23 que tiene un pH en el intervalo de 2 a 10.

25. El aparato de electroforesis capilar según cualquiera de las reivindicaciones 20-24 donde la solución del electrolito de fondo comprende además un modificador de flujo electroosmótico dinámico y/o un disolvente orgánico.

45 26. El aparato de electroforesis capilar según la reivindicación 25 donde el modificador de flujo electro-osmótico dinámico es bromuro de cetil-trimetilamonio o bromuro de didodecildimetilamonio.

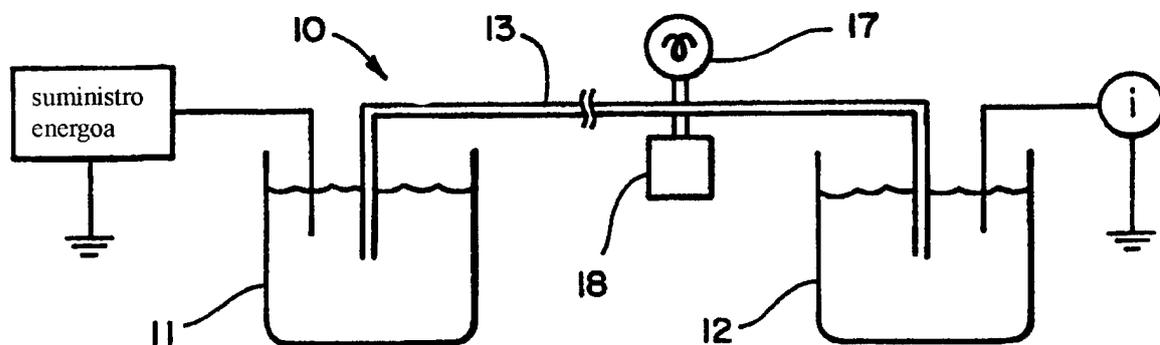
27. El aparato de electroforesis capilar según la reivindicación 25 donde el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en: metanol, etanol y acetona.

50 28. El aparato de electroforesis capilar según cualquiera de las reivindicaciones 20-27 donde el compuesto ácido carboxílico vinílico tiene una concentración de aproximadamente 2 a 5 mM.

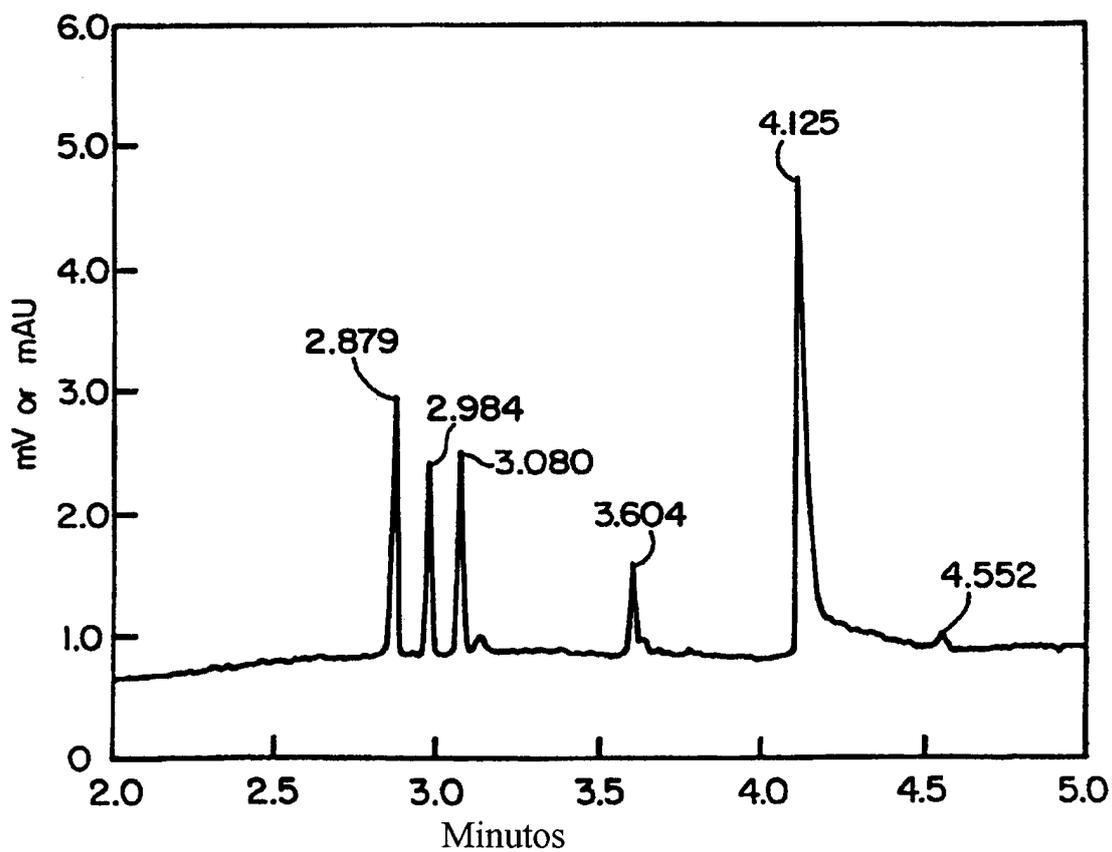
55 29. La utilización de compuesto ácido carboxílico vinílico o un derivado catiónico o aniónico del mismo como solución de electrolito de fondo en la detección fotométrica ultravioleta indirecta de iones en una muestra por electroforesis capilar por medida del decrecimiento de la absorbancia debida al desplazamiento de los compuestos de ácido carboxílico vinílicos por los iones, donde el citado compuesto ácido carboxílico vinílico comprende uno o más grupos funcionales en conjugación con uno o más grupos funcionales carbonilo a través de uno o más dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno.

60

65



**FIG\_1**



**FIG\_2**