

ELETROFORESE CAPILAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CE-MS): VINTE ANOS DE DESENVOLVIMENTO**Nilson Antonio Assunção e Etelvino José Henriques Bechara**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo – SP, Brasil

Ana Valéria Colnaghi Simionato*# e Marina Franco Maggi Tavares

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo – SP, Brasil

Emanuel Carrilho

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 29/1/08; aceito em 7/5/08; publicado na web em 8/10/08

CAPILLARY ELECTROPHORESIS COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (CE-MS): TWENTY YEARS OF DEVELOPMENT. CE-MS has been increasingly used for analysis of a vast array of compounds. This article reviews the different electrophoretic modes, interfaces and mass analyzers that are commonly used in the CE-MS coupling, as well as the technique advantages and performance characteristics. A large compilation of CE-MS applications is also presented. Therefore, this review is both a guide for beginners and a collection of key references for people who are familiar to the technique. Furthermore, this is the first CE-MS review published in a Brazilian journal and marks the installation of the first two commercial CE-MS units in Sao Paulo State.

Keywords: capillary electrophoresis; electrospray ionization; mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

A eletroforese capilar (CE) vem ocupando um espaço crescente na química analítica como uma poderosa ferramenta de separação e identificação de uma ampla gama de moléculas. A CE possui alta resolução e eficiência, parâmetros estes de grande importância em um processo de separação. Outra vantagem é o baixo custo operacional: mesmo em condições em que se empregam solventes orgânicos, os volumes consumidos de amostra e eletrólito são desprezíveis comparados à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), até mesmo quando a última é utilizada em escala capilar. Ressaltamos também que os processos eletroforéticos têm como característica positiva a pequena quantidade de amostra injetada (ordem de nL), fator de importância em aplicações clínicas. Porém a maior contribuição que a CE oferece é sua complementaridade aos métodos já estabelecidos, devido à variedade de modos de separação existentes – e muitos ainda em desenvolvimento – os quais permitem a análise de praticamente todas as classes de compostos.¹⁻³ A CE acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) surgiu, aproximadamente, há duas décadas, e foi e vem sendo usada em diferentes aplicações, com crescente aceitação. O sucesso desta combinação alia o alto poder de resolução e eficiência da CE com a universalidade e sensibilidade que a MS oferece frente a outros sistemas de detecção como, por exemplo, espectrofotometria na região do UV-visível, bem como fluorescência induzida a laser (LIF – *laser induced fluorescence*), que são pouco informativos em relação à estrutura do analito. Um exemplo de tais características de MS envolve seu uso juntamente a ferramentas computacionais, o que é altamente recomendado em estudos envolvendo amostras complexas (como proteínas, peptídeos e metabólitos), já que informações como massa molecular e estrutura (MS em *tandem*) são indispensáveis para

caracterização e quantificação de tais analitos.

Desta forma, as informações oferecidas pela segunda dimensão do detector de massas constituem uma outra vantagem do uso de CE-MS. Assim, solutos que apresentam pequenas variações no tempo de migração, ou até mesmo que migram com a mesma velocidade, podem ser identificados. Neste cenário, a CE-MS vem emergindo como uma ferramenta de grande impacto em bioanalítica, porém ainda são necessários grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento para atingir sua plena capacidade tecnológica.⁴⁻⁷

INSTRUMENTAÇÃO

Em 1987, Olivares *et al.* relataram o uso inédito do espectrômetro de massas como detector para CE.⁸ Desde então, a técnica CE-MS tem recebido crescente aceitação, onde o MS complementa, ou substitui, detectores convencionais que são menos informativos e universais.^{9,10}

O acoplamento *off-line* CE-MS usando dessorção em plasma e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – *matrix-assisted laser desorption ionization*) como fontes de ionização também já foram relatados.¹¹⁻¹⁵ Porém, os sistemas CE-MS realmente efetivos foram os de acoplamento *on-line*, inicialmente usando ionização por bombardeamento com átomos rápidos em fluxo contínuo (cf-FAB – *continuous-flow fast atom bombardment*) com interfaces do tipo junção líquida (*liquid junction*)¹⁶⁻¹⁸ e com líquido auxiliar (*sheath liquid*).¹⁹⁻²¹ No entanto, o sistema CE-MS *on-line* somente tornou-se viável e robusto quando uma fonte *electrospray* (ESI – *electrospray ionization*) foi empregada.⁸ Um diagrama universal do sistema CE-MS é apresentado na Figura 1, mostrando de maneira esquemática todos os compartimentos dos sistemas CE e MS. Também, de maneira geral, são ilustradas na Figura 1 algumas possibilidades para acoplamento CE-MS cobrindo os modos de separação eletroforética, modos de ionização e diferentes interfaces, e os analisadores de massas.

Entre os vários modos de separação existentes em CE, os usados

*e-mail: avsimionato@iqm.unicamp.br

#Endereço atual: Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

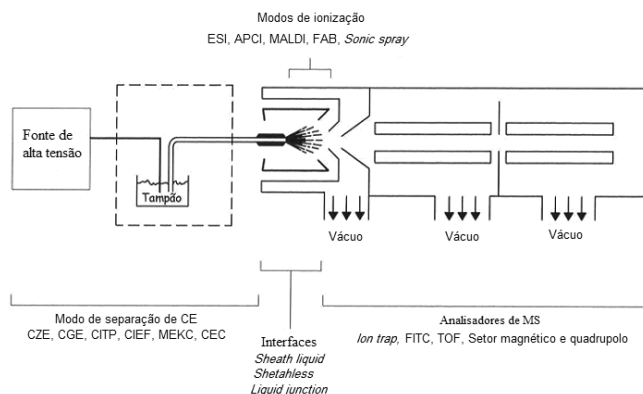


Figura 1. Diagrama de um sistema CE-ESI-MS. CZE: capillary zone electrophoresis; CGE: capillary gel electrophoresis; CITP: capillary isotachopheresis; CIEF: capillary isoelectric focusing; MEKC: micellar electrokinetic chromatography; CEC: capillary electrochromatography. ESI: electrospray ionization; APCI: atmospheric pressure chemical ionization; MALDI: matrix assisted laser desorption ionization; FAB: fast atom bombardment. FTICR: Fourier transform ion cyclotron resonance; TOF: time of flight

no sistema CE-MS devem apresentar características específicas, principalmente quanto à volatilidade dos componentes do eletrólito. Modos de separação como eletroforese capilar de zona (CZE – *capillary zone electrophoresis*) com tampões voláteis ou não-aquosos são amplamente usados em CE-MS²² e eletrocromatografia capilar (CEC – *capillary electrochromatography*).^{23,24} Os trabalhos pioneiros envolvendo aplicações de CE-MS, utilizando eletrólitos não-aquosos, foram realizados por Tomlinson *et al.*²⁵ na separação de drogas e metabólitos. Uma das vantagens que estes tipos de eletrólitos oferecem é a formação de um *spray* estável e compatível com o sistema MS.^{26,27} Este fenômeno ocorre principalmente ao se utilizar capilares com revestimento polimérico interno e eletrólitos contendo modificadores orgânicos (como formamida, metanol e acetonitrila), em análises de proteínas e peptídeos.²⁸⁻³⁰

Outros modos de separação que empregam eletrólitos mais elaborados, como isotacoforese capilar transiente (*t*-CITP – *transient capillary isotachopheresis*), focalização isoeletrica capilar (CIEF – *capillary isoelectric focusing*) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC – *micellar electrokinetic chromatography*), também podem ser utilizados.³¹⁻³⁴ Nestes casos, para evitar a contaminação do detector pelos componentes não voláteis do eletrólito (tensoativos, ciclodextrinas, etc), uma alternativa de acoplamento denominada preenchimento parcial (PF – *partial filling*) foi proposta.³⁵ Em PF-MEKC, por exemplo, o capilar é primeiramente preenchido com o eletrólito apropriado para o acoplamento com MS (volátil), seguido pela introdução do eletrólito micelar e, finalmente, pela injeção da amostra. Os analitos se separam no eletrólito micelar de acordo com suas hidrofobicidades e, então, migram para o eletrólito volátil, livre de tensoativo, seguindo em velocidade constante até o detector. A corrente é interrompida antes que o eletrólito micelar alcance o detector, evitando assim a contaminação deste.^{36,37}

A combinação de MEKC com ESI-MS foi demonstrada com sucesso na análise de compostos quirais por Shamsi *et al.*³⁸ O poli-sódio *N*-undecanoil-*L*-valinato foi empregado como tensoativo por ser compatível com MS. O uso deste sistema micelar demonstrou-se vantajoso uma vez que o tensoativo polimérico auxiliou no processo de ionização, levando a uma alta relação sinal/ruído, comparada a sistemas monoméricos (Figura 2). Frente a esse cenário, analitos quirais polares (carregados ou neutros) podem ser separados e detectados por MEKC-MS com alta eficiência, seletividade e sensibilidade.

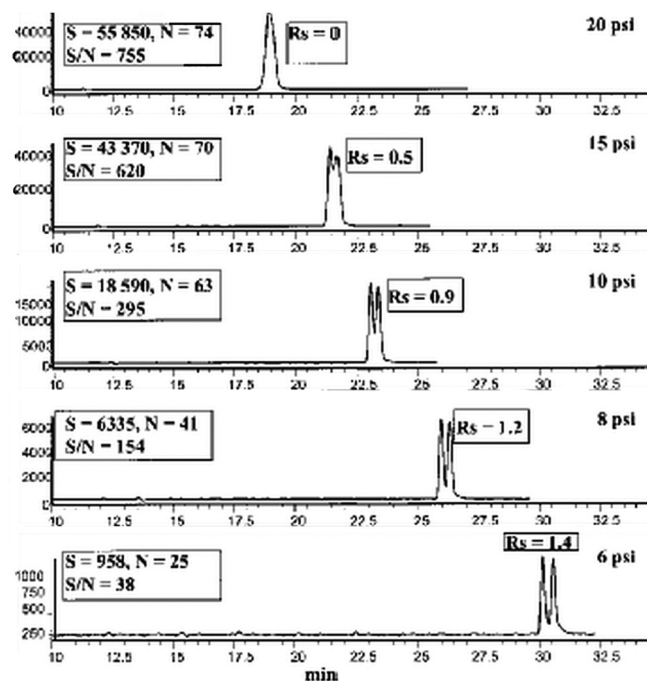


Figura 2. Separação da mistura racêmica dos compostos: terbutalina, clenbuterol, salbutamol, 3-aminopirrolidina, ibuprofenol (IB), 2-hidroxiibuprofenol, carboxiprofenol e vacomicina por MEKC-ESI-MS, demonstrando o efeito da variação da pressão do gás nebulizador sobre a resolução. Reproduzida da ref. 38 com permissão da Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

O uso de microdispositivos (*microchips*) de separação eletroforética com detecção por espectrometria de massas (μ CE-MS) também vem crescendo.³⁹⁻⁴⁶ Com este propósito, diferentes configurações de interfaces já foram desenvolvidas, tal como acoplamento em linha com MALDI-MS.⁴⁷⁻⁴⁹ Jin *et al.*⁵⁰ apresentaram um trabalho revolucionário construindo um sistema de reator enzimático em linha no qual a bomba seringa, tradicionalmente usada para gerar o fluxo hidrodinâmico, foi substituída pelo fluxo eletroosmótico, levando as proteínas até o reator enzimático. As enzimas foram imobilizadas em uma fase estacionária e neste sistema foi possível, em uma única etapa, promover a digestão de proteínas em 12 min com um sistema integrado de eletroforese na forma de um *chip* e sua caracterização em um sistema MALDI-TOF-TOF (*time of flight*).

O acoplamento em linha usando extração em fase sólida – eletroforese capilar – ionização por *electrospray* – espectrometria de massas por tempo de voo (SPE- μ CE-ESI-TOF-MS) também já foi desenvolvido.⁵¹ Para isso, o *microchip* foi fabricado em poli(dimetilsiloxano) usando fios de aço como molde, que definiram canais cilíndricos de 50 μ m de diâmetro. Capilares de sílica fundida foram inseridos nesta estrutura. O *microchip* foi então separado em dois níveis: no nível inferior o canal foi preenchido com poliestireno para realizar a extração e no nível superior ocorreu a separação eletroforética, que terminou em uma interface de *electrospray* sem líquido auxiliar.

Configurações para a interface CE-MS

A liberação de íons provenientes de gotículas à pressão atmosférica, na região da fonte de íons para o vácuo do analisador de massas, é um processo comum a ambas as técnicas de cromatografia líquida (LC) e CE. Desta forma, as interfaces para o acoplamento CE-MS foram desenvolvidas com base nas de LC-MS já existentes.³¹ Contudo, em CE-MS, o circuito elétrico envolvido na separação eletroforética (que deve ser fechado na saída do capilar, ou entrada do espectrômetro

de massas), a baixa velocidade do fluxo eletrosmótico e a natureza do eletrólito de separação devem ser considerados.

As três configurações comumente utilizadas para o acoplamento entre CE e ESI-MS são: com líquido auxiliar coaxial (*coaxial sheath liquid*), com junção líquida (*liquid junction*) e, sem líquido auxiliar (*sheathless* ou *nanospray*). Todas as configurações envolvem o fechamento do circuito de alta tensão na extremidade de saída do capilar de separação. Estas configurações diferem umas das outras pela posição dos eletrodos e a natureza do ambiente de ionização (presença de líquido auxiliar ou não), para a formação do *spray* na entrada do sistema ESI-MS, e serão melhor discutidas individualmente.³³

Interface com líquido auxiliar coaxial (*coaxial sheath liquid*)

A interface com líquido auxiliar coaxial é a modalidade mais usada para o acoplamento CE-ESI-MS devido à sua fácil construção, estabilidade e reprodutibilidade. O líquido auxiliar é introduzido através de um tubo de aço inoxidável concêntrico ao capilar eletroforético, em vazões que variam de nanolitros a poucos microlitros por minuto. A mistura entre o efluente eletroforético e o líquido auxiliar ocorre na extremidade do tubo. Um gás nebulizador – que auxilia na formação do *spray* – pode ser introduzido através de um terceiro tubo concêntrico externo (Figura 3). O circuito eletroforético pode ser fechado pelo aterramento do capilar metálico (agulha) do ESI. A estabilidade e a simplicidade de implementação desta interface constituem algumas vantagens deste acoplamento. Por outro lado, a principal desvantagem desta técnica é a perda de detectabilidade devido à diluição dos analitos ao se misturarem com o líquido auxiliar, levando a limites de detecção maiores que os observados na ausência deste (interface *sheathless*). Porém, a otimização de parâmetros eletroforéticos (como pH, concentração e natureza do tampão) e do modo de ionização (natureza e concentração de solvente orgânico e aditivos, e vazão do líquido auxiliar) podem melhorar a sensibilidade para uso geral desta interface.³⁴

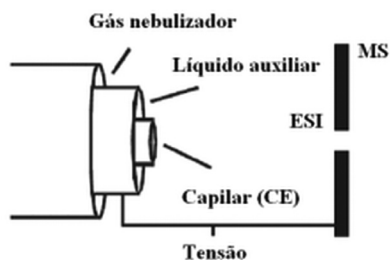


Figura 3. Interface CE-ESI-MS com líquido auxiliar coaxial

Apesar desta configuração oferecer flexibilidade na escolha do tampão eletroforético, os tampões comumente usados em CE – como fosfato e borato – podem gerar problemas na interface ESI devido à baixa volatilidade, podendo contaminá-la e suprimir a ionização dos analitos, gerando espectros de massas pouco informativos. Essa limitação deve ser especialmente considerada quando CE é empregada em diferentes modalidades (MEKC e CGE, por exemplo) nas quais aditivos não compatíveis com ESI-MS são adicionados ao eletrólito. Assim, tampões orgânicos, como ácido fórmico e acetato ou bicarbonato de amônio, são os mais usados em CE-ESI-MS.

Um avanço no desenho da interface ESI com líquido coaxial para o formato ortogonal, isto é, a 90° com relação ao eixo do espectrômetro,⁵² ou para o formato excêntrico, isto é, alinhado com o eixo do espectrômetro⁵³ porém não centralizado, introduziu uma maior flexibilidade na escolha dos eletrólitos da CE. O uso de uma interface ortogonal à entrada da amostra (contra-eletrodo) no MS reduz o risco de contaminação ou obstrução da entrada do MS e permite o uso

de tampões eletroforéticos moderadamente não voláteis, podendo melhorar a separação dos analitos.⁵⁴ Nesta interface, a agulha do ESI é aterrada e uma alta tensão é aplicada na entrada do MS, para onde os íons são direcionados devido à interação eletrostática. Assim, a probabilidade de apenas moléculas carregadas entrarem no MS é maior do que em interfaces lineares, aumentando a detectabilidade das interfaces ortogonais. Por essas razões, a interface ESI ortogonal é a mais usada e comercializada para o acoplamento CE-ESI-MS (Figura 4).

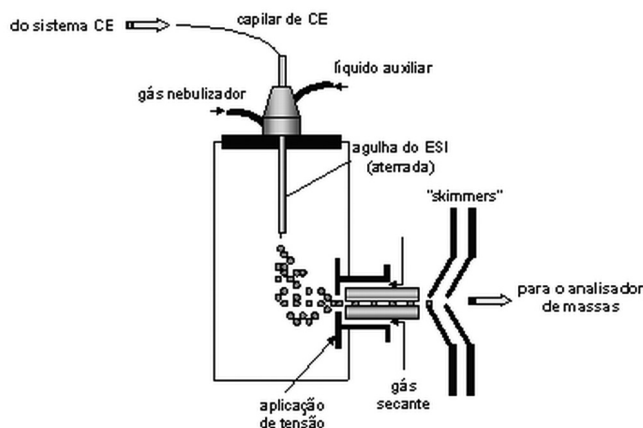


Figura 4. Interface CE-ESI-MS com líquido auxiliar ortogonal

Interface sem líquido auxiliar (*sheathless*)

Na Figura 5 é apresentado um diagrama da interface sem líquido auxiliar. Esta interface é, conceitualmente, a mais simples e a mais adequada porém, experimentalmente, é a mais difícil para o acoplamento CE-ESI-MS. A maior dificuldade experimental é manter simultaneamente os circuitos elétricos de CE e ESI. Para isso, é necessária a deposição de um filme fino de material condutor (como ouro, prata, polímero condutor ou grafite) na extremidade do capilar.³⁴ A estabilidade do *spray* é auxiliada pelo formato da extremidade de saída do capilar, a qual é normalmente pontiaguda (cônica) a fim de auxiliar a formação do *spray*. Uma alternativa é inserir a ponta do capilar dentro de uma agulha de metal, a qual auxilia na estabilidade do contato elétrico dos dois sistemas.

Algumas das limitações da interface *sheathless* são: o tempo curto de vida; a montagem delicada da interface; a necessidade de recobrimentos de ótima qualidade para o funcionamento adequado do ESI e, a formação de espécies químicas em decorrência de reações eletroquímicas nesta superfície e consequente detecção pelo MS.

Nesta interface, a tensão é aplicada diretamente na extremidade de saída do capilar através do material condutor depositado em sua extremidade afunilada. Os limites de detecção atingidos com essa

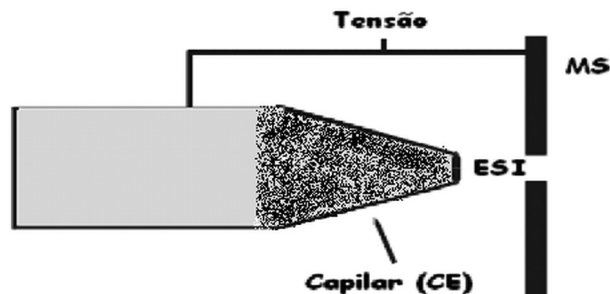


Figura 5. Interface CE-ESI-MS sem líquido auxiliar. A parte escura na ponta do capilar representa o filme metálico depositado

técnica são os mais baixos dentre as interfaces disponíveis, porque não ocorre diluição do efluente eletroforético com o líquido auxiliar. Porém, a instabilidade da interface e a limitação na escolha do tampão eletroforético (que deve ser volátil já que entrará diretamente no espectrômetro de massas) são também desvantagens que limitam o uso desta técnica. Por essas razões, a literatura apresenta apenas 11% de trabalhos onde este tipo de interface é usado para o acoplamento CE-ESI-MS.¹⁰

Interface com junção líquida (liquid junction)

Na Figura 6 é apresentado um diagrama da interface CE-ESI-MS com junção líquida. Nesta configuração, um eletrodo é inserido na extremidade próxima à entrada do MS pela junção do capilar com outro capilar e o ponto onde o sistema é aterrado. O capilar eletroforético termina em um reservatório contendo um líquido auxiliar, usado para fechar o circuito eletroforético, e este é alinhado com a agulha do *electrospray*, posicionada do lado oposto do reservatório. O contato elétrico para fechar o circuito é estabelecido através do líquido auxiliar. Uma configuração alternativa é o uso de uma união em “T” para conectar o capilar, a agulha de ESI e o reservatório. A distância entre o capilar e a agulha de ESI é de cerca de 10 – 25 μm para que ocorra a transferência efetiva dos analitos durante a formação do *spray*. A principal vantagem deste tipo de acoplamento é que CE e ESI podem ser operados independentemente. Assim, diferentemente das interfaces sem líquido auxiliar com deposição de material condutor sobre a própria ponta do capilar, problemas que porventura ocorram na agulha de ESI podem ser resolvidos facilmente pela sua troca, sem afetar o capilar de CE e vice-versa. Além disso, esta interface oferece flexibilidade para a escolha do eletrólito de separação. Por outro lado, algumas desvantagens deste sistema são: o posicionamento crítico do capilar; formação de bolhas na superfície no eletrodo devido a reações eletroquímicas (eletrolise) resultando em problemas como interrupção da corrente no sistema CE e, o volume morto elevado na união dos capilares que leva a um aumento da dispersão, com conseqüente perda de eficiência de separação. Desta forma, esta interface é pouco usada no acoplamento CE-MS.^{55,56}

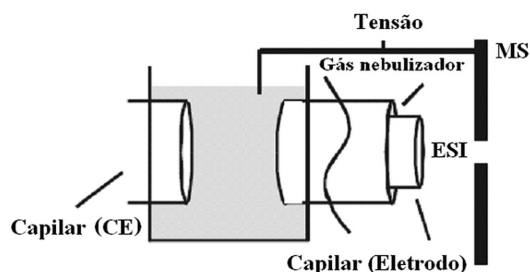


Figura 6. Interface CE-ESI-MS com junção líquida

Modos de ionização e analisadores de massas

Diversos modos de ionização podem ser empregados para o acoplamento CE-MS, tais como cf-FAB,^{57,58} ionização química à pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*),^{59,60} MALDI^{61,62} e ESI.^{8,63} ESI é o mais comumente usado uma vez que transfere moléculas ionizadas da fase líquida diretamente para a fase gasosa. Outra característica interessante do ESI é que moléculas com alta massa molecular podem ser detectadas pela formação de íons multicarregados (já que a maioria dos espectrômetros de massas apresenta uma faixa limitada de valores de razão massa/carga - m/z).¹⁰

Diferentes analisadores de massas podem ser acoplados à CE, incluindo triplo quadrupolo, ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier,⁶⁴⁻⁶⁷ sistema de focalização dupla (seto-

res elétrico e magnético),^{68,69} tempo de voo⁷⁰⁻⁷² e *ion trap*.^{61,62} Os quadrupolos são os analisadores mais comumente usados em CE-MS, provavelmente devido a sua popularidade como detector de cromatografia e, conseqüentemente, seu menor custo. Entretanto, a baixa velocidade de varredura (fator limitante na detecção de picos eletroforéticos que apresentam alta eficiência), baixa resolução e sensibilidade (especialmente no modo *scan*) são as principais limitações destes analisadores. Já os analisadores *ion trap*, também encontrados em muitos laboratórios, representam uma boa opção para o acoplamento CE-MS por apresentarem melhores velocidades de varredura e sensibilidade, mas principalmente por poderem realizar múltiplos estágios de fragmentação (MSⁿ) sem o custo adicional de instrumentos híbridos.⁵

Limites de detecção e outras figuras de mérito

O limite de detecção em CE-MS é influenciado, primeiramente, pelas características intrínsecas do equipamento de MS como, por exemplo, a plataforma de separação dos íons e configurações específicas dos esquemas de detecção de íons. Adicionalmente, o modelo de interface empregado, as condições em que essa interface é operada, as propriedades do eletrólito, a dimensão do capilar e outros parâmetros do sistema eletroforético influenciam a detectabilidade do sistema.^{8,63} Na literatura, encontram-se valores de quantidades mínimas detectadas para sistemas *sheath liquid* e *sheathless* na ordem de 3–20 e 0,1–5 fmol, respectivamente, na análise de peptídeos sintéticos.⁵

Grahama *et al.*⁷³ empregaram CE-MS na quantificação de 30 espécies de compostos encontrados em veneno de cobra (contendo moléculas relacionadas ao processo de vasodilatação), apresentando limites de detecção na ordem de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Soga *et al.*⁷⁴ desenvolveram um método para determinação de 82 compostos (incluindo 9 ânions inorgânicos, 23 ácidos orgânicos, 18 aminoácidos e 32 carboidratos) em uma única análise, obtendo limites de detecção entre 0,1 e 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em um sistema CE-MS/MS com analisador triplo quadrupolo. Limites de detecção de 0,3–3,8 ng mL⁻¹ foram obtidos na análise de anfetaminas em urina de humanos, utilizando extração em fase sólida (SPE – *solid phase extraction*) para pré-concentração e *clean up* da amostra.⁷⁵

Conforme mencionado anteriormente, os menores limites de detecção são obtidos com a interface CE-MS *sheathless*, embora seja ainda pouco usada. Por exemplo, Edwards *et al.*⁷⁶ conseguiram determinar 118 metabólitos relacionados à *Escherichia coli* com esta interface em uma única análise, obtendo limites de detecção de 20 nmol L⁻¹ a 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Wang *et al.*⁷⁷ desenvolveram um método para analisar nucleosídeos em urina de humanos com excelentes linearidades e limites de detecção na faixa de 0,00862–3,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em outro exemplo, a separação de 7 isômeros D e L de fármacos foi realizada por CE-ESI-MS com limites de detecção de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em menos de 30 min.⁷⁸

Lara *et al.*⁷⁹ apresentaram um novo método combinando extração em fase sólida e CE-MS para analisar 11 giberelinas, o qual apresentou linearidade entre 0,984–0,995, variação nos tempos de migração inferior a 0,8% e detectabilidade entre 0,31–1,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ge *et al.*⁸⁰ desenvolveram e validaram um novo método analítico usando CE-MS/MS para analisar 12 sulfoamidas em carne suína, apresentando sensibilidade requerida pela decisão da Comunidade Européia (2002/657/EC *European Decision*). A faixa de linearidade (r) encontrada foi 0,996–0,997, a precisão das áreas dos picos foi inferior a 14%, a faixa de recuperação foi 76–98% e os limites de quantificação variaram na faixa de 12,5–46,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Sturm *et al.*⁸¹ apresentaram um método para analisar interferentes (álcool aminos) em lubrificantes e líquidos refrigeradores (*coolants*) usando CE-MS e empregando eletrólitos não aquosos. O mesmo foi

otimizado resultando em análises com tempo de migração inferiores a 9 min, sendo possível analisar 10 contaminantes. O método apresentou variação dos tempos de migração inferior a 1,5%, linearidade entre 0,990–0,999, limite de detecção inferior a 1 mg L⁻¹ e repetibilidade intra e inter dia inferior a 5% (n = 10).

Fekete *et al.*⁸² validaram um método para quantificar 8 quinonas de uso veterinário aplicadas em vacas leiteiras. Este método foi desenvolvido de acordo com a regulamentação da área na Comunidade Européia para estas formulações (EU Council Regulation n.º. 2377/90). Resultados satisfatórios foram encontrados, tais como linearidade entre 0,989–0,992, desvios de tempo de migração e área de picos inferiores a 18% e recuperação entre 81–110%. Estes parâmetros foram inferiores aos requeridos na norma acima citada, o que indica que o método baseado em CZE-MS/MS para análise de antibióticos em controle e segurança de alimentos tem alto potencial de aplicação.

APLICAÇÕES PARA CE-MS

Nos últimos 20 anos a CE acoplada à MS vem ganhando notoriedade crescente como ferramenta analítica,^{2,9,63} e anualmente a revista científica mais importante na área de métodos eletroforéticos e técnicas afins, a *Electrophoresis*, dedica uma edição especial inteira a trabalhos exclusivos com CE-MS.⁸³⁻⁸⁵ A maioria dos trabalhos empregando esta técnica está relacionada às ciências da vida,⁸⁶ todavia, encontram-se na literatura trabalhos nas mais diferentes áreas, envolvendo várias modalidades de eletroforese capilar acopladas à MS.^{31,87-90}

Soga *et al.*⁹¹ desenvolveram e determinaram 352 substâncias modelo relacionadas a rotas metabólicas conhecidas, o que é um resultado altamente satisfatório, empregando CE-MS como ferramenta analítica. Esta mesma metodologia baseada em CE-MS foi empregada, em outro trabalho, para analisar 1692 compostos oriundos do extrato da bactéria *Bacillus subtilis* (Figura 1S – Material Suplementar). Estes resultados geraram informações sobre mudanças no metabolismo durante a fase de esporulação. O mesmo grupo de pesquisa comprovou a possibilidade de separar compostos aniônicos relacionados a rotas metabólicas do *B. subtilis*.⁹² As quantidades detectadas foram da ordem de fmol, o que tornou o método desenvolvido ainda mais atraente e de grande aplicabilidade para estudos desta natureza.

He *et al.*⁹³ desenvolveram um método para a detecção de metabólitos diagnósticos em urina por CE-MS, obtendo um método mais específico e sensível que por detecção UV. Dentre os metabólitos investigados incluem-se os relacionados à deficiência de γ -glutamil transpeptidase, deficiência generalizada de glutatona, deficiência de adenilsuccinase, atrofia de girato e histidinemia. Há também vários trabalhos mostrando a eficiência do emprego de CE-MS em estudos metabólicos em fluidos biológicos de origem animal e vegetal.⁹⁴⁻⁹⁷

Soga *et al.*⁹⁸ descreveram um método para separação e detecção de 1.859 analitos em extratos de fígado de rato e estudaram múltiplas mudanças em níveis metabólicos, incluindo a ativação da rota da biossíntese do oftalmato. Esse trabalho mostra que a CE-MS é uma poderosa ferramenta na descoberta de biomarcadores de baixa massa molecular, relacionados ao stress oxidativo.

A busca de métodos analíticos aplicados a análises clínicas, nas quais a disponibilidade de amostra é mínima (sangue, ou ainda mais criticamente, fluido cérebro-espinhal, por exemplo), tem recorrido à CE-MS como a técnica de escolha. Dentro desta necessidade, sistemas analíticos de CE utilizam menos que 10 nL de amostra por injeção, fazendo com que seja ideal para testes pediátricos, geriátricos e forenses. Em HPLC, mesmo em escala capilar, utiliza-se no

mínimo 1 μ L em cada injeção. Smetkova *et al.*⁹⁹ publicaram uma revisão sobre análise de morfina e compostos relacionados por LC e CE-MS. Diferentes modos de ionização à pressão atmosférica, bem como demais parâmetros relacionados à eficiência de ionização, foram discutidos. Concluiu-se que CE-MS é, por enquanto, menos usada que LC-MS nas análises de tais compostos, mas que tem grande potencial de aceitação devido às vantagens já citadas. A análise do entorpecente *ecstasy* e seus derivados em urina, usando CE-ESI-MS, também é encontrada na literatura.¹⁰⁰ Demais fármacos como cafeína, anfetamina e benzodiazepinas também já foram analisados pela técnica de CE-MS.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Metodologias via CE-MS para analisar proteínas glico-conjugadas em urina de pacientes foram também desenvolvidas, as quais auxiliam o diagnóstico de várias desordens metabólicas, tais como *Diabete mellitus* e outras doenças que afetam o metabolismo em geral.^{101,105-107} A descoberta de biomarcadores relacionados a desordens metabólicas em organismos humanos, tais como doença de Alzheimer, tornou-se vital para o diagnóstico do estágio inicial da doença, bem como para a compreensão do seu mecanismo. A alta resolução de CE ajuda na identificação de amostras complexas, geralmente eliminando etapas de isolamento prévio, e a alta sensibilidade da MS auxilia a descoberta de biomarcadores no estágio inicial de disfunções metabólicas.¹⁰⁸ Desta forma, desde 2003, métodos baseados em CE-MS passaram a ser reconhecidos na Comunidade Européia como metodologia oficial para diagnósticos.¹⁰⁹ Lord *et al.*¹¹⁰ relataram a análise do ácido 5-aminolevulínico (ALA) e do porfobilinogênio (PBG), dois metabólitos relacionados à porfiria aguda intermitente (PAI), por CE-MS com níveis de detecção suficientes para fornecer um diagnóstico rápido e preciso da doença.

Em estudos proteômicos, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) é amplamente usada, embora apresente várias limitações, que levaram ao desenvolvimento de sistemas complementares, como a cromatografia bidimensional. Entretanto, a CE oferece possibilidade de, no futuro, superar os sistemas eletroforéticos convencionais, frente à diversidade de mecanismos de separação. Recentemente, trabalhos envolvendo estudos proteômicos são encontrados na literatura, os quais comprovam a evolução de CE-MS aplicada neste tipo de estudos.¹¹¹⁻¹¹⁵

A técnica de CE-MS também pode ser empregada na análise de resíduos de pesticidas em alimentos. O limite de detecção obtido é pelo menos uma ordem de grandeza menor que em CE-UV e, concomitantemente, menor que os permitidos por lei (limite máximo permitido para o resíduo) aumentando, portanto, a aplicabilidade desta técnica. A análise de ácidos nucleicos, bem como seus adutos, também já foi realizada por CE-MS. No segundo caso, adutos de benzo[a]pireno foram avaliados, uma vez que são compostos policíclicos aromáticos presentes no meio ambiente.¹¹⁶ Novos procedimentos de preparação de amostra, a fim de eliminar os nucleotídeos não adutos, foram discutidos, como extração em fase sólida com afinidade por metais.¹¹⁷

Outra aplicação de grande interesse é a análise de aminoácidos em alimentos, por necessitar de métodos quantitativos e precisos. A análise de aminoácidos é particularmente desafiadora devido ao fato que a maioria dos aminoácidos não absorve na região UV, requerendo derivatização da amostra e levando a maior fonte de erros.⁶³ O sistema CE-MS é o ideal para análise qualitativa e quantitativa de aminoácidos em alimentos devido à sua precisão e sensibilidade, embora o custo da análise ainda seja alto. Alguns trabalhos na literatura demonstraram a utilidade e confiabilidade de CE-MS para a análise de aminoácidos (Figura 7).⁷⁴ Nestes trabalhos, a CE-MS apresenta um grande avanço uma vez que a pequena diferença de mobilidade entre alguns aminoácidos sempre foi um empecilho nas separações envolvendo outras modalidades

de CE. Porém, a combinação de artefatos, tais como o uso de pressão na separação e aditivos no eletrólito, aliados a ferramentas computacionais possibilitou a análise eficiente e a quantificação de aminoácidos em diferentes matrizes.^{2,69,84,112} A extração em fase sólida previamente à análise por CE-MS contribuiu para o aumento da detectabilidade dos métodos de análise de alimentos, como leite de soja,¹¹⁸ pêssego, nectarina,¹¹⁹ sucos de uva e laranja.¹²⁰ Um estudo envolvendo a avaliação de diferentes métodos de hidrólises da proteína albumina soro bovina (BSA – *bovine serum albumin*) usando CE-MS para análise dos aminoácidos resultantes mostrou a utilidade e aplicabilidade da técnica, empregando a castanha do pará como amostra real.¹²¹

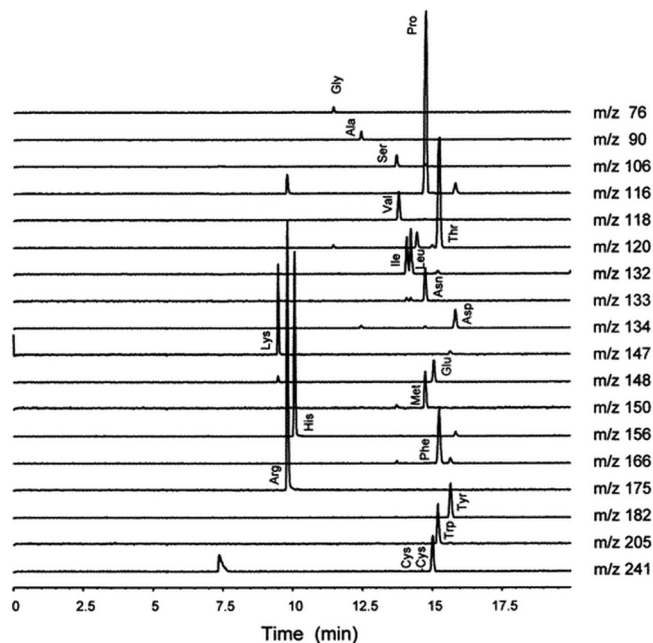


Figura 7. EIEs (Extracted Ion Electropherograms) de aminoácidos presentes em molho de soja. Reproduzida da ref. 91 com permissão da ACS

Na Tabela 1 é mostrado um panorama geral das principais aplicações de CE-MS em proteoma, metaboloma, separações enantioméricas, forenses, ambientais e clínicas.

O ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS DA EVOLUÇÃO DE CE-MS NO BRASIL

O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara tem como interesse o desenvolvimento de metodologias analíticas e bioanalíticas com CE-ESI-MS/MSⁿ relacionado a vários enfoques. Um deles é a busca de biomarcadores para o estudo de mecanismos relacionados ao estresse redox e carbonílico associado a α -aminocetonas e β -cetoácidos endógenos. Estes estudos estão relacionados a várias desordens metabólicas. Sabe-se hoje que O₂ e NO atuam como parceiros no metabolismo normal e que desequilíbrios nesta cooperação produzem danos oxidativos e nitrosativos em biomoléculas e organelas, ameaçando a vida da célula. Outra linha de estudo é a atividade pró-oxidante e acilante de metabólitos de aminoácidos, particularmente α -aminocetonas e β -cetoácidos, que são acumulados nos tecidos de portadores de desordens. Nos próximos anos a investigação dos mecanismos de oxidação aeróbica dos metabólitos: ácido 5-aminolevulínico (ALA); aminocetona (AA); succinilcetona (SA) e metil aceto acetato (MAA), bem como os efeitos deletérios de seus produtos de oxidação finais – ácido 4,5-dióxidovalérico (DOVA), metilglioxal (MG) e biacetilo – sobre células em cultura,

ratos e humanos será continuada. Uma das principais ferramentas para este estudo está em metodologias baseadas em CE-ESI/MSⁿ para análise destes metabólitos e busca de marcadores relacionados ao estresse carbonílico.

A Profa. Dra. Marina F. M. Tavares supervisiona o laboratório de cromatografia e eletroforese capilar (LACE), fundado em 1997 no IQ-USP. Seus interesses de pesquisa relacionam-se com separações em meio líquido, cromatografia e eletroforese capilar de alta eficiência, em tópicos de cunho fundamental e aplicado, centrados em compostos de importância clínica, forense e ambiental, além de fármacos, alimentos e produtos naturais. A linha de pesquisa que abrange aspectos fundamentais inclui estudos dos mecanismos de separação, modelos de migração eletroforética e eletrosmótica, interação soluto-micela, equilíbrios ácido-base e de complexação, otimização de separações e estratégias de pré-concentração *on-line*. A linha clínica inclui a avaliação de metabólitos (hemoglobina glicada, cetoácidos, hormônios esteroidais) em fluidos biológicos (sangue e urina), enquanto que a área forense inclui a investigação de drogas de abuso (opioides, canabinóides, anfetaminas) em fluidos biológicos alternativos (cabelo e humor vítreo). A área ambiental contempla estudos sobre emissões veiculares e poluentes no ar atmosférico (aldeídos e cetonas) e águas de abastecimento (fármacos, pesticidas, azo-corantes). A linha de fármacos inclui investigação de pureza e controle de qualidade de fármacos anti-retrovirais (coquetel AIDS) e anti-câncer (ftalocianinas metaladas). Em alimentos, o foco está na análise de constituintes (carboidratos, ácidos graxos, ácidos carboxílicos, compostos fenólicos e aminoácidos), aditivos (corantes e vitaminas) e contaminantes (pesticidas). Na linha de produtos naturais, há interesse na caracterização de extratos vegetais (compostos fenólicos), óleos essenciais e hidrolisados de proteína de interesse cosmiátrico ou fitoterápico.

O Laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BioMicS – tem como metas o desenvolvimento de instrumentação analítica em métodos eletroforéticos, em particular no desenvolvimento de *microchips* de separação. Visa também o desenvolvimento de metodologias bioanalíticas que possam contribuir não só para um melhor diagnóstico de doenças, mas também para o entendimento dos processos biológicos envolvidos. Para tanto, atua nas áreas de genômica e análises genéticas, proteômica e análises de proteínas, e metabolômica e análise de metabólitos secundários de plantas e microrganismos. Com exceção das análises genéticas, as áreas de proteômica e metabolômica são essencialmente dependentes de espectrometria de massas e a utilização de CE-MS é fundamental para o sucesso de tais projetos. Alguns exemplos de desenvolvimentos nesta direção, começando pela instrumentação, são o acoplamento de *microchips* ou MS, desenvolvimento de colunas especiais para CE-MS *sheathless*, microcolunas empacotadas para eletrocromatografia e métodos eletroforéticos em meio não-aquoso.²⁸ Particularmente na área de proteômica, o foco é voltado para a proteômica clínica, buscando biomarcadores para diagnóstico precoce de doenças e no entendimento de como algumas doenças evoluem, como esquizofrenia e Alzheimer. O interesse em metabólitos secundários abrange desde a detecção e identificação estrutural de novos metabólitos biologicamente ativos,^{122,129} até o entendimento de rotas metabólicas e mecanismo de ação de proteínas numa abordagem mais ampla de química biológica e biologia de sistemas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar, disponível gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, encontra-se a Figura 1S, que contém eletroferogramas dos íons extraídos (EIEs) de metabólitos catiônicos da bactéria *Bacillus subtilis*.⁹¹

Tabela 1. Principais aplicações de CE-MS

Aplicação	Analito	Matriz	Modalidade de CE	Interface, modo de ionização	Analizador de MS	Ref.
Proteômica	Biomarcadores de doenças renais	Urina Humana	CZE	<i>Sheath liquid</i>	TOF	114
	Biomarcadores de doenças renais	Urina Humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	TOF	122
	Biomarcadores de câncer de próstata	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	TOF	123
	Digerido proteico de patógenos	Pus, escarro e urina de humanos	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	93 124
Metabolômica	Glutaciona, piroglutamato, adenil succinato, ornitina, histidina e ácido homogenístico	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	
	Metabólitos de haloperidol	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	125
	Isômeros de anfetaminas e pseudo-efedrina	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	78
	Isômeros de tramadol	Plasma humano	CZE-partial filling	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	126
	Ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares	Arroz transgênico	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	N.I.*	127
	Metabólitos das vias glicolítica e pentose fosfato, do ciclo do ácido tricarbóxico da foto-respiração e da biossíntese de aminoácidos	Folha de arroz	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Triplo quadrupolo	128
	Sideróforos	Extrato bacteriano	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	129
	Metabólitos aniônicos, catiônicos, nucleotídeos e derivados de CoA	Extrato de <i>Bacillus subtilis</i>	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Triplo quadrupolo	92
	Nucleotídeos glicosilados	Extrato celular	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Linear Ion trap</i>	130
	Metabólitos ácidos e fosforilados	Extratos de procaríotos	CZE	<i>Sheathless</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	76
	Metabólitos bacterianos	<i>Escherichia coli</i>	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	131
	Enzimas bacterianas	<i>Escherichia coli</i>	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo e TOF	132
	Glicofosfatos, ácidos orgânicos, nucleotídeos e compostos derivados da coenzima A (CoA)	Padrões analíticos	CZE com aplicação de pressão (polaridade reversa)	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	133
Farmacêutica/ Separações enantioméricas	Drogas de abuso	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	134
	Fármaco	Urina humana	CZE-NACE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	135
	Fármaco	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	N. I.	136
	Fármacos para doenças pulmonares	Plasma	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Triplo quadrupolo	137
	Fármacos e metabólitos	Soro	CZE-partial-filling	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	138
	Fármacos	Plasma de macaco	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI e API	Triplo quadrupolo e TOF	139
	Aminoácidos relacionados com desordens metabólicas	Sangue	CZE	<i>Sheathless</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	140
	Impureza em composto antifúngicos	Fármacos	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	141
	Fármacos anestésicos	Formulações	CZE-partial-filling	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	142
	Forense/ Drogas de abuso	Solução de padrões	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo-TOF	143
	Fármacos	Solução de padrões	CZE-partial-filling	<i>Sheath liquid</i> , <i>ion spray</i>	Quadrupolo	144
	Antibióticos	Solução de padrões	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	Quadrupolo	145
	Fármacos	Solução de padrões	CZE	N.I., ESI	Triplo quadrupolo	146
Herbicidas	Solução de padrões	CZE	<i>Sheath liquid</i> , ESI	<i>Ion trap</i>	147	

Tabela 1. continuação

Aplicação	Analito	Matriz	Modalidade de CE	Interface, modo de ionização	Analizador de MS	Ref.
Forense	β -carbonilas	Extratos de plantas	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	<i>Ion trap</i>	148
	Morfina e anfetamina	Urina	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	<i>Ion trap</i>	149
	Anfetaminas	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	<i>Ion trap</i>	104
	Ópio	Extrato de planta	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	TOF	150
Ambiental	Herbicida	Água	CZE-NACE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	<i>Ion trap</i>	151
	Espécies metálicas	Solo	CZE	<i>Sheath liquid, ICP**</i>	N.I.	152
	Antimônio	Esgoto	CZE	<i>Sheath liquid, ICP</i>	N.I.	153
	Glicoproteínas associadas ao câncer	Urina humano	CZE	<i>MALDI</i>	TOF	154
	Derivado de boro (drogas anticancerígenas)	Urina humana	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	<i>Ion trap</i>	155
	Borofenilalanina	Tecidos humanos	CZE	<i>Sheath liquid, ICP</i>	Setor eletro-magnético	156
	Serotonina e precursores	Plasma humano	CZE	<i>Sheath liquid, ESI</i>	TOF	157
	Metaloproteínas anti-cancerígenas	Soro	CZE	<i>Sheath liquid, ICP</i>	N.I.	158

*N.I.: não informado. **ICP: plasma acoplado indutivamente

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa, dos grupos envolvidos e bolsa de pós-doutorado, mas especialmente pelo financiamento dos dois equipamentos CE-MS, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pós-doutorado e de pesquisa em produtividade.

REFERÊNCIAS

- Nilsson, S.; *Tese de Doutorado*, University of Uppsala, Suécia, 2004.
- Schmitt-Kopplin, P.; Frommberger, M.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3837.
- Aebersold, R.; Mann, M.; *Nature* **2003**, *422*, 198.
- Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A.; *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437.
- Hernández-Borges, J.; Neusüß, C.; Cifuentes, A.; Pelzing, M.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2257.
- Yates, J. R.; *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1.
- Mol, R.; de Jong, G. J.; Somsen, G. W.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 146.
- Olivares, J. A.; Nguyen, N. T.; Yonker, C. R.; Smith, R. D.; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1230.
- Petersen, J. R.; Mohammad, A. M.; *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press: Totowa, 2001.
- Schmitt-Kopplin, P.; Englmann, M.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1209.
- Keough, T.; Takigiku, R.; Lacey, M. P.; Purdon, M.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1594.
- Weinmann, W.; Parker, C. E.; Baumeister, K.; Maier, C.; Tomer, K. B.; Przybylski, M.; *Electrophoresis* **1994**, *15*, 228.
- Weinmann, W.; Baumeister, K.; Kaufmann, I.; Przybylski, M.; *J. Chromatogr.* **1993**, *628*, 111.
- Van Veelen, P. A.; Tjaden, U. R.; Van Der Greef, J.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F.; *J. Chromatogr.* **1993**, *647*, 367.
- Suter, M. J. F.; Caprioli, R. M.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 198.
- Moseley, M. A.; Deterding, L. J.; Dewit, J. S. M.; Tomer, K. B.; Kennedy, R. T.; Bragg, N.; Jorgenson, J. W.; *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1577.
- Moseley, M. A.; Deterding, L. J.; Tomer, K. B.; Jorgenson, J. W.; *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 167.
- Moseley, M. A.; Deterding, L. J.; Tomer, K. B.; Jorgenson, J. W.; *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 197.
- Foret, F.; Thompson, T. J.; Vouros, P.; Karger, B. L.; Gebauer, P.; Bocek, P.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4450.
- Pleasant, S.; Thibault, P.; Kelly, J.; *J. Chromatogr.* **1992**, *591*, 325.
- Caprioli, R. M.; Moore, W. T.; Martin, M.; Dague, B. B.; Wilson, K.; Moring, S.; *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 247.
- Scriba, G. K. E.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1159*, 28.
- Klampfl, C. W.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1044*, 131.
- Barceló-Barrachina, E.; Moyano, E.; Galceran, M. T.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1927.
- Tomlinson, A. J.; Benson, L. M.; Gorrod, J. W.; Naylor, S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *657*, 373.
- Peri-Okonny, U. L.; Kennedler, E.; Stubbs, R. J.; Guzman, N. A.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 139.
- Ballard, J. N. M.; Lajoie, G. A.; Yeung, K. K. C.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1156*, 101.
- Assunção, N. A.; Deziderio, L. A. G.; Paulino, L. G.; Lupetti, K. O.; Carrilho, E.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3292.
- Steiner, F.; Hassel, M.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 399.
- Senior, J.; Rolland, D.; Tolson, D.; Chantzis, S.; De Biasi, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 413.
- Hofstadler, S. A.; Wahl, J. H.; Bruce, J. E.; Smith, R. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6983.
- Von Brocke, A.; Nicholson, G.; Bayer, E.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1251.
- Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.; *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37.
- Viberg, P.; Nilsson, S.; Skoog, K.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4241.
- Tanaka, Y.; Kishimoto, Y.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *802*, 83.
- Nelson, W. M.; Lee, C. S.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3265.
- Uijsselaer, P. G.; Otsuka, K.; Terabe, S.; *J. Chromatogr.* **1998**, *802*, 3.
- Shamsi, S. A.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4036.
- Xue, Q.; Foret, F.; Dunayevskiy, Y. M.; Zavracky, P. M.; McGruer, N. E.; Karger, B. L.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 426.
- Razunguzwa, T.; Timperman, A. T.; *Methods Mol. Biol.* **2006**, *339*, 67.
- Akashi, S.; Suzuki, K.; Arai, A.; Yamada, N.; Suzuki, E. I.; Hirayama, K.; Nakamura, S.; Nishimura, Y.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1932.

42. Dahlin, A. P.; Wetterhall, M.; Liljegren, G.; Bergstrom, S. K.; Andrén, P.; Nyholm, L.; Markides, K. E.; Bergquist, J.; *Analyst* **2005**, *130*, 193.
43. Song, Q. J.; Greenway, G. M.; McCreedy, T.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *18*, 1.
44. Schoenher, R. M.; Ye, M.; Vannatta, M.; Dovichi, N. J.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2230.
45. Kameoka, J.; Craighead, H. G.; Zhang, H.; Henion, J.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1935.
46. Licklider, L. K.; Werner, G.; Lacey, M. P.; Keough, T.; Purdon, M. P.; Takigiku, R.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4170.
47. Stomakhin, A. A.; Vasiliskov, V. A.; Timofeev, E.; Schulga, D.; Cotter, R. J.; Mirzabekov, A. D.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1193.
48. Ro, K. W.; Liu, J.; Knapp, D. R.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1111*, 40.
49. Musyimi, H. K.; Guy, J.; Narcisse, D. A.; Soper, S. A.; Murray, K. K.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 4703.
50. Jin, L. J.; Ferrance, J.; Sanders, J. C.; Landers, J. P.; *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 11.
51. Chen, W.; Shen, J.; Yin, X.; Yu, Y.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 35.
52. Serwe, M.; Ross, G.; *Chromatographia* **1999**, *49*, S73.
53. Lu, M.; Tong, P.; Xiao, H.; Xia, S.; Zheng, X.; Liu, W.; Zhang, L.; Chen, G.; *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1461.
54. Liu, C. C.; Alary, J. F.; Vollmerhaus, P.; Kadkhodayan, M.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1366.
55. Sheppard, R. L.; Henion, J.; *Electrophoresis* **2002**, *18*, 287.
56. Garcia, F.; Henion, J. D.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 985.
57. Caprioli, R. M.; Moore, W. T.; Martin, M.; DaGue, B. B.; *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 247.
58. Wolf, S. M.; Vouros, P.; *J. Chromatogr.* **1995**, *480*, 247.
59. Takada, Y.; Sakairi, M.; Koizumi, H.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1474.
60. Tanaka, Y.; Otsuka, K.; Terabe, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1889.
61. Rejtar, T.; Hu, P.; Juhasz, P.; Campbell, J. M.; Vestal, M. L.; Preisler, J.; Karger, B. L.; *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 171.
62. Preisler, J.; Hu, P.; Rejtar, T.; Moskovets, E.; Karger, B. L.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 17.
63. Landers, J. P. Em *Handbook of Capillary Electrophoresis*; 2nd ed.; Serviers, J. C.; Smith, R. D., eds.; CRC Press: Boca Raton, 1997.
64. Hofstadler, S. A.; Swanek, F. D.; Gale, D. C.; Ewing, A. G.; Smith, R. D.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1477.
65. Severs, J. C.; Hofstadler, S. A.; Zhao, Z.; Senh, R. T.; Smith, R. O.; *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1808.
66. Castoro, J. A.; Chiu, R. W.; Monnig, C. A.; Wilkins, C. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7571.
67. Hofstadler, S. A.; Wahl, J. H.; Bruce, J. E.; Smith, R. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6983.
68. Perkins, J. R.; Tomer, K. B.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2835.
69. Prange, A.; Schaumlöffel, D.; Bratter, P.; Richarz, A. N.; Wolf, C.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 764.
70. Andón, B.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3661.
71. Zhu, K.; Kim, J.; Yoo, C.; Miller, F. R.; Lubman, D. M.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6209.
72. Brenner-Weiss, G.; Kirschofer, F.; Kuhl, B.; Nusser, M.; Obst, U.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1009*, 147.
73. Grahama, R. L. J.; McClean, S.; O'Kane, E. J.; Theakston, D.; Shaw, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333*, 88.
74. Soga, T.; Neiger, D. N.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1236.
75. Boatto, G.; Nieddu, M.; Carta, A.; Pau, A.; Palomba, M.; Asproni, B.; Cerri, R.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *814*, 93.
76. Edwards, J. L.; Chisolm, C. N.; Shackman, J. G.; Kennedy, R. T.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1106*, 80.
77. Wang, S.; Zhao, X.; Mao, Y.; Cheng, Y.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1147*, 254.
78. Iio, R.; Chinaka, S.; Takayama, N.; Hayakawa, K.; *J. Health Sci.* **2005**, *51*, 693.
79. Lara, F. J.; García-Campaña, A. M.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J. M.; García-Ayuso, L. E.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7665.
80. Ge, L.; Peh, C. Y. C.; Yong, J. W. H.; Tan, S. N.; Hua, L.; Ong, E. S.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1159*, 242.
81. Sturm, S.; Strasser, E. M.; Stuppner, H.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1112*, 331.
82. Fekete, A.; Hertkorn, N.; Frommberger, M.; Lahaniatis, M. R.; Kettrup, A.; Schmitt-Kopplin, P.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2216.
83. *Electrophoresis*, **2004**. Special Issue: Paper Symposium Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry, *25*, 1927-2108.
84. *Electrophoresis*, **2006**. Special Issue: Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry, *27*, 2025-2259.
85. *Electrophoresis* **2007**. Special Issue: Capillary - Mass Spectrometry, *28*, 1303-1473.
86. Kolch, W.; Neusuß, C.; Pelzing, M.; Mischak, H.; *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 959.
87. Banks, J. F.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2255.
88. Simpson, D. C.; Smith, R. D.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1291.
89. Henion, J. D.; Mordehai, A. V.; Cai, J.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2103.
90. Sheppard, R. L.; Tong, X.; Cai, J.; Henion, J. D.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2054.
91. Soga, T.; Ohashi, Y.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Tomita, M.; Nishioka, T.; *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 488.
92. Soga, T.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Ohashi, Y.; Tomita, M.; Nishioka, T.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233.
93. He, T.; Quinn, D.; Fu, E.; Wang, Y. K.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *727*, 43.
94. Zhao, X.; Lu, Y.; Phillips, D. R.; Hwang, H. M.; Hardin, I. R.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1159*, 217.
95. Tanaka, Y.; Higashi, T.; Rakwal, R.; Wakida, S.; Iwahashi, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 608.
96. Takahashi, H.; Hayashi, M.; Goto, F.; Sato, S.; Soga, T.; Nishioka, T.; Tomita, M.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiyama, H.; *Annals of Botany* **2006**, *98*, 819.
97. **Bezy, V.; Chaimbault, P.; Morin, P.; Unger, S. E.; Bernard, M. C.; Agrofoglio, L. A.;** *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2464.
98. Soga, T.; Baran, R.; Suematsu, M.; Ueno, Y.; Ikeda, S.; Sakurakawa, T.; Kakazu, Y.; Ishikawa, T.; Robert, M.; Nishioka, T.; Tomita, M.; *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16768.
99. Smetkova, M.; Ondra, P.; Lemr, K.; *Chemické Listy* **2004**, *98*, 336.
100. Varesio, E.; Cherkaoui, S.; Veuthey, J. L.; *J. High Res. Chromatogr.* **1998**, *21*, 653.
101. Peri-Okonny, U. L.; Wang, S. X.; Stubbs, R. J.; Guzman, N. A.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2652.
102. Ma, Y.; Liu, G.; Du, M.; Stayton, I.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1473.
103. Sheppard, R. L.; Henion, J.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2901.
104. Ramseier, A.; Siethoff, C.; Caslavská, J.; Thormann, W.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 380.
105. Fliser, D.; Wittke, S.; Mischak, H.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2708.
106. Kaiser, T.; Kamal, H.; Rank, A.; Kolb, H. J.; Holler, E.; Ganser, A.; Hertenstein, B.; Mischak, H.; Weissinger, E. M.; *Blood* **2004**, *104*, 340.
107. Kaiser, T.; Wittke, S.; Just, I.; Krebs, R.; Bartel, S.; Filser, D.; Mischak, H.; Weissinger, E. M.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2044.
108. Wittke, S.; Mischak, H.; Walden, M.; Kolch, W.; Radler, T.; Wiedemann, K.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1476.
109. Manley, S.; John, W. G.; Marshall, S.; *Diabetic Medicine* **2004**, *21*, 673.
110. Lord, G. A.; Luo, J. L.; Lim, C. K.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 314.

111. Stutz, H.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1254.
112. Wetterhall, M.; Palmblad, M.; Hakansson, P.; Markides, K. E.; Bergquist, J.; *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 361.
113. Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Pataridis, S.; Miksíková, I.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1155*, 125.
114. Weissinger, E. M.; Wittke, S.; Kaiser, T.; Haller, H.; Bartel, S.; Krebs, R.; Golovko, I.; Rupperecht, H. D.; Haubitz, M.; Hecker, H.; Mischak, H.; Fliser, D.; *Kidney Int.* **2004**, *65*, 2426.
115. Mischak, H.; Kaiser, T.; Walden, M.; Hillmann, M.; Wittke, S.; Herrmann, A.; Knueppel, S.; Haller, H.; Fliser, D.; *Clin. Sci.* **2004**, *7*, 85.
116. Gennaro, L. A.; Vadhanam, M.; Gupta, R. C.; Vouros, P.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1541.
117. Warnke, U.; Gysler, J.; Hofte, B.; Tjaden, U. R.; Van der Greef, J.; Kloft, C.; Schunack, W.; Jaehde, U.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 97.
118. Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á.; García-Montelongo, F. J.; Cifuentes, A.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 948.
119. Juan-García, A.; Font, G.; Pico, Y.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1550.
120. Simo, C.; Barba, S. C.; Cifuentes, A.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1306.
121. Simionato, A. V. C.; Moraes, E. P.; Carrilho, E.; Tavares, M. F. M.; Kenndler, E.; *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2051.
122. Simionato, A. V. C.; da Silva, D. S.; Lambais, M. R.; Carrilho, E.; *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 490.
123. Theodorescu, D.; Fliser, D.; Wittke, S.; Mischak, H.; Krebs, R.; Walden, M.; Ross, M.; Eltze, E.; Bettendorf, O.; Wulfing, C.; Semjonow, A.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2797.
124. Hu, A.; Chen, C. T.; Tsai, P. J.; Ho, Y. P.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5124.
125. Tomlinson, A. J.; Benson, L. M.; Jameson, S.; Johnson, D. H.; Naylor, S.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 15.
126. Rudaz, S.; Cherkaoui, S.; Dayer, P.; Fanali, S.; Veuthey, J. L.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *868*, 295.
127. Takahashi, H.; Hayashi, M.; Goto, F.; Sato, S.; Soga, T.; Nishioka, T.; Tomita, M.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiyama, H.; *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 819.
128. Sato, S.; Soga, T.; Nishioka, T.; Tomita, M.; *Plant J.* **2004**, *40*, 151.
129. Simionato, A. V. C.; Simó, C.; Cifuentes, A.; Lacava, P. T.; Araújo, W. L.; Azevedo, J. L.; Carrilho, E.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2567.
130. McNally, D. J.; Hui, J. P. M.; Aubry, A. J.; Mui, K. K. K.; Guerry, P.; Brisson, J. R.; Logan, S. M.; Soo, E. C.; *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18489.
131. Lee, R.; Ptolemy, A. S.; Niewczas, L.; Britz-McKibbin, P.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 403.
132. Saito, N.; Robert, M.; Kitamura, S.; Baran, R.; Soga, T.; Mori, H.; Nishioka, T.; Tomita, M.; *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1979.
133. Harada, K.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A.; *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 403.
134. Iio, R.; Chinaka, S.; Tanaka, S.; Takayama, N.; Hayakawa, K.; *Analyst* **2003**, *128*, 646.
135. Servais, A. C.; Fillet, M.; Mol, R.; Somsen, G. W.; Chiap, P.; Jong, G. J. D.; Crommen, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 752.
136. Zhou, L.; Thompson, R.; Reamer, R. A.; Miller, C.; Welch, C.; Ellison, D. K.; Wyvratt, J. M.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 409.
137. Toussaint, B.; Palmer, M.; Chiap, P.; Hubert, P.; Crommen, J.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1363.
138. Cherkaoui, S.; Rudaz, S.; Varesio, E.; Veuthey, J. L.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3308.
139. Kindt, E. K.; Kurzyniec, S.; Wang, S. C.; Kilby, G.; Rossi, D. T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 893.
140. Schultz, C. L.; Moini, M.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1508.
141. Castro-Puyana, M.; García-Ruiz, C.; Cifuentes, A.; Crego, A. L.; Marina, M. L.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 170.
142. Cherkaoui, S.; Veuthey, J. L.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 615.
143. Iwata, Y. T.; Kanamori, T.; Ohmae, Y.; Tsujikawa, K.; Inoue, H.; Kishi, T.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1770.
144. Grard, S.; Morin, Ph.; Dreux, M.; Ribet, J. P.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *926*, 3.
145. Bonnici, P. J.; Damen, M.; Waterval, J. C. M.; Heck, A. J. R.; *Anal. Biochem.* **2001**, *290*, 292.
146. Srinivasan, K.; Bartlett, M. G.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 624.
147. Otsuka, K.; Smith, C. J.; Grainger, J.; Barr, J. R.; Patterson Jr., D. G.; Tanaka, N.; Terabe, S.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *817*, 75.
148. Huhn, C.; Neustüß, C.; Pelzing, M.; Pyell, U.; Mannhardt, J.; Pütz, M.; *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1389.
149. Tsai, J. L.; Wu, W. S.; Lee, H. H.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1580.
150. Lazar, I. M.; Naisbitt, G.; Lee, M. L.; *Chromatographia* **1999**, *50*, 188.
151. Scranò, L.; Bufo, S. A.; Menzinger, F.; Schmitt-Kopplin, P.; *Environ. Chem. Lett.* **2006**, *4*, 225.
152. Casiot, C.; Donard, O. F. X.; Potin-Gautier, M.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2002**, *57*, 173.
153. Michalke, B.; Schramel, P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *834*, 341.
154. Choudhary, G.; Chakel, J.; Hancock, W.; Torres-Duarte, A.; McMahon, G.; Wainer, I.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 855.
155. Mauri, P. L.; Basilico, F.; Pietta, P. G.; Pasini, E.; Monti, D.; Sauerwein, W.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *788*, 9.
156. Pitois, A.; De Las Heras, L. A.; Zampolli, A.; Menichetti, L.; Carlos, R.; Lazzerini, G.; Cionini, L.; Salvatori, P. A.; Betti, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 751.
157. Peterson, Z. D.; Lee, M. L.; Graves, S. W.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *810*, 101.
158. Polec-Pawlak, K.; Abramski, J. K.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K.; Jarosz, M.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1128.