

ESTRATÉGIAS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR. PARTE 2. MANIPULAÇÃO DA VELOCIDADE DA FASE DISPERSA/SECUNDÁRIA

Maria de Lourdes L. de Moraes

Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Rua Artur Riedel, 276, 09972-270 Diadema – SP, Brasil

Marina F. M. Tavares

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

Elisabete A. Pereira*

Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos - SP 264, km 110, 18052-780 Sorocaba – SP, Brasil

Recebido em 5/3/09; aceito em 7/7/09; publicado na web em 8/1/10

PRECONCENTRATION STRATEGIES IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS. PART 2. MANIPULATION OF THE DISPERSE/SECONDARY VELOCITY. This work describes CE preconcentration strategies based on the effect of manipulation of the disperse/secondary velocity. Introduced by Terabe *et al.* in 1984, micellar electrokinetic chromatography is a powerful separation approach that increases the usage of electrokinetic phenomena for the separation of nonionic compounds. The main disadvantage of MEKC is the low concentration sensitivity associated with the limited optical path length for on-capillary photometric detection and the limited volume of sample solution that can be injected. This paper compiles on-line concentration strategies for neutral analytes by sample stacking and sweeping in micellar electrokinetic chromatography.

Keywords: MEKC (micellar electrokinetic chromatography); stacking; sweeping.

INTRODUÇÃO

Princípio da separação

A cromatografia eletrocínética micelar (*MEKC*, *micellar electrokinetic chromatography*) é uma versão modificada da eletroforese capilar. Nesta nova versão agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida proporcionando, desta forma, um sistema cromatográfico de duas fases.¹ Quando um analito neutro é injetado na solução micelar, uma fração deste analito é incorporada dentro da micela e migra com a velocidade da micela. A fração do analito que permanece livre da micela migra com velocidade eletrosmótica. A velocidade de migração do analito depende do coeficiente de distribuição do analito entre a fase micelar e a fase não micelar aquosa.¹

Como em qualquer separação eletroforética em capilar, a alta resolução da MEKC requer a injeção de um pequeno volume de amostra. Pequenos volumes de amostra tornam a detecção de baixas concentrações inviável. Por exemplo, no caso da detecção de absorbância na região do ultravioleta (UV), os limites de detecção são da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹, o que é inadequado para as análises de constituintes traços em amostras de diversas procedências como, por exemplo, ambiental, clínica etc.²

O *stacking* (empilhamento) de espécies carregadas tem sido usado extensivamente em muitas áreas da eletroforese capilar³⁻⁷ para aumentar a sensibilidade das medidas. Quando uma amostra é dissolvida em um solvente com condutividade elétrica menor do que a do eletrólito de corrida, o *stacking* ocorre durante a aplicação da tensão. Este fenômeno ocorre porque na região onde a amostra se encontra existe um campo elétrico maior do que na região do capilar preenchida pelo eletrólito de corrida. Assim, a velocidade eletroforética é maior e os íons migram mais rapidamente em direção à interface entre a zona de alta e baixa condutividade. Quando os íons

alcançam a fronteira entre a zona da amostra e a zona do eletrólito, eles são desacelerados causando uma contração da zona da amostra. Este efeito é contínuo até que todos os íons presentes na região da amostra sejam concentrados em uma banda fina. O campo elétrico torna-se homogêneo e os íons são separados segundo os princípios convencionais da eletroforese capilar.⁸

Stacking eletrocínético ou campo amplificado é outro caminho para se obter a pré-concentração de espécies carregadas. Neste caso, uma pequena banda de água é inserida no capilar, por pressão, antes da injeção da amostra. A introdução de uma pequena banda de água garante um elevado campo elétrico local no ponto de injeção.⁹ Quando a tensão é aplicada, os íons que se encontram na região de baixo campo elétrico migram e são acelerados na região da banda de água (alto campo elétrico). Quando estes íons encontram novamente um campo elétrico menor, são desacelerados e se concentram em uma banda fina na fronteira entre estas duas regiões.

Embora o *stacking* da amostra pode ser efetivo para espécies carregadas negativa ou positivamente, moléculas neutras não são afetadas por estas estratégias. No entanto, com a introdução da MEKC por Terabe e colaboradores⁹ que possibilitou incorporar uma velocidade eletroforética aos analitos neutros, graças ao engenhoso uso de micelas, diversas estratégias de *stacking*, em meio micelar, foram desenvolvidas.

AUMENTO DA SENSIBILIDADE DE ANALITOS NEUTROS: ESTRATÉGIAS DE STACKING EM MEKC

As técnicas de *stacking* podem ser divididas com base no modo de injeção (hidrodinâmico ou eletrocínético). No *stacking* com modo de injeção hidrodinâmico as amostras são preparadas em água ou em meio micelar de baixa condutividade e podem ser injetadas em grandes volumes com a polaridade da fonte de alta tensão normal (positiva) ou invertida (negativa).

No *stacking* com modo de injeção eletrocínética as amostras são preparadas em meio micelar de baixa condutividade. As amostras

*e-mail: ealves@ufscar.br

são injetadas utilizando a polaridade da fonte negativa depois da introdução de um volume de água.

Stacking com modo de injeção hidrodinâmica

Stacking em modo normal (SMN)

O mecanismo do SMN¹⁰ é ilustrado na Figura 1. A amostra é preparada em matriz aquosa e injetada por um longo tempo quando comparado ao modo hidrodinâmico usual, depois que o capilar foi devidamente preenchido com eletrólito de corrida (solução neutra ou básica) contendo um tensoativo aniônico (Figura 1a). Com a aplicação da tensão positiva, as micelas do eletrólito, provenientes do lado catódico (pólo negativo), migram em direção ao anodo entrando na zona da amostra (Figura 1b). As micelas dentro da zona da amostra, região de baixa condutividade, movimentam-se rapidamente carregando os analitos em direção à fronteira F1. Quando as micelas alcançam a fronteira entre a zona da amostra e a zona do eletrólito, elas são desaceleradas causando uma contração da zona da amostra (Figura 1c). Este efeito é contínuo até que todos os analitos presentes na região da amostra sejam concentrados em uma banda fina. O campo elétrico torna-se homogêneo e como o fluxo eletrosmótico (EOF, *electroosmotic flow*) é maior do que a migração eletroforética das micelas, as micelas também se movem em direção ao detector. Finalmente, a separação das bandas pode ser observada na Figura 1d.

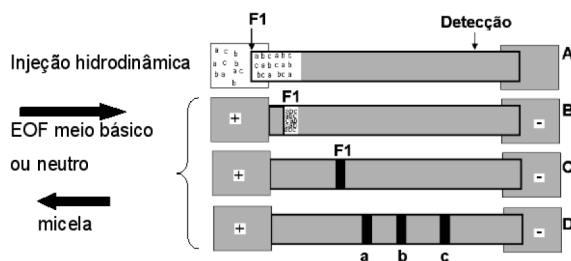


Figura 1. Modelo de stacking em modo normal (SMN): a. injeção de grande volume de amostra; b. com aplicação da tensão as micelas, em alta velocidade, entram na zona da amostra carregando os analitos neutros para a fronteira F1; c. pré-concentração dos analitos em uma fina banda na fronteira F1; d. análise das zonas separadas

O SMN é o mais simples e rápido de ser realizado. Por outro lado, tempos de injeção superior a 40 s produzem alargamento dos picos e, conseqüentemente, perda da resolução.

Stacking em modo de polaridade invertida do eletrodo (SMPIE)

As amostras são preparadas em meio aquoso e injetadas utilizando um maior tempo do que no modo SMN, depois que o capilar foi devidamente preenchido com eletrólito de corrida (solução neutra ou básica) contendo um tensoativo aniônico (Figura 2a).¹¹ Quando a tensão é aplicada, utilizando polaridade negativa, as micelas provenientes do reservatório catódico migram em direção ao eletrodo de carga oposta carregando e pré-concentrando os analitos neutros na interface entre a zona da amostra e a zona do eletrólito, F1 (Figura 2b). A amostra é empurrada para o reservatório catódico pelo EOF e o capilar é preenchido pelo eletrólito proveniente do reservatório anódico (Figura 2c). O procedimento de preenchimento do capilar é monitorado pelo valor de corrente. Quando a corrente atingir 97-99% do valor inicial, a polaridade é invertida (Figura 2c). Com a polaridade positiva a separação das zonas ocorre normalmente (Figura 2d). Para se conhecer o valor de corrente inicial, o capilar é preenchido com o eletrólito de corrida e a tensão é aplicada por cerca de 5 min.

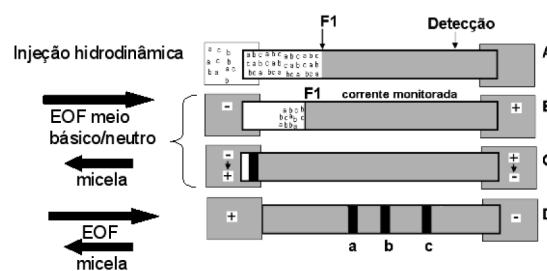


Figura 2. Modelo de stacking em modo de polaridade invertida do eletrodo (SMPIE). Legenda igual à da Figura 1 para a, b e d; c. pré-concentração dos analitos e inversão da polaridade

A vantagem da SMPIE é que a utilização da polaridade negativa permite que um grande volume de amostra possa ser introduzido dentro do capilar. O efeito de dispersão, sobre as bandas focalizadas, causado pela diferença da velocidade eletrosmótica local entre a zona de alta e baixa condutividade também é minimizado. A desvantagem é a etapa de troca da polaridade que pode ser responsável pelos problemas de repetibilidade. O volume de amostra que permanece no capilar, depois da inversão da polaridade, irá variar de uma análise para outra se a corrente não for controlada rigorosamente.

Stacking em modo de migração reversa das micelas (SMMRM)

Um grande volume de amostra, preparada em uma matriz de baixa condutividade, é injetado no capilar que previamente foi preenchido com um eletrólito de corrida micelar em meio ácido (Figura 3a).¹² Sob estas condições, a velocidade eletroforética da micela é maior do que o EOF devido à redução do potencial zeta nas paredes do capilar. Com a aplicação da tensão, utilizando polaridade negativa, (Figura 3b), as micelas provenientes do reservatório catódico entram no capilar e arrastam os analitos, que se encontram na zona da amostra, em direção ao detector. Desde que a polaridade negativa é aplicada no *inlet* (lado da injeção) o EOF, apesar de reduzido, empurra a amostra lentamente para fora do capilar em direção ao reservatório catódico fazendo com que o capilar seja preenchido pelo eletrólito proveniente do reservatório aniônico. Quando as micelas alcançam a fronteira entre a zona da amostra e a zona do eletrólito, elas são desaceleradas, pré-concentrando os analitos em uma banda fina. Depois da pré-concentração dos analitos neutros na fronteira F1 e antes da remoção completa da amostra, as bandas focalizadas separam-se da fronteira F1 (Figura 3c). Na Figura 3d é possível observar que a amostra é completamente removida da coluna e a separação das zonas pré-concentradas ocorre. O processo não envolve a troca de polaridade.

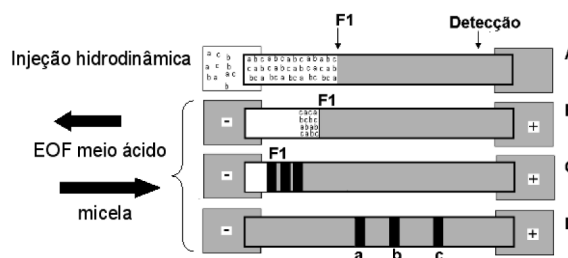


Figura 3. Modelo de stacking em modo migração reversa das micelas (SMMRM). Legenda igual à da Figura 1 para a, b e d. Em c. os analitos pré-concentrados deixam a fronteira F1 antes da remoção da zona da amostra pelo eletrólito

A SMMRM apresenta como vantagens: a utilização de longos tempos de injeção sem que ocorra perda significativa da resolução dos picos, o processo não envolve a troca de polaridade e, o mais importante, um ganho significativo na resposta do detector (aumento de sinal que pode ser de 100 vezes). A principal desvantagem observada foi baixa repetibilidade na altura dos picos. Este problema pode ser resolvido utilizando-se um padrão interno.

Stacking em modo de migração reversa das micelas usando banda de água (SMMRA)

Inicialmente uma banda de água é inserida no capilar, devidamente preenchido com eletrólito de corrida micelar (solução ácida), antes da introdução da amostra. Um grande volume da amostra é injetado hidrodinamicamente (Figura 4a).¹³ A amostra é preparada em matriz de baixa condutividade micelar, ou seja, o tensoativo é adicionado à amostra em uma concentração levemente superior ao valor da sua concentração crítica micelar (CMC) para aumentar a solubilidade dos analitos. A injeção de uma banda de água garante um elevado campo elétrico quando comparado com a zona da amostra. Quando a tensão, polaridade negativa, é aplicada forma-se uma região de alto campo elétrico na banda de água que é maior que no restante da solução. Os analitos dissolvidos nas micelas entram na zona da água e são acelerados; quando eles ultrapassam a fronteira entre a zona de água e o eletrólito de corrida, experimentam um campo elétrico menor e são desacelerados pré-concentrando-se em uma banda fina na fronteira entre estas duas regiões, F1 (Figura 4b). O EOF, apesar de reduzido, empurra a amostra lentamente para fora do capilar, em direção ao reservatório catódico, com isso o capilar é preenchido pelo eletrólito proveniente do reservatório aniônico (Figura 4c). As bandas focalizadas são separadas segundo os princípios convencionais da MEKC (Figura 4d).

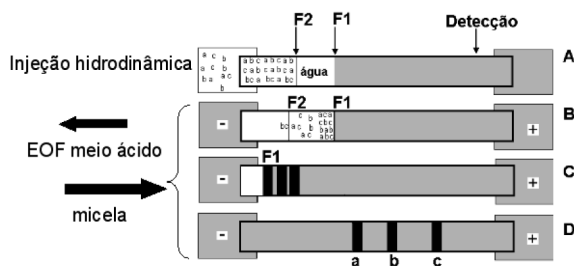


Figura 4. Modelo de stacking em modo migração reversa das micelas com banda de água (SMMRA): a. injeção de grande volume de água seguida pela injeção da amostra preparada em meio micelar; b. aplicação da tensão e pré-concentração na fronteira F1; c. separação das zonas pré-concentradas antes da remoção total da zona de baixa condutividade; d. análise das zonas separadas

Os pontos críticos da SMMRA são o comprimento das zonas da amostra e da água bem como a condutividade da amostra. Longos tempos de injeção de água e ou da amostra não são recomendadas desde que o tempo para remover a amostra e/ou a água é muito longo, resultando em longos tempos de migração. Isto ocorre porque a protonação dos grupos silanois em baixos valores de pH produz um EOF reduzido. Desde que a amostra é preparada em meio micelar, a solubilidade de compostos hidrofóbicos pode aumentar de forma significativa, o que pode ser uma vantagem para a análise de solutos com baixa solubilidade em água.

Stacking com modo de injeção eletrocinética

Stacking em modo de campo amplificado (SMCA)

As etapas e os mecanismos envolvidos na SMCA¹⁴ estão descritos na Figura 5. Inicialmente, o capilar é preenchido com um eletrólito

micelar (solução neutra). Após a injeção de um grande volume de água (Figura 5a), a amostra, preparada em meio micelar de baixa condutividade, é introduzida no capilar pelo modo eletrocinético utilizando polaridade negativa. Com a aplicação da tensão ocorre a formação de um alto campo elétrico na região da zona de água. Os analitos dissolvidos nas micelas entram na zona da água e são acelerados; quando eles ultrapassam a fronteira entre a zona de água e o eletrólito de corrida, experimentam um campo elétrico menor e são desacelerados pré-concentrando-se em uma banda fina na fronteira entre estas duas regiões, F1 (Figura 5b). O EOF empurra a amostra em direção ao reservatório catódico, com isso o capilar é preenchido pelo eletrólito proveniente do reservatório aniônico (Figura 5c). O preenchimento do capilar é monitorado pelo valor de corrente. Quando a corrente atingir 97-99% do valor inicial, o que ocorre quando toda a banda de água é removida do capilar, a polaridade é invertida (Figura 5c). Com a polaridade positiva a separação das zonas ocorre normalmente (Figura 5d).

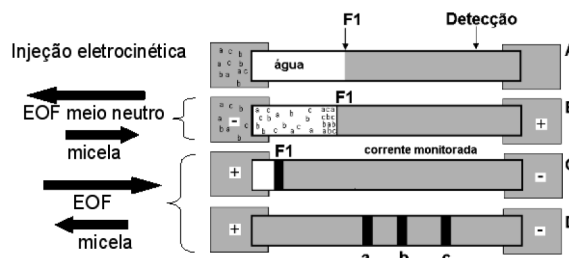


Figura 5. Modelo de stacking em modo de campo amplificado (SMCA). Legenda igual à da Figura 4 para a, b e d. Em c, a polaridade deve ser invertida quando o valor da corrente atingir de 97 a 99% do valor inicial

A SMCA apresentou resultados satisfatórios de pré-concentração somente quando tensoativos de alta massa molar foram utilizados como fase pseudo-estacionária. Este comportamento foi relacionado ao fato que tensoativos de baixa massa molar como, por exemplo, SDS, quando entram na zona da água sofrem dispersão formando monômeros devido a grande diluição que sofrem nesta zona.

Stacking em modo de campo amplificado com migração reversa das micelas (SMCA-MRM)

No SMCA-MRM,¹⁵ o capilar é preenchido com um eletrólito micelar (solução ácida). Uma banda de água é introduzida no capilar antes da injeção da amostra (Figura 6a). A amostra, preparada em uma solução ácida micelar de baixa condutividade, é introduzida no capilar utilizando o modo eletrocinético, polaridade negativa. Ao entrar em contato com a banda de água, as micelas e analitos são acelerados; ao atingir a fronteira entre a zona de água e o eletrólito de corrida eles experimentam um campo elétrico menor e são desacelerados, pré-concentrando-se em uma banda fina na fronteira entre estas duas regiões, F1 (Figura 6b). Apesar de reduzido, o EOF empurra a banda de água lentamente para fora do capilar, em direção ao reservatório catódico, com isso o capilar é preenchido pelo eletrólito proveniente do reservatório aniônico (Figura 6c). O tempo de injeção da amostra é determinado monitorando-se o valor da corrente. Quando a corrente atingir de 97 a 99% do valor inicial, a tensão é desligada. O reservatório contendo a amostra é substituído por um reservatório de eletrólito e a tensão é aplicada utilizando polaridade negativa (Figura 6c). A Figura 6d apresenta a separação das bandas focalizadas por MEKC.

A maior vantagem da SMCA-MRM é que a estratégia não envolve a inversão da polaridade, principal fator responsável pela falta de repetibilidade. A principal limitação é que a eficiência da pré-concentração é mais significativa para compostos moderadamente a altamente hidrofóbicos.

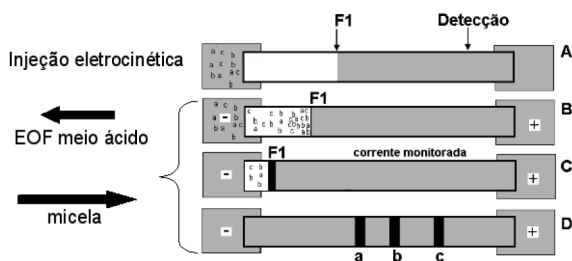


Figura 6. Modelo de stacking em modo de campo amplificado com migração reversa das micelas. (SMCA-MRM). Legenda igual à da Figura 4 exceto c, onde a polaridade deve ser invertida quando o valor da corrente atingir de 97 a 99% do valor inicial, a tensão é desligada e o reservatório contendo a amostra é substituído por um reservatório contendo eletrólito e a tensão é aplicada utilizando polaridade negativa

Stacking mediado por adição de sal (SMAS)

Análogo ao *stacking* mediado por força iônica para solutos iônicos¹⁶ a estratégia de *stacking*, proposto por Palmer e Landers,¹⁷ também envolve manipulação da força iônica, mas para *stacking* das micelas e não do soluto neutro diretamente. Tendo em vista que as moléculas neutras não possuem mobilidade eletroforética, o método proposto utiliza a baixa força iônica do eletrólito de corrida contendo micelas para promover o *stacking*. O *stacking* das micelas é induzido por um simples aumento da condutividade da amostra, obtido através da adição de uma quantidade apropriada de sal (Figura 7a). Quando a tensão é aplicada em uma amostra que possui uma condutividade maior do que o eletrólito de corrida, ocorre o desenvolvimento de um baixo campo elétrico na zona da amostra e um alto campo elétrico na zona do eletrólito (Figura 7b). Assim, as micelas carregadas negativamente, que migram rapidamente em direção ao pólo positivo, são desaceleradas na fronteira entre a amostra e o eletrólito (F1), promovendo um *stacking* das micelas nesta interface (Figura 7c). À medida que as micelas penetram na zona da amostra, estas capturam os analitos neutros. O EOF é responsável pelo transporte das bandas pré-concentradas ao detector (Figura 7d).

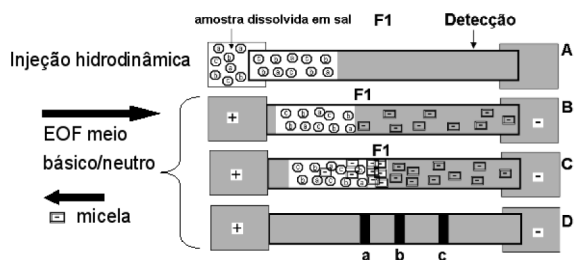


Figura 7. Modelo de stacking mediado por adição de sal (SMAS): a. injeção da amostra preparada em meio de alta condutividade; b. aplicação da tensão, movimento das micelas em direção ao eletrodo de carga oposta; c. pré-concentração na interface F1; d. separação das bandas pré-concentradas

Esta estratégia apresenta alta eficiência de pré-concentração principalmente para matrizes biológicas que, frequentemente, possuem alto teor de sal.¹⁸

AUMENTO DA SENSIBILIDADE DE ANALITOS NEUTROS: ESTRATÉGIAS DE SWEEPING EM MEKC

O *sweeping* (varredura), introduzido por Quirino e Terabe,¹⁹ é a captura e acumulação das moléculas do analito por uma fase pseudo-estacionária, que penetra na zona da amostra durante a aplicação da

tensão. O método proposto baseia-se na injeção de um grande volume da amostra (Figura 1S, material suplementar), onde a amostra e o eletrólito de corrida devem possuir a mesma condutividade, sendo que a amostra não deve conter micelas.

O uso de um eletrólito de corrida com um valor de pH muito baixo promove a eliminação do EOF. Com a aplicação da tensão, polaridade negativa, na extremidade do capilar onde a injeção da amostra é feita, as micelas aniônicas provenientes do reservatório catódico, que migram em direção ao eletrodo de carga oposta, entram na zona da amostra arrastando os analitos neutros e concentrando-os em uma banda fina. A captura e concentração dos analitos ocorrem devido à partição ou interação dos analitos com as micelas. A separação das zonas é baseada nos princípios da MEKC.

O *sweeping* também pode ser realizado na presença de EOF. O mecanismo proposto é o mesmo que para o *sweeping* na ausência de EOF, exceto pela aplicação da tensão com polaridade positiva na extremidade do capilar onde a injeção da amostra é realizada. Um grande volume de amostra, preparado em uma matriz com mesma condutividade que o eletrólito de corrida, mas isenta de micelas, é introduzido no capilar (Figura 2S, material suplementar). Com a aplicação da tensão, polaridade positiva, no ponto de injeção, as micelas aniônicas contidas no eletrólito de corrida migram em direção ao eletrodo de carga oposta fazendo uma varredura do analito, de forma que as moléculas neutras presentes na região da amostra sejam concentradas em uma banda fina. Como EOF é maior do que a migração eletroforética das micelas, os analitos dissolvidos nas micelas se movem em direção ao detector. Finalmente, a separação das bandas pode ser observada na Figura 2S.

O *sweeping* apresenta como vantagens: alta versatilidade (aplicável tanto para analitos neutros quanto para os iônicos), pré-concentração efetiva (aumento de sinal analítico pode ser superior a 1000 vezes). Como desvantagem destaca-se a natureza do soluto. A adição de solventes orgânicos é recomendada para analitos hidrofóbicos, entretanto o fator de pré-concentração pode ser reduzido em função da quantidade de solvente adicionado ao sistema. O fator de retenção (k) na zona da amostra, o qual é o parâmetro mais importante no *sweeping*, diminui com o aumento da concentração do solvente orgânico.

A Tabela 1 apresenta o resumo das condições a serem utilizadas para as estratégias de aumento de sensibilidade em MEKC.

CONCLUSÕES

Os sistemas de pré-concentração utilizando o *stacking* e *sweeping* são frequentemente de simples execução e têm um grande campo de aplicações. A maior parte das análises utiliza água como solvente e injeção de grandes volumes de amostras ou métodos de amplificação. Ganhos de 40 a 360 vezes no sinal analítico podem ser obtidos dependendo da estratégia utilizada e do tipo de amostra analisada. O uso de estratégias *on line* de aumento de sensibilidade tornou a eletroforese capilar uma técnica analítica particularmente atrativa para a aplicação em diferentes áreas que incluem análises farmacêuticas,²⁵⁻²⁷ toxicológicas²⁸ e ambientais.²⁹⁻³¹

MATERIAL SUPLEMENTAR

Encontra-se disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo .PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Tabela 1. Resumo das condições utilizadas para as estratégias de aumento de sensibilidade utilizadas em MEKC

Modo	Preparação da amostra	banda de água ^a	pH eletrólito	Polaridade	analitos
Injeção hidrodinâmica					
SMN	Baixa condutividade (meio não micelar)	não	Básico ou neutro	+	Triazinas, ²⁰ fenóis ²¹
SMPIE	Baixa condutividade (meio não micelar)	não	Básico ou neutro	- → + ^b	Triazinas, ²⁰ dioxinas ²²
SMMR	Baixa condutividade (meio não micelar)	não	Ácido	-	Esteroides ²³
SMMRA	Baixa condutividade (meio micelar)	sim	Ácido	-	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), esteroides ¹³
Injeção eletrocínética					
SMCA	Baixa condutividade (meio micelar)	sim	Básico ou neutro	- → + ^c	Estrogênios ¹⁴
SMCA-MRM	Baixa condutividade (meio micelar)	sim	Ácido	-	Fenóis, esteroides ¹⁵
Outros modos					
SMAS	Alta condutividade (meio não micelar)	não	Básico ou neutro	+	Corticoides ¹⁶
<i>Sweeping</i>	Condutividade igual ao eletrólito (meio não micelar)	não	Básico, neutro ou ácido	+ ou - ^d	Aldeídos, ²⁴ alquil fenil cetonas, esteroides ¹⁹

^a A banda de água é introduzida no capilar após o condicionamento do capilar com o eletrólito de corrida. ^b A polaridade é invertida quando a corrente atingir 97-99% do valor inicial. ^c Na injeção a polaridade é negativa, tensão de separação aplicada é positiva. ^d A tensão de separação aplicada depende do pH do eletrólito.

REFERÊNCIAS

1. Terabe, S.; *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman: Redwood City, 1986.
2. Posanzini, M.; Di Palo, V.; Petricca, M.; Fratarcangeli, R.; Brocco D.; *Atmos. Environ.* **1996**, *22*, 3757.
3. Tsai, I. L.; Sun, S. W.; Liao, H. W.; Lin, S. Ch.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 8665.
4. Jong, Y. J.; Ho, Y. H.; Ko, W. K.; Wu, S. M.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 7570.
5. Oztekin, N.; Aydin, H. M.; Erim, F.; *Chromatographia* **2009**, *70*, 987.
6. Morales, S.; Cela, R.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *846*, 401.
7. Moraes, M. L. L.; Moraes, L. S.; Pereira, E. A.; Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1041.
8. Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 493.
9. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawak, M.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111.
10. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *781*, 119.
11. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *791*, 255.
12. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 149.
13. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., B* **1998**, *714*, 29.
14. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *798*, 251.
15. Quirino, J. P.; Terabe, S.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 893.
16. Shihabi, Z. K.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *902*, 107.
17. Palmer, J.; Landers, J. P.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1679.
18. Palmer, J.; Landers, J. P.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1941.
19. Qurino, J. P.; Terabe, S.; *Science* **1998**, *282*, 465.
20. Turiel, E.; Fernandez, P.; Perez-Conde, C.; Camara, C.; *Analyst* **2000**, *125*, 1725.
21. Monton, M. R. N.; Quirino, J. P.; Otsuka, K.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *939*, 99.
22. Liu, Z.; Sam, P.; Sirimanne, S. R.; Mcclure, P. C.; Grainger, D. G.; Patterson, Jr.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *673*, 125.
23. Kim, J. B.; Otsuka, K.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *912*, 343.
24. Pereira, E. A.; Cardoso, A. A.; Tavares, M. F. M.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 700.
25. Macia, A.; Borrull, F.; Aguilar, C.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 428.
26. Michalska, K.; Pajchel, G.; Tyski, S.; *J. Pharm. Biom. Anal.* **2008**, *48*, 321.
27. Michalska, K.; Pajchel, G.; Tyski, S.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 2934.
28. Musijowski, J.; Pobozy, E.; Trojanowicz, M.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1104*, 337.
29. Juan-Garcia, A.; Font, G.; Pico, Y.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 104.
30. Molina-Mayo, C.; Hernandez-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 348.
31. Macia, A.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1117*, 234.