

2.4 Modos de separación en CE

Una de las características más destacables de la electroforesis capilar es su gran versatilidad para afrontar una gran variedad de análisis. Esta versatilidad se fundamenta en gran parte en los diversos modos de operación que la técnica ofrece. Estos modos son en su mayoría fácilmente accesibles cambiando la composición del BGE o algunas condiciones de separación. Los modos de operación más comunes de la técnica y su criterio de separación se muestran en la figura 2.10 donde se han ordenado según su aplicación en química analítica.

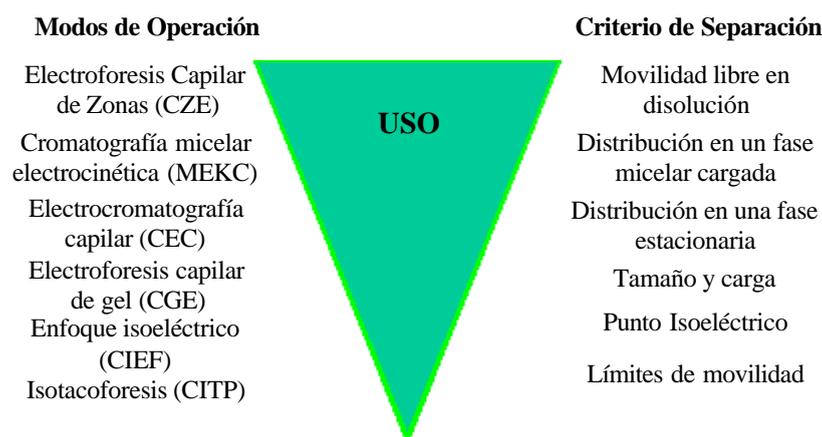


Figura 2.11. Modos de operación en CE

A continuación, se explicará en que consiste cada modo de operación, prestando un interés especial a los dos modos de separación utilizados en esta tesis doctoral (CZE y MEKC). El fundamento de CGE, CIEF y CITP será explicado brevemente ya que son modos usados básicamente en bioquímica para la separación de macromoléculas.

2.4.1 Electroforesis capilar de zonas (CZE)

CZE es el modo más usado de la técnica debido a su versatilidad y sencillez de aplicación. Desde el punto de vista teórico, los fundamentos de la separación por CZE ya se han explicado en el apartado 2.2. Como se muestra en la figura 2.4, la separación ocurre porque los analitos migran en zonas discretas a diferente velocidad. La separación de compuestos aniónicos y catiónicos es posible gracias al EOF. Si la magnitud del EOF es suficiente, los compuestos aniónicos son arrastrados hacia al detector colocado en el cátodo (polaridad directa). En el caso contrario, por ejemplo aniones de dimensiones reducidas y muy cargados es necesario cambiar la polaridad del *inlet* y del *outlet* (trabajar con voltajes “negativos”) de tal manera que estos aniones son detectados en el ánodo (polaridad inversa). Los analitos neutros no migran y por lo

tanto coeluyen con el EOF. Una separación en CZE se lleva a cabo simplemente rellenando el capilar con el BGE adecuado.

Tabla 2.2 Electrolitos de fondo habituales en CZE.

BGE	pKa
Fosfato	2.12 (pKa ₁)
Citrato	3.06 (pKa ₁)
Formiato	3.75
Citrato	4.74 (pKa ₁)
Acetato	4.75
Citrato	5.40 (pKa ₃)
MES*	6.15
Fosfato	7.21 (pKa ₂)
TRIS	8.30
Borato	9.24
CAPS**	10.40
Fosfato	12.32 (pKa ₃)

* ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico

** ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico

Como ya se ha comentado antes, el pH del BGE es la clave de la separación ya que determina el grado de ionización y por lo tanto la movilidad relativa de los diferentes analitos. En consecuencia, el BGE elegido debe poseer una buena capacidad tamponante al pH de trabajo. Otras características interesantes que debe tener son una baja absortividad a la longitud de onda de detección y una baja movilidad electroforética para minimizar el paso de corriente. La tabla 2.2 muestra algunos de los BGE más habituales en CZE.

La magnitud del EOF es otro parámetro clave en CZE y debe ser controlado por el usuario. Por ejemplo, a un pH elevado el EOF puede ser demasiado rápido resultando en la elución de los analitos antes de ser separados mientras que a pHs bajos podemos alargar innecesariamente el tiempo de análisis. Básicamente, el control del EOF requiere modificar la carga de la pared del capilar o la viscosidad del BGE. El pH del BGE es el modo más eficaz de variar la velocidad del EOF pero hay que tener en cuenta que también afecta a la carga del analito y por tanto a su movilidad. Esta velocidad puede reducirse disminuyendo el voltaje de trabajo tal y como predice la ecuación 2.1. No obstante, esta opción presenta desventajas relacionadas con el aumento del tiempo de análisis o la pérdida de eficacia en la separación. El EOF también se ve afectado por cambios en la concentración, y por tanto en la fuerza iónica, del BGE. Aumentar la concentración del BGE disminuye el potencial zeta y reduce el EOF (ecuación 2.4). El

intervalo de concentraciones del BGE habituales se sitúa entre 10 y 50 mM aunque para algunos BGEs poco conductores se pueden utilizar concentraciones superiores a 100 mM.

Tabla 2.3. Métodos para controlar el flujo electroosmótico.

VARIABLE	RESULTADO	OBSERVACIONES
Campo eléctrico (E)	Cambios proporcionales en el EOF	Al aumentar E aumenta también el efecto Joule.
pH del tampón	Si el pH aumenta el EOF crece	Método más adecuado para variar el EOF.
Fuerza iónica o Concentración del tampón	Un aumento de cualquiera de los dos disminuye el potencial zeta	Puede provocar aumento del efecto Joule. Fuerza iónicas bajas pueden provocar adsorción de la muestra.
Temperatura	Al aumentarla disminuye la viscosidad (2-3 %/°C) y aumenta EOF	Facilidad de control debido a la automatización y termostatación.
Adición de modificadores orgánicos	Modifican el potencial zeta y la viscosidad	Generalmente disminuyen el EOF y pueden alterar la selectividad

Finalmente, el EOF puede ser disminuido o invertido añadiendo aditivos del BGE que se adsorban sobre la pared del capilar (por ejemplo, tensioactivos catiónicos) que bloquean los grupos silanol, o incluso suprimido utilizando algún capilar modificado químicamente (covalent coatings) donde los grupos silanol han sido derivatizados. El efecto de estas variables y de otras no comentadas sobre el EOF se resume en la tabla 2.3.

El diagrama de flujo de la figura 2.11 esquematiza como se desarrolla un método para la separación de solutos mediante CZE. Como puede observarse, es necesario conocer las propiedades ácido-base de los analitos, cuando esto no es posible, es aconsejable realizar dos experiencias a pHs ácido y básico, y comprobar la posición de los analitos respecto del EOF. Un analito con algún grupo básico, estará protonado a pHs bajos y migrará antes del EOF mientras que algún analito con algún grupo ácido se comportará como una anión y migrará después del EOF en la experiencia a pHs básico (siempre suponiendo polaridad directa). En caso de conocer el pKa del analito, se puede predecir su comportamiento electroforético y proponer el BGE más adecuado.

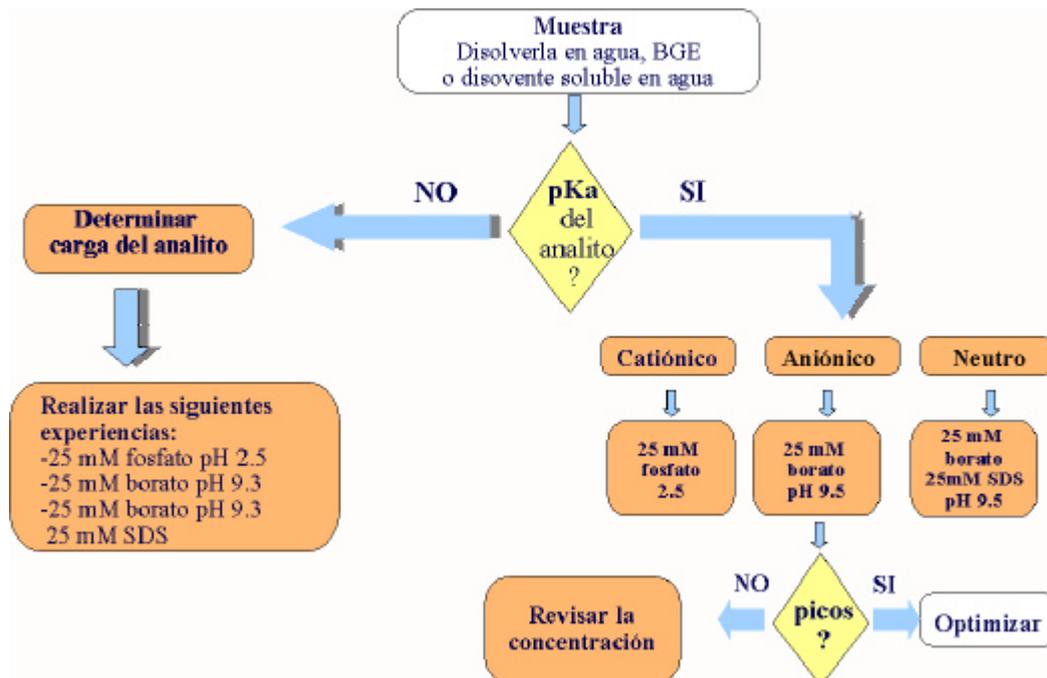


Figura 2.12. Desarrollo de un método de análisis mediante CZE

Una vez que se han hallado unas condiciones de separación donde los analitos migren y puedan ser detectados se optimiza el método en cuanto a resolución entre picos, tiempo de análisis etc. La optimización del método implica en primer término obtener una resolución suficiente de todos los analitos y para ello el pH del BGE es el parámetro clave. Modificándolo (siempre que el analito continúe ionizado) obtenemos diferentes relaciones carga/radio y por tanto diferentes movilidades. Para separaciones de mezclas complejas, puede ser necesario el uso de aditivos en el BGE con un efecto muy diverso. Por ejemplo, es habitual el uso de un solvente orgánico para cambiar la viscosidad del medio, de surfactantes catiónicos para reducir la absorción de analitos catiónicos o de ciclodextrinas que pueden incluir en diferente extensión los analitos de la mezcla y ayudar así en su separación. Una vez que la resolución de los analitos es suficiente, se intenta disminuir el tiempo de análisis mediante el aumento del voltaje o la disminución de la longitud del capilar aunque estos parámetros también pueden afectar a la resolución.

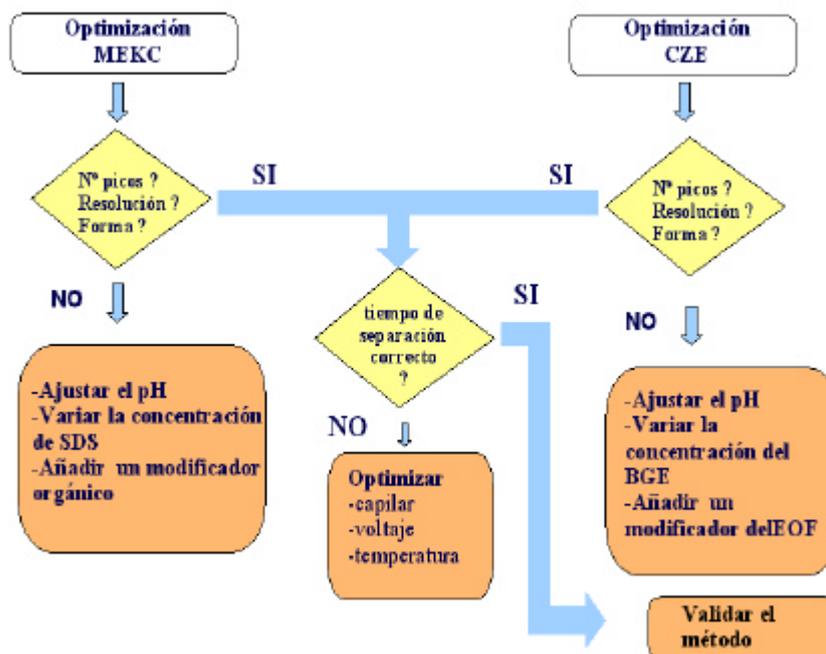


Figura 2.13. Optimización de un método de análisis mediante CZE o MEKC

No obstante puede ocurrir que la mezcla contenga uno o más analitos no ionizables en el intervalo de pH habitual en CE. En este caso, tanto en las experiencias iniciales realizadas a pH ácido o básico, obtendremos picos que no migrarán y aparecerán sin resolver junto al EOF. En este caso, la separación completa de la mezcla por CZE no es posible y es necesario el uso del modo micelar (MEKC).

2.4.2 Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

La cromatografía electrocinética micelar (MEKC) es una técnica híbrida entre la electroforesis capilar y la cromatografía de líquidos. Desde su introducción en 1984 por Terabe⁵ es uno de los modos de operación más usados en CE ya que permite separar tanto analitos neutros como cargados. La separación de compuestos neutros por MEKC se basa en la adición al BGE de un tensioactivo cargado a una concentración suficiente para formar micelas (concentración micelar crítica). Estos analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa del BGE en diferente extensión dando lugar a su separación. Las moléculas neutras interactúan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad y adquieren de esta manera movilidad electroforéticas (figura 2.13).

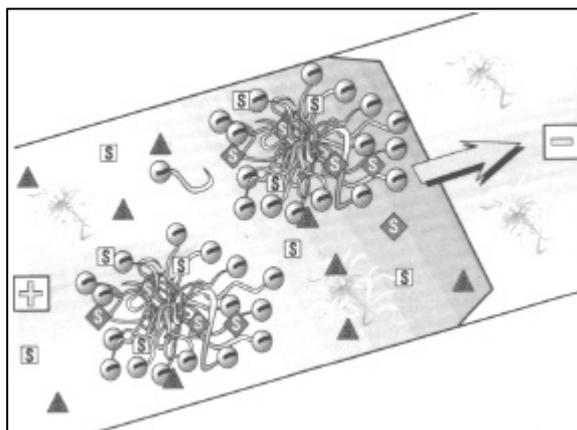


Figura 2.14. Esquema de separación MEKC.

El mecanismo de separación en MEKC es esencialmente cromatográfico ya que podemos entender la fase micelar como una fase pseudoestacionaria y definir un factor de capacidad cromatográfico k' .

$$K' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)} \quad (2.10)$$

Donde t_r es el tiempo de retención del soluto, t_0 el tiempo de retención de un soluto que se mueve con el EOF y t_m es el tiempo de retención de la micela. Esta ecuación es una modificación de la definición clásica de factor capacidad que incluye el movimiento de la micela. Obsérvese, como en el caso de que la micela fuera realmente estacionaria, t_m sería infinito y el factor de capacidad se reduciría a su expresión convencional.

Los compuestos neutros separados por MEKC migran en un intervalo de tiempo conocido como ventana de elución y comprendido entre t_0 y t_m . Los compuestos hidrofílicos que no interaccionan con la micela eluyen junto al EOF mientras que aquellos compuestos que están totalmente solubilizados en la fase micelar eluyen con la micela. Desde el punto de vista de la resolución, interesa una ventana de elución grande que puede ser conseguida usando condiciones de EOF moderado y micelas de gran movilidad.

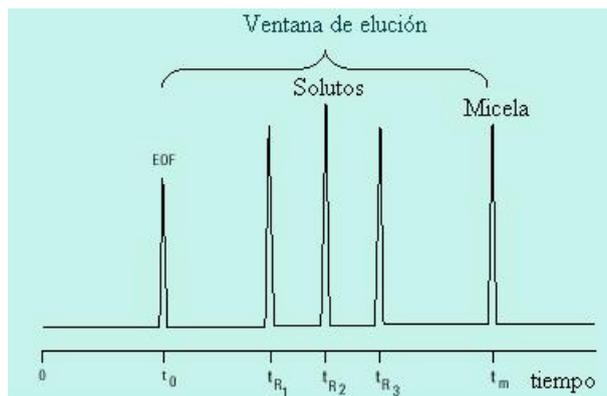


Figura 2.15. Ventana de elución para solutos neutros usando un tensioactivo aniónico

La selectividad de la separación en MEKC puede ser manipulada con facilidad usando diferentes tensioactivos⁶. Estos cambios en selectividad son comparables a los que obtendríamos si modificásemos la fase estacionaria en cromatografía líquida. Los surfactantes más habituales en MEKC son los aniónicos en especial el dodecilsulfato sódico (SDS) aunque otros tensioactivos catiónicos, neutros (en combinación con cargados) o zwitterionicos han sido utilizados. Algunos de estos tensioactivos más comunes se muestran en la tabla 4.

Tabla 2.4. Tensioactivos utilizados en MEKC

	Tensioactivo	CMC (mM)¹	Número de agregación
Aniónicos	SDS	8.2	62
	Ácido cólico	14	2-4
	Ácido deoxicólico	5	4-10
	Ácido taurocólico	10-15	4
Catiónicos	CTAB ²	1.3	78
No-Iónicos	Triton X-100	0.24	140
Zwitterionic	CHAPS ³	8	10

¹ concentración micelar crítica

² bromuro de cetiltrimetilamonio.

³ 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio] propanosulfonato

El desarrollo y optimización de un método por MEKC ha sido esquematizado en las figuras 2.11 y 2.12. Si se sospecha de la presencia de algún analito neutro en la mezcla, se puede estudiar su comportamiento en un BGE en presencia de SDS. En caso de interactuar con la micela, el analito neutro se desplaza respecto del EOF hacia tiempos superiores. En este caso pasaríamos a optimizar la separación de la mezcla siendo la concentración de SDS el factor principal a modificar. No obstante, otros factores como el pH (sobre todo si se trata de una mezcla de solutos neutros y cargados) puede ser de gran utilidad. Al igual que en cromatografía, la adición de un solvente orgánico al medio de separación modifica las constantes de distribución en la fase micelar y puede ayudarnos a mejorar la resolución. El metanol o el

acetonitrilo en un porcentaje en volumen inferior al 50 % (por encima se rompe la estructura micelar) son los solventes orgánicos más usados.

2.4.3 Electro cromatografía capilar (CEC)

La CEC es un modo de reciente aparición que permite la separación simultanea de solutos neutros y cargados⁷. Este modo de operación consiste en el uso de capilares de sílice fundida rellenos de fases estacionarias convencionales en HPLC. Al igual que en CE, se aplica un campo eléctrico a través del capilar, generándose un flujo de solvente causado por electroósmosis. En general, este EOF conduce el solvente (y, por tanto, los solutos) a través del capilar. En CEC, la separación de los solutos neutros de una muestra se basa en las diferencias en la relación de distribución (partición) entre la fase estacionaria y la fase móvil (BGE con un porcentaje de solvente orgánico). A diferencia de la cromatografía, las eficiencias obtenidas son altas ya que la fase móvil no se mueve por aplicación de presión, por lo que el perfil del flujo generado es plano, aunque no tan perfecto como en un capilar normal. La fase estacionaria puede ser fijada en partículas (normalmente en material de sílice) empaquetadas dentro del capilar o fijada a las paredes del capilar. Los compuestos que poseen carga pueden ser también influenciados por el campo eléctrico aplicado dando lugar a una migración diferencial causada por electroforesis. Por lo tanto CEC es una técnica con un alto poder de resolución ya que el criterio de separación es doble (partición y migración). Además presenta ventajas claras frente al HPLC como es el ahorro del sistema de bombas, gasto de fase móvil y una mayor eficiencia. Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes (comparada frente a CZE o MEKC) básicamente de carácter instrumental como es el aumento del coste del capilar o la necesidad de un sistema de presurización. Este sistema de presurización de los extremos del capilar no lo poseen los equipos de CE de primera generación y es necesario para evitar la formación de burbujas, asegurar un flujo reproducible e impulsar por el interior del capilar las disoluciones usadas en los procesos de pre- y post-acondicionamiento.

2.4.4 Electroforesis capilar en gel (CGE)

En este modo de operación, el capilar se rellena con un gel que actúa como tamiz molecular, ya que la separación está basada en la diferencia en el tamaño de los solutos⁸. Este gel elimina el EOF, con lo cual las moléculas neutras no migran, y evita la adsorción de solutos en la pared del capilar. Se han utilizado como geles polímeros lineales (poliacrilamida, hidroxialquilcelulosa), entrecruzados (poliacrilamida/bis-acrilamida), agarosa, o poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato sódico. La técnica ha sido especialmente

aplicada a la separación de fragmentos de macromoléculas con la misma relación carga/masa y que no podrían ser separadas sin la presencia de un gel.

2.4.5 Enfoque isoelectrico capilar (CIEF).

Es una técnica utilizada para la separación de péptidos, proteínas, aminoácidos y otras sustancias anfotéricas, en base a sus puntos isoelectricos (pI)⁹. Una solución de anfólitos que generarán un gradiente de pH (que vendrá dado por sus pI), y las muestras, son introducidas en el capilar. El extremo anódico del capilar está sumergido en una solución ácida, mientras que el extremo catódico lo está en una solución básica. Al aplicar un campo eléctrico los analitos se mueven hasta encontrar un pH en el que son neutros, y entonces cesa su migración (proceso de focalización). Una vez se ha alcanzado un estado estacionario, los analitos pueden ser extraídos del capilar de varias maneras, entre ellas, mediante la aplicación de una diferencia de presión, de forma que las diferentes bandas pasen ante el detector a una velocidad constante. En CIEF es necesario eliminar el EOF por medio del uso de un capilar recubierto internamente; ya que si no los analitos pudieran ser arrastrados antes de ser focalizados. Los capilares recubiertos presentan además la ventaja de reducir la adsorción de las proteínas a la pared del capilar.

2.4.6 Isotacoforesis capilar (CITP)

En isotacoforesis capilar se trabaja con un sistema discontinuo de tampón¹⁰. En este sistema los componentes de la muestra viajan entre un ión delantero de mayor movilidad electroforética que la muestra, y un ión posterior de menor movilidad. Tomando como ejemplo el análisis de aniones, cuando el campo eléctrico es aplicado, los aniones empiezan a migrar hacia el ánodo, de forma que el anión delantero migra con la mayor velocidad, seguido por el anión con la siguiente mayor movilidad, y así sucesivamente. Una vez alcanzado el estado estacionario, los aniones viajan en zonas discretas, pero a una misma velocidad, la determinada por el ión delantero. Para ello el campo eléctrico se autoajusta en cada zona para mantener una velocidad constante, de manera que en la zona de mayor movilidad el campo eléctrico es menor, y a la inversa. Si un ión difunde dentro de una zona vecina su velocidad cambia y vuelve de nuevo a la zona que le corresponde. El isotacoferograma obtenido no presenta picos, sino una serie de plataformas correspondientes a cada analito y la cuantificación se realiza a partir de la longitud de esa zona. El principio de la isotacoforesis ha sido usado como técnica de preconcentración en MEKC o CZE (fenómenos de *stacking*). De esta manera, un 30-50% del capilar puede ser rellenado con muestra manteniendo una buena eficiencia de separación y consiguiéndose mejorar los límites de detección en un factor de 1000 o incluso superior.

2.5 Aplicaciones de la electroforesis capilar

Antes de considerar las aplicaciones de la electroforesis capilar en la última década vamos discutir la utilidad de la CE como técnica de análisis. Son varias las razones para elegir la CE entre las diversas técnicas espectroscópicas y de separación (tabla 2.5).

Tabla 2.5. Ventajas y limitaciones de la electroforesis capilar como técnica de análisis

(A) Razones para el uso de la CE

- Alta eficiencia en la separación
- Facilidad de automatización
- Simplicidad en el desarrollo del método
- Versatilidad de modos de operación
- Cortos tiempo de análisis
- Necesidad de pequeños volúmenes de muestra (nanolitros).
- Generación mínima de residuos.

(B) Limitaciones para el uso de la CE, consideración de técnicas de separación alternativas

- Compuestos térmicamente estables y volátiles → considerar GC.
 - Analitos a concentraciones inferiores a 1 mg/l → considerar detectores de CE de alta sensibilidad o LC.
 - Analitos insolubles en medio acuoso → considerar CE en medio no acuoso o LC.
 - Necesidad del uso del detector de masas (identificación de picos, análisis estructural) → considerar LC-MS.
 - Uso en modo preparativo → considerar LC
-

Por ejemplo, si tenemos en cuenta las necesidades de la industria farmacéutica y sus normativas de análisis, la CE es una técnica de análisis muy ventajosa debido a su alta selectividad y bajo coste comparada con la cromatografía líquida. En este sentido, son muchas las aplicaciones en este campo; análisis de preparados farmacéuticos¹¹, estudios de estabilidad¹², impurezas de principios activos¹³, separaciones quirales¹⁴ o análisis de metabolitos en fluidos biológicos¹⁵. El mecanismo de separación en CE (en especial en CZE) y en HPLC son distintos; por tanto proporcionan datos no correlacionados y hablamos entonces de técnicas de separación ortogonales. Estos es de especial interés para llevar a cabo validaciones cruzadas¹⁶ o aplicar la CE como complemento de la cromatografía líquida en separaciones complicadas mediante esta última técnica. El número de aplicaciones en el campo biomédico es también elevado e incluye en aplicaciones

clínicas y forenses¹⁷, análisis de extractos naturales¹⁸ o toxinas¹⁹. No obstante, en este campo destaca con claridad el análisis de macromoléculas²⁰. El análisis de proteínas mediante CE es de gran interés ya que los resultados son comparables a los obtenidas por los métodos clásicos (como la electroforesis en gel) y presenta las ventajas de la automatización y buenos resultados cuantitativos. El uso de los modos de operación como CIEF, CGE o CE-MS ha permitido obtener mapas peptídicos o elucidar la estructura secundaria de algunas proteínas. Otro campo en expansión es el análisis de DNA, normalmente por CGE y fruto de ello son las diversas revisiones bibliográficas recientemente aparecidas²¹. Por otro lado CE ha sido aplicada con éxito al análisis de alimentos; por ejemplo el análisis de cationes inorgánicas en zumos y vinos²² (mediante detección UV-Vis indirecta) o el análisis de carbohidratos (por detección directa²³ e indirecta²⁴). Varias son también las aplicaciones en el campo medioambiental, aunque los bajos límites de detección requeridos en este tipo de análisis hace normalmente necesario el uso de un método de preconcentración previo a la separación. La extracción en fase sólida²⁵ o las técnicas de *stacking*²⁶ han sido empleadas en trabajos donde se aplica la CE a la determinación de herbicidas y pesticidas. En este campo destaca el primer método de electroforesis capilar aprobado por la *American Society for Testing and Materials* (ASTM) para la determinación de aniones inorgánicos en matrices acuosas mediante detección UV-Vis indirecta²⁷.

La electroforesis capilar, es por tanto una técnica muy versátil, que complementa y amplía las posibilidades de otras técnicas de separación como la cromatografía de líquidos, de gases o la iónica. Sin embargo, presenta sus limitaciones (tabla 2.5) que hay que tener en cuenta a la hora de elegir entre una técnica de separación u otra. Por ejemplo, la cromatografía de gases es una técnica muy establecida y con gran poder de resolución de compuestos volátiles termoestables o la cromatografía de líquidos es una técnica más adecuada para la separación de compuestos apolares que son complicados de analizar por CE debido a su limitada solubilidad en medio acuoso. Un razonamiento parecido se puede hacer si pensamos en la hibridación con la espectroscopia de masas. La LC-MS y GC-MS son técnicas muy robustas y establecidas mientras que la interfase CE-MS es de reciente aparición y presenta incompatibilidades con algún modo de separación como MEKC debido a la naturaleza no volátil de los tensioactivos usados.

En este sentido CEC permite separar analitos neutros sin la adición de tensioactivo y por lo tanto se facilita su acoplamiento con el detector de masas. La aparición de nuevas fases estacionarias para CEC, la posibilidad instrumental de usar gradientes de fase móvil y la mejora en el empaquetamiento de las columnas hacen pensar en CEC como una técnica de separación muy prometedora²⁸. Otra vertiente con gran futuro de la técnica es la miniaturización para obtener equipos de electroforesis capilar en chip^{29,30,31} que aumentan el campo de aplicación de la técnica a determinaciones por ejemplo de analitos a nivel celular.

References

- ¹ Le Potier, I., Taverna, M., Fatal, E., Benzaki, J., Chevalier, M., Ferrier, D. *Chromatographia*. 2001, 53, 563-570.
- ² Heiger, D.N. High Performance Capillary Electrophoresis-An introduction. 1992, 2nd Ed., Hewlett-Packard Company, 77-84.
- ³ Agilent Application Note. Peak purity analysis in CE and HPLC using DAD technology. 1993. Publication Number 12-5091-7502E.
- ⁴ Doble, P., Macka, M., Hadad, P. *Trend Anal Chem*. 2000, 19, 10-17.
- ⁵ Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T. *Anal. Chem*. 1985, 57, 834-841.
- ⁶ Nishi, H., Terabe, S. *J. Chromatogr. A*. 1996, 735, 3-27.
- ⁷ Siouffi, A. M., Tomao, V., Pesek, J. *Analisis*. 1999, 27, 151-154
- ⁸ Claeys, R., Groven, C., Gorus, F. K. *Clin Chem*. 2001, 47, 967-970.
- ⁹ Liu, X., Sobic, Z., Krull, S.I. *J. Chromatogr. A*. 1996, 735, 165-190
- ¹⁰ Caslavská, J., Thormann, W. *J Micro Sep*. 2001, 13, 69-83.
- ¹¹ Altria, K. D., Filbey, S. D. *J. Liq. Chromatogr*. 1993, 16, 2281-2292
- ¹² Altria, K. D., Elgey, J., Lockwood, P., Moore, S. *Chromatographia*. 1996, 42, 332-342.
- ¹³ Altria, K. D. *J. Chromatogr A*. 1996, 735, 43-56.
- ¹⁴ Verleysen, K., Sandra, P. *Electrophoresis*. 1998, 19, 2798-2833.
- ¹⁵ Szökő, É. *Electrophoresis*. 1997, 18, 74-81.
- ¹⁶ Fabre, H., Altria, K.D. *LC· GC Europe*. 2001, 5, 302-310.
- ¹⁷ Landers, J.P. *Electrophoresis*. 1997, 18, 1709-1906.
- ¹⁸ Morin, P., Dreux, M. *J. Liq. Chromatogr*. 1993, 16, 3735-3755.
- ¹⁹ Isaac, H.J. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2438-2452.
- ²⁰ Deyl, Z., Tagliaro, F., Mikšik, I. *J. Chromatogr B*. 1994, 656, 3-27.
- ²¹ Righetti, P.G., Gelfi, C. *Electrophoresis*. 1997, 18, 1709-1714.
- ²² Jones, W. R., Dai, H. J., Heisz, O., Warren, N. *LaborPraxis*. 1997, 21, 49-50.
- ²³ Paulus, A., Klockow, A. *J. Chromatogr A*. 1996, 720, 353-376.
- ²⁴ Soga, T., Ross, G.A. *J. Chromatogr A*. 1999, 834, 65-71.
- ²⁵ Chicharro, M., Zapardiel, A., Bermejo, E., Perez, J. A., Moreno, M. *J Liq Chrom & R T*. 2001, 24, 461-478.
- ²⁶ Quirino, J. P., Terabe, S., Otsuka, K., Vincent, J. B. Vigh, G. *J. Chromatogr. A*. 1999, 838, 3-10.
- ²⁷ Agilent Application Note. ASTM approved method for water analysis by capillary electrophoresis. 2000, Publication Number 5968-8660E.
- ²⁸ Colon, L.A., Reynolds, K.J., Alicea-Maldonado, R., Fermier, A.M. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2162-2174.
- ²⁹ Wachs, T., Henion, J. *Anal Chem*. 2001, 73, 632-638.
- ³⁰ Steiner, F., Scherer, B. *J. Chromatogr. A*. 2000, 887, 55-83.
- ³¹ Wang, J., Chatrathi, M.P., Mulchandani, A., Chen, W. *Anal Chem*. 2001, 73, 1804-1808.