

# Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME)



**Igor Rafael dos Santos Magalhães,  
Pierina Sueli Bonato\***

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
14040-903 – Ribeirão Preto (SP)  
Brasil.  
\*psbonato@fcfrp.usp.br

**Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira,**

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
14040-901 – Ribeirão Preto (SP)  
Brasil.

## Resumo

Este artigo tem o objetivo de discutir os fundamentos da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas. Os avanços recentes na técnica e algumas aplicações em diferentes áreas também são destacados.

## Abstract

This article aims to discuss the fundamental aspects of hollow fiber-liquid phase microextraction. Recent advances of this technique and some applications in different areas are also highlighted.

## Palavras-chave

Técnicas analíticas, técnicas de preparação de amostras, microextração em fase líquida, LPME.

## Keywords

Analytical techniques, sample preparation techniques, liquid-phase microextraction, LPME.

## 1. Introdução

Apesar do excelente poder analítico das diferentes técnicas de separação como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar (CE), a determinação de compostos presentes em concentrações reduzidas em matrizes complexas geralmente exige uma etapa prévia de preparação das amostras. Por exemplo, na análise de fármacos e

metabólitos em fluidos biológicos (sangue total, plasma, líquido etc.), as proteínas e outros compostos endógenos presentes nestas amostras podem ser adsorvidos no material de recheio da coluna ou na parede do capilar empregado em CE, levando a mudanças nos tempos de retenção/migração e diminuição da eficiência das colunas utilizadas<sup>1</sup>. Por outro lado, os compostos endógenos eluídos da coluna ou capilar podem interferir na determinação dos analitos de interesse.

Dentre as propriedades ideais de uma técnica de preparação de amostras, pode-se destacar a simplicidade, a rapidez, o baixo custo, a seletividade e a alta recuperação do analito de interesse<sup>2</sup>. Atualmente, as técnicas de preparação de amostras mais utilizadas são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE)<sup>3</sup>. Nessas duas técnicas, os procedimentos são geralmente tediosos, caros e requerem grande consumo de solventes orgânicos<sup>4</sup>. Portanto, as tendências recentes em técnicas de preparação de amostras apontam na direção de miniaturização, automação e uso reduzido de solventes orgânicos<sup>5</sup>.

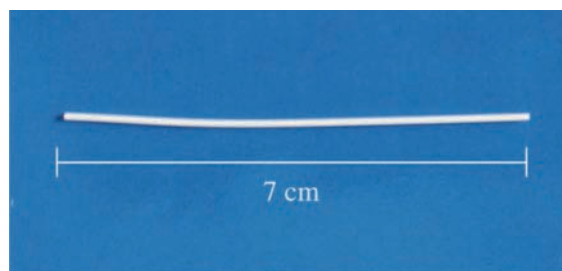
Uma promissora técnica de extração, caracterizada pelo consumo reduzido de solventes orgânicos, foi desenvolvida recentemente e denominada microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (*Hollow fiber-liquid phase microextraction*, LPME). Essa técnica vem sendo empregada com sucesso na análise de várias matrizes incluindo, biológicas, ambientais, alimentícias etc.

## 2. Histórico e fundamentos da LPME empregando membranas cilíndricas ocas

Várias tentativas foram feitas nas últimas décadas para a miniaturização da LLE tradicional, com o objetivo final de reduzir a razão solvente orgânico/fase aquosa, porém conservando as características desejáveis da técnica precursora. O primeiro relato de um procedimento empregando essa estratégia foi feito por Jeannot e Cantwell, em 1996, que desenvolveram a técnica denominada microextração em gota única (*single drop microextraction* – SDME)<sup>6</sup>. Nessa técnica, uma gota de solvente orgânico, suspensa em um dispositivo especial de Teflon<sup>®</sup>, foi utilizada para a extração dos analitos de interesse presentes na matriz aquosa. Para a extração, o dispositivo com a gota suspensa foi imerso no frasco contendo a amostra e a solução foi submetida a agitação por um tempo necessário para difusão dos analitos da matriz aquosa para a gota de solvente orgânico. No final da extração, a gota foi recolhida para posterior análise. Logo após, um novo formato de SDME foi introduzido, o qual permite o uso de microseringas convencionais para a execução da técnica<sup>7,8</sup>. A SDME pode ser empregada por imersão direta da gota na amostra ou via *headspace*; procedimentos baseados em duas ou três fases são descritos para SDME. Visto que a técnica é baseada na transferência dos analitos presentes em mililitros de amostra para alguns microlitros de solvente orgânico,

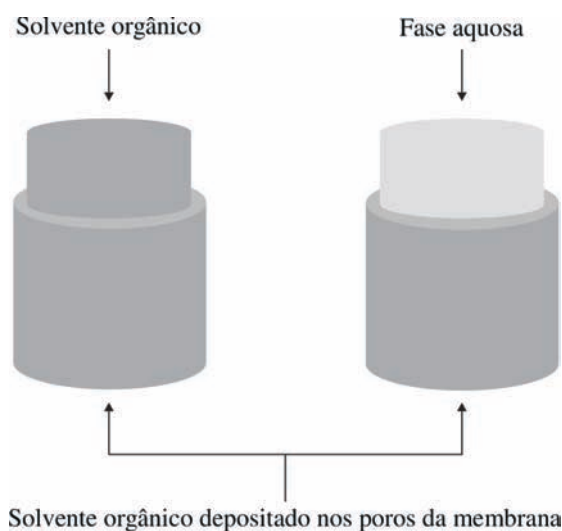
altas taxas de concentração são alcançadas no extrato final (enriquecimento). Por outro lado, a SDME apresenta algumas desvantagens, sendo a principal delas relacionada à instabilidade da gota suspensa na ponta da agulha da microseringa, que pode prejudicar a precisão do método e impedir o uso de períodos de extração prolongados e maiores velocidades de agitação. Além disso, a ocorrência de emulsificação no processamento de amostras contendo lipídios (por exemplo, plasma) dificulta a aplicação dessa técnica na área bioanalítica. Essa técnica é considerada a precursora do termo *microextração em fase líquida* pela introdução do uso de microlitros de solvente orgânico em um procedimento de extração<sup>9</sup>.

Baseados na excelente capacidade de concentração, seletividade e baixo consumo de solventes orgânicos desta técnica, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen propuseram uma alternativa para o uso da microextração em fase líquida<sup>10</sup>. Na técnica desenvolvida por eles, uma membrana cilíndrica oca, porosa e hidrofóbica (Figura 1), com diâmetro interno de 600 µm, paredes com espessura de 200 µm e poros de 0,2 µm, é impregnada com um solvente orgânico imiscível em água e o lúmen da mesma é preenchido com microlitros de uma fase aceptora. As duas extremidades da membrana são conectadas a duas microseringas que servem para a introdução e retirada da fase aceptora. Dessa forma, a membrana atua como uma barreira entre as fases doadora (amostra) e aceptora, permitindo a aplicação de agitação. Como a membrana empregada possui poros de tamanho reduzido, as macromoléculas presentes na amostra não são extraídas. Para evitar a ocorrência de contaminação entre as análises, cada unidade de extração é utilizada uma única vez. Dentre as várias tentativas para miniaturização da LLE, a microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME) é a que teve maior sucesso, por combinar o conceito de extrações com membranas ao uso reduzido de razões solvente orgânico/fase aquosa, conservando os princípios observados na LLE convencional<sup>11-14</sup>.



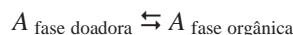
**Figura 1.** Membrana cilíndrica oca de polipropileno utilizada na microextração em fase líquida (LPME).

A LPME pode ser utilizada nos modos de extração em duas ou três fases<sup>15</sup>, de acordo com as características do analito em questão, conforme pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Modos de extração empregados na LPME: duas fases (*esquerda*) e três fases (*direita*).

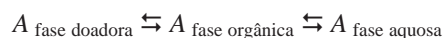
No sistema em duas fases, o analito  $A$  é extraído da amostra aquosa (fase doadora) para um solvente orgânico imiscível em água presente no lúmen da membrana (fase aceptora), através do mesmo solvente imobilizado nos poros da membrana. O equilíbrio de extração no sistema de duas fases pode ser descrito como:



O equilíbrio é caracterizado pela constante de distribuição  $K_{\text{org/d}}$ , que é definida como a razão da concentração do analito  $A$  na fase orgânica ( $org$ ) e na fase doadora ( $d$ ). A força motriz do processo de LPME em duas fases é a diferença de solubilidade do analito entre as fases aquosa e orgânica e, portanto, esse modo é geralmente empregado na extração de compostos com caráter neutro ou de baixa polaridade. Visto que o solvente extrator presente nos poros da membrana não é disponível para a análise, as recuperações obtidas em duas fases são geralmente menores que as previstas em cálculos teóricos. Como o extrato obtido é orgânico, a fase aceptora pode ser diretamente analisada por GC ou HPLC em fase normal.

No modo de três fases, o pH da amostra aquosa (fase doadora) é ajustado de tal forma a manter o analito  $A$  na forma neutra, que é então extraído por um

solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa presente no lúmen da mesma (fase aceptora). Nesta fase, de pH oposto ao da amostra, o analito é convertido para a forma ionizada e, desta forma, impossibilitado de retornar para o solvente orgânico. Logo, o analito deve apresentar maior solubilidade na fase aceptora aquosa do que no solvente orgânico depositado na membrana para obtenção de taxas de enriquecimento desejáveis. Resumindo-se, o equilíbrio de extração no sistema de três fases pode ser definido como:



O equilíbrio é caracterizado pelas constantes de distribuição  $K_{\text{org/d}}$  e  $K_{\text{a/org}}$ .  $K_{\text{org/d}}$  é definida como a razão entre as concentrações do analito nas fases orgânica ( $org$ ) e doadora ( $d$ ), enquanto que  $K_{\text{a/org}}$  é a razão entre as concentrações do analito nas fases aceptora ( $a$ ) e orgânica ( $org$ ). A constante de distribuição total entre as fases aceptora e doadora pode ser descrita por:

$$K_{\text{a/d}} = K_{\text{org/d}} \cdot K_{\text{a/org}}$$

O processo em três fases é indicado para analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis (ácidos ou bases fracas) e o parâmetro mais importante no processo é a diferença de pH das fases doadora e aceptora. Após a extração, a fase aceptora aquosa obtida pode ser prontamente introduzida em CE em meio aquoso ou HPLC em fase reversa. Recentemente, Bardstue et al. publicaram um trabalho relatando algumas recomendações práticas acerca da execução da LPME no modo de três fases<sup>16</sup>.

Outra opção disponível para LPME é o emprego de carreadores para a extração de analitos altamente hidrofílicos e caracterizados por baixos coeficientes de distribuição octanol-água<sup>17</sup>. Neste modo, reagentes adicionados na fase doadora ou no solvente orgânico possibilitam a formação de pares iônicos com o analito de interesse, reduzindo a sua polaridade e favorecendo a partição no solvente orgânico impregnado na membrana<sup>18</sup>.

Para realização da extração, o modo estático ou o modo dinâmico podem ser utilizados na LPME<sup>11</sup>. No modo estático, a fase aceptora presente na membrana permanece estagnada durante a extração e o frasco contendo a amostra sofre agitação vigorosa por diferentes meios (por exemplo, magnético), com o objetivo de permitir a renovação constante da fase doadora em contato com a membrana. Terminada a extração, a fase aceptora é

coletada e analisada conforme desejado. No modo dinâmico, desenvolvido para acelerar o processo de extração e aumentar as recuperações, a fase aceptora é repetidamente injetada e retirada da membrana, possibilitando o trapeamento do analito após alguns ciclos. Da mesma forma que no modo anterior, no final da extração a fase aceptora é separada para análise. Neste modo da técnica, além dos parâmetros tradicionais que devem ser otimizados em LPME, outros fatores também devem ser avaliados para otimização do processo como, por exemplo, o número de ciclos, o tempo de permanência e a velocidade de injeção da fase aceptora. Além disso, o modo dinâmico requer o uso de instrumentação para realização do procedimento (ex.: bombas).

Dentre as várias vantagens da LPME como técnica de extração, destaca-se a simplicidade, visto que nenhum aparato específico é necessário para implantação do procedimento no laboratório. Desde a publicação do trabalho pioneiro de Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, há exatos dez anos, vários formatos foram propostos para aplicação da técnica, inclusive um sistema idealizado em nosso laboratório (Figura 3), no qual as microsseringas utilizadas para o suporte da membrana foram substituídas por microponteiras<sup>19,20</sup>. As amostras são normalmente agitadas magneticamente com barras (mais comum), por *vortex* ou usando um ultrassom. Outra modificação importante na técnica foi a introdução de membranas com maior diâmetro interno (1200  $\mu\text{m}$ ), que possibilitam o uso de maior quantidade de fase aceptora, bem como seções do dispositivo de tamanho reduzido (< 2 cm). Embora polipropileno seja o material mais popular para confecção da membrana, outros materiais vêm sendo empregados para esta finalidade (por exemplo, polissulfona<sup>21</sup> e difluoreto de polivinilideno<sup>22</sup>).

Diferentes parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método, tais como: tipo de solvente orgânico, ajuste do pH da amostra, solução aceptora (no caso de três fases), aplicação de temperatura e agitação no sistema, tempo de extração, além da adição de modificadores orgânicos e pares iônicos<sup>14</sup>. Assim como em outras áreas da química analítica, o planejamento experimental na otimização do processo de extração em LPME também tem sido usado com sucesso<sup>23</sup>. Uma descrição detalhada, em língua portuguesa, da influência desses parâmetros na otimização de um procedimento por LPME podem ser encontrados em De Oliveira et al.<sup>24</sup>.

### 3. Avanços recentes da técnica

A LPME caracteriza-se por ser uma técnica em constante evolução desde o surgimento dos primeiros relatos da mesma. Inicialmente, a técnica foi idealizada para extração de substâncias orgânicas. No entanto, estudos recentes direcionados para a análise de compostos inorgânicos também começam a ser descritos. Chen et al. realizaram a determinação de perclorato em água por intermédio da formação de um par iônico com o carreador acetato de hexilamônio, com posterior análise por espectrometria de massas (MS)<sup>25</sup>. Saleh et al. promoveram a extração de selênio presente em amostras de água, urina e plasma com um procedimento de LPME em duas fases<sup>26</sup>. Para a eficaz recuperação do analito, o metal foi complexado com o reagente fenilenodiamina, levando à formação de um produto passível de partição no solvente orgânico. O extrato orgânico resultante foi analisado por HPLC com detecção por absorção no ultravioleta (UV).

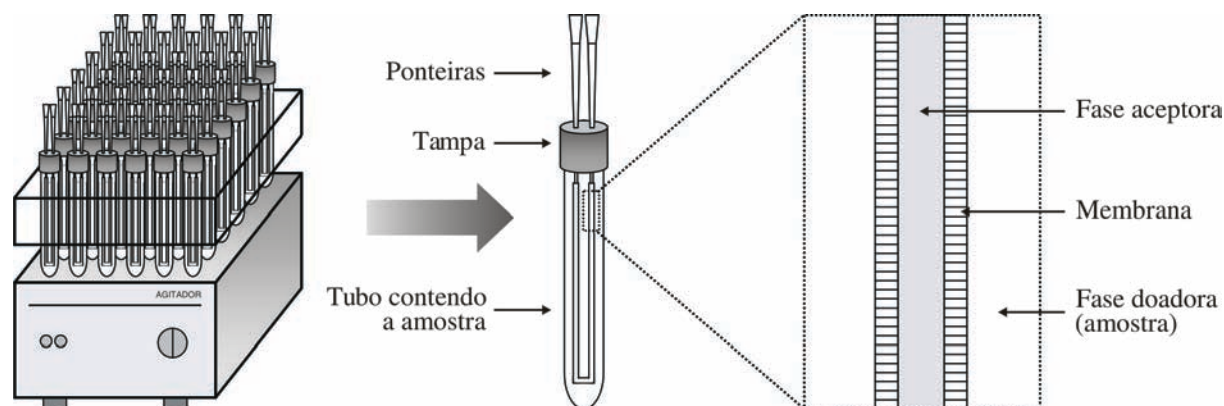


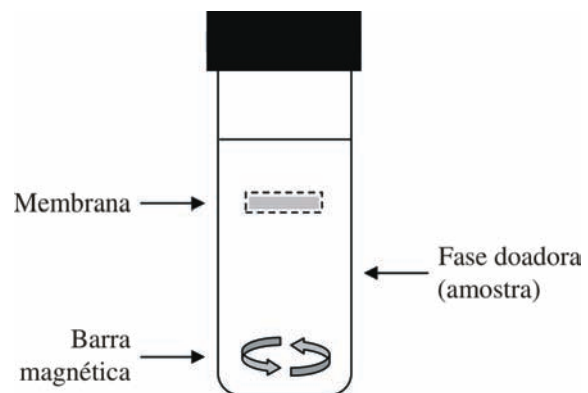
Figura 3. Novo formato da LPME desenvolvido recentemente.

Com o intuito de melhorar a separação cromatográfica de alguns analitos, procedimentos de derivação *in situ* têm sido relatados. Nesse processo, a reação ocorre a partir da adição do agente de derivação no meio contendo a amostra ou no solvente de extração impregnado na membrana. Saaid et al. relataram a extração de diferentes aminas biogênicas em amostras de alimentos, utilizando LPME em três fases simultaneamente à derivação desses analitos com cloreto de dansila presente na fase doadora<sup>27</sup>. HPLC foi empregada para analisar o extrato proveniente do procedimento de extração. Lee et al. utilizaram o reagente *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida dissolvido em clorofórmio depositado na membrana para derivação e extração de produtos de degradação de diferentes agentes químicos em água, com posterior análise por GC-MS<sup>28</sup>.

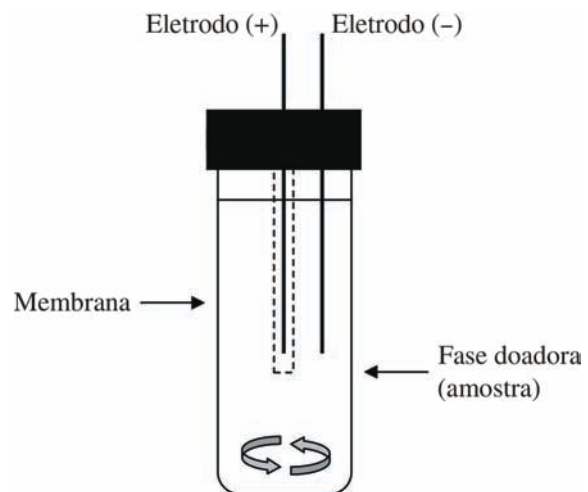
Algumas modificações técnicas foram introduzidas na LPME com o passar dos anos. Inspirados na extração sortiva em barras de agitação (SBSE), Jiang e Lee desenvolveram um novo formato para a técnica, que emprega seções da membrana (2 cm) fechadas nas duas extremidades e preenchidas com solvente orgânico (neste caso, octanol) (Figura 4). Logo depois, a unidade é inserida na amostra aquosa e a extração é iniciada com o auxílio de agitação magnética. Após o tempo necessário, o solvente orgânico é coletado e analisado por GC-MS. O procedimento desenvolvido foi denominado de *solvent bar microextraction* (SBME)<sup>29</sup>.

Apesar de a LPME possibilitar a extração de várias amostras ao mesmo tempo pela simplicidade e baixo custo de cada unidade de extração, o tempo necessário para alcançar níveis satisfatórios de recuperação pode ser relativamente alto em alguns métodos, especialmente quando é necessário realizar as extrações no estado de equilíbrio. Portanto, uma nova modalidade de LPME foi desenvolvida com o objetivo de melhorar essa característica. Nesse processo, denominado de extração eletrocinética em membranas (*electro membrane extraction* - EME), a transferência do analito da amostra para a fase aceptora ocorre, principalmente, pela migração eletrocinética proporcionada pela diferença de potencial entre as fases<sup>30</sup>. O formato da EME é bastante similar ao usado na LPME em três fases porém, eletrodos são inseridos na fase doadora e aceptora para geração do campo elétrico (Figura 5). No primeiro relato da EME foram utilizadas altas voltagens para realização do procedimento e, recentemente, Kjelsen et al. sugeriram o emprego de baixas voltagens obtidas com baterias convencionais

de 9 V<sup>31</sup>. Embora o conhecimento atual sobre EME seja limitado, a seleção do pH da solução aceptora, do solvente orgânico presente na membrana, do tempo de extração e do potencial elétrico aplicado no sistema são importantes na otimização do processo<sup>32</sup>. Dessa forma, os estudos desta modalidade descritos na literatura relatam períodos de extração menores que dez minutos<sup>33</sup>. A EME tem sido aplicada para a preparação de amostras bioanalíticas contendo diferentes fármacos<sup>34</sup>.



**Figura 4.** Representação ilustrativa da *solvent bar microextraction* (SBME).



**Figura 5.** Representação ilustrativa da extração eletrocinética em membranas (EME).

Uma possível desvantagem atribuída à LPME é a necessidade de manipulação das membranas nas etapas do procedimento. Portanto, a automação do processo tem sido idealizada por vários grupos de pesquisa e, nos últimos anos, algumas tentativas foram descritas nesse sentido. Zhao e Lee publicaram o primeiro relato utilizando esta estratégia<sup>35</sup>. Mais tarde, Hou et al. desenvolveram um sistema semiautomatizado para injeção e retirada da fase acceptora orgânica com uma bomba de injeção em LPME dinâmica<sup>36</sup>. O procedimento idealizado foi aplicado na determinação de diferentes pesticidas em água empregando GC-MS como técnica de análise. Müller et al. relataram o uso de um amostrador acoplado ao GC-MS para injeção do extrato obtido após LPME estática de alguns compostos biologicamente ativos em água<sup>37</sup>. Em 2005, Jiang et al. reportaram um sistema otimizado de LPME dinâmica para extração de nitrofenol de água<sup>38</sup>. Nesse trabalho, uma bomba específica também foi empregada e programada para realização dos ciclos de introdução e remoção do solvente orgânico. Procedimento semelhante foi adotado em outro trabalho do grupo para determinação de alguns herbicidas em água utilizando LPME em três fases<sup>39</sup>.

Sistemas completamente automatizados também têm sido desenvolvidos para realização do processo de extração. Ouyang e Pawliszyn relataram o emprego de um sistema integrado ao amostrador CTC CombiPal<sup>®</sup>, que foi utilizado para análise de carbaril em amostras de vinho<sup>40</sup>. Diferentemente dos outros trabalhos, todas as etapas da LPME (injeção e retirada da fase acceptora, agitação da amostra e introdução no sistema analítico) são realizadas por intermédio de um programa específico. Nozal et al. descreveram o acoplamento *in-line* da LPME em um equipamento de CE disponível comercialmente<sup>41</sup>. Neste sistema, o dispositivo de extração foi acomodado no cartucho contendo o capilar de sílica fundida e o procedimento de extração executado por comandos presentes no próprio programa para CE. Os autores aplicaram o método para determinação de anti-inflamatórios não esteroidais em urina. Recentemente, Pezo et al. desenvolveram um sistema automatizado para LPME no modo dinâmico, que possibilita a extração de várias amostras ao mesmo tempo<sup>42</sup>. Além disso, um protótipo comercial para realização da LPME em placas de 96 poços foi desenvolvido e apresentado recentemente, e pode aumentar consideravelmente a capacidade de processamento das amostras da técnica bem como facilitar a automação e conexão direta dela com os diferentes sistemas analíticos<sup>11</sup>.

#### 4. Conclusões

Neste trabalho, os diferentes aspectos da LPME foram apresentados e discutidos. Fica evidente o envolvimento de diversos grupos de pesquisa no desenvolvimento da técnica, propondo modificações no intuito de sobrepor as dificuldades na extração de algumas classes de compostos e facilitar a automação da LPME. As vantagens inerentes à LPME e o grande número de artigos publicados nos últimos anos relatando o emprego da técnica sugerem que, em breve, ela poderá se tornar uma técnica de rotina em laboratórios analíticos e bioanalíticos.

#### 5. Referências Bibliográficas

1. C. Mišl'anová, M. Hutta. *J. Chromatogr. B*, 797, 91 (2003).
2. R.M. Smith. *J. Chromatogr. A*, 1000, 3 (2003).
3. S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.S.C.F. Jardim. *Quim. Nova*, 24, 68 (2001).
4. F.M. Lanças. *Extração em fase sólida (SPE)* (2004).
5. H. Kataoka. *Trends Anal. Chem.*, 22, 232 (2003).
6. M.A. Jeannot, F.F. Cantwell. *Anal. Chem.*, 68, 2236 (1996).
7. M.A. Jeannot, F.F. Cantwell. *Anal. Chem.*, 69, 235 (1997).
8. Y. He, H.K. Lee. *Anal. Chem.*, 69, 4634 (1997).
9. R. Lucena, M. Cruz-Vera, S. Cárdenas, M. Valcárcel. *Bioanalysis*, 1, 135 (2009).
10. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *Anal. Chem.*, 71, 2650 (1999).
11. J. Pawliszyn, S. Pedersen-Bjergaard. *J. Chromatogr. Sci.*, 44, 291 (2006).
12. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *J. Chromatogr. A*, 1184, 132 (2008).
13. J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. *Anal. Chim. Acta*, 624, 253 (2008).
14. E. Psillakis, N. Kalogerakis. *Trends Anal. Chem.*, 22, 565 (2003).
15. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *J. Chromatogr. B*, 817, 3 (2005).
16. K.F. Bårdstu, T.S. Ho, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, J.Å Jönsson. *J. Sep. Sci.*, 30, 1364 (2007).
17. T.S. Ho, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *J. Chromatogr. A*, 998, 61 (2003).

18. T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *J. Chromatogr. Sci.*, 44, 308 (2006).
19. I.R.S. Magalhães, P.S. Bonato. *J. Sep. Sci.*, 31, 3106 (2008)
20. I.R.S. Magalhães, P.S. Bonato. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 1805 (2009).
21. N. Vora-adisak, P. Varanusupakul. *J. Chromatogr. A*, 1121, 236 (2006).
22. S. Cui, S. Tan, G. Ouyang, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2241 (2009).
23. P. da Fonseca, L.A.P. de Freitas, L.F.R. Pinto, C.R. Pestana, P.S. Bonato. *J. Chromatogr. B*, 875, 161 (2008).
24. A.R.M. de Oliveira, I.R.S. Magalhães, F.J.M. de Santana, P.S. Bonato. *Quim. Nova*, 31, 637 (2008).
25. H.C. Chen, W.S. Chen, W.H. Ding. *Talanta*, 79, 442 (2009).
26. A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, S. Shariati, M. Rezaee. *J. Chromatogr. B*, 877, 1758 (2009).
27. M. Saaid, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, C. Basheer, H.K.Lee. *J. Chromatogr. A*, 1216, 5165 (2009).
28. H.S.N. Lee, M.T. Sng, C. Basheer, H.K.Lee. *J. Chromatogr. A*, 1196-1197, 125 (2008).
29. X. Jiang, H.K. Lee. *Anal. Chem.*, 76, 5591 (2004).
30. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 521 (2007).
31. I.J.O. Kjelsen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. *J. Chromatogr. A*, 1180, 1 (2008).
32. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. *J. Chromatogr. A*, 1109, 183 (2006).
33. A. Gjelstad, T.M. Andersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. *J. Chromatogr. A*, 1157, 38 (2007).
34. A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 921 (2009).
35. L. Zhao, H.K. Lee. *Anal. Chem.*, 74, 2486 (2002).
36. L. Hou, G. Shen, H.K. Lee. *J. Chromatogr. A*, 985, 107 (2003).
37. S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp. *J. Chromatogr. A*, 985, 99 (2003).
38. X. Jiang, S.Y. Oh, H.K. Lee. *Anal. Chem.*, 77, 1689 (2005).
39. J. Wu, K.H. Ee, H.K. Lee. *J. Chromatogr. A*, 1082, 121 (2005).
40. G. Ouyang, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 78, 5783 (2007).
41. L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, Á. Ríos, M. Valcárcel. *Electrophoresis*, 28, 3284 (2007).
42. D. Pezo, J. Salafranca, C. Nerín. *J. Chromatogr. A*, 1174, 85 (2007).