KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE

LEONA KVASNIČKOVÁ[a], ZDENĚK GLATZ[b,*], VLADISLAV KAHLE[c]

[a]Zdravotní ústav se sídlem ve Zlíně, pracoviště Uherské Hradiště, [b]Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, [c]Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno
e-mail: glatz@chemi.muni.cz

Došlo 5.3.02, přepracováno 13.11.02, přijato 5.12.02.

Klíčová slova : kapilární elektrochromatografie, elektroosmotický tok, kolony, instrumentace, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Elektroosmotický tok
3. Kolony používané v kapilární elektrochromatografii
4. Instrumentace
5. Aplikace
6. Závěr

1. Úvod

Pokrok v řešení analytických problémů v biochemii, molekulární biologii, chemii životního prostředí, farmakologii i průmyslu je podmíněn využitím moderních separačních metod. Mezi ně patří též kapilární elekrochromatografie (capillary electrochromatography, CEC). Tato relativně nová metoda se v současné době prudce rozvíjí, o čemž rovněž svědčí exponenciálně vzrůstající počet publikovaných prací.

CEC je vysokoúčinná separační metoda, založená na spojení kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární zónové elektroforézy (CZE). Zatímco HPLC využívá ke generování toku rozdílu tlaku, v CEC je pohyb kapalné mobilní fáze zprostředkován elektrickým polem, které způsobuje elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF). CEC si přitom zachovává výhody obou metod, ze kterých vzešla: vyšší účinnost a jednoduchost instrumentace pocházející z CZE a vyšší selektivitu a kapacitu kolony danou interakcí se stacionární fází jako v HPLC. K separaci analytů dochází u CEC převážně dvojím mechanismem. Elektroneutrální i ionizované látky jsou stejně jako v chromatografii separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, respektive na základě sítového efektu v případě gelové permeační chromatografie. Látky ionizované se navíc pohybují v elektrickém poli rychlostí danou jejich efektivními mobilitami, což také přispívá k větší selektivitě vlastní separace.

První experiment, při němž bylo v kapalinové chromatografii aplikováno elektrické pole, provedl již v roce 1939 Strain[1,2]. Tuto metodu použil pro separaci barviv a dokázal, že kombinací elektroforézy a adsorpční chromatografie lze dosáhnout výrazného zlepšení selektivity. Termín elektrochromatografie zavedl v roce 1943 Beraz[3], a to při popisu uspořádání papírové elektroforézy. Elektrické pole využil v roce 1949 k transportu látek gelovou strukturou také Tisselius[4]. Podobné pokusy prováděli v roce 1952 Mould a Synge[5]. Ve své práci se zabývali působením elektrického pole v tenkovrstvé chromatografii (TLC) a v roce 1954 pak publikovali práci[6] věnovanou separaci polysacharidů. Aplikaci elektrického pole na chromatografickou kolonu se v roce 1974 podrobněji věnoval Pretorius[7]. Jako první použil EOF k migraci nenabitých látek náplňovou kolonou o vnitřním průměru 1 mm. Jeho výsledky ukázaly velmi zajímavé možnosti, které nabízí použití EOF v chromatografii. Důležitým mezníkem ve vývoji CEC byla práce Jorgensona a Lukacsové[8]. Ti v roce 1981 ukázali možnosti uplatnění EOF v náplňových kapilárních kolonách. Provedli separaci 9-methylantracenu a perylenu na koloně o vnitřním průměru 170 μm naplněné 10 μm částicemi Partisil ODS-2 za použití mobilní fáze obsahující acetonitril, napětí 30 kV a fluorescenční detekce, tj. za velmi podobných podmínek, za jakých se v CEC pracuje dodnes. Tato jejich práce a práce Knoxe a Granta[9,10], kteří používali 5 μm částice, ukázaly, že EOF je atraktivní alternativou k hydrodynamickému tlaku využívanému v HPLC.

Cílem tohoto článku je krátké seznámení s problematikou kapilární elektrochromatografie, stručný popis teoretických základů, používané instrumentace a možných aplikací. Podrobnější informace lze nalézt v řadě přehledných článků[11–20] a také ve třech monografiích, které vyšly v nedávné době[21–23].

2. Elektroosmotický tok

Jedním ze základních jevů, který se spolupodílí na separaci v CZE, je elektroosmosa, respektive EOF. Jde o tok elektrolytu v separační kapiláře způsobený přítomností nabitých skupin v její stěně. Křemenná kapilára, která je nejčastěji používaným typem kapiláry v CZE, obsahuje ve své stěně ionizovatelné silanolové skupiny SiOH. V přítomnosti základního elektrolytu při pH > 2 dochází k jejich disociaci:

$$SiOH \rightarrow SiO^- + H^+$$

a stěna kapiláry tak získává záporný náboj. Ten přitahuje kladně nabité ionty základního elektrolytu, které u stěny kapiláry vytvářejí stabilní elektrickou dvojvrstvu. Zatímco vrstva kationtů v těsném kontaktu se stěnou kapiláry je fixována (Sternova vrstva), kationty vzdálenější vytvářejí pohyblivou

* Autor pro korespondenci

difuzní (Guyovu-Chapmanovu) vrstvu (obr.1). Pokud je na kapiláru přivedeno stejnosměrné elektrické napětí, kationty difuzní vrstvy začnou migrovat k záporné elektrodě – katodě. Jelikož jsou solvatovány, začne se ke katodě pohybovat i elektrolyt přítomný v kapiláře. Tento pohyb je označován jako EOF.

Jak již bylo zmíněno, v CEC je pohyb mobilní fáze dán EOF. U kapilárních kolon pro CEC, plněných silikagelovými mikročásticemi, přispívá k EOF kromě náboje stěny kapiláry také povrchový náboj částic. U kolon polymerních a povrchově modifikovaných musí stacionární fáze pro tvorbu EOF ve své struktuře obsahovat ionogenní skupiny, neboť povrchový náboj kapiláry je eliminován. Díky tomu, že EOF je generován v celém objemu kapiláry, je jeho rychlostní profil téměř pístový, na rozdíl od toku působeného rozdílem tlaku (obr. 2). Rychlost EOF přitom téměř nezávisí na průměru kapiláry. Dochází tím k menšímu rozmývání zón analyzovaných látek, což přispívá k vyšší účinnosti separace.

Lineární rychlost elektroosmotického toku v_{EOF} lze vyjádřit Hunterovou rovnicí[11]:

$$v_{EOF} = \frac{\sigma\left[\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}{2cF^2}\right]^{1/2} E}{\eta}$$

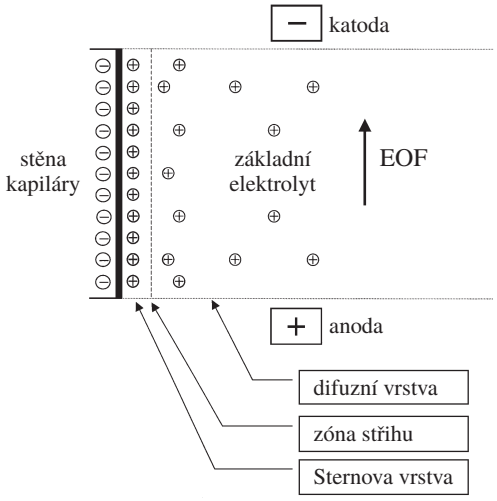
kde ε_0 je permitivita vakua; ε_r permitivita, c koncentrace a η viskozita mobilní fáze, respektive základního elektrolytu, E intenzita elektrického pole; σ nábojová hustota na povrchu rozhraní, F Faradayova konstanta, R univerzální plynová konstanta a T absolutní teplota. Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že EOF závisí na mnoha faktorech, které mohou mít vliv, respektive mohou být využity pro optimalizaci vlastní separace jak v CZE, tak i CEC.

3. Kolony používané v kapilární elektrochromatografii

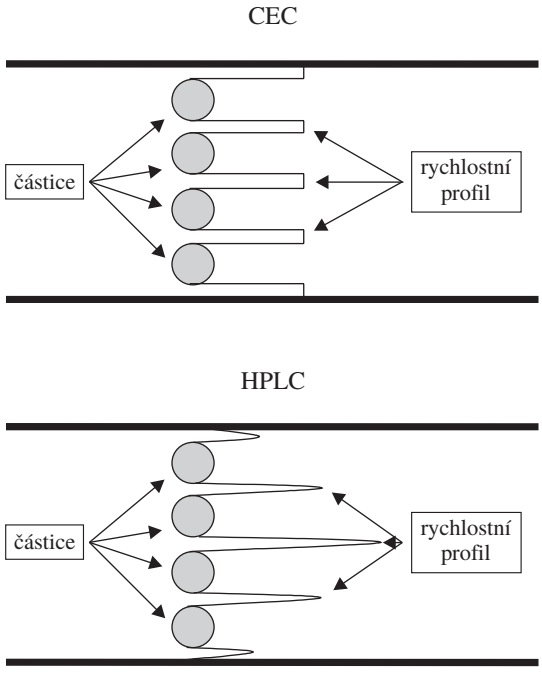
Z hlediska umístění stacionární fáze existují v CEC dva základní typy kapilárních kolon: náplňové a povrchově modifikované. U náplňových kolon je kapilára naplněna příslušnou stacionární fází zcela nebo po detekční okénko, přičemž podle typu stacionární fáze se náplňové kolony dále rozdělují na kolony plněné mikročásticemi jako v případě HPLC a kolony plněné kontinuální (monolitickou) stacionární fází.

Použití kolon plněných mikročásticemi v současné době převažuje. Mikročástice nesou chemicky vázanou stacionární fázi a jsou v koloně zadržovány vstupní a výstupní fritou. Nejčastěji jde o silikagelové sorbenty pro HPLC o velikosti částic 1,5–5 μm. Na trhu jsou však již dostupné stacionární fáze vyráběné speciálně pro CEC, jsou to například CEC 3 μm ODS1 (Phase Separation) a CEC 3 μm C18 (Hypersil). Vnitřní průměr kolony se zpravidla pohybuje mezi 50 až 135 μm. Mikročásticové kolony pro CEC jsou již komerčně dostupné, jejich cena je však zatím poměrně vysoká, a tak většina laboratoří si připravuje kolony vlastní.

Nejpoužívanější metodou pro plnění kolon je plnění tlakové, kdy je suspenze stacionární fáze v organickém rozpouštědle plněna z rezervoáru do kolony HPLC pumpou[24–26]. Dále je možné k naplnění kolony použít[27] superkritického CO_2, odstředivé síly[28] nebo gravitace[29]. Pro elektrokinetické plnění kolon byl rovněž úspěšně využit EOF (cit.[30]). Ačkoli se metodami plnění kolon zabývá velké množství publikací, je tato operace poměrně obtížná. Dalším z praktických problémů, který se vyskytuje při použití kolon plněných mikročásticemi, je tvorba bublinek, které mohou vznikat mj. na rozhraní frity a náplně. Předcházet vzniku bublin lze tlakováním obou elektrodových nádobek, chlazením kapiláry, důkladným odplyněním mobilní fáze, užitím nízkých koncentrací elektrolytů (nebo elektrolytů s nízkou vodivostí) a kapilár s menšími vnitřními průměry. Problémem je také skutečnost, že kapiláry jsou v místě frity velmi křehké, snadno může dojít k jejich



Obr. 1. **Princip elektroosmotického toku EOF v křemenné kapiláře, jejíž stěna má záporný náboj**



Obr. 2. **Srovnání rychlostních profilů toku mobilní fáze u náplňových kolon pro CEC a HPLC**

ulomení, a tím ke zničení kolony. Byla publikována řada metod přípravy tohoto typu kolon a byly diskutovány vlivy velikosti částic a problémy spojené s tvorbou bublinek v mobilní fázi[31–44].

Další možností je použití kolon s monolitickými polymerními náplněmi[45–53]. Tyto kolony obsahují souvislé porézní lože organického či anorganického polymeru. To je v kapiláře buď kovalentně uchyceno na vnitřní stěnu, nebo je v kapiláře udržováno adhezí polymeru. Díky tomu nejsou u monolitických kolon zapotřebí zadržovací frity a je zmenšeno nebezpečí tvorby bublinek. Příslušná stacionární fáze je polymerována *in situ*, tj. přímo v kapiláře. Obsahuje jednak chemické skupiny pro daný chromatografický mód a dále skupiny ionizované, odpovídající za vznik EOF – zpravidla sulfoskupiny. Plnění je podstatně jednodušší než u náplňových kolon, protože nevyžaduje vysoké tlaky. K syntéze organopolymerních monolitů je nejčastěji využívána radikálová polymerace. Změnami složení prepolymerační směsi lze získat monolity o různém chemickém složení a požadované morfologii. Vývoj těchto kolon je teprve v počátcích a v současné době se intenzivně rozvíjí[54].

Do skupiny polymerních kolon patří také tzv. sol-gel monolitické náplně. Tyto monolity jsou připravovány z alkoxysilanů procesem, který zahrnuje jejich hydrolýzu a následnou polykondenzaci. Koloidní roztok je nejprve převeden na hydrogel a pak je termicky pozměněn za vzniku sítě xerogelu uchyceného na vnitřní stěnu kolony. Proces sol-gel může být použit také pro vytvoření monolitu slepením již naplněných silikagelových mikročástic. Příprava monolitických náplní sol-gel je popsána v několika pracech[55–61]. Další alternativou polymerních kolon je použití tzv. „molecularly imprinted polymers“, tj. polymerů s molekulárními otisky. Tyto polymery jsou připravovány v přítomnosti molekuly příslušného analytu, která při polymeraci dává v polymeru vznik specifických dutin komplementárních tvarem i chemickou funkčností. Jejich aplikace především v oblasti chirálních separací jsou uvedeny v několika pracích a přehledných publikacích[62–64].

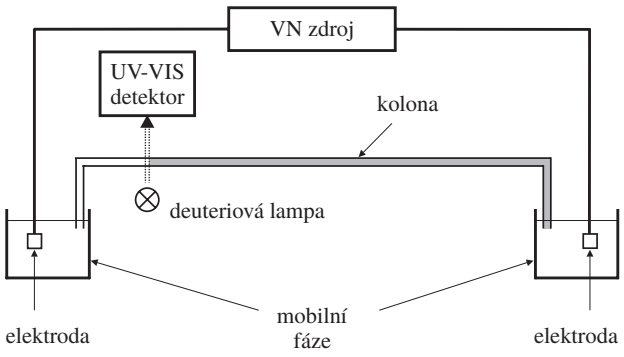
Druhým typem kolon jsou povrchově modifikované kolony (open tubular, OT), jež představují, co se týče přípravy a stability, nejjednodušší typ kolon pro CEC (cit.[65–67]). Jde vlastně o obdobu kolon pro plynovou chromatografii, u kterých stacionární fáze tvoří pouze tenkou vrstvu na vnitřní stěně kapiláry. Pro dosažení vyššího poměru objemu stacionární a mobilní fáze je nutné pracovat s kapilárami o vnitřním průměru menším než 25 μm, což se však odráží v nižší citlivosti detekce. Dalšího zvýšení množství stacionární fáze, a tím i vyšší zádržové kapacity lze dosáhnout speciálními metodami, např. leptáním.

4. Instrumentace

Instrumentace, potřebná k provádění analýz CEC je podobná CZE a je v principu velmi jednoduchá (obr. 3). CEC je většinou prováděna v křemenných kapilárních kolonách (viz výše). Oba konce kolony jsou ponořeny do elektrodových nádobek obsahujících mobilní fázi, kam je též přiváděn elektrický proud z vysokonapěťového zdroje platinovými elektrodami. Mobilní fáze jsou vodné roztoky pufrů s různým obsahem organických rozpouštědel mísitelných s vodou (acetonitril, methanol) pro řízení retence. Většinou se pracuje při alkalickém pH, při kterém je na stacionární fázi dostatečná koncentrace ionizovaných skupin nezbytných pro konstantní EOF. Byly však publikovány i separace CEC za použití nevodných mobilních fází[38]. Vzorky jsou stejně jako u CZE dávkovány elektrokineticky nebo tlakově. Reprodukovatelná analýza vyžaduje přesnou kontrolu pracovních parametrů, jako jsou separační napětí a teplota kapilární kolony.

Nejčastěji používaná detekční metoda je UV-VIS spektrofotometrie, kdy optickou dráhu tvoří vnitřní průměr kapiláry. Nevýhoda zde spočívá v nízké citlivosti, dané krátkou optickou dráhou. Naopak velmi citlivá je fluorimetrická detekce, zvláště pokud je jako excitační zdroj použit laser o vhodné vlnové délce (LIF – laser-induced fluorescence)[68,69]. Jisté omezení zde představuje poměrně malý počet přirozeně fluoreskujících látek. Řešením je pak derivatizace studovaných analytů pomocí reaktivních fluorescenčních značek, kterých je v současné době velký výběr. Instrumentálně náročné je spojení CEC a hmotnostní spektrometrie[70–72], má ovšem zásadní výhodu ve schopnosti identifikovat jednotlivé analyty.

V současné době jsou pro provádění analýz CEC často využívány komerční i v laboratoři sestavené přístroje pro CZE. Ty sice splňují základní požadavky, tak jak byly popsány v předchozím odstavci, a umožňují i automatické dávkování vzorku, ale zároveň představují jistá omezení. Největší problém spočívá ve skutečnosti, že běžné techniky CZE nevyužívají programovanou změnu základního elektrolytu, a proto tato funkce není v elektroforeografech instalována. Naopak pro CEC je gradientová eluce velmi důležitá, neboť umožňuje podstatné zrychlení analýzy, zvláště v případě separace směsí, obsahujících analyty s širokým rozsahem polarit. Byla proto navržena celá řada metod, které tento nedostatek řeší[73]. Nejjednodušší z nich je kroková změna složení mobilní fáze[74,75], která má ale pouze omezenou použitelnost. Pro vytváření kontinuálních gradientů mobilní fáze byly popsány v zásadě dvě možnosti, publikované v různých obměnách. Především je to použití gradientové HPLC pumpy, ze které se přivádí mobilní fáze o měnícím se složení na vstup CEC kapiláry[76–79], a dále užití dvou zdrojů vysokého napětí řízených počítačem[80,81]. Obě naposledy popsané metody mají společnou nevýhodu v instrumentální náročnosti, která je v silném protikladu k principiální jednoduchosti CEC. Nejnověji byla popsána velmi jednoduchá metoda, využívající pro přípravu kontinuálních gradientů mobilní fáze turbulence, ke které dochází v místě náhlého zvětšení průměru přívodní kapiláry[82].



Obr. 3. **Schéma instrumentace pro kapilární chromatografii**

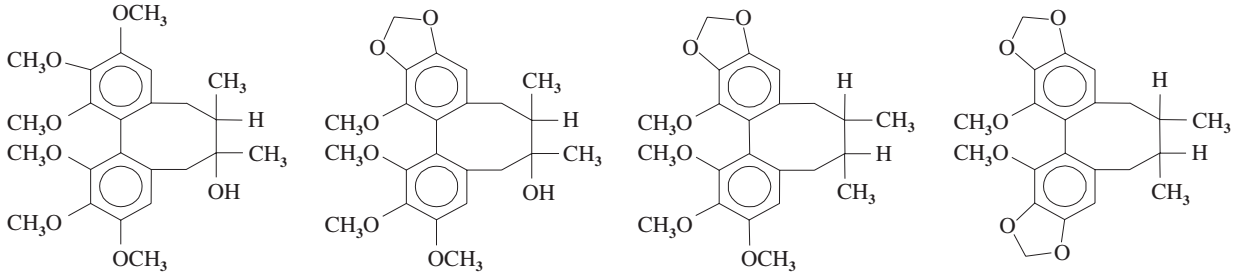


Schéma 1

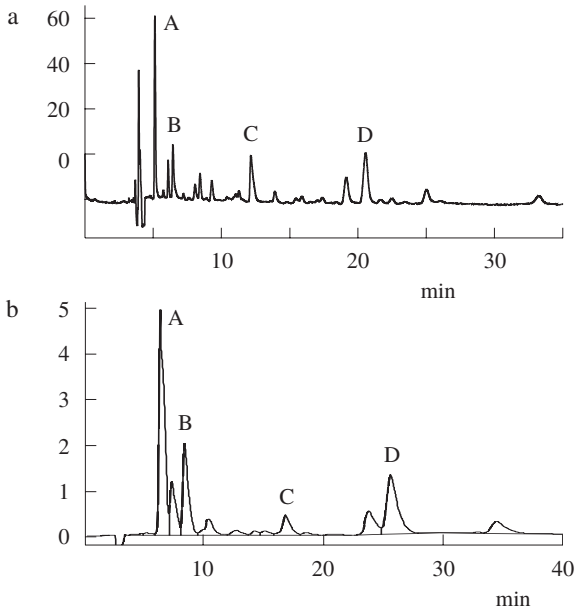
Tabulka I
Přehled charakteristických aplikací CEC v náplňových mikročásticových kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Polycyklické aromatické uhlovodíky	3 μm Nucleosil C18	acetonitril/2 mM borát (80:20)	110
Triazinové herbicidy	3 μm Hypersil C18 3 μm Hypersil C8	acetonitril/25 mM octan sodný, pH 8 (50:50)	111
Steroidy	3 μm Hypersil C18	acetonitril/2 mM fosfát, pH 7,8 (80:20)	32
Kanabinoidy	3 μm Hypersil C18	acetonitril/25 mM fosfát, pH 2,57 (gradient)	112
Triglyceridy	3 μm Hypersil C18	50 mM octan amonný v acetonitril/isopropylalkohol/*n*-hexan (57:38:5)	113
Vitaminy – estery retinolu	7 μm Nucleosil C18	2,5 mM octan lithný v *N*,*N*-dimethylformamid/acetonitril/methanol (20:70:10)	114
Thalidomid a jeho deriváty	5 μm LiChrospher C18	acetonitril/5 mM octan amonný, pH 6 (60:40)	115
PTH deriváty aminokyselin	5 μm Zorbax ODS	acetonitril/5 mM fosfát, pH 7,55 (gradient)	78
Cyt c – tryptické štěpení	1,5 μm Polymicro ODS	1,5% TFA/acetonitril (gradient)	116

Současný rozvoj v molekulární biologii a biochemii především v souvislosti s projekty studia genomu, proteomu a metabolomu s sebou přinesl potřebu analýzy velkého množství vzorků o velmi malých objemech. Jedním z řešení tohoto problému je miniaturizace a automatizace stávajících separačních analytických metod, což vedlo k vývoji mikrofluidních zařízení, respektive zařízení na bázi mikročipů[83]. I když nejčastěji využívanou metodou je v tomto případě CZE, objevily se již první zprávy o spojení těchto technik s CEC (cit.[84]).

5. Aplikace

Přestože CEC byla vyvinuta pro separaci neutrálních látek, její aplikační potenciál se v současné době neomezuje pouze na ně. Aplikace zahrnují látky organické i anorganické, nízkomolekulární i vysokomolekulární, látky syntetické či přírodního původu. CEC tedy může najít uplatnění v celé řadě oblastí, jako jsou farmakologie, biochemie, biotechnologie, organická chemie, chemie životního prostředí atd. Převládajícím chromatografickým módem je přitom chromatografie s obrácenými fázemi, CEC však byla rovněž prováděna v uspořádání s normálními fázemi[85–88], jako ionexová[88–96] nebo gelová permeační chromatografie[48,97–99], a dokonce jako adsorpční chromatografie na hydroxyapatitu[100]. Je však nutné zdůraznit, že s ohledem na amfifilní charakter stacionární fáze v CEC



Obr. 4. **Příklad separace extraktu schisandry čínské (*Schisandra chinensis*) metodou CEC (a) na monolitické polyakrylamidové C12 koloně a HPLC (b) s obrácenými fázemi – A: schisandrin, B: gomisin A, C: gomisin N, D: wuweizisu C** (převzato z práce[109] s laskavým svolením vydavatelství Elsevier)

Tabulka II
Přehled charakteristických aplikací CEC v monolitických polymerních kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Enantiomery aminokyselin	polymethakrylát (molekulární otiskování)	acetonitril/kys.octová/voda (80:10:10)	117
Peptidy	polyakrylamid C12	acetonitril/10 mM Tris–15 mM borát, pH 8,2 (47:53)	47
Steroidy	polyakrylamid C12	acetonitril/voda/mravenčan, pH 3 (55:40:5)	118
Žlučové kyseliny	polyakrylamid C12/NH_2	acetonitril/voda/mravenčan, pH 3 (55:40:5/ 60:35:5)	53
Lignany	polyakrylamid C12	acetonitril/10 mM Tris–15 mM borát, pH 8,2 (70:30)	109

Tabulka III
Přehled charakteristických aplikací CEC v povrchově modifikovaných kolonách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Lit.
Tetracyklinová antibiotika	C18	methanol/30 mM citrát–24,5 mM β-alanin, pH 3,0 (40:60)	119
Varianty laktoglobulinů A a B	DNA aptamery	25 mM Trizma, pH 7,3 10 mM fosfát, pH 7,3	120
Benzodiazepiny	cholesterol	acetonitril/10 mM Tris–HCl, pH 7,3 (gradient)	121
Aminokyseliny	deriváty porfyrinu	0,1 M fosfát, 50 mM Tris, pH 2,1 50 mM borát, pH 9,7	122

jde často o kombinaci těchto módů. CEC byla též aplikována při separaci chirálních látek[101–104], a to za použití chirálních stacionárních fází nebo přídavku některého z chirálních selektorů do mobilní fáze. Rozsáhlé uplatnění zde našla již zmiňovaná technika molekulárního otiskování.

Vzhledem k množství prací zabývajících se aplikací této metody, není možné uvést jejich kompletní přehled, a proto jsou v tabulkách I až III uvedeny jen práce dokumentující její aplikační záběr. Případní zájemci jsou odkázáni na řadu přehledných článků, věnovaných dané problematice[13–16,19,21–23,105–108].

Jako typický příklad může přitom sloužit analýza tetrahydrocyklookta[1,2:3,4]dibenzenových lignanů (viz schéma 1) v extraktu léčivé rostliny schisandry čínské (syn. Klanopraška) *Schisandra chinensis*[109] (obr. 4). Pro srovnání je uvedena analýza stejného extraktu HPLC s obrácenými fázemi. Jak je z obrázků zřejmé, CEC dosahuje vyšší účinnosti, a tím i vyššího rozlišení analyzovaných látek.

6. Závěr

CEC je unikátní elektromigrační separační metoda, která se v posledních pěti letech intenzivně rozvíjí. Lze očekávat, že v budoucnu získá velkou důležitost pro svou vysokou separační účinnost, rychlost analýzy, nízké nároky na množství vzorku a relativně nízkou finanční náročnost. Z jejího vývoje lze usuzovat, že CEC bude užívána v laboratořích jako možná alternativa stávajících separačních metod HPLC a CZE. V současné době je však potenciál CEC omezen celou řadou problémů. Musí být vyřešena reprodukovatelná příprava kolon, ať již na bázi mikročásticových či polymerních stacionárních fází. Dalším významným omezením je neexistence komerčně dostupné instrumentace. Po vyřešení těchto problémů, které si vyžádá v nejbližších letech nemalé úsilí, má CEC šanci stát se rutinně používanou metodou.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. 203/02/1447) a Programem podpory cíleného výzkumu a vývoje Akademie věd České republiky (grant č. S4031202).

LITERATURA

1. Strain H.: J. Am. Chem. Soc. *61*, 1292 (1939).
2. Strain H., Sullivan J.: Anal. Chem. *23*, 816 (1951).
3. Berraz G.: An. Asoc. Quim. Argent. *31*, 96 (1943).
4. Tisselius A.: Discuss. Faraday Soc. *7*, 7 (1949).
5. Mould D. L., Synge R. L. M.: Analyst *77*, 964 (1952).
6. Mould D. L., Synge R. L. M.: Biochem. J. *58*, 571 (1954).
7. Pretorius V., Hopkins B. J., Schieke J. D.: J. Chromatogr. *99*, 23 (1974).
8. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: J. Chromatogr. *218*, 209 (1981).
9. Knox J. H., Grant I. H.: Chromatographia *24*, 135 (1987).
10. Knox J. H., Grant I. H.: Chromatographia *32*, 317 (1991).
11. Dittmann M. M., Wienand K., Bek F., Rozing G. P.: LC GC *13*, 800 (1995).
12. Ross G., Dittmann M. M., Bek F., Rozing G. P.: Am. Lab. (Boston) *26*, 34 (1996).
13. Colón L. A., Reynolds K. J., Maldonado R. A., Fermier A. M.: Electrophoresis *18*, 2162 (1997).
14. Cikalo M. G., Bartle K. D., Robson M. M., Myers P., Euerby M. R.: Analyst *123*, 87 (1998).
15. Smith N. W., Carter-Finch A. S.: J. Chromatogr., A *892*, 219 (2000).
16. Colón L. A., Burgos G., Maloney T. D., Cintrón J. M., Rodríguez R. L.: Electrophoresis *21*, 3965 (2000).

17. Bartle K. D., Meyers P.: J. Chromatogr., A *916*, 3 (2000).
18. Knox J. H., Boughtflower R.: Trends Anal. Chem. *19*, 643 (2000).
19. Altria K. D., Smith N. W., Turnbull C. H.: Chromatographia *46*, 664 (1997).
20. Rathore A. S., Horváth C.: J. Chromatogr., A *781*, 185 (1997).
21. Krull I. S., Stevenson R. L., Mistry K., Swartz M. E.: *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography*. HNB Publishing, New York 2000.
22. Bartle K. D., Myers P. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. RSC Press, London 2001.
23. Deyl Z., Švec F. (ed.): *Capillary Electrochromatography*. Elsevier, Amsterdam 2001.
24. Boughtflower R. J., Underwood T., Paterson C. J.: Chromatographia *40*, 329 (1995).
25. Smith N. W., Evans M. B.: Chromatographia *38*, 649 (1994).
26. Boughtflower R. J., Underwood T., Maddin J.: Chromatographia *41*, 398 (1995).
27. Robson M. M., Roulin S., Shariff S. M., Raynor M. W., Clifford A. A., Meyers P., Euerby M. R., Johnson C. M.: Chromatographia *43*, 313 (1996).
28. Fermier A. M., Colón L. A.: J. Microcolumn Sep. *10*, 439 (1998).
29. Reynolds K. J., Maloney T. D., Fermier A. M., Colón L. A.: Analyst *123*, 1493 (1998).
30. Yan C.: U.S. Patent 5, 453 163, (1995).
31. Carney R. A., Robson M. M., Bartle K. D., Myers P.: J. High Resolut. Chromatogr. *22*, 29 (1999).
32. Frame L. A., Robinson M. L., Lough W. J.: J. Chromatogr., A *798*, 243 (1998).
33. Saevels J., Wuyts M., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J.: J. Pharm. Biomed. Anal. *20*, 513 (1999).
34. Zhang Y., Shi W., Zhang L., Zou H.: J. Chromatogr., A *802*, 59 (1998).
35. Euerby M. R., Johnson C. M., Cikalo M., Bartle K. D.: Chromatographia *47*, 135 (1998).
36. Seifar R. M., Kraak J. C., Kok W. T., Poppe H.: J. Chromatogr., A *808*, 71 (1998).
37. Adam T., Ludtke S., Unger K. K.: Chromatographia *49*, S49 (1999).
38. Roed L., Lundanes E., Greibrokk T.: J. Microcolumn Sep. *11*, 421 (1999).
39. Ludtke S., Adam T., Unger K. K.: J. Chromatogr., A *786*, 229 (1997).
40. Lumley B., Khong T. M., Perrett D.: Chromatographia *54*, 625 (2001).
41. Tang Q., Lee M. L.: Trends Anal. Chem. *19*, 648 (2000).
42. Engelhardt H., Hafner F. T.: Chromatographia *52*, 125 (2000).
43. Choudhary G., Horvath C.: J. Chromatogr., A *781*, 161 (1997).
44. Colón L. A., Maloney T. D., Fermier A. M.: J. Chromatogr., A *887*, 43 (2000).
45. Palm A., Novotný M. V.: Anal. Chem. *69*, 4499 (1997).
46. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. *69*, 3646 (1997).
47. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. *70*, 2288 (1998).
48. Peters E. C., Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. *70*, 2296 (1998).
49. Švec F., Peters E. C., Sýkora D., Yu G., Fréchet J. M. J.: J. High Resolut. Chromatogr. *23*, 3 (2000).
50. Fujimoto C., Fujise Y.: Anal. Chem. *68*, 2753 (1996).
51. Fujimoto C.: Anal. Chem. *67*, 2050 (1995).
52. Ericson C., Liao J., Nakazato K., Hjertén S.: J. Chromatogr., A *776*, 43 (1997).
53. Que A. H., Konse T., Baker A. G., Novotný M. V.: Anal. Chem. *72*, 2703 (2000).
54. Tanaka N., Nagayama H., Kobayashi H., Ikegami T., Hosoya K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Cabrera K., Lubda D.: J. High Resolut. Chromatogr. *23*, 111 (2000).
55. Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Hosoya K., Tanaka N.: J. High Resolut. Chromatogr. *21*, 477 (1998).
56. Dulay M. T., Quirino J. P., Bennett B. D., Kato M., Zare R. N.: Anal. Chem. *73*, 3921 (2001).
57. Fujimoto C.: J. High Resolut. Chromatogr. *23*, 89 (2000).
58. Ratnayake C. K., Oh C. S., Henry M. P.: J. Chromatogr., A *887*, 277 (2000).
59. Dulay M. T., Kulkarni R. P., Zare R. N.: Anal. Chem. *70*, 5103 (1998).
60. Chirica G., Remcho V. T.: Electrophoresis *20*, 50 (1999).
61. Hayes J. D., Malik A.: Anal. Chem. *72*, 4090 (2000).
62. Remcho V. T., Tan Z. J.: Anal. Chem. *71*, 248A (1999).
63. Tan Z. J., Remcho V. T.: Anal. Chem. *69*, 581 (1997).
64. Vallano P. T., Remcho V. T.: J. Chromatogr., A *887*, 125 (2000).
65. Jinno K., Sawada H.: Trends Anal. Chem. *19*, 664 (2000).
66. Pesek J., Matyska M. T., Cho S. J.: J. Chromatogr., A *845*, 237 (1999).
67. Pesek J., Matyska M. T.: Electrophoresis *18*, 2228 (1997).
68. Yan C., Dadoo R., Zhao H., Zare R. N., Rakestraw D. J.: Anal. Chem. *67,* 2026 (1995).
69. Tao L., Kennedy R. T.: Trends Anal. Chem. *17*, 484 (1998).
70. Verheij E. R., Tjaden U. R., Niessen W. M. A., Van Der Greef J.: J. Chromatogr., A *554*, 339 (1991).
71. Choudhary G., Apffel A., Yin H. F., Hancock W.: J. Chromatogr., A *887*, 85 (2000).
72. von Brocke A., Nicholson G., Bayer E.: Electrophoresis *22*, 1251 (2001).
73. Rimmer C. A., Piraino S. M., Dorsey J. G.: J. Chromatogr., A *887*, 115 (2000).
74. Euerby M. R., Gilligan D., Johnson C. M., Bartle K. D.: Analyst *122*, 1087 (1997).
75. Ding J., Szeliga J., Dipple A., Vouros P.: J. Chromatogr., A *781*, 327 (1997).
76. Behnke B., Bayer E.: J. Chromatogr., A *680*, 93 (1994).
77. Taylor M. R., Teale P., Westwood S. A.: Anal. Chem. *69*, 2554 (1997).
78. Huber C. G., Choudhary G., Horváth C.: Anal. Chem. *69*, 4429 (1997).
79. Lister A. S., Rimmer C. A., Dorsey J. G.: J. Chromatogr., A *828*, 105 (1998).
80. Yan C., Dadoo R., Zare R. N., Rakestraw D. J., Anex D. S.: Anal. Chem. *68*, 2726 (1996).
81. Figeys D., Aebersold R.: Anal. Chem. *70*, 3721 (1998).

82. Que A. H., Kahle V., Novotný M. V.: J. Microcolumn Sep. *12*, 1(2000).
83. Becker M. H. (ed.): *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science, Topics in Current Chemistry*, sv. 194. Springer, Heidelberg 1998.
84. Yu C., Švec F., Fréchet J. M. J.: Electrophoresis *21*, 120 (2000).
85. Maruska A., Pyell U.: Chromatographia *45*, 229 (1997).
86. Maruska A., Pyell U.: J. Chromatogr., A *782*, 167 (1997).
87. Lai E. P. C., Dabek-Zlotorzynska E.: Electrophoresis *20*, 2366 (1999).
88. Lammerhofer M., Švec F., Frechet J. M. J., Lindner W.: J. Chromatogr., A *925*, 265 (2001).
89. Smith N. W., Evans M. B.: Chromatographia *41*, 197 (1995).
90. Wei W., Luo G. A., Yan C.: Am. Lab. (Boston) *30*, 20C (1998).
91. Ye M. L., Zou H. F., Liu Z., Ni J. Y., Zhang Y. K.: Anal. Chem. *712*, 616 (2000).
92. Cikalo M. G., Bartle K. D., Myers P.: Anal. Chem. *71*, 1820 (1999).
93. Hilder E. F., Klampfl C. W., Haddad P. R.: J. Chromatogr., A *890*, 337 (2000).
94. Lammerhofer M., Lindner W.: J. Chromatogr., A *829*, 115 (1998).
95. Li D. M., Knobel H. H., Remcho V. T.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. *695*, 169 (1997).
96. Huang P. Q., Jin X. Y., Chen Y. J., Srinivasan J. R., Luman D. M.: Anal. Chem. *71*, 1796 (1999).
97. Venema E., Kraak J. C., Tjissen R., Poppe H.: Chromatographia *48*, 343 (1998).
98. Venema E., Kraak J. C., Tjissen R., Poppe H.: J. Chromatogr., A *837*, 3 (1993).
99. Stol R., Kok W. T., Poppe H.: J. Chromatogr., A *814*, 201 (2001).
100. Yin G., Liu Z., Zhou R., Zhan J., Wang J., Yuan N. J.: J. Chromatogr., A *918*, 393 (2001).
101. Fanali S., Catarcini P., Blaschke G., Chankvetadze B.: Electrophoresis *22*, 3131 (2001).
102. Lelievre F., Yan C., Zare R. N., Garei P.: J. Chromatogr., A *723*, 145 (1996).
103. Wistuba D., Czesla H., Roeder M., Schurig V.: J. Chromatogr., A *815*, 183 (1998).
104. Wistuba D., Schurig V.: Electrophoresis *21*, 4136 (2000).
105. Robson M. M., Cikalo M. G., Myers P., Euerby M. R., Bartle K. D.: J. Microcolumn Sep. *9*, 357 (1997).
106. Dermaux A., Sandra P.: Electrophoresis *20*, 3027 (2000).
107. Krull I. S., Sebag A., Stevenson R.: J. Chromatogr., A *887*, 137 (2000).
108. Vanhoenacker G., Van den Bosch T., Rozing G., Sandra P.: Electrophoresis *22*, 4064 (2001).
109. Kvasničková L., Glatz Z., Štěrbová H., Kahle V., Slanina J., Musil P.: J. Chromatogr., A *916*, 265 (2001).
110. Rebscher H., Pyell U.: Chromatographia *42*, 171 (1996).
111. Dittmann M. M., Rozing G. P.: J. Microcolumn Sep. *9*, 399 (1997).
112. Lurie I. S., Meyers R. P., Conver T. S.: Anal. Chem. *70*, 3255 (1998).
113. Dermaux A., Medvedovici A., Ksir M., Van Hove E., Talbi M., Sandra P.: J. Microcolumn Sep. *11*, 451 (1999).
114. Roed L., Lundanes E., Greibrokk T.: J. Chromatogr., A 890, 347 (2000).
115. Meyring M., Strickmann D., Chankvetadze B., Blaschke G., Desiderio C., Fanali S.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. *723*, 255 (1999).
116. Behnke B., Metzger J. W.: Electrophoresis *20*, 80 (1999).
117. Lin J. M., Nakagama T., Uchiyama K., Hobo T.: J. Pharm. Biomed. Anal. *15*, 1351 (1997).
118. Que A. H., Palm A., Baker A. G., Novotny M. V.: J. Chromatogr., A *887*, 379 (2000).
119. Pesek J., Matyska M. T.: J. Chromatogr., A *736*, 313 (1996).
120. Rehder M. A., Mcgown L. B.: Electrophoresis *22*, 3759 (2001).
121. Catabay A. P., Sawada H., Jinno K., Pesek J. J., Matyska M. T.: J. Capillary Electrophor. *5*, 89 (1998).
122. Charvátová J., Kašička V., Král V., Deyl Z.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. *770*, 165 (2002).

L. Kvasničková[a], Z. Glatz[b], and V. Kahle[c] *([a]District Public Health Department, Uherské Hradiště, [b]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, [c]Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno):* **Capillary Electrochromatography**

Capillary electrochromatography (CEC) can be considered a hybrid of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC). The growing interest in this technique is reflected in an increasing number of relevant scientific publications. CEC uses an electrically driven flow to transport the solutes through the chromatographic column. Separation can be achieved by differential interaction with stationary phase, differential electromigration, or a combination of both. The main features of CEC are presented, including basic principles and a literature overview on the practical approaches used.