

ON-LINE PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

JANA HORÁKOVÁ, VÍTĚZSLAV MAIER
a JURAJ ŠEVČÍK

*Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého
Olomouc, Tr. Svobody 8, 771 46 Olomouc
jana.horakova@post.cz, maierv@email.cz,
sevcik@prfnw.upol.cz*

Došlo 12.1.05, přepracováno 15.2.05, přijato 24.3.05.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, on-line prekoncentrace, zakoncentrování, sweeping, izotachoforéza

Obsah

1. Úvod
2. On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů
 - 2.1. Zakoncentrování vzorku zesílením pole – (field amplified sample stacking – FASS)
 - 2.2. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu – (large volume sample stacking – LVSS)
3. Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek
 - 3.1. Nametení – (sweeping) ionizovatelných a hydrofóbních analytů
4. Přechodná izotachoforéza – (transient isotachopheresis – tITP)
5. Závěr

1. Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je účinná mikrokolonová separační technika s vysokou prostupností vzorku (tzv. high throughput separation technique), vhodná pro separaci velké řady analytů v různých matricích. Velkou nevýhodou kapilární elektroforézy je obvykle nízká koncentrační citlivost v porovnání s kapalinovou chromatografií jako nejčastěji používanou srovnatelnou technikou¹. Důvodem nízké koncentrační citlivosti je dávkování velmi malých objemů vzorku (řádově jednotky až desítky nanolitů) a u spektrálních detektorů krátká absorpční dráha detekčního paprsku (shodná s vnitřním průměrem použité kapiláry).

V posledních letech se stále častěji objevuje snaha zvýšit citlivost stanovení prováděných technikou kapilární elektroforézy. Možností, jak zvýšit citlivost detekce v kapilární elektroforéze, je poměrně mnoho, přes obtížné konstrukční řešení detektorů a s tím související ekonomickou zátěž, až po elegantní techniky realizované prostřed-

nictvím změn elektrického a chemického pole přímo v kapiláře, které umožní zakoncentrovat složky analytu do velmi úzkých zón. Výsledkem je zvýšení koncentrace analytu v kapiláře před vlastní detekcí.

Trendem dnešní instrumentace je provést rychlou a jednoduchou analýzu s co nejmenším počtem úprav a operací se vzorkem. Sofistikované on-line prekoncentrační techniky tyto požadavky velmi dobře splňují. Díky znalostem dějů, které doprovázejí elektromigraci, je možno vyvíjet velmi účinné on-line prekoncentrace.

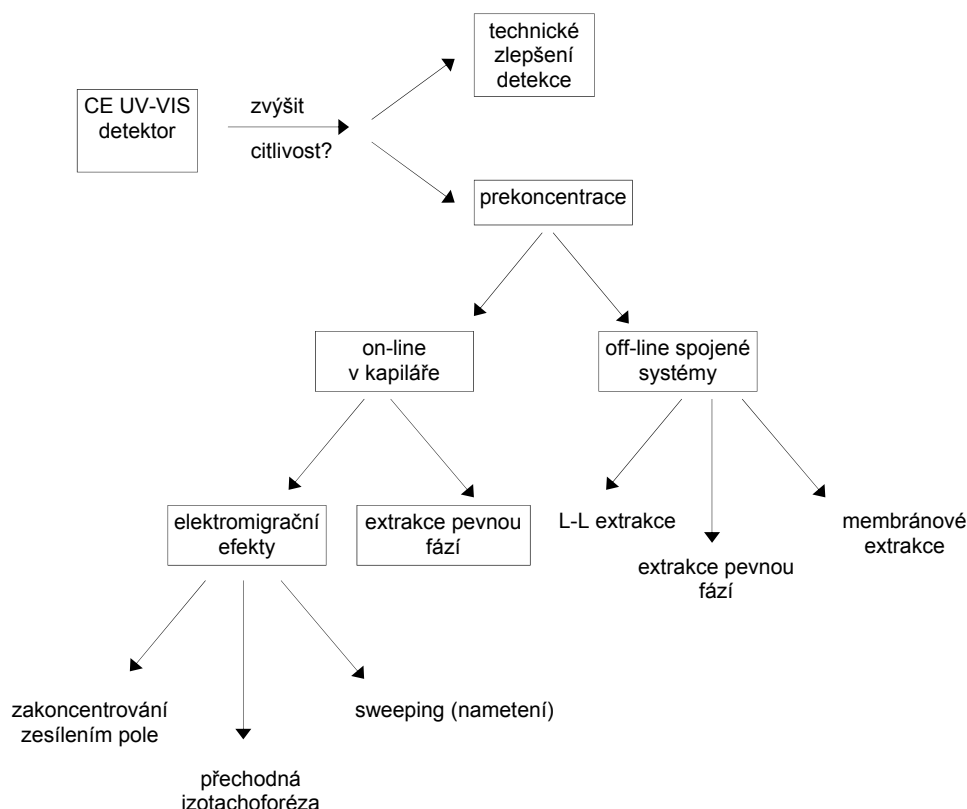
Alternativní možnosti k on-line prekoncentracím jsou úpravy konstrukce detektorů, využití jiných detekčních technik (laserem indukovaná fluorescence – LIF, hmotnostní spektrometrie – MS, elektrochemická detekce), derivatizace atp. Tyto možnosti jsou však technicky náročnější a ekonomicky méně výhodné než on-line prekoncentrace².

On-line (on-capillary) prekoncentrace představují dostupnější možnost zvýšení citlivosti nežli použití jiného než UV-VIS detektoru nebo konstrukčně složitých modifikací detekční cely (případně detekčního okénka). Prekoncentrace analytů on-line v kapiláře během nadávkování a separace analytů je často označována jako zakoncentrování – stacking. Tento jev byl poprvé popsán Tisseliem v polyakrylamidové gelové elektroforéze³. Zakoncentrování – stacking může být uskutečněno jak při využití hydrodynamického, tak i elektrokinetického nástřiku.

Tento přehledný článek poukazuje na možnosti použití „on-capillary“ a „on-line“ technik k prekoncentracím celé řady analytů, které jsou pak separovány některou z technik kapilární elektroforézy (kapilární zónová elektroforéza – CZE, micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC). Zmíněné možnosti jsou přehledně vyobrazeny na obr. 1. (cit.¹).

2. On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů

Kapilární elektroforéza je často používána pro separaci analytů, které podléhají ionizačním rovnováhám (disociace, protonizace, asociace, komplexace). Rychlost migrace je pak ovlivnitelná změnou některých vlastností pracovního elektrolytu (pH, vodivost, teplota atp.). I malá změna těchto vlastností může vést ke generaci prekoncentračního mechanismu. Neexistuje ostrá hranice mezi jednotlivými prekoncentračními mechanismy, ale zjednodušeně lze říct, že pro on-line prekoncentraci ionizovatelných analytů lze využít následující principy: zakoncentrování vzorku zesílením pole – field amplified sample stacking (FASS), přechodná izotachoforéza – transient isotachopheresis (tITP), zakoncentrování pomocí organického rozpouštědla např. acetonitrilu – acetonitrilový stacking,



Obr. 1. Schéma prekoncentrací v kapilární elektroforéze

samozakoncentrování vzorku – sample self-stacking, přechodné pH rozhraní – dynamic pH junction, nametení – sweeping atd. Tyto principy umožní dávkování většího objemu vzorku do kapiláry (omezení představuje délka kapiláry) a následné zakoncentrování nadávkovaného analytu do velmi úzké zóny před vlastní separací. Přehledných článků zabývajících se problematikou on-line prekoncentrací ionizovatelných analytů je celá řada^{4–6}.

2.1. Zakoncentrování vzorku zesílením pole (field amplified sample stacking)

Zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS) je jednou z velmi často používaných technik prekoncentrace, jejíž princip je znám již několik let. Podstata spočívá v interakci elektrického silového pole (vkládaného napětí mezi konce kapiláry) a pole koncentračního. Koncentrační pole je generováno díky různé vodivosti (koncentraci) pracovního elektrolytu a nadávkované zóny vzorku^{7–10}.

Nejjednodušší možností jak zvýšit citlivost detekce je využít dnes již standardní postup rozpuštění vzorku pro analýzu v desetkrát zředěném pracovním elektrolytu nebo ve vodě. Při aplikaci stejnosměrného elektrického pole

dojde díky rozdílným vodivostem zón pracovního elektrolytu a zóny vzorku (zóna vzorku má nižší vodivost) k zakoncentrování dávkované zóny. V obou zónách je pak jiná hodnota intenzity elektrického pole (v zóně vzorku je vyšší). Důsledkem toho je rozdílná rychlost migrace analytů v obou zónách (analyty v zóně vzorku migrují rychleji). Na rozhraní obou zón tak dojde k zakoncentrování analytů vlivem zpomalení rychlosti migrace. Separace pak probíhá klasickým mechanismem kapilární zónové elektroforézy (CZE), ale s užší počáteční zónou vzorku.

FASS se samozřejmě dá uskutečnit i pomocí současné změny pH a vodivosti zón vzorku a pracovního elektrolytu. Pokud to povaha analytů umožňuje, lze vzorek okyselit nebo naopak zalkalizovat přidávkou kyseliny nebo hydroxidu. Dojde tak ke změně pH a k ovlivnění ionizační rovnováhy analytů. Na hodnotě pH je silně závislá efektivní mobilita analytů, což vede k vytvoření podmínek pro odlišnou rychlost migrace analytu v nadávkované zóně vzorku a v zóně pracovního elektrolytu. Tento způsob prekoncentrace je využíván pro analýzy celé řady analytů s rozdílným acidobazickým chováním.

Většina publikovaných prací o zakoncentrování ionizovatelných analytů uvádí dosažení deseti- až tisícnásobného zesílení signálu analytu, což umožnilo techni-

ce kapilární zónové elektroforézy proniknout i do oblasti separace a kvantifikace velmi nízkých koncentrací analytu (10^{-7} – 10^{-8} mol l^{-1}) za použití běžného UV-VIS detektoru^{11–14}.

Tento jednoduchý přístup umožňuje nadávkování pouze optimální nástřikové délky (tj. ne větší než 2 % délky kapiláry), protože v opačném případě dojde ke ztrátě separační účinnosti. V literatuře je tento nejjednodušší způsob označován jako přirozené zakoncentrování (normal stacking mode, NSM)^{15–17}. Pokud je nadávkované množství vzorku větší než je optimální nástřiková délka v NSM, je nutné, aby matrice vzorku naopak migrovala ven z kapiláry nástřikovým koncem. Tento způsob je označován jako zakoncentrování vzorku z velkého objemu (large volume sample stacking, LVSS). „Pumpování“ matrice ven z kapiláry při dávkování může být zajištěno buď pomocí elektroosmotického toku nebo použitím externího tlaku. Směr toku matrice musí být opačný než migrace dávkovaných analytů a velikost obráceného toku musí být menší než je rychlost migrace dávkovaných analytů. Nevýhodou tohoto způsobu prekoncentrace je možnost fokusovat buď jenom kationty nebo jenom anionty během jedné analýzy. Prekoncentrační faktor se v tomto případě pohybuje většinou kolem stonásobku zesílení signálu analytu.

Mezi techniky, které využívají změny ve vodivostech zón dávkovaného vzorku patří i metody využívající techniky, kdy se vzorek rozpustí ve 30% (v/v) vodném roztoku acetonitrilu s přidávkou anorganické soli o vysoké koncentraci. Tento přístup se dá velmi dobře uplatnit při analýzách biologických vzorků, které už obsahují potřebnou koncentraci chloridu sodného^{18–22}.

2.2. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu (Large volume sample stacking)

Zakoncentrování s přepínáním polarit y vychází z rozpouštění vzorku v základním elektrolytu nebo rozpouštění tak, aby měl nízkou vodivost. Dávkování je hydrodynamické a mnohem delší než v případě NSM. Po nástřiku dlouhé zóny vzorku do kapiláry nastává fáze přepólování polarit y zdroje na opačnou polaritu, než jaká bude použita pro vlastní separaci. Tím dochází k migraci matrice ven z kapiláry a analyty se zakoncentrují ve formě úzké zóny na počátku kapiláry. To znamená, že polarita pro odstranění matrice při zakoncentrování je volena podle znaménka náboje separovaných analytů. Do pracovního elektrolytu se přidává většinou aditivum, které obrací směr elektroosmotického toku (např. kationtový tenzid). V momentě, kdy hodnota protékajícího proudu vzroste na 90–99 % hodnoty běžné pro základní elektrolyt bez aditiva, je polarita změněna tak, aby elektroosmotický tok protékal směrem k detektoru²³.

I přesto, že některé komerční přístroje neumozňují měnit polaritu, je možné LVSS bez přepínání polarit y uskutečnit. Nicméně je tento přístup málo používaný pro nedostatečnou opakovatelnost a obtížné technické provedení.

Zakoncentrování (stacking) s využitím elektrokinetického dávkování poprvé popsali Chien a Burgi⁷. Teoretické základy jsou uvedeny v práci Chiena⁹. Vzorek je rovněž připraven tak, aby měl nízkou vodivost. Následně je proveden elektrokinetický nástřik, který zajišťuje selektivní dávkování buď jenom kationtů, nebo jenom aniontů. Pokud je elektroosmotický tok v opačném směru oproti migraci nástřikovaných iontů, je nutné, aby rychlost elektroosmotického toku byla menší než rychlost migrace dávkovaných analytů. Zakoncentrování (stacking) při elektrokinetickém dávkování poskytuje větší navýšení citlivosti detekce, než nabízí hydrodynamický nástřik. To je vysvětleno skutečností, že u hydrodynamického nástřiku je velikost nástřiku limitována délkou kapiláry. V případě elektrokinetického dávkování tomu tak není, protože analyty migrují do kapiláry nezávisle na délce kapiláry. V tomto případě lze dosáhnout prekoncentračního faktoru víc než tisíc, což jsou nejvyšší hodnoty dosažitelné při LVSS pomocí hydrodynamického nástřiku²⁴.

Dalším přístupem pro tzv. on-capillary (přímo v kapiláře) prekoncentraci analytů v kapilární zónové elektroforéze je tzv. přechodné pH rozhraní (dynamic pH junction). Využívá se skutečnosti, že efektivní mobilita slabě kyselých a slabě bazických analytů je silně závislá na pH základního elektrolytu. V kapiláře je možné navolit takový elektrolytový systém, který je obdobou systémů používaných při izoelektrické fokusaci, kde se místo amfolytů využívá základních elektrolytů o rozdílných hodnotách pH. Nejjednodušší provedení této techniky je využití rozdílných hodnot pH mezi dávkovanou zónou vzorku a základním elektrolytem (např. pH vzorku je o 1,5 jednotky menší než je pH základního elektrolytu)^{25,26}, přičemž lze využít buď pufrů o stejném složení (pufr pro rozpouštění vzorku a základní elektrolyt obsahuje stejné složky, ale má jiné pH), anebo lze využít dvou pufrů o rozdílném pH a rozdílném složení^{27–29}.

3. Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek

Některé ionizovatelné analyty se ovšem obtížně separují klasickou kapilární zónovou elektroforézou. Proto výhodou může být využití přidavku micelotvorných látek do základního elektrolytu (micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC), které i v případě nabitých analytů může poskytnout zajímavé ovlivnění selektivity. Principy zakoncentrování (stackingu) v micelární elektrokinetické chromatografii nabitých analytů jsou velmi podobné principům uvedených v citacích^{30–35}.

3.1. Nametení (sweeping) ionizovatelných a hydrofóbních analytů

Rozdílné druhy aditiv přidávané k základnímu elektrolytu ovlivňují selektivitu. Nametení³⁶ (sweeping) je nový fenomén, který zlepšuje citlivost, ale podstata techniky vychází z interakcí analytu a micel (rozdělovací rovno-

váhy) podobně, jako je tomu v micelární elektrokinetické chromatografii.

Při technice „sweepingu“ se používá přídavku micelotvorných látek do základního elektrolytu, který je umístěn v elektrolytové nádobce na dávkovací straně kapiláry. Samotná kapilára, druhá elektrolytová nádobka a ani vzorek neobsahují použité micelotvorné činidlo. Analyty mají silnou afinitu pro speciální typy aditiv, zahrnující iontové nebo neiontové micely, cyklodextriny apod.^{37–43}

Využívá se interakcí mezi analytem (ion, neutrální molekula) a tzv. pseudostacionární fází (PS), kterou může být některé z uvedených aditiv. Pseudostacionární fáze proniká do široké zóny vzorku a na tomto rozhraní dochází k nakoncentrovávání (nametení) vzorku. Rozsah prekoncentrace je určován součtem všech interakcí mezi analytem a PS fází. Systém umožňuje efektivní odstranění matricových nečistot. Tato technika poskytuje nízký detekční limit (10^{-9} mol l⁻¹).

Jednoduchá nebo složitá aditiva mohou být použita pod podmínkou, že kinetika interakce je rychlejší než kinetika elektroforetické relaxace, a výsledkem je zakoncentrování v úzkém pásu. Všeobecně se používají aniontové tenzidy (dodecyl sulfát sodný, SDS) k zakoncentrování neutrálních nebo kationtových analytů, kde délka fokusační zóny závisí na velikosti retenčního faktoru. Nametení (sweeping) ve většině případů probíhá optimálně, když vodivost vzorku je podobná vodivosti základního elektrolytu, ačkoliv může být také použita vyšší vodivost vzorku za předpokladu, že je nalezena vhodná délka nástřiku vzorku. Pro separaci některých aniontových analytů se za alkalických podmínek ke zlepšení nametení (sweepingu) používají kationtové nebo neiontové tenzidy. Za přítomnosti kationtového tenzidu musí být k potlačení elektroosmotického toku kapilára pokrytá. Pouze nabitě analyty mohou být separovány pomocí neutrální PS fáze⁴⁴. Nejčastěji se využívají nabitě molekuly PS fáze, ale i neiontová PS fáze může poskytovat potřebnou separaci nabitých molekul. Rozdíl je v tom, že nabitě analyty vstupují do micel neutrální PS fáze a dochází analogicky k prekoncentraci.

Pokud má vzorek stejnou vodivost jako základní elektrolyt, uskuteční se nametení (sweeping) za využití homogenního elektrického pole. Jinou možností je použití vysokých koncentrací solí ve vzorku a nametení (sweeping) se uskuteční s využitím tzv. redukováného elektrického pole v zóně vzorku.

Doposud byla publikována celá řada prací zabývajících se prekoncentrací různých analytů v rozmanitých maticích s využitím „sweeping“ mechanismu^{40,41,45–49}.

Je možné využívat i kombinace dvou prekoncentračních mechanismů. Typickým příkladem je využití dynamického rozdílu v hodnotách pH elektrolytů (dynamic pH junction – sweeping). Tato metoda je založena na využití „sweeping“ podmínek (základní elektrolyt s PS fází, vzorek bez PS fáze) a podmínky přechodného pH rozhraní – dynamic pH junction (rozdílné pH vzorku a pufru)^{26,30,50–51}.

4. Přechodná izotachofórze (tITP)

Izotachofórze (ITP) je založena na použití diskontinuálního elektrolytového systému, kdy analyty migrují podle své mobility v úzkých zónách za sebou mezi vedoucím (leading, LE) a koncovým (terminating, TE) elektrolytem. Pro prekoncentraci s využitím ITP mechanismu lze vycházet z Kohlrauschovy regulační funkce^{52–62}.

Vhodnou kombinací dvou nebo více rozdílných pracovních elektrolytů v jedné separační kapiláře lze docílit jevu, který je označován jako přechodná izotachofórze (tITP). Tento jev je možno využít k prekoncentraci celé řady analytů⁶³.

Nejčastěji jsou při tITP-CE analýze používány dva různé přístupy⁵⁴.

- Jestliže je základní elektrolyt zvolen tak, že ko-ion má vyšší efektivní mobilitu než analyty, ITP migrace je dosažena pomocí vhodného koncového elektrolytu (může být použit místo základního elektrolytu anebo ho lze dávkovat jako zónu) za zónou vzorku. Ko-ion v tomto případě přebírá úlohu vedoucího elektrolytu. Vzorek je nadávkován hydrodynamicky a po vložení elektrického pole dojde k vytvoření přechodného ITP stavu. Po zakoncentrování je koncový elektrolyt vyměněn za základní elektrolyt a nastává separace pomocí CZE.
- Jestliže základní elektrolyt obsahuje ko-ion s nižší efektivní mobilitou než analyt, musí samotný vzorek být obohacen o vedoucí ion (např. pro separaci kationtů je možno použít K⁺, NH₄⁺, Na⁺) k dosažení tITP. Ko-ion se pak chová jako koncový ion. To může být výhodou pro biologické vzorky, které často přirozeně obsahují dostatečné množství iontů s vysokou mobilitou pro uskutečnění ITP prekoncentrace. Alternativou je přídavek takovýchto solí do samotného vzorku.

Je možno oba mechanismy kombinovat. Velmi často je vlastní mechanismus tITP kombinací uvedených případů, protože lze využít přístupu (a) pro vzorky obsahující soli vysoce mobilních iontů.

Přechodná izotachofórze je velmi často používána pro prekoncentraci ionizovatelných analytů. Ve spojení s kapilární elektroforézou představuje účinný prekoncentrační systém, který byl použit pro zvýšení citlivosti stanovení celé řady analytů^{63–70}.

5. Závěr

Tento článek podává přehled o nejčastěji používaných on-line prekoncentračních technikách v kapilární elektroforéze. Autoři jsou si vědomi, že nelze podat úplný a vyčerpávající přehled všech doposud publikovaných prací týkajících se prekoncentrací. Úspěšnost zvoleného prekoncentračního mechanismu je mimo jiné silně závislá i na povaze a chování samotných analytů, případně složitosti

matrice. Použití on-line prekoncentrace je nutno volit po pečlivém uvážení všech faktorů, které by mohly ovlivnit její úspěšnost. Trendem posledních let je aplikovat on-line prekoncentrace na reálné vzorky s relativně složitou maticí pomocí kombinace uvedených základních prekoncentračních technik.

Autoři děkují záměru č. MSM 6198959216 a grantu FRVŠ G6 3044/2005 za finanční podporu.

LITERATURA

1. Simonet B. M., Rios A., Valcarcel M.: *Trends Anal. Chem.* 22, 10 (2003).
2. Li S. F. Y.: *Capillary electrophoresis – principles, practice and applications*. Elsevier, Amsterdam 1994.
3. Hjertén S., Jersted S., Tiselius A.: *Anal. Biochem.* 11, 219 (1965).
4. Quirino J. P., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 902, 119 (2000).
5. Chien R. L., Burgi D. S.: *Anal. Chem.* 64, 1046 (1992).
6. Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 902, 107 (2000).
7. Chien R. L., Burgi D. S.: *J. Chromatogr.* 559, 141 (1991).
8. Chien R. L., Burgi D. S.: *J. Chromatogr.* 559, 153 (1991).
9. Burgi D. S., Chien R. L.: *Anal. Chem.* 63, 2866 (1991).
10. Chien R. L., Helmer J. C.: *Anal. Chem.* 63, 1354 (1991).
11. Galli V., Barbas C.: *Anal. Chim. Acta* 482, 37 (2003).
12. Lohg Y. H., Hernandez M., Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Borrull F., Calull M., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr., B* 784, 255 (2003).
13. Wey B. A., Zhang C. X., Thormann W.: *J. Chromatogr., A* 853, 95 (1999).
14. Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T.: *J. Chromatogr., A* 1032, 193 (2004).
15. Quirino J. P., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 781, 119 (1997).
16. Burgi D. S., Chien R. L.: *J. Microcol. Sep.* 3, 199 (1991).
17. Chien R. L., Burgi D. S.: *Anal. Chem.* 71, 995 (1999).
18. Shihabi Z. K.: *J. Cap. Electrophor.* 2, 267 (1995).
19. Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 744, 231 (1996).
20. Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 781, 35 (1997).
21. Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 781, 491 (1997).
22. Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 817, 25 (1998).
23. Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J. L.: *J. Chromatogr., A* 757, 281 (1997).
24. Zhang C.-X., Thormann W.: *Anal. Chem.* 68, 2523 (1996).
25. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 72, 1242 (2000).
26. Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsuboty K., Chen D. D. Y., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1013, 65 (2003).
27. Britz-McKibbin P., Kranack A. R., Paprica A., Chen D. D. Y.: *Analyst* 123, 1461 (1998).
28. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 72, 1729 (2000).
29. Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y.: *Chromatographia* 57, 87 (2003).
30. Britz-McKibbin P., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1000, 917 (2003).
31. Wienberg R., Sapp E., Moring S.: *J. Chromatogr.* 516, 271 (1990).
32. Szucz R., Vindevogel J., Sandra P., Verhegen L. C.: *Chromatographia* 36, 323 (1993).
33. Farran A., Ruiz S., Serra C., Aguilar M.: *J. Chromatogr., A* 737, 109 (1996).
34. Wu H., Guan F., Luo Y.: *Sepe (Chinese J. Chromatogr.)* 13, 390 (1995).
35. Zhang C.-X., Thormann W.: *Anal. Chem.* 70, 540 (1998).
36. Quirino J. P., Terabe S.: *Science* 282, 465 (1998).
37. Quirino J. P., Terabe S.: *Anal. Chem.* 71, 1638 (1999).
38. Palmer J., Munro N. J., Landers J. P.: *Anal. Chem.* 71, 1679 (1999).
39. Kim J. B., Quirino J. P., Otsuka K., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 916, 123 (2001).
40. Quirino J. P., Terabe S., Otsuka K., Vincent J. B., Vigh G.: *J. Chromatogr., A* 838, 3 (1999).
41. Monton M. R. N., Quirino J. P., Otsuka K., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 939, 99 (2001).
42. Munro N. J., Palmer J., Stalcup A. M., Landers J. P.: *J. Chromatogr., B* 731, 369 (1999).
43. Otsuka K., Matsumura M., Kim J. B., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 979, 425 (2002).
44. Quirino J. P., Kim J.-B., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 965, 357 (2002).
45. Fang C., Liu J.-T., Lin C.-H.: *Talanta* 58, 691 (2002).
46. Otsuka K., Matsumura M., Kim J.-B., Terabe S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 1861 (2003).
47. Kim J.-B., Otsuka K., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 912, 343 (2001).
48. Lin C.-E., Liu Y.-C., Yang T.-Y., Wang T.-Z., Yang C.-C.: *J. Chromatogr., A* 916, 239 (2001).
49. Wu C.-H., Chen M.-C., Su A.-K., Shu P.-Y., Chou S.-H., Lin C.-H.: *J. Chromatogr., B* 785, 317 (2003).
50. Britz-McKibbin P., Otsuka K., Terabe S.: *Anal. Chem.* 74, 3736 (2002).
51. Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsubota K., Chen D. D. Y., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 1013, 65 (2003).
52. Stegehuis D. S., Irth H., Tjaden U. R., van der Greef J.: *J. Chromatogr., A* 538, 393 (1991).
53. Foret F., Szoko E., Karger B. L.: *Electrophoresis* 14, 417 (1993).
54. Foret F., Szoko E., Karger B. L.: *J. Chromatogr., A* 608, 3 (1992).
55. Stegehuis D. S., Tjaden U. R., van der Greef J.:

- J. Chromatogr., A 591, 341 (1992).
56. Hanna M., Simpson C., Perrett D.: J. Chromatogr., A 894, 117 (2000).
57. Everaerts F. M.: *Graduation Report*. University of Technology, Eindhoven 1964.
58. Everaerts F. M.: *Thesis*. University of Technology, Eindhoven 1968.
59. Martin A. J. P., Everaerts F. M.: Anal. Chim. Acta 38, 233 (1967).
60. Haglund H.: Sci. Tools 17, 2 (1970).
61. Simpson C. F., Whittaker M.: *Electrophoretic Techniques*. Academic Press, London 1983.
62. Everaerts F. M., Verheggen T. P. E. M., Mikkers F. E. P.: J. Chromatogr. 169, 21 (1979).
63. Bocek P., Deml M., Gebauer P., Dolnik V.: *Analytical Isotachopheresis*. VCH, Weinheim 1988.
64. Okamoto H., Okamoto Y., Hirokawa T., Timerbaev A. R.: Analyst 128, 1439 (2003).
65. Ito K., Ichihara T., Zhuo H. A., Kumamoto K., Timerbaev A. R., Hirokawa T.: Anal. Chim. Acta 497, 67 (2003).
66. Riaz A., Kim B., Chung D. S.: Electrophoresis 24, 2788 (2003).
67. Hirokawa T., Ichihara T., Ito K., Timerbaev A. R.: Electrophoresis 24, 2328 (2003).
68. Hirokawa T., Ichihara T., Timerbaev A. R.: J. Chromatogr., A 993, 205 (2003).
69. Auriola S., Thibault P., Sadvovskaya I., Altman E.: Electrophoresis 19, 2665 (1998).
70. Church M. N., Spear J. D., Russo R. E., Klunder G. L., Grant P. M., Andresen B. D.: Anal. Chem. 70, 2475 (1998).

J. Horáková, V. Maier, and J. Ševčík (*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*):
On-line Preconcentration Techniques in Capillary Electrophoresis

Preconcentration is a very important issue for achievement of low detection limits. Various on-line preconcentration modes, various electrolyte compositions, pH values and mechanisms responsible for the focusing effect are described in literature. The main modes of stacking, sweeping and transient isotachopheresis are discussed. Some of the described methods are combinations of major techniques of preconcentration and less known focusing techniques. References for optimization of focusing conditions and routine use of on-line preconcentration are given.