BIOMOLEKULÁK ANALÍZISE KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZISSEL – MÓDSZERTANI TANULMÁNYOK

PhD értekezés tézisei

Végvári Ákos

Program megnevezése:	Bioanalitika
Alprogram megnevezése:	Fehérje szerkezet és funkció
Alprogramvezető:	Dr. Belágyi József
Témavezető:	Dr. Kilár Ferenc

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Központi Kutatólaboratórium
2001

BEVEZETÉS

A kapilláris elektroforézis az elválasztástudományokban használt technikák közül az egyik legígéretesebb, amit a publikációk gyorsan növekvő száma és az évente tartott nemzetközi találkozók is bizonyítanak. Elméletileg bármilyen kémiai tulajdonságú molekula analizálható kapilláris elektroforézissel, töltött csakúgy mint semleges (ez utóbbi töltött molekulákkal történt komplexálódást követően). A technikát különböző területek (pl. a környezettudományok, a biokémia, a molekuláris biológia, a klinikai diagnosztika, a biotechnológia, az igaszságügyi orvostan) eredményesen hasznosítják. Az 1980-as években kereskedelmi forgalomban megjelent készülékekkel a kapilláris elektroforézis nem csupán a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia kiegészítő technikájaként nyert teret, de számos esetben ki is váltotta azt gyorsabb és jobb eredményeinek köszönhetően.

A folyadékkromatográfiához hasonlóan, a kapilláris elektroforézis is teljes automatizálást, közvetlen detektálást, valamint az elválasztott minta komponensek mennyiségi kiértékelését teszi lehetővé. További hasonlóságként említhető meg, hogy mindkét technika tökéletesen alkalmas preparatív célokra. Az elemezhető anyag mennyisége kisebb kapilláris elektroforézis esetén, de speciális technikákkal ezek a probléma is megoldhatók.

A klasszikus gél elektroforézissel ellentétben kapilláris elektroforézissel egyszerre csak egy minta elemezhető. Több kapillárist használva egyszerre, képalkotó vagy gyors lézer pásztázó detektálási módszerrel ötvözve a probléma leküzdhető. Az említett detektálási módok iránti érdeklődés rohamosan nőtt a Human Genome Project (HUGO) elindítása óta, amely a tervezettnél jóval korábbi befejezéséhez a kapilláris elektroforézis nagy felbontóképessége és gyors analízis ideje nagymértékben hozzájárult.

A technika alkalmazási területe nem korlátozódik csupán analitikai elválasztásokra, hanem segítségével molekulakölcsönhatások tanulmányozása, enzim kinetikai mérések, DNS topológia tanulmányok (azonos méretű molekulák eltérő sebességgel történő vándorolása gélben vagy polimer oldatban, azok különböző alakja miatt) is megoldhatók.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim céljai a következők voltak:

- A kapilláris elektroforézis technika felhasználási lehetőségeinek vizsgálata biomolekulák elválsztásában.
- A ligandumcserélő mechanizmus tanulmányozása szabad aminosavak kapilláris elektroforetikus és elektrokromatográfiás elválasztásában, újonan szintetizált ill. kémiailag aktivált királis szelektorok felhasználásával. Az elválasztási paraméterek vizsgálata és optimálása aminosavak enantiomerjeinek elválasztásában.
- Egy megfelelő pórusméretekkel és endozmotikus áramlás létrehozásához szükséges elegendő töltéssűrűséggel rendelkező homogén gélből álló, *in situ* polimerizált elektrokromatográfiás oszlop elkészítése, mely ribonukleozidok elválasztására alkalmas borátcsoportokat tartalmaz.
- Különböző pH tartományú, eltérő forrásból származó amfolit oldatokkal kialakított pH grádiensek vizsgálata, valamint diagnosztikailag fontos hemoglobin variánsok nagy felbontású elválasztása az általunk kidolgozott injektálási módot felhasznásával.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

LIGANDUMCSERÉS KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZIS

Enantimomerek elválasztását két eltérő módon végezhetjük, amelyeket *közvetlen* és *közvetett* enantiomer elválasztásnak neveznek. A közvetlen mód diasztereomer átmeneti komplexek kialakulását feltételezi az enantiomer és királis szelektor molekulák között. Közvetett enantiomer elválasztás esetén királis reagenssel kovalens kötéssel képződött diasztereomer termékek szeparációja történik.

A ligandumcserés mechanizmussal történő közvetlen enantiomer-elválasztás több komponensű kelátkomplexek képződésén alapszik. A komplexek centrális ionként pl. Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}-t tartalmaznak, melyekhez legalább két királis bifunkcionális

ligandum kapcsolódik. Keletkezésük pl. aminosavak (gyakorta prolin és hidroxiprolin) és réz vagy más nehézfémsó oldatok összekeverésével oldható meg. Az enantiomerek elválasztása a keletkező átmeneti komplex eltérő stabilitásán alapul. A minta és a szelektor molekulái koordinációs kovalens kötésekkel stabilizálódnak, de hidrofób, hidrogén, elektrosztatikus és Van der Waals kölcsönhatások is szerepet kaphatnak.

Szabad aminosavak enantiomerjeinek első közvetlen elválasztását L-prolin- és L-hidroxiprolin-Cu(II) komplexekkel sikerült megoldani. A ligandumcserés mechanizmust szabad aminosavak enantiomerjeinek elektroforetikus és elektrokromatográfiás elválasztásaiban tanulmányoztuk.

KAPILLÁRIS ELEKTROKROMATOGRÁFIA

A kapilláris elektrokromatogáfia sok szempontból hibrid elválasztási technika, ötvözi a nagy felbontóképességű kapilláris kromatográfia és elektroforézis előnyeit. Hidrodinamikus nyomás helyett az endozmozis által létrehozott folyadékáramot hasznosítjuk a mozgófázis elválasztási oszopon történő továbbítására. Az endozmózis a töltéssel rendelkező szilárd- és folyadékfázis határán (Helmholtz kettősréteg) keletkezik. Az elválasztási mechanizmus alapvetően a két fázis közötti különböző kromatográfiás kölcsönhatásokon alapul (pl. megoszlás). Ha a minta komponensek töltöttek, akkor vándorlásukat az elektromos erőtér is befolyásolja, azaz elektroforetikus elválasztás is történik. A kapilláris elektrokromatográfia ugyanazokat az állófázisokat kínálja mint hagyományos társa, a HPLC - amelyek változatos elválasztási mechanizmusa és szelektivitása széles alkalmazási lehetőségeket biztosít – nagy beruházási költségű pumpák nélkül. Hasonlóan a kapilláris elektroforézishez, kis belső átmérőjű (10-100 mm) oszlopok használhatók, ezzel is csökkentve a Joule hő okozta zónaszélesedést.

Az ún. nyitott csöves kapilláris elektrokromatográfiában az állófázis vékony rétegben a kapilláris belső falához van kötve. Más esetekben az oszlop általában szervetlen részecskékből (pl. szilika gyöngyök) álló állófázissal van töltve (töltött kapilláris elektrokromatográfia). Ezek az oszlopok nagyobb mennyiségű minta elválasztására képesek szemben a nyitott oszlopokkal, de a klasszikus kromatográfiás zónaszélesedési effektusok nagyobbak. További hátrány, hogy ilyen vékony oszlopok kisméretű részecskékkel való egyeneltes megtöltésére alkalmas módszer napjainkban nem létezik, frittekre és túlnyomásos kamrákra van szükség a töltet mozgása ill. a buborékképződés megakadályozására. Ezen problémák legtöbbje kiküszöbölhető polimer hálózatból felépülő

állófázisok (folytonos ágyak, másnéven monolitok vagy gélek) alkalmazásával. Az ilyen folytonos kromatográfiás ágy *in situ* készítése egyszerű, a töltet polimer láncokból felépülő, kisméretű (0.2-0.5 μm), kovalensen összekapcsolódó részecskékből áll. Ezek a folytonos hordozók számos kromatográfiás eljárásban, csakúgy mint legújabban az elektrokromatográfiában, sikeresen alkalmazhatók.

A polimer oldatok és gélek (pl. agaróz és poliakrilamid) állnak legközelebb az ideális kromatográfiás közeghez, mert ezek nem részecskékből épülnek fel, azaz fizikailag és makroszkóposan homogének, ami kis zónatorzulást jelent.

A homogén elválasztási közeg szemre áttetsző polimer hálózat, azaz az építőelemei nem elég nagyok ahhoz, hogy fénymikroszkóppal észlelhetők legyenek és/vagy nincs akkora fényszórásuk, hogy opálosak legyenek. Az agaróz gélek kis koncentrációkban enyhe opálosodást mutatnak, ami nagyobb koncentrációk esetén kifejezettebb.

KAPILLÁRIS IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS

Az izoelektromos fókuszálás olyan nagyfelbontóképességű technika, amely amfoter vegyületek (pl. fehérjék vagy peptidek) elválasztására alkalmas. Rutinszerűen alkalmazzák biológiai minták jellemzésére, fehérjetisztítási eljárások ellenőrzésére, fehérjék mikroheterogenitásának és stabilitásának elemzésére valamint fehérjék izoelektromos pontjának meghatározására. A kapilláris izoelektromos fókuszálás ötvözi a hagyományos gél izoelektromos fókuszálásnál tapasztalt nagy felbontóképességet automatizálással és mennyiségi kiértékelhetőséggel. Mivel az ömlesztett szilika kapillárisok belső fala negatívan töltött, endozmotikus áram jöhet létre. Ezért az első kapilláris izoelektromos fókuszálás kísérleteket semleges polimerrel (pl. lineáris poliakrilamid) bevont kapillárisokban végezték, amelyekben az endozmozis nem volt mérhető.

A módszer nagy felbontóképessége a fókuszáló hatásnak köszönhető. A nagyon magas elektromos térerő hatására néhány percen belül kialakul az egyensúly a pH grádiensen belül, míg a felbontás mértéke nem romlik.

Bevonatos kapillárisokban a fókuszálást követően a kialakult pH grádienst teljes hosszában el kell mozdítani az észlelési pont előtt egy második lépésben, hogy a zónák detektálhatók legyenek. Az ilyen két lépéses izoelektromos fókuszálás esetén két mobilizálási módszer ismeretes.

Az egy lépéses, ún. "dinamikus" izoelektromos fókuszálást bevonat nélküli kapillárisban végzik, melynek során a fehérjék elválasztása a pH grádiens endozmotikus vándorlása közben történik. A mintát és az amfolitokat egy zónaként injektálják a katolittal

előzetesen megtöltött kapillárisba. A pH grádiens kialakulása és a fókuszálás egyszerre történik, miközben a minta-amfolit zóna a detektálási pont felé vándorol. A metilcellulózt vagy hidroximetilcellulózt tartalmazó katolit oldat dinamikusan bevonatot képez a kapilláris falán, ezáltal csökkentve a fehérjék adszorpcióját és az endozmozis mértékét.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

TANULMÁNYOK KIS MÉRETŰ MOLEKULÁKKAL

*SZABAD α-AMINOSAVAK ENANTIOMERJEINEK ELVÁLASZTÁSA LIGANDUMCSERÉS KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZISSEL (**I.** CIKK)*

Szabad aminosavak enantiomerjeinek elválasztására új királis szelektort szintetizáltunk L-4-hidroxiprolinból, feltételezve, hogy a nitrogénatomhoz kapcsolt hosszú, hidrofób alkillánc javítja a felbontást. Az alkilcsoportot a hidroxiprolin aminocsoportja és egy epoxidvegyület közötti reakcióval nyertük. Elemanalízis, NMR és IR módszerek igazolták az új királis szelektor (*N*-(2-hidroxioktil)-L-4-hidroxiprolin) szerkezetét. A vegyület réz(II)-ionokkal alkotott kelátkomplexét foszfát oldatban használtuk.

Tizenhárom szabad aminosav enantiomerjeinek sikeres elválasztását oldottuk meg kapilláris elektroforézissel. A szelektor 10 m*M* koncentrációban elegendő volt valamennyi aminosav esetében. Már 0.03 % D-DOPA kimutatható volt L-DOPA-t tartalmazó mintában. A D-enantiomer hatástalan Parkinson-kór kezelésében, ennek következtében orvosi készítményekben nem kívánatos a jelenléte. A szelektor koncentrációjának növelésével nagyobb felbontást értünk el, de 8-10 m*M* érték felett a felbontás nem volt növelhető, ezért 10m*M*-os szelektor koncentrációt használtunk minden kísérletben.

Nagyobb elektrolit koncentrációk esetében egyre jobb felbontást kaptunk, de ugyanakkor a vándorlási idő jelentősen megnőtt. Szerves oldószer adagolásával nem értünk el további javulást a felbontásban. Az aminosavak izoelektromos pontja és az enantiomerjeinek optimális elválasztásához szükséges pH értéke között összefüggést állapítottunk meg.

*SZABAD α-AMINOSAVAK ENANTIOMERJEINEK ELVÁLASZTÁSA LIGANDUMCSERÉS KAPILLÁRIS ELEKTROKROMATOGRÁFIÁVAL (**II.** CIKK)*

Az újonnan szintetizált reaktív királis szelektort (*N*-(2-hidroxi-3-alliloxi-propil)-L-hidroxiprolin) *in situ* együtt polimerizáltuk semleges, töltéssel rendelkező és keresztkötő monomerekkel szabadgyökös mechanizmust alkalmazva. A polimerizáció során keletkező láncok hálózata kisméretű (0.2-0.5 μm) részecskéket hoz létre, amelyek kovalensen egymáshoz és a kapilláris falához vannak kötve. Az így összekapcsolódott részecskék elég nagyok, hogy permeabilitást és kis ellennyomást biztosítsanak. A mikrorészecskék durva felülete nagy felszínt és kapacitást eredményez. Mivel az endozmózist a szulfonsav csoportok töltései hozzák létre, annak sebessége független a mozgófázis pH-jától.

Kilenc α-aminosav enantiomerjeinek elektrokromatográfiás elválasztását sikeresen oldottuk meg reaktív L-hidroxiprolint használva szelektorként.

A DL-fenilalanint használva modelvegyületként, az endozmotikus, a hidrodinamikus és nyomással támogatott kombinált módokat hasonlítottuk össze. Az endozmotikus módban tapasztaltuk a legnagyobb felbontást, ugyanakkor az elválasztás hatékonysága hasonló volt az endozmotikus és hidrodinamikus eljárások esetén. Érdekes, hogy a nyomással támogatott kombinált módban mind a felbontás, mind a hatékonyság jobb volt a másik két esettel összevetve.

Az oszlop hosszának csökkentésével és a feszültség növelésével a nyomás segítette módban kaptuk a leggyorsabb elválasztást. A királis folytonos ágyak nagy töltéssűrűséggel bírnak, ami nagy endozmotikus áramlást hoz létre, ezért ugyanaz az oszlop folyadékkromatográfiás és elektrokromatográfiás eljárás esetén is használható.

A ligandumcserés kapilláris elektroforézist és elektrokromatográfiát összehasonlítva megállapítható, hogy mindkét módszer nagy szelektivitást és rövid analízis időt biztosít. Az elektroforetikus módban nagyobb felbontást értünk el viszonylag rövid vándorlási időket mérve, de a királis szelektor molekula hatékonyabb volt az elektrokromatográfiában használtnál. A mérési idők elektrokromatográfiás módban rövidebbek voltak, mivel az elektroforetikus és endozmotikus sebességeket az alkalmazott nyomás növelte.

*RIBONUKLEOZIDOK AGARÓZ ALAPÚ GÉLBEN TÖRTÉNŐ KAPILLÁRIS ELEKTROKROMATOGRAFIÁS ELVÁLASZTÁSA (**III.** CIKK)*

Ribonukleozidok elválasztására borátionokat biztosító csoportokat, a 3-aminofenilbórsav félszulfát és akriloil-klorid reakciójából kapott, aktív monomert használtunk. A szintetizált vegyületet akrilsavval szabadgyökös mechanizmussal együtt polimerizálva hosszúláncú polimert kaptunk.

A kapillárisokat forró agaróz és a polimert tartalmazó oldatok keverékével töltöttük fel, majd hűtés során gélesedést tapasztaltunk. Ezt a géllel töltött oszlopot 4-5 hetes időtartam alatt, teljesítményromlás nélkül tudtuk használni. Az elméleti tányérszám legtöbször elérte a 100-350 000 m^{-1} értéket.

Az új homogén gél tulajdonságainak tesztelésére elektrokromatográfiás kísérletekben az acetont (mint gyakori endozmózismarkert) vizsgáltuk frontanalízis módszerrel. A mért kísérleti varianciát összevetettük az Einstein-egyenlet alapján számolt elméleti diffúziós értékkel. Az utóbbi érték mindig nagyobb volt a kísérletekben kapott teljes zónaszélesedésnél. Az adatokból egyértelműen látható, hogy az aceton-zóna egyenletes határvonala a mérés során csak a longitudinális diffúzió által torzult, az Eddy-diffúzió nem volt mérhető.

Az oszlop szelektívitásátnak tesztelésére ribonukleozidokat használtunk, mert ultraibolya tartományban jól detektálhatók. Ezek a molekulák bázisaikban különböznek csupán. A gél borátcsoportjaival való kölcsönhatást az azonos cukor részek teszik lehetővé. A ribonukleozidok semlegesek pH 7,8-on, ezért vándorlásukat kizárólag a negatív akrilsav és borátcsoportok által létrehozott endozmotikus áramlás biztosítja. Négy ribonukleozid alapvonal elválsztását oldottuk meg.

A gél viszonylag kis pórusméreteinek következtében az átlagos idő, amíg a minta molekulái egyik kölcsönhatási helyről a következőig diffundálnak, kicsi (sokkal kisebb, mint töltött oszlopok esetében). Ez a van Deemter-egyenlet harmadik tagjának csökkenését eredményezi. Az elválasztott zónák észlelt szélességét a molekulák szilárd fázison töltött ideje, azaz a kölcsönhatás erőssége is meghatározza.

TANULMÁNYOK BIOPOLIMEREKKEL

*ÚJ INJEKTÁLÁSI MÓDSZER FEJLESZTÉSE HEMOGLOBIN VARIÁNSOK KAPILLÁRIS IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁSSAL TÖRTÉNŐ ANALÍZISÉHEZ (**IV.** CIKK)*

Az amfolitokat és a mintát egymást követő három lépésben, keverés nélkül injektáltuk úgy, hogy az amfolit oldat a mintát közrefogta. Ezt az injektálási eljárást "szendvics"-nek neveztük el. Azonos és különböző tipusú amfolit oldatokat használtunk, különböző hosszúságú zónákban. A kapilláris 20-30 %-át töltöttük meg a "szendvics" módszerrel. A minta komponenseinek izoelektromos fókuszálása feszültség hatására következett be, miközben a pH grádiens endozmotikusan a katód irányába vándorolt.

Kísérleteinkben aminometilált nitrofenolokat használtunk az injektálási módszer optimálására. A különböző cégektől származó és különböző pH tarományú tizenhat amfolit oldatban a festék molekulák jellegzetes elválasztási mintázattal fókuszálódtak, azaz a kialalkult pH grádiens mindig különböző volt.

Szűk és széles pH grádiensű amfolitokat hasonlítottunk össze. A legrosszabb felbontást alacsony, szűk tartományú (pH 3-5) amfolitokkal észleltük. Ennél jobb felbontást adtak a magasabb, szűk tartományú és a széles tartományú oldatok. A felbontás és a vándorlási idő is különböző volt azonos tartományú de eltérő eredetű amfolit oldatok esetén. Annak ellenére, hogy a festék molekulák izoelektromos pontjai nem mindig estek az adott amfolit biztosította pH tartományba, minden mérésnél sikeres volt az elválasztás. Ezekben az esetekben a zónák élesedés közben vándorolnak a grádiensben.

Különböző pH tartományú amfolitok kombinálásával a festékek jobb elválasztását értük el. A "szendvics" módszerrel kombinált szűk és széles pH tartományú amfolitok nagyobb felbontást eredményeztek mint ugyanazon amfolitok és a minta egyszerű injektálása. Lényegesen jobb felbontást kaptunk alacsonyabb (2 %) koncentrációjú amfolitok alkalmazásával. Két szűk pH tartományú amfolit oldat kombinálása hasonló jó elválsztást adott mint a széles pH tartományúak, annak ellenére, hogy nem mindegyik izoelektromos pont volt a tartományban.

A kereskedelmi hemoglobin készítmény valamennyi fő komponense esetében alapvonal elválasztást kaptunk. Ezeken a variánsokon kívül kis csúcsokat is kaptunk, amik valószínűleg a fehérjék glikozilált változatai lehettek. Az egészséges és diabeteszes vérből nyert hemoglobin mintákat nagy felbontással választottuk el a "szendvics" injektálási

módszer segítségével. A legnagyobb felbontást szűk és széles pH tartományú amfolitok kombinálásával értük el.

A "szendvics" módszer használata a következő előnyökkel jár: (1) egyszerű módját kínálja a különböző amfolitok kombinálásának, (2) a két amfolit zóna aránya egyszerűen változtatható, (3) a minta molekulái nem kerülnek kölcsönhatásba az amfolitokkal az injektálást megelőzően és (4) nagy felbontás érhető el a megfelelő amfoliltok kombinálásával.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A biomolekulák vizsgálatára módosított és kifejlesztett kapilláris elektroforézis módszerek a technika hasznosságát és alkalmazhatóságát bizonyították.

Az olyan kis méretű molekulákat, mint az aminosavak és ribonukleozidok, szabad zóna elektroforézissel és elektrokromatográfiában folytonos ággyal és egy új homogén géllel tanulmányoztuk. Mindegyik módszer kitűnt egyszerűségével: (1) a minta komponensei vizes oldatokban injektálhatók, (2) UV tartományban az oszlopon keresztül lehetett detektálni, (3) a szelektivitás nagy és (4) a szintézis egyszerű volt.

Kapilláris izoelektromos fókuszálással tanulmányoztuk a fehérjéket, mint a biopolimerek jellegzetes képviselőit. A bevonat nélküli kapillárisokban használt új injektálási eljárás nagy felbontást és megismételhetőséget biztosított, mint azt hemoglobin variánsok elválasztásával megmutattuk. A vizsgálatok kiterjedtek a pH grádiens kialakulására is, amit különböző amfolit oldatok esetén tanulmányoztunk.

A PhD ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

I. **Á. Végvári, M.G. Schmid, F. Kilár, G. Gübitz**
Chiral Separation of a-Amino Acids by Ligand-Exchange Capillary Electrophoresis Using *N*-(2-hydroxy-octyl)-L-4-hydroxyproline as a Selector *Electrophoresis* **1998**, 19, 2109-2111.

II. **M.G. Schmid, N. Grobuschek, C. Tuscher, G. Gübitz, Á. Végvári, E. Machtejevas, A. Maruška, S. Hjertén**
Chiral Separation of Amino Acids by Ligand-Exchange Capillary Electrochromatography Using Continuous Beds
Electrophoresis **2000**, 21, 3141-3144.

III. **S. Hjertén, Á. Végvári, T. Srichaiyo, H.-X. Zhang, C. Ericson, D. Eaker**
An Approach to Ideal Separation Media for (Electro)chromatography
J. Cap. Elec. **1998**, 5(1&2), 13-26.

IV. **F. Kilár, Á. Végvári, A. Mód**
New Set-up for Capillary Isoelectric Focusing in Uncoated Capillaries
J. Chromatogr. A **1998**, 813, 349-360.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A. Maruška, C. Ericson, **Á. Végvári,** S. Hjertén. (Normal-Phase) Capillary Chromatography Using Acrylic Polymer-Based Continuous Beds. *J.Chromatogr. A* (1999) **837:**25-33.

Á. Végvári, M.G. Schmid, F. Kilár, G. Gübitz. Alfa-aminosavak *N*-(2-hidroxi-oktil)-L-4-hidroxiprolin szelektorral végzett királis elválasztása ligandumcserélő kapilláris elektroforézissel. *Scientia Medica Hungarica* (2000 május) (Abstract)

Á. Végvári, A. Földesi, Cs. Hetényi, O. Kochegarova, M.G. Schmid, V. Kudirkaite, S. Hjertén. A New Easy-to-Prepare Homogeneous Continuous Electrochromatographic Bed for Chiral Recognition. *Electrophoresis* (2000) **21:**3116-3125.