



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0050059
B01D 15/08 (2006.01) (43) 공개일자 2007년05월14일

(21) 출원번호	10-2007-7005284	(87) 국제공개번호	WO 2006/017620
(22) 출원일자	2007년03월05일	(43) 공개일자	2006년02월16일
심사청구일자	없음		
번역문 제출일자	2007년03월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2005/027655		
국제출원일자	2005년08월02일		

(30) 우선권주장 10/914,005 2004년08월06일 미국(US)

(71) 출원인 다이오넥스 코포레이션
미국 94086 캘리포니아 쉐니베일 타이탄 웨이 1228

(72) 발명자 시에 샤오핑
미국 네브라스카주 68505 링컨 도슨 크리크 드라이브 8040
쉬 밍청
미국 네브라스카주 68505 링컨 바인 스트리트 넘버 57 6521
앨링턴 로버트 더블유.
미국 네브라스카주 68502 링컨 유클리드 애버뉴 2030

(74) 대리인 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 분리 시스템, 분리 시스템의 구성 요소, 및 이들의 제조방법 및 이용 방법

(57) 요약

본 발명의 모놀리스형 투과성 폴리머 재료는 칼럼 케이싱 내에서 제조된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 모놀리스형 투과성 폴리머 재료는, 중합용 혼합물 및 칼럼의 크기에 따라서, 외부 소스로부터 열을 가함으로써, 저온, 예컨대, 40℃에서 중합이 개시되고, 보다 높은 온도, 예컨대, 60℃에서 온도가 유지됨으로써, 중합된다. 상기 중합 개시 온도는, 발열 폭주 조건이 유발되지 않도록 하고, 상기 칼럼의 단면에서 실질적으로 일정하지 않은 온도가 얻어지게 하는 고열 반응이 수행되지 않도록 하기에 충분히 낮은 온도이다. 또한, 상기 보다 높은 온도 조건은 충분한 모노머의 고갈, 및 입체 장애도의 증가 이후에 이용되며, 이러한 높은 온도 조건에 의해, 기공 크기 균일도의 상당한 저하를 유발할 수 있는 수준의 높은 발열 반응이 수행되지 않도록, 상기 중합 반응은 충분히 느린 속도로 수행된다.

특허청구의 범위

청구항 1.

크로마토그래피 시스템으로서,

시료 주입기;

상기 시료 주입기로부터 주입된 시료를 수용하며, 칼럼 케이싱(casing), 및 상기 칼럼 케이싱 내부에 존재하는 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그를 포함하는 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼;

상기 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼 내에서 상기 시료를 소정의 성분들로 분리하기 위해, 상기 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼에 용매가 공급되도록, 상기 크로마토그래피 칼럼과 소통하는 용매 시스템; 및

상기 크로마토그래피 칼럼으로부터 배출되는 유체를 수용하기 위한 장치

를 포함하며,

상기 칼럼 케이싱은 내부의 칼럼벽 표면을 가지는 칼럼 케이싱벽을 포함하고,

상기 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

불연속성(discontinuity)을 가지지 않고 평탄한 벽을 가지고 있으며, 상기 칼럼벽의 내표면과 접촉하며, 온도-시간이 적절하게 제어(temperature-time moderation)되는

것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼이,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그 중 하나의 플러그 내부에 온도 측정 장치를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가 디비닐벤젠을 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가,

소수성 표면 작용기를 가지는 글리시딜 메타크릴레이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가, 요소 포름알데하이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 6.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가 실리카를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 7.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 칼럼 케이싱이 유리인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도-시간이 적절하게 제어되는, 하나 이상의 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가 크기 보상형(size-compensation)인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 시스템.

청구항 9.

크로마토그래피의 수행 방법으로서,

칼럼 케이싱, 및 모놀리스형 폴리머 충전재를 가지는 크로마토그래피 칼럼에 시료를 제공하는 단계; 및

상기 크로마토그래피 칼럼에 용매를 공급함으로써, 상기 크로마토그래피 칼럼 내에서 상기 시료를 소정의 성분들로 분리하는 단계

를 포함하며,

상기 충전재는 발열 반응에 의해 야기되는 불균일한 기공 크기를 실질적으로 가지지 않으며,

상기 모놀리스형 폴리머 충전재는 온도-시간이 적절하게 제어되는

것을 특징으로 하는 수행 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서,

상기 칼럼 케이싱, 및 모놀리스형 폴리머 충전재를 가지는 크로마토그래피 칼럼에 시료를 제공하는 단계가,

크기 보상형 크로마토그래피 칼럼에 상기 시료를 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수행 방법.

청구항 11.

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 칼럼 케이싱, 및 모놀리스형 폴리머 충전재를 가지는 크로마토그래피 칼럼에 시료를 제공하는 단계가,

비닐기를 가지는 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그에 상기 시료를 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수행 방법.

청구항 12.

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 칼럼 케이싱, 및 모놀리스형 폴리머 충전재를 가지는 크로마토그래피 칼럼에 시료를 제공하는 단계가,

요소 포름알데하이드를 가지는 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그에 상기 시료를 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수행 방법.

청구항 13.

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 칼럼 케이싱, 및 모놀리스형 폴리머 충전재를 가지는 크로마토그래피 칼럼에 시료를 제공하는 단계가,

실리카 폴리머를 가지는 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그에 상기 시료를 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수행 방법.

청구항 14.

크로마토그래피 칼럼으로서,

내부의 칼럼벽, 및 상기 칼럼벽 내부에 존재하는 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그를 가지는 크로마토그래피 칼럼 지지체를 포함하며,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

분리에 효과적인 오프닝을 가지며,

온도-시간의 적절한 제어 하에 중합함으로써 얻어지는 단면 균일성을 가지는

것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 15.

제14항에 있어서,

상기 분리에 효과적인 오프닝의 크기가, 중합 반응 동안 압력에 의해 적어도 부분적으로 제어되는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 16.

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가,

평탄한 벽을 가지고 있으며, 압력에 의해 크기가 보상된 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 17.

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는

내부에 실질적으로 기공을 포함하지 않으며, 평탄한 벽을 가지는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 18.

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그가,

상기 플러그의 벽에 채널형 오프닝(channeling opening)을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 19.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

메타크릴레이트가 주성분으로서 구성된 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 20.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

소수성 표면 작용기를 가지는 메타크릴레이트가 주성분으로서 구성된 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 21.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

요소 포름알데하이드가 주성분으로서 구성된 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 22.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

실리카가 주성분으로서 구성된 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 23.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

글리시딜 메타크릴레이트 폴리머와 에틸렌 디메타크릴레이트 폴리머가 1:1 내지 2:1의 중량비로 주성분을 구성하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 24.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

글리시딜 메타크릴레이트 폴리머와 에틸렌 디메타크릴레이트 폴리머가 3:2의 중량비로 주성분을 구성하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 25.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

디비닐벤젠과 스티렌이 3:1 내지 9:1의 비율로 혼합된 혼합물을 주성분으로서 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 26.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는,

디비닐벤젠과 스티렌이 4:1의 비율로 혼합된 혼합물을 주성분으로서 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 27.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 칼럼이 35 중량% 내지 80 중량%의 디비닐벤젠을 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 28.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 칼럼이 64 중량%의 디비닐벤젠을 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 29.

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 칼럼이,

내부에 온도 측정 장치를 가지는 폴리머 플러그를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 30.

제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

직경이 10 mm보다 큰 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 31.

제14항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

1 mm 당, 상기 기공의 부피, 및 상기 칼럼의 길이 방향에서의 상기 기공의 평균 크기가,

위치에 따라 변화하지 않으며, 그 변화율은 5% 이하인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼.

청구항 32.

크로마토그래피 칼럼 제조용 장치로서,

중합하는 동안 중합용 혼합물을 수용하기에 적절하며, 온도가 제어되는 반응 체임버(chamber), 및

중합하는 동안, 온도를 변화시키기 위한 수단을 포함하며,

상기 중합용 혼합물의 온도-시간이 적절하게 제어되는

것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼 제조용 장치.

청구항 33.

제32항에 있어서,

상기 온도가 제어되는 반응 চে임버 내에 상기 중합용 혼합물을 가압하기 위한 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 34.

제33항에 있어서,

상기 가압 수단이 이동 가능한 부재를 가지는 가압 수단인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 35.

제34항에 있어서,

상기 이동 가능한 부재가,

중합하는 동안 압력을 가할 때, 상기 중합용 혼합물과 접촉하도록 위치하는 평탄한 표면을 가지는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 36.

크로마토그래피 칼럼 제조용 장치로서,

플러그를 제조하기 위해 중합하는 동안, 중합용 혼합물을 수용하기에 적절하며, 온도가 제어되는 반응 চে임버;

상기 플러그에 수용액을 적용하기 위한 수성 처리 수단; 및

상기 플러그 중의 보이드를 감소시키기 위해 상기 플러그에 압력을 가하기 위한 수단

을 포함하며,

상기 온도가 제어되는 반응 চে임버는 온도-시간을 적절히 제어하기 위한 수단을 포함하는

것을 특징으로 하는 크로마토그래피 칼럼 제조용 장치.

청구항 37.

제36항에 있어서,

상기 플러그에 방사선을 조사하기 위한 수단; 및

상기 방사선 조사량을 제어하기 위한 수단

을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 38.

중합용 혼합물을 칼럼 케이싱에 넣는 단계, 및

저온 중합 및 고온 중합 반응의 조합을 이용하여, 상기 칼럼 케이싱에 수용된 상기 중합용 혼합물을 중합하는 단계를 포함하는

것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서,

상기 중합용 혼합물을 상기 칼럼 케이싱에 넣는 단계가,

직경이 10 mm 이상인 칼럼 케이싱 내에 상기 중합용 혼합물을 넣는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.

중합용 혼합물을 칼럼 케이싱에 넣는 단계; 및

상기 혼합물을 직접 중합함으로써, 강한 양이온 교환기를 제공하는 단계를 포함하며,

상기 중합용 혼합물이, 설폰기를 함유하는 관능성 모노머를 포함하는

것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.

제40항에 있어서,

상기 중합용 혼합물을 상기 칼럼 케이싱에 넣는 단계가,

상기 중합용 혼합물 중의 폴리머를 가수분해한 다음, 얻어진 하이드록시기를 클로로설폰산을 이용하여 개질하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제40항 또는 제41항에 있어서,

상기 중합용 혼합물을 칼럼 케이싱에 넣는 단계가,

상기 중합용 혼합물 중의 폴리머를 가수분해한 다음, 얻어진 하이드록시기를 클로로설폰산의 피리딘염 용액을 이용하여 개질하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

모놀리스형 크로마토그래피 칼럼의 제조 방법으로서,

온도 구배에 의해 모놀리스형 크로마토그래피 칼럼의 공간 단면 변화가 억제되도록, 온도-시간이 적절히 제어되는 조건 하에 중합하는 단계를 포함하는

것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 44.

제43항에 있어서,

충분한 압력을 가하여, 중합하는 동안 수축으로 인해 발생하는 진공에 의한 보이드의 생성이 억제되도록, 상기 중합을 압력 하에 수행하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 45.

온도-시간을 적절히 제어하면서, 포로젠을 포함하는 중합용 혼합물을 중합함으로써, 폴리머 플러그를 형성하는 단계;

형성된 폴리머 플러그를 세척하여, 팽윤하는 경향이 있는 포로젠을 제거하는 단계; 및

상기 폴리머 플러그가 팽윤되는 것을 억제하고, 보이드를 제거하기 위해, 가압하는 단계

를 포함하는 모놀리스형 크로마토그래피 칼럼의 제조 방법.

청구항 46.

GMA, ATMS, EDMA, 개시제, 및 포로젠을 혼합하여, 중합용 혼합물을 형성하는 단계; 및

칼럼 내에서 온도-시간이 적절하게 제어되는 조건 하에 상기 혼합물을 중합하는 단계

를 포함하는 강한 음이온 칼럼의 제조 방법.

청구항 47.

제46항에 있어서,

상기 혼합물의 중합 단계가,

저온의 제어 개시점(control initiation point)에서 시작하여, 안전점(safe point)으로 온도가 점진적으로 증가되는 온도 구배 하에 상기 혼합물을 중합시킨 다음, 폭주(run-away)가 일어나지 않으며, 적절한 중합 및 가교가 얻어지는, 상기 안전점보다 높은 고온에서 경화시키는 단계를 포함하는

것을 특징으로 하는 강한 음이온 칼럼의 제조 방법.

청구항 48.

제46항 또는 제47항에 있어서,

상기 혼합물의 중합 단계가,

33 내지 45℃ 범위의 제어 개시점에서 시작하여, 안전점으로 온도가 점진적으로 증가되는 온도 구배 하에 상기 혼합물을 중합시킨 다음, 상기 안전점보다 높은 고온에서 경화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 강한 음이온 칼럼의 제조 방법.

청구항 49.

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 혼합물의 중합 단계가,

상기 제어 개시점에서 시작하여, 안전점으로 온도가 점진적으로 증가되는 온도 구배 하에 상기 혼합물을 중합시킨 다음, 상기 안전점보다 높은 고온에서 경화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 강한 음이온 칼럼의 제조 방법.

명세서

기술분야

본원은, Robert W. Allington, Shaofeng Xie, Tao Jiang, 및 Mingcheng Xu의 명의로, 2003년 6월 25일에 "SEPARATION SYSTEM, COMPONENTS OF A SEPARATION SYSTEM AND METHODS OF MAKING AND USING THEM"을 발명의 명칭으로 하여 출원된 미국특허출원 제10/607,080호의 일부 계속 출원이며, '080 출원은 Shaofeng Xie 및 Robert W. Allington의 명의로, 2002년 6월 26일에 "SEPARATION SYSTEM, COMPONENTS OF A SEPARATION SYSTEM AND METHODS OF MAKING AND USING THEM"을 발명의 명칭으로 하여 출원된 미국특허출원 제10/180,350호의 일부 계속 출원이다.

본 발명은 분리 시스템, 및 상기 분리 시스템의 구성 요소에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 모놀리스형(monolithic) 투과성 폴리머 재료를 포함하는 분리 시스템, 및 그의 구성 요소에 관한 것이다.

배경기술

매크로포어(macropore)를 가지는 모놀리스형 재료, 예컨대, 매크로포어를 가지는 모놀리스형 유기 폴리머 재료 및 모놀리스형 실리카 충전재는 크로마토그래피 시스템 또는 추출 시스템과 같은 분리 시스템의 구성 요소로서 알려진 물질이다. 이러한 물질은 매크로포어를 가지는 모놀리스형 폴리머 플러그 또는 고상 지지체(solid support)로서 형성되며, 적어도 포로젠(porogen)을 포함하는 중합용 혼합물 중의 하나 이상의 모노머를 중합함으로써 제조된다. 경우에 따라서, 기공도(porosity), 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포, 및 기타 특성을 제어하기 위하여 중합용 혼합물에 그 밖의 성분으로서, 가교제; 촉매; 및 중합 후에 용해될 수 있는 가용성 소형 폴리머를 추가하는 기법이 알려져 있다. 아울러, 중합된 플러그를 개질하기 위해 상기 플러그에 작용기를 부가할 수도 있다.

통상적으로, 상기 플러그 또는 고상 지지체는 크로마토그래피 칼럼 또는 가압 용기와 같은 하우징(housing) 중에 수용된다. 상기 플러그가 수용되는 하우징의 일부는 반응기로서 작용한다. 종래 기술에 따른 모놀리스형 칼럼의 한 제조 방법에 따르면, 중합용 혼합물을 칼럼 케이싱(column casing)에 넣고, 상기 칼럼 케이싱 내에서 중합 반응을 개시함으로써, 상기 칼럼의 벽 안쪽에, 매크로포어를 가지는 폴리머 플러그 또는 고상 지지체를 형성할 수 있다.

이러한 플러그 또는 고상 지지체의 용도는 기체, 액체, 및 초임계 유체 크로마토그래피, 막 크로마토그래피 및 여과, 고상 추출, 촉매 반응기, 고상 합성(solid phase synthesis) 등을 비롯하여 광범위하다. 상업적 용도를 고려할 때, 상기 플러그 또는 고상 지지체가 수용되는 칼럼 또는 그 외 용기의 효율, 분리에 소요되는 시간, 및 상기 칼럼 또는 그 외 용기의 재현성(reproducibility)은 중요한 인자들이다. 예컨대, 다공성 폴리머가 수용되는 분리 시스템의 효율은, 상기 칼럼, 또는 매크로포어를 가지는 폴리머 재료를 함유하는 그 밖의 구성 요소의 선택도; 및 영역 확대(zone spreading)와 관련이 있다. 전술한 인자들 중 몇몇 인자는 분리 공정을 수행하는 동안 상기 플러그 또는 고상 지지체에서의 이동상의 속도, 및 분자의 확산에 따라 영향을 받는다.

분자의 확산 및 이동상의 속도가 칼럼의 효율에 미치는 영향에 대해서는, 이들 인자들이 칼럼의 효율을 대표하는 값인 HETP(Height Equivalent to Theoretical Plates)에 미치는 영향을 확인함으로써, 부분적인 설명이 가능하다. 하기 van Deemter 식은 H(HETP)를 영역 확대와 유속과 확산의 관계식 나타낸 식으로서, H값이 낮을수록, 칼럼의 효율이 높다:

$$H = A + B/u + C/u$$

(상기 식에서, u는 이동상의 유속이고, A는 방사형 Eddy 확산 계수이고, B는 길이 방향 분자 확산 계수이며, C는 질량 이동 계수임).

분자의 확산은 분자들 각각의 확산에 따라 좌우되며, 베드(bed)의 충전에 따른 영향은 받지 않는다. Eddy 확산은 상기 입자의 충전 균질성의 영향을 받는다.

질량 이동에 의해 나타나는 영역 확대는 비(非)다공성 입자, 및 1.5 μm 보다 작은 크기를 가지는 다공성 입자를 이용하여 최소화할 수 있다. 정제 공정에서는 샘플의 충전률이 높아야 하는데(분석 공정과는 반대임), 비다공성 입자를 이용하여 충전하는 경우에는 이러한 비다공성 충전물이 제공하는 표면적이 상당히 작기 때문에, 정제 공정을 수행하기에 바람직하지 않다. 또한, 상당히 작은 크기의 충전 입자를 이용하는 경우에는 고압을 가해야 하고, 분리 공정을 저속에서 수행해야 하는데, 현재 통용되는 기기를 이용해서는 고압을 가하기 어려우며, 저속 수행으로 인해 분리에 소요되는 시간(경우에 따라서, H/min으로 표시함)이 길어질 수 있다.

한편, 매크로포어를 가지는 모놀리스형 폴리머 플러그 또는 고상 지지체를 구성 요소로서 포함하는 종래의 분리 시스템에서는 상기 플러그 또는 고상 지지체로서, 바람직한 크기보다 크고, 균일성이 작으며, 마이크로포어(micropore)를 가지는 폴리머 입자로부터 생성된 것을 이용한다. 종래 기술에 따르면, 이러한 폴리머 입자는 크기가 크고, 균일성이 불량하기 때문에, 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포가 불균일하게 나타난다. 또한, 전술한 van Deemter 식으로부터, 종래의 시스템에 이용되는 다공성 폴리머의 경우에는 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포가 불균일하기 때문에, 영역 확대가 대규모로 나타난다는 것을 확인할 수 있다. 아울러, 시료가 마이크로포어에 의해 포획되어, 시료가 포획된 상태가 잠시 동안 유지되기 때문에, 영역이 확장된다. 이는 통상적으로, 상기 마이크로포어의 안팎, 및 정지상과 이동상 사이의 비(非)평형 질량 이동이라고 칭할 수 있다.

종래 기술에 따른 다공성 폴리머로 이루어진 플러그 또는 고상 지지체는 분리에 효과적인 오프닝 크기 균일도가 낮으며, 바람직하지 않은 표면 특성을 가지고, 외벽에 벽 효과(wall effect)에 의해 생성된 보이드(void)를 가지기 때문에, 분리 시스템에 이용하는 경우, 영역 확대도가 크고, 낮은 효율이 얻어진다.

또한, 종래 기술에 따른 몇몇 다공성 폴리머를 이용하는 경우, 중합하는 동안 발생하는 폴리머의 수축, 및 중합 후에 발생하는 폴리머의 수축과 관련된 문제가 해결되지 않는다. 중합하는 동안 폴리머의 수축이 나타나는 이유는, 중합용 액상 혼합물 중에 모노머가 무작위하게 분포되어 있고, 상기 폴리머는 규칙적인 구조를 가지는 모노머로 구성되어 있기 때문이다. 따라서, 대부분의 중합 반응에 있어서, 상기 폴리머들의 부피는 혼합된 모노머들의 부피보다 작다. 전술한 종래의 모든 폴리머의 제조 방법에서는 중합하는 동안 이러한 수축 문제가 나타난다. 한편, 중합 후에 폴리머의 수축이 나타나는 이유는, 높은 친수성을 가지는 수성 이동상, 또는 고극성을 가지는 그 밖의 이동상, 예컨대, 유기 용매의 함량이 5~8% 미만인 액상 혼합물과, 높은 친수성을 가지는 폴리머 지지체 간의 불화합성(incompatibility) 때문이다.

중합하는 동안, 분리 시스템, 및 상기 시스템의 구성 요소에 이용되는 다공성 재료의 수축으로 인해, 상기 다공성 폴리머의 표면 상에 불균일한 보이드가 얻어지며, 상기 폴리머에 분포하는, 분리에 효과적인 오프닝의 크기가 불균일해짐으로써, 칼럼의 효율 및 제조 방법의 재현성에 바람직하지 않은 영향을 끼친다. 벽 효과에 의해 칼럼 효율이 저하되는 까닭은, 벽 효과에 의해 시료가 벽 채널을 통해 유동하여, 분리용 매질을 우회하기 때문이다. 또한, 벽 효과에 의해 전술한 제조 방법의 재현성이 감소하는 이유는 벽 효과에 의한 영향이 나타나는 위치와 정도를 칼럼마다 예측할 수 없기 때문이다.

전술한 종래 특허 문헌에 기재된, 큰 채널을 가지는 칼럼은 표면적 및 용량이 작다. 이처럼 용량이 작은 칼럼은 시료의 충전도가 높아야 하는 정제 공정에 이용하기에는 바람직하지 않다. 종래에, 전술한 수축 문제를 해결하기 위해 적절한 액상 혼합물의 개발에 많은 노력과 시간, 및 비용을 들였지만, 결과적으로는 칼럼 용량의 저하가 나타났다.

종래 기술에 따라 제조된 칼럼은 전술한 현상 및/또는 결점으로 인해, (1) 비드가 충전된 칼럼 시판품보다 작거나, 불량한 분해능(resolution)을 가지고, (2) 전술한 방법에 따라 분리 시, 특히, 대형 분자를 분리하는 데 있어서, 실리카 비드 또는 폴리머 비드가 충전된 종래의 칼럼에 비해 분해능 및 속도가 상당히 낮거나 바람직하지 않으며, (3) 다양한 형태와 크기를

가지는 불규칙한 입자의 충전에 의해 넓은 기공 분포가 얻어지기 때문에, 칼럼의 효율이 저하되고, (4) 전술한 재료에 있어서 입자 크기 및 형태의 불균일로 인한 넓은 기공 분포에 의해 영역 확대가 크게 나타나고, (5) 상기 재료가 가지는 다량의 마이크로포어에 의해서도 영역 확대가 크게 나타나며, (6) 상기 칼럼에 사용되는 재료의 수축에 의해 상기 칼럼의 효율이 저하된다는 문제점이 있다.

미국특허 제5,453,185호에는 상기 모노머의 일부를 대신해 불용성 폴리머를 이용하여, 중합용 혼합물 중의 모노머의 함량을 감소시킴으로써, 상기 중합용 혼합물의 수축도를 저하시키는 방법이 제안되어 있다. 그러나, 전술한 특허문헌에 따르면, 폴리머의 수축도를 저하할 수는 있지만, 다량의 관능성 모노머(functional monomer)를 이용해야 하는 칼럼의 용량 및 머무름 용량(retention capacity)이 바람직하지 않게 된다. 한편, 종래의 특허문헌에는, 칼럼의 효율 및 제조 방법의 재현성에 바람직하지 않은 요소들, 즉, 폴리머의 수축이 칼럼의 분해능에 미치는 바람직하지 않은 영향, 및 그로 인해 다공성 폴리머의 표면에 생성되는 불규칙한 보이드, 및 상기 폴리머에 분포된 분리에 효과적인 오프닝의 불균일성에 대해서는 언급되어 있지 않다.

유럽특허 제1,188,736호에는, 한쪽 단부는 밀폐되고 다른 쪽 단부는 개방된 폴리테트라플루오로에틸렌 튜브 내에서 모노머, 가교제, 포로젠계 용매(porogenic solvent), 및 개시제를 인-시투 공중합(in-situ copolymerization)시킴으로써, 다공성 폴리(에틸렌 글리콜 메타크릴레이트-co-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)를 제조하는 방법에 대해 기재되어 있다. 이렇게 하여 얻어진 칼럼은 기체-액체 크로마토그래피용으로서 이용된다. 그러나, 전술한 유럽특허문헌에 기재된 제조 방법에 따르면, 부분적인 이유로, 개방된 단부를 가지는 플라스틱 튜브 중에서 폴리머를 중합하기 때문에, 실제 용도에 적합한 특성을 가지는 재료가 얻어지지 않으므로 바람직하지 않다.

한편, 미국특허 제2,889,632호, 미국특허 제4,923,610호, 및 미국특허 제4,952,349호에는 2개의 플레이트 및 세퍼레이터를 포함하며, 실링된 장치 중에서, 매크로포어를 가지는 막을 제조하는 방법에 대해 기재되어 있다. 전술한 방법에 따르면, 바람직한 막형 지지체를 다공성 폴리머 시트의 박막으로부터 천공한 다음, 상기 지지체가 적절한 작용기를 가지도록 개질시킨다. 다공성 시트막은 "막 분리"용 지지 장치 내에 고정된다. 전술한 미국특허문헌들은 유럽특허 제1,188,736호에 기재된 방법을 다공성 막의 제조, 및 막 분리용 용도로서 실제 이용하기 위한 기법의 개발에 확대하여 응용한 것이다. 전술한 미국특허문헌에 기재된 방법에 따라 얻어진 재료는 2 nm 미만의 크기를 가지는 마이크로포어부터 큰 크기를 가지는 포어를 포함하는, 매크로포어를 가지는 막이다. 상기 폴리머 입자는 0.5 μm 보다 작은 크기를 가진다. 막 분리에서의 분리 메카니즘은 종래의 액체 크로마토그래피의 메카니즘과는 상이하다.

전술한 미국특허문헌에 따라 제조된 다공성 재료는 (1) 막이 얇기 때문에 머무름 인자(retention factor: Rf)가 제한되며, (2) 전술한 입자에 의해 형성되는 기공은 크기가 작으며, 각각의 막의 두께보다 훨씬 긴 길이의 베드를 가지는 액체 크로마토그래피 칼럼과 함께 이용되는 경우, 높은 유속에서 사용될 수 없다는 문제점이 있다. 상기 마이크로포어 및 그 밖의 트랩핑 포어(trapping pore)는 분리될 분자를 포획하여, 영역 확대를 유발한다. 여기서, "트랩핑 포어"란, 영역 확대를 유발하는 기공, 예컨대, 분리가 진행되고 있는 기공보다 약간 큰 크기부터, 분리가 진행되고 있는 기공 직경의 7배 크기에 이르는 크기의 범위를 가지는 기공을 의미한다.

미국특허 제5,334,310호; 미국특허 제5,453,185호; 및 미국특허 제5,728,457호에는 각각, 실링된 칼럼 내에서 매크로포어를 가지는 폴리(글리시딜 메타크릴레이트-co-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)폴리스티렌을 제조하는 방법에 대해 기재되어 있다. 전술한 특허 문헌에 기재된 방법은 유럽특허 제1,188,736호, 및 미국특허 제2,889,632호, 미국특허 제4,923,610호, 및 미국특허 제4,952,349호에 기재된 방법을 단백질 분리용 액체 크로마토그래피 칼럼의 제조에 확대 응용한 방법이다. 미국특허 제5,334,310호; 미국특허 제5,453,185호; 및 미국특허 제5,728,457호에는, 비드가 충전된 종래의 칼럼의 틈새 부피(interstitial volume)를 제거함으로써 칼럼 효율을 향상시킬 수 있다고 기재되어 있다. 전술한 미국특허 문헌에 따라 제조된 플러그는 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 가지며, 상기 오프닝 크기 분포는 포로젠의 타입 및 함량, 모노머, 및 중합 온도에 의해 제어된다. 상기 매크로포어를 가지는 폴리머는 다양한 크기를 가지는 복수의 입자들이 상호 결합되어 있는, 복수의 회합체(aggregate)로 구성되며, 이러한 입자들은 상기 회합체들 사이에, 이동상을 수송하기 위한 큰 크기의 기공 채널을 형성한다. 전술한 회합체 또는 클러스터의 사이에는 분리용 소형 기공이 존재한다. 상기 소형 기공은 조밀하게 충전된 약 100~300 nm 크기의 초소형 입자로부터 생성된다.

전술한 미국특허문헌들에 따라 제조된 재료를 이용하는 경우에는 상기 입자들 내부, 또는 입자들 사이의 마이크로포어 중에 서로 분자가 물리적으로 포획되기 때문에, 분리능이 저하된다는 문제점이 있다. 또한, 전술한 특허문헌에 따르면, 비드가 충전된 베드에서와 마찬가지로, 모놀리스형 매질 중에 틈새 공간이 존재하지 않는다고 기재되어 있지만, 실제로는 상기 회합체와 상기 상호 결합되어 있는 입자 사이에 존재하는 큰 크기의 채널에 의해, 종래의 비드가 충전된 칼럼에서의 비드

사이에 존재하는 틈새 부피로 인한 문제와 같은 문제가 나타난다. 좁은 입자 크기 분포를 가지는 경우에도, 다양한 크기의 회합체 또는 클러스터로부터 생성되는 큰 크기의 채널은 불균질하며, 불규칙한 틈새 공간을 제공한다. 이러한 불규칙한 틈새 공간으로 인해, 불량한 칼럼 효율이 얻어진다.

미국특허 제5,334,310호; 미국특허 제5,453,185호, 및 제5,728,457호에는 제곱 마이크로미터에서부터 제곱미터 단위의 단면적을 가지는 칼럼 내에서 분리용 매질을 제조하는 방법에 대해 기재되어 있다. 전술한 특허문헌에 기재된 제조 방법 역시 문제점이 있다. 전술한 특허문헌의 발명자들은 그 문제점에 대해 *Chemistry of Materials*, 1997, 9, 1898에서 논의한 바 있다.

그 중 주된 문제점은, 전술한 방법에 따라 제조된 대직경(26 mm I.D.) 칼럼은 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포가 대단히 불균일하기 때문에, 크로마토그래피에 의한 분리에는 적절하지 않다는 점이다. 이러한 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포의 불균일성은 중합 시의 발열, 폴리머의 단열 효과, 열 전달 불가, 개시제 분해의 자체적인 촉진, 및 26 mm 직경의 몰드 중에서 아조비스이소부티로니트릴을 개시제로서 이용함으로써, 빠른 속도로 방출되는 질소 오염물에 의해 얻어지는 것이다. 중합 시의 발열 및 열 전달 상의 문제에 의해 칼럼 내부의 온도 증가 및 온도차가 발생하기 때문에, 대직경 몰드, 예컨대, 15 mm보다 큰 직경을 가지는 몰드에서는 중합 반응이 촉진되고, 칼럼의 중앙부와 칼럼의 외벽 사이에 온도 구배가 나타남으로써, 불균일한 구조가 얻어진다. 전술한 문제점을 해결하기 위한 방법으로서, 중합용 혼합물을 서서히 부가하는 방법이 제안된 바 있다. 그러나, 이러한 방법은 부분적인 해결 방법일 뿐, 완전한 해결 방법은 아니다. 뿐만 아니라, 대직경 칼럼에서의 온도 구배 문제가 해결되지 않았기 때문에, 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포가 불균일하다는 문제점이 있다.

전술한 문제점은 *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 5693에 공개된 계산식으로부터 이론적으로 입증될 수 있다. 전술한 논문에 따르면, 얇은 실린더를 적층하여, 방사형 유동 크로마토그래피용 대직경 칼럼을 제조함으로써, 모듈러 접근법(modular approach)을 이용한 해결 방법이 제안되어 있다. 그러나, 연속적인 플러그를 형성하기 위해 디스크 사이를 실링하는 것이 어렵고, 시간 소요가 크다는 단점이 있다.

미국특허 제5,334,310호, 미국특허 제5,453,185호, 미국특허 제5,728,457호에는, 약한 음이온 교환기 및 역상 칼럼의 재료가 기재되어 있다. 전술한 특허문헌에 따라 제조된 약한 음이온 교환기는 분해능, 용량, 및 강도가 낮고, 분리 속도가 느리며, 재현성이 대단히 불량하다는 단점이 있다. 아울러, 전술한 특허문헌들에 따른 역상 매질은 상당히 작은 용량, 불량한 분해능, 및 대단히 불량한 재현성을 가진다. 이러한 매질은 벽 채널링 효과(wall channeling effect), 즉, 소수성이 큰 매질이 고극성 이동상 중에서 수축함으로써 유발되는 효과가 나타나기 때문에, 수분 함량이 높은 이동상, 예컨대, 물 중의 8% 미만의 아세토니트릴에는 이용될 수 없다. 또한, 이러한 매질은 분리 공정을 수행하는 동안 압축(compression)됨으로써, 칼럼의 헤드에 과도한 보이드 부피가 얻어진다. 전술한 특허문헌에서는, 약한 양이온 교환기, 강한 양이온 교환기, 강한 음이온 교환기, 정상상 매질(normal phase media), 및 소수성 상호작용 매질의 제조 방법에 대한 지침은 거의 제공되지 않는다. 이러한 매질로서는 막, 비드 또는 겔을 기재로 한 매질이 알려져 있다. 그러나, 공지된 방법은 오프-라인 상태에서 수행되며, 모놀리스형 칼럼의 인-시투 제조에는 이용될 수 없다. 전술한 미국특허 제2,889,632호, 미국특허 제4,923,610호, 및 미국특허 제4,952,349호에 따라 제조된 모놀리스형 막은 용량 및 분해능이 낮다.

Peters 등의 "Preparation of Large-Diameter 'Molded' Porous Polymer Monoliths and the Control of Pore Structure Homogeneity", *Chemistry of Materials* v. 9, n7, July 1997에 기재된 방법에 따르면, 온도 구배를 형성하지 않기 위해 모놀리스형 플러그를 서서히 중합한다. 전술한 문헌에 기재된 일 구현예에 따르면, 온도는 55°C 또는 60°C의 일정한 저온으로 유지된다. 전술한 문헌에 기재된 다른 구현예에 따르면, 중합 속도가 낮게 유지되며, 모노머를 점진적으로 부가하여 중합 시의 발열을 감소시킴으로써, 반응 속도가 제한된다.

그런데, 전술한 방법에 따르면, 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포가 불균일하고, 폴리머 플러그의 강도가 낮을 뿐만 아니라, 분리에 효과적인 오프닝 크기가 크기 때문에 많은 액체 크로마토그래피 분리법에 이용하기에 실용적이지 않다는 문제점이 있다. 또한, 낮은 온도로 인해, 가교도가 저하되고, 몇몇 폴리머에 있어서는 충분한 강도를 가지지 않는 플러그가 얻어진다.

아울러, 전술한 문헌에는 중합하는 동안의 칼럼의 내부 온도에 대한 정보를 얻는 방법에 대해서도 기재되어 있다. 전술한 방법은 상기 칼럼 내에 온도 측정 장치를 매입(embedding)하는 단계를 포함한다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명은 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머와 상승 관계(synergistic relationship)를 가지는 신규한 분리 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 다른 목적은, 신규한 크로마토그래피 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 크로마토그래피 칼럼을 제조하기 위한 신규한 장치를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 크로마토그래피 칼럼의 신규한 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 신규한 모놀리스형 투과성 매질을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 향상된 분해능을 가지는 모놀리스형 투과성 칼럼을 제공하는 것이다.

아울러, 본 발명의 목적은 향상된 용량을 가지는 모놀리스형 투과성 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 향상된 유속을 가지는 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 수성 용매와 함께 이용되는 경우, 저하된 팽윤도를 가지는 칼럼을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 향상된 재현성을 가지는 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 용량, 분해능, 또는 유속의 향상을 목적으로 선택된, 크기가 제어된, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 모놀리스형 투과성 칼럼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 조제용 등급의 분리를 위한 대직경 칼럼의 신규한 제조 방법을 제공하는 것이다.

아울러, 본 발명의 목적은 신규한 대직경 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 조사 방법(irradiation method)을 이용하여, 투과성 폴리머 지지체를 포함하는 폴리머 재료의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규한, 약한 음이온 교환 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규한 역상 칼럼을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 고성능의 강한 음이온 교환 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 고성능의 약한 양이온 교환 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 고성능의 강한 양이온 교환 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 고성능의 정상상 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 중합하는 동안의 매질의 수축, 또는 세척 또는 분리하는 동안의 매질의 팽윤으로 인한 분리용 매질의 품질 저하를 방지하는 방법을 제공한다.

아울러, 본 발명의 목적은, 상당히 유사한 특성을 가지는 칼럼들이 배열된 칼럼의 배열이 함께 조작되는 크로마토그래피 시스템을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 액체, 기체 및 초임계 유체 크로마토그래피; 전기 크로마토그래피; 촉매 반응기; 여과; 또는 시료에 인접하여 위치하거나, 또는 시료로부터 적어도 부분적으로 수직하게 위치하는 투과성 폴리머 지지체 또는 투과성 고상 폴리머 홀더를 이용해야 하는 그 밖의 용도를 포함하는 크로마토그래피에 이용하기 위한 모놀리스형 투과성 고상 지지체의 신규한 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규한 고분해능 매질, 및 상기 매질의 신규한 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 상호 결합된 회합체 입자의 크기 및 형태를 보다 균일하게 함으로써, 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포가 균일한, 신규한 투과성 고상 지지체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 마이크로포어를 거의 또는 전혀 가지지 않는 신규한 투과성 고상 지지체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 벽에 보이드를 포함하지 않는 신규한 투과성 고상 지지체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 모놀리스형 크로마토그래피 매질의 용량을 향상시키는 신규한 방법을 제공하는 것이다.

아울러, 본 발명은 향상된 분해능을 가지는 모놀리스형 투과성 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 용량, 분해능, 또는 유속의 향상을 목적으로 선택된, 크기가 제어된, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 모놀리스형 투과성 칼럼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 조제용 등급의 분리를 위한 대직경 칼럼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

아울러, 본 발명의 목적은 고성능의 촉매 반응기를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 고성능의 고상 추출용 베드를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 완전한 회전형(convoluted)의 제어된 미세한 표면 구조를 가지는 공유 결합된 입자를 포함하고, 마이크로포어를 거의 또는 전혀 포함하지 않는 신규한 모놀리스형 투과성 매질을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 중합 시 발열로 인한 불균일성을 무시 가능한 수준으로 포함하는 모놀리스형 크로마토그래피 베드를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 크로마토그래피 칼럼 내로의 열 전도에 의해 상기 칼럼 내에서의 중합 반응을 제어하는 신규한 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은, 제어 하에 상기 베드에 방사선을 충돌시킴으로써, 중합 속도를 제어하고, 이로써, 열 구배(thermal gradient)를 제어하는 것이다.

아울러, 본 발명의 목적은, 비교적 안전한 방사선 소스를 이용하여, 예컨대, 중에너지 X선(medium energy X-ray) (예를 들면, 200 KeV), UV 방사선, 또는 가시광 방사선을 제공함으로써 중합 반응을 제어하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 마이크로포어를 거의 또는 전혀 가지지 않는 고용량의 투과성 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 나노미터(nm)에서부터 밀리미터(mm) 범위의 단위를 가지는 소직경 칼럼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은, 100 mm 이하의 중간 직경, 및 1,000 mm까지의, 또는 그 보다 큰 대직경을 가지며, 균일한 크로마토그래피용 칼럼의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 다공성 폴리머에서 분리에 효과적인 오프닝의 균일성에 대한 온도 구배의 영향을 최소화한 중합 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 폭주 온도(run-away temperature)의 발열 반응이 일어나지 않는 중합 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 상기 폴리머 혼합물 내에서의 최고 온도는 자발 폭주 온도보다 낮지만, 상기 최고 온도는 상기 폴리머 혼합물의 반응 시간 동안 적어도 부분적으로 유지되는 온도인 것을 특징으로 하는 중합 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은, 대직경의 모놀리스형 칼럼을 제조하기 위해 에너지 전도를 이용하는 신규한 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 중합하는 동안, 모놀리스형 플러그의 단면에서의 온도차가 유의적인 수준으로 나타나지 않게 하면서, 이후의 중합 반응에서는 적절한 가교도가 얻어지기에 충분한 열 에너지를 제공하며, 발열 폭주 온도에 도달하지 않으면서, 적당한 시간 내에 높은 중합 완료도를 제공하는 수준에서, 온도가 유지되는 것을 특징으로 하는 신규한 중합 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 온도 증가 및 구배(갑작스런 변화가 아니라, 연속적이고, 점진적인 변화) 온도 증가 단계를 이용하여, 모놀리스형 칼럼을 제조하는 단계를 포함하는, 크로마토그래피 칼럼의 신규한 제조 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은, 중합 공정을 수행하는 동안 발열 및 열 소산(dissipation) 속도를 제어하기 위한 신규한 제어 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 폴리머의 강도를 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명에 따르면, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머 플러그를 생성하기 위해, 포로젠 또는 용매를 이용하는 대신에 중합용 혼합물을 중합한다. 본 명세서에서, "분리에 효과적인 오프닝"이란, 크로마토그래피와 같은 분리 공정에서 영향을 미치는 기공, 또는 채널, 또는 그 밖의 오프닝을 의미한다. 또한, 통상적으로 "기공"이란, 입자 내에 형성되고 실질적으로 원형을 나타내는 오프닝을 의미하며, 입자를 관통하는(기공을 관통하는) 기공, 또는 입자 내에 형성된 오프닝일 수도 있고, 경우에 따라서는, 복수의 입자의 회합체들 내에 또는 상기 회합체들을 관통하여 형성되는 오프닝일 수도 있다. 단면이 실질적으로 원형이라는 것은, 완전한 원형이 아닌 기공임을 의미하고, 예컨대, 서로 인접한 구형의 표면 사이에 개방된 공간이 기공인 경우에는 불완전한 구체의 호를 경계로서 가질 수 있다. 본 명세서에 사용된 그 밖의 다른 용어들에 대한 정의는 이하에 기재된 바와 같다. 분리 인자(separation factor)로서는, 머무름 및 용량에 영향을 미치는 인자, 또는 분리 공정에 영향을 미치는 그 밖의 인자가 포함된다. 또한, 본 명세서에서 "매크로포어를 가지는" 재료란, 분리 시스템에 이용되는 모놀리스형 재료를 칭하는 통상적인 의미의 용어로서 여겨진다. 통상적으로 매크로포어는, 오프닝의 길이에 관계없이 50 nm보다 큰 직경을 가지며, 구형 입자(globule) 사이에 형성되는 기공 또는 그 밖의 보이드를 의미하며, 상기 오프닝의 의미는, 단면의 치수가 다른 것보다 실질적으로 길지 않으며, 실질적으로 원형 단면을 가지는 기공으로 제한되지는 않는다.

본 명세서에서 "투과성" 재료란, 분리 기술에서 모놀리스형 재료와 관련하여 가장 널리 이용되는 "매크로포어를 가지는" 재료와 같은 방식으로 해석될 수 있지만, "투과성 재료"와 "매크로포어를 가지는 재료"의 문자상의 의미가 혼동되지 않도록 하기 위해서 바람직하기로는, "매크로포어를 가지는" 재료는, 복수의 기공을 비롯하여 복수의 채널, 및 그 외 복수의 오프닝을 가지는 재료와, 하나의 채널, 또는 하나의 기공, 또는 하나의 오프닝을 가지는 재료를 구분하는 데 사용되고, "투과성" 재료는, 기공을 포함하지 않는 재료와, 기공을 포함하는 재료를 구분하는 데 사용된다. 또한, 본 명세서에서, "투과성 비다공성" 매질이란, 채널 등과 같은 오프닝을 가지지만, 전술한 바와 같이 정의되는 기공은 포함하지 않는 매질을 의미한다. 아울러, 폭주 온도란, 열이 추가되지 않은 상태에서 반응이 계속되는 시점의 온도로서, 추가되는 열과는 관계없이, 상기 반응에 의해 발생한 열로 인해, 상기 반응 온도보다 높은 온도가 유지됨으로써, 폭주 온도에서는 상기 반응이 자발적으로 유지된다. 또한, "온도-시간이 적절히 제어된" 모놀리스형 재료란, 상기 폭주 온도보다 낮지만, 중합을 달성하기에 충분히 높은 온도에서, 중합을 달성하기에 충분히 긴 시간 동안 높은 중합 완료도로 중합되어, 중합된 폴리머가 바람직한 특성, 예컨대, 적절한 강도, 분리에 효과적인 오프닝의 적절한 크기, 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포의 균일성 등을 가지게 된 모놀리스형 재료를 의미한다. 이러한 온도-시간의 적절한 제어는 경우에 따라서, 외부에서 가해지는 열을 제어하여, 중합 속도를 적절히 제어함으로써 달성될 수 있으므로, 중합 속도와 관련이 있다.

온도-시간이 적절히 제어되는 중합 반응에 있어서의 관건은, 소정의 용도에 적절한 칼럼의 강도를 얻기에 적합한 가교 수준을 달성하기에 바람직한 중합 시간 및 중합 온도를 선택하는 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 중합에 영향을 끼치는 여러 인자, 예컨대, 상기 중합용 혼합물에 조사되는 에너지의 속도, 활성화된 개시제 또는 활성화제의 양, 적절한 모노머의 양, 이용되는 폴리머 및 모노머의 종류와 관련하여, 적절한 가교도를 얻기 위한 온도, 및 실질적인 중합이 수행된 후, 다른 분자들에 의한 입체 장애 또는 차단과 같은 결합 방해 요인을 서로 적절하게 조화시킴으로써, 이러한 요건을 충족시킨다.

상기 중합에 영향을 끼치는 인자의 특성을 조화시키는 한 가지 방법으로서, 상기 혼합물에 조사되는 에너지의 속도, 및/또는 외부 소스로부터 상기 혼합물로의 에너지 도입 방식(예컨대, 혼합물 표면에서의 열 전도에 의해 수조로부터 도입되는 열에너지, 또는 방사선에 의해 혼합물에 도입되는 X선 에너지)을 제어하는 방법이 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 수조를 이용하여 상기 혼합물의 표면에 열을 도입한다. 발열에 의해 생성된 열은 반응 속도를 제어함으로써 제어되

며, 이러한 반응 속도의 제어는 수조의 온도를 제어함으로써 수행된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 혼합물로부터의 열 소산 속도 및 상기 수조로부터 상기 혼합물로 도입되는 열의 속도를 고려하여, 상기 수조의 온도를 제어함으로써, 자발적으로 유지되는 반응 온도보다 낮은 온도이되, 바람직한 가교도를 가지도록 적절한 시간 내에 실질적으로 완료된 반응이 얻어지기에 충분히 높은 온도를 유지하는 수준으로, 발열에 의한 열 방출 속도를 제어할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 수조의 온도를 제어함으로써, 상기 반응에 의해 방출되는 열을 제어한다. 상기 반응에 의해 방출되는 열은 통상적으로 반응 속도에 비례하므로, 속도가 증가할 수록 발열도가 증가하기 때문에, 수조의 온도에 의해 제어될 수 있다. 즉, 수조에 열을 가하여, 수조의 온도를 점진적으로 증가시키거나(구배 온도 제어), 또는 중합이 진행되는 단계별로 증가시키므로써, 상기 반응 속도를 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 구배 온도 제어 시, 모노머의 고갈과 같은 중합 억제 인자를 고려하여, 중합 속도 증가율을 일정하게 유지시키는 속도로 온도가 증가하여, 반응 속도는, 폭주 중합을 억제하고, 칼럼 특성의 불균일성을 유발할 수 있는 열 구배를 피할 수 있을 정도로 낮게 유지된다. 본 발명에 따르면, 대직경의 칼럼을 이용하는 경우에도, 상기 반응을 제어함으로써, 바람직한 특성을 가지는 칼럼을 제공할 수 있다.

전술한 기법에서, 혼합물의 엔탈피(본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 혼합물의 엔탈피는 온도에 의해 결정됨)는, 자발적으로 유지되는 반응 속도에 도달하지 않으면서, 온도-시간이 적절히 제어되는 폴리머를 소정의 방법에 의해 제공 가능한 속도에서 중합 반응을 제공하는 한편, 개시제를 활성화시키는 소정의 수준으로 증가된다. 본 명세서에서 이러한 수준의 엔탈피는 제어 개시점으로서 칭한다. 엔탈피가 제어 개시점에 도달한 후, 하나 이상의 단계에서 온도가 증가될 수 있는 중합 수준까지는 상기 반응 속도가 실질적으로 일정하게 유지되며, 바람직한 경우, 중합이 종료될 때까지, 통상적으로는 95% 이상 중합될 때까지 보다 높은 엔탈피로 증가된다. 중합 수준이 충분하여, 온도-시간이 적절하게 제어되기에 적절한 수준으로 온도가 증가될 수 있는 시점을 안전점(safe-point)이라 칭하며, 이러한 안전점에서는 하나 이상의 단계에서의 온도 증가, 또는 온도의 큰 증가가 일어난다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 중합하는 동안 발생하는 수축 문제를 해결할 수 있으며, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 중합 후의 팽윤(이후에 수축을 유발할 수 있음) 문제를 해결할 수 있다. 이러한 수축으로 인해, 상기 폴리머의 표면에는 크기가 커진 보이드가 얻어지며, 기공의 균일성, 및 상기 폴리머 내의 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포가 불량할 수 있다. 상기 보이드는, 규칙적인 구조를 가지는 폴리머의 중합 시, 상기 폴리머의 부피가 중합 전의 모노머의 부피에 비해 감소하기 때문에 생성되는 것이라고 여겨진다. 이러한 보이드는 표면 자유 에너지의 차로 인해, 대부분 칼럼벽과 폴리머의 사이에 위치한다. 상기 보이드에는, 통상적인 중합 개시제로서 이용되는 아조비스이소부티로니트릴(AIBN)에 의해 발생되는 질소 가스가 충전되어 있을 수도 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 중합하는 동안 충분한 압력을 가하여, 분리에 효과적인 오프닝의 분포를 균일하게 하고, 벽 효과에 의한 보이드가 발생하지 않도록 함으로써, 전술한 수축 문제를 해결할 수 있다. 또한, 이러한 압력에 의해, 입자의 크기, 및 플러그 중의 오프닝의 특성 및 형태를 어느 정도 제어된다는 것이 확인되었다. 중합하는 동안 상기 칼럼을 대기압에서 유지시켜, 전술한 수축 문제를 해결함으로써, 보이드의 생성을 억제할 수 있다. 일반적으로는 간편하게 250 psi의 압력을 이용하지만, 고압 및 저압을 이용할 수도 있다. 압력을 가하여, 상기 플러그의 수축이 정지되면, 보이드가 제거된다. 본 발명의 제2 구현예에 따르면, 중합 후에 발생할 수 있는 수축 문제를 해결할 수 있다. 예를 들면, 몇몇 플러그는 유기 용매와 같은 몇몇 액상 혼합물에 노출될 때, 팽창하는 경향이 있으며, 이후에는, 예컨대, 수성 이동상 중에서 수행되는 분리 공정에서는 수축되어, 보이드가 생성된다. 그러나, 전술한 바와 같은 본 발명의 구현예에 따르면, 상기 액상 혼합물에 노출 시, 상기 칼럼을 수축되지 않도록 유지시키므로써, 수축 문제를 해결할 수 있다. 상기 액상 혼합물에 노출하는 동안 발생하는 이러한 수축을 억제하는 방법 중 하나로서, 가압을 들 수 있다. 그 밖에, 이러한 수축 및/또는 팽윤의 해결 방법, 예컨대, 수축 문제의 개선 또는 수축 문제의 해결 방법은 다음과 같다. 외부에서 가하는 압력은 중합용 반응 혼합물의 내부에 작용하는 불균일한 힘, 및 상기 중합용 혼합물과 상기 칼럼의 내벽 사이의 불균일한 힘을 극복함으로써, 분리에 효과적인 입자의 균일성, 분리에 효과적인 오프닝의 크기 및 분포의 균일성, 및 상기 칼럼 내벽에 대한 상기 폴리머 접촉의 연속성을 유지할 수 있다.

놀랍게도, 몇몇 타입의 폴리머 플러그를 중합하는 동안, 압력을 가하여 수축 문제를 해결한 경우, 또는 상기 폴리머 플러그가 친수성 액상 혼합물, 예컨대, 수성 이동상에 노출될 때 발생하는 수축 문제를 해결하기 위해 역상 칼럼에 이용한 경우에는 상기 폴리머 플러그가 보이드를 가지지 않는다. 대신에, 상기 폴리머 플러그는 직경이 약 2 μm 인 고상 입자를 포함하고, 상기 고상 입자는, 상기 입자들 사이에 존재하며 비교적 크기가 큰 유동 채널(분리에 효과적인 오프닝)과 함께 공유 결합되어 있다. 놀라운 점은, 이러한 입자들이 기공을 포함하지 않아도, 상기 플러그의 크로마토그래피 용량이 높다는 것이다. 이러한 특성은, 약 50~200 nm 깊이 및 너비의 예기치 않은 홈 또는 골이 형성되고, 그 밖의 특이한 표면 특성 때문에 얻어지는 것이라고 생각된다. 통상적인 입자를 현미경으로 관찰하는 경우, 상기 입자는 상당히 작은 성상체(asteroid)와 유사한 형상을 나타낸다.

중합하는 동안에 가해지는 압력, 예를 들면, 선형 증가시키는 압력, 일정한 압력, 또는 단계적인 압력 구배는 얻고자 하는 특성에 따라 적절히 선택된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 분리에 효과적인 오프닝의 크기는, 중합하는 동안 기공을 형성하는 포로젠의 종류 및 비율에 따라 선택되며, 이러한 포로젠은 중합 후, 상기 플러그로부터 세척되어야 한다. 상기 포로젠의 비율은 원하는 특성을 얻고자 하는 시행을 통하여 선택된다. 또한, 이러한 시행으로부터 포로젠의 총량을 정할 수 있다.

다른 예를 들면, 세척용 유기 액상 혼합물과 같은 몇몇 액상 혼합물에 노출되면 팽윤하고, 그 이후에, 예컨대, 수성 이동상 중에서 분리 공정을 수행하는 동안에는 수축되는 경향이 있어, 칼럼벽과 폴리머 지지체 사이에 보이드가 형성되며, 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포가 불균일하게 되는 재료로 이루어진 플러그를 제조한다. 예컨대, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 역상 플러그는 중합 시, 몇몇이 수축될 수 있으며, 중합 후에는, 중합하는 동안 수축되지 않은 몇몇 플러그, 및 물이나 그 밖의 극성 액상 혼합물에 노출될 때 수축될 수 있는 몇몇 플러그가 수축될 수 있다. 이러한 재료로 이루어진 플러그를 개선하기 위한 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 수축 수준을 변화시키거나, 또는 상기 수축으로 인해 발생한 공간이 보상되도록, 상기 분리 공정을 수행하는 동안 일어날 수 있는 수축도와 동일한 수준, 또는 상기 수축도보다 큰 수준의 수축을 유발할 수 있는 조건에서, 중합하는 동안 피스톤을 이용하여 압축함으로써, 및/또는 중합 후, 압축함으로써, 전술한 수축 문제를 해결할 수 있다. 압력을 이용하여 수축된 부분을 보상하는 경우, 또는 보이드의 형성을 억제하기 위해 수축을 억제하는 경우에는 유체를 이용하여 가하는 압력보다는, 비(非)유체 압력, 예컨대, 피스톤을 이용한 압력을 이용하는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 모놀리스형 겔의 기공을 개방하기 위해 모놀리스형 겔에 염 액상 혼합물을 가하는 것을 나타내는 데 "압축(compression)"이 사용되는 경우, "가압"은 "압축"은 서로 다른 용어이며, 가압의 의미에는 이러한 의미의 "압축"이 포함되지 않는다.

전술한 수축 문제를 해결하기 위한 다른 방법으로서, 역상 매질에 친수기를 도입하여 팽윤시키는 방법이 있으며, 이렇게 함으로써, 분리 공정이 수행되는 동안, 친수성이 큰 환경 중에서 발생할 수 있는 폴리머의 수축을 방지할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 칼럼 또는 적절한 그 밖의 몰드에 중합용 혼합물을 가한 다음, 상기 칼럼 또는 몰드 중에서 중합 반응을 개시한다. 상기 칼럼 또는 몰드를 충분히 실링함으로써, (1) 오븐 중에서 중합하는 경우, 증발에 의한 기대치 않은 손실을 방지하거나, 또는 (2) 수조에서 중합하는 경우의 오염 또는 희석을 억제할 수 있다. 중합하는 동안, 상기 중합용 액상 혼합물에 압력을 가한다. 바람직하게는, 상기 압력을 대기압보다 높은 수준으로 유지시킴으로써, 중합에 의해 분리용 매질의 고상 플러그가 얻어질 때까지, 또는 중합이 완료될 때까지, 수축에 의한 보이드의 생성을 억제할 수 있다. 중합하는 동안에 상기 중합용 액상 혼합물이 접촉하는 칼럼 또는 몰드의 내표면은 비(非)반응성일 수 있고, 또는 상기 플러그의 표면에 대한 접착성이 증가되도록 처리될 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중합용 혼합물은 (1) 선택된 모노머; (2) 칼럼의 종류에 따라 첨가되는 첨가제; (3) 개시제 또는 촉매; 및 (4) 분리에 효과적인 오프닝을 형성하기 위해 이용되는 포로젠 또는 복수의 포로젠을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중합 전 또는 중합 후에, 상기 중합용 혼합물에 작용기를 부가할 수 있다. 상기 포로젠, 개시제, 추가될 작용기, 첨가제, 및 반응 조건, 및 모노머 및/또는 폴리머는, 칼럼의 종류, 예컨대, 역상 칼럼, 약한 양이온 칼럼, 강한 양이온 칼럼, 약한 음이온 칼럼, 강한 음이온 칼럼, 친화성 지지체, 정상상, 고상 추출, 및 촉매상에 따라 선택된다. 또한, 상기 중합용 혼합물의 성분은 칼럼에 원하는 특성을 부여하기에 적절하도록 선택된다.

본 발명에 따른 크로마토그래피 칼럼은 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그를 수용하기 위한, 내벽을 가지는 케이싱을 포함하는 것이 바람직하며, 상기 중합용 혼합물 중의 포로젠에 의해 형성되는, 분리에 효과적인 오프닝 또는 표면은 제어된 크기를 가지며, 상기 폴리머 플러그가 중합되는 동안 압력에 의해 크기가 제어된다. 이러한 플러그는 크로마토그래피 칼럼에서 시료 지지용 지지체로서 이용된다. 상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는 육안 관찰 시 불연속성이 관찰되지 않는 평탄한 벽을 가지며, 실질적으로 상기 플러그는 불연속성 또는 오프닝을 가지지 않는다. 본 명세서에서 불연속성이란, 표준적인 평탄부로부터 융기된 부분 또는 오프닝, 또는 침하된 부분, 또는 그 외의 변형이 나타나는 부분, 혹은 나안으로 관찰되기에 충분한 크기의 패튼을 일컫는다. 본 명세서에서, "크기 보상형 폴리머(size-compensated polymer)" 재료란, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 모놀리스형 투과성 폴리머 재료로서, 전술한 방법, 예컨대, 중합하는 동안, 또는 중합 후, 극성 액상 혼합물에 노출하는 동안, 가압 및/또는 온도-시간을 적절히 제어함으로써, 혹은 수성 액상 혼합물을 이용하여 세척하는 동안, 또는 수성 액상 혼합물을 이용하여 분리 공정에서 수성 액상 혼합물의 존재 하에 압력을 가하여, 상기 수성 액상 혼합물 중에서 발생하는 추가의 수축이 억제된 칼럼을 이용함으로써, 상기 분리에 효과적인 오프닝이 불연속성 및 불균일성을 가지지 않도록 한 재료를 일컫는다. 불연속성 또는 불균일성을 나타내는 한 가지 유형은 벽 효과이며, 또 다른 유형은 폴리머 플러그의 서로 다른 단면 위치에서 나타나는 분리에 효과적인 오프닝의 크기차이다.

본 발명의 일 구현예에 따른 칼럼은, 중합하는 동안, 중합용 혼합물을 수용하기에 적절한, 온도가 제어되는 반응 챔버, 및 상기 챔버에 수용된 중합용 혼합물에 압력을 가하기 위한 수단을 이용하여 제조된다. 상기 중합용 혼합물은 하나 이

상의 폴리머 형성 재료, 및 포로젠을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 외부의 유체 압력 또는 기계적 압력 하에, 상기 중합용 혼합물과 접촉하는 평탄한 표면을 가지는 이동 가능한 부재에 의해 압력을 가할 수도 있고, 압력 하에 질소 가스와 같은 가스, 또는 액체를 이용하여 상기 중합용 혼합물에 직접 압력을 가할 수도 있다.

중래 기술에 따라, 서로 다른 소수성 및 친수성을 가지는 역상 매질이 제조된 바 있다. 역상 매질은 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 및 이들의 조합을 포함한다. 이들 매질은, 수성 이동상 중에서 서로 다른 선택도 및 습윤화도(wetability)를 가지도록, 페닐, C4, C8, C12, C18, 및 하이드록시기, 또는 소수성 기와 친수성 기의 조합을 포함하는 바람직한 작용기를 가지는 모노머의 직접 중합에 의해 제조된다. 이 때의 중합 조건, 및 포로젠은 대형 분자, 특히, 단백질, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 및 합성 호모폴리머의 고분해능을 제공하도록 선택된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 역상 매질은 폴리(스티렌-co-디비닐벤젠)을 기재로 한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 역상 매질은 폴리(스테아릴 메타크릴레이트-co-디비닐벤젠)을 기재로 한다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 역상 매질은 폴리(부틸 메타크릴레이트-co-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)를 기재로 한다.

우수한 특성을 가지는 역상 플러그는 디비닐벤젠(DVB)을 포함하는 가교제와, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 및 서로 다른 탄소 사슬 길이를 가지는 스티렌(ST) 또는 메타크릴레이트(MA)를 포함하는 모노머의 코폴리머를 주성분으로 한다. 통상적으로, 상기 가교제가 40 중량%보다 많은 양인 경우에 우수한 결과가 얻어진다. 상기 디비닐벤젠과 상기 스티렌의 중량비는 7:1 내지 9:1인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 4:1이며, 64 중량% DVB 또는 40 중량% 스티렌과 72 중량%의 DVB 또는 1 g 디비닐벤젠, 1 g 스티렌을 이용할 수도 있다. 아울러, 상기 칼럼은 17:3 내지 19:1의 비율, 바람직하게는 9부 디비닐벤젠: 1부 스티렌일 수 있다. 친수성기를 가지는 모노머를 첨가하여, 수성 이동상에서의 상기 폴리머 매질의 수축을 개선함으로써, 분리 공정을 수행하는 중의 벽 효과를 억제할 수 있다. 총 모노머 중의 DVB의 함량은 40% 내지 100%인 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 칼럼의 충전 용량을 향상시키기 위한 DVB의 함량은 80%(입수 가능한 최고 함량의 시판품)이다. 또한, 상기 플러그는 소수성 표면 작용기를 가지는 메타크릴레이트를 포함하며, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 플러그는 요소 포름알데하이드 또는 실리카를 포함하는 비닐 화합물이다.

이온 교환 플러그는 메타크릴레이트 폴리머를 주성분으로 한다. 약한 음이온 교환 플러그는 글리시딜 메타크릴레이트(GMA) 폴리머, 및 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트(EDMA) 폴리머를 주성분으로서 한다. 강한 음이온 교환 플러그는 글리시딜 메타크릴레이트 폴리머, 2-(아크릴로일옥시에틸)트리메틸암모늄 메틸 설페이트(ATMS) 폴리머, 및 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트의 폴리머를 주성분으로 한다. 아울러, 상기 중합용 혼합물은 1,4-부탄디올, 프로판올, 및 AIBN을 더 포함할 수 있다. 약한 양이온 교환 플러그는 글리시딜 메타크릴레이트, 아크릴산(AA), 및 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트를 주성분으로 한다. 강한 양이온 교환 플러그는 글리시딜 메타크릴레이트, 2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판설폰산(AMPS), 및 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트를 주성분으로 한다. 전술한 이온 교환기 모두에 있어서, 상기 플러그의 제조 전, 또는 상기 플러그의 제조 후에 작용기를 부가할 수 있다. 총 모노머 중의 EDMA의 함량은 40% 내지 80%인 것이 바람직하다.

EDMA와 같은 가교제의 함량을 증가시킴으로써, 수성 상에서의 상기 매질의 팽윤을 저하시켜, 상기 칼럼의 강도를 증가시킬 수 있다. 상기 각각의 중합용 혼합물은, 고유속 및 저유속 모두에서 고속 및 고분해능을 얻기 위해 가압 하의 중합 반응에 의해 개질된다. 원하는 상호 반응성 작용기를 포함하도록, 그 밖의 관능성 모노머의 상호작용 및 제어된 개질 반응을 위한 원하는 작용기를 포함하는 모노머의 공중합에서의 커플링시킴으로써, 상기 분리용 매질의 강도를 향상시키는 한편, 상기 칼럼의 용량을 증가시킬 수 있다. 이러한 제어된 개질 반응에 의해, 잠재적인 소수성 표면 영역을 친수성 작용기로 덮음으로써, 상기 칼럼의 소수성 역시 향상시킬 수 있다. 개질 조건은, 상기 매질에 보다 높은 용량 및 보다 높은 친수성을 제공할 뿐만 아니라, 수성 액상 혼합물 중의 폴리머 매트릭스의 팽윤을 억제하도록 선택되며, 이러한 팽윤 현상은 비드 및 모놀리스를 포함하는 친수성이 큰 그 밖의 폴리머 매트릭스에서 일어난다.

상기 폴리머 플러그는 종래의 액체 크로마토그래피 칼럼을 포함하는 임의의 크기 또는 임의의 형태를 가지는 칼럼 내에서 제조될 수 있으며, 상기 칼럼은 원형, 실린더형, 코일형, 굽은 또는 곧은 모세관형, 또는 마이크로칩일 수도 있고, 임의의 치수 또는 기하형을 가질 수도 있다. 소정의 성분들로 분리될 샘플 또는 혼합물을 칼럼에 주입한 다음, 상기 칼럼을 통해 액상을 이동시켜, 상기 샘플을 상기 소정의 성분들로 분리한다. 상기 성분은 분획 수집기 중에서 검출 및/또는 수집되거나, 또는 기체 크로마토그래피 또는 질량 분광분석계와 같은 그 밖의 장치에 삽입될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 복수의 칼럼은 크로마토그래피 시스템 중에 병렬 연결되며, 상기 크로마토그래피 시스템은 펌핑 시스템, 용매 시스템, 및 검출 시스템을 포함한다. 상기 칼럼은 높은 재현성을 가지는 투과성 폴리머 칼럼이며, 관련된 분리용 칼럼으로서 함께 작용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 25 mm보다 큰 직경을 가지는 크로마토그래피 디스크 또는 플러그가 얻어진다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 전술한 반응은, 시간, 수조 및 상기 중합용 혼합물 중의 반응물의 온도에 대해서만 의존하는 것 이외에, 또는 이들에 대신에, UV-vis, X선, 또는 감마선과 같은 전자기 방사선과 같은 독립적인 수단에 의해 제어된다. 독립적인 수단을 사용하지 않는 본 발명의 일 구현예에 따르면, 열 전도와 같은 전도에 의해, 또는 수조로부터의 전도에 의해 상기 칼럼을 더 가열할 수도 있다. 또한, 가열 소스로부터 가열할 수도 있고, 상기 반응 물질의 온도를 원하는 온도 범위로 유지시키기 위한 또는 필요한 경우, 상기 반응 중에 온도를 변화시키기 위한 피드백을 제어 하에 반응기 중에서 축열체(thermal mass)의 상당히 높은 비율의 냉각제와 접촉하는 냉각 수단에 의해 열을 제거할 수도 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 다양한 강도 또는 다양한 파장의 X선을 이용하여, 상기 반응물의 중합 속도를 제어함으로써, 발열 반응을 제어할 수 있다. 본 발명의 일 변형예에 따르면, 중합 속도를 증가 또는 저하시키기 위하여 X선을 상기 칼럼에 투과시킴으로써, 상기 칼럼 전체에 또는 선택된 위치에 에너지를 부여할 수 있다. 이러한 X선의 투과는, 모노머의 자유 라디칼을 생성하여, 상기 모노머의 반응성을 증가시키기 위해 이중 결합을 분해하기에 충분한 수준으로 상기 모노머에 X선을 조사함으로써 수행될 수 있다. 또 다른 방법은, 상기 반응물에 대해 이용되는 온도 범위에서 방사선에 의해 활성화되는, 방사선 민감성 개시제를 이용하는 것이다. 상기 개시제는 상기 모노머만을 단독으로 이용하는 경우의 활성화 시간 및 온도에 비해 상당히 적은 시간 및 상당히 낮은 온도가 얻어지도록 선택된다. 상기 개시제는 충분한 강도의 방사선이 조사되는 경우에만 자유 라디칼을 형성하기 때문에, 다른 인자들에 대해서는 독립적으로, 상기 중합 반응을 제어하는 데 이용될 수 있다.

중합 반응의 제어에 광개시제를 이용하는 경우, 섬광제(scintillator) 및 감광제와 같은 성분을 첨가함으로써 제어성을 향상시킬 수 있다. 예컨대, X선에 의해 상기 용매 중의 섬광제가 활성화되어, 상기 X선에 대한 반응으로 발광이 일어난다. 바람직하기로, 중합 시, 상기 광개시제의 활성을 증가시키기 위해 형광성 감광제를 첨가할 수 있다. 이러한 섬광제 및 감광제 종류는, 상기 섬광제에 의해 X선 에너지의 유효한 흡수가 일어나도록, 그리고 상기 광개시제의 흡광 밴드 내의 유효 파장에서 광이 방사되도록 선택된다.

X선과 같은 방사선 조사에 의한 중합 반응을 이용하여, 마이크로미터 내지 미터 단위의 단면을 가지는 모놀리스형 재료를 제조한다. X선은 상기 재료 내로 깊이 투과될 수 있다. 유기 폴리머 및 무기 폴리머 둘 다, X선 또는 γ 선을 이용하여 제조될 수 있다. 고에너지 X선 및 γ 선은 상기 재료를 대단히 깊은 깊이로 이동할 수 있다. 저에너지 내지 중에너지 X선은 상기 재료에 얇은 깊이로 투과됨으로써, 중합 시간이 길어지지만, 이용하기에 안전하다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, X선 섬광제와 광개시제의 조합을 병용하면서, 저에너지 X선을 이용하여, 중합 반응을 개시한다. 본 발명자들은 12시간 미만부터 1 주 이상의 시간까지 중합 시간을 비(非)열(광개시) 제어함으로써, 만족스런 크로마토그래피 칼럼이 얻어진다는 것을 발견하였다. 칼럼의 직경이 20 mm보다 큰 경우, 칼럼의 열 중합에서는 통상적으로 런 어웨이 발열 반응, 및 심한 온도 구배가 나타난다. 이는 칼럼의 특성을 저하시키는 불균일에서 기인한 것이다. X선 또는 γ 선, 또는 UV를 이용하여 보다 느린 속도로 중합 속도를 제어하는 경우에는 중합 속도가 적절한 속도로 유지되는 한편, 발열의 속도도 적당하게 된다. 발열에 의해 야기되는 열 구배는 직경이 1 미터보다 큰 칼럼의 특성을 저하시키지 않을 정도로 작은 수준일 수 있다.

안정화용 첨가제를 이용함으로써, 과도한 속도의 발열, 및 그 결과 얻어지는 공정(중합) 온도, 및 온도 구배를 억제할 수 있다. 이러한 안정화용 첨가제는, 지나친 고온을 야기할 수 있는 정도의 고속은 아니면서 바람직한 폴리머가 생성되는 속도로까지 상기 반응이 자유롭게 전개될 수 있도록 하는 특성을 가져야 한다. 예를 들면, 과산화물 개시제 디스테릴티오디프로피오네이트(DSTDP)를 이용하여, 부반응을 일으키는 하이드록시 라디칼을 킨칭(quenching)함으로써, 이후에 주반응에 비해 반응 당 추가적인 열을 계속 생성할 수 있다. 또 다른 접근 방법에 따르면, 주 반응에 안정화제를 사용한다. 상기 안정화제는 주용매에서의 제한된 용해도, 또는 상기 반응 온도에서의 활성, 및 상기 반응 온도보다 높은 온도에서의 더 큰 용해도가 얻어지도록 선택된다. 이와 유사한 조건 하에, 안정화제, 바람직하기로는 상기 포로젠 중에 용해되며, 용해도 또는 활성에 의존적인 온도를 가지는 안정화제를 사용할 수 있다.

제조용 크로마토그래피 및 촉매 반응기의 경우에는 상기 칼럼이 고부피의 매질을 가지도록, 상기 칼럼의 크기를 비율에 따라 증대시키는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 칼럼 내에서 2단계 중합에 의해 대직경 칼럼을 제조한다. 먼저, 가압하면서, 또는 압력을 가하지 않은 채로, 목표로 하는 칼럼의 직경보다 작은 직경을 가지는 얇은 실린더형 다중 칼럼을 몰드 중에서 제조한다. 상기 얇은 칼럼의 제조 시에 이용된 중합용 액상 혼합물과 동일한 중합용 액상 혼합물이 충전된 대직경의 칼럼 내에 상기 얇은 칼럼을 둔다. 상기 얇은 칼럼의 한쪽 두께는 8 mm (발열 중합하는 동안, 열 소산에 있어서 문제를 유발할 수 있는 온도 구배의 형성을 억제하기 위한 최대 두께로 알려져 있음)를 초과하지 않아야 한다. 온도 구배가 생성되는 경우에는 유효한 오프닝 크기 분포가 불균일하게 되며, 이에 따라, 크로마토그래피에 이용하기에는 바람직하지 않다.

분리 시스템에 이용되는 크기 보상형 폴리머의 제조 시, 중합하는 동안 압력의 양을 변화시킴으로써, 및/또는 역상 분리용 매질을 형성하는 데 이용되는 몇몇 폴리머를 이용하는 경우에는 사용 시, 또는 극성 용매(예컨대, 수성 용매 또는 세척용 유체)와 접촉 시, 압력을 가함으로써, 주어진 폴리머가 분리에 적절한 특성을 가지도록 소정 용도에 적합하게 맞출 수 있다. 상기 폴리머 자체의 특성을 용도에 맞추어 선택한 다음에는 칼럼을 제조하여 테스트할 수 있다. 이러한 테스트에 기초하여, 압력을 가함으로써 몇몇 칼럼의 특성을 변화시킬 수 있다. 이는, 몇몇 칼럼에 압력을 가함으로써, 입자 크기의 균일성을 향상시킬 수 있고, 입자 크기의 변화에 의해 폴리머 전체에서의 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포 및 균일성이 향상되는 것이라고 사료된다. 입자 크기, 및 분리에 효과적인 오프닝 크기의 균일성 향상으로 인해, 향상된 분해능이 얻어진다. 통상적으로, 압력을 증가시킴으로써, 칼럼의 용량 및 분해능, 및 압력-시간 구배를 향상시킬 수 있다. 이는, 몇몇 칼럼의 경우, 중합하는 동안, 및/또는 상기 폴리머를 이용하거나, 또는 극성 액상 혼합물을 이용하여 상기 폴리머를 세척하는 동안, 압력을 가하여, 마이크로포어가 크게 감소 또는 제거됨으로써, 영역 확대가 저하되기 때문이라 사료된다.

통상적으로, 중합하는 동안, 중합용 혼합물의 엔탈피를 제어함으로써, 크기가 작거나 큰 칼럼의 특성을 제어할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 이러한 칼럼의 특성 제어는 에너지를 도입 및/또는 제거함으로써 달성된다. 본 발명의 구현예에 따르면, 방사선을 이용함으로써 에너지를 도입할 필요가 없으면서, 중합하는 동안 온도 및 압력에 의해, 또는 온도 제어에 의해 엔탈피가 제어되지만, 경우에 따라서는 방사선에 의해 에너지를 더 첨가할 수 있다. 이러한 제어에 의해, 상기 분리에 효과적인 오프닝의 불규칙성을 저하시키는 한편, 바람직한 특성을 얻을 수 있다. 바람직한 특성을 가지는 칼럼을 얻기 위해서는 엔탈피가 중합 범위이되, 폭주 엔탈피보다는 낮은 수준에서, 그리고 반응열에 의해, 시간-온도가 적절하게 제어되지 않는 재료가 얻어지도록 하는 과도한 발열이 나타나지 않도록 하는 엔탈피에서 유지된다. 특히, 수조를 이용하여 엔탈피를 제어하는 것이 경제적이다. 몇몇 중합용 혼합물의 경우에는 방사선, 예컨대, UV 방사선, IR 방사선, X선, 가시광선, 또는 상기 중합용 혼합물 내로 도입되는 열과 방사선의 조합을 제어하면서 이용함으로써, 또는 열의 도입이나 제거에 의해 엔탈피가 전술한 범위에서 유지된다. 또한, 압력을 가함으로써, 엔탈피가 증가된다. 발열 반응의 경우, 발열에 상응하는 속도에서 열을 소산시킴으로써, 엔탈피가 폭주 온도보다 낮게 유지된다.

몇몇 중합용 혼합물을 이용하는 데 있어서, 열을 도입하는 것만으로, 예컨대, 가열된 수조를 통해, 온도를 바람직한 반응 온도로 증가시킴으로써, 상기 반응을 개시한다. 발열 속도가 제어되는 상기 중합용 혼합물로부터 열이 전달되는 매질의 온도를 변화시켜, 열을 전달하는 한편, 주기적으로 상기 반응을 변화시킴으로써, 상기 폴리머 혼합물로 전달되는 열의 양을 제어할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 플러그의 외표면과 접촉하는 표면의 온도는, 칼럼 내에서의 과도한 온도 구배를 유발하는 속도로 열이 도입되지 않도록 하기에 충분히 낮되, 폴리머가 적절히 가교되기에 충분히 높은 온도에서 유지된다. 이러한 온도의 유지는, 상기 외표면의 온도를 단계별로, 또는 점진적으로, 예를 들면, 느린 속도로 선형 증가시킴으로써 달성된다. 반응의 변화 속도가 낮도록, 가해진 온도는 제어 개시점과 제1 안전점 사이에서 제어된다. 이로써, 온도-시간이 적절히 제어되는 폴리머가 생성되고, 적절한 시간 내에 중합이 완료되도록 온도를 증가시킴으로써, 중합될 때까지 발열이 낮게 유지된다.

본 발명의 신규한 모듈리스형 고상 지지체는 예컨대, 다음과 같은 점에서 바람직하다: (1) 종래 기술에 비해 우수한 방식의 크로마토그램을 제공한다; (2) 간편하고도 경제적인 방법으로 제조가 가능하다; (3) 종래 기술에 따른 분리 유속에 비해 더 빠른 유속을 제공한다; (4) 종래 기술에 따른 방법에 비해, 보다 낮은 압력에서도 높은 분해능을 제공한다; (5) 일회용 칼럼을 이용하여, 칼럼의 비용을 절감함으로써, 고분해능을 제공한다; (6) 다양한 형태의 칼럼(예컨대, 환형 크로마토그래피에 이용되는 환형 칼럼), 및 임의의 치수, 특히, 마이크로칩이나 모세관, 및 모듈리스형 투과성 폴리머 팁을 이용하는 질량 분광측정용 주입기와 같은 상당히 작은 치수의 칼럼을 쉽게 제조할 수 있다; (7) 소형 및 대형 분자를 신속하게 분리할 수 있다; (8) 추출, 크로마토그래피, 전기영동, 초임계 크로마토그래피, 촉매용 고상 담체, TLC 및 집적 CEC 분리, 또는 화학적 반응을 비롯한 많은 공정에 이용되는 우수한 분리용 매질을 제공할 수 있다; (9) 공지된 모듈리스형 투과성 분리용 매질에 보다 우수한 특성을 제공할 수 있다; (10) 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포가 균일한 대직경 칼럼의 신규한 제조 방법을 제공할 수 있다; (11) 수성이 큰 이동상에서의 벽 효과가 나타나지 않으며, 보다 향상된 칼럼 효율을 가지는 분리용 매질을 제공할 수 있다; (12) 분리에 효과적인 인자들의 특성을 향상시킬 수 있다; 및 (13) 역상 칼럼에서의 팽윤 및 수축 문제를 개선할 수 있다.

(상세한 설명)

대체로, 중합용 혼합물을 포로젠 또는 용매와 함께 용기에 넣은 다음, 중합함으로써, 분리 시스템, 예컨대, 크로마토그래피 칼럼용으로서, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 플러그를 형성한다. 바람직하기로, 상기 중합용 혼합물의 중합 반응은 크로마토그래피 칼럼, 또는 분리용 체임버 등과 같은, 상기 플러그가 이용될 용기 중에서 수행된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 혼합물을 중합하는 동안 나타나는 수축 효과를 보상하는 한편, 상기 혼합물을 중합함으로써, 크기 보상형 폴리머 플러그가 얻어진다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 물의 존재 하에 팽윤하는 경향이 있는 재료에 압력을 가하여,

전술한 수축 문제를 해결함으로써, 본 발명의 다른 구현예에 따른, 크기 보상형 폴리머 플러그를 제조할 수 있다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 압력을 가함으로써, 및/또는 상기 중합용 혼합물의 성분을 선택함으로써, 및/또는 전자기 방사선과 같은 외부력을 이용하는 공정에 의해, 및/또는 온도-시간의 적절한 제어에 의해, 분리에 효과적인 오프닝 크기 및 상기 오프닝 분포를 제어한다. 상기 폴리머의 수축이 발생하는 경우에는, 상기 용기의 벽에 인접한 확장된 보이드가 확대될 수 있고, 칼럼 내의 기공 또는 분리에 효과적인 오프닝 사이즈의 분포에 바람직하지 않은 영향을 끼칠 수 있기 때문에, 이러한 수축은 보상되거나 방지된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 중합하는 동안, 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 재료가 수축하는 경우, 중합하는 동안 압력을 가하여, 상기 재료의 강도를 유지시킴으로써, 이러한 수축을 보상할 수 있다. 이러한 수축을 보상하기 위해 상기 칼럼을 대기압에서 유지시키는 경우에는 보이드의 생성을 방지할 수 없으며, 불량한 재현성이 얻어질 수 있다. 또한, 폴리머, 모노머, 개시제, 및 포로젠의 종류를 적절히 선택함으로써, 상기 칼럼의 특성을 향상시킬 수 있고, 중합하는 동안 압력을 가하면서, 또는 그 밖의 공정을 이용하여 중합할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 몇몇 역상 플러그의 경우에는 상기 플러그가 생성된 후에, 그리고 중합 후, 수성 액상 혼합물을 이용한 세척과 같은 그 밖의 반응에 의해 유발되는 팽윤 도중에 또는 팽윤 후에, 상기 플러그에 압력을 가한다. 중합하는 동안, 상기 중합용 액상 혼합물이 접촉하는 상기 칼럼 또는 몰드의 표면은 비반응성일 수도 있고, 또는 접착성이 증가되도록 처리된 것일 수도 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중합용 혼합물은 적어도 하나의 비닐 화합물, 및 포로젠을 포함한다. 상기 중합용 혼합물 중에는 개시제가 포함되며, 비닐 모노머 및 포로젠에 개시 공정을 적용함으로써, 분리용 폴리머 플러그를 이용하는 크로마토그래피 칼럼용 또는 그 밖의 장치용 모놀리스형 플러그가 얻어진다. 일반적으로, 상기 중합용 혼합물은 비닐 모노머 외에도, 비닐 폴리머, 또는 모노머와 폴리머의 혼합물, 및 개시제 및 포로젠을 포함한다. 그러나, 상기 중합용 혼합물 중에 개시제를 배합하지 않는 채로 수행되는 그 밖의 중합 방법은 종래 기술로서 공지되어 있으며, 방사선을 조사하여, 폴리머를 생성할 수도 있다. 또한, 본 발명의 일면은, 요소 포름알데하이드 또는 실리카 플러그를 생성하기 위해 이용되는 비닐기, 예컨대, 요소 포름알데하이드 또는 실리카 외에도, 중합 반응에 모노머 및 폴리머를 적용할 수 있다.

본 발명의 제조 방법에 의해 제조된 크로마토그래피 칼럼은, 중합하는 동안 형성되는, 소정의 크기 분포를 가지는 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그를 수용하기 위해, 내벽을 가지는 지지체를 포함하며, 상기 오프닝 크기는 상기 중합용 혼합물의 구성 성분의 종류 및 비율에 따라서 부분적으로 제어된다. 예를 들면, 분리에 효과적인 오프닝 크기는 포로젠 이외의 성분 중 몇몇의 양에 비례하며, 상기 중합용 혼합물 중의 포로젠의 양 및 종류에 의해 제어된다. 압력은 대기압보다 약간 높은 압력에서 상기 칼럼벽의 강도값까지의 범위에서 선택될 수 있다. 상기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는 평탄한 벽을 가지며, 상기 플러그 내에는 실질적으로 마이크로포어를 포함하지 않는다. 상기 플러그는 표면 작용기를 가질 수 있다. 예컨대, 페놀기와 같은 소수성 표면 작용기를 부가하여, 역상 플러그에서 수성 기체 용매를 이용하는 경우에 나타나는 팽윤도를 저하시킬 수 있지만, 전술한 경우에는 칼럼의 용량도 함께 저하될 수 있다. 마찬가지로, 친수성 표면 작용기를 부가하여, 역상 플러그의 용량을 향상시킬 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따른 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는 벽 내부에 마이크로포어 또는 채널형 오프닝(channeling opening)을 포함하지 않으며, 비닐 폴리머를 주성분으로 하지만, 본 발명의 수행 시, 그 밖의 다른 폴리머를 이용할 수도 있다. 약한 이온 교환기 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그는, 메타크릴레이트의 폴리머, 예컨대, 글리시딜 메타크릴레이트와 에틸렌 디메타크릴레이트가 2.5 내지 3.5의 범위, 또는 1.8 내지 2.2의 범위의 중량비값으로, 바람직하게는 상기 글리시딜 메타크릴레이트와 에틸렌 디메타크릴레이트가 3:2의 중량비로 주성분을 구성한다. 특별한 특성을 가지는 역상 모놀리스형 투과성 폴리머 플러그의 경우에는, 디비닐벤젠과 스티렌의 폴리머가 주성분으로서 구성된다. 상기 디비닐벤젠과 스티렌의 비값은 3.5 내지 4.5, 내지 0.8 내지 1.2인 것이 바람직하고, 특히, 상기 디비닐벤젠과 스티렌의 중량비가 4:1인 것이 바람직하며, 64 중량%의 DVB(디비닐벤젠) 또는 40 중량%의 스티렌, 및 72 중량%의 DVB를 포함할 수도 있고, 상기 디비닐벤젠과 상기 스티렌의 중량비가 2:3 내지 3:2의 범위, 또는 바람직하기로는 1:1일 수 있다. 아울러, 상기 칼럼은 상기 디비닐벤젠과 상기 스티렌의 비율이 8:1 내지 10:1의 범위일 수 있으며, 바람직하게는 상기 비율이 9:1이다. 또한, 100 중량%의 DVB를 이용하는 것도 바람직하다.

도 1에, 중합용 혼합물을 준비하는 단계(12), 상기 혼합물을 중합하는 단계(14), 크로마토그래피 작업을 위한 칼럼을 준비하는 단계(16) 및 크로마토그래피 작업을 수행하는 단계(18)를 포함하는 크로마토그래피 칼럼 제조 방법의 한 구현예(10)의 블록 다이어그램이 도시된다. 혼합물을 중합하는 단계(14)에 사용되는 중합용 혼합물은 중합 가능한 모노머 또는 폴리머, 개시제 또는 조사와 같은 개시 공정, 및 포로젠을 포함하며, 이들 중 많은 것들이 당업계에 공지되어 있다. 중합용 혼합물을 준비하는 단계(12), 중합 단계(14), 크로마토그래피 작업을 수행하는 단계(16) 및 크로마토그래피 작업을 수행하는 단계(18) 모두 다른 형태를 취할 수 있다. 이들 변형 중 일부에 대하여 이하 기재한다.

상기 단계(14)는 중합 화합물을 보이드를 감소시키도록 압축시키면서 반응시키는 하위단계(20), 폴리머를 세척하는 하위 단계(22), 및 일부 구현예에서는, 상기 폴리머를 반응시켜 특정 작용기를 부가하는 단계(24)를 포함한다. 중합하는 동안 중합용 혼합물을 압착시키지 않고 작동가능한 칼럼이 얻어질 수 있으나, 이와 같은 압축을 적용함으로써 현저한 개선이 얻어졌다. 이러한 개선은 경쟁적인 상업적 칼럼과 일부 유형의 칼럼 및 일부 적용을 위해서는 경쟁적이지 않을 칼럼을 구분하기에 충분히 현저한 것이다. 압축에 의해 형성이 방지되는 보이드 및 불균일한 분리에 효과적인 오프닝은 밀봉된 용기 내에서 중합 동안 폴리머의 수축에 의해 형성되는 빈 공간의 불균일한 분포로부터 초래될 수 있다. 이와 같은 빈 공간의 불균일한 분포는 칼럼 벽 표면, 폴리머 표면, 질소 및 포로젠 사이의 표면장력의 차이로 인한 것일 수 있다. 압축은 이러한 수축을 흡수하여 중합 동안에 칼럼의 전체 부피를 감소시키기에 충분하여야 한다. 이러한 공정은 칼럼 내에 분리에 효과적인 오프닝 크기에 영향을 미칠 수 있으며, 요구된다면 분리에 효과적인 오프닝 크기 내에 변형을 창출하도록 단계적인 공정으로 사용될 수 있다.

세척 단계(22)는 포로젠 및 미반응 모노머 또는 특정 칼럼을 위해 사용될 수 있으나 칼럼 내에 유지되도록 의도되지 않는 기타 성분들을 제거하기 위한 통상적인 단계이다. 상기 단계 이후, 칼럼이 단백질을 분리하기 위한 것이라면 중요한 상기한 바와 같은 작용기들을 부가하는 방식으로 반응시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세척 단계는 플러그의 팽창 후 수축을 야기한다. 수축은 보이드 채널링은 야기하므로, 한 구현예에서는 팽창된 플러그에 압력을 가하여 수축 동안에 보이드 형성을 방지한다.

도 2에, 압력 공급원(23), 압력을 중합용 혼합물(32)에 적용하기 위한 압력 전달 메커니즘(25), 압축 피스톤(27) 및 제한 용기(21)를 가지는 중합 장치(28)의 블록 다이어그램이 도시된다. 바람직한 구현예에서, 상기 압력 공급원(23)은 일정한 수압의 조절된 공급원이나 스프링 또는 공기 또는 불활성 기체 공급원과 같은 다른 공급원이 사용될 수 있다. 유사하게, 바람직한 구현예에서, 상기 메커니즘(25)은 중합 동안 피스톤 표면이 눌러지는 중합된 플러그에 매끄러운 표면을 제공하는 매끄러운 표면을 가진 피스톤이나, 투과성 모놀리스 중합 플러그에 직접 적용되는 기체와 같은 다른 공급원이 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 압축 피스톤(27)은 칼럼부(21) 내부로 이동하여 중합 반응 동안 구획(32) 내에 중합용 혼합물에 압력을 가한다. 중합 반응이 완결되면, 칼럼을 통하여 용매를 펌핑함으로써 포로젠을 제거할 수 있다. 중합은 온도 조절된 환경(29)에서 수행되며, 바람직한 구현예에서 수욕이나 가열된 체임버와 같은 임의의 온도 조절 메커니즘일 수 있다. 상기 기구를 위한 물질은 당업계에 공지된 임의의 전형적인 물질일 수 있다.

도 3에, 금속 칼럼 케이싱(1022), 제한 용기(88), 전달 메커니즘(25), 압축 피스톤(112) 및 압력 캡(80)을 가지는 중합 장치의 한 구현예(28)의 단면도가 도시된다. 상기 금속 칼럼(1022)은 제한 용기(88)에 대하여 타이트하게 수용되며, 이들 사이에 실(seal)(1021)을 구비한다. 상기 실(1021)의 압축이 장치의 배럴(122) 내 쇼울더(1052) 및 렌치 플랫(1023A, B))에 의해 제공되며, 스레드(1053)로 칼럼(1022)에 부착되어 칼럼(1022)과 제한 용기(88) 사이에 누출 없는 연결을 제공한다. 상기 전달 메커니즘(25)은 압축 피스톤(112), O-링(110), 막대(106), 유지 고리(104), 다른 O-링(100), 및 수압 피스톤 헤드(602)로 이루어지며, 압축 피스톤(112)과 O-링(110)이 제한 용기(88) 내부에 타이트한 실을 형성하도록 이들 모두 배럴(122) 내로 정렬되고 피팅된다. 상기 압력 캡(80)은 상기 배럴(122)에 피팅되는 유체 유입 포트(33)를 구비하며, 이들 사이에 가스킷(94)이 구비된다.

상기 압력 캡(80)과 배럴(122)은 타이트하게 연결되어 유체 유입구(33)를 통하여 적용되는 가압된 유체의 누출을 방지한다. 상기 전달 메커니즘(25)이 다음 도시되는 바와 같이 포지셔닝되어, 제한 용기(88) 내에 체적을 창출한다. O-링에서 배럴(122)의 내부 직경과 제한 용기(88)의 내부 직경의 비의 제공이 압력 곱셈 인자를 제공한다. 칼럼(1022)의 반대 단부는 칼럼 구획(32) 내 중합 반응물로 충전되고, 구속 플러그(1024)가 오프닝 내에 피팅된다. 구속 캡(604)이 칼럼(1022) 위로 스레딩되어, 구속 플러그(1024)가 오프닝을 밀봉하도록 한다. 바람직한 구현예는 밀봉을 제공하기 위한 타이트한 피팅 플러그(1024)를 도시하나, 링과 같은 대안적인 밀봉이 실 또는 방사상 실을 제공하도록 용이하게 사용될 수 있다. 유체 유입구(33)가 조절가능한 유체 펌프 또는 압축 가스의 조절된 용기와 같은 조절된 압력 공급원에 연결된다.

바람직한 구현예는 유체 공급원; 압축된 가스 또는 유체 유입구(33)를 통하여 적용된 압축된 유체를 사용하나, 압축력은 대안적 수단; 예컨대, 이에 제한되지 않으나 절단 메커니즘(25)을 압착하는 스프링, 중력을 이용하여 압축을 제공하는 전달 메커니즘(25) 위에 스태킹된 분동, 또는 전달 메커니즘(25)이 칼럼 구획(32) 내부에 모놀리스 중합 칼럼 재료를 압축하도록 정렬된 구심력에 의해 용이하게 공급될 수 있다.

일단 조립되면, 장치(28)는 바람직한 구현예에서 열적으로 조절되는 수욕인 온도-조절된 환경(29)에 배치된다. 다음, 유압이 압력 캡(80), 가스킷(94), 수압 피스톤 헤드(602) 및 O-링(100)에 포함되는 유체 유입 포트(33)를 통하여 적용된다. 이와 같이 적용된 힘은 수압 피스톤 헤드(602)를 압력 캡(80)으로부터 멀리 이동시키고, 막대(106)의 말단에 힘을 발휘한다.

상기 막대(106)는 힘을 압축 피스톤(112)에 전달하여 바람직하게 매끄러운 표면(1101)에서 압축 압력을 모놀리스 폴리머 칼럼 재료에 적용한다. 상기 매끄러운 표면은 연속적이고 균일한 표면이 궁극적인 적용에서 분석적 유체에 노출되는 모놀리스 중합 재료 위에 창출되도록 하고, 모놀리스 폴리머 칼럼 재료가 압축 피스톤(112)에 부착되는 것을 감소시킨다.

구속 플러그(1024), 칼럼(1022), 실(1021), 제한 용기(88), 및 압축 피스톤(112)이 모놀리스 중합 재료를 제한한다. 화학적 반응이 진행됨에 따라, 모놀리스 중합 재료의 부피가 감소하고, 전달 메커니즘(25)이 제한 용기(88) 내로 더욱 이동한다. O-링(100)과 O-링(11) 사이의 공기가 배럴(122) 내에 공기 배출 오프닝(603)을 통하여 배출된다. 이러한 방식으로 반응 물질의 압축이 모놀리스 중합 재료 내에 바람직하지 않은 보이드 형성을 방지하고, 사용시에 칼럼 성능을 저하시킬 모놀리스 중합 재료와 칼럼(1022) 사이에 벽 효과(wall effects)를 제거한다.

반응이 진행되고 모놀리스 중합 재료 부피가 감소함에 따라, 압축 피스톤(112)이 칼럼(1022)에 보다 가까이 이동한다. 중합 후반에, 유지 링(104)이 배럴(122) 내에 쇼울더(1052)와 접촉하여, 전달 메커니즘(25)의 전방 이동을 정지시킨다. 새로 형성된 모놀리스 중합 재료의 압착이 이러한 작용에 의해 방지된다. 이 위치에서, 압축 피스톤(112)의 매끄러운 표면(1101)이 칼럼 말단과 거의 평행하며, 모놀리스 중합 재료가 재료 내에 바람직하지 않은 보이드 또는 재료와 칼럼(1022) 사이에 벽 효과 없이 칼럼(1022)을 충전한다. 렌치 플랫(1023A, 1023B)을 사용하여, 중합 장치(28)가 칼럼(1022)로부터 어셈블리로서 분리된다. 크로마토그래피 장치가 양 말단에 설치된다.

도 4에, 중합 장치 구현예(28)와 유사하고, 유리 칼럼 케이싱(922), 피스톤 헤드 어셈블리(401), 변위 피스톤(40) 및 구속 플러그(923)를 가지는 중합 장치의 다른 구현예(28A)가 도시된다. 일부 분석 화학 적용에서, 습윤된 표면은 금속 성분을 함유하지 않아야 한다. 바람직한 구현예에 대한 논의는 유리 칼럼(922) 및 플라스틱 부품을 언급하고 있으나, 비-금속성 재료; 예컨대, 이에 제한되지 않으나, 유리, 세라믹 또는 허용가능한 기계적 특성을 제공하는 플라스틱이 사용될 수 있다. 나아가, 본원에서 논의는 적절한 유압 공급원에 의해 제공되는 압력을 언급하고 있으나, 이에 제한되지 않으나 스프링, 분동 또는 기계적 수단을 포함하는 압축을 제공하는 대안적 수단이 용이하게 사용될 수 있다.

상기 피스톤 헤드 어셈블리(401)는 칼럼(922) 내에 조립되고 피팅되는 피스톤(76), O-링(38) 및 중간부(50)를 포함한다. 변위 피스톤(40)과 O-링(64)으로 이루어지는 플런저 어셈블리(20)가 조립되고, 유압 실린더(21) 내에서 오목부(92)가 유체 유입 포트(33)로부터 떨어지도록 수압 실린더 부분(21) 내로 피팅된다. 상기 플런저 어셈블리(20)는 변위 체임버(60) 내로 완전히 밀려진다.

다음, 수압 실린더 부분(21)과 플런저 어셈블리(30)가 칼럼(922) 위로 쓰레딩된다. 적절한 도구를 사용하여, 환상의 쇼울더(42)가 변위 피스톤(40)과 접촉하고 감소된 직경의 넥(48)이 오목부(92) 내로 피팅될 때까지, 피스톤 어셈블리(401)가 수압 실린더 부분(21) 내로 밀려진다. 칼럼(922)가 반응물로 충전되고, 구속 플러그(923)가 칼럼(922)의 오픈 말단 내로 삽입된다. 구속 캡(924)이 칼럼(922) 말단 위로 쓰레딩되어, 구속 플러그(923)를 칼럼(922)에 타이트하게 유지한다. 이러한 구현예는 구속 플러그(923)와 칼럼(922) 사이에 타이트한 피트를 이용하나, 이에 제한되지 않으나 면 또는 방사상 실을 창출하는 O-링을 포함하는 대안적 방법이 용이하게 사용될 수 있다.

다음, 유압 공급원이 유체 유입 포트(33)를 통하여 공급된다. 유체는 수압 실린더 부분(21), 변위 피스톤(40) 및 O-링(64)에 의해 변위 체임버(60) 내에 포함된다. 조립된 성분은 온도-조절된 환경(29)에 배치된다. 이 구현예에서, 열적으로 조절되는 수욕이 사용되나, 반응 온도를 조절할 수 있는 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다.

유압의 적용은 변위 피스톤(40)을 유체 유입 포트(33)로부터 멀리 이동시킨다. 이러한 변위 피스톤(40)의 이동은 힘을 중간부(50)의 환상 쇼울더(42)에 가하며, 상기 환상 쇼울더는 압력을 피스톤(76)을 통하여 칼럼(922) 내에 모놀리스 폴리머 물질에 가한다.

반응 화학물질이 중합됨에 따라, 부피는 감소한다. 모놀리스 폴리머 재료에의 압력의 조절된 적용은 모놀리스 폴리머 재료 내에 바람직하지 않은 보이드의 형성 및 부피 감소에 따른 모놀리스 폴리머 재료와 칼럼(922) 벽 사이의 벽 효과 형성을 방지한다. 반응이 진행됨에 따라, 피스톤(76)이 칼럼(922) 내로 더욱 이동하여 부피 감소를 대체한다. 피스톤 위에 매끄러운 표면(74)이 모놀리스 폴리머 재료의 균일한 표면을 창출하여, 그 최종 용도에서 분석용 유체에 일정한 경계면을 제공하고, 모놀리스 폴리머 재료가 피스톤(76) 표면에 부착되는 것을 방지한다.

반응이 완결된 무렵, 환상 쇼울더(42)가 칼럼(922) 말단과 접촉하여 중간부(50)의 칼럼(922) 내로의 추가적인 이동을 방지한다. 이는 보이드와 벽 효과가 제거된 이후의 모놀리스 폴리머 재료의 압착을 방지한다. 상기 환상 쇼울더(42)는 또한 피스톤이 이동할 수 있는 거리를 제한하여, 칼럼(922) 내에 형성되는 모놀리스 폴리머 재료의 보이드를 및 크기를 조절한다.

중합이 완료된 후, 수압 실린더 부분(21)을 변위 피스톤(40) 및 그 O-링(64)과 함께 칼럼(922)으로부터 제거한다. 구속 캡(924) 및 구속 플러그(923)를 제거하고, 최종적으로 피스톤 헤드 어셈블리(401)를 제거한다. 다음, 크로마토그래피 장치를 양 말단에 설치한다.

또한, 압축 기체를 반응 화학물질 표면에 직접 적용함으로써 반응 화학물질에 대한 압축을 제공하는 것이 가능하다. 이러한 방법은, 결과 형성되는 모놀리스 폴리머 재료의 표면이 매끄럽거나 균일하지 않으며, 특정 칼럼 포맷이 선택될 경우 모놀리스 폴리머 재료 보다 다공성일 수 있으므로, 상기한 기술에 비하여 열등한 것으로 간주된다. 다른 칼럼 포맷에서, 기체의 직접 적용은 보다 적용가능할 것이다. 폴리머 막대의 말단을 절단하여 고해상도 분리를 얻는 것이 필요할 것이다. 도 5에, 120 psi 수압 하에 칼럼 케이싱 내부에서 중합된 강한 양이온 교환기의 9,000 배 확대된 주사현미경(SEM) 사진이 도시되며, 이는 기공이 없으나 채널을 가지는 입자 글로불들이 불균일한 표면과 스테킹된 플레이트 형의 구조의 정도가 낮기 때문에 높은 표면적을 가짐을 보인다. 그 표면을 덮는 돌출부를 가지는 입자들의 거친 표면은 증가에 의한 성장을 나타낼 수 있는 사인을 보인다.

도 6에, 압력의 적용에 의해 팽창 및 수축의 문제가 피하여진 칼럼 내에서 분리된 단백질 샘플로부터의 피크를 가진 크로마토그램이 도시된다. 상기 피크는 명확하고 비교적 좋은 해상도를 가지며 높다. 상기 특정 크로마토그램은 하나의 용매로서 pH 7.6의 0.01 M Tris 버퍼를 사용하고 다른 하나의 용매로서 5분 시간 내에 0 내지 50% 2차 용매 구배를 가진 용매를 사용하여 콘알부민, 오브알부민 및 트립신 저해제의 단백질 샘플 상에 3 ml/mm의 유동 속도로 구배 회피를 위한 것이다. 상기 칼럼 내에 배압은 스캐어 인치 당 250 파운드인 반면, 이와 같은 보상이 없는 칼럼은 동일한 구배에 대하여 보다 높은 배압을 가질 것으로 예상된다.

도 7에서, 세 개의 플러그가 도시되며, 하나는 중합 동안 압력을 가지고 생성되는 왼쪽에, 두 개는 압력 없이 중합되는 오른쪽에 도시된다. 도 7은 칼럼 형성 동안 수축에 의해 야기되는 칼럼 표면 상에 형성되는 불연속성을 예증한다. 칼럼 내부에 예측불가능하게 이격된 비교적 큰 오프닝 형태의 유사한 불연속성이 있다. 이들 도면은 또한 불연속성을 제거하여 동일한 조성 및 크기의 칼럼 사이에 보다 나은 재생산성 및 크로마토그래피 작업 동안 개선된 해상도를 얻을 수 있음을 예증한다.

도 8에, 펌핑 시스템(121), 칼럼 및 검출 어레이(141)를 구비한 크로마토그래피 시스템(101), 수집기 시스템(117), 조절기(119) 및 퍼지 시스템(123)의 블록 다이어그램을 도시한다. 상기 칼럼 및 검출 어레이(141)는 그 안에 투과성 플러그를 가진 다수의 칼럼을 포함한다. 바람직하게, 상기 플러그는 크기-보상된 폴리머 플러그이다. 상기 펌핑 시스템(121)은 조절기(119)의 조절하에 용매를 칼럼과 검출 어레이(141)에 공급한다. 상기 퍼지 시스템(123)은 펌프 어레이(135)와 소통하여 펌프 및 펌프 사이의 라인 및 크로마토그래피 작업 사이의 칼럼을 정화한다. 상기 펌프 어레이(135)는 용매를 칼럼과 검출 어레이(141)에 공급하며, 이로부터 방출물이 조절기(119)의 조절하에 수집기 시스템(117) 내로 흐른다. 상기 조절기(119)는 칼럼 및 검출기 어레이(141) 내에 검출기로부터 용질의 밴드를 나타내는 시그널을 받으며 이에 따라 당업계에 공지된 방식으로 분류 수집기 시스템(117)을 활성화한다. 적절한 분류 수집기 시스템은 Isco, Inc., 4700 Superior Street, Lincoln, NE 68504.로부터 구입가능한 FOXY7 200 분류 수집기이다.

용매를 펌프 어레이(135)로 공급하기 위하여, 상기 펌핑 시스템(121)은, 첫번째 및 두번째 것이 각각 (131) 및 (133)으로 표시되는 복수의 용매 저장소 및 매니폴드, 펌프 어레이(135), 및 조절기(119)의 조절하에 구동되어 펌프 어레이(135)를 작동시키는 모터(137)를 포함한다. 상기 조절기(119)는 또한 펌프 어레이(135) 내에 밸브를 조절하여 모터가 펌프 어레이(135) 내에 왕복 운동하는 펌프의 피스톤을 가동시킴에 따른 용매의 흐름과 구배 형성을 조절하는 동시에, 상기 어레이 내에 복수의 펌프로부터 용매를 펌핑하고 (131)과 (133)과 같은 용매 저장소 및 매니폴드로부터 용매를 펌낸다.

바람직한 구현예에서, 왕복 운동하는 피스톤 펌프 어레이가 사용되나, 왕복 운동 및 피스톤 유형과 무관하게 임의의 유형의 펌프가 적합하다. 다수의 다른 펌프 및 펌핑 원리가 당업계 및 당업자에게 공지되어 있으며, 임의의 그러한 공지된 펌프 또는 펌핑 원리를 본원에 개시된 발명에 대부분의 경우 통상적인 엔지니어링으로 적용할 수 있다. 도 1의 구현예에 두 개의 용매가 개시되어 있으나, 단지 하나의 용매 또는 2개 이상의 용매가 사용될 수 있다.

방출물을 처리하기 위하여, 수집기 시스템(117)은 용질을 수집하기 위한 분류 수집기(141), 매니폴드(143) 및 매니폴드(143)로부터 폐기물을 처리하기 위한 폐기물 보관소(145)를 포함한다. 하나 이상의 분류 수집기가 칼럼 및 검출 어레이(143)와 소통하여 매니폴드와 함께 또는 단독으로 칼럼으로부터 용질을 받는다. 매니폴드를 사용하여 하나 이상의 칼럼으로부터 용질을 결합시키고 단일 용기 내에 이들을 보관할 수 있거나, 또는 각각의 칼럼이 그 자체의 용기 내에 용질을 보관하거나, 일부 칼럼은 각각 그 자체의 용기 내에 용질을 보관하고 다른 칼럼들은 동일한 용기 내에 용질을 결합시킬 수 있다. 매니폴드(143)는 칼럼 및 검출 어레이(141)와 소통하여 각각의 칼럼으로부터 방출물을 채널링하고 이를 폐기물 보관소(145)에 보관한다.

도 8의 시스템은 각각 유사한 작업에 수반되는 칼럼 어레이를 포함하고 있기 때문에, 단일 작업을 수행하는 각각의 칼럼이 그 작업을 수행하는 다른 칼럼들 모두와 가능한한 유사한 것이 바람직하므로 칼럼의 재생가능성이 특히 중요하다. 결과적으로, 다른 칼럼들과 밀접하게 연관된 샘플 분리를 수행함에 있어 협력하도록 의도되는 칼럼 군에 상당한 이점이 있으며, 본 발명의 투과성 폴리머 칼럼은 특정 용도를 가진다.

측벽 내에 오프닝이 없거나 플러그 몸체 내에 큰 오프닝이 없는 분리 매개체로서 폴리머 플러그를 가지는 칼럼 또는 기타 장치를 제조하기 위하여, 중합 장치의 한 구현에는 중합 동안에 중합용 혼합물을 함유하도록 되는 온도 조절 반응 챔버 및 상기 온도 조절 반응 챔버 내에서 상기 중합용 혼합물에 압력을 가하는 수단을 포함한다. 상기 중합용 혼합물은 모노머, 폴리머 및 포로젠을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 가압 수단은 이동가능한 부재를 사용하여 압력을 가하는 수단이다. 상기 중합용 혼합물은 가교 시약 및 가교 모노머를 포함한다. 강성, 용량 및 분리에 효과적인 오프닝 분배를 가교 시약, 모노머, 중합 온도 및 압력에 의해 조절한다.

오븐의 경우 용매 손실을 피하고 수축 반응 챔버의 경우 혼합물의 물로의 회석 또는 오염을 피하기 위하여, 중합은 밀폐된 용기 내에서 수행된다. 이온 교환 칼럼을 위한 혼합물과 같은 일부 혼합물의 중합 동안 압력이 가하여져 수축에 의해 형성되는 진공의 균형을 맞춘다. 중합 후 상기 폴리머 플러그를 세척하여 포로젠을 제거한다. 일부 폴리머의 경우, 상기 플러그는 세척 동안 또는 플러그가 역상 플러그인 경우와 같이 수성 액체 혼합물이 가하여진다면 크로마토그래피 작업 동안 팽창하려는 경향을 가질 수 있다.

혼합물을 그 성분들로 분리하기 위하여, 투과성 폴리머 플러그가 상기한 바와 같이 형성된다. 이는 통상적인 관상 실리더, 모세관 또는 마이크로칩이거나 임의의 규모 또는 형상을 가진 전형적인 액체 크로마토그래피 칼럼을 포함하는 임의의 크기 또는 형태의 칼럼 내에 형성될 수 있다. 샘플이 상기 플러그와 병렬 배치되며, 샘플 성분들이 플러그를 통하여 이동함에 따라 서로 분리된다.

예컨대, 액체 크로마토그래피에 의해 샘플 내에 단백질 혼합물로부터 단백질을 분리하기 위하여, 칼럼이 플러그로서 형성되고 포로젠과 함께 중합된다. 사용 전에 수축이 보상된다. 상기 샘플을 칼럼내로 주입하고 용매를 칼럼을 통하여 흐르도록 함으로써, 샘플이 플러그를 통하여 운반됨에 따라 그 성분들로 분리된다. 한 구현예에서, 복수의 샘플들이 별개의 칼럼 내에서 높은 반복 가능성으로 동시에 분리된다.

분리 공정에 사용되는 크로마토그래피 칼럼의 한 구현에는 내부 케이싱 벽을 가진 크로마토그래피 케이싱을 가지며 상기 케이싱 벽 내에 투과성 모놀리스 폴리머 플러그를 가진다. 상기 플러그는 중합 전에 중합용 혼합물 내 포로젠에 의해 폴리머 내에 형성된 조절된 크기 및 중합 동안에 압력에 의해 적어도 부분적으로 조절된 크기일 수 있는 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머이다. 상기 투과성 모놀리스 폴리머 플러그는 매끄러운 벽을 가지고 상기 투과성 모놀리스 폴리머 플러그 내에 실질적으로 기공을 가지지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 플러그는 비닐 폴리머로 형성되나, 우레아 포름알데하이드 또는 실리카와 같이 다른 것으로 형성될 수 있다. 이들은 소수성기와 같은 표면 작용기를 포함하여 수성 용매로 팽창을 감소시키거나 친수성기를 포함하여 용량을 증가시킬 수 있다.

중합용 혼합물 내에 성분들과 다른 플러그 내에 성분들의 비율에 대한 일부 실시예가 예증된다. 예컨대, 오프닝 채널링이 없는 약이온 교환성의 투과성 모놀리스 폴리머 플러그는 메타크릴레이트 폴리머로 원칙적으로 형성된다. 유리하게, 상기 투과성 모놀리스 폴리머 플러그는 원칙적으로 글리시딜 메타크릴레이트 및 에틸렌 디메타크릴레이드로 1:1 내지 7:3 및 바람직하게는 3:2의 중량비 범위로 형성된다.

강한 음이온 교환기는 원칙적으로 성분 글리시딜 메타크릴레이트(GMA) 및 에틸렌 디비닐메타크릴레이트(EDMA)를 0.8:1.2 내지 2.8:3.2 및 바람직하게 1:3의 비로 포함한다. 상기 중합 액체 혼합물을 바람직한 구현예에서 0.4g의 GMA, 0.5g의 2-(아크릴로일옥시에틸)트리메틸암모늄 메틸 설페이트, 1.2g의 EMDA, 1.5g의 1,4-부탄디올, 1.35g의 프로판올, 0.15g의 물 및 0.02g의 AIBN을 포함한다.

약한 양이온 교환기는 메틸 메타크릴레이트(MMA), GMA 및 EDMA의, MMA의 GMA에 대한 비가 4.5:5.5 이고 EDMA에 대한 비가 0.8:1.2이고, 11:13, 바람직하게는 5:1:12인 중합 액체 혼합물을 포함하였다. 상기 중합 액체 혼합물을 0.2 g의 AA, 0.5 g의 methyl methacrylate (MMA), 0.1 g의 GMA, 1.2 g의 EDMA, 2.55 g의 도데칸올, 0.45 g의 시클로헥산을 및 0.02 g의 AIBN을 포함한다. 중합 후, 상기 칼럼을 5M 소듐 하이드록사이드 NaOH 내 5M 소듐 클로로아세테이트 내에서 60°C에서 6 시간 동안 가수분해한다.

다른 예는 다음과 같다: (1) 1:1 내지 2:1 중량비의 글리시딜 메타크릴레이트 및 에틸렌 디메타크릴레이트; (2) 3:1 내지 9:1 중량비의 디비닐벤젠 및 스티렌; (3) 4:1 중량비 또는 디비닐벤젠의 양이 35 내지 80 중량%, 바람직하게는 64 중량%인 디비닐벤젠 및 스티렌; (4) 각각 8:2:15 중량비의 디비닐벤젠, 스티렌 및 포로젠; (5) 13-17 단위의 개시제와 결합된 도데칸올에 대하여 7 내지 9 단위의 디비닐벤젠 내지 1.5 내지 2.5 단위의 스티렌 비율 범위의 디비닐벤젠, 스티렌 및 도데칸올; (6) 개시제와 결합된 각각 8:2:15의 디비닐벤젠, 스티렌 및 도데칸올, (7) 각각 개시제와 결합된, 7-9 : 1.5-25 : 9-13 : 2.5-35 비율의 디비닐벤젠, 스티렌, 도데칸올 및 톨루엔; (8) 각각 개시제와 결합된, 8:2:11:3 비율의 디비닐벤젠, 스티렌, 도데칸올 및 톨루엔; (9) 각각 개시제와 결합된 0.5-0.7 : 0.3-0.5 : 1-2 : 0.1-25 비율의 글리시딜 메타크릴레이트, 에틸렌 디메타크릴레이트, 시클로헥사놀 및 도데칸올; (10) 각각 0.6:0.4:1.325:0.175 비율의 글리시딜 메타크릴레이트, 에틸렌 디메타크릴레이트, 시클로헥사놀 및 도데칸올.

일반적으로, 목표로 하는 적용을 위하여 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 모놀리스 폴리머 서포트를 제조하는 공정은 다음 단계를 포함할 수 있다: (1) 선별된 포몰러의 중합용 혼합물을 제조하는 단계; (2) 상기 혼합물을 때때로 본 발명의 일부 구현예에서 칼럼으로 언급되는 원하는 형상 및 크기의 용기 내에 배치하는 단계; (3) 상기 칼럼을 가압 설비 또는 비-압력 밀봉으로 밀봉하는 단계; (4) 상기 중합용 혼합물을 가열 욕 또는 오븐 내에서 조절된 온도로 선별된 압력하에 또는 압력없이 중합하는 단계; (5) 상기 칼럼을 상기 가열 욕 또는 오븐으로부터 꺼내어 원하는 기능을 위해 선별되거나 특별히 고안된 설비를 적용하는 단계; (6) 포로젠 및 가용성 물질을 칼럼으로부터 분리하여 선별된 용매로 바람직하게는 프로그래밍된 흐름에 의해 세척하는 단계; (7) 일부 구현예에서, 제조된 변형 액체 혼합물을 펌핑하여 상호작용을 위한 원하는 작용기를 얻는 단계 (8) 가열 욕 또는 오븐 내에서 조절된 조건하에 특별 변형을 수행하는 단계, (9) 칼럼으로부터 상기 변형 액체 혼합물을 분리하여 바람직하게는 프로그래밍된 흐름으로 세척하는 단계; (10) 고해상도로 원하는 조건에서의 사용을 위해 칼럼을 안정화, 조립 및 컨디셔닝하는 단계; (11) 타겟 적용에서 샘플 분리를 사용하여 칼럼을 규명하는 단계; 및 (12) 칼럼 내에 액체를 선별된 저장 액체 혼합물로 대체하는 단계. 단계 7 내지 9는 사용되는 매질의 작용기에 따라 임의적이거나 반복적이다. 단계 1 내지 5는 2 이상의 복수 단계 중합 공정에서 변형되고 반복된다.

본 발명의 일부 구현예에서, 중합용 혼합물은 단일 또는 복수의: (1) 모노머; (2) 포로젠; (3) 개시제 또는 촉매; 및/또는 (4) 첨가제 또는 충전제(임의로)를 포함한다. 상기 중합용 혼합물은 칼럼으로 충전되거나 주입되기 전에 헬륨을 사용하여 15 분 이상 동안 또는 진공에 의해, 또는 이들 조합에 의해 탈기될 수 있다. 상기 탈기의 목적은 혼합물 내 산소를 제거하는 것이다. 산소는 다른 상황에서 저해제 또는 개시제로 작용하여 일부 예측불가능한 중합 습성을 초래할 수 있으며, 이는 칼럼의 해상도 및 재생가능성에 치명적이다.

상기 공정을 위해 적절한 모노머는 당업계에 공지된 모노, 디 및 다작용성 모노머, 바람직하게는 중간생성물로서 인-시투 생성될 수 있는 비닐 또는 하이드록시 실리카 작용기를 함유하는 모노머를 포함한다. 전형적인 모노비닐 모노머는 스티렌 및 하이드록시, 할로젠, 아미노, 설폰산, 카르복시산, 니트로기 및 C4, C8, C12, 및 C18과 같은 상이한 알킬 사슬을 함유하는 그 유도체, 또는 중합 전후에 작용기들을 생성하기 위하여 사용될 수 있으며 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 비닐 술폰산 및 상기 화합물들을 인-시투 생성하는데 사용될 수 있는 그 유도체 또는 기를 포함하는 보호된 포맷을 포함한다. 이들 모노머들의 혼합물이 사용될 수 있다. 하이드록시기, 비닐기, 알킬기 또는 그 유도체를 가진 실록산 및 그 혼합물이 바람직하다. 일작용성 모노머의 양은 본 발명의 구현예에서 전체 모노머의 2 내지 60%로 변화한다. 이러한 변화는 매질의 유형에 극적으로 의존한다.

전형적인 이작용성 또는 다작용성 모노머는 바람직하게 벤젠, 나프탈렌, 피리딘, 알킬 에틸렌 글리콜 또는 그 올리고와 같은 브리징 모어이터를 가지는 2- 또는 복수의 비닐-함유 모노머이다. 폴리비닐 화합물의 예는 디비닐벤젠, 디비닐나프탈렌, 알킬렌 디아크릴레이트, 디메타크릴레이트, 디아크릴아미드 및 디메타크릴아미드, 디비닐피리딘, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트 및 디아크릴레이트, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트 및 아크릴레이트, 펜타에리스리톨 디-, 트리-, 또는 테트라메타크릴레이트 및 아크릴레이트, 트리메틸로프로판 트리메타크릴레이트 및 아크릴레이트, 및 이들 화합물들의 혼합물이다. 디, 트리 및 테트라하이드록실기를 가진 실록산은 종종 인-시투 생성되며 또한 본 발명에서 바람직하다. 전형적인 다작용성 모노머의 양은 본 발명의 구현예에서 40 내지 80%이다.

개시제는 아조 화합물 및 퍼옥사이드와 같은 당업계에 공지된 모든 개시제를 포함한다. 전형적인 개시제의 예는 아조비스 이소부틸로니트릴, 벤조일 퍼옥사이드, 2,2'-아조비스(이소부티르아미드)디하이드레이트, 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)디하이드로클로라이드이다. 전형적인 개시제의 양은 본 발명의 구현예에서 전체 모노머 중의 0.5 내지 2%이다. 실록산이 사용되는 경우, 산과 같은 촉매가 개시제 대신 사용된다. 촉매의 양은 중합용 혼합물 1 리터당 수 밀리몰 내지 몰이다. 중합용 혼합물 내에 개시를 혼입하지 않는 다른 중합에 대한 접근이 방사하여 폴리머를 형성하는 것과 같이 당업계에 공지되어 있으며 사용가능하다.

포로젠은 중합 후에 제거되어 분리에 효과적인 오프닝 구조를 생성할 수 있는 임의의 물질 또는 화합물이다. 사용가능한 전형적인 포로젠은 유기 용매, 물, 올리고머, 폴리머, 분해가능하거나 가용성인 폴리머이다. 유기 용매의 일부 예는 알코올, 에스테르, 에테르, 지방적 및 방향족 탄화수소, 테콘, 디, 트리, 테트라에틸렌 글리콜, 부탄 디올, 글리세롤 또는 이들 용매의 조합이다. 포로젠의 선택은 분리에 효과적인 오프닝의 크기 및 분리에 효과적인 오프닝의 필요한 분포에 의존한다.

일부 구현예에서, 단일 포로젠 용매 또는 포로젠 용매의 조합이 선택된다. 단일 또는 조합의 포로젠 용매는 모노머 및 개시제와 혼합되어 균일한 액체 혼합물을 형성할 수 있으나, 단일 또는 조합 포로젤 용매는 형성되는 폴리머와 저조한 가용화 성능을 가진다. 중합은 대개 개시제로부터 시작한다. 올리고머 형성 후, 가교되어 가교된 폴리머 또는 핵을 형성하고, 폴리머 또는 핵이 연속 성장한다. 이들 폴리머 체인 및 핵은 포로젠 용매의 가용화 성능에 의해 허용되는 크기로 액체 혼합물로부터 침전된다. 이들 폴리머 체인 및 핵은 액체 혼합물 내에 먼저 현탁되어 충돌 및 가교를 통하여 작은 입자들을 형성한다. 상기 작은 입자들이 포로젠 및 모노머에 의해 팽창되고, 중합 및 다른 핵 또는 입자와의 응집에 의해 계속하여 성장한다. 보다 큰 입자가 충돌에 의해 함께 응집하고 가교에 의해 배치된다. 폴리머와 핵의 침전 시간 및 속도는 입자, 응집물 또는 클러스터의 크기 및 이들 입자 및 응집물 중에 형성되는 분리에 효과적인 오프닝의 크기 및 분리에 효과적인 오프닝 분포에 극적으로 영향을 미친다.

매우 저조한 성능의 용매와 상당히 우수한 용매의 조합이 액체 혼합물 내에 폴리머의 가용성 및 팽창가능성을 조정하기에 보다 나으며, 이는 원하는 보이드를 및 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 초래하는 것으로 밝혀졌다. 큰 분리에 효과적인 오프닝의 생성이 가장 중요하므로 저조한 성능의 용매의 선택이 보다 중요하다. 큰 분리에 효과적인 오프닝의 생성 후, 분리에 효과적인 오프닝 크기를 감소시키기 위한 우수하거나 상당히 우수한 용매를 찾기는 항상 용이하다. 알코올 또는 하이드록실기 또는 복수의 하이드록실기를 함유하는 중성 화합물이 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드 및 폴리메타크릴아미드로 이루어진 매질에 대한 저조한 용매에 대한 보다 나은 선택인 것으로 밝혀졌다. 다른 체인 길이 및 하이드록실기수의 알코올을 사용하여 용해도 또는 가용화 성능이 용이하게 조정할 수 있다. 폴리머를 위한 우수한 용매는 톨루엔, 테트라하이드로퓨란, 아세트니트릴, 포름아미드, 아세트아미드, DMSO와 같은 통상적인 우수한 용매로부터 선택될 수 있다. 포로젠의 전형적인 양은 본 발명의 구현예에서 20 내지 80%, 보다 바람직하게 40 내지 60%로 변화한다.

본 발명에 사용되는 첨가제 또는 충전제는 특히 요구되는 특성을 매질에 부여하는 재료들이다. 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머의 한가지 중요한 특성은 폴리머의 강성이다. 불용성 강성 폴리머 입자, 실리카 입자 또는 기타 무기 입자를 중합용 혼합물에 첨가하여 중합 후에 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머를 강화할 수 있다. 매우 많은 수 또는 양의 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머는 대개 우수한 강도(strength 또는 toughness)를 가지지 않는다. 이들은 대부분 취약하다. 강성의 입자는 폴리머를 위한 프레임워크로서 작용할 수 있다. 다른 구현예에서, 매우 일-분산된 비-다공성 입자를 중합용 혼합물에 첨가함으로써 큰 직경의 칼럼의 제조 동안 열 전달의 문제가 감소된다. 종종, 큰 직경의 칼럼이 고유동 예비 크로마토그래피 또는 촉매층으로 하여금 낮은 배압으로 고유동율을 허용하도록 하기 위하여 요구된다.

분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머의 구현예에서, 일-분산된 큰 비-다공성 입자 또는 비드들이 조밀한 패키징의 패턴으로 타이트하게 패킹된다. 중합용 혼합물이 큰 비드들 사이의 공간으로 충전되고 이 공간 내에서 중합된다. 조밀하게 패킹된 일-분산 비드들에 의하여 흐름 패턴 및 칼럼 효율성이 개선된다. 큰 일-분산된 비드들이 큰 칼럼에 대한 지지 물질이므로, 매우 다수 또는 다량의 분리에 효과적인 오프닝을 가진 물질을 큰 직경의 칼럼 내에 낮은 강성을 가진 매질의 붕괴 위험 없이 제조할 수 있다. 다수 또는 다량의 분리에 효과적인 오프닝이지만 폴리머의 강성 구조로 인하여 고유동율에 도달할 수 있다.

다른 구현예에서, 분리에 효과적인 오프닝을 충전재로서 혼입시키는 2-단계 또는 복수 단계 중합으로 큰 직경의 칼럼의 제조에서 열 소산 문제가 피하여진다. 본 발명의 구현예에서, 동일한 중합용 혼합물로부터 제조되는 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 복수의 얇은 칼럼을 충전재로 사용하여 큰 칼럼의 인-시투 제조 동안 열 소산 문제를 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에서, 폴리머 막대를 동일한 목적의 충전재로서 사용한다. 본 발명의 한 구현예에서, 충전재 물질은 큰 비-다공성 실리카 비드이다.

폴리머, 모노머, 개시제, 포로젠, 첨가제 및 중합 온도를 선별하여 칼럼 특성을 개선시키고, 중합 동안 압력을 사용하는 중합의 구현예와 함께 또는 다른 공정들과 함께 사용할 수 있다. 이러한 공정의 일부 측면들을 모노머 및 축중합 반응 및 실리카 모놀리스를 형성하는 졸 겔 반응과 같은 자유 라디칼 반응 이외의 중합 반응에서 형성되는 폴리머에 적용할 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서 칼럼 하드웨어는, 원통형, 원뿔형, 직사각형 및 정다각형을 포함하는 다양한 형상을 가지는 크로마토그래피 칼럼으로 사용될 강성 튜브 또는 이들 튜브의 어셈블리를 포함한다. 이러한 튜브는 금속, 유리, 실리카, 플라스틱

틱 또는 기타 폴리머, 보다 바람직하게는 스테인레스 스틸 또는 유리를 포함하는 당업계에 공지된 통상적인 재료로부터 제조될 수 있다. 이러한 튜브의 내부 규모는 직경, 두께, 넓이 또는 폭에 있어서 마이크로미터 내지 미터일 수 있다. 투과성 고체 물질이 튜브의 전체 단면적을 채울 수 있으며, 튜브를 축으로 또는 방사상으로 통과함으로써 분리 방식에 따라, 보다 구체적으로 축방향 또는 직접 유동 크로마토그래피 또는 방사상 유동 크로마토그래피에 따라 샘플 분리가 일어난다 (Lee, W-C, et al, "Radial Flow Affinity Chromatography for Trypsin Purification", Protein Purification (book), ACS Symposium Series 427, Chapter 8, American Chemical Society, Washington, D.C., 1990.). 중합 액체 혼합물이 중합 동안 접촉하는 칼럼 또는 몰드의 내부 표면은 비-반응성이거나 플러그 표면의 점착을 증가시키도록 처리될 수 있다. 튜브는 당업계에 공지된 임의의 사용가능한 설비를 포함하여 이를 다른 장치, 보다 구체적으로 크로마토그래피 장치와 연결할 수 있다.

본 발명의 구현예에서, 모놀리식 투과성 고체 폴리머가 예컨대 내부 직경 150 미크론인 모세관 내에 형성된다. 다른 매우 중요한 구현예에서, 모놀리식 투과성 강성 물질이 종종 압력하에 제거가능한 80. mm i.d. Teflon 밀봉 고리 내에 형성되고 밀봉된다. 상기 고리 및 칼럼은 저가의, 신뢰할 수 있는 고성능 고해상도의, 매우 신속하고 용이하게 대체가능한 대체 크로마토그래피 칼럼으로서 판매될 수 있다. 다른 구현예에서, 튜브 직경은 10mm이다. 다른 구현예에서, 튜브 직경은 4.6mm 이고 재료는 스테인리스 스틸이다. 본 발명의 다른 구현예에서, 플라스틱 주사기 배럴이 칼럼으로 사용된다. 다른 구현예에서, 모놀리식 매트릭스가 금속 용기, 밀봉판 및 복수의 원통형 홀을 가지는 삽입물을 함유하는 몰드 내에 형성된다. 삽입물의 두께는 1 내지 10mm로 변화한다. 몰드는 실리카 또는 강성 폴리머로 형성된 플레이트 상에 복수의 채널 또는 홈을 가지는 마이크로장치일 수 있다. 모놀리식 물질이 특별히 고안된 마이크로 크기의 장치, 예컨대 대상 매질을 함유하고 임의로 바닥에 작은 용리 포트를 가지는 마이크로-티터 플레이트에 적합하도록 임의의 크기 및 형상으로 형성될 수 있다. 고안된 형상 및 크기 또는 이들 장치를 이용한 적용에 있어서 제한은 없다.

중합용 혼합물은 중합될 생성물의 최종 용도에 따라 원하는 형상 및 크기를 가진 칼럼 내로 충전되거나 삽입되어 고체 지지체로서 사용하기 위한 분리에 효과적인 오프닝을 형성할 수 있다. 유리하게, 중합은 칼럼 내에서 행하여지며, 여기서 크로마토그래피 칼럼, 촉매층, 추출 체임버 등과 같은 플러그가 사용된다. 본 발명의 한 구현예에서, 양압(positive pressure)이 중합 동안 중합용 혼합물에 발휘되어 응집물의 입자 크기를 조절하고 중합 동안 부피 수축을 보상한다. 응집물의 입자 크기는 비-가압된 중합으로부터 생성된 것보다 균일하고 큰 것으로 밝혀졌다. 중합 동안 부피 수축은 양의 대기압에 의해 또는 양압으로 피스톤을 움직임으로써 보상된다.

보다 구체적으로, 중합용 혼합물이 바람직한 구현예에서 칼럼에 또는 일부 다른 적절한 몰드에 가하여진다. 중합이 칼럼 또는 몰드 내에서 개시된다. 칼럼 또는 몰드는 중합이 오븐 내에서라면 포로젠 또는 모노머의 증발에 의한 계획되지 않은 손실을 방지하도록 또는 중합이 수욕 내에서라면 오염 또는 희석을 방지하도록 충분히 밀봉된다. 중합 동안, 압력이 중합 액체 혼합물에 가하여진다. 바람직하게는, 압력이 대기압 이상의 수준으로 유지되어 응집물의 크기 및 폴리머 내에 그 분포를 조절하고 폴리머 벽 표면 상에 및 매질 내부에 수축에 의한 보이드 형성을 방지하고, 중합이 완결될 때까지 매질이 칼럼 벽으로부터 분리되어 갭 또는 벽 채널을 통한 대안적인 액체 통로를 형성하는 것을 방지한다. 수축을 수용하도록 칼럼을 대기압으로 유지시키는 것은 모든 경우에 있어서 보이드 형성을 방지하지 못하였으며 저조한 재생가능성을 제공하였다. 압력 공급원은 기체 압력, 비-상용성 액체로부터의 압력, 기압에 의해 구동되는 피스톤, 전력(sprint force) 또는 수압일 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 임의의 수의 가압된 몰드(튜브)가 단일 수욕 내에서 일정한 또는 조절된 온도로 유지될 수 있으며, 단일(예컨대, 질소, 물 등)의 매니폴드로부터 동일하게 가압될 수 있다. 이는 균일성 및 생산 속도를 모두 증가시킨다.

본 발명의 다른 구현예에서, 선별된 압력이 고압 질소에 의하여 중합용 혼합물에 발휘된다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 선별된 압력이 중합 동안 도 2, 3 또는 3에 도시되는 가압 장치에 의하여 중합용 혼합물에 발휘된다. 칼럼은 한쪽 말단이 밀봉되고 중합용 혼합물이 상기 칼럼 내로 충전된다. 다른 쪽 말단이 도 2, 3 또는 4에 도시되는 장치에 의해 밀봉된다. 상기 칼럼을 포함하는 중합 설비의 전체 어셈블리가 도 2, 3 또는 4에 도시된다. 주사기 펌프로부터의 수압에 의해 구동되는 매끄러운 Teflon 플러그를 가진 피스톤에 의하여 압력이 중합에 가해진다. 중합용 혼합물이 칼럼 내에서 상기 Teflon 플러그 및 O-링에 의해 밀봉된다. 일정한 양압이 중합용 혼합물에 가하여지면, 실제 압력은 수압과 마찰간의 차이이다. 중합 동안, 모노머가 폴리머로 전환됨에 따라 피스톤은 칼럼 내로 이동하여 폴리머의 수축으로 인하여 생성되는 보이드를 보상한다. 이는 임의의 음압(negative pressure) 및 이러한 수축으로 인하여 밀봉된 칼럼 내에 생성되는 보이드를 방지함으로써 칼럼 효율성을 개선한다.

수축은 모든 방향으로 일어나는 것으로 믿어진다. 결과 형성되는 고육은 AIBN에 의해 생성되는 질소 가스 또는 칼럼 내부에 음압을 가지는 용매 증기에 의하여 점유될 것이다. 보이드는 폴리머 벽 상에 크고 불규칙한 움푹 들어간 곳이거나 전체 폴리머 표면에 펼쳐있는 작고 불규칙한 움푹 들어간 곳일 수 있다. 보이드는 또한 폴리머 내부에 분포되어 분리에 효과적

인 오프닝 크기 분포의 불균일성을 초래할 수 있다. 이러한 불규칙한 보이드과 겹은 벽 효과 또는 칼럼의 영역 전개를 초래한다. 이들은 칼럼 효율성에 치명적이며 칼럼의 해상도를 저하시킨다. 이들 보이드과 겹은 또한 동일한 생산 배치 내에서 차례대로 또는 생산의 배치로부터 배치까지 칼럼 성능의 낮은 반복가능성을 초래한다.

본 발명의 한 구현예에서, 선별된 압력이 중합용 혼합물에 발휘되어 응집물의 크기 및 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 조절한다. 입자 크기는 중합 동안 중합용 혼합물에 대한 압력의 변화에 따라 변화한다. 입자 크기는 압력에 높을수록 더 크다. 양압 하에, 중합 동안의 폴리머 수축은 압력 방향으로만 일어난다. 이는 폴리머 내부에 보이드 및 칼럼 벽에 인접한 벽면 상에 보이드/겹의 형성을 방지한다.

중합 공정 동안, 모노머의 폴리머로의 전환이 증가됨에 따라 모노머 농도가 계속하여 감소한다. 가교된 폴리머는 계속하여 액체 혼합물로부터 침전되어 서로 응집하여 보다 큰 입자 또는 클러스터를 형성한다. 이들 입자들은 침전하고 비닐기를 가진 활성 폴리머 체인과 같은 가교체에 의하여 서로 연결된다. 이들 상호연결된 입자들은 칼럼 바닥으로 침강하여, 칼럼 상부에서 보다 낮은 모노머 농도를 초래한다.

분리에 효과적인 오프닝 크기는 전체 모노머 농도 및 그 비율에 의해 크게 영향을 받는다. 불균일한 분리에 효과적인 오프닝 크기 구배가 중력 방향을 따라 형성되어, 영역 전개를 초래한다. 입자 크기는 중합 압력에 의해 부분적으로 조절되므로, 분리에 효과적인 오프닝 크기의 구배를 중합 동안의 압력을 조정함으로써 수정할 수 있다. 한 구현예에서, 선형으로 증가되는 압력이 중합 동안 중합용 혼합물에 발휘된다. 다른 구현예에서, 단계 압력 구배가 중합 동안에 중합용 혼합물에 발휘된다. 압력 증가/감소의 속도 및 패턴은 응집물의 입자 크기 및 전체 중합 공정 동안 그 분포를 조절하도록 선택된다. 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포의 선형 구배가 요구되는 경우, 이는 중합 동안에 압력을 다른 속도 및 다른 최대 압력으로 변화시킴으로써 얻어질 수 있다.

중합 온도는 개시제의 선택에 의존한다. AIBN 및 벤조일 퍼옥사이드가 사용되는 경우, 전형적인 온도는 50 내지 90°C이다. 가열 공급원은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다. 바람직한 방식은 온도 조절되는 가열 욕 또는 오븐이다. 반응 시간은 개시제 및 반응 온도의 선택에 따라 0.5 내지 48 시간이다. 본 발명의 한 구현예에서, 중합은 온도 조절된 수욕 내에서 60°C에서 20 시간 동안 수행된다.

감광성 개시제가 사용되는 경우, IR, US-vis 또는 X-선과 같은 조사가 중합 공급원으로 사용된다. 한 구현예에서, 개시제의 열적 활성화에 의하여 반응이 시작된다. 다른 구현예에서, 화학적 개시제를 사용하거나 사용하지 않고 X-선과 같은 에너지 조사의 적용에 의해 반응이 시작된다. X-선이 사용되는 경우, 개시제는 중합 온도 충분히 이상의 온도에서 열적으로 활성화하도록 선별되어야 한다. 한편, X-선 조사 하에 반응물이 활성을 받기에 바람직한 소정의 영역 내에 온도에서 개시제가 활성화한다. 개시제는 또한 해리를 위한 활성화 시간 및 온도가 모노머 단독을 위한 것 보다 현저히 적도록 선별된다. 활성 개시제(자유 라디칼)의 생성은 X-선의 강도에 의해서만 조절된다. X-선 강도는 조절가능하므로, 반응 속도는 조절가능하며 "폭주"하거나 과열되지 않을 것이다. 또한, 개시제는 X-선 조사 하에 반응물이 활성을 받기에 바람직한 소정의 영역 내에 온도에서 활성화하도록 선택될 수 있다.

한 구현예에서, X-선이 중합 에너지의 전부 또는 일부를 공급한다. X-선 광양자의 에너지는 폴리머 제조에 따라 두께 또는 단면에 차이를 가지고 변화한다. 보다 낮은 에너지 X-선이 보다 작은 직경의 폴리머 막대의 제조에 사용되고, 보다 높은 에너지 X-선 또는 보다 낮은 에너지 X-선의 보다 장시간 동안의 노출이 큰 직경의 폴리머 막대를 위해 사용된다. 바람직한 구현예에서, 중합 온도는 X-선 온/오프를 스위칭함으로써 조절된다. X-선이 스위칭 오프되면, 자유 라디칼의 수명이 전형적으로 약 1초이므로, 수초 내에 중합이 신속히 정지된다.

한 구현예에서, X-선을 에너지 공급원으로 사용하는 중합을 개시하기 위하여 광개시제가 사용된다. 상기 광개시제는 γ -선, X-선, UV, 가시 및 IR 민감성 광개시제를 포함하는 폴리머 분야에 광 중합에 사용되는 전형적인 광개시제들이다. 상기 광개시제는 아조키스이소부틸로니트릴과 같은 아조 화합물, 이페닐(2,4,6-트리메틸 벤조일)포스핀 옥사이드와 같은 퍼옥사이드, 페난트렌퀴논과 같은 케톤, 2-클로로티오크산텐-9-온, 4,4'-비스(디메틸아미노)벤조페논, 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논, 4,4'-비스(디메틸아미노)벤즈에보페논, 2-크로로티오크산텐-9-온, 벤질 디메틸 케탈, 유기 금속 착체들을 포함한다. 이들 광개시제는 양이온성 및 자유 라디칼 중합 모두에 사용되는 것들을 포함한다. 한 구현예에서, AIBN을 광개시제로서 사용한다. 다른 구현예에서, 페난트렌퀴논을 광개시제로서 사용한다.

한 구현예에서, 섬광제(scintillator) 및 감광제를 사용하여 광개시제의 활성을 증진시킨다. 예컨대, X-선은 용매가 에너지를 첨가된 섬광제에 전달하도록 활성화하거나 섬광 특성을 가지는 용매의 섬광을 직접적으로 야기함으로써 섬광을 야기한다.

다. 바람직하게, 형광성 감광제를 첨가하여 중합을 야기함에 있어 광개시제의 활성을 증가시킴으로써 섬광을 보조한다. 상기 섬광제 및 감광제는 섬광제에 의한 X-선으로부터 효율적인 에너지 흡수를 야기하고 광개시제의 흡수 밴드 내에서 효율적인 과정에서 광 조사를 야기하도록 선별된다.

사용가능한 섬광제는 임의의 중래 기술에서의 발광 물질을 포함한다. 일반적으로, 섬광제는 테르페닐, 4급 페닐, 나프탈렌, 안트라센과 같은 벤젠 고리를 함유하는 화합물, 헤테로사이클을 함유하는 화합물, 카르보닐기를 가지는 화합물, 2개 이상의 루로로포어(lurophors)를 함유하는 화합물, 및 유기금속 화합물, ZnTe, ZnSe, ZnS, Csl, Gd_2O_2S and $CaWO_4$ 와 같은 무기 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 2,5-디페닐옥사졸(PPO), 2-페닐-5-(4-바이페닐틸)1,3,4-옥사디아졸(PBD), 2-(1-나프틸)-5-페닐옥사졸(NPO)가 섬광제로 사용된다. 한 구현예에서, 테르페닐이 섬광제로서 사용된다. 다른 구현예에서, ZnSe이 섬광제로서 사용된다.

바람직하게, 다단계 개시 공정이 광개시제를 사용하는 X-선 보조 중합을 위해 사용된다. 섬광제와 감광제의 조합을 사용하는 개시의 메커니즘은 다단계 개시 공정인 것으로 믿어진다. 첫째, X-선이 용매 분자를 활성화하여 전자적으로 여기된 용매 분자를 형성한다. 여기된 용매 분자가 그 여기 에너지를 섬광제로 신속하게 전달하여 전자적으로 여기된 섬광을 형성한다. 다음, 광양자 방출에 의하여 섬광제의 여기 상태에가 바닥 상태로 완료된다. 방출된 광양자는 광개시제에 의해 흡수되고 활성화 자유 라디칼을 형성한다. 상기 자유 개시제 자유 라디칼은 모노머의 비닐 작용기와 접촉하여 중합 공정을 시작한다. 상기 공정은 다음과 같이 묘사될 수 있다: X-선 $h\nu$ -- 여기된 용매 분자* -- 여기된 섬광제 분자* -- UV 또는 가시 $h\nu'$ -- 여기된 개시제 분자* -- 개시제 자유 라디칼 - 폴리머 라디칼

X-선 조사 중합은 폴리스티렌, 폴리테트라하이드로퓨란과 같은 호모폴리머, 에폭시 또는 기타 가교된 물질과 같은 수지, 및 칼럼, 막 또는 임의의 다른 하우징 내 물질과 같은 분리 매질과 같은 다공성 폴리머 지지체를 제조하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 방법은 임의의 형상의 성형된 부품의 제조를 위해 사용될 수 있다. 한 구현예에서, X-선을 에너지 공급원으로 사용하여 폴리스티렌을 제조한다. 폴리스티렌을 좁은 입구를 가진 원통 형상의 유리 바이얼 몰드 내에 준비한다. 액체 혼합물 중합 및 벌크 중합 모두 호모폴리스티렌의 제조를 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 폴리글리시딜메타크릴레이트 수지를 동일한 방법으로 사용하여 제조한다. 다른 구현예에서, 다공성 폴리(스티렌-코-디비닐벤젠)이 제조된다. 다른 구현예에서, 다공성 폴리(글리시딜 메타크릴레이트-코-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)폴리머 지지체가 제조된다.

단면이 수 마이크로미터 내지 수 미터인 다공성 모노리식 폴리머 지지체의 제조를 위해 X-선을 사용할 있다. X-선 조사 중합을 사용하여 모세 및 마이크로보어 분석 칼럼, 전형적인 분석 칼럼, 및 예비 및 공정 칼럼을 포함하는 모노리식 액체 크로마토그래피 칼럼을 제조한다. 한 구현예에서, 내부 직경이 1 cm인 유리 칼럼 내에 다공성 모노리식 지지체가 제조된다. 상기 칼럼은 SEM, 기공률 측정법(porosimetry), 및 크로마토그래피에 의해 특성이 묘사된다.

유리 하우징 내에 폴리(스티렌-코-디비닐벤젠) 모노리식 칼럼은 우수한 펄타이드 분리를 보인다. X-선이 물질 깊이로 투과할 수 있다. 유기 및 무기 폴리머 모두 X-선 또는 γ -선을 이용하여 제조될 수 있다. 고에너지 X-선 및 γ -선은 물질 깊이는 곳까지 이동할 수 있다. 보다 큰 깊이가 요구되는 경우, 중합되지 않은 혼합물이 X-선 빔 내에 배치되고, 전체 시간-평균 조사가 중합되는 물체를 통하여 충분히 균일하도록 선택되는 방식으로 회전되고 변형될 수 있다. 크로마토그래피 흐름의 의도되는 방향으로 정렬되는 조사는 조사 빔의 흡수로 인해 층 내에 상당한 크로마토그래피 불균일성을 야기하지 않음을 주목한다. 축방향 불균일성은 반드시 조사 불균일성과 마찬가지로 성능을 저하시키지 않는다.

저에너지 X-선은 보다 적은 깊이로 물질을 통과하나 사용하기에 보다 안전하다. 한 구현예에서, 저에너지 X-선을 사용하여 직경 3.5cm의 유리 칼럼 내 다공성 모노리식 지지체를 제조하였다. 다른 구현예에서, 88 mm 직경의 폴리머 칼럼 하우징 내 모노리식 지지체를 제조한다. 중합 온도는 적어도 한면의 반응 혼합물이 조절되도록 C-선 광양자의 강도 및 에너지를 조절함으로써 또한 물 자켓에 의해 조절된다. 바람직하게, 그러한 수 냉각은 칼럼을 축방향으로 냉각시키나 방사상 방향으로 냉각시키지 않아, 열 구배 및 이에 따른 불균일성을 피한다. 모든 흐름 경로가 크로마토그래피 흐름 방향에서 동일한 불균일성을 경험하며, 따라서, 분리에 영향을 미치지 않는다. 큰 직경의 칼럼 중앙부에서의 중합 온도는 전체 중합 공정 동안 칼럼 가장자리에서의 중합 온도와 거의 동일하다. 모노머의 전환은 중합 4일 후에 완료된다.

X-선 조사 중합은 열 중합과 조합될 수 있다. 중합 속도 및 기공률은 중합 속도에 의해 조절할 수 있으며, 중합 속도는 X-선 에너지 및 강도 및 중합 온도에 의해 조절할 수 있다. 조사 중합 공정의 경제성 및 안전성을 고려하여, 저 에너지 및 강도 X-선이 바람직하게 큰 직경의 모노리식 폴리머 지지체 제조에 사용된다. 모노머의 전환은 3.5cm 직경 칼럼 내에서 48 시간으로 중합 후에 70% 이상 완료된다. 중합 속도를 가속화하고 전환을 단시간 내에 완료하기 위하여, 개시제에 상응하는 요구되는 온도에서 열 중합이 사용된다. 한 구현예에서, X-선 조사 중합 후 70°C에서 열 중합에 의하여 다공성 폴리(스피

렌-코-디비닐벤젠)이 제조된다. 폴리머의 가공물은 X-선 조사 중합 및 열 중합 모두 모노머 조성, X-선 강도 및 에너지, 개시제 및 첨가제 조합의 선택, 및 중합 온도에 의해 조절할 수 있다. 중합 공정에 사용되는 포로젠 발생 용매는 먼저 기재한 순수한 열 중합에 사용되는 것과 동일하다. 액체 크로토그래피 용도를 위한 우수한 폴리머 지지체가 얻어진다.

과거에는 호모폴리머, 슬라브-형상 폴리머 수지 및 다공성 폴리머 표면 코팅을 포함하는 폴리머를 제조하기 위하여 자외선 및 가시광선 조사를 사용하여 왔으나, 본 발명의 폴리머 물질에는 사용되지 않았다. UV 및 가시광선 모두 얇은 고체의 투명 물질을 투과할 수 있다. 자외선 및 가시광선을 사용하여 막과 같이 얇고 투명한 물질을 제조하여 왔다. 물질의 두께가 증가하면 폴리머의 균질성이 더욱 문제가 된다. 이는 다공성 고체 물질을 통한 광선의 확산 및 감쇠로 인한 것이다. 광선이 고체 물질을 통하여 이동할 수 있는 깊이는 물질의 작용기 및 굴절지수에 따라 신속히 감소한다. 2 상으로 이루어진 아크릴성 건조 다공성 칼럼을 고려한다: 아크릴 수지 굴절 지수 약 1.5 및 공기 굴절지수 1.00. 이는 광선을 완전히 확산시켜 이 물질이 백색 불투명한 초크처럼 보이도록 한다. 이러한 명백한 차이로 인하여 중합을 위한 UV 또는 가시광선의 사용을 방지하여 왔다.

자외선 및 가시광선을 사용하여 높은 균질성을 가지는 상기한 물질을 포함하는 폴리머 물질을 제조하고 수 인치 두께의 폴리머 물질을 제조할 수 있다. 한 칼럼 및 자외선 및 가시광선을 사용하여 칼럼을 제조하는 방법의 구현에 있어서, 선별된 광선의 파장에서 목표로 하는 폴리머 수지와 매우 유사하거나 동일한 굴절 지수를 가지는 용매를 중합을 위해 선택한다. 선별된 파장에서 광선은 Christiansen Effect가 거의 없음으로 인하여 중합 동안 폴리머를 통하여 이동할 수 있으며, 여기서 목표로 하는 다공성 수지가 상당히 반투명 또는 투명으로 된다. 특정 파장 범위에서의 광선은 기공이 용매로 가득차 있으므로 투명하다. 바람직하게, 폴리머 고체 및 용매 내에서의 굴절 지수가 매우 근접한 단색 광선이 중합을 위해 선택된다. 열 보다는 광선에 의해 활성화되는 개시제를 광개시제와 함께 사용한다. 백색 광선이 사용되는 경우, 전달된 광선은 폴리머 고체 및 용매 또는 용매 조합 내에서의 광선의 굴절 지수가 매우 근접한 특정 파장에 상응한다. 광개시제를 근접한 투명 폴리머 및 용매 파장 범위에서 광선을 흡수하고 이에 의하여 활성화되도록 선택한다. 개시제는 상기 파장 범위를 흡수한다.

바람직하게, 광개시제가 활성화되면 이는 본래의 크로모포어를 결여한 단편 상으로 분산된다. 이러한 단편은 선별된 파장의 광선의 파장 범위에서 흡수를 가지지 않는다. 광개시 분자 내에서 크로모포어에 의해 광선이 흡수되면, 결과는 표면에서의 국부적 중합이다. 크로모포어가 이러한 반응후 잔존하면, 이들은 다음 광선이 다음 광개시 분자를 활성화하는 것을 막아 중합을 본래 표면으로 제한할 것이다. 따라서, 광선은 보다 깊이 폴리머 혼합물을 통하여 이동할 수 있으며, 광선의 전달이 증가된다. 이러한 효과는 Bleaching Effect로 알려져 있다. 이에 대하여 우수한 광 개시제는 2,4,6-트리메틸벤조일디페닐포스핀 옥사이드인 것으로 밝혀졌다. Bleaching effect와 Christiansen effect는 광개시 또는 e-선 개시에 의한 매우 두꺼운 층 또는 깊은 다공성 폴리머의 생산에 있어 상승적이다. 후자의 경우, X-선이 용매를 여기시키고, 이는 2차 에너지를 소위 "감광제"로 전달하고, 상기 감광제는 형광을 내어 개시제를 활성화한다. 용매가 X-선에 의해 여기되어 자체적으로 형광을 발광하면, 부가적인 정도의 상승작용이 존재한다. 종종 p-테르페닐이 X-선 중합을 위한 감광제로 사용된다. 사용되는 용매를 형광 발광시키는 용매는 톨루엔, o-, m-, p-크실렌, 또는 1,2,3 (또는 기타 이성체) 메스틸렌과 같은 아릴 화합물을 포함한다. 한 구현예에서, 호모-폴리(글리시딜 메타크릴레이트)를 o-크실렌을 포로젠 생성 용매로 사용하여 통상적인 액체 혼합물 중합에 의해 제조한다. o-크실렌, 모노머 및 특히 폴리머의 굴절 지수는 근접한다. 액체 혼합물 내에 결과 생성되는 폴리머는 거의 투명하나 백색 광선의 적은 확산으로 인하여 거의 반투명하지 않다.

표적 폴리머의 굴절지수를 측정한다. 우수한 용매와 저조한 성능의 용매 모두 표적 폴리머의 굴절 지수와 근접하는 굴절 지수를 가지도록 선택한다. 용매의 비를 조정함으로써, 용매 혼합물의 굴절 지수가 폴리머와 거의 동일하게 될 것이다. 따라서, 용매에 의해 팽창된 폴리머를 통한 광선의 전달은 최대에 도달할 수 있다. 한 구현예에서, 다공성 폴리메타크릴레이트 기재 모놀리스가 용매의 조합을 사용하여 제조된다.

큰 직경을 가지는 온도-시간 완화된 폴리머 플러그를 제조함에 있어, 중합 동안에 불균일한 중합 온도로 인하여 야기되는 불균일한 폴리머 모놀리스를 피하여야 한다. 대부분의 분리가 수행되기 위해서, 균일한 폴리머는 소정의 단면 내에 분리에 효과적인 오프닝의 기공 크기 분포에 있어 25% 미만, 바람직하게는 2% 미만의 편차를 가져야 한다. 본 명세서에서, 방식은 분포 곡선의 피크이다. 분포 곡선은 상이한 기공 크기(오프닝)의 직경에서 다공성 물질의 단위 중량 당 기공 부피의 백분율이다. 열 소산 보다 열 생성 속도가 빠르면, 불균일한 중합 온도가 생성된다. 조절하기 어려운 방식으로 및 때때로 기하학적으로 불균일한 방식으로 열을 증가시키는 중합의 자가 가속화에 의하여 이와 같은 불균일한 중합 온도를 가지는 경향이 증가된다. 중합의 자가 가속화 경향은 겔 효과에 의해 증가되며 중합 온도를 증가시킨다.

균일한 중합 온도를 가지기 위해서, 열 생성 속도는 열 소산 속도와 동일하여야 한다. 원하는 중합 온도는 중합 동안 열 생성 및 소산 평형 속도에 의해 결정된다. 중합 온도를 최적화함으로써 열 소산 속도를 열 생성 속도와 평형을 이루도록 조절할 수 있다.

중합 온도가 충분히 낮으면 중합의 자가 가속화는 일어나지 않는다. 낮은 중합 온도에서, 개시제로부터의 자유 라디칼 생성 및 중합 속도는 느리다. 폴리머 라디칼은 높은 겔 점도로 인하여 폴리머 라디칼 또는 개시제의 충돌에 의하여 종결되기에 용이하므로, 낮은 중합 속도 및 자유 라디칼 생성 속도가 수소 전달 또는 폴리머 체인 재정렬로 인하여 중합 종결 기회를 증가시킨다. 전체 중합 속도는 활성 폴리머 라디칼의 종결에 대한 반대 효과로 인하여 증가되지 않는다.

중합 온도가 기저 온도보다 높으면 중합의 자가 가속화가 일어난다. 상기 기저 온도는 모노머의 중합 또는 공중합 속도에 따라 변화하며 포로젠 및 모노머와 같은 중합용 혼합물의 환경에 의존한다. 상이한 포로젠은 vfhlaj 및 개시제 라디칼에 대한 상이한 종결 효과를 가질 수 있다. 상이한 모노머는 상이한 중합 속도 및 종결 속도를 가질 수 있다. 따라서, 낮은 온도를 선택하여 겔 효과로 인한 중합의 자가 가속화를 피하면서 열 생성 및 소산의 균형을 맞출 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 중합을 위하여 낮은 온도를 사용하여 중합의 자가 가속화를 피하고, 일부의 중합 공정 동안 큰 직경의 칼럼을 포함하는 상이한 직경의 칼럼 내에서 열 생성과 소산 속도를 조절하며, 겔 효과는 후반의 다른 일부의 중합 공정 동안 보다 고온을 허용한다. 예컨대, 상기 방법을 사용하는 중합에서, 주위 중합 온도를 사용하여 50 mm 직경 및 25cm 직경의 칼럼 내에서 다공성 분리 매질을 제조하였다.

그러나, 저온에서의 중합을 사용하는 일부 환경하에 불리한 점은 강성(rigidity)의 결여이다. 이는 폴리머 매트릭스의 가교 정도가 충분하지 않아서 다공성 폴리머가 용매 내에서 팽창하기 때문일 것이다. 이는 또한 저온에서의 모노머 전환이 충분히 높지 않아서 매트릭스 내에 거대한 크기의 분리에 효과적인 오프닝을 생성하기 때문이다. 매우 거대한 기공은 폴리머 매트릭스의 강도를 극적으로 감소시켜, 매질 또는 고압하에 또는 매질 또는 고유동속도에서 다공성 폴리머가 크로마토그래피 분리에 유용하지 않게 된다. 그러나, 저온에서 최초 중합 후에 중합 온도를 증가시키면 가교 정도 및 모노머의 전환이 개선될 수 있다. 본 발명에서, 최초 중합 이후 중합 온도를 증가시켜, 다공성 폴리머 매트릭스의 강성을 향상시키기 위하여 가교 정도 및 모노머의 전환을 개선시킨다. 고온 경화 공정을 사용하여 다공성 폴리머의 강성을 개선시킨다. 본 발명의 한 구현예에서, 주위 중합 온도에서의 저온 중합 이후 70℃를 사용하여 다공성 폴리머를 경화시킨다. 본 발명의 다른 구현예에서, 40℃ 저온 중합 이후 60℃를 사용하여 폴리머를 경화시킨다.

크로마토그래피 분리를 위한 다공성 폴리머 매트릭스의 결정적으로 중요한 특성은 분리에 효과적인 오프닝 크기의 분포의 균일성이다. 저온 및 고온 중합의 조합은 상이한 위치에서 상이한 중합 온도에 의해 생성되는 분리에 효과적인 오프닝 크기의 차이로 인하여 종종 매트릭스 내에 분리에 효과적인 오프닝 크기의 불균일한 분포를 초래한다. 다공성 폴리머 매트릭스의 분리에 효과적인 오프닝 크기는 특정 정도의 모노머 전환 및 특정 정도의 가교 이후 보다 고온의 온도에 의해 다공성 폴리머의 크로마토그래피 특성에 영향을 미칠 정도로 변화되지 않는다. 이러한 시점이 도달된 이후의 중합 온도의 증가는 다공성 폴리머의 크로마토그래피 특성에 영향을 미칠 정도로 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포를 변화시키지 않으나, 대신 모노머 전환 정도 및 가교 정도를 증가시킴으로써 폴리머 매트릭스의 강성을 개선시킨다.

본 발명에서, 중합 온도 및 시간은 높은 정도의 모노머 전환 및 가교를 달성하고 중합의 열 생성과 소산 속도를 평형화하여 크로마토그래피 분리를 위해 충분히 우수한 분리에 효과적인 오프닝의 균일한 크기 분포를 달성하도록 최적화되었다. 중합 온도를 더욱 증가시켜 모노머 전환 및 가교 정도를 개선시켰다. 중합 온도 및 시간의 단계 프로그램을 사용하여 크로마토그래피 용도 및 균일한 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 필요로 하는 기타 용도를 위한 다공성 분리 매질을 제조하였다. 예컨대, 본 발명의 한 구현예에서, 원하는 중합 길이로 주위온도로부터 70℃로의 중합 온도 증가에 대한 최적의 프로그래밍된 단계를 사용하여 우수한 크로마토그래피 특성을 가지는 다공성 폴리머 매트릭스를 제조하였다.

일부 중합의 경우, 안전한 지점에서 중합 온도 및 시간의 프로그래밍된 단계 증가가 우수한 분리 매질을 제공하였으나, 다른 중합의 경우, 이는 충분히 우수하지 않을 수 있다. 이러한 경우 플러그를 개선시키기 위한 대안적인 단계가 이용가능하다. 또한, 대안적인 절차는 중합 시간을 감소시켜 원하는 전환 및 가교 정도를 달성할 수 있다. 열 생성 및 소산 속도를 평형화하고/하거나 첫번째 절차에서 중합의 자가 가속화를 피하기 위하여 요구되는 지나치게 낮은 중합 온도로 인하여 원하는 가교 정도 및 전환이 달성될 수 없는 상황에, 이러한 대안적 절차가 유용하다.

대안적 절차는 저온 중합에서 특정 양의 모노머 전환 후 중합 온도의 느린 선형 증가를 사용한다. 이러한 대안적 절차는 중합 동안 열 생성 및 소산의 평형을 유지하면서 중합 속도를 증가시키고, 중합 시간을 단축시키고, 모노머의 폴리머로의 전환 정도를 증가시킨다. 이러한 상황에서 증가된 온도에서 열 생성은 특정 양의 모노머 전환 이후 중합 동안 모노머 농도 감소로 인하여 보다 빠르지 않다. 중합의 자가 가속화 또한 모노머의 감소된 농도로 인하여 일어나지 않았다. 본 발명에서, 중합 온도의 선형 구배를 최적화하여 저온 중합과 고온 경화 공정을 커플링시켜 크로마토그래피 분리를 위한 다공성 폴리머의 분리에 효과적인 오프닝의 최적의 크기 분포를 달성하였다.

본 발명의 한 구현예에서, 우수한 크로마토그래피 특성을 가진 다공성 폴리머 제조를 위하여 주위 온도에서 70℃로의 중합 온도의 선형 구배를 사용하였다. 본 발명의 다른 구현예에서, 40℃에서 최초 중합과 60℃에서 경화를 조합하여 40℃에서 60℃로의 중합 온도의 선형 구배를 사용하여 우수한 크로마토그래피 특성을 가진 분리 매질을 제조하였다.

프로그래밍된 단계, 다단계 또는 선형의 중합 온도 증가는 큰 직경의 칼럼뿐 아니라 작은 직경의 칼럼의 제조에도 매우 유용하여 매질의 크로마토그래피 특성을 개선시킨다. 이러한 방법은 작은 직경으로부터 큰 직경의 칼럼으로 크로마토그래피 칼럼의 제조를 늘이는 데에 유용한 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 한 구현예에서, 정확히 동일한 온도 프로그램을 사용하여 4.6mm 및 34mm 직경을 가지는 칼럼을 제조하여 분리 매질의 동일한 크로마토그래피 특성을 달성하였다. 본 발명의 다른 구현예에서, 프로그래밍된 온도를 변경하여 34mm 직경의 칼럼을 제조하였다.

도 18에, 시간의 횡좌표를 가진 그래프(352)가 도시되며, 여기서 좌측은 온도의 세로좌표이고 우측은 중합의 완료 백분율의 세로좌표이며, 두개의 곡선(354) 및 (356)과 두개의 점선으로 된 곡선(364) 및 (366)을 가진다. 상기 곡선(354)은 온도를 보이는 곡선이고, 곡선 (364)은 중합용 혼합물 내에 온도를 자가 유지 온도 이하로 유지하는 칼럼 표면상에서 낮은 일정한 온도에서 중합을 위한 상이한 시간 경과 동안 완료 백분율을 보이는 곡선이다. 중합은 신속히 상승한 다음 지나치게 낮은 중합 값에서 평평하게 된다. 저온은 강성(stiffness)의 결여 및 불균질 폴리머를 초래한다. 강성의 결여는 겔 효과가 현저해짐에 따라 가교를 낮은 값으로 감소시키고 분리에 효과적인 오프닝의 크기를 바람직하지 않은 크기로 증가시키는 저온의 결과이다. 일반적으로, 칼럼 중앙부와 칼럼의 표면 간에는 수 ℃의 온도 증가가 나타나며, 이로 인해 불균질한 폴리머가 얻어진다. 상기 곡선(366)은 중합의 온도 구배 과정에 대한 대조-개시 지점(358)과 안전점(36) 사이 및 안전점(360)으로부터 상당한 완료 지점(362)까지 상이한 시간 경과 동안 중합 완료율(%)을 도시하고, 곡선(356)은 동일 지점 사이에 칼럼 표면에서 온도 변화를 도시한다.

칼럼 표면에서의 온도는 보다 서서히 증가하고 대조-개시 지점(358)과 안전점(360) 사이의 중합 속도는 서서히 증가하며, 안전점(36) 이하의 중합용 혼합물의 온도에 있어 현저한 증가를 초래하지 않는다. 대조 개시 지점(358) 전의 온도는 중합이 개시되는 지점까지 보다 빠르게 증가하고, 그 다음, 입체 장애가 거의 없으며 반응하기에 충분한 모노머가 있으므로 매우 서서히 증가한다. 안전점(36)에서, 입체 장애는 증가되며 모노머의 양은 감소하고 온도는 증가되어 보다 많은 가교를 야기하고 중합 반응이 완결되도록 할 수 있다. 칼럼 표면에서의 증가율은 중합용 혼합물의 조성 및 모놀리스의 원하는 특성에 따라 변화하나, 대조 개시점과 안전점 사이에서 일반적으로 시간 당 5℃ 보다 낮으며 안전점 이후 일반적으로 시간 당 15℃ 이상에 도달한다.

도 19에, 서미스터(thermistor)(380)가 그 온도를 측정하기에 충분히 근접하여 배치되고, 칼럼 내 4분의 1 지점에서 서미스터(382)가 그 온도를 측정하기에 충분히 근접하여 배치된 외부 표면(378)과 중심 세로축 사이에 중간쯤에 가상의 동심원 칼럼(376)을 가지는, 중심 세로축(374)을 가지는 칼럼(372)의 단편 세로 단면도가 도시된다. 외부 표면의 온도는 임의의 가열 또는 냉각 수단에 의해 조절되나 바람직한 구현예에서 그 온도가 서미스터(384)와 같은 임의의 수단에 의해 측정될 수 있는 수욕이다.

칼럼(372)을 통한 온도 프로파일(370)이 한 방식의 온도 구배 중합 동안에 나타나므로 도시된다. 이러한 방식의 온도 구배 중합에서, 칼럼의 외부 표면은 칼럼 중심 온도와 동일 온도로 유지되고, 칼럼 외부 표면에서 온도를 조절함으로써 두 온도 모두 점진적으로 증가하도록 야기된다. 온도 프로파일(370)에 예증되는 바와 같이, 외부 온도가 낮은 속도로 증가되어 반응속도를 발열 생성 속도가 실질적으로 열 소산과 동일하게 유지하는 수준으로 반응 속도를 조절하고, 외면 온도가 외부 표면에서 증가 속도가 중심에서 증가 속도가 동등하도록 서서히 증가되는 온도에서, 동심원 실린더에서 낮은 지점이 있다. 상기 낮은 지점은 외부 온도의 2와 2분의 1 정도 이내로 유지되어야 하며 바람직하게 균질성을 위하여 동일하게 유지된다. 점진적인 온도 증가는 겔 효과를 부분적으로 보상하고 대조 개시 지점과 안전점 사이에 칼럼 내에 발열 생성 측면에서 균질한 폴리머와 함께 우수한 중합 속도를 유지하여 중합에 요구되는 시간을 감소시키기 위한 것이다.

도 21은 다음의 크로마토그래피 조건을 가지는 온도 완화된 칼럼 내 분리 크로마토그램이다: (a) 샘플: (1) 리보뉴클레아제 A, (2) 사이토크롬 C 및 (3) 라이소자임; (b) 칼럼: 40~60℃의 온도 구배에서 24 시간 중합 후 60℃에서 12 시간 경화에 의해 제조된 WCX (250 by 35mm 1.0.); (c) 이동상: 버퍼 A: 10 mM 인산 버퍼, pH~7.6, 버퍼 B: 버퍼 A 내에 1M NaCl, pH=7.6, 구배: 4CV 내에 20~50 % B, 다음 0.8 CV 내에 50 내지 100% B; 유동속도: 50 ml/mm.

본원 명세서에 기재된 투과성 폴리머는 하나 이상의 적절한 구조를 가질 수 있다. 한 구조는 일부 표적 적용에 대하여 원하는 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 가진다. 일반적으로, 이는 적어도 한 방향에서 분리를 위한 고표면적을 제공하는 300nm 미만의 작은 분리에 효과적인 오프닝 및 대다수의 이동상의 통과하는 500nm 이상의 것과 같이 분리를 거의 제공하지 않는 크고 불규칙한 오프닝을 포함한다. 바람직하게, 분리 효과적 오프닝의 크기는 50 내지 200 나노미터이며, 크고

불규칙한 오프닝은 매질 및 저압 분리를 위해서는 2-5 미크론이고 고압 분리를 위해서는 0.6 내지 2 미크론이다. 분리 효과적 오프닝 크기 분포 및 불규칙한 크기 분포를 포로젠, 모노머, 개시제의 유형 및 양과 중합 온도, 시간 및 압력에 의하여 조절할 수 있다. 한 구현예에서, 모노머는 원하는 작용기를 가질뿐 아니라 중합 역학 및 폴리머 구조를 변화시켜 칼럼 효율성을 개선시키도록 선별되어 보다 이상적인 분리 효과적 오프닝 크기 분포를 유도한다. 모노머의 비율이 동일 목적으로 선별된다. 포로젠의 유형 및 양은 원하는 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포의 생성을 위한 조심스러운 조사 후에 선별된다. 중합 동안 압력의 사용 및 선별이 원하는 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포 및 전체 칼럼을 통한 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포의 균일성을 위하여 특히 중요하다. 이는 또한 불규칙한 보이드 및 통상적으로 밀봉되거나 오픈된 중합에서 발생하는 벽 채널 형성을 방지한다.

중합 동안 압력을 사용하고 기타 중합 조건 및 시약을 조심스럽게 조정함으로써 마이크로기공의 형성이 극적으로 감소되거나 방지될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 분리에 효과적인 오프닝을 가지는 폴리머의 주사전자현미경 (SEM) 연구로부터, 폴리머 입자 모르폴로지가 산호의 일부 형태와 유사한 것으로 밝혀졌다. 산호-형 폴리머는 부착에 의해 성장된 것이 명백한 상호연결된 물결모양 입자로 이루어진다. 이들 입자 내부는 비-다공성이다. 그 표면은 매우 주름져 있으며 매우 많은 수의 다양한 오프닝 크기의 작은 오픈된 얇은 홈들을 포함한다. 상기 폴리머 중 하나의 SEM 연구에서, 입자는 코어-셀 구조로 짧은 깊이의 오프닝을 가진다. 이들 통상적이지 않은 물결모양 폴리머 구조 및 코어-셀 입자 구조는, 입자 또는 비드 내부에 다수의 마이크로기공 및 메조기공을 포함하는 전형적인 매크로다공성 매질에서의 매스 전달 문제를 피하면서 규칙적인 비-다공성 분리 매질에 비하여 모놀리스의 성능을 크게 향상시킨다. 이러한 구조는 또한 소위 "Perfusion Beads" 또는 문헌에 개시된 단단한 기공을 가지는 모놀리스와는 매우 다르다. 내부 힘이 폴리머를 팽창시키려 할 때 압력을 적용하거나 팽창에 대한 부피를 유지함에 의하여 일부 칼럼 내에서 입자 응집체를 조절하여 응집되고 실질적으로 둥근 입자 응집체 보다는 스테킹되고 일반적으로 편평하거나 네스팅된 구조를 형성한다.

본 발명에서 모놀리스는 비-다공성 입자 패킹의 고해상도와 매크로다공성 패킹의 고성능을 그들 문제를 피하면서 좋아한다. 상기 물결모양 입자는 모노머 및 활성 올리고머에 의해 팽창되고 둘러싸이는 폴리머 핵으로부터의 부착과 다른 폴리머 핵과의 병합에 의해 성장할 수 있다. 이들 입자는 서로 응집하고 가교에 의해 강화된다. 이러한 구조는, 이론적 모델에 따른 영역 스프레딩의 주요 이유 중 하나인 입자 내부 기공 내에서, 마이크로기공 내에 샘플 분자의 트래핑 방지에 의해 칼럼 효율성을 크게 개선시킨다. 입자, 응집체 또는 클러스터의 크기는 보다 균질하게 조정될 수 있으며, 압력을 조심스럽게 조절함과 동시에 앞서 논의된 기타 요인들을 선별함으로써 분리에 효과적인 오프닝 크기 분포를 고해상도를 부여하도록 개선할 수 있다.

액체 크로마토그래피 내에 보다 친수성인 화합물의 만족스러운 분리는 종종 출발하는 이동상이 유기용매가 없는 100% 물일 것을 요구한다. 이러한 유형의 분리는 순수한 스티렌/디비닐벤젠, 폴리메타크릴레이트 및 매우 친수성인 C4, C8, C12 및 C18을 함유하는 그 유도체를 기재로 하는 역상 매질로는 만족스러운 정도로 얻을 수 없다. 낮은 유기 용매 함량을 가진 수성 이동상 내에서 폴리머가 수축한다. 이러한 수축은 칼럼 벽과 폴리머 매질 사이에 보이드를 초래하여, 크로마토그래피 내에서 소위 "벽 채널링"을 초래한다. 결과로서, 샘플과 이동상은 매질을 우회하고 매질 내에 벽 채널을 통과한다. 샘플은 유지되지 않거나 부분적으로 유지되어 각각의 순수한 샘플에 대하여 복수의 피크를 생성한다.

한 구현예에서, 순수(pure water) 또는 염 액체 혼합물을 매질을 통과시켜 매질을 최대한 수축시킨 다음 벽과 폴리머 매질 사이의 보이드가 밀봉될 때까지 피스톤으로 매질을 압축함으로써 벽 효과를 방지한다. 피스톤은 너트 설비에 의하여 배치된다. 이러한 설비는 도 3-4에 도시된다. 칼럼의 배압을 먼저 감소시킨 다음 증가시킴으로써 이러한 수축 및 벽 보이드의 밀봉을 모니터링할 수 있다. 상기 공정은 분리 공정 중에 벽 채널링 형성을 방지한다. 한 구현예에서, 폴리머가 순수 내에서 수축되고 PEEK 피스톤 설비로 압축된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 폴리머가 1 mol/l NaCl 액체 혼합물 내에 수축되고 PEEK 피스톤 설비로 압축된다.

매우 극성인 환경에서, 선형 폴리머 체인 및 폴리머 표면 상에 C4, C8, C12 C18 체인이 표면으로 붕괴되어 샘플 분자와 매질 표면 사이에 저조한 상호작용을 초래한다. 또한, 매질과 이동상의 극성 간의 극심한 차이로 인하여 층(bed)이 이동상에 의해 매우 저조하게 습윤된다. 매스 전달 및 샘플과 정지상간의 상호작용이 매우 저조하여, 낮은 칼럼 효율성 및 해상도를 초래한다. 이러한 문제 및 벽 채널링 문제는, 샘플 보유 및 분리를 위해 요구되는 소수성을 유지하면서 폴리머 매트릭스의 소수성을 증가시킴으로써 감소시킬 수 있다.

폴리머 매트릭스는 하이드록실, 아마이드, 카바미드 또는 폴리머 반복 단위 내에 친수성 모이어티와 같은 친수성 작용기를 함유한다. 폴리머는 폴리머 매트릭스의 친수성으로 인하여 물에 의해 습윤되고 팽창될 수 있다. 폴리머 매질의 표면은 역상 크로마토그래피 내에 소수성 상호작용을 위하여 여전히 매우 소수성인 폴리스티렌 체인 또는 C4, C8, C12 및 C18 체

인을 함유한다. 물 내에서 폴리머 수축이 감소되거나 완전히 방지되며, 이는 또한 벽 채널링 문제를 해결한다. 소수성 모이어티를 함유하는 모노머를 직접 공중합시키거나 폴리머를 친수성 모이어티를 혼입시키도록 변경함으로써 친수성을 향상시킬 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 벽 채널링 및 물 내에 소수성 상호작용 체인의 붕괴를 방지하기 위하여 친수성 하이드록실에틸 메타크릴레이트를 스티렌 및 디비닐벤젠과 공중합한다. 본 발명의 한 구현예에서, 스테아릴 아크릴아미드를 스테아릴 메타크릴레이트 및 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트와 공중합한다. 친수성 모노머의 부가 또한 역상 칼럼 내에서 단백질 변성을 감소시킬 수 있다. 한 바람직한 구현예에서, 아크로니트릴을 스티렌 및 디비닐벤젠과 공중합한다. 상기 폴리머는 친수성 모노머의 친수성이 증가함에 따라 더욱 팽창한다. 친수성 모이어티를 함유하는 폴리머로 구성된 역상 분리 매질은 수성 및 비수성 액체 혼합물 내에서 모두 팽창할 것이다. 이는 수성 이동상 내에서 역상 분리 매질의 적용가능성을 확대시킨다.

인-시튜 중합을 사용하여 임의의 크기 및 형상의 칼럼을 제조할 수 있다. 한 구현예에서, 내부 직경 75 마이크로미터인 원통형 모세관 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, 4.6 mm ID를 가진 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, 88 mm ID를 가진 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, 100 마이크로미터 내지 700 마이크로미터 이하의 단면을 가진 정사각형 모세관 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, 3 mm 두께 및 1 cm 내부직경을 가진 폴리머를 제조하였다. 다른 구현예에서, 1cm 외부직경 및 4.6mm 내부직경을 가진 도넛형상의 모놀리스를 제조하였다. 다른 구현예에서, 100 마이크로미터 내부직경 홈을 가진 마이크로칩 칼럼을 제조하였다.

소수성 상호작용 크로마토그래피는 중간정도의 소수성을 가진 매우 친수성 분리 매질을 필요로 한다. 덜 소수성인 탄소 체인 또는 폴리머 체인으로 매트릭스의 친수성을 더욱 증가시킴에 따라, 역상 매질을 소수성 상호 작용 매질로 바꿀 수 있다.

보통의 상 크로마토그래피는 그 표면이 친수성 작용기로 완전히 덮힌 친수성 매질을 필요로 한다. 종래기술에서는, 보통의 상 분리 매질을 얻기 위하여, 폴리(글리시딜 메타크릴레이트-코-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트) 내 에폭시기의 가수분해를 사용하였다. 보통의 상 분리 매질은 하이드록실 및 아미드와 같은 친수성 작용기를 함유하는 친수성 모노머의 인-시튜 직접 중합에 의하여 제조된다. 한 구현예에서, 하이드록실에틸 메타크릴레이트는 EDMA와 같은 가교제와 공중합되어 보통의 상 매질을 얻는다. 본 발명의 한 구현예에서, 칼럼 하드웨어는 유리 섬유로 강화된 폴리프로필렌 배럴이다.

종래 기술에 따라 제조되는 역상 모놀리스 매질은 매우 낮은 성능을 가지며 분리 중에 압축된다. 액체 크로마토그래피 매질의 적재 성능 및 매질의 강성은 매질의 가교 밀도를 증가시킴에 의해 증가된다. 가교 밀도는 폴리(스티렌-코-디비닐벤젠) 모놀리스 내에 보다 높은 양의 디비닐벤젠과 같은 가교제를 사용함으로써 증가된다. 본 발명의 한 구현예에서, 가교제의 100%가 디비닐벤젠이다(80% 순도, 상업적으로 구입가능한 최고의 순도 등급). 그 성능은 종래 기술에서 제조되는 모놀리스보다 6배 높다. 가압 중합 하에 제조되는 고성능 모놀리스는 고해상도 및 고성능을 가진다. 본 발명의 한 구현예에서, 전체 모노머 중 90% 디비닐벤젠(80% 순도)이 사용된다.

매질의 강성 및 해상도를 개선시키는 다른 방법은 커릴口 내에 전체 폴리머 밀도를 증가시킴에 의한 것이다. 혼합물 내에 전체 모노머 함량을 증가시킴으로써 전체 폴리머 함량을 증가시킨다. 중합용 혼합물 내에 전체 모노머 함량을 증가시킴에 의하여, 칼럼의 해상도 또한 향상된다. 분리에 효과적인 오프닝 크기 및 그 분포는 중합용 혼합물 내에 전체 모노머 농도에 의하여 크게 영향을 받는다. 본 발명의 한 구현예에서, 46 중량%의 전체 모노머를 사용하여 매질의 강성 및 해상도를 향상시킨다.

종래 기술에서 제조되는 모놀리스 매질은 저조한 해상도, 낮은 분리 속도, 낮은 강성 및 매우 낮은 성능을 가진다. 폴리(글리시딜 메타크릴레이트-코-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)를 순수 디에틸아민으로 변경함으로써 종래 기술의 약 음이온 교환기를 기재로 한 모놀리스 폴리메타크릴레이트를 제조하였다. 이는 물 내에서 널리 팽창되고 고 유동 속도로 사용할 수 없다. 이 매질은 매우 낮은 강성을 가지며 6cm/mm 이상의 유동 속도에서 안정하지 않다. 상기 칼럼의 배압은 작업 중에 계속하여 증가한다. 친수성 매질의 강성을 향상시키는 두가지 방법이 제공된다.

첫째, 폴리머 매트릭스의 가교 밀도를 증가시킴으로써 매질의 강성을 향상시킬 수 있다. 낮은 가교 밀도에서, 물에 의해 가용화되고 용매 밖으로 연장되는 비-가교된 선형 폴리머 체인들이 많이 있다. 상기 폴리머 매트릭스는 이와 같은 연장된 가용화로 인해 팽창한다. 폴리머 내에 폴리머 매트릭스의 팽창은 분리에 효과적인 오프닝의 크기 및 상호 연결된 입자들 사이의 간격을 좁힌다. 그 기공률 또한 감소된다. 이는 높은 배압을 초래한다. 고도로 가용화된 다공성 폴리머는 연질의 겔의 특성을 가진다. 압력 하에, 연질 폴리머는 용이하게 압축될 수 있으며 보다 높은 압력을 유도한다. 압력 증가는 추가로 매질을 압축시켜 더 높은 압력을 유도한다. 압력 증가 및 압축의 사이클로 인하여 종래기술의 모놀리스는 고속 분리 적용에 유용하지 않다.

가교 밀도 증가에 따라, 팽창가능한 선형 폴리머 체인이 짧아지고 팽창이 감소된다. 분리에 효과적인 오프닝을 가진 폴리머는 보다 강성으로 된다. 분리 효과적 오프닝을 가진 구조가 수성 용매 내에 유지된다. 고도로 가교된 폴리머 매트릭스를 이용하여 높은 기공률 및 보다 큰 분리에 효과적인 오프닝 크기가 얻어질 수 있음, 이는 압축 및 압력 증가의 치명적인 사 이클 없이 보다 높은 유동 속도가 이용될 수 있도록 한다. 고유동속도를 사용하여 고속 분리를 달성할 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 70% 가교제, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트(EDMA)를 사용함으로써 이온 교환기의 가교 밀도가 크게 향상된다. 보다 바람직한 구현예에서, EDMA의 양은 50%이다. 다른 바람직한 구현예에서, EDMA 양은 60%이다. EDMA는 이온 교환기를 함유하는 그 공중합체보다 더 소수성이다. EDMA의 양을 증가시킴으로써, 폴리머 매트릭스의 소수성이 감소된다. 이는 팽창의 감소를 초래하고 강성을 향상시킨다. 이는 수성 상 내에 높은 폴리머 강성이 매우 요구되는 경우 친수성 가교제 대신에 보다 소수성인 가교제를 사용함에 따른 부가적인 이점이다.

두번째, 본 발명에서 조절된 변경에 의하여 폴리머 분리 매질의 강성 및 칼럼 효율성 모두 개선된다. 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)는 이온 교환 작용기를 함유하도록 변경되기 전에 소수성이다. 종래 기술에서 GMA 모놀리스 약 음이온 교환기(WAX)가 60°C에서 3 시간 동안 순수 디에틸아민과의 반응에 의해 변경된다. 순수한 디에틸아민은 폴리머를 팽창시킬 수 있으며 폴리머 입자 내로 확산되어 GMA 에폭시드기에 접근한다. 이러한 변경 반응은 폴리머의 분리에 효과적인 오프닝 표면 상에 GMA 모이어티뿐 아니라 폴리머 매트릭스 내에 GMA 모이어티 또한 변경시킨다. 이온 교환 작용기를 함유하는 소수성 모이어티는 변경 후 분리에 효과적인 오프닝 내부 및 외부에서 소수성 백본과 혼합된다. 이러한 비-선별적 변경이 전체 폴리머 매트릭스가 물 내에서 연장하여 팽창하고 일부 소수성 백본은 분리 효과적 오프닝 표면에 노출되도록 한다. 분리 오프닝 표면 상의 소수성 패치는 이온 교환 크로마토그래피 분리 동안에 2차 소수성 상호작용을 초래할 수 있으며, 이는 영역 확대를 초래한다.

폴리머 입자 표면 상에 GMA의 조절된 변경은 입자 내부를 보다 소수성이고 물 내에서 덜 팽창되도록 유지할 수 있다. 표면 GMA 변경 후에, 입자 표면은 훨씬 더 소수성이 되며 물 분자를 끌어당긴다. 보다 소수성인 백본은 폴리머 입자의 내부까지 재처리하여 입자의 보다 소수성인 코어와 함께 머무르며, 크로마토그래피 분리 동안 매우 극성인 버퍼 환경으로부터 제거된다. 이는 소수성 이온 교환기로의 표면 커버를 증가시키고 2차 소수성 상호작용으로부터의 영역 확대를 방지한다. 조절된 표면 변경은 수성 액체 혼합물 내에서 저온에서 촉매화된 변경에 의하여 달성된다. 촉매는 바람직하게 산 또는 양자를 인-시튜 생성할 수 있는 시약이다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 디알킬 아민 수소 클로라이드 염이 촉매로서 사용된다. 상기 염 액체 혼합물은 매우 극성이며 소수성 폴리머를 팽창시키는 덜 팽창시킨다. 상기 이온성 촉매는 매우 소수성인 내부 매트릭스 내로 확산하는 대신 액체 혼합물 내에 머무르는 경향이 있다. 보다 낮은 반응 온도는 폴리머의 팽창가능성을 감소시킨다. 디에틸아민은 폴리머 매트릭스 내로 확산될 수 있으나, 디에틸 아민과 GMA와의 저온에서의 반응은 매우 느리고 무의미하다. 본 발명의 한 구현예에서, 디알킬 아민 수소 클로라이드 촉매는 디에틸아민 수소 클로라이드이다. 다른 구현예에서, 촉매는 트리메틸아민 수소 클로라이드이다. 한 구현예에서, 반응 온도는 25°C이다. 다른 구현예에서, 변경 온도는 30°C이다.

모놀리식 약한 양이온 교환기의 합성을 위한 종래 기술의 공정은 막, 비드 및 겔에 근거하며, 이들 중 어떠한 것도 모놀리식 칼럼의 인-시튜 제조 공정에 직접 사용될 수 없다. 약한 양이온 교환기를 제조하기 위한 7가지 방법을 이하 기재한다. 이들 방법에서 모든 변경 반응은 변경 액체 혼합물을 칼럼을 통하여 선별된 온도에서 연속적으로 펌핑시킴으로써 수행되거나, 시약이 칼럼 내로 펌핑된 후 칼럼 내부에서 밀봉되고 밀봉 욕 또는 오픈 내에서 가열된다.

첫번째 방법은 폴리(글리시딜 메타크릴레이트-코에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)(PGMAEDMA)의 클로로아세테이트 염을 사용한 2-단계 변경이다. 문헌에서는 소듐 클로로아세테이트를 사용하여 하이드록시에틸 메타크릴레이트 기재 물질을 변경하여 카르복시산기를 얻어왔다. 모놀리스 변경을 위한 상기 반응의 이점을 얻기 위하여, 1M H₂SO₄ 수성 액체 혼합물을 사용하여 가수분해함으로써 GMA 내에 에폭시드 고리를 먼저 개환하여 하이드록실기를 얻는다. 두번째 단계에서, 클로로아세테이트가 폴리머 내에 하이드록실기와 커플링되어 카르복시기를 폴리머에 부착시킨다. 이 반응은 수산화나트륨과 같은 강 염기에 의해 촉매화된다. 반응 온도는 40 내지 80°C, 바람직하게 50 내지 70°C이다. 반응 시간은 1 내지 24 시간, 바람직하게 6 시간 미만으로 변화한다. 본 발명의 한 구현예에서, 변경 반응은 5M 수산화나트륨 수성 액체 혼합물을 60°C에서 2 시간 동안 모놀리식 칼럼을 통하여 펌핑함으로써 일어난다. 이러한 매질의 성능은, 칼럼 효율성은 좋으나 이상적이지 않다. 성능은 보다 장시간의 반응 및 보다 높은 반응 온도에 의해 증가될 수 있다. 그러나, 분리 매질은 폴리머 내에 에스테르의 부 가수분해 반응으로 인하여 연성으로 된다. 가교 밀도는 가교제 EDMA 또한 가수분해되므로 저하된다.

두번째 방법은 글리콜산을 시약으로 사용하여 카르복시 작용기를 얻기 위한폴리머 내에 GMA의 1-단계 변경이다. 글리콜산은 PGMEDMA와 40 내지 90℃에서 1 내지 24시간 동안 반응한다. 이 반응은 글리콜산 자체가 촉매이므로 자가 촉매 반응이다. 상기 반응은 트리플루오로아세트산(TFA)과 같은 다른 강산에 의해 촉매화될 수 있다. 상기 반응은 간단하나 약한 양이온 교환기의 성능은 부반응으로 인하여 낮다. 에폭시드 고리를 부반응으로서 가수분해 반응에 의해 개환할 수 있다. 이러한 반응을 방지하기 위하여, 비수성 용매를 사용한다. 바람직하게, 양성자를 함유하는 용매를 사용한다. 본 발명의 한 구현예에서, TFA 촉매를 함유하는 포름산 내에 글리콜산 액체 혼합물을 칼럼을 통하여 3 시간 동안 80℃에서 펌핑한다.

세번째 방법은 글리콜산 및 클로로아세테이트를 사용하는 PGMEDMA의 이중 변경이다. 이중 변경 반응의 몇가지 이점이 있다. 첫째, 이는 수성 액체 혼합물 내에서 수행될 수 있다. 둘째, 두 반응 단계 모두 원하는 생성물을 형성한다. 셋째, 첫째 단계의 부반응이 둘째 변경 단계를 위한 원하는 작용기를 형성한다. 넷째, 이중 변경 반응의 조건은 매트릭스의 강성을 유지하는 백본의 가수분해를 피하면서 동일하거나 보다 높은 성능을 얻기 위한 단일 반응보다 온화할 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 첫번째 반응을 TFA를 촉매로서 함유하는 글리콜산 수성 액체 혼합물 내에서 수행하고 두번째 반응은 NaOH 수성 액체 혼합물 내에서 클로로아세테이트의 치환 반응이다.

네번째 방법은 글리콜산과 클로로아세테이트의 one-pot 반응이다. 이중 순차적 반응 대신에, 두 시약 모두를 반응 동안 액체 혼합물 내에 함께 주입한다. 글리콜산과의 반응은산-촉매화되는 대신 염기-촉매화된다. 이 방법은 세번째 방법의 이점을 가지나, 물 내에 글리콜산에 의한 염기-촉매화된 개환 반응의 반응성이 낮음으로 인하여 보다 낮은 성능을 가진다.

다섯번째 방법은 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트의 가수분해이다. 에스테르기의 가수분해는 카르복실 작용기를 형성한다. PGMEDMA 막 또는 비드의 직접 가수분해가 종래 기술에 알려져 있다. 그러나, 결과 형성되는 매질은 우수한 성능 또는 분리를 가지지 못한다. 본 발명자들에 의하여, 친수성 및 소수성 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트를 혼성화함으로써 해상도 및 성능 모두 극적으로 개선할 수 있음이 발견된다. 물 분자는 입자 표면 내로 확산하여 아크릴레이트의 친수성 모이어티로 인하여 표면을 보다 잘 습윤시킬 수 있기 때문에, 가수분해 반응은 훨씬 더 효율적이다. 상기 반응은 TFA 또는 NaOH 수성 액체 혼합물과 같은 산 및 염기 모두에 의해 촉매화될 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 폴리(메틸메타크릴레이트-코-하이드록시에틸 메타크릴레이트-코-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)가 제조되고 가수분해되어 약한 양이온 교환기를 얻는다. 다른 구현예에서, 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트-코-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트)가 가수분해된다. 다른 구현예에서, PGMEDMA가 산에 의해 먼저 그리고 두번째로 염기에 의해 가수분해된다. 이러한 방법으로 얻은 약한 양이온 교환기는 백본 가교제의 가수분해로 인하여 보다 연성이다.

여섯째 방법은 아크릴 또는 메타크릴산의 직접 공중합이다. 산의 직접 공중합은 1 단계로 약한 양이온 교환기를 생성한다. 이 방법은 제조 방법을 크게 단순화한다. 약한 양이온 교환기의 성능은 변경 방법에 비하여 비교적 높으나 여전히 이상적이지 않다. 산성 모노머 대 가교성 모노머의 비율은 2 내지 30%, 바람직하게 5 내지 15%이다. 산성 모노머의 함량이 높을수록, 성능은 높으나 매질은 연성이다. 직접 중합 방법은 모놀리식 막, 칼럼, 칩, 튜브 또는 당업계에 공지된 임의 포맷의 제조에 적용가능하다.

일곱번째 방법은 직접 공중합과 조절된 변경의 조합이다. 본 발명에서, 이러한 조합으로 인하여 매질의 강성을 유지하면서 고성능을 얻을 수 있는 것으로 발견되었다. 결과 생성되는 매질은 고유동속도를 사용하는 고-처리량 분리를 위하여 사용될 수 있다. 아크릴 또는 메타크릴산의 직접 중합에 의하여 개선된 성능은 높은 함량의 산을 함유하는 매질의 연성으로 인하여 한계에 도달한다. 산성 모노머는 무작위하게 중합되고 매트릭스를 통하여 분산된다. 산은 버퍼 내에서 염으로 전환되고 수성 이동상 내에서 매질의 연장된 팽창을 초래한다. 또한, 소수성 백본은 탄소 체인으로 이루어지며 에스테르가 표면 상에 노출되어 이온 교환 크로마토그래피 분리 동안 2차 소수성 상호작용을 초래한다. 이는 영역 확대 및 테일링을 유도한다. 소수성 표면은 성능을 향상시키면서 친수성이 되도록 더욱 변경될 수 있다. 이와 같이 조절된 변경은 매질의 연성을 방지하면서 매질의 성능 및 친수성을 향상시킨다. 과도하게 변경된 매질은 표면 상에 변경 이외에도 입자 내부에 변경을 초래한다. 약 음이온 교환기의 제조에서 논의한 바와 같이, 입자 내부의 변경은 과도한 팽창을 초래하여 분리에 효과적인 오프닝을 블로킹하거나 형태를 변화시켜 치명적인 압력 증가 및 압축 사이클을 초래한다. 본 발명의 한 구현예에서, 약한 양이온 교환기를 첫번째 단계로 아크릴산, 메틸 메타크릴레이트(MMA) 및 EDMA의 공중합, 및 두번째 단계로 메틸 메타크릴레이트의 가수분해에 의하여 제조한다. MMA의 가수분해는 염기-촉매화되고, NaOH와의 반응 후 아크릴산의 전환 산물인 매우 친수성인 아크릴레이트 염의 존재에 의하여 가속화된다.

이와 같이 직접 중합과 변경을 조합하는 방법학은 다수의 작용기와 동시에 매트릭스의 강성을 필요로 하는 모든 친수성 폴리머 지지체의 제조에 적용가능하다. 이는 모놀리식 튜브 또는 칼럼, 모놀리식 막, 모놀리식 모세관 및 칩 또는 기타 임의의 다른 포맷의 모놀리식, 및 폴리머 입자, 겔, 막 또는 폴리머 분리 매질의 기타 임의 유형의 제조에 적용가능하다. 특히, 모놀리식 막의 해상도 및 성능은 이러한 방법으로 개선될 수 있다. 이러한 개선은 인-시튜 공정 또는 오프 라인 공정에 의

하여 달성될 수 있다. 직접 중합에 의하여 얻어지는 모놀리스 또는 비드는 반응 액체 혼합물을 패킹된 칼럼 또는 막을 통하여 펌핑하거나, 또는 이들을 변경 액체 혼합물 내로 침지함으로써 변경될 수 있다. 상기 비드들은 변경 액체 혼합물 내에 현탁될 수 있다. 이러한 방법학을 사용함으로써, 고성능의 강한 음이온 교환기(SAX) 및 강한 양이온 교환기(SCX)를 개발하였다.

모놀리식 강한 음이온 교환기를 제조하기 위한 종래 기술의 공정은 막, 비드 및 겔에 근거하며, 모놀리식 강한 음이온 교환 칼럼의 제조에 적용가능하지 않다. 모놀리식 강한 음이온 교환 칼럼을 인-시츄 제조하는 세 가지 방법이 이하 제공된다.

방법 1은 매우 강성인 폴리머와 조절된 표면 변경의 조합이다. PGMEDMA의 트리메틸아민 수소 클로라이드를 사용한 변경을 사용하여 막 및 비드 기재의 강한 음이온 교환기를 얻어왔다. 모놀리식 강한 음이온 교환기의 제조를 위해 반응이 사용되는 경우, 결과 생성되는 매질은 연성이며 고속 분리를 위하여 사용될 수 없다. 본 발명에서 모놀리식 약 음이온 교환기의 제조에서와 같이 두 가지 방식으로 강성이 개선된다: 높은 가교 밀도 및 조절된 변경 반응.

SAX를 위한 기본 폴리머는 가교성 모노머 대 기능성 모노머의 보다 높은 비율을 사용함으로써 높은 가교 밀도를 함유하도록 조성된다. 가교제의 양을 폴리머 내 전체 모노머의 50% 이상으로 증가시킨다. 본 발명의 한 구현예에, 전체 모노머 내에 60% EDMA가 사용된다. 포로젠 및 그 비율을 비교적 저압에서 최적의 해상도를 제공하도록 선별한다.

조절된 변경은 PGMEDMA의 촉매화된 아민화에 의하여 달성된다. 상기 촉매는 당업계에 공지된 임의의 염기일 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 트리메틸아민이 촉매로서 사용된다. 촉매의 양은 액체 혼합물의 1 내지 50 부피%, 바람직하게는 10 내지 30%이다. 반응 온도는 10 내지 60°C, 바람직하게는 20 내지 50°C이다. 반응 시간은 10 분 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 4 시간이다. 선별된 촉매 반응은 입자의 내부 보다 입자의 표면을 변경시켜 고 유동 속도에서 사용가능한 매질을 생성한다. 본 발명의 한 구현예에서, 반응은 40°C에서 3 시간 동안 수행된다.

방법 2는 4급 아민 또는 4급 아민을 인-시츄 생성할 수 있는 중간체를 함유하는 모노머의 직접 공중합이다. 본 발명의 한 구현예에서, 4급 아민을 함유하는 작용성 모노머는 2-(아크릴옥시옥시에틸)트리메틸암모늄 메틸 설페이트(ATMS)이다. 상기 폴리머는 높은 가교 밀도를 가진다. 전체 모노머 내에 가교성 모노머의 비율은 50 내지 70%이다. 본 발명의 한 구현예에서, 60% EDMA가 사용된다. ATMS의 양은 2 내지 20%, 바람직하게 5 내지 15%이다. 모노머의 나머지를 구성하는 세번째 모노머는 바람직하게 HEMA와 같은 친수성 모노머이나 소수성 모노머 또한 사용될 수 있다.

방법 3은 상기 방법 2와 1에서 보인 직접 중합과 조절된 표면 변경의 조합이다. 방법 1에 의해 얻어지는 강한 양이온 교환기는 강성이며 고해상도를 가진다. 그러나, 이는 비-이상적 성능을 가진다. 방법 2는 성능을 개선시키나 충분하지 않으며 저해상도를 가진다. 직접 중합과 조절된 표면 변경의 조합이 성능을 배가시키고 해상도 및 회수를 향상시킨다. 표면이 친수성 단백질 양성기로 완전히 덮히므로 단백질 회수가 향상된다. 보다 낮은 단백질 회수의 주된 원인인 2차 소수성 상호작용이 최소화된다. 포로젠을 조사하고 원하는 유동속도를 제공하도록 선별한다. 본 발명의 바람직한 한 구현예에서, 부탄디올, 프로판올 및 물의 조합을 포로젠으로서 사용한다. 중합용 혼합물과 조건을 원하는 유동속도에서 최적의 해상도를 제공하도록 조정한다.

모놀리식 강한 양이온 교환기를 제조하기 위한 종래 기술의 공정은 막, 비드 및 겔에 근거하며, 모놀리식 강한 양이온 교환 칼럼의 인-시츄 제조에 적용할 수 없다. 모놀리식 강한 양이온 교환 칼럼을 인-시츄 제조하기 위한 세가지 방법이 이하 제공된다.

방법 1은 유기 용매 내에 가용성인 강 염기에 의해 촉매화되는 부탄 술포(sultone) 또는 프로판 술포를 사용한 PGMEDMA의 변경이다. 촉매로서 NaOH 액체 혼합물을 사용하는 PGMEDMA의 프로판 술포를 사용한 변경을 이용하여 막 또는 비드-기재의 강한 양이온 교환기를 제조하여 오고 있다. 상기 반응은, 프로판 술포가 NaOH 수성 액체 혼합물 내에 가용성이 아니므로 2-상 반응이다. 상기 2-상 반응 혼합물을 칼럼을 통하여 펌핑하여 변경을 행할 수 있다. 몇몇 접근법을 취하여 변경 반응을 수행하고 있다.

접근법 1은 제 1 단계로 포타슘 t-부톡사이드와 같은 강 염기로 매질을 활성화한 다음 부탄 술포를 사용하여 친핵성 개환 반응하는 것으로 이루어지는 2-단계 변경 반응이다. 부탄 술포는 액체이며 프로판 술포는 실온에서 고체이기 때문에, 부탄 술포가 바람직하다. 포타슘 t-부톡사이드가 그 소듐 상응물 보다 가용성이 높으므로 바람직하다. 상기 용매는 디메틸술포(DMSO)와 같은 시약의 우수한 용매이다. 상기 변경 액체 혼합물은 인-시츄 변경을 위하여 칼럼을 통하여 펌핑되기 위하여 균질하여야 한다. 접근법 2는 활성화 및 변경 단계 모두로 이루어진 one-pot 반응이다. 강 염기 및 부탄 술포 모두 강

용매 내에 용해된다. 상기 액체 혼합물을 칼럼을 통하여 계속하여 펌핑하거나 몇 시간 동안 선별된 온도에서 밀봉한다. 반응 온도는 바람직하게 80 내지 120℃이다. 본 발명의 한 구현예에서, 90℃가 사용된다. 본 발명의 다른 구현예에서, 120℃가 사용된다.

방법 2는 강한 양이온 교환기를 함유하는 모노머의 직접 중합이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 2-아크릴아미도-2-메틸-2-프로판술폰산(AMPS)이 술폰기 함유 작용성 모노머로 사용된다. AMPS의 양은 2 내지 20%, 바람직하게 5 내지 15%이다. 상기 폴리머 성능은 첫번째 방법에 비하여 크게 개선된다. 상기 중합용 혼합물을 원하는 유동 속도에서 최적의 해상도를 제공하도록 포물레이션한다.

방법 3은 직접 중합과 조절된 변경의 조합이다. 본 발명의 한 구현예에서, AMPS를 GMA 및 EDMA와 공중합한다. 상기 폴리머를 상기한 방법 1과 같이 조절된 변경에 의하여 더욱 변경시킨다. 성능과 해상도 모두 방법 1 및 2와 비교하여 크게 개선된다. EDMA의 양은 바람직하게 50 내지 70%이다. AMPS의 양은 바람직하게 2 내지 15%이다. 나머지 모노머는 GMA이다. 본 발명의 다른 구현예에서, AMPS를 HEMA 및 EDMA와 공중합한다. 포로젠을 원하는 유동속도를 제공하도록 조사하고 선별한다. 중합용 혼합물과 조건이 향상되어 고해상도 및 고속 크로마토그래피를 제공한다.

하이드록실기 함유 폴리머 매트릭스를 SCX를 위하여 술폰기를 함유하도록 조절 변경하는 것은 다음 공정을 사용함으로써 매우 효율적인 것으로 밝혀졌다. 이 공정의 한 구현예에서, 코폴리머 매트릭스 내에 글리시딜 메타크릴레이트를 가수분해하여 두 개의 하이드록실기를 함유하도록 하였다. 상기 하이드록실기들을 클로로술폰산으로 더욱 변경하였다. 이 공정의 다른 버전에서, 변경을 클로로술폰산의 피리딘 염 액체 혼합물을 사용하여 수행하였다. 첫번째 공정을 도 20의 등식 1 및 2에 도시하고, 두번째 공정을 도 20의 등식 3에 도시한다.

인-시투 중합 방법에 의한 효율적인 크로마토그래피 분리를 위한 큰 직경의 모놀리식 칼럼의 제조는 발열 중합에 의해 형성되는 폴리머의 열 분리 효과로 인하여 매우 어려운 작업이었다. 모놀리스의 중심에서 모놀리스 표면까지의 최단 거리(본 명세서에서 반경으로 정의됨)가 칼럼 하드웨어 재료에 따라 8 mm 미만인 이상, 열 전달은 중합 온도의 불균질성을 방지하기에 충분히 신속한 것으로 밝혀졌다.

감소된 중합 열을 사용하여 큰 직경의 모놀리식 칼럼을 제조하는 한 기법은 다단계 중합을 사용하는 것이다. 이 기법에서, 각각의 중합 단계에서 생성되는 폴리머 모놀리스는 중합을 위한 몰드가 우수한 열 전달 물질로 이루어져 있다면 8 mm 이하의 직경을 가진다. 이는 먼저 8 mm 미만의 반경을 가지는 칼럼을 제조하고, 충전재와 칼럼 벽 사이의 중합 액체 혼합물의 반경 또한 8mm 미만이고 충전재 사이의 거리가 2mm 미만인 2단계 중합을 위한 충전재로서 이들을 사용함으로써 달성된다. 본 발명에서, 충전재 사이의 중합 액체 혼합물의 두께가 2 mm 미만이면 중합 온도 변화에 대하여 영향이 무의미한 것으로 밝혀졌다. 복수의 얇은 폴리머 칼럼을 큰 직경의 칼럼 내로 충전하고 2단계 중합용 혼합물로 충전한다. 상기 칼럼을 규칙적인 설비 또는 중합 동안 가압을 허용하는 설비들로 밀봉한다. 다음, 큰 직경의 칼럼을 온도 조절되는 가열 욕 또는 오븐 내에 배치하여 2단계 중합을 행한다. 상기 얇은 칼럼을 상기한 공정에 의하여 가압 또는 비-가압 중합으로 제조한다. 1단계 중합에서 제조되는 얇은 모놀리식 칼럼을 바람직하게 세척 및 추가적인 변경없이 보존한다. 2단계 중합을 위한 중합용 혼합물은 매질의 유형에 따라 1단계 중합을 위한 중합용 혼합물과 동일하거나 상이하다.

상기 공정에서, 8 mm 미만의 반경을 가진 얇은 칼럼은 고체 막대, 디스크, 8mm 미만의 실린더 벽 두께를 가지는 공동의 튜브, 또는 막일 수 있다. 상기 얇은 칼럼의 형상은 둥근 형상, 사각형, 삼각형 등과 같이 당업계에 공지된 임의의 형상일 수 있다. 충전재는 본 명세서의 충전재 물질 부분에 기재된 다른 입자일 수 있는 것으로 인지될 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 반경 5 mm 미만의 복수의 얇은 칼럼이 사용된다. 본 발명의 한 바람직한 구현예에서, 50 mm X 10 mm I.D.를 가진 모놀리식 폴리머 막대를 충전재로 사용한다. 본 발명의 다른 바람직한 구현예에서, 10 mm X 34 mm I.D.를 가진 모놀리식 폴리머 막대를 충전재로서 사용한다. 본 발명의 다른 바람직한 구현예에서, 다양한 내부 및 외부 직경을 가진 폴리머 실린더를 충전재로서 사용한다.

큰 직경의 칼럼을 제조하기 위한 다른 기법은 앞서 기재한 바와 같이 온도-시간 완화를 사용하는 것이다. 이 기법을 사용함에 있어, 약한 양이온 칼럼 및 강한 음이온 칼럼을 제조하여 왔으며, 다른 유형의 칼럼 또한 온도-시간 완화를 사용하여 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 약한 양이온 칼럼을 제조하는 한가지 방법은 1 부의 GMA, 4 내지 6 부의 MMA, 10 내지 14 부의 EDMA 및 개시제를 포함하는 중합용 혼합물로 용기 내로 가하는 단계 및 혼합물이 균질 액체 혼합물이 될 때까지 가법계 혼드는 단계를 포함한다. 다음, 포로젠을 상기 균질한 액체 혼합물 내로 가하고 상기 새로운 혼합물이 균질하여 중합 액체 혼합물을 형성할 때까지 혼든다. 상기 중합 액체 혼합물은 대개 이 지점에서 칼기되고 칼럼이 중합 액체 혼합물로

충전된다. 물론, 액체 혼합물은 처음부터 중합용 혼합물을 혼합하기 위한 용기 또는 용기의 일부로서 칼럼을 사용하여 제조될 수 있다. 상기 중합 액체 혼합물을 칼럼 내에서 온도-시간 완화 조건 하에 중합하여 플러그를 형성하고 상기 플러그를 세척하여 포로젠을 제거한다.

일부 유형의 칼럼의 경우, 칼럼은 바람직하게 압력을 중합 액체 혼합물에 추가적으로 가하는 수단을 포함한다. 이러한 구현예에서, 칼럼을 밀봉하고 중합을 개시한 후에, 압력을 앞서 기재한 바와 같이 중합용 혼합물에 가할 수 있다. 한 구현예에서, 중합용 혼합물은 35 내지 45℃에서 조절 개시 지점에서 시작하여 12 시간 내에 안전점으로 점진적으로 증가되는 구배 온도에서 중합되고, 55 내지 65℃에서 24 시간 동안 경화된다. 다른 구현예에서, 중합용 혼합물은 35 내지 45℃에서 72 시간 동안 중합된 다음 55 내지 65℃에서 24 시간 동안 경화된다.

유사하게, 2 내지 4 부의 GMA, 2 내지 4 부의 ATMS, 7 내지 11 부의 EDMA 및 개시제를 포함하는 중합용 혼합물을 용기 내로 가하고 상기 혼합물을 균질한 액체 혼합물이 될 때까지 가볍게 흔들고, 포로젠을 상기 균질 액체 혼합물 내로 정량하고 상기 새로운 혼합물이 균질한 중합 액체 혼합물이 될 때까지 흔들고, 상기 액체 혼합물을 탈기하고, 칼럼을 상기 중합 액체 혼합물로 충전하고, 상기 중합 액체 혼합물을 칼럼 내에서 시간-온도 완화 조건하에 중합하여 플러그를 형성함으로써, 강한 음이온 칼럼을 제조하여 왔다. 다음, 상기 플러그를 세척하여 포로젠을 제거할 수 있다.

약한 양이온 교환기의 제조에서와 같이, 칼럼은 중합 액체 혼합물에 압력을 가하는 수단을 포함할 수 있으며, 칼럼을 밀봉하고 압력을 중합용 혼합물에 가하는 단계들을 추가로 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 상기 중합용 혼합물을 35 내지 45℃의 조절 개시 지점에서 시작하여 55 내지 65℃의 안전점으로 서서히 증가하는 온도 구배에서 중합하고, 55 내지 65℃에서 24 시간 동안 경화한다. 다른 구현예에서, 중합용 혼합물을 35 내지 45℃에서 72 시간 중합하고 55 내지 65℃에서 24 시간 경화한다.

모세관 칼럼의 성능을 앞서 기재한 바와 같은 절차에 의해 향상시킬 수 있다. 한가지 방법은 포로젠 생성 용매들의 올바른 조합을 선택하여 압력하에 또는 압력없이 분리 매질을 생성하는 것이다. 올바른 극성 및 폴리머 가용화 성능을 가진 용매들의 선택은 마이크로기공이 없거나 칼럼의 분리 효율성에 영향을 미칠 수 있는 작은 기공들이 없는 다공성 폴리머 지지체를 초래할 수 있다. 중합 동안 압력의 적용은 매질의 균일성을 추가로 향상시키고 마이크로기공의 형성을 방지할 것이다. 한 구현예에서, 내부 직경 320 마이크로미터인 모세관 칼럼을 클로로시클로헥산과 1-데칸올의 용매의 조합을 사용하여 제조하여, 120 psi 압력을 적용하거나 적용하지 않고, 샘플 분자의 저조한 매스 전달을 초래하는 마이크로기공 또는 작은 기공들을 함유하지 않는 모놀리식 다공성 폴리머 지지체를 생성하였다. 다른 구현예에서, 1-에틸헥산 산과 미네랄 오일을 포함하는 용매들의 조합을 사용하여 압력을 적용 또는 적용하지 않고 마이크로기공을 함유하지 않는 모놀리식 다공성 물질을 제조하였다.

X-선, UV-vis의 사용은 모세관 성능을 크게 향상시킬 수 있다. X-선은 낮은 에너지 및 낮은 강도 손실로 물질을 투과할 수 있다. X-선은 거의 강도 손실없이 모세관을 투과할 수 있다. 감광제 또는 섬광제는 용매에 의하여 전달되는 X-선 에너지를 효율적으로 흡수하고, 액체 혼합물 내에서 형광 또는 인광 발광할 수 있다. 상기 균질한 형광 및 인광은 중합 액체 혼합물 내에서 중합을 균질하게 개시하는 개시제에 의하여 흡수될 수 있다. 이는 모놀리식 분리 매질 및 입자를 포함하는 다공성 폴리머 지지체의 다공성 구조의 균일성을 유도한다. 이는 모놀리식 모세관의 효율성을 크게 향상시킨다. X-선을 에너지 공급원으로 사용하는 저온 중합은 보다 낮은 중합 온도로 인하여 느린 중합 속도를 초래한다. X-선의 강도 및 에너지의 적당한 조정은 원하는 중합 속도를 유도하며, 이는 균질한 분리 매질 형성을 유도할 수 있다. X-선, 섬광제/감광제, 적당한 용매 성능을 가진 용매 및 중합 동안 압력의 사용은 마이크로기공 또는 샘플 분자와 유사한 크기의 작은 기공을 가지지 않는 분리 매질의 형성을 유도하여 성능을 크게 개선시킬 수 있다. 한 구현예에서, X-선을 에너지 공급원으로 사용하여 모세관 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, X-선을 에너지 공급원으로 사용하여 마이크로칩 칼럼을 제조하였다.

폴리머에 근접한 굴절 지수를 가지는 용매의 올바른 선택은, 앞서 기재한 Christiansen Effect로 알려져 있는 광선의 강도의 손실이 거의 없이 광선이 모세관을 통하여 이동할 수 있도록 한다. Bleaching Effect를 가지는 개시제의 사용은 UV-vis 광선이 무시할 만한 강도 손실로 모세관 칼럼을 통하여 이동할 수 있도록 한다. 광선은 중합 액체 혼합물 내에서 균질하다. 균질한 광선의 흡수는, Christiansen effect and bleaching effect를 고려하지 않고 가열 또는 UV-vis 개시 중합에 의하여 촉진되는 개시와 달리 중합의 균질한 개시를 유도한다. 이는 액체 혼합물 내에 균질한 폴리머 형성을 유도한다. 그 결과, 보다 균질한 다공성 구조가 형성될 수 있다. 이는 모세관 칼럼 성능을 보다 향상시킨다. 상기 방법과 우수한 가용화 성능의 용매, 가압 중합의 조합은 마이크로기공 또는 칼럼 성능에 영향을 미치지 않는 작은 기공들을 함유하지 않는 균질한 매질의 형성을 유도할 수 있다. 한 구현예에서, UV-가시 광선을 사용하여 모세관 칼럼을 제조하였다. 다른 구현예에서, UV-가시 광선을 사용하여 마이크로칩 칼럼을 제조하였다.

실시예

이하, 하기 실시예를 통하여, 본 발명에 보다 상세하게 설명하나, 본 발명은 하기 실시예로 제한되지 않는다:

일반적인 방법

통상적으로, 하기 실시예에 이용된 각각의 형태의 매질의 제조 공정은 다음과 같은 3개의 주단계, 즉, (1) 폴리머 매트릭스의 제조하는 단계; (2) 상기 폴리머 매트릭스를 개질하여, 바람직한 작용기를 도입하는 단계; 및 (3) 상기 매질에 특성 부여하는 단계를 포함한다.

전술한 주단계는 몇몇 서브단계(substep), 즉, (1a) 모노머, 포로젠, 및 개시제의 종류 및 양을 다양하게 이용하여, 중합용 혼합물의 제제화하는 단계; (1b) 진공 및 헬륨 퍼징(purging)에 의해 상기 중합용 혼합물을 탈기하는 단계; (1c) 서로 다른 직경을 가지며 내부가 비어 있는 칼럼과 몰드로서 관형 물질을 조립하는 단계로서, 대개는 상기 칼럼의 한쪽 단부를 캡 또는 스톱퍼(stopper)로 실링(sealing)하는 조립 단계; (1d) 상기 칼럼에 중합용 혼합물을 충전하는 단계; (1e) 중합하는 동안 압력을 가하기 위해, 상기 몰드의 다른 쪽 단부에 캡, 또는 별도로 고안된 피팅을 실링하는 단계; (1f) 유리 칼럼을 이용하는 경우, 한쪽이 개방된 단부를 가지는 몰드 중에서 상기 액상 혼합물을 예열한 다음, 수력압(hydraulic pressure), 기압, 또는 기계적 수단에 의한 압력을 포함하는 각종 압력 소스(pressure source)를 이용하여 소정의 압력을 가하는 단계; (1g) 소정의 온도에서, 온도가 제어되는 가열용 베스(bath) 또는 오븐 중에 상기 몰드를 두는 단계; (1h) 다양한 시간 동안 중합하는 단계; (1i) 중합 후, 상기 가열용 베스로부터 상기 칼럼을 꺼낸 다음, 상기 캡 또는 가압 장치 대신, 세척용 액체를 상기 칼럼 내부로 펌핑하기 위한 칼럼 피팅을 장착하는 단계; 및 (1j) 유기 용매 및/또는 물을 이용하여 상기 칼럼을 세척하는 단계를 포함한다.

상기 칼럼의 개질 방법은, (2a) 다양한 종류와 양의 반응제 및 촉매를 이용하여, 개질용 반응 혼합물을 제제화하는 단계; (2b) 5 상부피의 개질용 액상 혼합물을 상기 칼럼 내로 펌핑한 다음, 상기 칼럼을 실링하거나, 또는 보다 많은 종류의 액상 혼합물을 상기 칼럼 내로 연속 펌핑하는 단계; (2c) 온도가 제어되는 가열용 베스 중에서, 다양한 온도에서 다양한 시간 동안 개질 반응을 수행하는 단계; 및 (2d) 유기 용매 및 물을 이용하여, 상기 칼럼을 세척하는 단계를 포함한다.

상기 칼럼의 특성은 액체 크로마토그래피 분리, 기공도 측정, BET 표면적 측정, SEM(scanning electron microscopy)에 의한 관찰, UV 분광분석, 및 육안 관찰을 포함하는 다양한 방법에 의해 평가될 수 있다. 그 중에서, 상기 액체 크로마토그래피에 의한 특성 평가는 다양한 속도에서 다양한 분리 방식으로 수행하는 단계를 포함한다. 통상적으로 사용되는 장치, 공정, 및 방법에 대해서는 다음의 예시한 바와 같다.

중합용 액상 혼합물의 탈기 방법

초음파 탈기기(ultrasonic degasser)를 이용하여, 수분 흡입기에 의해 발생된 진공을 5분간 가함으로써, 상기 중합용 액상 혼합물을 탈기시킨다. 그런 다음, 상기 액상 혼합물을 최소 20분간 퍼징한다.

안정화 및 컨디셔닝 방법

개질 반응 후, 세척 단계를 수행한 다음에는 이온 교환 칼럼을 안정화 및 컨디셔닝한다. 강한 음이온 교환기용 유리 칼럼(100×10 mm I.D.)을 안정화 및 컨디셔닝하는 경우에는, 0.01 몰/L의 트리스 HCl 완충액(pH 7.6)의 유속을 0 ml/분에서부터 20 ml/분까지 1분간 선형 증가시킨 다음, 0.5분간 방치한다. 상기 압축 용액을 2분간 구배에 의해 동일한 완충액 중의 1 몰/L의 NaCl로 교체한 다음, 0.5분간 방치한다. PEEK 라인을 가지는 스테인리스 스틸 칼럼을 안정화 및 컨디셔닝하는 경우에는, 최대 유속을 20 ml/분 대신에 5 ml/분으로 한 것을 제외하고는 위에서와 동일하게 수행한다. 그 밖의 이온 교환 칼럼에 대한 안정화 및 컨디셔닝 방법은 허용되는 최대 유속에 따라 다르다.

특성 평가 방법

1. 액체 크로마토그래피(LC) 분리를 이용한 특성 평가

1a. LC에 의한 특성 평가 방법 1: 액체 크로마토그래피에 의한 단백질 및 펩타이드의 분리

이동상:

이동상 A (또는 완충액 A):

음이온 교환 크로마토그래피: 0.01M의 트리스 HCl(pH 7.6)

양이온 교환 크로마토그래피: 0.01M의 소듐 포스페이트(pH 7.0)

역상 크로마토그래피: 물 중의 0.15% 트리플루오로아세트산(TFA)

이동상 B (또는 완충액 B):

이온 교환 크로마토그래피: 완충액 A 중의 1M의 NaCl

역상 크로마토그래피: 아세토니트릴(ACN) 중의 0.15% TFA

샘플:

음이온 교환 크로마토그래피:

0.6 mg/ml의 미오글로빈, 1 mg/ml의 콘알부민, 1 mg/ml의 오브알부민, 및 1 mg/ml의 트립신 저해제.

양이온 교환 크로마토그래피:

1 mg/ml의 콘알부민, 1 mg/ml의 오브알부민, 및 1 mg/ml의 트립신 저해제.

역상 크로마토그래피(단백질의 분리시):

1.5 mg/ml의 리보핵산분해효소(ribonuclease), 0.5 mg/ml의 사이토크롬 C(cytochrome C), 1.5 mg/ml의 BSA, 0.9 mg/ml의 탄산탈수효소(carbonic anhydrase), 1.5 mg/ml의 오브알부민.

역상 크로마토그래피(펩타이드의 분리시):

33 g/ml의 Met-엔케팔린, Let-엔케팔린, 안지오텐신 II, 파이살레민(Physalaemin), 성분 P

샘플의 제조 방법

상기 샘플의 제조 방법은, 눈금이 매겨진 15 ml 용량의 플라스틱 튜브에 8 ml의 완충액 A를 충전하는 단계; 적당한 양의 단백질 샘플을 칭량하여, 상기 튜브에 넣는 단계; 상기 튜브를 캡으로 실링한 다음, 모든 단백질이 용해될 때까지, 상기 튜브를 적절히 진동시키는 단계; 상기 튜브의 10 ml 눈금에 도달할 때까지, 보다 많은 양의 완충액 혼합물을 첨가하는 단계를 포함한다.

또한, 단백질 분리에 의한 칼럼의 특성 평가 방법은 다음과 같다:

먼저, Isco 2350 2개의 펌프 시스템에 상기 칼럼을 장착한다. 펌프 A는 0.01 몰/L의 트리스 HCl 완충액(완충액 A)를 포함하며, 펌프 B는 완충액 A 중의 1 몰/L의 NaCl(완충액 B)를 포함한다. 사용하기 전에, 20분 이상 헬륨을 퍼징하여 이동상을 탈기시켰다. 단백질을 분리하기 위해 UV 검출기를 감도 0.05, 파장 280 nm(펩타이드의 분리시에는 파장 240 nm)으로 세팅하였다. 상기 샘플의 주입 부피는 20 μ l였다. 상기 칼럼을 먼저 20 상부피의 완충액 B로 세척한 다음, 15 상부피의 완충액 A를 3 ml/분의 유속(내직경이 4.6 mm인 칼럼의 경우; 내직경이 10 mm인 칼럼의 경우에는 10 ml/분의 유속)으로, 컨디셔닝하였다. 0에서부터 50%의 완충액 B 20 상부피를 3 ml/분의 유속(내직경이 4.6 mm인 칼럼의 경우; 내직경이 10 mm인 칼럼의 경우에는 10 ml/분의 유속)으로 이용하여, 구배에 의해 단백질을 구배시켰다.

1b. LC에 의한 특성 평가 방법 2: 이온 교환기의 결합 용량 측정

이온 교환 칼럼의 결합 용량을 전단 분석법(frontal analysis)에 의해 측정하였다. 상기 칼럼을 20 상부피의 완충액 B로 세척한 다음, 15 상부피의 완충액 A를 이용하여 컨디셔닝하였다. 용출물의 흡수도가 더 이상 증가되지 않을 때까지, 완충액 A 중의 5 mg/ml의 BSA 또는 라이소자임(lysozyme) 액상 혼합물(음이온 교환기 및 역상의 경우에는 BSA를 이용하고,

양이온 교환기의 경우에는 라이소자임을 이용함)을 상기 칼럼 내로 펌핑하여, 상기 칼럼을 샘플 단백질로 포화시킨 다음, 100%의 완충액 A를 이용하여 흡수되지 않은 단백질을 세척하였다. 20 상부피에 대한 0에서부터 50%까지 완충액 B의 구배에 의해, 상기 칼럼에 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질을 바이알 내에 수집한 다음, 280 nm의 파장에서 UV 분광분석계를 이용하여 단백질의 농도를 확인하였다. 수집된 단백질의 농도와 수집 부피를 곱하여, 상기 칼럼의 총 결합 용량을 산출하였다.

1c. LC에 의한 특성 평가 방법 3: 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)

단백질의 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해, 상기 칼럼의 특성을 평가하였다. 리보핵산분해효소, 사이토크롬 C, 라이소자임, 우태아혈청, 및 탄산탈수효소를 포함하는 단백질의 혼합물(0.01M의 트리스 HCl 완충액 액상 혼합물(pH 7.0) 중에 상기 단백질들이 각각 1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.2 mg/ml, 1 mg/ml, 및 0.5 mg/ml의 농도로 포함되어 있음)을, 동일 완충액에 대해 1 ml/분의 유속에서 0.01 mol/L 트리스 HCl 완충액(pH 7.6) 중의 0.5 mol/L의 NaCl의 15분간의 구배에 의해 분리하였다.

1d. LC에 의한 특성 평가 방법 3: 침전-재용해 크로마토그래피에 의한 폴리머 분자량의 결정

침전/재용해 크로마토그래피를 이용하여 폴리머 분자량을 확인하기 위해, 특성 평가 방법 6을 이용하였다. 2.6 ml/분의 유속에서 메탄올 중에서 15%부터 80%까지의 THF의 6분간의 구배에 의해 7개의 폴리머 표준(Mp: 12,900, 20,650, 34,500, 50,400, 96,000, 214,500, 982,000)을 분리하였다. 상기 각각의 폴리머 표준을 메탄올 중의 50% THF에 56 mg/ml의 총농도로 용해하였다. 주입 부피는 20 FI이었다.

1e. LC에 의한 뉴클레오타이드의 분리:

Pd(A)₁₂₋₁₈ (물 중에 2.4 mg/ml)의 샘플을 완충액 A 중에서 1 ml/분의 유속에서 30%부터 60%까지의 완충액 B의 구배에 의해 분리하였다(A=20% 아세트니트릴과 80% 20 mmol/L의 소듐 포스페이트; B= A 중의 1 mol/L NaCl).

1f. 음이온 교환기를 이용한 LC에 의한 뉴클레오타이드의 분리:

완충액 A 중에서 0%부터 50%까지의 완충액 B의 구배에 의해 LC에 의한 특성 평가 방법 1에서와 같은 방법으로 각각의 AMP, ADP, 및 ATP 샘플 (각각이 물 중에 0.4, 0.8, 0.8 mg/ml)을 분리하였다.

(실시예 1)

액상 중합용 혼합물을 다음과 같이 제조하였다: 1.2 g의 글리시딜 메타크릴레이트(GMA), 0.80 g의 에틸렌 디메타크릴레이트(EDMA)(중합용 혼합물 1), 및 0.02 g의 2,2-아조비스이소부티로니트릴(AIBN)을 20 ml 용량의 바이알에 넣고 혼합한 다음, 얻어진 혼합물이 균질한 액상 혼합물이 될 때까지 적절히 진동(shaking)시켰다. 그런 다음, 상기 액상 혼합물에 2.55 g의 사이클로헥산올(CHOH) 및 0.45 g의 도데칸올(DODOH)을 부가한 다음, 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 진동시켰다. 이렇게 하여 얻어진 중합용 혼합물을 전술한 탈기 공정에서와 같은 방법으로 탈기시켰다.

가압 장치(도 4에 도시됨)에 의해 한쪽 단부가 실링(sealing)되어 있으며, 내부가 비어 있는 스테인리스 스틸 칼럼(내직경: 4.6 mm, 길이: 50 mm)에 상기 액상 혼합물을 가득히 충전하였다. 도 4에 도시된 칼럼의 원래의 캡인 스테인리스 스틸 스crew 캡 중에 포함된 PEEK 플러그를 이용하여, 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 실링하였다. 도 3의 장치는 시린지 펌프(syringe pump)에 연결되어 있다. 물을 매질로서 이용하여, 120 psi의 압력을 가하였다. 상기 칼럼 내부에는 공기가 존재하지 않는다. 상기 칼럼을 60℃의 온도에서 수직 방향으로 수조 내에 넣은 다음, 20시간 동안 두었다. 중합 반응 후, 상기 칼럼을 상기 수조로부터 빼내어, 실온으로 냉각시켰다.

압력을 해제한 후에, 상기 시린지 펌프로부터 도 3의 장치를 분리하였다. 도 3의 장치를 개방하여, 상기 칼럼으로부터 조심스럽게 제거하였다. 상기 칼럼 외부로 백색의 폴리머가 연장되어 있었다. 폴리머의 길이를 확인한 결과, 상기 칼럼 및 도 3의 장치 내부에 존재하는 상기 중합용 액상 혼합물의 높이보다 약 2 mm 짧았다. 레이저 블레이드를 이용하여, 연장된 폴리머 부분을 제거하였다. 그런 다음, 상기 칼럼에 원래의 HPLC 칼럼 피팅(fitting)을 장착하였다. 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 다음, 아세트니트릴을 이용하여, 45℃의 온도에서 0.5 ml/분의 속도로 20분간 세척하였다.

상기 칼럼의 한쪽 단부로부터 상기 피팅을 탈착한 다음, 아세토니트릴을 다른 쪽 단부로부터 상기 칼럼 내로 10 ml/분의 속도로 펌핑하여, 상기 칼럼으로부터 상기 매질을 가압하였다. 상기 폴리머 매질의 벽 표면은 평탄한 것으로 확인되었다. 상기 폴리머의 정상부는 평탄하였다.

(실시예 1의 비교예)

중합용 액상 혼합물을 다음과 같이 제조하였다: (1) 1.2 g의 글리시딜 메타크릴레이트(GMA), 0.80 g의 에틸렌 디메타크릴레이트(EDMA)(중합용 혼합물 1), 및 0.02 g의 2,2-아조비스이소부티로니트릴(AIBN)을 20 ml 용량의 바이알에 넣고 혼합한 다음, 얻어진 혼합물이 균질한 액상 혼합물이 될 때까지 적절히 진동(shaking)시켰다. (2) 상기 액상 혼합물에 2.55 g의 사이클로헥산올(CHOH) 및 0.45 g의 도데칸올(DODOH)을 부가한 다음, 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 진동시켰다. 이렇게 하여 얻어진 중합용 액상 혼합물을 전술한 탈기 공정에서와 같은 방법으로 탈기시켰다.

상기 칼럼의 원래의 캡인 스테인리스 스틸 스크류 캡 중에 포함된 PEEK 플러그를 이용하여, 내부가 비어 있는 스테인리스 스틸 칼럼(내직경: 4.6 mm, 길이: 50 mm)의 한쪽 단부를 실링하였다. 상기 칼럼에 상기 액상 혼합물을 가득히 충전하였다. 상기 칼럼의 정상부에 PEEK 플러그를 조심스럽게 둔 다음, 제2 스크류 캡을 이용하여 실링하였다. 상기 칼럼 내에는 공기가 존재하지 않아야 한다. 그런 다음, 상기 칼럼을 60°C의 온도에서 수직 방향으로 수조 내에 넣은 다음, 20시간 동안 두었다. 중합 반응 후, 상기 칼럼을 상기 수조로부터 빼내어, 실온으로 냉각시켰다.

상기 PEEK 플러그를 탈착한 후, 상기 칼럼 내에는 백색 폴리머가 관찰되었다. 상기 칼럼에 원래의 HPLC 칼럼 피팅을 장착하였다. 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 다음, 테트라하이드로퓨란(THF)을 이용하여, 0.5 ml/분의 속도로 20분간 세척하였다.

상기 칼럼의 한쪽 단부로부터 상기 피팅을 탈착한 다음, 아세토니트릴(ACN)을 10 ml/분의 속도로 다른 쪽 단부로부터 상기 칼럼 내로 펌핑하여, 상기 칼럼으로부터 상기 매질을 가압하였다. 상기 폴리머 매질의 벽 표면에서는 소형의 불규칙한 많은 압흔(dent)이 관찰되었다.

다른 모노머를 이용하여, 각각의 칼럼을 제조하였다. 상기 폴리머 로드(rod)의 벽 표면에서는 불규칙한 보이드가 관찰되었다. 도 7은 전술한 도 개의 로드, 및 가압 하에 제조된 하나의 로드를 촬영한 사진을 나타낸다.

(실시예 1의 다른 버전)

상이한 비율 및 상이한 조합의 관능성 모노머 및 가교제를 이용하여, 상이한 중합용 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 상기 관능성 모노머로서는, 글리시딜 메타크릴레이트(GMA), 2-하이드로에틸 메타크릴레이트(HEMA), 메틸 메타크릴레이트(MMA), 2-(아크릴로일옥시에틸)트리메틸암모늄 메틸 설페이트(ATMS), 아크릴산(AA), 2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판설폰산(AMPS), 스테아릴 메타크릴레이트(SMA), 라우릴 메타크릴레이트(LMA), 부틸 메타크릴레이트(BMA), 스티렌(ST), 및 4-에틸스티렌(EST)을 이용하였다. 또한, 상기 가교용 모노머(가교제)로서는, 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트(EDMA), 및 디비닐 벤젠(DVB)을 이용하였다. 본 실시예에서는 상기 관능성 모노머, 상기 가교용 모노머, 및 상기 포로젠의 비율을 다르게 하여 이용하였다. 상기 포로젠으로서, 사이클로헥산올, 도데칸올, 데칸올, 1-헥사데칸올, 부탄올, 프로판올, 이소-프로판올, 에탄올, 메탄올, 1,4-부탄디올과 같은 알코올, 그 밖에도, 톨루엔, N,N-디메틸 아세트아미드, 아세토니트릴, 1,2-디메톡시에탄, 1,2-디클로로에탄, 디메틸 프탈레이트, 2,2,4-트리메틸펜탄, 1,4-디옥산, 2-메틸옥시에탄올, 1,4-부탄디올, m-자일렌, 디이소부틸 프탈레이트, 테트라(에틸렌 글리콜) 디메틸 에테르, 테트라(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜)(F.W. 1000), 폴리(프로필렌 글리콜) 모노부틸 에테르(F.W. 340, 1000, 2500)가 포함된다. 본 실시예에서 이용되는 개시제로서는, 2,2'-아조비스이소부티로니트릴(AIBN) 및 벤조일 퍼옥사이드가 포함된다.

상기 모노머와 상기 포로젠의 다양한 조합에 따라, 칼럼을 제조한 다음, 검사하여, 그 특성을 평가하였다.

몇몇 칼럼의 경우에는 약간의 압력 조건 하에서 각각의 중합용 혼합물을 이용하여 제조되었다. 이 때의 압력 조건으로서는 (1) 중합하는 동안, 상기 칼럼을 대기중에 개방하는 조건, (2) 중합하는 동안, 상기 칼럼을 실링하는 조건, (3) 상기 중합용 혼합물에 직접 질소 가스를 적용하여, 상기 칼럼을 가압하는 조건, 및 (4) 상기 중합용 혼합물과 고무 피스톤, 플라스틱 피스톤, 및 금속 피스톤을 각각 접촉시킨 다음, 스프링, 수력압, 또는 가스 압력에 의해 가압하거나, 혹은 스프링과 같은 기계적인 힘을 이용하는 경우, 전술한 장치 또는 그의 변형된 장치를 이용하여 상기 피스톤을 하방으로 구동시킴으로써 가압하는 조건이 포함된다.

그 결과, (1) 대기압이 존재하는 경우에는 상기 칼럼에서 많은 표면이 불연속성(discontinuity)을 나타내었고, 칼럼의 효율 및 분해능에 있어서 재현성을 가지지 않았다. (2) 칼럼을 실링하여 가압한 경우, 상기 칼럼에서 많은 표면이 불연속성을 나타내었고, 칼럼의 효율 및 분해능에 있어서 재현성을 가지지 않았다. (3) 가스 압력을 이용하여 칼럼을 가압한 경우에는 상기 칼럼 정상부의 단부 표면은 연질의 불규칙한 성질을 나타내었으며, 벽 표면은 평탄하였다. 분리 크로마토그램에서는 양호한 재현성이 나타났다. (4) 피스톤을 이용한 경우, 재현성이 상당히 높게 나타났으며, 전술한 각각의 경우와 비교하여, 우수한 분해능이 얻어졌다.

(실시예 2)

2.0 g의 GMA, 2.5 g의 2-(아크릴로일옥시에틸)트리메틸암모늄 메틸 설페이트(ATMS, 80%), 6.0 g의 EDMA, 7.5 g의 1,4-부탄디올, 6.75 g의 프로판올, 0.75 g의 물, 및 0.1 g의 AIBN을 이용하여, 중합용 액상 혼합물을 실시예 1에서와 같이 제조하였다.

가압 장치(도 4에 도시됨)에 의해 한쪽 단부가 실링(sealing)되어 있으며, 내부가 비어 있는 유리 칼럼(내직경: 10 mm, 길이: 100 mm)에 상기 액상 혼합물을 가득히 충전하였다. 도 4에 도시된 바와 같은 PEEK 스크류 캡 중에 포함된 테플론 플러그를 이용하여, 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 실링하였다. 도 4의 장치는 시린지 펌프에 연결되어 있다. 상기 칼럼 내부에는 공기가 존재하지 않는다. 상기 칼럼을 60℃의 온도에서 수직 방향으로 수조 내에 넣은 다음, 15분간 동안 두었다. 매질로서 물을 이용한 시린지 펌프에 의해 상기 칼럼에 120 psi의 압력을 가한 다음, 20시간 동안 방치하였다. 중합 반응 후, 상기 칼럼을 상기 수조로부터 빼내어, 실온으로 냉각시켰다.

압력을 해제한 후에, 상기 시린지 펌프로부터 도 4의 장치를 분리하였다. 도 4의 장치를 개방하여, 상기 칼럼으로부터 조심스럽게 제거하였다. 폴리머 로드的高度를 확인한 결과, 상기 칼럼 내부에 존재하는 상기 중합용 액상 혼합물的高度보다 4 mm 짧았다. 상기 칼럼에 원래의 HPLC 칼럼 피팅을 장착하였다. 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 다음, 아세토니트릴을 이용하여, 45℃의 온도에서 2 ml/분의 속도로 20분간 세척하였다.

상기 칼럼의 한쪽 단부로부터 상기 피팅을 탈착한 다음, 아세토니트릴을 10 ml/분의 속도로 다른 쪽 단부로부터 상기 칼럼 내로 펌핑하여, 상기 칼럼으로부터 상기 매질을 가압하였다. 상기 폴리머 매질의 벽 표면은 평탄한 것으로 확인되었다. 상기 폴리머의 정상부는 평탄하였다.

(실시예 2의 다른 버전)

압력 및 가압 방법을 변화시켜, 실시예 2의 방법에 따라 수행하였다. 중합하는 동안에는 각각 다른 일정한 압력을 가하였다. 본 실시예에서 이용된 압력은 80 psi, 150 psi, 180 psi, 200 psi, 240 psi, 및 300 psi이다. 각각의 칼럼의 배압(back pressure)은 서로 다르다. 스캐닝 전자 현미경(SEM: scanning electron microscopy)을 이용하여 상기 폴리머의 구조를 분석한 결과, 상기 각각의 폴리머의 입자 크기 역시 다른 것으로 확인되었다.

중합하는 동안, 상기 중합용 혼합물에 단계적인 압력 구배를 형성하였다. 즉, 4 psi/분의 증가율로 10 psi에서부터 5분간 압력을 증가시킨 다음, 2 psi/분의 비율로 10분간, 1 psi/분의 비율로 20분간, 0.8 psi/분의 비율로 30분간 압력을 증가시킨 후, 1시간 이내에 180 psi의 압력이 되도록 압력을 증가시켰다. 중합을 수행하는 동안, 180 psi의 최종 압력을 20시간 동안 유지시켰다.

2시간 동안, 15 psi부터 180 psi까지의 선형 구배를 형성하여, 중합 초기 단계에서의 반응 수행 시, 압력을 가하였다. 그리고, 이후의 중합 반응에서도 18시간 동안 180 psi의 압력을 유지시켰다.

트리메틸아민 수용액 혼합물(50 부피%) 중에 0.45 g/ml의 트리메틸아민 하이드로클로라이드의 5 ml의 액상 혼합물을 펌핑함으로써, 각각의 칼럼을 모두 개질하였다. 상기 칼럼을 실링한 다음, 40℃의 수조에서 3시간 동안 가열하였다. 상기 각각의 칼럼을 개질한 직후, 상기 각각의 칼럼을 20 상부피(bed volume)의 물로 세척하였다. 그런 다음, 상기 각각의 칼럼을 전술한 바와 같은 방법으로, 상 안정화 및 컨디셔닝하였다. 이온 교환기에서 LC에 의한 특성 분석 방법을 이용하여, 상기 각각의 칼럼의 특성을 분석하였다. 상기 각각의 칼럼의 배압, 입자 크기, 및 분해능은 가압 방법에 따라 모두 다르게 나타났다.

또한, 본 실시예에서는 각각의 칼럼에 대해서 중합 시간을 다르게 적용하였다. 즉, 20시간 대신 44시간의 중합 동안 중합 반응을 수행한 것을 제외하고는 실시예 2에서와 동일한 방법으로 각각의 칼럼을 제조하였다.

1개의 압력 소스를 가지는 10개의 채널 매니폴드를 이용하여 10개의 병렬 칼럼을 제조하였다. 제조된 각각의 칼럼은 개별적인 칼럼 제조 공정에 비해서 우수한 재현성을 나타내었다.

SEM에 의해 폴리머 모폴로지, 및 입자의 내부 구조를 분석하였다. 그 결과, 종래 기술에 따르면, 모놀리스형 매질 중에서 다공질 구조를 가지는 데 반해, 상기 입자의 내부 구조는 비(非)다공질 구조를 가지는 것으로 확인되었다.

(실시예 3)

17.5 g의 DVB, 19.8 g의 테트라(에틸렌 글리콜), 10.2 g의 테트라(에틸렌 글리콜) 디메틸 에테르, 및 0.18 g의 AIBN을 이용하여, 실시예 1 및 실시예 2에서와 같은 방법에 따라 2개의 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼을 아세토니트릴로 세척한 다음, 15 ml/분의 유속에서 20 상부피의 물을 이용하여 다시 세척하였다. 상기 칼럼의 양 말단에, 상기 칼럼 내로 수동 조작형 피스톤을 압축하였다. 그런 다음, 0.15%의 트리플루오로아세트산을 포함하는 아세토니트릴을 이용하여 상기 각각의 칼럼을 세척한 후, LC 분석 방법 1a 및 1b에 따라, 상기 각각의 칼럼의 특성을 분석하였다. 이들 칼럼은 비교예 1의 칼럼과 비교할 때, 단백질 및 펩타이드 분리에 대한 분해능이 현저하게 향상되었다. 또한, 상기 각각의 칼럼의 용량은 비교예 1의 칼럼에 비해 5배 이상 증대되었다. 그리고, 상기 각각의 칼럼의 배압은 낮았다. 0.15% TFA를 포함하는 100% 물로부터 이동상 구배가 개시되는 경우, 고분해능이 얻어졌다. 상기 각각의 칼럼에서는 벽 효과가 관찰되지 않았다. 한편, 비교예에 따른 칼럼의 경우에는 수상에서의 벽 효과로 인해 단백질 및 펩타이드가 칼럼으로부터 미리 용출되었다.

(실시예의 비교 버전)

실시예 1의 비교예로서, 3 ml의 스티렌, 2 ml의 디비닐벤젠, 7.5 ml의 도데칸올, 및 0.5 g의 AIBN을 이용하여 중합용 액상 혼합물을 제조하였다. LC 분석 방법 1a 및 1b에 기재된 바와 같은 역상 단백질 및 펩타이드 분리에 따라서 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 3의 다른 버전)

실시예 3에서는 서로 다른 조합의 포로젠, 및 각각 상이한 탄소 사슬 길이를 가지는 각종 모노머를 이용하고, 총 모노머 함량, 및 개시제 및 수축 용매(shrinkage solvent)의 종류를 다르게 하여, 칼럼을 제조하였다.

본 실시예에 사용된 포로젠으로서는, C1 내지 C12의 알코올, N,N- 디메틸 아세트아미드, 아세토니트릴, 1,2-디메톡시에탄, 1,2-디클로로에탄, 디메틸 프탈레이트, 2,2,4-트리메틸펜탄, 1,4-디옥산, 2-메틸옥시에탄올, 1,4-부탄디올, 톨루엔, m-자일렌, 디이소부틸 프탈레이트, 테트라(에틸렌 글리콜) 디메틸 에테르, 테트라(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜) (F.W. 1000), 폴리(프로필렌 글리콜) 모노부틸 에테르(F.W. 340, 1000, 2500)가 포함된다. 또한, 이들 용매를 적절히 조합하여 이용함으로써, 고분해능 칼럼을 얻을 수 있다. 알코올 및 그의 조합을 이용하는 경우에는 낮은 배압으로 통과하는 이동상에 대한 높은 분해능을 제공하는 한편, 큰 채널을 제공할 수 있다. 이러한 분해능은 그 밖의 양호한 용매를 이용하여, 세부적으로 조정할 수도 있다.

본 실시예에 이용된 모노머로서는, 전술한 조합의 포로젠을 가지는 부틸 메타크릴레이트 및 스테아릴 메타크릴레이트가 포함된다. 본 실시예에서는 7 g의 SMA, 10.5 g의 DVB, 19.5 g의 에탄올, 13.0 g의 부탄올, 및 0.18 g의 AIBN을 구성 성분으로 하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 1개의 칼럼을 제조하였다. 또한, 7 g의 라우릴 메타크릴레이트(LMA), 1 g의 HEMA, 12 g의 EDMA, 30 g의 도데칸올, 및 0.2 g의 AIBN을 구성 성분으로 하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 또 다른 칼럼을 제조하였다. 또, 7 g의 부틸 메타크릴레이트(BMA), 1 g의 HEMA, 12 g의 EDMA, 3 g의 물, 16.5 g의 프로판올, 10.5 g의 1,4-부탄디올, 및 0.2 g의 AIBN을 구성 성분으로 하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 1개의 칼럼을 제조하였다. 각각 상이한 탄소 사슬 길이를 가지는 이들 모노머를 조합하여 이용함으로써, 각각 다른 소수성 및 상호 작용을 제공할 수 있으며, 각각 다른 소수성 및 특성을 가지는 샘플에 대한 고분해능 및 회수도를 제공할 수 있다. 예컨대, 소수성이 큰 단백질을 분리하는 경우에는 부틸 메타크릴레이트계 매질을 이용하고, 친수성이 큰 단백질, 펩타이드, 또는 올리고뉴클레오타이드를 분리하는 경우에는 스테아릴 메타크릴레이트계 매질을 이용한다.

모노머와 가교제의 비율을 다르게 하는 경우에도 상기 칼럼의 선택도 및 분해능을 조정할 수 있다. 1.05 g의 SMA, 0.7 g의 DVB, 3.25 g의 에탄올, 및 0.018 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

또한, 다른 종류의 개시제를 이용하여, 칼럼을 제조할 수도 있다. 10 ml의 디비닐벤젠(순도 80%), 30 ml의 도데칸올, 10 ml의 스티렌, 및 0.20 g의 벤조일 퍼옥사이드로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

아울러, 중합 시간을 다르게 하여, 칼럼을 제조할 수도 있다. 중합 시간을 20시간 대신 44시간으로 한 것을 제외하고는 실시예 3에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다.

가압 전에 상기 폴리머를 수축시키기 위해, 다른 종류의 극성 용매를 이용하였다. 실시예 3에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조한 다음, 물로 세척한 후, 20 상부피의 1 M NaCl을 이용하여 세척하였다. 얻어진 염을 세척한 다음, 상기 칼럼 내로 수동 조작형 피스톤을 이용하여 압력을 가하였다. 출발 이동상으로서 0.1 M의 NaH_2PO_4 (pH 4.0)를 이용한 경우, 상기 칼럼에서는 벽 효과가 관찰되지 않았다.

각각 다른 압력을 가한 경우, 상기 플러그를 중합한 다음, 수계 액상 혼합물의 존재 하에 가압하거나, 또는 가압하지 않은 경우, 각각 다른 세척용 액상 혼합물 및 각각 다른 촉매를 이용한 경우에 대해서, 전술한 실험을 반복 수행하였다. 전술한 각각의 실험에서, 압력을 가하지 않은 경우에는 외벽에 불연속성이 나타났으며, 특성 분석 시, 수계 액상 혼합물을 이용하여 세척함으로써 팽윤시킨 다음, 압력을 가하지 않은 경우에는 반복 가능성이 불량하였고, 크로마토그램의 피크가 적게 나타났다.

60 psi(pound per square inch), 120 psi 및 600 psi를 포함하는 고압 및 저압에서 테스트를 수행하였다. 상기 칼럼의 직경, 및 소정의 중합용 혼합물을 이용하여, 필요한 압력 수준을 다양하게 할 수 있지만, 모든 경우에 있어서는 대단히 낮은 압력 하에서 만족스런 결과가 얻어질 수 있다고 여겨진다. 적절한 압력의 상한은 상기 칼럼 벽 및 상기 피팅의 강도에 따라 정해진다.

또한, 가압 수준 역시 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포에 영향을 끼치므로, 분리에 효과적인 오프닝의 적절한 크기, 상기 분리에 유용한 오프닝의 크기 분포, 및 상기 칼럼의 재현성과 함께, 적절한 압력을 선택해야 한다.

(실시예 4)

9 g의 글리시딜 메타크릴레이트, 9 g의 에틸렌 디메타크릴레이트, 0.18 g, 21.6 g의 사이클로헥산올, 및 6.3 g의 도데칸올로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 2에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 상기 폴리머의 길이를 확인한 결과, 상기 칼럼 내부에 존재하는 상기 중합용 액상 혼합물의 높이보다 약 7 mm 짧았다. 확인 후, 상기 칼럼에 원래의 HPLC 칼럼 피팅(fitting)을 장착하였다. 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 다음, 아세토니트릴을 이용하여, 45℃의 온도에서 4 ml/분의 속도로 20분간 세척하였다. 상기 칼럼을 다음과 같이 개질하였다:

570 mg의 트리메틸아민 하이드로클로라이드, 24 ml의 디에틸아민, 및 6 ml의 물을 포함하는 액상 혼합물을 2 ml/분의 속도로 18분간 상기 각각의 칼럼에 펌핑하였다. 그런 다음, 상기 각각의 칼럼을 30℃의 온도에서 수조 내에 3시간 동안 두었다. 상기 각각의 칼럼을 100 ml의 물로 세척하였다. 그런 다음, 상기 각각의 칼럼을 0.01 몰/L 트리스 HCl 완충액을 이용하여, pH 7.6에서 4 ml/분의 속도로 30분간 더 세척하였다. 전술한 안정화 및 컨디셔닝 방법에 따라 상기 각각의 칼럼을 안정화 및 컨디셔닝하였다. 세척 후, 상기 원래의 칼럼 피팅으로부터 상기 피스톤을 완전히 압축시켰다. 상기 칼럼의 배압은 상기 완충액 중, 10 ml/분의 속도에서 약 360 psi이었다. 전술한 LC 분석 방법에 의해 상기 칼럼의 특성을 확인하였다.

(실시예 5)

1 g의 스티렌, 1 g의 디비닐벤젠(DVB)(80% 디비닐 벤젠 및 20% 에틸스티렌(EST)), 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN을 혼합하여, 중합용 액상 혼합물을 제조하였다.

얻어진 액상 혼합물을 N_2 퍼징(purging)에 의해 탈기한 다음, 칼럼 피팅에서부터 상기 스크류 캡의 내부에 존재하는 PEEK 플러그에 의해 한쪽 단부가 실링된 스테인리스 스틸 칼럼(50×4.6 mm i.d.)에 충전하였다. 상기 칼럼의 다른 쪽 단부는 또 다른 PEEK 플러그로 실링되어 있다. 상기 혼합물을 수조 내, 70℃의 온도에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼에 원래의 칼럼 피팅을 장착한 다음, 1 ml/분의 유속으로 THF를 이용하여 10분간 세척한 후, 상기 칼럼을 단백질의 분리에 사용하였다. 상기 칼럼의 배압은 10 ml/분의 유속에서 약 230 psi이었다. 상기 폴리머는 10 ml/분의 아세토니트릴에서 약 2.9 mm가 압축되었다. 전술한 LC 분석 방법 1a 및 1b에 따라, 상기 칼럼을 역상 단백질 및 펩타이드의 분리에 이용하였다.

(실시예 5의 다른 버전)

총 모노머 함량이 더 큰 것을 제외하고는, 실시예 5에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 본 실시예의 중합용 액상 혼합물은 1.2 g의 스티렌, 1.2 g의 디비닐벤젠, 2.6 g의 도데칸올, 및 0.024 g의 AIBN을 포함한다. 상기 칼럼의 배압은 10 ml/분의 아세토니트릴에서 약 220 psi이고, 상기 폴리머는 0.9 mm만이 압축되었다. 이로써, 총 모노머 함량이 큰 경우에는 상기 칼럼이 거의 압축되지 않는다.

또한, 직경이 각각 22 mm, 15 mm, 10 mm, 8 mm, 2.1 mm, 1 mm, 542 μ m, 및 320 μ m인 각각의 칼럼을 실시예 4와 같은 방법으로 제조하였다. 아울러, 10 mm $\times$ 2.1 mm i.d.의 크기를 가지는 짧은 칼럼 역시 제조하였다. LC 분석 방법에 따르되, 상기 칼럼의 직경에 상응하는 동일 유속에서 상기 각각의 칼럼의 역상 단백질 분리 시의 특성에 대해 확인하였다. 각각 다른 직경을 가지는 칼럼에는 "인-시튜중합 방법"을 적용할 수 있다. 특히, 이러한 중합 방법은 별도의 충전 단계를 수행할 필요가 없기 때문에, 작은 직경을 가지는 칼럼, 또는 마이크로유체 채널에 적용하기에 적합하다.

(실시예 6)

실시예 5의 제조 방법에 따라 칼럼을 제조하였다.

제조된 칼럼에, 피스톤을 포함하는 원래의 칼럼 피팅을 장착한 다음, 1 ml/분의 유속에서 10분간 아세토니트릴을 이용하여 세척하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 물로 10분간 더 세척하였다. 상기 칼럼의 양쪽 단부에 존재하는 각각의 피스톤을 상기 칼럼 내로 압축시켰다. LC 분석 방법에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 상기 피스톤에 의한 수중에서의 상기 폴리머의 압축, 및 압축 후에 상기 피스톤에 의해 압축성이 유지되기 때문에, 수중에서의 폴리머 수축을 야기하는 벽 효과가 얻어지지 않았다.

(실시예 6의 다른 버전)

1.8 g의 디비닐벤젠, 0.2 g의 스티렌, 2.3375 g의 도데칸올, 0.6625 g의 톨루엔, 0.02 g의 AIBN, 및 3.0 g의 도데칸올로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 5와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 흡인기를 이용하여 5분간 진공을 가함으로써 상기 모든 반응 성분들을 탈기한 다음, 헬륨으로 20분간 퍼징한 후에, 상기 무게를 칭량하였다. 스크류 캡에 수용된 PEEK 플러그에 의해 한쪽 단부가 실링된 스테인리스 스틸 칼럼(50 $\times$ 4.6 mm i.d.)에 상기 중합용 액상 혼합물을 충전하였다. 상기 칼럼의 다른 쪽 단부는 제2 PEEK 플러그로 실링되어 있다. 상기 혼합물을 수조 내, 66 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼에, 피스톤을 포함하는 원래의 칼럼 피팅을 장착한 다음, 1 ml/분의 유속에서 아세토니트릴을 이용하여 10분간 세척하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 물로 10분간 더 세척하였다. 상기 양쪽 단부의 피스톤을 칼럼 내로 압축시켰다. LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 고함량의 가교제를 이용하는 경우, 상기 칼럼의 용량이 향상되었다. 본 실시예의 칼럼은 실시예 6에서 제조된 몇몇 칼럼에 비해 3배 이상의 용량을 가진다.

한편, 10 ml의 디비닐벤젠(순도 80%), 10 ml의 스티렌, 및 0.20 g의 벤조일 퍼옥사이드로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 다른 칼럼을 제조하였다.

먼저, 칼럼을 20분간 N₂에 의해 퍼징하였다. 스크류 캡에 수용된 PEEK 플러그에 의해 한쪽 단부가 실링된 스테인리스 스틸 칼럼(50 $\times$ 4.6 mm i.d.)에 상기 중합용 액상 혼합물을 충전하였다. 상기 칼럼의 다른 쪽 단부는 제2 PEEK 플러그로 실링되어 있다. 상기 혼합물을 수조 내, 70 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼에 원래의 칼럼 피팅을 장착한 다음, 1 ml/분의 유속에서 테트라하이드로퓨란을 이용하여 10분간 세척하였다. 그런 다음, LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 역상 단백질 및 펩타이드 분리함으로써, 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 벤조일과 같은 각종 개시제 역시, 상기 모놀리스형 매질의 제조에 적합하다.

직경 크기가 보다 작은 스테인리스 스틸 칼럼(50 $\times$ 2.1 mm i.d.), 및 PEEK 칼럼(50 $\times$ 4.6 mm i.d.)을 제조한 다음, 전술한 실시예에서와 같이 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 7)

디비닐벤젠, 0.2 g의 하이드록시에틸메타크릴레이트, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 6에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 상기 액상 혼합물을 수조 내, 70 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼에,

피스톤을 포함하는 원래의 칼럼 피팅을 장착하였다. 그런 다음, 1 ml/분의 유속에서 아세토니트릴을 이용하여 10분간 세척한 후, 물, 및 0.01 몰/L 트리스 HCl 완충액(pH 7.6) 중의 0.5 몰/L의 NaCl을 이용하여 더 세척하였다. LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 역상 단백질 분리함으로써, 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 7의 다른 버전)

상기 하이드록시에틸메타크릴레이트의 중량을 0.4 g으로, 그리고 상기 디비닐벤젠의 중량을 1.6 g으로 변경한 것을 제외하고는, 실시예 7에서와 같은 방법에 따라 칼럼을 제조하고, 그의 특성을 분석하였다.

또한, 상기 하이드록시에틸메타크릴레이트의 중량을 1 g으로, 그리고 상기 디비닐벤젠의 중량을 1 g으로 변경한 것을 제외하고는, 실시예 7에서와 같은 방법에 따라 또 다른 칼럼을 제조하고, 그의 특성을 분석하였다.

아울러, 1.8 g의 디비닐벤젠, 0.16 g의 스티렌, 0.04 g의 하이드록시에틸메타크릴레이트, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 7에서와 같은 방법에 따라 칼럼을 제조하였다.

중합 후, 상기 칼럼에, 피스톤을 포함하는 원래의 칼럼 피팅을 장착하였다. 그런 다음, 1 ml/분의 유속에서 아세토니트릴을 이용하여 10분간 세척한 후, 물, 및 0.01 몰/L 트리스 HCl 완충액(pH 7.6) 중의 0.5 몰/L의 NaCl을 이용하여 더 세척하였다. 얻어진 칼럼을 피스톤으로 압축한 다음, LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 단백질 및 펩타이드를 역상 분리함으로써, 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 8)

내부가 비어 있는 시린지 배럴(70×12 mm i.d. Combiflash chromatography용 Redisep 배럴, 미국 68504 네브라스카주 링컨 서피어리어 스트리트 4700에 소재하는 Isco, Inc.에서 제조)의 한쪽 단부를 실링한 다음, N₂를 이용하여 20분간 탈기 한 후, 1.6 g의 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 6.4 g의 디비닐벤젠, 89 mg의 AIBN, 12 g의 도데칸올로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 상기 칼럼에 충전하였다. 상기 배럴의 팁을 블록화된 니들(blocked needle)로 실링하였다. 그런 다음, 상기 배럴을 수조 내, 70℃에서 24시간 동안 가열하였다. 상기 배럴을 HPLC 펌프에 연결한 후, 유속 1 ml/분에서 THF를 이용하여 30분간 세척하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 이용하여, 페놀 화합물의 정상상(normal phase) 및 역상 분리를 수행하였다.

(실시예 9)

중합용 액상 혼합물을 다음과 같이 제조하였다: (1) 1 g의 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 1 g의 에틸렌 디메타크릴레이트, 및 0.02 g의 AIBN을 각각 칭량한 다음, 20 ml 용량의 바이알에 넣은 다음, 균질한 액상 혼합물이 얻어질 때까지, 적절히 진동시켰다. (2) 상기 액상 혼합물에 1 g의 사이클로헥산을 및 2 g의 도데칸올을 부가한 다음, 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 진동시켰다. 흡인기를 이용하여 5분간 진공을 가함으로서, 상기 모든 반응 성분들을 탈기한 다음, 헬륨을 이용하여 20분간 퍼징한 다음, 칭량하였다.

가압 장치(도 4에 도시됨)에 의해 한쪽 단부가 실링되어 있으며, 내부가 비어 있는 스테인리스 스틸 칼럼(내직경: 4.6 mm, 길이: 50 mm)에 상기 액상 혼합물을 가득히 충전하였다. 그런 다음, 스테인리스 스틸 스크류 캡 중에 수용된 PEEK 플러그(상기 칼럼의 원래 캡이었음)를 이용하여, 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 실링하였다. 도 4의 장치는 시린지 펌프에 연결되어 있다. 물을 매질로서 이용하여, 120 psi의 압력을 가하였다. 상기 칼럼 내부에는 공기가 존재하지 않는다. 상기 칼럼을 60℃의 온도에서 수직 방향으로 수조 내에 넣은 다음, 20시간 동안 두었다. 중합 반응 후, 상기 칼럼을 상기 수조로부터 빼내어, 실온으로 냉각시켰다. 그런 다음, 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 후, 0.5 ml/분의 유속으로 20분간 건조 THF(본 자 체에 의해 건조됨)를 이용하여 세척하였다. 상기 칼럼을 약물의 정상상 분리용으로서 이용하였다.

(실시예 9의 다른 버전)

0.5 g의 GMA, 0.5 g의 HEMA, 1 g의 EDMA, 1.8 g의 사이클로헥산을, 1.2 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 9에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다.

상기 칼럼을, 0.5 ml/분의 유속으로 THF를 이용하여 20분간 세척한 다음, 물로 세척하였다. 상기 칼럼에, 물 중의 1.0 몰/L의 황산 10 ml를 펌핑하였다. 상기 칼럼을 칼럼 플러그로 실링한 다음, 수조 내, 80℃의 온도에서 3시간 동안 두었다. 그런 다음, 전술한 변경 반응을 수행한 후, 상기 칼럼을 20 ml의 물로 세척한 다음, 건조 THF를 이용하여 다시 세척한 후, 정상상 분리를 수행하여 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

한편, 1 g의 글리시딜 메타크릴레이트, 1 g의 에틸렌 디메타크릴레이트, 2.4 g의 사이클로헥산올, 0.6 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

제조된 칼럼을, 0.5 ml/분의 유속으로 THF를 이용하여 20분간 세척한 다음, 물로 세척하였다. 상기 칼럼에, 물 중의 1.0 몰/L의 황산 10 ml를 펌핑하였다. 상기 칼럼을 칼럼 플러그로 실링한 다음, 수조 내, 80℃의 온도에서 3시간 동안 두었다. 그런 다음, 전술한 변경 반응을 수행한 후, 상기 칼럼을 20 ml의 물로 세척한 다음, 건조 THF를 이용하여 다시 세척한 후, 정상상 분리를 수행하여 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 10)

0.7 g의 라우릴 메타크릴레이트(LMA), 0.1 g의 HEMA, 1.2 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 3과 같은 방법으로 스테인리스 스틸 칼럼(50×4.6 mm i.d.)을 제조하였다.

(실시예 10의 다른 버전)

0.8 g의 라우릴 메타크릴레이트(LMA), 1.2 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다. 또한, SMA/DVB 비가 10/90이 되도록, 0.175 g의 스테아릴 메타크릴레이트(SMA), 1.575 g의 DVB (순도 80%), 3.25 g의 1-헥사데칸올, 및 0.018 mg의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 또 다른 칼럼을 제조하였다. 아울러, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 3.25 g의 옥탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

또한, SMA/DVB 비가 60/40이 되도록, 1.05 g의 SMA, 0.7 g의 DVB, 3.25 g의 에탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

아울러, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 1.95 g의 에탄올, 1.30 g의 부탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

아울러, 테트라데칸올, 데칸올, 옥탄올, 헥산올, 부탄올, 프로판올, 에탄올, 및 메탄올, 및 이들의 조합을 포로젠계 용매로서 이용하여, 전술한 방법에서와 같이 복수의 칼럼을 제조하였다.

또한, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 2.925 g의 에탄올, 0.33 g의 메탄올, 0.33 g의 이소프로판올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

또, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 2.6 g의 에탄올, 0.33 g의 메탄올, 0.33 g의 프로판올, 0.33 g의 부탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

아울러, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 2.762 g의 에탄올, 0.33 g의 메탄올, 0.33 g의 프로판올, 0.33 g의 부탄올, 0.33 g의 헥산올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

또한, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 0.7 g의 SMA, 1.05 g의 DVB, 2.435 g의 에탄올, 0.33 g의 메탄올, 0.33 g의 프로판올, 0.33 g의 부탄올, 0.33 g의 헥산올, 0.33 g의 옥탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

또, SMA/DVB 비가 40/60이 되도록, 1.05 g의 DVB, 3.08 g의 에탄올, 0.016 g의 에틸 에스테르, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다.

아울러, 1.75 g의 DVB, 3.25 g의 도데칸올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼을 실시예 10의 제1 버전에서와 같은 펩타이드 분리용으로서 이용하였다. C1 내지 C12 알코올을 가지는 일련의 칼럼을 전술한 방법으로 제조한 다음, 펩타이드 분리에 이용하여 특성을 분석하였다.

또한, 상기 프로젠으로서, 상기 도데칸올 대신에, 이소-프로판올, N,N-디메틸 아세트아미드, 디메틸 아세트아미드, 아세토니트릴, 1,2-디메톡시에탄, 1,2-디클로로에탄, 디메틸 프탈레이트, 2,2,4-트리메틸펜탄, 1,4-디옥산, 2-메틸옥시에탄올, 1,4-부탄디올, 톨루엔, m-자일렌, 디이소부틸 프탈레이트, 테트라(에틸렌 글리콜) 디메틸 에테르, 테트라(에틸렌 글리콜), 폴리(프로필렌 글리콜)(F.W. 1000), 폴리(프로필렌 글리콜) 모노부틸 에테르(F.W. 340, 1000, 2500)를 이용하여, 전술한 방법에서와 같이 일련의 칼럼을 제조하였다.

아울러, 1.75 g의 DVB, 2.925 g의 이소프로판올, 0.325 g의 1,4-부탄디올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또한, 1.75 g의 DVB, 2.275 g의 이소프로판올, 0.975 g의 2-메틸옥시에탄올, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또, 1.75 g의 DVB, 2.60 g의 이소프로판올, 0.65 g의 디메틸 프탈레이트, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또한, 1.75 g의 DVB, 2.7 g의 테트라에틸렌 글리콜, 0.3 g의 디에틸렌 글리콜, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

아울러, 1.75 g의 DVB, 2.7 g의 테트라(에틸렌 글리콜), 0.3 g의 글리세롤, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또, 1.75 g의 DVB, 1.98 g의 테트라(에틸렌 글리콜), 1.02 g의 테트라(에틸렌 글리콜)디메틸 에테르, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또한, 1.75 g의 DVB, 1.98 g의 테트라(에틸렌 글리콜), 1.02 g의 테트라(에틸렌 글리콜)디메틸 에테르, 및 0.018 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

(실시예 11)

1 g의 메틸 메타크릴레이트(MMA), 1 g의 EDMA, 1.8 g의 사이클로헥산올, 1.2 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 1에서와 같은 방법에 따라 칼럼(50×4.6 mm i.d. 스테인리스 스틸, 즉, 길이가 50 mm이고, 내직경이 4.6 mm임)을 제조하였다. 그런 다음, 제조된 칼럼에 HPLC 펌프를 연결한 후, THF, 및 물을 순차적으로 이용하여, 0.5 ml/분의 유속에서 20분간 세척하였다.

그런 다음, 상기 칼럼 내에서 다음과 같은 가수분해 반응을 수행하였다: (1) 6 몰/L의 NaOH 2 ml를 0.5 ml/분의 유속으로 상기 칼럼에 펌핑한 다음, (2) 2개의 칼럼 플러그로 상기 칼럼을 실링한 후, 수조 내, 80°C의 온도에서 1시간 동안 두었다. 20 ml의 물을 이용하여 0.5 ml/분의 유속에서 상기 칼럼을 세척한 후, LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 단백질 분리 및 결합 용량 측정을 수행함으로써, 특성을 분석하였다.

(실시예 11의 다른 버전)

0.1 g의 아크릴산(AA), 0.9 g의 메틸 메타크릴레이트(MMA), 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 11에서와 같이 칼럼을 제조하였다. 그리고, 가수분해 반응 전, 및 가수분해 반응 후에 각각 상기 칼럼의 용량을 측정하였다. 그 결과, 가수분해 반응 전의 상기 칼럼의 용량은 칼럼 부피 1 ml 당 약 10 mg 라이소자임이었다. 한편, 가수분해 반응 후의 상기 칼럼의 용량은 약 30 mg이었다.

또한, 0.2 g의 AA, 0.8 g의 MMA, 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 11에서와 같이 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼의 용량을 특성 분석 방법 11에 따라 측정하였다. 가수분해 반응 전의 상기 칼럼의 용량은 칼럼 부피 1 ml 당 약 27 mg 라이소자임이었다. 한편, 가수분해 반응 후의 상기 칼럼의 용량은 약 50 mg이었다.

아울러, 0.3 g의 AA, 0.7 g의 MMA, 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 11에서와 같이 칼럼을 제조하였다. 그리고, 가수분해 반응 전, 및 가수분해 반응 후에 각각 상기 칼럼의 용량을 측정하였다. 가수분해 반응 전의 상기 칼럼의 용량은 칼럼 부피 1 ml 당 약 43 mg 라이소자임이었다. 한편, 가수분해 반응 후의 상기 칼럼의 용량은 60 mg보다 큰 값이었다.

또한, 0.4 g의 AA, 0.6 g의 MMA, 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

아울러, 0.1 g의 AA, 0.9 g의 tert-부틸 아크릴레이트, 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또, 0.3 g의 AA, 0.3 g의 MMA, 1.4 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

아울러, 0.2 g의 AA, 0.7 g의 MMA, 0.1 g의 HEMA, 1 g의 EDMA, 2.85 g의 도데칸올, 0.15 g의 사이클로헥산을, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다. 또한, 0.4 g의 AA, 1.6 g의 DVB, 3-도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또한, 1 g의 GMA, 1 g의 EDMA, 2.4 g의 사이클로헥산을, 0.6 g의 도데칸올, 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼 내에서 실시예 9의 다른 버전에서와 같이, 산 촉매의 존재 하에 개환 반응을 수행한 다음, 실시예 11에서와 같이, 염기 촉매의 존재 하에 가수분해 반응을 수행하였다.

아울러, 0.5 g의 GMA, 0.5 g의 HEMA, 1 g의 EDMA, 1.8 g의 사이클로헥산을, 1.2 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다.

또한, 0.2 g의 AA, 0.6 g의 MMA, 0.2 g의 GMA, 1 g의 EDMA, 3 g의 도데칸올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다. 전술한 바와 같이, 제조된 칼럼 내에서 산 촉매의 존재 하에 개환 반응을 수행한 다음, 염기 촉매의 존재 하에 가수분해 반응을 수행하였다. 그런 다음, 5M의 NaOH 중의 0.25M의 소듐 클로로아세테이트를 포함하는 액상 혼합물을 이용하여, 60℃에서 6시간 동안 가수분해하였다.

아울러, 0.2 g의 AA, 0.5 g의 MMA, 0.1 g의 GMA, 1.2 g의 EDMA, 2.55 g의 도데칸올, 0.45 g의 사이클로헥산을, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 바와 같이 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼 내에서, 5M의 NaOH 중의 0.25M의 소듐 클로로아세테이트를 이용하여, 60℃에서 6시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다.

전술한 바와 같이 제조된 각각의 칼럼에 대해 상 안정화 및 압축 방법(Bed Stabilization and Compression Method)에 따라 수행한 다음, 전술한 바와 같이 LC 특성 분석 방법에 따라 단백질 분리 및 결합 용량 측정을 수행함으로써, 상기 각각의 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 12)

3 g의 GMA, 3 g의 EDMA, 6.9 g의 사이클로헥산을, 2.1 g의 도데칸올, 및 0.06 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 1에서와 같은 방법으로 칼럼(PEEK 라인을 가지는 스테인리스 스틸, 50 × 4.6 mm ID)을 제조하였다.

제조된 칼럼을 산성 조건 하에 개환 반응시킴으로써, 개질하였다. 물과 0.5 M 황산의 액상 혼합물 5 상부피를 상기 칼럼 내로 펌핑하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 실링한 후, 수조 내, 50℃의 온도에서 4시간 동안 가열하였다. 상기 칼럼을 개질한 후, 20 상부피의 물을 이용하여 상기 칼럼을 세척하였다.

그런 다음, 상기 칼럼을 에테르화 반응시키면서 다시 개질하였다. 20 g의 소듐 클로로아세테이트, 20 g의 NaOH, 및 64 ml의 물을 포함하는 액상 혼합물 5 상부피를 상기 칼럼 내에 펌핑하였다. 상기 칼럼을 칼럼 플러그로 실링한 다음, 수조 내, 60℃에서 2.5시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 물로 세척한 후, 전술한 안정화 및 컨디셔닝 방법에 따라서 안정화 및 컨디셔닝하였다. 전술한 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 12의 다른 버전)

본 실시예에서는 다른 개질 방법에 따라 개질한 것을 제외하고는 실시예 12와 동일하게 수행하여, 복수의 칼럼을 제조하였다.

즉, 실시예 12에서와 같은 방법으로 제조된 칼럼을, 물과 6 몰/L 글리콜산 및 0.5 M TFI로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여 3시간 동안 개환 반응을 수행함으로써, 개질시켰다.

또 다른 칼럼을 전술한 바와 같이 개환 반응시킨 다음, 60℃에서, 5 M의 NaOH 액상 혼합물 중에서 2.5시간 동안 가수분해함으로써 개질시켰다.

또한, 다른 칼럼을, 40 g의 글리콜산, 및 0.5 M의 트리플루오로아세트산(TFA) 60 ml를 포함하는 액상 혼합물을 이용하여, 2시간 동안 개환 반응시킴으로써 개질하였다. 그런 다음, 20 g의 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 및 5M의 NaOH 60 ml를 포함하는 액상 혼합물을 이용하여 3시간 동안 더 개질시켰다.

(실시예 13)

12 g의 AA, 30 g의 MMA, 6 g의 GMA, 72 g의 EDMA, 27 g의 사이클로헥산을, 153 g의 도데칸올, 및 1.2 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 2에서와 같은 방법으로 30개의 칼럼을 각각 제조하였다. 상기 각각의 칼럼의 제조 시, 중합하는 동안 120 psi의 압력을 가하기 위한 하나의 시린지 펌프에 연결된 3개의 매니폴드를 이용하여, 병렬 합성(parallel synthesis)에 의해 동시에 제조하였다. 중합 후, 시린지 피스톤(약 9 mm i.d.)을 이용하여, 상기 칼럼으로부터 폴리머를 배출시켜, 이후 단계에서 이들 폴리머를 이용하였다.

전술한 바와 같이 얻어진 폴리머 로드 중 하나를 약 8 mm의 직경을 가지는 소형의 폴리머로 조정하였다. 그런 다음, 두께가 1 cm인 복수의 디스크로 절단하였다. 이들 디스크를 제2 단계 중합용 충전재로서 이용하여, 다른 칼럼을 하나 더 제조하였다. 1.8 ml의 액상 혼합물을 유리 칼럼(100×10 mm i.d.)에 충전한 후, 상기 칼럼의 한쪽 단부를 도 3에 도시된 가압 장치를 이용하여 실링하였다. 그런 다음, 상기 칼럼에 상기 폴리머 디스크 6개를 하나씩 충전하였다. 이 때, 상기 각각의 디스크가 상기 액상 혼합물 중에 침적되도록 충전하였다. 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 테플론 스톱퍼로 실링하였다. 상기 가압 장치를 시린지 펌프에 연결하였으며, 상기 시린지 펌프는 상기 중합용 액상 혼합물에 120 psi의 일정한 압력을 가하기 위해 이용된다. 상기 칼럼을 수조 내, 60℃의 온도에서 20시간 동안 가열하였다. 중합 후, 상기 수조에서 상기 칼럼을 꺼내었다. 압력을 해제한 다음, 상기 시린지 펌프로부터 상기 가압 장치를 탈착하였다. 상기 가압 장치를 개방한 후, 상기 칼럼을 따뜻한 온도로 유지시키면서, 상기 칼럼으로부터 상기 가압 장치를 서서히 제거하였다. 그런 다음, 20 상부피의 아세트 니트릴, 및 물을 순차적으로 이용하여, 1 ml/분의 유속에서 상기 칼럼을 세척하였다. 전술한 안정화 및 컨디셔닝 방법에 따라, 상기 칼럼을 안정화 및 컨디셔닝하였다. 5M의 NaOH 중의 0.25 몰/L의 소듐 클로로아세테이트를 이용하여, 60℃에서 6시간 동안 상기 칼럼을 개질하였다. 그런 다음, LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 13의 다른 실시예)

충전재로서 상기 폴리머 로드를 이용하여, 전술한 2단계 중합 방법에 따라서 또 다른 칼럼(100 mm × 35 mm ID, 유리)을 제조하였다. 상기 칼럼의 한쪽 단부를 테플론 플러그로 실링하였다. 그리고, 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 N_2 탱크에 연결하였다. 그런 다음, 60℃의 온도, 120 psi의 압력 조건 하에 20시간 동안 중합 반응을 수행하였다.

(실시예 14)

8 g의 아크릴산, 20 g의 메틸 메타크릴레이트, 4 g의 글리시딜 메타크릴레이트, 48 g의 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 102 g의 도데칸올, 18 g의 사이클로헥산을, 및 0.8 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 길이가 짧은 8개의 폴리머 로드(10 mm × 34 mm ID)를 제조하였다. 상기 각각의 폴리머 로드의 제조는 120 psi의 N_2 압력 하에서 수행되었

다. 제조된 각각의 폴리머 로드들, 실시예 12에 따른 2단계 중합 방법에 의한 대직경의 롱 칼럼(long diameter long column) 제조용 충전재로서 이용하였다. 유리 칼럼(100 mm × 35 mm ID)에 상기 쇼트 칼럼을 충전한 다음, 전술한 바와 같은 중합 반응을 수행하였다. 상기 칼럼의 한쪽 단부를 테플론 플러그로 실링하고, 다른 쪽 단부는 N₂ 탱크에 연결하였다. 상기 중합 반응을 60℃의 온도, 및 120 psi의 압력 하에 20시간 동안 수행하였다. 그런 다음, 상기 칼럼을 20 상부피의 아세토니트릴 및 물로 세척하였다. 상기 칼럼 내에서, 5M의 NaOH 중의 0.25M의 소듐 클로로아세테이트를 이용하여, 60℃에서 6시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 그런 다음, 전술한 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 15)

4 g의 GMA, 4 g의 EDMA, 2.8 g의 도데칸올, 9.2 g의 사이클로헥산올, 및 0.08 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 1에서와 같은 방법으로 칼럼(PEEK 라인을 가지는 스테인리스 스틸, 50 mm × 4.6 mm ID)을 제조하였다.

제조된 칼럼 내에서, 1M의 H₂SO₄ 액상 혼합물을 이용하여 40℃에서 3시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 가수분해 후, DMSO 중의 5%의 소듐 t-부톡사이드 액상 혼합물 5 상부피를 상기 칼럼에 펌핑함으로써, 상기 칼럼을 활성화시킨 다음, 수조 내, 90℃의 온도에서 1시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 20%의 상기 활성화 액상 혼합물, 및 80%의 부탄 설통을 포함하는 액상 혼합물을 이용하여, 80℃에서 20시간 동안 개질하였다.

(실시예 15의 다른 버전)

상기 부탄 설통 대신에, 프로판 설통을 이용한 것을 제외하고는 실시예 15에서와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다.

또한, 상기 개질 및 활성화 온도를 90℃ 대신에 120℃로 하고, 오일 배스(oil bath) 중에서 수행한 것을 제외하고는 실시예 15에서와 동일한 방법으로 또 다른 칼럼을 제조하였다.

아울러, 4 g의 HEMA, 4 g의 EDMA, 9.4 g의 도데칸올, 2.6 g의 사이클로헥산올, 및 0.08 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 15에서와 같은 방법으로 또 다른 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼을 실시예 15와 같은 방법으로 개질하였다.

또한, 0.55 g의 GMA, 1.2 g의 EDMA, 0.25 g의 2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판설통산(AMPS), 0.48 g의 NaOH, 0.5 g의 물, 1.86 g의 프로판올, 0.64 g의 부탄디올, 및 0.02 g의 AIBN으로 이루어진 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 1과 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다.

한편, 전술한 바와 같은 AMPS 직접 공중합에 의해 다른 칼럼을 제조한 다음, 실시예 15와 같은 방법으로 더 개질하였다.

제조된 각각의 칼럼에 대해서 전술한 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라, 강한 양이온 교환 단백질 분리, 및 결합 용량을 측정함으로써, 상기 각각의 칼럼의 특성을 분석하였다.

(실시예 16)

45 ml의 테트라메톡시실란, 0.01 몰/L의 아세트산 수용액 100 ml, 9 g의 요소, 및 11.5 g의 폴리(에틸렌 옥사이드) (M.W. 10,000)로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 1과 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 본 실시예에서는 아이스 배스(ice bath) 중에서 상기 혼합물을 30분간 교반함으로써, 상기 액상 혼합물을 얻었다. 그런 다음, 상기 칼럼 내에서, 40℃의 온도, 600 psi의 압력 하에 24시간 동안 중합 반응을 수행하였다. 상기 칼럼을 20 ml의 물을 이용하여 0.5 ml/분의 유속에서 세척한 후, 0.01 몰/L의 수성 암모늄 하이드록사이드 액상 혼합물 5 ml를 상기 칼럼 내에 펌핑하였다. 상기 칼럼을 실링한 다음, 120℃에서 3시간 동안 방치한 후, 에탄올로 세척하였다.

(실시예 17)

증류 또는 정상상 크로마토그래피에 의해 모노머로부터 메틸 에테르 하이드로퀴논 또는 tert-부틸카테콜과 같은 개시제를 제거한 다음, 이용하였다.

240 mg의 p-테르페닐, 800 mg의 AIBN, 16 g의 스티렌, 16 g의 디비닐벤젠(80%), 26.4 g의 미네랄 오일, 및 21.6 g의 2-에틸헥산산으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 같은 방법으로 중합용 액상 혼합물을 제조하였다.

가압 장치(도 4에 도시됨)에 의해 한쪽 단부가 실링되어 있으며, 내부가 비어 있는 유리 칼럼(내직경: 10 mm, 및 길이: 100 mm)에 상기 액상 혼합물을 가득히 충전하였다. 도 4에 도시된 PEEK 스크류 캡 중에 수용된 테플론 플러그를 이용하여, 상기 칼럼의 다른 쪽 단부를 실링하였다. 그런 다음, X선 튜브 전압 111 kVp에서 600 R/시간의 조사량으로 72시간 동안 X선에 노출하여, 중합 반응을 수행하였다. 얻어진 칼럼을 70℃에서 2시간 동안 더 가열하였다. 그런 다음, 헥산/아세톤 (50/50), 아세톤, 및 아세토니트릴을 각각 20 상부피의 용매와 함께 순차적으로 이용하여, 상기 칼럼을 세척하였다.

압력을 해제한 다음, 상기 시린지 펌프로부터 도 4에 도시된 바와 같은 장치를 탈착하였다. 도 4의 장치를 개방한 다음, 상기 칼럼으로부터 조심스럽게 제거하였다. 상기 폴리머 로드的高度를 확인한 결과, 상기 칼럼 내부의 상기 중합용 액상 혼합물的高度보다 4 mm 짧았다. 그런 다음, 상기 칼럼에 원래의 HPLC 칼럼 피팅을 장착하였다. 상기 칼럼을 HPLC 펌프에 연결한 다음, 아세토니트릴을 이용하여 45℃의 온도, 2 ml/분의 유속에서 20분간 세척하였다.

상기 칼럼을 20 상부피의 물로 더 세척한 후, 피스톤으로 압축시킴으로써 보이드 부피를 제거하였다. 그런 다음, 1a에 기재된 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 도 9는 상기 칼럼의 크로마토그램을 도시한 도면이다.

(실시예 17의 다른 버전)

30 g의 스티렌, 30 g의 디비닐벤젠, 38.05 g의 미네랄 오일, 및 22.18 g의 2-에틸헥산산, 0.518 g의 p-테르페닐, 및 1.31 g의 AIBN으로 이루어진 혼합물을 이용하여, 실시예 17과 같은 방법으로 유리 칼럼(내직경 35 mm × 길이 100 mm) 중에서 칼럼을 제조하였다. 제조된 칼럼을 20 상부피의 아세토니트릴, 및 물을 각각 이용하여 세척하였다. 그런 다음, 1a에 기재된 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 분리 결과는 도 9에 도시된 바와 같다.

또한, 실시예 17과 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 상기 칼럼의 한쪽 단부에서 피팅을 탈착한 다음, 다른쪽 단부를 통해 10 ml/분의 유속에서 아세토니트릴을 상기 칼럼 내로 펌핑하여, 상기 칼럼으로부터 상기 매질을 압축하였다. 상기 분리용 매질을 50℃의 진공 오븐 중에서 24시간 동안 건조시킨 후, SEM 및 수은 기공측정기를 이용하여, 상기 분리용 매질의 기공을 측정하였다.

아울러, 대직경 유리 칼럼(내직경 35mm × 길이 100 mm)을 이용하여, 실시예 17과 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 도 4에 도시된 장치 대신, 테플론 스크류 캡 중에 각각 수용된 2개의 테플론 플러그를 이용하여 상기 칼럼을 실링하였다. 상기 폴리머를 상기 칼럼 외부로 배출한 다음, 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 상기 폴리머를 건조하였다. 그런 다음, SEM 및 기공 측정 방법에 따라 상기 폴리머의 기공을 측정하였다.

또한, 중합용 액상 혼합물: 240 mg의 p-테르페닐, 800 mg의 AIBN, 3.2139 g의 스티렌, 28.8088 g의 디비닐벤젠(순도: 80%), 37.4060 g의 1-도데칸올, 및 13.25 g의 톨루엔으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 전술한 실시예에서와 같이 대직경 칼럼(35mm × 100 mm)을 이용하여, 또 다른 칼럼을 제조하였다.

한편, 2.0034 g의 디비닐벤젠(80%)의 모노머 혼합물 중에 240 mg의 p-테르페닐 및 800 mg의 AIBN을 용해하여 얻은 중합용 액상 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 전술한 실시예에서와 같이 대직경 칼럼(35mm × 100 mm)을 이용하여, 또 다른 칼럼을 제조하였다. 상기 모노머 혼합물에 31.6926 g의 테트라에틸렌 글리콜, 및 16.3224 g의 테트라에틸렌 글리콜 디메틸 에스테르를 첨가하였다.

도 12 내지 도 15에 도시된 폴리머 하우스징 내에서 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 또 다른 칼럼을 제조하였다. 중합용 액상 혼합물은 73.2 g의 디비닐벤젠, 73.4 g의 스티렌, 85.2 g의 미네랄 오일, 60.8 g의 2-에틸헥산산, 0.882 g의 p-테르페닐, 및 2.94 g의 AIBN을 포함한다. 상기 칼럼 중앙부에서의 중합 온도는 상기 칼럼의 가장자리에서의 온도와 거의 동일하였다. 110 kV X선 조사에 의한 중합 반응을 수행하고 4일 후, 모노머의 전환 반응이 거의 완료되었다. 발열에 의한 바람직하지 않은 영향이 더 이상 나타나지 않는 것으로 보아, 상기 반응이 열적으로 완료되었음을 확인하였다.

각종 섬광제, 광개시제, 모노머, 및 포로젠계 용매를 이용하여, 그 밖의 많은 칼럼을 제조하였다. 상기 칼럼의 제조에 이용되는 포로젠계 용매로서는, 옥탄과 같은 알칸, 메탄올, 프로판올, 및 사이클로헥산올과 같은 알코올, 테트라하이드로퓨란

과 같은 에테르, 디옥산, 테트라에틸렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜 디메틸 에테르와 같은 올리고머가 포함된다. 또한, 상기 칼럼의 제조에 이용되는 광개시제로서는 2-클로로티옥산텐(chlorothioxanthen)-9-온, 4,4'-비스(디메틸아미노)벤조페논, 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논, 페난트렌퀴논, 디페닐(2,4,6-트리메틸벤조일)포스핀 옥사이드, 및 아조 비스이소부티로니트릴(AIBN)이 포함된다. 이용된 섬광제로서는, 2,5-디페닐옥사졸(PPO), 2-페닐-5-(4-비페닐릴)1,3,4-옥사디아졸(PBD), 2-(1-나프틸)-5-페닐옥사졸(a-NPO), p-테르페닐, 및 ZnSe가 포함된다. 또한, 이용된 모노머로서는, 아크릴로니트릴, 부틸 메타크릴레이트, 글리시딜 메타크릴레이트, 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 스티렌, 디비닐벤젠, 에틸 스티렌이 포함된다.

도 9는 (1) Met-엔케팔린; (2) Leu-엔케팔린; (3) 안지오텐신; (4) 파이유살래민(Phyusalaemin); 및 (5) 직경 10 mm 및 35 mm, 길이가 65 mm의 칼럼 내에서 X선 조사에 의해 개시된 중합 반응에 의해 제조된 폴리(DVB-co-St) 모놀리스형 칼럼의 물질 P의 혼합물의 서로 다른 2개의 칼럼에서의 분리 크로마토그램을 도시한 도면이다; 이동상: (A) 0.15% (v/v) TFA와 물; 구배: A 중에 7 상부피의 10-40% B, 5 ml/분의 유속 I.D. 칼럼, 및 50 ml/분 35 I.D. 칼럼; 검출 파장: UV 214 nm.

도 10은, 고정된 상표면(152), 회전 가능한 상표면(156), 고정된 상표면(152), 및 회전 가능한 상표면(156)을 회전시키도록, 고정된 지지 표면(152)에 연결되어 있고 회전 가능한 표면(156)에 고정되어 있는 지지용 부재(157), 및 4개의 형광 램프 홀더(154A-154D)를 구비한, 자외광 또는 가시광 캐비닛 중합 장치(150)의 정면도(top view)를 도시한 도면이다. 상기 각각의 홀더에는 가시광 또는 자외광 형광 램프가 삽입된다.

도 11은, 중합 장치(162)를 회전시키기 위해 모터(159)에 의해 왕복 회전하는 구동 부재(156)를 개략적으로 도시한, 중합 장치(150)의 측면도이다. 도 11에는 4개의 램프 중 두 개(166D 및 166B)가 램프 홀더(154D 및 154B), 및 기다란 램프(166D 및 166B)의 하단부를 지지하는 해당 홀더에 실장된 상태가 도시되어 있다. 피스톤(164)은 중합 반응을 수행하는 동안, 용기(162) 중의 중합용 혼합물을 가압하는 데 사용된다. 팬(158)은 상기 중합 장치를 냉각시키기 위해 이용되며, 커버, 측부, 및 램프에 코팅된 반사성 코팅은 광을 용기(162)의 광 전도성 벽 내부로 다시 반사시킨다. 이러한 장치에서는 램프(166A~166D)(도 11에는 166D 및 166B가 도시되어 있음)를 이용하여, 광을 상기 중합용 혼합물에 충돌시킴으로써, 중합 반응을 개시 및 제어할 수 있다. 비교적 대직경을 가지는 칼럼의 중합은, 상기 칼럼의 길이 방향의 모든 위치에서의 최종 플러그의 방사형 균일성(radial uniformity)을 유지시키면서, 수행될 수 있다. 바람직한 경우, 온도 구배를 제어하기 위해 상기 라이트를 켜거나 꺼서, 광과 온도의 조합 인자를 제어하는 방식으로 중합함으로써, 균일성이 얻어질 수 있다.

도 12는 문(174), 상부 윈도우(176), 홀더(178), 및 반응 혼합물(182)을 수용하는 용기(180)를 가지는 방사선 차단 캐비닛(172)을 포함하는, 대체로 X선 방사를 이용하는 중합용 장치(170)의 개략적인 정면도이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 피스톤(184)을 사용하여, 반응 혼합물(182)를 가압할 수 있다. 장치(170)에서 X선, 또는 그 밖의 적절한 방사선(예컨대, 감마선)을 이용하여, 중합 용기에서의 반응을 안전하고도 간편하게 제어할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 홈(186)을 통해 공기를 주입하여, 그 밖의 다른 구현예와 관련된 설명에서와 같은 방식으로 반응 혼합물(182)에 대해 내부 방향으로 피스톤(184)을 이동시킴으로써, 피스톤(184)에 의해 압력을 가할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 장치(170)는 사용자에게 간편한 소형의 캐비닛 X선 시스템으로서, 문을 가지는 전자레인지와 유사한 형태를 나타내고, 캐비닛 내에 실장된 상태에서 제어된다. 상기 장치에는 낮은 수준의 전압이 사용되고, 대직경 칼럼에 이용하는 경우에도, 상기 장치는 적절한 수준의 낮은 투과성을 가지기 때문에, 상기 캐비닛 옆에서도 모든 사람들이 안전하게 조작할 수 있다. 또한, 전술한 공정에서는 광개시제, 형광성 용매(fluorescing solvent), 또는 포로젠, X선 감광제 및/또는 섬광제와 같은 중합 보조 성분을 추가적으로 이용하기 때문에, 상기 장치는 본 발명의 중합에 이용하기에 바람직하다. 이러한 유닛을 이용함으로써, 중합 반응에서의 X선을 제어할 수 있고, 도 10 및 도 11에 도시된 바와 같은 그 밖의 유닛을 이용함으로써, 중합 반응에서의 그 밖의 방사선을 제어할 수 있기 때문에, 예를 들면, 반응 시간을 단축시키되, 파괴적인 헤드 증가(head build-up)를 피하기 위해서는 열을 이용하여 중합 종료점 및 한 지점까지, 방사선을 이용하여, 중합 반응을 제어할 수 있다.

도 13은 반응물 도입용 오프닝(200), 냉각용 유체 주입구(203), 냉각제 배출구(205), 케이싱(204), 및 오버플로우 배출구(202)를 포함하는 반응관(180)의 단면도이다. 상기 냉각제로서는 물을 이용하는 것이 바람직하다. 오프닝(206)을 제공한다. 212에 수용된 중합용 혼합물(도 14)의 대향부에 플러그(182)를 이동시키기 위한 오프닝(206)이 제공된다. 용기(180)를 반전시켜, 상기 반응 혼합물을 위치시킨 다음, 오프닝(200)을 통해 열전쌍을 제공할 수 있으며, 마찬가지로 플러그를 삽입할 수 있다. 이러한 배열에서는 바람직한 경우, 압력 하에 상기 반응 혼합물을 조사할 수 있으며, 중합의 개시 및 제어를 위해 X선 축으로 방향으로 조사될 수 있다. 냉각제로서 물을 유동시킴으로써, 방사선과 압력의 조합 인자에 의해 열 구배를 제어할 수 있으며, 최종 크로마토그래피 플러그 또는 지지체에서의 균일성을 향상시킬 수 있다.

도 14는, 도 13에 도시된 장치를 선 14-14를 따라 절취하여 도시한 정면 단면도로서, 투명한 X선 방사 윈도우(192), 냉각 수용 포트(202), 반응물용 오프닝(200), 열전쌍(215) 및 그의 도체(218), 및 핀, 반응 혼합물(212)을 가압하여 플러그(182)를 이동시키기 위한 공기 가압 오프닝(206), 212에 반응 혼합물을 수용하기 위한 반응물 하우징, 칼럼으로서 용기(180)를 이용하여 크로마토그래피를 수행하는 동안, 용매 및 분석물을 분배하기 위한 제1 분배 플레이트(213), 및 중합 후에 212에서 상기 칼럼 내에서의 분리를 수행한 다음, 상기 용매 및 분석물을 수용하기 위한 제2 분배 플레이트(215)가 도시되어 있다. 이러한 배열을 이용하는 경우에는 방사선이 윈도우(192)를 통과하기 때문에, 상기 반응물의 중합이 제어될 수 있다. 이러한 제어는 플러그(182)에 의해 가해지는 압력 하에 수행될 수 있다.

도 15는, 도 13의 중합 용기(180)를 선 15-15를 따라 절취하여 도시한 정면 단면도로서, 피스톤(182), 및 212의 반응물에 X선을 조사하고, 저장조(190) 내의 물을 유동시켜 냉각시키면서, 상기 반응물을 가압하기 위해 피스톤(182)에 압력을 가하는 에어 스페이스(210)가 도시되어 있다.

전술한 설명으로부터, 방사선을 제어하면서, 포로젠 또는 용매를 포함할 수 있는 중합용 혼합물의 중합을 다공성 플러그 중에서 수행할 수 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 중합을 수행하기 위해서는 방사선에 의해 중합 반응이 수행되도록 하는 적어도 하나의 성분이 존재한다. 이러한 성분 중 일부는 중합을 개시 또는 촉진하는 기타 성분을 활성화하는 방사선을 방출할 수 있다. 또한, 전술한 목적을 위해 상기 방사선 혼합물은 적어도 하나의 모노머, 적어도 하나의 포로젠 또는 용매, 및 중합을 수행하는 성분을 포함해야 한다. 한편, 하나의 모노머와 함께 X선을 이용하여, 지지체를 제조할 수도 있다. 상기 중합용 혼합물 중에 포로젠 또는 용매가 포함되는 경우, 상기 지지체는 다공성을 나타낼 수 있다. X선은 특히 안전한 형태의 방사선이며, 폴리머 지지체를 형성하는 데 있어서 폭넓게 적용될 수 있다. 방사선에 의해 중합을 유발할 수도 있고, 혹은 중합을 개시 또는 촉진시키는 추가적인 에너지를 방출하는 용매와 같은 성분에 방사선을 조사할 수도 있다.

(실시예 18)

110 kV X-선 조사에 의해 호모폴리머, 폴리머 수지, 및 다공성 폴리머 지지체를 제조하였다. 이들 폴리머를 유리 바이알 및 칼럼 내에서 제조하였다. 스티렌 중의 1 %의 AIBN 및 0.1%의 p-테르페닐을 포함하는 중합용 혼합물을 전술한 탈기 방법에 따라 탈기시킨 다음, 1 ml 용량의 유리 바이알에 충전하였다. 충전된 바이알을 스크류 캡으로 실링하였다. 111 kVp 전력을 이용하여 600 R/시간의 조사량으로 X-선에 상기 바이알을 2일간 노출시켰다. 그 결과, 상기 바이알 내부에 고상의 벌크 폴리스티렌 폴리머가 생성되었으며, 상기 바이알의 유리를 깨서 상기 폴리머를 얻었다.

(실시예 18의 다른 버전)

전술한 방법에 따라 호모폴리글리시딜 메타크릴레이트를 제조하였다.

전술한 액상 혼합물 중합 방법에 따라 호모폴리스티렌을 제조하였다. 1%의 AIBN 및 0.1%의 p-테르페닐을 포함하는 톨루엔 중의 50% 스티렌을, 600 R/h X선에 2일간 노출시켜 중합하였다. 전술한 조사 조건과 동일한 조건에서 중합함으로써, 폴리스티렌이 얻어졌다.

스티렌과 디비닐 벤젠을 1:1의 비율로 이용하여, 전술한 방법에서와 같이 폴리(스티렌-co-디비닐벤젠) 수지를 제조하였다. 상기 수지의 제조에 이용되는 중합용 혼합물은 0.9 g의 스티렌, 0.9 g의 디비닐벤젠, 17 mg의 AIBN, 5.7 mg의 p-테르페닐을 포함한다. 상기 중합용 혼합물을 중합함으로써, 상기 폴리머 수지가 얻어졌다. 전술한 조사 조건과 동일한 조건에서 중합 반응을 수행한 지 5시간 후, 겔화가 일어났다.

글리시딜 메타크릴레이트(GMA)와 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트(EDMA)를 1:1의 비율로 이용하여, 전술한 방법에서와 같이 폴리(글리시딜-co-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트) 수지를 제조하였다. 상기 수지의 제조에 이용되는 중합용 혼합물은 0.9 g의 GMA, 0.9 g의 EDMA, 17 mg의 AIBN, 5.7 mg의 p-테르페닐을 포함한다. 상기 중합용 혼합물을 중합함으로써, 상기 폴리머 수지가 얻어졌다. 전술한 조사 조건과 동일한 조건에서 중합 반응을 수행한 지 5시간 후, 겔화가 일어났다.

글리시딜 메타크릴레이트(GMA)와 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트(EDMA)를 1:1의 비율로 이용하여, 전술한 방법에서와 같이 폴리(글리시딜-co-에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트) 다공성 지지체를 제조하였다. 상기 지지체의 제조에 이용되는 혼합물은 0.45 g의 GMA, 0.46 g의 EDMA, 0.91 g의 사이클로헥산올, 20 mg의 AIBN, 1.5 mg의 p-테르페닐을 포함한다. 상기 혼합물을 중합한 결과, 다공성 폴리머가 얻어졌다. 전술한 조사 조건과 동일한 조건에서 중합 반응을 수행한 지 6시간 후, 겔화가 일어났다.

0.45 g의 스티렌, 0.45 g의 디비닐벤젠(순도 80%), 0.91 g의 사이클로헥산을, 20 mg의 AIBN, 6.5 mg의 p-테르페닐을 포함하는 중합용 혼합물을 이용하여, 전술한 방법과 같이 폴리(스티렌-co-디비닐벤젠) 다공성 지지체를 제조하였다. 상기 혼합물을 중합한 결과, 다공성 폴리머가 얻어졌다. 전술한 조사 조건과 동일한 조건에서 중합 반응을 수행한 지 4.5시간 후, 겔화가 일어났다.

(실시예 19)

내직경이 각각 75 μm , 100 μm , 200 μm , 250 μm , 320 μm , 530 μm , 및 700 μm 인 서로 다른 실리카 모세관 칼럼을, 90°C의 오븐 중에서 1 M의 소듐 하이드록사이드 액상 혼합물을 이용하여 2시간 동안 개질하였다. 개질된 모세관 칼럼을 60 칼럼부피의 탈이온수 및 아세톤으로 세척하였다. 상기 칼럼 내부로 질소를 퍼징함으로써, 상기 칼럼을 건조시켰다. 그런 다음, 상기 모세관 칼럼에, N,N-디메틸포름아이드(DMF) 중의 0.02%(w/v) 하이드로퀴논 및 50%(v/v) 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트를 포함하는 실란화 액상 혼합물(silanizing liquid mixture)을 충전하였다. 상기 모세관 칼럼의 양쪽 단부를 실링한 다음, 오븐 내, 100°C의 온도에서 약 10시간 동안 가열한 후, DMF, 및 아세톤을 이용하여 세척하였다. 세척 후, 질소 퍼징에 의해 상기 모세관 칼럼을 건조하였다.

표 1에 기재된 성분을 이용하여, 실시예 1과 같은 방법으로 중합용 액상 혼합물을 제조하였다.

개질된 각각의 모세관 칼럼(통상적으로 15~20 cm)에 상기 중합용 액상 혼합물을 충전하였다. 상기 모세관의 양쪽 단부 각각을, 역시 상기 중합용 액상 혼합물이 충전된 1.8 mL의 유리 바이알 중에서 실링하였다. 테플론 및 파라필름을 이용하여, 상기 바이알의 캡을 이중으로 실링하였다. 각각의 바이알 중 약 500 μL 의 부피는 빈 상태로 두었으며, 상기 바이알 높이의 반이 되는 높이에 상기 모세관의 단부가 위치하도록 하였다. 전술한 바와 같은 실링 바이알을 이용하여, 2개 내지 4개의 칼럼을 제조할 수 있다. 상기 모세관 칼럼을 표 1에 기재된 바와 같은 온도에서 수직 방향으로 수조 내에 매단 다음, 스탠드에 상부 바이알을 클램핑하여, 20시간 동안 두었다. 중합 후, 약 20 칼럼부피의 유기 용매, 통상적으로는 아세토니트릴을 이용하여, 포로젠으로서 미네랄 오일을 이용한 경우에는 헥산을 이용하여, 모놀리스형 모세관 칼럼을 세척하였다.

1a에 기재된 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라, 3 μL /분, 5 μL /분, 및 10 μL /분의 유속에서 각각의 칼럼에 대한 특성을 분석하였다. 그 결과, 우수한 분해능이 얻어졌다.

표 1: 중합용 액상 혼합물의 조성 및 중합 조건

반응물	I		II		III		IV		V	
	vol%	g	vol%	g	wt%	g	vol%	g	wt%	g
스티렌	20	2.1	16	1.6	20	2.0	20	2.1	8	0.8
디비닐벤젠	20	2.1	24	2.5	20	2.0	20	2.1	32	3.2
테트라하이드로퓨란	7.5	0.8								
클로로사이클로헥산			9.5	1.1						
THP							7.0	0.7		
1-데칸올	52.5	5.0	50.5	4.8			53	5.1		
톨루엔									8	0.8
1-도데칸올									52	5.2
1-에틸헥산산					27	2.7				
미네랄 오일					33	3.3				
AIBN	0.04 g									
중합 온도, °C	70		70		70		70		80	

(실시예 19의 다른 버전)

.40 g의 BMA, 2.6 g의 EDMA, 3.8 g의 1-프로판올, 1.6 g의 1,4-부탄디올, 0.6 g의 물, 및 0.04 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 전술한 실시예에서와 같이 모놀리스형 모세관 칼럼을 제조하였다. 중합 반응을 60°C에서 수행하였다. 미세분석 액상 크로마토그래피 시스템을 이용하여, 1a에 기재된 LC에 의한 특성 분석 방법에 따라 상기 칼럼의 특성을 분석하였다. 유속은 5 μL /분으로 하였다. 그 결과, 단백질 분리능이 우수하였다.

BMA/EDMA 비(1/3 내지 3/2) 및 포로젠의 농도(전체 반응물을 기준으로, 1-프로판올은 34 내지 39 중량%의 농도로, 1,4-부탄디올은 20 내지 15 중량%의 농도로 함)를 변화시켜, 그 밖의 많은 폴리(아크릴레이트) 기재의 모놀리스형 모세관 칼럼을 제조하였다.

또한, 2.2 g의 DVB, 1.3 g의 스티렌, 0.9 g의 아크릴로니트릴, 4.7 g의 미네랄 오일, 0.8 g의 톨루엔, 및 0.044 g의 AIBN을 포함하는 중합용 혼합물을 이용하여, 실시예 19과 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 중합 온도는 75°C이다. 폴리머 매트릭스 중의 아크릴로니트릴의 함량이 0 내지 50%로 변화시켜, 그 밖의 많은 칼럼을 제조하였다. 폴리머는 친수성이 증가되었지만, 단백질 유지성은 각각 다르게 나타났다. 또한, 0.8 g의 GMA, 2.4 g의 EDMA, 0.8 g의 ATMS, 3.1 g의 1-프로판올, 2.6 g의 1,4-부탄디올, 0.3 g의 물, 및 0.04 g의 AIBN으로 이루어진 중합용 혼합물을 이용하여, 실시예 19와 같은 방법으로 칼럼을 제조하였다. 60°C의 온도에서 20시간 동안 중합 반응을 수행하였다. 중합 후, 아세토니트릴을 이용하여, 상기 칼럼 중의 포로젠계 용매를 세척하였다. 그런 다음, 개질용 액상 혼합물, 즉, TMA와 물의 부피비가 1:2이며, 0.45 g/ml의 TMA HCl을 이용한 혼합물을 상기 칼럼에 충전하였다. 그런 다음, 40°C에서 4시간 동안 상기 칼럼을 개질시켰다.

(실시예 20)

3.2154 g의 아크릴산, 8.0026 g의 메틸 메타크릴레이트, 1.6064 g의 글리시딜 메타크릴레이트, 19.2055 g의 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 43.8952 g의 1-도데칸올, 9.0017 g의 사이클로헥산올, 및 320 mg의 디페닐 (2,4,6 트리메틸(벤졸) 포스핀 옥사이드를 포함하는 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 중합용 액상 혼합물을 제조하였다. 제조된 중합용 액상 혼합물을 5분간 음파과쇄(sonication)한 다음, 한쪽 단부가 테플론 캡으로 실링된 칼럼에 넣은 후, 제2 테플론 캡으로 상기 칼럼을 실링하였다. 통상적인 천장등(ceiling light)에 상기 혼합물을 7일간 노출시켰다. 그런 다음, 20 상부피의 아세토니트릴을 이용하여 상기 칼럼을 세척한 후, 20 상부피의 물을 이용하여 다시 세척하였다. 크로마토그래피를 수행하는 경우의 상기 칼럼의 특성에 대해 분석하였다.

(실시예 20의 다른 버전)

2.5074 g의 글리시딜 메타크릴레이트, 2.5003 g의 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트, 7.5003 g의 p-자일렌, 및 58.2 mg의 디페닐(2,4,6 트리메틸(벤졸) 포스핀 옥사이드를 포함하는 혼합물을 이용하여, 전술한 실시예에서와 같이 10 cm×1 cm ID의 유리 칼럼을 제조하였다. 상기 중합용 혼합물을 통상적인 천장등에 24시간 노출시켰다. 또 다른 2 ml 용량의 바이알 내에서 24시간 동안 동일한 중합 반응을 수행하였다. 그 결과, 모노머 전환률은 92%였다.

또한, 10 g의 GMA, 및 0.1 g의 디페닐 (2,4,6 트리메틸(벤졸) 포스핀 옥사이드를 포함하는 중합용 혼합물을 이용하여, 바이알 내에서 호모폴리글리시딜 메타크릴레이트를 제조하였다. 상기 중합용 혼합물을 통상적인 천장등에 24시간 노출시켰다. 상기 폴리머는 중합 3시간 후에 경화되었다. 이로써, 대단히 투명한 폴리머가 얻어졌다.

아울러, 10 g의 GM, 10 g의 자일렌, 및 0.1 g의 디페닐 (2,4,6 트리메틸(벤졸) 포스핀 옥사이드를 포함하는 중합용 혼합물을 이용하여, 바이알 내에서 호모폴리(글리시딜 메타크릴레이트)를 제조하였다. 상기 액상 혼합물을 통상적인 천장등에 24시간 노출시켰다. 상기 폴리머는 중합 3시간 후에 경화되었다. 이로써, 대단히 투명한 폴리머가 얻어졌다.

도 16은 온도 판독 장치(222), 상기 칼럼의 열 전달을 제어하기 위한 수단(224), 및 열 제어용 수단 (226)을 포함하는, 크로마토그래피 칼럼 중합용 장치(220)를 도시한 도면이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 열 전달 장치(224)는 상기 칼럼이 침지되는 구조이지만, 열 전달 장치(224)로서, 상기 칼럼 내로 열을 도입하는 그 밖의 적절한 수단, 예컨대, 오픈 또는 복사 가열기 또는 전기 가열기 등을 이용할 수도 있다. 또한, 상기 장치에는, 단일 칼럼 내에서의 상기 온도 측정 수단의 판독 결과와, 상기 칼럼의 각각 다른 위치에서의 임의의 온도 구배 또는 온도 불균일성 간의 차이에 의해 나타나는 상기 칼럼의 온도 단면적을 지속적으로 모니터링하기 위해 상기 중합용 혼합물 내에 삽입되는 온도 측정 수단, 예컨대, 열전쌍(thermocouple)이 장착되어 있다. 모든 칼럼을 정확하게 모니터링할 수 있지만, 상기 중합용 혼합물이 서로 동일하고, 상기 칼럼의 크기가 소정의 조건 하에 서로 동일한 경우에는 보다 적은 수의 칼럼을 모니터링할 수도 있고, 혹은 예측 가능한 중합 반응의 경우에는 칼럼을 모니터링하지 않고, 대신에 상기 중합용 혼합물 온도 특성과 관련된 과거의 기록을 이용할 수 있다.

도 16에서 6개의 칼럼(228A~228F)의 각각의 번호는 간편하게 설명하기 위해 부여한 것이다. 칼럼(228D)는 상기 칼럼으로부터 뺀어 나온 3개의 도체(230A~230C)를 가지는 칼럼이다. 상기 도체의 한쪽 단부는 온도 측정 장치에 연결되어 있고, 다른 쪽 단부는 온도 판독 장치(222)에 연결되어, 온도 변화 프로필을 제공하고 상기 칼럼 간의 임의의 차이를 탐지한다.

다. 이와 마찬가지로, 다른 칼럼들 역시 상기 칼럼으로부터 뺀어 나온 복수의 도체를 가지며, 상기 온도 단면적을 모니터링할 수 있는 소정 개수의 열전쌍으로부터 뺀어 나온 소정 개수의 도체를 나타내는 것으로서 간주한다. 일반적으로, 상기 도체의 개수는 상기 칼럼의 중앙부에 한 개, 그리고 상기 칼럼의 벽 부근에 한 개, 총 2개이면 충분하다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 열 제어용 수단(226)은 수조에 침지된 전기 가열기(232)와 같은 가열기이지만, 상기 수단에 의해 제어되는 그 밖의 형태의 가열기를 사용할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 가열기 제어기(234)는 상기 가열기를 제어하기 위한 전력원이고, 온도 측정 장치(336)는 수조 내에 침지된 감온 장치(thermostatic device)이다. 온도 판독 및 제어(240)는 감온식으로 가열기 제어기(234)에 연결될 수 있지만, 최소한 수조와 같은 칼럼 환경 중에서 온도를 판독할 수도 있다. 상기 장치는, 적절한 제어 하에 상기 수조를 냉각시키기 위한 물을 교체해야 하는 경우, 물 순환 시스템을 더 포함할 수 있다. 온도 판독 장치(222)는 세 지점에서의 온도를 기록할 수 있는 임의의 종류의 스트립 차트 리코더 또는 디지털 리코더 형태의 3개의 판독 장치를 포함한다. 또한, 발열의 존재를 나타내는 소정량에 의해, 상기 세 지점 중 임의의 점이 그 밖의 점으로부터 편향 여부를 결정하기 위해, 비교측정 검출기(comparator detector)를 포함할 수도 있다. 이러한 장치 중 하나는 242에 도시되어 있으며, 그 밖의 장치는 244에 도시되어 있다. 한편, 각각의 측정 장치로부터 측정된 온도는 조작자에 의해 개인적으로 판독될 수 있으며, 이 때 임의의 온도 조정이 수행된다.

도 17은, 3개의 온도 측정 장치, 즉, 벽 측정 장치(350A), 상기 칼럼 중앙부에 위치하는 측정 장치(350B), 및 상기 칼럼벽과 상기 칼럼의 중앙부 사이에 위치하는 측정 장치(350C)가 삽입되어 있고, 칼럼벽(346)을 가지며, 중합용 혼합물(348)이 충전되어 있는 칼럼(228D)의 일부를 개략적으로 도시한 도면이다. 상기 장치들은 칼럼으로부터 방사형 방향의 온도 구배를 검출할 수 있는 프로파일을 제공하기에 적절한 임의의 위치에 위치할 수 있다. 온도 측정 장치(242)에서 측정된 온도를 표시하기 위해, 열전쌍이 그에 상응하는 각각의 도체(230A, 230B, 및 230C)에 연결되어 있다.

이러한 배열에 있어서, 상기 수조 중의 칼럼은 적절한 가교도로 중합시킬 수 있되, 자발적으로 유지되는 온도보다 낮은 온도에서 유지될 수 있는 온도로 온도 상승되며, 상기 자발적으로 유지되는 온도는, 반응 속도를 증가시키고, 보다 많은 양의 열을 발생시키기 위해, 더 많은 열을 발생시키는 폭주 방식으로 중합이 유지되기에 충분하게 중합열이 방출되는 온도이다. 상기 칼럼의 단면에서 서로 다른 속도로 중합이 수행되지 않도록 하기 위해 이러한 열은 일정한 온도 단면을 유지시키는 속도로 도입된다.

전술한 중합 반응은 칼럼의 형태에 따른 과거의 기록에 의해, 또는 상기 칼럼 내의 온도 측정 장치에서 판독된 온도로부터 결정되는 단일 온도에서 일어날 수 있다. 한편, 중합이 진행됨에 따라, 온도 폭주 영역으로 이동되지 않으면서, 서로 다른 수준의 온도가 취급될 수 있으며, 상기 칼럼에 바람직한 특성을 제공하기 위해서 보다 높은 온도를 안전하게 이용할 수도 있다. 이 같은 방식으로, 수조의 온도를 소정의 시간 동안 단일 온도에서 유지시킨 다음, 다른 온도로 증가시킬 수 있다. 전술한 일련의 단계를 이용할 수 있다.

(실시예 21)

길이 75 mm × 내직경 35 mm의 칼럼 내에서, 36.01 g의 EDMA, 3.01 g의 GMA, 15.01 g의 MMA, 6.09 g의 아크릴산, 0.94 g의 AIBN, 85.67 g의 1-도데칸올, 및 10.57 g의 사이클로헥산올을 포함하는 혼합물을 이용하여, 단백질 분리용 약한 양이온 교환 칼럼을 제조하였다. 수조 내, 40℃에서 72시간 동안 중합 반응을 수행한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합 반응을 수행하였다. 그런 다음, 45℃, 300 psi의 상압 하에, 10 상부피의 아세토니트릴을 이용하여 상기 칼럼을 세척하였다. 액체 크로마토그래피에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석한 결과, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 22)

길이 75 mm × 내직경 35 mm의 칼럼 내에서, 36.02 g의 EDMA, 3.03 g의 GMA, 15.03 g의 MMA, 6.08 g의 아크릴산, 0.93 g의 AIBN, 85.64 g의 1-도데칸올, 및 10.53 g의 사이클로헥산올을 포함하는 혼합물을 이용하여 약한 양이온 교환 칼럼을 제조하였다.

상기 칼럼을 40℃에서 72시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 그런 다음, 45℃, 300 psi의 상압 하에, 10 상부피의 아세토니트릴을 이용하여 상기 포로젠 용매를 세척 제거하였다. 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 23)

12.81 g의 아크릴산, 32.01 g의 MMA, 6.40 g의 GMA, 76.83 g의 EDMA, 176.04 g의 1-도데칸올, 16.00 g의 사이클로헥산올, 및 1.96 g의 AIBN을 포함하는 혼합물을 이용하여, 내직경 35 mm × 길이 100 mm의 약한 양이온 교환 칼럼을 제조하였다.

수조 내, 40 내지 60℃의 온도에서 12시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 처음 12시간 동안, 상기 중합 온도를 40℃에서부터 60℃까지 선형 증가시켰다. 그런 다음, 45℃, 300 psi의 상압 하에, 10 상부피의 아세토니트릴을 이용하여 상기 칼럼을 세척하였다.

(실시예 24)

12.81 g의 아크릴산, 32.01 g의 MMA, 6.40 g의 GMA, 76.83 g의 EDMA, 176.04 g의 1-도데칸올, 16.00 g의 사이클로헥산올, 및 1.96 g의 AIBN을 구성 성분으로 하는 혼합물을 포함하며, 내직경이 35 mm이고 길이가 300 mm인 칼럼 하우징 중에서, 약산 양이온 교환 칼럼을 제조하였다.

수조 내, 40 내지 60℃의 온도에서 12시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼을 실시예 23에서와 같이 세척하였다. 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 25)

18.05 g의 아크릴산, 45.06 g의 MMA, 9.21 g의 GMA, 108.13 g의 EDMA, 238.52 g의 1-도데칸올, 31.56 g의 사이클로헥산올, 및 3.1 g의 AIBN을 구성 성분으로 하는 혼합물을 포함하며, 내직경이 35 mm이고 길이가 300 mm인 칼럼 하우징 중에서, 약산 양이온 교환 칼럼을 제조하였다.

상기 혼합물을 40℃에서 72시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 상기 칼럼을 위에서 설명한 바와 같이 세척하였으며, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 26)

8.11 g의 GMA, 24.09 g의 EDMA, 8.07 g의 ATMS, 28.06 g의 1-프로판올, 29.14 g의 1,4-부탄디올, 3.05 g의 물, 및 0.48 g의 AIBN을 포함하는 혼합물을 이용하여, 길이 75 mm×내직경 35 mm의 강한 음이온 교환 칼럼을 제조하였다.

상기 혼합물을 40℃에서 72시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 액체 크로마토그래피에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석한 결과, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 27)

8.0317 g의 GMA, 24.0089 g의 EDMA, 8.0295 g의 ATMS, 27.0134 g의 1-프로판올, 30.0176 g의 1,4-부탄디올, 3.0344 g의 물, 및 0.6177 g의 AIBN을 포함하는 혼합물을 이용하여, 길이 75 mm×내직경 35 mm의 강한 음이온 교환 칼럼을 제조하였다. 상기 혼합물을 40℃에서 72시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 12시간 동안 중합하였다. 액체 크로마토그래피에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석한 결과, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 28)

25.66 g의 GMA, 76.81 g의 EDMA, 25.64 g의 ATMS, 96.04 g의 1-프로판올, 86.49 g의 1,4-부탄디올, 9.62 g의 물, 및 1.99 g의 AIBN을 포함하는 혼합물을 이용하여, 길이 300 mm×내직경 35 mm의 강한 음이온 교환 칼럼을 제조하였다.

40℃에서부터 60℃까지 온도를 선형 증가시키면서, 상기 혼합물을 중합한 다음, 60℃에서 12시간 동안 방치하였다. 그런 다음, 10 psi에서부터 150 psi까지, 12시간 동안 압력을 점진적으로 증가시키면서 압축시켰다. 액체 크로마토그래피에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석한 결과, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 29)

100.06 g의 DVB, 108.77 g의 TEG, 41.26 g의 TEG-DME, 및 1.27 g의 AIBN을 포함하는 혼합물을 이용하여, 길이 100 mm×내직경 35 mm의 펩타이드 분리용 칼럼을 제조하였다.

상기 혼합물을 40 내지 60℃의 온도에서 12시간 동안 중합한 다음, 10 psi에서부터 150 psi까지 4시간 동안 압력을 선형 증가시키면서 압축하는 한편, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다. 액체 크로마토그래피에 의해 상기 칼럼의 특성을 분석한 결과, 상기 칼럼은 양호한 분리능을 나타내었다.

(실시예 30)

내직경이 34 mm이고 길이가 25 cm인 칼럼 내에서, 12.81 g의 AA, 32.01 g의 MMA, 6.40 g의 GMA, 76.83 g의 EDMA, 176.04 g의 1-도데칸올, 16.00 g의 사이클로헥산올, 및 1.96 g의 AIBN을 포함하는 중합용 혼합물을 이용하여 실시예 2와 같은 방법에 따라 다공성 모놀리스형 폴리머를 제조하였다. 상기 칼럼을 25℃, 150 psi의 압력 하에 48시간 동안 중합한 다음, 60℃에서 24시간 동안 중합하였다.

제조된 칼럼을 HPLC 칼럼에 연결한 다음, 20 상부피의 THF 및 물을 각각 이용하여 세척하였다.

상기 칼럼 내에서, 80℃에서 6 몰/L의 NaOH를 이용하여 1시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 그런 다음, 20 상부피의 물을 이용하여 상기 칼럼을 세척한 후, LC에 의한 특성 분석 방법에 따라서 단백질 분리 및 결합 용량에 대한 특성을 분석하였다.

(실시예 30a의 다른 버전)

40℃에서부터 60℃까지 24시간 동안 선형 온도 구배를 유발한 것을 제외하고는 실시예 30과 동일하게 칼럼을 제조하였다. 그런 다음, 60℃에서 12시간 동안 경화시켰다.

전술한 바와 같은 온도 구배를 유발하면서, 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 직경이 4.6 mm이고, 길이가 5 cm인 칼럼을 제조하였다.

전술한 바와 같은 온도 구배를 유발하면서, 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 직경이 10 mm이고, 길이가 10 cm인 칼럼을 제조하였다.

(실시예 31)

78.80 g의 EDMA, 38.46 g의 GMA, 11.91 g의 AMPS, 4.9 M의 NaOH 수용액 혼합물 11.72 g, 12.44 g의 물, 162.23 g의 1-프로판올, 38.79 g의 1,4-부탄디올, 및 1.97 g의 AIBN을 포함하는 중합용 액상 혼합물을 이용하여, 실시예 21과 같은 방법으로 직경이 34 mm이고 길이가 25 cm인 칼럼을 제조하였다. 20 상부피의 아세토니트릴 및 물을 각각 이용하여, 상기 칼럼을 세척하였다. 그런 다음, 60℃의 온도에서, 0.5 M의 H₂SO₄ 중에서 3시간 동안 상기 폴리머를 가수분해한 다음, 10 상부피의 탈이온수를 이용하여 세척하였다. 가수분해된 폴리머를 다음과 같은 방법으로 개질하였다: 먼저, 5 상부피의 건조 아세토니트릴로 상기 칼럼을 사전에 세척하여, 상기 칼럼 중에 존재하는 물을 제거하였다. 그런 다음, 250 psi의 상압에서 5 상부피의 개질제를 상기 칼럼 내에 펌핑하였다. 60℃에서 3시간 동안 개질 반응을 수행하였다. 그런 다음, 0.5M의 H₂SO₄ 5 상부피를 이용하여 상기 칼럼을 세척함으로써, 상기 개질제를 제거한 다음, 10 상부피의 초순수(nanopure water)를 이용하여 상기 칼럼을 다시 세척하였다. 상기 개질제의 제조 방법은 다음과 같다. 먼저, 10% 피리딘을 포함하는 아세토니트릴을 10℃보다 낮은 온도로 냉각시킨 다음, 냉각된 액상 혼합물에 동량의 클로로설폰산을 점진적으로 첨가하였다. 전체 제조 공정을 수행하는 동안, 상기 액상 혼합물의 온도를 실온보다 낮은 온도로 제어하였다.

(실시예 31a의 다른 버전)

40℃에서부터 60℃까지 24시간 동안 선형 온도 구배를 유발한 것을 제외하고는 실시예 31과 동일하게 칼럼을 제조하였다. 그런 다음, 60℃에서 12시간 동안 경화시켰다.

전술한 바와 같은 온도 구배를 유발하면서, 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 직경이 4.6 mm이고, 길이가 5 cm인 칼럼을 제조하였다.

전술한 바와 같은 온도 구배를 유발하면서, 전술한 실시예에서와 같은 방법으로 직경이 10 mm이고, 길이가 10 cm인 칼럼을 제조하였다.

한편, 78.80 g의 EDMA, 38.46 g의 GMA, 11.91 g의 AMPS, 4.9 M의 NaOH 수용액 혼합물 13.89 g, 6.22 g의 물, 140.85 g의 1-프로판올, 32.02 g의 1,4-부탄디올, 및 1.97 g의 AIBN을 포함하는 중합용 혼합물을 이용한 것을 제외하고는, 실시예 31과 동일한 방법으로 칼럼을 제조하였다.

전술한 실시예로부터, 본 발명에 따른 신규한 모놀리스형 고상 지지체는 예컨대, 다음과 같은 점에서 바람직하다: (1) 종래 기술에 비해 우수한 방식의 크로마토그램을 제공한다; (2) 간편하고도 경제적인 방법으로 제조가 가능하다; (3) 종래 기술에 따른 분리 유속에 비해 더 빠른 유속을 제공한다; (4) 종래 기술에 따른 방법에 비해, 보다 낮은 압력에서도 높은 분해능을 제공한다; (5) 칼럼의 비용을 절감함으로써, 일회용 칼럼을 이용하여, 고분해능을 제공한다; (6) 다양한 형태의 칼럼(예컨대, 환형 크로마토그래피에 이용되는 환형 칼럼), 및 임의의 치수, 특히, 마이크로칩이나 모세관, 및 모놀리스형 투과성 폴리머 팁을 이용하는 질량 분광측정용 주입기와 같은 상당히 작은 치수의 칼럼을 쉽게 제조할 수 있다; (7) 소형 및 대형 분자를 신속하게 분리할 수 있다; (8) 추출, 크로마토그래피, 전기영동, 초임계 크로마토그래피, 촉매용 고상 담체, TLC 및 집적 CEC 분리, 또는 화학적 반응을 비롯한 많은 공정에 이용되는 우수한 분리용 매질을 제공할 수 있다; (9) 공지된 모놀리스형 투과성 분리용 매질에 보다 우수한 특성을 제공할 수 있다; (10) 분리에 효과적인 오프닝의 크기 분포가 균일한 대 직경 칼럼의 신규한 제조 방법을 제공할 수 있다; (11) 수성이 큰 이동상에서의 벽 효과가 나타나지 않으며, 보다 향상된 칼럼 효율을 가지는 분리용 매질을 제공할 수 있다; (12) 분리에 효과적인 인자들의 특성을 향상시킬 수 있다; 및 (13) 역상 칼럼에서의 팽윤 및 수축 문제를 개선할 수 있다.

이상, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명의 바람직한 구현예를 설명하였으나, 본 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하다. 따라서, 전술한 실시예 이외에도 본 발명의 청구의 범위 내에서 다양하게 실시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 상세한 설명에 기재된 특징 및 그 밖의 특징에 대한 이해를 돕기 위하여 다음과 같은 도면을 참조한다:

도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 크로마토그래피 칼럼의 제조 방법을 도시한 개략도이다.

도 2는, 중합하는 동안, 유리 칼럼에 압력을 가하기 위한 본 발명의 일 구현예에 따른 부품의 어셈블리를 도시한 도면이다.

도 3은, 중합하는 동안, 스테인리스 스틸 칼럼에 압력을 가하기 위한 본 발명의 다른 구현예에 따른 부품의 어셈블리를 도시한 도면이다.

도 4는, 중합하는 동안, 유리 칼럼에 압력을 가하기 위한 본 발명의 다른 구현예에 따른 부품의 어셈블리를 도시한 도면이다.

도 5는 실린더 칼럼 내에서 120 psi의 수력압 하에 중합된 강한 양이온 이온 교환기의 SEM 사진이다.

도 6은, 중합하는 동안 압력을 가함으로써, 비틀림(distortion)이 일어나지 않은 칼럼을 이용한 경우, 단백질 샘플로부터 얻은 피크를 나타내는 크로마토그램을 도시한 도면이다.

도 7은 3개의 칼럼을 도시한 사진으로서, 맨 왼쪽의 칼럼은 중합하는 동안 압력을 가한 칼럼이고, 나머지 2개의 칼럼은 중합하는 동안 압력을 가하지 않은 칼럼이다.

도 8은 칼럼의 배열을 가지며, 각각의 칼럼이 유사한 재현 특성을 가지는 크로마토그래피 시스템의 블록 다이어그램(block diagram)이다.

도 9는 중에너지(110 keV) X선 조사에 의해 중합한 경우에 얻어지는 크로마토그래피 분리를 도시한 크로마토그램이다.

도 10은 크로마토그래피 칼럼용 UV 또는 가시광 중합 장치의 평면도이다.

도 11은 도 10에 도시된 장치의 측면 단면도이다.

도 12는 크로마토그래피 칼럼용 X선 중합 장치의 개략적인 정면도이다.

도 13은 도 12에 도시된 장치의 정면 단면도이다.

도 14는 도 12에 도시된 장치를 선 14-14을 따라 절취하여 도시한 정면 단면도이다.

도 15는 도 13에 도시된 장치를 선 15-15을 따라 절취하여 도시한 정면 단면도이다.

도 16은 모놀리스형 칼럼을 제조하기 위한 혼합물의 중합용 장치를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 17은 도 16의 구현예에 이용된 온도 구배를 모니터링하기 위해, 내부에 온도 측정 장치를 포함하는 칼럼의 개략적인 부분 절취도이다.

도 18은 일정한 저온에서의 중합 반응과 온도를 변화시킨 상태에서의 저온 중합 반응에 있어서 적절한 시간 동안 얻어지는 중합물을 비교한 그래프이다.

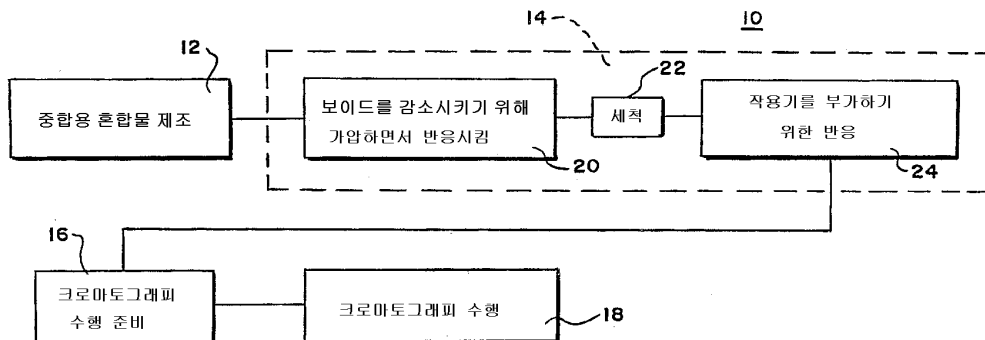
도 19는 상기 칼럼의 외표면의 온도가 상기 칼럼의 중앙부와 동일한 온도로 유지되는 공정에서, 칼럼의 중앙부에서부터 외 표면까지의 온도를 도시한 그래프이다.

도 20은 GMA 및 EDMA와 AMPS의 공중합 방법, 및 그의 변형 방법을 도시한 도면이다(식 1, 식 2, 및 식 3이 포함되어 있음).

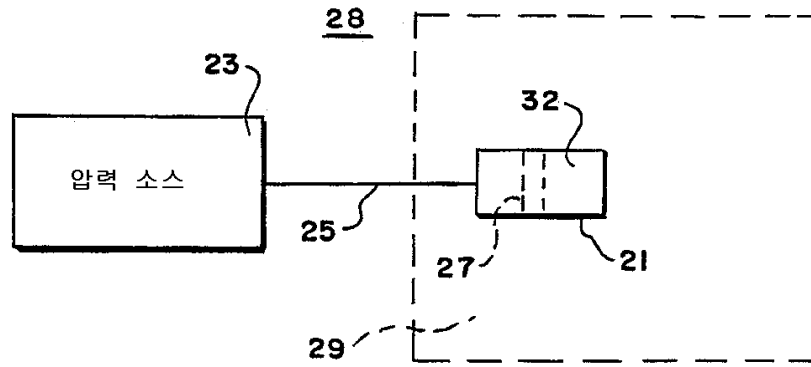
도 21은 온도-시간이 적절하게 제어되는 칼럼에서의 분리 크로마토그램이다.

도면

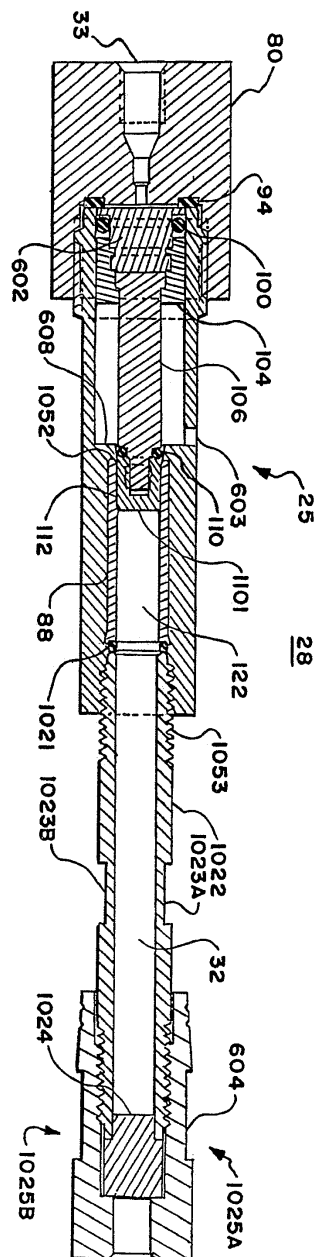
도면1



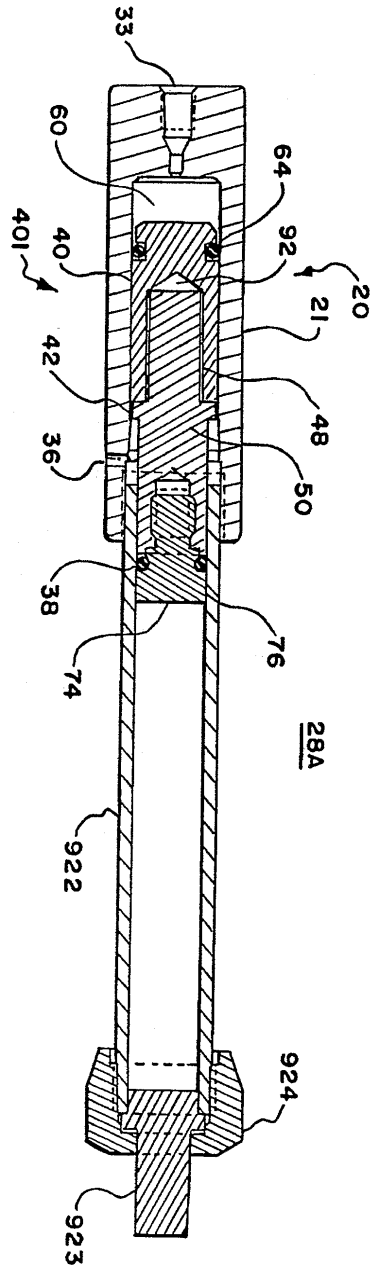
도면2



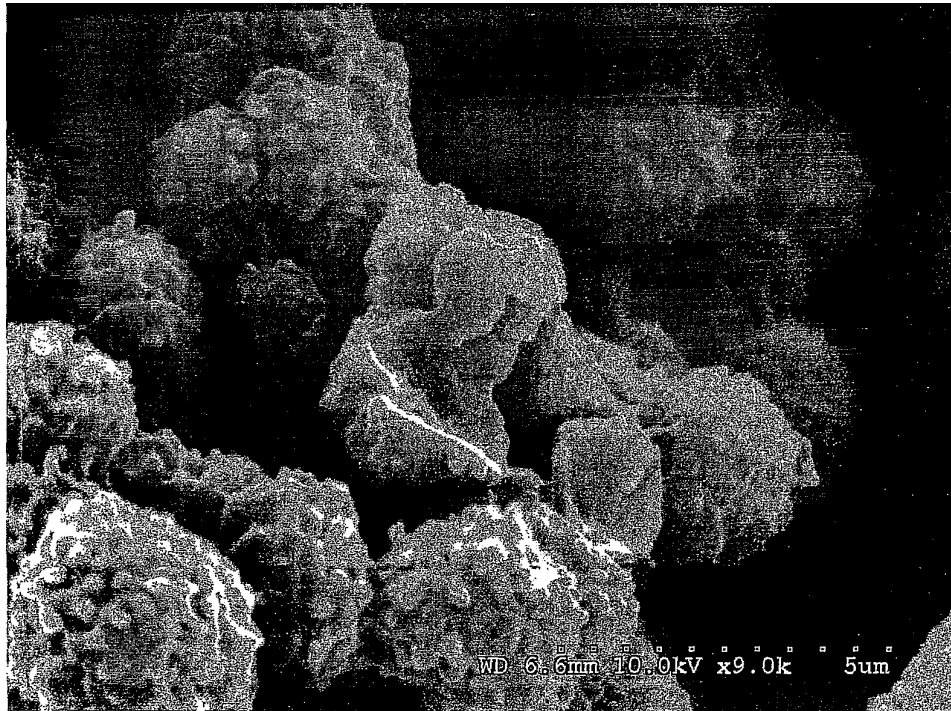
도면3



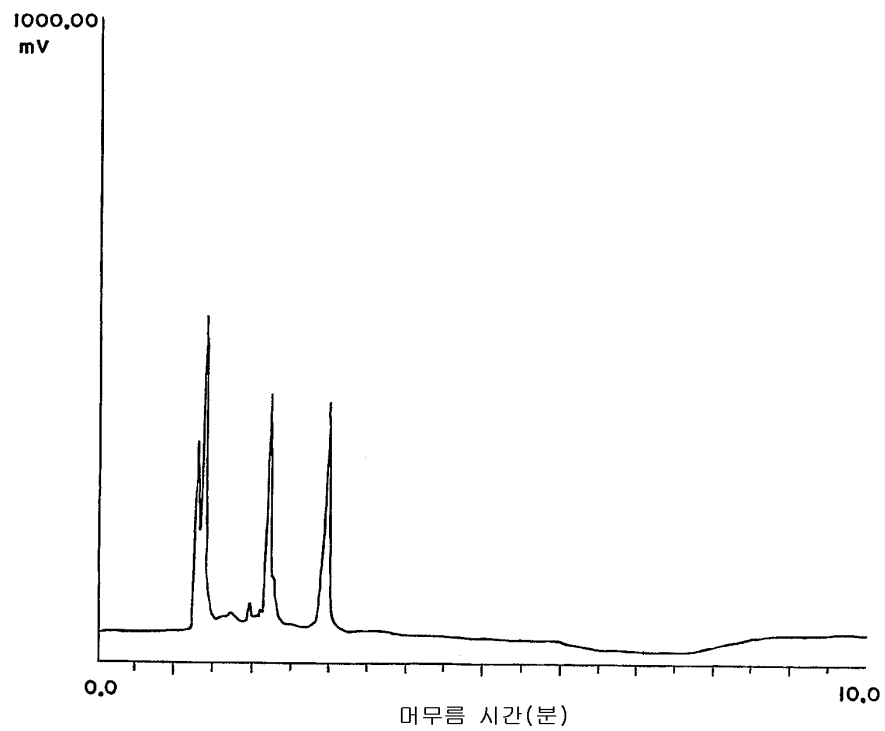
도면4



도면5



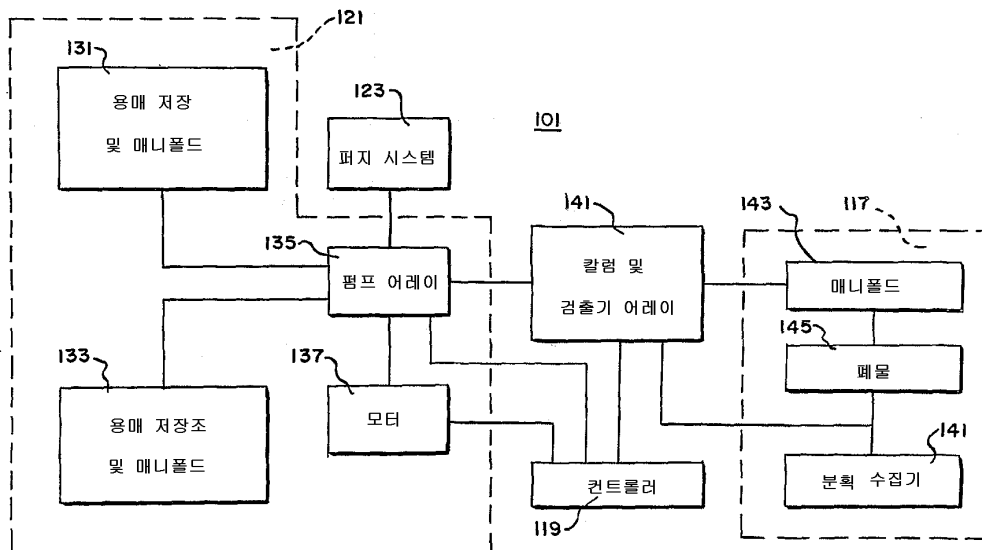
도면6



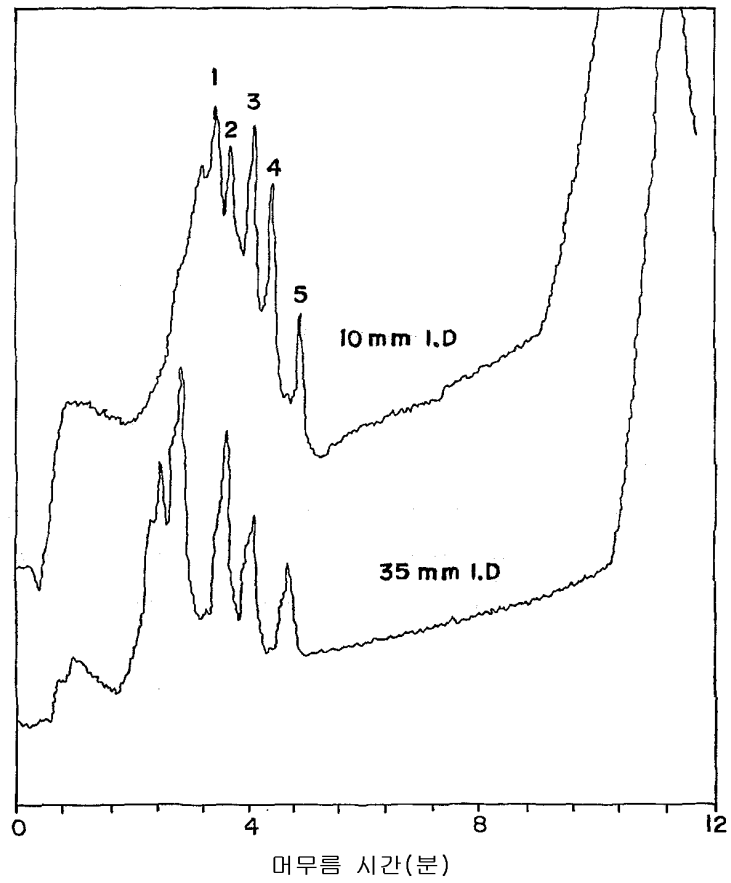
도면7



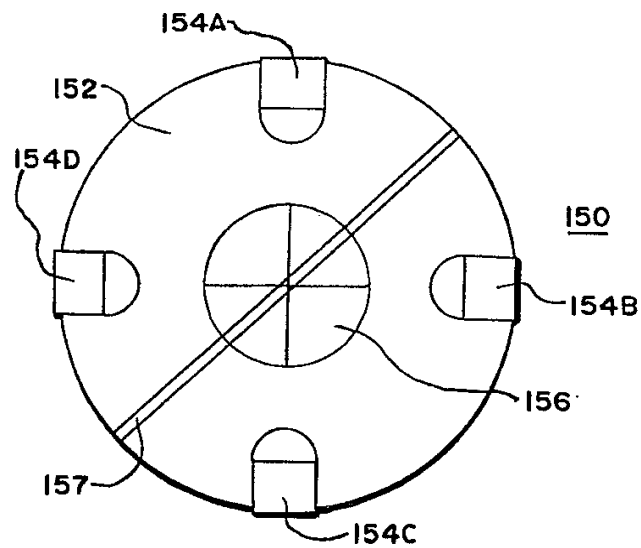
도면8



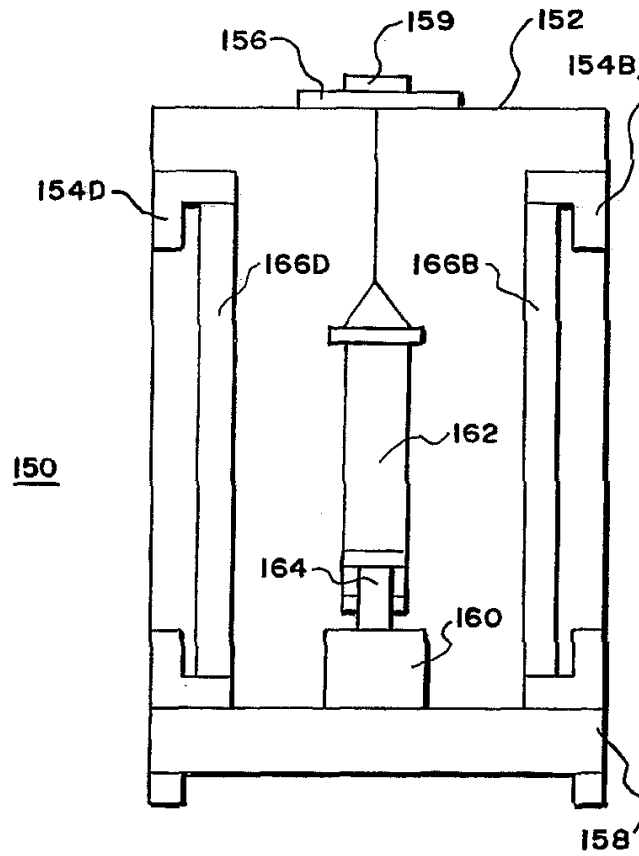
도면9



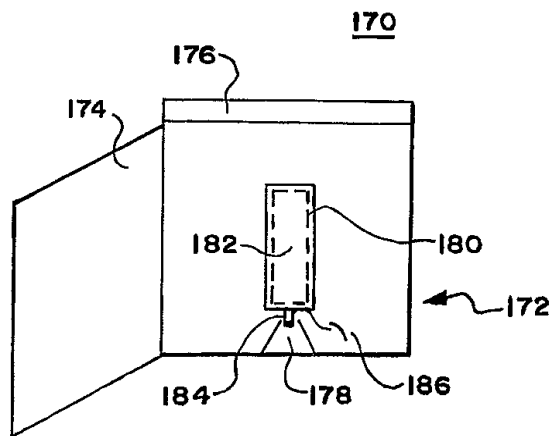
도면10



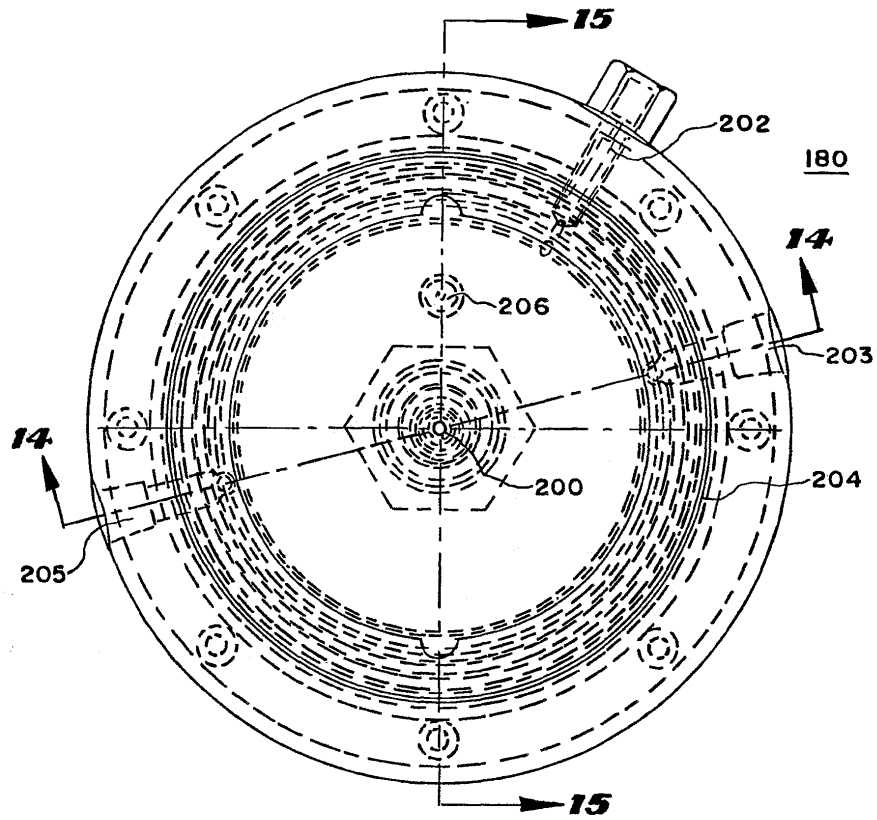
도면11



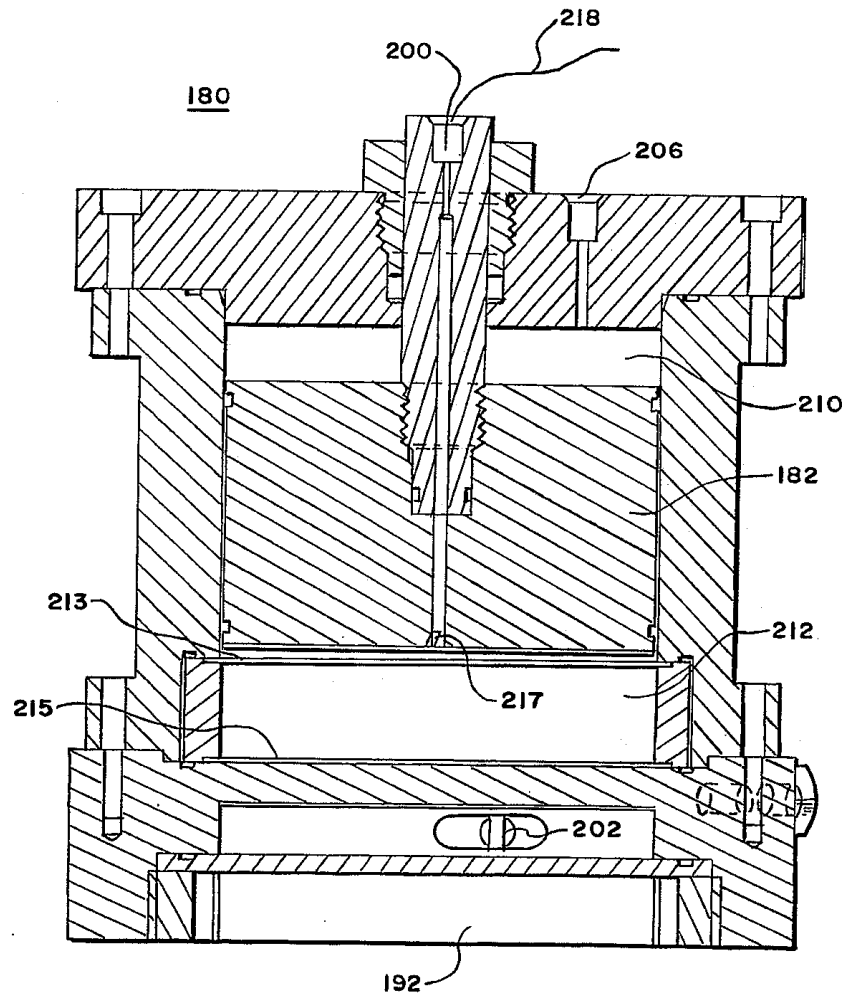
도면12



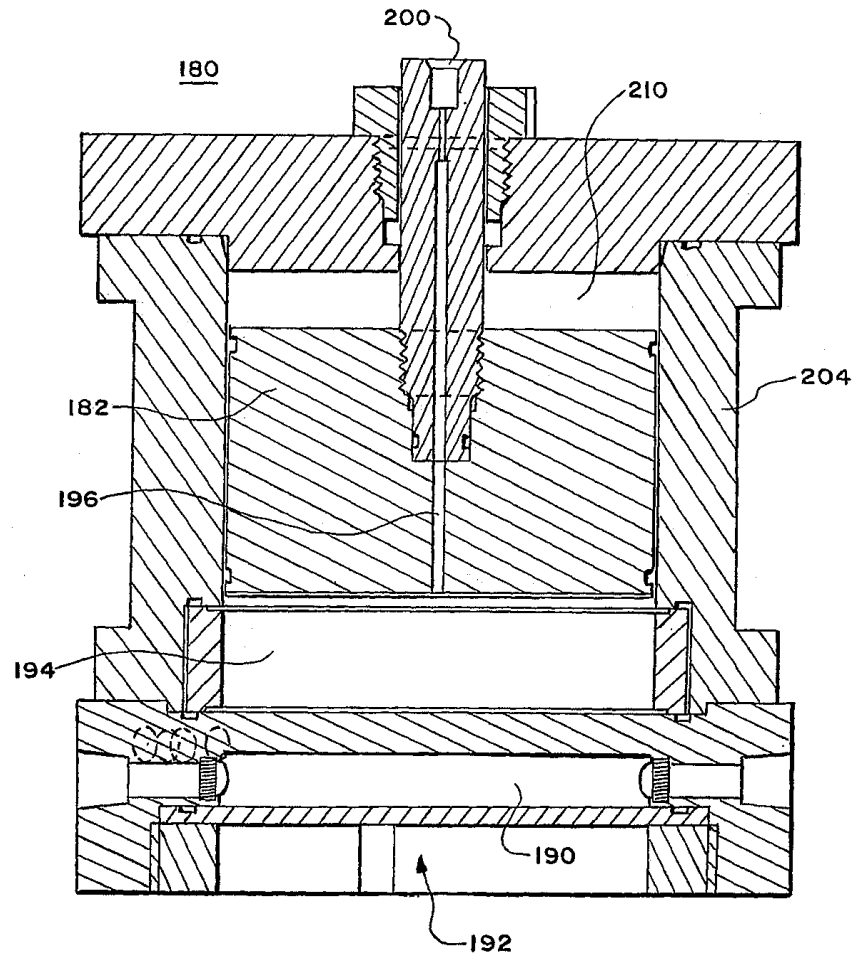
도면13



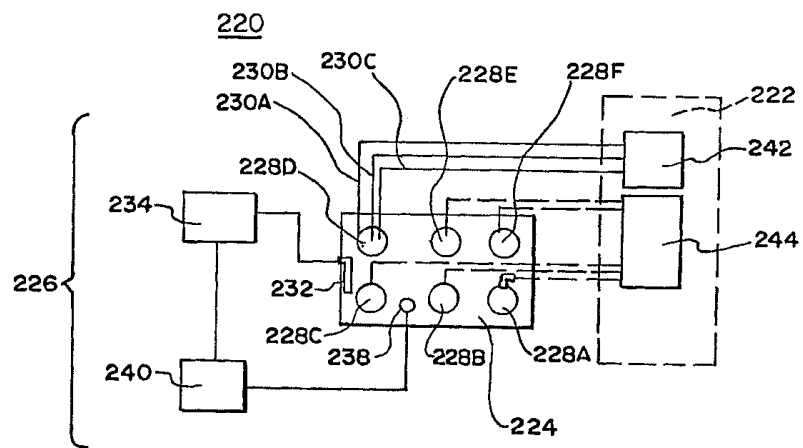
도면14



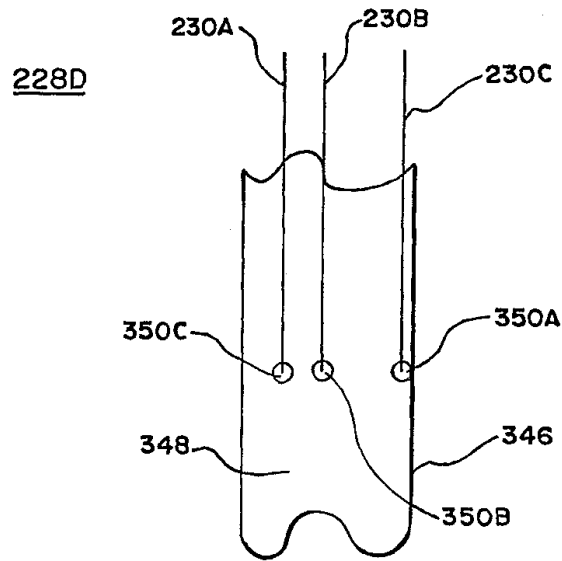
도면15



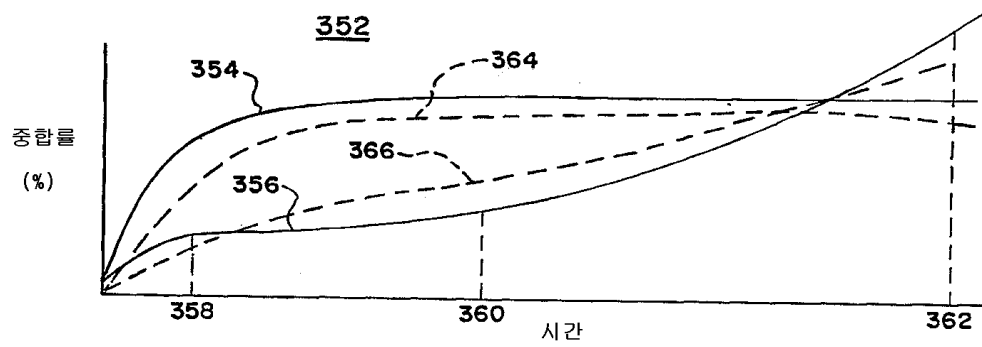
도면16



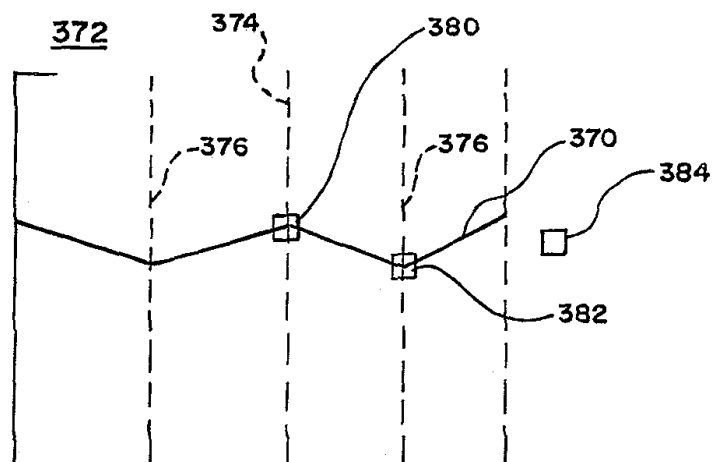
도면17



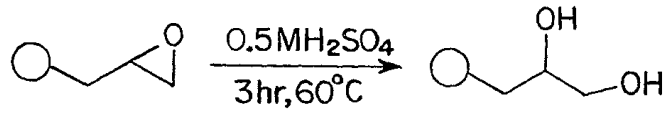
도면18



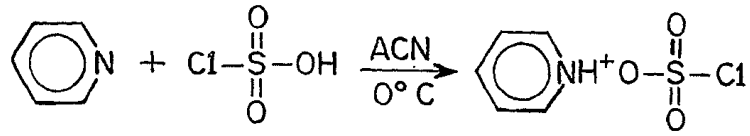
도면19



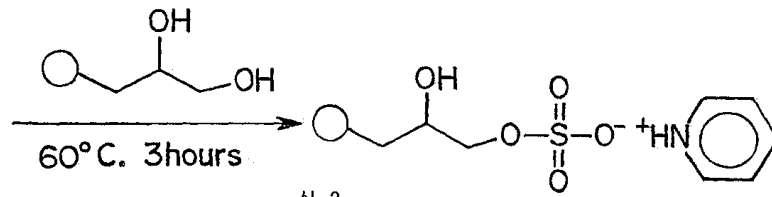
도면20



식 1



식 2



식 3

도면21

