

주조된 매크로 다공성 Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 막대를 이용한 카페인과 트립토판의 분리

김룡매 · 염홍원 · 노경호[†]

인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구센터
402-751 인천시 남구 용현동 253
(2005년 6월 20일 접수, 2005년 9월 8일 채택)

Separation of Caffeine and Tryptophan Using Molded Macroporous Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) Rods

Longmei Jin, Hongyuan Yan and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering, Inha University,
253, Younghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
(Received 20 June 2005; accepted 8 September 2005)

요 약

주조된 매크로 다공성 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 막대를 간단한 주형 과정을 거쳐서 실험실 내 튜브모양의 주형인 크로마토그래피 칼럼(4.6×100 mm)을 사용하여 자유 라디칼 중합에 의해 만들었다. 이는 에폭시 그룹이 유도된 일체형 칼럼과 황산을 이용한 에폭시드 그룹의 화학적인 변형과정을 이용하였다. 단량체 및 포로젠(세공을 생성하는 물질)의 비율, 온도 등 중합반응의 조건을 변화시켜서 세공크기를 조절하여 물질의 체류시간에 영향을 미쳤다. 본 연구에서는 주조된 일체형 칼럼을 이용하여 카페인과 트립토판을 분리하였으며, 중합원료조성이 일체형 칼럼의 효율과 선택도 그리고 분리도에 미치는 영향을 고찰하였다.

Abstract – The molded macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) rods produced by a facile molding process were polymerized *in situ* within a tubular mold, chromatographic column (4.6×100 mm) by free radical polymerization. It was complemented by epoxy derivatized monolithic column and chemical modification of the epoxide groups with the sulphuric acid. By variation of the polymerization conditions, such as the ratio of the monomers, the porogen (pore generating material), and the temperature, the pore size could be varied, so the retention time of the samples may be adjusted. For the mixture of caffeine and tryptophan in the prepared monolithic column, the influences of polymerization material compositions to the efficiency, selectivity, and resolution of the monolithic column were investigated.

Key words: Separation, Macroporous Monolithic Column, Polymerization, Modification

1. 서 론

1990년대 초, 단량체와 포로젠의 혼합물을 닫힌 튜브 또는 다른 용기 안에서 자유 중합시키는 아주 간단한 ‘조형’ 과정에 의해 형성한, 다른 종류의 경직된 매크로 다공성 일체형 칼럼의 발전을 보였다[1]. 다공성 무기재료가 촉매 작용과 크로마토그래피 영역에서 널리 쓰이는 아주 대중적인 지지체이기 때문에 [2], 실리카로부터 만들어진 일체형 칼럼은 유기 중합체와 거의 동시에 발전하였다[1]. 현재 일체형 크로마토그래피 지지체는 마이크로칩에서부터 제조용 정제까지 아주 많은 영역에 사용되고 있다[3]. 이것은 그들의 가장

중요한 장점인 편리한 일체 형태의 크로마토그래피 지지체의 특징을 갖고 있기 때문이다. 비더로 채워진 형태의 칼럼은 용액의 channeling을 겪어야 하므로 지지체의 효율이 떨어진다. 하지만, 일체형 칼럼은 고도의 다공성 재료로 만들어진 하나의 일체이기에 이런 문제점이 없다. 대류에 의한 전달과 높은 동적 공극률은 일체형 칼럼의 아주 뛰어난 성질이다[4].

일체형 칼럼은 아주 다양한 단량체를 사용할 수 있으며 높은 외부 공극률의 구조로 되어 있으므로 준비과정이 입자로 채워진 칼럼보다 더욱 좋은 용통성이 있다. 또한, 높은 공극률은 높은 투과성과 낮은 압력강하를 가져올 수 있다[5]. 실리카 일체형 칼럼은 80% 이상의 아주 높은 공극률을 보여주며 작은 분자의 역상 분리와 정제에 주로 사용된다. 반면에 methacrylate 일체형 칼럼은 단백질과 핵

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

산, 바이러스 등과 같은 고분자의 정제를 위한 분리에 사용된다[6]. Styrene, methacrylate, acrylate, acrylamide 또는 환상의 단량체로부터 만들어진 중합체 일체형 칼럼은 이미 보고되었다[1]. 중합체 입자에 의해 만들어진 칼럼의 효율은 일반적으로 실리카 입자로 채워진 재래식 칼럼보다는 더 낮지만, 몇몇 고성능 중합체 일체형 칼럼은 생물학 고분자를 위한 일체형 칼럼 시장의 상당한 부분을 차지할 것이다[5].

Methacrylate, acrylate, acrylamide 일체형 칼럼 가운데 어느 종류의 일체형 칼럼도 일정용매조성의 HPLC 조건하에서 넓은 범위의 물질들에 대해 높은 칼럼 효율을 제공하지 못하였다. 때문에 최적화는 각자의 준비과정에서 필수적이다. 중합체 일체형 칼럼, 특히 친수성 중합체 일체형 칼럼은 실리카 재료보다 더욱 높은 단백질 친화성을 보이고 있으며 생체고분자의 기용기 용매조성의 분리에 유용하다[5].

몇 개의 시스템 변수는 넓은 범위에서 일체형 칼럼의 다공성 성질을 조절할 수 있으며, 일체형 장치의 유체역학적 성질을 조절하는데 이용될 수 있다. 기능적인 단량체의 직접적인 혼성 중합, 활성 그룹의 화학적인 변형 및 선택된 중합체 시술의 세공표면의 접붙이기와 같은 다양한 방법은 표면의 화학적인 성질을 조절하는데 이용될 수 있다[1].

구조된 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼의 에폭시드(epoxide) 그룹은 많은 물질과 반응하여 이온교환체를 형성한다[7-13]. 본 연구에서는 황산을 이용하여 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 연속 막대를 변형하여 친수성의 칼럼 표면을 형성하였다. 이를 통해 카페인과 트립토판의 분리를 하였으며 두 물질의 선택도, 분리도 등을 분석하였고, 아울러 중합반응의 조건이 일체형 칼럼의 효율과 선택도 등에 미치는 영향을 분석하였다.

2. 이 론

일체형 칼럼의 질량과 부피 등을 측정하고, 칼럼의 공극률은 아래와 같은 식 (1)에 의해 계산하였다.

$$\epsilon = \frac{(\Delta m/\rho) - \Delta V}{V_d} \quad (1)$$

$$\Delta V = V_w - V_d \quad (2)$$

위 식에서 ϵ 은 공극률(%)을 말하며 Δm 은 만들어진 초기 일체형 칼럼과 건조된 일체형 칼럼의 질량차이(g)를 말하며 ρ 는 액상 중합 혼합물질의 밀도(g/ml)를 말한다. 또한, V_w 는 초기 일체형 칼럼의 부피(ml), V_d 는 건조된 일체형 칼럼의 부피(ml)를 각각 말한다[4].

시료의 체류인자(k)는 다음 식으로 표시할 수 있다.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

이 식에서 t_0 은 무용시간(dead time)이고, t_R 은 시료의 체류시간이다. 피크의 너비는 칼럼의 효율과 관계되며, 이동상과 고정상의 특성에 따라서 칼럼의 분리도는 영향을 받게 된다. 또한, 용출시간은 체류인자와 관계된다. 칼럼의 효율은 칼럼의 이론단수(N)에 의해 표시되며 아래 식에 의해 구하였다[8].

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

여기서 $w_{1/2}$ 는 피크 높이를 기준으로 1/2지점에서의 시료의 피크 폭이다[14]. 칼럼의 선택도(α)는 피크의 상대적인 분리에 의해 측정되며 아래 식으로 표현할 수 있다.

$$\alpha = t_{R2}/t_{R1} \quad (5)$$

여기서 t_{R1} 과 t_{R2} 는 선후로 용출되는 두 피크의 체류시간을 말한다. 분리도(R)는 두 피크의 차이(Δt)와 피크의 평균 폭(w)으로 정의되며 아래 식으로 표현할 수 있다. 분리도는 체류시간과 피크 폭의 단위가 시간과 길이로 표시되기에 무차원이 된다.

$$R = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (6)$$

여기서 w_1 , w_2 는 각기 두 물질의 피크 폭을 말한다.

3. 실험

3-1. 시약 및 기기

단량체 glycidyl methacrylate(GMA)는 TCI organic chemicals(Tokyo, Japan)에서, 가교제인 ethylene glycol dimethacrylate(EGDMA)는 Fluka(Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 개시제인 azobisisobutyronitrile(AIBN) 그리고 포로젠인 dodecyl alcohol과 cyclohexanol은 각기 Junsei Chemical(Tokyo, Japan), Ducksan Pharmaceutical(Kyungki-Do, Korea), Kanto Chemical(Kyungki-Do, Korea)에서 구입하였다. 황산과 메탄올은 모두 Ducksan Pure Chemical(Kyungki-Do, Korea)에서 구입하였고 L-tryptophan과 caffeine은 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 물은 2차 증류수를 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 여과지(FH-0.45 μ m)로 여과하여 사용하였다. 본 연구에서 사용된 HPLC장치로는 M930 펌프(solvent delivery pump, Young Lin Co.)와 M720 UV detector(Absorbance Detector, Young-In Scientific Co.) 그리고 10 ml 샘플 루프를 연결한 Rheodyne 주입 밸브로 구성되었으며 데이터 출력장치로는 Autochromin(Ver. 1.42, Young Lin Co.)을 사용하였다.

3-2. 실험방법

메탄올을 100% 또는 2차 증류수와 혼합하여 90:10 vol%의 혼합 용액을 만들어서 이동상으로 사용하였고 시료는 모두 메탄올에 녹여 준비하였다. 이동상 저장용기 안에 헬륨가스를 넣어 탈기처리를 진행하였다. UV 검출기의 파장은 280 nm로 고정하였고 HPLC 실험은 상온에서 진행하였다.

3-3. 중합체 일체형 칼럼의 준비

간단한 조형과정에 의해 만들어지는 경직된 매크로 다공성 유기 중합체 일체형 칼럼의 준비는 아주 간단하고 직접적이다. 주형인 100×4.6 mm 크기의 스테인리스 스틸 크로마토그래픽 칼럼의 한쪽 끝을 폴리에틸렌 필름으로 막고 고무밴드로 밀봉하고, 반대편 주입구부터 진공 처리를 한 중합 혼합물을 천천히 채우고 역시 같은 방법으로 밀봉한다. Table 1과 같이 중합 혼합물은 단량체 glycidyl methacrylate(GMA), 가교제인 ethylene glycol dimethacrylate(EGDMA), 그리고 포로젠인 cyclohexanol과 dodecyl alcohol을 포함한다. 개시

Table 1. Conditions for preparing the polymerization mixture

| Substance | Volume (ml) | |
|-------------|-----------------|-----------------|
| Initiator | AIBN | 0.045-0.064 (g) |
| Monomer | GMA | 0.7-1.2 |
| Crosslinker | EDMA | 0.4-0.9 |
| Porogen | Cyclohexanol | 0.4 |
| | Dodecyl alcohol | 3.4-4.4 |

*Polymerization temperature, 55 °C; polymerization time, 24 h.

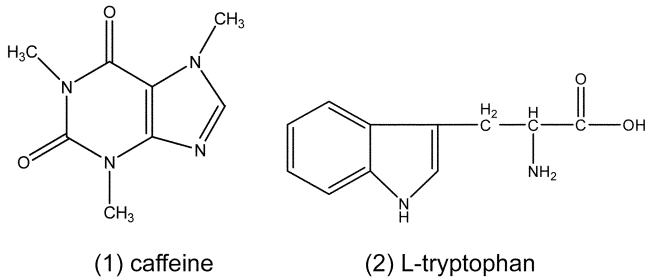


Fig. 1. Chemical structure of caffeine and L-tryptophan.

제인 AIBN을 상술한 네 가지 중합 혼합물에 넣고 초음파처리를 15분간 하고 다음에 헬륨가스로 10분 동안 반복 진공 처리를 해서 칼럼에 천천히 채워넣는다. 그 다음에 55 °C 항온수조에 넣어서 24 시간 유지하여 중합반응을 유도한다. 중합반응이 끝나면 밀봉처리를 제거하고 펌프에 연결하여 메탄올, 물로 일체형 칼럼을 2시간 정도 세척하여 칼럼 내에 존재하는 포로젠과 기타 가용성 물질을 제거한다. 여기서 중합혼합물의 양은 여러 가지 비의 조성으로 실험을 하였다. 이를테면 단량체와 가교제의 혼합비를 1:1로 하거나 혹은 2:1로 하였을 때 얻어지는 칼럼의 압력은 많은 차이가 있었다. 단량체의 비가 클수록 칼럼의 압력은 증가하였으며 구조가 유사한 물질을 칼럼에 주입하였을 때 시료의 체류시간에 큰 차이가 없어 물질 분리가 잘 이루어지지 않았다. 하여 본 실험에서는 단량체 (GMA) 1.1 ml, 가교제(EGDMA) 0.65 ml, 포로젠인 cyclohexanol 0.4 ml, dodecyl alcohol 3.5 ml 그리고 개시제인 AIBN은 0.045 g으로 혼합한 것을 사용하였다.

Fig. 2에서는 만들어진 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 막대를 황산과 반응시켜 친수성의 화학표면을 갖는 과정을 보여준다. 우선 0.25 mol/ml 황산을 0.5 ml/min으로 펌프에 연결하여 칼럼에 통과시킨다. 마지막으로 황산으로 처리된 일체형 칼럼을 메탄올, 물로 세척한다. 이렇게 하여 세공표면에 친수성의 화학구조를 얻을 수 있다.

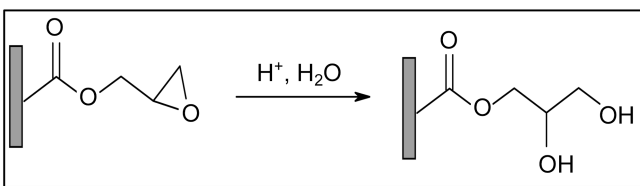


Fig. 2. Chemical modification scheme for preparation of the hydrophilic monolithic column.

4. 결과 및 토론

4-1. 유체역학 성질

만들어진 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼은 에폭시드(epoxide) 그룹이 있으며 이는 소수성이기 때문에 생체고분자 등을 분리하기 어렵다. 친수성 물질을 이용하여 구조표면의 에폭시드 그룹을 화학적으로 변형하여 친수성의 표면으로 만들었다. Fig. 2와 같이 황산과 반응함으로써 두 개의 히드록실기(-OH)를 갖는 친수성의 표면구조의 일체형 칼럼이 얻어진다.

4-2. 압력강하

Fig. 3에서는 만들어진 친수성 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼에서는 압력과 이동상의 유속간의 선형관계를 보여주고 있다. 단량체와 가교제의 혼합비를 각기 약 1:1, 2:1, 3:1로 변화시켰을 때 얻어지는 일체형 칼럼의 압력은 크게 변하였다. 혼합물 가운데 단량체의 함량이 클수록 칼럼의 압력은 커졌다. 또한, 이동상의 유속이 커질수록 일체형 칼럼의 압력도 점차 커졌다. 본 실험에서 단량체와 가교제의 함량비가 약 2:1로 만들어진 일체형 칼럼의 압력은 유속을 증가하여도 매우 낮았다. 이것은 일체형 칼럼의 아주 중요한 장점의 하나로서 일체형 칼럼의 구조에 관계된다. 일체형 칼럼은 내부가 서로 연결된 골격의 고체상 및 유체 흐름통로의 단일체로 구성되었다. 골격이 작고 또한 유체흐름통로(through-pore)가 크면 확산 통로길이나 유체저항이 채워진 입자 칼럼에 비해 현저하게 감소한다. 일체형 칼럼의 낮은 압력강하는 긴 칼럼과 높은 유속을 이용하여 빠르고 효율적인 분리를 할 수 있다는 것을 의미한다.

4-3. 일체형 칼럼을 이용한 물질 분리

Fig. 1에서는 카페인과 (L)-트립토판의 화학적인 구조식을 보여주고 있으며 Fig. 4에서는 황산으로 변형된 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼을 이용한 경우에서 카페인(0.5 mg/ml)과 L-트립토판(1 mg/ml)의 분리 크로마토그램을

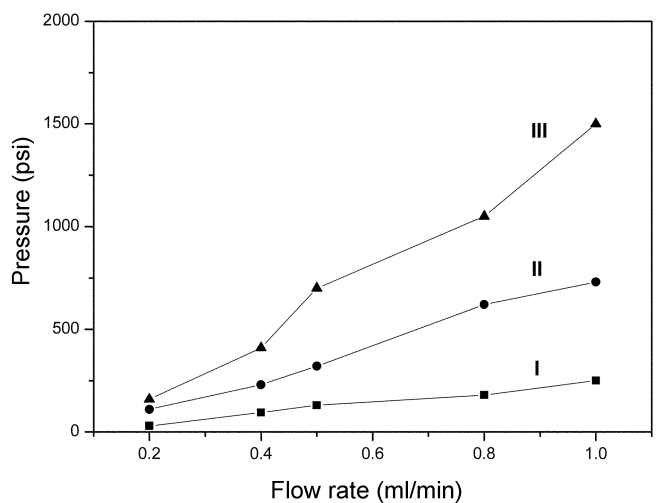


Fig. 3. Relationship between flow rate and column pressure. (Column: 100×0.46 cm I.D.; Mobile phase: methanol; I: GMA 0.7 ml, EGDMA 0.9 ml, II: GMA 1.1 ml, EGDMA 0.65ml; III: GMA 1.2, EGDMA 0.4 ml).

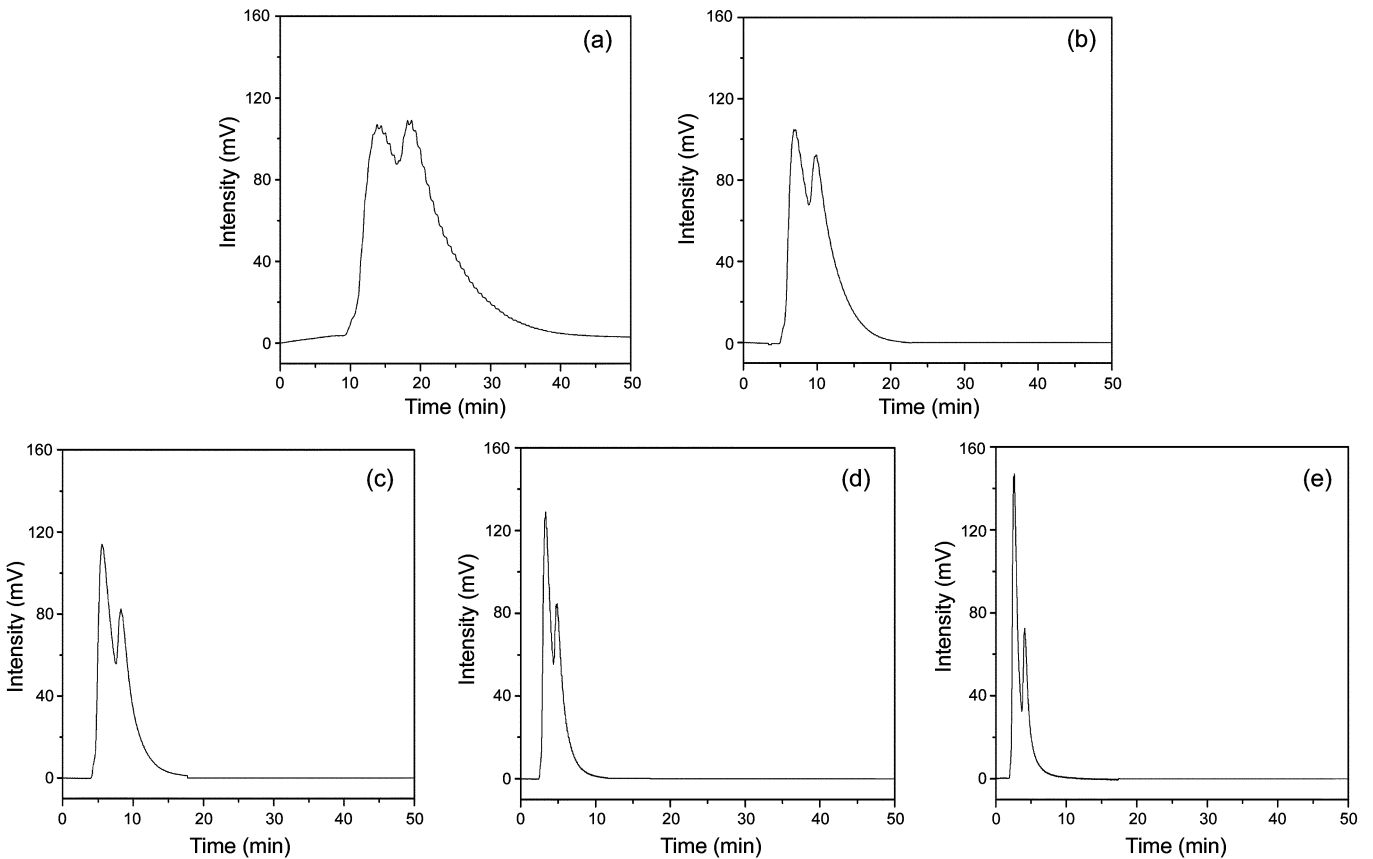


Fig. 4. Chromatogram of caffeine and L-tryptophan using sulphuric acid modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith. (Mobile phase: methanol; Inj. Conc.: caffeine 1mg/ml, L-tryptophan 0.5 mg/ml; inj. Vol.: 20 μ l; a: 0.2, b: 0.4, c: 0.5, d: 0.8, e: 1.0 ml/min).

보여주고 있다. 이동상(메탄올)의 유속을 0.2에서 1 ml/min로 점차 증가시켜서 실험을 한 결과에 의하여 유속이 낮은 경우, 두 가지 혼합물의 용출 피크는 아주 넓은 피크 넓이를 보여주고 있다. 반면에 유속이 커짐에 따라 피크 넓이는 점차 줄어들고 피크 모양이 뾰족하게 변하여서 더욱 좋은 분리효과를 보여주었다. 또한, 유속을 증가함으로써 물질의 분석시간을 줄일 수 있었다. 위와 동일한 실험조건하에서 칼럼의 공극률(ϵ)은 식 (1)에 의해 구하였다. 만들어진 초기 일체형 칼럼의 무게와 50 °C 드라이 오븐에서 건조한 건조된 일체형 칼럼의 무게를 각기 측정하였으며, 이 두 상태에서의 부피도 각각 측정하였다. 또한, 반응 전 중합혼합물의 밀도도 측정하였다. 이렇게 구해진 일체형 칼럼의 공극률은 0.54이었다[4].

Fig. 5에는 Fig. 4에서 사용한 동일한 칼럼을 사용하였으며, 이동상으로 메탄올과 물의 혼합용액(90:10 vol%)을 사용하였다. 유속이 0.6에서 0.8 ml/min로 증가함에 따라서 용출되는 (L)-트립토판 피크 넓이가 커진 것을 볼 수 있다. 이것은 이동상에 극성인 물을 첨가함으로써 같은 극성인 (L)-트립토판이 칼럼에서의 체류가 적어진다는 것을 알 수 있다.

Table 2에서는 Fig. 4와 5의 분리 크로마토그램에서 얻어진 두 가지 물질의 체류시간을 보여주고 있으며, 식 (4)-(6)에 의해 구해진 칼럼의 이론단수, 선택도와 분리도를 보여주고 있다. 식 (4)에 의해 구해진 칼럼의 이론단수는 이동상이 메탄올일 경우, 유속이 높을 때 비교적 컸으며 각기 98, 187이었으며 반면에 이동상이 메탄올과 물의 혼합물일 경우, 유속이 낮을 때 비교적 큰 값인 133, 60을 얻었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 이동상이 메탄올일 때, 유속이 1 ml/min 일 때의 칼럼의 선택도(1.55)와 분리도(1.10)가 가장 좋았으며, 이동상이 메탄올과 물의 혼합물일 때 유속이 0.8 ml/min 일 때의 칼럼의 선택도(2.28)와 분리도(1.17)가 더 좋았다.

본 실험에서 카페인과 (L)-트립토판 두 가지 물질에 대해 비교적 낮은 선택도를 얻었다. 이것은 만들어진 칼럼의 다공성 성질에 관계되며 포로젠의 성질 및 단량체와 포로젠의 비율 등에 관계될 것이다. 일체형 칼럼은 유체투과성이 우수하며 이는 그들의 세공크기에 의존한다. 다공성 중합체 구조에는 보편적으로 미세공을 갖고 있는데 이는 칼럼의 효율과 피크의 대칭성에 부정적으로 작용한다.

칼럼내에서 균일한 다공성 구조를 갖는 원통 모양의 일체형 칼럼의 준비는 단순한 중합반응 단계로 이루어지는데, 이런 큰 크기의 일체형 칼럼은 수동적인 조작과정 가운데 여러 가지 오차가 발생할 수 있으므로 준비하기가 어렵다. 하지만, 중합 일체형 칼럼은 우수한 생체 적합성을 보여주고, 넓은 pH 범위를 갖고 있으며 부식성 이동상으로도 세척할 수 있다.

중합반응의 조건을 조절하는 등 일체형 칼럼의 준비단계를 발전시키는 실험이 진행되고 있으며 더욱 효율적인 매크로 다공성 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼을 만들기 위해 아직도 많은 실험이 진행되어야 할 것이다.

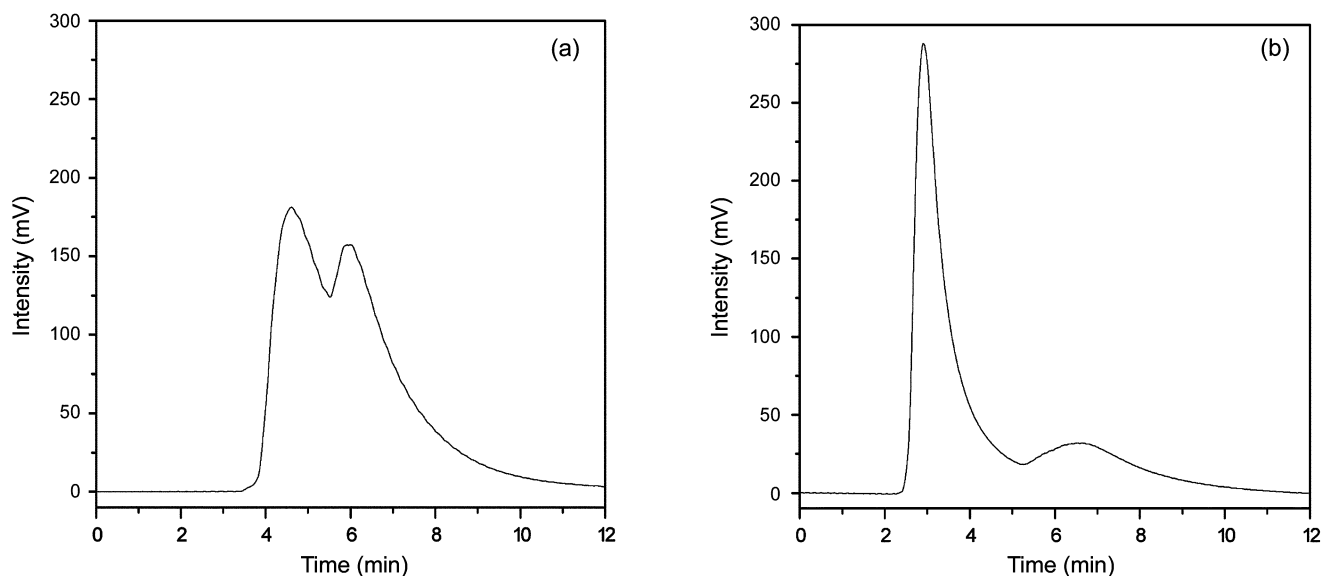


Fig. 5. Chromatogram of caffeine and L-tryptophan using sulphuric acid modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith at different flow rate. (Mobile phase: methanol:water (90:10 vol%); Inj. Conc.: caffeine 1mg/ml, L-tryptophan 0.5 mg/ml; inj. Vol.: 20 μ l; a: 0.6, b: 0.8 ml/min).

Table 2. Retention times and the calculated values of caffeine(1) and L-tryptophan(2)

| Mobile phase | Flow rate(ml/min) | t_{R1} (min) | t_{R2} (min) | k_1 | k_2 | N_1 | N_2 | α | R |
|--------------------------------|-------------------|----------------|----------------|-------|-------|--------|--------|----------|------|
| Methanol | 0.2 | 14.14 | 18.44 | 10.07 | 13.43 | 17.92 | 35.36 | 1.30 | 0.28 |
| | 0.4 | 6.88 | 9.91 | 4.39 | 6.75 | 27.05 | 56.05 | 1.44 | 0.49 |
| | 0.5 | 5.57 | 8.27 | 3.35 | 5.47 | 34.33 | 87.39 | 1.49 | 0.63 |
| | 0.8 | 3.35 | 4.83 | 1.62 | 2.78 | 50.38 | 88.94 | 1.44 | 0.64 |
| | 1 | 2.65 | 4.12 | 1.07 | 2.22 | 98.10 | 187.47 | 1.55 | 1.10 |
| Methanol+water (90:10 vol%) | 0.6 | 4.61 | 5.99 | 2.61 | 3.69 | 133.17 | 60.50 | 1.30 | 0.40 |
| | 0.8 | 2.91 | 6.65 | 1.27 | 4.20 | 42.34 | 36.35 | 2.28 | 1.17 |

5. 결 론

참고문헌

자유라디칼 중합반응에 의하여 매크로 다공성 poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) 일체형 칼럼을 만들었으며 황산을 이용하여 친수성의 구조표면을 얻었다. 이 일체형 칼럼을 이용하여 카페인과 (L)-트립토판을 분리하는데 성공 하였다. 본 연구에서 만들어진 일체형 칼럼은 0.57의 공극률이 있으며 아주 낮은 압력강하를 보였다. 또한, 메탄올과 물의 혼합 이동상을 이용하였을 때 보다 이상적인 선택도(2.28)와 분리도(1.17)를 얻을 수 있었다. 하지만, 칼럼 효율(N , 98과 187)이 비교적 낮았으므로 칼럼 효율을 향상하기 위한 더욱 많은 실험이 진행되어야 할 것이다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀생물분리기술연구센터의 지원에 감사드립니다.

- Švec, F., "Preparation and HPLC Applications of Rigid Macroporous Organic Polymer Monoliths," *J. Sep. Sci.*, **27**(10), 747-766(2004).
- Unger, K. K., *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, M. Dekker, NY, USA(1990).
- Švec, F., Tennikova, T. B. and Deyl, Z., "Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications," Elsevier, Amsterdam, 173(2003).
- Krajnc, P., Leber, N., Štefaneč, D., Kontrec, S. and Podgornik, A., "Preparation and Characterization of Poly(high internal phase emulsion) Methacrylate Monoliths and Their Application as Separation Media," *J. Chromatogr. A*, **1065**(1), 69-73(2005).
- Ikegami, T. and Tanaka, N., "Monolithic Columns for High-efficiency HPLC Separations," *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**(1), 1-7(2004).
- Štrancar, A., Podgornik, A., Barut, M. and Necina, R., in: R. Freitag (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Modern Advances Chromatography)*, vol. 76, Springer, Heidelberg, 49(2002).

7. Azanova, V. V., Hradil, J., Svec, F., Pelzbauer, Z. and Panarin, E. F., "Reactive Polymers. 60. Glycidyl Methacrylate-styrene-ethylene Dimethacrylate Terpolymers Modified with Strong-acid Groups," *React. Polym.*, **12**(3), 247-260(1990).
8. Azanova, V. V., Hradil, J., Sytov, G., Panarin, E. F. and Svec, F., "Macroporous Membranes: Part 2. 2,3-Epoxypropyl Methacrylate-styrene-ethylene Dimethacrylate Macroporous Membranes Bearing Strong Acid Groups," *React. Polym.*, **16**(1), 1-8(1991).
9. Hradil, J. and Svec, F., "Reactive Polymers. 61. Synthesis of Strongly Basic Anion Exchange Methacrylate Resins," *React. Polym.*, **13**(1), 43-53(1998).
10. Luo, Q., Zou, H., Xiao, X., Guo, Z., Kong, L. and Mao, X., "Chromatographic Separation of Proteins on Metal Immobilized Iminodiacetic Acid-bound Molded Monolithic Rods of Macroporous Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate)," *J. Chromatogr. A*, **926**(2), 255-264(2001).
11. Gong, B., Ke, C. and Geng, X., "Synthesis of Monodisperse Poly (glycidylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Beads and Their Application in Separation of Biopolymers," *Chinese J. Chem.*, **22**(3), 283-289(2004).
12. Calleri, E., Massolini, G., Lubda, D., Temporini, C., Loiodice, F. and Caccialanza, G., "Evaluation of a Monolithic Epoxy Silica Support for Penicillin G Acylase Immobilization," *J. Chromatogr. A*, **1031**(1), 93-100(2004).
13. Wu, N., Dempsey, J., Yehl, P. M., Dovletoglou, A., Ellison, D. and Wyvratt, J., "Practical Aspects of Fast HPLC Separations for Pharmaceutical Process Development Using Monolithic Columns," *Analytica. Chimica. Acta.*, **523**(2), 149-156(2004).
14. Gritti, F., Piatkowski, W. and Guiochon, G., "Study of the Mass Transfer Kinetics in a Monolithic Column," *J. Chromatogr. A*, **983**(1), 51-71(2003).