

MAGDALENA PATUREJ, MIROŚŁAWA EL FRAY^{*)}

Politechnika Szczecińska
Instytut Polimerów
Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
^{*)} e-mail: mirfray@ps.pl

Zastosowanie chemii kombinatorycznej i metod *high-throughput* w syntezie i badaniach materiałów polimerowych

Streszczenie — Artykuł stanowi przegląd literaturowy dotyczący — wykorzystujących podejście chemii kombinatorycznej (CombiChem) — metod syntezy materiałów polimerowych, ze szczególnym uwzględnieniem polikondensacji, polimeryzacji rodnikowej, kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej oraz polimeryzacji z otwarciem pierścienia ROP. Omówiono urządzenia stosowane w procesach CombiChem, tj. reaktory konwencjonalne i mikrofalowe, opisano proces tworzenia wirtualnych bibliotek polimerowych, metody oczyszczania oraz sposoby analizy i charakterystyki tak otrzymywanych produktów. Oceniono obecny stopień wykorzystania CombiChem w projektowaniu i pozyskiwaniu nowych biodegradowalnych materiałów polimerowych.

Słowa kluczowe: chemia kombinatoryczna, synteza równoległa, metody wysoko wydajne.

APPLICATION OF COMBINATORIAL CHEMISTRY AND HIGH-THROUGHPUT METHODS IN THE SYNTHESIS AND INVESTIGATIONS OF POLYMER MATERIALS

Summary — The paper is a literature review of the methods, applying the combinatorial chemistry (CombiChem) approach, concerning the polymer materials syntheses, especially polycondensation (Table 1), radical polymerization, controlled radical polymerization and ring opening polymerization ROP. The equipment used in CombiChem processes, *i.e.* conventional and microwave reactors (Table 2, Fig. 1) were discussed. The process of formation of virtual polymer libraries and the methods of purification, analyses and characterization of the products obtained were described. The present degree of CombiChem application in design and preparation of novel biodegradable polymer materials was evaluated.

Key words: combinatorial chemistry, parallel synthesis, high-throughput methods.

METODY KOMBINATORYCZNE — CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Sukces związany z wykorzystaniem metod kombinatorycznych oraz wysokoprzepustowych (o dużych wydajnościach, *high-throughput*) w przemyśle farmaceutycznym przyczynił się w ostatniej dekadzie [1] do zastosowania takich technik także i w innych dziedzinach. Chemia kombinatoryczna (*Combinatorial Chemistry*, „CombiChem”) pozwala na równoczesne syntezywanie dużej liczby strukturalnie powiązanych ze sobą związków chemicznych przy użyciu różnorodnych substratów. Procedura taka znacznie przyspiesza proces tworzenia nowych cząsteczek, umożliwia redukcję kosztów i czasu syntezy [2, 3]. Pierwsze próby kombinatorycznego podejścia do poszukiwania materiałów podjęli ponad sto lat temu Edison [4] i Ciamician [5]. Edison przetestował ponad 1600 różnych materiałów zanim odkrył odpowiedni materiał na drucik żarowy do żarówek, natomiast Ciamician poddawał działaniu promieni słonecznych setki potencjalnie fotoaktywnych materiałów.

W zależności od sposobu prowadzenia procesu wyróżnia się syntezę klasyczną (statyczną) bądź dynamiczną. *Klasyczna chemia kombinatoryczna* opiera się na tworzeniu bibliotek kombinatorycznych zawierających rzeczywiste związki, podczas gdy podstawę *dynamicznej chemii kombinatorycznej* stanowi opracowywanie molekularnych lub supramolekularnych bibliotek, określanych jako wirtualne. Najważniejszym zastosowaniem strategii chemii kombinatorycznej jest poszukiwanie substancji biologicznie aktywnych, zwłaszcza leków. Wykorzystanie CombiChem w syntezie leków umożliwia otrzymywanie ich w jednym naczyniu reakcyjnym, z jednoczesnym uzyskiwaniem nawet miliona rozdzielanych następnie produktów (metoda „*split-and-mix*”) [2].

Procedura kombinatoryczna pozwala również, choć z pewnymi ograniczeniami, na wytwarzanie związków wielkocząsteczkowych o założonej określonej strukturze chemicznej i właściwościach. Poważnym problemem jest jednak wyodrębnianie polimerów z mieszaniny reakcyjnej (obecność rozmaitych monomerów wewnątrz

jednego naczynia reakcyjnego może prowadzić do powstawania polimerowych mieszanin). Dlatego też nowe materiały polimerowe uzyskuje się wykorzystując syntezę równoległą (*parallel synthesis*) tzn. każdy monomer ulega indywidualnej polimeryzacji w osobnym naczyniu reakcyjnym, dzięki czemu powstają „czyste” produkty [2].

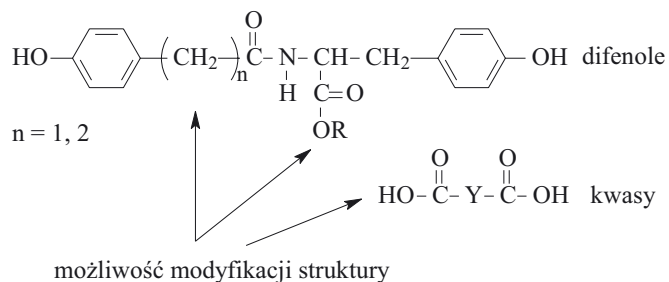
Zastosowanie technik kombinatorycznych w poszukiwaniu nowych materiałów polimerowych jest bardzo obiecujące ze względu na fakt, iż podczas procesu jest możliwa jednoczesna zmiana kilku parametrów, co z kolei pozwala na określenie nowych zależności między strukturą a właściwościami. Równocześnie, w toku syntezy równoległej można analizować wiele ważnych parametrów np. stopień polidispersji, ciężar cząsteczkowy, lepkość [6, 7] — dzięki czemu można tworzyć różne biblioteki danych.

NAJWAŻNIEJSZE METODY SYNTEZY POLIMERÓW WYKORZYSTUJĄCE CHEMIĘ KOMBINATORYCZNĄ

Głównym celem zastosowania syntezy kombinatorycznej w przypadku materiałów polimerowych jest skrócenie czasu wytwarzania nowych materiałów, szybsza optymalizacja warunków prowadzenia polimeryzacji oraz badanie zależności między strukturą a właściwościami produktu. Aparatura stosowana w równoległej, zautomatyzowanej i kombinatorycznej syntezie może być wykorzystywana do realizacji wszystkich metod polimeryzacji, jednak warto nadmienić, że ciągle największe problemy napotyka synteza układów o dużej lepkości.

Polikondensacja

Procesy polikondensacyjne zalicza się do najpowszechniej występujących w przyrodzie podstawowych typów reakcji otrzymywania polipeptydów i polisacharydów, dlatego też szereg syntetycznych polimerów również uzyskuje się metodą polikondensacji. Kombinatoryczne podejście do syntezy polimerów kondensacyjnych potencjalnie wykorzystywanych w medycynie po raz pierwszy zastosowano w 1997 r. [8–12]. Przeprowadzono kopolimeryzację 22 monomerów (8 kwasów dikarboksylovych oraz 14 difenoli pochodzących od L-tyrozyny), tworząc wszystkie możliwe kombinacje substratów, w wyniku czego otrzymano 112 ściśle naprzemiennych polimerów typu A-B. Uzyskano w ten sposób grupę analogów strukturalnych, zawierających pochodne aminokwasu L-tyrozyny, co umożliwiło sterowanie właściwościami makroskopowymi polimerów na drodze niewielkich zmian w strukturze (labilności) łańcucha głównego oraz długości i objętości grup bocznych (schemat A). W zbiorze difenoli zmienną był rodzaj podstawnika bocznego R oraz liczba grup metylenowych ($n = 1, 2$), podczas gdy w kwasach dikarboksylovych możliwa była modyfikacja struktury w wyniku zmiany



Schemat A. Materiały wyjściowe do utworzenia biblioteki poliarylanów [10]

Scheme A. Starting materials for the formation of a library of polyarylates [10]

fragmentu oznaczonego literą Y (grupy metylenowe lub metoksy o różnej liczbie atomów węgla) [8–10]. Badania wykazały, że otrzymane poliarylany ulegają biodegradacji oraz wykazują znaczną cytokompatybilność.

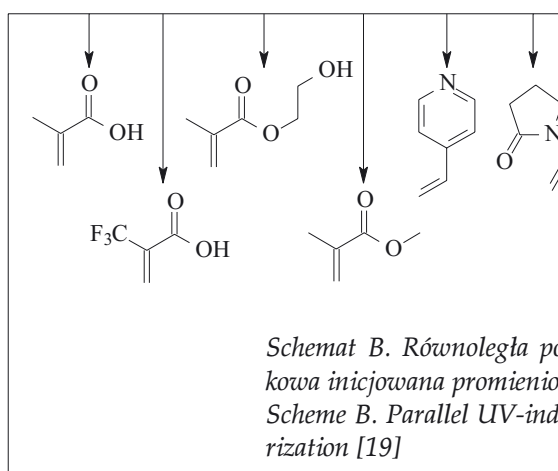
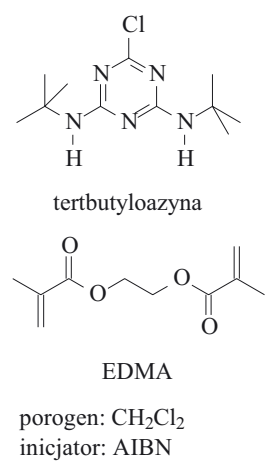
Jedną z podstawowych zalet syntezy kombinatorycznej stanowi możliwość uzyskania wielu rodzajów polimerów w dość krótkim czasie. Wykorzystując mechanizm addycji Michaela, zespół R. Langer otrzymał 140 typów polimerów estrowo-akrylanowych w ciągu dwóch tygodni (tabela 1) [13]. Zsyntetyzowane polimery podlegające kontrolowanej biodegradacji, okazały się interesującymi materiałami z punktu widzenia zastosowania jako wektory w terapii genowej.

W okresie kilku lat zespół R. Langer rozwinął bibliotekę do 2350 elementów. Po wyeliminowaniu polimerów nierozpuszczalnych w wodzie i wykazujących niewystarczające oddziaływanie z DNA, oceniano ponad pięćdziesiąt rodzajów polimerów pod względem efektywności transfekcji. Badania doprowadziły do zidentyfikowania dwóch nowych polimerów o poziomie transfekcji podobnym do poziomu transfekcji komercyjnie dostępnych reagentów opartych na lipidach [14].

Równoległą syntezę kombinatoryczną wykorzystano również do otrzymywania materiałów do zastosowań innych niż biomedyczne. W celu wytworzenia materiałów o właściwościach elektroluminescencyjnych O. Lavastre [15] — posługując się wyższym stopniem zautomatyzowania — poddał reakcji sprzęgania węgiel-węgiel, katalizowanej przez Pd, monomery dihalogenowe i dietylnowe. Prowadził równoległe 96 reakcji polimeryzacji w warunkach różnych kombinacji monomerów oraz katalizatora. Proces prowadzono w ciągu 24 h w temp. 60 °C, a właściwości fluorescencyjne materiałów zbadano za pomocą lampy UV. Porównanie charakterystyki fluorescencyjnej produktów uzyskanych metodą kombinatoryczną i klasyczną dowiodło, że podejście kombinatoryczne odzwierciedla rzeczywiste cechy polimerów. Efekty tych prac potwierdziły, że metoda *high-throughput* jest odpowiednim narzędziem do szybkiej i jakościowej oceny nowych związków jako potencjalnych diod elektroluminescencyjnych.

T a b e l a 1. Monomery diakrylowe (A—J) i aminy (1—12) użyte w syntezie poli(β -aminoestrów) [13]
T a b e l e 1. Diacrylate monomers (A—J) and amines (1—12) used in the syntheses of poly- β -aminoesters [13]

1		7		A		F	
2		8		B			
3		9		C		G	
4		10		D		H, I	
5		11		E		J	
6		12					



Ważnym aspektem uwzględnianym w toku opracowywania syntez nowych materiałów jest powtarzalność prowadzonych procesów, zwłaszcza wtedy, gdy produkty są przeznaczone do wykorzystania w skali przemysłowej. Prace realizowane w firmie General Electric wykazały [16], że zastosowanie całkowicie zautomatyzowanego podejścia kombinatorycznego w polimeryzacji stopowej bisfenolu A (BPA) i difenylowęglanu (DPC) pozwoliło na otrzymanie powtarzalnych serii polimerów (powtarzalność weryfikowano na podstawie pomiarów ciężarów cząsteczkowych metodą GPC).

Polimeryzacja rodnikowa

Procesy polimeryzacji łańcuchowej można z powodzeniem realizować stosując podejście kombinatoryczne. S. M. Alesso [17] przeprowadził zautomatyzowaną równoległą polimeryzację suspensyjną styrenu, diwiny-

lobenzenu i chlorometylowinylobenzenu inicjowaną 2,2'-azoizobutyronitrylem (AIBN). Otrzymał perełki polimeru różnej wielkości o powtarzalnym rozkładzie wymiarów ziaren.

Inny rodzaj polimerów uzyskał D. J. Gravert [18]. Podejście równoległe wykorzystał w syntezie blokowych kopolimerów szczepionych stosując inicjatory bifunkcyjne z grupami: α -nitrylodiazenową i 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-*N*-oksyłową (TEMPO). Inicjatory z grupami α -nitrylodiazenowymi poddawał wcześniejszej polimeryzacji z różnymi monomerami, a otrzymane produkty użył w charakterze makroinicjatorów polimeryzacji bloków z grupami TEMPO w podwyższonej temperaturze (70—130 °C).

Ciekawy typ polimeryzacji wolnorodnikowej inicjowanej promieniami słonecznymi prowadzonej wg podejścia równoległego opisał F. Lanza [19]. W tym przypadku zastosowano procedurę manualną, co pozwoliło

na syntezę i przebadanie ok. 60 rodzajów polimerów (schemat B).

Z kolei D. T. Williamson [20] wykorzystał podejście kombinatoryczne w polimeryzacji wolnorodnikowej poli(styreno-*co*-metakrylanu metylu) oraz poli(styreno-*co*-metakrylanu butylu) w sposób systematyczny zmieniając stosunki monomerów.

Kontrolowana polimeryzacja rodnikowa

Zautomatyzowane syntezy równoległe zastosowano również do kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, takiej jak: polimeryzacja rodnikowa z udziałem addycyjno-fragmentacyjnego odwracalnego przeniesienia (RAFT) [21, 22] oraz polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP) [23, 24].

Techniką polimeryzacji RAFT wytworzono kopolimery szczepione z kontrolowaną długością łańcucha w reaktorze równoległym zaopatrzone w automatyczny system dyspergowania [21]. Wyjściowe substraty o zmodyfikowanych chemicznie łańcuchach poddano polimeryzacji z różnymi monomerami otrzymując bibliotekę kopolimerów szczepionych. Procedura taka umożliwiła produkcję od 200 do 300 rodzajów kopolimerów na dobę.

Podobną zautomatyzowaną kontrolowaną polimeryzację rodnikową (MADIX) opisał P. Chapon [22]. Homopolimery i kopolimery diblokowe zsyntetyzował automatycznie w powtarzalny sposób z różnymi ksantogenianami. Analiza metodą chromatografii żelowej (GPC) wykazała, że polimery zsyntezowane automatycznie miały podobną budowę do budowy produktów otrzymanych w polimeryzacji klasycznej.

R. B. Nielson i G. Klaerner [23, 25] dowiedli, że można wytworzyć kopolimery styrenu i akrylanu butylu za pomocą równoległej i w pełni zautomatyzowanej polimeryzacji ATRP. W ten sposób uzyskano biblioteki liczące 48–140 elementów. W celu zdyspergowania wszystkich reagentów i przygotowania próbek do charakterystyki *high-throughput* użyto systemów całkowicie zautomatyzowanych.

Polimeryzacja z otwarciem pierścienia ROP

F. Nederberg [26] opisał równoległą kontrolowaną polimeryzację z otwarciem pierścieni: laktydowego i laktonowego. Badał katalityczne działanie 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydiny (DMAP) oraz 4-pirolidynopirydiny (PPY) w polimeryzacji laktydów wobec etanolu jako inicjatora (0,1–4 równoważników aminy w stosunku do alkoholu) i w warunkach zmiennego stosunku inicjatora do monomeru.

R. Hoogenboom [27, 28] metodą syntezy równoległej przeprowadził żyjącą kationową polimeryzację ROP 2-etylo-2-oksazoliny. Roztwór podstawowy inicjatora i monomeru w ponad 40 kombinacjach różnych stosunków poddawał dyspergowaniu w naczyniach reakcyj-

nych i wirował w ciągu 24 h w temp. 80 °C. W celu zakończenia polimeryzacji dodawał piperydynę, a otrzymane polimery automatycznie wytrącał i przenosił do fiolek. Analiza GPC i NMR wykazała zarówno powtarzalność, jak i żyjący charakter polimeryzacji.

APARATURA STOSOWANA DO SYNTEZY KOMBINATORYCZNEJ

Metody kombinatoryczne w syntezie polimerów stają się coraz bardziej atrakcyjne, dlatego też pojawia się konieczność projektowania i konstruowania różnorodnych reaktorów odpowiednich do prowadzenia licznych równoległych procesów polimeryzacji. Urządzenia takie muszą umożliwiać jednoczesne realizowanie syntezy polimerów, ich oczyszczanie i odbieranie (stąd też procesy te nazywane są *high-throughput*). Specjalistyczna aparatura wykorzystywana w chemii kombinatorycznej pozwala na przebieg polireakcji w warunkach różnych wartości ciśnienia i temperatury a także na pobieranie próbek produktu w określonych odstępach czasu w celu badania, np. kinetyki reakcji. Dodatkową trudnością są tu zmieniające się właściwości otrzymywanych jednocześnie polimerów, takie jak: ciężar cząsteczkowy, polidispersyjność, budowa blokowa itp.

Reaktory konwencjonalne

Jednym z typów reaktorów umożliwiającym jednocześnie prowadzenie wielostopniowej reakcji syntezy, następnie oczyszczanie i odbieranie produktów jest system Argonaut Quest 210 [29] zaprojektowany przez Argonaut Technologies. Pozwala on na równoległe przeprowadzenie ponad 20 syntez, pracę w przedziale temperatury -40–130 °C oraz w atmosferze gazu obojętnej. W jednostkach typu „*bank-to-bank transferring*” są realizowane wielostopniowe reakcje, a specjalny moduł automatyczny odpowiada za przemywanie stałych reagentów. W wyniku bezpośredniego odparowania rozpuszczalnika z mieszaniny, wielokrotnego przemywania i filtracji następuje wytrącenie i wyizolowanie produktu stałego. W systemie Argonaut Quest 210 można prowadzić syntezy zarówno w fazie stałej, jak i w roztworze.

Inny typ reaktora Argonaut Endeavor zaprojektowano do syntez realizowanych pod ciśnieniem zwiększonym do $34 \cdot 10^5$ Pa. W aparacie jest możliwy przebieg nawet 8 reakcji równocześnie w temperaturze pokojowej bądź wyższej (do 200 °C), a układ mieszadeł magnetycznych wykonuje pracę w roztworach polimerów o lepkości nawet do 1000 cP. Specjalne oprogramowanie (Endeavor Advanced Software) pozwala na w pełni zautomatyzowaną kontrolę ciśnienia, temperatury i szybkości mieszania, w wyniku której następuje natychmiastowa ocena wielu warunków procesu, co zwiększa tym samym jego wydajność. Endeavor zaprojektowano do prowadzenia polimeryzacji, hydrogena-

cji, a także do badania katalizatorów. Przykład zastosowania tego typu reaktora stanowi synteza polietylenu, gdzie pod ciśnieniem wprowadza się dodatek substancji stałej.

W omówionych reaktorach można wprowadzić prowadzić syntezy równoległe, jednak procesy te odznaczają się małym stopniem zautomatyzowania. Dlatego też o wiele bardziej interesujące są urządzenia w pełni zautomatyzowane wyposażone w specjalne dozowniki w postaci strzykawk. Urządzeniem tego typu jest Chemspeed AWS2000 [30] pracujący w przedziale temperatury -70 — 180 °C, w zależności od wybranego termostatu. Podwójne zastosowanie atmosfery obojętnej (pierwszej wewnątrz reaktora, drugiej w płaszczu) i obecność w zestawie specjalnej słuzki z kompletem rękawic, pozwalają na użycie do syntezy bardzo wrażliwych reagentów. Można je dozować i pobierać zarówno podczas mieszania bądź wytrząsania, jak i chłodzenia bądź ogrzewania. Odparowywanie w czasie rzeczywistym rozpuszczalników umożliwia realizowanie wielostopniowych syntez.

Dzięki wykorzystaniu zestawu Solid-Phase Synthesis wykonuje się równoległe, całkowicie zautomatyzowane procesy oczyszczania. Wysokowrzące rozpuszczalniki, takie jak: *N,N*-dimetyloformamid lub dimetylosulfotlenek mogą być bezpośrednio odparowywane z reaktorów. Istnieje również możliwość badania wstępnego etapu reakcji przy użyciu w pełni zautomatyzowanej chromatografii cienkowarstwowej TLC. Początkowe ogrzewanie naczyń reakcyjnych pozwala na szybkie określenie, np. energii aktywacji.

ASW2000 jest wykorzystywany w różnych dziedzinach chemii, zarówno w przemyśle, jak i w naukowych jednostkach badawczych. Z jego udziałem realizuje się polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu [31], polimeryzację z otwarciem pierścienia oksazolinowego [27], polimeryzację emulsyjną, syntezę poliestrów, poliamidów oraz poliolefin. W systemie urządzeń Chemspeed powstała również platforma zwana Accelerator [30], w której dużą dokładność dozowania substancji stałych zapewnia zautomatyzowany system ważenia próbek. Dodatkowo, z platformą jest zintegrowany 4-strzykawkowy dozownik do cieczy.



Rys. 1. Chemspeed ASW2000 (po lewej) i Chemspeed Accelerator (po prawej)

Fig. 1. Chemspeed ASW2000 — on left, and Chemspeed Accelerator — on right

Accelerator zaprojektowano do równoczesnego prowadzenia nawet 192 syntez organicznych, zwłaszcza polimerowych (rys. 1).

Wspomniany już Chemspeed ASW200P pozwala na przebieg reakcji w warunkach podwyższonego ciśnienia (100 bar), z dwoma różnymi gazami reakcyjnymi, każdy pod indywidualnym ciśnieniem w bloku, co daje możliwości zautomatyzowanego badania polimeryzacji np.: olefin (tabela 2).

SYSTAG oferuje różnego rodzaju reaktory (FlexyLab systems) [32], w których prowadzi się syntezy równoległe bądź operacje indywidualne, pod ciśnieniem do $60 \cdot 10^5$ Pa i w przedziale temp. -80 — 280 °C. Obecność mieszadeł mechanicznych z kontrolowaną szybkością mieszania gwarantuje pracę z roztworami o dużej lepkości. Dodatkowo, w systemie są możliwe: kontrola pH, automatyczna destylacja z detekcją temperatury wrzenia, rzeczywiste monitorowanie procesu za pomocą spektroskopii IR a także pobieranie próbek do analizy HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej). Maksymalnie 8 reaktorów równoległych ogranicza jednak liczbę jednocześnie prowadzonych syntez *high-throughput*.

Amtec GmbH zaprojektował Slurry Phase Reactor SPR16 [33] składający się z 16 pojedynczych reaktorów, w którym pobieranie próbek odbywa się nawet pod ciśnieniem, bez konieczności przerywania reakcji.

T a b e l a 2. Charakterystyka urządzeń stosowanych w reakcjach polimeryzacji
T a b l e 2. Characteristics of the equipment used in polymerization reactions

Charakterystyka	Argonaut Quest 210	Argonaut Endeavor	Chemspeed AWS2000	Chemspeed Accelerator
Temperatura, °C	-25—130	-25—200	-70—150	-70—150
Ciśnienie	atmosferyczne	$35 \cdot 10^5$ Pa	atmosferyczne	$100 \cdot 10^5$ Pa
Liczba syntez możliwych do przeprowadzenia	20	8	112	192
Indywidualna kontrola	<i>T</i>	<i>T, p</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
Reflux	—	—	+	+
Odparowanie rozpuszczalnika	+	—	+	+
Filtracja	+	—	+	+
Transport reagentów	+ (bank-to-bank)	—	+ (autosampler)	+ (autosampler)

Reaktory mikrofalowe

Do otrzymywania materiałów polimerowych coraz częściej stosuje się nowy typ procesów, mianowicie wysoko wydajne syntezy wspomagane mikrofalami. Główną zaletę użycia promieniowania mikrofalowego stanowi skrócenie czasu syntezy oraz kontrola parametrów reakcji [34]. Techniki mikrofalowe są obecnie wykorzystywane np. w procesach wulkanizacji gumy i wytwarzaniu kompozytów typu polimer/drewno [35].

Firma Discover System oferuje urządzenia do wysoko wydajnej syntezy organicznej wspomaganej mikrofalami [36]. Prosty system Discovery umożliwia kontrolowanie wartości temperatury i ciśnienia.

TWORZENIE WIRTUALNYCH BIBLIOTEK POLIMEROWYCH

Zastosowanie podejścia kombinatorycznego do otrzymywania polimerów wiąże się z użyciem zaawansowanych urządzeń do prowadzenia syntez równoległych. Alternatywnym rozwiązaniem jest posługiwanie się technikami komputerowymi, za pomocą których szybko generuje się liczne różnorodne struktury o, z góry założonym zastosowaniu, następnie skutecznie się selekcjonuje oraz określa zależności między strukturą polimeru a jego cechami. Dzięki zaawansowanemu oprogramowaniu nie tylko tworzy się wirtualne biblioteki nowych nieopisanych wcześniej produktów, lecz również przewiduje się ich właściwości.

Modele półdoświadczałne wykorzystujące wyniki uzyskane z pomiarów, pozwalają raczej na racjonalny a nie intuicyjny wybór próbek do szczegółowych badań. Jak dotąd opisano zastosowanie komputerowych modeli LAD (*Logical Analysis Data*), ANN (*Artificial Neural Network*) i QSPR (*Quantitative Structure-Performance Relationship*) do określania wzrostu komórek i adsorpcji protein na materiałach z biblioteki J. Kohna [37–39].

Model QSPR [39], podobnie jak całą koncepcję chemii kombinatorycznej opracowano na potrzeby przemysłu farmaceutycznego. QSPR poddaje ocenie elementy biblioteki za pomocą molekularnych deskryptorów (np. kwantyfikacji pewnych cech struktury cząsteczki: liczby atomów, wiązań, itp.). Umożliwiają one wyrażenie parametrów fizykochemicznych badanych związków w postaci liczbowej oraz przeprowadzenie analizy statystycznej i sformułowanie odpowiedniego równania. Model QSPR wiąże właściwości materiałów z molekularnymi deskryptorami przy użyciu regresji częściowych najmniejszych kwadratów. Wykorzystując całkowity indeks giętkości TFI (*total flexibility index*, deskryptor, określony jako liczba atomów węgla/tlenu w zmiennym obszarze w łańcuchu głównym i bocznym) oraz jego zależność od temperatury zeszklenia T_g i kąta zwilżania θ w odniesieniu do zbioru znanych polimerów, udało się przewidzieć wartości T_g i θ nowych, niezbadanych produktów, a tym samym w dużym stopniu prognozować

ich właściwości. Sukces przewidywania adsorpcji protein i wzrostu komórek na materiałach polimerowych z biblioteki J. Kohna pokazuje, że jedynie integracja metod kombinatorycznych i komputerowych pozwala na szybkie i efektywne projektowanie nowych polimerów, a ponadto umożliwia korelowanie parametrów projektowych tych materiałów odnoszących się głównie do struktury chemicznej z ich właściwościami, zwłaszcza na poziomie oddziaływań komórka–biomateriał, a także jednocześnie ograniczanie zakresu badanych materiałów do małego zbioru „wirtualnych związków” [2].

OCZYSZCZANIE PRODUKTÓW CHEMII KOMBINATORYCZNEJ

W celu wykonania bardziej szczegółowych badań analitycznych materiału polimerowego najczęściej poddaje się go oczyszczaniu. Jeden z najprostszych sposobów oczyszczania stanowi wytrącanie, umożliwiające oddzielenie wielkocząsteczkowych produktów od pozostałych nieprzereagowanych monomerów. Całkowicie zautomatyzowane metody filtracji wytrąconych polimerów są realizowane w reaktorach (Argonaut Quest 205/210, wszystkie urządzenia w systemie Chemspeed).

Inną, powszechną techniką usuwania zanieczyszczeń z polimerów jest ekstrakcja ciecz/ciecz [40]. W przypadku urządzeń Chemspeed separację fazową realizuje się za pomocą zaprogramowanej objętości warstwy organicznej oraz wodnej. MSW500 umożliwia równoległą ale manualną ekstrakcję ciecz/ciecz, natomiast Argonaut dostarcza zautomatyzowanych systemów Flash Master II służących do wielokrotnego oczyszczania próbki (do 10 kolumn), wmywania gradientowego i do bezpośredniej rejestracji widma UV-Vis.

Wysoko wydajne badania prowadzone w celu uzyskania materiału o wymaganych właściwościach polegają na testowaniu dużych bibliotek w krótkim czasie, dlatego też ogromna liczba danych musi być efektywnie przetworzona i zinterpretowana. Obróbka tak dużej ilości wyników w tradycyjny sposób jest niemożliwa, dlatego wysiłek naukowców kieruje się na rozwijanie nowych oprogramowań ułatwiających przetwarzanie danych. Dostępne w handlu oprogramowania Avantium Technologies — VirtualLab i Symyx Library Studio pozwalają na zautomatyzowane projektowanie doświadczenia [41], jednak wyzwaniem ciągle pozostaje selekcja ważnych danych z miliona wyników i ich wizualizacja konieczna do określenia odpowiednich deskryptorów.

KLASYCZNE METODY CHARAKTERYSTYKI POLIMERÓW WYKORZYSTYWANE DO OPISU WŁAŚCIWOŚCI PRODUKTÓW CombiChem

W przypadku prowadzenia wielu równoległych syntez jest konieczne szybkie i dokładne scharakteryzowanie właściwości produktów. Wysoko wydajną charakte-

rystykę polimerów, prowadzącą do uzyskania danych w sposób szybki i zautomatyzowany, realizuje się dwiema metodami: w wyniku redukcji czasu potrzebnego na zbadanie pojedynczej próbki, bądź wykonania pomiarów kilku próbek jednocześnie. Ponadto, już minimalna liczba oznaczeń powinna dostarczać wyczerpujących informacji do badań wstępnych, a wyniki odnoszące się do próbek małej objętości muszą być powtarzalne i porównywalne z danymi uzyskanymi w testach prowadzonych w większej skali. Odpowiedni dobór metod badawczych w zależności od rodzaju materiałów zapewnia zaś projektowanie doświadczenia (*Design of Experiment, DoE*).

Chromatografia

Chromatografia żelowa (rozdzielania) SEC i wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC to metody czasochłonne (czas badania 15–30 min), dlatego też efektywne wykorzystanie ich do charakterystyki produktów syntezy kombinatorycznej wymaga skrócenia czasu pomiaru. Jednym z rozwiązań jest skrócenie kolumny [42]. Analiza wstrzykowo-przepływowa (*flow injection analysis, FIA*, system instalowany przed kolumną), pozwala natomiast na zautomatyzowane wstrzykiwanie próbki na ciągle przepływający strumień eluentu. Polimer Laboratories i Symyx rozwinęły szybki system SEC, obejmujący oba wyżej opisane rozwiązania (PL XT-20 i PL RS-20). W tym przypadku czas analizy trwa 2–5 min [43].

Innym sposobem ograniczenia czasu oznaczania jest użycie — zamiast tradycyjnie wypełnionych — kolumn monolitycznych. Konwekcja przez duże pory monolitu usprawnia transport masy dużych makrocząstek, zmniejsza tarcie wewnętrzne i ściśliwość. Porównanie ciężarów cząsteczkowych określonych z zastosowaniem handlowej wypełnionej oraz monolitycznej kolumny pokazało, że stopień rozdziału był zbliżony, a odchylenia od wartości ciężarów cząsteczkowych i czas potrzebny na pomiar były znacznie mniejsze w przypadku użycia kolumny z wypełnieniem monolitycznym [44].

Chromatografię żelową (GPC) często wykorzystuje się do oznaczania ciężarów cząsteczkowych polimerów oraz ich dyspersji. Specjalnie zaprojektowane systemy GPC wyposażone w krótsze i wysokosprawne kolumny umożliwiające równoległe pomiary oraz analizę FIA, pozwalają na zredukowanie do 90 % czasu potrzebnego do analizy. Jest to zwłaszcza korzystne w przypadku zastosowania wysokiej temperatury, gdyż ogranicza degradację termiczną materiału [45]. Prawie wszystkie opisane do chwili obecnej w literaturze podejścia równoległe, wykorzystują konwencjonalne systemy GPC [9, 11, 15], jednak ultraszybkie techniki badawcze GPC również są dostępne w handlu. Wysokosprawne kolumny dostarcza np.: Polymer Standards Service [46], Waters (także kolumny wysokotemperaturowe) [47], BioChromLabs, Inc. [48]. Symyx wprowadził na rynek

systemy Rapid GPC [25], w ramach których monitoruje się proces polimeryzacji, określa ciężary cząsteczkowe i analizuje dane w czasie rzeczywistym.

Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu technik wysokosprawnej i konwencjonalnej GPC pokazało, że metoda wysokosprawna może mieć praktyczne zastosowanie do oznaczania ciężarów cząsteczkowych bibliotek polimerowych.

Mikroskopia

Wykorzystanie najprostszych technik optycznych do monitorowania w czasie rzeczywistym właściwości polimerów jest bardzo obiecujące. Metody te są bowiem szybkie, nie powodują destrukcji próbki, stosunkowo łatwo je zminiaturyzować i uczynić równoległymi. Jednak zastosowanie niektórych z nich jest skomplikowane, gdyż potrzebne są wyspecjalizowane narzędzia chemometryczne a także jest konieczne wprowadzanie płytkowych czytników UV-Vis dających możliwość prowadzenia pomiarów równoległych i uzyskiwania szybkich danych. Za pomocą mikroskopu optycznego [49], w kombinatoryczny sposób zbadano krystalizację folii z izotaktycznego polistyrenu (iPS), a wyniki, np. temperaturową zależność szybkości krystalizacji, łącznie z obrazami mikroskopowymi otrzymano w czasie krótszym niż dwa dni.

Wykorzystanie mikroskopii sił atomowych (AFM) pozwala na utworzenie mikroskopowej mapy opisującej zarówno topografię powierzchni, jak i jej właściwości, m.in. tarcie, adhezję, rozkład ładunku elektrostatycznego, oraz strukturę domen magnetycznych. Technika ta nie zawsze jest jednak stosowana do wykonywania wielokrotnych, pojedynczych pomiarów ze względu na długi czas badania.

Zautomatyzowany sposób obrazowania powierzchni materiałów może posłużyć do określania zależności pomiędzy warunkami prowadzenia procesu a wymiarami cząstek i ich rozkładem. AFM okazała się skuteczną metodą badania folii z diblokowych kopolimerów polistyren-*b*-poli(metakrylan metylu) PS-*b*-PMMA [50] oraz do oceny wpływu grubości próbki na energię powierzchniową materiału [51].

Spektroskopia

Techniki spektroskopowe dostarczające informacji na temat budowy i struktury chemicznej, jak również właściwości materiałów polimerowych można z powodzeniem stosować do badania produktów CombiChem. Spektroskopia FT-IR umożliwia zarówno ilościową, jak i jakościową analizę, zatem stopień przereagowania monomerów można ocenić na podstawie intensywności odpowiadających mu sygnałów na widmie.

Za pomocą spektrometru Nicolet-Nexus 670 FT-IR wyposażonego w detektor Hg-Cd-Te chłodzony ciekłym gazem, można badać bardzo cienkie folie [52].

Spektrometry IR i NIR produkują: Brucker (seria VECTOR 22/N) [53], ThermoElectron [54] (Nicolet Nexus), Buchi [55] i TheMathWorks [56]. Są to jednak urządzenia nie mające autosamplera, dlatego wykorzystanie możliwości metod spektroskopowych o wysokiej przepustowości jest ograniczone do aparatów Pike Technology [57].

ATR-FT-IR pozwala na bezpośrednie charakteryzowanie polimerów bez ich przetwarzania, doskonale więc nadaje się do szybkiego badania dużej liczby produktów. Ograniczenie czasu przygotowywania próbek skutkuje zwiększeniem szybkości oznaczeń do 40 próbek/h.

Spektroskopia masowa MALDI-TOF-MS to niezwykle użyteczna metoda określania ciężarów cząsteczkowych, ich rozkładu oraz analizy grup końcowych polimerów [58]. Technika wielowarstwowej aplikacji [59] pozwala na szybkie przygotowywanie próbek, a zatem skrócenie i usprawnienie analizy. Dodatkową zaletę stanowi miniaturyzacja próbek, dzięki czemu w urządzeniu MALDI umieszcza się ich jednocześnie co najmniej 400 razy więcej niż w konwencjonalnej metodzie.

Pomiary lepkości

Pomiary lepkości powszechnie stosuje się w celu szybkiego oszacowania ciężarów cząsteczkowych polimerów, określenia zachowania się polielektrolitów bądź oceny stopnia agregacji itp. Ten rodzaj badań jest istotny zwłaszcza w przypadku poliolefin, gdyż jedyną alternatywę stanowi tu wysokotemperaturowa GPC. Handlowo dostępne systemy pozwalają na równoległe prowadzenie pomiarów lepkości wraz ze zautomatyzowanym rozcieńczaniem i dozowaniem [60], jednak jak dotąd nie opisano ich wykorzystania w praktyce.

Nanoidentyfikacja

Metody badań nanostruktury, w tym także nanoidentyfikacja (obejmująca obrazowanie skaningowe) stanowią ważne narzędzie wykorzystywane do oceny materiałów polimerowych. Umożliwiają one pomiary quasi-statyczne parametrów takich jak: twardość, moduł zredukowany i odporność na ścieranie. Na rynku są dostępne urządzenia do nanoidentyfikacji, m.in. Nanoindenter XP firmy MPS Inc [61], Nanoindenter i Triscope firmy Hysitron [62] i kilka systemów oferowanych przez Veeco [63]. Rozwój specjalnych technik pomiarowych, np. nano-DMA umożliwił badanie miękkich polimerów (elastomerów) i następnie określenie w nanoskali właściwości lepkosprężystych materiałów polimerowych w odniesieniu do biomateriałów, farb, dielektryków, gum, elastomerów itp. Urządzenie Quantitive Stiffness Mapping pozwala na pomiar ok. 250 000 modułów w ciągu ok. 2 h, co świadczy o dużej przepustowości systemu.

Analiza rentgenowska

Analiza rentgenowska jako nieniszcząca metoda analizy bardzo często służy do oceny materiałów polimerowych. Na przykład, dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego (XRD) stosuje się do badania nanokompozytów polimerowych [64], oznaczania naprężenia szczątkowego kompozytów polimerowych [65] oraz ciekłych kryształów [66]. Urządzenie D8 Discover firmy Bruker [67] wykorzystuje pomiary refraktometrii rentgenowskiej i wysoko rozdzielczej dyfrakcji promieni X do wyznaczania cech powierzchniowych, takich jak grubość, gęstość, chropowatość. Inne zautomatyzowane dyfraktometry promieniowania rentgenowskiego produkują m.in. Crystal Logic Inc [68] i spectroscopyNOW [69]. Urządzenie NanoSTAR Brukera [67] umożliwia analizę wymiarów i rozkładu nanostruktur polimerów, materiałów biologicznych, włókien i nanoproszków. NanoSTAR określa w sposób zautomatyzowany zarówno w cieczach, jak i proszkach kształty nanostruktur i ich orientację. Łączy w sobie technikę szeroko- (WAXS) i wąskokątowego (SAXS) rozpraszania promieni rentgenowskich z nanografią rentgenowską. Chociaż NanoSTAR nie zaprojektowano specjalnie do badań wysoko wydajnych, a kombinacja pomiarów SAXS/WAXS stanowi pewne ograniczenia, to jednak stosuje się go w charakterze uniwersalnego narzędzia do pomiarów nanostrukturalnych.

Pomiary kąta zwilżania i analiza termiczna

Pomiary kąta zwilżania służą do oceny właściwości materiałów do różnych zastosowań, m.in. w farmacji (zwilżalność, energia powierzchniowa), w przemyśle drukarskim (zwilżalność papieru, metalu, gumy) i tekstylnym (zwilżalność włókien) oraz w kosmetyce (badanie stabilności emulsji). DataPhysic opracował w pełni zautomatyzowane urządzenie (ACA50) [70], umożliwiające pomiary kąta zwilżania statycznego i dynamicznego, napięcia powierzchniowego i napięcia międzyfazowego przy użyciu nawet sześciu różnych rozpuszczalników. Zautomatyzowany system zapewnia dozowanie próbek, natomiast odpowiednie oprogramowanie pozwala na tworzenie procedury pomiaru i kierowanie nią, a także obliczanie, np. swobodnej energii powierzchniowej oraz kąta zwilżania. Inne dostępne urządzenia o podobnych możliwościach to: Drop Shape Analysis System G10/DSA10 Krussa [71], urządzenia z firmy OEG [72] lub Future Digital Scientific [73].

Aparaty do analizy termicznej zaopatrzone w systemy autosamplero- w, są dostosowane do prowadzenia analiz wysoko wydajnych. Shimadzu PY2020 Thermal Analysis System jest wyposażony w dozownik 48-próbkowy i może być połączony ze spektrometrem masowym [74] dzięki czemu badanie kinetyki polimeryzacji można prowadzić w roztworze w wyniku monitorowania podczas reakcji zawartości monomeru w stosunku

do ilości standardu wewnętrznego. PY2020 pozwala na selektywną analizę GC/MS polimerów w czasie rzeczywistymi i w szerokim zakresie temperatury na drodze pirolizy, termicznej desorpcji/pirolizy i analizy wydzielanego gazu (EGA).

CHEMIA KOMBINATORYCZNA W SYNTEZIE BIOMATERIAŁÓW POLIMEROWYCH

Wykorzystanie CombiChem do otrzymywania różnorodnych związków staje się szczególnie interesujące ze względu na pozyskiwanie nowych biodegradowalnych materiałów o potencjalnym zastosowaniu, celowanej i personalizowanej terapii lekowej lub genowej oraz inżynierii tkankowej. Pierwsza kombinatorycznie zaprojektowana biblioteka biomateriałów [9–11] dostarczyła szczegółowych informacji na temat zależności między ich strukturą a właściwościami, dzięki czemu jeden z elementów biblioteki użyto jako materiał do rekonstrukcji przepukliny [75]. Trudność w zastosowaniu podejścia kombinatorycznego w dziedzinie biomateriałów wynika ze złożoności żywych komórek i tkanek oraz ich interakcji z materiałami. Inne ograniczenie stanowi brak odpowiednich urządzeń do przeprowadzania niezbędnych specjalistycznych badań produktów, związanych, m.in. z adsorpcją protein na powierzchni biomateriału, szybkością i mechanizmem jego degradacji, interakcjami komórka–materiał, badaniem biokompatybilności *in vitro*. Istnieją nieliczne laboratoria rozwijające metody szybkiego badania adsorpcji protein i wzrostu komórek na powierzchni biomateriału [76].

Wykorzystanie metod komputerowych do badania biomateriałów jest również utrudnione ze względu na wspomnianą wcześniej wrodzoną kompleksowość komórek i tkanek oraz ich kontakty z materiałami. Ograniczenie stanowi także fakt, że modele semi-doświadczalne sprawdzają się jedynie w połączeniu z dużymi zbiorami różnorodnych danych.

PODSUMOWANIE

Techniki kombinatoryczne i wysoko wydajne pozwalają zarówno na tworzenie, jak i na badanie materiałów polimerowych w znacznie krótszym czasie niż metody konwencjonalne. Ponadto, dane uzyskane ze specjalnych bibliotek polimerowych ułatwiają dokładniejsze zrozumienie zależności między strukturą a właściwościami produktów.

Synteza równoległa wydaje się bardzo użyteczna do otrzymywania polimerów, obarczona jest jednak kilkoma wadami. Na przykład, mniejsze wymiary reaktorów nie zawsze dostarczają poglądu na rzeczywisty przebieg procesu, większy jest bowiem wpływ, np. zanieczyszczeń na czystość produktów. W reakcjach wymagających udziału katalizatora (w stosunku, np. 1:10000 do reagenta), pojawiają się różnice wydajności procesu podczas pracy z małymi ilościami monomerów. Kolej-

nym ograniczeniem jest zbyt duża (do przenoszenia i mieszania) lepkość roztworów polimerów. Kluczowy problem może stanowić również rachunek ekonomiczny — pojedynczy proces polimeryzacji nie wymaga dużej ilości materiału, w odróżnieniu od, np. 96 równoległych polireakcji.

Opisano już kilka przykładów równoległego i zautomatyzowanego podejścia w dziedzinie przygotowywania i charakterystyki materiałów polimerowych. W obszarze tworzenia materiałów polimerowych podejście kombinatoryczne znajduje się nadal na etapie początkowym, należy się spodziewać, że potrzeba opracowywania nowych materiałów o specyficznych właściwościach w najbliższej przyszłości spowoduje znaczne poszerzenie obszaru wykorzystywania metod CombiChem.

LITERATURA

- [1] Thomson L. O., Elman J. A.: *Chem. Rev.* 1996, **96**, 555.
- [2] Kohn J.: *Nat. Mater.* 2004, **3**, 745.
- [3] Takeuchi I., Lauterbach J., Fasolka M. J.: *Mater. Today* 2005, **10**, 18.
- [4] Bryan G. S.: „Edison, the Man and his work”, Knopf, London 1930.
- [5] Freemantle M.: *Chem. Eng. News* 1998, **76**, 37.
- [6] Hoogenboom R., Meier M. A. R., Schubert U. S.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 15.
- [7] Meier M. A. R., Hoogenboom R., Schubert U. S.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2004, **25**, 21.
- [8] Brocchini S.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001, **53**, 123.
- [9] Brocchini S., James K., Tangpasuthadol V., Kohn J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, **42**, 66.
- [10] Brocchini S., James K., Tangpasuthadol V., Kohn J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1997, **119**, 4553.
- [11] Fiordeliso J., Bron S., Kohn J.: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1994, **5**, 497.
- [12] Moore J. S., Stupp S. I.: *Macromolecules* 1990, **23**, 65.
- [13] Lynn D. M., Langer R.: *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 10761.
- [14] Anderson D. G., Lynn D. M., Langer R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, **42**, 3153.
- [15] Lavastre O., Illichev I., Jegou G., Dixneuf P. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**, 5278.
- [16] *Pat. US 6 307 004* (2001).
- [17] Alesso S. M., Yu Z., Pears D., Worthington P. A., Luke R. W. A., Bradley M.: *J. Comb. Chem.* 2001, **3**, 631.
- [18] Gravert D. J., Datta A., Wentworth P., Janda K. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 9481.
- [19] Lanza F., Sellergren B.: *Anal. Chem.* 1999, **71**, 2092.
- [20] Williamson D. T., Long T. E.: *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 2001, **42**, 634.
- [21] Charmot D., Mansky P., Kolosov O., Benoit D., Klarner G., Jayaraman M., Piotti M., Chang H. T., Nava-Salgada V.: *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 2001, **42**, 627.
- [22] Chapon P., Mignaud C., Lizarraga G., Destarac M.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 87.
- [23] Nielson R. B., Safir A. L., Petro M., Lee T. S., Huefner P.: *Polym. Mater. Sci. Eng.* 1999, **80**, 92.
- [24] Zhang H., Fijten M. W. M., Hoogenboom R., Reinierkes R., Schubert U. S.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 81.
- [25] Klaerner G., Safir A. L., Chang H. T., Petro M., Nielson R. B.: *Polym. Prep.* 1999, **40**, 469.
- [26] Nederberg F., Conner E. F., Moller M., Glauser T., Hedrick J. L.: *Angew.*

- Chem.* 2001, **113**, 2784. [27] Hoogenboom R., Fijten M. W. M., Schubert U. S.: *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 2002, **43**, 969. [28] Hoogenboom R., Fijten M. W. M., Meier M. A. R., Schubert U. S.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 92. [29] <http://www.argotech.com>. [30] <http://www.chemspeed.com>.
- [31] Zhang H., Hoogenboom R., Fijten M. W. M., Schubert U. S.: *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 2002, **43**, 17. [32] <http://www.systag.ch>. [33] <http://www.amtec-chemnitz.com>. [34] Buchmeiser M. R., Lubbad S., Mayr M., Wurst K.: *Inorg. Chim. Acta* 2003, **345**, 145. [35] Clark D., Folz D.: *Adv. Sci. Technol.* 2003, **31**, 367. [36] <http://www.cemsynthesis.com>. [37] Abramson S., Alexe G., Hammer P. L., Kohn J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 2005, **73A**, 116. [38] Smith J. R., Seyda A., Weber N., Knight D., Abramson S., Kohn J.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2004, **25**, 127. [39] Kholodovych V., Smith J. R., Knight D., Abramson S., Kohn J., Welsh W. J.: *Polymer* 2004, **45**, 7367. [40] Cheng S., Corner D. D., Williams J. P., Meyers P. L., Boger D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 2567.
- [41] Schmatloch S., Meier M. A. R., Schubert U. S.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 33. [42] <http://www.polymerlabs.com>. [43] <http://www.polymerlabs.com/gpc/plxt20.htm#middle>. [44] Lubbad S., Buchmeiser M. R.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2002, **23**, 617. [45] Pasch H., Kilz P.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 104. [46] <http://www.polymer.de>. [47] <http://www.waters.com>. [48] <http://www.biochrom1.com>.
- [49] Beers K. L., Douglas J. F., Amis E. J., Karim A.: *Langmuir* 2003, **19**, 3935. [50] Smith A. P., Douglas J. F., Mederith J. C., Amis E. J., Karim A.: *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 2001, **39**, 2141.
- [51] Smith A. P., Sehgal A., Douglas J. F., Karim A., Amis E. J.: *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 131. [52] <http://www.thermonicolet.com>. [53] <http://www.bruckeroptics.com>. [54] <http://www.thermo.com>. [55] <http://www.nirsolutions.com>. [56] <http://www.mathworks.com>. [57] <http://www.piketech.com>. [58] Nielson M. W. F.: *Mass Spectrom. Rev.* 1999, **18**, 309. [59] Meier M. A. R., Schubert U. S.: *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2003, **17**, 713. [60] <http://www.lauda.de>.
- [61] <http://www.mts.com>. [62] <http://www.hysitron.com>. [63] <http://www.veeco.com>. [64] Biswas M., Ray S. S.: *Adv. Polym. Sci.* 2001, **155**, 167. [65] Balasingh C., Singh A. K.: *Met. Mater. Processes* 2000, **2**, 269. [66] Sinha S. K., Sunil K.: *Liq. Cryst.* 2001, 333. [67] <http://www.bruker-axs.com>. [68] <http://www.xtallogic.com>. [69] <http://www.spectroscopynow.com>. [70] <http://www.dataphysics.de>.
- [71] <http://www.kruss-usa.com>. [72] <http://www.oeg-messtechnik.de>. [73] <http://www.fdsc.com>. [74] <http://www.laboratorytalk.com>. [75] Kohn J.: *Med. Device. Develop.* 2006, 35. [76] Weber N., Bolikal D., Bourke S. L., Kohn J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, **68**, 496.

Otrzymano 13 XII 2007 r.