

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV MATERIÁLŮ

**Příprava a charakterizace magnetických nosičů  
z hypersít'ovaných polystyrenových mikročástic a jejich  
použití v biosenzoru**

Zkrácená verze dizertační práce

**Petr Šálek**  
Praha 2012

Školitel: Ing. Daniel Horák, CSc.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	6
2 CÍL PRÁCE.....	7
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Polymerizační techniky pro přípravu mikročastic .....	8
3.1.1 <i>Suspenní polymerizace</i> .....	8
3.1.2 <i>Emulzní polymerizace</i> .....	9
3.1.3 <i>Disperzní polymerizace</i> .....	11
3.1.4 <i>Srážecí polymerizace</i> .....	12
3.1.5 <i>Metoda vícestupňového botnání a polymerizace</i> .....	12
3.1.6 <i>Mikrofluidní způsob</i> .....	13
3.2 Porézní částice.....	13
3.2.1 <i>Hypersíťování</i> .....	14
3.3 Magnetické polymerní částice .....	14
3.3.1 <i>Magnetické nosiče připravované z porézních částic</i> .....	15
3.4 Biosenzor .....	15
3.4.1 <i>Kombinace biosenzoru a protilátky</i> .....	16
4 CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH MIKROČÁSTIC .....	17
4.1 Morfologie .....	17
4.2 Specifický povrch .....	17
4.3 Rtuťová porozimetrie .....	18
4.4 ATR FTIR spektroskopie.....	18
4.5 Měření magnetických vlastností .....	18
4.6 Stanovení obsahu elementárních prvků .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
5.1 Disperzní polymerizace St a DVB stabilizovaná HPC .....	20
5.1.1 <i>P(St-DVB) mikročastice síťované 0.3 hm.% DVB</i> .....	20
5.1.2 <i>P(St-DVB) mikročastice síťované 1 hm.% DVB</i> .....	20
5.2 Disperzní polymerizace St a DVB stabilizovaná PVP.....	22
5.2.1 <i>P(St-DVB) mikročastice síťované 1-5 hm.% DVB</i> .....	22
5.3 Hypersíťování P(St-DVB) mikročastic.....	22
5.3.1 <i>Mikročastice obsahující 0.3 hm.% DVB</i> .....	22
5.3.2 <i>Mikročastice obsahující 1 hm.% DVB</i> .....	23
5.3.3 <i>Hypersíťování P(St-1-5%DVB) mikročastice</i> .....	24
5.4 Funkcionalizace hypersíťovaných částic a srážení oxidu železa v jejich pórech .....	24
5.4.1 <i>Hypersíťované P(St-1%DVB) mikročastice se sulfonovými skupinami</i> .....	24
5.4.2 <i>Hypersíťované P(St-5%DVB) mikročastice s aminovými skupinami</i> .....	25
5.5 Aplikace magnetických mikročastic v imunosenzoru - elektrochemická detekce bílkovin .....	25

6 ZÁVĚR.....	27
7 LITERATURA .....	30
8 SEZNAM ZKRATEK .....	36
9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA.....	38
9.1 Články .....	38
9.2 Příspěvky na konferencích .....	38

## **ABSTRAKT**

Cílem dizertační práce bylo vyvinout a charakterizovat funkcionalizovaný vysoce magnetický polymerní nosič mikrometrové velikosti s úzkou distribucí velikostí, který bude vhodný pro následné bioaplikace. Přitom byl sledován vztah mezi strukturou a vlastnostmi produktu. Výchozí monodisperzní poly(styren-*co*-divinylbenzenové) [P(St-DVB)] mikročástice s různým obsahem divinylbenzenu (DVB) byly připraveny disperzní polymerizací. Sledován byl vliv typu rozpouštědla, iniciátoru, koncentrace a způsobu dávkování DVB na morfologii, velikost a distribuci velikostí částic. Aby byly částice porézní s velikostí pórů v řádu desítek nanometrů, byly nízké zesítné P(St-DVB) mikročástice hypersíťovány za přítomnosti chloridu číničitého jako katalyzátoru. Dosaženo bylo vysokých hodnot specifického povrchu částic ( $> 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ) a vysokého obsahu mikropórů ( $\sim 0.6 \text{ ml/g}$ ). Samotnému hypersíťování předcházela chlormethylace mikročástic. Studován byl vliv tří různých chlormethylačních činidel na porézní vlastnosti produktu. Mikročástice byly následně funkcionalizovány sulfonovými nebo aminovými skupinami, které usnadnily zachycení magnetického oxidu železa vysráženého uvnitř porézní struktury. Na funkcionalizované vysoce magnetické mikročástice byl posléze imobilizován anti-ovalbumin, ovalbumin a nakonec anti-ovalbumin značený křenovou peroxidázou. Přidáním peroxidu vodíku k suspenzi takovýchto mikročástic došlo ke změně elektrického proudu, což umožnilo kvalitativní detekci ovalbuminu imobilizovaného na funkcionalizovaných magnetických mikročásticích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Disperzní polymerizace, styren, divinylbenzen, mikročástice, hypersíťování, magnetický, ovalbumin, biosenzor.

## **ABSTRACT**

With the aim to develop and characterize a functionalized highly magnetic polymer carrier of micrometer size and of narrow particle size distribution that will be suitable for biological applications, hypercrosslinked microspheres were prepared. Simultaneously, the relation between structure and properties of product was observed. Condition of dispersion polymerization were optimized to obtain starting monodisperse poly(styrene-*co*-divinylbenzene) [P(St-DVB)] microspheres. The P(St-DVB) microspheres of different degree of crosslinking were prepared and effect of some polymerization parameters, such as type of solvent, initiator, concentration and mode of DVB addition on morphology, size and particle size distribution were investigated. The starting microspheres were hypercrosslinked to obtain microporous inner structure. Hypercrosslinked particles had very large specific surface area ( $> 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ) and high content of micropores ( $\sim 0.6 \text{ ml/g}$ ). First, P(St-DVB) microspheres were chloromethylated using three different chloromethylation agents to regulate their porous properties. Hypercrosslinking was achieved by the addition of stannic chloride as a catalyst and by increasing a temperature. The hypercrosslinked microspheres were then functionalized with sulfo- or aminogroups. The functional groups captured precipitated iron oxide inside porous structure of the microspheres and also served as a reactive site for intended immobilization of the protein. So, the solution of ferrous and ferric chloride was imbibed under vacuum into the porous structure and iron oxide was precipitated by an aqueous ammonia solution. Finally, the functionalized magnetic hypercrosslinked microspheres were integrated into a biosensor for qualitative detection of ovalbumin.

## **KEY WORDS**

Dispersion polymerization, styrene, divinylbenzene, microsphere, hypercrosslinking, magnetic, ovalbumin, biosensor.

# 1 ÚVOD

Polymerní nosiče nalézají stále širší uplatnění jak v syntézách na pevné fázi, tak i při separacích nejrůznějších látek [1]. Příkladem jsou detekce, izolace, charakterizace a průmyslové syntézy biologicky aktivních látek. Nové stacionární fáze, nejen polymerní, ale i anorganické, přispěly k rozvoji gelové permeační [2], kapalinové [3,4] a plynové chromatografie [5], či elektroforetických technik [6]. Polymerní nosiče mohou být jak přírodního (agaróza, celulóza, dextran), tak i syntetického původu [polystyren, polyakrylamid, poly(2-hydroxyethyl-methakrylát)] [7].

Zaměříme-li se na separace biologických látek z reálných vzorků (potravin, krev, moč, půda, atd.), je nutné si uvědomit, že jde o směsi velice komplexní. Izolace jediné komponenty nebo skupiny chemických látek (proteiny, enzymy, nukleové kyseliny) z takovýchto směsí je pak náročná. Ve většině případů nesmí být pro další aplikace izolovaný materiál jakkoliv znečištěný. Těmto požadavkům plně vyhovují separace pomocí funkcionalizovaných magnetických polymerních částic. Magnetické polymerní nosiče se osvědčily pro izolaci nukleových kyselin [8], sorpci proteinů [9,10], imobilizaci enzymů [11], detekci bílkovin v immunosenzorech [12], nebo se magnetické nanočástice používají jako kontrastní činidla pro zobrazování tkání pomocí magnetické rezonance [13].

Na magnetické polymerní nosiče je kladena celá řada požadavků. Částice musí být stabilní v roztocích (neagregovat), biokompatibilní, obsahovat funkční skupiny, minimálně adsorbovat nespecifické látky, nepodléhat nežádoucím chemickým přeměnám a současně mít vysoký obsah magnetického plniva, aby byly separace v magnetickém poli dostatečně rychlé. Důležitý je pravidelný sférický tvar částic a jejich velikost. Optimální velikost polymerních částic je od 2 do 10  $\mu\text{m}$ . Takovéto mikročástice mají dostatečně vysoký povrch pro možné interakce s izolovanou látkou, což zlepšuje účinnost separace. Při použití částic  $< 2 \mu\text{m}$ , například v chromatografických aplikacích, může dojít k ucpání kolony. V neposlední řadě, musí být zmíněn požadavek na úzkou distribuci velikostí částic, která bývá v chromatografii rozhodující. Monodisperzní mikročástice totiž vykazují jednotné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo připravit a charakterizovat funkcionalizovaný magnetický polymerní nosič na bázi poly(styren-*co*-divinylbenzenových) [P(St-DVB)] mikročástic získaných disperzní polymerizací. Výhodou této polymerizace, je-li vedena za vhodných podmínek, je vznik částic o velikosti v jednotkách mikrometrů s úzkou distribucí velikostí. Dalším úkolem bylo do částic zavést hypersíťováním mikro- a mezopóry, které by umožnily následné vysrážení oxidů železa uvnitř porézní struktury, čímž by se nosič stal magnetickým. Současně bylo zapotřebí po hypersíťování mikročástice vhodně funkcionalizovat, aby byly posléze využitelné v biologické aplikaci, jmenovitě ke stanovení ovalbuminu v biologických vzorcích. V neposlední řadě jsme se snažili nalézt vztah mezi strukturou a vlastnostmi částic a popsat vliv řady reakčních parametrů na charakteristiky výsledných mikročástic zahrnujících morfologii, velikost, polydisperzitu, porozitu, magnetické charakteristiky a přítomnost reaktivních skupin.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 POLYMERIZAČNÍ TECHNIKY PRO PŘÍPRAVU MIKROČÁSTIC

Polymerní částice se nejčastěji připravují heterogenními polymerizačními technikami. Buď se jedná o dvoufázový systém vytvořený již na začátku polymerizace (monomer je nerozpustný v polymerizačním mediu, ve kterém je dispergován do malých kapek), nebo dochází k rozdělení fází až v průběhu polymerizace, kdy se polymer od jisté molekulové hmotnosti stává v prostředí nerozpustným. Jako vhodné se jeví využití zejména radikálových polymerizací, včetně v současné době oblíbených pseudoživých technik (radikálová polymerizace s přenosem atomu - ATRP, polymerizace v přítomnosti nitroxidu, či radikálový adičně fragmentační přenos řetězce - RAFT), které však nejsou předmětem této práce. Jelikož v rámci dizertační práce byla pro přípravu mikročástic využívána technika disperzní polymerizace, věnujeme ji v dalším textu největší pozornost.

V závislosti na vlastnostech reakčního média, monomeru a vznikajícího polymeru se přitom využívají nejrůznější iniciátory, stabilizátory, popř. jiné pomocné látky. Nejčastěji používaným způsobem iniciace je termický rozklad iniciátoru, který může být ze skupiny organických či anorganických peroxidů, např. dibenzoylperoxid (BPO) a peroxodisíran draselný či azosloučenin, např. 2,2'-azobis(2-methylpropionitril) (AIBN). Obvyklé typy stabilizátorů jsou diskutovány v jednotlivých podkapitolách.

#### 3.1.1 Suspenzní polymerizace

I když metoda suspenzní polymerizace byla patentována již v roce 1912, stále často je využívanou technikou pro přípravu částic v rozmezí od desítek mikrometrů až do jednotek milimetrů s širokou distribucí velikostí [14].

Princip klasické suspenzní polymerizace spočívá v tom, že monomer a v něm rozpuštěný iniciátor je v kontinuální vodné fázi, která zprostředkovává přenos tepla, suspendován mícháním do kapek a ty jsou následně polymerizovány. Suspenze kapek není dostatečně stabilní, a tak dochází k tomu, že kapičky koaleskují do větších kapek, ale díky míchání jsou opět rozděleny na menší. Každá kapka se dá považovat jako samostatné polymerizační místo. Koalescenci se dá do určité míry účinně zabránit použitím stabilizátoru, jehož molekuly jsou v tenké vrstvě adsorbovány na povrchu dispergovaných kapek. Tím je vytvořena stérická zábrana omezující koalescenci kapek [15]. Nejčastěji používanými polymerními stabilizátory jsou polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, polyakrylová kyselina, hydroxyalkyl celulóza; možné jsou i anorganické koloidy. Rovnováha mezi koalescencí kapek a jejich rozdělováním rozhoduje o výsledné velikosti budoucích polymerních částic. V neposlední řadě se na jejich velikosti podílí také způsob a rychlost míchání, stejně tak i velikost a tvar polymerizační nádoby a také poměr mezi kontinuální (obvykle vodnou) a organickou fází a koncentrace stabilizátoru.

Suspenzní technika našla uplatnění pro výrobu polystyrenu, polyakrylátů, polyvinylacetátu, atd. Suspenzní polymerizace je aplikovatelná i na ve vodě

rozpustné monomery, jako jsou akrylamidy a jejich deriváty; kontinuální fázi pak tvoří organická kapalina (různé minerální oleje, toluen, atd.).

### 3.1.2 Emulzní polymerizace

Emulzní polymerizace je podstatně složitější než suspenzní technika. Na začátku polymerizace je monomer v kontinuální fázi přítomen ve formě větších kapek o velikosti v rozmezí od 1 do 10  $\mu\text{m}$ . Kapky jsou rezervoáry monomeru pro růst polymerních částic. Malá část monomeru se nachází ve vodné fázi, kde začíná iniciace polymerizace. Monomer je navíc dispergován ve vodné fázi do micel pomocí emulgátoru obsahujícího obvykle ve své struktuře jak hydrofilní, tak i hydrofobní část. Emulgátor (tenzid) snižuje povrchové napětí mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami, monomerem a vodou. Zatímco hydrofilní části molekul emulgátoru jsou nasměrovány do vodné fáze, hydrofobní části utvářejí monomerní micely. Po smísení monomeru s vodou se mícháním monomer disperguje do malých kapiček, jejichž povrch okupují molekuly emulgátoru. Zahřátím se ve vodné fázi generují radikály, které pronikají do monomerních micel, kde je zahájena polymerizace. Po vyčerpání monomeru z kapek i rozpuštěného ve vodě už nemůže docházet ke generaci nových částic, a tudíž další polymerizace probíhá pouze v samotných polymer-monomerních částicích. Produkt emulzní polymerizace je označován jako latex, kterým se většinou rozumí vodná disperze částic o velikosti v rozsahu desítek až stovek nanometrů. Výhodou emulzní polymerizace je vysoká reakční rychlost, vysoká průměrná molární hmotnost produktu a také snadný odvod reakčního tepla.

Tento model emulzní polymerizace, který vypracoval Harkins [16-18], bývá označován jako micelární. Jeho kinetické vztahy a kvalitativní popis pak odvodili Smith a Ewart [19,20]. Micelární model emulzní polymerizace není jediným. Další modely vycházejí z polymerizace na fázovém rozhraní či předpokládají homogenní nukleaci částic [21], o které bude pojednáno v kapitole o disperzní polymerizaci (viz. kap. 3.1.3).

#### *Bez emulgátorové emulzní polymerizace*

Mezi klasickou emulzní polymerizací a bez emulgátorovou polymerizací existují podobnosti [22], avšak na rozdíl od klasické emulzní polymerizace nedochází k nukleaci a růstu částic v micelách. Nepřítomnost emulgátoru v polymerizačním systému se dá považovat za přednost této metody. I přes nepřítomnost emulgátoru si systém uchovává koloidní stabilitu díky nábojům pocházejícím z ionizovatelného iniciátoru, což je další rozdílem oproti klasické emulzní polymerizaci.

Mnohé vědecké skupiny se zaměřily na studium průběhu bez emulgátorové emulzní polymerizace, bohužel absolutně platný mechanismus nebyl prozatím nikým předložen. Nicméně, do současné doby bylo navrženo již několik mechanismů polymerizace, které se navzájem doplňují. Zatímco bez emulgátorová emulzní polymerizace methyl-methakrylátu a vinyl-acetátu probíhá dle Fitche

mechanismem homogenní nukleace [21] polymerizace ve vodě nerozpustných monomerů, jako je styren, probíhá mechanismem micelárním [23]. Další mechanismus je založen na modelu, kdy rostoucí volné radikály terminují a jejich následnou koagulací vznikají částice [23].

Výsledné polymerní částice mají větší velikost, než mají typické latexy, obvykle 0.5–1  $\mu\text{m}$  a také nižší polydisperzitu [24].

### ***Mikroemulzní polymerizace***

Mikroemulzí se rozumí termodynamicky stabilní, izotropní a opticky transparentní disperze dvou nemísitelných kapalin (olej a voda) v přítomnosti povrchově aktivní látky, kterou je jeden tenzid, směs tenzidů, či směs hlavního a pomocného tenzidu (kosurfaktantu).

Pro systém olej ve vodě je vodná fáze označována jako kontinuální a disperzní fáze se v ní nachází ve formě mikroemulze skládající se z malých monomerních mikrokapek o průměru menším než 10 nm. Povrch mikrokapek je obklopen molekulami povrchově aktivní látky. Tvorba mikroemulzní je procesem spontánním a pro jejich tvorbu není zapotřebí použití žádné energie, na rozdíl od klasických emulzí. Na druhou stranu je pro tvorbu mikroemulze a pro zachování její termodynamické stability zapotřebí značného množství povrchově aktivní látky v polymerizační násadě (až 20 hm.%). Jako kostabilizátor se používají amfifilní alkoholy s krátkým řetězcem (od butanolu po hexanol). Jeho molekuly se nacházejí uvnitř mezifázové monovrstvy povrchově aktivní látky [25].

Množství získaných částic o průměrné velikosti od 20 do 60 nm se obvykle pohybuje v rozmezí 5-10 hm.% polymerizační násady. Připravené polymery se vyznačují vysokou molekulovou hmotností a jsou v porovnání s klasickou emulzní polymerizací polydisperzní [26]. Uvedené nedostatky činí mikroemulzní polymerizaci méně atraktivní pro průmyslové aplikace [27].

### ***Miniemulzní polymerizace***

Miniemulzní polymerizace je speciálním případem emulzní polymerizace, kdy se pomocí stabilizátoru a kostabilizátoru zabraňuje koalescenci kapek a agregaci částic v průběhu procesu. Na začátku je miniemulze vytvořena smícháním kontinuální vodné a disperzní fáze, která je emulgována v homogenizačním zařízení do nanočástic o velikosti 50-500 nm. Vytvoření miniemulze s dostatečně malými částicemi je velmi žádoucí pro zajištění nukleace probíhající v kapkách a potlačení micelární a homogenní nukleace. K homogenizaci může být využito mechanické a magnetické míchání nebo ultrazvuk [28,29].

Po smíchání všech komponent reakční násady dochází k emulgaci monomeru do kapek nanometrové velikosti (vytvoření systému olej ve vodě). Samotná polymerizace je zahájena vstoupením radikálu do kapky monomeru, kde dochází k nukleaci na rozdíl od klasické emulzní polymerizaci [30,31]. Kapky jsou následně

polymerizovány ideálně bez změny jejich velikosti. Stabilizátorem je obecně povrchově aktivní látka rozpustná v kontinuální fázi.

Miniemulzní polymerizací lze připravit polystyren, polyvinylchlorid, polyethylen, polyurethan, polyamid, atd [32].

Zaměníme-li charakter fází a kontinuálním prostředím je nepolární rozpouštědlo a disperzní fázi polární monomer, systém se označuje jako inverzní miniemulzní polymerizace. Tímto způsobem se polymerizují hydrofilní monomery, např. methakrylová kyselina [32].

### 3.1.3 Disperzní polymerizace

Disperzní polymerizace v nepolárních rozpouštědlech byla vyvinuta v sedmdesátých letech minulého století britskou firmou ICI pro výrobu disperzních barev [33]. Její mechanismus (homogenní nukleace) byl však popsán Fitchem až po více než dvaceti letech [21]. Velikost polymerních částic v těchto nátěrových hmotách byla typicky ve stovkách nanometrů, teprve přechodem od nepolárních k polárním rozpouštědlům se podařilo získat částice až mikrometrové velikosti [34]. Výhodou disperzní polymerizace je možnost produkovat monodisperzní částice v jednom reakčním kroku. Disperzní polymerizace může probíhat jak radikálovým, tak i iontovým mechanismem. Monomery mohou být ve vodě nerozpustné (styren, divinylbenzen, methyl-methakrylát) [35], či ve vodě rozpustné (deriváty akrylamidu, *N*-vinylpyrrolidon) [36,37]. Samozřejmě je možné monomery vzájemně kopolymerizovat [38].

Na začátku polymerizace jsou všechny reakční komponenty (monomer, iniciátor, stabilizátor) rozpustné v polymerizačním prostředí (rozpouštědle) a tvoří kontinuální fázi. Termickým rozkladem nízkomolekulárního iniciátoru se generují radikály a posléze rostoucí oligomerní radikály, které jsou stále rozpustné v kontinuální fázi. S narůstající délkou řetězců oligomerních radikálů se pro ně stává kontinuální fáze termodynamicky špatným prostředím, což má za následek vysrážení nestabilních primárních nukleí ve formě disperzní fáze. Kritická délka oligomerních řetězců, při které dochází k vysrážení primárních nukleí, je určena polaritou a rozpustností polymeru v kontinuální fázi. Obecně je přijímáno, že velikost primárních nukleí je okolo 20 nm [39]. V průběhu polymerizace se na vysrážená nuklea současně adsorbují řetězce stabilizátoru a nuklea se spojují do energeticky vhodného uspořádání – tedy do tvaru koule [40]. Dále bylo zjištěno, že při disperzní polymerizaci se řetězce stabilizátoru současně roubují na vznikající polymer a vzniklý roubovaný kopolymer zlepšuje stabilizaci systému. V okamžiku vysrážení primárních nukleí je nukleační fáze považována za ukončenou a nastupuje fáze růstová. Zatímco nukleace je považována za nestabilní, růstová fáze je stabilní [41]. Nukleaci lze považovat za ukončenou po přibližně 1 % konverzi monomeru [42]. Růst částic může probíhat dvěma způsoby. (1) Uvnitř nukleí zbotnalých monomerem, která zachytávají oligomerní radikály z kontinuální fáze a současně solvované molekuly iniciátoru. Propagační reakce probíhá uvnitř částic a je doprovázena gel-efektem, který zvyšuje polymerizační rychlost. Tak vznikají

vysokomolekulární polymerní částice o menší velikosti. Tento způsob je upřednostněn při polymerizaci nepolárních monomerů v polárním prostředí. (2) Již existující částice rostou díky adsorpci polymerních řetězců z kontinuální fáze. Takto rostou zejména částice, kdy je vznikající polymer dobře rozpustný v kontinuální fázi. V tomto případě se zvyšuje kritická délka řetězců a prodlužuje se doba nukleační fáze. Vzniklé částice mají tak větší velikost, ale nižší molekulovou hmotnost. [43,44]. Proto je pro disperzní polymerizaci typický nepřímý vztah mezi velikostí částic a molekulovou hmotností polymeru [15]. Je-li vznik primárních nukleí dostatečně rychlý a všechny částice rostou stejnou rychlostí, výsledné polymerní mikročástice mají jednotnou velikost [43].

Morfologie výsledných částic je také ovlivněna kopolymerizací s bifunkčním monomerem, čímž lze například zlepšit mechanické vlastnosti [45] a připravit zesíťené a nerozpustné polymery. Přítomnost komonomeru však může narušit mechanismus tvorby monodisperzních částic, které jsou pak polydisperzní nebo mají dokonce nepravidelný tvar [46]. Je tedy zřejmé, že vznik monodisperzních částic je dán souhrou několika parametrů ovlivňujících mechanismus disperzní polymerizace.

Polymery připravené disperzní polymerizací nacházejí široké uplatnění v oblasti nátěrových hmot, lepidel, tonerů a jako náplně kolon pro separační účely.

### **3.1.4 Srážecí polymerizace**

Vzhledem k podobnosti s disperzní polymerizací se často obě techniky nerozlišují. Jediným rozdílem oproti disperzní polymerizaci je, že se nepoužívá stabilizátor k zabránění agregace částic. To lze považovat za výhodu, protože výsledný produkt není stabilizátorem znečištěn. Nevýhodou je nutnost používat podstatně nižší koncentraci monomeru v rozpouštědle, aby nedocházelo k agregaci vznikajících polymerních částic.

Jako příklad lze uvést srážecí polymerizaci DVB, která probíhá ve směsi acetonitrilu s toluenem; výsledné monodisperzní částice mají velikost okolo 4  $\mu\text{m}$  [47].

### **3.1.5 Metoda vícestupňového botnání a polymerizace**

Tato technika je elegantním způsobem přípravy částic jednotné velikosti. Princip jejího provedení byl popsán v roce 1980 [48]. Metoda poskytuje částice o velikosti od 3  $\mu\text{m}$  až do 100  $\mu\text{m}$  [49].

Nejprve musí být připravena výchozí semínka (jádra), která se běžně předbortnají aktivující sloučeninou. Na semínka je kladen požadavek striktní monodisperzity. Jedině tak mohou být výsledné částice monodisperzní. Monodisperzní semínka se posléze bortnají emulzí nízkomolekulární aktivující kapaliny (kapalina A), která je nerozpustná ve vodě. Dále je také doporučováno pro usnadnění jejího transportu vodnou fází a zvýšení účinnosti bortnání přidat emulzi další kapaliny (kapalina B), jež může být částečně mísitelná s vodou, ale musí rozpouštět kapalinu A.

Samotnému procesu polymerizace předchází další aktivace předbotnalé vodné disperze částic emulzí kapaliny C, kterou je monomer.

Polymerizace může být pak provedena jak disperzně [50], tak i suspenzně [51]. Monodisperzní semínka jsou připravována disperzní polymerizací [52], nebo bezemulgátorovou emulzní polymerizací, která poskytuje semínka menší než 1  $\mu\text{m}$  [53].

### 3.1.6 Mikrofluidní způsob

Proces spočívá v kontinuální tvorbě emulze monodisperzních kapek ve speciálním mikrofluidním zařízení, které jsou následně polymerizovány do částic jednotné velikosti. Metodou lze připravovat částice od 20 do 1000  $\mu\text{m}$  [54]. Systém se skládá ze tří kanálů: v prostředním z nich proudí monomer, nebo roztok oligomerů (disperzní fáze) a ve dvou sousedních kanálech proudí kontinuální fáze. Všechny tři kanály ústí do jednoho otvoru, ze kterého vycházejí uniformní kapky tekoucí v kontinuální fázi. Vytvořené kapky jsou následně vytvrzeny fotoiniciovanou polymerizací, či polykondenzací [55].

Alternativou mikrofluidního způsobu přípravy částic je proces enkapsulace, kdy dochází k vytvrzení kontinuální fáze v pevnou slupku obalující bublinu plynu [56].

## 3.2 PORÉZNÍ ČÁSTICE

Porozitou se rozumí volný prostor v pevném materiálu. Je definována jako poměr objemu porů ( $V_p$ ) ke zdánlivému objemu částice či porézního materiálu ( $V$ ).

Dle své velikosti byly póry rozděleny do tří skupin Mezinárodní společnosti pro čistou a užitou chemii (IUPAC) [57]:

1. mikropóry < 2 nm,
2. mezopóry 2-50 nm,
3. makropóry > 50 nm.

Při kopolymerizaci monovinylických monomerů (např. St) s multivinylickými monomery (např. DVB), které systém síťují, se často do polymerizační směsi přidává ještě další organická látka, která působí jako porogen. Oba monomery musí být v této organické látce rozpustné, ale naopak vznikající polymer nerozpustný. V průběhu polymerizace pak dochází k fázové separaci mezi polymerem a porogenem. Obecně lze připravit polymery neprorézní, gelového, nebo makroporézního typu. Gelové polymery jsou porézní pouze ve zbotnalém stavu. Naproti tomu makroporézní polymery mají stálou porozitu nejen ve zbotnalém, ale i v suchém stavu.

Jako porogen lze použít nejen kapalné nízkomolekulární rozpouštědlo, ale i inertní polymer, který je rozpustný v monomerech, nebo jejich kombinaci. V případě použití rozpouštědla lze volit takové, které buď dobře, nebo špatně solvuje vznikající polymer.

### 3.2.1 Hypersít'ování

Vývojem vysoce porézního, tzv. hypersít'ovaného materiálu vycházejícího z P(St-DVB) částic připravených suspenzní polymerizací se zabýval Davankov od 70. let minulého století. [58]. Charakteristickými rysy hypersít'ovaných částic jsou:

- trvalá porozita,
- vysoký objem mikropórů (~ 0.6 ml/g), jejichž velikost je menší než 2 nm,
- velmi vysoké hodnoty specifické povrchu (> 1000 m<sup>2</sup>/g).

Hypersít'ováním se rozumí vytvoření velkého počtu můstků mezi benzenovými jádry silně zbotnalých polystyrenových řetězců přebytkem termodynamicky dobrého rozpouštědla, např. 1,2-dichlorethanu [58]. Pro dosažení hypersít'ované struktury je nutno vytvořit na benzenových jádrech mezi sousedními řetězci minimálně tři vazby [59]. Je nutno připomenout, že obvykle vzniká pouze jeden uzel sítě.

Před vlastním hypersít'ováním je zapotřebí zavést do polymerní struktury reaktivní prekurzory pro následné vytvoření můstků mezi řetězci. Proto je benzenový kruh chloralkylován Friedel-Craftsovou alkylací. Používat lze několik chloralkylačních činidel, např. 4,4'-(chlormethyl)bifenyl, formaldehyddimethyl acetal a chlormethylmethyl ether. Čím je zavedený můstek mezi polymerními řetězci kratší a jejich počet vyšší, tím je hustší síť a vyšší specifický povrch materiálu. Hypersít'ovací reakce si vyžaduje přítomnost katalyzátoru, např. Lewisovu kyselinu. Samotná reakce pak probíhá několik hodin za zvýšené teploty.

Hypersít'ování polymerů gelového typu vede výhradně k mikroporézním materiálům. Z makroporézních polymerů se hypersít'ováním získají polymery obsahující póry ze všech tří oblastí velikostního spektra. Hypersít'ované polymery nacházejí uplatnění jako stacionární fáze v kolonách kapalinových chromatografů, měniče iontů [60], specifické sorbenty [61], jako náhrada destilačních technik [62], při uchovávání vodíku jako alternativního zdroje energie [63], atd.

### 3.3 MAGNETICKÉ POLYMERNÍ ČÁSTICE

Pro přípravu magnetických polymerních částic sestávajících typicky z anorganického plniva a organické matrice byla navržena řada metod. Každá z nich má svá omezení, zejména co do množství magnetického plniva enkapsulovaného v polymeru, velikosti a polydisperzity částic. Připraveny byly jak polymerní částice, které měly enkapsulováno jediné magnetické jádro, tak i více magnetických jader, nebo částice měly magnetický materiál na svém povrchu. Popsány byly i magnetické částice, na jejichž povrchu byly naroubovány polymerní řetězce („brushes“) [64].

Magnetické mikročástice musí být chemicky stabilní při různých hodnotách pH neagregovaly, byly biokompatibilní jsou-li určeny pro lékařské účely, dále částice nespecificky interagovat s nežádoucími látkami, které mohou být přítomny v reálných vzorcích. Také by měly obsahovat vysoký obsah magnetického plniva, který vykazuje vysoké magnetické vlastnosti, je superparamagnetický a není toxický. Tyto požadavky dobře splňují oxidy železa, jako je magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>;

FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), který vzniká oxidací magnetitu peroxidem vodíku [65], chlornanem sodným [66], dusičnanem železitým [67] nebo samotným vzdušným kyslíkem [68].

Samotná příprava částic magnetických oxidů byla posána již v šedesátých letech minulého století, kdy byly hroudy magnetitu mlety v přítomnosti povrchově aktivní látky - kyseliny olejové [69]. Tento zdlouhavý postup byl ale vhodný pouze pro částice dispergované v organických rozpouštědlech. V současné době se oxidy železa srážejí ze solí v alkalickém prostředí, často hydroxidem amonným [70].

Obalení magnetických „jader“ polymerní matricí může být provedeno heterogenními polymerizacemi uvedenými v kapitole 3.1 [71]. Přesto každý systém monomer-magnetické jádro vyžaduje nalezení optimálních podmínek syntézy.

### 3.3.1 Magnetické nosiče připravované z porézních částic

Dalším možným způsobem přípravy magnetických nosičů je využití porézních polymerních částic, jejichž struktura poskytuje prostor pro vysrážení oxidu železa.

Přímá inkorporace magnetického oxidu do pórů polymerních částic je obtížná. Veškerý oxid často zůstává na povrchu, a činí tak z dříve kulovitých částic nosiče nepravidelného tvaru. Navíc oxid železa při separaci nespécificky interaguje s cílovou biologicky aktivní látkou. Proto se jako vhodné jeví do porézní struktury nejprve nasát roztok či roztoky solí železa, případně roztoků solí dalších kovů a posléze uvnitř pórů vysrážet zvýšením pH oxid železa [72].

Některé polymerní částice si ale ve své porézní struktuře nedokážou vysrážený oxid železa udržet a ten je posléze uvolňován do okolního prostředí. Významnou roli pro udržení oxidů kovů uvnitř pórů hraje přítomnost některých funkčních skupin, které oxid železa ukotvují iontovou vazbou. Tato schopnost je připisována karboxylovým, oxiranovým, aminovým či sulfonovým skupinám [72].

Magnetické polymerní částice pod označením Dynabeads<sup>®</sup> jsou vyráběny průmyslově metodou vícestupňového botnání a polymerizací firmou Invitrogen.

## 3.4 BIOSENZOR

První zmínka o biosenzorech pochází z roku 1962, kdy byl prezentován experiment s glukózaoxidázou zachycenou na povrchu kyslíkové elektrody pomocí dialyzační membrány. Biosenzorem se označuje zařízení obsahující citlivý biologický prvek (biorekogniční část), který může být buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem poskytujícím signál k dalšímu zpracování. Elektrický signál je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika analyzovaných chemických látek ve vzorku. Biosenzory jsou v přímém kontaktu se vzorkem (voda, krev, moč, potraviny, atd.), nebo je měřící roztok v uzavřené nádobě a vzorek se přidává po ustavení pozadí signálu v přítomnosti pracovního roztoku, popř. měření probíhá v průtočném systému [73].

Biorekogniční část senzoru lze rozdělit do dvou skupin:

1. biokatalytické – analyt je přeměněn v průběhu chemické reakce a je často substrátem enzymové reakce (enzymu, organely, buňky, atd.),
2. bioafinitní – analyt je specificky vázán v afinitním komplexu s protilátkou, nukleovou kyselinou, atd.

Biologické látky sloužící jako biorekogniční část musí být v čistém stavu.

Fyzikálně-chemické převodníky lze rozdělit na:

1. elektrochemické (potenciometrické, amperometrické, konduktometrické, voltametrické),
2. optické (fotometrické, fluorimetrické, luminiscenční, nelineárně optické),
3. piezoelektrické a akustické,
4. kalorimetrické.

### 3.4.1 Kombinace biosenzoru a protilátky

Imunochemické afinitní biosenzory využívají jako biorekogniční prvek protilátky, což jsou o bílkoviny schopné specificky rozpoznat jiné molekuly, např. imunoglobulin G (IgG) o molekulové hmotnosti 160 kDa. Ten je tvořen dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci. Řetězce jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky za vzniku struktury ve tvaru písmene Y. Spodní „noha“ je označována jako fragment  $F_c$ , který umožňuje vazbu protilátky na membránu a ve své struktuře nese volné karboxylové skupiny. Obě boční ramena jsou označována fragmenty  $F_{ab}$ ; obsahují místa pro vazbu antigenu. Ve své struktuře nesou volné aminové skupiny a obsahují variabilní a konstantní oblasti. Variabilní části jsou důležité pro vznik různých vazebných míst k rozpoznání části antigenu. Konstantní oblasti vytvářejí vlastní vazebné místo pro antigen.

Kompetitivní uspořádání biosenzoru spočívá v imobilizaci analytu, např. na funkcionalizovaný povrch magnetických částic, jejich inkubaci s protilátkou a následném přidání k biosenzoru. Zachycená protilátka se detekuje přidáním označené sekundární protilátky. Tento způsob stanovení je vhodný pro nízkomolekulární analyty. Pro molekuly s vyšší molekulovou hmotností, které mohou ve své struktuře nést více vazebných míst pro protilátku, je vhodné sendvičové uspořádání. Na citlivém povrchu je imobilizována protilátka mající afinitu k analytu, který se na ni při inkubaci naváže. Následně je přidána další vhodně značená protilátka (např. nosící enzym pro konverzi substrátu). Množství navázané značené sekundární protilátky je přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku [73].

Využití biosenzorů je velmi rozmanité, například byl elektrochemický biosenzor použit ke stanovení peroxidu vodíku přidávaného do potravin [74], zjištění přítomnosti stanovení bakterií poukazujících na fekální znečištění [75] nebo k detekci protirakovinných látek [76].

## 4 CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH MIKROČÁSTIC

### 4.1 MORFOLOGIE

Mikročástice byly pozorovány světelným mikroskopem Opton III a fotografovány kamerou Canon EOS 400D. Velikost mikročástic v suchém stavu byla stanovena ze snímků z rastrovacího (SEM) a transmisního elektronového mikroskopu (TEM) pořízených JEOL JSM 6400 a Tecnai Spirit G2.

Pro výpočty jsou používány následující rovnice:

$$D_n = \sum n_i D_i / \sum n_i \quad (1),$$

$$D_w = \sum n_i D_i^4 / \sum n_i D_i^3 \quad (2),$$

$$PDI = D_w / D_n \quad (3),$$

kde  $n_i$  a  $D_i$  jsou počet částic a průměr velikosti  $i$ -té částice (příp. póru),  $D_n$  je početní střed průměru částic,  $D_w$  je hmotnostní střed průměru částic a PDI je index polydisperzity. Minimální počet analyzovaných částic je 500.

### 4.2 SPECIFICKÝ POVRCH

BET izoterma umožňuje stanovení množství adsorbátu potřebného k monovrstvému pokrytí externího povrchu a dostupného vnitřního povrchu pórů adsorbentu. Je hojně užívanou technikou pro stanovení hodnoty specifického povrchu  $S_{BET}$  na základě fyzisorpce.

BET izoterma je obecně udávána v linearizované formě (4):

$$p/[n^a \cdot (p^0 - p)] = [1/(n_m^a \cdot C)] + [(C - 1)/(n_m^a \cdot C)] \cdot (p/p^0) \quad (4),$$

kde  $C$  je konstanta typická pro BET, která je exponenciálně závislá na rozdílu skupenského tepla adsorbátu a jeho adsorpčním teplem,  $n^a$  je adsorbované množství plynu při hodnotě relativního tlaku  $p/p^0$  a  $n_m^a$  je adsorpční kapacita adsorbentu při zaplnění jednou vrstvou molekul plynu.

BET izoterma je platná pouze v rozmezí relativních tlaků  $0.05 \leq p/p^0 \leq 0.3$ , kdy je lineární. U mikroporézních materiálů BET izoterma v uvedeném intervalu lineární průběh obvykle nevykazuje a po extrapolaci protíná osu  $y$  v negativních hodnotách; hodnota konstanty  $C$  tak nabývá záporných hodnot. Proto by u mikroporézních materiálů neměla BET izoterma platit. Tento problém byl vyřešen zavedením několika kritérií popsanych v ISO normě pro stanovení specifického povrchu dle BET izotermy [77].

Adsorpční izoterma byla stanovena z adsorpce dusíku při 77 K přístrojem Gemini VII 2390 Analyzer v rozmezí relativních tlaků od 0.010 do 0.995. Rozmezí relativních tlaků pro stanovení Brunauer-Emmett-Teller (BET) izotermy bylo 0.05-0.30 a její vyhodnocení splňovalo požadavky ISO 9277 z roku 2010 [77].

### 4.3 RTUŤOVÁ POROZIMETRIE

Metoda rtuťové porozimetrie pracuje na principu vtačování rtuti do pórů měřeného materiálu za zvyšujícího se tlaku. Změna tlaku mezi tlakem rtuti a tlakem plynné fáze ( $\Delta p$ ) může být vyjádřen povrchovým napětím rtuti a střední hodnotou poloměru zakřivení menisku kapaliny. Tento vztah je znám jako Young-Placeova rovnice. Za předpokladu, že tvar pórů je cylindrický a o jistém poloměru  $r$  a kontaktní úhel rtuti s pevným povrchem je roven  $\varphi$  nabývá rovnice tvaru známého jako Washburnova rovnice (5) [78]:

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \cos \varphi \quad (5),$$

kde povrchové napětí  $\gamma$  je rovno  $480 \text{ mN/m}^2$  a  $\varphi$  je roven  $140^\circ$  [79].

Kumulativní objem pórů a distribuce velikosti pórů suchých mikročástic byla stanovena rtuťovými porozimetry Pascal 140 a 440 ve dvou tlakových intervalech, 0-400 kPa and 1-400 MPa, dovolujících vyhodnotit oblast mezo a makropórů. Vzhledem k velikosti připravených mikročástic nebyly makropóry vyhodnocovány. Objem pórů a průměrná velikost mezopórů byly stanoveny z křivky pro kumulativní objem rtuti dle Washburnovy rovnice předpokládající cylindrický tvar pórů [80]. Mezoporozita byla spočtena dle rovnice (6):

$$\text{Mezoporozita (\%)} = (V_{\text{Hg}} \cdot 100) / [V_{\text{Hg,celkový}} + (1/\rho)] \quad (6),$$

kde  $V_{\text{Hg}}$  je kumulativní objem Hg v mezopórech,  $V_{\text{Hg,celkový}}$  je celkový kumulativní objem zahrnující mezo- a makropóry a  $\rho$  je hustota mikročástic ( $\rho = 1.09 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).

### 4.4 ATR FTIR SPEKTROSKOPIE

K měření byl použit Thermo Nicolet NEXUS 870 FTIR spektrometr (Madison, WI 537 11, USA) v systému profukovaném suchým vzduchem za použití deuterovaného triglycinsulfátového detektoru v rozmezí vlnočtů od 400 do  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Pro stanovení ATR FTIR spekter práškových vzorků byl použit jednodrazový systém závislý na úplném odrazu s diamantovým krystalem Golden Gate™ Heated Diamond ATR Top-Plate (Specac Ltd., Orprington, Kent BR5 4HE, Great Britain). Typické podmínky měření byly: 256 snímání vzorku (sample scans), rozlišení (resolution)  $4 \text{ cm}^{-1}$ , Happ-Genzel apodizace, KBr dělič paprsků.

### 4.5 MAGNETICKÉ VLASTNOSTI

Magnetizační křivky byly měřeny při pokojové teplotě na EV9 vibračním magnetometru s maximální hodnotou magnetického pole 2 T. Teplotní závislost magnetické susceptibility,  $\kappa$ , byla měřena v rozmezí teplot 77-1000 K na KLY-4S/CS-3  $\kappa$ -můstku. Rychlost ohřevu byla  $8.5 \text{ K/min}$ .

## 4.6 PRVKOVÁ ANALÝZA

Mikročástice byly analyzovány CHNS/O prvkovým analyzátozem Perkin Elmer série 2400 a obsah železa byl stanoven atomovým absorpčním spektrometrem. Před stanovení byly magnetické mikročástice louhovány v konc. HCl při 80 °C a obsah železa byl stanoven v eluátu. Pro termogravimetrickou analýzu byl použit přístroj Perkin Elmer TGA 7, kdy teplota byla zvyšována od teploty okolí až do 860 °C rychlostí 10 °C/min v prostředí vzduchu.

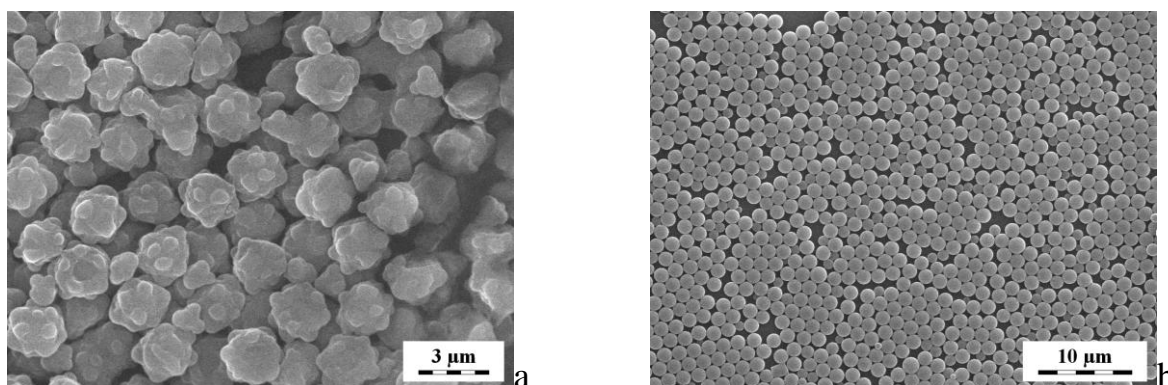
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 DISPERZNÍ POLYMERIZACE St A DVB STABILIZOVANÁ HPC

#### 5.1.1 P(St-DVB) mikročástice síťované 0.3 hm.% DVB

Monodisperzní málo zesítěné P(St-DVB) mikročástice (0.3 hm.% DVB) byly připraveny v EtOH, iniciátorem polymerizace byl BPO a stabilizátorem HPC. V průběhu experimentů byl sledován vliv koncentrace HPC na morfologii, velikost a šířku distribuce velikostí mikročástic. Koncentrace HPC v EtOH byla měněna v rozmezí 1-6.5 hm.%. Jelikož síťující monomer (DVB) ovlivňuje tvorbu monodisperzních částic v průběhu nukleační fáze, což může způsobit agregaci částic, byl jeho přidavek oddálen na jednu hodinu po začátku polymerizace.

Byla-li koncentrace stabilizátoru nízká, a v důsledku nežádoucí agregace měly připravené částice nepravidelný tvar, který je označován jako květákovitý („cauliflower“) (Obrázek 1 a). Při vyšších koncentracích HPC měly částice pravidelný kulovitý tvar. Při polymerizaci s koncentrací HPC 3.6 hm.% se podařilo připravit 1.2  $\mu\text{m}$  monodisperzní P(St-DVB) částice (Obrázek 1 b). Z toho se dá soudit, že v tomto případě HPC účinně stabilizoval polymerizaci a nukleační fáze probíhala dostatečně rychle. Při vysoké koncentraci HPC (6.5 hm.%) vznikaly polydisperzní částice sestávající ze dvou velikostních rodin.



Obrázek 1. SEM mikrofotografie P(St-DVB) mikročástic (0.3 hm.% DVB) připravených disperzní polymerizací v EtOH. Stabilizátorem byl HPC o koncentracích 1 (a) a 3.6 hm.% (b) v rozpouštědle

#### 5.1.2 P(St-DVB) mikročástice síťované 1 hm.% DVB

Monodisperzní P(St-DVB) mikročástice obsahující 1 hm.% DVB byly získány disperzní polymerizací ve směsi rozpouštědel MetCel/EtOH a směsi EtOH/EtCel. Iniciátorem byl BPO a stabilizátorem HPC. V průběhu polymerizace byl sledován vliv objemových poměrů rozpouštědel a způsob dávkování DVB na morfologii, velikost a šířku distribuce velikostí mikročástic.

Směs MetCel/EtOH byla zvolena s úmyslem zvýšit velikost připravených mikročástic ve srovnání s polymerizací v čistém EtOH (kapitola 5.1.1). EtOH je totiž termodynamicky horším rozpouštědlem pro PSt než MetCel a EtCel. Polarita

EtOH v porovnání s MetCel je jen o málo vyšší, ale zato podstatně větší než polarita EtCel. Jelikož pro účinné chromatografické separace je vhodná velikost částic v rozmezí 2-10  $\mu\text{m}$  [60], snažili jsme se regulovat velikost částic v tomto rozsahu a pro biologické experimenty získat částice o průměru 4  $\mu\text{m}$ .

Ve snaze optimalizovat systém jsme měnili poměr rozpouštědel (MetCel/EtOH) od 0.5 do 1.5 (w/w). Veškeré množství DVB (1 hm.% vztaženo na monomer) bylo přidáno jednu hodinu po začátku polymerizace. S rostoucím obsahem MetCel ve směsi s EtOH se zvyšovala rozpustnost polymerních řetězců a současně vzrůstala hodnota číselného středu průměru částic  $D_n$  ze 4.6  $\mu\text{m}$  na 7.2  $\mu\text{m}$ . Distribuce velikostí částic byla však velmi široká, což dokumentovaly hodnoty PDI v rozmezí 1.25-1.37. Jelikož nebyly mezi vlastnostmi připravených částic zásadní rozdíly, byl pro další práci zvolen poměr MetCel/EtOH = 0.5 (w/w).

V dalších experimentech byl sledován vliv způsobu dávkování síťujícího monomeru na kvalitu P(St-DVB) mikročástic a zúžení distribuce jejich velikostí. Byl porovnáván režim dávkování DVB v jednom kroku s kontinuálním dávkováním zahájeným jednu hodinu po začátku polymerizace. Zvolené dávkovací rychlosti byly: 2  $\mu\text{l}/0.5$  min., 2  $\mu\text{l}/1$  min., 2  $\mu\text{l}/2$  min. a 2  $\mu\text{l}/3$  min. Velikost mikročástic  $D_n$  klesala s pomalejší rychlostí dávkování DVB z hodnoty 4.7  $\mu\text{m}$  na 3.6  $\mu\text{m}$  a současně se distribuce velikosti částic rozšiřovala. PDI vzrostla z hodnoty 1.31 na 1.49. kontrolovaným dávkováním DVB se podařilo připravit pravidelné kulovité mikročástice s požadovanou velikostí (3.9  $\mu\text{m}$ ), i když s širší distribucí velikostí (PDI = 1.49). Jako vhodná se jevila rychlost dávkování DVB v intervalu od 2  $\mu\text{l}/0.5$  min do 2  $\mu\text{l}/1$  min.

Ve snaze zúžit distribuci velikostí mikročástic připravených disperzní polymerizací St jsme se rozhodli zahájit dávkování DVB 5 min. po začátku polymerizace. Zvolené rychlosti dávkování vycházely z poznatů diskutovaných v předchozím odstavci a byly 2  $\mu\text{l}/30$  s, 2  $\mu\text{l}/45$  s, 2  $\mu\text{l}/60$  s a 2  $\mu\text{l}/75$  s. S pomalejší rychlostí dávkování DVB hodnota  $D_n$  vzrůstala z 2.5 na 4.9  $\mu\text{m}$  a index polydisperzity měl klesající trend (z PDI = 1.28 na PDI = 1.16). Úpravou dávkovací rychlosti se podařilo připravit P(St-DVB) mikročástice s požadovanou velikostí (3.7  $\mu\text{m}$ ) a s PDI = 1.16.

Jako další rozpouštědlo přidávané k EtOH byl vybrán EtCel, který je v porovnání s MetCel termodynamicky lepším rozpouštědlem pro PSt, protože je méně polární. Nejprve byl opět hledán vhodný poměr EtCel/EtOH s cílem připravit P(St-DVB) mikročástice o požadované velikosti. DVB (1 hm.%) byl přidáván jednu hodinu po začátku polymerizace. Se snižujícím se obsahem EtCel ve směsi s EtOH klesala střední velikost částic z 60 na 2.4  $\mu\text{m}$ . Rovněž hodnoty PDI vykazovaly klesající trend: z PDI  $\sim$  2 na PDI = 1.24. Jako vhodný se jevil poměr EtCel/EtOH = 0.67 (w/w).

V další fázi práce byl opět regulován způsob dávkování DVB. DVB byl přidáván 1 hod. po začátku polymerizace v jednom kroku a kontinuálně dávkovacími rychlostmi 2  $\mu\text{l}/0.5$  min., 2  $\mu\text{l}/1$  min., 2  $\mu\text{l}/2$  min. a 2  $\mu\text{l}/3$  min. S klesající okamžitou koncentrací DVB v polymerizační směsi, tedy s pomalejším dávkováním DVB, se

zvyšovala průměrná velikost částic  $D_n$  z 2.4 na 5.4  $\mu\text{m}$ . Index polydisperzity bylo možné považovat za velmi uspokojivý ( $\text{PDI} \leq 1.05$ ). Při dávkovací rychlosti DVB 2  $\mu\text{l}/3$  min se podařilo připravit 5.4  $\mu\text{m}$  mikročástice s hodnotou  $\text{PDI} = 1.03$ . Pro další práci byla zvolena rychlost dávkování DVB kolem rychlosti 2  $\mu\text{l}/1$  min.

Nakonec jsme dávkovali DVB bylo zahájeno již 5 min. po začátku polymerizace St s rychlostí, 2  $\mu\text{l}/30$  s, 2  $\mu\text{l}/45$  s, 2  $\mu\text{l}/60$  s a 2  $\mu\text{l}/75$  s, popř. byl celý objem DVB přidán v jednom kroku. Ze získaných údajů je patrné, že dávkování DVB 5 min. po začátku polymerizace nemělo příznivý vliv na kvalitu připravených mikročástic. Distribuce velikostí částic byly relativně široké ( $\text{PDI} = 1.06\text{-}1.26$ ) a hodnota  $D_n$  kolísala mezi 4.1-6.1  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 DISPERZNÍ POLYMERIZACE St A DVB STABILIZOVANÁ PVP

### 5.2.1 P(St-DVB) mikročástice síťované 1-5 hm.% DVB

Abychom omezili agregaci částic v průběhu hypersíťování (kapitoly 5.3.1 a 5.3.2), v další experimentální práci jsme se snažili připravit monodisperzní P(St-DVB) mikročástice obsahující až 5 hm.% bifunkčního monomeru (DVB). Obecně je přijímáno, že disperzní kopolymerizace St s vyšším množstvím DVB by měla probíhat spíše v polárním prostředí, kde nedochází k výraznému narušení morfologie vzniklých mikročástic. Vznikají pak vysokomolekulární mikročástice s menší průměrnou velikostí. Zvýšená polarita kontinuální fáze také snižuje počet roubovacích reakcí, což omezuje nežádoucí vliv imobilizovaného roubovaného kopolymeru na morfologii mikročástic.

Polymerizace probíhala ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (0.11 w/w) a iniciátorem byl AIBN, který se v porovnání s BPO rozkládá rychleji. Na rozdíl od předchozích experimentů jsme zaměnili HPC stabilizátor za PVP, kterému je ve vodných prostředích prisuzován lepší stabilizační účinek. Při disperzní kopolymerizaci St s DVB ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  byl sledován vliv koncentrace DVB na velikost a šířku distribuce velikostí připravených mikročástic. S rostoucí koncentrací DVB hodnota  $D_n$  klesala z 1.7 na 1.48  $\mu\text{m}$ . Hodnoty  $\text{PDI}$  lze považovat za velmi uspokojivé a téměř konstatní ( $\text{PDI} \approx 1.01$ ), což svědčí o monodisperzitě mikročástic.

## 5.3 HYPERSÍŤOVÁNÍ P(ST-DVB) MIKROČÁSTIC

Hypersíťované částice jsou v dalším textu pojmenovány jako HPSX, kde H je označení pro hypersíťování, PS je zjednodušení zkratky P(St-DVB) a X značí typ chlormethylačního činidla; pro chlormethylaci s chlormethylmethyl etherem (CMME; X = M), chlormethylethyl etherem (CMEE; X = E) a chlormethyloktyl etherem (CMOE; X = O).

### 5.3.1 Mikročástice obsahující 0.3 hm.% DVB

Ze série P(St-DVB) mikročástic obsahujících 0.3 hm.% DVB a připravených disperzní polymerizací v EtOH byly k dalším experimentům vybrány částice o velikosti 2.3  $\mu\text{m}$  a 1.2  $\mu\text{m}$ . P(St-DVB) mikročástice byly nejprve zhotovány v DCE,

poté chlormethylovány pomocí CMME, CMEE, nebo CMOE, posléze byla k suspenzi mikročástic v DCE přidána Lewisova kyselina ( $\text{SnCl}_4$ ) a za zvýšené teploty byly částice hypersíťovány. Po důkladném promytí a vysušení byly HPSX mikročástice charakterizovány rtuťovou porozimetrií a adsorpční izotermou dusíku pro stanovení objemu ( $V_{\text{Hg}}$ ) a velikosti mezopórů ( $D_{\text{Hg}}$ ) a specifického povrchu ( $S_{\text{BET}}$ ) (Tabulka 1). Nicméně, po hypersíťování různě chlormethylovaných P(St-DVB) mikročástic došlo k jejich agregaci do objektů různých tvarů a velikostí. K agregaci mohlo napomáhat nedostatečné zesíťování výchozích P(St-DVB) mikročástic.

Tabulka 1. Porézní vlastnosti HPSX mikročástic stanovené rtuťovou porozimetrií a BET izotermou.

	HPSM			HPSE			HPSO		
$D_n^a$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_{\text{BET}}^b$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_{\text{Hg}}^c$ ( $\text{ml}/\text{g}$ )	$D_{\text{Hg}}^d$ ( $\text{nm}$ )	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_{\text{Hg}}$ ( $\text{ml}/\text{g}$ )	$D_{\text{Hg}}$ ( $\text{nm}$ )	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_{\text{Hg}}$ ( $\text{ml}/\text{g}$ )	$D_{\text{Hg}}$ ( $\text{nm}$ )
1.2	347	0.27	9.2	345	0.27	9.8	19	0.14	9.6
2.3	707	0.20	9.4	87	0.13	9.2	81	0.28	9.8

<sup>a</sup> $D_n$  – číselný průměr velikosti částic, <sup>b</sup> $S_{\text{BET}}$  – specifický povrch, <sup>c</sup> $V_{\text{Hg}}$  – kumulativní objem mezopórů ze rtuťové porozimetrie, <sup>d</sup> $D_{\text{Hg}}$  – průměrná velikost mezopórů ze rtuťové porozimetrie.

### 5.3.2 Mikročástice obsahující 1 hm.% DVB

Jak vyplynulo z předchozí kapitoly, P(St-DVB) částice s velmi nízkým obsahem DVB (0.3 hm.%) připravené disperzní polymerizací nebyly vhodné pro hypersíťovací reakci. Z toho důvodu byly hypersíťovány částice s vyšším obsahem DVB (1 hm.%).

Před samotným hypersíťováním byly silně zbotnalé P(St-DVB) mikročástice opět chlormethylovány třemi různými chlormethylačními činidly (CMME, CMEE a CMOE). Nicméně, po hypersíťování došlo k jistému poškození povrchu mikročástic, které také částečně zagregovaly. Chlormethylací částic pomocí CMME a následným hypersíťováním se podařilo připravit HPSM mikročástice, jejichž hodnota  $S_{\text{BET}} = 1212 \text{ m}^2/\text{g}$ . HPSE částice měly  $S_{\text{BET}}$  nižší ( $929 \text{ m}^2/\text{g}$ ). HPSO mikročástice (chlormethylace CMOE) měly  $S_{\text{BET}}$  nejnižší ( $367 \text{ m}^2/\text{g}$ ). V HPSM mikročásticích byly nejhoněji zastoupeny póry v oblasti průměrů od 8 do 24 nm, kumulativní objem mezopórů činil  $0.4 \text{ ml}/\text{g}$  a mezoporozita byla vypočtena na 29 %. Mezoporézní vlastnosti HPSO mikročástic byly podobné HPSM mikročásticím a nejvíce zastoupené mezopóry měly průměr od 6 do 20 nm. Kumulativní objem činil  $0.3 \text{ ml}/\text{g}$ , čemuž odpovídala mezoporozita 23 %. Mezoporozita HPSE mikročástic byla ze všech studovaných mikročástic nejvyšší a činila 34 %. Nejčastěji zastoupené mezopóry měly průměr 7-25 nm a jejich kumulativní objem byl  $0.43 \text{ ml}/\text{g}$ .

### 5.3.3 Hypersít'ování P(St-1-5%DVB) mikročástic

P(St-DVB) mikročástice s různým obsahem DVB připravené disperzní polymerizací stabilizovanou PVP a iniciovanou AIBN byly chlormethylovány pomocí CMME, který v předcházejících experimentech poskytoval vysoce porézní materiály (kapitola 5.3.1 a 5.3.2), a posléze hypersít'ovány. Po důkladném promytí a vysušení byly HPSX mikročástice charakterizovány rtuťovou porozimetrií a adsorpční izotermou dusíku pro stanovení objemu ( $V_{\text{Hg}}$ ) a velikosti mezopórů ( $D_{\text{Hg}}$ ) a specifického povrchu ( $S_{\text{BET}}$ ) (Tabulka 2). Vyšší koncentrace DVB ve výchozích částicích měla pozitivní vliv na zabránění agregace.

Tabulka 2. Porézní vlastnosti HPSM částic stanovené rtuťovou porozimetrií a BET izotermou.

Částice	DVB (hm.%)	$S_{\text{BET}}^a$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_{\text{Hg}}^b$ (ml/g)	$D_{\text{Hg}}^c$ (nm)
HPSM-1	1	725	0.40	19
HPSM-2	2	587	0.37	19
HPSM-3	3	631	0.26	16
HPSM-4	4	635	0.21	15
HPSM-5	5	675	0.35	17

<sup>a</sup> $S_{\text{BET}}$  – specifický povrch, <sup>b</sup> $V_{\text{Hg}}$  – kumulativní objem mezopórů ze rtuťové porozimetrie, <sup>c</sup> $D_{\text{Hg}}$  – průměrná velikost mezopórů ze rtuťové porozimetrie.

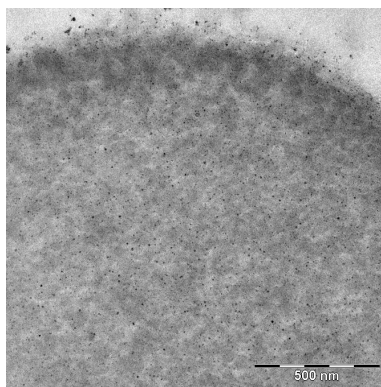
## 5.4 FUNKCIONALIZACE HYPERSÍŤOVANÝCH ČÁSTIC A SRÁŽENÍ OXIDU ŽELEZA V JEJICH PÓRECH

### 5.4.1 Hypersít'ované P(St-1%DVB) mikročástice se sulfonovými skupinami

Hypersít'ované mikročástice byly proto sulfonovány, což je konvenční metoda pro modifikaci P(St-DVB) kopolymerů. HPSX mikročástice (1 hm.% DVB) byly reagovány s koncentrovanou kyselinou sírovou za katalýzy  $(\text{Ag})_2\text{SO}_4$ . Podle analýzy síry činil obsah sulfonových skupin v částicích  $\sim 4$  mmol  $-\text{SO}_3^-/\text{g}$ . Přítomnost sulfonových skupin byla dále potvrzena ATR FTIR spektroskopií.

Při srážení oxidů železa v pórech mikročástic jsme sledovali vliv porézních vlastností různých HPSX- $\text{SO}_3^-$  mikročástic na vlastnosti produktu. Magnetické mikročástice byly připraveny z HPSM- $\text{SO}_3^-$ , HPSE- $\text{SO}_3^-$  a HPSO- $\text{SO}_3^-$  částic a sledován byl vliv koncentrace  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na množství oxidu železa vysráženého uvnitř mikročástic. I když byla koncentrace chloridů měněna v rozmezí 2-8.5 hm.%, poměr  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  byl po vždy udržován konstantní ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 2/1$  mol/mol). Nejprve byly do HPSX- $\text{SO}_3^-$  mikročástic nasáty vodné roztoky chloridů železa pomocí vakua. Po odstranění vakua a přidání vodného roztoku amoniaku byl za zvýšené teploty vysrážen oxid železa uvnitř

pórů mikročastic. Na TEM mikrofotografii řezu magnetickou mikročasticí HPSM-M5-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> je patrná přítomnost nanočastic oxidu železa o velikosti ~ 9 nm v porézní struktuře (Obrázek 2). Obsah železa byl stanoven atomovou absorpční spektroskopií (AAS), změnou obsahu uhlíku (CA) po vysrážení oxidu železa a termogravimetrickou analýzou (TGA). S rostoucí koncentrací železnatých a železitých solí vzrůstal obsah železa uvnitř mikročastic až na ~50 hm.%. Dále byly také charakterizovány magnetické vlastnosti mikročastic.



Obrázek 2. TEM mikrofotografie řezu HPSM-M5-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> mikročasticí.

#### 5.4.2 Hypersíťované P(St-5%DVB) mikročastice s aminovými skupinami

1.48 μm HPSM mikročastice s 5 hm.% DVB, připravené disperzní polymerizací v přítomnosti PVP stabilizátoru, byly před srážením magnetického oxidu železa uvnitř jejich pórů struktury nejprve sulfonovány. Ani opakovaně se však nepodařilo vysrážet oxid železa do pórů sulfonovaných HPSM mikročastic. Veškerý vysrážený oxid železa se nacházel okolo mikročastic nebo na jejich povrchu. Z tohoto důvodu byly zavedeny do HPSM mikročastic aminové skupiny, kterým je přisuzováno, že napomáhají udržet oxidy železa uvnitř pórů P(St-DVB) částic.

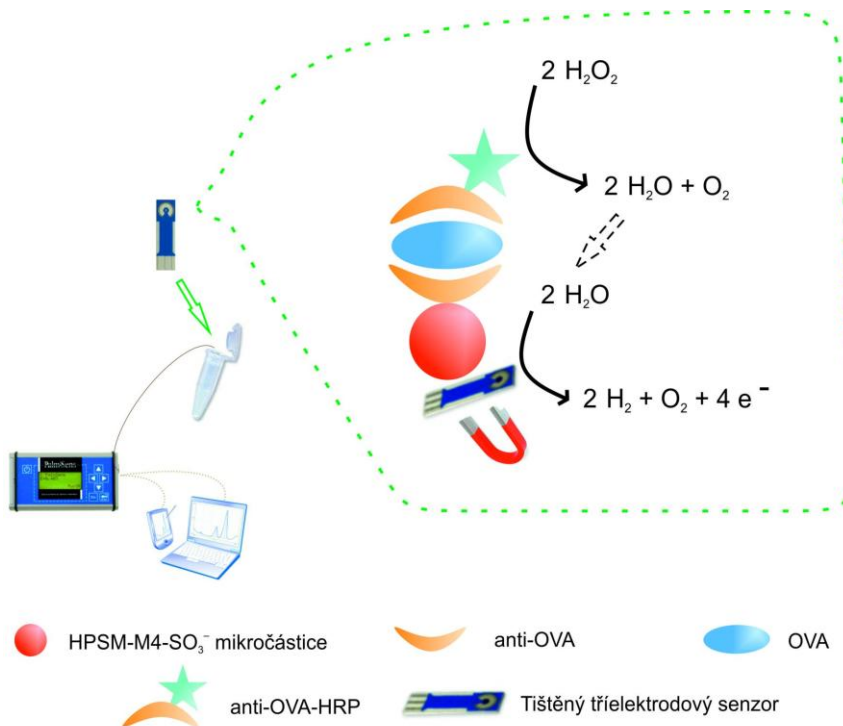
Obsah aminových skupin byl spočítán z elementární analýzy dusíku a činil ~ 3 mmol -NH<sub>2</sub>/g. Úspěšnost průběhu reakce byla rovněž potvrzena ATR FTIR. Záměna sulfonových za aminové skupiny skupin měla pozitivní vliv na vysrážení oxidu železa v pórech. V dalších experimentech jsme se snažili připravit mikročastice s vysokým obsahem oxidů železa uvnitř jejich pórů. Proto byl postup srážení oxidu železa uvnitř částic opakován třikrát. Obsah vysráženého oxidu byl opět stanoven AAS, CA a TGA a vzrostl z ~ 20 až na ~ 40 hm.%.

### 5.5 APLIKACE MAGNETICKÝCH MIKROČASTIC V IMUNOSENZORU - ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE BÍLKOVIN

V současné době jsou funkcionalizované magnetické polymerní mikročastice často využívány k elektrochemickému stanovení biologicky aktivních látek. Jejich použití s sebou nese hned několik výhod. První spočívá v nahrazení detekce „koncového bodu“ barevných enzymatických reakcí založených na principu ELISA.

Dále také nabízejí zjednodušení, zrychlení a miniaturizaci celého procesu a snadnou separaci magnetem [80]. Z důvodu adsorbce biologicky aktivních látek na povrchu elektrody imunosenzoru je jeho regenerace a opakované použití omezené. Nicméně, kombinace imunosenzoru s magnetickými mikročásticemi celý problém řeší [81,82].

Pro sestavení imunosenzoru k elektrochemické detekci bílkovin (OVA) byly použity sulfonované magnetické HPSM-M4-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> mikročástice s obsahem železa ~ 50 hm.%. Mikročástice s imobilizovaným anti-ovalbuminem (anti-OVA) byly integrovány do elektrochemického imunosenzoru sendvičového typu, kde umožnily izolaci a detekci ovalbuminu (OVA) jako modelového proteinu (Obrázek 3).



Obrázek 3. Princip elektrochemické detekce OVA pomocí sendvičového imunosenzoru s integrovanými HPSM-M4-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> mikročásticemi.

## 6 ZÁVĚR

Na začátku práce byla pro přípravu výchozích P(St-DVB) mikročastic zvolena vsádková disperzní kopolymerizace St s velmi malým množstvím DVB (0.3 hm.%) v prostředí ethanolu v přítomnosti různé koncentrace stérického stabilizátoru (HPC). Bylo zjištěno, že tímto způsobem je možno při koncentraci HPC 3.6 hm.% připravit monodisperzní 1.2  $\mu\text{m}$  P(St-DVB) mikročastice (index polydisperzity 1.05).

Z řady nízce zesíťovaných mikročastic byly pro hypersíťování vybrány častice o velikosti 1.2  $\mu\text{m}$  a 2.3  $\mu\text{m}$ . Před zahájením hypersíťovací reakce bylo nutné do mikročastic zavést reaktivní chlormethylové skupiny, kterým následně sloužily jako síťovací místa uvnitř každé častice. P(St-DVB) mikročastice byly chlormethylovány třemi činidly: CMME, CMEE a CMOE. Bylo zjištěno, že volba chlormethylačních činidel měla zásadní vliv na porézní vlastnosti připravených hypersíťovaných mikročastic. S rostoucí velikostí molekuly chlormethylačního činidla klesal objem velmi malých pórů uvnitř mikročastic, což dokumentovaly hodnoty specifického povrchu stanoveného dynamickou adsorpcí dusíku a také hodnoty porozit stanovené rtuťovou porozimetrií. Nicméně, naměřené charakteristiky je nutné interpretovat s jistou opatrností, protože během hypersíťování nízce sesíťovaných P(St-0.3%DVB) mikročastic docházelo k jejich kompletní agregaci do objektů různých tvarů a velikostí, což se následně mohlo promítnout do stanovených hodnot specifického povrchu, kumulativního objemu pórů a průměrné velikosti mezopórů stanovených rtuťovou porozimetrií. Lze soudit, že nízce zesíťované P(St-0.3%DVB) mikročastice připravené disperzní polymerizací v EtOH v přítomnosti stérického stabilizátoru HPC nejsou vhodné k hypersíťování.

Na základě předešlých poznatků jsme se snažili připravit P(St-DVB) mikročastice s vyšším obsahem DVB (1 hm.%). Pro jejich syntézu byla opět zvolena disperzní polymerizace. S cílem zvětšit průměrnou velikost P(St-DVB) mikročastic, byla polymerizace vedena ve směsi rozpouštědel MetCel/EtOH a EtCel/EtOH. Stérickým stabilizátorem byl opět HPC. Během polymerizace byl sledován vliv poměru rozpouštědel a způsobu dávkování DVB na morfologii a velikost připravených P(St-DVB) mikročastic. Zvýšení koncentrace DVB má vzhledem k rozdílné reaktivitě DVB a St zásadní vliv na průběh kopolymerizace. Nejprve byl hledán vhodný poměr MetCel/EtOH, aby byly získány mikročastice s velikostí  $\sim 4 \mu\text{m}$ . DVB byl dávkován jednu hodinu po začátku polymerizace v jednom kroku. Jako vhodný poměr se jevil MetCel/EtOH = 0.5 (w/w), kdy však vznikaly velmi polydisperzní P(St-DVB) mikročastice (PDI = 2.31). Po nalezení tohoto poměru rozpouštědel byl regulován způsob dávkování DVB. Ten byl dávkován buď v jednom kroku krátce po začátku polymerizace, nebo kontinuálním způsobem různými rychlostmi (2  $\mu\text{l}/0.5 \text{ min.}$ , 2  $\mu\text{l}/1 \text{ min.}$ , 2  $\mu\text{l}/2 \text{ min.}$  a 2  $\mu\text{l}/3 \text{ min.}$ ) jednu hodinu po začátku polymerizace. Kontinuálním dávkováním se podařilo snížit hodnotu indexu polydisperzity, tj. zúžit distribuci velikostí častic. Bylo zjištěno, že je výhodné dávkovat DVB kontinuální rychlostí  $\sim 2 \mu\text{l}/\text{min.}$  Z toho zjištění jsme vycházeli při další regulaci způsobu dávkování DVB, které jsme zahájili již 5 minut

po začátku polymerizace; přidáván byl celý objem DVB v jednom kroku, nebo kontinuálně různými rychlostmi (2  $\mu$ l/30 s, 2  $\mu$ l/45 s, 2  $\mu$ l/60 s a 2  $\mu$ l/75 s). Regulací způsobu dávkování DVB se podařilo zlepšit kvalitu mikročastic. Byl-li DVB dávkován 5 min. po začátku polymerizace rychlostí 2  $\mu$ l/45 s, měly výsledné P(St-DVB) mikročastice velikost 3.7  $\mu$ m a index polydisperzity 1.16.

Disperzní polymerizace ve směsi EtCel/EtOH byla provedena analogicky jako v případě směsi MetCel/EtOH. Jako vhodný poměr byl zjištěn EtCel/EtOH = 0.67 (w/w). Mikročastice měly velikost 2.4  $\mu$ m a PDI = 1.23. Posléze byl opět regulován způsob dávkování DVB, kdy byl přidáván celý jeho objem v jednom kroku nebo kontinuálně různými rychlostmi (2  $\mu$ l/0.5 min., 2  $\mu$ l/1 min., 2  $\mu$ l/2 min. a 2  $\mu$ l/3 min.) jednu hodinu po začátku polymerizace. Podařilo se připravit 4.2  $\mu$ m P(St-DVB) mikročastice s velmi úzkou distribucí velikostí (PDI = 1.05). Dále jsme opět dávkovali DVB 5 min. po začátku polymerizace v jednom kroku, nebo kontinuálně různými rychlostmi (2  $\mu$ l/30 s, 2  $\mu$ l/45 s, 2  $\mu$ l/60 s a 2  $\mu$ l/75 s). Opět se podařilo připravit mikročastice požadované velikosti, bohužel ale došlo k mírnému rozšíření distribuce velikostí.

V další části práce byly P(St-1%DVB) mikročastice o velikosti 3.7  $\mu$ m chlormethylovány třemi různými činidly a poté hypersít'ovány. Opět se potvrdilo, že s rostoucí velikostí molekuly chlormethylačního činidla se snižoval objem malých pórů uvnitř částic. Porézní vlastnosti byly dokumentovány adsorpcí dusíku a rtuťovou porozimetrií. Významné bylo, že se chlormethylací CMME a hypersít'ováním podařilo připravit mikročastice s velmi vysokým specifickým povrchem (1212 m<sup>2</sup>/g) a současně se také se podařilo významně zabránit agregaci částic. Nicméně, částice měly po hypersít'ování narušený povrch a část z nich mírně agregovala.

Posléze byly vyvíjeny P(St-DVB) mikročastice s obsahem DVB 1 až 5 hm.% pomocí disperzní kopolymerizace stabilizované PVP a iniciované AIBN. Sledován byl vliv různé koncentrace DVB na morfologii a velikost připravených P(St-DVB) mikročastic. S cílem najít postup přípravy takto zesít'ěných monodisperzních mikročastic jsme navýšili polaritu kontinuální fáze. Disperzní kopolymerizace St a DVB byla proto vedena ve směsi H<sub>2</sub>O/EtOH. Díky zvýšené polaritě polymerizačního prostředí se podařilo připravit monodisperzní 1.48  $\mu$ m mikročastice obsahující 5 hm.% DVB. Zvýšená polarita měla ale za následek snížení průměrné velikosti P(St-DVB) mikročastic (1.5–1.7  $\mu$ m) v závislosti na koncentraci DVB. Byl stanoven stupeň zesít'ění P(St-5%DVB) mikročastic, který odpovídal přidanému množství DVB do kopolymerizační násady.

P(St-1-5%DVB) mikročastice byly následně hypersít'ovány. Samotnému hypersít'ování předcházela chlormethylace CMME. Hypersít'ováním různě zesít'ěných výchozích mikročastic se podařilo připravit materiály s odlišnými porézními vlastnostmi. Zvýšením obsahu DVB se rovněž zabránilo agregaci mikročastic během hypersít'ování. Povrch částic byl ale po reakci porušen.

Z obou typů různě syntetizovaných P(St-DVB) mikročastic byly připraveny magnetické nosiče. Mikročastice obsahující 1 hm.% DVB, pocházející z disperzní

polymerizace ve směsi MetCel/EtOH, které byly po chlormethylaci různými činidly hypersíťovány a před srážením oxidu železa uvnitř jejich pórů funkcionalizovány sulfonovými skupinami. Poté byly do jejich porézní struktury nasáty za vakua roztoky chloridu železnatého a železitého a následně byl vysrážen magnetický oxid železa. Během přípravy magnetických P(St-DVB) mikročástic jsme zjistili, že se vzrůstající koncentrací chloridů železa v reakční směsi vzrůstal obsah oxidů železa uvnitř mikročástic. Podařilo se připravit magnetické mikročástice s obsahem železa ~ 50 hm.%.

Při srážení oxidů železa v hypersíťovaných P(St-DVB) mikročásticích připravených v přítomnosti PVP stabilizátoru a funkcionalizovaných sulfonovými skupinami se nepodařilo zavést oxid železa do pórů. Proto byly hypersíťované mikročástice funkcionalizovány aminovými skupinami. V tomto případě se podařilo vysrážet oxidy železa uvnitř pórů částic. V průběhu práce jsme se snažili připravit mikročástice s vysokým obsahem železa. Zvolili jsme proto opakované srážení oxidů železa z roztoků chloridů železa nasávaných do pórů. Bylo-li srážení opakováno třikrát, podařilo se navýšit obsah železa v částicích až na ~ 40 hm.%.

V této dizertační práci byly nově připraveny sulfonované magnetické hypersíťované P(St-DVB) mikročástice, které byly integrovány do biosenzoru pro kvalitativní elektrochemické stanovení proteinů na principu ELISA. Jako modelová bílkovina byl zvolen ovalbumin, který byl úspěšně detekován enzymatickou přeměnou peroxidu vodíku katalyzovanou křenovou peroxidázou imobilizovanou na částicích přítomných v biosenzoru.

## 7 LITERATURA

- [1] Sherrington, D.C.; Hodge, P. *Synthesis and Separations Using Functional Polymers*; John Wiley and Sons: Chichester, **1988**.
- [2] Cooper, A.R.; Vanderveer, D.S. Recent Advances in Aqueous Gel-Permeation Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1978**, *1*, 693-726.
- [3] Čoupková, M.; Janeš, K.; Sanitrák, J.; Čoupek, J. Determination of Free Polyethylene Glycols in Ethoxylated Derivatives by Liquid-Chromatography. *J. Chromatogr.* **1978**, *160*, 73-80.
- [4] Sie, S.T.; Vandenhoeed, N. Preparation and Performance of High-Efficiency Columns for Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 257-266.
- [5] Griffiths, J.; James, D.; Phillips, C. Gas Chromatography. *Analyst* **1952**, *77*, 897-904.
- [6] Collawn Jr., J.F.; Cox, D.J.; Hamlin, L.M.; Fish, W.W. Thin-Layer Gel Chromatography of Proteins in Mild and Denaturing Detergents. *J. Chromatogr. A* **1978**, *157*, 227-234.
- [7] Jandera, P. *Šeparační a analytické metody v ochraně životního prostředí; Edice Macro M-21*; Ústav makromolekulární chemie AV ČR: Praha **1996**.
- [8] Miglino, R.; Jodlowska, A.; Pappu, H.R.; Van Schadewijk, T.R. A Semi-Automated and Highly Sensitive Streptavidin Magnetic Capture-Hybridization RT-PCR Assay: Application to Genus-Wide or Species-Specific Detection of Several Viruses of Ornamental Bulb Crops. *J. Virol. Methods* **2007**, *146*, 155-164.
- [9] Hickstein, B.; Peuker, U.A. Characterization of Protein Capacity of Nanocation Exchanger Particles as Filling Material for Functional Magnetic Beads for Bioseparation Purposes. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 409-416.
- [10] Liang, H.F.; Wang, Z.C. Adsorption of Bovine Serum Albumin on Functionalized Silica-Coated Magnetic MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *124*, 964-969.
- [11] Rittich, B.; Španová, A.; Ohlashenny, Y.; Lenfeld, J.; Rudolf, I.; Horák, D.; Beneš, M.J. Characterization of Deoxyribonuclease I Immobilized on Magnetic Hydrophilic Polymer Particles. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *774*, 25-31.
- [12] Yang, M.; Li, H.; Javadi, A.; Gong, S. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as Labels for the Preparation of Ultrasensitive Electrochemical Immunosensors. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3281-3286.
- [13] Kluchova, K.; Zboril, R.; Tucek, J.; Pecova, M.; Zajoncova, L.; Safarik, I.; Mashlan, M.; Markova, I.; Jancik, D.; Sebel, M.; Bartonkova, H.; Bellesi, V.; Novak, P.; Petridis, D. Superparamagnetic Maghemite Nanoparticles from Solid-State Synthesis - Their Functionalization Towards Peroral MRI Contrast Agent and Magnetic Carrier for Trypsin Immobilization. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2855-2863.
- [14] Farbenfabriken Bayer & Co. Verfahren zur Herstellung von Künstlichem Kautschuk. Ger. Patent 254,672, **1912**.
- [15] Arshady, R. Suspension, Emulsion, and Dispersion Polymerization - A Methodological Survey. *Colloid Polym. Sci.* **1992**, *270*, 717-732.

- [16] Harkins, W.D. A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization I. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 381-382.
- [17] Harkins, W.D. A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization II. *J. Chem. Phys.*, **1946**, *14*, 47-48.
- [18] Harkins, W.D. A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1428-1444.
- [19] Smith, W.V.; Ewart, R.H. Kinetics of Emulsion Polymerization. *J. Chem. Phys.* **1948**, *16*, 592-599.
- [20] Smith, W.V. The Kinetics of Styrene Emulsion Polymerization. *J. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3695-3702.
- [21] Fitch, R.M. *Polymer Colloids, A Comprehensive Introduction*; Academic Press: San Diego, **1997**.
- [22] Ottewill, R.H.; Shaw, J.N. Studies on Preparation and Characterization of Monodisperse Polystyrene Latices. I. Preparation. *Colloid Polym. Sci.* **1967**, *215*, 161-166.
- [23] Song, Z.; Poehlein, G.W. Particle Nucleation in Emulsifier-Free Aqueous-Phase Polymerization: Stage 1. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *128*, 486-500.
- [24] Bataille, P.; Almassi, M.; Inoue, M. Emulsifier-Free Emulsion Polymerization of *n*-Butyl Methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *67*, 1711-1719.
- [25] Larpent, C. Microemulsion Polymerization as a Way to Synthesize Well-Defined Highly Functionalized Nanoparticles. In *Colloidal Polymers. Synthesis and Characterization*; Elaissari, A., Ed.; Marcel Dekker: New York, **2003**.
- [26] Kong, X.; Wu, Q.; Hu, W.; Wang, Z. Monodisperse Ultrafine Polystyrene Nanoparticles Prepared by a Semicontinuous Microemulsion Polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 4522-4528.
- [27] Chen, W.; Liu, X.; Liu, Y.; Bang, Y.; Kim, H.I. Synthesis of PMMA and PMMA/PS Nanoparticles by Microemulsion Polymerization with a New Vapor Monomer Feeding System. *Colloids Surf., A* **2010**, *364*, 145-150.
- [28] Farzi, G.; Mortezaei, M.; Badiei, A. Relationship Between Droplet Size and Fluid Flow Characteristics in Miniemulsion Polymerization of Methyl Methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *120*, 1591-1596.
- [29] Durand, A.; Marie, E. Macromolecular Surfactants for Miniemulsion Polymerization. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *150*, 90-105.
- [30] Sharon, B.S.; Margel, S. Synthesis and Characterization of Polychloromethylstyrene Nanoparticles of Narrow Size Distribution By Emulsion and Miniemulsion Polymerization Processes. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288*, 869-877.
- [31] Yildiz, U.; Capek, I.; Sarov, Y.; Corobea, M.C.; Polovkova, J. Kinetics and Colloidal Parameters of Miniemulsion Polymerization of Butyl Acrylate. *Polym. Int.* **2009**, *58*, 1411-1421.
- [32] Crespy, D.; Landfester, K. Miniemulsion Polymerization as a Versatile Tool for the Synthesis of Functionalized Polymers. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 1132-1148.

- [33] Barrett, K.E.J. Dispersion Polymerisation in Organic Media. *Br. Polym. J.* **1973**, *5*, 259-271.
- [34] Among, Y.; Reich, S.; Levy, M. Monodisperse Polymeric Spheres in the Micron Size Range by a Single Step Process. *Br. Polym. J.* **1982**, *14*, 131-136.
- [35] Kawaguchi, S.; Ito, K. Dispersion Polymerization. *Adv. Polym. Sci.* **2005**, *175*, 299-328.
- [36] Macková, H.; Horák, D. Effects of the Reaction Parameters on the Properties of Thermosensitive Poly(*N*-isopropylacrylamide) Microspheres Prepared by Precipitation and Dispersion Polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 968-982.
- [37] Babič, M.; Horák, D. Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-Based Microspheres Prepared by Heterogeneous Polymerizations. *Macromol. React. Eng.* **2007**, *1*, 86-94.
- [38] Li, W.H.; Stöver, H.D.H. Mono- or Narrow Disperse Poly(Methacrylate-*co*-Divinylbenzene) Microspheres by Precipitation Polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 2899-2907.
- [39] Shen, S.; Sudol, E.D.; El-Aasser, M.S. Dispersion Polymerization of Methyl Methacrylate - Mechanism of Particle Formation. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1994**, *32*, 1087-1100.
- [40] Thomson, B.; Rudin, A.; Lajoie, G. Dispersion Copolymerization of Styrene and Divinylbenzene. II. Effect of Crosslinker on Particle Morphology. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *59*, 2009-2028.
- [41] Song, J.S.; Tronc, F.; Winnik, M.A. Two-Stage Dispersion Polymerization Toward Monodisperse, Controlled, Micrometer-Sized Copolymer Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6562-6563.
- [42] Lu, Y.Y.; El-Aasser, M.S.; Vanderhoff, J.W. Dispersion Polymerization of Styrene in Ethanol: Monomer Partitioning Behavior and Locus of Polymerization. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1988**, *26*, 1187-1203.
- [43] Thomson, B.; Rudin, A.; Lajoie, G. Dispersion Copolymerization of Styrene and Divinylbenzene - Synthesis of Monodisperse, Uniformly Cross-Linked Particles. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1995**, *33*, 345-357.
- [44] Lacroix-Desmazes, P.; Guillot, J. Dispersion Polymerization of Styrene in Ethanol-Water Media: Monomer Partitioning Behavior and Locus of Polymerization. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1998**, *36*, 325-335.
- [45] Gao, B.; Wu, Y.C.; Zhang, Z.G.; Hua, J.J.; Yao, K.D.; Hou, X. Poly(Acrylamide-*co*-Acrylic Acid)/Poly(Vinylpyrrolidone) Polymer Blends Prepared by Dispersion Polymerization. *J. Macromol. Sci., Part B: Phys.* **2008**, *47*, 544-554.
- [46] Song, J.S.; Winnik, M.A. Cross-Linked, Monodisperse, Micro-Sized Polystyrene Particles by Two-Stage Dispersion Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8300-8307.
- [47] Li, K.; Stöver, H.D.H. Porous Monodisperse Poly(Divinylbenzene) Microspheres by Precipitation Polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1993**, *31*, 2473-2479.

[48] Ugelstad, J.; Mørk, P.C.; Kaggerud, K.H.; Ellingsen, T.; Berge, A. Swelling of Oligomer-Polymer Particles. New Methods of Preparation of Emulsions and Polymer Dispersions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1980**, *13*, 101-140.

[49] Srisopa, A.; Ali, A.M.I.; Mayes, A.G. Understanding and Preventing the Formation of Deformed Polymer Particles during Synthesis by a Seeded Polymerization Method. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2011**, *49*, 2070-2080.

[50] Okubo, M., Takekoh, R., Suzuki, A. Preparation of Micron-Sized, Monodisperse Poly(Methyl Methacrylate)/Polystyrene Composite Particles Having a Large Number of Dents on Their Surfaces by Seeded Dispersion Polymerization in the Presence of Decalin. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 1057-1061.

[51] Goncalves, O.; Asua, J.; Araújo, P.; Machado, A. Synthesis of PS/PMMA Core-Shell Structured Particles by Seeded Suspension Polymerization. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6960-6964.

[52] Okubo, M., Yonehara, H., Yamashita, T. Influence of Particle Diameter on the Morphology of Micron-Sized, Monodispersed Composite Polymer Particles Produced by Seeded Polymerization for the Dispersion of Highly Monomer-Swollen Polymer Particles. *Colloid Polym. Sci.* **2000**, *278*, 1007-1013.

[53] Okubo, M., Ise, E., Yamashita, T. Production of Micron-Sized Monodispersed Polymer Particles by Seeded Polymerization for the Dispersion of Highly Monomer-Swollen Particles Prepared with Submicron-Sized Polymer Seed Particles Utilizing the Dynamic Swelling Method. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1998**, *36*, 2513-2519.

[54] Xu, S.; Nie, Z.; Seo, M.; Lewis, P.; Kumacheva, E.; Stone, H.A.; Garstecki, P.; Weibel, D.B.; Gitlin, I.; Whitesides, G.M. Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluids: Control over Size, Shape, and Composition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 724-728.

[55] Park, J.I.; Tumarkin, E.; Kumacheva, E. Small, Stable, and Monodispersed Bubbles Encapsulated with Biopolymers. *Macromol. Rapid. Commun.* **2010**, *31*, 222-227.

[56] Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul, R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquérol, J.; Siemieniewska, T. Reporting Physisorption Data for Gas Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface-Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603-619.

[57] Davankov, V.A.; Rogozhin, S.V.; Tsyurupa, M.P. Factors Determining Degree of Swelling of Crosslinked Polymers. *Angew. Makromol. Chem.* **1973**, *32*, 145-151.

[58] Tsyurupa, M.P.; Mrachkovskaya, T.A.; Maslova, L.A.; Timofeeva, G.I.; Dubrovina, L.V.; Titova, E.F.; Davankov, V.A.; Menshov, V.M. Soluble Intramolecularly Hypercrosslinked Polystyrene. *React. Polym.* **1993**, *19*, 55-66.

[59] Veverka, P.; Jeřábek, K. Mechanism of Hypercrosslinking of Chloromethylated Styrene-Divinylbenzene Copolymers. *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 21-25.

- [60] Fontanals, N.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C. Hypercrosslinked Polymer Microspheres with Weak Anion-Exchange Character. Preparation of the Microspheres and Their Applications in pH-Tuneable, Selective Extractions of Analytes from Complex Environmental Samples. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1215*, 21-29.
- [61] Belyakova, L.D.; Schevchenko, T.I.; Davankov, V.A.; Tsyurupa, M.P. Sorption of Vapors of Various Substances by Hypercrosslinked Styrosorb Polystyrenes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, *25*, 249-266.
- [62] Jeřábek, K.; Hanková, L.; Prokop, Z. Post-Cross-Linked Polymer Adsorbents and Their Properties for Separation of Furfural from Aqueous-Solutions. *React. Polym.* **1994**, *23*, 107-112.
- [63] Germain, J.; Fréchet, J.M.J.; Svec, F. Nanoporous Polymers for Hydrogen Storage. *Small* **2009**, *5*, 1098-1111.
- [64] Xu, C.; Ohno, K.; Ladmiral, V.; Composto, R.J. Dispersion of Polymer-Grafted Magnetic Nanoparticles in Homopolymers and Block Copolymers. *Polymer* **2008**, *49*, 3568-3577.
- [65] Pilgrimm, H. Superparamagnetic Particles Process for their Manufacture and Usage. U.S. Patent 5,928,958, **1999**.
- [66] Babič, M., Horák, D., Jendelová, P., Glogarová, K.; Herynek, V.; Trchová, M.; Likavčanová, K.; Lesný, P.; Pollert, E.; Hájek, M.; Syková, E. Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-Coated Maghemite Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 283-294.
- [67] Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S. Synthesis of Very Fine Maghemite Particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, *149*, 6-9.
- [68] Carpenter, E.E.; Long, J.W.; Rolison, D.R.; Logan, M.S.; Pettigrew, K.; Stroud, R.M.; Kuhn, L.T.; Hansen, B.R.; Mørup, S. Magnetic and Mossbauer Spectroscopy Studies of Nanocrystalline Iron Oxide Aerogels. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 08N711.
- [69] Pappel, S.S. Low Viscosity Magnetic Fluid Obtained by the Colloidal Suspension of Magnetic Particles. U.S. Patent 3,215,572, **1965**.
- [70] Massart, R. Preparation of Aqueous Ferrofluids without Using Surfactant - Behavior as a Function of the pH and the Counterions. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. C* **1980**, *291*, 1-3.
- [71] Lu, S.; Ramos, J.; Forcada, J. Self-Stabilized Magnetic Polymeric Composite Nanoparticles by Emulsifier-Free Miniemulsion Polymerization. *Langmuir* **2007**, *23*, 12893-12900.
- [72] Ugelstad, J.; Ellingsen, T.; Berge, A.; Helgée, O.B. Magnetic Polymer Particles and Process for the Preparation Thereof. U.S. Patent 4,654,267, **1987**.
- [73] Skládal, P. *Biosenzory*. Masarykova Univerzita, Brno 2002.
- [74] Zhang, B.; Cui, Y.L.; Chen, H.F.; Liu, B.Q.; Chen, G.N.; Tang, D.P. A New Electrochemical Biosensor for Determination of Hydrogen Peroxide in Food Based on Well-Dispersive Gold Nanoparticles on Graphene Oxide. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1821-1829.

- [75] Cheng, Y.X.; Liu, Y.J.; Huang, J.J.; Xian, Y.Z.; Zhang, Z.G.; Jin, L.T. Fabrication of tyrosinase biosensor based on multiwalled carbon nanotubes-chitosan composite and its application to rapid determination of coliforms. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1463-1469.
- [76] Serafin, V.; Agui, L.; Yanez-Sedeno, P.; Pingarron, J.M. Glucosinolate Amperometric Bienzyme Biosensor Based on Carbon Nanotubes-Gold Nanoparticles Composite Electrodes. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1527-1532.
- [77] ISO 9277. Determination of the Specific Surface Area of Solids by Gas Adsorption – BET Method. Second Ed. International Organization for Standardization, Geneva, **2010**.
- [78] Washburn, E.W. The Dynamics of Capillary Flow. *Phys. Rev.* **1921**, *17*, 273-283.
- [79] Kaneko, K. Determination of Pore Size and Pore Size Distribution 1. Adsorbents and Catalyst. *J. Membr. Sci.* **1994**, *96*, 59-89.
- [80]. Centi, S.; Laschi, S.; Mascini M. Improvement of Analytical Performances of a Disposable Electrochemical Immunosensor by Using Magnetic Beads. *Talanta* **2007**, *73*, 394–399.
- [81] Liang, W.; Yi, W.; Li, Y.; Zhang, Z.; Yang, M.; Hu, C.; Chen, A. A Novel Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Gold Composite Nanomaterial: Synthesis and Application in Regeneration-Free Immunosensor. *Mater. Lett.* **2010**, *64*, 2616–2619.
- [82] Jaffrezie-Renault, N.; Martelet, C.; Chevelot, Y.; Cloarec, J.P. Biosensors and Bio-Bar Code Assays Based on Biofunctionalized Magnetic Microbeads. *Sensors* **2007**, *7*, 589-614.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

- $a_m$  - povrch molekuly adsorbátu  
 $A_s$  - celkový povrch adsorbentu  
AIBN - 2,2'-azobis(2-methylpropionitril)  
AAS - atomová absorpční spektroskopie  
anti-OVA (IgG) - králičí anti-ovalbumin  
anti-OVA-HRP - králičí anti-ovalbumin značený křenovou peroxidázou  
ATR FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a úplným odrazem  
BET - Brunauer-Emmett-Teller  
BPO - dibenzoylperoxid  
C - konstanta BET izotermy  
CA - analýza uhlíku  
CMEE - chlormethylethyl ether  
CMME - chlormethylmethyl ether  
CMOE - chlormethyloktyl ether  
 $D_i$  - průměr velikosti  $i$ -té částice  
 $D_n$  - početní střed průměru částic  
 $D_w$  - hmotnostní střed průměru částic  
 $D_{Hg}$  – průměrná velikost mezopórů  
DCE - 1,2-dichlorethan  
DVB – divinylbenzen  
EtCel - 2-ethoxyethanol  
EtOH - ethanol  
HPC - 2-hydroxypropyl celulóza  
HPSX - hypersíťované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice  
HPSM-NH<sub>2</sub> hypersíťované chlormethylmethyl etherem reagované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice obsahující aminové skupiny  
HPSM-M-NH<sub>2</sub> – magnetické hypersíťované chlormethylmethyl etherem reagované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice obsahující aminové skupiny  
HPSM-NO<sub>2</sub> – hypersíťované chlormethylmethyl etherem reagované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice obsahující nitroskupiny  
HPSX-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> – hypersíťované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice obsahující sulfonové skupiny  
HPSX-M-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> – magnetické hypersíťované poly(styren-*co*-divinylbenzenové) mikročástice obsahující sulfonové skupiny  
IgG – imunoglobulin G  
L - Avogadrova konstanta  
 $m$  - hmotnost adsorbentu  
MetCel - 2-methoxyethanol  
 $n^a$  - počet molekul adsorbátu zachycených na povrchu adsorbentu za jednotku času  
 $n_m^a$  - adsorpční kapacita adsorbentu při zaplnění jednou vrstvou molekul adsorbátu  
 $n_i$  - počet částic  $i$ -té frakce

$P$  - absolutní tlak

$\left(\frac{p}{p^*}\right)$  - relativní tlak

PDI - index polydisperzity

P(St-DVB) - poly(styren-*co*-divinylbenzen)

PSt - polystyren

PVP – poly(*N*-vinylpyrrolidon)

$r$  - poloměr póru

$S_{\text{BET}}$  - specifický povrch

SEM - rastrovací elektronová mikroskopie

St – styren

TEM - transmisní elektronová mikroskopie

$V$  – objem částic či porézního materiálu

$V_{\text{Hg,celkový}}$  – kumulativní objem mezo- a makropórů

$V_{\text{Hg}}$  – kumulativní objem mezopórů

$\theta$  - plocha adsorbentu obsazená molekulami plynu

## 9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

### 9.1 ČLÁNKY

Rittich, B.; Španová, A.; Šálek, P.; Němcová, P.; Trachtová, Š.; Horák D. Separation of PCR-Ready DNA from Dairy Products Using Magnetic Hydrophilic Microspheres and Poly(Ethylene Glycol)-NaCl Water Solutions. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1667-1670.

Svobodová, A.; Křížek, T.; Širc, J.; Šálek, P.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Štulík, K. Monolithic Columns Based on a Poly(Styrene-Divinylbenzene-Methacrylic acid) Copolymer for Capillary Liquid Chromatography of Small Organic Molecules. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1544-1547.

Šálek, P.; Horák D. Hypercrosslinked Polystyrene Microspheres and Polydivinylbenzene Microspheres from Dispersion and Suspension Polymerization. *e-Polymers* **2011**, *064*, 1-12.

Šálek, P.; Korecká, L.; Horák, D.; Petrovský, E.; Kovářová, J.; Metelka, R.; Čadková, M.; Bílková, Z. Immunomagnetic Sulfonated Hypercrosslinked Polystyrene Microspheres for Electrochemical Detection of Proteins. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 14783-14792.

Čadková, M.; Korecká, L.; Šálek, P.; Metelka, R.; Bílková, Z. Voltammetric Detection of Ovalbumin at Screen-Printed Electrodes in Combination with Immunomagnetic Particles. *Sens. Electroanal.* **2011**, *6*, 347-356.

### 9.2 PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH

Rittich, B.; Španová, A.; Šálek, P.; Trachtová, S.; Horák, D. Application of Aqueous Phase System and Hydrophilic Magnetic Microspheres for Isolation of Bacterial PCR-Ready DNA from Dairy Products, 7<sup>th</sup> International Conference Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Vancouver 2008, Canada.

Šálek, P.; Horák, D. Hypercrosslinked Polystyrene Microspheres: Design and Properties, IPCG Conference on Polymer Colloids 2009, Il Cioco 2009, Italy.

Šálek, P.; Horák, D. Dispersion Polymerization of Styrene for Preparation of Novel Monodisperse Hypercrosslinked Microspheres, Chemie a společnost, VUT Brno 2009.

Šálek, P.; Horák, D. New Highly Magnetic Microspheres Based on Hypercrosslinked Poly(Styrene-*co*-Divinylbenzene), MACRO 2010, 43<sup>rd</sup> IUPAC World Polymer Congress, Glasgow 2010, UK.

Fenclová, T.; Širc, J.; Munzarová, M.; Lhotka, M.; Šálek, P.; Příkladný, M.; Hobzová, R.; Michálek, J. Nanofibrous Scaffolds Prepared by Electrospinning: Preparation and Morphology Characterization, ICPAC 2010, Réduit 2010, Mauritius.

Šálek, P.; Horák, D. Příprava a charakterizace magnetických vysoce zesíťených polymerních nosičů, Vzdělávací a informační středisko ÚMCH AV ČR, Praha 2011.

Rittich, B.; Španová, A.; Trachtová, Š.; Šálek, P.; Horák, D. Magnetic and Nonmagnetic Particles for Biotechnological Applications. 11th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, Pretoria 2011, South Africa.

Korecká, L.; Čadková, M.; Šálek, P.; Metelka, R.; Bílková, Z. Combination of Innovative Magnetic Particles and Electrochemical Immunosensor for Ovalbumin Detection, 5<sup>th</sup> International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring, Ouarzazate 2011, Morocco.