



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Pavel Doležal

**Korelace AFM a mikro-spektroskopie aplikovaná na
soubor nanočástic**

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Anna Fučíková, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Fyzika se zaměřením na vzdělávání

Praha 2022

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat Mgr. Anně Fučíkové, Ph.D. za vedení mé práce, trpělivost a ohromné množství předaných poznatků a nových informací.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Název práce: Korelace AFM a mikro-spektroskopie aplikovaná na soubor nanočástic

Autor: Pavel Doležal

Katedra / Ústav: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Anna Fučíková, Ph.D, Katedra chemické fyziky a optiky

Abstrakt: Tato práce se zabývá dvěma velmi moderními metodami používanými pro zkoumání světa v menším než mikro měřítku. První z nich je tzv. AFM (mikroskopie atomárních sil), používaná pro měření topologie vzorku až na atomární úrovni. Druhou je mikro-spektroskopie používaná pro zkoumání charakteru emisních spekter nanočástic. Cílem této práce je spojit obě tyto metody tak, aby bylo možné detailně proměřit velikost a tvar nanočástic a současně zkoumat jejich emisní spektrum.

V první části práce podrobně představuji obě metody, čtenáři předkládám jejich principy, výhody a použití. V druhé části popisuji provedená přípravná měření – jako je délková a směrová kalibrace kamer měřící soustavy a výběr vhodné podložky pod vzorek. V závěru druhé části odvozuji a poté předkládám mnou navržený postup.

Postup sestává z 20 kroků a s jeho využitím bude možné podrobněji studovat luminiscenční záření pocházejících z nanometrových zdrojů, především zkoumat jeho závislost na tvaru a velikosti nanočástice. Velmi slibnou je také možnost měřit vliv vzdálenosti dvou nanočástic na jejich emisní spektra.

Klíčová slova: AFM, mikroskopie atomárních sil, nanočástice, mikro-spektroskopie, luminiscence

Title: Combination of AFM and micro-spectroscopy applied on nanoparticles

Author: Pavel Doležal

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: Mgr. Anna Fučíková, Ph.D, Department of Chemical Physics and Optics

Abstract: This thesis is about two very modern scientific methods used to study the world in smaller than micro scale. The first one of them is atomic force microscopy (AFM) which is used to measure the topology of a sample at the atomic scale. The second one is micro-spectroscopy which is used to study the nature of emission spectra of nanoparticles. The goal of this thesis is to combine these two methods so that it can be used to measure in detail the size and the shape of nanoparticles and in the same time study their emission spectra.

In the first part of the thesis I present both methods, their principles, benefits and applications. In the second part I describe performed measurements, such as scale and directional calibration of measuring apparatuses cameras and selection of suitable sample carrier. At the end of the second part, I present my proposed procedure how to pair the same sample location studied by AFM and micro-spectroscopy.

The procedure consist of 20 steps and with its use it will be possible to study luminescence emission in more detail, especially for example examine its dependence on the shape and size of the nanoparticle. The ability to measure the effect of the distance between two nanoparticles on their emission spectra is also very promising.

Keywords: AFM, atomic force microscopy, nanoparticles, micro-spectroscopy, luminescence

Obsah

1 Předmluva	2
2 Teoretický úvod	3
2.1 Mikroskopie atomárních sil	3
2.1.1 Základní princip	3
2.1.2 Sestavení obrazu	5
2.1.3 Módy	6
2.1.4 Praktické aplikace AFM	9
2.1.5 Vznik artefaktů	10
2.2 Mikro-spektroskopie	12
2.2.1 Obecný princip	12
2.2.2 Praktické aplikace.....	16
3 Korelace AFM a mikro-spektroskopie.....	17
3.1 Použité přístroje a jejich uspořádání.....	17
3.2 Synchronizace obrazů.....	22
3.2.1 Orientace.....	22
3.2.2 Měřítka.....	25
3.2.3 Šířka štěrbin.....	29
3.3 Výběr podložky	31
3.3.1 Měření tloušťky podložek	32
3.3.2 Měření luminiscenčních spekter podložek	34
3.4 Návrh korelace	39
3.4.1 Zaměření štěrbin	40
3.4.2 Zaměření hrotu	42
3.4.3 Zaměření oblasti měření	44
3.4.4 Zaměření spektrálních stop.....	46
3.4.5 Navržený postup	47
3.5 Příklad korelace AFM a mikro-spektroskopie.....	50
4 Diskuze	52
5 Závěr	55
Seznam použité literatury	56
Seznam tabulek	58

1 Předmluva

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je moderní mikroskopická metoda vyvinuta roku 1985 německými fyziky G. Binnigem, C. F. Quatem a Ch. Gerberem. Tato metoda svým rozlišením dalece přesahuje schopnosti optických mikroskopů a zároveň poskytuje informaci o topologii a mechano-chemických vlastnostech povrchu vzorku. Díky tomu, že dolní hranice rozlišení sahá, až k možnosti identifikovat jednotlivé atomy se dnes používá zejména v biologii, mikrobiologii, nanotechnologii, polymerní vědě, fyzice nebo ve výzkumu ukládání energie.

Mikro-spektroskopie je metoda umožňující zkoumat luminiscenci vzorků z oblastí menších než mikrometr, která nachází užítí zejména v prohlubování porozumění luminiscenčních jevů.

Přestože je možné přístroje pro AFM a mikro-spektroskopii propojit tak, aby oba pozorovali stejný vzorek, nebyl v době zadání této bakalářské práce publikován postup, jak přístroje pro AFM a mikro-spektroskopii zaměřit současně na jednu konkrétní nanočástici. Právě vytvoření tohoto postupu je primárním cílem této práce, neboť by mohl usnadnit další výzkum nejen nanočástic. Pokud by se podařilo tento postup vytvořit, bylo by možné např. zkoumat vliv jemných rozdílů ve tvaru a velikosti nanočástice na její emisní spektrum, nebo zkoumat, jak je toto spektrum ovlivněno přítomností další nanočástice v závislosti na jejich vzájemné vzdálenosti. Sekundárním cílem této práce je poté přiblížení moderních mikroskopických metod širšímu publiku, především učitelům fyziky, a seznámení je s přístroji využívanými v současném výzkumu na konkrétním příkladu.

Tato práce je psána obecnější formou, tak aby byla snadno dostupná pro širokou veřejnost bez požadavků na hluboké odborné znalosti konkrétního oboru fyziky. První část této práce se zabývá popisem AFM a mikro-spektroskopie, především jejich fyzikálních principů, druhá část je zaměřena na konkrétní měření a obrazovou synchronizaci obou zařízení. Nejprve je popsána celá měřící aparatura a poté jsou popsána přípravná měření nezbytná pro provedení korelace, jako je délková kalibrace použitých kamer, zjištění vzájemné orientace jejich obrazů a výběr podložky. Na základě přípravných měření byla vytvořena poslední část, ve které je popsán samotný návrh postupu korelace AFM a mikro-spektroskopie, tento návrh byl úspěšně aplikován a jeho kvalita vyhodnocena.

2 Teoretický úvod

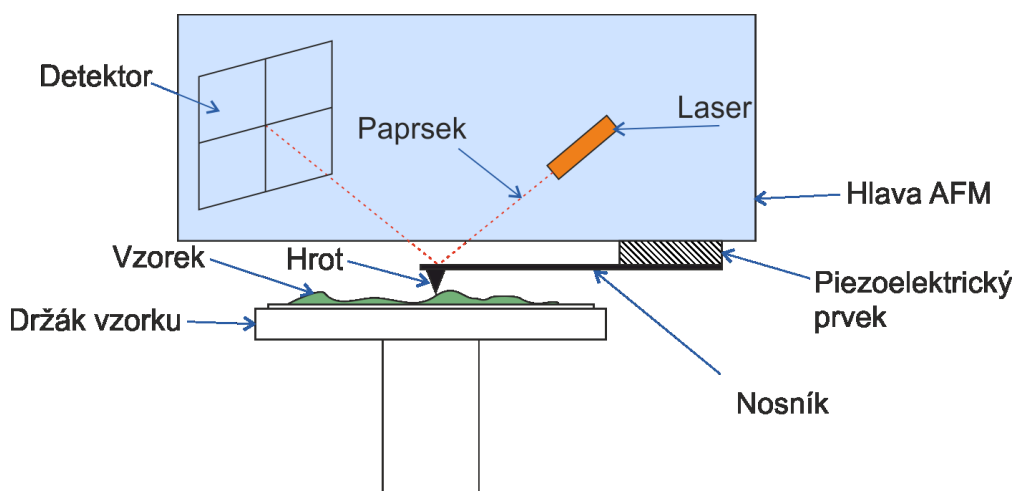
2.1 Mikroskopie atomárních sil

AFM je zkratka pro mikroskopii atomárních sil (z anglického *atomic force microscopy*). Jak název napovídá, jedná se o metodu mikroskopického zobrazování vzorku, jako je například optická, elektronová, nebo tunelová mikroskopie. Oproti optické mikroskopii však AFM nemá rozlišení omezeno difrakcí, nebo aberací, jelikož k interakci se vzorkem a jeho zkoumání nepoužívá světelný paprsek. Místo světelného paprsku se ke zkoumání vzorku využívá kontakt snímací sondy s povrchem vzorku a jejich přímou vzájemnou interakci. Na rozdíl od tunelové mikroskopie, která také využívá sondu, není ke zkoumání vzorku použit tunelový proud, ale zaznamenávání působení mezi atomy sondy a atomy vzorku, které pochází přímo z mezi-atomových interakcí, jako jsou např. van der Waalsovy síly, kapilární síla, elektrostatická síla, atd. Takto jsme schopni získat informaci o topologii vzorku, která ve svislé ose (ose z) dosahuje až atomárního rozlišení. V osách x , y jsme v rozlišení omezeni velikostí špičky hrotu sondy, ta je v řádu několika nanometrů.

AFM neklade významné požadavky na prostředí, ve kterém se vzorek musí nacházet. Na rozdíl od elektronové mikroskopie může AFM měření probíhat na vzduchu, ve vakuu, ve vlhkém i přímo v kapalném prostředí, což otevírá široké možnosti, např. studovat biologické vzorky v jejich přirozeném prostředí

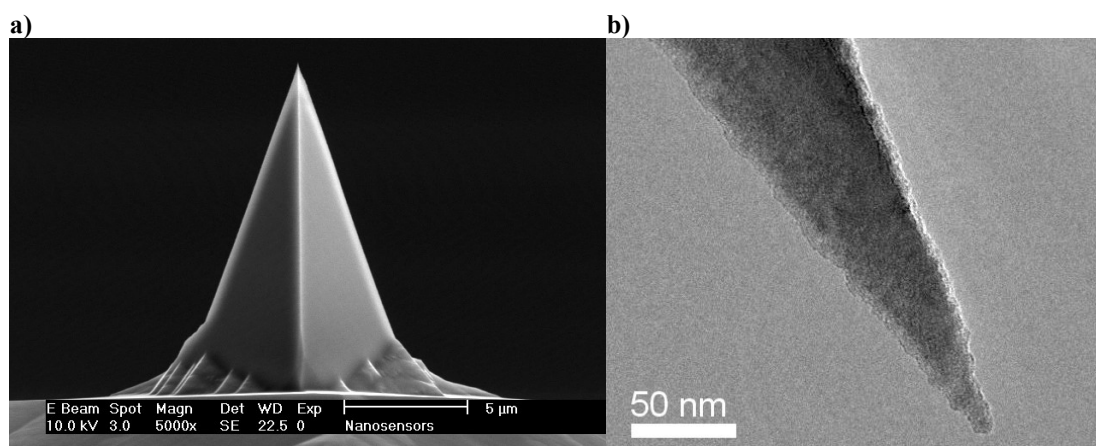
2.1.1 Základní princip

Schématické znázornění principu AFM je zobrazeno na Obr. 2.1



Obr. 2.1 – Schéma principu AFM

Základní částí AFM je sonda, která sestává z malého pružného nosníku (délky řádově 0,1 mm), který je přes piezoelektrický prvek, neboli piezoelement, pevně uchycen k tzv. AFM hlavě. AFM hlava v sobě obsahuje potřebné optické elementy typu laser, detektor ale i mechanické části, např. motory pro hrubý posuv v ose z. Piezoelement je schopen se v závislosti na přiloženém napětí buď smršťovat, nebo roztahovat a to v řádu nanometrů až po v případě našeho zařízení 10 μm . Poloha nosníku je detekována pomocí laserového paprsku - když dojde ke kontaktu se vzorkem, tak se nosník prohne a tím pádem dojde k vychýlení laserového paprsku na detektoru. Dle typu měření jsme potom schopni ovlivňovat jemné pohyby hrotu nad vzorkem, nebo pracovat v bezkontaktním módu. Jak jsem zmínil výše, hlava bývá zpravidla opatřena malými krokovými motory pro hrubé posuvy sondy určené k hrubému přiblížení se ke vzorku, avšak během vlastního měření se tyto krokové motory nevyužívají a hlava zůstává ideálně v konstantní výšce. Namísto toho se během měření pro pohyb sondy využívá piezoelektrický element (který se smršťuje či roztahuje). Nosník je k AFM hlavě uchycen přes piezoelement pouze jedním koncem tak, aby druhý konec byl volný a mohl vibrovat a interagovat se vzorkem. Tento volný konec je ze spodní části opatřen hrotem, jehož délka se pohybuje v jednotkách μm , špička hrotu bývá běžně s poloměrem menším než 15 nm, avšak vyrábí se i s poloměrem 2 nm [1]. Příklad hrotu včetně měřítka je pro ilustraci zobrazen na Obr. 2.2.



Obr. 2.2 – Elektronové snímky hrotu PPP – NHCR (spol. Nanosensors) [2]

- a) Přední pohled na hrot
- b) Detail vrcholu hrotu

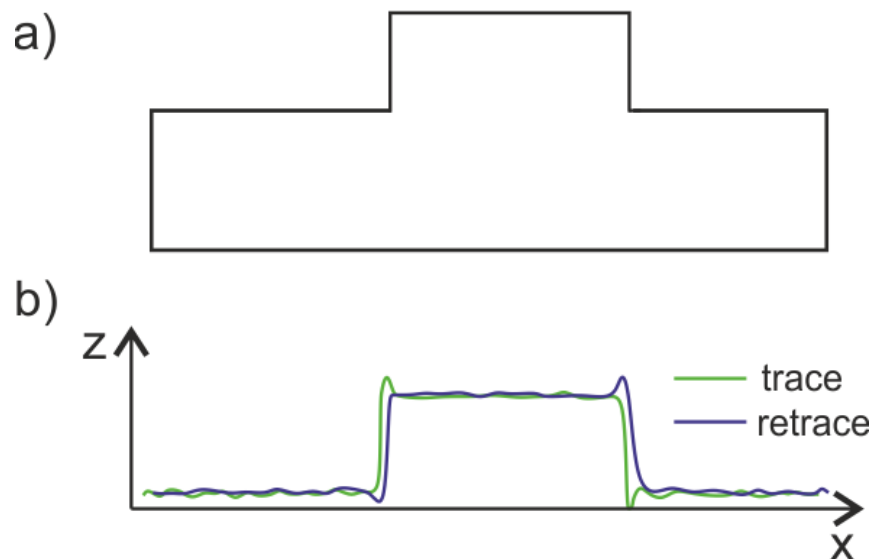
Hrot je jedinou částí celého AFM mikroskopu, která přichází do kontaktu se vzorkem. V závislosti na velikosti atomárních sil působících na hrot se celý nosník vychyluje, nebo se mění amplituda jeho kmitů. Tyto změny jsou však příliš malé na to, aby se zaznamenávaly přímo a z tohoto důvodu je vrchní část nosníku ozářena laserovým paprskem, tento paprsek se od nosníku odráží a dopadá na detektor, kde je měřena jeho výchylka. Tato výchylka je poté přepočítána softwarem dodaným k AFM a následně je určena výška vzorku v daném bodě. Z těchto výpočtu můžeme získat i mechano-chemické vlastnosti daného bodu vzorku, pokud použijeme správný mód a hrot. Velikost jednoho bodu výsledného obrazu je limitována špičkou hrotu (obr. 2.2 b), tj. čím ostřejší hrot tím lepšího rozlišení je možno dosáhnout. Detektor i laser jsou pevnou součástí hlavy AFM.

Vzorek je upevněn na desku, na které stojí AFM hlava a ta bývá zpravidla opatřena vlastními polohovacími mechanismy. V našem případě je možné zároveň sledovat vzorek zesponu optickým mikroskopem. Celé zařízení je umístěno na anti-vibračním stole, aby se vibrace z okolí nepřenášely na vzorek.

2.1.2 Sestavení obrazu

Výsledný obraz AFM měření lze interpretovat jako závislost výšky vzorku na souřadnicích x , y . Měření obvykle probíhá tak, že piezoelement pohne hrotem přes celý zvolený rozsah x -ové souřadnice od prvního po poslední pixel řádku a zpět a až poté je posunut ve směru osy y o jeden pixel při zvoleném rozlišení. Výsledek měření při konstantní souřadnici y a rostoucí souřadnici x je označován jako tzv. *trace* stopa, při klesající souřadnici x jako tzv. *retrace* stopa zvoleného řádku. Jeden řádek obrazu je poté vytvořen jako průměr *trace* a *retrace stop*. V ideálním případě by obě stopy měly být naprosto shodné, ve skutečnosti však k naprosté shodě nikdy nedochází a úkolem operátora AFM je najít takové parametry měření, aby rozdíl mezi stopami byl minimální.

Porovnání *trace* a *retrace stop* lze provádět v průběhu měření, nebo zobrazit zpětně. Zpětné zobrazení je vhodné například pro identifikaci tzv. obrazových artefaktů, tj. rozdílů naměřeného tvaru vzorku proti jeho skutečnému tvaru (více viz 2.1.5 dále). Příklad porovnání a artefaktů je zobrazen na Obr. 2.3 – zde zobrazené artefakty v okolí hran jsou typické pro vzorky s ostrými hranami a lze je minimalizovat např. snížením rychlosti skenu. [3]



Obr. 2.3 – Příklad rozdílu mezi stopami *trace* a *retrace*

- a) Skutečný tvar profilu vzorku
- b) Naměřený tvar profilu vzorku

2.1.3 Módy

AFM může snímat povrch vzorku v několika různých módech, ty nejčastější jsou v následujících odstavcích popsány.

2.1.3.1 Kontaktní mód

V tomto módu je hrot nosníku tažen po povrchu vzorku a měřena je buď výchylka nosníku při konstantním napětí na piezoelementu, nebo je naopak držena konstantní výchylka nosníku a měřeno je napětí na piezoelementu potřebné pro udržení této výchylky (napětí je řízeno zpětnovazebním signálem z určení polohy nosníku pomocí výchylky laseru).

Nevýhodami tohoto módu jsou: riziko přichycení hrotu ke vzorku vlivem přitažlivých atomárních sil, riziko poškození vzorku a nosníku nárazem (v případě vzorku s velkými rozdíly výšek), nebo riziko odtržení části vzorku a jeho nalepení na hrot v případě měkkých, nebo lepkavých vzorků, všechny tyto poškození způsobují vznik nepřesností v měření a obrazových artefaktů. Zároveň kontaktní mód vede k rychlému opotřebení a ztupení hrotu, což vede ke snížení rozlišovací schopnosti tohoto hrotu v osách x , y . Tento mód byl používán spíše u prvních AFM přístrojů [4] a v dnešní době se používá především, pokud chceme kromě topografie měřit i jiné vlastnosti, jako je adhezivita, nebo konduktivita, kdy je kontakt se vzorkem nutný.

2.1.3.2 Režim AC

Režim Anglicky zvaný „*Tapping mode*“, který by bylo možné přeložit jako „*Režim klepání*“, nejčastěji však nazývaný AC mód je režim patřící do typu měření pomocí přerušovaného kontaktu se vzorkem. Byl vyvinut jako řešení již zmíněného problému kontaktního módu, který se týkal zvýšeného rizika poškození vzorku a otupení hrotu [5]. V tomto režimu volný konec nosníku s hrotem nuceně osciluje v blízkosti své vlastní rezonanční frekvence v nízké výšce nad vzorkem. Oscilací je nejčastěji dosaženo pomocí piezoelektrického prvku, ale mezi další možnosti patří střídavé magnetické pole, střídavé zahřívání modulovaným laserovým paprskem a další [6]. Oscilace jsou řízeny řídicím signálem, který má pevně nastavené hodnoty buď frekvence, nebo amplitudy. To znamená, že dokud není hrot v kontaktu s povrchem, je i frekvence a amplituda volného konce nosníku konstantní. Jakmile dojde k přiblížení nosníku k povrchu vzorku, pak je-li například pevně nastavená frekvence (ta je následně vynucována pomocí piezoelementu), změní se vlivem meziatomárních sil hodnota amplitudy. Tato změna amplitudy je detekována, použita jako zpětnovazební signál a následkem toho, se upraví svislá poloha nosníku tak, aby amplituda kmitů nosníku odpovídala řídicímu signálu s určenou tolerancí. Obraz je následně zrekonstruován jako mapa svislé polohy nosníku. Toto měření lze provést i obráceně kdy se pomocí piezoelementu vynucuje amplituda a měří se změna frekvence.

Kromě svislé polohy nosníku je v tomto režimu možné zaznamenávat také fázi mezi frekvencí řídicího signálu a frekvencí kmitů nosníku. Hodnota fáze se bude v průběhu měření měnit v závislosti na lokálních mechanických vlastnostech vzorku, jako je tuhost.

Při měření v AC módu je základní požadavek na hodnotu frekvence daného nosníku, aby byla mnohem vyšší, než frekvence vibrací budov, která je nejsilnější v okolí hodnoty 100 Hz [7] (v mém případě se jedná o frekvenci 30 – 60 Hz). Tohoto požadavku je běžně dosahováno, neboť rezonanční frekvence pro měření v AC módu se dnes u běžných nosníků pohybuje od desítek do stovek kHz, v případě ultrakrátkých nosníků dokonce do řádu tisíců kHz [1]. Amplituda kmitů se běžně pohybuje od jednotek nm do stovek nm [6].

Výhoda tohoto režimu, oproti kontaktnímu, spočívá v mnohonásobně menších podélných silách působících na vzorek během měření. Tím je sníženo riziko posunutí

i těch částí vzorku, které nejsou pevně přichyceny k podkladu. Zároveň tento typ měření umožňuje získat maximální možné rozlišení v osách x , y při dané šířce špičky hrotu oproti jiným módům při použití hrotu se špičkou shodných parametrů.

2.1.3.3 Bezkontaktní režim

Stejně jako přerušovaný režim, je bezkontaktní režim založen na kmitání nosníku v blízkosti rezonanční frekvence. V případě bezkontaktního režimu však není hrot v přímém kontaktu s povrchem vzorku, ale jeho frekvence a amplituda kmitů jsou ovlivňovány pouze prostřednictvím sil, které dosahují nad povrch (např. van der Waalsova síla je nejsilnější od 1 nm do 10 nm). Tyto síly působí jako tlumení kmitů a tedy snižují rezonanční frekvenci, změna rezonanční frekvence se projeví změnou amplitudy a ta je poté zaznamenána. Zpětnovazebním systémem je poté upravena výška nosníku tak, aby byla udržena konstantní frekvence, nebo amplituda (záleží na zvolené modulaci) a hodnota této změny výšky je zpracována a převedena na obraz povrchu vzorku.

Výhodou režimu je, že hrot není během celého oscilačního cyklu v přímém kontaktu se vzorkem, ale nachází se několik nm nad jeho povrchem a dochází tak k nejmenšímu možnému narušení vzorku i opotřebením hrotu. Výraznou nevýhodu způsobují přitažlivé síly mezi atomy vzorku a hrotu, jejich vlivem může docházet k náhodnému přilnutí hrotu k povrchu vzorku a tím dojít k narušení měření. Tento jev je nejvýraznější v případě vzorků, na kterých je přítomna vrstva vody, kdy přilnutí způsobují především kapilární síly.

2.1.3.4 Další módy

AFM je schopné pracovat v celé řadě dalších módů, jako je například QI mód zaznamenávající v každém pixelu výsledného obrazu celou silovou křivku (závislost síly na vzdálenosti), z analýzy této křivky se dají určit mechanické vlastnosti v daném bodě včetně např. Youngova modulu pružnosti vzorku. Dalším módem je silou modulovaný mód, kdy vrchol hrotu osciluje pod povrchem vzorku, nebo různé módy pro manipulaci se vzorkem, jako je přesun molekul, vytahování zachycených molekul ze vzorku, narušování vzorku atd. Tyto módy, ač velice užitečné pro studium vzorků jsou zbytečně komplikované pro hledání základního postupu pro korelaci s mikrospektroskopií, proto jsou v této práci uvedeny pouze pro doplnění celkového obrazu o možnostech AFM.

2.1.4 Praktické aplikace AFM

AFM bylo vyvinuto v 80. letech 20. století pro rozšíření použitelnosti řádkovacího tunelového mikroskopu (STM) na biologické vzorky. Od doby svého vzniku se rozšířilo do mnohem širšího spektra oborů díky velké škále použitelnosti, jednoduchému zacházení a relativně nízké ceně přístrojů (viz úvod kapitoly 7 v [8]).

Pro materiální vědy a především pro fyziku povrchů má mimořádný význam schopnost AFM zobrazovat jednotlivé atomy¹, díky čemuž je možné zkoumat jemné povrchy kovů a identifikovat jednotlivé absorbované prvky (viz kapitola 7.1.3 v [7]). Vysokého rozlišení se používá i pro zobrazení jednotlivých molekul, nebo jejich uspořádání na krystalech, případně při sledování vzájemné interakce mezi molekulami. V tomto ohledu je také využíváno možnosti provádět AFM měření ve velmi různorodých prostředích, umožňující studii molekul tzv. *in situ* (lat. v *původním místě*) tj. v podmínkách imitujících situaci v jejich přirozeném prostředí. Možnosti měřit pomocí AFM mechanické, elektrické a magnetické vlastnosti v nano-měřítku se využívá pro studium mechanických charakterizací materiálů, tření, pro měření míry opotřebení a další (kapitola 7.1 [7]). Velmi úspěšně bylo AFM aplikováno například pro výzkum hrubosti povrchů lékařských titanových implantátů, kde hrubost hraje kritickou roli v jejich biokompatibilitě (kapitola 7.1.1 [8]).

V nanotechnologických oborech je AFM považováno za jeden z nejdůležitějších nástrojů, jelikož představuje často jedinou možnost, jak provést dimensionální, elektrické a magnetické měření v oblastech řádu 10 nm s požadovanou přesností (kapitola 7.2 [7]) Přesnost AFM hraje významnou roli například při studiu kvantových teček (luminiscenčních nanočástic, kam patří i námi studované křemíkové nanočástice), nebo ve studiu nanotrubiček a jim podobných objektů (kapitola 7.2.1 [7]). Avšak AFM lze využít i při dílčích konstrukcích některých nanozařízení, jako je konstrukce vodičů, kontaktů, tranzistorů, nanotyček atd. (kapitola 7.2.3 [8]).

Velmi široké uplatnění má AFM dodnes také v biologii, kde je využita především možnost provádět AFM měření v širokém rozsahu prostředí, např. v kapalném, což umožňuje měření ve fyziologických podmínkách. Díky tomu je AFM využíváno při měření a zobrazování bakterií, měření mechanických vlastností lipidových dvojvrstev, zobrazování celých živých buněk, ale i jejich vnitřních struktur

¹ Atomové rozlišení je možné použít jen v případě extrémně čistých materiálů a ve vakuu

včetně sledování dynamických jevů (kapitola 7.3 [7]). Tyto možnosti vedly například proměřením zdravých a nádorem napadených buněk k prokázání, že nádorem napadené buňky mají oproti zdravým výrazně sníženou tuhost. Velký přínos má AFM také při léčbě některých typů rakoviny, kde slouží AFM jako hlavní diagnostický nástroj (kapitola 7.3.4 [7]).

Přestože se technika AFM uplatnila v tak širokém rozsahu, má i svá omezení. Hlavním faktorem omezujícím použitelnost je maximální rozdíl výšek povrchu vzorku ve skenované oblasti, ten nesmí zpravidla přesahovat jednotky až nižší desítky μm kvůli omezenému rozsahu pohybu piezoelementu v ose z. Samotná velikost skenované oblasti nemůže přesahovat přibližně $150 \times 150 \mu\text{m}$ ze stejného důvodu. Použití AFM se také stává problematické, je-li důležitá rychlost skenování, neboť změřit běžný AFM sken trvá několik minut, při vyšších rozlišeních a velikostech snímané oblasti až desítky minut. Dalším faktorem ovlivňujícím použitelnost a kvalitu zobrazování je vznik artefaktů, kterému se věnuje následující oddíl.

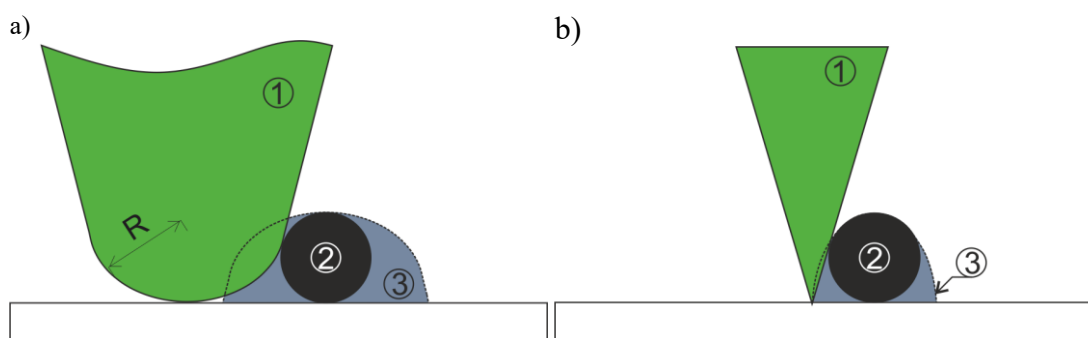
2.1.5 Vznik artefaktů

Jako artefakty jsou při zobrazování povrchů označovány rozdíly mezi získanými daty a skutečným povrchem vzorku. Tyto artefakty je nezbytné znát a dokázat rozeznat pro správnou interpretaci výsledků měření a pro optimalizaci zadávaných parametrů. Artefakty lze rozdělit do mnoha kategorií, např. dle příčiny jejich vzniku. Pro jejich názornost jsou v následujících odstavcích popsány artefakty způsobené hrotem, mezi další patří například artefakty způsobené elektronickým šumem, tepelným šumem, znečištěním vzorku, nelinearitou piezoelementů, vibracemi budovy, světelnou interferencí, počítačovým zpracováním obrazu, nastavenými parametry atd. Podrobný rozbor všech těchto typů by dalece přesahoval rozsah bakalářské práce, pro hlubší popis lze nahlédnout do [3; 4; 8].

2.1.5.1 Artefakty způsobené hrotem

Jakýkoliv obraz získaný metodou AFM je vlastně konvolucí geometrie hrotu a geometrie povrchu vzorku. Je tedy zřejmé, že konkrétní tvar použitého hrotu, a hlavně jeho špičky, bude mít veliký vliv na kvalitu obrazu. V ideálním případě by hrot byl velice ostrý a úzký - jednalo by se o konvoluci hrotu, reprezentovaného matematickou delta funkcí, a povrchu. Z této konvoluce by nám vyšel přesný tvar povrchu bez artefaktů s maximálním rozlišením. V reálném případě se však hrot jako čistá delta

funkce nechová, proto budeme tvar hrotu, i když stále idealizovaně, charakterizovat dvěma veličinami: poloměrem hrotu R , neboli poloměrem křivosti vrcholu hrotu, a úhlem hrotu α , který získáme jako úhel mezi svislou osou hrotu a boční stěnou jehlanu, který tvoří hrot. Poloměr hrotu R bude hrát významnou roli například, bude-li vzorek tvořen sférickými částicemi s poloměrem r menším, než je poloměr R . Tato situace je znázorněna na Obr. 2.4. V tomto případě bude výsledný obraz *de facto* obrazem hrotu – zkoumaná částice v takovém případě přebírá roli sondy. Zdánlivá velikost částice bude výrazně blíže té skutečné, bude-li užit hrot s výrazně menším poloměrem. [3; 6]



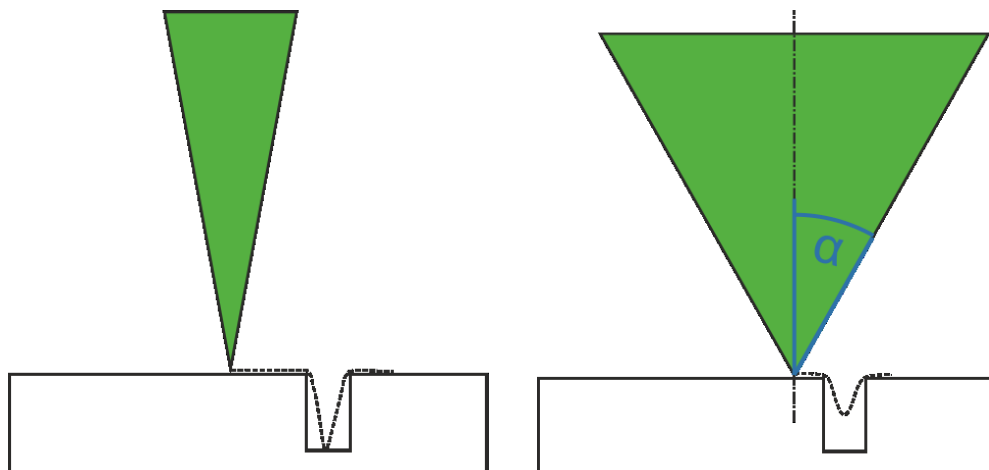
Obr. 2.4 – Znázornění vzniku artefaktu na sférické částici
a) Poloměr hrotu R srovnatelný s poloměrem částice b) Poloměr hrotu R výrazně menší, než poloměr částice
1 – hrot; 2 – skutečný tvar vzorku; 3 – zdánlivý tvar vzorku

Na úhlu α může záviset například naměřená hloubka a tvar jam, či děr v měřeném vzorku, jak je znázorněno na Obr. 2.5, na těchto obrázcích je výsledný obraz jam znázorněn čárkovanou čarou. V případě užšího hrotu, tedy menšího úhlu α odpovídá naměřená hloubka jámy té skutečné hloubce, v druhém případě se jáma jeví méně hluboká, v obou případech bude nesprávně znázorněn tvar jam. Tento efekt bude dále výraznější, pokud bude poloměr hrotu srovnatelný se šířkou jámy. [3; 6]

Artefakty mohou také vznikat poškozením hrotu, nebo jeho znečištěním. K poškození hrotu může dojít nevhodně zvolenými měřicími parametry skenování, nárazem do nečistoty na vzorku, ale i běžným opotřebením hrotu. Tato poškození se projevují např. rozostřením obrazu, zdvojením obrazu, opakujícími se vzory apod. Znečištěním je chápáno ulpění částic na vrcholu hrotu, kdy při měření nečistota prakticky nahrazuje měřicí sondu. [3]

a)

b)



Obr. 2.5 – Zdánlivé zmenšení děr ve vzorku vlivem velikosti úhlu hrotu α
 a) V případě menšího úhlu hrotu α
 b) V případě většího úhlu hrotu α

Jedna z mnoha možností pro identifikaci artefaktů je porovnávání tzv. *trace* a *retrace* stopy, jak je uvedeno v 2.1.2.

2.2 Mikro-spektroskopie

2.2.1 Obecný princip

Spektroskopie je obor fyziky studující interakci elektromagnetického záření s látkou. Elektromagnetické záření je po odrazu, absorpci, nebo emisi látkou rozkládáno pomocí spektrometru na spektrum – závislost intenzity elektromagnetického záření na vlnové délce.

Mikro-spektroskopie je definována jako spektroskopie zabývající se spektry objektů, které mají rozměry v řádu mikrometrů až nanometrů. V této práci jsem se zabýval převážně luminiscencí nanočástic.

Luminiscence je dle [9] definována následovně:

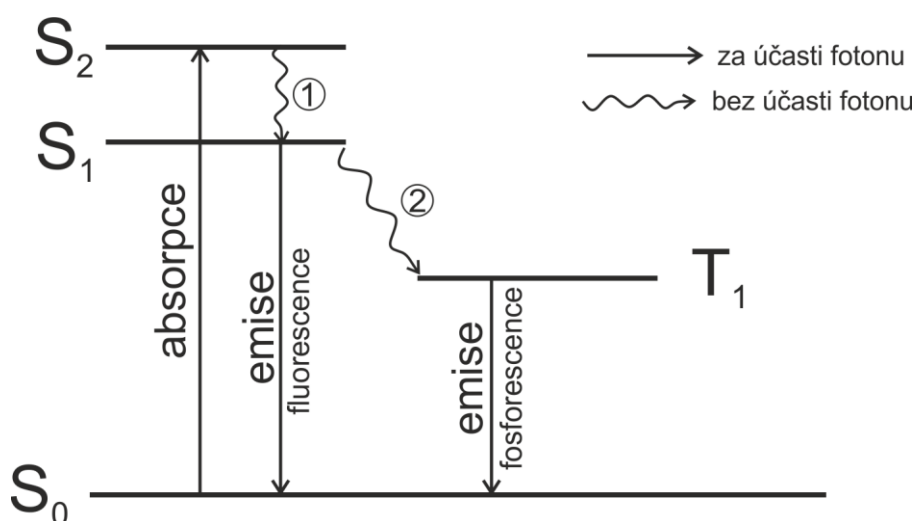
„Luminiscencí pevných látek rozumíme přebytek elektromagnetického (světelného) záření, které látka vysílá nad zářením rovnovážným popsáním Planckovým vyzařovacím zákonem. Přitom ještě musí platit, že toto záření má dobu dohasínání podstatně delší, nežli je perioda světelných oscilací ($10^{-14} - 10^{-15}$ s).”

Tato definice vyžaduje, aby byla dané látce dodávána energie, a podle toho v jaké podobě je tato energie dané luminiscence schopné látce dodávána se luminiscence dále dělí (např. fotoluminiscence - excitace provedena fotonem, elektroluminiscence – excitace provedena elektronem, chemiluminiscence – excitační energie pochází

z chemické reakce, apod...). V této práci se bude dále pod pojmem luminiscence uvažovat pouze fotoluminiscence, ta využívá dodávanou energii v podobě fotonů, tzv. excitačního záření (platí zde Stokesův zákon - ten mimo jiné říká, že excitační foton má vyšší energii než foton emitovaný). [9]

Samotný proces luminiscence nenastává okamžitě po absorpci fotonu, ale trvá určitou dobu, která je charakterizována několika veličinami. Mezi tyto veličiny patří výše zmíněná doba dohasínání, to je doba, která uplyne mezi okamžikem vypnutí excitačního signálu a vymizením luminiscenčního signálu. Tato doba se může pohybovat od femtosekund (tzv. fluorescence) až po desítky hodin (tzv. fosforescence).

Princip luminiscence z hlediska energetických stavů atomu, nebo molekuly dané luminiscence schopné látky je znázorněn na tzv. Jablonského diagramu na Obr. 2.6. Absorpce přilétajícího fotonu excitačního záření vybudí molekulu ze základního energetického stavu S_0 na stav vyšší. Je-li materiál vybuzen na vyšší vibrační stav, než první excitovaný S_1 projde nejprve vnitřním přechodem právě na nejnižší hladinu stavu S_1 – při těchto přechodech dochází ke ztrátě energie, která není vyzářena v podobě fotonu, ale je přeměněna na pohybovou energii částic neboli teplo. Ze stavu S_1 může materiál přejít přímo do základního stavu vyzářením fotonu – v tomto případě hovoříme o fluorescence a doba mezi absorpcí a vyzářením je velmi krátká, v řádu 10^{-8} s.



Obr. 2.6 - Jablonského diagram zobrazující základní princip luminiscence z hlediska energetických stavů atomu, nebo molekuly luminiscující látky
 1 – vnitřní přechod
 2 – mezi-systémový přechod

Druhou možností přechodu ze stavu S_1 je mezi-systémový přechod např. do tripletního stavu T_1 . Ze stavu T_1 se však systém může dostat zpět do základního stavu pouze zakázaným přechodem za vyzáření fotonu. V tomto případě hovoříme o fosforescenci. Jelikož zakázaný přechod má mnohem menší pravděpodobnost je i jeho četnost mnohonásobně nižší a výsledkem je, že doba dohasínání fosforescence je od řádu milisekund až do řádu hodin.

2.2.1.1 Rozlišovací schopnost mikroskopu

Zdroj luminiscenčního záření, který je rozměrově menší, než použitá vlnová délka se jeví v mikroskopu jako difrakční obrazec koncentrických tzv. Airyho kroužků. Rozlišovací schopnost standardního optického mikroskopu je dána tzv. Rayleighovým kritériem, to říká, že dva bodové objekty lze považovat za rozlišitelné, pokud se difrakční maximum (střed) jednoho bodu překrývá s prvním difrakčním minimem druhého. Budeme-li uvažovat difrakci na kruhovém otvoru, lze tento požadavek vyjádřit vztahem [10]

$$X_{min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.1)$$

kde λ je vlnová délka použitého světla, NA je numerická apertura – bezrozměrné číslo charakterizující rozsah úhlů v kterém může objektiv přijímat světlo.

Rozlišovací schopnost běžných optických mikroskopů je zhruba v řádu stovek nanometrů, tedy by se mohl zdát, že chceme-li zkoumat nanočástice, které mohou mít rozměry i v řádu jednotek nanometrů, je použití mikroskopu naprosto nevhodné. Nicméně úkolem mikro-spektroskopie není zkoumání velikosti objektů, nebo jejich tvarů, ale pouze získání elektromagnetického spektra pocházející z jedné emitující nanočástice. Je tedy dostačující, pokud jsou částice dostatečně daleko od sebe, aby bylo možné jejich elektromagnetické vyzařování od sebe odlišit – tedy v tomto kontextu lze vztah (2.1) chápat jako mezní kritérium pro minimální vzdálenost dvou emitujících částic.

Mezi další požadavky patří, aby nebyly v oblasti měřené nanočástice (či nanočástic) žádné parazitní signály, nebo luminiskující nečistoty jako prach, organické nečistoty apod.

2.2.1.2 Šumy

Obraz vzorku i emisní spektrum je snímáno dusíkem chlazenou CCD kamerou Princeton Instruments Model 7509-0001, kde CCD (z angl. *charge-coupled device*) značí čip pro snímání obrazu. Na tuto kameru je luminiscenční signál veden skrze monochromator Acton SP-2300i rovněž od firmy Princeton Instruments.

Dopadající fotony ze vzorku generují pomocí fotoefektu elektrony na jednotlivých pixelech čipu kamery. Jednotlivé pixely jsou tvořeny polovodičem, který tvoří potenciálovou jámu a ta dokáže generovaný náboj uchovat. Následně jsou náboje přesouvány přes jednotlivé pixely k okraji CCD čipu, kde jsou poté vyčítány a převedeny na elektrický signál. Tento signál je poté elektronicky zpracován na výstupní data.

Stejně jako každý jiný způsob snímání obrazu je i snímání obrazu CCD kamerou zatíženo šumem. Šum je v kontextu této práce označení pro data, která nenesou informaci o měřeném vzorku, ale jsou součástí surového obrazu získaného z CCD kamery. Zároveň je šum limitujícím faktorem pro citlivost kamery a poměr signál/šum určuje kvalitu získaného obrazu. Celkový šum kamery se skládá především z tzv. tepelného šumu, čtecího šumu a fotonového šumu.

Tepelný šum vzniká uvolněním elektronů z atomů CCD senzoru vlivem tepelných vibrací a závisí tak výrazně na teplotě senzoru a délce expozice. K uvolnění těchto elektronů dochází bez vlivu dopadajícího světla, ale přesto jsou přičteny k výslednému signálu. Čtecí šum je způsoben nedokonalostí přístroje, vzniká především při převádění elektronů na signál. Fotonový šum je způsoben náhodným rozptřením fotonů dopadajících na senzor a je tak nedílnou součástí každého světelného záření.

Fotonový šum nelze odstranit, ani významně potlačit, čtecí šum lze výrazně snížit snížením rychlosti vyčítání signálu. Tepelný šum lze výrazně snížit chlazením CCD senzoru kapalným dusíkem (až na teplotu $-108\text{ }^{\circ}\text{C}$). Právě potlačení tepelného šumu se zachováním potřebné doby expozice (pro potřeby této práce až 10 minut) je hlavním důvodem k použití chlazení kamery. Pro další potlačení tepelného šumu je po měření možné ze získaného surového obrazu odečíst tzv. temný snímek. Temný snímek je obraz pořízený CCD senzorem při zavřené závěrce, je však nutné dodržet při jeho získání stejnou dobu expozice i teplotu senzoru, jaké byly použity při získání surového obrazu. [11; 12]

Mezi další zdroje šumu patří výstřelový šum (nebo také Schottkyho šum), kmitavý šum (neboli $1/f$ šum) a několik dalších. Tyto zdroje šumu však nejsou hlavním důvodem chlazení CCD kamery a jejich popis přesahuje rámec této práce.

2.2.2 Praktické aplikace

Mikro-spektroskopie nachází využití v řadě oborů, hlavním důvodem pro její využití je velmi vysoká citlivost a selektivita, kterou je možné díky modernímu vývoji přístrojů aplikovat i v každodenním rutinním měření. Další nespornou výhodou je možnost aplikovat tuto metodu nedestruktivním a neinvazivním způsobem. [13]

V biologii se mikro-spektroskopie uplatňuje zejména pro její minimální narušení živého vzorku, jako jsou buňky. Objevuje se tedy proto i ve vědeckých pracích zabývajících se výzkumem rakoviny, sklerózy a jiných. [14] Dále při studiu vývoje kostí, nebo proteinových a lipidových struktur, studium vlivu povrchově aktivních látek na lidské vlasy a mnoho dalšího. [14] Přímou aplikací na KCHFO MFF UK bylo mikro-spektroskopie využito například při výzkumu použití křemíkových nanokrystalů a nanodiamantů jako fluorescenčních značek pro biologii. [15]

V geologii se mikro-spektroskopie využívá při studiu luminiscence minerálů, pro odhalení luminiscenčních mechanismů, elektronové struktury, pro odhalování tepelné a radiační historie hornin, nebo pro identifikaci jejich specifických nečistot. [16]

Mikro-spektroskopie začíná díky modernímu vývoji přístrojů nacházet uplatnění i v potravinářské vědě, kde se začíná využívat jako detekční nástroj mnoha látek, nebo znečištění. [13]

3 Korelace AFM a mikro-spektroskopie

V době zadání této bakalářské práce nebyl znám žádný publikovaný pokus o korelaci AFM a mikro-spektroskopie zaměřenou na korelaci jedné nanočástice měřené jak AFM tak mikro-spektroskopii. Přitom právě spojením obou metod by bylo možné upřesnit nejistoty nutně vyplívající z nemožnosti přiřadit emisní spektrum nanočástice jejímu konkrétnímu tvaru. Při vyvinutí efektivní a reprodukovatelné metody korelace by bylo možné například zpřesnit závislost podoby emisního spektra na velikosti a tvaru nanočástic a zpřesnit tak poznatky o procesu luminiscence. Pokud by se podařilo spojit tuto metodu korelace s manipulací nanočásticemi pomocí AFM, bylo by také možné proměřit jaký vliv má vzájemná vzdálenost dvou a více nanočástic na jejich emisní spektrum.

Během procesu vypracování postupu korelace bude také nezbytné zjistit vhodnost použití podložek běžně používaných pro AFM na kvalitu optického signálu měřeného pomocí mikro-spektroskopie. Hlavní obava o vhodnosti použití plyne z vlastního luminiscenčního záření podložek.

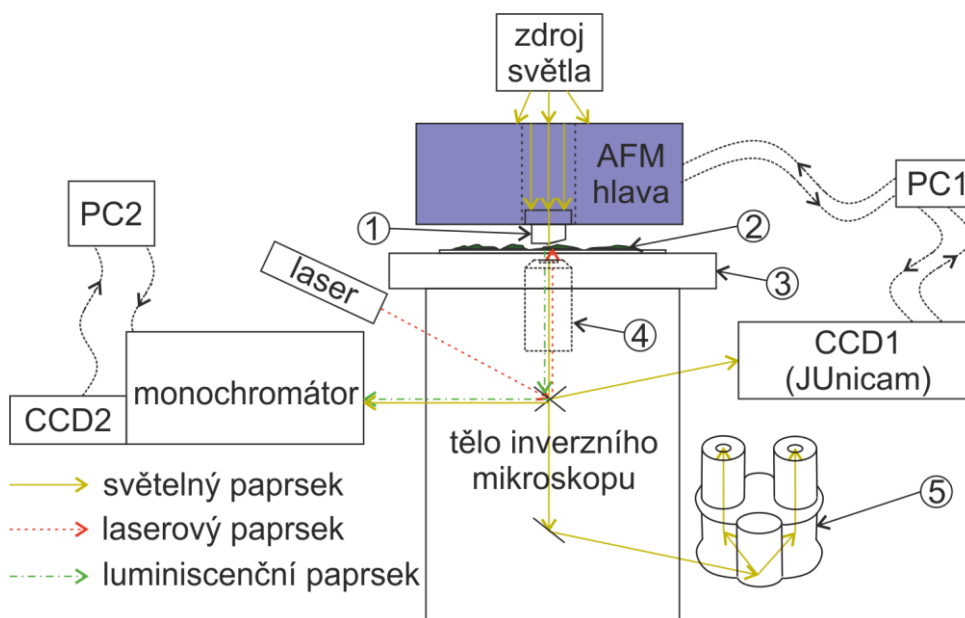
Dále bude v průběhu vypracování korelačního postupu nezbytné proměřit vzájemné orientace obrazů kamer AFM a monochromátoru a jejich měřítka pro různé objektivy. Tyto poznatky by mohly být také využity při dalším výzkumu nanočástic na použité soustavě přístrojů.

Jako nanočástice jsou v průběhu měření používány křemíkové nanokrystaly.

3.1 Použité přístroje a jejich uspořádání

Základní částí měřicí soustavy pro korelaci mikro-spektroskopie a AFM je optický inverzní mikroskop Olympus IX73 v provedení One Deck. Mezi zdroj světla mikroskopu a držák vzorku je umístěna AFM hlava, která má ve střední části opticky průchodnou oblast, na jejíž spodní straně se nachází držák nosníku AFM. Tento držák je vyroben z opticky čistého křemenného skla a jeho spodní a vrchní stěna jsou vyleštěny tak, aby jím mohl projít svazek AFM laseru a světlo ze zdroje osvětlení mikroskopu. Pokud je vzorek transparentní tak světlo ze zdroje osvětlení mikroskopu projde skrz něj a je tak možné mikroskop používat jako standardní inverzní mikroskop. Paprsek světla ze zdroje po průchodu objektivem dopadá na sadu čoček, nastavitelných

zrcátek a filtrovou kostku² uvnitř těla mikroskopu. Vhodným nastavením těchto elementů můžeme určit, jakým přístrojem bude paprsek následně zpracován. Na pravém portu mikroskopu je umístěna CCD kamera JUnicam, její výstup je napojen na stejný počítač, na který je napojeno řízení a výstup AFM a je tedy možné její obraz zobrazit v softwaru JPK NanoWizard Control, tato kamera slouží pro AFM měření a pozorování hrotu a měřené oblasti vzorku. Další možností pro pozorování vzorku je, po přesměrování signálu, okulár samotného inverzního mikroskopu, což je užitečné zejména při hledání vhodné pozice vzorku. Třetí možností pro zpracování světelného obrazu je vedení signálu do levého portu a skrze monochromátor Acton SpectraPro SP-2300 od společnosti Princeton Instruments do dusíkem chlazené CCD kamery Princeton Instruments Model 7509-0001. Uspořádání těchto přístrojů a celé měřicí soustavy je schematicky znázorněno na Obr. 3.1.



Obr. 3.1 – Schematické znázornění uspořádání měřicí soustavy;
1 – držák hrotu AFM z křemenného skla; 2 – vzorek; 3 – držák vzorku;
4 – objektiv v mikroskopu; 5 – okulár inverzního mikroskopu

Pozn. jednotlivé výstupní porty tělem mikroskopu jsou jen schematicky naznačeny žlutou barvou označující průchod světelného paprsku. Laser znázorněný v levé části obrázku je budící laser, detekční laser AFM není na obrázku pro přehlednost znázorněn – je součástí AFM hlavy.

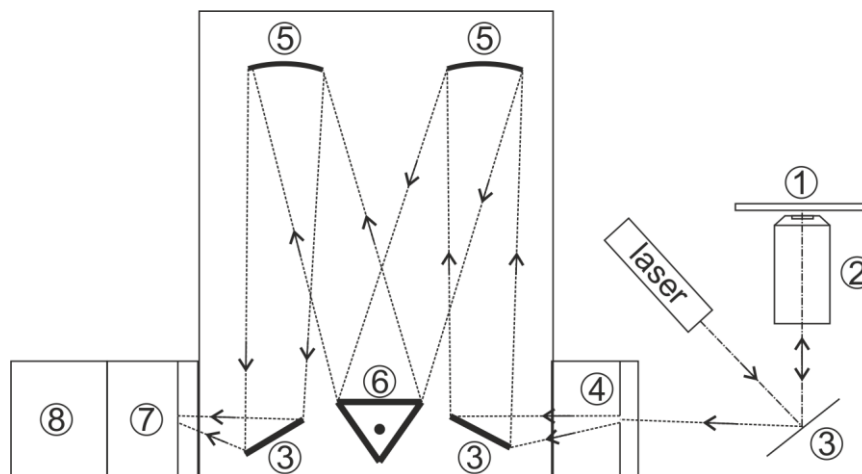
² Filtrová kostka je optický prvek sestávající z až dvou optických filtrů a dichroického zrcadla. Její účel zde je umožnit excitačnímu laserovému svazku dopad na vzorek a zároveň odfiltrování vlnové délky excitačního laseru ze svazku světla dopadajícího na CCD kameru.

Svazek AFM detekčního laseru prochází křemenným držákem AFM nosníku a po odrazu od vrchní části nosníku dopadá na detektor umístěný v AFM hlavě. Tento detektor zaznamenává polohu AFM nosníku pomocí odraženého laserového svazku. Část svazku detekčního laseru prochází zbylou částí aparatury spolu s osvětlením mikroskopu. Je-li výstup měřící soustavy nastaven na kameru JUnicam (nebo okulár mikroskopu), projevuje se část svazku detekčního laseru, jako světlejší oblast na záběru kamery viz Obr. 3.14b na str. 43. Pokud by však byl výstup měřící soustavy nastaven na CCD kameru monochromátoru, zatímco by detekční laser AFM zůstal zapnutý, působil by tento laser jako silný parazitický signál a znehodnocoval by mikrospektroskopické měření – z tohoto důvodu je zapotřebí během mikrospektroskopického měření zajistit, aby byl AFM detekční laser vypnutý. Obdobně je zapotřebí zajistit během mikro-spektroskopického měření vypnutí osvětlení mikroskopu a vypnutí osvětlení laboratoře.

Jelikož se nosník AFM nachází přímo na spodní stěně křemenného držáku, je možné vhodným nastavením hrot umístit do cesty optického paprsku a tím ho zobrazit jako stín na libovolné CCD kameře, nebo v okuláru mikroskopu. Tato procedura je nezbytná pro určení snímané oblasti vzorku metodou AFM a je možné hrot během tohoto měření sledovat.

Budící laser o vlnové délce 355 nm sloužící k excitaci vzorku (jedná se o jiný laser, než je detekční laser AFM) je veden skrze zadní port mikroskopu a skrze objektiv až na vzorek. Tím je příslušná část vzorku excitována a vybuzená luminiscence je dále vedena přes filtrovou kostku. Filtrová kostka propouští excitační záření na vzorek, ale nepropustí ho, díky dichroickému zrcadlu, dále na monochromátor Acton SpectraPro SP-2300 a CCD kameru Princeton Instruments Model 7509-0001. Na uvedenou CCD kameru je filtrovou kostkou propuštěna vybuzená luminiscence.

Monochromátor je využit v tzv. Czernyho-Turnerově uspořádání. Schéma monochromátoru je znázorněno na Obr. 3.2 (jedná se o detailní popis monochromátoru s CCD kamerou z Obr. 3.1). Velmi důležitým prvkem tohoto monochromátoru je tzv. turret – jedná se o otočnou hlavici, která má na dvou stěnách umístěny disperzní prvky s různými vlastnostmi (např. dvě difrakční mřížky, každá s jinou mřížkovou konstantou) a na jedné stěně má rovinné zrcadlo.



Obr. 3.2 – Schéma měřicí soustavy pro mikro-spektroskopii. Prvky 1, 2 a 3 jsou součástí inverzního mikroskopu.

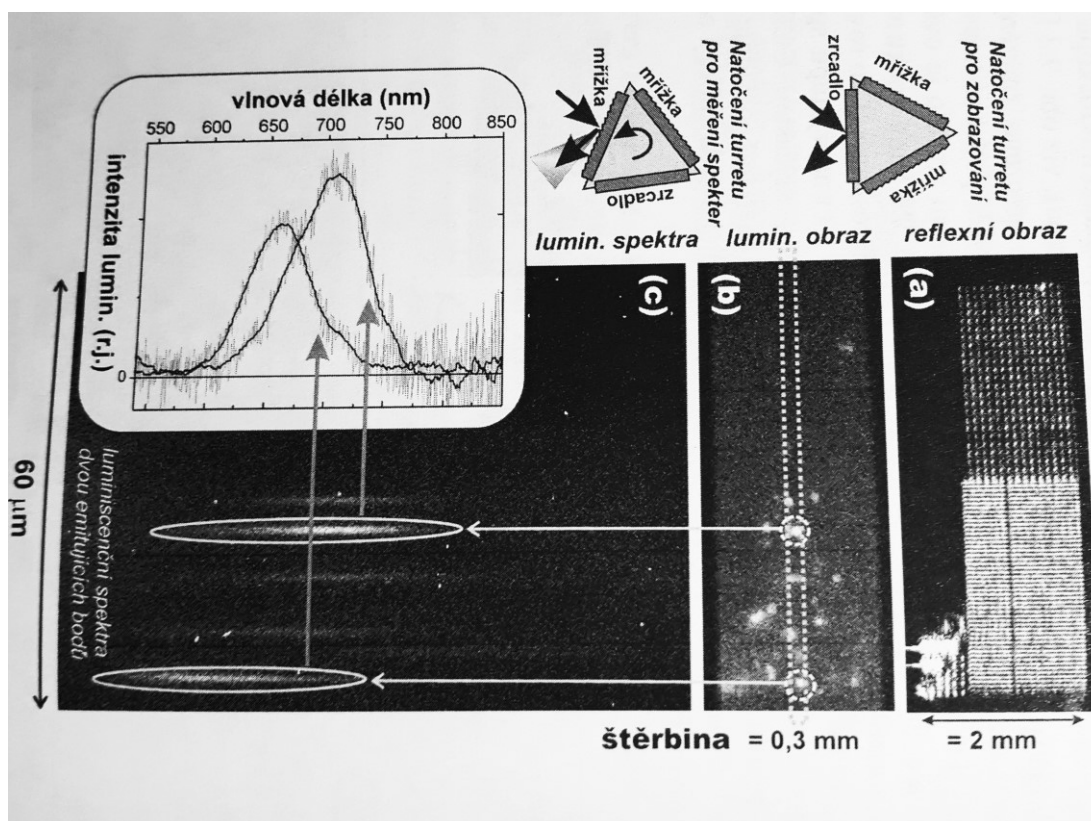
1 – vzorek s možností osvětlení; 2 – objektiv mikroskopu; 3 – rovinná zrcadla; 4 – vstupní štěrbinu; 5 – sférická zrcadla; 6 – otočný turret s disperzními prvky a zrcadlem; 7 – CCD kamera; 8 – Chlazení kamery

Spektroskopické měření probíhá následovně (viz Obr. 3.3)

A) Otočný turret (na Obr. 3.2, element 6), je natočen tak, aby v optické cestě stálo jeho rovinné zrcadlo. Tím je zařízení uvedeno do režimu snímání obrazu a de facto nepracuje jako monochromátor (v tomto režimu může být při spojení s AFM detekční AFM laser zapnutý). Vzorek je nasvětlen a vstupní štěrbinu, která v dalším kroku slouží k zamezení signálu z neměřených oblastí, je plně otevřena, tak na CCD kamere na výstupní štěrbině vzniká mikroskopický optický obraz vzorku. Pohybem vzorku se hledá vhodná oblast. Námi studované nanočástice se na obrazu při transmisním osvětlení lampou mikroskopu jeví jen jako malé černé, mírně rozmazané tečky, jelikož jsou pod rozlišovací schopností mikroskopu. Hledá se taková pozice, aby nanokrystaly nebyly příliš nahuštěné a nebylo tam mnoho viditelných agregátů a zároveň se zde nenacházeli žádné nečistoty, například prachová vlákna.

B) Vzhledem k tomu, že naším cílem je sledovat luminiscenci pocházející od jednotlivých nanočástic, je třeba omezit obraz vzorku vstupní štěrbinou (viz element 4 na Obr. 3.2), která se nachází před monochromátorem. Takto zajistíme, pokud jsou vzorky dostatečně naředěné, že v každé laterální rovině detektoru se nachází ideálně právě jeden luminiscenční zdroj. Po nalezení vhodného místa vzorku vypneme pomocné osvětlení mikroskopu a zapneme excitační zdroj, v našem případě se jedná o laser 355 nm. Zajistíme, že před monochromátorem je vhodná sada filtrů, tak aby excitační vlnová délka neprocházela do detekční části a procházely jen fotony, které

nás zajímají, tj. luminiscence z námi studovaných nanočástic. Nanokrystaly se nyní na kameře jeví, jako bodové zdroje světla o velikosti alespoň jednoho pixelu. Pokud je potřeba tak je nyní možné doladit pozici vzorku tak, aby se ve směru kolmém na štěrbinu nenacházely dvě částice na stejném řádku a nedocházelo v dalším měřicím kroku k mísení jejich signálů. To je také hlavní důvod použití vstupní štěrbinu.



Obr. 3.3 – Průběh měření spektra jednotlivých Si nanokrystalů v pravidelné čtvercové mřížce. Aparatura použitá k zachycení těchto obrazů je odlišná od aparatury použitá pro měření v této práci. (a) Zaostření struktur v odraženém světle, štěrbinu je otevřena, na turretu použito zrcadlo, snímáme reflexní obraz, excitační laser je vypnutý, osvětlení mikroskopu je zapnuté (b) luminiscenční obraz při excitaci UV-laserem, osvětlení mikroskopu je vypnuté, štěrbinu je otevřená, na turretu použito zrcadlo (c) spektrální obraz, štěrbinu je zavřena, aby došlo k vymezení jen dvou luminiscenčních zdrojů (na obr. b je štěrbinu pouze vyznačena tečkovaně) na turretu použita difrakční mřížka. Spektrální obraz je následně zpracován do podoby emisního spektra (závislost intenzity záření na vlnové délce – viz graf vlevo nahoře) sečtením všech řádků, které obsahují informaci o emisi jednoho zdroje. Převzato z [9].

C) Turret (Obr. 3.2, element 6) se natočí tak, aby v optické cestě byl jeho disperzní prvek. V tomto režimu se luminiscenční stopa rozmítne do podoby spektrální stopy ve směru kolmém na štěrbinu (v tomto režimu musí být zajištěno, že AFM laser je vypnutý). Je-li turret ve stabilní poloze, je v tomto režimu možné kalibrovat CCD kameru – každý sloupec jejich CCD senzorů nyní přísluší určité vlnové délce světla.

D) Spektrální stopa se softwarově zpracuje do podoby grafické závislosti intenzity záření na vlnové délce, tedy emisního spektra, pocházející ideálně od jedné nanočástice.

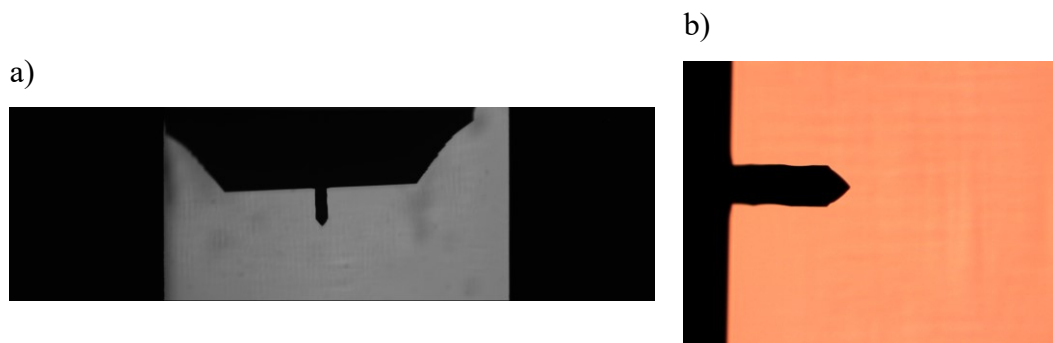
3.2 Synchronizace obrazů

3.2.1 Orientace

Vlivem rozdílných optických cest a umístění kamer na různých portech mikroskopu jsou obrazy z CCD kamery monochromátoru a kamery JUnicam nesouhlasně orientovány, mají různá zvětšení a zobrazují různě velké oblasti. Stejně tak orientace AFM zobrazování v řídicím softwaru JPK NanoWizard Control je na obrazovce řídicího počítače orientována naprosto nezávisle na zmíněných kamerách. Tento fakt ztěžuje především výběr oblasti pro AFM skenování v rámci obrazů kamer. Z tohoto důvodu bylo mým prvním krokem jednoznačné určení vzájemné orientace obrazů kamer a AFM za účelem vytvoření jednoduchého návodu na synchronizaci zařízení a určení shodné oblasti AFM a mikro-spektroskopie pro další měření.

Do držáku vzorků inverzního mikroskopu jsem umístil čisté standardní podložní sklíčko pro mikroskopii, jako nosník AFM jsem použil nosník Acta od výrobce APPNano. Objektiv inverzního mikroskopu jsem použil Olympus UPLFLN 10X2 (dále označován jako „objektiv 10x“) se zvětšením 10krát, numerickou aperturou 0,3 a pracovní vzdáleností 10 mm. [17]

V programu AFM *JPK NanoWizard Control* jsem ovládal AFM kameru JUnicam, v témže programu v okně *Data viewer – Height (measured)* jsem ovládal pohyb AFM nosníku a vybíral skenovanou oblast. Okno *Data viewer* při AFM měření mimo jiné zobrazuje výsledky měření, tedy výšku povrchu vzorku ve zvolené oblasti. Nosník jsem přiblížil k povrchu podložního skla, ale ne na vzdálenost menší, než 500 μm , aby nosník byl v zaostřené vzdálenosti obou kamer, ale zároveň aby nedošlo k opotřebení hrotu nosníku ani v případě, že by podložní sklo obsahovalo nečistoty a zajistil jsem, že se nebudou dotýkat. Pro účely zjištění orientace obrazů jsem v tomto okně náhodně vybral oblast o rozměrech 100x100 μm a to v takové pozici, aby hrot byl dobře viditelný na obou kamerách, viz Obr. 3.4.



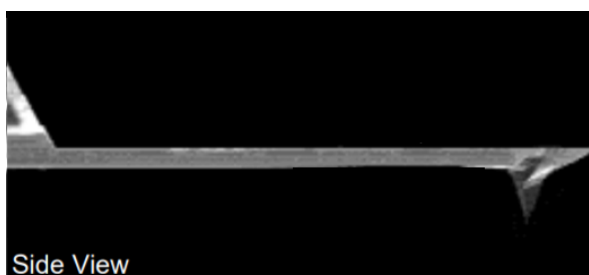
Obr. 3.4 – Hrot Acta zobrazený na kamerách při použití objektivu 10x

a) Zobrazení na kameře monochromátoru

b) Zobrazení na kameře JUnicam AFM

Tmavý stín u nosníku (na obr. a) nahoře, na obr. b) vlevo) je tzv. čip – držák nosníku o velikosti 3,4 x 1,6 mm, nosník je umístěn na kratší hraně čipu.

Hrot jsem nejprve umístil do středu této oblasti, objektiv jsem zaostřil tak, aby byl hrot dobře viditelný na obou kamerách a pořídil jsem fotografie přes kameru JUnicam a zároveň přes kameru monochromátoru (Obr. 3.4). Poté jsem hrot přemístil do levého horního rohu vybrané skenované oblasti a v obou kamerách vyfotografoval, nakonec jsem hrot přemístil do pravého horního rohu a opět vyfotografoval. Protože během pohybu nosníku zůstávaly kamery staticky zaměřeny na jedno místo vzorku, mohl jsem získané snímky přeložit přes sebe v programu Corel Draw X8 a určit přibližný rozsah skenované oblasti z pohledu kamery JUnicam i kamery monochromátoru a především určit jejich vzájemnou orientaci. Skutečnou pozici hrotu na nosníku jsem musel odhadnout z listu technické specifikace hrotu Acta [18], který obsahuje pohled na nosník z boku (viz Obr. 3.5), jelikož kamera monochromátoru a kamera JUnicam sice zobrazují nosník zdola, ale vlastní hrot na nosníku na nich není viditelný³.

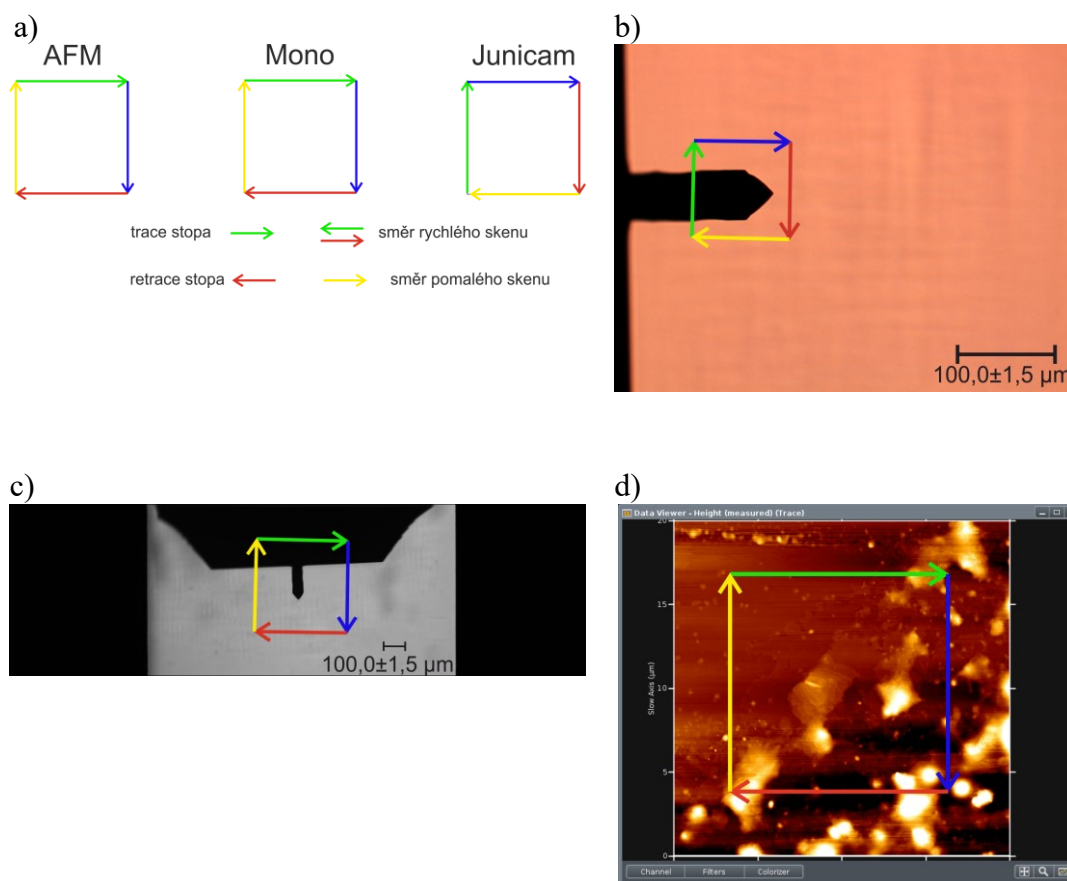


Obr. 3.5 – Boční pohled na nosník Acta [18]

³ Rovina zaostření nemůže zároveň obsahovat hrany nosníku a hrot, navíc je hrot velmi malý a na kameře při pohledu zdola velmi těžko rozeznatelný i při zaostření na hrot.

Výsledkem tohoto měření bylo zjištění vzájemné orientace okna pro zobrazování AFM, kamery JUnicam a kamery monochromátoru. Ukázalo se, že kamera monochromátoru a okno pro AFM měření mají shodnou orientaci, zatímco kamera JUnicam je vůči kameře monochromátoru otočena o 90° proti směru hodinových ručiček. Tento výsledek je zobrazen na Obr. 3.6, který může sloužit jako pomocný návod pro další měření, z toho důvodu jsem provedení zvolil velmi jednoduché a orientaci jsem zvýraznil použitím barevných šipek. Šipky shodných barev na těchto obrázcích vždy odpovídají stejnému skutečnému směru pohybu nosníku. Z hlediska okna AFM měření lze pomocí těchto šipek znázornit také orientaci tzv. trace a retrace stopy (viz 2.1.2), rychlého skenu a pomalého skenu jak je znázorněno na Obr. 3.6 a)⁴. Směr rychlého skenu je směr, ve kterém se AFM hrot pohybuje rychleji, v tomto směru se zaznamenává trace a retrace stopa a lze hovořit o měření v jednom řádku. Ve směru pomalého skenu se hrot AFM pohne o jeden krok až po proměření řádku. V okně AFM měření je počátek měření v levém dolním rohu vybrané skenované oblasti, z pohledu kamer je to vždy tam, kde je umístěn hrot na začátku měření.

⁴ Tuto orientaci je možno změnit nastavením úhlu skenu. V rámci celé práce je tento úhel ponechán na hodnotě 0, tedy veškeré měření odpovídá zde uvedené orientaci.



Obr. 3.6 – Výsledek určení vzájemné orientace s vyznačenými orientačními šipkami. Šipky na každém obrázku odpovídají shodnému skutečnému směru posunutí nosníku.
 a) znázornění vzájemné orientace: AFM – okno pro měření AFM; Mono – CCD kamera monochromátoru; Junicam – CCD kamera AFM
 b) snímek kamery Junicam
 c) snímek kamery monochromátoru
 d) okno pro měření programu JPG NanoWizard Control s příkladem výsledku měření křemíkových nanokrystalů

3.2.2 Měřítka

V této části měření bylo zapotřebí kalibrovat kameru Junicam a CCD kameru monochromátoru Princeton Instruments Model 7509-0001, aby bylo určeno, jaké skutečné velikosti odpovídá 1 pixel, na každé kameře. Tento postup je nezbytný, aby bylo možné z fotografií určit skutečné vzdálenosti v dalších částech měření.

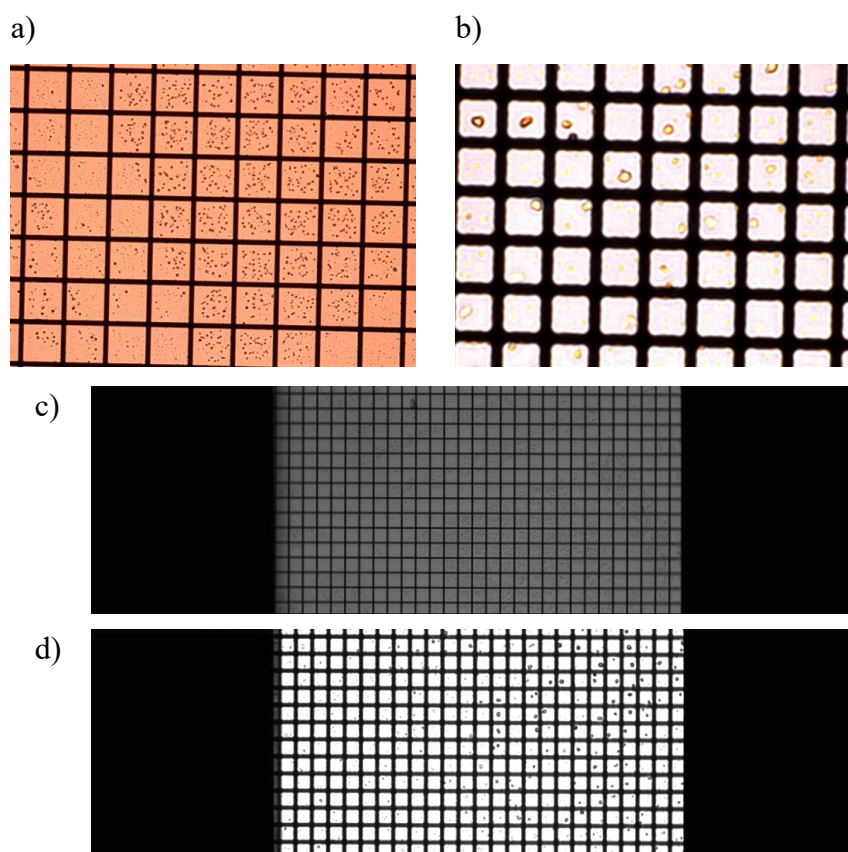
Pro tyto účely jsem do držáku vzorku umístil sklíčko s mřížkou R1L3S3P od společnosti ThorLabs. Parametry tohoto sklíčka odpovídaly běžným podložním sklům pro mikroskopii (rozměry 76 x 26 mm) a na něm byly naneseny 4 kalibrační mřížky o roztečích 10, 50, 100 a 500 μm .

Kameru spektroskopu i kameru Junicam jsem postupně kalibroval pro dva různé objektivy značky Olympus, objektiv UPLFLN 10X2 (dále označován jako „objektiv 10x“) se zvětšením 10krát, numerickou aperturou 0,3 a pracovní vzdáleností

10 mm a objektiv LUCPLFLN 60X (dále označován jako „objektiv 60x“) se zvětšením 60krát, numerickou aperturou 0,7 a pracovní vzdáleností 1,5 – 2,2 mm. [17]

Pro objektiv 10x jsem jako nejvhodnější mřížku pro kalibraci zvolil s roztečí 50 μm , pro objektiv 60x s roztečí 10 μm . Mřížky jsem volil tak, aby se na fotografii nacházelo co nejvíce polí mřížky pro zpřesnění výpočtů, ale zároveň aby byla jednotlivá pole dobře rozeznatelná a zpracovatelná běžně dostupným softwarem.

Zvolené mřížky jsem přes dané objektivy vyfotografoval – kamerou JUnicam pomocí AFM ovládacího programu JPK NanoWizard Control (ukládal ve formátu PNG), kamerou spektroskopu pomocí programu pro řízení spektroskopu WinSpec/32 v.2.5.12.2 (ukládal ve formátu TIF). Fotografie mřížek použité pro toto měření jsou zobrazeny na Obr. 3.7.



Obr. 3.7 – Fotografie kalibračních mřížek použitých pro délkovou kalibraci kamer.

a) Mřížka s roztečí 50 μm , kamera JUnicam, objektiv 10x

b) Mřížka s roztečí 10 μm , kamera JUnicam, objektiv 60x

c) Mřížka s roztečí 50 μm , kamera monochromátoru, objektiv 10x

d) Mřížka s roztečí 10 μm , kamera monochromátoru, objektiv 60x

Fotografie mřížek jsem následně otevřel v programu Gimp v. 2.10.4, kde jsem nástrojem *měřidlo* změřil počet pixelů n na fotografii mezi dvěma zvolenými body.

Body jsem zvolil tak, aby se co nejvíce snížila statistická chyba, tedy aby bylo měřeno přes co nejvíce polí mřížky. Zároveň jsem body volil tak, aby měření bylo efektivní, tedy za body jsem volil středy průsečíků čar mřížky, tak, aby vždy byly oba součásti jedné čáry. Následně jsem pomocí počtu polí kalibrační mřížky mezi zvolenými body určil skutečnou vzájemnou vzdálenost l v mikrometrech. Postup jsem opakoval na jiné dvojici bodů o stejné vzdálenosti l , aby bylo možné výsledky statisticky zpracovat a určit nepřesnost měření. Naměřené počty pixelů jsou uvedeny v Tabulka 3.1, v Tabulka 3.2 je uvedeno statistické zpracování těchto výsledků.

Kamera	Objektiv	Rozteč mřížky [μm]	Počet polí mřížky	n									
				641	640	643	642	637	640	640	638	642	
JUnicam	10x	50	6	642	645	642	642	641	646	643	642	645	
				618	618	619	625	614	620	616	621	614	
JUnicam	60x	10	5	619	623	615	611	614	/	/	/	/	
				670	671	671	669	670	671	672	670	670	
CCD monochromátoru	10x	50	27	671	671	671	670	671	671	/	/	/	
				656	657	658	659	657	655	658	658	657	
CCD monochromátoru	60x	10	23	656	655	658	658	/	/	/	/	/	
				656	655	658	658	/	/	/	/	/	

Tabulka 3.1 – Výsledky měření počtu pixelů mezi dvěma body kalibrační mřížky; n – naměřené hodnoty počtu pixelů
Každé naměřené hodnotě n odpovídá jiná dvojice bodů kalibrační mřížky, vždy o stejném počtu polí kalibrační mřížky mezi nimi.

Tyto výsledky jsem statisticky zpracoval dle [19], abych mohl určit nepřesnost provedeného měření.

Nejprve jsem vypočetl průměrnou hodnotu počtu pixelů \bar{n} pro každou kombinaci kamery a objektivu. Následně jsem spočetl směrodatnou odchylku jednoho měření s dle vztahu

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N n_i - \bar{n}}{N-1}}, \quad (3.1)$$

kde N je počet měření počtu pixelů pro danou kameru a objektiv, n_i je i -tá naměřená hodnota počtu pixelů. Z hodnoty s jsem určil směrodatnou odchylku aritmetického průměru $s_{\bar{n}}$ vztahem

$$s_{\bar{n}} = \frac{s}{\sqrt{N}}, \quad (3.2)$$

Následně jsem určil nepřesnost kalibračních mřížek Δn jako polovinu tloušťky čáry každé mřížky. Tloušťku čar v pixelech jsem měřil opět v programu Gimp pomocí nástroje *měřidlo*.

Z uvedených výpočtů jsem následně mohl stanovit nepřesnost měření počtu pixelů mezi zvolenými body jako celkovou mezní střední nejistotu $u_{\bar{n},stř}$ dle vztahu

$$u_{\bar{n},stř} = \sqrt{(3s_{\bar{n}})^2 + (\Delta n)^2}. \quad (3.3)$$

Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v Tabulka 3.2.

Kamera	Objektiv	Rozteč mřížky [μm]	l [μm]	\bar{n}	s	$s_{\bar{n}}$	Δn	$u_{\bar{n},stř}$ $P \approx 1$
JUnicam	10x	50	300	641,72	2,30	0,54	7	7,19
JUnicam	60x	10	50	617,64	3,89	1,04	20	20,24
CCD monochromátoru	10x	50	1350	670,60	0,74	0,19	2,5	2,56
CCD monochromátoru	60x	10	230	657,08	1,26	0,35	4,5	4,62

Tabulka 3.2 – Statistické zpracování počtu pixelů mezi dvěma body.

l – skutečná vzdálenost dvou bodů; \bar{n} – aritmetický průměr počtu pixelů; s – směrodatná odchylka jednoho měření, $s_{\bar{n}}$ – směrodatná odchylka aritmetického průměru; Δn – nepřesnost kalibrační mřížky; $u_{\bar{n},stř}$ – celková mezní střední nejistota počtu pixelů

Z výsledků měření počtu pixelů mezi dvěma zvolenými body kalibračních mřížek bylo poté možné určit skutečnou vzdálenost odpovídající jednomu pixelu l_1 vztahem

$$l_1 = \frac{l}{\bar{n}} \quad (3.4)$$

Nepřesnost určení této vzdálenosti byla vypočtena vztahem (3.5) odvozeným ze vztahu pro nepřesnost nepřímého měření

$$u_{l_1} = \frac{l}{\bar{n}^2} u_{\bar{n},stř} \quad (3.5)$$

Výsledky těchto výpočtů, včetně relativní nejistoty $\frac{u_{l_1}}{l_1}$, uvádí Tabulka 3.3.

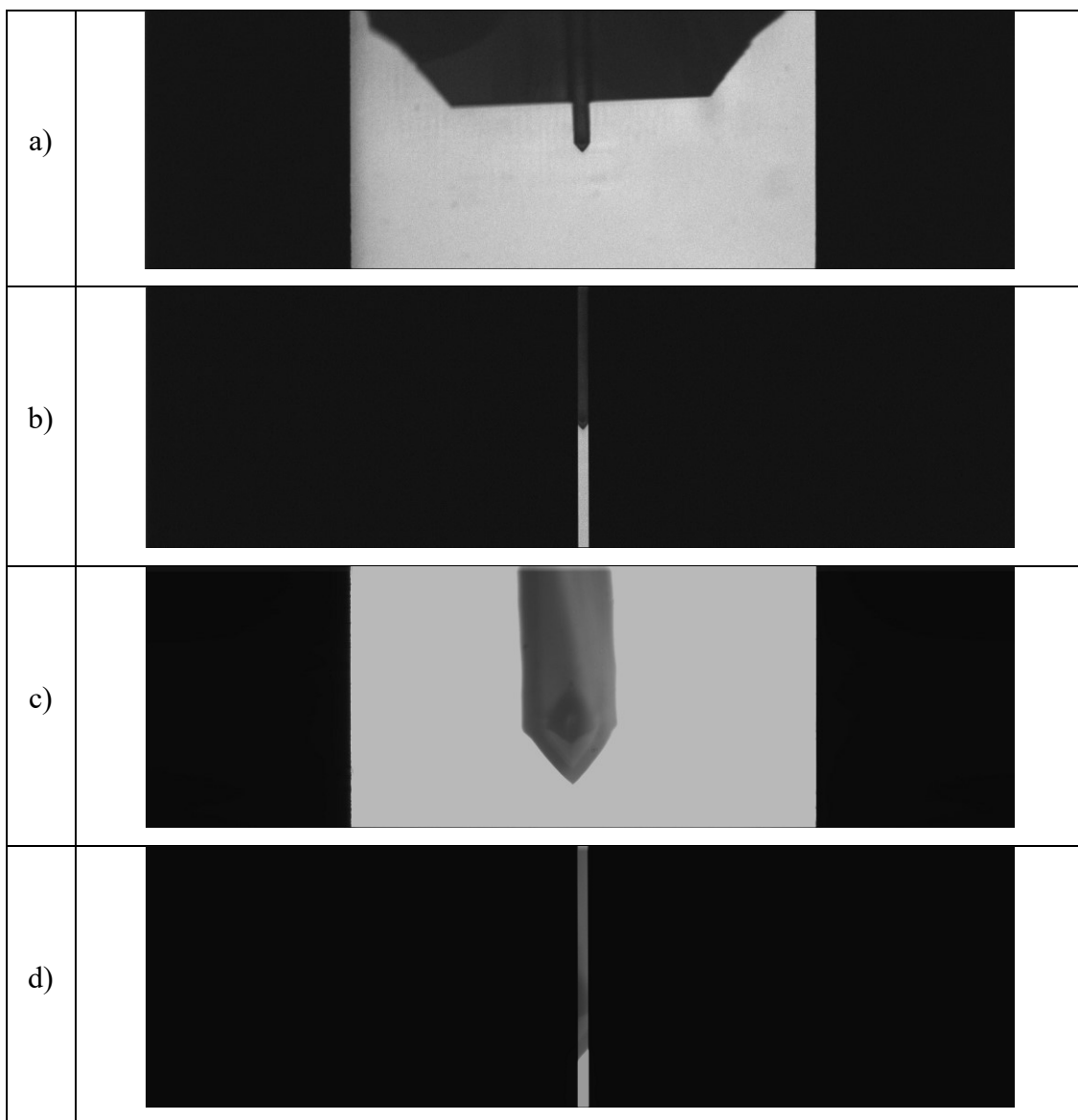
Kamera / objektiv	l_1 [nm]	u_{l_1} [nm]	$\frac{u_{l_1}}{l_1}$ [%]
JUnicam / 10x	467,5	5,2	1,1
JUnicam / 60x	81,0	2,7	3,3
CCD monochr. / 10x	2013,1	7,7	0,4
CCD monochr. / 60x	350,0	2,5	0,7

Tabulka 3.3 – Výsledky výpočtů skutečné délky l_1 odpovídající jednomu pixelu na fotografii. u_{l_1} značí nepřesnost měření l_1 , u_{l_1}/l_1 značí tzv. relativní nejistotu.

3.2.3 Šířka štěrbin

Při měření luminiscenčních spekter spektrometrem, jak je zmíněno v odstavci 3.1, se s výhodou používá zastínění části luminiscenčního obrazu štěrbinou - do cesty optického paprsku se zasune štěrba v tubusu, který se nachází mezi tělem mikroskopu a spektrometrem a tím se výrazně zúží oblast vzorku, z které se měří spektrální signál. Jelikož štěrba je umístěna v cestě paprsku až za objektivem, záleží na použitém objektivu, jak velká část vzorku bude měřena. Bylo proto zapotřebí pro každý z používaných objektivů určit velikost štěrbinou vymezené oblasti, aby tento údaj byl při korelaci AFM a spektroskopie již známý.

Štěřba ovlivňuje pouze obraz na CCD kameře monochromátoru a tuto kameru jsem v předešlé kapitole kalibroval. Pro určení velikosti vymezené oblasti tedy stačilo štěrbinu vyfotografovat CCD kamerou a změřit velikost oblasti v pixelech pro každý z objektivů a dle známých převodních vztahů převést na reálnou vzdálenost. Počet pixelů jsem změřil programem Gimp a zpracoval statisticky, neboť se jednalo o přímé měření [19]. Použité fotografie jsou na Obr. 3.8, výsledky měření jsou uvedeny v Tabulka 3.4.



**Obr. 3.8 – Snímky štěrbiny z CCD kamery monochromátoru. Fotografie bez štěrbin jsou určeny pro ilustraci zvětšení.
 a) bez štěrbin, objektiv 10x; b) se štěrbinou, objektiv 10x;
 c) bez štěrbin, objektiv 60x – na tomto obrázku je dobře rozeznatelný hrot jako tmavší oblast spodní části nosníku; d) se štěrbinou, objektiv 60x;**

objektiv	n_s								
10x	16	17	19	15	17	17	16	16	17
60x	17	19	19	17	18	19	20	19	17

Tabulka 3.4 – Naměřené hodnoty šířky štěrbin v počtech pixelů n_s fotografie

Výsledky jsem statisticky zpracoval dle [19] a použil vztahy (3.1), (3.2), (3.3), (3.4) a (3.5). Výsledky tohoto zpracování jsou uvedeny v Tabulka 3.5.

objektiv	\bar{n}_s	Δn_s	s_{n_s}	$s_{\bar{n}_s}$	$u_{\bar{n}_s, st\check{r}}$ $P \approx 1$
10x	16,7	0,5	1,1	0,4	1,2
60x	18,3	0,5	1,1	0,4	1,2

Tabulka 3.5 – Statistické zpracování naměřených hodnot šířky štěrbin v pixelech.
 \bar{n}_s – průměrná hodnota počtu pixelů; Δn_s – nepřesnost měření programu Gimp; s_{n_s} – směrodatná odchylka jednoho měření; $s_{\bar{n}_s}$ – směrodatná odchylka aritmetického průměru; $u_{\bar{n}_s, st\check{r}}$ – celková mezní střední nejistota

Ze známého počtu pixelů mezi okraji štěrbin na fotografii n_s a skutečné vzdálenosti odpovídající jednomu pixelu l_1 jsem určil vzdálenost l_s , kterou vymezuje štěrbina na vzorku vztahem

$$l_s = n_s l_1. \quad (3.6)$$

Nepřesnost tohoto výpočtu jsem určil vztahem odvozeným z výpočtu chyby nepřímého měření [19]

$$u_{l_s} = \sqrt{(n_s u_{l_1 px})^2 + (l_1 px u_{n_s})^2}, \quad (3.7)$$

kde vzdálenost odpovídající jednomu pixelu pro CCD kameru monochromátoru a objektiv 10x je $l_1 = (2013 \pm 8)$ nm, pro objektiv 60x je $l_1 = (350,0 \pm 2,5)$ nm. Po dosazení do těchto vztahů dostáváme šířku štěrbinou vymezené oblasti pro objektiv 10x

$$l_s = (33,6 \pm 2,4) \mu\text{m},$$

pro objektiv 60x

$$l_s = (6,4 \pm 0,4) \mu\text{m}.$$

3.3 Výběr podložky

Excitační laser o vlnové délce 355 nm má průměr svazku paprsku na vzorku v řádu několika desítek μm . Vzhledem k tomu, že excitace je vedena přes zadní port, tak je excitována i podložka, na jejichž horní straně jsou nanoseny studované nanokrystaly. Toto umístění je tedy nevhodné ze spektroskopického hlediska ale je nutné pro zachování přístupnosti vzorku pro AFM měření, které probíhá rovněž z horní strany. Z tohoto důvodu je zapotřebí vybrat takovou podložku, která má vlastní

luminiscenční záření co nejslabší, aby co nejméně ovlivňovala luminiscenční výsledky měření studovaných nanočástic a zároveň byla dostatečně rovná pro účely měření pomocí AFM.

Testované podložky byly vybrány z podložek, které se běžně používají pro AFM měření, jelikož cílem práce je tyto dvě metody korelovat. Je nutné zdůraznit, že jednak nemůže být vzorek z vrchu překryt krycím sklíčkem, jako je tomu běžné při optické mikroskopii, ale není ani vhodné, aby vzorek spočíval přímo na standardním podložním mikroskopickém sklíčku. Podložní mikroskopické sklíčko má velmi nerovný povrch (nerovnosti až 10 nm [8]), čímž by výrazně snižoval možnost rozlišení topografie vzorku pomocí AFM. Zároveň by se v těchto nerovnostech mohla více držet vlhkost a čistící kapalina, neboť povrch musí být před každým nanesením nového vzorku očištěn od nečistot, včetně mastnoty a prachu. Tyto nečistoty by opět mohl ovlivňovat charakter emisních spekter.

Místo skla se pro AFM měření používá podložka ze slídy (přírodní minerál patřící do skupiny hlinitokřemičitanů) umístěna do kovového rámečku, na který je dimenzován držák vzorků v mikroskopu. Nejčastěji se používá slída kruhového tvaru o průměru 15 mm (tloušťka max. 0,15 mm). Hlavní předností slídy je, že se jedná o přirozeně se vyskytující vrstvený materiál, který se snadno štěpí podél jedné z os a jehož jednotlivé vrstvy jsou skutečně atomárně rovné. [8] Tím je prakticky možné získat absolutně čistý a atomárně rovný povrch pomocí např. jednoduché metody kdy se izolepa přilepí na starý povrch se vzorkem a ta se strhne společně s jednou atomární vrstvou slídy a získáme tak nový čistý povrch. Druhou možností je štěpení žiletkou, kdy se daná destička rozlomí žiletkou podél jedné vrstvy a vzniknou tak dvě nové destičky s čistým povrchem, které jsou samozřejmě tenčí než původní destička.

Mezi testovanými podložkami byly tedy především slída, pro porovnání ve dvou třídách kvality V1 a V4 (V1 je nejvyšší kvalita čistoty, která by měla obsahovat nejméně příměsí prvků jiných minerálů a zároveň obsahovat co nejméně zlomů v krystalové mřížce). Zároveň byly testovány jako podložky i běžné krycí sklíčko pro mikroskopii a křemenné sklíčko pro porovnání a pro případ, že by se slída ukázala jako naprosto nevhodná pro měření luminiscence.

3.3.1 Měření tloušťky podložek

Měření tloušťky podložek nemohlo proběhnout před měřením emisních spekter podložek. Tloušťka byla totiž měřena mikrometrickým šroubem, tj. kontaktní

metodou, a jako taková by velmi pravděpodobně mechanicky poškodila podložky a zároveň měla vliv na jejich čistotu a tím nepředvídatelně ovlivnila měření. Pro pohodlí čtenáře jsem však tuto kapitolu umístil dříve, aby během čtení následující kapitoly o měření spekter byly čtenáři známy tloušťky podložek.

Tloušťku d jednotlivých slídových podložek jsem měřil, aby bylo více zřejmé, za jakých podmínek měření spekter podložek proběhlo, aby se zvýšila přesnost případné reprodukce, a aby bylo lépe porozuměno, jak intenzita luminiscence závisí na síle podložky. Křemenná a skleněná podložka, jejichž luminiscenci jsem také měřil, měly již od výrobce uvedenu tloušťku včetně nepřesnosti, nebylo tedy zapotřebí je proměřovat. Slídové podložky se během měření zarovnávají odstraněním svrchní vrstvy, jejich tloušťky tedy neodpovídají těm uvedeným výrobcem a bylo zapotřebí je změřit.

Měřeny byly slídové podložky třídy V1 a V4 značky Structure Probe, podložka V1 byla připravena ve dvou tloušťkách, aby v další části měření bylo možné vyhodnotit vliv tloušťky podložky na luminiscenci.

Mikrometrický šroub použitý pro toto měření byl kalibrován a způsoboval nepřesnost měření tloušťky podložky $\Delta d = 5 \mu\text{m}$. Naměřené hodnoty uvádí

Tabulka 3.6 a statistické zpracování dle [19] za použití vztahů (3.1), (3.2), (3.3), (3.4) a (3.5) uvádí Tabulka 3.7.

Podložka	d [μm]						
V1 silná	170	160	160	160	170		
V1 tenká	70	60	60	60			
V4	130	140	140	140	140	140	140

Tabulka 3.6 – Naměřené hodnoty tloušťky slídových podložek

Tloušťka skleněné podložky od společnosti Marienfield je uváděna výrobcem $(150 \pm 20) \mu\text{m}$, výrobcem uváděná tloušťka křemenné podložky je $(250 \pm 130) \mu\text{m}$ [20].

Podložka	\bar{d} [μm]	s_d [μm]	$s_{\bar{d}}$ [μm]	Δd [μm]	$u_{d,stř.}$ [μm] $P \approx 1$
V1 silná	164	5	2	5	9
V1 tenká	62	3	1	5	9
V4	139	4	2	5	7

Tabulka 3.7 – Statistické zpracování tloušťky jednotlivých slídových podložek.

\bar{d} – aritmetický průměr naměřené tloušťky skla; s_d - směrodatná odchylka jednoho měření; $s_{\bar{d}}$ – směrodatná odchylka aritmetického průměru; Δd – nepřesnost mikrometrického šroubu; $u_{d,stř.}$ – celková mezní střední nejistota měřené tloušťky skla.

3.3.2 Měření luminiscenčních spekter podložek

V této části jsem měřil slídové podložky kruhového tvaru o průměru 15 mm třídy V1 a V4 značky Structure Probe. Podložka V4 měla tloušťku (139 ± 5) μm . Podložku V1 jsem měřil ve dvou tloušťkách, (164 ± 9) μm a (62 ± 9) μm , aby bylo možné vyhodnotit vliv tloušťky podložky na luminiscenci. Dále jsem měřil běžné krycí sklíčko pro mikroskopii od společnosti Marienfield (24x24x0,15 mm) a křemenné krycí sklíčko značky Ted Pella (19x19x0,25 mm). Abych určil skutečnou luminiscenční intenzitu I jednotlivých podložek, změřil jsem také vliv pozadí, tedy jedno měření jsem provedl s prázdným držákem vzorku. Při ostatních měřeních jsem musel podložky umístit na běžné podložní sklo pro mikroskopii (76x26x1 mm).

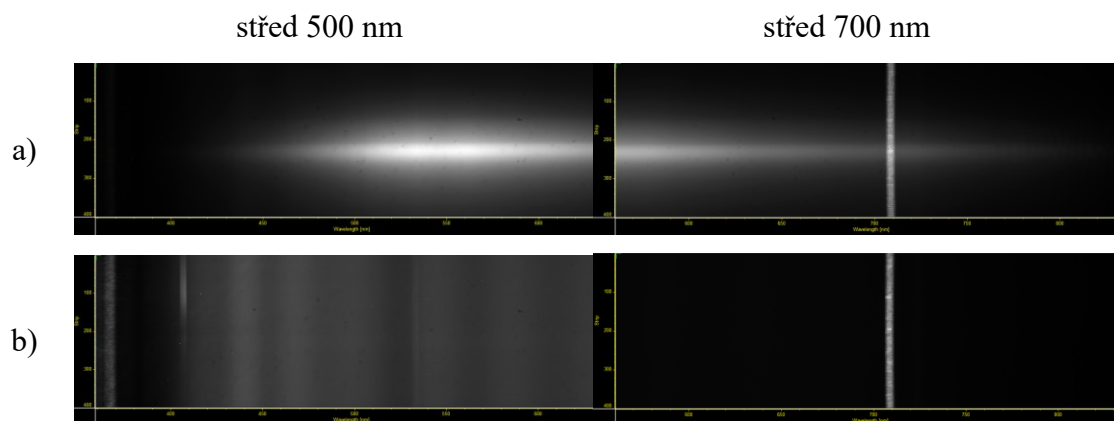
Luminiscenci jsem měřil na stejném zařízení použitým při korelaci AFM a mikro-spektroskopie tj. monochromátorem Acton SpectraPro SP-2300 od společnosti Princeton Instruments, budící laser jsem použil MPL-F-355-5mW (vlnová délka 355 nm, výkon 5 mW). Objektiv mikroskopu jsem použil LUCPLFLN 60X se zvětšením 60krát, numerickou aperturou 0,7 a pracovní vzdáleností 1,5 – 2,2 mm [17], v optické cestě mezi tělem mikroskopu a spektrografem byla filtrová kostka pro excitaci 355 nm a štěrba, která vymezovala oblast vzorku o šířce $(6,3 \pm 0,7)$ μm . Jako disperzní prvek spektrografu jsem použil difrakční mřížku s 300 zářezy/mm. Záznamy z CCD kamery monochromátoru jsem zpracoval programem WinSpec/32 v.2.5.12.2.

Pozici laserového svazku a jeho zaostření v ose vzorku jsem bez štěrbinu nastavil na referenčním luminiscenčním sklu typu Rhodamine/Texas Red značky Ted Pella, tak aby bylo zajištěno správné zaostření na měřenou podložku, která má mnohem nižší intenzitu luminiscence než referenční sklo. Poté jsem štěrbinu umístil zpět.

Použitá difrakční mřížka monochromátoru Acton umožňovala snímání vlnových délek v rozsahu přibližně 280 nm, aby bylo pokryto celé viditelné spektrum, musel jsem měření provést 2x. V prvním měření jsem měřil luminiscenční intenzitu podložky v rozpětí 360 – 640 nm (střed v 500 nm), v druhém 560 – 838 nm (střed v 700 nm). Střed rozpětí jsem nastavoval v programu WinSpec/32 a podle rozpětí mřížky jsem program kalibroval. Dále jsem nastavil dobu expozice na 600 s. Doba expozice musela být pro každé měření stejná, abych mohl vzájemně luminiscenční spektra porovnávat, jak tvarově, tak především intenzitně. Také jsem nastavil vyčítací frekvenci jednotlivých řádků z CCD kamery na 100 kHz, abych co nejvíce zmínil vyčítací šum.

Výsledkem tohoto měření jsou dva černobílé obrázky o rozměrech 1340 × 400 pixelů pro každou podložku, viz Obr. 3.9. Na těchto obrázcích je přímo zobrazen luminiscenční signál vzorku. Vlivem rozlišení odpovídá každý sloupec pixelů rozsahu vlnových délek λ o šířce 0,21 nm. Pro zjednodušení uvažuji v dalším textu, že každému pixelu odpovídá jedna konkrétní vlnová délka. Světlost pixelů odpovídá intenzitě záření.

V programu WinSpec jsem dále tyto obrázky pomocí funkce Cross section převedl na graf závislosti intenzity záření I na vlnové délce λ . Program tento převod provedl tak, že v každém sloupci pixelů spočetl sumu intenzit záření všech jeho pixelů. Tím, že každý sloupec byl již kalibrován příslušnou vlnovou délkou, byl i výsledek tohoto převodu již kalibrován. Do tohoto převodu jsem nezapočítal horní a dolní okraj obrázků o šířce 100 pixelů, jelikož tyto okraje obsahují pouze šum a mohly by zhoršit kvalitu měření. Spektroskopická stopa se nachází převážně v rozsahu řádků 100-300.



Obr. 3.9 – Příklad luminiscenčních obrazů podložek.

Jedná se o celý obraz výstupu programu WinSpec použitého pro zpracování spektroskopického měření. Z tohoto obrazu jsou vybrány pouze řádky 100-300 (v pixelech), neboť ty obsahují luminiscenční stopu, zbytek obrazu je tvořen pouze šumem. Následné zpracování dat z výběru spočívá v integraci přes všechny pixely sloupce v každém sloupci.

Na obrázcích vpravo je zřetelně viditelný bílý pruh, jedná se o druhou harmonickou budícího laseru.

a) skleněná podložka, b) slídová podložka typu V4

Přestože program WinSpec zobrazoval výsledek tohoto převodu přímo jako graf, nebylo možné jej dále zpracovávat potřebným způsobem. Proto jsem data tvořící tento graf z programu WinSpec vyexportoval v podobě seznamu hodnot intenzit záření, kdy každá hodnota odpovídala dané vlnové délce. Přiřazení vlnových délek hodnotám intenzity záření však nebylo součástí exportu a bylo zapotřebí jej znovu doplnit v programu MS Excel. Jednalo se o 1340 hodnot pro každý střed rozsahu vlnových délek pro každou podložku. Tyto středy jsem již na začátku měření zvolil tak, aby se rozsahy vlnových délek částečně překrývaly. Překrytí mi umožnilo spojení dvou rozsahů do jednoho, kdy překrývající se části jsem nahradil průměrem obou hodnot. Výsledkem bylo 2303 hodnot intenzity záření v závislosti na vlnové délce v rozsahu 360 – 838 nm pro každou podložku.

Jelikož jsem stejným postupem provedl zpracování dat i pro měření intenzity záření pozadí, mohl jsem dále hodnoty pozadí odečíst od hodnot pro podložky. V programu MS Excel jsem z výsledných hodnot vytvořil grafy závislosti intenzity záření I na vlnové délce λ , které bylo možné dále zpracovávat.

Z výsledků měření bylo ihned patrné, že sklo intenzitou luminiscenčního záření dalece přesahuje ostatní zkoumané podložky v měřeném rozsahu vlnových délek. Pouze na vlnových délkách 405 – 410 nm převyšuje luminiscence podložky V1 o tloušťce $(62 \pm 9) \mu\text{m}$ luminiscenci skla a na vlnových délkách 370 – 426 nm je převýšena luminiscence skla luminiscencí křemene. Pro porovnání uvádím srovnání

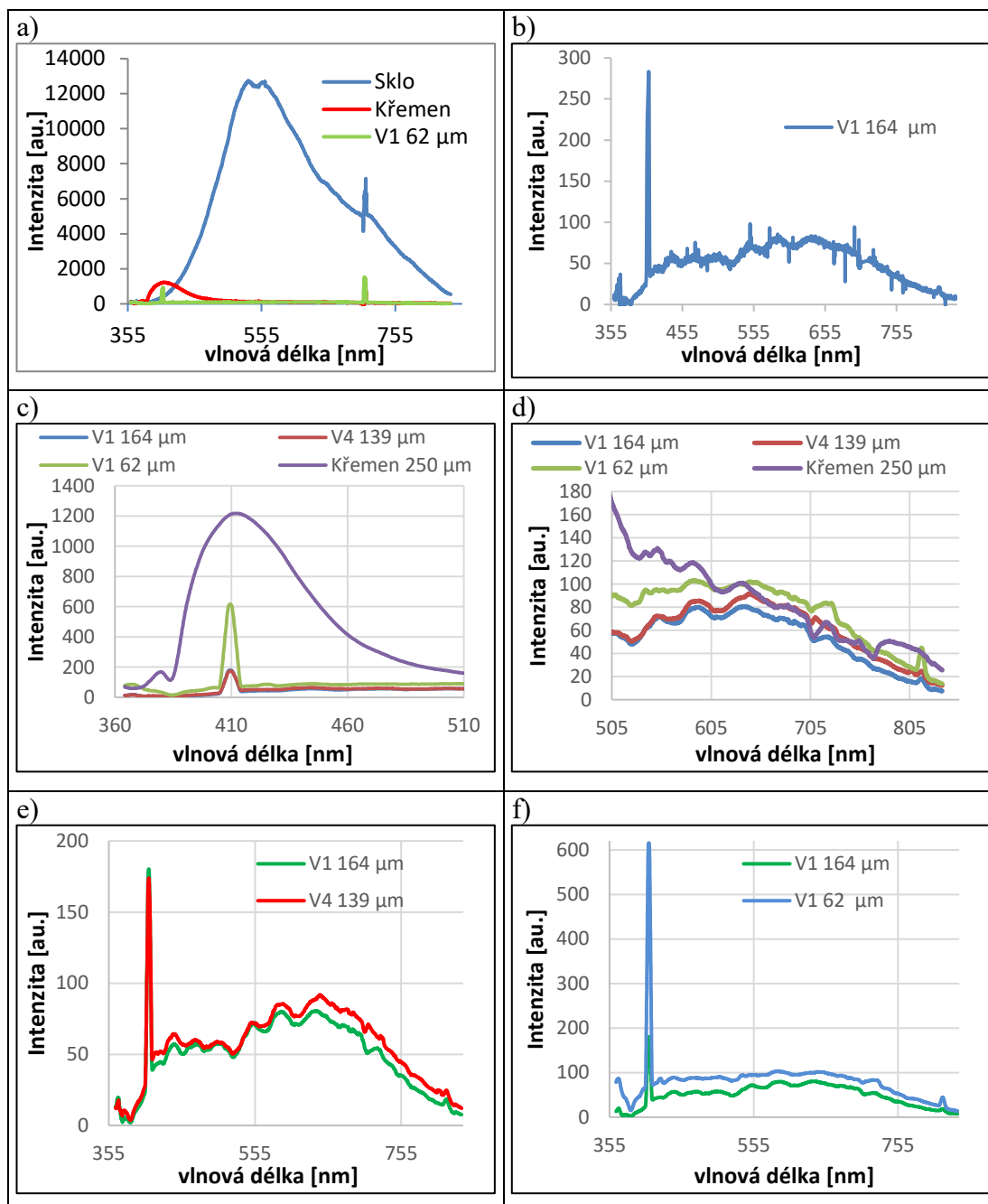
luminiscence křemenné a skleněné podložky s podložkou V1 viz Graf 3.1 a). Z následného detailnějšího zkoumání luminiscence podložek je sklo vynecháno pro větší přehlednost.

Na Graf 3.1 a) je také patrný vzestup intenzity luminiscence v okolí vlnové délky 710 nm, jedná se o druhou harmonickou vlnu budícího laseru, ta se projevovала již na luminiscenčních obrazech jako bílý pruh u všech podložek, viz Obr. 3.9. Tento vzestup intenzity v grafu tedy není způsoben luminiscencí podložek a je pro toto měření nezajímavý – z toho důvodu je v další části tento hrot nahrazen lineární funkcí v oblasti vlnových délek 705 – 715 nm, aby se výsledky staly přehlednějšími.

Dále jsem musel ze získaných dat odstranit vliv kosmického záření, to se projevuje, jako drobný výstřelový šum v celém rozsahu grafu závislosti intenzity záření na vlnové délce viz Graf 3.1 b). Kosmické záření jsou ionizované částice, které při průchodu CCD čipem generují náboj, který se následně přičítá k signálu generovanému dopadajícím zářením vzorku. Tento vliv je velmi malý a projevuje se proto, jen při slabých signálech, neboli měření slabého záření, viz rozdíl rozsahů svislých os Graf 3.1 a) a b).

Pro odstranění vlivu kosmického záření ze spektroskopických obrazů bylo již vyvinuto několik algoritmů, viz např. [21], [22], popř. se běžně používá porovnání dvou spekter zachycených za stejných podmínek k odhalení vlivu kosmického záření [22]. Tyto algoritmy a postupy jsem shledal příliš složitými pro potřeby této práce, neboť si v této práci nekladu za cíl vysoce přesné porovnání emisních spekter, ani jejich přesný rozbor. Jelikož jde pouze o vyvinutí a ověření postupu pro korelaci mikro-spektroskopie s AFM, je odstranění vlivu kosmického záření pouze estetickým problémem, popř. je užitečné pro zvýšení přehlednosti. Z těchto důvodů bylo použito pouze zahlazení kosmického záření pomocí tzv. klouzavého průměru s periodou 25. Tato funkce je implementována do programu MS Excel jako spojnice trendu. Každý bod této spojnice je vypočítán jako průměr z 25 předešlých hodnot původních dat. Výsledek tohoto postupu je zobrazen na Graf 3.1 c), d), e) a f).

Z Graf 3.1 c) a d) je patrné, že křemenné sklo intenzitou luminiscenčního záření značně převyšuje slídové podložky pro vlnové délky 355 – 510 nm a je s nimi srovnatelný na vlnových délkách 510 – 840 nm.



Graf 3.1 – Porovnání luminiscenčních spekter (závislost intenzity luminiscenčního záření na vlnové délce) podložek pro AFM a mikro-spektroskopické měření při excitaci laserem o vlnové délce 355 nm.

- a) Porovnání skleněné podložky s podložkou z křemene a tenčí slídkou V1
- b) Příklad vlivu kosmického záření na naměřené hodnoty emisního spektra podložky V1 o tloušťce 164 μm .
- c) Detail spekter podložek V1, V4 a křemene pro vlnové délky od 355 nm do 510 nm. Posun grafů od počátku je způsoben aplikací klouzavého průměru.
- d) Detail spekter podložek V1, V4 a křemene pro vlnové délky od 505 nm do 855 nm
- e) Srovnání slídkových podložek V1 a V4
- f) Srovnání slídkových podložek V1 o různých tloušťkách

Z detailního porovnání na Graf 3.1 e) a f) lze posoudit, že slídkové podložky V1 a V4 mají velmi podobná emisní spektra. Byť s minimálním rozdílem jsem však jako

nejméně luminiskující určil slídovou podložku V1 a to s větší tloušťkou (164 ± 9) μm .

3.4 Návrh korelace

Výsledky předešlých měření mi umožnili sestavit návrh na provedení korelace AFM a mikro-spektroskopie na souboru nanočástic, na základě něhož jsem provedl hlavní měření této práce. Mým cílem bylo navrhnout takový postup měření, jehož výsledkem bude detailní AFM snímek korelovaný se spektrálním obrazem s hlavním požadavkem, že v obou zmíněných měřeních musí být jednoznačně jisté, že se jedná o stejnou oblast.

Režim měření AFM mikroskopu jsem zvolil AC. Bezkontaktní režim jsem nezvolil, protože je nevhodný pro vlhké vzorky, kontaktní režim je nevhodný pro neukotvené částice a další módy mají buď jiný účel, než zobrazování povrchu, nebo jsou pro základní korelaci neúčelně komplikované (viz 2.1.3 Módy).

Z části 3.2.3 - *Šířka štěrbin* této bakalářské práce jsem usoudil, že z dostupných objektivů je pro toto měření vhodný LUCPLFLN 60X se zvětšením 60x, neboť s objektivem UPLFLN 10X2 se zvětšením 10x by šířka oblasti vymezené štěrbinou byla příliš velká. S příliš velkou vymezenou oblastí by bylo výrazně těžší nastavit do této oblasti pouze omezený počet nanočástic pro získání jejich jednotlivých spekter. V části 3.3 - *Výběr podložky* jsem odvodil, že vhodnou podložkou bude slídová podložka třídy V1, jelikož ze zkoumaných podložek má sama nejslabší emisní spektrum a zároveň je svým atomárně rovným povrchem velmi vhodná pro AFM měření.

Sestavení postupu korelace významně komplikuje fakt, že během měření není přesně známa pozice hrotu na nosníku a nosník blokuje světlo z osvětlení mikroskopu procházející vzorkem. Světlo z osvětlení mikroskopu blokové nosníkem totiž nedopadá na vzorek, ani na kameru a pro operátora AFM se právě měřená oblast vzorku stává neviditelnou, viz Obr. 3.14 b). Z tohoto důvodu jsem se rozhodl pro vytvoření šablony, která usnadní zaměření vzájemné pozice částice a hrotu. Účelem šablony je znázornit oblasti, do kterých je zapotřebí umístit hrot a měřenou částici, aby zvolená částice byla skutečně a jednoznačně proměřena a zároveň, aby bylo umožněno efektivní získání jejího emisního spektra.

Šablonu jsem se rozhodl zaměřovat z pohledu kamery JUnicam, jelikož touto kamerou se běžně zaměřuje vzorek při AFM měření. Velikost skenované oblasti

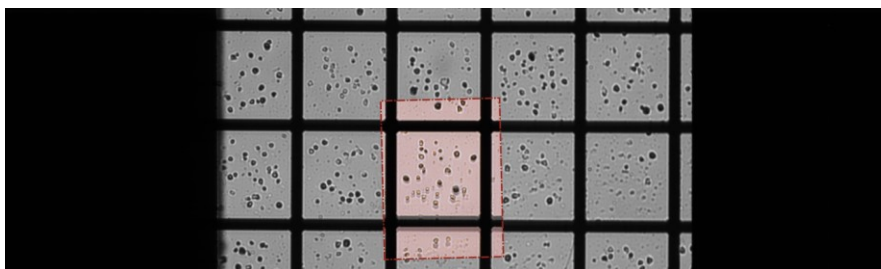
pomocí AFM jsem zvolil $20 \times 20 \mu\text{m}$. V následujících podkapitolách se zabývám sestavením této šablony a postupu měření.

3.4.1 Zaměření štěrbin

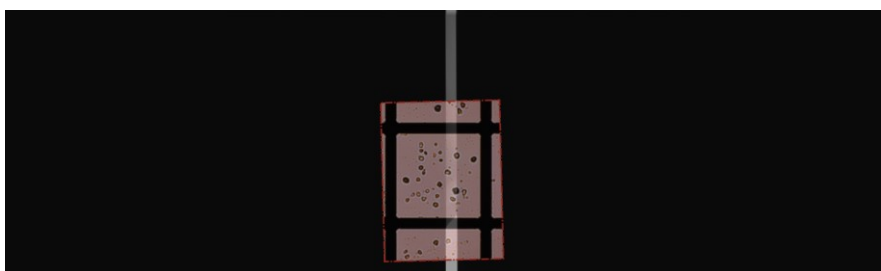
Při měření emisního spektra nanočástice se mnou zvolená nanočástice musí nacházet v prostoru vymezeném štěrbinou. Jelikož je štěrbina umístěna v optické cestě mezi spektroskopem a mikroskopem, není možné ji zobrazit kamerou JUnicam. Určení, kterou část vzorku štěrbina vymezuje z pohledu kamery JUnicam je však nezbytné pro úspěšnou korelaci.

Abych zaměřil štěrbinu z pohledu kamery JUnicam použil jsem dva snímky kalibrační mřížky s roztečí $50 \mu\text{m}$, jeden pořízený kamerou JUnicam a druhý pořízený kamerou monochromátoru s objektivem LUCPLFLN 60X. Tyto snímky byly pořízeny v rámci kalibrace kamer v části 3.2.2, ale pro potřeby samotné kalibrace nebyly využity.

Snímky obsahují kromě samotné mřížky i drobné nečistoty. Tyto nečistoty tvoří unikátní obrazec a umožňovaly mi tak nalézt, kde na snímku kamery monochromátoru se nachází část mřížky zachycená kamerou JUnicam. Obraz z kamery JUnicam jsem v programu CorelDraw otočil o 90° po směru hodinových ručiček dle části 3.2.1 a zmenšil z velikosti $1024 \times 768 \text{ px}$ na $237 \times 178 \text{ px}$ dle části 3.2.2, aby orientace a vzdálenosti na fotografii JUnicam odpovídaly vzdálenostem na snímku z kamery monochromátoru. Poté jsem s využitím obrazové průhlednosti přeložil snímky přes odpovídající si části. Výsledek je zobrazen na Obr. 3.10. Tímto postupem jsem odhalil, že vzájemná orientace kamer není 90° , ale přesněji $88,6^\circ$. Zároveň lze na Obr. 3.10 vidět, že přestože je šířka mřížky na obou snímcích shodná, výška již shodná není. Přeměření počtu pixelů jsem určil, že kamera monochromátoru natahuje obraz ve svislém směru o přibližně 1 pixel na každých 14 pixelů původní vzdálenosti.

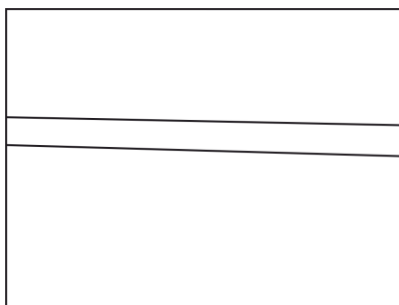


Obr. 3.10 – Přeložení snímku kalibrační mřížky s roztečí $50\ \mu\text{m}$ z kamery JUnicam a CCD kamery monochromátoru. Hranice snímku kamery JUnicam je zvýrazněna čerchovanou čarou



Obr. 3.11 – Přeložení snímku kalibrační mřížky s roztečí $50\ \mu\text{m}$ z kamery JUnicam a fotografie štěrbinou z CCD kamery monochromátoru.

Poté, co byly obrazy zarovnaný, jsem pod průhledný obraz kamery JUnicam umístil obraz štěrbinou z kamery monochromátoru tak, aby byl přesně zarovnaný se snímkem mřížky z kamery monochromátoru, viz Obr. 3.11. Po zarovnání jsem mohl překreslit rovnými čarami oblast vymezenou štěrbinou na snímek z kamery JUnicam a přetočit jej zpět na původní orientaci. Vytažením okrajů snímku kamery JUnicam a odstraněním samotného snímku vznikl základ pro šablonu korelace obsahující informaci, kterou část záběru kamery JUnicam vymezuje štěrbinou monochromátoru. Výsledek je zobrazen na Obr. 3.12.



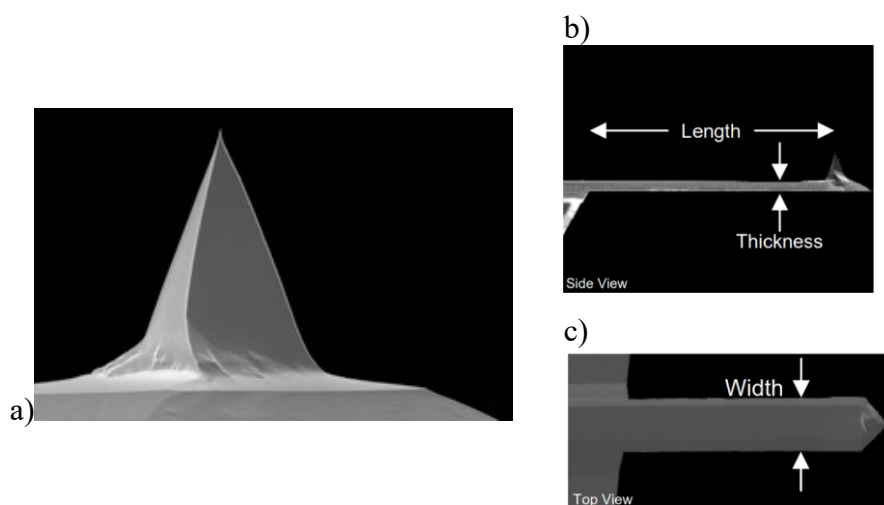
Obr. 3.12 – 1. krok vytváření šablony korelace AFM a mikrospektroskopie. Vnější obdélník představuje hranice záběru kamery JUnicam, dvě rovnoběžné čáry ohraničují oblast vzorku, která je omezena štěrbinou monochromátoru.

Natažení obrazu na kameře monochromátoru zde nehraje roli, jelikož k němu dochází jen ve směru kolmém na šířku štěrbinu.

Aby byl výsledek spektroskopického měření kvalitní, musí se ve štěrbině ve směru šířky štěrbinu (tj. ve směru šířky nosníku) nacházet pouze zkoumaný soubor nanočástic a žádné nečistoty. Ve směru na délku štěrbinu (délku nosníku) se ve štěrbině mohou nacházet další částice, nebo nečistoty, které bude možné oříznout ve funkci *Cross Section* programu WinSpec/32 zmíněné v části 3.3.2 - *Měření luminiscenčních spekter podložek*, ale nesmějí být příliš blízko zkoumaných částic, aby se luminiscenční záření částic a nečistot nemísilo.

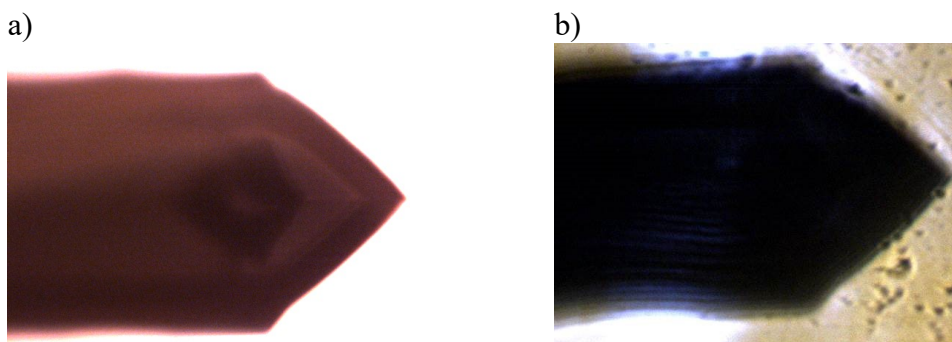
3.4.2 Zaměření hrotu

Jaká část vzorku bude skenována při AFM měření závisí na počáteční pozici hrotu a na zvoleném rozsahu. Skutečná a přesná pozice hrotu však není přímo známa, hrot a hlavně jeho špička totiž není během měření viditelný – je zastíněn nosníkem a je příliš malý na přímé pozorování optickým mikroskopem. Přestože existují elektronové snímky nosníku typu ACTA s viditelným hrotem, viz Obr. 3.13, není jejich použití pro zaměření hrotu na nosníku možné, jelikož žádné dva nosníky nejsou přesně stejné. Sám výrobce uvádí např. nepřesnost v délce nosníku až $\pm 10 \mu\text{m}$ [18], navíc dochází během měření k opotřebení, které může způsobit jeho otupení, ohnutí, nebo jiné deformace samotného hrotu. Jediným řešením by bylo prozkoumání každého nosníku před měřením pomocí elektronové mikroskopie, to by však výrazně prodloužilo dobu přípravy každého měření, navíc by elektronové snímkování bylo zapotřebí opakovat kvůli již zmíněnému běžnému opotřebení.



Obr. 3.13 – Elektronové snímky nosníku Acta od firmy APPNano [18]
a) Detailní boční pohled; b) pohled z boku; c) pohled z vrchu

Více praktickou možností, jak určit alespoň přibližně skutečnou pozici hrotu, je jeho prosvícení pomocí intenzivního světla z lampy mikroskopu. Nosník je sice z monokrystalické destičky křemíku, je však natolik tenký, že je možné jej alespoň částečně prosvítit zvýšením intenzity osvětlení a tím zviditelnit jehlanovou strukturu hrotu viz Obr. 3.14 a). I při prosvícení však není možné přesně⁵ zaměřit špičku hrotu, která zprostředkovává samotné měření, jelikož tvar celého hrotu není přesně rozeznatelný. Místo přesného zaměření jsem mohl jen odhadnout oblast, kde se vrchol hrotu s největší pravděpodobností nachází.

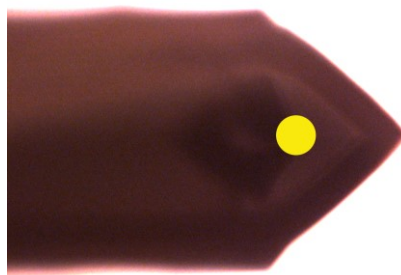


Obr. 3.14 – Pohled na nosník Acta přes CCD kameru JUnicam v ovládacím programu AFM. Použitý objektiv 60x. Vzorek se nachází mezi nosníkem a naším pohledem, osvětlení se nachází z tohoto pohledu za nosníkem.

- a) Částečně prosvícený nosník Acta s viditelným hrotem.
- b) Typický pohled na nosník Acta během AFM měření. Výrazně vyšší světlost vzorku kolem nosníku je způsobena detekčním laserem AFM.

Na základě Obr. 3.13 a Obr. 3.14 jsem oblast, kde se s největší pravděpodobností nachází hrot na nosníku, odhadl tak, jak je znázorněna na Obr. 3.15 žlutou oblastí ve tvaru kruhu. Poloměr tohoto kruhu odpovídá na obrázku vzdálenosti $(8,2 \pm 0,3) \mu\text{m}$. Velikost této oblasti jsem zvolil větší, než je nezbytné pro zvýšení pravděpodobnosti, že se hrot v této oblasti skutečně nachází a pro usnadnění použití výsledné šablony. Tato oblast bude na šabloně reprezentovat pozici, do které je zapotřebí umístit hrot pro úspěšnou korelaci.

⁵ Myšleno s přesností alespoň na 1 pixel CCD kamery. Připomínám, že 1 pixel CCD kamery JUnicam odpovídá s objektivem 60x vzdálenosti 81 nm viz Tabulka 3.3. Pro srovnání poloměr křivosti hrotu nosníku ACTA je uváděn 6 nm [18].

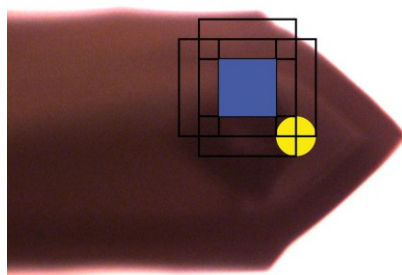


Obr. 3.15 – Znázornění nejpravděpodobnější pozice špičky hrotu nosníku Acta na pohledu z CCD kamery JUnicam.

3.4.3 Zaměření oblasti měření

To, kde na vzorku se nachází hrot na začátku měření, určuje, která část vzorku bude při nastavené velikosti skenu měřena pomocí AFM. Z toho plyne, že nepřesnost v zaměření hrotu se nutně musí promítnout v nepřesnosti zaměření oblasti měřeného skenu. Počátek měření AFM obrazu je v programu *JPK NanoWizard Control* levý dolní roh skenované oblasti, ten ale odpovídá pravému dolnímu rohu skenované oblasti v záběru kamery JUnicam.

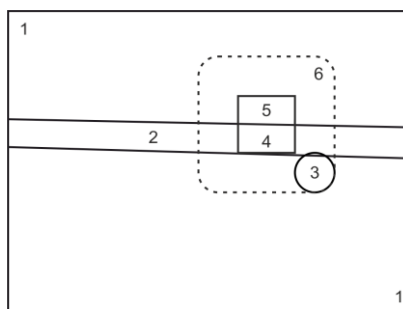
Oblast s největší pravděpodobností naskenování v závislosti na pozici hrotu jsem určil pro velikost skenované oblasti $20 \times 20 \mu\text{m}$. V programu CorewIDraw jsem zobrazil Obr. 3.15. Převodními vztahy z části 3.2.2 jsem rozměry skenované oblasti přepočtl na počet pixelů na kameře JUnicam. Nástrojem obdélník jsem 4x nakreslil tvar skenované oblasti o daných rozměrech v pixelech tak, že pravý dolní roh každého čtverce překrýval jeden ze čtyř krajních bodů kruhu – nejvíce vlevo, vpravo, nahoře a dole. Oblast, kterou po této operaci překrývali všechny čtverce, jsem označil za oblast, která bude s největší pravděpodobností naskenována. Výsledek jsem zvýraznil modrou barvou na Obr. 3.16 – jedná se tedy o oblast, která bude součástí AFM skenu kdykoliv, kdy se bude hrot nacházet ve žlutém kruhu.



Obr. 3.16 - Výsledek hledání oblasti s nejvyšší pravděpodobností skenování AFM při velikosti skenu $20 \times 20 \mu\text{m}$ – výsledek je na obrázku modře.

Okraje dílčích čtverců jsem následně spojil kruhovou výsečí o poloměru žlutého kruhu, tak vznikla maximální oblast možného skenování. Po odstranění nadbytečných čar jsem výsledek přenesl na šablonu tak, aby spodní část nejpravděpodobnější oblasti skenu překrývala štěrbinu. Vznikla tak oblast korelace o rozměrech $12 \times 6 \mu\text{m}$, která bude s největší pravděpodobností součástí AFM skenu $20 \times 20 \mu\text{m}$ a zároveň bude proměřena spektroskopicky.

Čárkovanou čarou ohraničená oblast zde představuje množinu bodů, které mohou být součástí skenu, je-li hrot umístěn ve žlutém kruhu. Z konečné podoby šablony jsem musel odstranit veškeré barevné značení a minimalizovat tloušťku čar – obojí by mohlo zhoršit identifikaci částic, nebo nečistot na vzorku. Na Obr. 3.17 je zobrazená výsledná šablona doplněná o popis jednotlivých částí, tento popis není součástí šablony určené pro měření. Šablona určená pro měření je vytisknuta na fólii, kterou je možné přeložit přes monitor počítače ovládající AFM. Existují i další způsoby realizace šablony, především softwarové.



Obr. 3.17 – Šablona pro korelaci AFM a mikro-spektroskopie na souboru nanočástic pro velikost základního AFM měření $20 \times 20 \mu\text{m}$.

- 1 – Vnější hranice. Tento obdélník určuje velikost, na jakou je zapotřebí zarovnat okno záběru kamery JUnicam.**
- 2 – Část vzorku vymezená štěrbinou.**
- 3 – Oblast, do které je zapotřebí umístit hrot na začátku AFM měření.**
- 4 – Oblast pro umístění měřeného souboru nanočástic v rámci korelace. Tato oblast bude s nejvyšší pravděpodobností měřena při základním AFM měření a bude měřena spektroskopicky. Její rozměry jsou přibližně $12 \times 6 \mu\text{m}$.**
- 5 – Oblast pro umístění charakteristické části vzorku. Tato oblast bude s nejvyšší pravděpodobností měřena při základním AFM měření, ale nebude měřena spektroskopicky.**
- 6 – Oblast, která může být proměřena při základním AFM měření.**

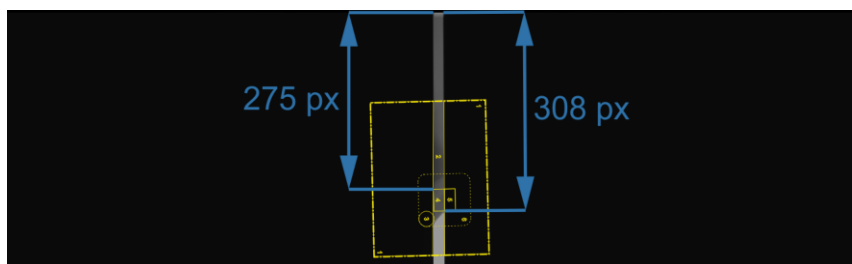
3.4.4 Zaměření spektrálních stop

Šablona na Obr. 3.17 přeložená přes záběr kamery JUnicam zajistí jednoznačné přiřazení částic naměřených AFM skenem k částicím zobrazených na kameře JUnicam. Aby proběhla úspěšná korelace AFM měření a spektroskopie, je zapotřebí stejně jednoznačně přiřadit emisní spektra naměřená pomocí mikro-spektroskopie k částicím zobrazeným na kameře JUnicam.

Mikro-spektroskopické měření je realizováno v programu *WinSpec*, převod spektrálních stop na grafické znázornění emisního spektra (neboli závislost intenzity záření I na vlnové délce λ) probíhá v témže programu pomocí funkce *Cross Section*, jak bylo popsáno v části 3.3.2 na straně 34. Funkce *Cross Section* umožňuje provést převod na grafické znázornění emisního spektra jen z určité části obrazu spektrálních stop zadáním rozsahu os x (vodorovná osa) a y (svislá osa) v pixelech. Je tedy možné zadáním správného rozsahu osy y zobrazit emisní spektrum jen těch částic, které jsou z pohledu kamery JUnicam v části 4 šablony.

Osu x je zapotřebí vždy ponechat celou, jelikož tato osa reprezentuje celý rozsah vlnových délek λ a její zkrácení by vedlo k neznámému posuvu v rámci vlnových délek. Abych určil jaký rozsah osy y je zapotřebí zadat, použil jsem Obr. 3.11 na str. 41, kde je záběr z kamery JUnicam přeložen, přes odpovídající oblast záběru z kamery monochromátoru se štěrbinou. Přes záběr z kamery JUnicam jsem

přeložil šablonu (Obr. 3.17) a záběr z kamery Junicam jsem odstranil. Tím jsem přenesl veškeré oblasti vymezené šablonou na odpovídající oblasti na záběru kamery monochromátoru, viz Obr. 3.18. Proměřením vzdálenosti v pixelech od horního okraje záběru kamery monochromátoru k hornímu a dolnímu okraji oblasti 4 šablony jsem získal rozsah osy y , ve kterém se nacházejí emisní stopy částic proměřených metodou AFM v oblasti 4 šablony. Potřebný rozsah osy y je 275 – 308 px.



Obr. 3.18 – Přeložení šablony pro korelaci přes odpovídající oblast záběru CCD kamery monochromátoru s vyznačením rozsahu oblasti 4 šablony na ose y .

3.4.5 Navržený postup

V této části popisuji mnou navržený postup pro korelaci AFM a mikro-spektroskopie na souboru křemíkových nanočástic. Postup se zakládá na šabloně zobrazené na Obr. 3.17, kterou jsem vytiskl na průhlednou folii bez číselného popisu, návod se však odkazuje na číselný popis.

Tento návod je koncipován pro přístroje a jejich uspořádání popsané v části 3.1 s použitím objektivu LUCPLFLN 60X se zvětšením 60krát, numerickou aperturou 0,7 a pracovní vzdáleností 1,5 – 2,2 mm. V celém měření je zapotřebí dbát na to, aby žádné částice nebyly překryty čarami šablony.

- 1) Přístroje se uvedou do provozu, CCD kamera monochromátoru se vychladí na $-108\text{ }^{\circ}\text{C}$, ustálí se termální drift nosníku AFM, ustálí se detekční laser AFM.
- 2) Na obrazovku počítače řídicího AFM měření se umístí šablona, která je vytisknuta na průhlednou folii formátu A4 v orientaci na výšku, samotná šablona je v horní části folie. Velikost, v jaké bude šablona vytisknuta, ovlivní, jak velké bude okno kamery Junicam v programu *JPK NanoWizard control* bude zapotřebí použít. Vhodná velikost šablony je např. $73 \times 55\text{ mm}$. Folie se zarovná na pravý okraj obrazovky. Tím bude

na obrazovce ponechán dostatečný prostor pro další okna nezbytná pro měření.

- 3) Výstup mikroskopu se nastaví na kameru JUnicam. V programu *JPK NanoWizard Control* se otevře okno kamery JUnicam zobrazující záběr mikroskopu a zaostří se na vzorek.
- 4) Velikost a pozice okna kamery JUnicam se zarovná s vnějším okrajem šablony, tj. oblastí 1, tak bude zajištěno, že pozice a velikosti jednotlivých oblastí odpovídají měřítku kamery.
- 5) Hrot nosníku se umístí do oblasti 3 šablony a nastaví se velikost oblasti měřené AFM na $20 \times 20 \mu\text{m}$. Tak bude zajištěno, že bude během AFM měření proměřena oblast 4 a 5 a některé části oblasti 6. V této části je možné použít prosvícení nosníku zvýšením intenzity osvětlení mikroskopu pro přesnější zaměření hrotu. Poté se nosník umístí tak vysoko, aby byl mimo zónu zaostření kamery JUnicam a nestínil tak vzorek.
- 6) Pohybem vzorkem pomocí příslušných šroubů vzorkové desky, na které se nachází AFM hlava se nalezne vhodná oblast vzorku. Zde je zapotřebí splnit následující parametry:
 - V oblasti 4 šablony se musí nacházet jen ty částice, na kterých chceme provést korelaci. Tato oblast nesmí obsahovat nečistoty (především luminiskující). Chceme-li korelovat více částic zároveň, musejí v této oblasti být částice dostatečně daleko od sebe a žádné dvě nesmějí být nad sebou, aby nedocházelo k ovlivnění jejich emisních spekter.
 - V části 5 se musí nacházet charakteristický prvek, tj. shluk nanočástic, nebo částice rozmístěné v dobře rozeznatelném a na celém záběru kamery JUnicam unikátním uspořádání. Tato část bude sloužit k jednoznačné identifikaci proměřených částic na záběrech kamer.
 - V oblasti 6 šablony se mohou nacházet další charakteristické prvky, ty pouze mohou být součástí základního skenu $20 \times 20 \mu\text{m}$ a lze je měřit při dalších skenech.
- 7) Pořídí se snímek kamerou JUnicam pro potřeby korelace. Od tohoto kroku je nezbytné, aby se vzorek nepohyboval vůči měřící soustavě.
- 8) Výstup optického mikroskopu se přepne na kameru monochromátoru, monochromátor se nastaví do režimu snímání obrazu (používá se pozice

zrcadlo turetu). Zde začíná spektroskopické měření. Spektroskopické měření se provede před AFM měřením, neboť spektroskopie klade větší požadavky na uspořádání nanočástic a lze očekávat, že doba expozice pro spektroskopii bude kratší, než doba měření AFM, rychleji se tedy odhalí případná nevhodnost uspořádání nanočástic. Dále je možné, že během spektroskopie budou odhaleny rušivé luminiscující nečistoty, které nebyly viditelné na ostatních kamerách.

- 9) Pořídí se snímek kamerou monochromátoru (excitační laser vypnutý, osvětlení mikroskopu zapnuté).
- 10) Do optické cesty se umístí štěrba, pořídí se znovu snímek.
- 11) Vypne se osvětlení mikroskopu a veškeré nekritické osvětlení v laboratoři a zavře se kryt celé soustavy, aby nedocházelo k průniku parazitických signálů na CCD kameru monochromátoru.
- 12) Zapne se excitační laser, pořídí se luminiscenční snímek (vypnuté osvětlení mikroskopu, zapnutý excitační laser).
- 13) Monochromátor se přepne do režimu snímání luminiscenčního spektra (používá se disperzní prvek turetu).
- 14) Zaznamená se luminiscenční spektrum (měřené běžně v časech od 10 s). Jelikož použitá difrakční mřížka umožňuje snímání jen v rozsahu přibližně 280 nm, je zapotřebí provést měření dvakrát – po prvé v rozsahu 360 – 640 nm (střed v 500 nm), po druhé v rozsahu 560 – 838 nm (střed v 700 nm).
- 15) Excitační laser se vypne, nebo se zablokuje vstup do zadního portu mikroskopu, výstup optického mikroskopu se přepne na kameru JUnicam, zapne se detekční laser AFM, je možné zapnout osvětlení v laboratoři.
- 16) Nosník se posune směrem dolů zpět do zóny zaostření kamery JUnicam a přistane na vzorku, spustí se měření. S jistotou bude v tomto kroku proměřena oblast 4 a 5 šablony.
- 17) Nyní je možné proměřit detaily jednotlivých nanočástic, nebo naopak širší oblast, aby bylo zmapováno širší rozložení vzorku a usnadnila se korelace.
- 18) V grafickém editoru se přeloží šablona pro korelaci přes záběr kamery JUnicam bez nosníku. Tak bude uloženo zmapování měřené oblasti.

- 19) V programu WinSpec se použije funkce Cross Section na uložené spektrální stopy (na oba rozsahy). Rozsah osy x se ponechá 0 – 1340 px, rozsah osy y se zvolí 275 – 308 px. Získaná data je zapotřebí zpracovat v programu MS Excel (nebo v podobném). Rozsahy vlnových délek v kroku 14 jsou zvoleny tak, aby se částečně překrývaly. Tím je možné oba rozsahy spojit tak, že intenzita bude v místě překryvu nahrazena průměrem hodnot z obou rozsahů.
- 20) Grafické znázornění emisního spektra získané v předešlém kroku odpovídá emisnímu spektru částic z oblasti 4 šablony na záběru kamery JUnicam. Pokud byla správně zvolena oblast vzorku, mělo by být možné jednoznačně přiřadit oblasti 4 šablony obraz získaný AFM měřením pomocí charakteristického prvku v oblasti 5 šablony. Částici (nebo částicím) v oblasti 4 odpovídá získané luminiscenční spektrum.

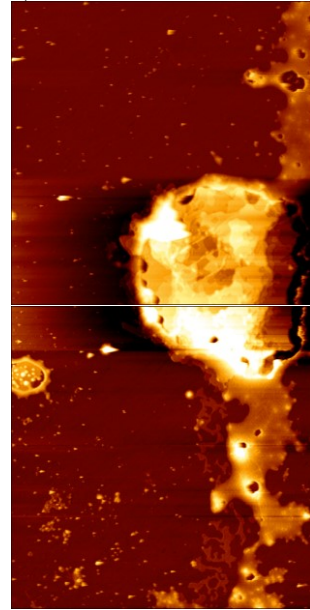
3.5 Příklad korelace AFM a mikro-spektroskopie

V průběhu psaní této práce byla vedoucí práce Mgr. Annou Fučíkovou, Ph.D. vyvinuta rychlejší, ale méně přesná metoda korelace AFM a mikro-spektroskopie založená na dílčích výsledcích této práce. Princip metody korelace spočívá v zarovnání nosníku AFM na střed štěrbiny na obrazu CCD kamery monochromátoru. Po provedení měření AFM a mikro-spektroskopie je možné samotnou korelaci provést metodou analýzy obrazu, nebo triangulace na základě kalibrace kamer uvedené v této práci v částí 3.2.1, 3.2.2 a 3.2.3. Příklad výsledku tohoto postupu je zobrazen na Obr. 3.19.

a)



b)



Obr. 3.19 – Příklad korelace AFM a mikro-spektroskopie na křemíkových nanočásticích.

- a) **Luminiscenční obraz z CCD kamery monochromátoru, použit objektiv mikroskopu se zvětšením 60x**
- b) **Výsledek AFM měření, jedná se o spojení dvou skenů každý o velikosti $10 \times 10 \mu\text{m}$**

4 Diskuze

Postup navržený v této práci umožňuje vymežit oblast vzorku o rozměrech $12 \times 6 \mu\text{m}$, o které lze s jistotou říci, že na ní dojde ke korelaci AFM a mikro-spektroskopického měření bude-li použit tento postup. Je pravděpodobné, že velikost oblasti by bylo možné snížit a zvýšit tím přesnost zaměření, např. zvýšením přesnosti zaměření hrotu a zmenšením oblasti základního AFM skenování. Tato práce si nekladla za cíl vytvořit korelaci na minimální možné ploše, ale především postup pro korelaci sestavit za dosažení co největší míry jistoty proměření. Z toho důvodu byla například oblast zaměření AFM hrotu zvolena podstatně větší, než bylo nezbytně nutné. Požadavek na umístění jediné nanočástice ze souboru nanočástic vzorku do oblasti jistého proměření je dosažitelný a je tedy tímto postupem možné korelovat emisní spektrum jediné nanočástice s jejím AFM obrazem.

Přestože se výsledný postup jeví jako značně komplikovaný, především pro veliký počet kroků, je většina těchto kroků jednoduchá a nezbytná i pro samostatné AFM, nebo mikro-spektroskopické měření. Značnou komplikací je však nutnost použití šablony a specializované folie kompatibilní s dostupnou formou tisku. Tento nedostatek by pro budoucí aplikace bylo možné výrazně redukovat softwarovým řešením a jeho vytvoření by bylo proto žádoucí. Určení časové náročnosti a vhodnosti při rutinním měření by však vyžadovalo více zkušebních měření. Dále je problematická případná reprodukce tohoto postupu na jiná zařízení, či uspořádání, kdy pro úspěšnou korelaci by bylo zapotřebí opakovat celý postup sestavení návrhu, především orientační a délková kalibrace kamer.

Další komplikací navrženého postupu představují požadavky na prostorové rozmístění částic vzorku v bodu 5 postupu. Kvůli tomuto požadavku je postup vhodný především pro zředěné vzorky s rovnoměrným rozmístěním částic, ale jistě se stane naprosto nevhodným pro vzorky s vysokou, nebo nerovnoměrnou hustotou nanočástic. Takové vzorky jsou však zároveň méně vhodné pro samostatnou mikro-spektroskopii. Vždy však bude zapotřebí vynaložit jisté úsilí pro splnění těchto požadavků, aniž by byl zaručen úspěch.

Sestavený postup lze porovnat s postupem uvedeným v článku [23], který vyšel v době sepisování této práce. Článek se zabývá laditelností zakázaného pásma amorfních křemíkových nanočástic a to právě za použití korelace mikro-spektroskopie a AFM. Postup uvedený v tomto článku byl nazván *Single-dot correlative microscopy*

a sestává z hrubého optického zarovnání, vícenásobného AFM skenu, užití pohyblivé štěrbinu v optické cestě před monochromátorem a v sestavení výsledného obrazu překryvem AFM skenů. Mnou uvedený postup nevyžaduje pohyblivou štěrbinu, ani překryv více AFM skenů přes sebe a umožňuje tedy rychlejší zpracování výsledků jediným AFM skenem a tedy i jejich rychlejší získání. Postup v [23] však nevyžaduje žádné další nástroje, jako je šablona, speciální folie, nebo software, ani neklade dodatečné požadavky na rozmístění nanočástic oproti samotné mikro-spektroskopii a tím se stává výrazně jednodušší na provedení. Zároveň je postup v článku [23] velmi vhodný pro korelaci AFM skenu a mikro-spektroskopie většího množství částic současně, zatímco postup uvedený v této práci se zaměřuje na jedinou nanočástici.

Dále byl během psaní této práce na základě mých měření a poznatků vyvinut postup pro korelaci Mgr. Annou Fučíkovou, Ph.D. pro potřeby výzkumu na KCHFO MFF UK. Tento postup nabízí mnohem rychlejší provedení, ale za cenu snížení přesnosti. Využívá vymezení oblasti AFM skenu pouze za použití štěrbinu. Hrot AFM se hrubým optickým zarovnáním na kameře monochromátoru zarovná na střed štěrbinu a po AFM a mikro-spektroskopickém měření se použije buď triangulace na základě měřítek kamer získaných v části 3.2.2, nebo obrazová analýza. Tento postup umožňuje korelovat na oblasti $60 \times 60 \mu\text{m}$, ale stejně jako postup v článku [23] nevyžaduje žádné dodatečné nástroje.

Kromě samotného návrhu postupu korelace AFM a mikro-spektroskopie je výsledkem této práce kalibrace obrazů kamer a spektroskopické proměření podložek používaných pro AFM. Na základě spektroskopického měření podložek pro AFM bylo určeno, že nejvhodnější podložka pro korelaci AFM a mikro-spektroskopie je slídová podložka typu V4. Oba tyto výsledky by samostatně mohli usnadnit budoucí měření na použitých přístrojích v laboratoři KCHFO.

Pro mikro-spektroskopická měření na vlnových délkách luminiscenčního spektra od 605 nm do 805 nm, bylo by možné používat i podložku z křemenného skla, neboť na těchto vlnových délkách byla její emise srovnatelná se slídovými podložkami. Nevhodnou se křemenná podložka stává pro vlnové délky luminiscence přibližně 360 – 550 nm.

Překvapivý byl výsledek srovnání slídových podložek typu V1 pro různé tloušťky. Ukázalo se, že tenčí podložka má mírně intenzivnější luminiscenci na celém měřeném rozsahu vlnových délek. Je možné, že se jedná o chybu měření, nebo se při

ztenčení slídové podložky více projevovала přítomnost skleněného podložního skla, které muselo být umístěno pod slídovou podložkou.

Dále byl překvapivým nárůst intenzity luminiscenčního záření slídových podložek v okolí vlnové délky 407 nm. Pro tenčí slídovou podložku typu V1 tento nárůst dokonce přesahoval intenzitu luminiscence skleněné podložky. Během měření se tento nárůst bohužel nepodařilo vysvětlit, ale je možné, že se jedná o přirozenou vlastnost slídových podložek, jelikož tento nárůst byl přítomen u luminiscenčních spekter všech slídových podložek.

Dalším výsledkem této práce je i rešerše, z které sestává teoretický úvod této práce a mapuje základní principy a praktické aplikace obou korelovaných metod. Tato rešerše byla psána vhodnou formou především pro učitele fyziky, aby poskytla vhled do moderních mikroskopických metod.

5 Závěr

Primárním cílem této práce bylo sestavit návrh postupu pro korelaci AFM a mikro-spektroskopie na souboru nanočástic. Pro sestavení bylo nejprve nezbytné provést délkovou a směrovou kalibraci kamer měřící sestavy a vybrat vhodnou podložku pro AFM měření, která nebude svým emisním spektrem znehodnocovat výsledky mikro-spektroskopie.

Výsledky kalibrací jsou uvedeny v části 3.2. Postup výběru podložky je uveden v části 3.3, kde byla určena jako nejvhodnější slídová podložka typu V4, jelikož měla ze všech měřených nejslabší emisní záření pro většinu vlnových délek. Samotný postup korelace AFM a mikro-spektroskopie byl úspěšně sestaven a je uveden v části 3.4.5. Kapitola 3.4 obsahuje kromě samotného postupu také jeho odvození, především zaměření jednotlivých částí vzorku a sestavení šablony nezbytné pro navržený postup. Samotný postup byl otestován vedoucí práce Mgr. Annou Fučíkovou, Ph.D.

Sekundárním cílem této práce bylo sestavení rešerše stavu AFM a mikro-spektroskopické techniky. Tato rešerše je uvedena v části 2 - Teoretický úvod, obsahuje základní principy obou korelovaných metod a jejich praktické aplikace. Rešerše je cílena především na učitele fyziky, aby byli seznámeni s moderními mikroskopickými metodami. S ohledem na sekundární cíl je teoretická část psána přístupnou formou.

V závěrečné diskuzi (kapitola 4) jsou podrobně popsány výhody i problémy navrženého postupu korelace. Hlavní výhodou je potřeba jediného AFM skenu a hlavní nevýhodou je nezbytnost použití fólie se šablonou, nebo analogického softwarového řešení, které však nebylo součástí této práce a nelze jej tak hodnotit. V kapitole 4 je zároveň uvedeno srovnání s podobnými postupy, které byly vyvinuty v průběhu psaní této práce.

Navržený postup je nyní možné aplikovat ve výzkumu luminiscence nanočástic např. upřesnit závěry získané souborovým měřením luminiscence, dále určit závislost charakteru emisního spektra na přesném tvaru a rozměrech jednotlivých nanočástic, nebo detailně proměřit závislost emisního spektra na vzdálenosti dvou blízkých nanočástic. Postup je bohužel obtížně reprodukovatelný na jiných měřících sestavách, jelikož je na míru navržen na sestavu v laboratoři KCHFO MFF UK, pro jiné sestavy by bylo nezbytné provést celý proces sestavení postupu znovu.

Seznam použité literatury

- [1] *Nano World Innovative Technologies*. [Online] [Citace: 5. Červenec 2019.]
<https://www.nanoworld.com/afm-probes-series>.
- [2] NanoAndMore GMBH. [Online] NanoAndMore GMBH. [Citace: 29. 5 2021.]
<https://www.nanoandmore.com/AFM-Probe-PPP-NCHR>.
- [3] Golek, F., a další. AFM image artifacts. *Applied Surface Science*. 2014, Sv. 304, stránky 11-19.
- [4] Giessibl, F. J. Advances in atomic force microscopy. Červenec 2003, Sv. 75, 3, stránky 949-983. doi: 10.1103/RevModPhys.75.949.
- [5] Zhong, Q., a další. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*. 10. červen 1993, Sv. 290, 1-2, stránky L688-L692.
- [6] *NanoWizard AFM Handbook*. [PDF] Berlín, Německo : JPG Instruments AG, 2015. verze 4.3.
- [7] Binnig, G., Quate, C. F. a Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Physical Review letter*. Květen 1986, Sv. 56, 9, stránky 930--933.
- [8] Eaton, Peter a West, Paul. *Atomic force microscopy*. New York : Oxford University Press, 2010. 978-0-19-957045-4.
- [9] Pelant, Ivan a Valenta, Jan. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha : Academia, 2006. Sv. I. 80-200-1447-0.
- [10] Born, Max a Emil, Wolf. *Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. New York : Cambridge University Press, 1999. 0-521-64222-1.
- [11] Úvod do techniky CCD čipů. *Moravské přístroje, Kamery pro astronomii*. [Online] 21. 9 2011. [Citace: 29. 10 2021.]
<https://www.gxccd.com/art?id=303&lang=405>.
- [12] CCD Sensitivity and Noise - What is noise and what does it matter? *Oxford Instruments Andor*. [Online] Oxford Instruments. [Citace: 29. 10 2021.]
<https://andor.oxinst.com/learning/view/article/ccd-sensitivity-and-noise>.
- [13] Deshpande, S. S. Principles and Applications of Luminescence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 3. Červen 2010, Sv. 41, 3, stránky 155-224.

- [14] Singh, Bhawana, a další. Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. *Current science*. 2012, 102, stránky 232-244.
- [15] Fučíková, Anna, a další. Novel use of silicon nanocrystals and nanodiamonds in biology. *Chemical Papers*. 2009, Sv. 63, stránky 704-708.
- [16] Waychunas, Glenn A. Luminescence spectroscopy. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*. 2014, Sv. 78, stránky 175-217.
- [17] Optics and Microscope Accessories. *OLYMPUS*. [Online] [Citace: 11. 3 2021.] <https://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/>.
- [18] *AppNano*. [Online] [Citace: 19. červenec 2019.] www.appnano.com/download/ACTA.pdf.
- [19] Brož, Jaromír. *Základy fyzikálních měření I*. 1. Praha : SPN, 1983.
- [20] *Web Ted Pella, Inc*. [Online] [Citace: 5. srpen 2019.] https://www.tedpella.com/histo_html/quartz-micro-slides.htm.
- [21] Pych, Wojtek. A Fast Algorithm for Cosmic-Ray Removal from Single Images. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*. February 2004, Sv. 116, 816, stránky 148-153.
- [22] Barton, Sinead J. a Hennelly, Bryan M. An Algorithm for the Removal of Cosmic Ray Artifacts in Spectral Data Sets. *Applied Spectroscopy*. 8, 1. August 2019, Sv. 73, stránky 893-901.
- [23] Huang, Chia-Ching, a další. Band-Gap Tunability in Partially Amorphous Silicon Nanoparticles Using Single-Dot Correlative Microscopy. *ACS Applied Nano Materials*. 2021, 4 (1), stránky 288-296.

Seznam tabulek

Tabulka 3.1 – Výsledky měření počtu pixelů mezi dvěma body kalibrační mřížky;	27
Tabulka 3.2 – Statistické zpracování počtu pixelů mezi dvěma body.	28
Tabulka 3.3 – Výsledky výpočtů skutečné délky l_1 odpovídající jednomu pixelu na fotografii.	29
Tabulka 3.4 – Naměřené hodnoty šířky štěrbin v počtech pixelů n_s fotografie	30
Tabulka 3.5 – Statistické zpracování naměřených hodnot šířky štěrbin v pixelech.	31
Tabulka 3.6 – Naměřené hodnoty tloušťky slídových podložek	33
Tabulka 3.7 – Statistické zpracování tloušťky jednotlivých slídových podložek.	34