

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Studijní obor: Farmacie



AFM vo farmaceutickej technológii 3
AFM in pharmaceutical technology 3

Diplomová práca

Veronika Ščuryová

Vedúci práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, máj 2015

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce pánovi doc. RNDr. Pavlovi Doležalovi, CSc. za to, že mi umožnil pracovať na tomto projekte, za jeho ochotu a odborné rady. Taktiež by som chcela poďakovať Mgr. Pavlovi Berkovi, že ma zasvätil do práce s AFM mikroskopom a za jeho pomoc s experimentálnou časťou práce a ďalej doc. Dittrichovi za prípravu Ag-nanočastíc.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové,

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Študent/ka: Veronika Ščuryová

Školiteľ: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Názov práce: AFM vo farmaceutickej technológii 3

Teoretická časť sa najprv zaoberá stavbou AFM mikroskopu, princípom danej metódy, určovaním topografie povrchu a režimami v ktorých je možné merať. Sú v nej opísané nesporné výhody oproti predchádzajúcim tradičným metódam ale aj jej úskalia. Ďalej porovnávam výsledky meraní pomocou AFM a deklarované rozmery a venujem sa tiež určovaniu tvaru častíc.

Experimentálna časť je najprv zameraná na detailný popis prípravy vzoriek nanočastíc pre AFM meranie. Tento postup bol následne prakticky využitý k charakterizácii veľkosti štyroch typov komerčne dostupných nanočastíc Chromeonov (Sigma-Aldrich) pomocou mikroskopie atómovej sily. Laboratórne pripravené AG-nanočastice sa z technicko-metodických dôvodov nepodarilo vyhodnotiť. Namerané výsledky veľkosti nanočastíc boli spracované do histogramov, ktoré poskytli popis rozloženia nameraných hodnôt veľkosti nanočastíc.

Zistila som, že oproti veľkosti nanočastíc deklarovaných výrobcom, sú hodnoty získané meraním AFM vždy o desiatky percent, teda podstatne menšie.

Pokúsila som metódu AFM využiť na hodnotenie tvaru nanočastíc, ale keďže je táto metóda primárne určená na snímanie povrchu, určenie tvar častíc sa nepodarilo a zrejme na túto úlohu nie je vhodná.

Kľúčové slová: AFM, nanočastice, Gwyddion, PD Chromeon

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Student: Veronika Ščuryová

Supervisor: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Title of thesis: AFM in Pharmaceutical Technology 3

The theoretical part deals first with the construction of AFM microscope, the principle of the method, determining the surface topography and regimes which can be used. Described therein are distinct advantages over previous traditional methods but also its pitfalls. Next, I compare the results of measurements using AFM and declared size and devote also determine the shape of the particles.

Experimental part is focused first on the detailed description of sample preparation for AFM measurement of nanoparticles. This procedure was followed by practical use to characterize the magnitude of the four types of commercially available nanoparticles Chromeonov (Sigma-Aldrich) using atomic force microscopy. The laboratory prepared Ag-nanoparticles could not be evaluated due to of technical and methodological reasons.

The magnitude of the measured results nanoparticles were processed in histograms, which provide a description of the distribution of the measured values of the nanoparticle size.

I found that compared to the size of the nanoparticles declared by the manufacturer are values obtained by measuring the AFM are always by ca tens percent, e.g. substantially smaller.

I tried to use AFM method for evaluation of the shape of the nanoparticles, but when this method is primarily intended for scanning the surface of particle the evaluation of shape obviously failed, so this method is not appropriate for this purpose.

Keywords: AFM, nanoparticles, Gwyddion, PD Chromeon

1. Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. ZADANIE.....	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
3.1 AFM mikroskopia	10
3.1.1 Základný princíp	11
3.1.2 Skener.....	11
3.1.3 Ramienko a hrot	12
3.1.4 Kalibrácia	13
3.1.5 Sily v AFM.....	14
3.1.6 Režimy merania	16
3.1.7 Artefakty	20
3.2 Charakterizácia častíc.....	21
3.2.1 Veľkosť častíc	21
3.2.2 Tvar častíc	24
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1 Použité materiály.....	27
4.1.1 Suroviny	27
4.1.2 Prístroje a pomôcky.....	28
4.2 Pracovný postup	28
4.2.1 Príprava vzoriek	28
4.2.2 Meranie veľkosti nanočastíc pomocou AFM.....	29
4.2.3 Spracovanie snímok pomocou programu Gwyddion.....	29
5. VÝSLEDKY	32
5.1 Štandard 100 nm	32

5.2	Chromeon A	35
5.3	Chromeon B	38
5.4	Chromeon C	42
5.5	Chromeon D	46
5.6	Porovnanie veľkosti nanočastíc nameraných pomocou AFM s deklarovným rozmerom	49
6.	DISKUSIA	50
7.	ZÁVERY	52
8.	Zoznam tabuliek	53
9.	Zoznam obrázkov	54
10.	Použitá literatúra	56

1. ÚVOD

Nanotechnológia sa radí k jedným z najdynamickejšie sa rozvíjajúcim technológiám súčasnosti. Ako nanotechnológia sa obecné označuje vedný odbor výskumu a vývoja, ktorý sa zaoberá cieľovým vytváraním a využívaním štruktúr materiálov v meradle niekoľkých nanometrov aspoň v jednom rozmere (1 nm -100 nm). Jej cieľom je presné ovládanie jednotlivých atómov a molekúl tak, aby vznikol nejaký objekt alebo štruktúra s novými vlastnosťami (elektrickými, optickými, fyzikálnymi apod.).⁽¹⁾ Využitie nanotechnológií a nanomateriálov je rozsiahle, v súčasnosti majú uplatnenie v mnohých oblastiach bežného života ako je elektronika, stavebníctvo, strojárstvo, potravinárstvo, v oblasti zdravotníctva najmä umelé kĺby, chlopne a náhrady tkanív.⁽²⁾

Medzi výhody nanočastíc pre využitie v oblasti vývoja liečiv a následné využitie v terapii patrí schopnosť stabilizovať inak nestabilné liečivá či zvyšovať biologickú dostupnosť zle vstrebateľných liečiv. Zväčšením povrchových plôch aktívnej látky môžu zvyšovať rýchlosť disolúcie. U niektorých nanočastíc bola popísaná schopnosť zacieliť sa po vstrebaní sa sliznicou na konkrétne miesta v tele.⁽³⁾

Existuje ešte veľa nejasností o správaní sa a bezpečnosti nanočastíc. Práve táto skutočnosť podnietila vývoj nových zobrazovacích metód zobrazujúcich častice menšie ako 0,1 μm .

Veľkosť nanočastíc a ich povrchové vlastnosti môžu ovplyvňovať spôsob a rozsah prieniku liečiv cez biologické membrány i distribúciu liečiv v tkanivách a orgánoch. Adekvátna veľkostná a tvarová charakteristika nanočastíc je nutným predpokladom výskumu v tejto oblasti. Môže znamenať veľký prínos pre vývoj nových liekových foriem.

Predkladaná diplomová práca je na FaF UK jednou z prvých, ktorá sa zameriava na využitie AFM pri charakterizácii nanočastíc v biofarmácii a farmaceutickej technológii. Vzhľadom k tomu sa jedná predovšetkým o prácu metodickú, zameranú na možnosti a limity pri hodnotení veľkosti, prípadne tvaru nanočastíc.

2. ZADANIE

1. Štúdium výsledkov získaných na katedre.
2. Všeobecná formulácia cieľov práce.
3. Spracovanie prekladu daných všeobecných kapitol súvisiacich s prácou.
4. Vyhľadanie aktuálnych informácií v elektronických databázach a časopisoch.
5. Upresnenie cieľa práce.
6. Prevádzanie a hodnotenie prvého bloku meraní.
7. Realizácia ďalších experimentov s následným vyhodnotením výsledkov.
8. Príprava predbežnej podoby práce s formuláciou záverov.
9. Vyhotovenie a kontrola konečnej podoby práce.
10. Príprava k prezentácii práce pri obhajobe a stanoviskách k posudku oponenta.

Úlohy v teoretickej oblasti práce boli upresnené takto:

1. preštudovať poznatky získané v oblasti AFM v rámci predchádzajúcich diplomových prací
2. vyhľadať, preštudovať a stručne spracovať aktuálne informácie využívané vo farmácii na meranie nanočastíc a určovanie ich tvaru a veľkosti

Úlohy a ciele v pokusnej časti boli nasledujúce:

1. vypracovať detailný postup AFM merania
2. získané praktické poznatky aplikovať pri hodnotení rozdielnych typov komerčne dostupných i laboratórne získaných nanočastíc

Konkrétne boli stanovené nasledujúce dielčie úlohy:

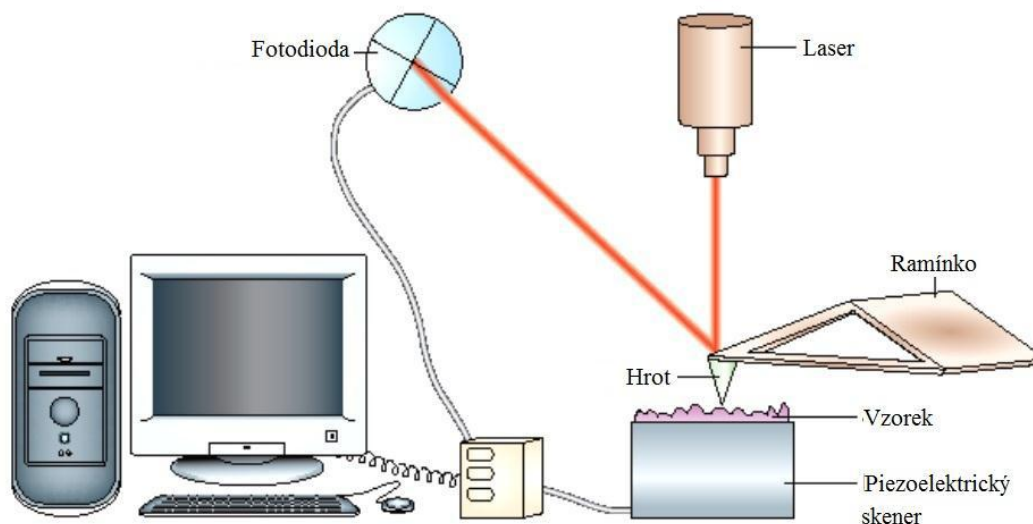
- 2.1 Premerať veľkosť vzoriek 5 rôznych typov nanočastíc
- 2.2 Charakterizovať nanočastice pomocou programu Gwyddion
- 2.3 Porovnať namerané veľkosti nanočastíc pomocou metódy AFM s deklarovými rozmermi výrobcu.
- 2.4 Posúdiť možnosti hodnotenia veľkosti nanočastíc pomocou AFM
- 2.5 Posúdiť vhodnosť AFM na popis veľkosti a tvaru nanočastíc

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 AFM mikroskopia

Prvý skenovací tunelový mikroskop bol zostrojený roku 1981 v Curychu švajčiarskymi vedcami Georgom Biningom a Heinrichom Rohrerom. Následne sa začali objavovať ďalšie odvodené metódy slúžiace na zobrazovanie trojrozmernej topografie povrchu. Medzi ne patrí aj mikroskopia atómovej sily – AFM objavená roku 1986. Tunelový efekt skenovacej tunelovej mikroskopie – STM umožňuje meranie len povrchov vodivých, nevodivé musia byť pokryté tenkou vodivou vrstvou, čo znižuje topografické rozlíšenie. AFM však umožňuje skúmať aj nevodivé vzorky.⁽⁴⁾

AFM mikroskop je tvorený sondou (ramienko s hrotom), skenerom (piezoelektrický článok), detektorom (laserová fotodióda) a optickým systémom umožňujúcim ľahkú orientáciu na povrchu vzorky (kamera). AFM musí byť napojený (*Obr. 1*) k počítaču kvôli riadeniu snímania, zaznamenávaniu a vizualizácii získaných dát.



Obr. 1: Schéma mikroskopu atomárnych síl⁽⁵⁾

3.1.1 Základný princíp

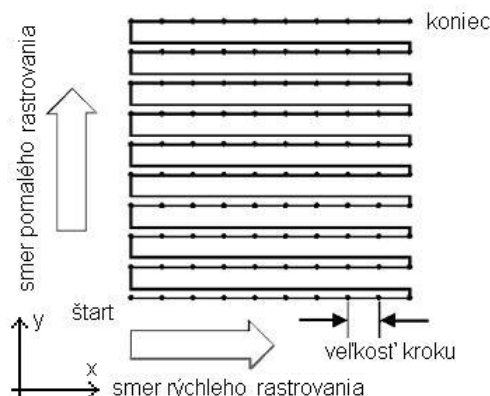
Mikroskopia atomárnych síl je založená na mapovaní atómových síl na povrchu vzorky. Táto metóda využíva sondu, ktorá rastruje povrch vzorky ostrým hrotom. Hrot je umiestnený na voľnom konci ramienka, ktoré je dlhé 100 μm až 200 μm .⁽⁶⁾

Vzájomné silové pôsobenie medzi hrotom a povrchom je prenášané na ramienko (cantilever), ktoré sa deformuje. Miera deformácie odpovedá veľkosti pôsobiacich síl. Interakcie bývajú založené na najrôznejších vlastnostiach vzorky (magnetických, elektrostatických, teplotných, elastických, topografických).⁽⁷⁾ Toto ohnutie je snímané citlivým snímačom (väčšinou laserovou diódou), ktorý zachycuje od ramienka odrazený laserový lúč, na základe toho počítač vyhodnotí trojrozmernú štruktúru vzorky.⁽⁶⁾ Zobrazovanie povrchu vzorky je možné na vzduchu, vo vákuu či v kvapaline.⁽⁸⁾

3.1.2 Skener

Pri skenovaní sa piezoelektrický skener pohybuje v smere osy x prípadne y (paralelne s povrchom vzorky). Tento pohyb je realizovaný po riadkoch v tzv. rýchlom smere (*fastscan*), keď sa skener dostane na koniec riadku dochádza ku kolmému posunu v pomalom smere (*slowscan*) a vracia sa (viz. **Obr.2**) bez merania na začiatok riadku.⁽⁹⁾

Skener môže byť ukotvený pod vzorkou (pevné ukotvenie hrotu) alebo môže byť spojený s hrotom a ramienkom (pevné ukotvenie vzorky).⁽¹⁰⁾ Skener následne kopíruje povrch vzorky a podľa jeho reliéfu (výšky nerovností) sa ohýba v smere osy z (kolmej na povrch vzorky).



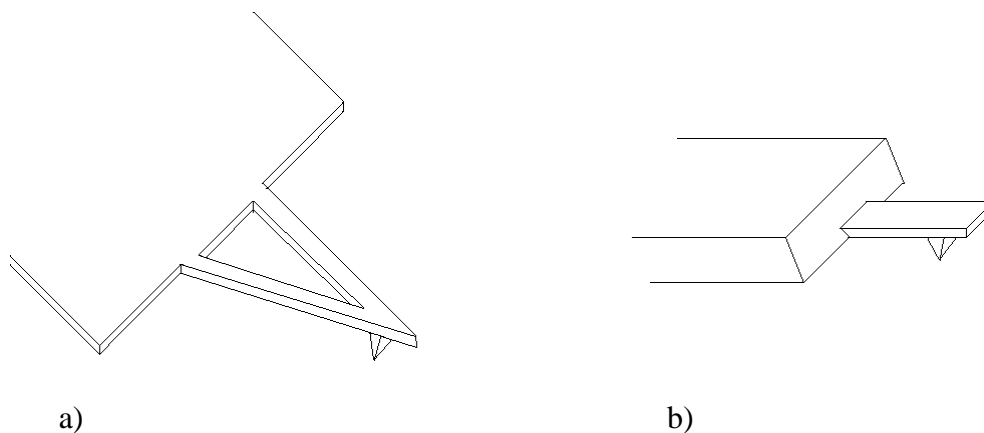
Obr. 2: Schéma rastrovania povrchu vzorky⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

3.1.3 Ramienko a hrot

Pri AFM hrot sníma sily pôsobiace medzi ním a vzorkou a ramienko sprostredkováva informácie o týchto silách. Vlastnosti ramienka (viz. Obr. 3) sú dané jeho použitím. Pre kontaktný mód musí mať ramienko vysokú rezonančnú frekvenciu, malú zotrvačnosť a malú tuhosť. Aby ramienko odolalo skrúteniu vplyvom bočných síl, konštruuje sa v tvare písmena V.

Jeho obvyklé rozmery sú 100 μm až 200 μm dĺžka, 10 μm až 40 μm šírka a hrúbka do 2 μm . Pre nekontaktný mód sa používajú ramienka obdĺžnikového tvaru s vysokou tuhosťou.⁽⁷⁾

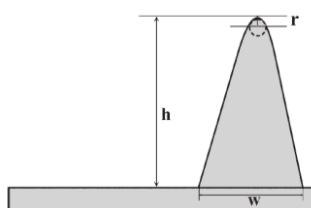
Ramienko je vyrábané z čistého kremíka, kremíka s rôznymi prímiesami prípadne z oxidu či nitridu kremíka (SiO_2 , Si_3N_4) ďalej ako wolframový zahnutý drôtik či strieborný pásik s diamantovým hrotom. Hrot a ramienko býva zvyčajne z rovnakého materiálu.⁽¹³⁾



Obr. 3: Tvary ramienka a) tvar písmena V a b) tvar plochého kvádra⁽²⁰⁾

Medzi najdôležitejšie parametre hrotu (**Obr. 4**) patrí polomer hrotu pri jeho vrchole, ktorý ovplyvňuje maximálne rozlíšenie, jeho dĺžka a štihlosť, ktorá ovplyvňuje schopnosť zobrazovať ostré hrany a hlboké zárezy. Tvar hrotu býva väčšinou pyramidálny alebo kužeľový.⁽¹³⁾

Špeciálnym typom hrotov sú nanotrubičky (z uhlíka, WS_2 , kobaltu). Nie sú to skutočné hroty, len sa nasádzajú na klasické hroty. Ich výhodou je štihlosť (zmenšujú polomer krivosti hrotu, umožňujú presnejšie zobrazovanie), malá adhézia k vzorke (hladší obraz) a pružnosť pri zaťažení (znižujú frekvenciu lámania hrotu). Nanotrubičky je možné naplniť chemicky či biologicky aktívnou látkou.⁽¹⁴⁾



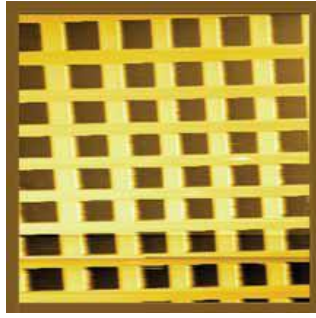
Obr. 4: Parametre hrotu - polomer hrotu pri vrchole (r), dĺžka hrotu (h), šírka (w)⁽¹⁵⁾

Pretože je pri AFM meraní hrot udržiavaný veľmi blízko zobrazovanému povrchu (vzdialenosť v nm), je náchylný k náhodným zmenám relatívnej vzdialenosti. Tieto zmeny môžu ovplyvniť meranie, prípadne poškodiť vzorku či hrot. Mikroskop je preto nutné vibračne izolovať. Umiestniť ho vo vhodnom prostredí (prízemie), na vhodnú podložku (ťažké mramorové stoly, stoly s pneumatickým tlmením). Myslieť treba aj na vibrácie prenášané vzduchom, pri meraní je preto nutné priklopiť merací systém špeciálnym nasadzovacím ťažkým kovovým krytom. V poslednej dobe existujú už aj tzv. aktívne antivibrácie, čo sú podložné plochy založené na aktívnej eliminácii vibrácií pomocou systému tlmičov spojených so spätnoväzbovou slučkou. Negatívne pôsobí aj tepelný drift (jednotlivé časti prístroja majú rozdielnu tepelnú rozťažnosť).⁽¹³⁾

3.1.4 Kalibrácia

Na kalibráciu hrotu využívame referenčné vzorky. Ide o vzorky s výraznou pravidelnou štruktúrou, ktorá je zmeraná pomocou iných metód, najčastejšie elektrónovou rastrovacou mikroskopiou. Tieto referenčné vzorky sú dodávané spolu s AFM mikroskopom. Zobrazením takejto vzorky napr. kovovej mriežky (**Obr. 5**) získame informáciu o kvalite hrotu, jeho tvare a rozlíšenie ktoré môže poskytnúť.

Využíva sa taktiež pri určovaní opotrebenia hrotu. Opotrebený a poškodený hrot neposkytuje kvalitné snímky.⁽⁷⁾



Obr. 5: Štandardná mriežka na stanovenie kvality hrotu⁽⁷⁾

3.1.5 Sily v AFM

Sily pôsobiace medzi hrotom a vzorkou spôsobujú deformáciu ramienka. Veľkosť týchto síl môžeme určiť pomocou Hookovho zákona:

$$F = kc \cdot \Delta z, \quad (1)$$

kde,

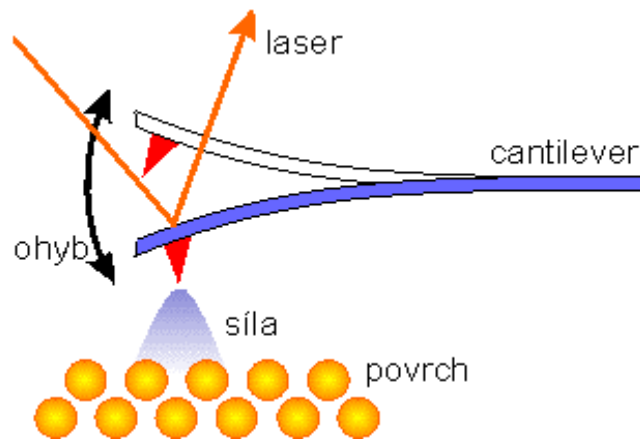
kc konštanta pružnosti ramienka,

Δz výchylka ramienka s hrotom v smere osy z .⁽¹⁶⁾

Sily ohýbajúce ramienko môžu byť rôzne (**Obr. 6**), predovšetkým sa však uplatňuje Van der Waalsova príťažlivá sila dlhého dosahu, pôsobiaca medzi dvoma atómami (dipól – dipólová interakcia) a krátkodosahová odpudivá sila elektrostatického pôvodu plynúca z Pauliho princípu, ktorý sa prejavuje pri prekrytí elektrónových orbitálov atómov alebo molekúl povrchu hrotu a vzorky.

Zatiaľ čo veľkosť príťažlivých síl je 10^{-8} N až 10^{-7} N, veľkosť síl odpudivých je rádovo nižšia 10^{-9} N až 10^{-8} N.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

Medzi ďalšie sily podieľajúce sa na interakcii hrot - vzorka sú kapilárne sily, pretože medzi špičkou hrotu a vzorkou môže dochádzať ku kondenzácii kvapaliny a taktiež samotná pružná sila ramienka daná jeho tuhosťou a mierou ohnutia.⁽¹⁹⁾⁽⁸⁾



Obr. 6: Interakcia hrotu s povrchom vzorky⁽²⁰⁾

Presný kvantovo mechanický výpočet týchto síl medzi hrotom a povrchom je pomerne zložitý. Vplyv oboch síl je možné modelovať napríklad empirickým Lennard - Jonesovým potenciálom. Pri vzájomnej interakcii hrot vzorka pre potenciál platí:

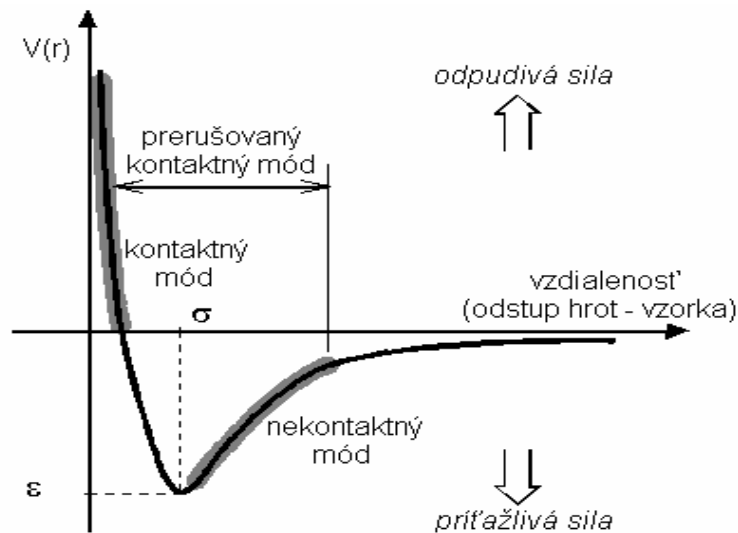
$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (2)$$

kde,

r vzdialenosť hrotu od vzorky,

σ a ε špecifické Lennard - Jonesove parametre.

Člen $(1/r)^{12}$ popisuje oblasť odpudivej sily, člen $(1/r)^6$ oblasť príťažlivej sily. Priebeh Lennard - Jonesovho potenciálu môžeme vidieť na **Obr.7** . Zo znižovaním vzdialenosti hrotu od vzorky prechádza krivka z oblasti príťažlivých síl do oblasti odpudivých síl.⁽²¹⁾



Obr. 7: Priebeh Lennard - Jonesovho potenciálu v závislosti od vzdialenosti hrot-vzorka⁽²¹⁾

3.1.6 Režimy merania

AFM umožňuje merať v niekoľkých režimoch (módoch) líšiacich sa vzdialenosťou hrotu od vzorky.

Kontaktný režim (*contact mode*)

Je to režim, pri ktorom hrot jemne kopíruje povrch vzorky (**Obr.8**). Vzdialenosť je tak malá, že na hrot pôsobia odpudivé sily a sily kapilárne, ktoré sa uplatňujú pri prítomnosti vody v okolí vzorky. Tieto sily spôsobujú ohnutie ramienka a hrotu. Ohnutie je priamo úmerné zmene povrchu vzorky.

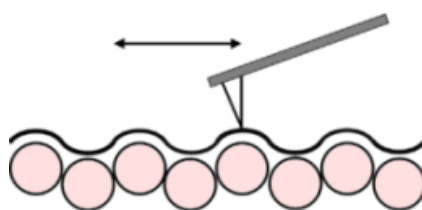
Výhodou kontaktného režimu je vyššia skenovací rýchlosť. Nevýhodou však je invazívnosť. Fyzický kontakt hrotu so vzorkou môže spôsobiť poškodenie mäkkých biologických vzoriek citlivých voči deformácii rovnako ako dochádza u hrotu k jeho postupnému otupovaniu až nevratnému poškodeniu. Častým problémom je zachytenie časti vzorky na hrote, čo spôsobuje skreslenie výsledkov.

V rámci kontaktného režimu môžeme merať vzorku 2 rôznymi spôsobmi:

1. **s konštantnou výškou**, pri ktorej je dodržiavaná určená hodnota výšky z_0 (poloha základne ramienka). Hrot sníma povrch vzorky a vplyvom topografických zmien povrchu dochádza k ohybu ramienka.
2. **s konštantnou silou**, kedy sa udržiava konštantné ohnutie ramienka. Tento režim je rozšírený o spätnú väzbu, ktorá kontroluje a upravuje z -zložku skeneru.

Vplyvom spätnej väzby je rýchlosť skenovania menšia. Na rozdiel od režimu s kontaktnou výškou však nemôže dôjsť k nekontrolovateľnému deštruktívnemu ohybu nosníka.⁽¹³⁾

3. Veľmi zriedka sa využíva aj **kombinovaný režim**, ktorý používa spätú väzbu len k dorovnaníu výšok s nízkou frekvenciou (sklon povrchu vzorky) a zvyšné informácie získava z ohybu ramienka. Výhodou je rýchlejší odber dát než z konštantnou silou ale väčší rozsah ako u konštantnej výšky.



Obr. 8 Kontaktný režim AFM⁽²²⁾

Bezkontaktný režim (*non-contact mode*)

Možnosť poškodenia vzorky pri kontaktnom režime viedla k vývoji režimu bezkontaktnému. Pri tomto režime nedochádza k priamemu kontaktu hrotu so vzorkou, ramienko len osciluje blízko nad skúmaným povrchom (**Obr. 9**). Vzdialenosť oscilujúceho hrotu od vzorky sa pohybuje v jednotkách až desiatkach nanometrov. Využíva príťažlivých Van der Waalsových síl dlhšieho dosahu. Celková sila je veľmi malá, ide rádovo o 10^{-12} N. Takéto sily vyhovujú drsnejším, prípadne mäkkším a elastickým vzorkám.⁽¹³⁾

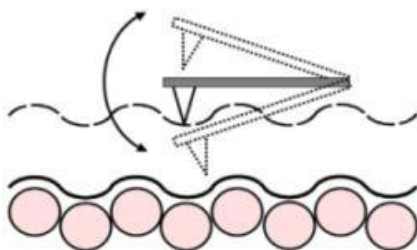
Tento režim sa používa len pre meranie v suchom stave, pretože v kvapalinách sa často vyskytujú aj iné odpudivé sily, ktoré maskujú sily Van der Waalsove.⁽²³⁾ Vhodnejšie je používať tuhšie nosníky ako pri kontaktnom režime, príliš mäkké nosníky môžu byť vtiahnuté do kontaktu so vzorkou. K detekcii slúžia zmeny rezonančnej frekvencie alebo amplitúdy kmitov ramienka v závislosti na vzdialenosti oscilujúceho hrotu a vzorky.

Vzťah medzi rezonančnou frekvenciou ramienka ω a rôznorodosťou povrchu vzorky udáva rovnica :

$$\omega = \frac{\sqrt{k_{eff}}}{m}, \quad (3)$$

Efektívna konštanta tuhosti k_{eff} sa mení v závislosti na tom ako sa ramienko o hmotnosti m približuje k povrchu vzorky. Medziatómové sily menia jej vlastnosti.

Keď sa oscilujúce ramienko priblíži blízko k povrchu vzorky do oblasti gradientu síl, mení a jeho rezonančná frekvencia a amplitúda kmitov klesá. Ramienko kmitá s rezonančnou frekvenciou ktorá sa pohybuje v rozmedzí 100 kHz až 400 kHz a s amplitúdou niekoľkých nanometrov. Pri bezkontaktnom režime sa interakcie zúčastňuje veľké množstvo atómov, preto rozlíšenie nie je tak veľké ako pri režime kontaktnom.

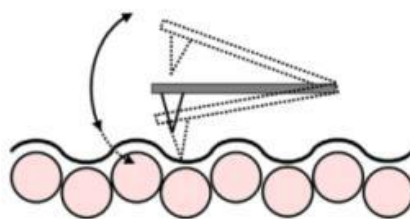


Obr. 9: Bezkontaktný režim AFM⁽²²⁾

Pokleповý režim (*intermittent contact mode, tapping mode*)

Kombináciou predchádzajúcich režimov vzniká pokleповý režim (**Obr. 10**). Rovnako ako bezkontaktný režim aj tu ramienko osciluje nad povrchom vzorky, oscilácie sú však tak veľké, že dochádza k pravidelnému dotyku so vzorkou ako pri režime kontaktnom.⁽²³⁾

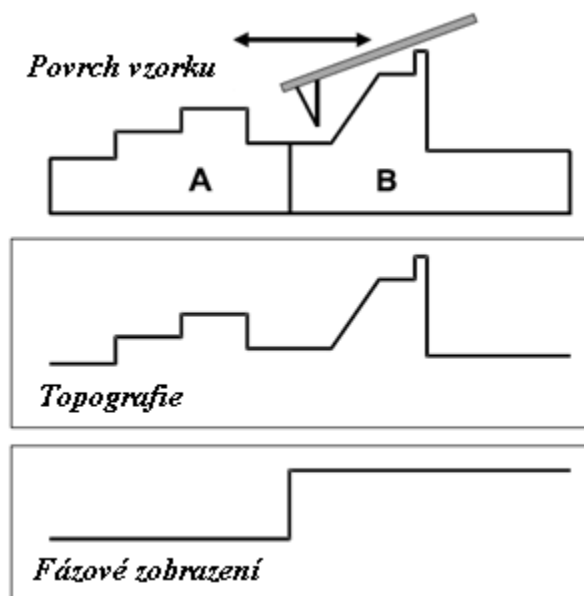
Pokiaľ je systém nastavený tak, aby k laterálnemu posunu hrotu dochádzalo len v dobe, kedy je vzdialený od vzorky, získajú sa tým výhody plynúce z oboch metód. Nepoškodzujú vzorku a keďže sa hrot dotkne povrchu hneď niekoľkokrát než sa posunie, dosiahne sa väčšieho rozlíšenia.⁽¹³⁾ Výhodou je meranie v suchom ale aj kvapalnom prostredí.



Obr. 10: Poklepový režim AFM⁽²²⁾

Poklepový režim poskytuje v rámci jedného merania nie len informácie o topografii získané pohybom ramienka hore a dolu ale aj možnosť fázového spracovania obrazu. Je to pomerne nový spôsob spracovania obrazu, využívajúci toho že interakcia hrot - vzorka nezávisí len na topografii ale aj na iných vlastnostiach (tvrdosť, pružnosť, adhézia či trenie), ktoré ovplyvňujú pohyb ramienka. ⁽¹³⁾

Rôzne vlastnosti materiálov vedú k spomaleniu oscilácie ramienka, čo sa prejaví na výslednom obraze tvorenom fázovými posunmi. Zatiaľ čo topografia poskytuje informácie o trojrozmernom profile vzorky, fázové zobrazenie umožňuje rozlíšiť oblasti s odlišnou vlastnosťou materiálu (napr. tuhosť). Rozdiel v zobrazovaní je vidieť na obr.11. ⁽²²⁾



Obr. 11: Topografické a fázové zobrazenia vzorky⁽²²⁾

3.1.7 Artefakty

Neskutočné obrazy na snímkach nameraných pomocou AFM nazývame artefakty. Skresľujú informácie o vzorke a sťažujú tak interpretáciu výsledkov. Niektoré artefakty sa dajú odstrániť prednastavením ideálnych parametrov, prípadne pri neskoršom spracovaní, kedy je snímok možno upraviť pomocou dostupných programov (Gwyddion, SPMlab).⁽²⁴⁾

Artefakty ovplyvnené hrotom

Priestorová konvolúcia hrotu – nameraná šírka častice je väčšia ako šírka reálna, výška častíc konvolúciou ovplyvnená nie je. Šírka častíc totižto býva ovplyvňovaná tvarom hrotu. Ten je väčšinou pyramidálneho tvaru a špička hrotu tak pri bočnom kontakte nekopíruje priamo časticu.

Zrkadlenie hrotu – ak vzorka obsahuje ostrejšie výbežky ako je šírka hrotu – dochádza vtedy k výmene snímania a namiesto aby hrot snímal vzorku, sníma vzorka hrot. Na snímke sa zobrazí povrch hrotu a nie vzorky.

Zdvojenie obrazu – je spôsobené nekvalitným koncom hrotu. Na snímke môžeme vidieť tzv. spárované častice, kedy obraz virtuálnej častice je omnoho menší ale jej orientácia je rovnaká ako u reálnej častice.⁽²⁵⁾

Artefakty spôsobené vzorkou

Rigidita vzorky – v prípade, že nie je vzorka dostatočne pevná môže dôjsť k odtrhnutiu časti vzorky a jej vozením po povrchu. Na snímke sa tak objaví rozmazaná čiara. Nedostatočná pevnosť býva problém najmä u práškových vzoriek, tie musia byť vhodným spôsobom ukotvené na podklad.⁽⁹⁾

Nečistoty vzorky – ak sa vzorka kontaminuje (prach, kvapalina, odtlačky prstov), dochádza ku skresleniu obrazu, na ktorom sa objavia neskutočné objekty.⁽⁸⁾

Príliš lesklé vzorky – môžu odrážať svetlo do detektoru a ten následne chybné interpretuje odraz od vzorky ako signál z ramienka a na snímke vznikajú pruhy.⁽⁹⁾

Softwarové artefakty

K artefaktom pri spracovaní obrazu dochádza vplyvom nesprávneho použitia algoritmov. Správnymi zásahmi do obrazu naopak môžeme mnohé artefakty eliminovať a neznehodnotiť pri tom namerané dáta. Programy na spracovanie dát tiež zlepšujú interpretáciu objektov.

Zvýraznením či vymazaním určitých častí spektra môže dôjsť k získaniu atomárnych štruktúr aj z náhodného šumu. Ak sú výškové rozdiely vzorky príliš veľké, farebná škála nemusí byť dostačujúca a dochádza k potlačeniu či skresleniu detailov.⁽⁸⁾

Artefakty spôsobené elektronikou

Artefakty majúce pôvod v elektronike sa obvykle prejavujú ako oscilácie, elektronický šum alebo nevysvetliteľným opakovaním imaginárnych objektov. Patrí sem aj tepelný drift piezokeramického skeneru. Drift je nechcené uchádzanie hrotu oproti vzorke. Z toho dôvodu sa línie vzorky, ktoré by mali byť rovné zdajú zakrivené. Javí sa ako deformácia počítačnej časti obrazu.⁽⁹⁾ Jedným z možných riešení zamedzení vzniku tepelného driftu je pri skenovaní veľmi malých plôch voliť vyššiu rýchlosť skenovania než je potrebná.⁽⁸⁾

3.2 Charakterizácia častíc

Termín nanočastice sa obecné používa pre častice, ktorých všetky 3 rozmery sú menšie ako 100 nm. Medzi najrozšírenejšie typy nanočastíc patria nanočastice kovu (napr. zlata, striebra), oxidov (kremičitého, titaničitého), selenidov (kadmenného) a polymérne nanočastice (kopolyméry, dendriméry). Nanočastice môžu byť pripravené dvoma spôsobmi. Metódou *zhora nadol* (miniaturizáciou konvenčných štruktúr) či *zdola nahor* (nukleáciou a rastom tuhej fáze, riadenou polymerizáciou). Vlastnosti pripravených nanočastíc zásadne ovplyvňuje ich veľkosť a tvar.

3.2.1 Veľkosť častíc

Mierou veľkosti častíc je ich dĺžka. Tento rozmer však jednoznačne definuje len kruhové častice, kde ich veľkosť odpovedá priemeru, resp. polomeru. Všetky ostatné tvary musia byť popísané aj inými faktormi. Využívajú sa najčastejšie aproximácia na ekvivalentnú guľu (guľu s rovnakým objemom, povrchom, či rýchlosťou sedimentácie ako reálna častica).⁽²⁶⁾

Najčastejšie používané metódy charakterizácie veľkosti častíc:

Sitová analýza

Je jedna z najstarších techník určovania veľkosti častíc. Jedná sa o súbor sít s rozličnou veľkosťou štvorcových otvorov. Analyzovaná vzorka je umiestnená na najvrchnejšie sito s najväčším priemerom otvorov a je podrobená štandardnej dobe trepania. Veľkostný parameter je dĺžka hrany najmenšieho otvoru, ktorým vzorka prejde. Touto metódou môžeme charakterizovať častice o veľkosti 5 μm až 125 μm .

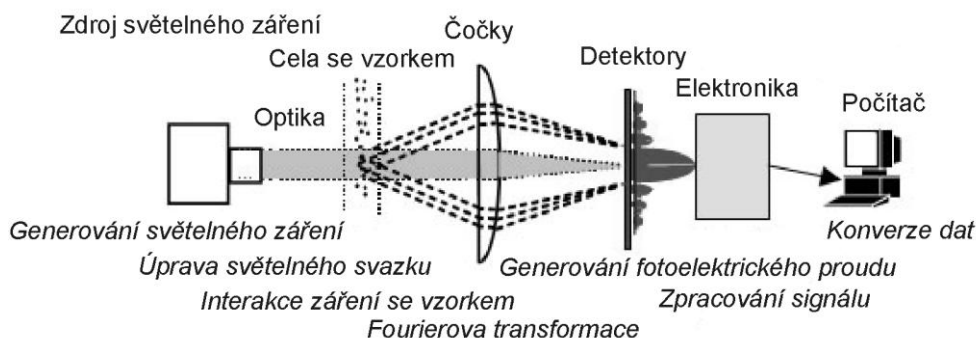
Sedimentačná analýza

Princíp sedimentačnej metódy je založený na určovaní veľkosti častíc zo sedimentačnej rýchlosti častice v gravitačnom poli. Najčastejším prostredím je voda, prípadne alkohol, oleje či vzduch. Najrýchlejšie sa usadia najväčšie častice. Na dne sedimentačnej nádoby zachytávajúcej padajúce častice sa nachádza navažovacie zariadenie, ktoré zaznamenáva zmenu hmotnosti v závislosti na čase. Získame priemer ekvivalentnej gule, ktorá v danom prostredí padá tou istou rýchlosťou. Je určená pre analýzu častíc v rozmedzí 1 – 100 μm .⁽²⁶⁾ Pri časticiach menších ako 1 μm pomalá sedimentácia neumožňuje aplikáciu tejto metódy.

Laserová difrakcia

Laserová difrakcia je jednou z najčastejšie používaných metód pre analýzu veľkosti častíc. Princíp spočíva v kontinuálnom prietoku častíc celou, pričom sú prežarované laserovým lúčom. Dochádza k ohybu (difrakcii) svetla od častíc vzorky. Uhol tohto ohybu je nepriamo úmerný ich veľkosti. To znamená, že veľké častice rozptýlia svetlo v malom uhle s vysokou intenzitou a malé rozptýlia svetlo v širšom uhle s nízkou intenzitou.

MIE teória zaoberajúca sa rozptylom elektromagnetického žiarenia časticami predpovedá dráhu ohybu svetla len pre kruhové častice. Z difrakčného obrazca snímaného detektorom sa preto vypočíta veľkosť teoretickej gule (o rovnakom objeme ako analyzovaná častica) a nie absolútna veľkosť častice. Rozsah merania je od 0,1 μm až 2000 μm .

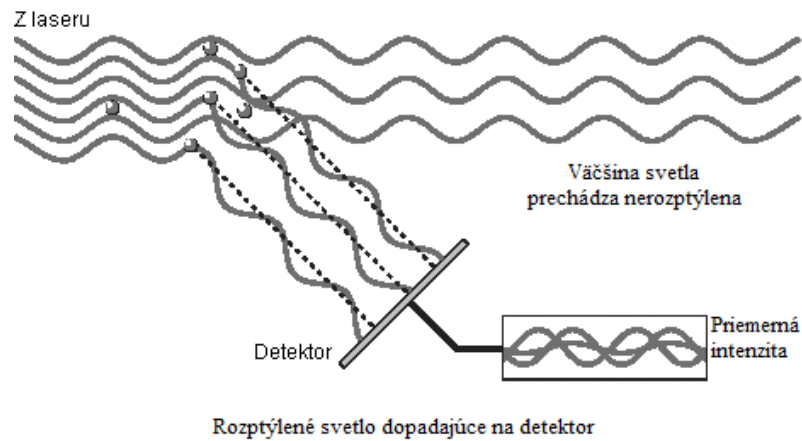


Obr. 12: Schéma laserového difraktoru⁽²⁷⁾

Dynamický rozptyl svetla (DLS)

Rovnako ako u laserovej difrakcie ide o optickú metódu s využitím lasera ako zdroja žiarenia. Je to metóda slúžiaca k stanovovaniu veľkosti častíc v nesedimentujúcich koloidných disperziách. Častice, ktoré sa pohybujú vplyvom Brownovho pohybu sú zdrojom rozptýleného svetla. Základom je meranie fluktuácie intenzity rozptýleného svetla okolo jej priemernej hodnoty.

Určuje sa relaxačný čas, čo je doba návratu fluktuácie k priemernej hodnote intenzity rozptýleného svetla. Menšie častice sa pohybujú rýchlejšie a tým fluktuácie vyvolané ich pohybom zaniknú rýchlejšie. Z relaxačného času sa získava hodnota difúzneho koeficientu. Ten závisí na teplote kvapaliny, jej viskozite a veľkosti suspendovaných častíc. Ak poznáme teplotu a viskozitu môžeme vypočítať hydrodynamický polomer (príp. priemer) častíc, ktorý odpovedá polomeru (priemeru) gule, ktorá by mala za rovnakých podmienok rovnaký difúzna potenciál. ktorý zahŕňa aj solvatačný obal. Metoda umožňuje merať častice o veľkosti $0,005 \mu\text{m} - 3 \mu\text{m}$.⁽²⁸⁾



Obr. 13: Princíp metódy DLS (rozptyl svetla)⁽²⁹⁾

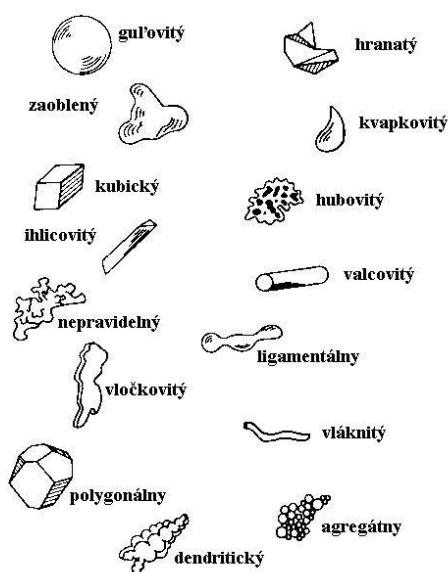
Mikroskopické metódy a obrazová analýza

Pre meranie veľkosti častíc sa využíva svetelná mikroskopia a mikroskopia elektrónová či už rastrovacía alebo transmisná. Obrazová analýza umožňuje spracovať zložité vizuálne informácie zo snímok do ľahko interpretovateľných výsledkov buď formou grafov (napr. distribúcia veľkosti častíc), prípadne formou vybraných hodnôt (napr. stredné hodnoty, štatistické priemery).⁽²⁶⁾

Je základnou technikou získania veľkosti a tvaru častíc pomocou obrazovej mikroskopie. Informácie môžu byť získavané manuálne (označením každého objektu) alebo automaticky. Automatická obrazová analýza ale vyžaduje omnoho lepšiu kvalitu obrazu, najmä kontrast.

3.2.2 Tvar častíc

Popis tvaru častíc sa rozdeľuje na kvantitatívny a kvalitatívny. Kvalitatívny popis (**Obr. 14**) je slovný. Kvantitatívny je číselný, vyhodnocovaný pomocou faktorov či koeficientov.



Obr. 14: Možné tvary častíc a ich kvalitatívny popis⁽³⁰⁾

Medzi najčastejšie používané kvantitatívne charakteristiky častíc patrí:

Stredná dĺžka úsekov⁽²⁶⁾

Je charakterizovaná ako priemer dĺžok všetkých (v praxi mnohých) rovnobežných úsečiek vo vnútri častice meraných v jednom smere spriemerované cez ostatné smery. Pri 2D štruktúrach je daná pomerom medzi plochou A a obvodom P podľa vzťahu:

$$\langle D_p \rangle = \pi \frac{A}{P} \quad (4)$$

Pri 3D štruktúrach pomerom medzi objemom a povrchom zo vzťahu:

$$\langle D_p \rangle = 4 \frac{V}{S} \quad (5)$$

Ekvivalentný priemer⁽²⁶⁾

Je priemer ekvivalentného kruhu (D_p) s plochou rovnakou ako má určovaná častica (A_p).

$$D_p = \sqrt{\frac{4A_p}{\pi}} \quad (6)$$

Elongácia častice⁽²⁶⁾

Kolmá vzdialenosť medzi dvoma rovnobežnými styčnými plochami dotýkajúcimi sa povrchu častice je Ferretov priemer. Tento rozmer je však závislý na orientácii častice, preto jedno meranie nemá vypovedajúcu hodnotu.

Môže sa určovať pre jednu jednotlivú časticu vo všetkých smeroch či pre odpovedajúci počet častíc s náhodnou orientáciou (ak majú rovnakú veľkosť a tvar). Ďalšou možnosťou je merať 2 na seba kolmé rozmery prechádzajúce stredom častice tak, aby obdĺžniková plocha uzavierajúca časticu bola minimálna. Určí sa maximálny Ferretov priemer a rozmer k nemu kolmý – minimálny Ferretov priemer. Ich vzájomný pomer sa nazýva "aspect ratio" **R** a určuje Heywoodov elongačný pomer častíc.

$$R = \frac{MaxFerret}{MinFerret} \quad (7)$$

Jeho hodnota je od 1 do ∞ , v prípade obráteného pomeru od 0 do 1. Podľa hodnoty tohto pomeru norma udáva niekoľko základných tvarov:

1 – 1,2 guľovitý tvar; 1,2 – 2 oválny tvar; 2 – 5 hranatý tvar; 5 – 25 tyčovitý tvar; nad 25 ihlicovitý tvar⁽³⁰⁾

Cirkularita (guľatnosť, oblosť)⁽²⁶⁾

Je daná pomerom druhej mocniny obvodu k ekvivalentnej ploche krát 4π :

$$cirkularita = \frac{P^2}{4\pi \cdot A_p} \quad (8)$$

Udáva mieru zhody skutočného dvojrozmerného tvaru častice s kruhom (hodnota rovná 1).

Fourierova analýza je metódou kvantitatívnej charakterizácie morfológie častíc, ktorá využíva fotografie častíc a popisuje ich tvar. Ide o proces, kedy na začiatku je stanovený približný všeobecný tvar častice a ten sa postupne upresňuje.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité materiály

4.1.1 Suroviny

Názov suroviny	Výrobca (resp. dodávateľ)
Nanosphere size standards 100nm (Lot. No.: 33115)	Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA
Nanobeads based on PD, Chromeon 470-marked – Chromeon A (Lot.No.: BCBC1020V)	Sigma - Aldrich, Nemecko
Nanobeads based on PD, Chromeon 470-marked, carboxylated – Chromeon B (Lot.No.: BCBG5788V)	Sigma - Aldrich, Nemecko
Nanobeads based on polyacrylonitrile, Chromeon 470-marked, carboxylated – Chromeon C (Lot.No.: BCBH9604V)	Sigma - Aldrich, Nemecko
Nanobeads based on PD, Chromeon 470-marked – Chromeon D (Lot.No.: 438516/1)	Sigma - Aldrich, Nemecko
Ag - nanočastice	FaF UK v Hradci Králové, Česko
Poly-L-Lysine solution	Sigma - Aldrich, Nemecko

Nanočastice PD–Chromeon

V experimentálnej časti boli použité na stanovenie veľkosti a tvaru nanočastice získané od firmy Sigma - Aldrich. Sú to fluorescenčne značené nanočastice z polyakrylnitrilu či PD. PD je nový polymér, ktorého vlastnosti sú podobné ako u polystyrénu. Má však nižšiu priepustnosť pre kyslík a tým dosahuje vyššiu

fotostabilitu pre farbivá. Ide o vodné suspenzie s pridaným pufrom (pH 7) v koncentrácii častíc 0,5 % (w/w).

4.1.2 Prístroje a pomôcky

Mikroskop atomárnych síl - AFM, typ EasyScan 2, výrobca NanoSurfAG, Švajčiarsko
Software Gwyddion na úpravu získaných snímok

Mikropipeta 20 µl, Brand Transferpette S

Sľuda (teoretický vzorec $\text{KMg}_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$) Grade V-4, 15 x 15 mm od firmy SPI Supplies (West Chester, V. Británie)

Obojstranná lepiaca páska

Petriho misky

4.2 Pracovný postup

4.2.1 Príprava vzoriek

Príprava merania vzorky Ag-nanočastíc

Na dosiahnutie atomárne hladkého a čistého povrchu nám poslúžili čerstvo odlúpnuté plátky sľudy. Proces odlúpnutia má veľký vplyv na kvalitu merania. Možný vznik praskliniek či nerovností spôsobuje zoraďovanie častíc v okolí a skreslenie merania.

Ag-nanočastice ako jediná vzorka neboli vo forme disperzie. Bolo preto potrebné použiť ich chemickú fixáciu, v našom prípade sme použili Poly-L-Lysin. Čerstvo odlúpnuté plátky sľudy sme obojstrannou lepiacou páskou pripevnili k podložnému sklíčku. Na sľudu sme následne pipetou naniesli roztok Poly-L-Lysinu. Po 5 minútach sme naniesli Ag-nanočastice v práškovej forme. Nechali schnúť 24 hodín pri izbovej teplote. Všetky vzorky boli prikryté Petriho miskami aby sa zabránilo nasadeniu prachových častíc a iných znečistením, ktoré by mohli skresľovať meranie.

Príprava ostatných vzoriek

Na čerstvo odlúpnuté plátky sľudy sme pipetou priamo naniesli 20 µl disperzie nanočastíc. Nechali schnúť 24 hodín pri izbovej teplote.

4.2.2 Meranie veľkosti nanočastíc pomocou AFM

Všetky merania boli robené mikroskopom NanosurfEasyScan 2 v pokleповom režime s Si hrotmi typu Tap 190 DLC s rezonančnou frekvenciou $190 \text{ kHz} \pm 60 \text{ kHz}$. Vzorku pripravenú podľa postupu v stati 5.2.1 som umiestnila na antivibračný stolík *IsoStage* a opatrne priklopila skenovaciu hlavu. Zadnými skrutkami som nastavila výšku hlavice.

Zapla som software NanosurfEasyScan 2 a nastavila parametre merania a typ cantilevru. Pre naše merania som používala nasledovné nastavenia: prostredie- vzduch, rýchlosť skenovania 0,7s; skenovací rozsah $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$; a sledovaný parameter - fázové rozdiely.

Bočnými mikrometrickými skrutkami som posúvala podložným panelom so vzorkou kým som na kamere nenašla merané miesto. Najprv som priblížila cantilever k vzorke, buď ručne pomocou *approach* alebo automaticky pomocou *advance*. Skenovanie sa po priblížení začne automaticky.

Následne som nastavila sklon cantilevru podľa sklonu krivky. Klikla som na pole s grafickým znázornením topografie a pomocou *meassure angle* som odčítala uhol sklonu najprv pre osu x (0°) a následne pre osu y (90°). Po vyrovnaní roviny sa snímka začne skenovať nanovo. Jeden sken trvá približne 6 minút.

Skenovanie sa dá ukončiť pomocou *finish* kedy sa dokončí sken vzorky alebo ihneď pomocou *stop*.

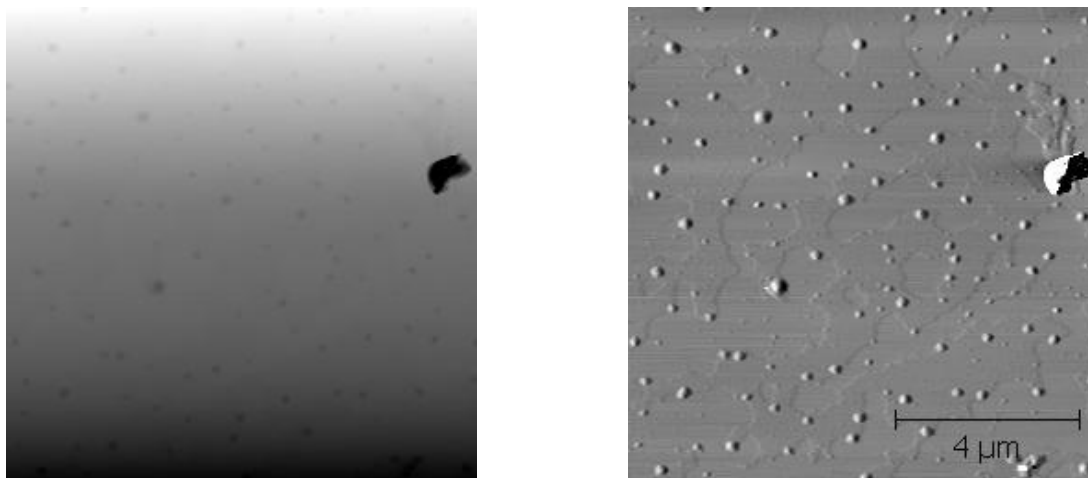
4.2.3 Spracovanie snímok pomocou programu Gwyddion

Na vyhodnotenie snímok a popisovanie častíc som použila program Gwyddion. Jedná sa o voľne dostupný software vyvinutý dvoma českými objaviteľmi z Českého metrologického inštitútu.

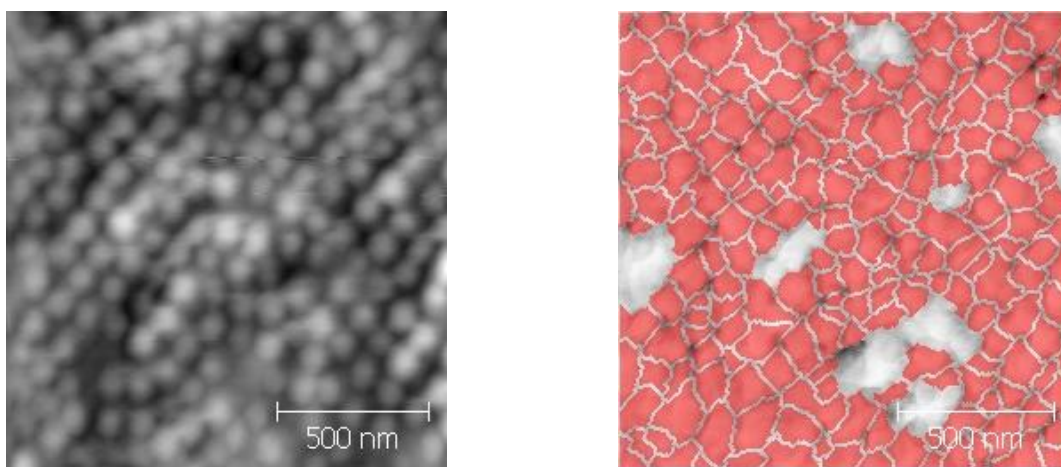
Najprv som si otvorila snímok z AFM a odstránila nerovnosť povrchu odčítaním strednej roviny, následne odčítala polynomiálne pozadie a posunula najmenšiu hodnotu na nulu

Jemné korekcie snímku som previedla pomocou ikon *mediánové zrovnanie riadkov* a *opravou horizontálnych šrámov*. Ďalšie korekcie sú v menu a ikonách pomenovaných ako *spracovanie dát – korekcia dát*. Tu sa nachádza širšia

škála od mediánového, modusového či segmentového zrovnania riadkov. K takto upravenej snímke (*Obr. 15*) som pridala meradlo a uložila v elektronickom **jpg** formáte.



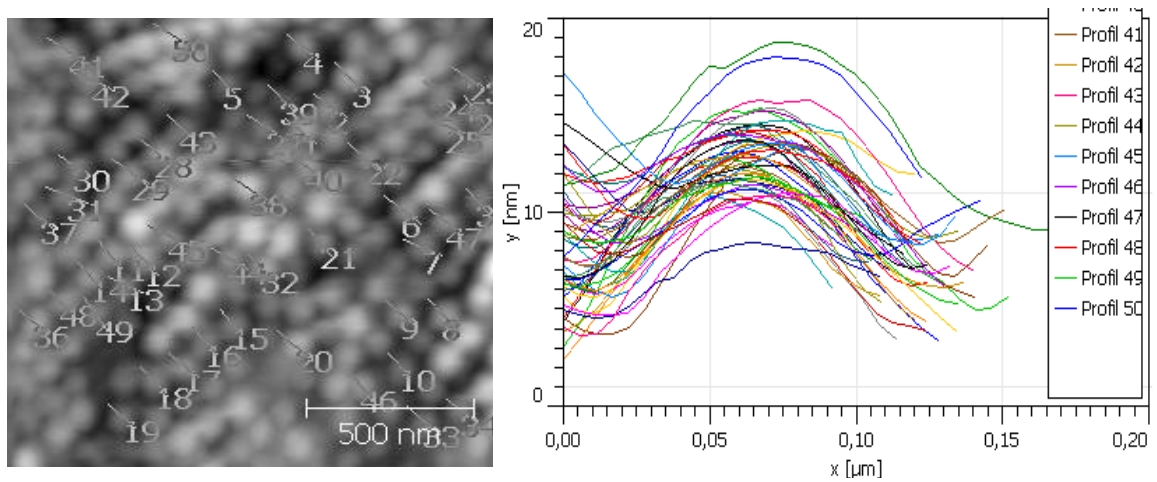
Obr. 15: Úprava snímok



Obr. 16: Označenie masky (100 nm štandard)

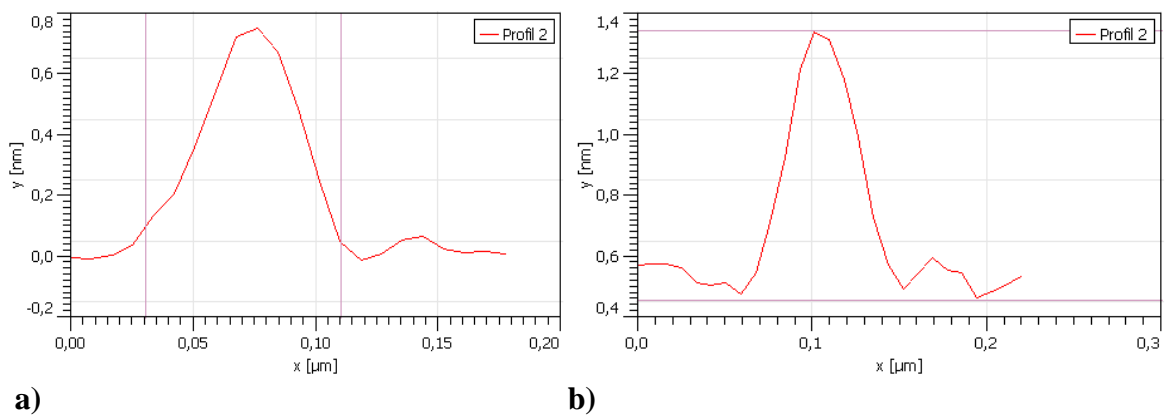
Určovanie veľkosti nanočastíc je možné buď pomocou masky (*Obr. 16*), tou sa označia všetky body ležiace v jednej rovine. Alebo pomocou profilov jednotlivých častíc.

Najprv som označila častice a pomocou ikony *získať profily* som získala grafické znázornenie veľkosti častíc (*Obr. 17*).



Obr. 17: Označenie meraných častíc a získané profily

Ďalej som oddelila profily a na každom určila šírku – priesečníkmi a výšku vodorovnými tečnami (*Obr. 18*)



Obr. 18: Profily častíc pre vymedzenie a) priesečníkmi b) vodorovnými tečnami

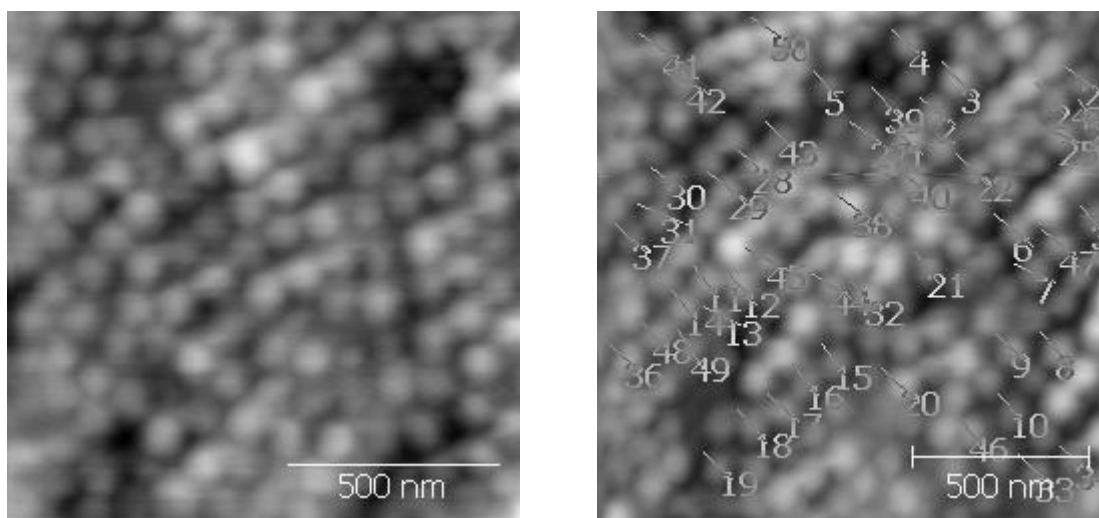
5. VÝSLEDKY

Výsledky meraní sú predložené samotnými snímkami a vyhodnotenia sú spracované do tabuliek a grafov. Najväčšia oblasť, ktorú bolo možné pri použití AFM EasyScan 2 spracovať, predstavovala oblasť 10 μm x 10 μm . Nasledovala úprava a vyhodnotenie snímok jednotlivých vzoriek pomocou programu Gwyddion.

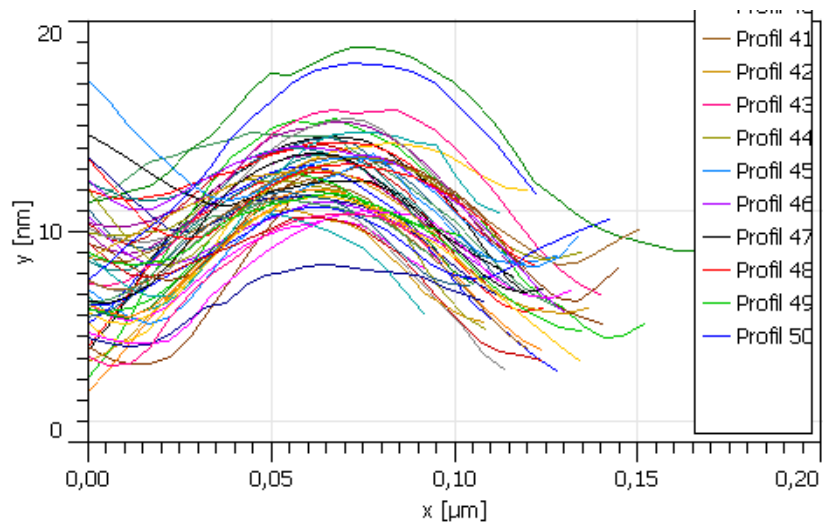
Vyhodnocované boli rozdielne vzorky nanočastíc štyroch typov Chromeonov a pre porovnanie 100 nm štandard.

5.1 Štandard 100 nm

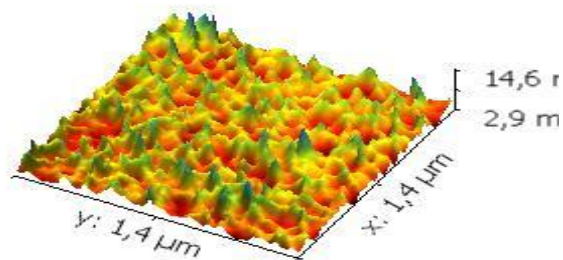
Táto vzorka bola meraná 3 dni a zo 120 snímok bola vybraná jedna oblasť s najzreteľnejšie viditeľnými časticami. Základná snímka o rozmeroch 10 μm x 10 μm bola priblížená na snímok 1,4 μm x 1,4 μm , z ktorého boli následne odčítané častice. Odčítaných bolo 50 častíc, ich označenie je zobrazené na **Obr. 19**. Následne boli urobené profily jednotlivých častíc, ako je ukázané na **Obr. 20** a parametre zapísané do tabuľky (**Tab.1**).



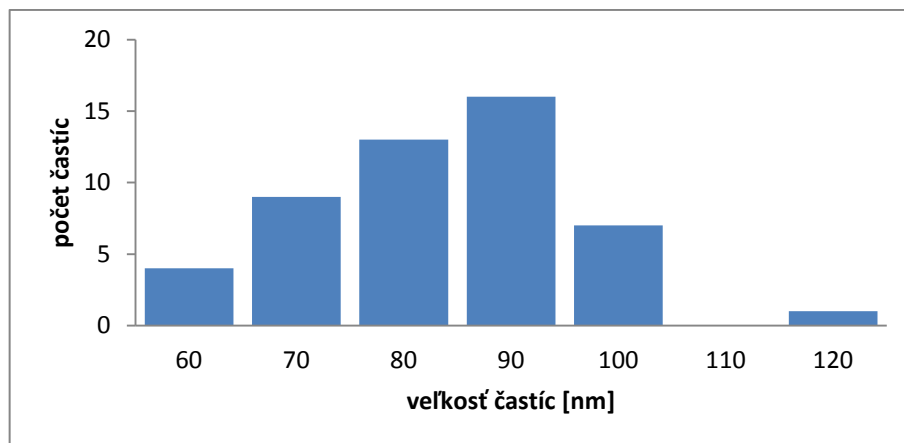
Obr. 19: Štandard 100 nm, odčítanie parametrov, rozlíšenie 1,4 x 1,4 μm



Obr. 20: Štandard 100 nm, profilogram veľkosti nanočastíc



Obr. 21: Trojrozsmerne zobrazenie častíc štandardu 100 nm



Obr. 22: Histogram veľkosti častíc štandardu 100 nm

Tab.1: Veľkosť nanočastíc 100 nm štandardu

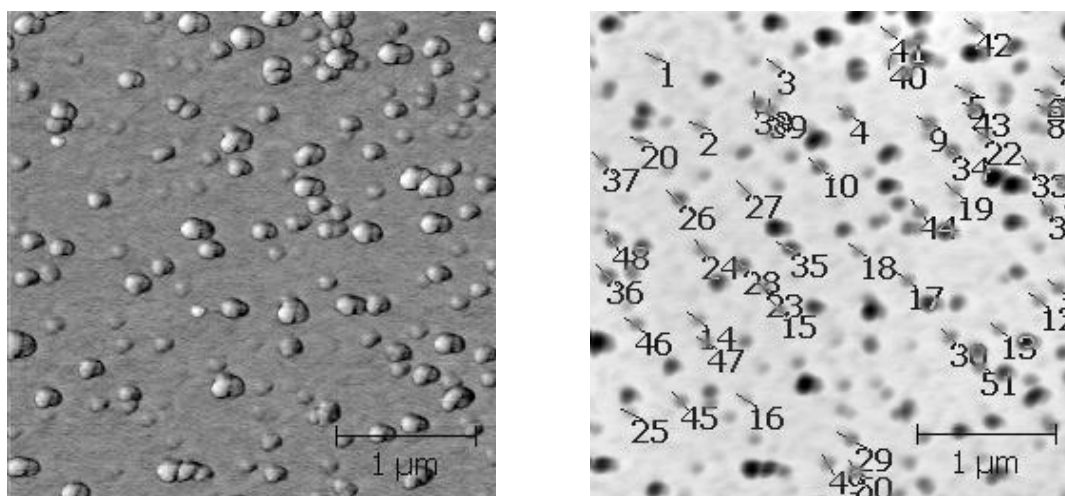
častica	výška [nm]	šírka [nm]
1	9,4	68,7
2	11,5	74,8
3	7,2	57,3
4	7,6	67,7
5	8,2	84,1
6	8,3	62,6
7	15,3	100,6
8	10,3	85,2
9	14,1	99,5
10	4,7	85,9
11	9,5	103,1
12	12,3	60,6
13	14,5	81
14	9,3	92,6
15	5,5	74,5
16	10,3	71,6
17	6,3	75,4
18	10,6	74,1
19	13,4	78,4
20	8,3	75,2
21	5,2	90,6
22	3,9	65,4
23	9,8	99,2
24	9,3	93,1
25	10,2	84,8
26	6,9	74,5
27	6,4	87

častica	výška [nm]	šírka [nm]
28	6,3	84,5
29	12,7	85,6
30	8,4	76,3
31	6,5	97
32	8,2	88,1
33	7,1	83,1
34	11,4	92
35	5,3	72,7
36	4,7	84,5
37	4,5	78,8
38	6,1	90,2
39	12,5	121
40	7,8	88,4
41	6,6	77,6
42	5,9	75,9
43	8,3	94,5
44	8,5	93,8
45	7,8	93,4
46	5,8	56,6
47	7,2	86,3
48	9,4	92
49	10,7	102,6
50	10,2	101,3
Arit.priemer	8,6	84,0
Sm.odchýlka	-	± 13,1
Medián	-	84,6
Modus	-	74,5

5.2 Chromeon A

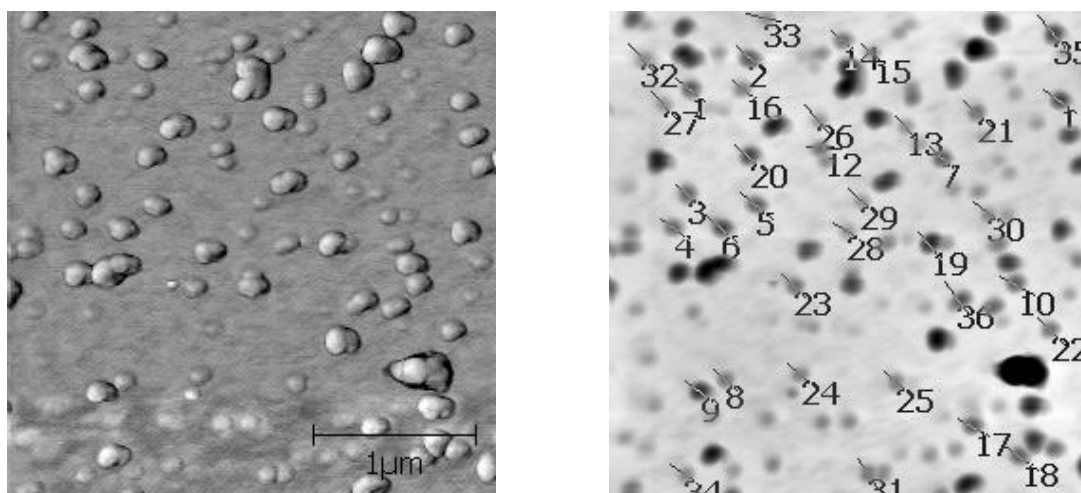
Chromeon A (PD Chromeon 470-marked) som merala 2 dni, pričom zo 60-tich snímok boli vybrané 2 oblasti (I, II), ktoré sú pre ilustráciu zobrazené na **Obr. 23** a **24**. Odčítala som parametre 85-tich častíc, pričom 36 z oblasti I a 51 z oblasti II. Následne som pomocou profilov (**Obr. 26** a **Obr. 27**) určila výšku a šírku častíc a zhrnula ich v **Tab. 2**.

1. meraná oblasť

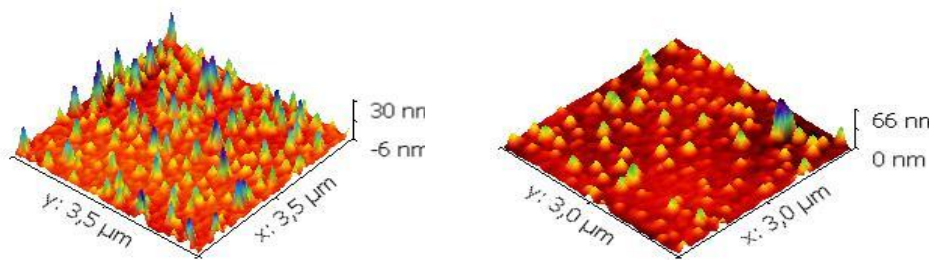


Obr. 23: Chromeon A, odčítanie parametrov oblasť I, rozlíšenie 3,5 x 3,5 µm

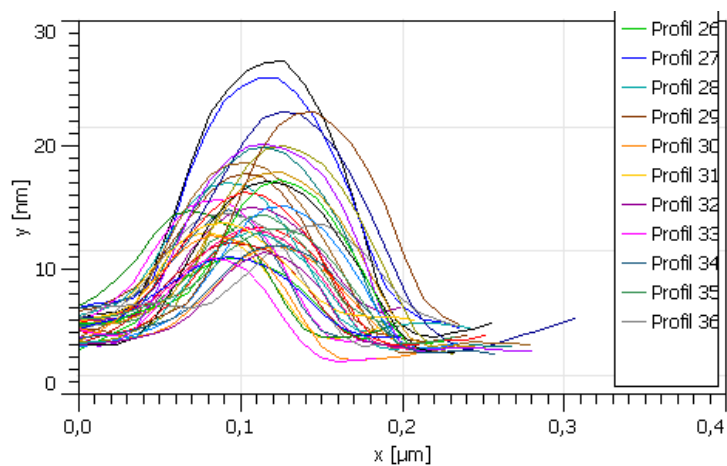
2. meraná oblasť



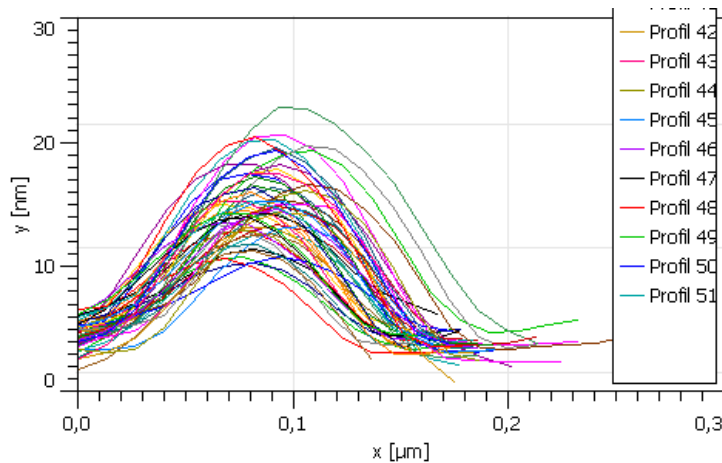
Obr. 24: Chromeon A, odčítanie parametrov oblasť II, rozlíšenie 3,0 x 3,0 µm



Obr. 25: Trojrozmerný snímok častíc Chromeon A, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II



Obr. 26: Chromeon A, oblasť I, profilogram veľkosti nanočastíc



Obr. 27: Chromeon A, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc

Tab.2: Veľkosť nanočastíc Chromeonu A

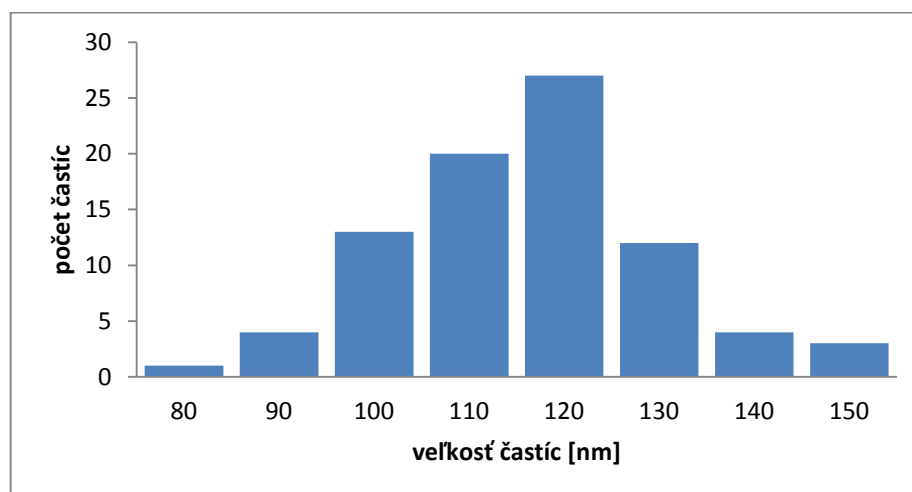
Častica	výška [nm]	šírka [nm]
1	8,2	107,4
2	9,1	113,1
3	9,9	118,1
4	8,9	91,6
5	9	95,9
6	9,3	108,8
7	10,9	117,9
8	21,8	123,9
9	10,9	116
10	6,9	116
11	14,7	107,4
12	13,9	116
13	15,2	134,6
14	18,8	135,3
15	13,1	116,7
16	18,2	124,6
17	15,6	116
18	16,7	132,5
19	17	131
20	20,3	146,1
21	10,7	103,6
22	8,2	127,9
23	11,2	121,7
24	9,6	110,7
25	12,2	86,9
26	13,2	101,2
27	9,9	112,6
28	8,9	104,5
29	8,7	119,8
30	14,6	116,7
31	12,5	114,6
32	21,5	126,7
33	8,5	124,1
34	9,3	122,2
35	25,4	132,5
36	9,5	120,9

častica	výška [nm]	šírka [nm]
37	11,4	118,5
38	23,5	122,9
39	18,9	124,3
40	11,3	101,7
41	15,1	110,3
42	8,8	94,3
43	20,5	128
44	14,9	103,8
45	28,3	146
46	23,3	133
47	21,7	138,8
48	9,3	102,4
49	9,5	103,8
50	10,5	105,7
51	14,2	82,3
52	11,9	93,8
53	30,7	144,8
54	17,4	121,4
55	11	101,2
56	20,8	120,7
57	27,3	146
58	21,9	139,5
59	25,8	128,7
60	14,5	100,2
61	12,6	102,1
62	21,5	126,5
63	11,5	112,4
64	11,8	98,3
65	16,2	118,4
66	14,5	109,3
67	12,6	105
68	20,1	122,2
69	13,4	107,4
70	12,2	107,9
71	11,7	106,7
72	8,8	105,2

Tab. 3: Veľkosť nanočastíc Chromeonu A (pokračovanie)

častica	výška [nm]	šírka [nm]
73	9,4	105,2
74	13,1	122,2
75	13,9	133,9
76	20,6	133,7
77	12,2	108,8
78	17,6	121,4
79	18,6	113,7
80	20,6	114,7
81	17,4	117,6

častica	výška [nm]	šírka [nm]
82	18,1	112,8
83	17,7	112,8
84	17,4	117,7
85	14,7	118,9
Arit. priemer	14,9	116
Sm. odchýlka	-	± 13,6
Medián	-	116
Modus	-	116

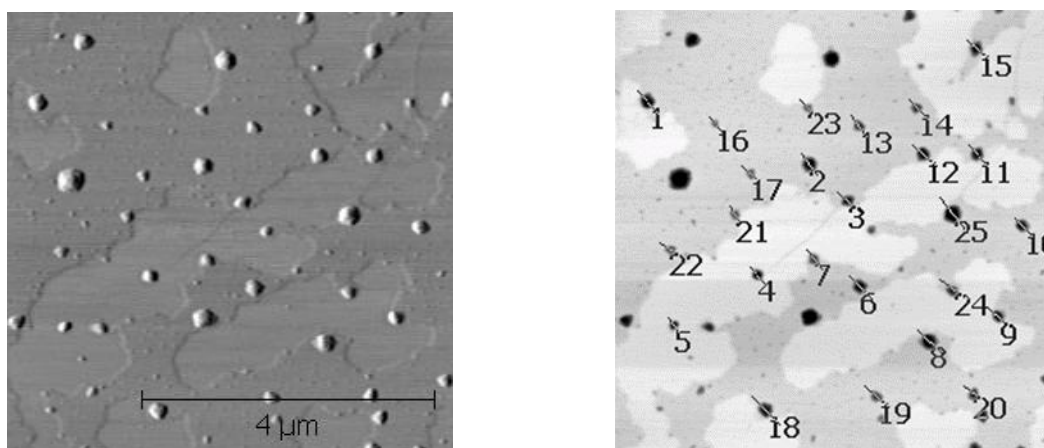


Obr. 28: Histogram veľkosti častíc Chromeonu A

5.3 Chromeon B

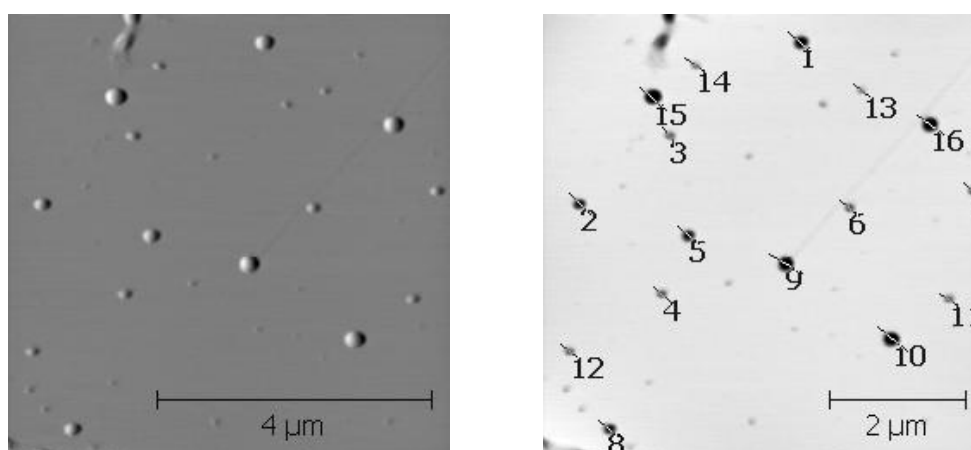
Chromeon B (Nanobeadsbased on PD, Chromeon 470-marked, carboxylated) som snímala 3 dni a urobila 116 snímok. Z toho boli v práci použité 2 oblasti (I a II). Bolo odčítaných len 41 častíc, 25 z oblasti I (**Obr.29**) a 16 z oblasti II (**Obr.30**), ostatné snímky bolo obtiažne hodnotiť. Získané profily častíc (**Obr.32** a **Obr. 33**) boli použité na určenie výšky a šírky častíc uvedených v **Tab.3**.

1. meraná oblasť

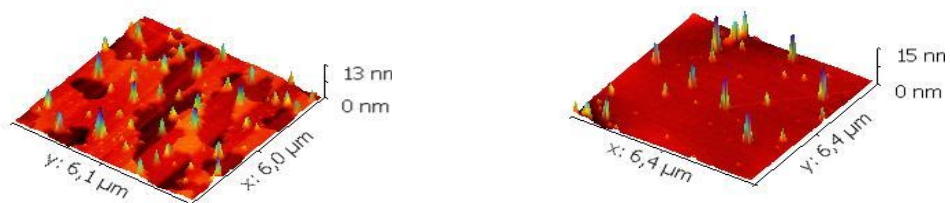


Obr. 29: Chromeon B, odčítanie parametrov oblasť I, rozlíšenie 6,0 x 6,0 μm

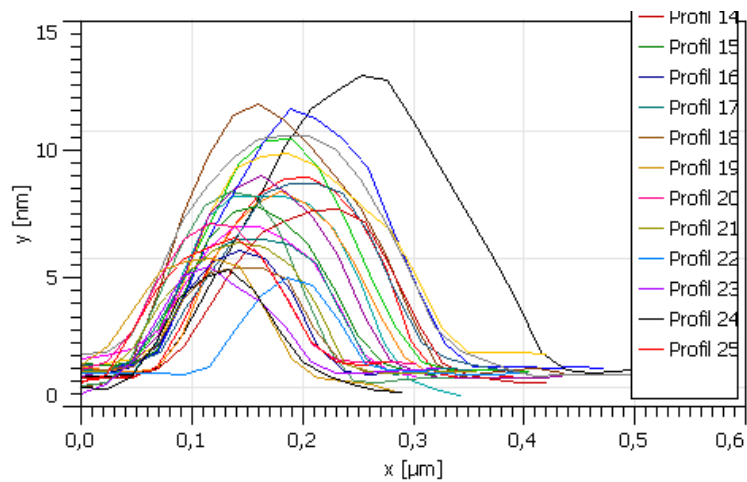
2. meraná oblasť



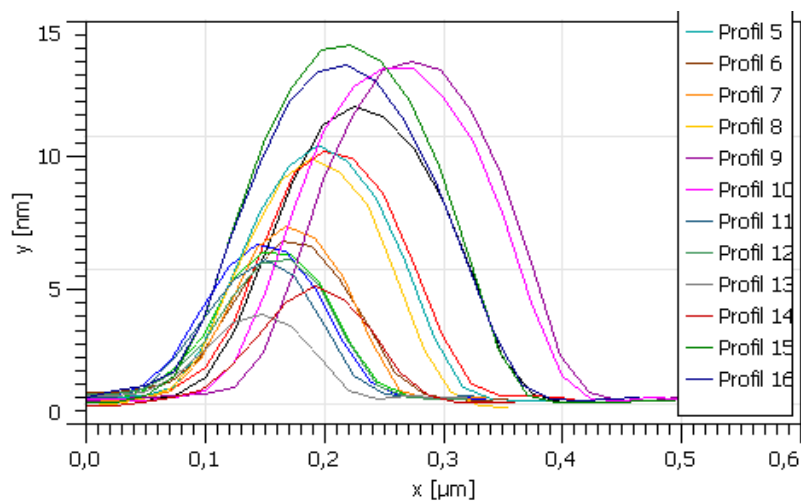
Obr. 30: Chromeon B, odčítanie parametrov oblasť II, rozlíšenie 6,4 x 6,4 μm



Obr. 31: Trojrozmerný snímok nanočastíc Chromeonu B, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II



Obr. 32: Chromeon B, oblast' I, profilogram veľkosti nanočastíc

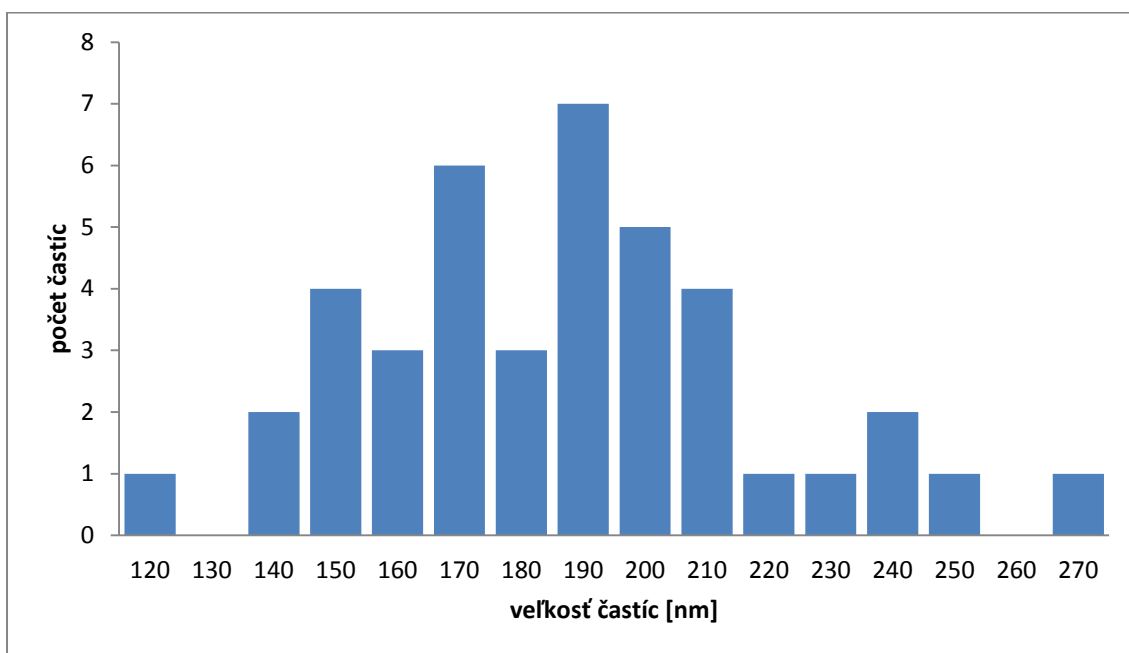


Obr. 33: Chromeon B, oblast' II, profilogram veľkosti nanočastíc

Tab.4: Veľkosť nanočastíc Chromeonu B

Častica	výška[nm]	šírka[nm]
1	6,5	164,1
2	5,2	143
3	5,3	154
4	4,1	136
5	5,3	171,8
6	5,9	154,9
7	5,3	173,2
8	4,4	152,1
9	5,8	185
10	5,3	147,9
11	7,1	173,7
12	7,4	219,5
13	10,7	249,3
14	8,3	167,1
15	8,1	212,4
16	8,5	170
17	8,5	195,7
18	8,8	235,1
19	7,7	191,9
20	11,7	242,2
21	8,4	209
22	11,7	225,5
23	10,2	201,9

častica	výška[nm]	šírka[nm]
24	8,3	210
25	12,7	276,4
26	12,1	198,1
27	9,6	190,9
28	5,9	185,9
29	5,7	181,2
30	9,9	200,5
31	6,3	185,9
32	6,9	181,2
33	9,6	163,2
34	13,3	197,6
35	13,1	207,6
36	5,2	164,3
37	5,6	173,7
38	3,3	116,4
39	4,7	138,6
40	14,3	188,5
41	13,2	194,5
Arit. priemer	8,1	186
Sm. odchýlka	-	± 32,6
Medián	-	185,9
Modus	-	173,7

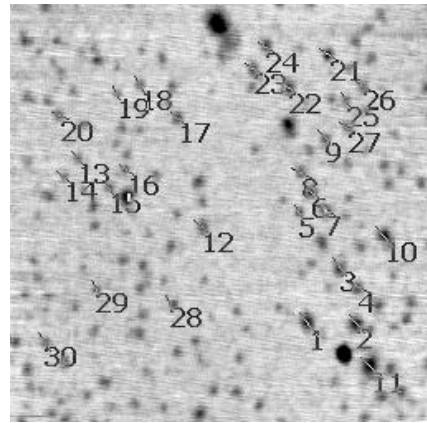
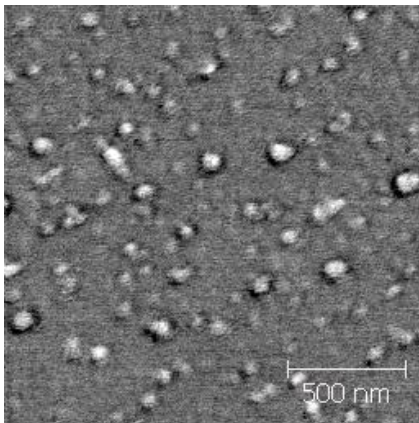


Obr. 34: Histogram veľkosti častíc Chromeonu B

5.4 Chromeon C

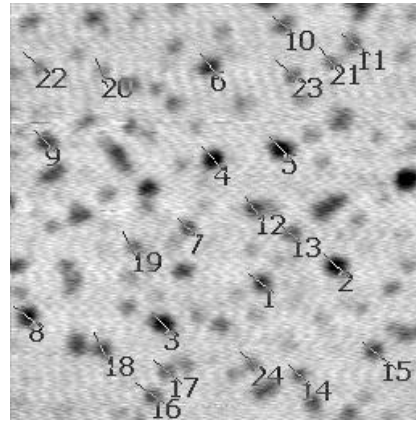
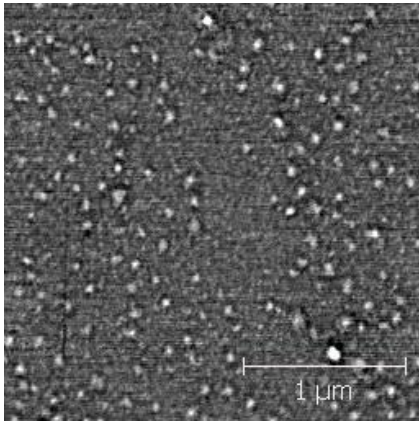
Táto vzorka (Nanobeads based on polyacrylonitrile, Chromeon 470-marked, carboxylated) bola meraná 2 dni, z 58 snímok boli vybrané 2 oblasti (I a II). Odčítaných bolo 54 častíc, 24 z oblasti I (obr. 35) a 30 z oblasti II (obr.36). Získané profily (**Obr. 38** a **Obr. 39**) sa použili na určenie výšky a šírky nanočastíc, ktoré sú uvádzané v **Tab.4**.

1. meraná oblasť

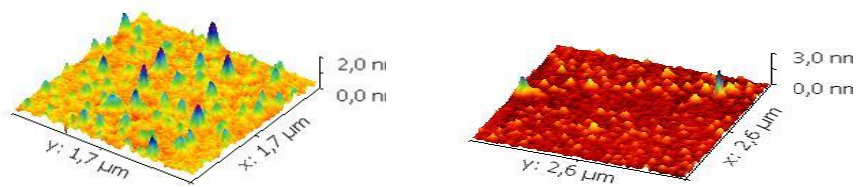


Obr. 35: Chromeon C, oblasť I, odčítanie parametrov, rozlíšenie 1,7 x 1,7 μm

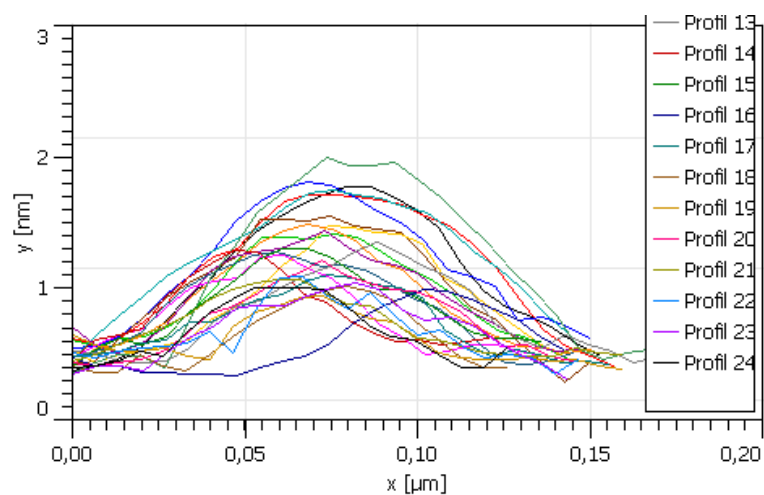
2. meraná oblasť



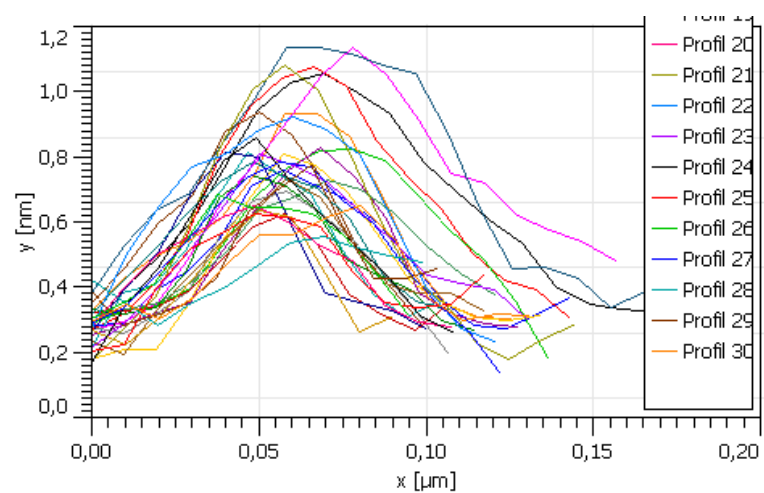
Obr. 36: Chromeon C, oblasť II, odčítanie parametrov, rozlíšenie 2,6 x 2,6 μm



Obr. 37: Trojrozmerný snímok častíc Chromeonu C, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II



Obr. 38: Chromeon C, oblast' I, graf veľkosti nanočastic

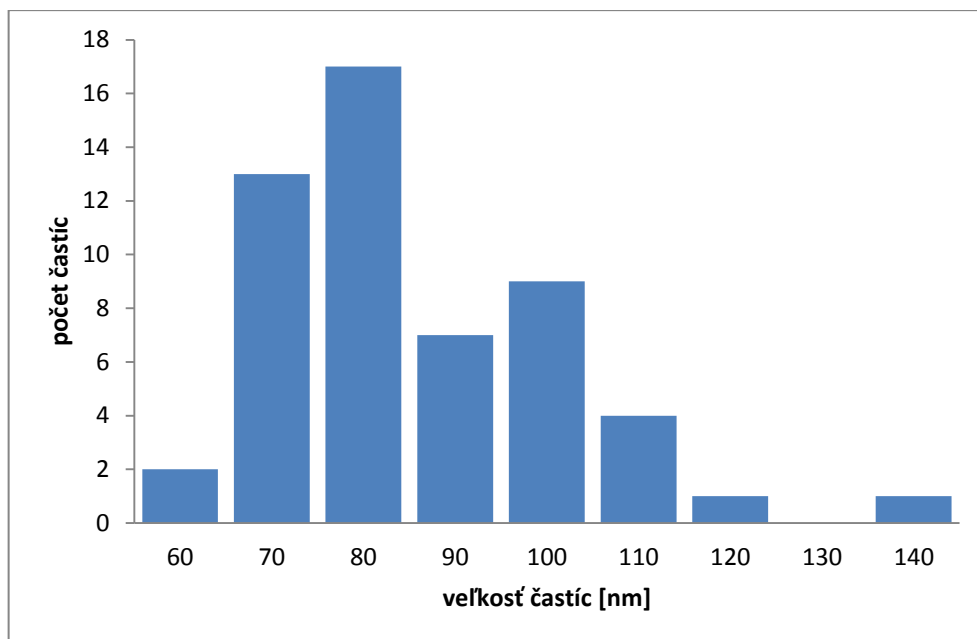


Obr. 39: Chromeon C, oblast' II, profilogram veľkosti nanočastic

Tab.5: Veľkosť nanočastíc u Chromeonu C

častica	výška[nm]	šírka[nm]
1	1,63	104,1
2	1,03	103,9
3	1,35	101,7
4	1,62	100,8
5	1,52	98,6
6	1,29	113,9
7	1,13	101,2
8	1,02	117,6
9	0,89	103
10	0,89	84,6
11	2,02	81
12	0,98	79,5
13	0,88	108,4
14	0,72	81,4
15	0,61	66,9
16	0,86	69,8
17	0,7	80
18	0,85	66,9
19	0,84	65,5
20	0,73	75,5
21	0,72	93
22	0,84	68,7
23	0,85	85,3
24	0,65	68,3
25	0,57	69,8
26	0,55	64,3
27	0,51	78,1
28	0,42	70,1
29	0,4	74,1
30	0,56	88,9

častica	výška[nm]	šírka[nm]
31	0,52	81
32	0,64	83,4
33	0,72	77,7
34	0,7	77
35	0,45	77,7
36	0,56	77,1
37	0,47	76,1
38	0,64	94
39	0,57	89,6
40	0,72	90,6
41	1,02	97,8
42	0,54	85,3
43	0,83	81,3
44	0,88	112,8
45	1,04	107
46	0,98	136,6
47	0,54	61,1
48	0,62	67,2
49	0,78	72,3
50	0,73	75,3
51	0,57	83,4
52	0,9	99,4
53	0,65	69,3
54	0,87	68,9
Arit.priemer	0,83	85
Sm.odchýlka	-	±16,3
Medián	-	81,15
Modus	-	66,9

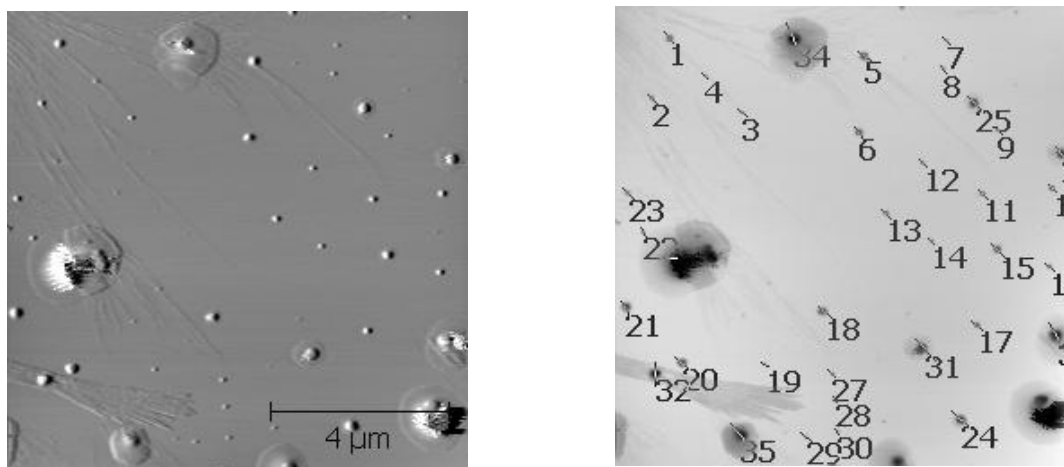


Obr. 40: Histogram veľkosti nanočastíc Chromeonu C

5.5 Chromeon D

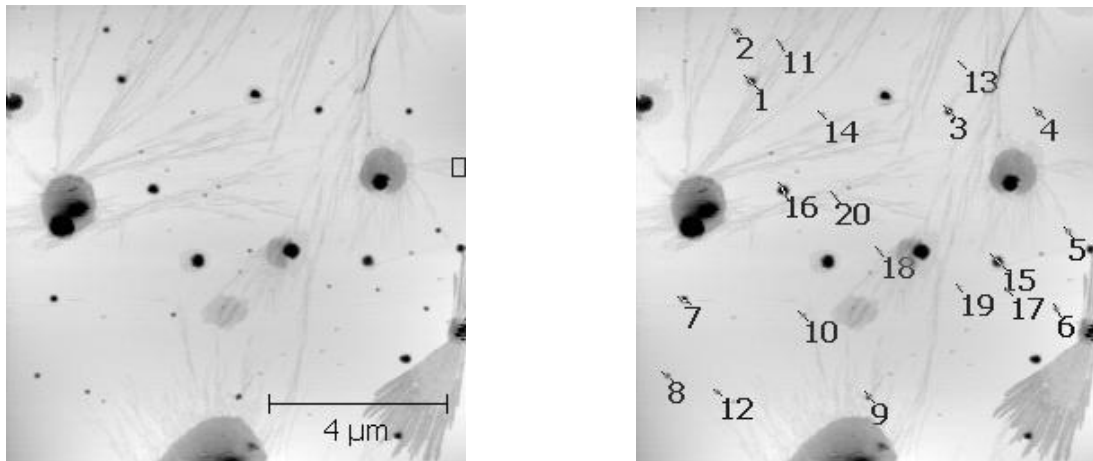
Chromeon D sa meral 2 dni, zo 65-tich snímok sa vybrali 2 oblasti. Označených bolo 55 častíc, 35 z oblasti I (*Obr.41*) a 20 z oblasti II (*Obr.42*). Následne pomocou profilov častíc (*Obr.44*) boli vyhodnotené parametre udané v **Tab.5**.

1. meraná oblasť

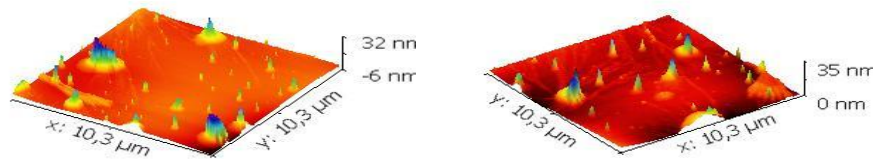


Obr. 41: Chromeon D, odčítanie parametrov, oblasť I, rozlíšenie 5,1 x 5,1 μm

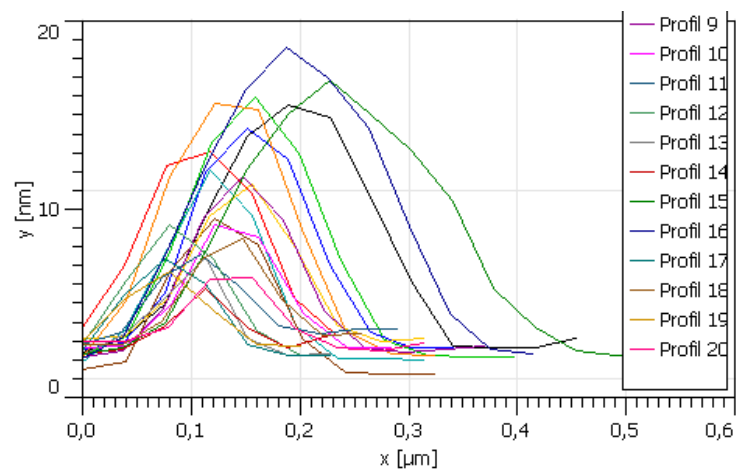
2. meraná oblasť



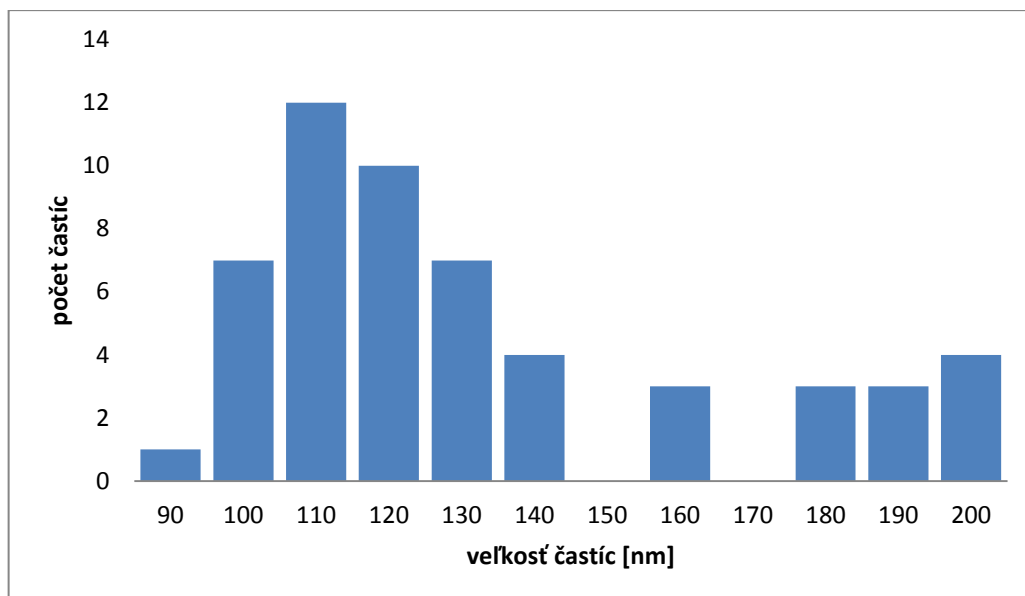
Obr. 42: Chromeon D, odčítanie parametrov, oblasť II, rozlíšenie 5,0 x 5,0 μm



Obr. 43: Trojrozmerný snímok častíc Chromeonu D, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II



Obr. 44: Chromeon D, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc



Obr. 45: Histogram velikosti nanočástic Chromeonu D

Tab.6: Velikost nanočástic Chromeonu D

částica	výška[nm]	šířka[nm]
1	12,8	130,8
2	8,7	110,3
3	7,2	103,8
4	4,2	101,9
5	16,6	139,4
6	11,2	124,1
7	4,5	111
8	4,8	106,1
9	6,5	100,2
10	12,3	123,3
11	11,1	131
12	9,2	102,4
13	10,1	126,7
14	7,7	100,7
15	13,3	139,6
16	11,5	118,1
17	10,1	125
18	12,7	130,6
19	4,5	101,9

částica	výška[nm]	šířka[nm]
20	15,2	163,5
21	15,3	155,6
22	10,3	113,6
23	11,8	123,2
24	12,3	180,4
25	14,1	179,1
26	14,3	194,5
27	5,4	110,3
28	4,8	93,8
29	4,1	108,9
30	2,8	109,1
31	13,5	190,3
32	24,7	184,7
33	19,7	206,3
34	18,9	202
35	19,1	190
36	14,1	162,3
37	10,6	124,6
38	14,8	132,7

Tab.7: Veľkosť nanočastíc Chromeonu D (pokračovanie)

častica	výška[nm]	šírka[nm]
39	12,3	126
40	11,2	119,3
41	8,9	121,2
42	15,5	135,6
43	8,5	127,9
44	9,4	138,9
45	7,2	123,2
46	4,8	122,5
47	7,1	120,3
48	5,4	113,4
49	3,4	109,2

častica	výška[nm]	šírka[nm]
50	15,2	197,6
51	17,4	201,7
52	5,4	110,6
53	6,1	110,6
54	4,5	106,3
55	4,2	104,2
Arit. priemer	10,4	133
Sm.odchýlka	-	±31,9
Medián	-	123,3
Modus	-	101,9

5.6 Porovnanie veľkosti nanočastíc nameraných pomocou AFM s deklaroványm rozmerom

	AFM	Deklarovaný rozmer
Štandard 100nm	84 nm ± 13,1 nm	100 nm
Chromeon A	116 nm ± 13,6 nm	170 nm
Chromeon B	186 nm ± 32.6 nm	200 nm
Chromeon C	85 nm ± 16,3 nm	100 nm
Chromeon D	133 nm ± 31.9 nm	130 nm

6. DISKUSIA

Výber meranej oblasti pri hodnotení AFM mikroskopom

Pri súvislej vrstve častíc hrot neprenikne medzi častice a z toho dôvodu je výška častice menšia ako v skutočnosti. A naopak pri jednotlivých časticách dostatočne vzdialených od seba sa pričítava šírka hrotu a teda je tento rozmer väčší ako skutočná častica.

Pôvodný zámer bol pre čo najpresnejšie výsledky vziať ako smerodajnú výšku u samostatných častíc a na prípadných monovrstvách častíc odčítať šírku častice. Pri meraní bolo náročné nájsť samostatné častice. Po zaschnutí kvapalnej fázy zostávala v škvrne príliš hrubá vrstva častíc. V okolí škvorny bol taktiež nájdené zhluky častíc zachytávajúce sa na drobných ryhách spôsobených oddelením sľudy. Ako najvhodnejšia oblasť pre získanie hodnotiteľných snímok sa javila oblasť v blízkosti škvorny, kde sa nesmeli nachádzať nedokonalosti povrchu (napr. ryhy vzniknuté pri oddelovaní sľudy).

U Ag-nanočastíc aj po fixácii na Poly-L-Lysin sa nepodarilo nájsť oblasť, ktorej výsledky by sa dali použiť. V experimentálnej časti preto spracované nie sú.

Spracovanie snímok:

Program Gwyddion je veľmi intuitívny, všetky základné úkony sú umiestnené vo forme ikon v hlavnej lište. Návod na prácu s týmto softwarom (spracoval F. Riguet) hodnotím ho ako prehľadný a zrozumiteľný.

Najprv som si otvorila snímok z AFM a odstránila nerovnosť povrchu odčítaním strednej roviny, následne odčítala polynomiálne pozadie a posunula najmenšiu hodnotu na nulu. Častice boli po tomto úkone lepšie viditeľné.

Na jemné korekcie AFM snímok analyzovaných vzoriek boli dostačujúce základné ikony nachádzajúce sa v hlavnej lište. S každou ďalšou úpravou však treba myslieť na zanesenie informácií, ktoré nie sú reálne a teda postupné skresľovanie výsledkov.

Určovanie veľkosti nanočastíc je možné aj pomocou masky, kedy sa označia všetky body ležiace v jednej rovine. V našom prípade však výška nanočastíc bola veľmi malá, pri tak malých rozdieloch sa maska zle označovala, jednotlivé častice sa zlievali

a po opakovanom označení jedného snímku vychádzali príliš odlišné údaje. Z toho dôvodu som radšej využívala profily jednotlivých častíc.

Určovanie veľkosti jednotlivých nanočastíc:

Feretov priemer udáva vzdialenosť medzi dvoma krajnými od seba najviac vzdialenými bodmi a slúži k určeniu veľkosti nepravidelných častíc. Ručným meraním priemerov (pomocou profilov jednotlivých častíc) boli vytýčené medze, v ktorých sa pohybovali veľkosti jednotlivých častíc. Z profilogramov sa dali oddeliť profily každej jednej častice. Priesečníkmi sa určila šírka častice a vodorovnými tečnami ich výška.

Príliš vysoké hodnoty pripadajúce na zhluky častíc alebo príliš malé hodnoty, ktoré pripadli na artefakty snímky, boli vylúčené pri odčítavaní častíc a následnom spracovaní výsledkov v programe Excel 2007.

Každá vzorka je charakterizovaná nie len priemernou veľkosťou nanočastíc so smerodatnou odchýlkou veľkosti častíc, ale taktiež histogramom. Ten lepšie odzrkadľuje distribúciu veľkostí častíc vo vzorke. Výška stĺpca určuje početnosť výskytu častíc danej veľkosti.

Veľkosť nanočastíc nameraná AFM bola vždy menšia v porovnaní s hodnotami deklarovanými výrobcom. Prvé vysvetlenie súviselo so skutočnosťou, že nanočastice boli merané pravdepodobne inou metódou. To nám však pre vysvetlenie nápadne širokého rozpätia hodnôt z AFM úplne nepostačovalo.

Pri podrobnejšom skúmaní sme zistili, že výška sa pohybovala rádovo v jednotkách nanometrov a to nie len u Chromeonov ale aj u štandardu polystyrénu, ktorý mal mať tvar gule. Predpokladáme, že hrot snímal len vrchnú časť nanočastíc. Z tohto dôvodu nebolo možné objektívne určiť tvar, a možno aj hodnoty veľkosti nanočastíc by bolo z metodického hľadiska užitočné premerať napríklad elektrónovou mikroskopiou. Na vyhodnocovanie skúmaných nanočastíc musí byť použitá iná technika, prípadne spracovanie vzorky.

7. ZÁVERY

1. V experimentálnej časti som nazhromaždila skúsenosti a praktickú zručnosť potrebnú pre zostavenie podrobného popisu prípravy vzoriek nanočastíc pre účely AFM merania. Vyskúšala som meranie na kalibračných mriežkach, 100 nm štandarde polystyrénu a následne som prešla k meraniu chromeonov.
2. Štandard nanočastíc polystyrénu 100 nm vykazoval pri AFM meraní veľkosť $84 \text{ nm} \pm 13,1 \text{ nm}$, Chromeon A vykazoval priemer $116 \text{ nm} \pm 13,6 \text{ nm}$, Chromeon B $186 \text{ nm} \pm 32,6 \text{ nm}$, Chromeon C $85 \text{ nm} \pm 16,3 \text{ nm}$ a Chromeon D vykazoval priemer $133 \text{ nm} \pm 31,9 \text{ nm}$.
3. Veľkosť nanočastíc meraných pomocou AFM bola s výnimkou Chromeonu D vždy nápadne menšia v porovnaní s hodnotami deklarovanými výrobcom.
4. Veľkostné rozpätie nameraných hodnôt veľkosti nanočastíc boli vo všetkých prípadoch nečakane široké.
5. Keďže veľmi pravdepodobne neboli nasnímané celé nanočastice ale len vrchné časti, nebolo možné určiť reálny tvar týchto častíc.
6. Metóda AFM sa ukázala ako príliš citlivá na meranie veľkosti a tvaru zadaných nanočastíc.

8. Zoznam tabuliek

Tab.1: Veľkosť nanočastíc 100 nm štandardu.....	33
Tab.2: Veľkosť nanočastíc Chromeonu A.....	36
Tab. 3: Veľkosť nanočastíc Chromeonu A (pokračovanie).....	37
Tab.4: Veľkosť nanočastíc Chromeonu B.....	40
Tab.5: Veľkosť nanočastíc u Chromeonu C.....	44
Tab.6: Veľkosť nanočastíc Chromeonu D	47
Tab.7: Veľkosť nanočastíc Chromeonu D (pokračovanie).....	48

9. Zoznam obrázkov

Obr. 1: Schéma mikroskopu atomárnych síl ⁽⁵⁾	10
Obr. 2: Schéma rastrovania povrchu vzorky ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾	11
Obr. 3: Tvary ramienka a) tvar písmena V a b) tvar plochého kvádra ⁽²⁰⁾	12
Obr. 4: Parametre hrotu - polomer hrotu pri vrchole (r), dĺžka hrotu (h), šírka (w) ⁽¹⁵⁾ ..	13
Obr. 5: Štandardná mriežka na stanovenie kvality hrotu ⁽⁷⁾	14
Obr. 6: Interakcia hrotu s povrchom vzorky ⁽²⁰⁾	15
Obr. 7: Priebeh Lennard - Jonesovho potenciálu v závislosti od vzdialenosti hrot- vzorka ⁽²¹⁾	16
Obr. 8 Kontaktný režim AFM ⁽²²⁾	17
Obr. 9: Bezkontaktný režim AFM ⁽²²⁾	18
Obr. 10: Pokleповý režim AFM ⁽²²⁾	19
Obr. 11: Topografické a fázové zobrazenia vzorky ⁽²²⁾	19
Obr. 12: Schéma laserového difraktuora ⁽²⁷⁾	23
Obr. 13: Princíp metódy DLS (rozptyl svetla) ⁽²⁹⁾	24
Obr. 14: Možné tvary častíc a ich kvalitatívny popis ⁽³⁰⁾	25
Obr. 15: Úprava snímok.....	30
Obr. 16: Označenie masky (100 nm štandard)	30
Obr. 18: Profily častíc pre vymedzenie a) priesečníkmi b) vodorovnými tečnami	31
Obr. 17: Označenie meraných častíc a získané profily.....	31
Obr. 19: Štandard 100 nm, odčítanie parametrov, rozlíšenie 1,4 x 1,4 μm	32
Obr. 20: Štandard 100 nm, profilogram veľkosti nanočastíc.....	33
Obr. 21: Trojrozmerné zobrazenie častíc štandardu 100 nm	33
Obr. 22: Histogram veľkosti častíc štandardu 100 nm	33
Obr. 23: Chromeon A, odčítanie parametrov oblasť I, rozlíšenie 3,5 x 3,5 μm	35
Obr. 24: Chromeon A, odčítanie parametrov oblasť II, rozlíšenie 3,0 x 3,0 μm.....	35
Obr. 25: Trojrozmerný snímok častíc Chromeon A, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II ..	36
Obr.27: Chromeon A, oblasť I, profilogram veľkosti nanočastíc.....	36
Obr. 27: Chromeon A, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc	36
Obr. 28: Histogram veľkosti častíc Chromeonu A	38
Obr. 29: Chromeon B, odčítanie parametrov oblasť I, rozlíšenie 6,0 x 6,0 μm	39
Obr. 30: Chromeon B, odčítanie parametrov oblasť II, rozlíšenie 6,4 x 6,4 μm	39
Obr. 31: Trojrozmerný snímok nanočastíc Chromeonu B, vľavo oblasť I,	39
Obr. 32: Chromeon B, oblasť I, profilogram veľkosti nanočastíc	40
Obr. 33: Chromeon B, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc.....	40
Obr. 34: Histogram veľkosti častíc Chromeonu B	42
Obr. 35: Chromeon C, oblasť I, odčítanie parametrov, rozlíšenie 1,7 x 1,7 μm	43
Obr. 36: Chromeon C, oblasť II, odčítanie parametrov, rozlíšenie 2,6 x 2,6 μm.....	43
Obr. 37: Trojrozmerný snímok častíc Chromeonu C, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II.	43
Obr. 38: Chromeon C, oblasť I, graf veľkosti nanočastíc.....	44
Obr. 39: Chromeon C, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc.....	44
Obr. 40: Histogram veľkosti nanočastíc Chromeonu C	46

Obr. 41: Chromeon D, odčítanie parametrov, oblasť I, rozlíšenie 5,1 x 5,1 μm	46
Obr. 42: Chromeon D, odčítanie parametrov, oblasť II, rozlíšenie 5,0 x 5,0 μm	47
Obr. 43: Trojrozmerný snímok častíc Chromeonu D, vľavo oblasť I, vpravo oblasť II	47
Obr. 44: Chromeon D, oblasť II, profilogram veľkosti nanočastíc	47
Obr. 45: Histogram veľkosti nanočastíc Chromeonu D.....	48

10. Použitá literatura

1. **Hošek, J.:** *Úvod do nanotechnologie. Praha : České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8, 6-7.*
2. **Anonym:** <http://nanotechnologie.vsb.cz/>. [Online] [Datum: 20. január 2014.]
3. **Edward M., Michele P. T.:** *Application of nanotechnology: A case study in this pharmaceutical area.* [Online] 2004. [Datum: 21. január 2014.] www.foley.com.
4. **Wickramasinghe, H. K.:** *Progress in scanning Probe Microscopy. Vol.48, No.1, pp. 347-358, s.l. : Acta Materialia, 2000.*
5. **Eaton P., West P.:** *Atomic Force Microscopy. s.l. Oxford University Press, 2010. ISBN 978-0199570454, p.9.*
6. **Kubínek R.:** *Jak měřit NANO, Nástroje pro měření a vyhodnocování nanostruktur. volně šířitelný text. s.l. : Univerzita Palackého v Olomouci, 2010.*
7. **Tománková K., Kolářová H., Kubínek R., Vůjtek M. a Dušková H.:** *Mikroskopie atomárních sil v biologických aplikacích. 56 (5): 340-345, s.l. : Čs. čas. fyz., 2006.*
8. **Klemeš J.:** *Studium biomolekul pomocí AFM. Bakalářská práce. Brno. Masarykova univerzita. 2008.*
9. **Vůjtek M.:** *UPOL, Mikroskopie skenující sondou, Univerzita Palackého v Olomouci, 2003. [Online] [Datum: 12. Február 2015.] www.atmilab.upol.cz.*
10. **Oujezdská, A.:** *Studium biointerakcí pomocí AFM. Bakalářska práce. Brno : Masarykova univerzita, 2009.*
11. **Edwardson J. M., Hemderson R. M.:** *Atomic force microscopy and drug discovery. Drug Discovery Today . January 2004, Zv. Vol. 9, No.2: 64-71, s. 64-71.*
12. **Truchlý, M.:** *Vyšetrovanie lokálnych elektrických vlastností pomocou rastrovacích sondových mikroskopov. Študentská vedecká odborná činnosť. Bratislava, 2009.*
13. **Kubínek R., Vůjtek M., Mašláň M.:** *Mikroskopie skenující sondou. Olomouc : Vydavatelství University Palackého v Olomouci, 2003. ISBN 80-244-0602-0.*
14. **Mironov, V. L.:** *Foundamentals of scanning probe microscopy. Nizhniy Novgorod : The russian academy of Sciences, Institut for Physics of Microstructures, 2004.*
15. **Braga P. C., Ricci D.:** *Methods in Molecular Biology: Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications. Vol. 242: str.6, Totowa, N.J. : Humana Press Inc., 2004. ISBN 1-58829-094-8.*

16. **Vansteenkiste S. O., Davies M. C., Roberts C. J., Tendler S. J. B., Williams P. M.:** *Scanning probe microscopy of biomedical interfaces*. Vol. 57, No. 2: 95-136, s.l. : *Progres in Surface Science*, 1998.
17. **Garcia, R. a Perez, R.:** *Dynamic atomic force microscopy methods*. Vol.47: pg.197-301, s.l. : *Surface science reports*, 2002.
18. **Dietz P., Hansma P. K., Inacker O., Lehmann H.D., Herrman K. H.:** *Surface pore structures of micro- und ultrafiltration membranes imaged with the atomic force microscope*. Vol. 65: pg. 101-111, s.l. : *Journal of science*, 1992.
19. **Hartmann U.:** *An Elementary Introduction to Atomic Force Microscopy and Related Methods*. Saarbrücken, Germany : *Institute of Experimental Physics, University of Saarbrücken*, 1997.
20. **Anonym:** http://atmilab.upol.cz/texty/dipl_bio.pdf. [Online] [Dátum: 15. Február 2015.]
21. **Šoltýs J.:** *AFM nanolitografia a jej aplikácia na vybrané polovodičové štruktúry*. Kandidátska dizertačná práca. Bratislava : *ElU SAV*, 2005.
22. **Jandt, K. D.:** *Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces*. Vol.491: 303-332, s.l. : *Surface Science*, 2001.
23. **Hilal N., Bowen W. R., Alkhatib L., Ogunbiyi O.:** *A review of atomic force microscopy applied to cell interactions with membranes*. Vol. 84, No. 4: 282-292, s.l. : *Chemical Engineering Research and Design*, 2006. ISSN: 0263-8762.
24. **Nečas D., Klapetek P.:** *Gwyddion – Free SPM (AFM, SNOM/NSOM, STM, MFM, . . .) data analysis software*. [Online] [Dátum: 12. Február 2015.] www.gwyddion.net.
25. **Vujtek M., Kubínek R., Zboril R., Mašláň M., Novotný R.:** *Analýza nanocástic oxidu železitého metódou AFM*. s.l. : *Univerzita Palackého v Olomouci*.
26. **Pabst W., Gregorová E.:** *Charakterizace částic a částicových soustav*. Praha : *VŠCHT*, 2007.
27. **Anonym:** [Online] [Dátum: 16. február 2015.] <http://tresen.vscht.cz/min/sites/default/files/tvar%20a%20velikost%20castic%20VSCHT.pdf>.
28. **Kvítek L.:** *Metody studia koloidních soustav, učební text*. [Online] 2006. [Dátum: 12. Február 2015.] <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>.
29. **Anonym:** [Online] [Dátum: 15. február 2015.] <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>.
30. **Anonym:** *Merný povrch*. [Online] [Dátum: 8. Marec 2015.] <http://stifner.sk/skola/doc/prasky/VASPM4.doc>.

31. **Anonym:** [Online] 20. január 2014.

[http://www.physics.sk/subory/clanky//data/dlha%20cesta%20k%20atomovemu%20rozli
seniu.pdf](http://www.physics.sk/subory/clanky//data/dlha%20cesta%20k%20atomovemu%20rozli
seniu.pdf).