

Mikroskopie a rentgenová strukturní analýza

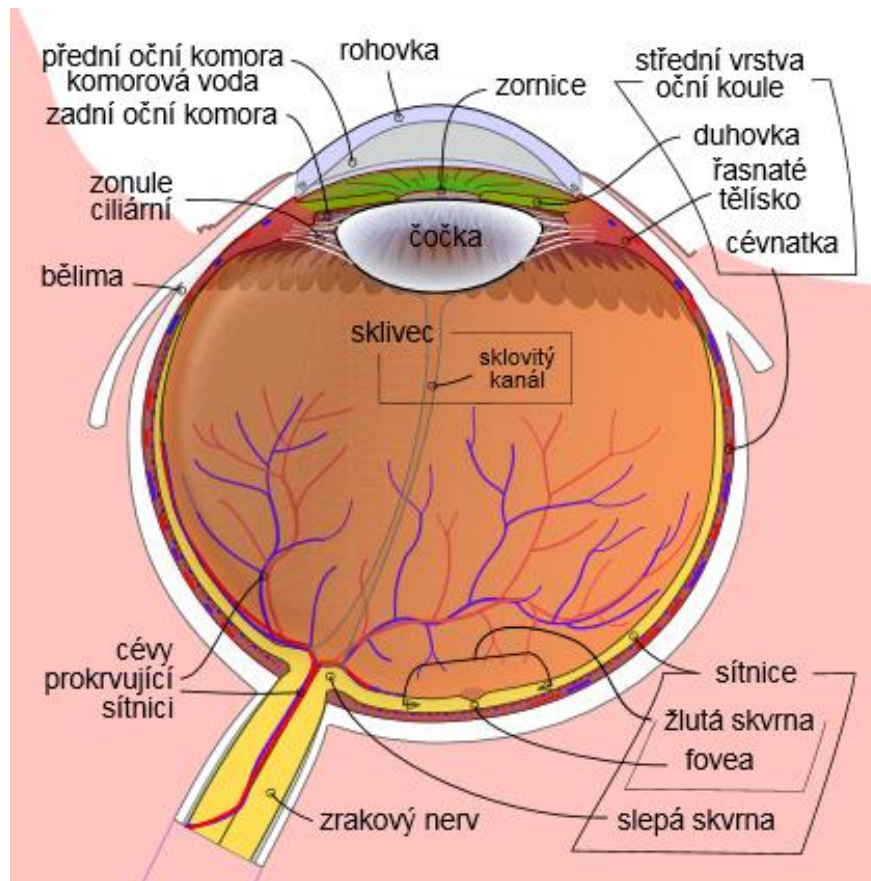
- (1) Světelná mikroskopie
- (2) Elektronová mikroskopie
- (3) Mikroskopie skenující sondou
- (4) Rentgenová strukturní analýza

Doporučená literatura (viz STAG):

1. Vůjtek M., Kubínek R., Mašláň M. *Nanoskopie*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012, ISBN 978-80-244-3102-4.
2. Elektronické materiály (Kouřil, R.).
3. Williams, D.B., Carter, C.B. *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science* (4vol set), 2009, ISBN 978-0-387-76502-0.
4. Fuka J., Havelka B. *I. Optika*. Praha SPN, 1961
(https://www.opto.cz/books/fuka_havelka_optika_1961/)
5. Nauš J. *Experimentální metody biofyziky I*. Učební text UP Olomouc, 1985.
6. Prosser V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. Academia Praha, 1989.

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Oko - smyslový orgán zraku



optický systém

světločivná vrstva

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Gullstrandův model oka

- Alvar Gullstrand (1862-1930)
 - švédský oftalmolog, nositel Nobelovy ceny v 1911 za fyziologii a lékařství
 - studium lidského oka jako systému čoček



Poloměr křivosti: rohovka: 7.8 mm
přední plocha čočky: 10.0 mm
zadní plocha čočky: -6 mm

Optická mohutnost (velikost zakřivení): rohovka: 43 D, čočka: 15-20 D (proměnlivá)
oko jako celek: 59-63 D

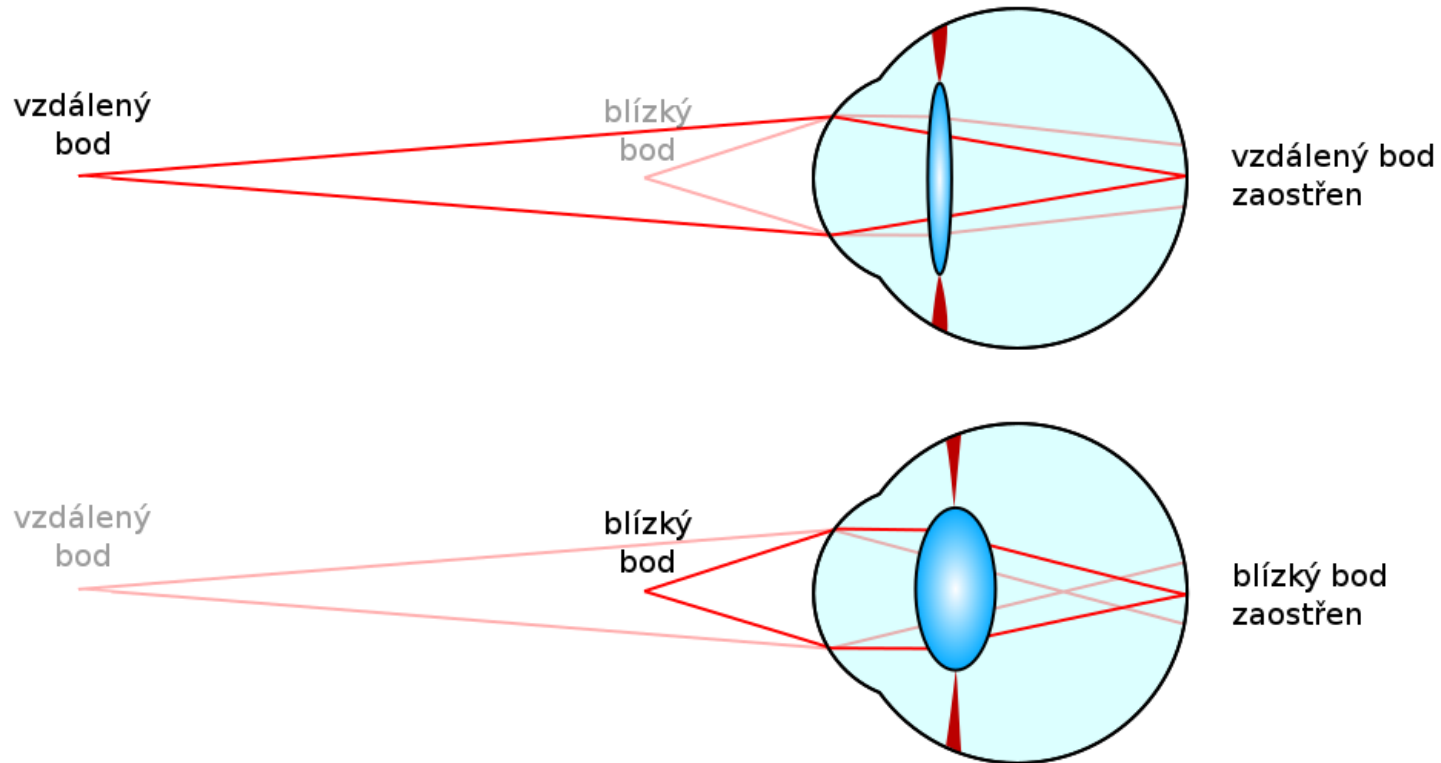
Př. $D=1/f'$ [m^{-1}], $1/f'=(n_2/n_1-1)(1/r_1-1/r_2) \Rightarrow$ čočka: $D = (1.413/1.336-1)(1/0.01+1/0.006) = 15.4$ D (dioptrií)

Akomodace oka: akomodační schopnost čočky (změna zakřivení)

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Akomodační schopnost čočky

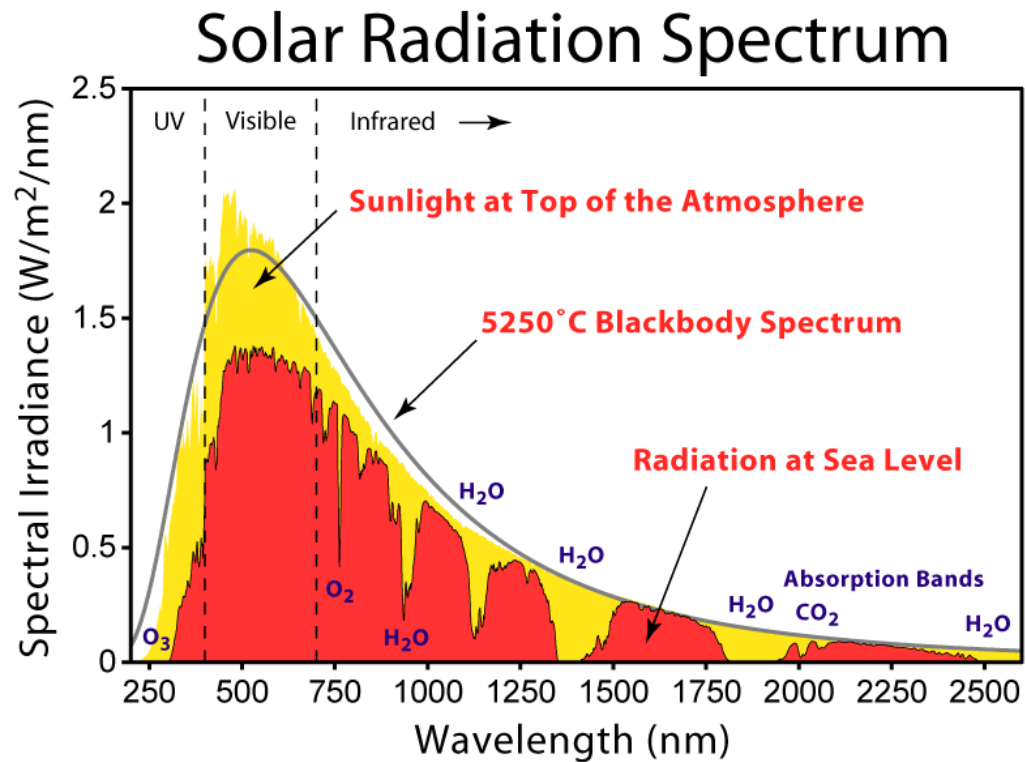
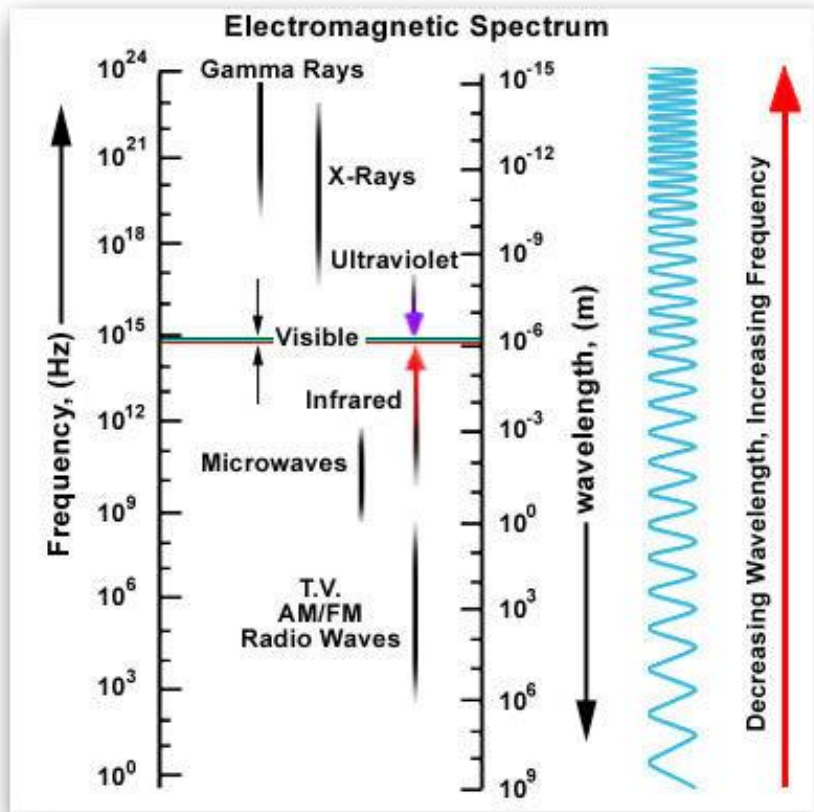
- rozsah je určen blízkým a dalekým bodem
- s rostoucím věkem akomodační schopnost čočky klesá (stařecká vetchozrakost)



- blízký bod (nejbližší bod, který vidíme ostře): dospělý člověk > 0.25 m, dítě ~ 0.1m
- daleký bod: ∞
- akomodační šíře zdravého oka: cca 4 D

Světelná mikroskopie – základní pojmy

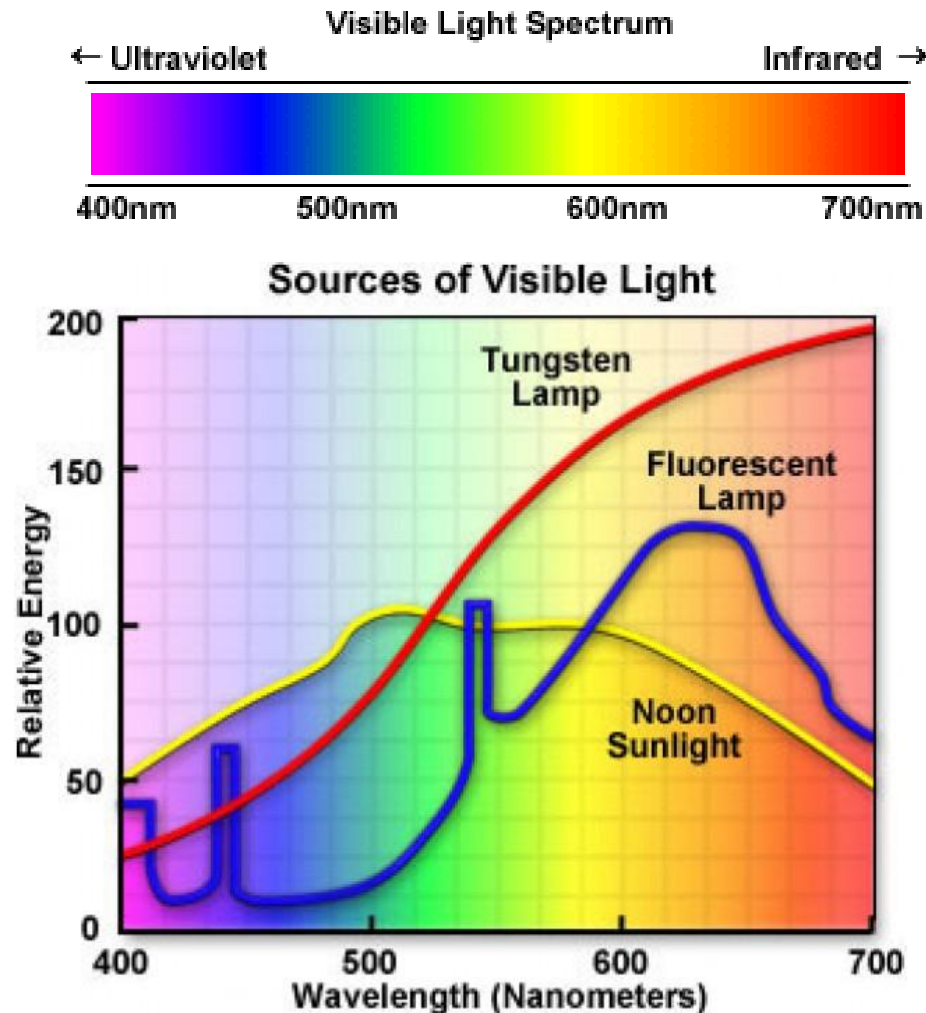
Spektrum elektromagnetického záření



Světelná mikroskopie – základní pojmy

Zdroje viditelného světla

- viditelná oblast (světlo – optika): λ v rozmezí 380 – 780 nm

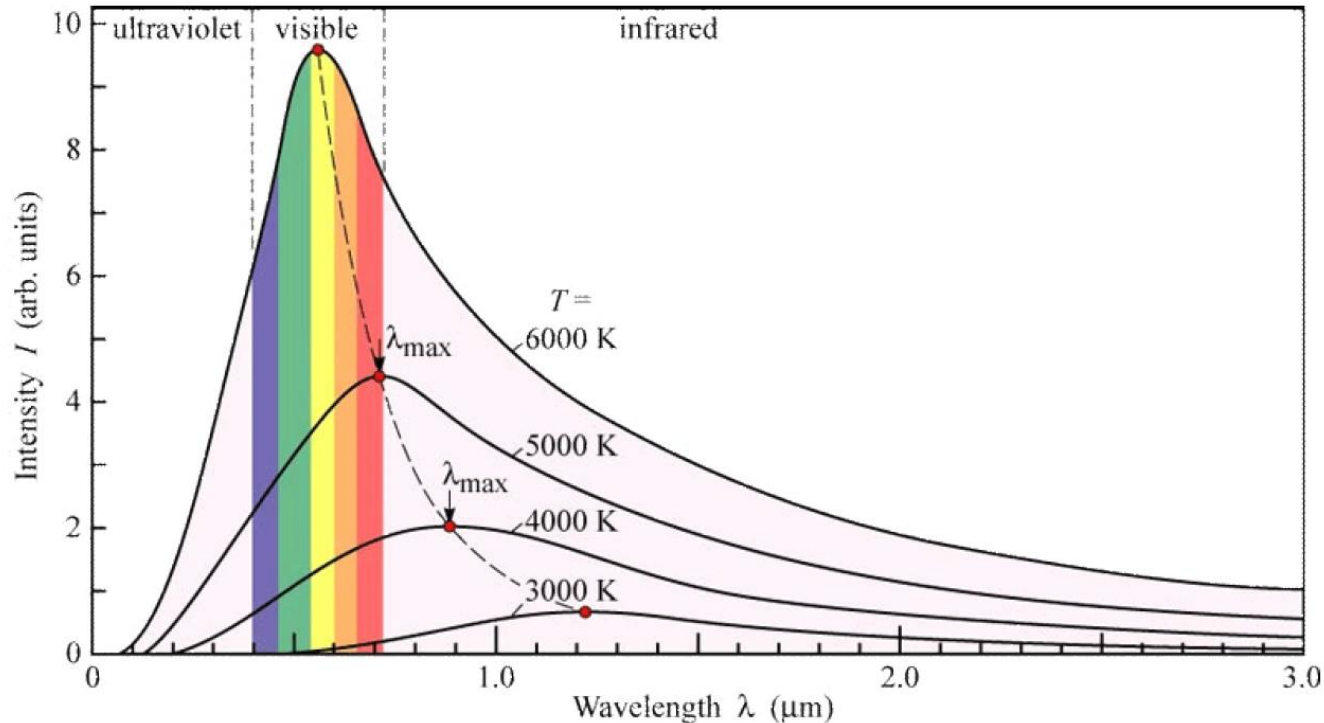


- světelná mikroskopie využívá převážně wolframové vlákno, příp. LED, výbojky

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Barevná teplota zdroje světla

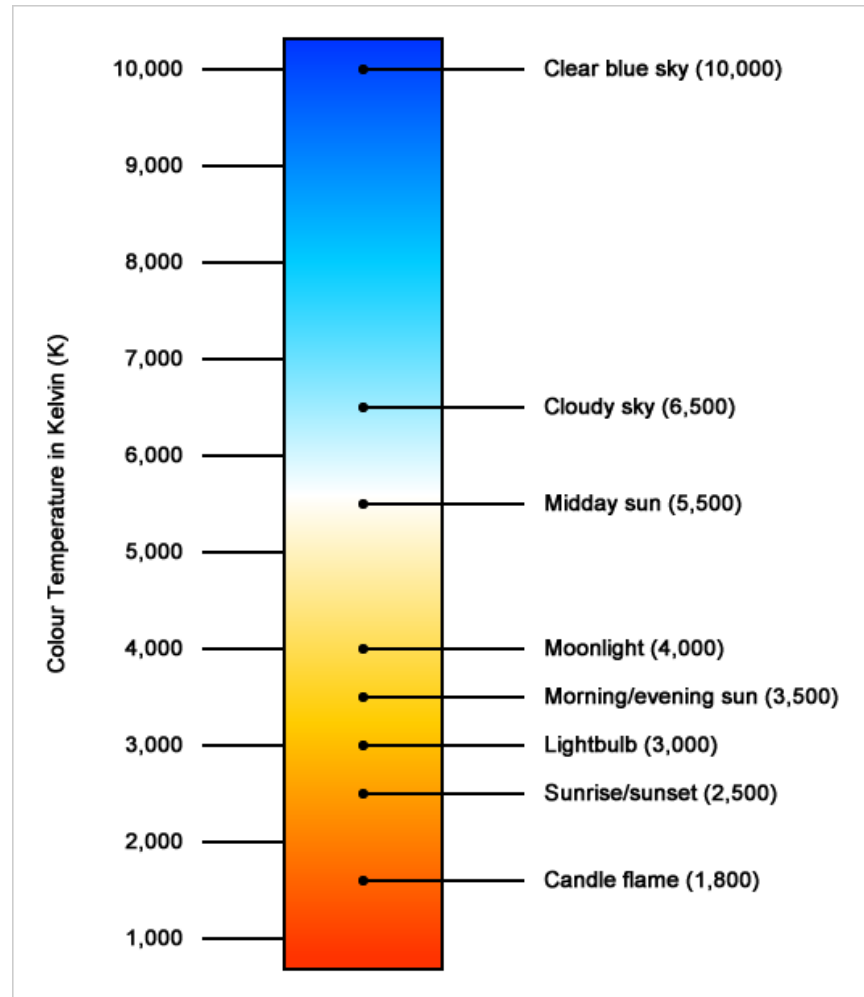
- Wienův „posunovací“ zákon: $\lambda_{\max} = b/T$ $b = 2.9 \times 10^{-3} \text{ m.K}$ (Wienova konst.)
 T – teplota tělesa [K]



- v záření absolutně černého tělesa je maximální energie vyzařována na vlnové délce, která se s rostoucí teplotou snižuje
- Wilhelm Wien obdržel za tento objev Nobelovu cenu za fyziku v roce 1911

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Barevná teplota zdroje světla

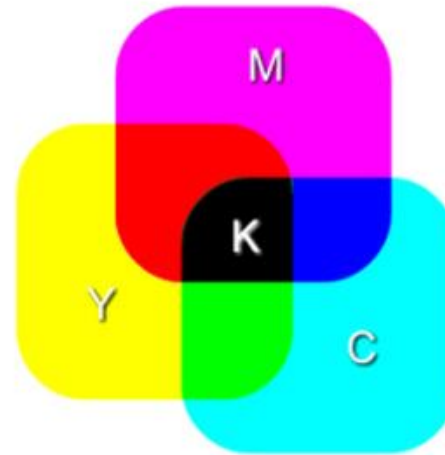
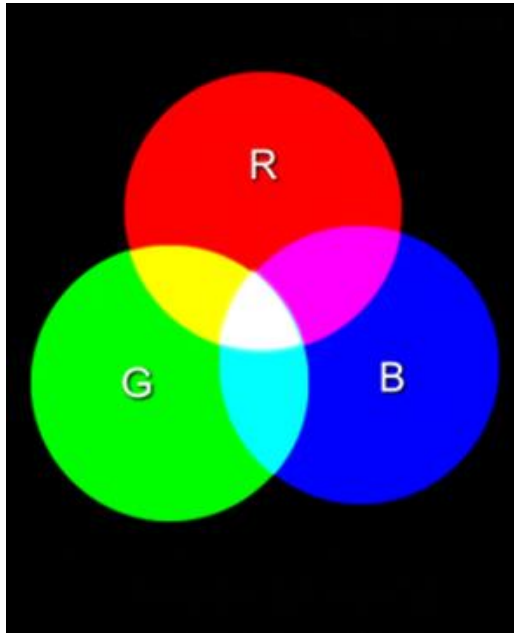


- většina světelných zdrojů u světelných mikroskopů (kromě fluorescenčních) používá wolframové vlákno
- vliv barevné teploty zdroje světla ve fotografické technice

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Vnímání barev lidským okem

- lidské oko obsahuje 3 druhy čípků – citlivost na červenou, zelenou a modrou (RGB)
- kombinací základních barev vnímáme všechny ostatní barvy



C (cyan) - azurová
M (magenta) - purpurová
Y (yellow) - žlutá
K (key) - černá

RGB – aditivní skládání barev (využíváno v zobrazovacích zařízeních)

- sčítáme jednotlivé složky barev, roste intenzita (jas)
- např. žlutou zobrazíme pomocí složení zelené a červené složky

CMYK – subtraktivní míchání barev (využíváno v tisku – 4 barevné náplně)

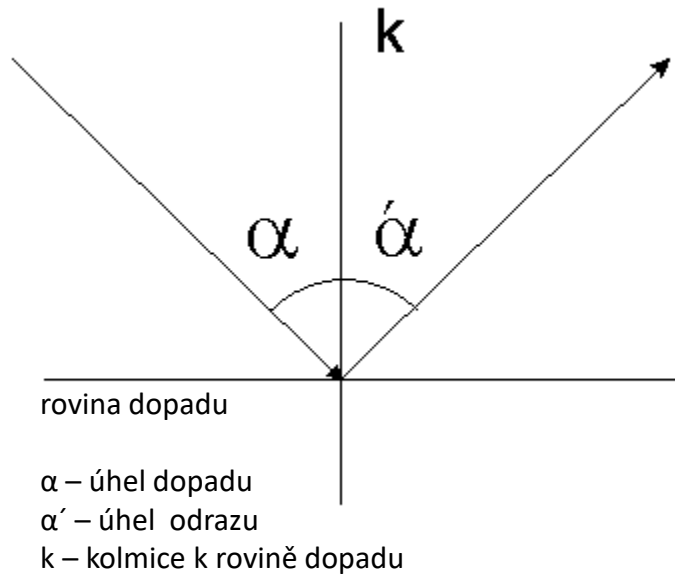
- z bílého světla odečítáme (filtrujeme) určité barevné složky
- např. žlutou vytiskneme pomocí toneru se žlutým pigmentem (absorbuje modrou složku)

Světelná mikroskopie – základní pojmy

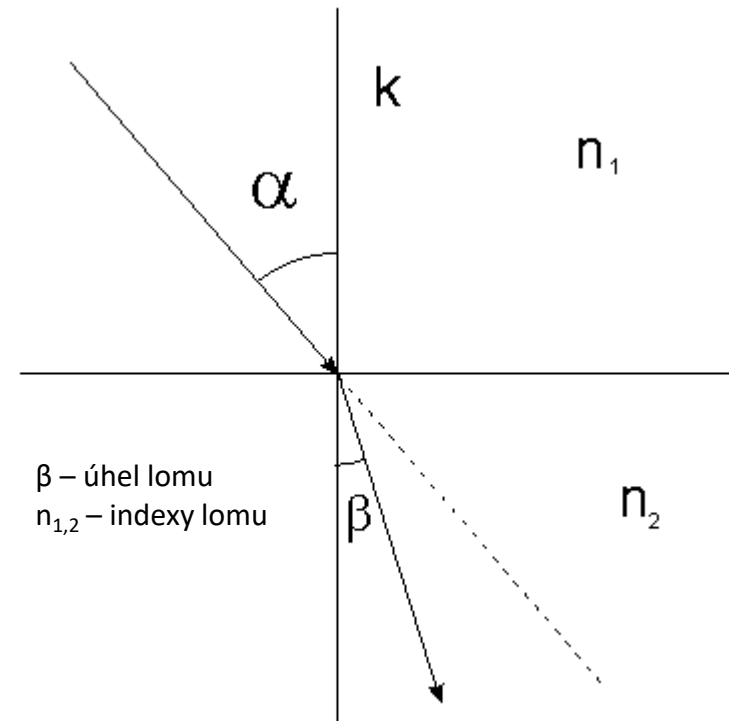
Odraz a lom světla

- k odrazu a lomu světla dochází při dopadu paprsků na rozhraní dvou prostředí s odlišnými optickými vlastnostmi

Odraz světla



Lom světla



Snellův zákon lomu:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta,$$

$$n = c / v,$$

c ... rychlost světla ve vakuu
 v ... rychlost světla v 2. prostředí

látka	vakuum	vzduch	voda	sklo	glycerol
n	1	1,00026	1,33	1,5-1,9	1,473

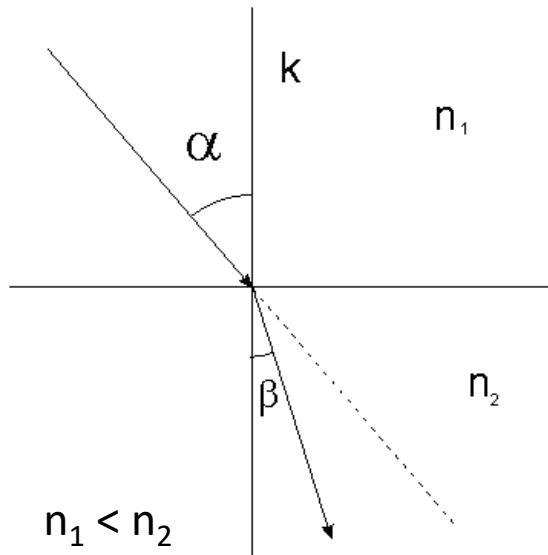
Světelná mikroskopie – základní pojmy

Odraz a lom světla

Rozdělení prostředí dle indexu lomu

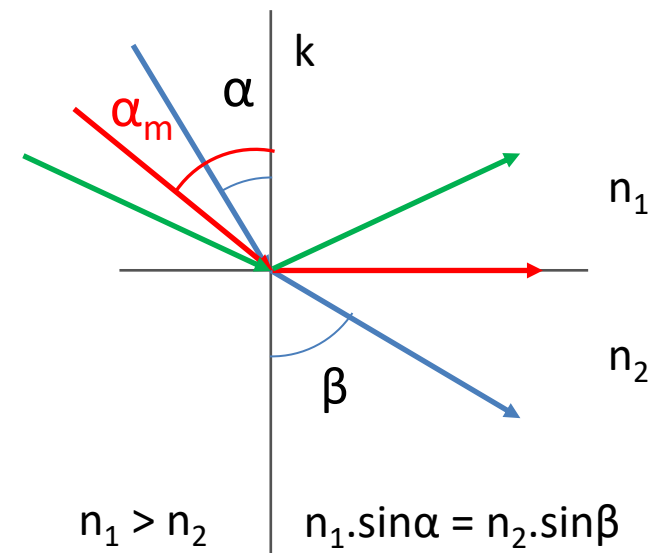
- opticky řidší (prostředí s menším indexem lomu)
- opticky hustší (prostředí s větším indexem lomu)

Lom paprsku ke kolmici



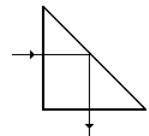
$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta$$

Lom paprsku od kolmice

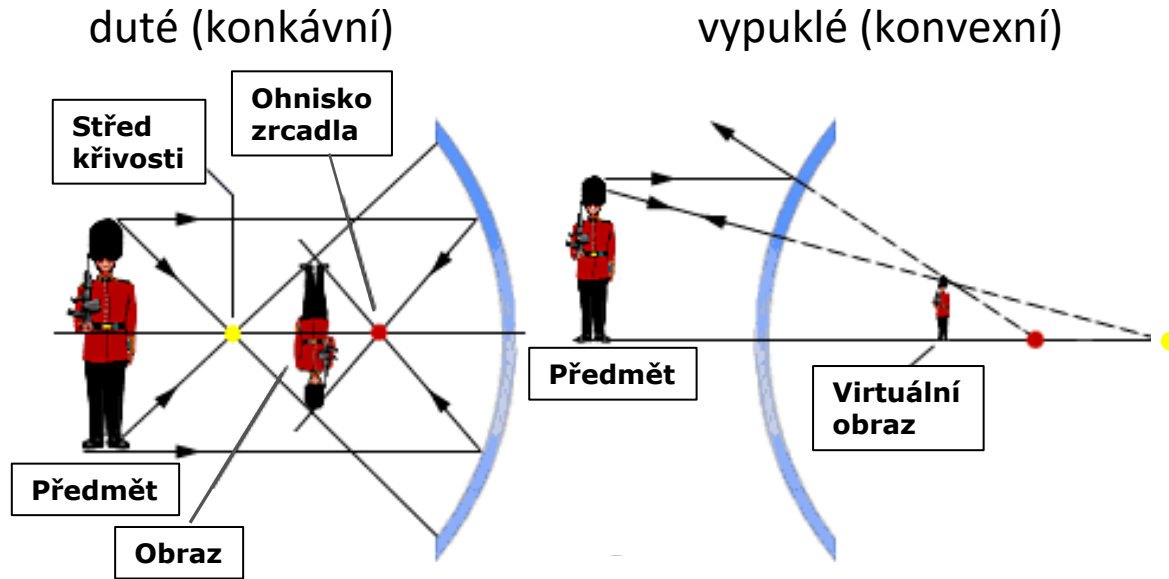


- s rostoucím úhlem dopadu α roste úhel lomu β
- α_m - **mezní úhel**, $\beta = 90^\circ$ (ještě dochází k lomu)
- $\alpha > \alpha_m$ – nastává **úplný odraz**

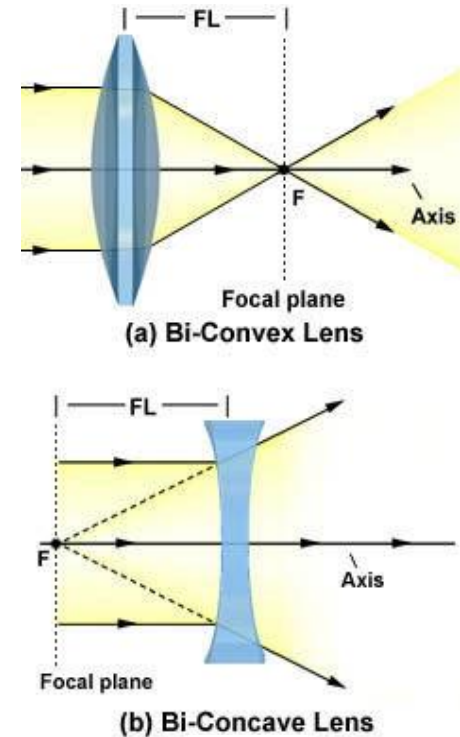
- využití úplného odrazu v konstrukci odrazných hranolů
rozhraní sklo - vzduch $\alpha_m = 42^\circ \Rightarrow$ při úhlu dopadu 45° nastává totální odraz



Odras světla zrcadlem



Lom světla čočkou



Konstrukce obrazu zrcadlem

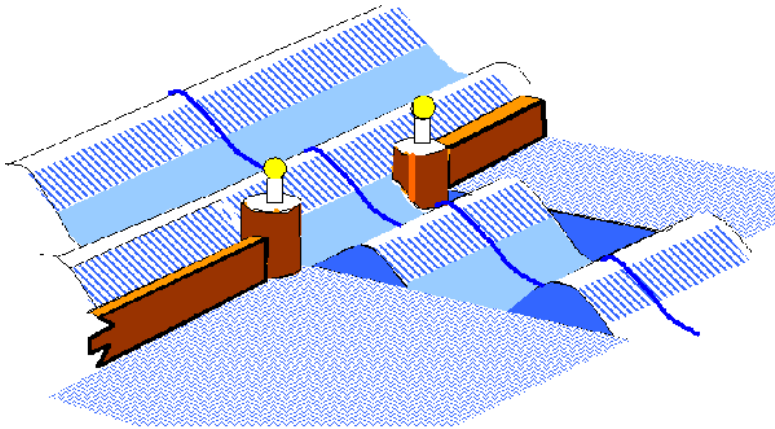
- Paprsek paralelní s optickou osou se odráží do ohniska
- Paprsek procházející ohniskem se odráží rovnoběžně s optickou osou
- Paprsek procházející středem křivosti se odráží po stejné dráze zpět
- obdobným způsobem dochází k lomu paprsků u čočky

Difrakce světla

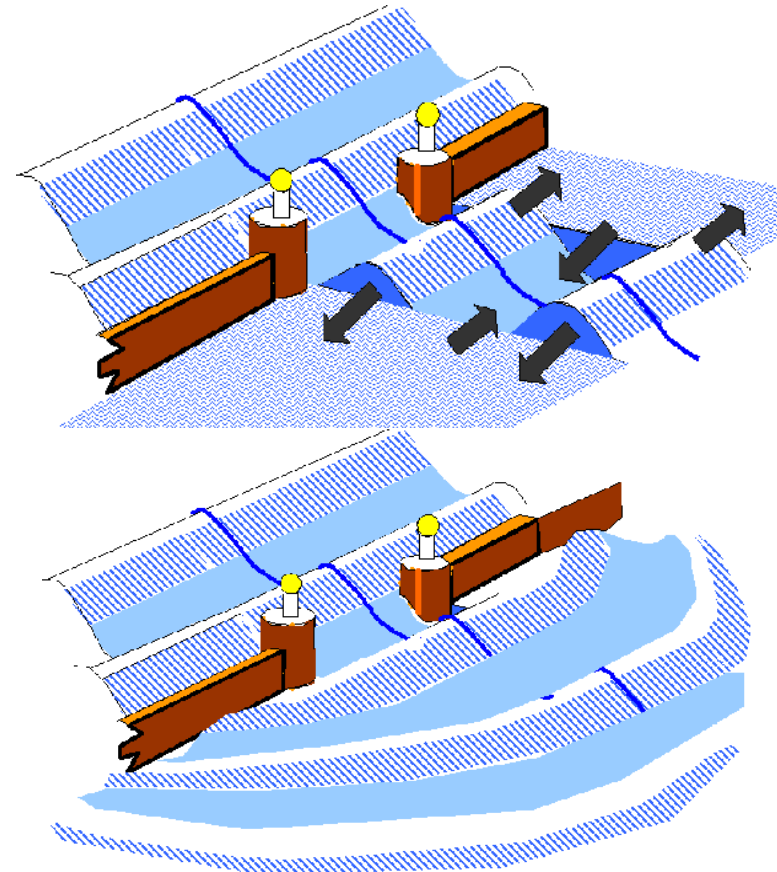
- k ohybu dochází, když vlnění při setkání s překážkou postupuje v jiných směrech, než ve směrech předvídaných zákony přímočarého šíření

Analogie difrakce světla s šířením mořských vln v přístavu

Nereálná situace



Reálná situace

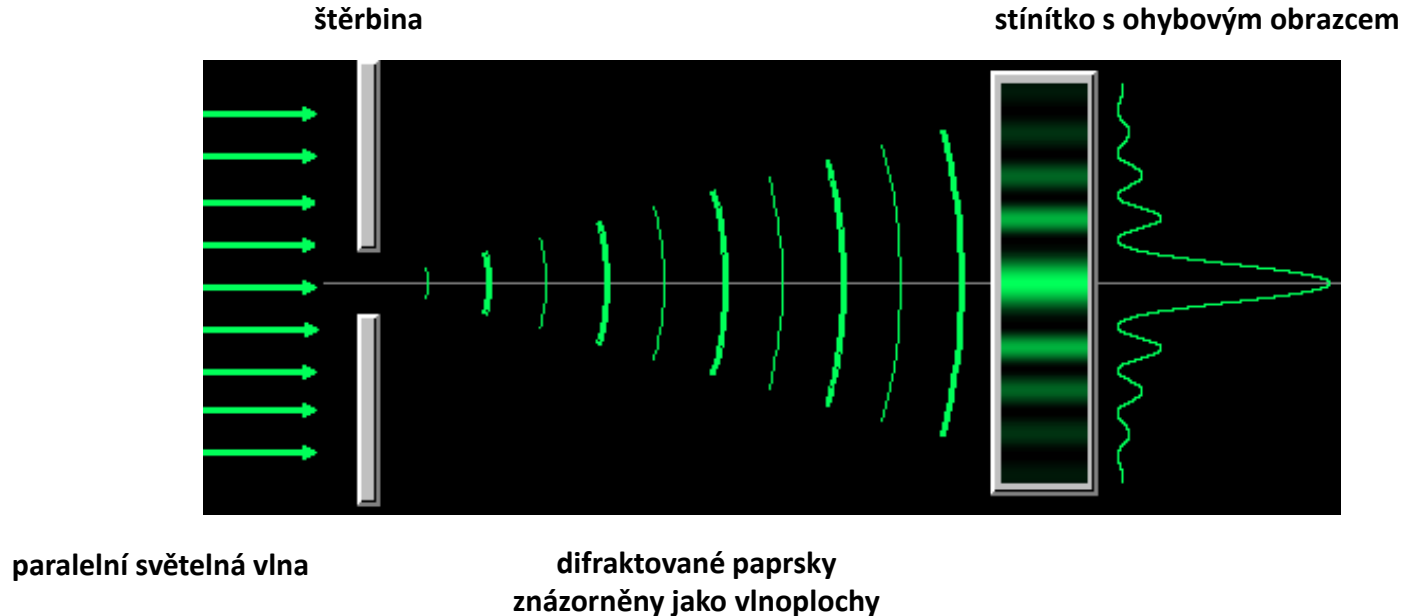


Difrakce světla

- k ohybu dochází, když vlnění při setkání s překážkou postupuje v jiných směrech, než ve směrech předvídaných zákony přímočarého šíření
- ohyb světla je **pozorovatelný**, jestliže rozměr překážky se blíží řádově vlnové délce použitého světla
- rozlišujeme:
 - (1) **Fresnelův ohyb** – pozorovaný na stínítku blízko překážky
 - (2) **Fraunhoferův ohyb** – pozorovaný na stínítku, kdy zdroj světla a stínítko jsou velmi vzdálené od překážky (v nekonečnu) $\Rightarrow$ paprsky pak lze považovat za **paralelní**

Difrakce světla

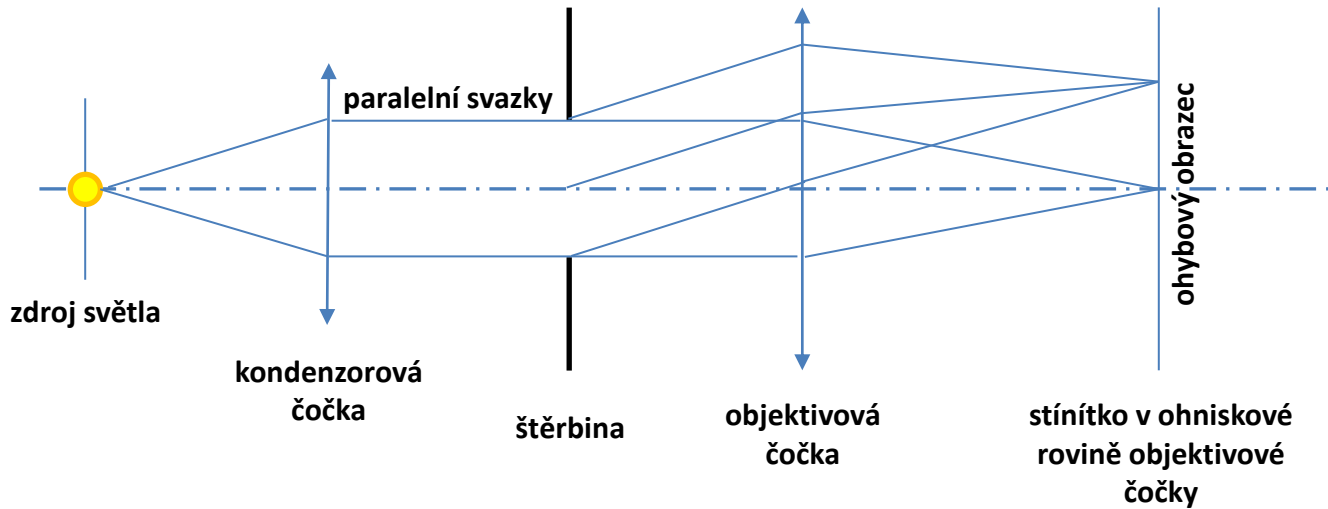
Fraunhoferův ohyb světelných paprsků na úzké štěrbině



- každý bod štěrbině se podle Huygensova principu stává zdrojem elementárního vlnění, které se z něho šíří v elementárních vlnoplochách i do prostoru za překážkou (oblast geometrického stínu)
- do každého bodu na stínítku pak dopadá světlo z každého bodu štěrbině
- osvětlením štěrbině koherentní vlnou vzniká na stínítku ohybový obrazec

Difrakce světla

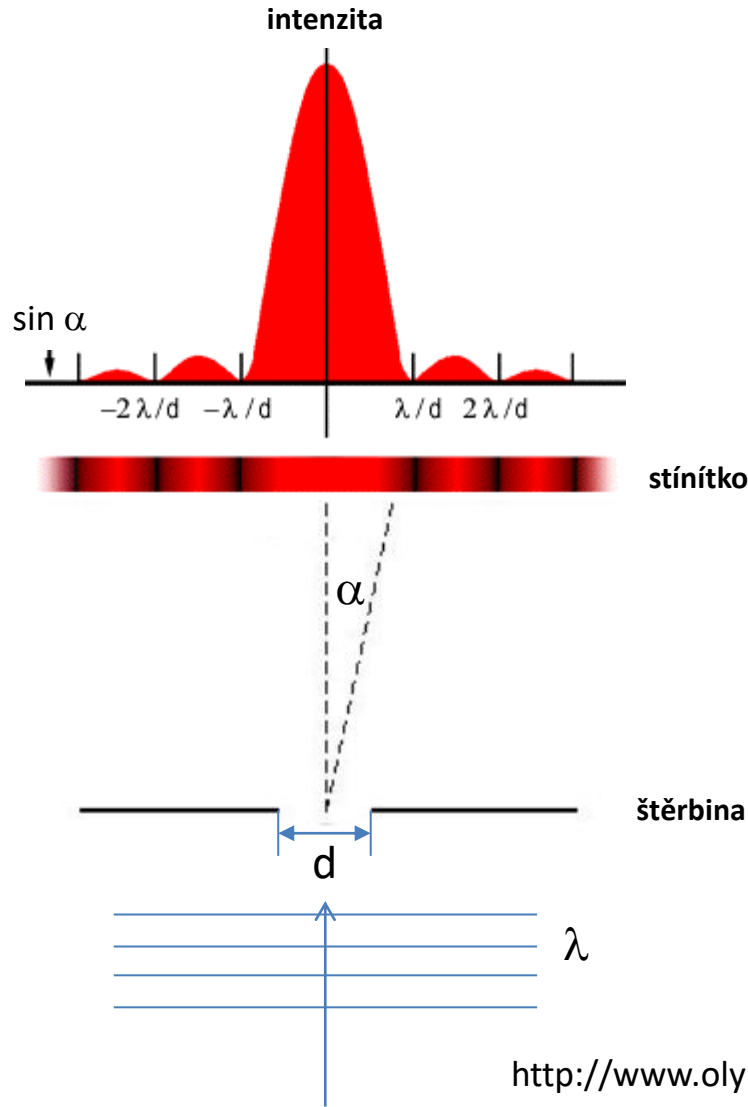
Pozorování Fraunhoferova ohybu - experimentální uspořádání optické soustavy



- splňuje podmínky vzdáleného zdroje světla (paralelní svazky) od štěrby díky kondenzorové čočce
- splňuje podmínky vzdáleného stínítka, na kterém je obraz tvořen paralelními svazky (díky objektivové čočce)
- experimentální uspořádání podobné konstrukci světelného mikroskopu $\Rightarrow$ při zobrazení předmětu (bodu) světelným mikroskopem se projeví i Fraunhoferův ohyb

Difrakce světla na úzké štěrbině

Ohyb světla na **úzké štěrbině** a vznik interferenčního obrazce na stínítku



Intenzita ohybového obrazce

$$I(\alpha) = I(0) \left(\frac{\sin \theta}{\theta} \right)^2, \quad \theta = \frac{\pi d}{\lambda} \sin \alpha$$

Podmínka minima:

$$I(\alpha) = 0 \Rightarrow \sin \theta = 0$$

$$\theta = k\pi = \frac{\pi d}{\lambda} \sin \alpha, \quad k = 1, 2, 3, \dots$$

$$\sin \alpha = k \frac{\lambda}{d}$$

míra ohybu závisí na velikosti štěrbině d i vlnové délce λ

Podmínka maxima:

$$\frac{d}{d\theta} \left(\frac{\sin \theta}{\theta} \right) = 0$$

pozice maxima uprostřed sousedních minim

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Difrakce světla na kruhovém otvoru

Ohyb světla na **kruhovém otvoru** (apertura objektivu světelného mikroskopu)

- Fraunhoferův ohyb omezuje rozlišovací mez světelného mikroskopu

Podmínka minima při ohybu světla na kruhovém otvoru:

- složité odvození (integrace přes kruhový otvor, výpočet zahrnuje Besselovy funkce 1.řádu)

$$\sin \alpha = 1.22 \frac{\lambda}{d}$$

α - úhlový poloměr prvního ohybového minima
(udává poloměr středové plošky ohybového obrazce)

d – průměr apertury

Pro velkou aperturu lze psát:

$$\alpha = 1.22 \frac{\lambda}{d}$$

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Interference světla

- fyzikální jev, který potvrzuje vlnovou povahu světla
- vzniká skládáním dvou nebo více světelných vlnění
- interference je pozorovatelná při skládání **koherentních** světelných vlnění

Popis vlnění: $y = A \sin \omega t$

ω - úhlová frekvence: $\omega = \frac{2\pi}{T} = 2\pi f$

perioda T a frekvence f pohybu: $\frac{1}{T} = f$

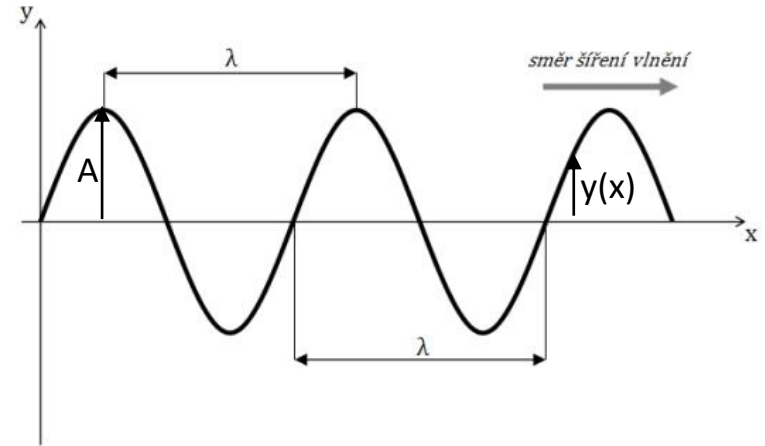
Popis vlny v libovolném bodě x ve směru šíření:

$$y(x) = A \sin \omega \left(t - \frac{x}{v} \right)$$

λ - vlnová délka vlnění : $\lambda = vT$

$$y = A \sin(\omega t - \varphi)$$

φ - fázový posuv vlnění: $\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} x = kx$



celková energie vlnění:

$$W = W_k + W_p = \frac{1}{2} m \omega^2 A^2$$

Intenzita vlnění (energie/plochu):

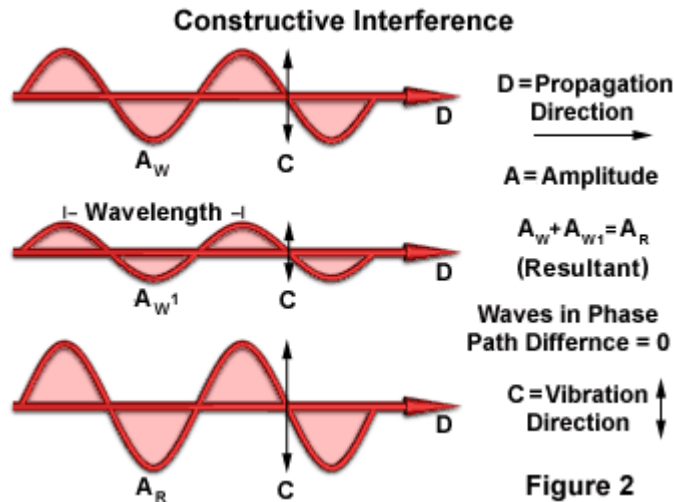
$$I = K A^2$$

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Interference světla

Koherentní vlnění – mají stejnou frekvenci a konstantní fázový rozdíl, který se v daném bodě prostoru s časem nemění

Fázový rozdíl dvou vlnění: $\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta l$, Δl ... dráhový rozdíl

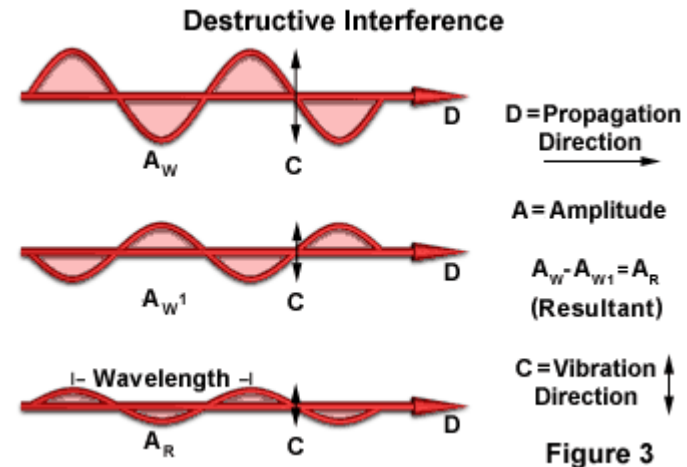


Vznik interferenčního maxima

$$\Delta l = 2k \frac{\lambda}{2}, k \in N_0$$

$$I = K(A_W + A_{W1})^2$$

$$A_W = A_{W1} \Rightarrow I = K4A_W^2$$



Vznik interferenčního minima

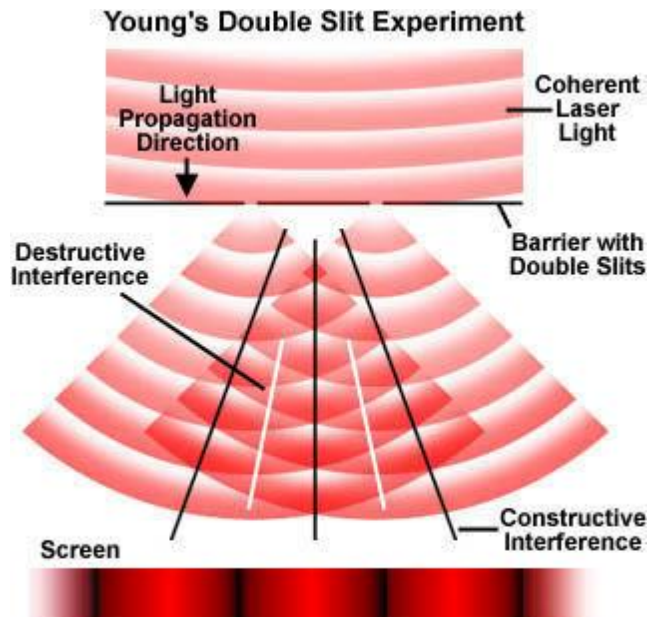
$$\Delta l = (2k + 1) \frac{\lambda}{2}, k \in N_0$$

$$I = K(A_W - A_{W1})^2$$

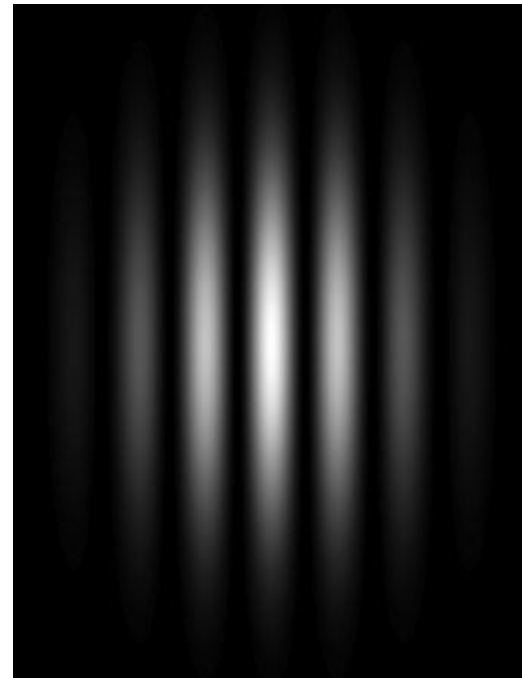
Interference světla

Youngův pokus (r. 1801)

- dokázal vlnovou povahu světla a vysvětlil proces interference světla



reálný interferenční obrazec



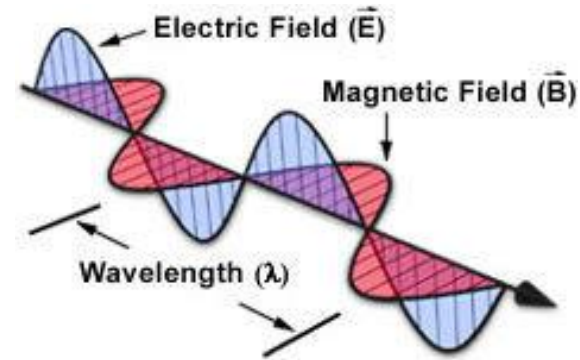
- dvojice úzkých štěrbin plní roli dvou zdrojů koherentního záření
- na stínítku dochází k interferenci světla

<https://www.youtube.com/watch?v=luv6hY6zsd0>

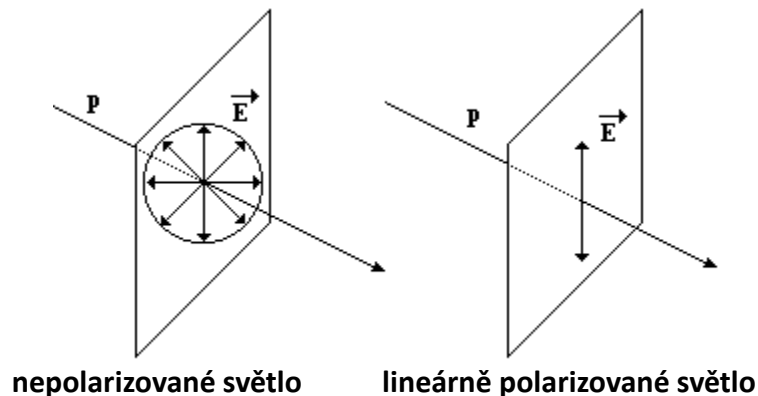
Světelná mikroskopie – základní pojmy

Polarizace světla

Světlo jako elektro (E) magnetické (B) vlnění



- vektory elektrické intenzity $\vec{E}$ a magnetické indukce $\vec{B}$ jsou kolmé vzájemně a ke směru šíření vlny
- bílé světlo (sluneční, žárovka, ...) je nepolarizované ($\vec{E}$ kmitá ve všech rovinách)
- polarizované světlo je vhodné pro studium opticky aktivních látek
 - polarizací bílého světla omezíme kmitání $\vec{E}$ do jedné roviny
- metody polarizace světla – odraz a lom světla, dvojlom, polarizační filtry

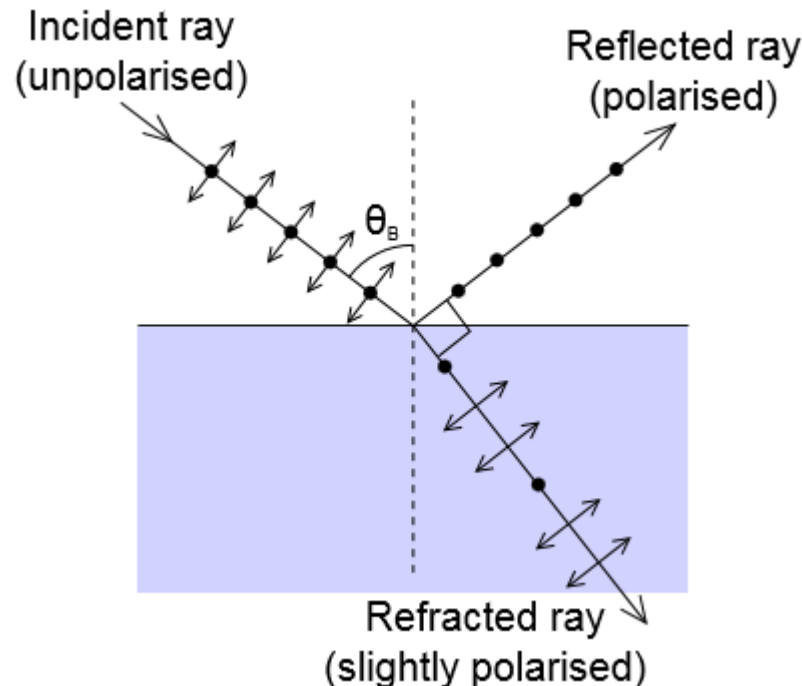


Světelná mikroskopie – základní pojmy

Polarizace světla odrazem

- nepolarizované světlo dopadá na rozhraní dvou opticky různých látek pod polarizačním úhlem – tzv. **Brewsterův úhel**
- odražený paprsek je dokonale polarizovaný v rovině kolmé k rovině dopadu
- odražený a lomený paprsek svírají úhel 90°
- pro Brewsterův úhel platí:

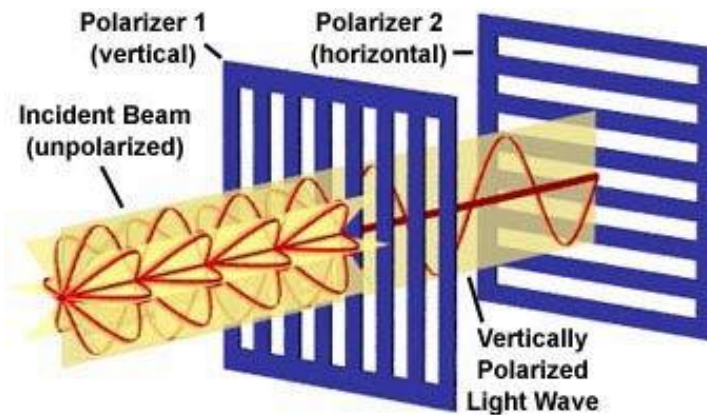
$$\tan \theta_B = \frac{n_2}{n_1}$$



Světelná mikroskopie – základní pojmy

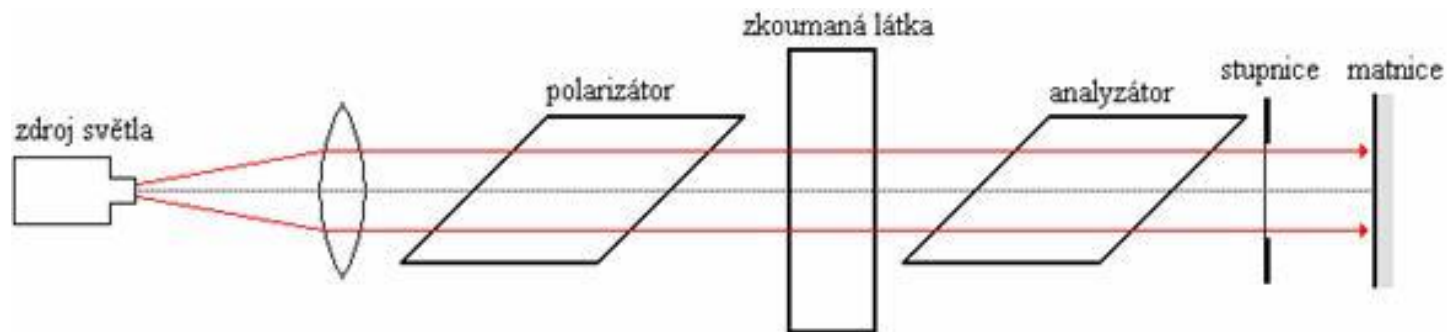
Polarizace světla

Zkřížené polarizátory



<http://www.olympusmicro.com/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>

Využití zkřížených polarizátorů u polarimetrů



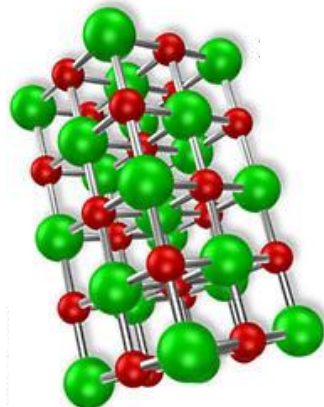
- výchozí nastavení bez vzorku – zkřížený polarizátor a analyzátor – tmavé zorné pole
- zkoumaná látka změní rovinu polarizace a rozjasní zorné pole na matnici
- otočením analyzátoru o daný úhel získáme opět tmavé pole
- úhel stočení je úměrný koncentraci opticky aktivní látky

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Dvojlom světla

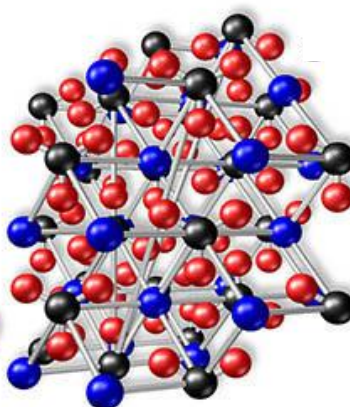
- lom světla na rozhraní dvou prostředí se řídí Snellovým zákonem $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta$
$$\frac{c}{v_1} \sin \alpha = \frac{c}{v_2} \sin \beta$$
- prostředí rozlišujeme:
 - opticky izotropní – rychlost šíření paprsku nezávisí na směru
 - index lomu se v dané látce nemění
 - opticky anizotropní – rychlost šíření závisí na směru a polarizaci
 - vykazují **dvojlom**, vzniká **řádný a mimořádný paprsek**
 - krystaly kromě krystalů kubické soustavy

izotropní



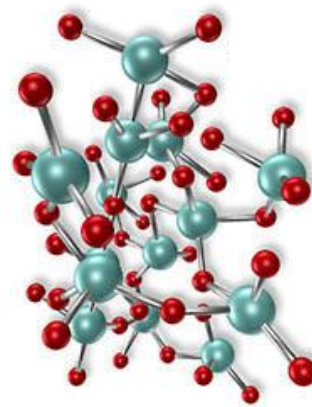
chlorid sodný

anizotropní



Islandský vápenec

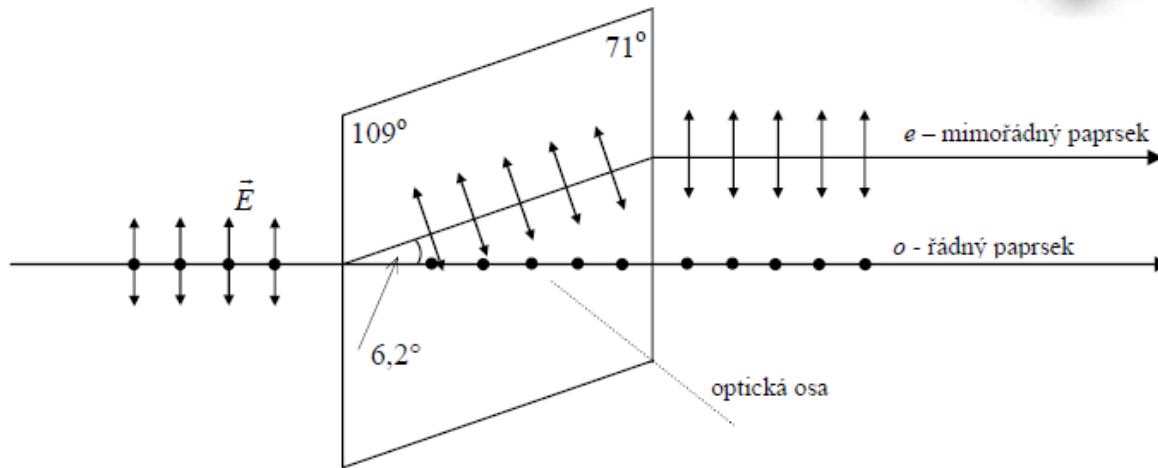
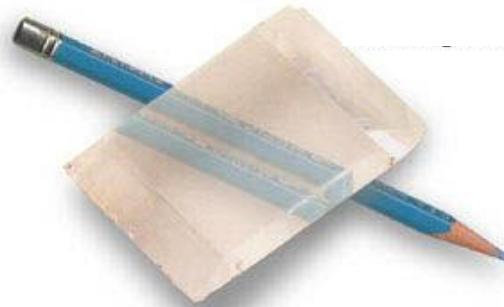
izotropní/anizotropní



polymer

Dvojlom světla

Islandský vápenec (klencová soustava)



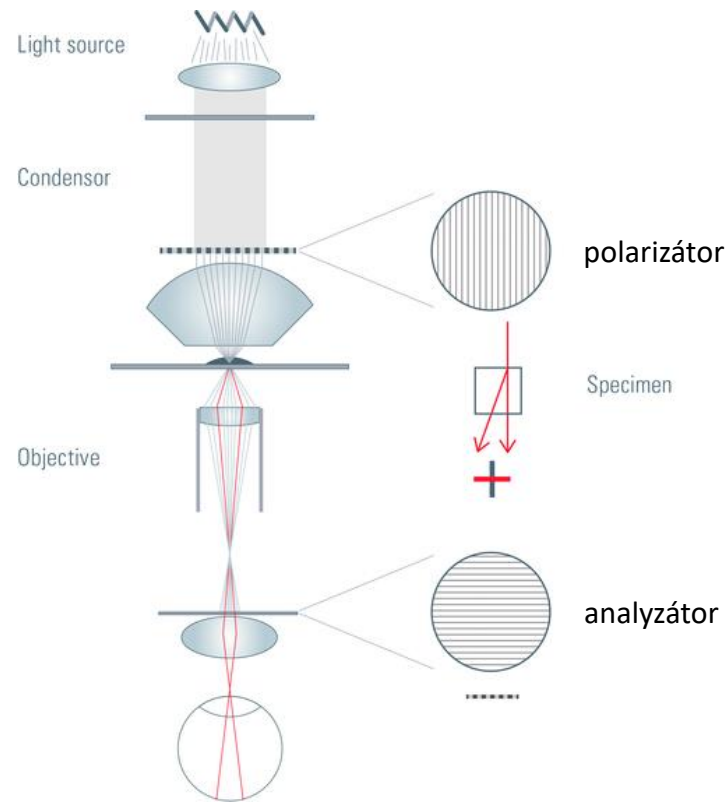
- při dopadu bílého světla na klenec dochází k polarizaci a vzniku dvou paprsků
- **řádný paprsek** – šíří se jako v izotropním prostředí (splňuje zákon lomu)
- **mimořádný paprsek** – neřídí se zákon lomu
- na výstupu jsou oba paprsky vzájemně posunuté a **rovnoběžné** (možná interference)
- **optická osa** – udává směr, ve kterém k dvojlomu nedochází

Světelná mikroskopie – základní pojmy

Dvojlom světla

Polarizační mikroskopie

- využívá kombinace světelného mikroskopu a polarimetru
- studium anizotropních krystalů (mineralogie), buněčných stěn, škrobových zrn (biologie)

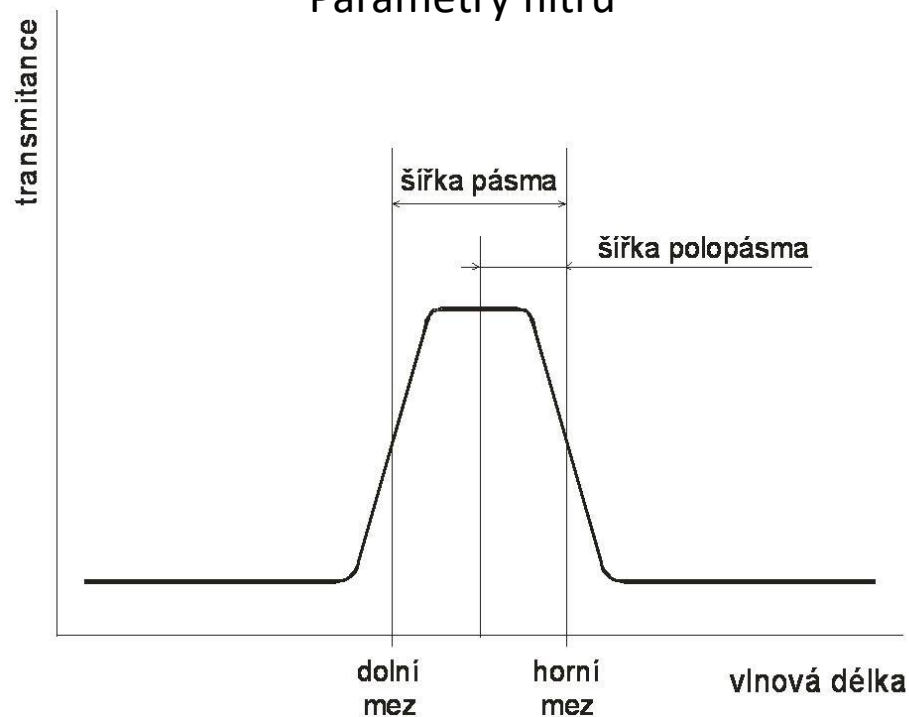


- polarizátor je ve zkřížené pozici s analyzátozem
- při dvojlomu jeden paprsek kmitá kolmo k polarizační rovině analyzátoru (neprojde) a druhý rovnoběžně s ní, projde a je detekován

Světelné filtry

- z širokého spektra viditelného světla propouští některé λ a selektivně absorbují nebo odrážejí nežádoucí λ
- „longpass“ filtry – propouští delší vlnové délky světla
- „shortpass“ filtry – propouští krátké vlnové délky
- „bandpass“ filtry – propouští světlo v daném intervalu vlnových délek

Parametry filtru



Světelná mikroskopie – základní pojmy

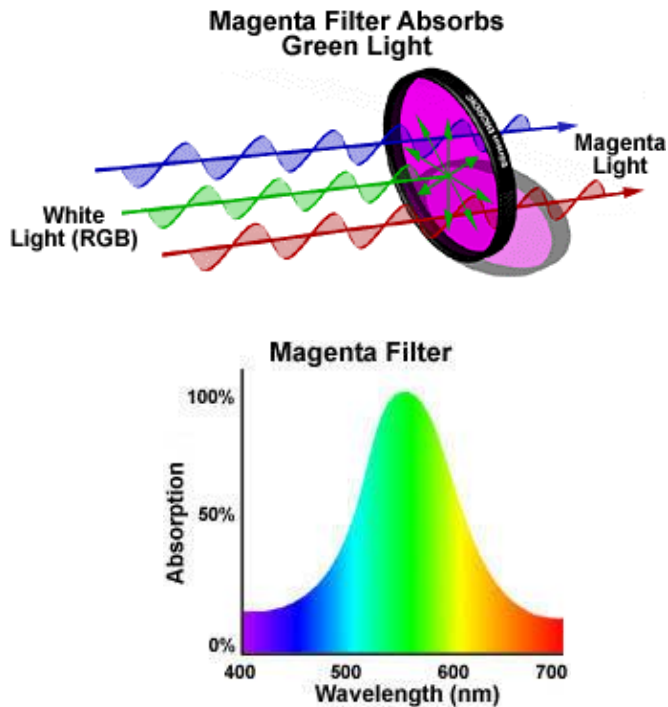
Světelné filtry

- rozlišujeme dva základní typy – **filtry absorpční a interferenční**

Absorpční filtry

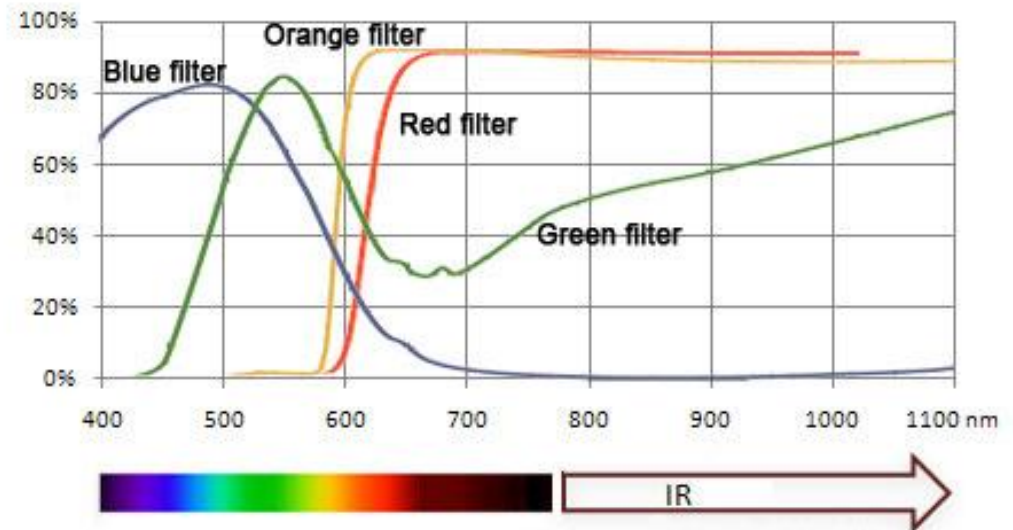
- barevná skla, želatinové vrstvy obarvené pigmenty, syntetické polymery

Příklad: fialový filtr – absorpce zelené složky, propouští až 90% červené a modré složky



absorpční spektrum

Propustnost barevných filtrů



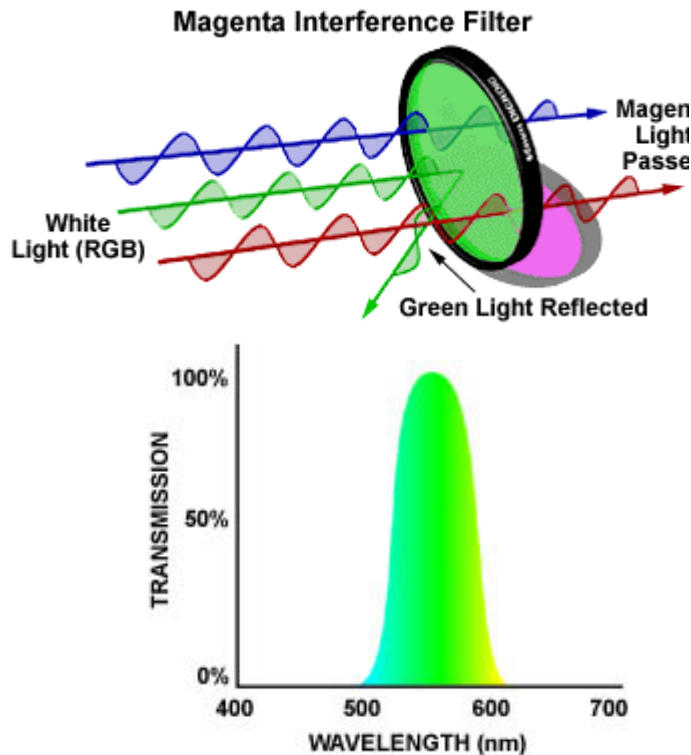
Světelná mikroskopie – základní pojmy

Světelné filtry

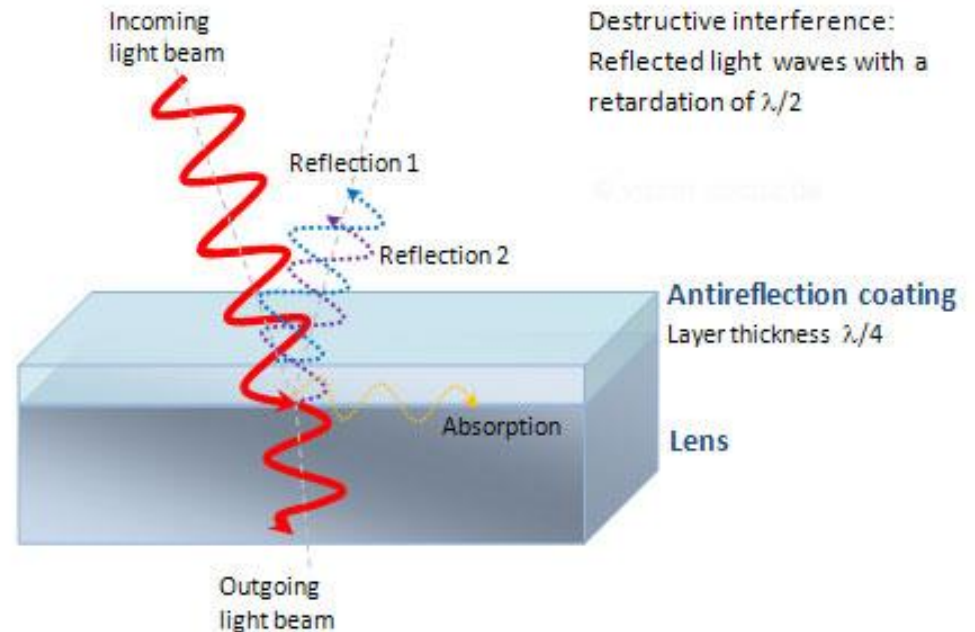
- rozlišujeme dva základní typy – **filtry absorpční a interferenční**

Interferenční filtry

- odrazem a vícenásobnou interferencí potlačují nežádoucí λ



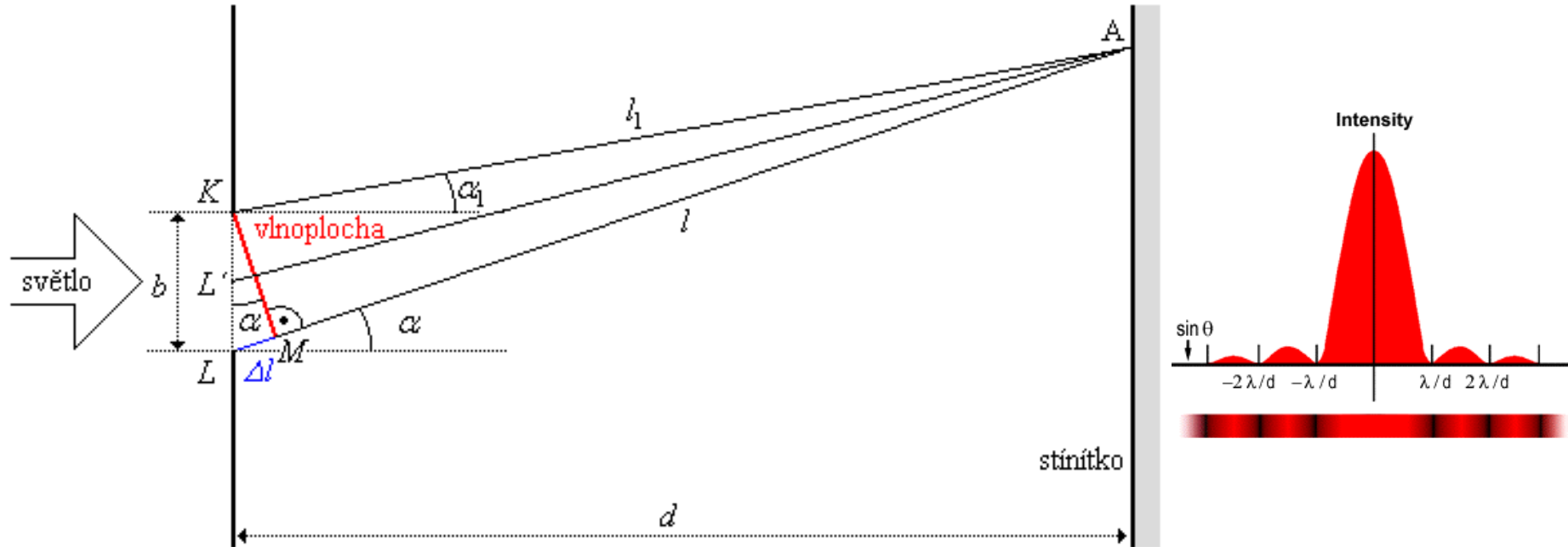
Principle of destructive interference



Dichroické filtry/zrcadla

- odráží světlo jedné bravy, propouští světlo druhé bravy
- používají se ve světelné mikroskopii (např. fluorescenční mikroskop)

Cvičení: Ohyb světla na úzké štěrbině – stanovení podmínek interferenčního max/min



Výsledek:

- vycházíme z: $\Delta l = b \cdot \sin \alpha$
- uvažujeme dvojice vln o dráhovém rozdílu $\Delta l/2$

Podmínka minima: $\Delta l/2 = (2k+1) \cdot \lambda/2 \Rightarrow \Delta l = 2 \cdot (2k+1) \cdot \lambda/2 = \text{sudé č. } \lambda/2 = k \lambda$

$$\Delta l = k \lambda \Rightarrow \sin \alpha = k \lambda / b$$

Podmínka maxima: $\Delta l = (2k+1) \cdot \lambda/2$