



**FAKULTA  
STROJNÍ  
ČVUT V PRAZE**

# **Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie**

**Návrh metodiky pro ověření přesnosti  
měření na digitálních mikroskopech**

**Design of a methodology for verifying the  
accuracy of measurements on digital  
microscopes**

**Diplomová práce**

**2021**

**Adam PELC**

<b>Studijní program:</b>	Výrobní inženýrství
<b>Studijní obor:</b>	Bez specializace
<b>Vedoucí práce:</b>	Ing. Jan Urban

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Pelc** Jméno: **Adam** Osobní číslo: **460012**  
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**  
Zadávající katedra/ústav: **Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie**  
Studijní program: **Výrobní inženýrství**  
Specializace: **Bez specializace**

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Návrh metodiky pro ověření přesnosti měření na digitálních mikroskopech**

Název diplomové práce anglicky:

**Design of a methodology for verifying the accuracy of measurements on digital microscopes**

Pokyny pro vypracování:

- 1) Princip funkce a oblasti využití digitálních mikroskopů v průmyslu.
- 2) Volba popř. návrh vhodného etalonu pro ověření přesnosti digitálních mikroskopů
- 3) Tvorba metodiky pro ověření přesnosti vybraných digitálních mikroskopů
- 4) Ověření navrhované metodiky

Seznam doporučené literatury:

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

**Ing. Jan Urban, ústav technologie obrábění, projektování a metrologie FS**

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **30.04.2021** Termín odevzdání diplomové práce: **29.07.2021**

Platnost zadání diplomové práce: \_\_\_\_\_

Ing. Jan Urban  
podpis vedoucí(ho) práce

Ing. Libor Beránek, Ph.D.  
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.  
podpis děkana(ky)

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

\_\_\_\_\_  
Datum převzetí zadání

\_\_\_\_\_  
Podpis studenta

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem: „Návrh metodiky pro ověřování přesnosti měření na digitálních mikroskopech“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jana Urbana s použitím literatury, uvedené na konci mé diplomové práce v seznamu použité literatury.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval Ing. Janu Urbanovi za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání diplomové práce.

## ANOTACE

Jméno autora:	<b>Pelc Adam</b>
Název diplomové práce:	Návrh metodiky pro ověřování přesnosti měření na digitálních mikroskopech
Název anglicky:	Design of a methodology for verifying the accuracy of measurements on digital microscopes
Rok zpracování:	2021
Ústav:	Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie
Vedoucí bakalářské práce:	Ing. Jan Urban
Bibliografické údaje:	Počet stran: 101 Počet obrázků: 66 Počet tabulek: 63 Počet grafů: 4 Počet příloh: 26
Klíčová slova: Keywords:	Mikroskop, digitální, ověření, přesnost, měření Microscope, digital, verification, accuracy, measurements

Anotace: Cílem diplomové práce je navrhnout metodiku ověření přesnosti měření digitálními mikroskopy a její následné ověření. Návrh metodiky zahrnuje i volbu vhodných etalonů k samotnému ověření.

Abstrakt: The purpose of diploma thesis is to design a methodology for verifying the accuracy of measurements with digital microscopes and its subsequent verification. The design of a methodology also includes the selection of suitable standards for the verification itself.

1. Úvod.....	3
2. Světelné paprsky a jejich pozorování.....	4
2.1. Co je světlo? .....	4
2.2. Rychlost šíření světla .....	5
2.2.1. Šíření světla mimo vakuum .....	6
2.3. Paprskový (částicový) model světla .....	7
2.4. Zákon odrazu .....	8
2.4.1. Rohový reflektor.....	9
2.5. Zákon lomu.....	10
2.6. Zobrazování pomocí zrcadel.....	12
2.7. Zobrazování pomocí čoček .....	15
2.7.1. Oko.....	17
3. Světelná mikroskopie.....	18
3.1. Osvětlovací prvky mikroskopu.....	18
3.2. Köhlerovo osvětlení při spodním osvitu .....	19
3.3. Köhlerovo osvětlení v reflexní mikroskopii .....	21
3.4. Numerická apertura rozlišení a hloubka ostrosti.....	22
3.5. Optické prvky mikroskopu.....	28
3.5.1. Objektivy.....	29
3.5.1.1. Vady objektivů a čoček.....	31
3.5.2. Okuláry.....	34
3.6. Tvorba obrazu v mikroskopu.....	35
4. Digitální mikroskopie.....	38
4.1. Architektura světelného senzoru.....	38
4.2. CCD a CMOS.....	41
4.3. Barevná vs monochromatická kamera .....	42
4.4. Parametry kamer .....	43
4.4.1. Velikost pixelu.....	43
4.4.2. Snímkovací frekvence .....	45
4.4.3. Spektrální odezva .....	45
4.4.4. Dynamický rozsah.....	45
4.4.5. Šum ze čtení signálu .....	46
4.4.6. Temný šum .....	46
4.5. Výhody digitální mikroskopie a porovnání s optickou .....	47
5. Přehled vybraných metod v mikroskopii.....	47

5.1.	<i>Mikroskopie s využitím temného pole</i> .....	47
5.2.	<i>Mikroskopie s polarizovaným světlem</i> .....	48
5.3.	<i>Diferenciální interferenční kontrast (DIC)</i> .....	50
5.4.	<i>Konfokální mikroskopie</i> .....	51
6.	<i>Ověření přesnosti měření rovinných rozměrů</i> .....	54
6.1.	<i>Použité mikroskopy a jejich parametry</i> .....	54
6.2.	<i>Použité etalony</i> .....	57
6.3.	<i>Naměřené hodnoty</i> .....	58
6.3.1.	<i>Měření rovinných rozměrů při zvětšení do x200</i> .....	58
6.3.2.	<i>Pravítko Olympus x200</i> .....	59
6.3.3.	<i>Skleněné pravítko x50</i> .....	63
6.3.4.	<i>Skleněné pravítko x100</i> .....	64
6.3.5.	<i>Skleněné pravítko x200</i> .....	66
6.3.6.	<i>Skleněné pravítko x200 – sešívavý obraz</i> .....	67
6.3.7.	<i>Ověření přesnosti měření rozměrů na sešitém obraze při vysokém rozlišení</i> ....	68
6.3.8.	<i>Ověření přesnosti měření na nesešitém obraze při vysokém rozlišení</i> .....	71
6.4.	<i>Analýza dat získaných měřením rovinných rozměrů</i> .....	73
6.5.	<i>Komentář k naměřeným datům</i> .....	77
7.	<i>Ověření přesnosti měření prostorových rozměrů</i> .....	77
7.1.	<i>Použité mikroskopy a jejich parametry</i> .....	78
7.2.	<i>Použité etalony</i> .....	78
7.3.	<i>Naměřené hodnoty</i> .....	79
7.3.1.	<i>Měření na závitovém kalibru M11 x 1 - 6h</i> .....	79
7.3.2.	<i>Měření na závitovém kalibru M30 – 6h</i> .....	82
7.4.	<i>Analýza dat získaných měřením prostorových rozměrů</i> .....	83
7.5.	<i>Komentář k naměřeným datům z měření v prostorových obrazech</i> .....	86
8.	<i>Ověření přesnosti měření drsnosti povrchu</i> .....	87
8.1.	<i>Použité mikroskopy a jejich parametry</i> .....	87
8.2.	<i>Použité etalony</i> .....	88
8.3.	<i>Naměřené hodnoty</i> .....	90
8.3.1.	<i>Měření drsnosti na soustruženém povrchu</i> .....	90
8.3.2.	<i>Měření drsnosti na frézovaném povrchu</i> .....	92
8.3.3.	<i>Měření drsnosti na skleněném etalonu</i> .....	94
8.4.	<i>Analýza dat získaných při měření drsnosti povrchu</i> .....	95
8.5.	<i>Komentář k datům z měření drsnosti povrchu</i> .....	96

9.	<i>Ukázka výpočtu rozšířených nejistot.....</i>	<i>96</i>
10.	<i>Popis navržené metodiky ověření přesnosti měření.....</i>	<i>98</i>
11.	<i>Závěr.....</i>	<i>100</i>
12.	<i>Seznam obrázků.....</i>	<i>102</i>
13.	<i>Seznam grafů.....</i>	<i>104</i>
14.	<i>Seznam tabulek.....</i>	<i>105</i>
15.	<i>Seznam příloh.....</i>	<i>107</i>
16.	<i>Seznam použité literatury.....</i>	<i>108</i>
17.	<i>Přílohy.....</i>	<i>111</i>





## 1. Úvod

Optické mikroskopy prošly v poslední dekádě obrovskými inovacemi. V porovnání se svými předchůdci jsou schopny dosahovat vyšších hodnot zvětšení a lepšího rozlišení. Tento technologický pokrok se týká všech jejich částí. Mezi hlavní prvky, které prošly podstatnými inovacemi, patří optické elementy v optické trase, jako jsou objektivy, okuláry a další čočky.

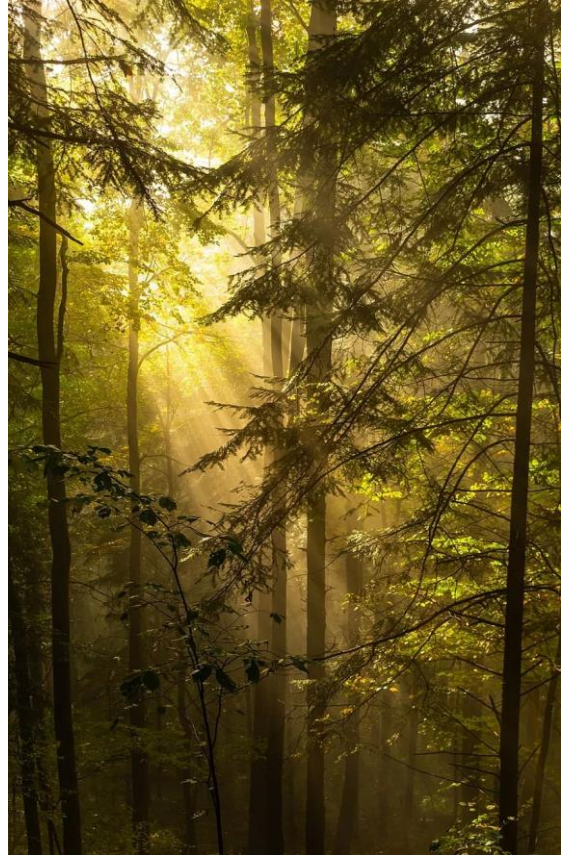
Nelze opomenout pokrok v oboru digitální mikroskopie, ke kterému nejvíce přispěly inovace v oblasti kamerových čipů, ať už mluvíme o CCD nebo sCMOS čipech. Díky těmto inovacím jsme schopni digitálními optickými mikroskopy zaznamenat obraz s vyšším rozlišením, než kdybychom obraz pozorovali pouhým okem. Obrazy zachycené pomocí čipů vyrobených moderními technologiemi dosahují takového rozlišení, že je s klidným srdcem můžeme promítat na monitory s rozlišením 4K UHD.

Jelikož optické digitální mikroskopy jsou nástroje určené primárně k pozorování povrchu vzorku, a ne k měření rozměrů, je funkce měření rozměrů na vzorku spíše doplňková. V technických oborech se čím dál častěji objevuje otázka, jestli je možné s digitálními optickými mikroskopy měřit rozměry s přesností, která se alespoň přibližuje dotykovým metodám. V této diplomové práci je navržena metodika k ověření přesnosti měření digitálními mikroskopy a dále pomocí této metodiky je přesnost měření ověřena. Protože jsou ověřované mikroskopy vybaveny funkcí sešívání dílčích obrazů i v ose Z, je v této práci navržena metodika i pro měření na 3D obrazech. Díky této funkci jsou digitální mikroskopy schopny měřit například drsnost povrchu nebo jiné parametry, které není možné vyhodnotit z 2D snímku vzorku.

Téma této diplomové práce bylo zvoleno z důvodu vlastního zájmu o získání odpovědí v oblasti přesnosti měření digitálními mikroskopy v technických aplikacích.

## 2. Světelné paprsky a jejich pozorování

Tvorba obrazu je pro lidi jedním z nejvíce fascinujících emočních zážitků. Dokonce už ve starověku si lidé uvědomovali, že „vidění“ je výsledkem přímočarého šíření světelných paprsků. K tomuto názoru dospěli lidé při pozorování ostrých stínů za osvětlenými objekty. Přímocharé šíření světla může být ovlivněno určitými optickými prvky, například zrcadly nebo čočkami. Úspěšné objevy a výzkumy dánského astronoma Tycha Braheho (1546-1601), původním jménem Tyge Ottesen Brahe. [1] Ohledně geometrické optiky vedly k následnému návrhu a konstrukci zvětšovací čočky, mikroskopů a dalekohledů. Všechny tyto nástroje slouží jako pomůcka k vidění. Díky jejich pomoci jsme dospěli k dalšímu porozumění přírodních věd, protože umožnily pozorování věcí kolem na mikro – a makro-úrovni. [2] Není tedy náhodou, že jejich funkce měla obrovský vliv na mnoho odvětví přírodních věd.

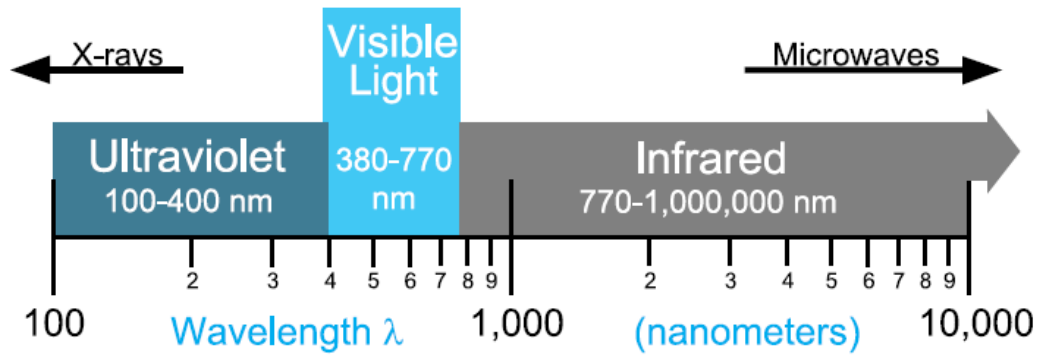


*Obrázek 1 Paprsky světla [3]*

Dokonce i tak obrovský nástroj, kterým je Velký hadronový urychlovač (Large hadron collider - L.H.C.), což je k dnešnímu datu největší urychlovač částic na světě, není nic jiného než velmi propracovaný mikroskop, pomocí kterého jsme schopni pozorovat svět elementárních částic s rozlišením vyšším, než je velikost jádra atomu. Velmi významnou roli pro lidstvo hraje také optika z pohledu vlny, díky které začal vývoj kvantové mechaniky. [2]

### 2.1. Co je světlo?

Obecně uznávaným trendem je popisování světla pomocí teorie elektromagnetického vlnění, světlo je tedy část spektra elektromagnetických vln, která se pohybuje prostorem a je viditelná lidským okem. Elektromagnetické spektrum zastupuje extrémně široký rozsah vlnových délek. Od rádiových vln s vlnovou délkou jednoho metru a více až po rentgenové záření s vlnovými délkami do jednoho pikometru. Na obrázku 2 jsou graficky znázorněny vlnové délky elektromagnetického spektra, kde vlnová délka roste zleva doprava. Viditelné spektrum (380 nm - 770 nm) je znázorněné bleděmodrým blokem.[4]



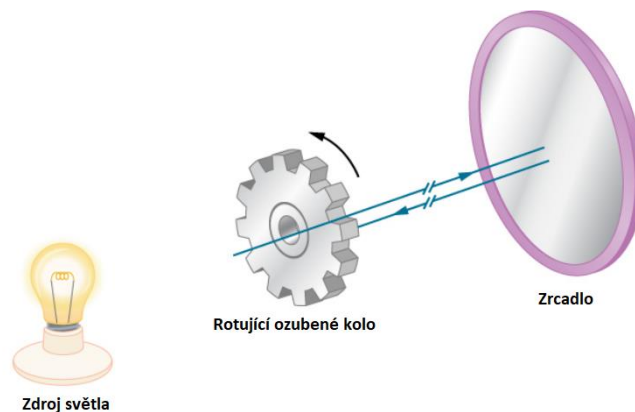
Obrázek 2 Viditelná část elektromagnetického spektra [4]

Při vlnových délkách rentgenového záření a menších má elektromagnetické záření tendenci se chovat více jako částice. Zatímco na druhé straně spektra má při vyšších vlnových délkách tendenci se chovat spíše jako vlnění. Viditelná část tohoto spektra leží zhruba ve střední části a vykazuje jak vlnové, tak i částicové chování. [4]

Stejně jako všechny elektromagnetické vlny, i ty světelné mohou interferovat jedna s druhou. Mohou být polarizovány a na ostré hraně může dojít k jejich ohybu. Zmíněné vlastnosti způsobují, že světlo může být filtrováno dle vlnové délky nebo koherentně zesílené. Ke stejnému jevu dochází i v laseru. [4]

## 2.2. Rychlost šíření světla

První úspěšný pokus o změření rychlosti světla čistě na zemi byl proveden Armandem Fizeauem (1819-1896) v roce 1849. Pokus spočíval v umístění ozubeného kola, které se velmi rychle otáčelo na jeden vrchol kopce a zrcadla na druhý vrchol kopce. Obě místa byla vzdálena 8 kilometrů. Za ozubené kolo byl umístěn silný zdroj světla. Princip pokusu je na obrázku 3. [5]



Obrázek 3 Princip pokusu [5]

Rotující ozubené kolo tedy rozdělilo paprsky ze zdroje světla na sled pulzů. Rychlost rotace ozubeného kola byla postupně zvyšována, dokud pozorovatel za ozubeným kolem neregistroval žádné zrcadlem odražené světlo. Tento jev mohl nastat pouze tehdy, kdy zub kola zastoupil mezeru, kterou prošel směrem k zrcadlu původní paprsek světla. Ze znalosti rychlosti rotace ozubeného kola, počtu zubů na kole a vzdálenosti zrcadla od ozubeného kola určil Fizeau, že rychlost světla je  $3,15 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ . [5]

Fizeauův experiment byl později modifikován francouzským fyzikem Jeanem Léonem Foucaultem (1819-1868), který použil rotační zrcadlo místo ozubeného kola. Pomocí takto upraveného aparátu Foucault změřil, že rychlost světla je  $2,98 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ . Navíc se mu podařilo mezi rotační zrcadlo a vzdálené zrcadlo umístit trubici s vodou a přesvědčivě určit, že rychlost světla je při průchodu vodou snížena. [5][6]

Dnes je rychlost světla ve vakuu známa s vysokou přesností. V základní soustavě jednotek SI je pomocí rychlosti světla ve vakuu odvozena jednotka metr. Rychlost světla ve vakuu je tedy [5]:

$$c = 2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m/s} [5] \quad (1)$$

### 2.2.1. Šíření světla mimo vakuum

Rychlost světla při průchodu hmotou je menší než při průchodu vakuem, protože je světlo ovlivněno atomy daného prostředí, kterým prochází. Rychlost šíření je značně ovlivněna typem materiálu, jelikož interakce světla s atomy se velmi liší v závislosti na druhu atomů, krystalických mřížkách a dalších substrukturách. [5]

Na základě těchto vlastností můžeme tedy určit materiálovou konstantu, která popisuje rychlost šíření světla v daném materiálu. Tuto konstantu nazýváme index lomu  $n$ . [5]

$$n = \frac{c}{v} [6] \quad (2)$$

Kde:  $n$  – index lomu

$c$  – rychlost světla ve vakuu

$v$  – rychlost světla v daném prostředí

Jelikož rychlost světla je v látkovém prostředí vždy menší než ve vakuu, index lomu je tedy vždy větší než 1. V tabulce 1 je přehled indexů lomů pro zástupce různých látek. Tyto hodnoty jsou pro určitou vlnovou délku světla, protože se mírně liší se změnou vlnové délky. Všimněte si, že pro plyny se index lomu  $n$  blíží hodnotě 1. To dává smysl, jelikož atomy v plynném prostředí jsou od sebe mnohem vzdálenější, než v prostředí kapalném či pevném a nedochází tedy při průchodu světla k tolika interakcím se zmíněnými atomy. [4][5]

Látka	<i>n</i>
Plyny při 0 °C, 1 atm	
Vzduch	1,000293
Oxid uhličitý	1,00045
Vodík	1,000139
Kyslík	1,000271
Kapaliny při 20 °C	
Benzen	1,501
Sirouhlík	1,628
Tetrachlormetan	1,461
Ethanol	1,361
Glycerin	1,473
Voda	1,333
Pevné látky při 20 °C	
Diamant	2,419
Fluorit	1,434
Sklo	1,520
Flintové sklo	1,660
Led (při 0 °C)	1,309
Polystyren	1,490
Polymethylmetakrylát	1,510
Křemen (krystalický)	1,544
Křemen (amorfní)	1,458
Chlorid sodný	1,544
Zirkon	1,923

*Tabulka 1 Index lomu různých medií pro světlo o vlnové délce 589 nm ve vakuu [5].*

### 2.3. Paprskový (částicový) model světla

Z pohledu paprskového (částicového) modelu existují 3 způsoby, jak se světlo může dostat od zdroje do jiného místa. Světelné paprsky mohou přicházet přímo od zdroje světla prázdným prostorem, například ze Slunce na Zemi. Druhou ze tří možností je, že světlo na cestě od zdroje k pozorovateli prochází různými médii, například vzduchem nebo sklem. Třetí možností pohybu je odraz světla, například zrcadlem. Ve všech zmíněných případech si můžeme trajektorii světla představit jako přímku, kterou nazýváme paprsek. [5]

Experimenty dokazují, že když světlo dopadá na předmět několikrát větší, než je jeho samotná vlnová délka, šíří se po přímkách a chová se jako paprsek. Jelikož vlnová délka viditelného spektra světla je menší než jeden mikron, chová se jako paprsek ve většině obecných případů, kdy přichází do kontaktu s objekty většími než jeden mikron. Pro představu lze uvést příklad, kdy světlo dopadá na předmět, který lze bez pomůcek pozorovat lidským okem, například mince. Při dopadu se bude chovat jako paprsek se zanedbatelným vlnovým charakterem. [5]

Ve všech výše popsaných případech můžeme trajektorii světla popsat jako přímkovou. Světlo tedy může měnit směr, pokud dojde k interakci s předměty, jako je například zrcadlo, čočka nebo rozhraní dvou prostředí s odlišnými indexy lomu (kapitola 2.2.1.). Po zmíněné změně směru opět pokračuje jako paprsek po přímkové trajektorii. [5]

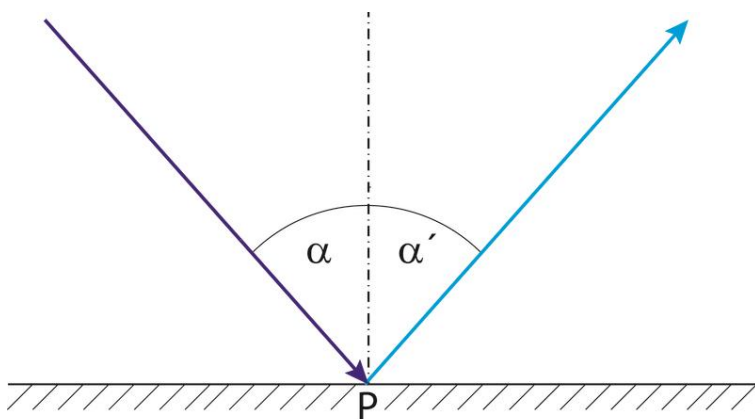
Na základě faktu, že se světlo šíří přímkově a jeho směr je ovlivněn interakcí s hmotou, můžeme jeho šíření popsat pomocí geometrických a základních trigonometrických vztahů. Tuto část optiky, kdy paprskový (*částicový*) charakter převládá nad vlnovým, nazýváme geometrická optika. [5]

V geometrické optice existují dva základní zákony, které popisují chování světla při interakci s hmotou. **Zákon odrazu**, který popisuje chování světla, když dochází k odrazu a **zákon lomu**, kdy světlo při průchodu hmotou mění směr. Tyto zákony budou dále rozebrány. [5]

## 2.4. Zákon odrazu

Světlo, které se odrazí od lesklého nebo zrcadlového povrchu se řídí **zákonem odrazu** (Obrázek 4): Úhel mezi dopadajícím paprskem  $\alpha$  a normálou plochy je shodný s úhlem mezi paprskem odraženým  $\alpha'$  a normálou. [4]

Odražený paprsek leží v rovině dané dopadajícím paprskem a bodem dopadu P. [8]



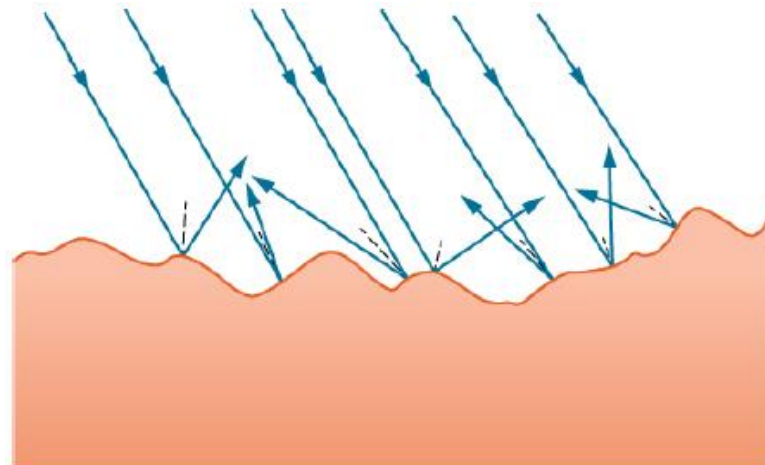
Obrázek 4 Zákon odrazu [7]

Zákon odrazu je matematicky popsán takto:

$$\alpha = \alpha' \quad [8]$$

(3)

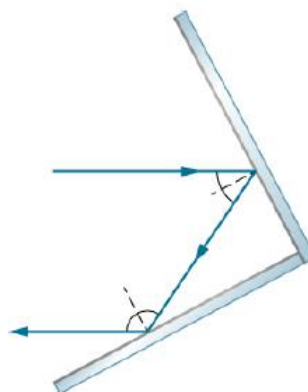
Na obrázku 4 je znázorněný odraz světelného paprsku od teoreticky hladkého povrchu. Běžně se ale setkáváme s odrazem od povrchu, který má určitou drsnost (Obrázek 5). Světlo dopadající na povrch s určitou strukturou se v každém bodě povrchu odráží pod jiným úhlem. Pro představu lze uvést příklad, kdy v temné místnosti osvětlíme list papíru. Pozorovatel na různých místech v místnosti uvidí rozptýlené, odražené světlo, které by nebylo možné pozorovat například při osvětlení zrcadla, které světlo odráží pouze jedním směrem. [5]



*Obrázek 5 Rozptyl světla při dopadu na nehladký povrch [5]*

#### **2.4.1. Rohový reflektor**

Světelné paprsky, které dopadají do soustavy navzájem kolmých odrazivých ploch se odráží paralelně zpět ke zdroji, ze kterého vychází (Obrázek 6). Nezávisí zde na úhlu dopadu paprsků. To znamená, že při zachování kolmosti odrazivých ploch se paprsek vždy vrací ke zdroji. [5]



*Obrázek 6 Paprsek odražený v rohovém reflektoru [5]*

Tohoto jevu využívají například odrazky na kole, autech a varovných značkách nebo cedulích. Všechny tyto prvky jsou navrženy tak, aby odrážely světlo zpět původním směrem. Tím je docíleno zvýšené viditelnosti objektu pro pozorovatele, pokud je pozorovatel a zdroj světla na jednom místě. Například řidič automobilu a přední světlomety. [5]



Pro zajímavost, na povrchu Měsíce je umístěn rohový reflektor, od kterého se odráží laserový signál vycházející ze země. Tímto systémem se pravidelně měří vzdálenost mezi Zemí a Měsícem. [5]

## 2.5. Zákon lomu

Snellův zákon, jinými slovy zákon lomu popisuje změnu směru šíření paprsku při průchodu mezi různými optickými prostředími. Tento jev je následkem změny rychlosti šíření světla v daném optickém prostředí. [5]

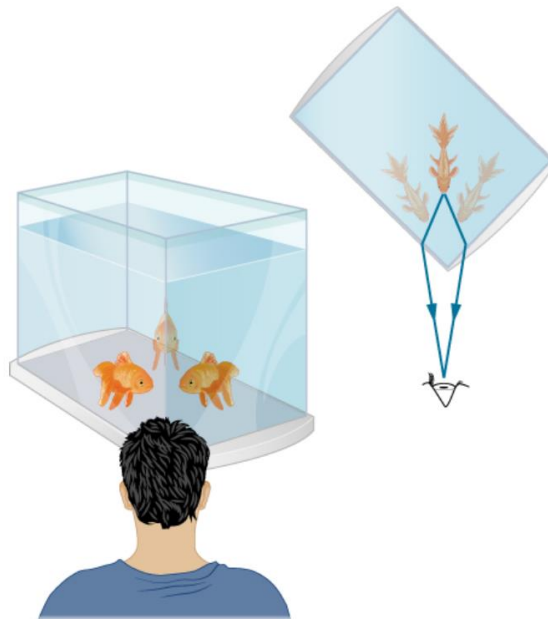
Rychlost šíření světla v optických prostředích závisí na indexu lomu a je popsána rovnicí:

$$v = \frac{c}{n} [m \cdot s^{-1}] [5] \quad (4)$$

Kde:  $n$  – Index lomu (tabulka 1)

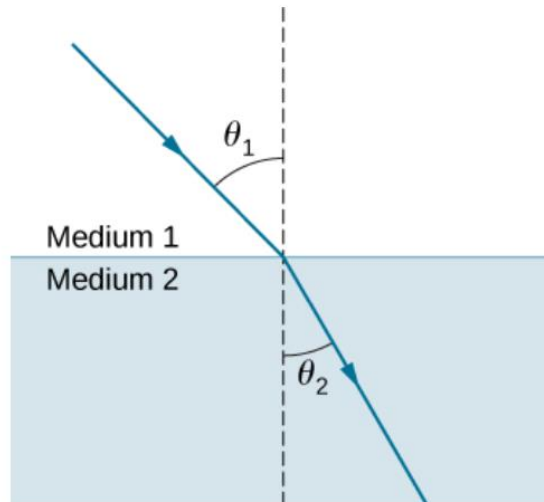
$c$  – Rychlost světla ve vakuu

$v$  – Rychlost světla v daném prostředí



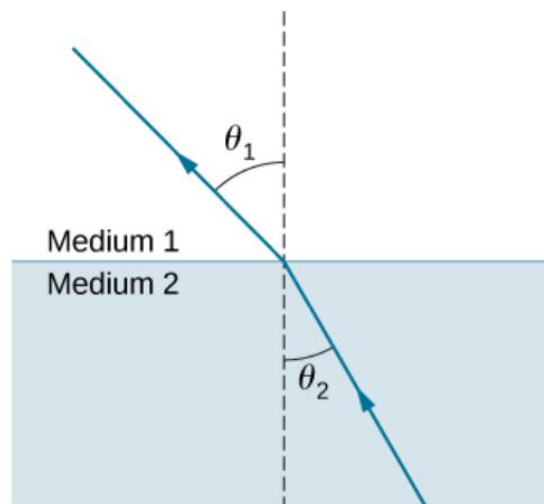
Obrázek 7 Lom světla, rybí akvário [5]

Na obrázku 7 je jasné, jak paprsek mění směr při průchodu z jednoho optického prostředí do druhého. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4., úhel dopadu a úhel lomu se měří mezi paprskem a kolmicí k rozhraní v bodě lomu. Na obrázku 8 je znázorněn případ, kdy světlo prochází prostředím s nižším indexem lomu do prostředí s vyšším indexem lomu a je zřetelné, že se světlo láme ke kolmici rozhraní v bodě lomu. [5]



Obrázek 8 Lom ke kolmici,  $n_2 > n_1$  [5]

Na obrázku uvedeném níže (obrázek 9), je znázorněn opačný případ, kdy světlo prochází prostředím s vyšším indexem lomu do prostředí s nižším indexem lomu a dochází k lomu od kolmice rozhraní v bodě lomu. [5]



Obrázek 9 Lom od kolmice,  $n_2 > n_1$  [5]

Tento jev matematicky popsal roku 1621 holandský matematik Willebrord Snell (1591-1626) a definoval do dnes platný zákon. Pro obecné případy lomu světla je definován takto [5]:

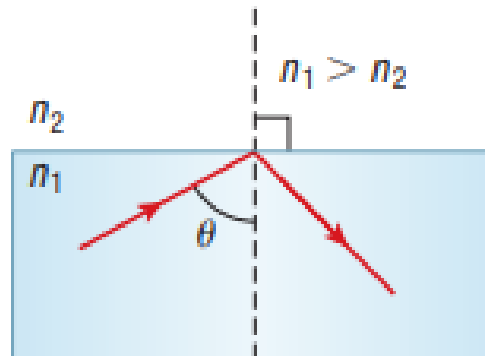
$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \quad [5]$$

(5)

- Kde:
- $n_1$  – Index lomu prostředí 1
  - $n_2$  – Index lomu prostředí 2
  - $\theta_1$  – Úhel dopadu paprsku (měřen mezi kolmicí a paprskem)
  - $\theta_2$  – Úhel lomu paprsku (měřen mezi kolmicí a paprskem)

Pokud úhel dopadu  $\theta_1$  dosáhne mezní hodnoty, může dojít k úplnému (totálnímu) odrazu paprsku od optického rozhraní, kdy do druhého prostředí s nižším indexem lomu nepronikne žádná část dopadajícího světla. Takový úhel, při kterém dojde k úplnému odrazu, nazýváme kritický úhel. [8]

Kritický úhel dopadu  $\theta_{1k}$  je definován jako úhel, pod kterým se světlo láme pod úhlem  $90^\circ$ , jinými slovy do roviny optického rozhraní. Pokud je úhel dopadu  $\theta_1$  větší než kritický, dochází k úplnému odrazu zpět do optického prostředí. [5] [8]



Obrázek 10 Úplný odraz světla [9]

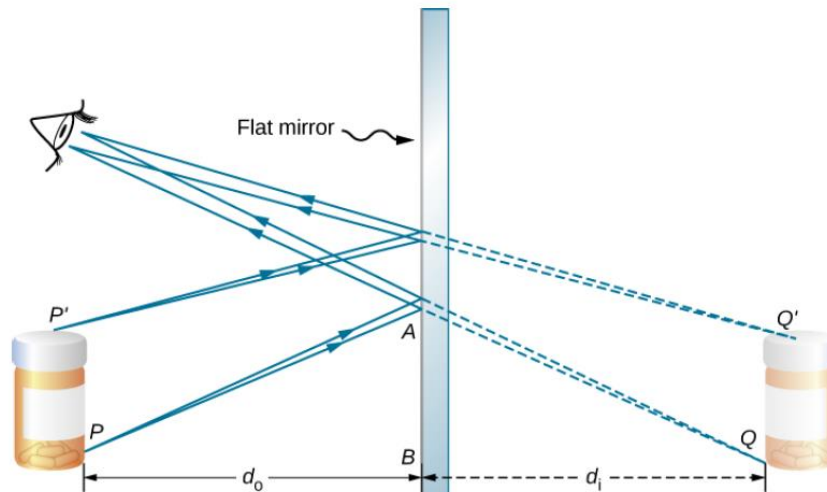
Úplného odrazu světla v optickém prostředí se hojně využívá například v optických kabelech sloužících k přenosu telefonního, internetového a televizního signálu. Optické prostředí v optickém kabelu je většinou ze skla nebo plastu. Protože jsou tyto kabely velmi tenké, tak světlo dopadá na rozhraní pod úhlem větším, než je úhel kritický, takže v optickém prostředí kabelu dojde k úplnému odrazu. Při použití svazku optických kabelů jsme schopni přenášet obraz bez použití čoček. Takového principu je použito například v endoskopech. [5]

## 2.6. Zobrazování pomocí zrcadel

V problematice zobrazování zrcadly rozeznáváme dva základní typy zrcadel: **rovinné a kulové**. [8]

Obraz, který je vytvořený **rovinným zrcadlem** se vždy řídí určitými pravidly. Obraz je vždy zdánlivý, přímý a stejné velikosti jako předmět. Obraz předmětu je souměrný podle roviny zrcadla a je stranově převrácený. [8]

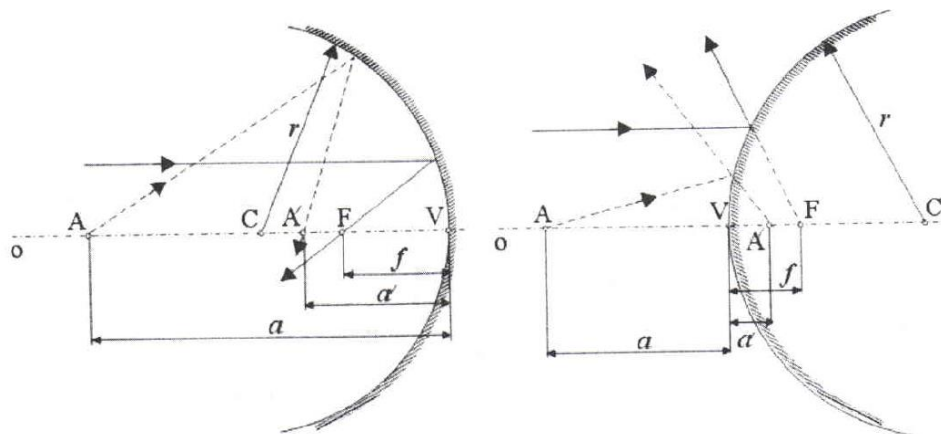
Na obrázku 11 je znázorněn chod paprsků při zobrazení rovinným zrcadlem. Ze zákona odrazu víme, že úhel dopadu je stejný jako úhel odrazu. Aplikujeme-li to společně se základními geometrickými vztahy na trojúhelníky  $PAB$  a  $QAB$  z obrázku 11 zjistíme, že trojúhelníky jsou shodné. To znamená, že vzdálenost  $PB$  (od předmětu k zrcadlu) je stejná, jako vzdálenost  $BQ$  (od zrcadla k obrazu). Pokud budeme měřit vzdálenost od roviny zrcadla, tak předmět a obraz leží v opačných směrech. Z toho vyplývá, že vzdálenost obrazu a předmětu od zrcadla by měla mít opačná znaménka. [5] [6]



Obrázek 11 Zobrazení rovinným zrcadlem [5]

Jak již bylo zmíněno, obraz vytvořený rovinným zrcadlem má stejnou velikost jako předmět, je přímý a zdánlivý. Při zobrazení **kulovými zrcadly** může vznikat obraz zvětšený nebo zmenšený, může se tvořit před kulovým zrcadlem i za kulovým zrcadlem. [6]

Rozlišujeme dva základní typy **kulových zrcadel**, pokud je odrazivá plocha na vnější straně kulové plochy, mluvíme o konvexním zrcadle. Pokud je odrazivá plocha na vnitřní straně kulové plochy, mluvíme o konkávním zrcadle. [5]



Obrázek 12 Kulová zrcadla [8]

Na obrázku výše (obrázek 12) jsou zobrazeny dva základní typy kulových zrcadel. Vlevo konkávní, vpravo konvexní. Pro zobrazování kulovými zrcadly je důležitá úsečka, která prochází bodem **C** (*střed křivosti*) a bodem **V** (*vrchol zrcadla*). Této křivce se říká optická osa. V polovině této úsečky leží bod **F** (*ohnisko zrcadla*). [8]

Zvláštní význam mají při zobrazování paprsky, které procházejí středem křivosti **C**, ohniskem **F** a paprsky rovnoběžné s optickou osou. Paprsky procházející bodem **C** dopadají na odrazivou plochu zrcadla kolmo a odrážejí se zpět do bodu **C**. Paprsky procházející ohniskem **F** se po dopadu na odrazivou plochu odrazí rovnoběžně s optickou osou, toto platí i naopak a paprsky rovnoběžné s optickou osou se odráží do ohniska **F**. [8]

Vzdálenost bodu **F** (*ohniska*) a bodu **V** (*vrchol zrcadla*) je ohnisková vzdálenost ***f***. Pro ***f*** platí [8]:

$$f = |FV| = \frac{r}{2} \quad [8] \quad (6)$$

Kde: *f* – Ohnisková vzdálenost  
 |*FV*| – Vzdálenost bodů *F* a *V*  
*r* – Poloměr křivosti

K matematickému popisu zobrazení kulovými zrcadly slouží **zobrazovací rovnice**, ta má tvar:

$$\frac{1}{x} + \frac{1}{x'} = \frac{2}{r} = \frac{1}{f} \quad [8] \quad (7)$$

Kde: *x* – vzdálenost předmětu od vrcholu zrcadla  
*x'* – vzdálenost obrazu od vrcholu zrcadla  
*r* – poloměr křivosti  
*f* – ohnisková vzdálenost

Pro získání správných výsledků při výpočtech je kriticky nutné dodržovat stejnou **znaménkovou konvenci**. Na základě této konvence se veličinám v zobrazovací rovnici přiřazují záporné, nebo kladné hodnoty. Jedna z možností, jak provést znaménkovou konvenci je dle optického středu zobrazovací soustavy, vrcholu zrcadla **V**, kde všechny veličiny doleva od vrcholu zrcadla mají znaménko záporné a doprava od vrcholu zrcadla mají veličiny znaménko kladné. [5][8]

Další možností je držet se dvou pravidel. První pravidlo říká, že ohnisková vzdálenost *f* je kladná pro konkávní zrcadla a záporná pro konvexní zrcadla. Druhé pravidlo říká, že vzdálenost obrazu *x'* je kladná pro obrazy skutečné a záporná pro obrazy zdánlivé. [5]

Další rovnicí, která popisuje kulová zrcadla je rovnice popisující **zvětšení**. [8]

$$Z = \frac{y'}{y} = \frac{x'}{x} \quad [8] \quad (8)$$

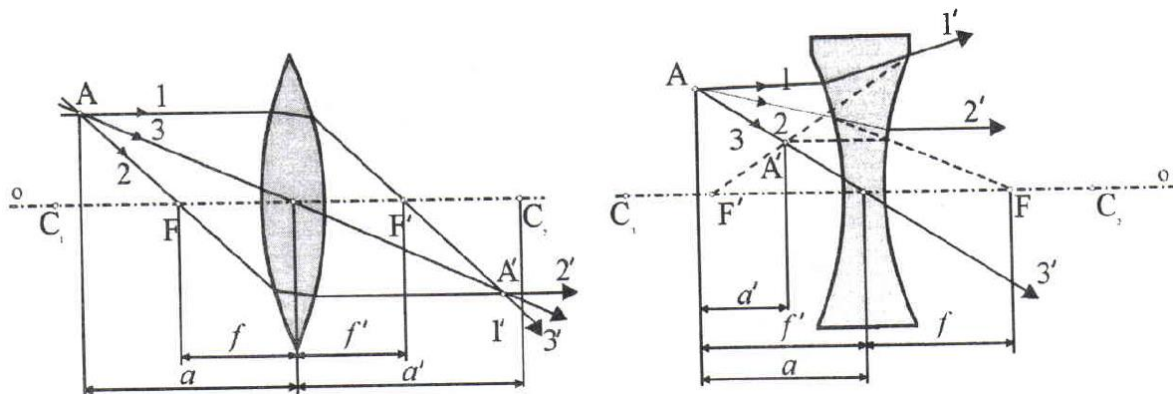
Kde: *y* – Výška předmětu  
*y'* – Výška obrazu  
*x* – Vzdálenost předmětu od vrcholu zrcadla  
*x'* – Vzdálenost obrazu od vrcholu zrcadla

Při dodržení znaménkové konvence platí, že kladná hodnota zvětšení znamená, že obraz předmětu je přímý. Záporná hodnota zvětšení náleží převrácenému obrazu. [8]

## 2.7. Zobrazování pomocí čoček

Čočky jsou jako optický prvek použity ve velmi širokém spektru nástrojů. Počínaje obyčejnou lupou, fotoobjektivy, objektivy pro mikroskopy až po komplexní systémy. Čočku jako moderátor směru paprsků obsahuje i lidské oko. Čočky jsou prvky tvořené průhledným optickým prostředím (sklo, plast), které je ve většině případů ohraničeno dvěma sférickými plochami. Paprsky, které se lámou na těchto plochách se lámou podle Snellova zákona (kapitola 2.5). Obecně lze čočky rozdělit do dvou hlavních skupin dle způsobu, jak se chovají procházející paprsky, jednou skupinou jsou **spojky** a druhou **rozptylky**. [5][8]

Paprsky, které jsou rovnoběžné s optickou osou se při průchodu **spojkou** střeťávají v jednom bodě (*ohnisku*) na druhé straně čočky. Při průchodu rozptylkou jsou paprsky rovnoběžné s optickou osou rozptýleny. Při průchodu paprsků čočkou se skutečný obraz předmětu vytváří na druhé straně čočky, v obrazovém prostoru. Prostor, kde je umístěn předmět nazýváme předmětový prostor. [5][8]



Obrázek 13 Spojka a rozptylka (vlevo spojka, vpravo rozptylka) [8]

Rozdělení čoček a základní znázornění principu chodu paprsků je zobrazeno na obrázku výše (obrázek 13). Paprsek **1**, který je rovnoběžný s optickou osou „*o*“ se po průchodu spojkou láme do ohniska v obrazovém prostoru, po průchodu rozptylkou pokračuje po přímce vycházející z ohniska v předmětovém prostoru, která prochází bodem prvního kontaktu paprsku s rozptylkou. Paprsek **2**, který prochází optickým středem spojky i rozptylky není nijak ovlivněn a pokračuje stejným směrem. Paprsek **3**, který prochází předmětovým ohniskem se při průchodu spojkou láme rovnoběžně s optickou osou. Pokud prochází rozptylkou a směřuje do ohniska v předmětovém prostoru, láme se také rovnoběžně s optickou osou. [8]

Čočky jsou charakterizovány veličinou, která popisuje jejich optické vlastnosti a říkáme jí **optická mohutnost**, která je definována jako [8]:

$$\varphi = \frac{1}{f'} [m^{-1}] [8] \quad (9)$$

Kde:  $f'$  – *Obrazová ohnisková vzdálenost čočky*

Jednotka optické mohutnosti je dioptrie (**D**). Stejně jako u zrcadel, tak i u čoček používáme znaménkovou konvenci. Platí, že pro spojky uvažujeme optickou mohutnost kladnou a pro rozptylky zápornou. Obrazová vzdálenost je kladná, pokud je obraz na druhé straně čočky, než je předmět a záporná, pokud hledáme vzdálenost zdánlivého obrazu. Poloměr křivosti je kladný pro plochu, která je vůči předmětu konvexní a záporný, pokud je plocha vůči předmětu konkávní. Obecně lze znaménkovou konvenci popsat jako souřadný systém se středem uprostřed čočky na optické ose. Doleva ve směru „x“ je souřadnice záporná a doprava kladná. [5]

Podobně jako u zrcadel popisujeme obecně čočky **zobrazovací rovnicí čoček**, která má tvar [8]:

$$\frac{1}{x'} - \frac{1}{x} = \frac{1}{f'} [8] \quad (10)$$

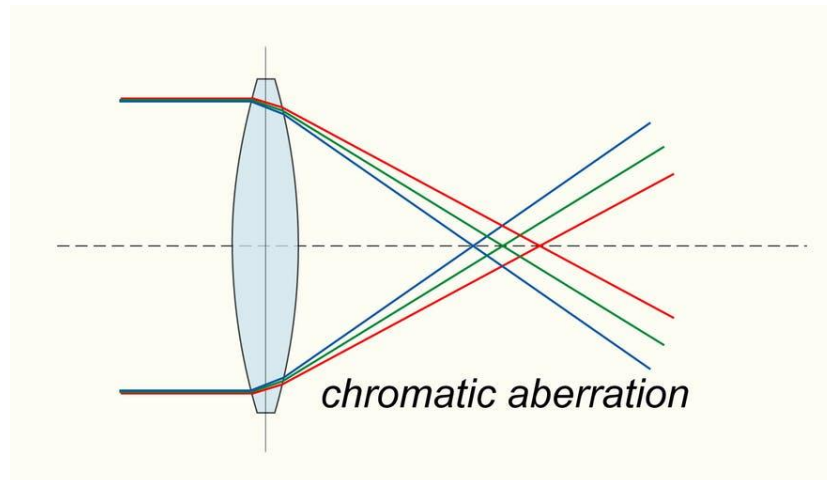
Kde:  $f'$  – *Obrazová ohnisková vzdálenost čočky*  
 $x$  – *Vzdálenost předmětu od středu čočky*  
 $x'$  – *Vzdálenost obrazu od středu čočky*

**Zvětšení** obrazu při zobrazení čočkami se řídí následujícím vztahem [8]:

$$z = \frac{y'}{y} = -\frac{a'}{a} [8] \quad (11)$$

Kde:  $a$  – *Vzdálenost předmětu*  
 $a'$  – *Vzdálenost obrazu*  
 $y$  – *Velikost předmětu*  
 $y'$  – *Velikost obrazu*

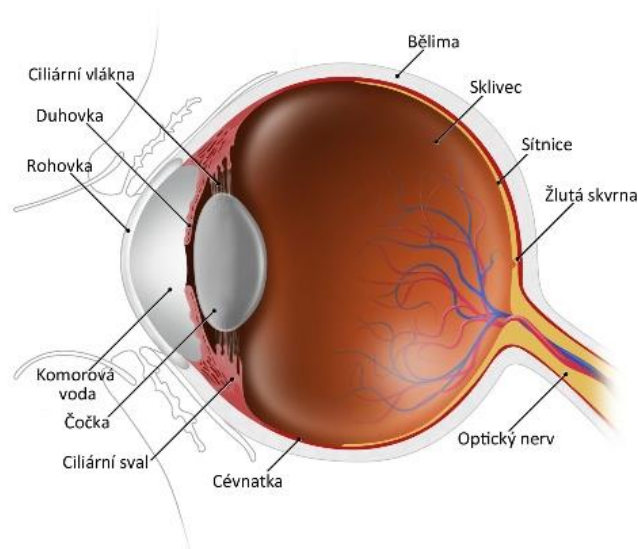
Běžně dostupné a používané čočky trpí různými vadami. Například chromatickou nebo otvorovou aberací. Chromatická aberace je způsobena tím, že úhel lomu světla závisí na konkrétní vlnové délce. Jelikož viditelné světlo obsahuje vícero vlnových délek, láme se každá část paprsku pod jiným úhlem. Princip chromatické aberace je na obrázku 14. Otvorová aberace způsobuje distorzi obrazu, protože široký svazek paprsků se neseťkává za čočkou v bodě, ale na větší ploše. Tyto vady lze částečně nebo úplně eliminovat použitím různých, za sebou zařazených čoček nebo použít ke konstrukci čoček kvalitnějších materiálů s různými povrchovými úpravami. [8]



Obrázek 14 Chromatic aberration [10]

### 2.7.1. Oko

Lidské oko (obrázek 15) dosahuje schopnosti vidět tak, že za pomoci světla tvoří obraz, který stimuluje nervová zakončení. Z nervových zakončení dále odchází impuls, který je zpracován mozkiem do finální podoby obrazu. Stejně jako fotoaparát se oko skládá ze clony a systému čoček na přední straně a povrchu citlivého na světlo na straně druhé. Světlo přichází do oka skrze systém clony a čoček a těmi je ostřen na zadní stranu (*sítnici*). [12]



Obrázek 15 Anatomie oka [11]



Systém čoček v oku se skládá ze dvou čoček. Z rohovky, která je na předním povrchu oka a oční čočky, která je vevnitř. Oční čočka je schopna proměnlivě měnit svoji ohniskovou vzdálenost a tím umožňuje vytvářet ostrý obraz různě vzdálených předmětů. Prostor mezi čočkami je vyplněn komorovou tekutinou. Na zadní vnitřní straně oka je sítnice, membrána obsahující nervová zakončení citlivá na světlo. Obraz promítaný čočkami na sítnici je skutečný, převrácený a zmenšený. [8][12]

### 3. Světelná mikroskopie

V posledním desetiletí jsme byli svědky enormního nárůstu aplikací a pokroku v oboru mikroskopie zkoumající prvky s rozměrem menším, než je jeden mikron. Rapidní vývoj nových fluorescenčních metod urychlil rozšíření fluorescenční mikroskopie pro laboratorní použití a výzkum. Pokroky v digitalizaci obrazu a jeho analýze umožnily uživatelům mikroskopů rychle a efektivně získávat kvantitativní měření na širokém spektru vzorků od syntetických keramických supravodičů až po pozorování živých buněk v jejich přirozeném prostředí, a to v reálném čase. Optické mikroskopy jsou schopny za pomoci digitální techniky pořizovat snímky velmi tenkých vrstev v ose Z, které jsou následně skládány do jednoho, za účelem vytvoření 3D obrazu povrchu. Takto upravenými mikroskopy, společně s mikroskopy konfokálními je dnes vybavena většina institucí. [13]

První vytvořené mikroskopy trpěly velkým množstvím vad a neduhů. Například optickou aberací, neostrotí obrazu a nedokonalými čočkami. První revoluce se mikroskopy dočkaly v polovině devatenáctého století s uvedením achromatických objektivů, které částečně odstranily chromatickou aberaci a disponovaly vyšší numerickou aperturou. Numerická apertura těchto objektivů se pohybovala okolo 0,65 pro objektivы normální a 1,25 pro imersní. V roce 1886, díky práci Ernsta Abbeho a Carla Zeisse vznikl první apochromatický objektiv. Za pomoci tohoto revolučního objektivu bylo najednou možno pozorovat obraz s mnohem menší sférickou aberací a téměř bez chromatické aberace při použití vyšších hodnot numerické apertury. O několik let později, v roce 1893, stanovil August Köhler metodu osvětlení, které pomohla naplno využít potenciál apochromatických objektivů. Poslední desetiletí devatenáctého století bylo svědkem inovace metalografických mikroskopů, anastigmatických čoček, binokulárních mikroskopů a prvního stereomikroskopu. [13][14]

#### 3.1. Osvětlovací prvky mikroskopu

Osvětlovací systém mikroskopu slouží jako zdroj viditelného světla, pomocí kterého je osvětlován pozorovaný vzorek. Běžně rozeznáváme tři základní typy zdrojů světla: **nízkonapětově wolframové žárovky, wolfram-halogenové žárovky a plynové výbojky.** [15]

**Wolframové žárovky** produkují spojité světelné spektrum o vlnových délkách od 300 do 1500 nanometrů při napětí od 6 do 12 V a příkonu okolo 100 W. Teplota světla, která je důležitá při pořizování barevných snímků produkovaná těmito žárovkami je relativně nízká. To má za následek teplejší odstín (*žluto-červený*) pozorovaných barev,

naopak vysoká teplota světla má za následek namodralé zbarvení. **Wolfram-halogenové** žárovky, stejně jako obyčejné wolframové produkují světlo spojitého vlnového spektra při příkonu od 10 do 100 W. Světlo produkované wolfram-halogenovými žárovkami je oproti wolframovému o poznání jasnější. Při použití w-h žárovek se jejich filament značně zahřívá, a proto je nutné zařadit do sestavy tepelný filtr k potlačení dlouhovlnných složek spektra a chlazení světelného zdroje. Při použití jasnějších zdrojů světla může dojít ke zkreslení barev na vzorku a je tedy vhodné použít neutrální filtry (*ND filtry – neutral density*), které redukují již zmíněnou intenzitu světla a nijak nezkrasují barvy. Například filtr ND50, který propustí pouze 50 % z celkové intenzity. **Plynové výbojky** na bázi rtuti nebo xenonu produkují velmi jasné světlo. Běžněji používané jsou výbojky na bázi rtuti, které produkují nespojitě světelné spektrum. Výbojky na bázi xenonu produkují světelné spektrum spojitě. Stejně jako u w-h žárovek je nutno tyto světelné zdroje chladit. [15][16][17]

Zdroj světla	Teplota [K]
Přírodní zdroje	
Jasná polední obloha	12000-18000
Zatažená obloha	7000
Letní polední slunce	5000-7000
Východ a západ slunce	3000
Umělé zdroje	
Bílá LED	6500-9500
Xenonová výbojka	5500-6500
12 V/100 W w-h žárovka při 9 V	3200
12 V/50 W w-h žárovka při 9 V	3200
Wolframové žárovka	2200-3400
Plamen	2000-2200

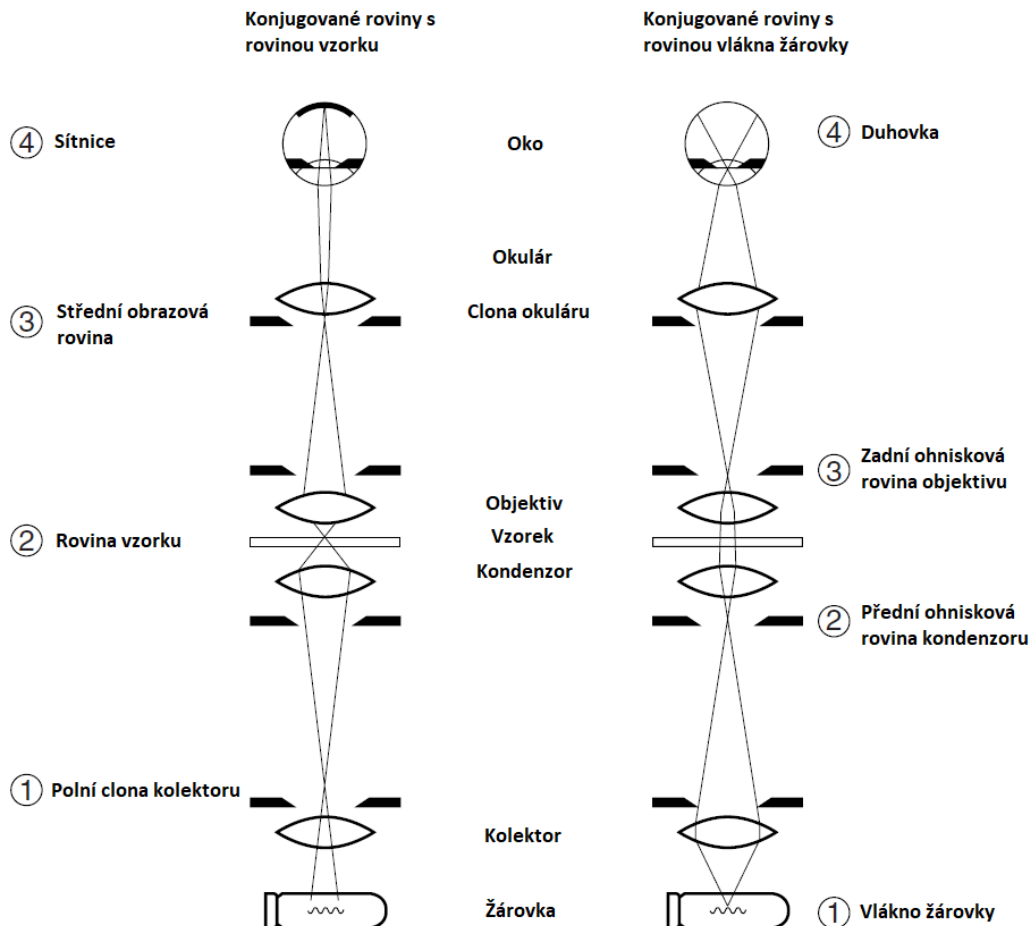
*Tabulka 2 Barevná teplota pro vybrané zdroje [18][19]*

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrně teploty barev vybraných světelných zdrojů.

### 3.2. Köhlerovo osvětlení při spodním osvitu

Osvětlení pozorovaného vzorku je v mikroskopii, fotomikroskopii a digitální mikroskopii nejdůležitější proměnná na cestě za získáním obrazového výstupu vysoké kvality. Köhlerovo osvětlení bylo poprvé představeno v roce 1893 Augustem Köhlerem ze společnosti Carl Zeiss, jako metoda k dosažení optimálního osvitu. [13]

Při rozboru optické trasy správně zaostřeného a seřízeného mikroskopu lze v optické trase najít dvě skupiny konjugovaných obrazových rovin. Jedna skupina se skládá ze čtyř konjugovaných rovin, kde vzniká obraz vzorku a druhá skupina se skládá ze čtyř konjugovaných rovin, kde vzniká obraz vlákna žárovky. Schematicky jsou tyto roviny společně s chodem jednotlivých paprsků zobrazeny na obrázku 16. Je důležité myslet na to, že chod paprsků je pouze **ilustrativní a neodpovídá skutečnosti**. [14][27]



Obrázek 16 Konjugované roviny [22]

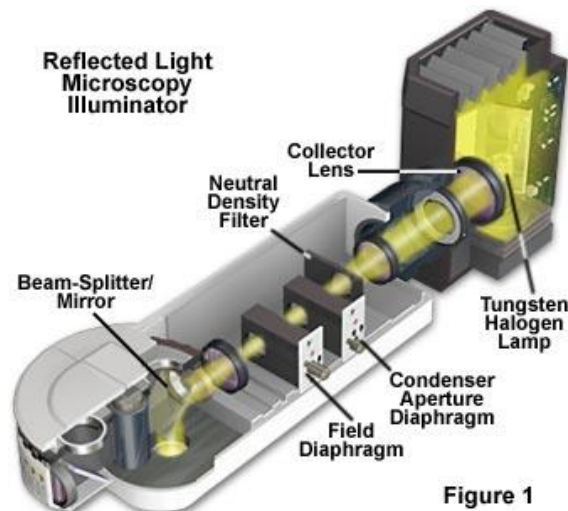
**Hlavním principem** Köhlerova osvětlení je, že konjugované roviny, ve kterých vzniká obraz vzorku, jsou dostatečně vzdáleny od rovin, ve kterých vzniká obraz vlákna žárovky. To znamená, že se do pozorovaného obrazu vzorku nepromítá vlákno žárovky a tím pádem získáme homogenní osvit. Konjugované roviny jsou navíc vzdáleny i od povrchových ploch čoček a díky tomu se do pozorovaného obrazu nepromítají případné nečistoty na zmíněných plochách. [27]

Základní požadavky k docílení Köhlerova osvětlení nejsou nijak složité. Je důležité, aby čočky kolektoru ostřily světlo vycházející z různých bodů vlákna žárovky na přední clonu kondenzoru a kompletně vyplnily aperturu (*otvor-nastavení clony*) kondenzoru. Zároveň musí být kondenzor nastaven tak, aby se dvě skupiny konjugovaných rovin vytvořily a zaostřily (*když je vzorek také zaostřen*) na specifických místech na ose optické trasy mikroskopu. Splněním těchto podmínek bude zajištěn jasný a rovnoměrný osvit roviny

vzorku, dokonce i s nerovnoměrným světelným zdrojem, jako je například wolfram-halogenová žárovka. Pokud bude správně zaostřen vzorek i kondenzor, budou konjugované roviny na správných místech a bude tedy možné rozlišení a kontrast upravovat polní clonou a aperturní clonou kondenzoru. [27]

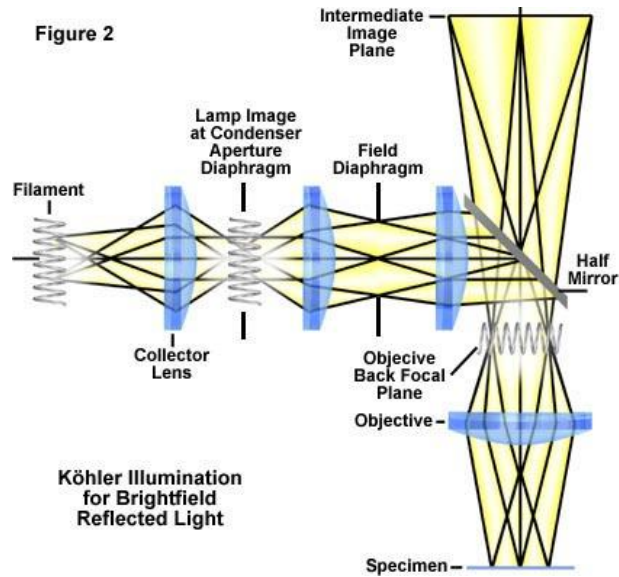
### 3.3. Köhlerovo osvětlení v reflexní mikroskopii

V reflexní mikroskopii využívající viditelné spektrum světla je Köhlerovo osvětlení nedílnou součástí každého pozorování. Tohoto druhu osvětlení v reflexní mikroskopii je možné docílit pomocí dvou proměnných clon. Na obrázku 16, clona blíže ke světelnému zdroji je aperturní clona a za ní ve směru chodu paprsku leží polní clona. Tyto clony jsou v reflexní mikroskopii za sebou v obráceném pořadí v porovnání s mikroskopii využívající spodního osvětlení vzorku. Tato konfigurace clon zajišťuje jasný, rovnoměrný osvit vzorku v rovině, do které je zaostřen objektiv. Zároveň jsou eliminovány všechny oslnivé odlesky od vzorku a je možné využít vyšších hodnot numerické apertury objektivů se zachováním uspokojivého kontrastu a rozlišení. [20]



Obrázek 17 Köhlerovo osvětlení [20]

Je důležité si uvědomit, že při použití reflexního osvětlení plní objektiv dvě funkce. Při průchodu paprsku skrz objektiv směrem ke vzorku slouží jako kondenzátor onoho paprsku a při chodu paprsku odraženého od vzorku slouží jako objektiv, který promítá paprsky tvořící obraz směrem k okuláru. V mikroskopii využívající spodního osvětlení vzorku je nutné s výměnou objektivu nastavit novou hodnotu numerické apertury kondenzátoru abychom dosáhli požadované kvality obrazu. Při reflexním osvětlení vzorku se numerická apertura kondenzátoru a nového objektivu mění simultánně. Konjugované roviny jsou podobné jako pro metodu spodního osvětlení vzorku, kde se obraz vlákna žárovky nachází v zadní ohniskové rovině objektivu. [20]



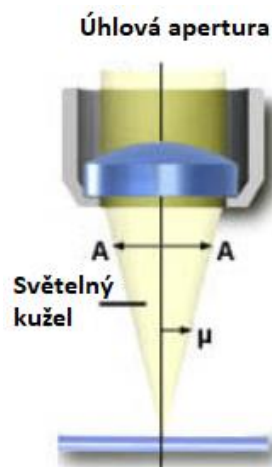
Obrázek 18 Köhlerovo osvětlení při mikroskopii pomocí viditelného, odraženého světla [20]

Hlavní funkcí Köhlerova osvětlení je kromě rovnoměrného osvětlení zajištění maximálního rozlišení a kontrastu, i když je zdrojem světla žárovka s wolframovým vláknem. Aperturní clona slouží k nastavení úhlu dopadu světelných paprsků na vzorek a numerická apertura objektivu určuje, jaký úhel odraženého světla je možné zachytit. Na obrázku 18 je znázorněn chod paprsků v systému s reflexním osvětlením vzorku. [13][20]

### 3.4. Numerická apertura rozlišení a hloubka ostrosti

**Numerická apertura** mikroskopového objektivu je ukazatel jeho schopnosti zachytit světlo a rozlišit detaily předmětu v dané předmětové vzdálenosti. [29]

Paprsky, které tvoří obraz, procházejí skrz vzorek (při *dolním osvětlení*) nebo se od něj odrážejí (při *reflexním osvětlení*) a vstupují do objektivu. Dráha těchto paprsků vytváří kužel (obrázek 19) s vrcholem v zobrazovaném bodě předmětu a v podélném řezu tohoto kužele lze definovat úhlovou aperturu. Úhlová apertura je určena ohniskovou vzdáleností objektivu. [29]



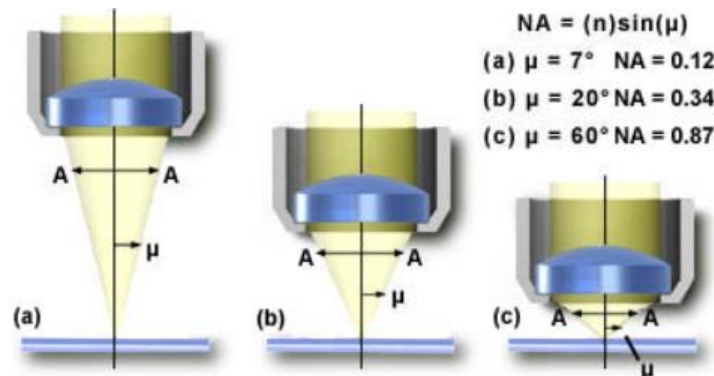
Obrázek 19 Úhlová apertura [29]

Na obrázku 19, úhel  $\mu$  zastupuje polovinu úhlové apertury (**A**) a souvisí s numerickou aperturou následovně [29]:

$$\text{Numerická apertura (NA)} = n (\sin \mu) \quad [29] \quad (12)$$

Člen  $n$  v rovnici (12) numerické apertury zastupuje index lomu optického prostředí mezi vzorkem a čočkou objektivu. Jeho hodnota se pohybuje v rozmezí od 1 pro vzduch do 1,51 pro speciální imersní oleje. Z rovnice pro numerickou aperturu (12) je jasné, že pokud je optickým médiem mezi vzorkem a čočkou objektivu vzduch (*index lomu  $n=1$* ), tak je hodnota numerické apertury závislá čistě na úhlu  $\mu$ , který může v tomto případě nabývat maximální hodnoty  $90^\circ$ . Maximální možná hodnota sinu úhlu  $\mu$  je tedy 1 ( $\sin(90^\circ) = 1$ ), což je teoretická nejvyšší hodnota numerické apertury pro objektivy, které využívají jako optické médium vzduch (*suché objektivy*). V praxi je ale velmi složité dosáhnout numerické apertury u suchých objektivů blížící se hodnotě 0,95. Takže hodnoty blížící se 1 jsou spíše teoretické. [29][30]

Na obrázku 20 je série světelných kuželů odvozených od objektivů s různými numerickými aperturami a ohniskovými vzdálenostmi. Jak se mění světelný kužel, úhel  $\mu$  se zvyšuje od  $7^\circ$  (obrázek 20a) do  $60^\circ$  (obrázek 20c), což má za následek příslušné zvětšení numerické apertury z 0,12 na 0,87. Hodnota numerické apertury 0,87 je téměř na limitu, při uvažování vzduchu jako optického prostředí. [29][30]



Obrázek 20 Světelné kužele pro různé objektivy [29]

Při rozboru rovnice pro numerickou aperturu (12) je zřejmé, že pro dosažení hodnoty numerické apertury vyšší než 1, je limitním faktorem index lomu  $n$  optického prostředí. Abychom získali hodnotu numerické apertury vyšší než 1, musí mít optické prostředí mezi čočkou objektivu a vzorkem vyšší index lomu ( $n > 1$ ), než má vzduch. V dnešní době jsou na trhu mikroskopové objektivy, které jsou navrženy pro použití v optickém prostředí s vyšším indexem lomu, než má vzduch, například ve vodě ( $n=1,33$ ), v glycerinu ( $n=1,47$ ) nebo v imersním oleji ( $n=1,51$ ). Protože tyto objektivy používají jako optické prostředí kapalinu, souhrnně je nazýváme imersní objektivy. Při použití imersních objektivů je nutné věnovat zvýšenou pozornost jejich specifikacím, aby nedošlo k použití jiného média, než pro které je objektiv určen. Použití chybného média může v obrazu vyvolávat různé artefakty, které následně degradují jeho kvalitu. [30]

Většina objektivů se zvětšením v rozmezí od 60x po 100x (*a více*) jsou navrženy pro použití právě s imersním olejem. Při rozboru rovnice numerické apertury (12) zjistíme, že teoreticky nejvyšší hodnota, které jsme schopni s imersním olejem dosáhnout, je  $n \cdot 1,51$  ( $n=1,51$  a  $\sin \mu = 1$ ). Většina imersních objektivů má při použití s olejem maximální numerickou aperturu 1,4. Vyšší hodnoty jsou opět pouze teoretické. [29]

Hodnota numerické apertury je z části závislá na úrovni korekce optické aberace. Objektivy s vyšší úrovní korekce mají obvykle vyšší hodnotu numerické apertury pro určité zvětšení (*tabulka 3*). Pokud se podíváme na skupinu objektivů se zvětšením 10x, je patrné, že pro plan-objektivy se numerická apertura zvyšuje v závislosti na korekci chromatické a optické aberace: plan – achromát, NA = 0,25; plan – fluorit, NA = 0,3; plan-apochromát. NA = 0,45. [30]

Zvětšení	Numerická apertura		
	Plan – achromát	Plan – fluorit	Plan – apochromát
0,5x	0,025	-	-
1x	0,04	-	-
2x	0,06	-	0,10
4x	0,10	0,13	0,20
10x	0,25	0,30	0,45
20x	0,40	0,50	0,75
40x	0,65	0,75	0,95
40x (olej)	-	1,30	1,00
60x	0,75	0,85	0,95
60x (olej)	-	-	1,40
100x (olej)	1,25	1,30	1,40
150x	-	-	0,90

*Tabulka 3 Numerická apertura pro vybrané objektivy [29]*

**Rozlišení** mikroskopového objektivu je definované jako nejmenší vzdálenost dvou bodů na vzorku, při kterém je možné tyto dva body od sebe rozlišit, tzn. nesplynou v jeden bod. [29]

V roce 1873 Ernst Abbe poprvé formuloval vztah, který popisuje limitní vzdálenost dvou bodů, kdy je pořád možné tyto body od sebe rozeznat. Vztah formulovaný Ernestem Abbem má tvar [31]:

$$d = \lambda / 2n \sin \mu \quad [31] \tag{13}$$

Kde:  $\lambda$  – Vlnová délka světla použitého pro osvit  
 $n$  – Index lomu prostředí mezi objektivem a vzorkem  
 $\mu$  – Polovina úhlové apertury objektivu

V dnešní době se k popisu nejmenší vzdálenosti, při které lze rozeznat dva body v obrazu, používá Rayleighovo kritérium. [31]

V mikroskopii využívající **spodního osvitu** vzorku je rozlišení  $R$  charakterizováno třemi parametry. Vlnovou délkou ( $\lambda$ ) světla použitého k osvitu, numerickou aperturou objektivu ( $NA_o$ ) a numerickou aperturou kondenzoru ( $NA_k$ ). Rayleighovo kritérium pro případ, kdy je rozdílná numerická apertura objektivu od numerické apertury kondenzoru má tvar (rovnice 14) [17]:

$$R = \frac{1,22\lambda}{NA_o + NA_k} [17] \quad (14)$$

Kde:  $\lambda$  – Vlnová délka světla použitého pro osvit  
 $NA_o$  – Numerická apertura objektivu  
 $NA_k$  – Numerická apertura kondenzoru

Pokud je hodnota numerické apertury kondenzoru upravena tak, aby odpovídala hodnotě numerické apertury objektivu a obě apertury jsou si rovny, lze vztah pro Rayleighovo kritérium zjednodušit na (rovnice 15) [17]:

$$R = \frac{0,61\lambda}{NA} [17] \quad (15)$$

Tato zjednodušená rovnice rozlišení (15) platí při rovnosti numerických apertur objektivu a kondenzoru pro mikroskopii využívající spodního osvitu a zároveň pro mikroskopii využívající reflexního osvitu vzorku. [17]

Je důležité si uvědomit, že zvětšení nevystupuje v žádném vztahu pro výpočet rozlišení. Jak již bylo zmíněno, rozlišení závisí pouze na vlnové délce světla a numerické apertuře. Z rovnice 15 je jasné, že se zkracující se vlnovou délkou světla poroste rozlišení (*nižší hodnoty R*) a naopak. Nejlepšího rozlišení se v optické mikroskopii dosahuje v oblasti blízké ultrafialovému světlu, protože tato oblast tvoří část spektra viditelného světla s nejkratší vlnovou délkou (kapitola 2.1.). Naopak nejmenšího rozlišení (*vyšší hodnota R*) dosáhneme při použití červeného světla, protože má největší vlnovou délku z viditelného spektra. Pro většinu případů se k osvitu vzorku používá bílého světla z wolfram-halogenové žárovky. Bílému světlu nelze přiřadit konkrétní vlnovou délku, protože v něm jsou rovnoměrně zastoupeny všechny barvy z viditelného spektra. Vlnová délka, která odpovídá středu viditelného spektra je přibližně 550 nanometrů a odpovídá zelené barvě světla, na kterou jsou oči nejvíce citlivé. Tato hodnota vlnové délky byla použita pro výpočet rozlišení v tabulce 4, ve které jsou shrnuty vlastnosti objektivů v závislosti na jejich typu. Vliv vlnové délky na rozlišení při konstantní numerické apertuře je v tabulce 5. [29][30]



Zvětšení	Typ objektivu					
	Plan – achromát		Plan – fluorit		Plan – apochromát	
	Numerická apertura	Rozlišení [ $\mu\text{m}$ ]	Numerická apertura	Rozlišení [ $\mu\text{m}$ ]	Numerická apertura	Rozlišení [ $\mu\text{m}$ ]
4x	0,10	2,75	0,13	2,12	0,20	1,375
10x	0,25	1,10	0,30	0,92	0,45	0,61
20x	0,40	0,69	0,50	0,55	0,75	0,37
40x	0,65	0,42	0,75	0,37	0,95	0,29
60x	0,75	0,37	0,85	0,32	0,95	0,29
100x	1,25	0,22	1,30	0,21	1,40	0,20

*Tabulka 4 Rozlišení a numerická apertura v závislosti na typu objektivu [29]*

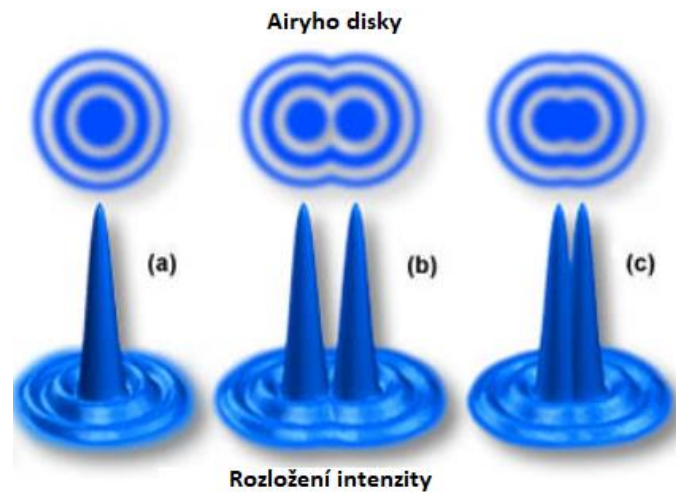
Vlnová délka [ $\text{nm}$ ]	Rozlišení [ $\mu\text{m}$ ]
360	0,19
400	0,21
450	0,24
500	0,26
550	0,29
600	0,32
650	0,34
700	0,37

*Tabulka 5 Rozlišení a vlnová délka [29]*

Když světlo z různých, nekonečně malých bodů vzorku prochází objektivem, tak obraz těchto bodů vytvořený v primární obrazové rovině není nekonečně malý bod, ale Airyho difrakční obrazec. Tento Airyho difrakční obrazec je Fraunhoferovo difrakční obrazec vytvořený výstupní čočkou objektivu, ze které sférické vlny konvergují do zadního ohniska objektivu. Centrální maximum Airyho obrazce se běžně nazývá jako Airyho disk a je to oblast, která je ohraničená prvním minimem Airyho obrazce a obsahuje 84% světelné energie. Tyto obrazce se skládají z tmavých a světlých soustředných kruhů, jako je znázorněno v horní části obrázku 21. Na tomto obrázku jsou zobrazeny Airyho disky a rozložení jejich intenzity v závislosti na vzdálenosti mezi nimi. [29]

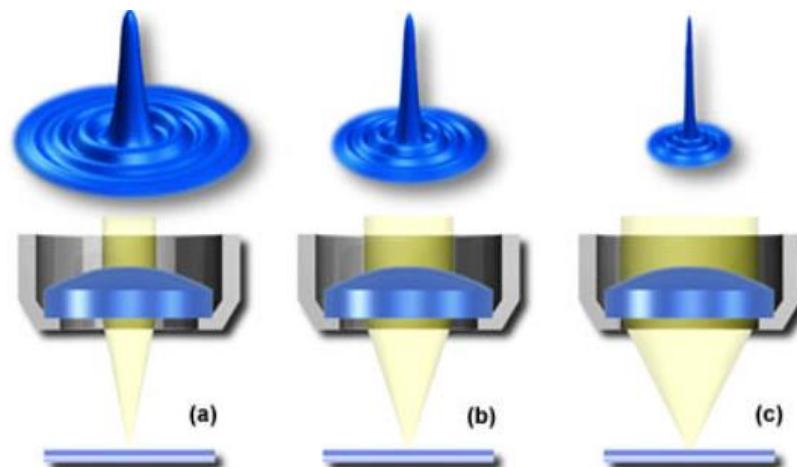
Obrázek 21a znázorňuje hypotetický Airyho disk, který v podstatě sestává z difrakčního obrazce obsahujícího centrální maximum (*obvykle označováno jako maximum nultého řádu*), které je obklopené soustřednými maximy prvního, druhého, třetího... řádu s postupně se snižujícím jasem. Dva Airyho disky a jejich rozložení intenzity na limitu optické rozlišitelnosti jsou zobrazeny na obrázku 21b. V této části obrázku je vzdálenost mezi disky větší, než je jejich poloměr a tím pádem jsou ještě rozlišitelné. Limitní vzdálenost, kdy jsou od sebe dva Airyho disky rozlišitelné je tedy jejich poloměr a ten je dán Rayleighovým kritériem (rovnice 15). Na obrázku 21c jsou znázorněny dva disky, které mají

mezi sebou vzdálenost menší, než je jejich poloměr, to znamená, že centrální maximum jednoho obrazce se překrývá s prvním minimem druhého obrazce a podle Rayleighova kritéria je již nelze rozlišit jako dva separátní. [14][29]



Obrázek 21 Airyho disky [29]

Z výše popsaného principu vytváření a následného rozlišení Airyho disků vyplývá, že čím menší disky jsou vytvářeny objektivem při procesu tvorby obrazu, tím více detailů vzorku je možné rozeznat. Obecně platí, že objektivy s vyšší úrovní korekce vad (*fluority a apochromáty*) vytvářejí menší Airyho disky než objektivy s nižší úrovní korekce vad. Obdobně je to s numerickou aperturou objektivu, kde objektivy s vyšší hodnotou numerické apertury vytvářejí menší Airyho disky a naopak. Toto jsou hlavní důvody, proč objektivy s vyšší úrovní korekce vad a s vyšší numerickou aperturou dokážou rozlišit drobnější detaily ve vzorku. [29][30]



Obrázek 22 Vliv numerické apertury na velikost Airyho disku [29]

Na obrázku 22 je schematicky znázorněn efekt velikosti numerické apertury na velikost Airyho disků vytvořených hypotetickými objektivy se stejnou ohniskovou vzdáleností, ale jinou numerickou aperturou. S malou hodnotou numerické apertury je Airy disk velký, jak je zobrazeno na obrázku 22a a se zvyšující se hodnotou numerické apertury objektivu společně se zvyšujícím se úhlem světelného kužele se velikost Airyho disků zmenšuje (obrázek 22b a 22c). [29][30]

Výsledný obraz z objektivu je v podstatě nespočet Airyho disků, které vnímáme jako tmavý a světlý odstín určité barvy. [29]

Stejně jako difrakce a vlnová povaha světla určují, že obraz bodu je difrakční obrazec s určitým průměrem, určují také, že difrakční obrazec má měřitelnou tloušťku podél optické osy z. **Hloubka ostrosti pole** v předmětové rovině odpovídá vzdálenosti dvou rovnoběžných rovin, které mezi sebou vymezují prostor, kde jsou všechny části předmětu (vzorku) zaostřeny. Matematicky je hloubka ostrosti pole popsána [22]:

$$Z = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad [22] \tag{16}$$

Kde:  $\lambda$  – *Vlnová délka světla použitého pro osvit*  
 $n$  – *Index lomu prostředí mezi objektivem a vzorkem*  
 $NA$  – *Numerická apertura objektivu*

Z rovnice 16 je jasné, že hloubka ostrosti pole klesá s druhou mocninou numerické apertury objektivu. Objektivy s malým zvětšením a tím pádem s nízkou hodnotou numerické apertury dosahují tedy mnohonásobně vyšších hodnot hloubky ostrosti pole než vysoce výkonné objektivy. Princip hloubky ostrosti pole je v mikroskopii stejný jako při fotografování, kde objektivy s vysokou světlostí ( $< f/4$ ) mají nízkou hodnotu hloubky ostrosti pole a objektivy s nízkou světlostí ( $> f/16$ ) mají hloubku ostrosti pole naopak vysokou. [22]

Rovnice 16 popisuje výpočet hloubky ostrosti pole pouze teoreticky a zjednodušeně. Ve skutečnosti je hloubka ostrosti pole ovlivněna řadou faktorů, mezi které řadíme principy geometrické a fyzikální optiky, optické aberace, stupeň akomodace oka a celkové zvětšení. [22]

### **3.5. Optické prvky mikroskopu**

Mikroskopové objektivy jsou nejpodstatnější součástí mikroskopu. Stojí za tvorbou primárního obrazu a hrají hlavní roli v určování kvality obrazu, kterou jsme mikroskopem schopni získat. Zároveň ovlivňují zvěstní konkrétního vzorku a rozlišení, se kterým jsme schopni pozorovat detaily. [21]

Jak již bylo podrobněji popsáno v kapitole (3.4.) rozlišení mikroskopu je primárně závislé na třech věcech, mezi které zahrnujeme vlnovou délku světla použitého pro osvit vzorku, úhlovou aperturu objektivu a index lomu prostředí mezi vzorkem a objektivem.

Rozlišením rozumíme minimální vzdálenost dvou bodů, které od sebe můžeme ve výsledném obrazu rozeznat a matematicky je popsáno Rayleighovým kritériem (rovnice 15 a 17) [21]:

$$R = 0,61\lambda/(n \sin(\mu)) \quad [21]$$

(17)

Kde:  $\lambda$  – Vlnová délka světla použitého pro osvit  
 $n$  – Index lomu prostředí mezi objektivem a vzorkem  
 $\mu$  – Polovina úhlové apertury objektivu

Při rozboru rovnice 17 je vidět, že rozlišení je přímo závislé na vlnové délce světla použitého pro osvit. Lidské oko reaguje na spektrum vlnových délek mezi 400 a 700 nanometry, toto spektrum zastupuje viditelnou část světelného spektra a je použito k osvitě ve valné většině pozorování. [21]

Člen v rovnici 17 ( $n \sin(\mu)$ ) je dosazen z rovnice 12 a jedná se pouze o rozepsaný vztah pro numerickou aperturu (NA), rovnice 15 a 17 jsou tedy totožné. Při volbě objektivu slouží jeho numerická apertura jako vhodný indikátor rozlišení, kterého je objektiv schopný dosáhnout a pokud nebudeme brát v potaz konstrukční řešení mikroskopu, tak je numerická apertura obecně nejdůležitější charakteristikou při volbě mikroskopového objektivu. Hodnoty NA leží v rozsahu od 0,1 pro objektivy s velmi malým zvětšením (1x až 4x) až do 1,5 pro vysoce výkonné, speciální objektivy se zvětšením 100x určené pro použití v imersním prostředí jako je voda, glycerin nebo speciální olej. [17][21]

### 3.5.1. Objektivy

Nejlevnějším a nejvíce rozšířeným typem objektivu jsou achromáty. Jsou vhodné především pro menší hodnoty zvětšení (30 – 40x). Tyto objektivy disponují korekcí axiální chromatické aberace pro dvě barvy viditelného světla, pro modrou a červenou čili pro vlnové délky okolo 486 a 656 nanometrů, které jsou vedeny do jednoho ohniska. Dále jsou achromáty vybaveny korekcí sférické aberace pro zelené světlo (456 nanometrů). Tyto objektivy tedy dosahují svých nejlepších výsledků při přidání filtru zeleného světla do optické trasy. Mezi další úskalí patří chybějící korekce pro zklenutí pole, které má za následek neostrost obrazu na krajích, nebo naopak ve středu. V posledních letech většina výrobců do svých produktových portfolií zařadila achromáty, které disponují korekcí pro zklenutí pole. Tyto objektivy nesou název planachromáty. [17][21][22]

Další, pokročilejší objektivy se nazývají semi-apochromáty. Tyto objektivy oproti předchozím disponují vyšší úrovní korekce vad a jsou samozřejmě dražší. Dříve byl k jejich konstrukci používán fluorit, proto se jím někdy též říká fluoritové. Čočky těchto objektivů jsou vyráběny ze skel se speciálním složením, obsahující například zmíněný fluorit, nebo z nových syntetických látek. Stejně jako achromáty, disponují semi-apochromáty korekcí axiální chromatické aberace pro červené a modré světlo. Navíc disponují korekcí sférické aberace pro dvě, v některých případech i pro tři barvy. Vyšší úroveň korekce vad semi-apochromátů oproti achromátům dovoluje vyrábět tyto objektivy s vyšší hodnotou numerické apertury. Mají také vyšší rozlišovací schopnost a jsou schopné poskytnout vyšší stupeň kontrastu, což z nich dělá oproti achromátům vhodnější kandidáty pro použití v digitální mikroskopii. [17][21]

Nejvyšší úrovní korekce vad disponují apochromáty. Ty představují nejdokonalejší mikroskopové objektivy, které jsou momentálně na trhu k dostání a jejich vysoká cena se odráží v sofistikovaném provedení a náročné výrobě. Zvětšení apochromátů se pohybuje v rozmezí od 10x do 100x, kde objektivy s menším zvětšením mají z pravidla větší pracovní vzdálenost než objektivy s větším zvětšením. Běžně jsou apochromáty korigovány pro axiální chromatickou aberaci tří barev (*červená, zelená a modrá*), tím dochází téměř k její eliminaci. Korekci sférické aberace mají běžně pro dvě nebo tři barvy. Většina nově vyvinutých apochromátů má korekci axiální chromatické aberace pro čtyři barvy (*tmavě modrá, modrá, zelená a červená*) a korekci sférické aberace taktéž. [17][21]

Všechny výše zmíněné objektivy trpí vadou zklenutí pole a vytváří zakřivený obraz, vliv tohoto artefaktu se zvyšuje s vlastním zvětšním objektivu. Výsledkem snahy o korekci tohoto artefaktu je vznik objektivů s korekcí zklenutí pole. Objektivy s touto korekcí se nazývají plan-achromáty, plan-fluory a plan-apochromáty v závislosti na úrovni zbytkových aberací. Ačkoliv je korekce zklenutí pole velmi nákladná, má pro digitální mikroskopii velký přínos a je velmi žádanou vlastností výkonných mikroskopových objektivů. [17][21]

Za účelem zvýšení hodnoty numerické apertury mohou objektivy pracovat v jiném optickém prostředí, než je vzduch, takové objektivy nazýváme imersní a princip jejich funkce je popsán v kapitole 3.4.

V tabulce 6 je přehled jednotlivých druhů běžných objektivů a jejich parametrů.

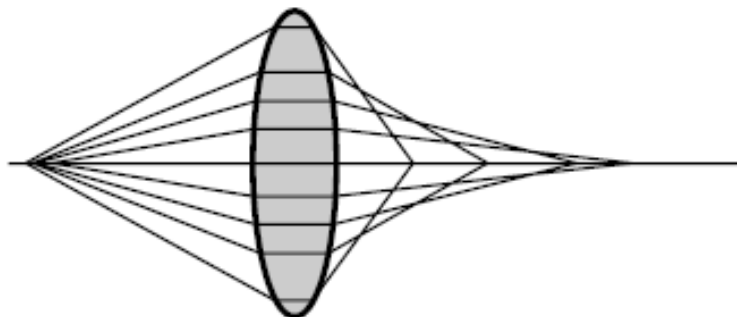
Zvětšení	Numerická apertura	Pracovní vzdálenost [mm]
Plan – achromáty		
4x	0,1	30
20x	0,4	1,3
40x	0,65	0,57
100x (imersní)	1,25	0,17
Plan – fluor		
4x	0,13	17,1
40x	0,75	0,72
100x (suchý)	0,9	0,3
100x (imersní)	1,3	0,2
Plan – apochromáty		
4x	0,2	15,7
40x	0,95	0,14
40x (imersní)	1	0,16
100X (imersní)	1,4	0,13

*Tabulka 6 Parametry vybraných objektivů [21]*

### 3.5.1.1. Vady objektivů a čoček

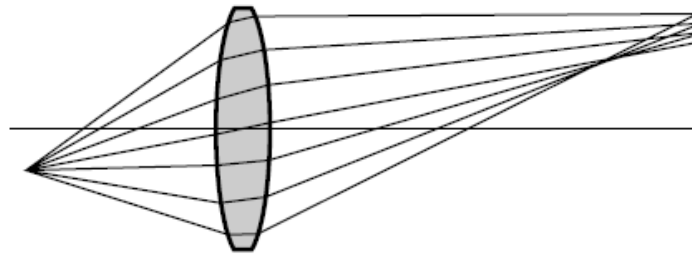
V kapitole 2.7. již byla zmíněna **chromatická aberace**. Tato vada vzniká důsledkem rozdílných vlnových délek světla ve viditelném spektru. Každé barvě v tomto spektru přísluší jiná vlnová délka, a proto se každá část bude při průchodu čočkou lámat jinak. Pro představu, modré světlo se láme do ohniska, které je na optické ose blíže čočce a červené světlo se láme do ohniska, které je od čočky dále. Při této chybě nikdy nedostaneme ostrý obraz, protože jednotlivé body jsou obklopeny barevnými závoji. Jelikož je každá vlnová délka zaostřena do jiné vzdálenosti od čočky, promítá se tato chyba také do rozdílu zvětšení pro různé barvy. Schéma chromatické aberace je na obrázku 14. [22]

Další vadou, kterou trpí čočky je **sférická aberace**, jinými slovy otvorová vada. Tato vada je nežádoucí následek, který vychází ze samotné konstrukce čoček a je způsobena zakřiveným povrchem čočky. Paprsky rovnoběžné s optickou osou, které procházejí střední částí čočky, jsou ostřeny do jiného bodu než paprsky procházející okrajovými částmi. To znamená, že na optické ose není přesně definována obrazová rovina. Bodový zdroj světla se při dokonalém zaostření jeví jako bod, který je obklopen světelnou září nebo sérií soustředných kruhů a výsledný obraz je tedy rozostřený. Sférická aberace nabývá záporných hodnot u spojek a kladných hodnot u rozptylek, z toho vyplývá princip korekce této vady. Jedním z běžných způsobů eliminace této vady je použití dubletu ze spojky a rozptylky různých tloušťek. Soustava čoček upravena k eliminaci sférické aberace je závislá na použití při specifických pracovních podmínkách, mezi které lze zařadit například tloušťku krycího prvku vzorku, polohu ohniskové roviny, index lomu mezi objektivem a vzorkem nebo vlnovou délku světla použitého k osvit. Další možností korekce je použití clony před čočkou, která zamezí průchodu okrajových paprsků, které jsou touto vadou ovlivněny nejvíce. Speciálně jsou k dostání objektivy s prstencem, pomocí kterého lze upravovat korekci za účelem snížení sférické aberace, pokud chceme mít možnost použít různá imerzní média. Schéma paprsků při sférické aberaci je na obrázku 23. Jak chromatickou aberaci, tak sférickou aberaci řadíme do kategorie, kterou nazýváme osově vady. [22]



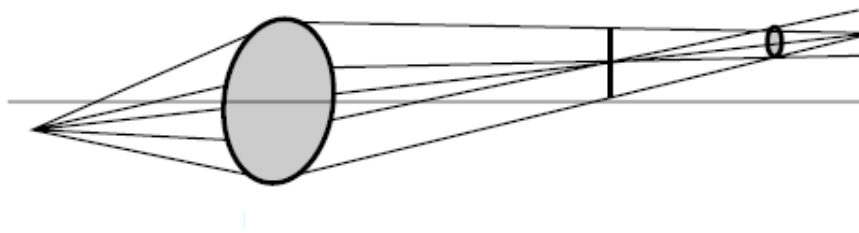
Obrázek 23 Sférická aberace [22]

Hlavním zástupcem mimo-osových vad je **koma**. Tato vada vzniká při zobrazování bodů, které leží mimo optickou osu, to znamená, že obrazové paprsky dopadají na čočku šikmo. Komu lze rozdělit na dva typy, na pozitivní a negativní. O negativní komě mluvíme v případě, kdy jsou paprsky procházející krajními partiemi čočky ostřeny blíže k optické ose než paprsky procházející středem čočky. U pozitivní komy jsou paprsky z periferií ostřeny dále od osy (obrázek 24). V obou případech je obrazem bodu protáhlá skvrna a bývá považována za nejhorší vadu z důvodu asymetrie vzniklého obrazu. Koma bývá obvykle korigována společně se sférickou aberací použitím vícera čoček vhodných tvarů. [22][23]



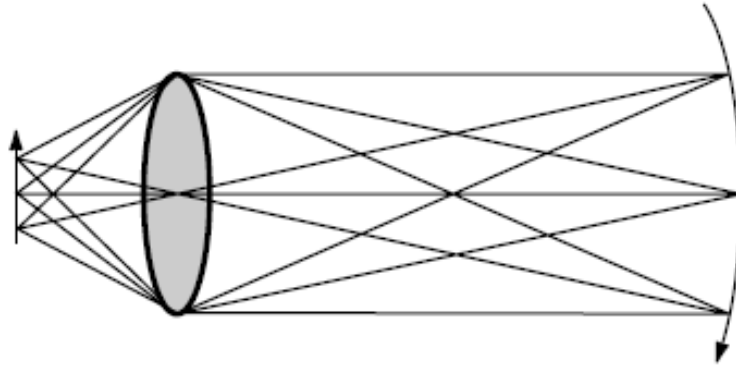
Obrázek 24 Pozitivní koma [22]

**Astigmatismus** je stejně jako koma mimo-osová vada a dochází k ní při zobrazování bodu, který se nachází mimo optickou osu. Oproti komě nejsou vznikající artefakty tolik citlivé na apertuře čočky a závisí mnohem více na úhlu dopadu obrazových paprsků. Astigmatismus je tím větší, čím větší je vzdálenost bodu od optické osy. Obrazové paprsky bodu procházející horizontální a vertikální rovinou čočky jsou zaostřeny do dvou navzájem posunutých míst a projevem je, že předmět v podobě bodu je zobrazen jako čára nebo elipsa, schématické zobrazení je na obrázku 25. Korekce astigmatismu se provádí především pro body ležící na okraji zorného pole a v jeho okolí. Toho je možné docílit kombinací vhodných čoček a clon. [22][24].



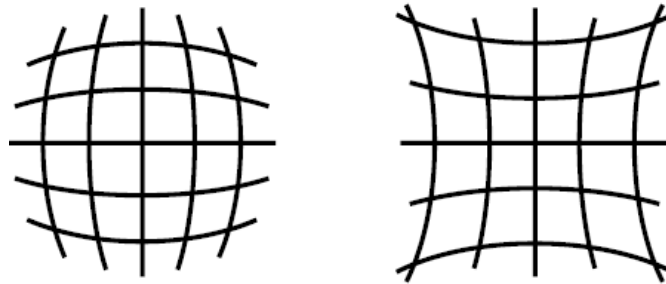
Obrázek 25 Astigmatismus [22]

Do mimo-osových vad řadíme také **zklenutí pole**. Tato vada se projevuje deformací obrazové roviny do sférické konkávní plochy a vzniká následkem změny příčného zvětšení. V tomto případě jsme schopni zaostřit jednotlivé oblasti obrazu ve tvaru prstenců, ale nikdy nezaostříme celý obraz. Schéma zklenutí pole je na obrázku 26. Korigovat zklenutí pole je možné vhodnou konstrukcí objektivu, přidanými čočkami v tubusu a v některých případech i okuláry. [22]



*Obrázek 26 Zklenutí pole [22]*

**Zkreslení**, jinými slovy distorze, je poslední mimo-osovou vadou, kterou se v této kapitole budu zabývat. Tato vada vzniká při zobrazování bodu ležícího mimo optickou osu hlavním paprskem. Následkem zkreslení je nelineární zvětšení v obrazu od středu k periferiím. V závislosti na tom, jestli se gradient zvětšení snižuje nebo zvyšuje, rozeznáváme dva druhy zkreslení. Soudkovité a poduškovité. Identifikovat typ zkreslení je možné například při pozorování rastru. Korekce této vady se provádí stejně jako u zklenutí pole. Na obrázku 27 je na rastru znázorněno zkreslení. Vlevo soudkovité, vpravo poduškovité. [22][25]



*Obrázek 27 Zkreslení [22]*



### 3.5.2. Okuláry

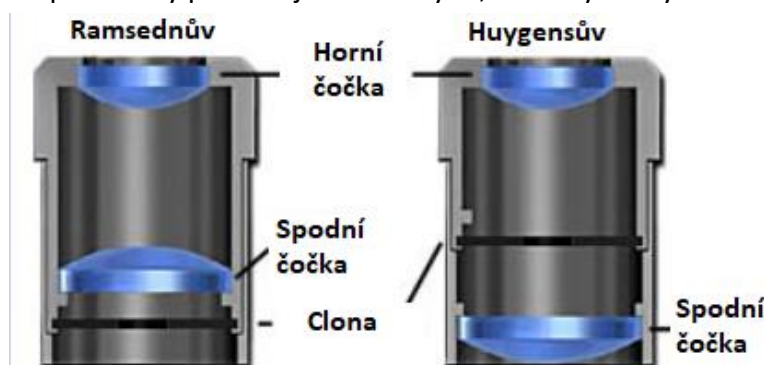
Okuláry slouží k pozorování obrazu z objektivu a jeho dalšímu zvětšení. Abychom optimálně využili zvětšení, které nabízí použitý objektiv, je důležité, aby se celkové zvětšení mikroskopu rovnalo 500 až 1000násobku numerické apertury objektivu. Větším zvětšením bychom už dosáhli tzv. prázdného zvětšení. Prázdným zvětšením rozumíme jev, kdy je výsledný obraz sice zvětšený, ale bez korespondujícího nárůstu v rozlišení detailů. Proto se většina výrobců optických prvků omezila na výrobu okulárů se zvětšením 5x – 20x. Zvětšení okuláru je definované jako 25 cm děleno jeho ohniskovou vzdáleností. Jakou roli okulár sehrává v tvorbě obrazu je popsáno v druhé polovině kapitoly 3.6. [13][22]

Běžně rozeznáváme dva základní typy okulárů z hlediska polohy čoček a clony. Negativní okulár s vnitřní clonou a pozitivní okulár, který má clonu pod čočkami (obrázek 28).

**Negativní okulár** má v nejjednodušším provedení dvě čočky a jednu clonu. Horní čočku, která je blíže k oku a spodní čočku, která je blíže k vzorku. Obě čočky jsou plankonvexní (*ploskovypuklé*) s konvexní plochou směrem k vzorku. Zhruba uprostřed mezi těmito čočkami se nachází fixní clona, která definuje kruhové zorné pole, které je možné pozorovat pohledem do mikroskopu. Tyto nejjednodušší okuláry, často nazývané **Huygensovy**, najdeme převážně u levnějších mikroskopových sestav využívající výhradně achromáty. V základní verzi nejsou čočky obsažené v tomto okuláru dostatečně korigovány. Pro vyšší úroveň korekce je místo jednoduché horní čočky použit čočkový dublet nebo triplet. [13][26]

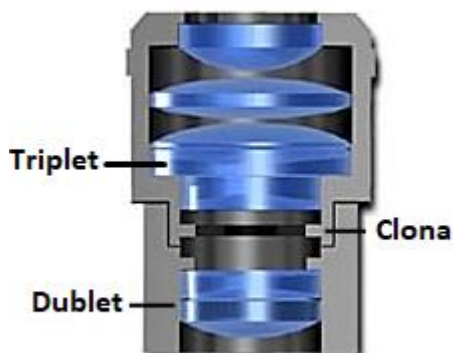
Zástupem druhé hlavní skupiny je **pozitivní okulár**, nebo také **Ramsednův**. Tento okulár má clonu pod spodní čočkou. V základním provedení má pozitivní okulár také dvě plankonvexní (*ploskovypuklé*) čočky, avšak v tomto případě konvexní plochy čoček směřují k sobě a clona je umístěna pod spodní čočkou. Jelikož přední ohnisková rovina leží přímo pod spodní čočkou, v úrovni clony, jsou tyto okuláry vhodné pro instalaci různých rastrů a pravítek k měření. Stejně jako u negativních okulárů, nejsou zde v základní verzi čočky dostatečně korigovány. Pro lepší korekci aberací se místo horní jednoduché čočky použije čočkový dublet nebo triplet. [13][26]

I když okuláry s čočkovým dubletem místo jednoduché horní čočky vykazují lepší vlastnosti, pořád jsou používány pouze s jednoduchými, málo výkonnými achromáty. [26]



Obrázek 28 Okuláry (zleva Ramsdenův, Huygensův) [26]

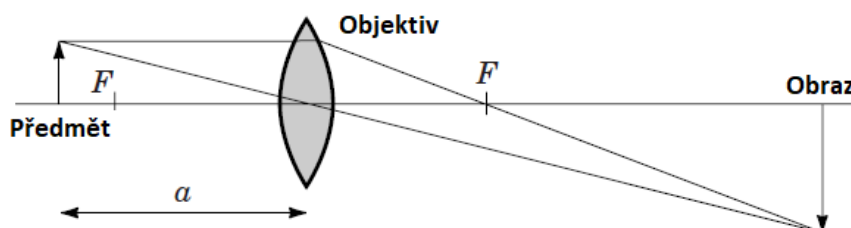
Je celkem jasné, že okuláry vybaveny pouze dvěma čočkami nebudou schopny uspokojivě korigovat zbytkové aberace vznikající v objektivu. Proto se používají okuláry, které obsahují vícero čoček (obrázek 29). Okulár na obrázku 29 obsahuje celkově sedm čoček. Z toho jeden dublet, jeden triplet a dvě čočky samostatné. Takové konstrukční řešení vede ke zlepšení korekce zbytkových aberací, snižuje zklenutí pole a celkově zvyšuje obrazovou kvalitu při použití s výkonnými objektivy. Tyto okuláry by měly být použity společně s výkonnými achromáty a musejí být použity se semi-apochromáty, apochromáty a objektivy typu „plan“. [26]



Obrázek 29 Periplan okulár [26]

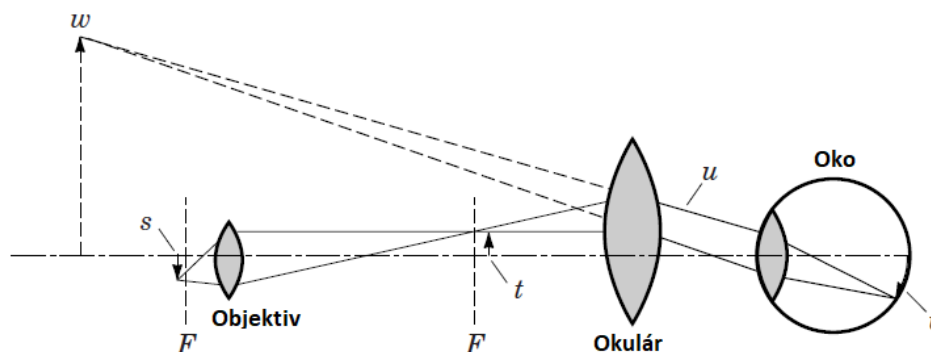
### 3.6. Tvorba obrazu v mikroskopu

K tomu, abychom pochopili, jak funguje mikroskop a jak se vytváří obraz, je třeba chápat základní chování paprsků při průchodu tenkými čočkami (kapitola 2.7.). V případě, kdy je mikroskopový objektiv zaostřen na vzorek, vzniká za objektivem reálný a zvětšený obraz. To znamená, že se předmět nachází ve vzdálenosti  $a$  mezi  $1f$  a  $2f$  (obrázek 30). Při reálném používání mikroskopu dostaneme ostrý obraz tak, že vzorek (*předmět*) umístíme do správně vzdálenosti  $a$  od objektivu. Ve skutečnosti dochází k tomu, že se ostřením mikroskopu snažíme dostat obraz (*obr. 31 „t“*) vytvořený objektivem do konkrétní polohy v přední apertuře okuláru. Pokud je mikroskop rozostřen, pořád existuje v blízkosti přední apertury okuláru skutečný obraz. Ten ale není ve správné pozici, aby okulár společně s okem mohly vytvořit ostrý obraz na sítnici. Na obrázku 31 si všimněme, že vzdálenost obrazu „t“ je několikanásobně větší, než vzdálenost předmětu „s“. Podíl vzdálenosti obrazu ku vzdálenosti předmětu nazýváme zvětšení a obvykle se pohybuje rozmezí 10 až 100. Výše zmíněný princip platí pro mikroskopy s objektivy, které nedisponují korekcí na nekonečno. [22]



Obrázek 30 Předmět – objektiv – obraz [22]

Na obrázku 31 je postupně vyznačen předmět společně se skutečnými a zdánlivými obrazy vznikajícími v mikroskopu, od  $s$  do  $w$ . Všimněme si, že předmět  $s$  leží těsně před ohniskem objektivu. Díky tomu vzniká již zmíněný skutečný, zvětšený obraz  $t$  v oblasti těsně za ohniskem okuláru. Protože je obraz  $t$  za ohniskem okuláru, vznikají divergující paprsky  $u$ , ze kterých rohovka a oční čočka vytvoří skutečný obraz  $v$  na sítnici. Sítnice z důvodu divergujících paprsků  $u$  vnímá předmět jako zvětšený, zdánlivý obraz  $w$ . [22]



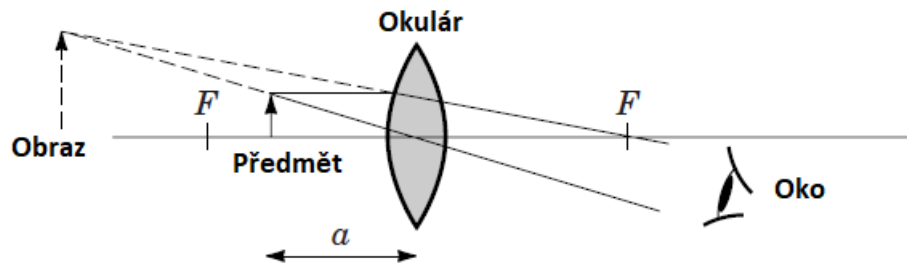
Obrázek 31 Základní princip nekorigovaného mikroskopu [22]

Moderní mikroskopy, využívající objektivy s korekcí na nekonečno, využívají k získání zvětšeného a skutečného obrazu stejný princip, jako byl uveden na začátku této kapitoly. Liší se v konstrukčním provedení optické trasy. U objektivů s korekcí na nekonečno je vzorek (předmět) umístěn v ohnisku objektivu a z jeho druhé strany vycházejí paralelní paprsky, které jsou zaostřeny do nekonečna a netvoří tedy žádný obraz. Tvorbu obrazu z takto korigovaného objektivu má za úkol tubusová čočka v těle mikroskopu, která z paralelních paprsků vytvoří skutečný obraz v okuláru. [22]

Hlavní výhodou této konstrukce je, že se zvyšuje flexibilita použití a konstrukce mikroskopu při zachování kontrastu a rozlišení, za kterým stojí objektiv. Mikroskop lze díky tomu dovybavit například o polarizátory, kompenzátory, DIC hranoly (diferenciální interferenční kontrast), zrcadla a fluorescenční filtry. Všechny tyto prvky lze umístit kamkoliv do oblasti paprsků zaostřených do nekonečna (paralelních paprsků), čili kamkoliv mezi objektiv a tubusovou čočku. Pokud budeme uvažovat kombinaci objektivu a tubusové čočky jako jeden skutečný objektiv, budou pořád platit pravidla pro vytvoření zvětšeného a skutečného obrazu jako na obrázku 31, protože pořád platí, že předmět je ve vzdálenosti mezi  $a$  mezi  $1f$  a  $2f$ . [22]

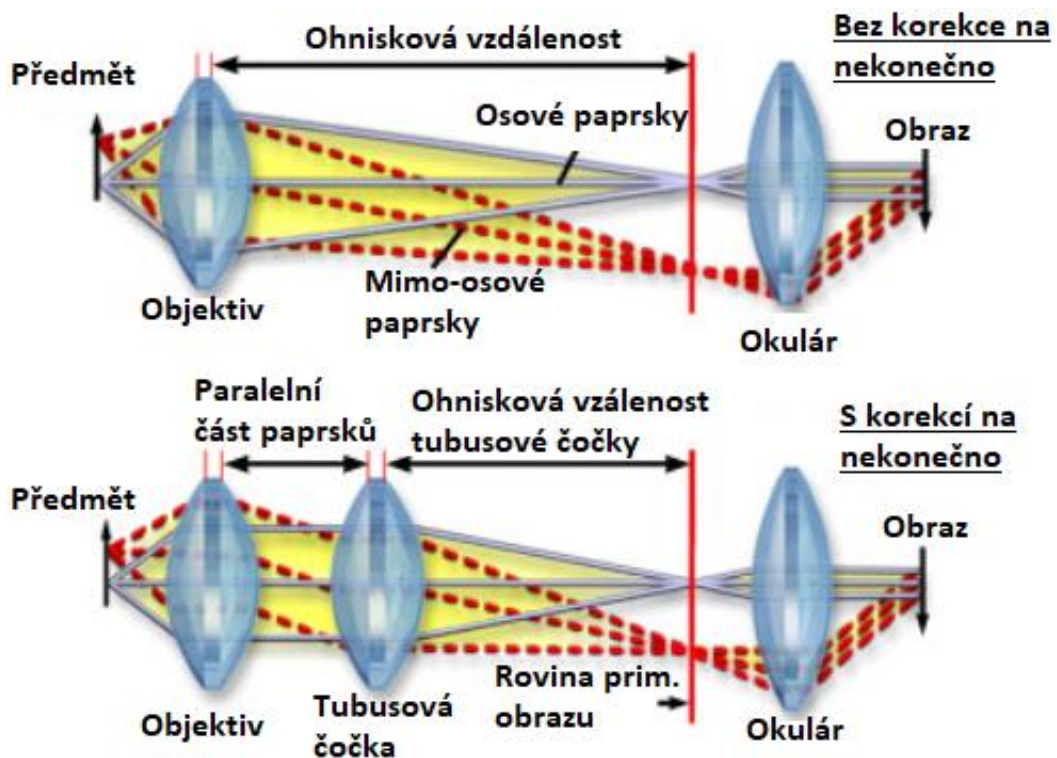
Funkcí okuláru je zvětšit primární obraz vytvořený objektivem v závislosti na vlastním zvětšení a společně s optickými prvky oka vytvořit na sítnici zvětšený a skutečný obraz obrazu primárního. Tím pádem, předmětem pro okulár je primární obraz vytvořený objektivem. **Důležité** je si uvědomit, že v případě okuláru leží předmět (primární obraz z objektivu) ve vzdálenosti menší, než je ohnisková vzdálenost okuláru a vzniká tedy zdánlivý obraz, který nelze zobrazit na stínítko a ani zachytit kamerou (obrázek 32). Pokud umístíme oko za okulár, tak soustava okulár-oko vytvoří skutečný sekundární obraz na sítnici, který mozek vnímá jako zvětšený zdánlivý obraz, který se nachází zhruba 25 cm před okem.

Vnímání zdánlivých obrazů je v optických systémech běžnou záležitostí. Například při pozorování malých objektů obyčejnou lupou „vidíme“ jejich zdánlivý obraz, nebo při pohledu do zrcadla.[22]



Obrázek 32 Chod paprsků okulárem [22]

Na obrázku níže (obrázek 33) je schematicky znázorněn chod paprsků v mikroskopu bez korekce na nekonečno (*nahoře*) a s korekcí na nekonečno (*dole*). Jak již bylo zmíněno, hlavním rozdílem je přítomnost oblasti paralelního chodu paprsků mezi objektivem a tubusovou čočkou. [22]



Obrázek 33 Schéma mikroskopu bez korekce na nekonečno a s korekcí na nekonečno [28]

## 4. Digitální mikroskopie

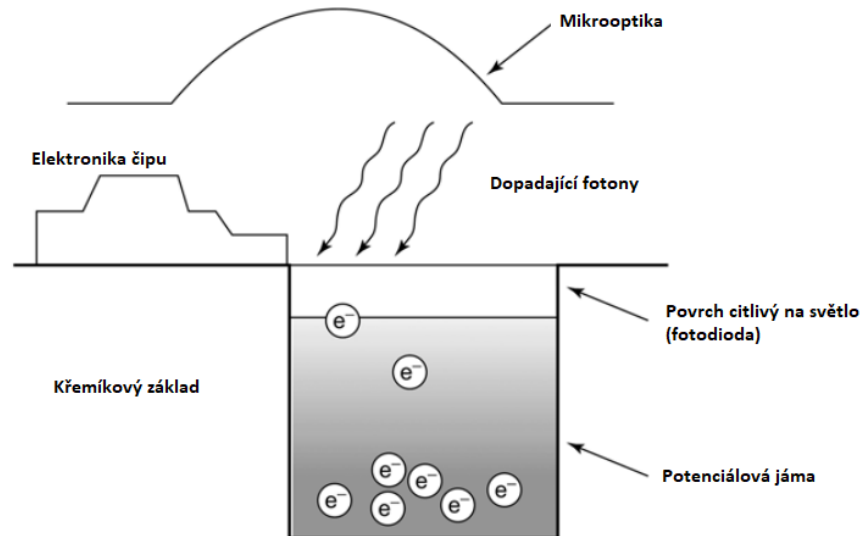
Základní konstrukční řešení světelného mikroskopu se za několik posledních dekad skoro nezměnilo. Dramaticky se za tu dobu ovšem změnil způsob, jakým jsou dnes mikroskopy používány a pokrok v používání se posouvá kupředu rapidní rychlostí. Z části je tato evoluce poháněna inovováním a vylepšováním komponent mikroskopu, které následně dovolují pozorovateli přistupovat k zobrazování novými způsoby. Vývoj různých přístupů k mikroskopii se superrozlišením je například založen na kompletní modifikaci způsobu sběru a analýzy obrazových dat a některé nové přístupy byly umožněny až s použitím konkrétních inovovaných komponent. Klíčovou komponentou, u které došlo k obrovskému pokroku je **obrazový záznamový systém**, který tvoří zásadní **rozdíl** mezi konvenční a digitální mikroskopií. V dnešní době se obrazové záznamové systémy skládají ze skupin hardwarových a softwarových prvků, které jsou specifické pro jednotlivé typy mikroskopů. [32]

Moderní záznamové systémy dokonce neodpovídají definicím rozlišení, protože rozlišení mikroskopu je založeno na teoriích, které předpokládají, že výstupní obraz bude detekován lidským okem. Většina těchto systémů v porovnání s lidským okem dosahuje v určitých oblastech mnohonásobně lepších výsledků. Všechny tyto pokroky v technologii daly vzniknout širokému spektru záznamových systémů pro obecné i specifické aplikace a otevřely dveře novým způsobům záznamu obrazu. Jako příklad lze uvést mikroskopii se superrozlišením, která stojí na základech pokroků v pořizování obrazových záznamů. [32]

Obecně lze říct, že obrazové záznamové systémy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, dle principu zachycení zorného pole. První skupinou jsou systémy, které zaznamenávají celé zorné pole najednou. Druhou skupinou jsou systémy, u kterých je obrazová informace získávána sekvenčním snímáním vzorku bod po bodu a následnou rekonstrukcí dvojrozměrného obrazu z dat jednotlivých bodů. Příkladem druhé skupiny jsou například laserové skenovací konfokální mikroskopy (*LSCM*). Každý princip získávání obrazové informace má zcela odlišné nároky na detektor a jedná se tedy o velmi obsáhlé téma. Princip funkce konfokálních mikroskopů bude nastíněn v dalších kapitolách a v této kapitole se omezíme na popis systému, který zaznamenává celé zorné pole najednou. To je především záznam **monochromatickou kamerou**. [32]

### 4.1. Architektura světelného senzoru

Většina světelných senzorů kamer používaných v mikroskopii jsou na bázi křemíku. Tento element má schopnost tvořit velké krystaly, ve kterých je každý atom vázán na svých šest sousedních atomů a vytváří obdélníkovou, trojrozměrnou mřížkovou strukturu. Dopadající foton může v určitých případech vazbu mezi atomy přerušit za současného uvolnění elektronu (*fotoelektrický jev*). Na povrchu křemíkové části je nanesena tenká kovová vrstva s pozitivním nábojem, která vytváří potenciálovou jámu. Potenciálová jáma má za úkol sbírat a uchovávat elektrony, princip je zobrazen na obrázku 34. Každý jeden světelný senzor (*pixel*) záznamového zařízení má svoji potenciálovou jámu. [33]



Obrázek 34 Schématická reprezentace senzoru citlivého na světlo (pixel) CMOS [33]

V závislosti na konstrukci senzoru rozlišujeme několik základních záznamových zařízení (*kamer*): **CCD** (charge-coupled device), **CID** (charge-injection device), **CMOS APS** (complementary metal-oxide semiconductor active pixel sensor), **CMOS PPS** (complementary metal-oxide semiconductor passive pixel sensor) a další. Nicméně, všechny zmíněné kamery fungují na principu obdélníkového pole, které je složeno ze senzorů citlivých na světlo (*pixelů*). Toto pole nazýváme čip. Výkonnost takového zařízení je charakterizována poměrem signálu k šumu, který určuje kvalitu měření. Tento poměr je běžně vyjádřen v decibelech pomocí vzorce [33]:

$$SNR \text{ (signal to noise)} = 20 \log(\text{signál}/\text{šum}) \quad [33] \quad (18)$$

Množství signálu je omezeno hloubkou potenciálové jámy, což je měřítkem toho, kolik náboje je jednotlivý senzor citlivý na světlo (*pixel*) schopný akumulovat. Tento parametr je obvykle měřen v elektronech a je vztažen na část čipu, která je citlivá na světlo (*faktor plnění*). Ve většině případů je polovina plochy čipu, nebo ještě větší část, zakryta neprůhlednými obvody, které slouží k přenosu náboje. Kvůli těmto obvodům jsou mezi jednotlivými pixely mezery, které redukuje faktor plnění pod hodnotu ideálních 100 %. Na povrchu čipu může být nanášena tenká vrstva s mikrooptickými elementy, které zaostřují dopadající světlo na citlivou část příslušných pixelů. Hloubka potenciálové jámy je úměrná velikosti pixelu. Například čip Kodak KAF-3200E CCD má pixel o velikosti 6,8 mikrometrů a hloubku potenciálové jámy 55 000 elektronů. Čip Kodak KAF 6303E má pixel o velikosti 9 mikrometrů a hloubku potenciálové jámy 100 000 elektronů. [33]

Pokud je hloubka potenciálové jámy jednoho pixelu překročena, elektrony proniknou do sousedních jam, což má za následek vznik jasného pruhu světla, který se táhne vertikálně z elektrony nasyceného bodu. Tento jev se nazývá **blooming** (obrázek 35) a k jeho eliminaci je nutné vybavit potenciálové jámy jednotlivých pixelů o kanály, které přebytečné elektrony odvádějí. Avšak čipy vybavené touto ochranou mají v porovnání s čipy bez ochrany mnohem menší hloubky potenciálových jam a jsou tedy méně citlivé. [33]



Obrázek 35 Blooming zapříčiněný nasycením pixelů [34]

Proces **pixel binning** (*hardwarové sdružování pixelů*) je proces, při kterém je možné spojit sousední pixely do jednoho za účelem získání pixelu s větší plochou. Například 2x2 binning znamená, že se náboj ze čtyř sousedních pixelů spojuje dohromady. Citlivost na světlo takto spojeného pixelu se čtyřikrát zvýší. Nicméně, účinná šířka a výška (*v pixelech*) čipu se odpovídajícím způsobem sníží. Je důležité si uvědomit, že se snižujícím počtem pixelů klesá i rozlišení. [33]

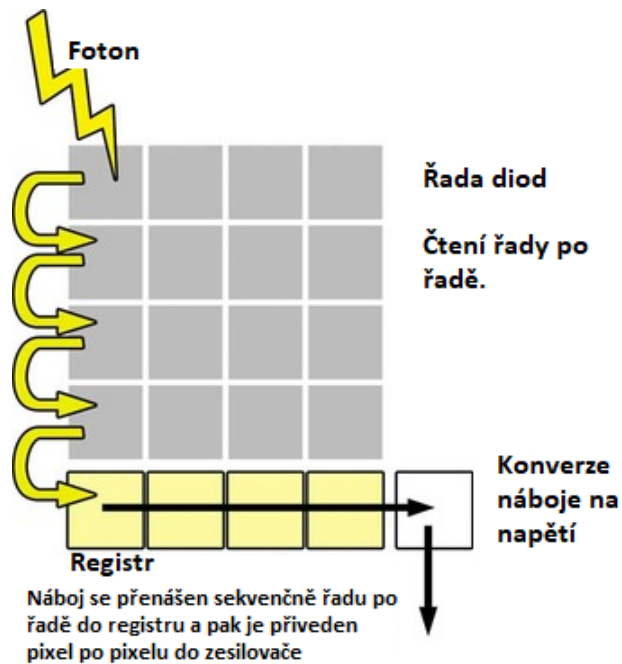
Z dopadajících fotonů je přeměněn jen zlomek na elektrony (*fotoelektrony*), které jsou uchovány a na konci expozice systémem přečteny. Množství fotonů, přeměněných na elektrony závisí u jednotlivých snímačů na jejich kvantové účinnosti (*QE – quantum efficiency*), což je funkce vlnové délky dopadajícího světla. Běžné kamery jsou nejvíce citlivé na vlnové délky zeleného a červeného světla z oblasti mezi 550 a 900 nanometry. Kamery střední třídy mají kvantovou účinnost QE v rozmezí od 25 % do 50 %. Nejlepší vědecké CCD kamery pro použití v laboratorních podmínkách dosahují kvantové účinnosti až 98 %. [33]

Všechny pořízené snímky jsou určitým způsobem znehodnoceny šumem. Jedná se o stochastický jev, který není zcela možné kompenzovat ani odstranit. Druhy šumu, které hrají roli v pořizování snímků vědeckými kamerami jsou: tepelný šum, fotonový šum, šum z obvodů a kvantifikační šum. [33][35]

## 4.2. CCD a CMOS

Jak již bylo řečeno v kapitole 4.1., většina mikroskopových záznamových systémů fungují na některé formě CCD snímače nebo CMOS snímače. Ačkoliv mezi nimi existuje řada podobností, v principu funkce se od sebe tyto dva druhy dramaticky liší. [32]

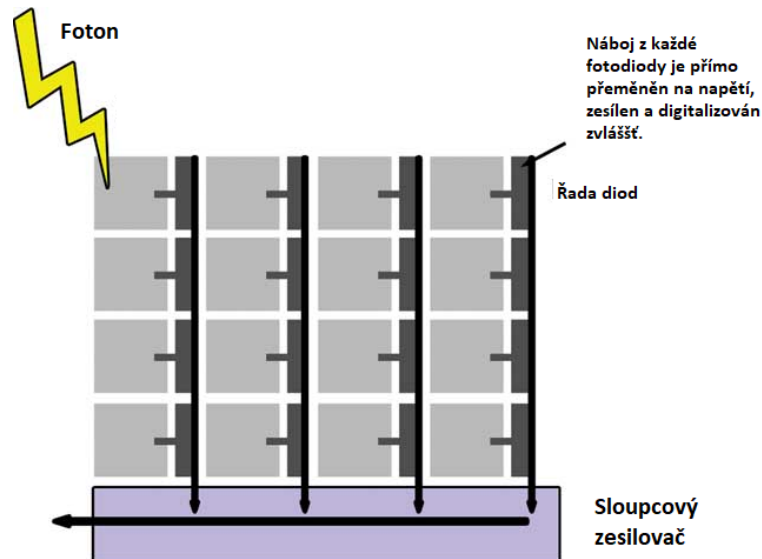
**CCD čipy** se skládají z dvojrozměrného pole fotodiod (*obrázek 36*). V průběhu záznamu obrazu se zvyšuje náboj v každé fotodiodě (*pixelu*). Poté je záznam ukončen a informace je dále sekvenčně zpracovávána. Existuje několik možností, jak může být informace zpracována, ale ve své podstatě se elektronový mrak z každého pixelu přenáší jeden po druhém do zesilovače, který měří hodnotu náboje a převádí ho na napětí. Přidružené elektronické zařízení poté redukuje šum, digitalizuje hodnoty a vytváří digitální data pro uložení v paměti počítače. Hlavní nevýhodou principu funkce CCD čipu je postupný přenos náboje ze všech pixelů, což limituje, jak rychle za sebou mohou být jednotlivé obrazy získány. To znamená, že se musí dokončit přenos náboje z každého pixelu před tím, než začne proces snímání dalšího obrazu. [32]



*Obrázek 36 Schématický princip funkce CCD čipu [32]*

Kamery využívající **CMOS** technologii se také skládají z dvojrozměrného pole fotodetektorů, které převádí fotony na elektrický náboj s hodnotou úměrnou energii absorbovaného fotonu. Ale v případě architektury CMOS je zesílení a digitalizace signálu prováděna v každém jednotlivém pixelu v určité pixelové řadě a až pak je předána dalšímu čipu, který má na starost správu digitálních dat a ukládání do počítače (*obrázek 37*). Tento postup řadového zpracování dramaticky snižuje čas, který je potřebný k přečtení obrazové informace a přípravě čipu k zachycení dalšího snímku. Výhoda vyšší snímací rychlosti je v tomto případě vykoupena zvýšenou variabilitou mezi pixely navzájem, protože každý pixel má svůj vlastní zesilovací obvod. [32][35]





Obrázek 37 Schématický princip funkce CMOS čipu [32]

Ještě před několika lety bylo celkem jednoduché, jakou architekturu čipu si vybrat. Jestli sáhnout po kameře s čipem CCD nebo s čipem CMOS. Pokud jsme požadovali vysoké rozlišení, vybrali jsme čip CCD a pokud jsme chtěli zachytit a pozorovat rychlé děje, volili jsme CMOS čip. V dnešní době dochází k rapidnímu pokroku v konstrukci CMOS čipů, konkrétně CMOS čipů speciálně pro vědecké použití a volba správné kamery už není tak přímočará. Výběr správné kamery pro konkrétní aplikaci je tedy značně obtížnější, protože existuje nespočet parametrů, které je třeba vyhodnotit a porovnat. Proto budou v následujících kapitolách popsány ty nejdůležitější parametry, které nejvíce ovlivňují výkonnost kamer s CCD a CMOS čipy. [32][33]

### 4.3. Barevná vs monochromatická kamera

Princip funkce kamerových čipů, které byly popsány výše, závisel čistě na měření intenzity dopadajícího světla a nebral v potaz spektrum vlnových délek. Což znamená, že získané obrazy byly monochromatické. Záznam barevného obrazu vyžaduje, aby čip měřil intenzitu dopadajícího světla různých vlnových délek. Běžně se volí červená, zelená a modrá k napodobení lidského zraku. K tomu se obecně používají dva druhy kamer: kamera s jediným čipem, který je vybaven filtry vlnových délek nebo kamery se systémem třech senzorů. [33]

Kamery, které využívají jeden čip jsou zpravidla vybaveny třemi druhy filtrů, které jsou využívány k zaznamenávání červených, zelených a modrých obrazů. Prvním je sestava tří barevných filtrů, druhým je nastavitelný filtr z tekutých krystalů a třetím je Bayerova maska (*Bayerův filtr nebo Bayerova mozaika*). Pokud je použita sestava tří filtrů nebo nastavitelný filtr, jsou jednotlivé barevné obrazy zaznamenávány za sebou. [33]

Výhodou použití sestavy tří oddělených filtrů je vysoký přenos (*95 % zvoleného rozsahu*), na druhou stranu, změna filtru zabere nějaký čas a může být zdrojem vibrací. Použitím nastavitelného filtru se sice vyhneme těmto nevýhodám v podobě delšího času

potřebného k výměně a možných vibrací, ale musíme počítat s nevýhodou v podobě nižšího přenosu, který nepřesáhne 50 % pro nepolarizované dopadající světlo. [33]

Bayerova maska se liší od dvou výše popsaných principů tím, že každý pixel je spojen s vlastním filtrem určité barvy (*červená, zelená a modrá*). Tato konstrukce kombinuje vysoké hodnoty přenosu s rychlostí, protože je barevný obraz zaznamenán najednou. Avšak skutečné intervaly vzorkování a rozlišení se sníží v porovnání se stejným senzorem bez Bayerovy masky. Ke spojení obrazů a zvýšení počtu pixelů se využívá softwarové interpolace. [33]

V roce 2002 byl na trh uveden revoluční čip **Foveon X3**, který odstranil problémy se sníženou prostorovou frekvencí při pořizování barevných snímků. Tento senzor se skládá ze tří vrstev materiálů citlivých na světlo, kde každá vrstva reaguje na jinou vlnovou délku. Díky této konstrukci je možné zachytit snímky všech tří barev zároveň. Nevýhodou tohoto řešení je malá kvantová účinnost ( $QE < 50\%$ ) v porovnání s většinou kamer pro vědecké použití. [33][35]

Současné zachycení snímků tří barev (*červená, zelená a modrá*) s vysokou citlivostí a rozlišením je možné při použití kamery se třemi čipy. Ta obsahuje optické hranoly k rozdělení paprsků dle vlnových délek, aby každý čip mohl zachytit a vyhodnotit odpovídající barvu. Zásadním problémem těchto kamer je jejich pořizovací cena, která je mnohonásobně vyšší než cena kamer s jedním čipem. [33]

Obecně lze říct, že barevné kamery jsou méně citlivé než jejich monochromatické protějšky, z důvodu přítomnosti optických komponent, jako jsou optické hranoly a barevné filtry. Nicméně tato nevýhoda může být vyvážena schopností zobrazit barevný obraz. [33]

#### **4.4. Parametry kamer**

V této kapitole je rozebrán výběr z nejdůležitějších parametrů, které hrají roli při volbě správné kamery pro konkrétní aplikace. [32]

##### **4.4.1. Velikost pixelu**

Jedním z klíčových parametrů při rozhodování hraje velikost jednotlivých pixelů. Jejich velikost určuje limitní rozlišení senzoru. Pro dané zvětšení, například 50x, menší velikost pixelů znamená vyšší rozlišení pořízeného obrazu. Je ale důležité si uvědomit, že velikost pixelů není jediným faktorem, který ovlivňuje výsledné rozlišení. Jak bylo popsáno v kapitole 3.4., rozlišení je ovlivněno také numerickou aperturou čili objektivem. [32]

Se zmenšující se velikostí jednotlivých pixelů se zmenšuje kapacita potenciálové jámy (*kolik elektronů je zachyceno, než dojde k nasycení*) a tím pádem mají menší pixely nižší poměr signálu ku šumu a menší hodnota dynamického rozsahu. Ke snížení poměru signálu ku šumu u kamer s malými pixely pomáhá chlazení kamer pod teplotu okolí. V dnešní době je většina kamer s vysokým rozlišením (*chlazené CCD (cCCD) a sCMOS*) s velikostí pixelu okolo 6,5 mikrometru schopna dosáhnout plného rozlišení s přijatelným dynamickým rozsahem a poměrem signálu ku šumu. Tabulka 7 porovnává klíčové vlastnosti nedávno uvedených cCCD a sCMOS kamer s velikostí pixelu 6,5 mikrometrů čtverečních.

V nedávné době byly také na trh uvedeny některé kamery s velikostí pixelu 4,5 mikrometrů a uspokojivým SNR poměrem. Obecně lze říct, že CMOS kamery mají o něco vyšší hodnoty SNR než CCD kamery, ale v praxi tento rozdíl není příliš výrazný. [32][33]

Parametr	cCCD	sCMOS
Velikost pixelu	6,5 $\mu\text{m}$ x 6,5 $\mu\text{m}$	6,5 $\mu\text{m}$ x 6,5 $\mu\text{m}$
Počet pixelů	1392 x 1040	2048 x 2048
Nejvyšší QE	70 % při 600 nm	72 % při 560 nm
Rychlost čtení	Do 17 FPS	Do 100 FPS
Šum při čtení	2e	2,5e
Dynamický rozsah	3000:1	30000:1

Tabulka 7 porovnání běžných chlazených CCD a sCMOS kamer [32]

Je jasné, že mikroskop zvětšuje obraz předmětu a promítá ho na kamerový čip. Je tedy nutné, abychom při výběru kamery zvažili, jak je velký obraz nejmenšího rozlišitelného bodu na vzorku, který je promítán na čip kamery. Pokud chceme zaznamenat plné rozlišení, které je dostupné skrze vybraný objektiv, je nutné ověřit, zda je zvolená kamera schopna vzorkování tohoto rozlišení. Tabulka 8 porovnává efekt, který má zvětšení obrazu na vzorkování difrakčního bodu. Všechny uvedené objektivy mají numerickou aperturu 1,4 a jsou schopny rozlišit od sebe body o velikosti okolo 0,2 mikrometru v průměru. V tomto určitém případě je samotným mikroskopem zvětšen obraz ještě 1,25x. To znamená, že v kombinaci s objektivem se zvětšením 40x se dostaneme na celkové zvětšení 50x. Při tomto zvětšení je bod o velikosti 0,2 mikrometru promítán na čip jako bod o velikosti 10 mikrometrů. Nyquist-Shanonův vzorkovací teorém říká, že tento objekt s průměrem 10 mikrometrů musí být vzorkován nejméně dvakrát ve směru X a dvakrát ve směru Y. to znamená, že pro zobrazení tohoto bodu je nutné mít senzor o velikosti 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  nebo menší. Takže čip o velikosti 6,5  $\mu\text{m}$  x 6,5  $\mu\text{m}$  není schopný zaznamenat plné, difrakčně omezené rozlišení objektivu. Objektivy se zvětšením 63x a 100x už vytváří obraz, který je dle Nyquistova kritéria dostatečně vzorkován. Pokud je velikost senzoru menší, než je nutné k dostatečnému vzorkování nejmenšího rozlišitelného bodu (*například objektiv se zvětšením 100x v tabulce 8*), tak je možné za účelem zlepšení poměru SNR využít pixel binning. [32][33]

Zvětšení objektivu	Zvětšení v kameře	NA	Rozlišení mikroskopu	Zvětšené rozlišení	Přijatelné vzorkování
40x	50x	1,4	0,2 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	Ne
63x	78x	1,4	0,2 $\mu\text{m}$	15,6 $\mu\text{m}$	Ano
100x	125x	1,4	0,2 $\mu\text{m}$	25 $\mu\text{m}$	Ano

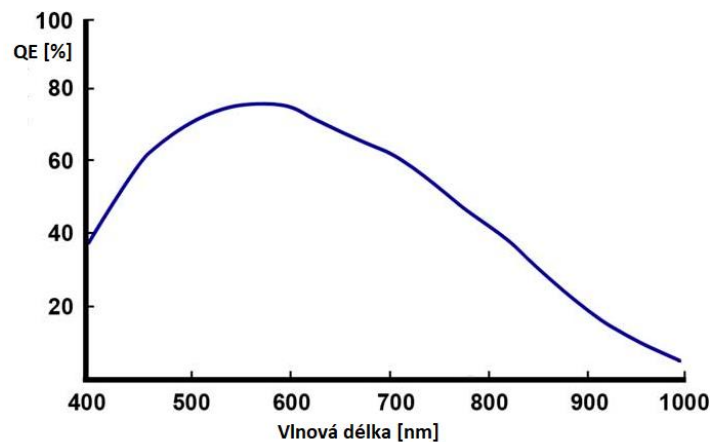
Tabulka 8 Mikroskopem zvětšený obraz promítaný na pixel o velikosti 6,5  $\mu\text{m}^2$  [32]

#### 4.4.2. Snímkovací frekvence

Snímkovací frekvence udává počet snímků, který je kamera schopná zachytit za sekundu. Digitální kamery nám dovolují snímkovací frekvenci do určitého maxima volit. V této oblasti jednoznačně převládají čipy CMOS s paralelním zpracováním obrazu. Maximální rychlost snímkovací frekvence je tedy vyšší pro CMOS čipy než pro CCD čipy, a to i navzdory faktu, že CCD prošly v této oblasti velkým pokrokem. Pro oba typy čipů ale platí, že s vyšší rychlostí snímkovací frekvence se zkracuje čas expozice a tím pádem i poměr SNR. [32]

#### 4.4.3. Spektrální odezva

Spektrální odezva kamery popisuje, jak dobře detekuje čip specifické vlnové délky dopadajícího světla. Jak CCD čipy, tak vědecké CMOS čipy jsou citlivé na vlnové délky od 400 nm do 1000 nm. Jelikož kvantová účinnost není konstantní v celém tomto spektru, je třeba vždy zkontrolovat spektrální odezvu konkrétní kamery. Kamery mívají obvykle určitou citlivost i ve spektru velmi blízkému infračervenému záření, pokud je potřeba detekovat signály i z tohoto spektra, v oblasti blízké infračervenému záření dosahují lepších výsledků CMOS čipy. Na obrázku 1 je znázorněna křivka odezvy pro CCD čip, tento konkrétní čip má rozumnou hodnotu kvantové účinnosti v celém viditelném spektru s maximem 73 % při 560 nm. [32][33]



Obrázek 38 Spektrální odezva pro CCD čip [32]

#### 4.4.4. Dynamický rozsah

Dynamický rozsah kamery udává, kolik samostatných a odlišitelných úrovní šedé je kamera schopna detekovat a třídit. Jinými slovy, popisuje nejmenší množství světla, které pixel zachytí a kolik fotonů je čip schopný nasbírat, než je nasycen. Jestliže je mezi nejmenším množstvím detekovatelného světla a nasycením veliký rozdíl, je snazší rozlišit jemné rozdíly v intenzitě světla vycházejícího z různých oblastí na vzorku. [32]

Dynamický rozsah si lze dobře představit následovně, když má nejnižší detekovatelná hodnota světla úroveň 2 a sytost nastane při hodnotě 12, tak 2 představuje část, která bude na obrazu černá a 12 představuje část, která bude bílá. Mezi černou (2) a bílou (12) musíme tedy rozdělit všechny různé odstíny šedé ve vzorku jenom na 9 úrovní (od 3 do 11). Je tedy jasné, že jemné rozdíly ve stínování nebudou zachyceny a uloženy. Na

druhou stranu, pokud nejnižší hodnota bude 2 a nejvyšší (*při nasycení*) bude 200, tak budeme schopni zachytit a uložit mnohem jemnější rozdíly v intenzitě světla. To znamená, že čím vyšší dynamický rozsah, tím lepší je kamera v zachycení malých rozdílů ve stínování vzorku. [32]

Dynamický rozsah je hloubka potenciálové jámy pixelu dělená čtecím šumem. Obvykle se hodnota DR často udává jako poměr, například 3000:1. Tento poměr udává rozsah od 1 (*černá*) do 3000 (*bílá*). Hodnotu DR můžeme také popsat jako počet bitů nesoucích informaci, které je možné rozlišit. Dvanácti bitový snímač má dynamický rozsah 4096:1 ( $2^{12} = 4096$ ). Hodnota DR bude jiná pro jiné snímkovací frekvence, obvykle mají CCD čipy v této oblasti výhodu, ale nové kamery s sCMOS čipy pro vědecké použití už dosahují oproti CCD čipům lepších výsledků. [32][33]

#### **4.4.5. Šum ze čtení signálu**

Čtecí šum je elektronický šum v systému. Jeho úroveň v kameře je důležitá při určování dynamického rozsahu a zároveň určuje, jak výkonná bude kamera při nízké intenzitě osvětlení. Se stoupající snímkovací frekvencí šum ze čtení roste. Přestože kamery vybavené sCMOS čipy jsou schopny dosáhnout snímkovací frekvence až 100 snímků za sekundu, jsou tyto hodnoty využitelné pouze v případě, že máme k dispozici silný signál. Pro případy velmi slabého osvětlení jsou k dispozici modifikované verze CCD čipů, které se nazývají elektronové násobící CCD čipy (*EM-CCD*). V těchto čipech prochází elektrony z každého pixelu víceúrovňovým zesilovacím registrem. V každém stupni registru způsobují přijaté elektrony ionizační děj, který zvyšuje počet elektronů. To znamená, že na výstupu z každé úrovně registru je počet výstupních elektronů podstatně navýšen. Kamery EM-CCD jsou tedy velmi citlivé při slabém osvětlení, ale jejich jednotlivé pixely jsou obecně větší než u obyčejných cCCD čipů. Vliv velikosti pixelu je rozebrán v kapitole 4.4.1. [32][33]

#### **4.4.6. Temný šum**

Temný šum vzniká díky teplotní excitaci elektronů v jednotlivých pixelech. Zde mají výhodu chlazené čipy cCCD a sCMOS, které tento šum výrazně redukují konstantním snižováním teploty čipu. Zde chlazené cCCD vykazují mnohem nižší hodnoty temného šumu v porovnání s chlazenými sCMOS čipy stejné velikosti. Můžeme bez obav říct, že ve většině případů je temný šum u cCCD čipů zanedbatelný. Je třeba dodat, že v poslední době výrobci sCMOS čipů tyto čipy podstatně vylepšili a docílili značné redukce hodnot temného šumu. Může se stát, že budeme v brzké době svědky příchodu sCMOS čipů, kde temný šum bude mít zanedbatelný dopad na celkové čtení signálu. [32]

#### **4.5. Výhody digitální mikroskopie a porovnání s optickou**

Z principů uvedených výše vyplývá, že mezi hlavní výhody digitální mikroskopie patří skutečnost, že jsme schopni výsledný obraz zobrazit na display nebo monitor a následně ho dále zpracovávat a analyzovat. Obecně se ke zpracování používají dva přístupy využívající softwarového zpracování. Prvním je zpracování a analýza obrazu přímo v softwaru mikroskopu (*Keyence, Leica, Olympus*), který je s mikroskopem přímo spojený. Druhým je zpracování obrazu v softwaru třetí strany, kam je nutné obraz před analýzou naimportovat v příslušném formátu, například Nikon NIS-elements.

Obraz je v softwaru možné upravovat nespočetně způsoby. Lze například upravovat histogram, zvyšovat kontrast, korigovat zklenutí pole a aplikovat různé filtry za účelem zlepšení kvality obrazu. V takto upraveném, nebo neupraveném obrazu je možné provádět nespočet variant kvantitativní analýzy. Lze například měřit rozměry jednotlivých bodů zájmu, jejich plochu a skrze určité matematické algoritmy i jejich četnost, například dle barvy nebo velikosti.

Velkou výhodou při použití softwaru, který je přímo spojen s mikroskopem je možnost použití funkcí ke skládání obrazu. Díky těmto funkcím jsme schopni při určitém zvětšení získat obraz větší plochy, než která je v daný okamžik v zorném poli. Díky takto složeným snímkům můžeme v jednom snímku zobrazit plochu požadované velikosti s větším zvětšením, než kdybychom funkci skládání snímků nevyužili a byli bychom nuceni využít k jejímu zobrazení menšího zvětšení. Dnes dostupné digitální mikroskopy umožňují i skládat snímky v ose *Z* (*kolmo k ploše vzorku*) a jejich složením pak získat ostrý obraz s podstatně vyšší hloubkou ostrosti. Skládáním snímků v ose *Z* je také možné získat 3D model povrchu vzorku, ze kterého lze například měřit drsnost povrchu nebo získat profil po zadané křivce. Další podstatnou výhodou oproti konvenčním mikroskopům je možnost obrazy ukládat v rozličných formátech, kde každý uchovává určitá obrazová data. Tyto uložené záznamy lze pak bez problému sdílet po celém světě.

Je třeba myslet i na ergonomii požití digitálních mikroskopů, kde uživatel sedí v komfortní pozici a jeho oči nejsou tolik namáhané.

Nevýhodou digitálních mikroskopů je softwarová a energetická závislost, kdy při přerušení dodávek elektrické energie je mikroskop bezcenný.

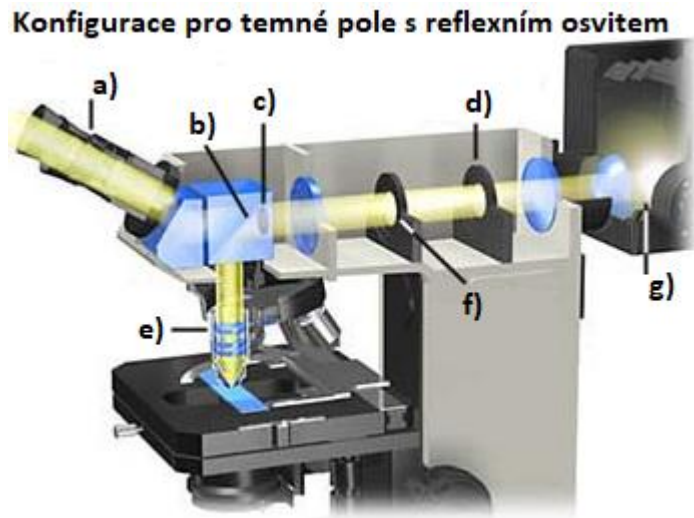
### **5. Přehled vybraných metod v mikroskopii**

V této kapitole jsou stručně popsány běžně používané metody v mikroskopii, ať už se jedná o metody optického zvyšování kontrastu nebo modifikace mikroskopu jako celku.

#### **5.1. Mikroskopie s využitím temného pole**

Při využití temného pole získáme zvýšený kontrast struktury vzorku při zachování hodnoty otvorového úhlu použitého objektivu. Pro pozorování v temném poli je nutné nasvítit vzorek asymetrickým, šikmým osvětlením. Díky šikmému osvětlení se paprsky dopadající na plochy kolmé k optické ose odrážejí mimo objektiv a nejsou jím zachyceny. Objektiv tedy zachycuje pouze paprsky, které se odrazily od povrchového reliéfu. Odraz

zachycených paprsků pak vytváří obraz s lepším kontrastem na úkor ztráty intenzity osvětlení. Pozadí je v tomto případě tmavé a světlo odražené od strukturních nerovností tvoří v obraze jasné prvky. Difrakční obrazce je možné zachytit jako jasné body a čáry, i když je průměr rozptylového objektu mizivý v porovnání s vlastním limitem rozlišení mikroskopu. Moderní mikroskopy již disponují variabilní osvětlovací soustavou, ve které lze velmi snadno přepínat mezi jednotlivými druhy osvitu. Osvitu temným polem se dosahuje vložením nepropustné, kruhové clony (obrázek 39 prvek a) do osvětlovací soustavy, která propustí paprsky pouze po svém obvodu. Základní schéma mikroskopu schopného osvětlení temným polem je na obrázku 39. [14][16][36]



*Obrázek 39 konfigurace pro temné pole s reflexním osvitem [36]*

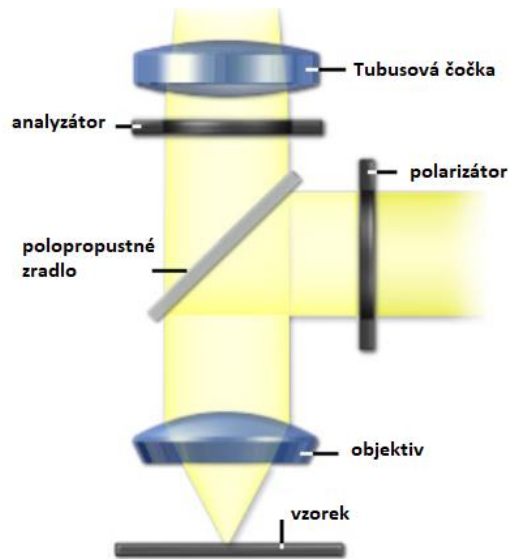
Na obrázku 39: a) Okulár, b) Polopropustné zrcadlo, c) Nepropustná clona, d) Kondenzorová clona, e) Objektiv, f) Polní clona, g) Světelný zdroj. [36]

## **5.2. Mikroskopie s polarizovaným světlem**

Polarizační mikroskop se obecně odlišuje od konvenčního mikroskopu přidáním polarizátoru před kondenzor a kompenzátoru s analyzátozem za objektiv. Polarizační mikroskop je také vybaven Bertrandovou čočkou, kterou je možné zařadit do optické trasy pro konoskopické pozorování interferenčních obrazců v oblasti zadní apertury objektivu. [14]

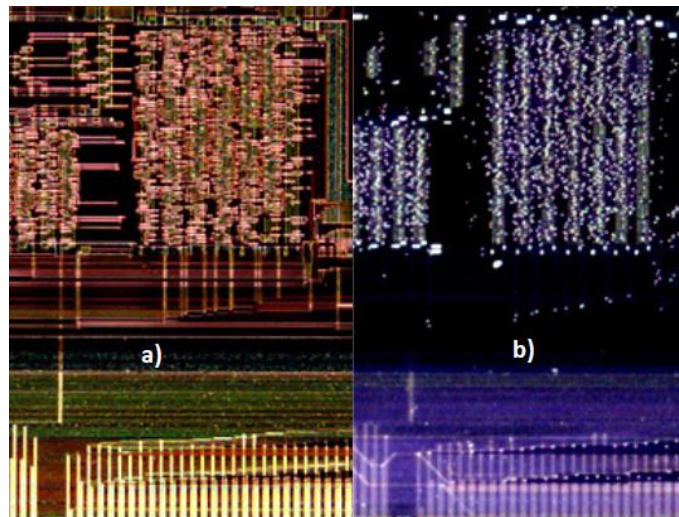
Polarizační mikroskopy s reflexním osvitem jsou vhodné pro zkoumání vzorků obsahující struktury, které během odrazu mění stav polarizace světla. Pomocí této metody lze například snadno zkoumat strukturní zrna ve vzorcích rud, nespočet kovových slitin a tenké vrstvy. V konkrétním příkladě optické konfigurace na obrázku 40 procházejí vlnoplochy osvitového světla polarizátorem, který je umístěn mezi zdrojem světla a polopropustným zrcadlem, které odráží paprsky do objektivu. Lineárně polarizované světlo je zaostřeno na povrch vzorku a odraženo zpět do objektivu. Po tom, co odražené světlo opustí aperturu objektivu ve formě paralelní skupiny vlnoploch, je promítáno na druhý polarizátor (*analyzátor*), který je otočen vůči polarizátoru o 90°. Analyzátozem mohou

směrem k tubusové čočce procházejí pouze depolarizované nebo posunuté vlnoplochy. Do optické soustavy lze těsně před analyzátor zařadit pomocný lambda filtr, který slouží k určení znaménka dvojlomu nebo ke změně šedého kontrastu na barevný. [14][37]



*Obrázek 40 Optická konfigurace mikroskopu s reflexním polarizovaným osvětlením [37]*

Ideálními kandidáty pro pozorování mikroskopem s polarizovaným světlem jsou anizotropní vzorky. Pokud bude primární odraz orientovaný paralelně k propustnému úhlu polarizátoru nebo analyzátoru, bude anizotropní vzorek vykreslen tmavý. Pokud bude primární odraz vůči polarizátoru nebo analyzátoru v diagonální pozici ( $45^\circ$  vůči ose polarizace), tak každá dopadající vlna bude rozdělena na dvě odrazové složky, které po odrazu dvojlomným prostředím tvoří eliptickou vlnoplochu. Pokud jsou tyto odrazové složky schopny vzájemné interference na analyzátoru, tak se výsledný obraz bude jevit světlý. Kontrast je v mikroskopii využívající polarizovaného světla vytvářen anizotropními oblastmi vzorku, magneto-optickými jevy, hlubokým leptáním nebo dvojlomnými povrchy. Na obrázku 41 je pro představu zobrazen počítačový čip, který byl v prvním případě (a) zobrazen v tmavém poli a druhém případě (b) bylo použito polarizované světlo. [14][37]

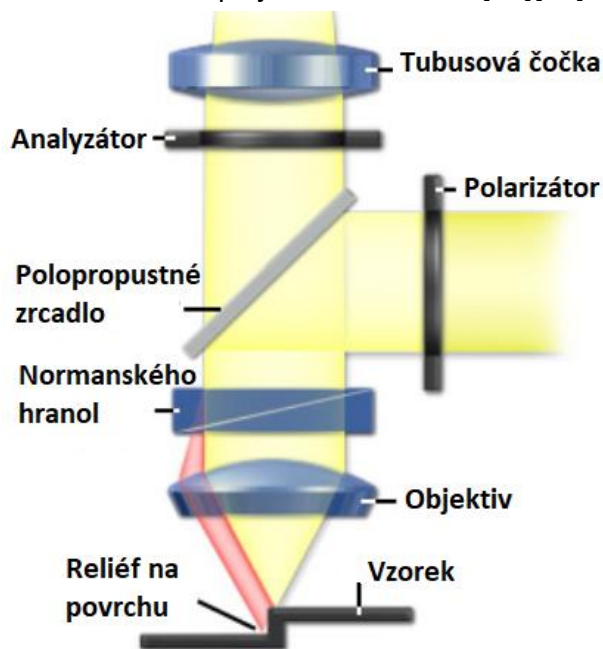


*Obrázek 41 Porovnání zobrazení v tmavém poli (a) a v polarizovaném světle (b) [37]*



### 5.3. Diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Jednou z neúčinnějších metod zvyšování kontrastu ve světelné mikroskopii je metoda diferenciálního interferenčního kontrastu. Tato metoda umožňuje pozorování těch nejmenších možných výškových rozdílů na povrchu. Optická trasa světelného mikroskopu je v tomto případě vybavena dvojlomným hranolem (*Normanského nebo wollastonův hranol, záleží na konstrukci*), který je umístěn v oblasti paralelního chodu paprsků (kapitola 3.6.), těsně za objektivem. Polarizátor je v tomto případě umístěn stejně jako u mikroskopie s polarizovaným světlem, tedy v osvětlovací soustavě za zdrojem světla. Hranol má za úkol rozdělit polarizované světlo osvitu na dva ortogonální polarizované paprsky, orientované diagonálně ( $45^\circ$ ) vzhledem k polarizátoru. Tyto navzájem kolmo polarizované paprsky se při kontaktu se vzorkem fázově posunou v místě, kde existuje nějaký reliéf. Pokud bude povrch vzorku dokonale hladký, nedojde k žádnému posunu a nic se nezobrazí. Jestliže bude na vzorku existovat, byť jen malý schod na profilu, jeden z paprsků bude muset urazit před odrazem delší vzdálenost. Jakmile se paprsky odrazí a vrátí se zpět do mikroskopu skrze objektiv a hranol, procházejí skrze druhý polarizátor (*analyzátor*), kde vzniká díky interferenci sekundární obraz, ve kterém jsou dráhové rozdíly jednotlivých paprsků převedeny do odstínů šedi, které jsou viditelné lidským okem nebo kamerou. Stejně jako u mikroskopie s polarizovaným světlem je možné zařadit před analyzátor lambda filtr, který převede šedé spektrum do barevného. Obecné schéma diferenciálního interferenčního mikroskopu je na obrázku 42.[14][37]



Obrázek 42 Diferenciální interferenční kontrast v optické mikroskopii – optická trasa [37]

Optické komponenty, které jsou nutné pro pozorování diferenciálního interferenčního kontrastu nijak neovlivňují numerickou aperturu objektivu, díky tomu je možné využít maximální numerickou aperturu objektivu. Navíc, obraz získaný metodou diferenciálního interferenčního kontrastu je jednoduše softwarově upravitelný za účelem dalšího zvýšení kontrastu. Jedním z nejpodstatnějších aspektů ve většině laboratorních zařízení při volbě mezi diferenciálním interferenčním kontrastem, polarizovaným světlem nebo využití temného pole je cena. Protože metoda DIC vyžaduje několik velmi drahých optických komponent, kterými jsou například Normanského hranol a čočky bez zbytkového pnutí, především objektivové. Pořízení takového mikroskopu je v porovnání s ostatními metodami zvyšování kontrastu velmi nákladnou záležitostí. Ve většině případů, zejména pokud se nejedná o fotomikrografii a/nebo digitální zobrazování, je metoda temného pole dostatečná k zobrazení všech požadovaných prvků, například metalografických výbrusů. Pokud je ale třeba pořídit snímky vzorků s průhlednou částí, je metoda DIC ideální volbou. Na obrázku 43 je zobrazen stejný počítačový čip jako na obrázku 41, ale v tomto případě byl zobrazen metodou diferenciálního interferenčního kontrastu. [37]

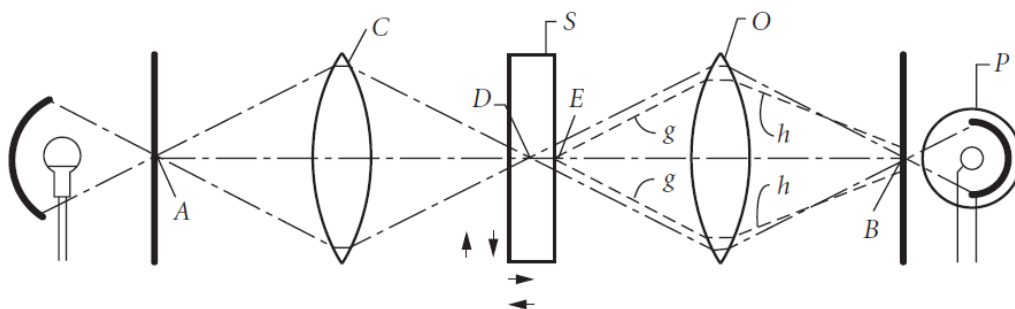


*Obrázek 43 Zobrazení vzorku metodou DIC [37]*

#### **5.4. Konfokální mikroskopie**

Konfokální mikroskopie nabízí oproti konvenční mikroskopii několik výhod. Mezi ně patří například schopnost řídit hloubku ostrosti, eliminovat nebo redukovat informaci o pozadí mimo ohniskovou rovinu a schopnost zachytit **sérii optických řezů** v ose Z u prostorových vzorků. Základním principem v konfokální mikroskopii je použití technik prostorového filtrování k odstranění rozostřeného světla nebo oslnění od vzorku, jehož tloušťka přesahuje bezprostřední blízkost ohniskové roviny. V posledních letech došlo k velkému nárůstu popularity konfokálních mikroskopů, protože jsou schopny relativně jednoduše zachytit obrazy s extrémně vysokou kvalitou a jsou považovány za jeden z nejdůležitějších pokroků, kterého se optické mikroskopii dostalo. [38]

V konfokální mikroskopii je vzorek skenován bod po bodu buď posuvem vzorku (*stage scanning*) nebo skenováním jednotlivých bodů posuvem paprsku (*beam scanning*) a obecně platí, že skenování probíhá dle určitého typu rastru. V obou případech je skenovaný bod zobrazen jako Airyho disk vytvořený objektivem s vysokou numerickou aperturou. Na výstupu z konfokálního mikroskopu se nachází bodová clona (*průměr od jednotek do stovek mikrometrů*). Tato clona je umístěna přesně do konjugované roviny se skenovaným bodem, takže propustí pouze světlo, které vychází ze skenovaného bodu. To znamená, že světlo, které vychází z jiných částí vzorku nebo se odráží od elementů optické trasy není clonou propuštěno a následně detekováno fotonásobičem. [14]



Obrázek 44 Optická trasa základního konfokálního mikroskopu [14]

Na obrázku 44 je znázorněna optická trasa základního konfokálního mikroskopu. V tomto případě kondenzor **C** vytváří obraz dírký první bodové clony **A** v konjugovaném bodě **D** na vzorku **S**. Objektiv **O** promítá obraz bodu **D** na druhou, výstupní bodovou clonu **B**, ta leží v konjugované rovině vůči **A** i **D**. Jiné body vzorku, jako například **E** nebudou zaostřeny v rovinách bodových clon, takže osvětlení těchto bodů bude slabé, a navíc většina rozptylových paprsků **g-h** z bodu **E** vůbec bodovou clonou **B** neprojde. Výstupní bodovou clonu **B** je možné použít tak malou, že nepropustí difrakční prstence Airyho obrazce zobrazovaného bodu **D** a tím dojde ke zvýšení rozlišovací schopnosti daného mikroskopu. [14]

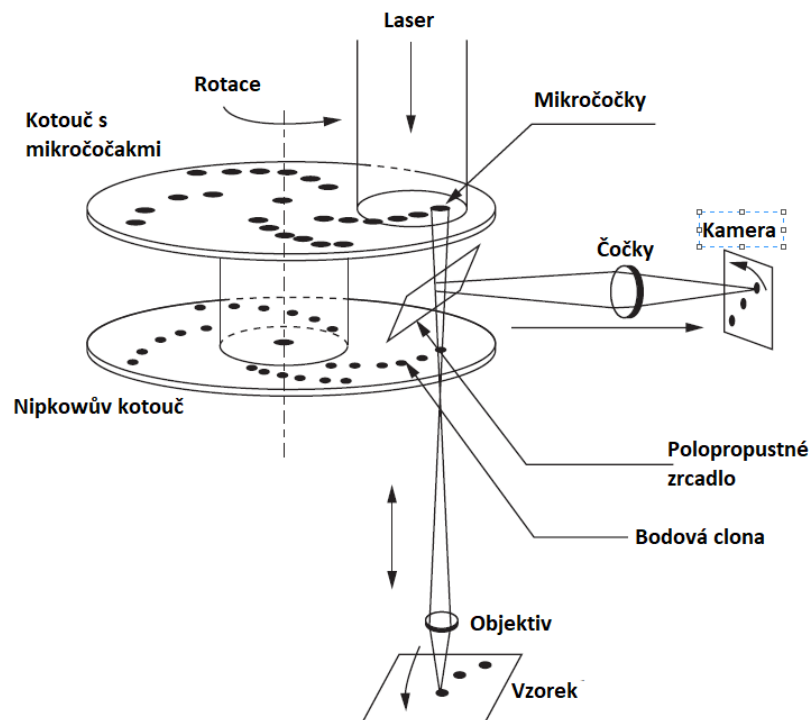
Konfokální mikroskopie využívající technologii **stage scanning** poskytuje znatelně rozšířeně zorné pole. Zobrazovací plocha zde není limitována zorným polem objektivu, ale záleží pouze na rozsahu pohybu stolku se vzorkem a schopnosti fotonásobiče s procesorem zpracovávat informace generované vysokou rychlostí. Další výhodou je, že objektiv musí být korigován jenom pro úzké zorné pole ležící na optické ose. Skenovací paprsek je v tomto případě stacionární.[14]

Konfokální mikroskop využívající technologii **beam scanning** je ve většině případů používán v mikroskopii s reflexním osvitom. Výhoda této metody spočívá v tom, že osvětlující paprsek prochází skrz stejný objektiv a směrovací zařízení, kterým prochází vracející se paprsek rozptýlený vzorkem. Nové mikroskopy z této kategorie využívají dvě galvanometrická zrcátka (*jedno pro každý směr 2D obrazu*), která skenují zaostřeným laserovým paprskem stacionární pole na vzorku. Část zpětně rozptýleného světla vzorkem je zachycena objektivem a dále se odráží od stejných zrcadel. Po odrazu od zrcadel prochází světelný paprsek skrze polopropustné zrcadlo a bodovou clonu, až poté je registrován ve

fotonásobiči. Úkolem polopropustného zrcadla je oddělit osvětlující paprsky od paprsků, které tvoří obraz. Je důležité, aby galvanometrická zrcátka byla umístěna v rovině konjugované se zadní ohniskovou rovinou objektivu. K tomu je zapotřebí dalších optických komponent, zadní ohniskovou rovinu objektivu posunou do požadované polohy. [14]

Pokud chceme pozorovat vzorek přímo a v reálném čase, využijeme k tomu metodu využívající reflexního osvitů a **Nipkowova kotouče**. Nipkowův kotouč slouží ke skenování části vzorku několika paprsky zároveň. Osvětlující paprsky vycházejí z tisíců bodových otvorů spirálovitě rozmístěných na upraveném Nipkowově kotouči, který se nachází v obrazové rovině objektivu. Což znamená, že stačí jeden rotační kotouč, který slouží jako bodová clona pro osvitové i obrazové paprsky zároveň. Za účelem překonání ztráty ve světelné intenzitě u původního návrhu s jedním Nipkowovým kotoučem byl firmou Yokogawa Electric Corp. původní koncept upraven. V novém konstrukčním řešení byl do systému zařazen druhý Nipkowův kotouč, který obsahoval mikročočky. Každý bodový otvor na prvním disku měl přiřazenou jednu čočku z druhého disku, která do příslušného bodového otvoru ostříla laserový svazek. Základní schéma upraveného systému dle Yokogawy je na obrázku 45.[14]

V konvenčním Nipkowově systému je skrze disk propuštěno zhruba 1 % dopadajícího světla. Pokud do systému zařadíme druhý disk s mikročočkami, zvýšíme propustnost prvního disku na 40 až 60 %. Díky tomuto nárůstu propustnosti je možné přímo pozorovat obraz vzorku, to je obrovskou výhodou při pozorování pohyblivých objektů, například živých buněk. [14]



Obrázek 45 Schéma konfokálního skeneru Yokogawa CSU-10 [14]

## 6. Ověření přesnosti měření rovinných rozměrů

V této kapitole je rozebrán postup ověření přesnosti měření rozměrů v jedné rovině digitálními mikroskopy firmy Keyence a následná analýza naměřených hodnot. Cílem této kapitoly je ověřit, jak přesně jsou schopny jednotlivé druhy mikroskopů měřit rozměry v 2D prostoru. Ověřování přesnosti probíhalo na třech mikroskopech od zmíněné firmy. Prvním ověřovaným mikroskopem byl **Keyence VHX 6000** vybaven objektivem s produktovým označením **VHZ20R/Z20T**. Druhým ověřovaným mikroskopem byl také Keyence VHX 6000, ale s objektivovým systémem s označením **VH-ZST**. Třetím ověřovaným mikroskopem byl **Keyence VHX 7000** s revolverovou hlavou **VHX 7100** nesoucí čtyři objektivy. Řada VHX 7000 je nejnovější model na trhu a je vlajkovou lodí značky Keyence v této kategorii mikroskopů. Řada VHX 6000 je tvořena staršími a hůře vybavenými modely. Všechny tyto mikroskopy se skládají z vlastního mikroskopu a z počítačové jednotky. Zpracování obrazu získaného mikroskopy probíhá ve speciálním softwaru, který se funkcemi liší napříč výrobními řadami mikroskopů a obsahuje různé funkce dostupné pro různé typy objektivů.

Jako etalony pro ověření přesnosti měření byla použita dvě pravítka. Prvním pravítkem je pravítko od firmy Olympus s rozsahem hodnot 0-1 mm s rozlišením 0,01 mm. Toto pravítko bylo použito pro ověření přesnosti při zvětšeních od x50 až po x2000. Druhým pravítkem bylo skleněné pravítko od firmy L.E.T. Optomechanika s rozsahem hodnot 0-50 mm s rozlišením 0,1 mm. Na tomto pravítku se ověřovala přesnost při zvětšení od x50 do x200. Protokol o kalibraci pravítka Olympus je přílohou 1 a protokol o kalibraci pravítka L.E.T. Optomechanika je přílohou 2.

### 6.1. Použité mikroskopy a jejich parametry

První mikroskop Keyence VHX 6000 byl vybaven objektivem VHZ20R/Z20T (Obrázek 46), který má následující parametry:

Model		VHZ20R/Z20T					
Zvětšení		x20	x30	x50	x100	x150	x200
Zorné pole [mm]	horizontálně	15,24	10,16	6,1	3,05	2,03	1,52
	Vertikálně	11,4	7,6	4,56	2,28	1,52	1,14
	Diagonálně	19,05	12,7	7,62	3,81	2,54	1,91
Hloubka ostrosti [mm <sup>2</sup> ]		34	15,5	6	1,6	0,74	0,44
Pracovní vzdálenost		25,5					

Tabulka 9 Parametry objektivu VHZ20R/Z20T [Příručka Keyence]

V tabulce 9, která popisuje základní vlastnosti zmíněného objektivu je zvětšení udáváno pro ½ palcový CCD čip a pro 15palcový monitor.



*Obrázek 46 Objektiv VHZ20R/Z20T [Příručka Keyence]*

Druhý mikroskop VHX 6000 byl vybaven objektivovým systémem VH-ZST (Obrázek 47), který se skládá ze dvou klopně výměnných objektivů. Tento systém je kromě schopnosti různých druhů osvětlení vybaven i polarizátory pro pozorování s polarizovaným světlem. Parametry tohoto objektivového systému jsou následující:

Model		VH-ZST					
Zvětšení		x20	x100	x200	x500	x1000	x2000
Zorné pole [mm]	horizontálně	15,24	3,05	1,52	0,61	0,3	0,15
	Vertikálně	11,4	2,28	1,14	0,46	0,23	0,11
	Diagonálně	19,05	3,81	1,91	0,76	0,38	0,19
Pracovní vzdálenost		25,5					

*Tabulka 10 Parametry objektivového systému VH-ZST [Příručka Keyence]*

Pro tabulku 10 platí to stejné, co pro tabulku 9. Zvětšení je udáváno pro 1/2 palcový CCD čip a pro 15palcový monitor.



*Obrázek 47 Objektivový systém VH-ZST [Příručka Keyence]*

Třetí ověřovaný mikroskop VHX 7000 byl vybaven revolverovou hlavou VHX 7100 (Obrázek 48) s automatickou výměnou čtyř objektivů. Objektivy osazené na této hlavě byly VHX-E20, VHX-E100, VHX-E500 a VHX-E2500. Jejich parametry jsou v tabulce 11. Všechny tyto objektivy mají numerickou aperturu NA 0,9. Hlava VHX 7100 má integrované osvětlení, díky kterému lze vzorek pozorovat ve světlém poli, v tmavém poli, se smíšeným osvětlením, s polarizovaným světlem a metodou DIC.

Model		VHZ20R/Z20T					
Zvětšení		x20	x30	x50	x100	x150	x200
Zorné pole [mm]	horizontálně	15,24	10,16	6,1	3,05	2,03	1,52
	Vertikálně	11,4	7,6	4,56	2,28	1,52	1,14
	Diagonálně	19,05	12,7	7,62	3,81	2,54	1,91
Hloubka ostrosti [mm <sup>2</sup> ]		34	15,5	6	1,6	0,74	0,44
Pracovní vzdálenost		25,5					
Model		VHX-E20					
Zvětšení		x20	x30	x40	x50	x80	x100
Zorné pole [mm]	horizontálně	15,24	10,16	7,62	6,1	3,81	3,05
	Vertikálně	11,4	7,6	5,7	4,56	2,85	2,28
	Diagonálně	19,05	12,7	9,53	2,85	4,76	3,81
Pracovní vzdálenost		30,0					
Model		VHX-E100					
Zvětšení		x100	x150	x200	x300	x400	x500
Zorné pole [mm]	horizontálně	3,05	2,03	1,52	1,02	0,76	0,61
	Vertikálně	2,28	1,52	1,14	0,76	0,57	0,46
	Diagonálně	3,81	2,54	1,91	1,27	0,95	0,76
Pracovní vzdálenost		25,5					
Model		VHX-E500					
Zvětšení		x500	x700	x1000	x1500	x2000	x2500
Zorné pole [mm]	horizontálně	0,61	0,44	0,31	0,2	0,16	0,12
	Vertikálně	0,46	0,33	0,23	0,15	0,11	0,09
	Diagonálně	0,76	0,54	0,38	0,25	0,19	0,15
Pracovní vzdálenost		25,5					
Model		VHX-E2500					
Zvětšení		x2500	x4000	x5000	x6000		
Zorné pole [mm]	horizontálně	0,12	0,08	0,06	0,05		
	Vertikálně	0,09	0,06	0,05	0,04		
	Diagonálně	0,15	0,1	0,08	0,06		
Pracovní vzdálenost		25,5					

Tabulka 11 Parametry objektivů osazených na hlavě VHX 7100 [Příručka Keyence]



*Obrázek 48 Hlava VHX 7100 [Příručka Keyence]*

## 6.2. Použité etalony

Jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly 6, k ověření přesnosti měření 2D rozměrů byla použita dvě pravítka s následujícími parametry:

### Pravítko Olympus (Obrázek 49):

- Rozsah: 0-1 mm
- Rozlišení: 0,01 mm
- Výrobce: Olympus
- Nejvyšší chyba: Při kalibraci byla zjištěna nejvyšší chyba v celém rozsahu 0,0007 mm při teplotě 20 °C +/- 1 °C.

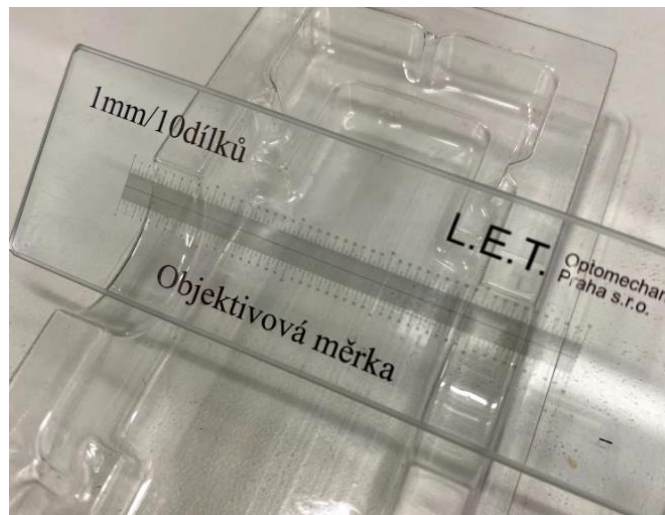


*Obrázek 49 Pravítko Olympus*



**Pravítko L.E.T. Optomechanika (Obrázek 50):**

- Rozsah: 0-50 mm
- Rozlišení: 0,1 mm
- Výrobce: L.E.T. Optomechanika
- Nejvyšší chyba: Při kalibraci byla zjištěna nejvyšší chyba v celém rozsahu 0,006 mm při teplotě 20 °C +/- 1 °C.



*Obrázek 50 Pravítko L.E.T. Optomechanika*

Detaily ke kalibraci pravítek jsou k nalezení v kalibračních listech (*Příloha 1 a 2*).

### **6.3. Naměřené hodnoty**

Měření rovinných rozměrů a jejich následná analýza probíhala naměřením stejných referenčních rozměrů všemi mikroskopy při určitém zvětšení a následném porovnání naměřených hodnot s referenčními hodnotami. Zároveň bylo provedeno ověření přesnosti při měření na sešívacích snímcích a na snímcích pořízených při vysokém zvětšení. Do ověření přesnosti při vysokém zvětšení nebyl zahrnut mikroskop vybavený objektivem VH220R/Z20T, z důvodu jeho malého maximálního zvětšení x200. Referenční hodnoty k porovnání s hodnotami naměřenými byly získány z kalibračních protokolů. Z důvodu množství těchto hodnot jsou v přílohách uvedeny pouze titulní strany protokolů, které vypovídají o výsledku provedené kalibrace pravítka.

#### **6.3.1. Měření rovinných rozměrů při zvětšení do x200**

První měření probíhало na pravítku Olympus při zvětšení x200. Všemi mikroskopy byl naměřen soubor 6 hodnot, které byly odečteny od referenční hodnoty. Z absolutní hodnoty výsledku byla stanovena odchylka od dané referenční hodnoty. Pro každé měření byla z odchylek stanovena průměrná odchylka, která byla použita pro popis jednotlivých mikroskopů při měření rovinných rozměrů. K získání číselných hodnot odchylek byly použity matematické funkce programu MS excel, k získání maximální zjištěné chyby byla použita funkce „=max(číslo)“.

Pro názornost je níže uveden kompletní přehled měření při zvětšení x200 všemi mikroskopy. Další měření budou uvedena pouze v podobě souhrnných tabulek. V každé tabulce je v prvním řádku, které pravítko bylo měřeno, ve druhém je uvedeno, s jakým zvětšením bylo pravítko zachyceno a ve třetím je uveden typ mikroskopu a objektivu.

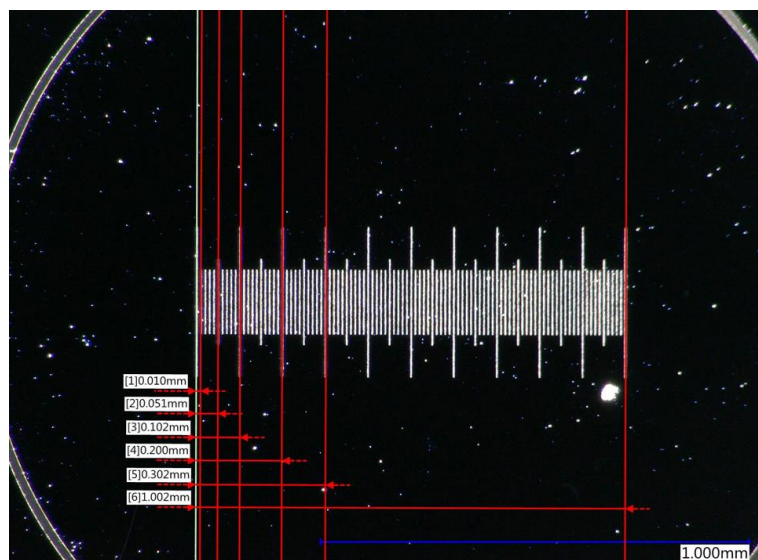
### 6.3.2. Pravítko Olympus x200

Tabulka 12: Měření na pravítku Olympus při zvětšení x200 na mikroskopu VHX 6000 VH220R/Z20T.

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10	0,03
2	50,01	51	0,99
3	99,51	102	2,49
4	200,05	200	0,05
5	299,43	302	2,57
6	999,75	1002	2,25
Průměrná odchylka:			1,40
Nejvyšší zjištěná chyba:			2,57

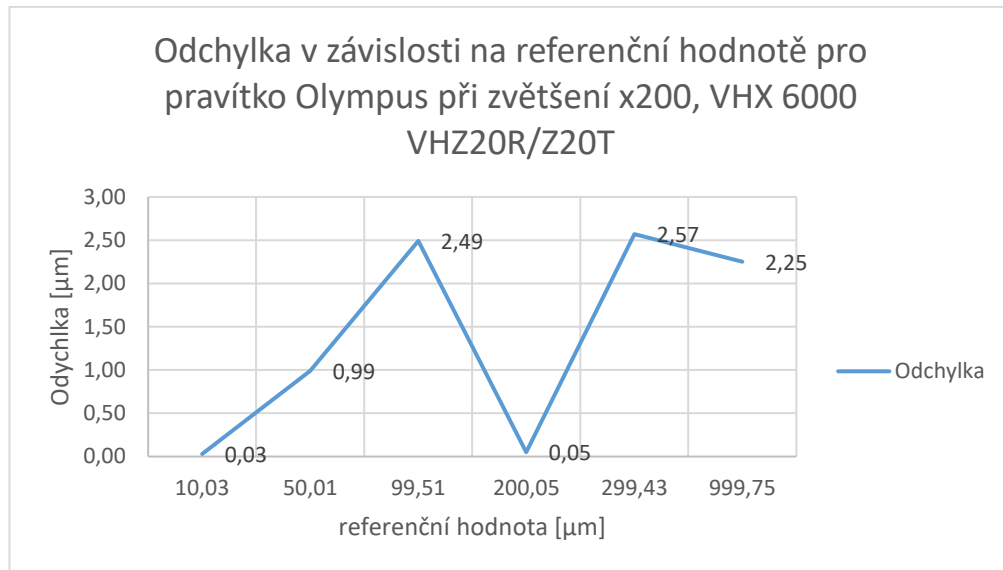
Tabulka 12 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH220R/Z20T

Hodnoty byly odečítány z obrazového výstupu pomocí funkce měření vzdálenosti přímkou definovanými dvěma body. Obrazový výstup k tabulce 12 je na obrázku 51.



Obrázek 51 Měření na obraze pravítka Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH220R/Z20T

Na grafu 1 je znázorněna závislost odchylky naměřené hodnoty od referenční hodnoty z tabulky 12.



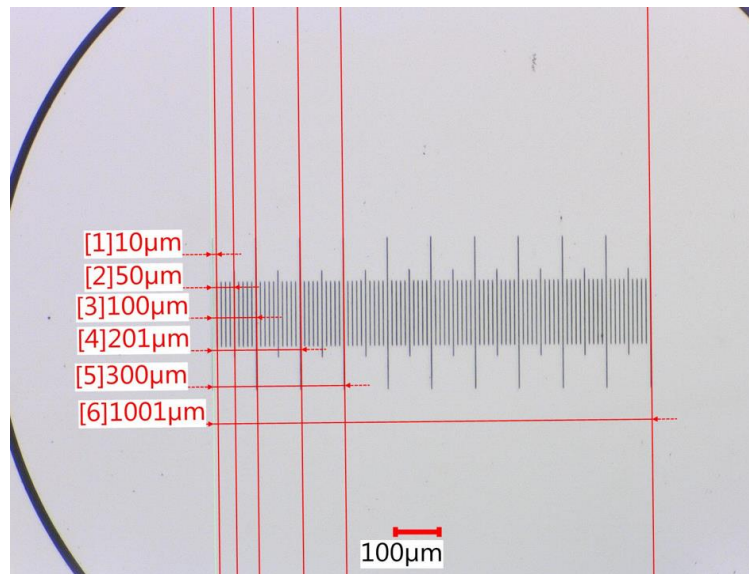
*Graf 1 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítko Olympus při zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T*

Tabulka 13: Měření na pravítku Olympus při zvětšení x200 na mikroskopu VHX 6000 VH-ZST.

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřená hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10	0,03
2	50,01	50	0,01
3	99,51	100	0,49
4	200,05	201	0,95
5	299,43	300	0,57
6	999,75	1001	1,25
Průměrná odchylka:			0,55
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,25

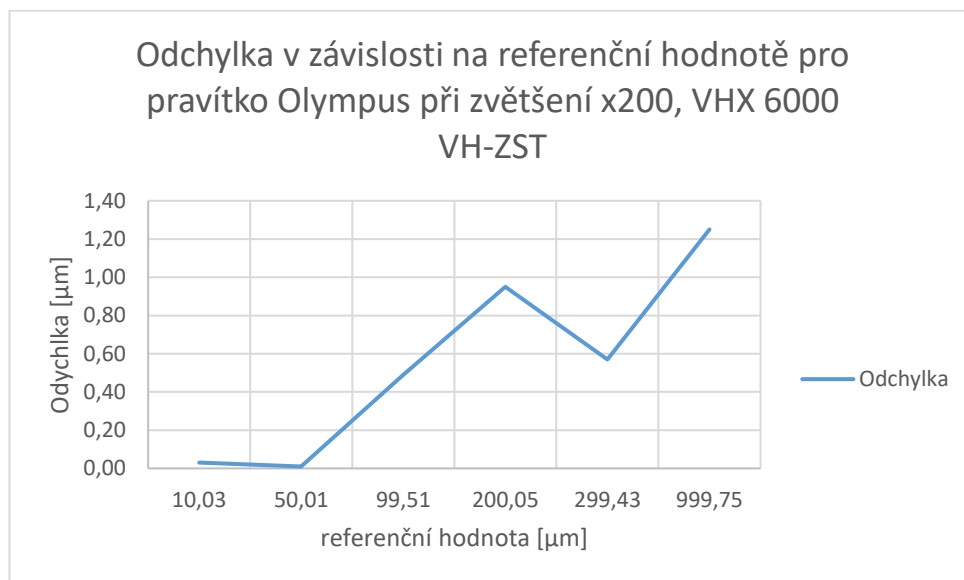
*Tabulka 13 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST*

Obrazový výstup k tabulce 13 je na obrázku 52.



Obrázek 52 Měření na obraze pravítka Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST

Závislost odchylek naměřených hodnot od referenčních z tabulky 13 je graficky zobrazena na grafu 2.



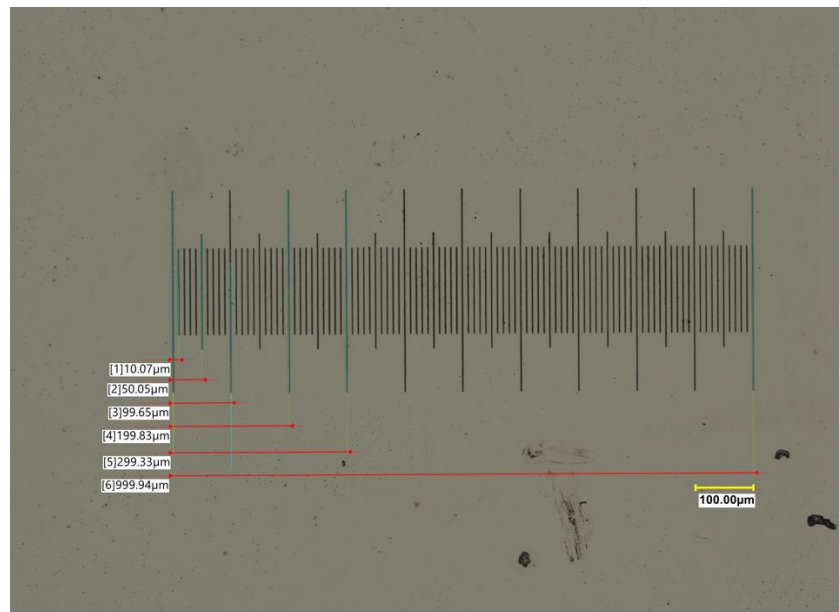
Graf 2 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítka Olympus při zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST

Tabulka 14: Měření na pravítka Olympus při zvětšení x200 na mikroskopu VHX 6000 VH-ZST.

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10,07	0,04
2	50,01	50,05	0,04
3	99,51	99,65	0,14
4	200,05	199,83	0,22
5	299,43	299,33	0,10
6	999,75	999,94	0,19
Průměrná odchylka:			0,12
Nejvyšší zjištěná chyba:			0,22

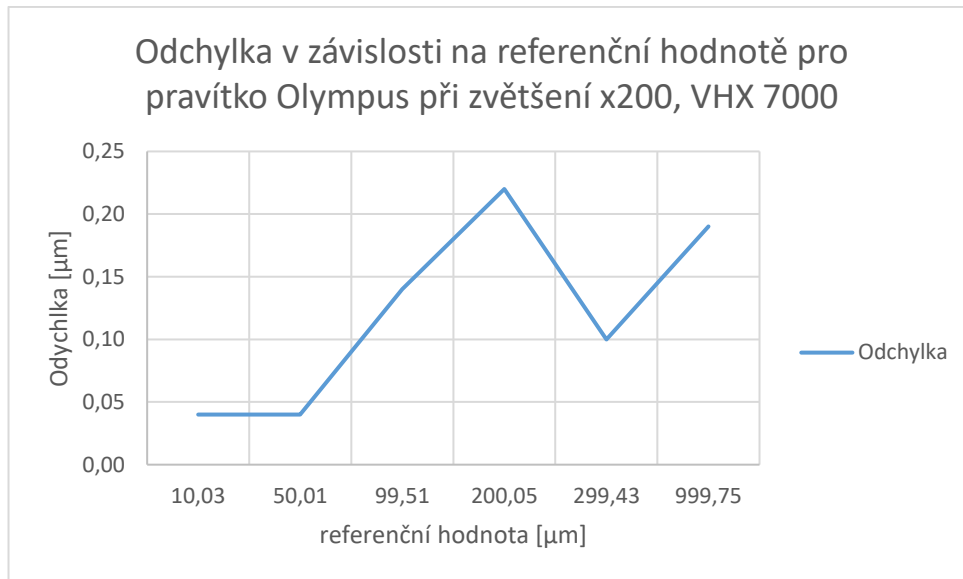
Tabulka 14 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 7000

Obrazový výstup k tabulce 13 je na obrázku 53.



Obrázek 53 Měření na obraze pravítka Olympus, zvětšení x200, VHX 7000

Závislost odchylek naměřených hodnot od referenčních z tabulky 14 je graficky zobrazena na grafu 3.



Graf 3 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítko Olympus při zvětšení x200, VHX 7000

### 6.3.3. Skleněné pravítko x50

Další měření probíhalo na skleněném pravítku L.E.T. Optomechanika a bylo vyhodnoceno stejným způsobem jako vzorové měření popsané výše a probíhalo opět na všech třech mikroskopech při zvětšení x50. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 15,16,17).

Pravítko sklo			
Zvětšení: x50			
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T			
Měření	Referenční hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřená hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1005	5,06
2	1999,83	2007	7,17
3	2999,88	3007	7,12
4	3999,73	4008	8,27
5	4999,71	5010	10,29
Průměrná odchylka:			7,58
Nejvyšší zjištěná chyba:			10,29

Tabulka 15 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 6000 VH220R/Z20T

Pravítko sklo			
Zvětšení: x50			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1004	4,06
2	1999,83	2020	20,17
3	2999,88	3028	28,12
4	3999,73	4036	36,27
5	4999,71	5049	49,29
Průměrná odchylka:			27,58
Nejvyšší zjištěná chyba:			49,29

Tabulka 16 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko sklo			
Zvětšení: x50			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1001,23	1,29
2	1999,83	2001,74	1,91
3	2999,88	3001,83	1,95
4	3999,73	4001,46	1,73
5	4999,71	5000,76	1,05
Průměrná odchylka:			1,59
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,95

Tabulka 17 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 7000

Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 15,16 a 17 uvedeny v příloze 3.

#### 6.3.4. Skleněné pravítko x100

Další měření probíhalo opět na pravítku L.E.T. Optomechanika, ale při zvětšení x100. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 18,19 a 20.



Pravítko sklo			
Zvětšení: x100			
Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1004	4,06
2	1999,83	2005	5,17
3	2999,88	3009	9,12
Průměrná odchylka:			6,12
Nejvyšší zjištěná chyba:			9,12

Tabulka 18 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 6000 VHZ20R/Z20T

Pravítko sklo			
Zvětšení: x100			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1011	11,06
2	1999,83	2025	25,17
3	2999,88	3036	36,12
Průměrná odchylka:			24,12
Nejvyšší zjištěná chyba:			36,12

Tabulka 19 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko sklo			
Zvětšení: x100			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1000,03	0,09
2	1999,83	2000,2	0,37
3	2499,82	2500,56	0,74
Průměrná odchylka:			0,40
Nejvyšší zjištěná chyba:			0,74

Tabulka 20 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 7000



Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 18,19 a 20 uvedeny v příloze 4.

### 6.3.5. Skleněné pravítko x200

V tomto měření bylo opět měřeno skleněné pravítko, tentokrát při zvětšení x200. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v tabulkách 21,22 a 23.

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	100,03	100	0,03
2	299,93	300	0,07
3	499,9	501	1,10
4	999,94	1002	2,06
Průměrná odchylka:			0,81
Nejvyšší zjištěná chyba:			2,06

Tabulka 21 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	100,03	100	0,03
2	299,93	301	1,07
3	499,9	501	1,10
4	999,94	1002	2,06
Průměrná odchylka:			1,06
Nejvyšší zjištěná chyba:			2,06

Tabulka 22 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	100,03	100,08	0,05
2	299,93	300,17	0,24
3	499,9	500,09	0,19
4	999,94	1000,37	0,43
Průměrná odchylka:			0,23
Nejvyšší zjištěná chyba:			0,43

Tabulka 23 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 7000

Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 21,22 a 23 uvedeny v příloze 5.

### 6.3.6. Skleněné pravítko x200 – sešívání obraz

K tomuto měření bylo opět použito skleněné pravítko a zvětšení x200, ale získaný obraz byl softwarovou funkcí sešíván z několika snímků za účelem získání obrazu větší plochy. V měření skleněného pravítka v kapitole 6.3.5. byla nejvyšší vzdálenost při zvětšení x200 viditelná v zorném poli 1 milimetr. Při sešívání snímků se zvětšením x200 byl získán obraz stejného rozlišení, kde je maximální viditelná vzdálenost 3 milimetry. Výsledky měření na sešívaném obraze při zvětšení x200 jsou v tabulkách 24,25 a 26.

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200 – sešívání			
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	999	0,94
2	1999,83	2001	1,17
3	2999,88	3000	0,12
Průměrná odchylka:			0,74
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,17

Tabulka 24 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešívání obraz, zvětšení x200, VHX 6000 VH220R/Z20T

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200 – sešívání			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1001	1,06
2	1999,83	2001	1,17
3	2999,88	3000	0,12
Průměrná odchylka:			0,78
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,17

Tabulka 25 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešitý obraz, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko sklo			
Zvětšení: x200 – sešívání			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	999,94	1000,08	0,14
2	1999,83	2000,07	0,24
3	2999,88	3000,03	0,15
Průměrná odchylka:			0,18
Nejvyšší zjištěná chyba:			0,24

Tabulka 26 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešitý obraz, zvětšení x200, VHX 7000

Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 24,25 a 26 uvedeny v příloze 6.

### 6.3.7. Ověření přesnosti měření rozměrů na sešitém obraze při vysokém rozlišení

K tomuto měření bylo použito pravítka Olympus, které bylo zachyceno při zvětšení x500, x1000, x1500 a x2000. Měření probíhalo vždy na obraze celého pravítka, který vznikl softwarovým sešitím jednotlivých snímků a vždy se měřily stejné referenční hodnoty. Mikroskop Keyence VHX 6000 VH-Z20R/Z20T byl z tohoto měření **vynechán**, protože je jeho maximální zvětšení jenom x200. Pro popis informací v tabulkách platí stejná analogie jako při měřeních výše.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 27 až 34.

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x500 – sešívání			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	99	0,51
2	499,45	495	4,45
3	999,75	991	8,75
Průměrná odchylka:			4,57
Nejvyšší zjištěná chyba:			8,75

Tabulka 27 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x500, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x500 – sešívání			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	99,71	0,20
2	499,45	501	1,55
3	999,75	1003,11	3,36
Průměrná odchylka:			1,70
Nejvyšší zjištěná chyba:			3,36

Tabulka 28 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x500, VHX 7000

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1000 – sešívání			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	100	0,49
2	499,45	501	1,55
3	999,75	1003	3,25
Průměrná odchylka:			1,76
Nejvyšší zjištěná chyba:			3,25

Tabulka 29 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1000, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1000 – sešívání			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	101,68	2,17
2	499,45	510,46	11,01
3	999,75	1022,14	22,39
Průměrná odchylka:			11,86
Nejvyšší zjištěná chyba:			22,39

Tabulka 30 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1000, VHX7000

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1500 – sešívání			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	100	0,49
2	499,45	500	0,55
3	999,75	1002	2,25
Průměrná odchylka:			1,10
Nejvyšší zjištěná chyba:			2,25

Tabulka 31 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1500, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1500 – sešívání			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	100,67	1,16
2	499,45	506,34	6,89
3	999,75	1013,89	14,14
Průměrná odchylka:			7,40
Nejvyšší zjištěná chyba:			14,14

Tabulka 32 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1500, VHX7000

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x2000 – sešívání			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	100	0,49
2	499,45	500	0,55
3	999,75	1001	1,25
Průměrná odchylka:			0,76
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,25

Tabulka 33 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x2000, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x2000 – sešívání			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	99,51	99,52	0,01
2	499,45	500,21	0,76
3	999,75	1001,47	1,72
Průměrná odchylka:			0,83
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,72

Tabulka 34 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x2000, VHX7000

Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 27 až 34 uvedeny v příloze 7.

### 6.3.8. Ověření přesnosti měření na nesešitém obraze při vysokém rozlišení

Poslední měření k ověření přesnosti měření 2D rozměrů proběhlo na pravítku Olympus na jednom snímku, který byl pořízen se zvětšením x1000 a x2000. Z tohoto měření byl opět vyloučen mikroskop Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T ze stejného důvodu, jako v předchozí kapitole. Výsledky měření jsou v tabulkách 35 až 38.



Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1000			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10	0,03
2	50,01	50	0,01
3	99,51	100	0,49
4	149,87	151	1,13
5	200,05	201	0,95
Průměrná odchylka:			0,52
Nejvyšší zjištěná chyba:			1,13

Tabulka 35 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x1000, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x1000			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10,3	0,27
2	50,01	51,23	1,22
3	99,51	101,72	2,21
4	149,87	153,17	3,30
5	200,05	204,7	4,65
Průměrná odchylka:			2,33
Nejvyšší zjištěná chyba:			4,65

Tabulka 36 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x1000, VHX7000

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x2000			
Keyence VHX 6000 - VH-ZST			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	10	0,03
2	20,02	20	0,02
3	50,01	50	0,01
4	99,51	100	0,49
Průměrná odchylka:			0,14
Nejvyšší zjištěná chyba:			0,49

Tabulka 37 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x2000, VHX 6000 VH-ZST

Pravítko Olympus 1 mm			
Zvětšení: x2000			
Keyence VHX 7000			
Měření	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	10,03	9,97	0,06
2	20,02	20,02	0,00
3	50,01	50,09	0,08
4	99,51	99,65	0,14
		Průměrná odchylka:	0,07
		Nejvyšší zjištěná chyba:	0,14

Tabulka 38 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x2000, VHX7000

Grafické závislosti odchylek v závislosti na referenční hodnotě jsou pro hodnoty z tabulek 35 až 38 uvedeny v příloze 8.

#### 6.4. Analýza dat získaných měřením rovinných rozměrů

Prvním krokem analýzy dat získaných v kapitolách 6.3.1 až 6.3.6., které porovnávají mezi sebou všechny tři mikroskopy, bylo vytvoření souhrnných tabulek. V těchto tabulkách jsou porovnány průměrné odchylky naměřených hodnot od hodnot referenčních pro jednotlivé mikroskopy. Data z kapitol 6.3.1 až 6.3.6. jsou zároveň rozdělena podle toho, jestli byl získaný obraz sešitý z obrazů dílčích, nebo jestli se měřilo přímo v konkrétním zorném poli. Díky tomuto rozdělení je možné získat informaci o tom, jestli sešívání obrazu ovlivňuje přesnost měření jednotlivých mikroskopů, a pokud ano, tak jak.

V tabulce 39 jsou porovnány průměrné odchylky jednotlivých mikroskopů při měření nesešívávaného etalonu při zvětšeních od x50 do x200.

Průměrná odchylka při měření pravítka bez sešívání	
Typ mikroskopu	Průměrná odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T	3,98
Keyence VHX 6000 - VH-ZST	13,33
Keyence VHX 7000	0,58

Tabulka 39 Porovnání průměrných odchylek jednotlivých mikroskopů při měření nesešívávaného obrazu 2D etalonu

V tabulce 40 jsou pro porovnání uvedeny průměrné odchylky z tabulky 39, ke kterým byla připočtena odchylka měření na sešívávaném obraze při zvětšení x200.



Průměrná odchylka při měření pravítka se sešíváním obrazu	
Typ mikroskopu	Průměrná odchylka [μm]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T	3,33
Keyence VHX 6000 - VH-ZST	10,82
Keyence VHX 7000	0,50

*Tabulka 40 Porovnání průměrných odchylek jednotlivých mikroskopů při měření sešívaneho i nesešívaneho obrazu 2D etalonu*

Při analýze hodnot z tabulky 39 je jasné, že nejpřesněji byly rovinné rozměry změřeny mikroskopem **Keyence VHX 7000** s průměrnou odchylkou 0,58 mikrometru. Jelikož se jedná o nejnovější model, který je vybaven tím nejlepším hardwarem a softwarem co firma Keyence nabízí, není výsledek překvapivý.

Druhým nejpřesnějším mikroskopem byl v tomto testu mikroskop řady VHX 6000 vybaven objektivem **VH220R/Z20T** s průměrnou odchylkou 3,98 mikrometru. Na posledním místě skončil mikroskop s objektivovým systémem **VH-ZST**, který má průměrnou odchylku 13,3 mikrometrů.

Výsledek porovnání mikroskopů řady VHX 6000 je poněkud překvapivý, protože při měření mikroskopem s objektivem VH220R/Z20T chybí v softwaru možnost digitálně přiblížit zaznamenaný obraz za účelem přesného umístění měřících bodů na obraz etalonu. Software využívaný objektivovým systémem VH-ZST digitální přiblížení obrazu umožňuje, avšak pouze v jednom kroku. Obraz zachycený mikroskopem VHX 7000 je možné digitálně přibližovat libovolně pomocí kolečka myši až do určitého limitu, který je softwarově omezen.

Ačkoliv bylo zjištěno, že objektivový systém VH-ZST je nejméně přesný při měření rovinných rozměrů, jeho výhodou oproti objektivu VH220R/Z20T je možnost rychlé výměny objektivu za účelem získání většího zvětšení.

Inovovaný software mikroskopu řady VHX 7000 disponuje funkcí **automatické detekce hran** v obraze, která při měření slouží k eliminaci chyb vnášených obsluhou. Jelikož software ověřovaných mikroskopů řady VHX 6000 tuto funkci nemá, nebyla při měření mikroskopem řady VHX 7000 využita, aby byly zachovány podmínky měření. Pokud bychom využili funkce automatické detekce hran, je možné předpokládat ještě přesnější měření mikroskopem řady VHX 7000.

Při porovnání hodnot z tabulek 39 a 40 je vidět, že při měření na sešívaneém obraze získáme přesnější výsledky. Zvýšení přesnosti je tedy způsobeno softwarovým postprocesingem při sešívání dílčích snímků a rozdílnou hloubkou ostrosti. Nicméně, toto tvrzení platí v tomto konkrétním případě, v jiných případech by sešívání snímků mohlo mít na přesnost měření spíše negativní vliv.

Pokud se podíváme na grafické závislosti odchylek na referenční hodnotě v přílohách 3 až 5 pro měření všemi třemi mikroskopy do maximálního zvětšení x200, tak téměř při všech měřeních narůstá odchylka s měřenou vzdáleností. Tento fakt pouze potvrzuje základní charakteristiku délkových měřidel, u kterých se s měřenou vzdáleností snižuje přesnost měření.

Přesnost měření rovinných rozměrů „x“ při uvažování možnosti sešívání obrazů testovanými mikroskopy **do zvětšení x200** je následující:

- Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T  $x \pm 3,33 \mu m$
- Keyence VHX 6000 - VH-ZST  $x \pm 10,82 \mu m$
- Keyence VHX 7000  $x \pm 0,5 \mu m$

Pokud shrneme data z kapitoly 6.3.7., kde byla ověřována přesnost měření na sešitých obrazech při zvětšení x500, x100, x1500 a x2000. Bude výsledná tabulka vypadat takto:

Průměrná odchylka jednotlivých mikroskopů při měření na sešívání obrazech, vysoké zvětšení		
Typ mikroskopu:	<b>VHX 6000 - VH – ZST</b>	<b>VHX 7000</b>
Zvětšení:	Průměrná odchylka	Průměrná odchylka
	[ $\mu m$ ]	[ $\mu m$ ]
x500	4,57	1,70
x1000	1,76	11,86
x1500	1,10	7,40
x2000	0,76	0,83

*Tabulka 41 Porovnání průměrných odchylek mikroskopů při měření rozměrů sešívání obrazů zachycených vysokým zvětšením*

Průměrné odchylky pro jednotlivá zvětšení byly opět vypočteny jako průměr absolutní hodnoty rozdílu naměřené hodnoty od hodnoty referenční. Při pohledu na grafické znázornění závislosti odchylek v příloze 7 platí to stejné, jako u měření při nižších hodnotách zvětšení. To je nárůst odchylky v závislosti na délce měřeného rozměru.

Z tabulky 41 je jasné, že při vysokých hodnotách zvětšení dosahuje mikroskop s objektivovým systémem VHX 6000 - VH – ZST lepších výsledků oproti mikroskopu řady VHX 7000. To lze odůvodnit například velikostí a polohou oblasti, která byla naskenována za účelem složení snímků, nebo nedostatkem softwarové kapacity ke zpracování velkého množství objemných dat.

Při jednotlivých měřeních bylo pozorováno, že pokud bude pravítko skenováno pouze v jednom směru a všechny jednotlivé snímky budou obsahovat část stupnice pravítka, software snímky sešije celkem obstojně a nedojde ke zřetelnému zkreslení. Pokud bude ale pravítko skenováno i se svým okolím, kde snímky onoho okolí budou „prázdné“ a nebudou obsahovat žádnou část stupnice, dojde při sešívání jednotlivých obrazů dohromady ke zřetelnému zkreslení, které může být výsledkem nárůstu nejistot při měření mikroskopem VHX 7000.

Přesnost měření rovinných rozměrů „x“ na sešíváných obrazech při zvětšeních **x500, x1000, x1500 a x2000** je pro testované mikroskopy následující:

Pro Keyence VHX 6000 - VH-ZST:

- Při zvětšení x500  $x \pm 4,57 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x1000  $x \pm 1,76 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x1500  $x \pm 1,1 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x2000  $x \pm 0,76 \mu\text{m}$

Pro Keyence VHX 7000

- Při zvětšení x500  $x \pm 1,7 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x1000  $x \pm 11,86 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x1500  $x \pm 7,4 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x2000  $x \pm 0,83 \mu\text{m}$

V této kategorii ověření jasně **převládá** v přesnosti hůře vybavený mikroskop **VHX 6000** s objektivovým systémem **VH-ZST**.

Poslední způsob ověření přesnosti měření rovinných rozměrů spočíval v pořízení nesešitých snímků při rozlišení x1000 a x2000. V obrazech pořízených při těchto zvětšeních byly opět naměřeny rozměry, které byly odečteny od referenčních hodnot a z absolutních hodnot výsledků byla vypočtena průměrná odchylka pro jednotlivé mikroskopy. Souhrnná tabulka 42 vychází z hodnot uvedených v kapitole 6.3.8. Grafické závislosti odchylek na referenční hodnotě mají opět stejný charakter jako byl již popsán. Tím je nárůst odchylky při zvětšení měřené vzdálenosti.

Průměrná odchylka jednotlivých mikroskopů při měření na nesešíváných obrazech, vysoké zvětšení		
Typ mikroskopu:	VHX 6000 - VH – ZST	VHX 7000
Zvětšení:	Průměrná odchylka	Průměrná odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
x1000	0,52	2,33
x2000	0,14	0,07

*Tabulka 42 Porovnání průměrných odchylek mikroskopů při měření rozměrů nesešíváných obrazů zachycených vysokým zvětšením*

Přesnost měření rovinných rozměrů „x“ na přímo zaznamenaných (nesešitých) obrazech vyháží na základě dat v tabulce 42 následovně:

Pro Keyence VHX 6000 - VH-ZST:

- Při zvětšení x1000  $x \pm 0,52 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x2000  $x \pm 0,14 \mu\text{m}$

Pro Keyence VHX 7000:

- Při zvětšení x1000  $x \pm 2,33 \mu\text{m}$
- Při zvětšení x2000  $x \pm 0,07 \mu\text{m}$

Z porovnání hodnot z tabulky 41 a 42 je jasné, jak softwarové sešívání obrazu ovlivňuje výslednou přesnost měření v daném obraze. U sešíváných obrazů je průměrná odchylka měření několikanásobně vyšší než u obrazů nesešítých.

### **6.5. Komentář k naměřeným datům**

Je nutné mít na paměti, že naměřené hodnoty nebyly získány za pomoci žádné asistenční funkce ke zvýšení přesnosti, aby bylo možné mezi sebou co nejlépe porovnat jednotlivé varianty mikroskopů. Ruční zadávání elementů, mezi kterými je měřena vzdálenost je tedy čistě závislé na uživateli, a proto je do měření vnášena značná chyba, která se odvíjí od toho, kam uživatel daný element v obraze umístí.

Výrobce udává, že jeho mikroskopy jsou schopny měřit s přesností na desetiny mikrometru, což na základě dostupných dat z kapitoly 6 nelze považovat za pravdivé tvrzení.

Pro měření rozměrů v rovinném obraze získaného se zvětšením do **x200** je nevhodnější variantou mikroskop Keyence VHX 7000 s průměrnou přesností  $\pm 0,5 \mu\text{m}$ . Při měření v obrazech získaných zvětšením od **x500** do **x2000** dosahuje mikroskop VHX 6000 s objektivovým systémem **VHZ20R/Z20T** průměrné přesnosti  $\pm 1,48 \mu\text{m}$  (průměr hodnot z tabulek 41 a 42), což z něj dělá oproti řadě VHX 7000 s průměrnou přesností  $\pm 4,03 \mu\text{m}$  (průměr hodnot z tabulek 41 a 42) vhodnější variantu pro měření při vysokém zvětšení.

## **7. Ověření přesnosti měření prostorových rozměrů**

V kapitole 6 byla ověřována přesnost měření na jednotlivých obrazech, které nebyly sešity a na obrazech, které byly sešity ze záznamů z jedné roviny. V této kapitole jsou obrazy sešity ze záznamů, které byly navíc pořízeny v různých polohách objektivu v ose Z vůči vzorku, za účelem vytvoření prostorového snímku povrchu.

Cílem této kapitoly je ověřit přesnost měření v 3D obraze, která je primárně ovlivněna schopností softwaru přesně sešívát obrazy z jednotlivých rovin navzájem posunutých na ose Z.

V této kapitole bude ověřena přesnost měření ve 3D obrazech pro tři mikroskopy, které byly ověřovány v kapitole 6 při měření na 2D obrazech. Těmito mikroskopy jsou dva mikroskopy řady VHX 6000, kde jeden je vybaven objektivem VHZ20R/Z20T a druhý je vybaven objektivovým systémem VH-ZST. Třetí mikroskop je řady VHX 7000 vybaven revolverovou hlavou VHX 7100. Protože je mikroskop řady VHX 7000 nástupcem mikroskopů řady VHX 6000 a je vybaven inovovaným softwarem společně s pokročilou hardwarovou technologií, lze předpokládat, že by měl být schopný přesnějšího měření v porovnání se starší řadou.

## 7.1. Použité mikroskopy a jejich parametry

Parametry ověřovaných mikroskopů jsou detailně popsány v kapitole 6.1. Proto zde budou popsány velmi stručně, pouze pro rekapitulaci.

Prvním mikroskopem je mikroskop z modelové řady **VHX 6000**, který je vybaven objektivem **VH220R/Z20T** se zvětšením od x20 do x200. Detailní popis parametrů je v tabulce 9. Druhý mikroskop je také řady **VHX 6000** a je vybaven objektivovým systémem **VH-ZST** s dvěma objektivy, které je mezi sebou možné libovolně měnit. První objektiv má zvětšení srovnatelné jako model **VH220R/Z20T**, a to od x20 do x200. Druhý objektiv disponuje zvětšením od x200 do x2000. Detaily k tomuto objektivovému systému jsou opět v kapitole 6.1, konkrétně v tabulce 10. Třetím mikroskopem je nová modelová řada **VHX 7000** s revolverovou hlavou **VHX 7100** nesoucí 4 výměnné objektivy. Parametry jednotlivých objektivů včetně jejich zvětšení jsou v tabulce 11.

## 7.2. Použité etalony

Po dlouhém rozhodování mezi možnými etalony, které by bylo možné použít pro ověření přesnosti měření ve 3D obrazech, byly zvoleny **závitové kalibry**. Konkrétně závitový kalibr **M11 x 1 – 6h** (obrázek 54) a **M30 – 6h** (obrázek 55). Referenční hodnoty rozměrů závitu byly změřeny na konturografu Marsurf LD120 od firmy Mahr. Protokoly z měření na konturografu jsou v příloze 9.

Závitové kalibry byly vybrány především kvůli jejich materiálu a charakteru povrchu, jelikož je ověřována přesnost mikroskopů především pro měření ve strojírenství.



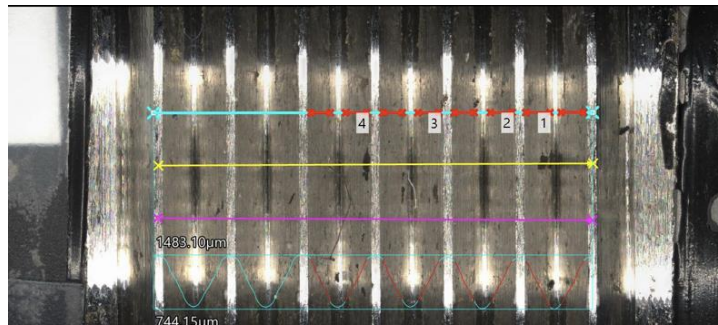
Obrázek 54 Závitový kalibr M11 x 1 – 6h



Obrázek 55 Závitový kalibr M30 – 6h

### 7.3. Naměřené hodnoty

Vlastní měření probíhalo v 3D obraze jednotlivých závitových kalibrů. Po kompletním naskenování povrchu a vytvoření sešitého obrazu povrchu byla určena 3 místa, ve kterých měření probíhalo. Vždy se jednalo o řez vytvořený jednou úsečkou. Jedna úsečka vedla na 3D obraze nejvyššími body a další dvě od ní byly odsazené. Díky měření na profilu, který vznikl rozdělením obrazu odsazenými úsečkami jsme získali hodnoty, které vypovídají o schopnosti mikroskopu měřit i na zakulacených površích. Pro získání představ, jak byly úsečky umístěny v obraze je možné nahlédnout na obrázek 54, kde je žlutá úsečka vedena nejvyššími body a tyrkysová a růžová jsou úsečky odsazené.



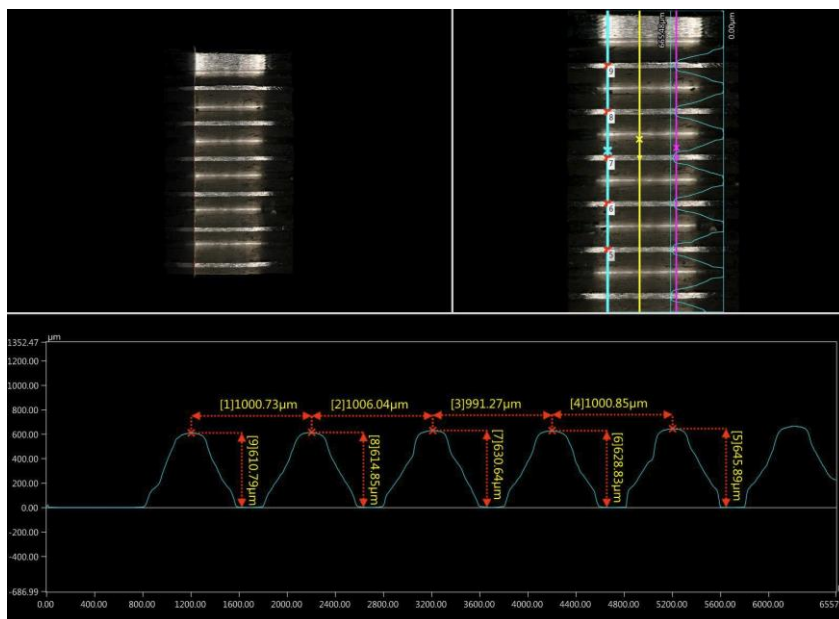
*Obrázek 56 Rozložení řezů při měření závitových kalibrů*

V každém řezu bylo měřeno stoupání, výška profilu a úhel profilu. Stoupání bylo v každém řezu měřeno čtyřikrát, výška profilu pětkrát a úhel profilu čtyřikrát. Z dat jednotlivých kategorií poté byla pomocí programu MS Excel vypočtena výběrová směrodatná odchylka, která sloužila jako hlavní zdroj informací o přesnosti měření.

Měření probíhalo všemi třemi mikroskopy při stejných zvětšeních, a to **x50** a **x100**, aby bylo možné mezi sebou jednotlivé mikroskopy porovnat.

#### 7.3.1. Měření na závitovém kalibru M11 x 1 - 6h

Pro názornost budou v této kapitole uvedeny naměřené hodnoty pouze jednou a zbytek bude přidán ve formě příloh. Jak již bylo řečeno, zpracování hodnot probíhalo přepisem naměřených dat do programu MS Excel, kde probíhalo jejich zpracování. Na obrázku 57 je znázorněn obrazový výstup z mikroskopu VHX 6000 VH220R/Z20T na závit M11. V tabulce 43 jsou pro názornost uvedeny naměřené hodnoty. V hlavičce tabulky je vždy uveden závitový kalibr, který byl měřen a typ mikroskopu společně se zvětšením.



Obrázek 57 Obrazový výstup z měření závitu M11 mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Závít M11 x 1 – 6h Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[µm]	[µm]	[°]	[µm]	[µm]	[°]
	996	558	53	1011	664	53,7
	976	637	50	1004	663	54,3
	1035	621	60	1005	662	52,9
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[µm]	[µm]	[°]	[µm]	[µm]	[°]
	998	568	46	1011	657	50,6
	996	623	50	1004	692	52,5
	986	518	59	992	687	51,0
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[µm]	[µm]	[°]	[µm]	[µm]	[°]
	1012	596	56	1029	649	55,0
	992	649	59	999	642	55,0
	1010	587	59	992	646	54,2
1019	563	65	1016	640	55,3	
	510			627		

Tabulka 43 Naměřené hodnoty z měření závitu M11 mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Hodnoty z tabulky 43, která uvádí naměřené hodnoty na závitovém kalibru **M11 x 1 – 6h** mikroskopem **VHX 6000 VH220R/Z20T** jsou zpracovány v tabulce 44.

Závit M11 x 1 – 6h Keyence VHX 6000 - VH-Z20R/Z20T						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	1002	579	55,0	1006	664	53,5
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	17	41	5,6	10	21	1,6

*Tabulka 44 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T*

Naměřené hodnoty na kalibru **M11 x 1 – 6h** mikroskopem **VHX 6000 VH-ZST** jsou v příloze 10 a zpracované hodnoty jsou v tabulce 45.

Závit M11 x 1 – 6h Keyence VHX 6000 - VH-ZST						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	998	490	65,2	1009	547	63,3
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	14	17	1,5	10	11	4,1

*Tabulka 45 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH-ZST*

Naměřené hodnoty na kalibru **M11 x 1 – 6h** mikroskopem **VHX 7000** jsou v příloze 11 a zpracované hodnoty jsou v tabulce 46.

Závit M11 x 1 – 6h Keyence VHX 7000						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	1000	680	54,1	997	719	58,4
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	10	16	0,9	20	11	0,8

*Tabulka 46 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 7000*



### 7.3.2. Měření na závitovém kalibru M30 – 6h

Měření a zpracování dat probíhalo stejně jako v kapitole 7.3.1., kde byl měřen závitový kalibr M11 x 1 – 6h.

V této kapitole jsou uvedeny zpracované hodnoty z měření závitového kalibru **M30 – 6h**.

Naměřené hodnoty na kalibru **M30 – 6h** mikroskopem **VHX 6000 VH220R/20T** jsou v příloze 12 a zpracované hodnoty jsou v tabulce 47.

Závit M30 – 6h Keyence VHX 6000 - VH-Z20R/Z20T						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	3500	2316	58,5	3515	2362	58,8
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	32	100	1,1	29	34	0,4

Tabulka 47 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Naměřené hodnoty na kalibru **M30 – 6h** mikroskopem **VHX 6000 VH-ZST** jsou v příloze 13 a zpracované hodnoty jsou v tabulce 48.

Závit M30 - 6h Keyence VHX 6000 - VH-ZST						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	3540	2035	63,5	3539	1998	62,0
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	28	113	2,0	38	48	2,7

Tabulka 48 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH-ZST

Naměřené hodnoty na kalibru **M30 – 6h** mikroskopem **VHX 7000** jsou v příloze 14 a zpracované hodnoty jsou v tabulce 49.

Závit M30 – 6h Keyence VHX 7000						
	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
<b>Celkový průměr:</b>	3496	2490	58,5	3495	2427	59,8
<b>Celková výběrová směrodatná odchylka:</b>	16	97	1,7	17	8	0,2

Tabulka 49 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 7000

#### 7.4. Analýza dat získaných měření prostorových rozměrů

Prvním krokem analýzy naměřených dat bylo vytvoření souhrnných tabulek pro měření jednotlivých závitů, aby bylo možné mezi sebou porovnat jednotlivé mikroskopy. Data z kapitol 7.3.1 a 7.3.2. jsou shrnuta v tabulkách 50 a 51, ve kterých jsou shrnuta naměřené hodnoty, výběrově směrodatné odchytky ( $\sigma$ ) a relativní chyba při měření jednotlivých závitových kalibrů pro dané mikroskopy. V tabulkách 50 a 51 je vždy v levém sloupečku zeleně vyznačen druh mikroskopu, který dle výběrové směrodatné odchytky dosáhl nej přesnějších hodnot a nejmenší chyby měření. V pravém sloupečku je pro porovnání uvedena referenční hodnota, která byla vypočtena jako průměr příslušných hodnot z protokolů v příloze 9.

<b>Výsledky měření závitu M11 x 1 – 6h</b>				
Typ mikroskopu a zvětšení	Stoupání			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $\mu\text{m}$ ]		[%]	[ $\mu\text{m}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	1002	17	1,65	1000
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	1006	10	1,01	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	998	14	1,40	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	1009	10	0,96	
Keyence VHX 7000 x50	1000	10	0,96	
Keyence VHX 7000 x100	997	20	1,98	
Typ mikroskopu a zvětšení	Výška profilu			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $\mu\text{m}$ ]		[%]	[ $\mu\text{m}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	579	41	7,17	710
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	664	21	3,17	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	490	17	3,46	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	547	11	2,06	
Keyence VHX 7000 x50	680	16	2,40	
Keyence VHX 7000 x100	719	11	1,49	
Typ mikroskopu a zvětšení	Úhel profilu			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $^{\circ}$ ]		[%]	[ $^{\circ}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	55,0	5,6	10,12	59,9
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	53,5	1,6	2,96	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	65,2	1,5	2,34	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	63,3	4,1	6,47	
Keyence VHX 7000 x50	54,1	0,9	1,74	
Keyence VHX 7000 x100	58,4	0,8	1,44	

Tabulka 50 Souhrn naměřených hodnot, výběrových směrodatných odchylek a relativních chyb měření u závitu M11 x 1 – 6h

## Výsledky měření závitu M30 – 6h

Typ mikroskopu a zvětšení	Stoupání			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $\mu\text{m}$ ]		[%]	[ $\mu\text{m}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	3500	32	0,92	3500
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	3515	29	0,83	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	3540	28	0,80	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	3539	38	1,08	
Keyence VHX 7000 x50	3496	16	0,46	
Keyence VHX 7000 x100	3495	17	0,49	
Typ mikroskopu a zvětšení	Výška profilu			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $\mu\text{m}$ ]		[%]	[ $\mu\text{m}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	2316	100	4,30	2430
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	2362	34	1,44	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	2035	113	5,56	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	1998	48	2,39	
Keyence VHX 7000 x50	2490	97	3,90	
Keyence VHX 7000 x100	2427	8	0,33	
Typ mikroskopu a zvětšení	Úhel profilu			
	Hodnota	$\sigma$	Relativní chyba	Ref. Hodnota
	[ $^{\circ}$ ]		[%]	[ $^{\circ}$ ]
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x50	58,5	1,1	1,84	60,2
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T x100	58,8	0,4	0,75	
Keyence VHX 6000 VHZST x50	63,5	2,0	3,19	
Keyence VHX 6000 VHZST x100	62,0	2,7	4,35	
Keyence VHX 7000 x50	58,5	1,7	2,96	
Keyence VHX 7000 x100	59,8	0,2	0,40	

*Tabulka 51 Souhrn naměřených hodnot, výběrových směrodatných odchylek a relativních chyb měření u závitu M30 – 6h*

Při analýze dat z tabulek 50 a 51 je na první pohled jasné, že mikroskop řady **VHX 7000** dosahuje v porovnání s dalšími testovanými modely nejvyšší přesnosti v každé kategorii měření. To potvrzuje tvrzení ze začátku kapitoly 7, že se jedná o nejpokročilejší model a měl by být schopný dosáhnout nejpřesnějších výsledků napříč porovnávanými modely.

Mikroskop řady VHX 7000 byl schopen změřit stoupání na závitovém kalibru M11 x 1 – 6h při zvětšení x50 jako:

$$1000 \pm 10 \mu\text{m} \text{ s relativní chybou } 0,96\%$$

A při zvětšení x100 bylo stoupání změřeno jako:

$$997 \pm 20 \mu\text{m} \text{ s relativní chybou } 1,98\%$$

Výška profilu závitu na kalibru M11 x 1 – 6h byla při zvětšení x50 změřena jako:

$$680 \pm 16 \mu\text{m} \text{ s relativní chybou } 2,4\%$$

Při zvětšení x100 byla změřena výška profilu jako:

$$719 \pm 11 \mu\text{m} \text{ s relativní chybou } 1,49\%$$

Úhel profilu závitu M11 x 1 – 6h byl při zvětšení x50 změřen jako:

$$54,1 \pm 0,9^\circ \text{ s relativní chybou } 1,74\%$$

Při zvětšení x100 byl úhel profilu změřen jako:

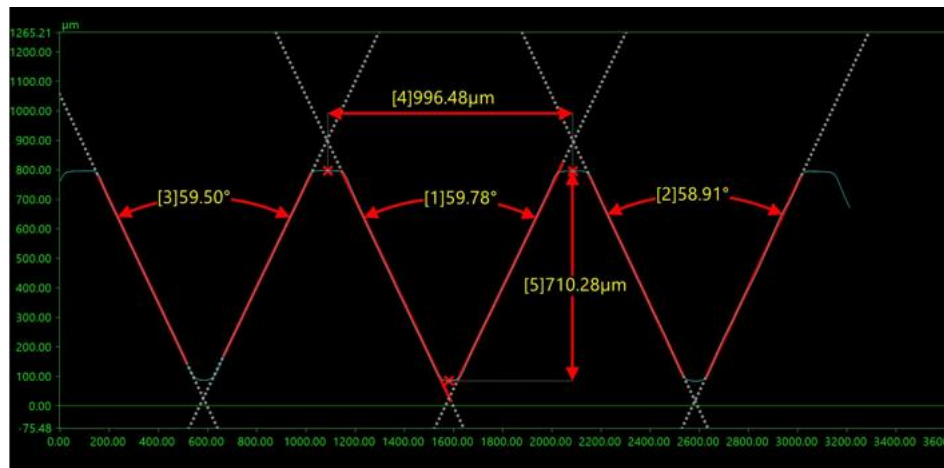
$$58,4 \pm 0,8^\circ \text{ s relativní chybou } 1,44\%$$

Analogicky lze přepsat všechny získané hodnoty pro jednotlivé mikroskopy z tabulky 50 a 51 do tvaru:

$$[\text{hodnota}] \pm [\sigma] \text{ s relativní chybou } [\text{Relativní chyba}]$$

Při porovnání naměřených hodnot s referenčními hodnotami v pravé části tabulek 50 a 51 je jasné, jak moc prostorové sešívání obrazu zhoršuje přesnost měření. Naměřené hodnoty ani z daleka neodpovídají udávaným parametrům jednotlivých mikroskopů.

Z dat v tabulce 50 a 51 je možné ve většině měření pozorovat **trend zvyšování přesnosti** s rostoucím zvětšením. Za účelem ověření tohoto tvrzení bylo provedeno jedno měření závitu M11 x 1 – 6h při zvětšení x200 na mikroskopu VHX 7000. Obrazový výstup tohoto měření je na obrázku 58. Naměřená hodnota stoupání je 996,48  $\mu\text{m}$ . Naměřená hodnota výšky profilu je 710,28  $\mu\text{m}$  a průměrná naměřená hodnota úhlu profilu z tohoto měření je 59,4°. Z porovnání s hodnotami v tabulce 46 lze usuzovat, že při vyšších hodnotách zvětšení dosáhneme přesnějších výsledků. Bohužel toto pozitivum s sebou nese i jedno podstatné negativum. Zvyšováním hodnoty zvětšení za účelem získání přesnějších výsledků se zvyšuje i čas, který je potřebný k softwarovému zpracování výsledného obrazu, protože se skládá z mnohonásobně vyššího počtu dílčích snímků. S tím souvisí i zvyšování nároků na úložiště dat, kde velikost snímků může bez problémů přesahovat desítky megabytů. Bohužel, dlouhý čas softwarového postprocesingu dílčích snímků je velmi nežádoucím aspektem při sériovém ověřování dílů. V porovnání s kontaktní metodou měření je to pro optické mikroskopy jasná porážka.



Obrázek 58 Měření závitu M11 x 1 – 6h, zvětšení x200

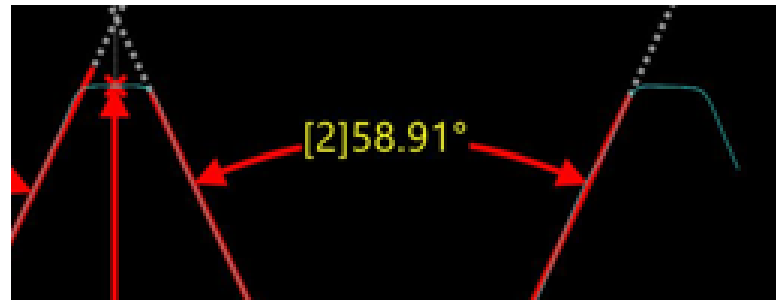
### 7.5. Komentář k naměřeným datům z měření v prostorových obrazech

Z naměřených dat je jasné, že měření prostorových rozměrů optickými mikroskopy není ani zdaleka srovnatelné s kontaktní metodou. I když mikroskop řady VHX 7000 vyšel jako nejpřesnější při měření prostorových rozměrů, výsledky získané tímto mikroskopem není možné v žádném případě považovat za relevantní v oblastech, kde hraje mikrometrová přesnost zásadní roli.

Největším zdrojem nepřesností v této kategorii měření je nedostatečná schopnost mikroskopu rozlišit jednotlivé plochy a správně sešit obraz. Tato chyba byla pozorována ve valné většině měření, jako chybně vykreslená vnější plocha závitů. Na obrázku 59 je detail profilu závitů M11 zachycený mikroskopem VHX 7000 při zvětšení x50. Je jasné, že vykreslení zaoblené plochy na vnějším povrchu závitů neodpovídá skutečnosti, pro porovnání je na obrázku 60 zobrazen detail z obrázku 58, který byl zachycen na stejném závitě při zvětšení x200. Z porovnání detailů na obrázcích 59 a 60 je jasné, že při vyšším zvětšení je mikroskop schopný přesnějšího zobrazení ploch, což mimo jiné potvrzuje výrok z posledního odstavce minulé kapitoly, že při zvyšování zvětšení roste i přesnost měření. Tento jev se projevoval u všech tří ověřovaných mikroskopů a souvisí s problematikou hloubky prostření obrazu, kdy při vyšších hodnotách zvětšení zachytí mikroskop více snímků a software má k dispozici více dat pro případnou aproximaci.

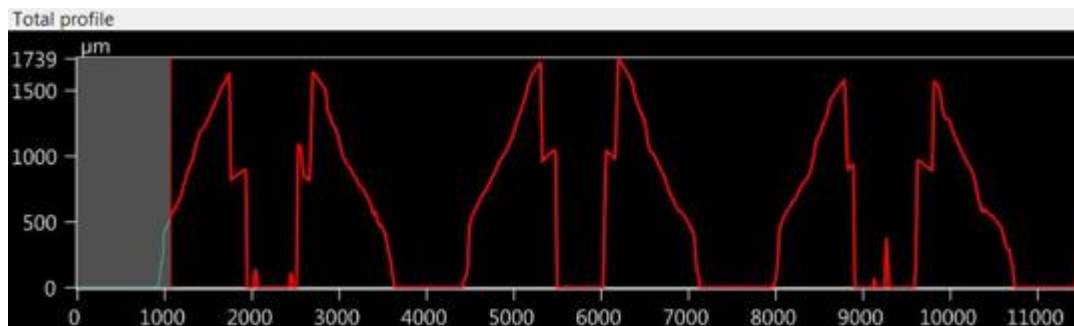


Obrázek 59 Detail zaoblené vnější plochy závitů M11 x 1 – 6h při zvětšení x50 mikroskopem VHX 7000



Obrázek 60 Detail vnější plochy závitu M11 x 1 – 6h při zvětšení x200 mikroskopem VHX 7000

Na obrázku 61 je zobrazen profil závitu M30, který byl zachycen při zvětšení x50 mikroskopem VHX 6000 VH-ZST. Takto zobrazený profil se vyskytoval ve valné většině měření a bylo velmi náročné dostat z mikroskopu obrazový výstup, který by byl vhodný k měření.



Obrázek 61 Chybný profil závitu M30 zobrazený mikroskopem VHX 6000 VH-ZST při zvětšení x50

## 8. Ověření přesnosti měření drsnosti povrchu

Cílem měření popsaného v této kapitole je ověření přesnosti měření drsnosti povrchu optickými mikroskopy. Měření probíhalo z pravidla na sešitém prostorovém obraze, který byl stejně jako v kapitole 7 získán skenováním povrchu vzorku. V této kapitole budou opět ověřovány tři mikroskopy, jako v kapitolách 6 a 7. Jako etalony pro porovnání výsledků byly zvoleny 2 povrchy. Jeden povrch byl soustružený a druhý frézovaný. I když měly jednotlivé etalony předepsanou drsnost, tak za účelem jejího ověření a získání referenční hodnoty byla drsnost těchto etalonů ověřena na konturografu.

Pro zajímavost proběhlo měření na skleněném etalonu drsnosti, abychom získali představu o tom, jestli je vůbec mikroskop schopný změřit drsnost na transparentním povrchu.

### 8.1. Použité mikroskopy a jejich parametry

Detailní popis použitých mikroskopů a jejich parametrů je popsán v kapitole 6.1. Pro ověřování přesnosti měření v kapitole 6, 7 a 8 byly použity vždy stejné mikroskopy se stejnou hardwarovou konfigurací. Tedy dva mikroskopy **Keyence VHX 6000**, jeden s objektivem **VHZ20R/Z20T** a druhý s objektivovým systémem **VH-ZST**. Třetím mikroskopem je **Keyence VHX 7000** s objektivovou hlavou **VHX 7100**.

## 8.2. Použité etalony

Jako etalony pro ověření přesnosti měření drsnosti optickými mikroskopy byly zvoleny dva kovové etalony. Jejich plocha byla získána procesem třískového obrábění. Jeden z povrchů byl soustružen a druhý frézován.

U těchto kovových etalonů zalisovaných v plastovém základu je zároveň uvedena drsnost jejich povrchu. Jelikož se jedná o poměrně staré etalony, které byly vyrobeny konvenčními technologiemi, byla přesnost předepsané hodnoty ověřena na konturografu MarSurf LD120 od firmy Mahr. Výstupní protokol z konturografu pro soustružený povrch je v příloze 15 a pro frézovaný povrch v příloze 16.

Parametry nastavení konturografu pro referenční měření soustruženého povrchu jsou v tabulce 52 a pro frézovaný povrch v tabulce 53.

Parametry nastavení	
Parametr	Hodnota
Lt	14,99 mm
Ls	2,5 $\mu\text{m}$
VB	+/- 5998,0
Vt	0,5 mm/s
Body	29984

*Tabulka 52 Parametry nastavení konturografu pro měření soustruženého povrchu*

Parametry nastavení	
Parametr	Hodnota
Lt	4,81 mm
Ls	2,5 $\mu\text{m}$
VB	+/- 5998,0
Vt	0,5 mm/s
Body	9622

*Tabulka 53 Parametry nastavení konturografu pro měření frézovaného povrchu*

Na obrázku 62 je etalon drsnosti soustruženého povrchu a na obrázku 63 je etalon drsnosti frézovaného povrchu.



*Obrázek 62 Etalon drsnosti soustruženého povrchu*



*Obrázek 63 Etalon drsnosti frézovaného povrchu*

Dle normy ČSN EN ISO 4288 byla při měření soustruženého povrchu dotykovým konturografem použita mezní vlnová délka (*cut-off*) 0,8 mm. Pro frézovaný povrch byla dle stejné normy použita mezní vlnová délka 2,5 mm.

Jak je možné vidět na obrázku 62 a 63, drsnost obou povrchů by měla být  $Ra = 3,2 \mu\text{m}$ . Při porovnání s protokoly z konturografu je jasné, že tyto hodnoty neodpovídají skutečnosti, a proto byla jako referenční drsnost použita právě hodnota naměřená konturografem.

Průměrná drsnost povrchu naměřená konturografem pro soustružený povrch je:

$$Ra = 4,635 \mu\text{m}$$

Průměrná drsnost povrchu naměřená konturografem pro frézovaný povrch je:

$$Ra = 3,611 \mu\text{m}$$

Pro ověření schopnosti optického mikroskopu měřit drsnost na transparentním vzorku byl použit skleněný etalon o drsnosti  $Ra = 0,74 \mu\text{m}$ . Kalibrační protokol k tomuto etalonu je v příloze 17. Etalon je zobrazen na obrázku 63.

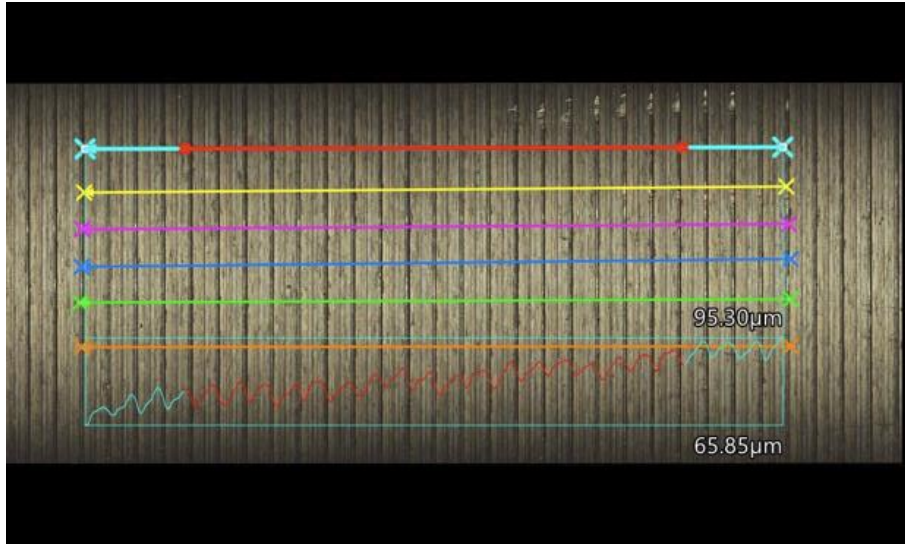


*Obrázek 64 Skleněný etalon drsnosti*



### 8.3. Naměřené hodnoty

Měření drsnosti vždy probíhalo na prostorově sešitém obrazu vzorku při **zvětšení x100** a s odpovídajícím nastavením lambda filtru. Na Obrázku 65 je pro názornost zobrazeno schéma měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 7000.



*Obrázek 65 Schéma měření a soustruženém povrchu mikroskopem VHX 7000*

Naměřené hodnoty byly opět zpracovány do tabulek v programu MS Excel a pomocí jeho matematických funkcí byla vypočtena průměrná hodnota drsnosti daného vzorku, průměrná odchylka od referenční hodnota a výběrová směrodatná odchylka z naměřených hodnot.

#### 8.3.1. Měření drsnosti na soustruženém povrchu

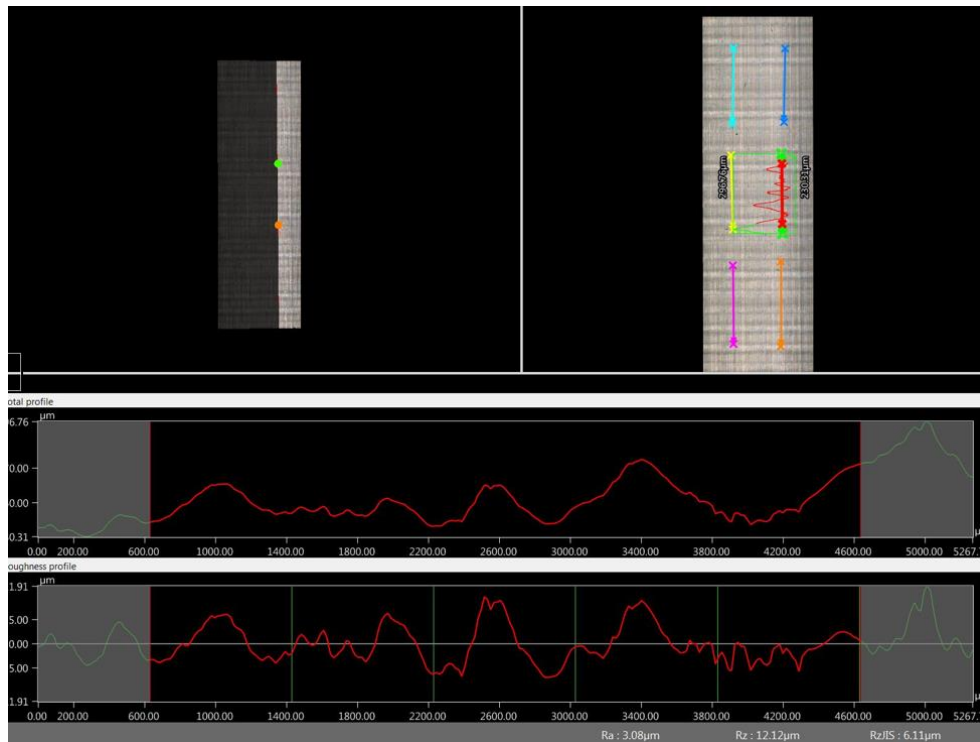
Pro názornost bude na začátku této kapitoly uvedeno kompletní měření včetně naměřených hodnot. Další výsledky budou uvedeny pouze ve formě zkrácených tabulek s výsledky. Naměřené hodnoty z měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T jsou v tabulce 52 a obrazový výstup ze zmíněného mikroskopu je na obrázku 66. Výsledky měření dalšími mikroskopy jsou uvedeny jako zkrácené verze tabulky 52.

V hlavičce každé tabulky je vždy uvedeno, co bylo měřeno a jakým mikroskopem. Dále jsou v tabulkách uvedeny referenční hodnoty z konturografu, průměrné hodnoty naměřené drsnosti, průměrné odchylky od referenčních hodnot a výběrové směrodatné odchylky.

Kompletní tabulky včetně naměřených dat jsou uvedeny v přílohách 18 až 20.

Pro všechny naměřené hodnoty byl použit odpovídající lambda filtr dle normy LC ISO 16610-21.

Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T jsou uvedeny v tabulce 54.



Obrázek 66 Obrazový výstup z měření drsnosti povrchu mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Měření drsnosti soustruženého povrchu		
Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T		
Referenční hodnota Ra [ $\mu\text{m}$ ]:		4,635
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	4,51	0,13
2	4,13	0,51
3	3,69	0,95
4	2,42	2,22
5	2,56	2,08
6	2,71	1,93
Průměr:	3,34	1,30
Nejvyšší zjištěná chyba:		2,22
Výběrová směrodatná odchylka		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,89

Tabulka 54 Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem **VHX 6000 VH-ZST** jsou uvedeny v tabulce 55.

<b>Měření drsnosti soustruženého povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 VH-ZST</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>4,635</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	2,32	2,31
Nejvyšší zjištěná chyba:		2,76
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,49

*Tabulka 55 Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST*

Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem **VHX 7000** jsou uvedeny v tabulce 55.

<b>Měření drsnosti soustruženého povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 7000</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>4,635</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	1,65	2,99
Nejvyšší zjištěná chyba:		3,16
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,11

*Tabulka 56 Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 7000*

### 8.3.2. Měření drsnosti na frézovaném povrchu

Měření drsnosti na frézovaném povrchu probíhalo stejným způsobem, jako měření drsnosti v předchozí kapitole, akorát s odpovídajícím etalonem.

Tabulky výsledků v této kapitole jsou rozvržením stejné, jako tabulky 54 až 56 z kapitoly 8.3.1. Kompletní výsledky měření jsou opět uvedeny v přílohách 21 až 23 a pro jejich vyhodnocení byl opět použit odpovídající lambda filtr dle normy LC ISO 16610-21.

Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem **VHX 6000 VH20R/Z20T** jsou uvedeny v tabulce 57.

<b>Měření drsnosti frézovaného povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 VH20R/Z20T</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>3,611</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	2,88	0,81
Nejvyšší zjištěná chyba:		1,41
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,60

*Tabulka 57 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VH20R/Z20T*

Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem **VHX 6000 VH-ZST** jsou uvedeny v tabulce 58.

<b>Měření drsnosti frézovaného povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 - VH-ZST</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>3,611</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	5,54	1,98
Nejvyšší zjištěná chyba:		3,77
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		1,51

*Tabulka 58 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST*

Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem **VHX 7000** jsou uvedeny v tabulce 59.

<b>Měření drsnosti frézovaného povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 7000</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>3,611</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	1,45	2,17
Nejvyšší zjištěná chyba:		2,32
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,18

Tabulka 59 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 7000

### 8.3.3. Měření drsnosti na skleněném etalonu

V této kapitole je popsáno experimentální měření provedené za účelem zjistit, jestli jsou optické mikroskopy firmy Keyence schopny měřit drsnost transparentního povrchu. Lze přepokládat, že se výsledné hodnoty drsnosti tohoto povrchu nebudou příliš blížit hodnotám reálným.

Dle kalibračního listu skleněného etalonu drsnosti v příloze 17 je referenční hodnota drsnosti povrchu tohoto etalonu  $R_a = 0,775 \mu\text{m}$ .

Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem **VHX 6000 VH220R/Z20T** jsou uvedeny v tabulce 60.

Kompletní tabulky s naměřenými hodnotami drsností skleněného etalonu jsou v přílohách 24 až 26.

<b>Měření drsnosti skleněného etalonu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 VH220R/Z20T</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	12,85	12,07
Nejvyšší zjištěná chyba:		13,53
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		1,52

Tabulka 60 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VH220R/Z20T

Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem **VHX 6000 VH-ZST** jsou uvedeny v tabulce 61.

Měření drsnosti skleněného etalonu		
Keyence VHX 6000 - VH-ZST		
Referenční hodnota Ra [ $\mu\text{m}$ ]:		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	<b>1,47</b>	<b>0,70</b>
Nejvyšší zjištěná chyba:		<b>1,13</b>
Výběrová směrodatná odchylka		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		<b>0,26</b>

Tabulka 61 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST

Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem **VHX 7000** jsou uvedeny v tabulce 62.

Měření drsnosti skleněného etalonu		
Keyence VHX 7000		
Referenční hodnota Ra [ $\mu\text{m}$ ]:		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota	Odchylka
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
Průměr:	<b>0,20</b>	<b>0,57</b>
Nejvyšší zjištěná chyba:		<b>0,61</b>
Výběrová směrodatná odchylka		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		<b>0,03</b>

Tabulka 62 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 7000

#### 8.4. Analýza dat získaných při měření drsnosti povrchu

Při měření drsnosti obrobených etalonů si nejlépe vedl mikroskop **VHX 6000** s objektivem **VHZ20R/Z20T**, ačkoliv v žádném případě nelze mluvit o přesném měření. O tom vypovídají průměrné hodnoty drsností v porovnání s referenčními hodnotami.

Drsnost soustruženého povrchu byla změřena mikroskopem **VHX 6000 VHZ20R/Z20T** jako:

$$Ra = 3,34 \mu\text{m} \text{ s průměrnou odchylkou od referenční hodnoty } 1,3 \mu\text{m}$$

Drsnost frézovaného povrchu byla změřena mikroskopem **VHX 6000 VHZ20R/Z20T** jako:

$$Ra = 2,88 \mu\text{m} \text{ s průměrnou odchylkou od referenční hodnoty } 0,81 \mu\text{m}$$

Při měření drsnosti skleněného etalonu si nejlépe vedl mikroskop řady **VHX 7000**. Opět zde nelze v žádném případě mluvit o přesném měření.

Z porovnání jednotlivých výsledků je jasné, že chyby při měření drsnosti na transparentním povrchu jsou enormní pro všechny typy zkoušených mikroskopů. Z toho důvodu je měření drsnosti na transparentním povrchu použitelné spíše pro získání orientační hodnoty drsnosti.

### **8.5. Komentář k datům z měření drsnosti povrchu**

Z dostupných naměřených průměrných hodnot drsnosti a jejich odchylek od referenčních hodnot je jasné, že optické mikroskopy jsou k měření drsnosti povrchu absolutně nevhodným nástrojem. Opět lze konstatovat, že s přesností kontaktní metody se přesnost mikroskopu nedá ani z daleka porovnat.

Překvapivým výsledkem je, že přesnost měření drsnosti povrchu na kovových etalonech mikroskopem **VHX 7000** byla překonána hardwarově a softwarově hůře vybaveným předchůdcem **VHX 6000**, který byl vybaven objektivem **VHZ20R/Z20T**.

Zdrojem těchto nepřesností v měření drsnosti je pravděpodobně nedostatečná schopnost rozlišení struktury povrchu vzorku při použitém zvětšení a následném sešívání obrazů.

Při měření skleněného etalonu sice dopadl nejlépe mikroskop **VHX 7000**, ale naměřené hodnoty jsou pořád dosti odlišné od hodnoty referenční a napříč zkoušenými mikroskopy se enormně liší. Zdrojem těchto vysokých nepřesností při měření drsnosti transparentního povrchu je pravděpodobně problém mikroskopů se zaostřením povrchu vzorku a tím spojený problém s následným sešíváním dílčích obrazů.

Bylo by vhodné dalším měřením drsnosti ověřit, jestli nedojde ke zvýšení přesnosti měření při vyšších hodnotách zvětšení, jako tomu bylo v kapitole 8. Avšak zvýšení hodnoty zvětšení s sebou nese již popsané problémy s časovou náročností zpracování a požadavkem na úložiště obrazových dat.

## **9. Ukázka výpočtu rozšířených nejistot**

V této kapitole bude pro názornost uveden výpočet rozšířené nejistoty měření, do které vstupuje nespočet dalších vlivů, které výslednou přesnost měření ovlivňují. Mezi tyto vlivy lze zařadit například teplotní roztažnost vzorku, počet opakovaných měření nebo rozlišovací schopnost.

Pro ukázkou tohoto výpočtu poslouží data z měření délkových rozměrů v rovinném obraze pravítka Olympus při zvětšení x200 mikroskopem Keyence VHX 7000 uvedená v tabulce 14.

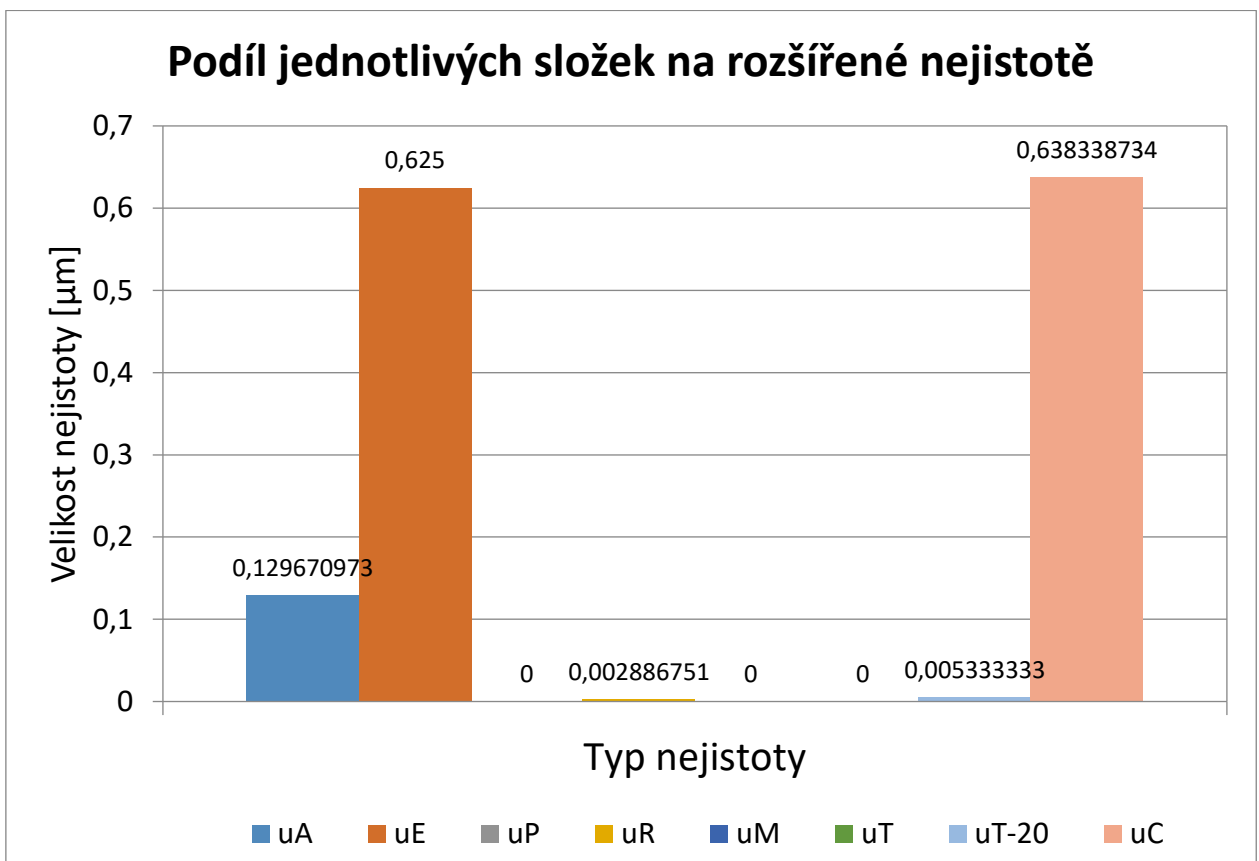
Všechny vlivy, které se podílejí na rozšířené nejistotě z uvedeného měření jsou v tabulce 63. Podíl jednotlivých vlivů na celkové rozšířené nejistotě je v grafu 4.

Veličina	Odhad	Standardní nejistota	Rozdělení	Citlivostní koeficient	Příspěvek k nejistotě
Nejistota typu A		0,129671 $\mu\text{m}$	norm.	1	0,129671 $\mu\text{m}$
Vliv etalonu		0,625 $\mu\text{m}$	norm.	1	0,625 $\mu\text{m}$
Vliv komparátoru		0 $\mu\text{m}$	norm.	1	0 $\mu\text{m}$
Vliv rozlišovací schopnosti	0	0,002887 $\mu\text{m}$	rovn.	1	0,002887 $\mu\text{m}$
Další vlivy *	0	0 $\mu\text{m}$	rovn.	1	0 $\mu\text{m}$
Vliv rozdílu teplot etalonového a kalibrovaného předmětu	0	0 $^{\circ}\text{C}$	rovn.	0,004 $\mu\text{m}/^{\circ}\text{C}$	0 $\mu\text{m}$
Vliv odchylky teploty od 20 $^{\circ}\text{C}$	0	5,333333 $\mu\text{m}/\text{m}$		0,001 m	0,005333 $\mu\text{m}$
Výsledná nejistota					0,638339 $\mu\text{m}$

Výsledná rozšířená nejistota:

$$U = 1,28 \mu\text{m}$$

Tabulka 63 Rozšířená nejistota měření pravítka Olympus mikroskopem VHX 7000 při zvětšení x200



Graf 4 Podíl jednotlivých složek na rozšířené nejistotě při měření pravítka Olympus mikroskopem VHX 7000 při zvětšení x200



## 10. Popis navržené metodiky ověření přesnosti měření

Na základě experimentů provedených výše byla navržena metodika, dle které by se mělo postupovat při ověřování přesnosti měření digitálními mikroskopy. Základním stavebním kamenem této metodiky je volba správného etalonu, od kterého se odvíjí všechny výsledky.

Jak již bylo řečeno, prvním krokem je volba správného etalonu. Měřený etalon by svou velikostí, nebo svým rozlišením měl odpovídat zvolenému zvětšení mikroskopu. Není vhodné, aby byla přesnost měření při zvětšení  $\times 50$  ověřována na etalonu s mikrometrovým rozlišením a obráceně.

Jelikož je přesnost měření v rovinném obraze ověřována u mikroskopů s vysokým rozsahem zvětšení, jako vhodné etalony k tomuto ověření byly zvoleny dvě délkové optické měřky. Prvním zvoleným etalonem je pravítko od firmy Olympus s délkou stupnice 1 mm a rozlišením 0,01 mm, které slouží k ověření přesnosti měření rovinných rozměrů při vyšších hodnotách zvětšení. Druhým zvoleným etalonem je pravítko od firmy L.E.T. Optomechanika s délkou stupnice 50 mm a rozlišením 0,1 mm, které slouží pro ověření přesnosti měření při nižších hodnotách zvětšení.

Vlastní ověření přesnosti měření rovinných rozměrů probíhá jak v obraze z jednoho zorného pole, tak i na sešitých snímcích, abychom získali představu o tom, jestli sešíváním snímků nedochází ke zkreslení hodnot. Zároveň je vhodné zachytit pravítko při různých hodnotách zvětšení, abychom získali představu, jaké přesnosti jsme schopni při určitém zvětšení dosáhnout. Naměřený rozměr je vždy vzdálenost dvou přímek, které co nejpřesněji kopírují rastr pravítka. Naměřené hodnoty je třeba dále porovnat s kalibračním listem pravítka, a z tohoto porovnání získáme odchylku měření při určitých podmínkách. Je pouze na stávajícím, nebo budoucím provozovateli mikroskopu, jestli vyhodnotí odchylky měření jako přijatelné, nebo nepřijatelné pro konkrétní aplikaci.

K ověření přesnosti měření rozměrů v sešitých 3D obrazech jsou použity dva závitové kalibry. Jedním je M11 x 1 – 6h a druhým je M30 – 6h. Těmito etalony je zároveň ověřena schopnost daného mikroskopu sešívát obrazy v ose Z, protože se na nich vyskytuje hodně šikmých a zaoblených ploch.

Ověření přesnosti měření rozměrů na 3D obrazech závitových kalibrů bylo provedeno při zvětšení  $\times 50$  a  $\times 100$  a vždy se měřilo stoupání daného závitu, jeho výška profilu a úhel profilu. Jelikož k závitovým kalibrům není dostupný kalibrační protokol, který by popisoval jednotlivé rozměry, byl jejich profil změřen konturografem. Získané hodnoty z konturografu byly použity jako referenční hodnoty, s kterými byly naměřené hodnoty porovnány. Z naměřených dat vyplývá, že přesnost měření rozměrů na 3D obrazech roste s použitým zvětšením a je tedy na provozovateli mikroskopu, aby zvážil všechna pro a proti, které s sebou zvýšení zvětšení nese.

K ověření přesnosti měření drsnosti povrchu byly zvoleny etalony drsnosti obráběného povrchu získaného soustružením a frézováním. Pro zajímavost byla přesnost měření povrchu ověřena i na etalonu drsnosti s transparentním povrchem. Jelikož

k etalonům obrobeného povrchu není dostupný kalibrační protokol, ze kterého by bylo možné získat referenční hodnoty, byla drsnost změřena na konturografu. Hodnoty získané konturografem slouží jako hodnoty referenční pro porovnání s hodnotami naměřenými.

Vlastní ověření přesnosti měření povrchu probíhalo na snímcích pořízených se zvětšením x100 na několika místech, aby bylo možné naměřené hodnoty statisticky zpracovat. Jelikož naměřené drsnosti ani zdaleka neodpovídají referenčním hodnotám, doporučení je opět použít vyšší hodnotu zvětšení. Opět je na provozovateli mikroskopu, aby zhodnotil všechna pro a proti použití takového zvětšení, při kterém by bylo dosaženo požadované přesnosti v tomto druhu měření.

## 11. Závěr

V teoretické části této práce je komplexně představena problematika optické mikroskopie, která je uvedena kapitolou popisující světlo a jeho chování. Informace uvedené v této kapitole jsou klíčové pro pochopení kapitol nadcházejících, které podrobněji rozebírají princip fungování optických mikroskopů a jejich součástí. V poslední kapitole teoretické části je popsán princip digitální mikroskopie. Tato kapitola slouží jako zdroj informací pro pochopení principu zachycení obrazů digitálními čipy a faktorů, které výsledný digitální obraz ovlivňují. Zároveň jsou v poslední kapitole teoretické části popsány zásadní rozdíly mezi konvenčním světelným mikroskopem a mikroskopem digitálním.

Teoretická část je tedy zdrojem všech potřebných informací k pochopení experimentů provedených v praktické části a ke správné interpretaci výsledků.

Praktická část této práce se skládá ze tří částí. V každé části byla ověřována přesnost měření rozměrů optickými mikroskopy za určitých podmínek. V první části byla ověřována přesnost měření rovinných rozměrů, ve druhé části byla ověřována přesnost měření rozměrů na skládaném 3D obraze a ve třetí části byla ověřována přesnost měření drsnosti povrchu.

Přesnost měření ve všech třech částech byla ověřována pro tři mikroskopy. Prvním mikroskopem byl Keyence VHX 6000 s objektivem VH220R/Z20T, druhým mikroskopem byl Keyence VHX 6000 s objektivovým systémem VH-ZST a třetím mikroskopem byl nejvyspělejší model VHX 7000 s revolverovou hlavou VHX 7100 nesoucí čtyři objektivy.

V první části, kde byla ověřována přesnost měření rovinných rozměrů dosáhl celkově nejvyšší přesnosti mikroskop VHX 7000. Což není překvapivý výsledek, jelikož se jedná o mikroskop vybavený nejmodernějšími technologiemi. Na základě naměřených hodnot nelze považovat ani jeden z ověřovaných mikroskopů jako vhodný pro aplikace, kde mikrometrová přesnost hraje zásadní roli. Měření probíhalo na optických měrkách od firmy Olympus a L.E.T. Optomechanika při zvětšení od x50 do x2000.

V druhé části byla ověřována přesnost měření na sešitých 3D obrazech a nejlepších výsledků zde dosáhl opět mikroskop VHX 7000. Měření probíhalo na závitových kalibrech M11 x 1 – 6h a M30 – 6h, na kterých bylo měřeno stoupání závitu, výška profilu závitu a úhel profilu závitu, vždy při zvětšení x50 a x100. Při těchto hodnotách zvětšení žádný z ověřovaných mikroskopů nedosáhl ani z daleka přesnosti, která by se dala srovnávat s kontaktní metodou měření, a proto nelze ani jeden z ověřovaných mikroskopů doporučit pro měření rozměrů v 3D obrazech vzorků, kdy je požadována vysoká přesnost měření. V této části bylo zjištěno, že přesnost měření rozměrů v 3D obrazech roste se zvyšováním zvětšení. Nabízí se tedy otázka, jaké je optimální zvětšení pro dosažení požadované přesnosti. Při tom je nutné myslet na to, že při zvyšování zvětšení se velmi znatelně prodlužuje čas zpracování výsledného snímku a zároveň rostou nároky na datové úložiště. Při sériovém ověřování mnoha vzorků jsou tyto aspekty velmi podstatné, protože s nárůstem zvětšení rapidně klesá produktivita.

Ve třetí části byla ověřována přesnost optických mikroskopů při měření drsnosti povrchu. Drsnost byla měřena na povrchu dvou kovových etalonů a jednoho skleněného etalonu při zvětšení x100. Povrch na jednom kovovém etalonu byl soustružený a na druhém frézovaný. Při měření drsnosti na kovových etalonech se referenční hodnotě drsnosti nejvíce přiblížil mikroskop VHX 6000 VH220R/Z20T a nejméně VHX 7000. Při měření na skleněném etalonu byl výsledek přesně opačný. Při měření drsnosti povrchu všemi mikroskopy se výsledné hodnoty drsností lišily od referenčních hodnot na tolik, že naměřené hodnoty nelze považovat za relevantní. Opět se nabízí otázka, jestli by nedošlo ke zvýšení přesnosti měření drsnosti při použití vyššího zvětšení.

V předposlední kapitole je pro zajímavost uveden vzorový výpočet rozšířené nejistoty u zvoleného měření a v poslední kapitole je metodicky popsán postup při ověřování přenosit měření digitálními mikroskopy.

Pokud se provozovatel rozhodl použít k měření rozměrů digitální mikroskop a zvážil přesnost měření tímto nástrojem, případně se zamyslel nad výhodami a nevýhodami měření při vyšších hodnotách zvětšení, jako nejvhodnější kandidát pro tuto činnost vychází mikroskop řady VHX 7000. Co se týká přesnosti měření rozměrů, řada VHX 7000 dosahovala nejlepších výsledků a je tedy vhodné investovat právě do tohoto typu.

## 12. Seznam obrázků

Obrázek 1 Paprsky světla [3].....	4
Obrázek 2 Viditelná část elektromagnetického spektra [4].....	5
Obrázek 3 Princip pokusu [5].....	5
Obrázek 4 Zákon odrazu [7].....	8
Obrázek 5 Rozptyl světla při dopadu na nehladký povrch [5].....	9
Obrázek 6 Paprsek odražený v rohovém reflektoru [5].....	9
Obrázek 7 Lom světla, rybí akvário [5].....	10
Obrázek 8 Lom ke kolmici, $n_2 > n_1$ [5].....	11
Obrázek 9 Lom od kolmice, $n_2 > n_1$ [5].....	11
Obrázek 10 Úplný odraz světla [9].....	12
Obrázek 11 Zobrazení rovinným zrcadlem [5].....	13
Obrázek 12 Kulová zrcadla [8].....	13
Obrázek 13 Spojka a rozptylka (vlevo spojka, vpravo rozptylka) [8].....	15
Obrázek 14 Chromatic aberration [10].....	17
Obrázek 15 Anatomie oka [11].....	17
Obrázek 16 Konjugované roviny [22].....	20
Obrázek 17 Köhlerovo osvětlení [20].....	21
Obrázek 18 Köhlerovo osvětlení při mikroskopii pomocí viditelného, odraženého světla [20].....	22
Obrázek 19 Úhlová apertura [29].....	22
Obrázek 20 Světelné kužele pro různé objektivy [29].....	23
Obrázek 21 Airyho disky [29].....	27
Obrázek 22 Vliv numerické apertury na velikost Airyho disku [29].....	27
Obrázek 23 Sférická aberace [22].....	31
Obrázek 24 Pozitivní koma [22].....	32
Obrázek 25 Astigmatismus [22].....	32
Obrázek 26 Zklenutí pole [22].....	33
Obrázek 27 Zkreslení [22].....	33
Obrázek 28 Okuláry (zleva Ramsdenův, Huygensův) [26].....	34
Obrázek 29 Periplan okulár [26].....	35
Obrázek 30 Předmět – objektiv – obraz [22].....	35
Obrázek 31 Základní princip nekorigovaného mikroskopu [22].....	36
Obrázek 32 Chod paprsků okulárem [22].....	37
Obrázek 33 Schéma mikroskopu bez korekce na nekonečno a s korekcí na nekonečno [28].....	37
Obrázek 34 Schématická reprezentace senzoru citlivého na světlo (pixel) CMOS [33].....	39
Obrázek 35 Blooming zapříčiněný nasycením pixelů [34].....	40
Obrázek 36 Schématický princip funkce CCD čipu [32].....	41
Obrázek 37 Schématický princip funkce CMOS čipu [32].....	42
Obrázek 38 Spektrální odezva pro CCD čip [32].....	45
Obrázek 39 Konfigurace pro temné pole s reflexním osvitom [36].....	48
Obrázek 40 Optická konfigurace mikroskopu s reflexním polarizovaným osvitom [37].....	49
Obrázek 41 Porovnání zobrazení v tmavém poli (a) a v polarizovaném světle (b) [37].....	49
Obrázek 42 Diferenciální interferenční kontrast v optické mikroskopii – optická trasa [37].....	50
Obrázek 43 Zobrazení vzorku metodou DIC [37].....	51
Obrázek 44 Optická trasa základního konfokálního mikroskopu [14].....	52
Obrázek 45 Schéma konfokálního skeneru Yokogawa CSU-10 [14].....	53
Obrázek 46 Objektiv VH20R/Z20T [Příručka Keyence].....	55
Obrázek 47 Objektivový systém VH-ZST [Příručka Keyence].....	55
Obrázek 48 Hlava VHX 7100 [Příručka Keyence].....	57
Obrázek 49 Pravitko Olympus.....	57
Obrázek 50 Pravitko L.E.T. Optomechanika.....	58
Obrázek 51 Měření na obraze pravitka Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH20R/Z20T.....	59
Obrázek 52 Měření na obraze pravitka Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST.....	61
Obrázek 53 Měření na obraze pravitka Olympus, zvětšení x200, VHX 7000.....	62
Obrázek 54 Závitový kalibr M11 x 1 – 6h.....	78
Obrázek 55 Závitový kalibr M30 – 6h.....	78
Obrázek 56 Rozložení řezů při měření závitových kalibrů.....	79
Obrázek 57 Obrazový výstup z měření závitu M11 mikroskopem VHX 6000 VH20R/Z20T.....	80
Obrázek 58 Měření závitu M11 x 1 – 6h, zvětšení x200.....	86



Obrázek 59 Detail zaoblené vnější plochy závitu M11 x 1 – 6h při zvětšení x50 mikroskopem VHX 7000 .....	86
Obrázek 60 Detail vnější plochy závitu M11 x 1 – 6h při zvětšení x200 mikroskopem VHX 7000 .....	87
Obrázek 61 Chybný profil závitu M30 zobrazený mikroskopem VHX 6000 VH-ZST při zvětšení x50	87
Obrázek 62 Etalon drsnosti soustruženého povrchu .....	88
Obrázek 63 Etalon drsnosti frézovaného povrchu .....	89
Obrázek 64 Skleněný etalon drsnosti .....	89
Obrázek 65 Schéma měření a soustruženém povrchu mikroskopem VHX 7000 .....	90
Obrázek 66 Obrazový výstup z měření drsnosti povrchu mikroskopem VHX 6000 VH-Z20R/Z20T .....	91



### 13. Seznam grafů

Graf 1 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítko olympus při zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	60
Graf 2 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítko Olympus při zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST .....	61
Graf 3 Odchylka v závislosti na referenční hodnotě pro pravítko Olympus při zvětšení x200, VHX 7000 .....	63
Graf 4 Podíl jednotlivých složek na rozšířené nejistotě při měření pravítka Olympus mikroskopem VHX 7000 při zvětšení x200.....	97

## 14. Seznam tabulek

Tabulka 1 Index lomu různých medií pro světlo o vlnové délce 589 nm ve vakuu [5].	7
Tabulka 2 Barevná teplota pro vybrané zdroje [18][19].	19
Tabulka 3 Numerická apertura pro vybrané objektivy [29].	24
Tabulka 4 Rozlišení a numerická apertura v závislosti na typu objektivu [29].	26
Tabulka 5 Rozlišení a vlnová délka [29].	26
Tabulka 6 Parametry vybraných objektivů [21].	30
Tabulka 7 porovnání běžných chlazených CCD a sCMOS kamer [32].	44
Tabulka 8 Mikroskopem zvětšený obraz promítaný na pixel o velikosti $6,5 \mu\text{m}^2$ [32].	44
Tabulka 9 Parametry objektivu VHZ20R/Z20T [Příručka Keyence].	54
Tabulka 10 Parametry objektivového systému VH-ZST [Příručka Keyence].	55
Tabulka 11 Parametry objektivů osazených na hlavě VHX 7100 [Příručka Keyence].	56
Tabulka 12 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T	59
Tabulka 13 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST	60
Tabulka 14 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x200, VHX 7000	62
Tabulka 15 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 6000 VHZ20R/Z20T	63
Tabulka 16 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 6000 VH-ZST	64
Tabulka 17 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x50, VHX 7000	64
Tabulka 18 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 6000 VHZ20R/Z20T	65
Tabulka 19 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 6000 VH-ZST	65
Tabulka 20 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x100, VHX 7000	65
Tabulka 21 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T	66
Tabulka 22 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST	66
Tabulka 23 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, zvětšení x200, VHX 7000	67
Tabulka 24 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešitý obraz, zvětšení x200, VHX 6000 VHZ20R/Z20T	67
Tabulka 25 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešitý obraz, zvětšení x200, VHX 6000 VH-ZST	68
Tabulka 26 Naměřené hodnoty na skleněném pravítku, sešitý obraz, zvětšení x200, VHX 7000	68
Tabulka 27 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x500, VHX 6000 VH-ZST	69
Tabulka 28 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x500, VHX 7000	69
Tabulka 29 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1000, VHX 6000 VH-ZST	69
Tabulka 30 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1000, VHX7000	70
Tabulka 31 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1500, VHX 6000 VH-ZST	70
Tabulka 32 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x1500, VHX7000	70
Tabulka 33 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x2000, VHX 6000 VH-ZST	71
Tabulka 34 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, sešitý obraz, zvětšení x2000, VHX7000	71
Tabulka 35 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x1000, VHX 6000 VH-ZST	72
Tabulka 36 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x1000, VHX7000	72
Tabulka 37 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x2000, VHX 6000 VH-ZST	72
Tabulka 38 Naměřené hodnoty na pravítku Olympus, zvětšení x2000, VHX7000	73
Tabulka 39 Porovnání průměrných odchylek jednotlivých mikroskopů při měření nesešivaného obrazu 2D etalonu	73
Tabulka 40 Porovnání průměrných odchylek jednotlivých mikroskopů při měření sešivaného i nesešivaného obrazu 2D etalonu	74
Tabulka 41 Porovnání průměrných odchylek mikroskopů při měření rozměrů sešivaných obrazů zachycených vysokým zvětšením	75
Tabulka 42 Porovnání průměrných odchylek mikroskopů při měření rozměrů nesešivaných obrazů zachycených vysokým zvětšením	76
Tabulka 43 Naměřené hodnoty z měření závitů M11 mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T	80
Tabulka 44 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T	81
Tabulka 45 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH-ZST	81
Tabulka 46 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 7000	81



Tabulka 47 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	82
Tabulka 48 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH-ZST .....	82
Tabulka 49 Výsledné hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 7000 .....	82
Tabulka 50 Souhrn naměřených hodnot, výběrových směrodatných odchylek a relativních chyb měření u závitu M11 x 1 – 6h .....	83
Tabulka 51 Souhrn naměřených hodnot, výběrových směrodatných odchylek a relativních chyb měření u závitu M30 – 6h .....	84
Tabulka 52 Parametry nastavení konturografu pro měření soustruženého povrchu .....	88
Tabulka 53 Parametry nastavení konturografu pro měření frézovaného povrchu .....	88
Tabulka 54 Výsledek měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	91
Tabulka 55 Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST .....	92
Tabulka 56 Výsledky měření drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 7000 .....	92
Tabulka 57 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	93
Tabulka 58 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST .....	93
Tabulka 59 Výsledky měření drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 7000 .....	94
Tabulka 60 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T ...	94
Tabulka 61 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VH-ZST .....	95
Tabulka 62 Výsledky měření drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 7000 .....	95
Tabulka 63 Rozšířená nejistota měření pravítka Olympus mikroskopem VHX 7000 při zvětšení x200	97

## 15. Seznam příloh

Příloha 1 Protokol o kalibraci pravítka Olympus .....	111
Příloha 2 Protokol o kalibraci pravítka L.E.T. Optomechanika.....	112
Příloha 3 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x50	113
Příloha 4 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x100 .....	114
Příloha 5 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x200 .....	115
Příloha 6 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x200 na sešitém obraze.....	116
Příloha 7 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro pravítko Olympus při zvětšení x500, x1000, x1500 a x2000 na sešitém obraze .....	117
Příloha 8 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro pravítko Olympus při zvětšení x1000 a x2000 .....	118
Příloha 9 Protokoly k závitovým kalibrům.....	119
Příloha 10 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH-ZST.....	120
Příloha 11 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem VHX 7000	121
Příloha 12 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	122
Příloha 13 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 6000 VH- ZST.....	123
Příloha 14 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX 7000 .....	124
Příloha 15 Protokol z konturografu k soustruženému povrchu.....	125
Příloha 16 Protokol z konturografu k frézovanému povrchu.....	126
Příloha 17 Protokol o kalibraci skleněného etalonu drsnosti.....	127
Příloha 18 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	128
Příloha 19 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000 VH – ZST.	129
Příloha 20 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 7000.....	130
Příloha 21 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T .....	131
Příloha 22 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000 VH – ZST...	132
Příloha 23 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 7000.....	133
Příloha 24 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VHZ20R/Z20T	134
Příloha 25 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000 VH – ZST .....	135
Příloha 26 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 7000.....	136

## 16. Seznam použité literatury

- [1] JONES, M. (2004) *Tycho Brahe, Cartography and Landscape in 16th Century Scandinavia*. In: Palang H., Sooväli H., Antrop M., Setten G. (eds) *European Rural Landscapes: Persistence and Change in a Globalising Environment*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-0-306-48512-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-0-306-48512-1_13)
- [2] MESCHÉDE, Dieter. *Optics, light, and lasers: the practical approach to modern aspects of photonics and laser physics*. Third, revised and enlarged edition. Weinheim: Wiley, [2017]. ISBN 3527413316.
- [3] [Paprsky světla]. In: *Pikist [online]*. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: <https://www.pikist.com/free-photo-shlgn/cs>
- [4] Ryer, A. (1997). *Light measurement handbook*. Newburyport, MA: International Light.
- [5] Anon, 2020. Book: University Physics III - Optics and Modern Physics (OpenStax). Available at: <https://phys.libretexts.org/@go/page/4484> [Accessed April 9, 2021].
- [6] B. Walker, *Optical Engineering Fundamentals, Second Edition*, SPIE Press, Bellingham, WA (2008).
- [7] KUPKOVÁ, Hana a Jaroslav PETR. *Zákon odrazu [online]*. In: . [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/1694>
- [8] NOVÁKOVÁ, Danuše, Zuzana MALÁ a Rudolf NOVÁK. *Fyzika II*. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2004. ISBN 8001030903.
- [9] CASLICK. Úplný odraz. In: *Refraction and total refraction [online]*. [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: <http://www.mrcaslick.altervista.org/SPH4U/TEXTBOOK/9.2.pdf>
- [10] , DrBob. Chromatic aberration. *Iceland photo tours [online]*. [cit. 2021-4-27]. Dostupné z: <https://iceland-photo-tours.com/articles/photography-tutorials/chromatic-aberration-what-it-is-and-how-to-avoid-it>
- [11] Anatomie oka. *Optika Pleyerová [online]*. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <http://www.ocnioptik.eu/akantameby/katarakta---sedy-zakal/>
- [12] Physics\_of\_the\_Eye. *Yorku.ca [online]*. 2019 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: [https://www.yorku.ca/menary/courses/firstyrlabs/2019/Physics\\_of\\_the\\_Eye.pdf](https://www.yorku.ca/menary/courses/firstyrlabs/2019/Physics_of_the_Eye.pdf)
- [13] W. DAVIDSON, Michael a Mortimer ABRAMOWITZ. *OPTICAL MICROSCOPY [online]*. [cit. 2021-5-3]. Dostupné z: [https://cw.fel.cvut.cz/b182/\\_media/courses/zsl/davidson-abramowitz-optical\\_microscopy.pdf](https://cw.fel.cvut.cz/b182/_media/courses/zsl/davidson-abramowitz-optical_microscopy.pdf)
- [14] *Handbook of Optics*. 3rd ed. Editor Michael BASS. New York: McGraw-Hill, c2010. ISBN 9780071498890
- [15] *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods, Second Edition*. Yang Leng. © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2013 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [16] MACEK, Karel, František HNILICA a Vladimír STARÝ. *Experimentální metody v materiálovém inženýrství*. Praha: Nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 9788001039342.
- [17] WEGERHOFF, Rainer, Olaf WEIDLICH a Menfred KÄSSENS. *Basics of light microscopy and imaging special edition*. Darmstadt, Germany, 2006.



- [18] ABRAMOWITZ, Mortimer. Color temperature. *Molecular expressions: Optical microscopy primer* [online]. 2015 [cit. 2021-5-4]. Dostupné z: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/colortemperatureintro.html>
- [19] ABRAMOWITZ, Mortimer. Light sources. *Olympus-lifescience* [online]. [cit. 2021-5-4]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/sources/>
- [20] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. Reflected Light. *Olympus-lifescience* [online]. [cit. 2021-5-17]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/reflectkohler/>
- [21] SPRING, Kenneth R., Ernst KELLER a Michael W. DAVIDSON. *Olympus-lifescience: Microscope Objectives Introduction* [online]. [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/objectives/>
- [22] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss, c2001. ISBN 0-471-25391-x.
- [23] Born, Max & Wolf, Emil, *Principles of Optics*, 6<sup>th</sup> Edition, Oxford: Pergamon Press, 1980.
- [24] SPRING, Kenneth R. a Michael W. DAVIDSON. *Nikon microscopy U: Astigmatism* [online]. [cit. 2021-6-1]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/tutorials/astigmatism>
- [25] KELLER, H. Ernst, Kenneth R. SPRING, Brian O. FLYNN a Michael W. DAVIDSON. *Olympus-lifescience: Geometric Distortion Aberrations* [online]. [cit. 2021-6-1]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/aberrations/distortion/>
- [26] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. *Olympus-lifescience: Eyepieces (Oculars)* [online]. [cit. 2021-6-4]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/oculars/>
- [27] DAVIDSON, Michael W. a Thomas J. FELLERS. *UNDERSTANDING CONJUGATE PLANES AND KÖHLER ILLUMINATION* [online]. [cit. 2021-6-6]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/pdfs/KohlerIllumination.pdf>
- [28] SPRING, Kenneth R. a Michael W. DAVIDSON. *Olympus-lifescience: Infinity Optical Systems* [online]. [cit. 2021-6-8]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/infinityintro/>
- [29] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. *Olympus-lifescience: Numerical Aperture and Resolution* [online]. [cit. 2021-6-9]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/numaperture/>
- [30] ROTTENFUSSER, Rudi, Erin E. WILSON a Michael W. DAVIDSON. Education in Microscopy and Digital Imaging: Numerical aperture and resolution. *Zeiss Microscopy Online Campus: Education in Microscopy and Digital Imaging* [online]. [cit. 2021-6-9]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html>
- [31] AKAY, Metin, ed. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2006 [cit. 2021-6-10]. ISBN 0471740365. Dostupné z: doi:10.1002/9780471740360



- [32] Jerome, W. (2017). Practical Guide to Choosing a Microscope Camera. *Microscopy Today*, 25(5), 24-29. doi:10.1017/S155192951700061X
- [33] Bernas, T. (2005), Basics of Digital Microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 31: 12.2.1-12.2.14. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1202s31>
- [34] Example of blooming caused by saturation of a sensor pixel. *Teledyne photometrics: Saturation and Blooming* [online]. [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://www.photometrics.com/learn/imaging-topics/saturation-and-blooming>
- [35] Sluder, G., & Wolf, D. E. (2013). *Digital Microscopy (ISSN Book 114)* (4th ed.). Academic Press.
- [36] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON. Reflected darkfield illumination. *Olympus-lifescience* [online]. [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/darkfieldreflect/>
- [37] ROTTENFUSSER, Rudi, Erin E. WILSON a Michael W. DAVIDSON. *Education in Microscopy and Digital Imaging: Contrast modes in reflected light microscopy* [online]. [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: [http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/reflectedcontrast.html#:~:text=Polari zed%20reflected%20light%20microscopy%20\(Figure,polarization%20during%20the%20reflection%20process.&text=The%20linearly%20polarized%20li ght%20waves,reflected%20back%20into%20the%20objective.](http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/reflectedcontrast.html#:~:text=Polari zed%20reflected%20light%20microscopy%20(Figure,polarization%20during%20the%20reflection%20process.&text=The%20linearly%20polarized%20li ght%20waves,reflected%20back%20into%20the%20objective.)
- [38] FELLERS, Thomas J. a Michael W. DAVIDSON. *Life science solutions: Introduction to Confocal Microscopy* [online]. [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>

## 17. Přílohy

### *Příloha 1 Protokol o kalibraci pravítka Olympus*



GQM/24 - **Speciální měření a metrologie**  
Interní kalibrační místo 1

## Protokol o kalibraci č. 1043288/1

Koordinátor IKM 1

<b>Datum kalibrace:</b>	27. 3. 2018
<b>Zadavatel:</b>	GQM/24
<b>Měřidlo:</b>	délkové měřítko skleněné
<b>Rozsah:</b>	0-1mm
<b>Rozlišení:</b>	0,01mm
<b>Výrobce:</b>	Olympus
<b>Identifikace:</b>	ID 1043288
<b>Specifikovaná přesnost:</b>	
<b>Použitý etalon:</b>	Werth Video-Check UA ID 1006427 MPE E1=0,35+L/900
<b>Metoda měření:</b>	Software Winwerth, objektiv se zvětšením 10x. Pravítko bylo vyrovnáno podle spodních a horních hran rysek hodnot 0,01;0,02;0,03;0,04;0,96;0,97;0,98;0,99mm. Měřicí místa jsou na levé straně rysek.
<b>Podmínky měření:</b>	teplota vzduchu: $t_A = 20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
<b>Výsledek:</b>	Největší zjištěná chyba v celém rozsahu je 0,0007mm
<b>Odborné doporučení:</b>	Dle specifikace zadavatele budou použity skutečně naměřené hodnoty
<b>Výsledek kalibrace:</b>	<b>Vyhovuje</b>

*Příloha 2 Protokol o kalibraci pravítka L.E.T. Optomechanika*



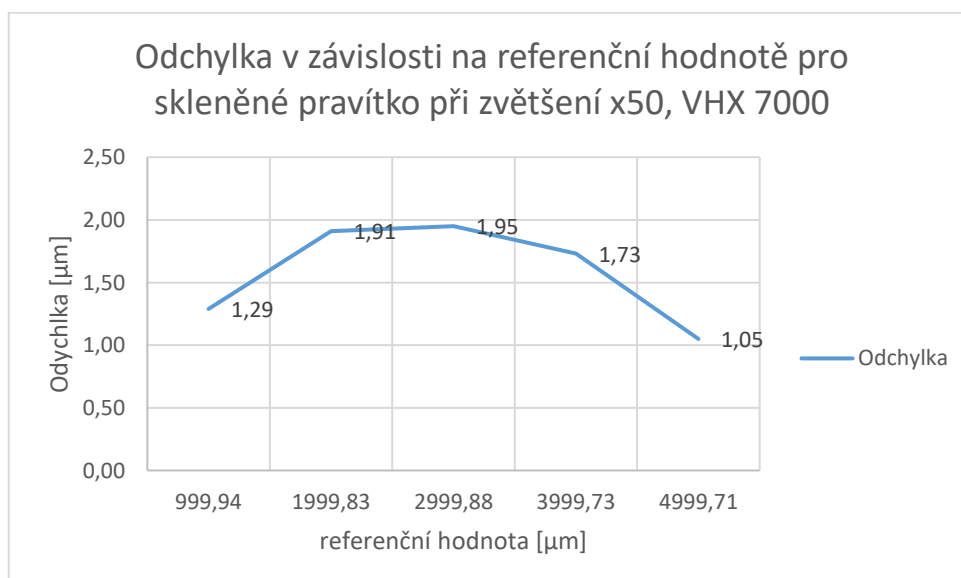
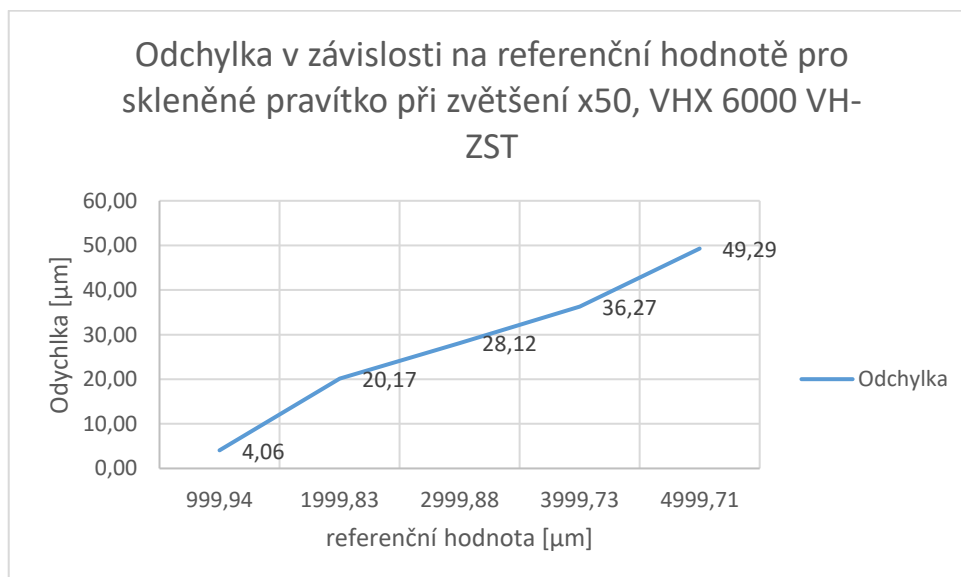
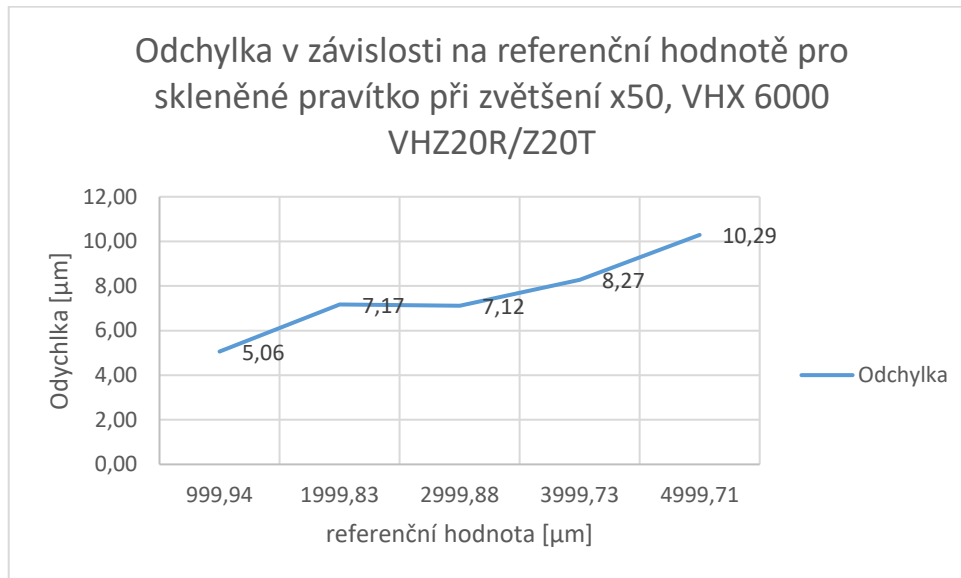
GQM/24 - Speciální měření a metrologie  
Interní kalibrační místo 1

## Protokol o kalibraci č. 1043287/1

Koordinátor IKM 1

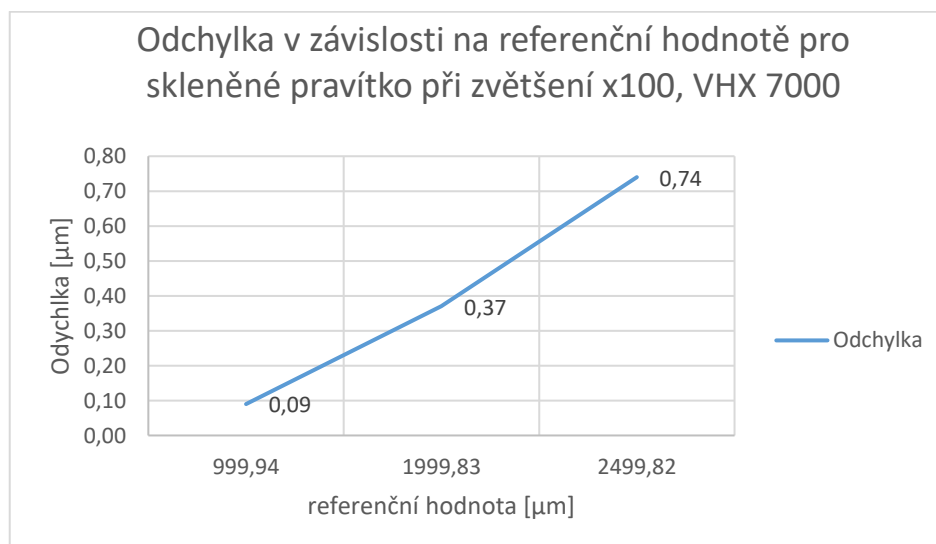
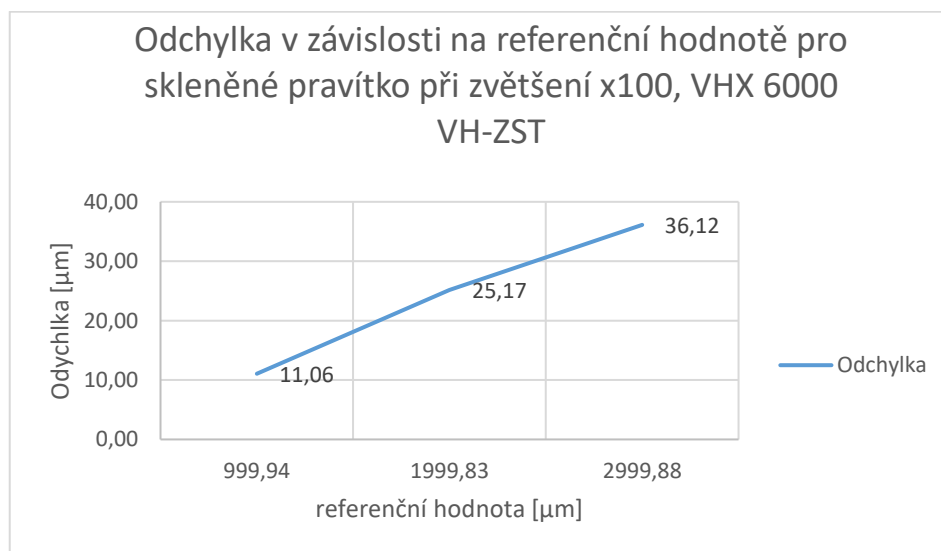
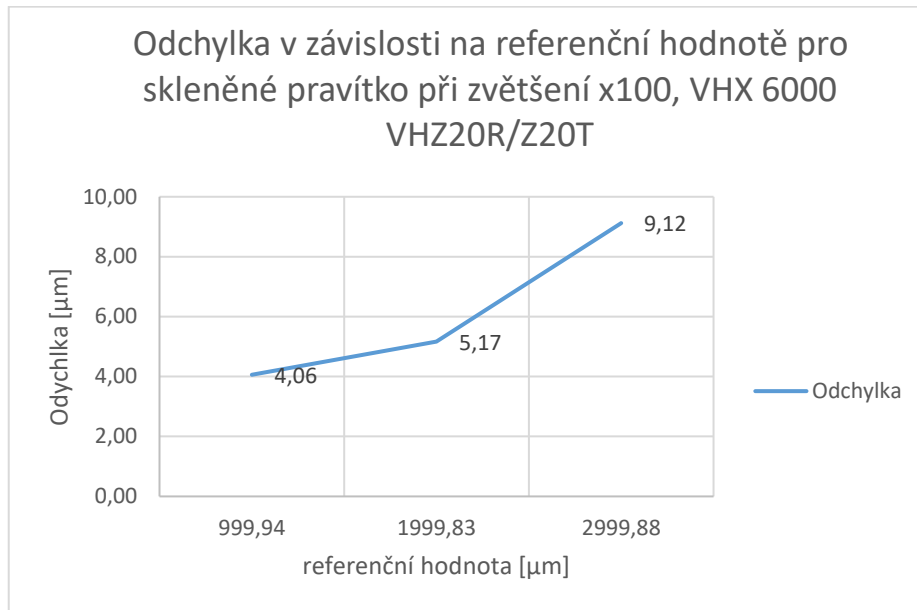
<b>Datum kalibrace:</b>	4. 4. 2018
<b>Zadavatel:</b>	GQM/24
<b>Měřidlo:</b>	délkové měřítko skleněné
<b>Rozsah:</b>	0-50mm
<b>Rozlišení:</b>	0,1mm
<b>Výrobce:</b>	L.E.T. Optomechanika
<b>Identifikace:</b>	ID 1043287
<b>Specifikovaná přesnost:</b>	
<b>Použitý etalon:</b>	Werth Video-Check UA ID 1006427 MPE E1=0,35+L/900
<b>Metoda měření:</b>	Software Winwerth, objektiv se zvětšením 3x. Pravítko bylo vyrovnáno podle podélné hrany rysky. Měřicí místa jsou na levé straně rysek nad podélnou čarou.
<b>Podmínky měření:</b>	teplota vzduchu: $t_A = 20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
<b>Výsledek:</b>	Největší zjištěná chyba v celém rozsahu je 0,006mm
<b>Odborné doporučení:</b>	Dle specifikace zadavatele budou použity skutečně naměřené hodnoty
<b>Výsledek kalibrace:</b>	<b>Vyhovuje</b>

*Příloha 3 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x50*

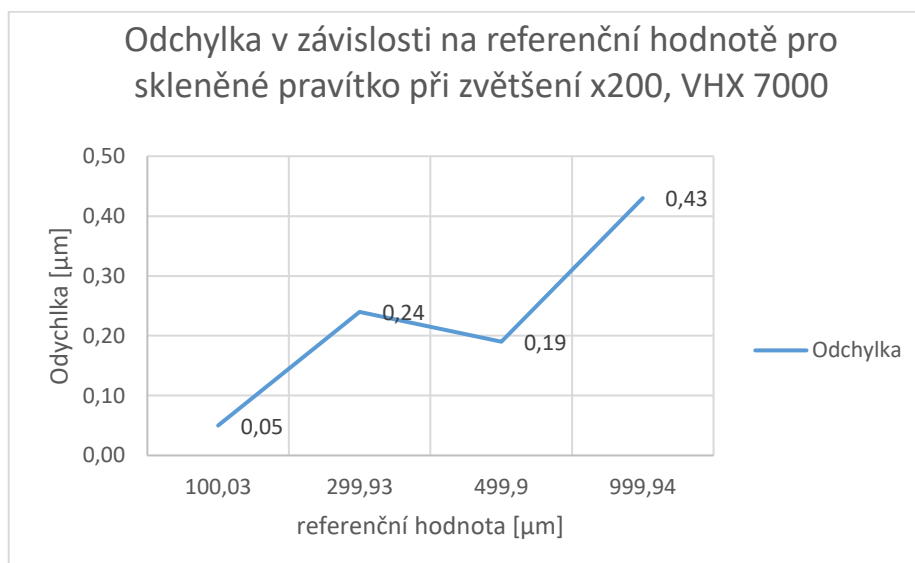
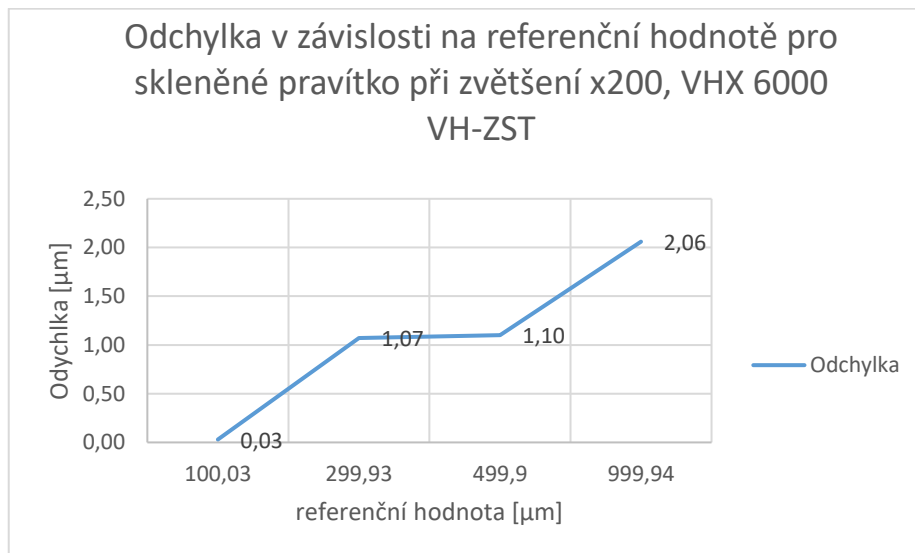
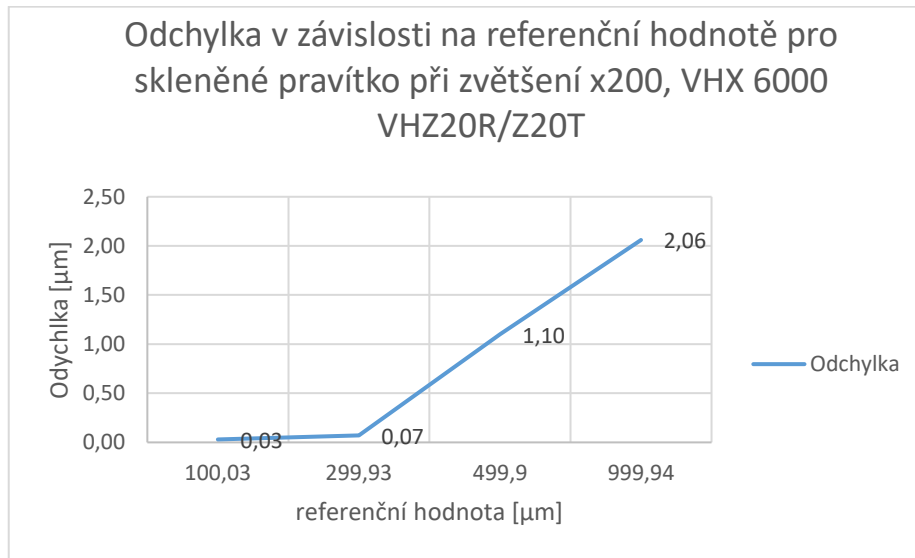




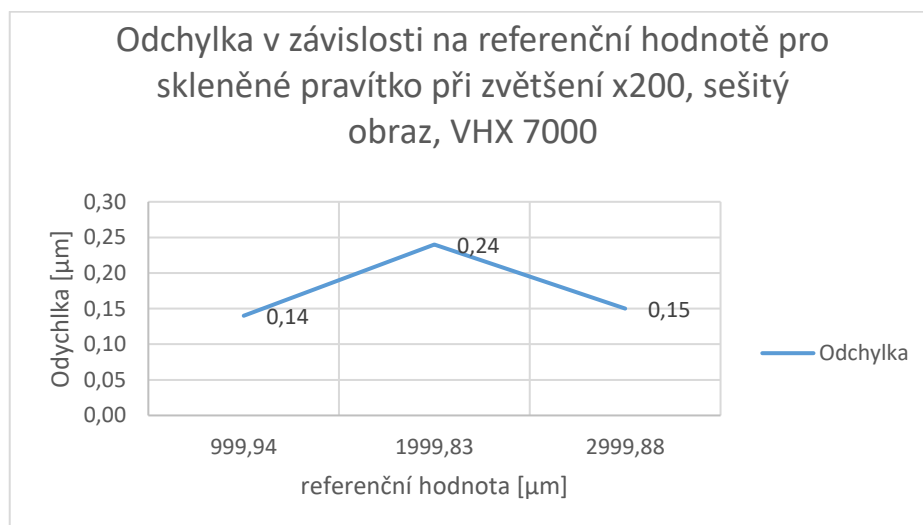
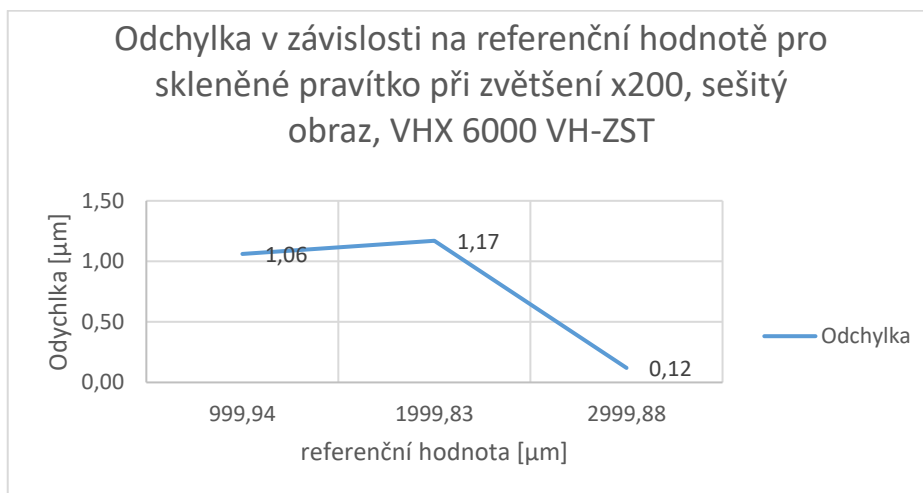
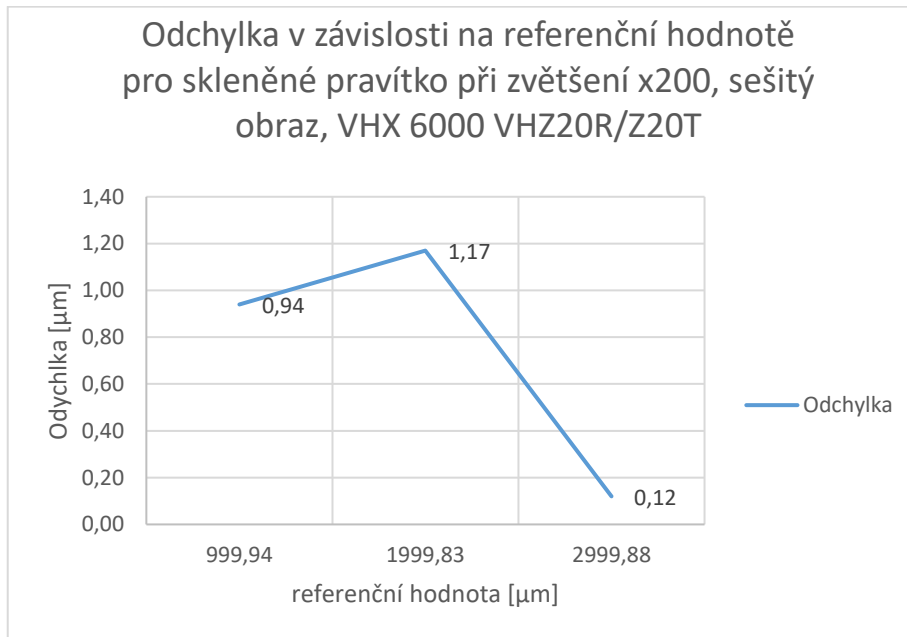
*Příloha 4 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x100*



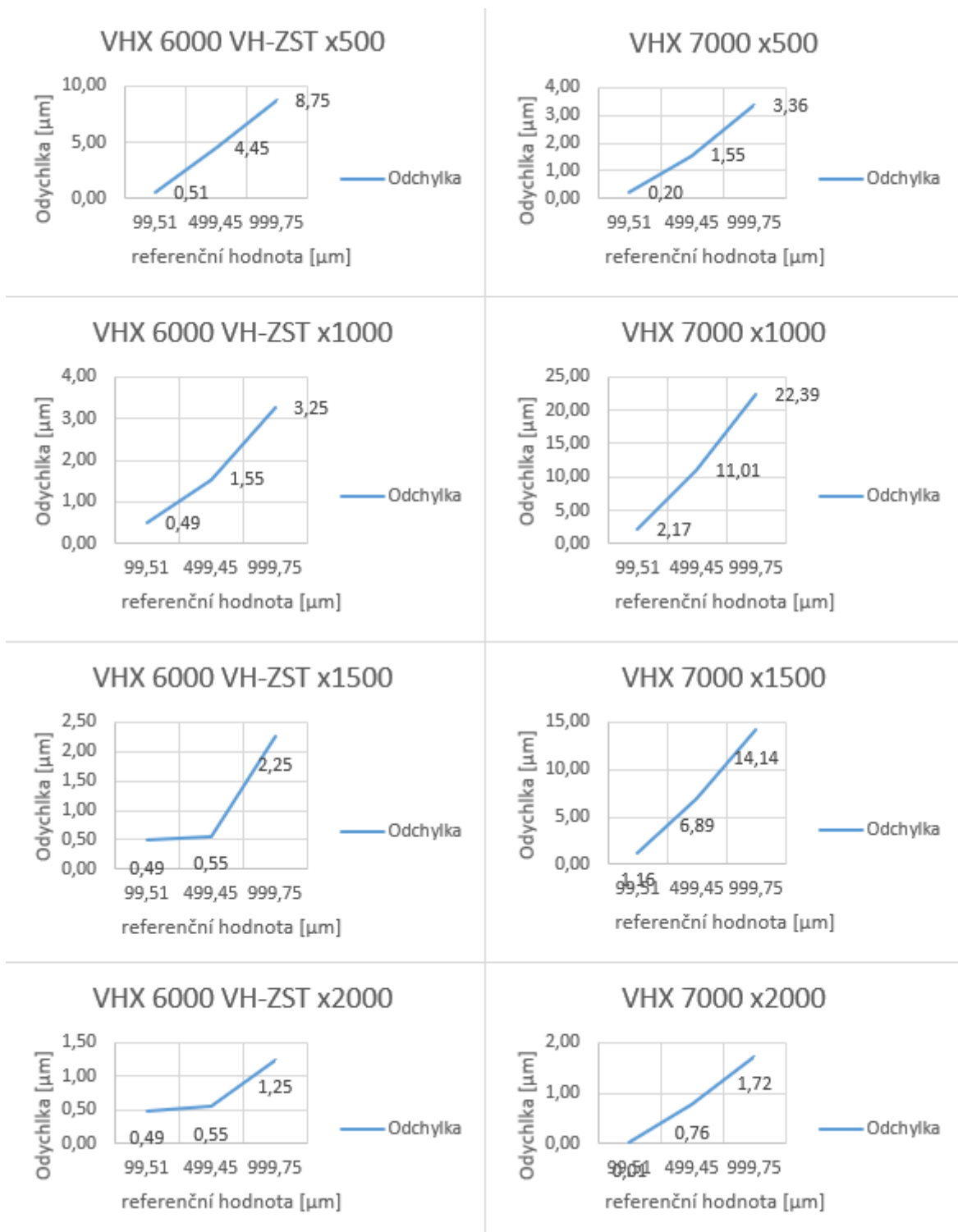
*Příloha 5 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x200*



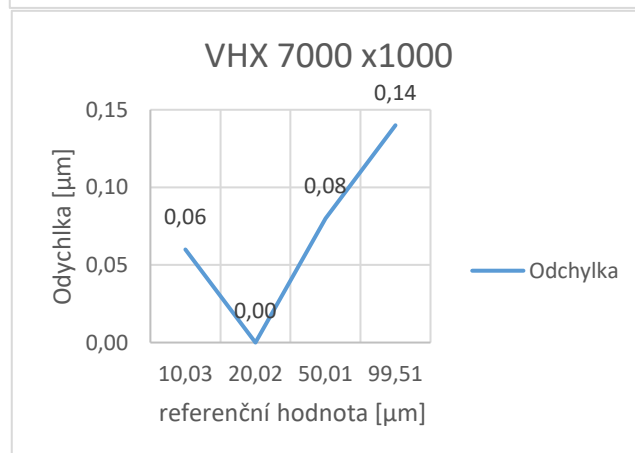
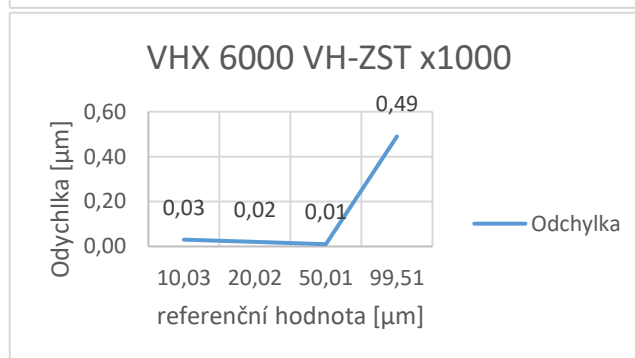
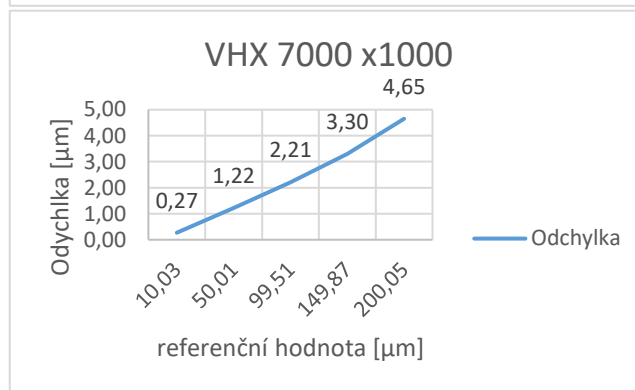
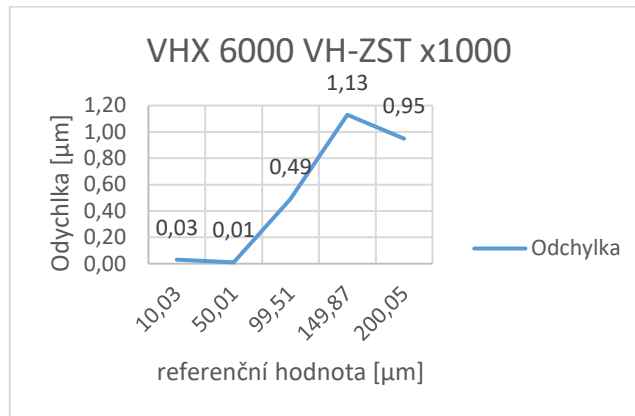
*Příloha 6 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro skleněné pravítko při zvětšení x200 na sešitém obraze*



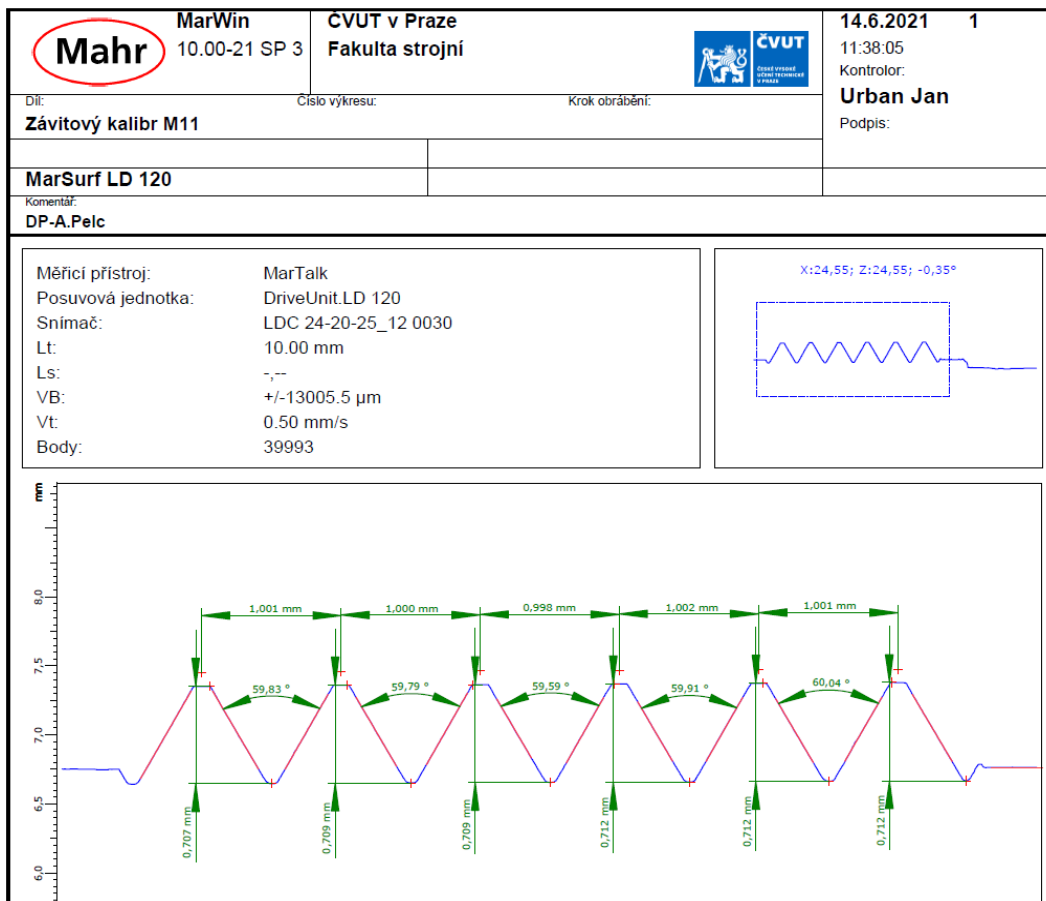
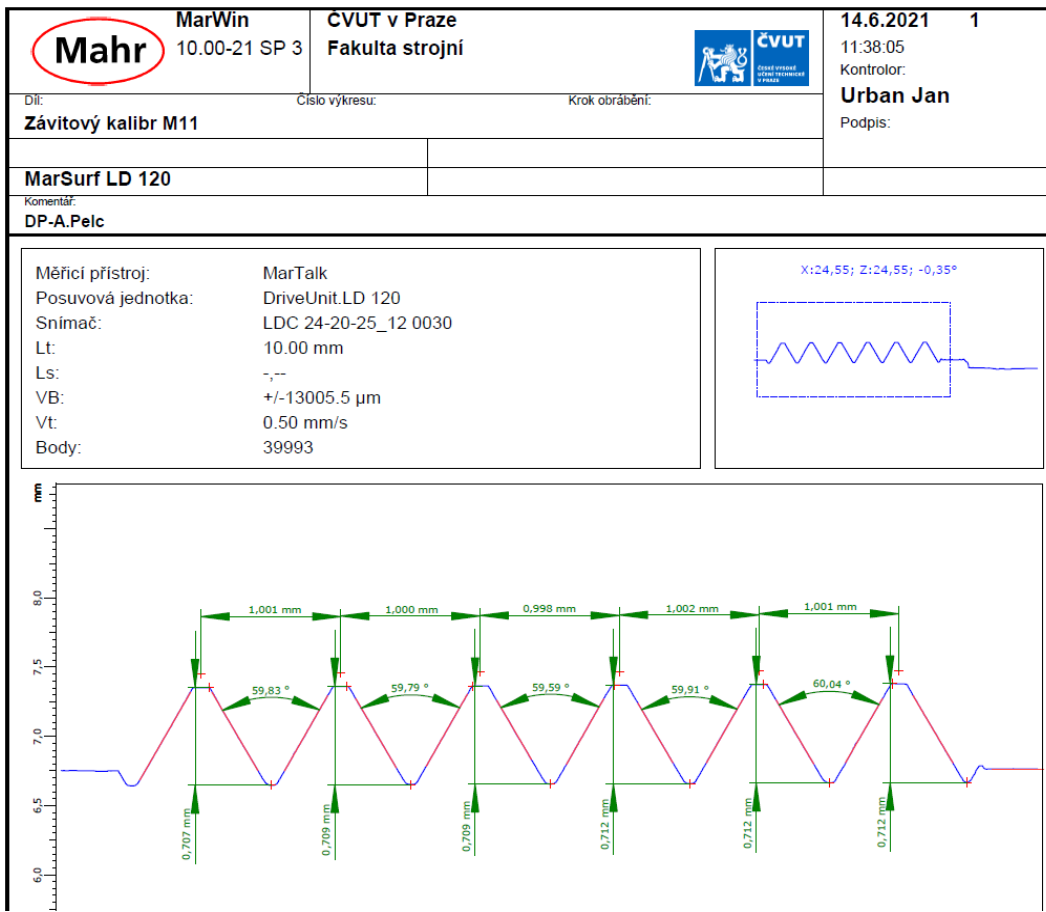
Příloha 7 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro pravítko Olympus při zvětšení x500, x1000, x1500 a x2000 na sešitém obraze



*Příloha 8 Grafické závislosti odchylek na referenčních hodnot pro pravítko Olympus při zvětšení x1000 a x2000*



*Příloha 9 Protokoly k závitovým kalibrům.*



*Příloha 10 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem  
VHX 6000 VH-ZST*

Závit M11 x 1 – 6h Keyence VHX 6000 - VH-ZST						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
	995	519	62	1012	527	64
	1022	498	66	1011	539	62
	987	471	66	1016	532	64
	992	498	65	998	545	66
		485			529	
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
	1002	510	65	1011	553	68
	1018	478	65	1011	561	71
	978	457	64	1016	555	61
	1005	487	67	992	557	59
		482			554	
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^{\circ}$ ]
	1000	498	67	1022	554	64
	988	479	64	1001	556	55
	980	475	64	997	552	63
	1009	502	67	1020	556	63
		510			538	

*Příloha 11 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M11 x 1 – 6h mikroskopem  
VHX 7000*

Závit M11 x 1 – 6h Keyence VHX 7000						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	1007,8	689,5	53,2	991,1	735,5	57,5
	1007,8	710,0	54,4	996,2	731,2	57,8
	982,8	701,8	54,0	1030,1	731,5	57,5
	1007,8	678,4	54,6	991,1	729,9	57,8
	694,3			734,8		
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	1001,6	658,9	52,2	982,8	714,7	57,8
	999,5	665,3	55,7	1007,5	714,5	58,4
	991,2	671,3	54,3	1014,7	720,1	58,1
	1005,8	672,8	53,8	974,6	718,9	58,4
	653,5			719,8		
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	1007,8	687,0	54,1	982,8	708,9	58,7
	999,5	665,7	55,4	1006,5	703,5	60,3
	982,9	696,0	53,5	1024,9	706,4	58,8
	1007,8	686,3	54,6	966,4	710,3	59,4
	676,4			711,4		



Příloha 12 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX  
6000 VHZ20R/Z20T

Závit M30 – 6h						
Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3558	2312	60	3566	2273	59,4
	3473	2353	58	3455	2319	59,2
	3484	2376	60	3542	2339	59,1
	3516	2391	59	3516	2354	59,2
	2420			2342		
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3530	2390	59	3542	2356	58,2
	3483	2389	58	3478	2384	59,0
	3442	2410	58	3517	2406	58,8
	3530	2387	58	3516	2405	58,6
	2392			2379		
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3499	2193	58	3517	2359	57,9
	3468	2197	58	3517	2374	58,6
	3502	2180	59	3504	2378	59,0
	3516	2169	56	3505	2375	58,6
	2183			2381		

Příloha 13 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX  
6000 VH-ZST



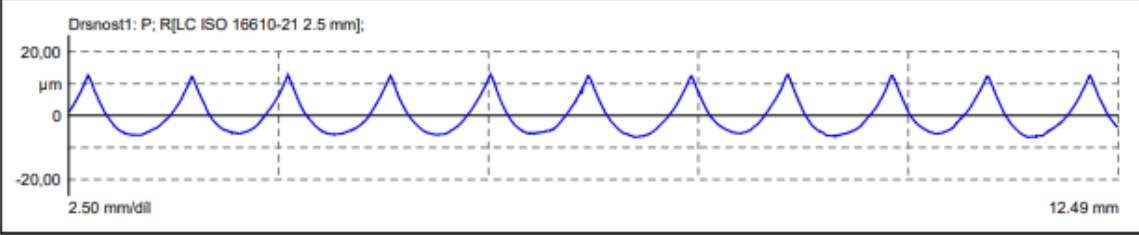
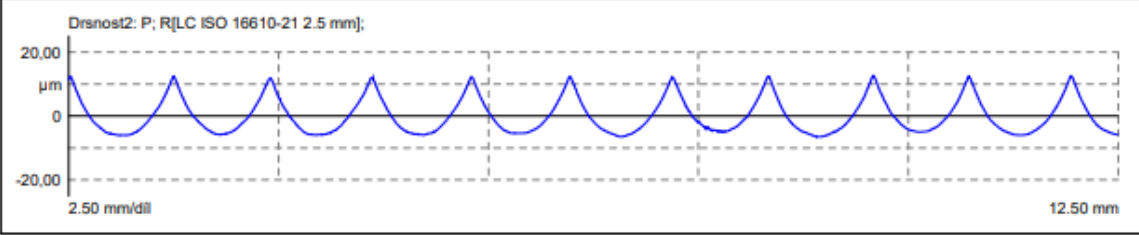

Závit M30 – 6h Keyence VHX 6000 - VH-ZST						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3522	1863	66	3532	1902	64
	3538	1894	61	3532	1927	60
	3536	1900	61	3547	1947	59
	3523	1907	63	3531	1967	61
		1907			1958	
65						
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3504	2027	66	3626	2026	65
	3540	2050	63	3547	2021	63
	3568	2070	63	3516	2021	63
	3552	2055	65	3516	2027	67
		2063			2015	
65						
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3613	2148	66	3591	2056	62
	3523	2160	61	3502	2059	58
	3537	2173	62	3548	2040	59
	3523	2166	65	3484	2020	63
		2142			1989	





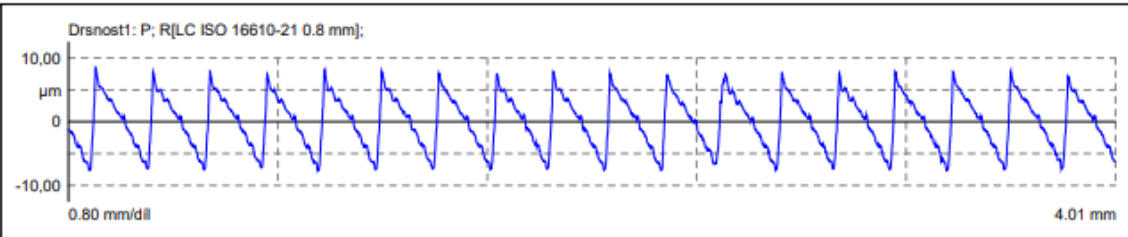
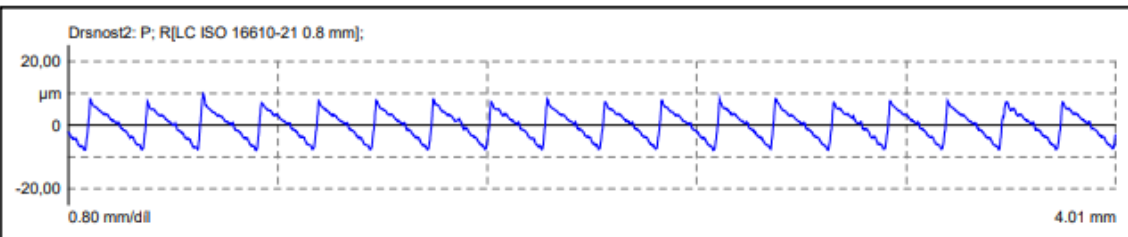
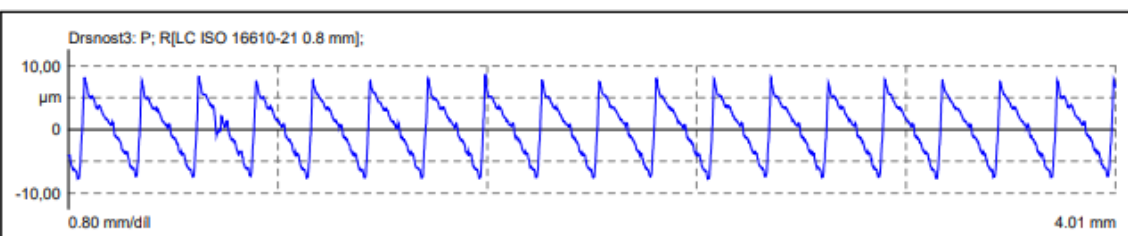
Příloha 14 Naměřené hodnoty při měření závitového kalibru M30 – 6h mikroskopem VHX  
7000

Závit M30 – 6h Keyence VHX7000						
Měření 1:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3494,7	2596,4	56,8	3496,8	2443,2	59,4
	3483,7	2618,0	56,4	3512,5	2442,0	59,5
	3512,4	2633,0	56,2	3473,1	2434,9	59,7
	3513,3	2643,4	55,9	3509,5	2431,6	59,7
		2589,8			2431,1	
Měření 2:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3481,8	2447,9	58,5	3509,4	2421,2	60,1
	3494,8	2453,4	58,8	3511,1	2422,4	60,1
	3495,1	2456,9	58,8	3479,6	2423,9	60,1
	3507,5	2462,4	60,2	3466,5	2419,3	60,1
		2471,8			2416,0	
Měření 3:	Zvětšení: x50			Zvětšení: x100		
	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu	Stoupání	Výška profilu	Úhel profilu
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $^\circ$ ]
	3488,3	2393,5	60,1	3493,6	2422,3	59,9
	3500,1	2392,6	60,2	3504,4	2421,3	59,8
	3463,5	2394,4	60,2	3475,2	2426,1	59,8
	3521,3	2391,7	59,9	3511,3	2425,6	59,8
		2403,0			2426,6	

## Příloha 15 Protokol z konturografu k soustruženému povrchu

	<b>MarWin</b> 10.00-21 SP 3	<b>ČVUT v Praze</b> Fakulta strojní		<b>3.6.2021</b> <b>1</b> 10:19:08 Kontrolor: <b>Pelc A.</b> Podpis:
	Díl: <b>Vzorek Ra3,2-RO</b>	Číslo výkresu:	Krok obrábění: <b>frézování</b>	
<b>MarSurf LD 120</b>		Komentář:		
Měřicí přístroj:    MarTalk Posuvová jednotka: DriveUnit.LD 120 Snímač:            LD A 14-10-2 1197		Lt:                    14.99 mm Ls:                    2.50 μm VB:                   +/-5998.0 μm Vt:                    0.50 mm/s Body:                29984		
Drsnost1: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];				
				
Drsnost2: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];				
				
Drsnost3: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];				
				
<b>Parametry drsnosti - Drsnost1: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];</b>				
Ra	4,820 μm	0,000		0,000
Rz	19,139 μm	0,000		0,000
R Sm	1186,333 μm	0,000		0,000
<b>Parametry drsnosti - Drsnost2: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];</b>				
Ra	4,676 μm	0,000		0,000
Rz	18,741 μm	0,000		0,000
R Sm	1187,722 μm	0,000		0,000
<b>Parametry drsnosti - Drsnost3: P; R[LC ISO 16610-21 2.5 mm];</b>				
Ra	4,410 μm	0,000		0,000
Rz	17,759 μm	0,000		0,000
R Sm	1186,722 μm	0,000		0,000

## Příloha 16 Protokol z konturografu k frézovanému povrchu

 <b>MarWin</b> 10.00-21 SP 3		<b>ČVUT v Praze</b> Fakulta strojní		 <b>3.6.2021 1</b> 10:26:24 Kontrolor: <b>Pelc A.</b> Podpis:	
Díl: <b>Vzorek Ra3,2</b>		Číslo výkresu:		Krok obrábění: <b>Soustružení</b>	
<b>MarSurf LD 120</b>		Komentář:			
Měřicí přístroj: MarTalk Posuvová jednotka: DriveUnit.LD 120 Snímač: LDA 14-10-2 1197			Lt: 4.81 mm Ls: 2.50 μm VB: +/-5998.0 μm Vt: 0.50 mm/s Body: 9622		
Drsnost1: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm]; 					
Drsnost2: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm]; 					
Drsnost3: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm]; 					
<b>Parametry drsnosti - Drsnost1: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm];</b>					
Ra	3,561 μm	0,000			0,000
Rz	15,749 μm	0,000			0,000
R Sm	219,029 μm	0,000			0,000
<b>Parametry drsnosti - Drsnost2: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm];</b>					
Ra	3,656 μm	0,000			0,000
Rz	16,203 μm	0,000			0,000
R Sm	219,029 μm	0,000			0,000
<b>Parametry drsnosti - Drsnost3: P; R[LC ISO 16610-21 0.8 mm];</b>					
Ra	3,615 μm	0,000			0,000
Rz	15,883 μm	0,000			0,000
R Sm	218,833 μm	0,000			0,000

*Příloha 17 Protokol o kalibraci skleněného etalonu drsnosti*

**GQM/24 - Speciální měření a metrologie  
Interní kalibrační místo 1**
**Protokol o kalibraci č.1019574/3**
**Datum kalibrace :** 29.08.2018

**Zadavatel :** GQM/24  
**Měřidlo :** Geometrický normál drsnosti  
**Identifikace:** v.č.3044721; ID 1019574  
**Použitý etalon :** Taylor Hobson Form Talysurf PGI 820  
 ID 306635(přístroj i snímač má ověřené parametry 1040/2017)  
**Metoda měření:** Kalibrační postup 1.1.26  
 Profil normálu byl měřen v 5-ti podélných řezech.  
 V každém řezu byla měřena tři místa.  
**Dráha snímače: 4,8mm filtr: Gauss**  
**Podmínky měření :** teplota vzduchu :  $t_A = 21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

**Výsledky :** Uvedené hodnoty jsou v mikrometrech a jsou  
 průměrem ze souboru patnácti měření.

parametr	jmenovitá hodnota ( $\mu\text{m}$ )	naměřená hodnota ( $\mu\text{m}$ )	nejistota kalibrace U
Ra	0,74	0,775	0,02036
Rz	-	1,640	0,02084
Rt	-	1,672	0,03653
Rmax	-	1,665	0,03300

Pro kontrolu drsnoměru je nutno použít naměřené hodnoty geometrického normálu drsnosti.

**Výsledek kalibrace :** **vyhovuje**

*Příloha 18 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000  
VHZ20R/Z20T*

<b>Měření drsnosti soustruženého povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>4,635</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	4,51	0,13
2	4,13	0,51
3	3,69	0,95
4	2,42	2,22
5	2,56	2,08
6	2,71	1,93
Průměr:	<b>3,34</b>	<b>1,30</b>
Nejvyšší zjištěná chyba:		<b>2,22</b>
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		<b>0,89</b>

*Příloha 19 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 6000  
VH – ZST*

<b>Měření drsnosti soustruženého povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 - VH-ZST</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>4,635</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	2,11	2,53
2	1,9	2,74
3	2,38	2,26
4	3,2	1,44
5	2,46	2,18
6	1,88	2,76
Průměr:	2,32	2,31
Nejvyšší zjištěná chyba:		2,76
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,49



*Příloha 20 Naměřené hodnoty drsnosti soustruženého povrchu mikroskopem VHX 7000*

<b>Měření drsnosti soustruženého povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 7000</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>4,635</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	1,83	2,81
2	1,69	2,95
3	1,64	3,00
4	1,65	2,99
5	1,48	3,16
6	1,61	3,03
Průměr:	1,65	2,99
Nejvyšší zjištěná chyba:		3,16
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,11



Příloha 21 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000  
VHZ20R/Z20T

Měření drsnosti frézovaného povrchu		
Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T		
Referenční hodnota Ra [ $\mu\text{m}$ ]:		3,611
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	2,49	1,12
2	3,86	0,25
3	2,56	1,05
4	3,08	0,53
5	3,11	0,50
6	2,2	1,41
Průměr:	2,88	0,81
Nejvyšší zjištěná chyba:		1,41
Výběrová směrodatná odchylka		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,60

*Příloha 22 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 6000  
VH – ZST*

<b>Měření drsnosti frézovaného povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 - VH-ZST</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>3,611</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	5,36	1,75
2	4,25	0,64
3	3,45	0,16
4	5,94	2,33
5	7,38	3,77
6	6,87	3,26
Průměr:	5,54	1,98
Nejvyšší zjištěná chyba:		3,77
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		1,51



*Příloha 23 Naměřené hodnoty drsnosti frézovaného povrchu mikroskopem VHX 7000*

<b>Měření drsnosti frézovaného povrchu</b>		
<b>Keyence VHX 7000</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>3,611</b>
<b>Měření</b>	<b>Hodnota</b>	<b>Odchylka</b>
	[ $\mu\text{m}$ ]	[ $\mu\text{m}$ ]
1	1,31	2,30
2	1,29	2,32
3	1,45	2,16
4	1,67	1,94
5	1,30	2,31
6	1,65	1,96
<b>Průměr:</b>	<b>1,45</b>	<b>2,17</b>
<b>Nejvyšší zjištěná chyba:</b>		<b>2,32</b>
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		<b>0,18</b>

*Příloha 24 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000  
VHZ20R/Z20T*

<b>Měření drsnosti skleněného etalonu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 VHZ20R/Z20T</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	14,3	13,53
2	12,98	12,21
3	11,26	10,49
Průměr:	12,85	12,07
Nejvyšší zjištěná chyba:		13,53
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		1,52

*Příloha 25 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 6000  
VH – ZST*

<b>Měření drsnosti skleněného etalonu</b>		
<b>Keyence VHX 6000 - VH-ZST</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	1,42	0,65
2	1,5	0,73
3	1,22	0,45
4	1,9	1,13
5	1,31	0,54
Průměr:	1,47	0,70
Nejvyšší zjištěná chyba:		1,13
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,26

*Příloha 26 Naměřené hodnoty drsnosti skleněného etalonu mikroskopem VHX 7000*

<b>Měření drsnosti skleněného etalonu</b>		
<b>Keyence VHX 7000</b>		
<b>Referenční hodnota Ra [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>		<b>0,775</b>
Měření	Hodnota [ $\mu\text{m}$ ]	Odchylka [ $\mu\text{m}$ ]
1	0,22	0,56
2	0,19	0,59
3	0,17	0,61
4	0,2	0,58
5	0,24	0,54
Průměr:	0,20	0,57
Nejvyšší zjištěná chyba:		0,61
<b>Výběrová směrodatná odchylka</b>		
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]		0,03