

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta strojní

Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie



Bakalářská práce

Konfokální mikroskopie

Confocal microscopy

Autor bakalářské práce:	Pavel Sommer
Vedoucí bakalářské práce:	Ing. BcA. Jan Podaný, Ph.D.
Datum obhajoby:	2022



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Sommer** Jméno: **Pavel** Osobní číslo: **495421**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávací katedra/ústav: **Ústav technologie obrábění, projektování a metrologie**
Studijní program: **Výroba a ekonomika ve strojírenství**
Studijní obor: **Technologie, materiály a ekonomika strojírenství**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Konfokální mikroskopie

Název bakalářské práce anglicky:

Confocal microscopy

Pokyny pro vypracování:

1. Mikroskopy a jejich principy.
2. Konfokální mikroskopy a jejich využití.
3. Návrh experimentu měření na konfokálním mikroskopu.
4. Zhodnocení naměřených výsledků.

Seznam doporučené literatury:

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. BcA. Jan Podaný, Ph.D. ústav technologie obrábění, projektování a metrologie FS

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

Datum zadání bakalářské práce: **15.03.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **29.07.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: _____

Ing. BcA. Jan Podaný, Ph.D.
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

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

Datum převzetí zadání

Podpis studenta

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma „Konfokální mikroskopie“ vypracoval samostatně a veškerou literaturu a další použité podklady jsem řádně uvedl a označil v příloženém seznamu.

V Praze dne: 20. 5. 2022

Pavel Sommer

Poděkování

Děkuji vedoucímu této bakalářské práce Ing. BcA. Janu Podanému, Ph.D. za jeho profesionální přístup, odborné vedení, cenné rady a v neposlední řadě za jeho čas. Dále bych chtěl poděkovat rodině za jejich podporu během celé etapy bakalářského studia.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je ze souboru dat naměřeného na snímkách vzorků A – D vyhodnotit parametry drsnosti povrchu získané profilovým a plošným způsobem. Tyto způsoby následně porovnat a zjistit, zda záleží na volbě metody. Druhým cílem je zjistit vliv velikosti plochy, ze které jsou zaznamenávány hodnoty, na plošné parametry drsnosti. Posledním cílem je vyhodnotit plošné parametry při použití různých velikostí filtru λ_c a zanalyzovat vliv tohoto filtru. Všechny části experimentu probíhaly na konfokálním mikroskopu LEXT OLS 3000 od společnosti Olympus. Relativní rozdíly mezi plošnými a profilovými parametry se pohybují v nezanedbatelných hodnotách, v maximálním případě 43,2 % od průměrné hodnoty u parametru největší výšky výstupku R_p (S_p). V případě vlivu velikosti plochy na plošné parametry se odchylka maximálně ovlivněného parametru od průměrné hodnoty rovná 6,6 %, a to rovněž u parametru největší výšky výstupku S_p . Velikost filtru λ_c se stejně jako u předchozí analýzy pohybuje v zanedbatelných číslech, a proto není tak důležité jakou hodnotu filtru λ_c si uživatel mikroskopu zvolí. Nejvíce ovlivněným parametrem je v tomto případě průměrná aritmetická úchylka S_a o hodnotě odchylky 5,7 % od průměrné hodnoty měření.

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to evaluate the surface roughness parameters obtained by profile and area method from the data set measured on the A - D sample images. These methods are then compared, and it is decided whether the choice of the method matters in the measurement. The second goal is to determine the effect of the area, from which the values are recorded, on the area roughness parameters. The last goal is to evaluate flat parameters using different filter sizes and analyze the effect of this filter. All parts of the experiment were conducted on the LEXT OLS 3000 confocal microscope by Olympus. The relative differences between area and profile parameters range in non-negligible values, with a maximum difference being 43.2 % from the average value for the maximum peak height parameter R_p (S_p). In the case of the effect of area size on area parameters, the deviation of the maximum affected parameter from the mean value is equal to 6.6 % for the maximum peak height parameter S_p . Similar to the previous analysis, the filter's size is in negligible numbers, which is why it is not that important, which the filter's value is chosen by the microscope user. The most affected parameter in this case is the roughness average parameter S_a with a deviation of 5.7 % from the average measurement value.

Klíčová slova

konfokální mikroskopie, drsnost povrchu, optika, parametry drsnosti

Key words

confocal microscopy, surface roughness, optics, roughness parameters

Obsah

Úvod	9
1 Optika v mikroskopii	10
1.1 Základní principy optiky	10
1.1.1 Světlo	10
1.1.2 Odraz a lom světla	10
1.1.3 Difrakce světla	11
1.2 Mikroskopie	12
1.2.1 Světelný mikroskop	13
1.2.2 Elektronový mikroskop.....	15
1.2.3 Fluorescenční mikroskopie	16
2 Konfokální mikroskopie	18
2.1 Princip konfokálního mikroskopu.....	18
2.2 Praktické využití.....	19
2.3 Výhody a nevýhody KM	20
3 Aplikace konfokálního mikroskopu	21
3.1 Praktické studie	21
4 Drsnost povrchu.....	23
4.1 Kontaktní měření drsnosti povrchu	24
4.2 Bezkontaktní měření drsnosti povrchu.....	24
4.3 Parametry povrchu	25
4.3.1 Výškové parametry drsnosti.....	26
4.3.2 Plošné parametry drsnosti	28
5 Experiment.....	30
5.1 Analýza profilových a plošných parametrů	30
5.2 Analýza plošných parametrů v závislosti na velikosti plochy	32
5.3 Analýza vlivu filtru λ_c na plošné parametry drsnosti.....	34

5.4	Diskuze výsledků provedených analýz	35
	Závěr	37
	Použitá literatura	38
	Seznam obrázků a tabulek	41
	Příloha 1	42
	Příloha 2	48
	Příloha 3	50

Úvod

Konfokální mikroskopie je optická zobrazovací technika, která zvyšuje optické rozlišení a kontrast zkoumaného vzorku. Použitím bodových clon neboli pinholes se docílí dostatečného optického rozlišení, které brání rozostření světla při tvorbě obrazu. Jedním ze základních konceptů konfokální mikroskopie a jedna z jejích největších výhod je rekonstrukce trojrozměrných struktur zachycením četných dvourozměrných obrazů v různých hloubkách ve vzorku.

Cílem práce je ze souboru dat získaného měřením na konfokálním mikroskopu LEXT OLS 3000 od společnosti Olympus zjistit míru odlišnosti parametrů získaných profilovým měřením proti parametrům vyhodnocovaným z plochy. Z velikosti odchylky následně vyvodit, zda se jedná o zanedbatelnou hodnotu, či nikoliv. Druhým vytyčeným cílem je analýza vlivu velikosti použité plochy při měření plošných parametrů a zjištění míry ovlivnění těchto parametrů. V třetí části experimentu je cíl podobný cíli z druhé části s tím rozdílem, že ovlivňujícím faktorem je velikost filtru λ_c na plošné parametry drsnosti povrchu.

Práce bude rozdělena do pěti hlavních kapitol. V první kapitole se budu zabírat optikou v mikroskopii, která je nezbytně nutná jako úvod do problematiky tohoto typu. V první části této kapitoly budu věnovat pozornost základním principům optiky, jako jsou definice světla, odraz a lom světla nebo difrakce světla, která ovlivňuje pozorování zejména při velkých zvětšeních. Druhá část bude věnována vývoji mikroskopie jako takové s tím, že se dále zaměřím i na různé druhy mikroskopů, hlavně jejich principy a využití. Druhá kapitola bude věnována konfokální mikroskopii, jejím výhodám a nevýhodám a principu konfokálního mikroskopu. Další kapitola bude o aplikaci konfokálního mikroskopu v praxi, kde se budu zabývat praktickým využitím tohoto mikroskopu na základě již provedených studií. Při sepisování této kapitoly budou použity zejména vědecké publikace z portálů jako je Web of Science, Google Scholar nebo ProQuest. Předposlední kapitola bude využita speciálně pro přípravu experimentu, v níž budu definovat parametry drsnosti potřebných pro provedení experimentu dle normy ČSN EN ISO 4287.

Poslední kapitola bude obsahovat analýzy jednotlivých částí experimentu s tím, že k vyhodnocení výsledků bude využit výstup z jednotlivých měření konfokálním mikroskopem. Jako nástroje pro demonstraci výsledků bude použita absolutní a relativní odchylka od průměrných hodnot dílčích měření.

1 Optika v mikroskopii

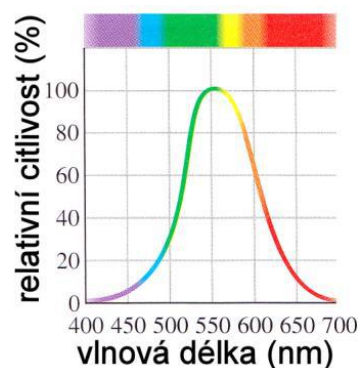
„Optická mikroskopie je rozsáhlý obor, který zahrnuje jak teorii a konstrukci samotných přístrojů, tak aplikace mikroskopických metod, sahající od biologie a medicíny přes chemii, mineralogii, metalurgii a jiné technologické aplikace až ke kriminalistice a restaurování uměleckých děl.“ (Plášek 1996)

Abychom pochopili tvorbu obrazu v mikroskopii a dalších dějů při pozorování preparátů, je zapotřebí si definovat některé ze základních principů optiky, ať už jde o šíření světla nebo jeho chování. Od těchto principů se odráží celá problematika mikroskopie.

1.1 Základní principy optiky

1.1.1 Světlo

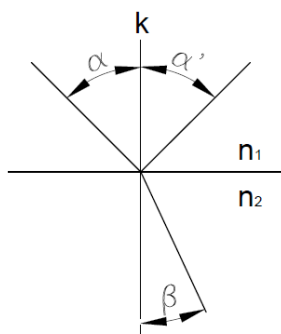
Viditelné světlo je elektromagnetické vlnění, které je naše oko schopné pozorovat. Lidské oko je však citlivé na jiné hodnoty elektromagnetického vlnění, proto jsme schopni rozlišit různé barvy viditelného spektra, které je znázorněno na obrázku 1. Z obrázku 1 je patrné, že oko vnímá nejlépe vlnovou délku o hodnotě zhruba 550 nm, ve které vidíme zelenou barvu. Viditelné spektrum nemá přesně definované hranice. Pokud však připustíme minimální relativní citlivost 1 %, tak se oblast vlnových délek ohraničí od hodnoty okolo 430 nm, kde vidíme fialové světlo, až po hodnotu 690 nm, kterou oko vyhodnocuje jako červenou barvu. (Halliday, Resnick, Walker 2000)



Obrázek 1: Graf relativní citlivosti oka na vlnové délce (Halliday, Resnick, Walker 2000)

1.1.2 Odraz a lom světla

Jestliže světelný paprsek dopadá na rozhraní dvou prostředí s odlišnými optickými vlastnostmi, světlo se na rozhraní částečně odrazí a částečně se láme do druhého prostředí.



Obrázek 2: Schéma šíření paprsků po dopadu na rozhraní dvou prostředí

ZÁKON ODRAZU SVĚTLA: Úhel dopadu α dopadajícího světelného paprsku na rozhraní dvou prostředí, který svírá společně s kolmicí dopadu k , je roven úhlu odrazu α' od tohoto rozhraní.

$$\alpha = \alpha' \quad (1.1)$$

Zdroj: (Halliday, Resnick, Walker 2000)

ZÁKON LOMU SVĚTLA: Situace, kdy paprsek světla přechází z opticky řidšího prostředí n_1 do prostředí hustšího n_2 , nastává lom světla ke kolmici tzn. úhel $\beta < \alpha$. Pokud bude situace opačná, tak nastává lom světla od kolmice, tzn. úhel $\beta > \alpha$.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_1}{n_2} \quad (1.2)$$

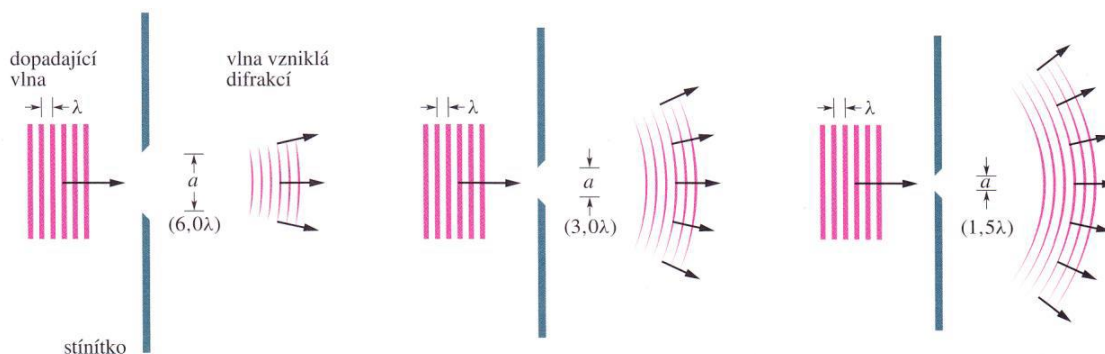
Zdroj: (Halliday, Resnick, Walker 2000)

1.1.3 Difrakce světla

Difrakci světla lze vysvětlit s pomocí vlnové teorie světla, která byla vytvořena Christianem Huygensem. Tato teorie neměla zprvu ve vědecké komunitě příliš velký úspěch a byla přijímána velmi pozvolna, jelikož byla přímým opakem teorie od uznávaného matematika a fyzika Isaaca Newtona, dle níž je světlo tvořeno proudem částic. Vývoj těchto protichůdných názorů o světle přinesl sám o sobě velmi zajímavý příběh. Po jejich smrti se v 19. století na scénu vědecké společnosti dostal mladý inženýr Augustin Fresnel. On sám věřil Huygensově vlnové teorii, na jejímž základě vypracoval práci o vlnové teorii, za kterou dokonce obdržel cenu v soutěži pořádanou francouzskou akademií věd v oblasti pojednávání o difrakci. I nadále však byla Newtonovými žáky vlnová teorie světla zpochybňována. Jedním

z nich byl například i slavný matematik Siméon Denis Poisson. (Halliday, Resnick, Walker 2000)

Na obrázku 3 si můžeme všimnout faktu, že k difrakci světla, neboli k jeho ohybu dochází tím více, čím je štěrbina stínítka, na které dopadá světlo o vlnové délce λ , užší. Zjednodušeně, pokud se velikost průměru štěrbiny bude přibližovat vlnové délce, tak difrakce dopadajícího světla bude větší.



Obrázek 3: Velikost difrakce světla v závislosti na průměru štěrbiny (Halliday, Resnick, Walker 2000)

Tato skutečnost je velmi důležitá zejména při pozorování vzorků pod mikroskopem při velkém zvětšení. To je problém, který nastává při sledování miniaturních struktur, u nichž se difrakce světla projevuje velmi výrazně. Pokud se bude i nadále předmět zvětšovat, obraz bude ovlivněn působením difrakčního jevu a jeho kvalita bude horší.

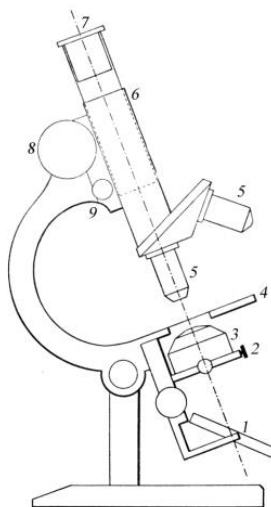
1.2 Mikroskopie

Mikroskop je optický přístroj, pomocí kterého jsme schopni sledovat velmi malé objekty. Ke zvětšování vzorků využívá čočky známé již tisíce let. První funkční mikroskop sestavil v 16. století holandský optik Hans Janssen společně se svým synem Zachariasem. Jejich zápal pro věc při prováděných pokusech je zavedl až k otázce: Jak by ovlivnilo pozorování použití dvou čoček namísto jedné? Ke konci 16. století sestavili první mikroskop, jenž se skládal ze dvou čoček. Zvětšení tohoto mikroskopu bylo oproti mikroskopu s jednou čočkou obrovské. Začátkem 17. století se italský badatel a matematik Galileo Galilei pokusil tento mikroskop vylepšit a povedlo se mu, nicméně nešlo o žádný průlomový objev. S dnešními mikroskopy se kvalita obrazu a zvětšení těchto jednoduchých přístrojů nedá vůbec srovnávat, avšak se lidem v této době otevřely další možnosti. Výrazné posunutí se konalo až v 17. století, kdy britský fyzik Robert Hook změnil při pozorování způsob osvětlování vzorků. Tím, že sledoval vzorky v prostředí s vyšším indexem lomu, zapříčinilo to, že byl najednou schopen pozorovat objekty až se stonásobným zvětšením. Dalším z významných postav, podepsaných pod zdokonalování

mikroskopu, byl holandský přírodovědec a obchodník s textilem Antoine van Leeuwenhoek. S lupami pracoval zejména při kontrole kvality textilních oděvů. Používal u toho kulovitou, pečlivě vybroušenou čočku jako objektiv. Jeho mikroskop měl pouze jednu čočku, která ovšem dokázala zvětšit obraz téměř 300x, a tak jako první pozoroval krevní buňky. Při zkoumání dešťové kapky objevil, že se v ní vyskytuje mnoho různých mikroorganismů. V 19. století dostal mikroskop téměř dnešní podobu a začala jeho komerční výroba. (Lednický 2009)

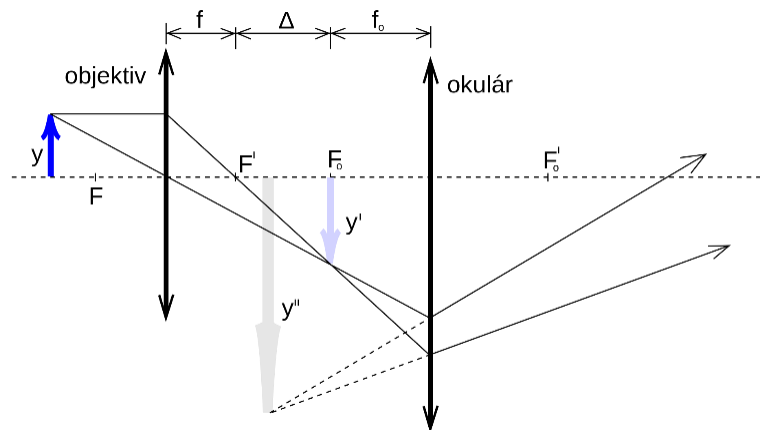
1.2.1 Světelný mikroskop

Světelný mikroskop, jak již bylo zmíněno, je optický přístroj, pomocí kterého jsme schopni sledovat velmi malé objekty. Skládá se ze tří základních částí, a to z osvětlovací soustavy, zobrazovací soustavy a mechanického zařízení. Preparát je osvětlován viditelným světlem, které jím prochází. Světlo je zpracováváno v zobrazovací soustavě a výstupem z něho je neskutečný obraz, který pozorujeme. Osvětlovací soustava je tvořena světelným zdrojem, filtry, irisovou clonkou a v neposlední řadě kondenzorem, který tvoří soustava čoček. Tyto čočky soustřeďují světlo procházející preparátem tak, aby bylo možné využít maximálního aperturního úhlu (úhlu odklonu paprsků od optické osy). Objektiv a okulár společně tvoří zobrazovací část. Jde o soustavu čoček, které jsou navzájem spojeny tubusem pro zajištění správné vzdálenosti mezi nimi. Další funkcí tubusu je oddělení čoček od okolního prostředí. Zobrazovací část tvoří ještě polarizační zařízení nebo dělič paprsků, který má za úkol rozdělit konkrétní paprsek takovým způsobem, aby šel do obou očí pozorovatele. Mechanická část se skládá ze stativu, stolku, nosiče tubusu, hlavice a z mikro-a makrometrického šroubu. (Lednický 2009)



Obrázek 4: Jednoduchý světelný mikroskop: 1) zdroj světla, 2) clona, 3) kondenzor, 4) stolek, 5) objektivy, 6) tubus, 7) okulár, 8) makrometrický šroub, 9) mikrometrický šroub (Lednický 2009)

Princip světelného mikroskopu je vysvětlen na obrázku 5. Ohnisko objektivu (F), před které umístíme pozorovaný předmět (y), vytvoří skutečný, převrácený a zvětšený obraz. Tento obraz bude ležet v předměťovém ohnisku (F_0) a stane se tím pádem předmětem (y') pro okulár. Okulár už jen předmět zvětší jako lupa a výsledkem bude neskutečný, převrácený a zvětšený obraz (y''). (Malý 2013)



Obrázek 5: Princip zobrazení světelného mikroskopu (Ryzí 2016)

Na výsledný obraz má vliv několik záležitostí. Jednou z nich je volba objektivu, která se odvíjí od toho, jaký požadujeme výstup. Každá vlastnost má na obraz jiný vliv, ať už jde například o ohniskovou vzdálenost, nebo o celkové zvětšení mikroskopu.

Ekvivalentní ohnisková vzdálenost vznikne spojením objektivu a okuláru v jedinou čočku, což způsobuje, že vzorek, který pozorujeme, pozorujeme skrz lupu o ohniskové vzdálenosti f' , jejíž výpočet lze provést pomocí rovnice (1.3).

$$f' = \frac{f_1' * f_2'}{\Delta} \quad (1.3)$$

Zdroj: (Otěpková 2021)

Kde: f' je ekvivalentní ohnisková vzdálenost [m]

f_1' je obrazová ohnisková vzdálenost objektivu [m]

f_2' je obrazová ohnisková vzdálenost okuláru [m]

Δ je optický interval mikroskopu vyjadřující vzdálenost ohnisek mezi sebou [m]

Zvětšení světelného mikroskopu je dáno součinem zvětšení objektivu (Z_{ob}) a okuláru (Z_{ok}) viz rovnice (1.4).

$$Z = Z_{ob} * Z_{ok} = \frac{\Delta * 250}{f_{ob} * f_{ok}} \quad (1.4)$$

Zdroj: (Otépková 2021)

Kde: Z je celkové zvětšení mikroskopu [-]

Δ je optický interval mikroskopu vyjadřující vzdálenost ohnisek mezi sebou [mm]

f_{ob} je ohnisková vzdálenost objektivu [mm]

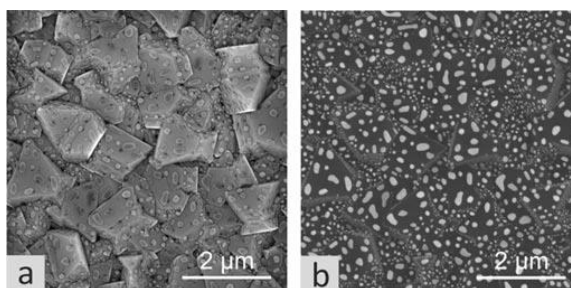
f_{ok} je ohnisková vzdálenost okuláru [mm]

250 je konvenční zraková vzdálenost lidského oka [mm]

1.2.2 Elektronový mikroskop

Elektronové a světelné mikroskopy si jsou v mnoha ohledech velmi podobné. Zásadní rozdíl mezi těmito mikroskopy je v tom, že zvětšený obraz sledovaného vzorku u elektronového mikroskopu vzniká na základě jeho interakce s elektronovým svazkem (proudem elektronů), zatímco u světelného obraz interaguje se svazkem světelným (proudem fotonů). Dalším rozdílem je, že skleněné čočky používané u světelných mikroskopů jsou u elektronových nahrazeny čočkami elektromagnetickými, což jsou cívky, u nichž lze změnou elektrického proudu regulovat jejich zvětšovací schopnost. Také elektronové mikroskopy dosahují až o tři řády vyššího rozlišení, než je tomu u mikroskopů světelných. (Hájková et al. 2018)

Použití elektronových mikroskopů jako prostředku pro zkoumání struktur látek nachází uplatnění v různých oborech. Například ve fyzice, kde se zkoumají struktury kovů, slitin, polovodičů nebo tenkých vrstev a jejich defektů, dále se pak ve fyzikální chemii studují mikro- a nanočástice nebo micely. V oboru anorganické a analytické chemie se jimi provádí ku příkladu prvková mikroanalýza materiálů. Elektronové mikroskopy využívá rovněž obor geologie, a to zejména pro studium struktury, analýzu a identifikaci minerálů. Stejně tak v oblasti materiálového inženýrství je tento druh mikroskopu nezbytný pro analýzu mikrostruktury a pórovitosti sledovaných materiálů. Těmito obory to však zdaleka nekončí, jelikož elektronové mikroskopy se používají také v kriminalistice, archeologii či medicíně jako prostředek pro diagnostiku virů. Za zmínku také stojí, že u nejmodernějších elektronových mikroskopů lze s pomocí speciálních metod zobrazení zviditelnit třírozměrné struktury vzorků nebo pozorovat vzorky při nízkých teplotách, či dokonce vzorky zmražené. (Hájková et al. 2018)



Obrázek 6: Ukázka výstupu z elektronového mikroskopu: a) topografie, b) materiálový kontrast (Hájková et al. 2018)

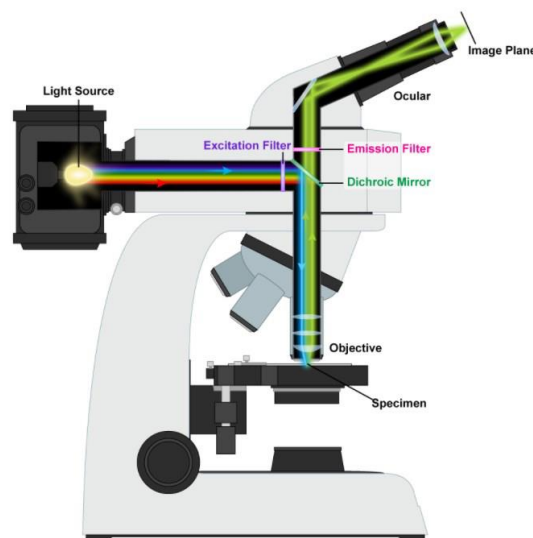
Jedním z elektronových mikroskopů je skenovací elektronový mikroskop (SEM). SEM využívá elektromagnetických cívek, které bodově zaostřují úzký svazek elektronů na vzorek. Jeho povrch je následně rastrován bod po bodu za pomoci skenovacích cívek. U SEM na rozdíl od jiných elektronových mikroskopů zpravidla neprocházejí elektrony vzorkem. Elektrony interagují s povrchem preparátu a vhodným detektorem je výsledek této interakce v každém bodě zaznamenán. Ve většině případech jsou mikroskopem detekovány sekundární elektrony, jež jsou dopadajícími primárními elektrony vyráženy z atomů na povrchu vzorku. Aby se zabránilo vlivu atmosféry na elektrony, pracuje SEM (stejně jako ostatní elektronové mikroskopy) s vysokým vakuem. Řídící počítač elektronicky zpracovává signál, ze kterého bod po bodu sestavuje finální obraz. (Hájková et al. 2018)

1.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Jednou z nejpoužívanějších kontrastních technik je v této době fluorescence. Tato technika se využívá hlavně v biologickém odvětví a vyžaduje použití takzvaných fluorochromů neboli fluoroforů, které pohlcují světlo v jednom rozsahu vlnových délek a posunou ho na delší vlnovou délku, tedy reemitují s nižší energií. První barviva používaná ve fluorescenční mikroskopii byla převzata ze sbírky používaných skvrn pro barvení tkanin. Dnes už je k dispozici velké množství různých barviv vyrobených přímo pro výzkum, které dokážeme absorbovat z UV oblasti do téměř infračervené. Vývoj fluoroforů pokračuje kupředu a získáváme další a další s novými, charakteristickými vlastnostmi. Kubitschek (2013) ve své publikaci uvádí, že použití fluorescenčně zbarvených protilátek mělo vliv na růst biologických aplikací, a to následovně: „*Použití fluorescenčně zbarvených protilátek a zavedení různých fluorescenčních heterocyklických sond syntetizovaných pro specifické biologické aplikace přineslo nebyvalý růst biologických aplikací fluorescenční mikroskopie. Zavedení fluorescenčních proteinů vyvolalo novou revoluci v mikroskopii, přispělo k rozvoji nepřeborného množství nových mikroskopických technik a umožnilo nedávný obrovský růst optické mikroskopie a nový vývoj v buněčné biologii.*“ V roce 2008 byl japonský vědec Osamu

Shimomura a další dva američtí vědci Martin Chalfie a Robert Y. Tsien ocenění Nobelovou cenou za objev a vývoj zeleného fluorescenčního proteinu u medúzy *Aequorea victoria*. Zajímavostí tohoto proteinu je, že při vystavení modrému světlu fluoreskuje zeleně. (Kubitscheck 2013)

Všechny fluorescenční mikroskopy jsou složeny z několika částí, které zůstávají pořád stejné, jsou jimi: zdroj excitačního záření, zobrazovací zařízení, dichromatická zrcadla a detektor emisního záření. Ukázka fluorescenčního mikroskopu s jednotlivými částí je na obrázku 7.



Obrázek 7: Schéma fluorescenčního mikroskopu (Otépková 2021)

Hlavním principem fluorescenčního mikroskopu je, že paprsek ze zdroje dopadá na dichromatické zrcadlo fungující jako dělič paprsků, odrážející úzký interval o konkrétní vlnové délce, a zbytek spektra propouští. Zaostření paprsku na vzorek a jeho průchod do objektivu je taktéž způsoben dopadem paprsku na dichromatické zrcadlo. Zrcadlem propuštěnému záření se říká emisní záření. Toto záření prochází zrcadlem z důvodu delší vlnové délky, než jakou má záření excitační. Následně putuje do druhého dichromatického zrcátka skrz bariéru, jejímž úkolem je zabránit excitačnímu záření dopadnout na detektory. Funkcí druhého zrcátka je rozdělit vyzářené fotony podle vlnové délky budicího laseru. Záznam vzorku je v počítači zpracováván digitálně a zobrazován v reálném čase. (Lakowicz, Masters 2008)

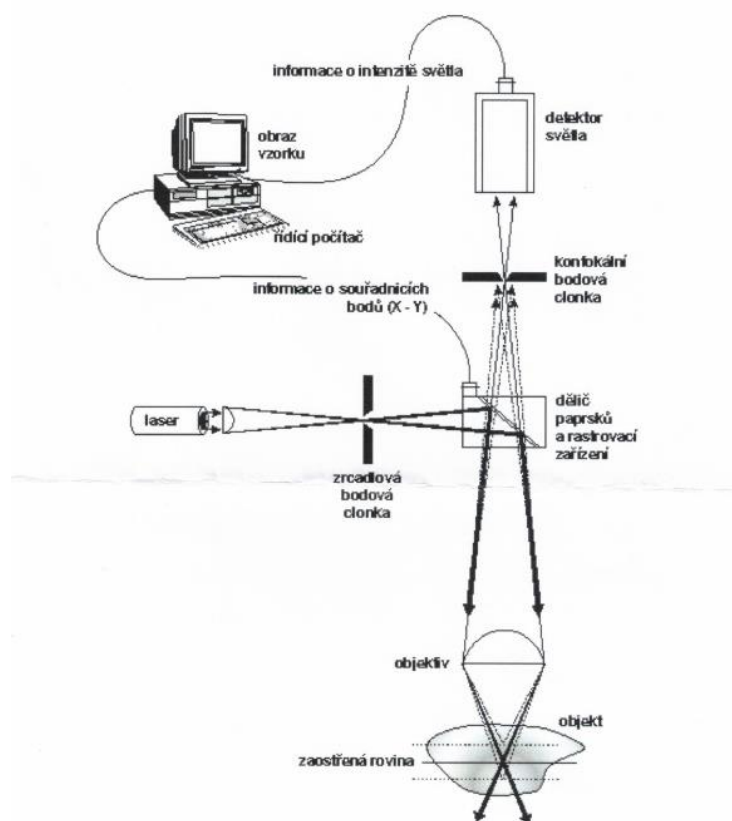
2 Konfokální mikroskopie

U sledování silně transparentních vzorků, jakými jsou například tkáňové řezy nebo velké buňky, nelze prakticky plně využít teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu. Zhoršená rozlišovací schopnost je důsledkem překrývání se zaostřeného sledovaného vzorku s rozmazanými okolními obrazy struktur, nacházejícími se mimo zaostřenou rovinu. Tento jev, který je obzvláště nepříjemný při pozorování fluorescenční mikroskopii, lze eliminovat pomocí konfokální mikroskopie. (Plášek 1996)

Konfokální mikroskopie, rovněž známá jako Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) nebo Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), je definována jako optická zobrazovací technika, která zvyšuje optické rozlišení a kontrast zkoumaného vzorku. Optické rozlišení je zvýšeno použitím bodových clon neboli pinholes tak, aby se zabránilo rozostření světla při tvorbě obrazu. Základním konceptem konfokální mikroskopie je rekonstrukce trojrozměrných struktur zachycením četných dvourozměrných obrazů v různých hloubkách ve vzorku. (Jerome, Price 2018)

2.1 Princip konfokálního mikroskopu

Princip konfokálního mikroskopu zobrazuje Obrázek 8. Sledovaný vzorek je osvětlen bodovým zdrojem světla. Nejčastějším typem tohoto světla je laserový paprsek soustředěný na clonku, která je následně objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek. Clonka se zobrazuje do bodu, který odpovídá velikosti průměru, rovnajícímu se difrakční mezi, jež je ovlivněna numerickou aperturou konkrétního objektivu. Vzorkem odražené a rozptýlené světlo, případně fluorescenci, sbírá ten samý objektiv. Zpětným průchodem tohoto světelného záření objektivem vzniká další obraz bodové clonky. Před fotonásobič je lokalizován obraz clonky pomocí děliče paprsků. V tomto místě obrazu se nachází další, tentokrát konfokální bodová clonka, jejímž úkolem je blokovat záření z míst mimo rovinu zaostřenou mikroskopem. Obraz roviny získáme z rastrovacího zařízení rastrováním bod po bodu. Z rastrovacího zařízení putuje do řídicího počítače signál z fotonásobiče, kde je registrován, společně s informacemi o souřadnicích analyzovaných bodů. Ze získaného souboru dat je následně řídicím počítačem sestaven konečný obraz pozorovaného vzorku. Díky filtraci záření dopadajícího na detektor, již obraz neobsahuje neostře pozadí z nezacílených oblastí vzorku. Spojením řídicího počítače s detektorem světla získáváme informace o intenzitě osvětlení pozorovaného vzorku. (Plášek 1996)

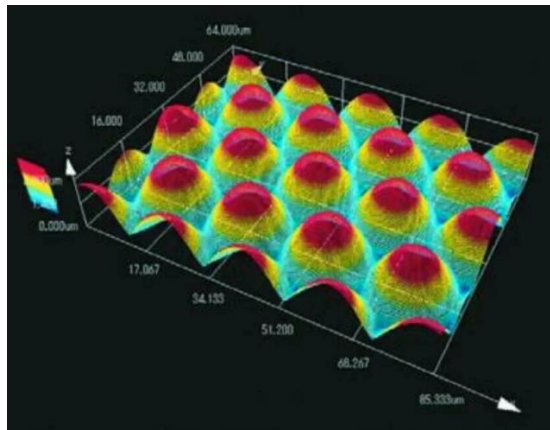


Obrázek 8: Schéma principu laserového konfokálního mikroskopu

2.2 Praktické využití

Technika optického dělení je široce využívána průmyslovou a vědeckou komunitou. Typickými vědami používajícími tuto techniku jsou materiálové vědy a vědy o živé přírodě. Konfokálního mikroskopu se využívá zejména při kontrole výroby dílů či součástek s vysokým požadavkem na přesnost výroby nebo u vodivých i nevodivých materiálů, jakými jsou například polovodiče. Své široké uplatnění a komplexnost dokazuje i to, že je používán v automobilovém a leteckém průmyslu, jako pomocný nástroj pro řízení kvality výroby. Díky jeho přímému 3D zobrazení nabízí měření skutečných vzdáleností, ploch, objemů, měření drsností povrchů a profilů, analýzu jednotlivých částic a spoustu dalších funkcí. Jelikož se jedná o velmi přesný, schopný a výkonný 3D metrologický nástroj, který výrazně převyšuje schopnosti konvenční mikroskopie, lze ho rovněž využít při analýze vad a poruch výrobků. V materiálových vědách je konfokální mikroskop využíván nejen ke zkoumání vlastností materiálů, jakými jsou plasty, keramika, kovy, ale také k vyhodnocování povlaku povlakovaných materiálů nebo chemických a biologických preparátů. Konfokální laserový

měřicí mikroskop, jak již bylo zmíněno, je nezbytnou součástí metrologie a materiálových věd. Avšak jeho potenciál není zdaleka naplněn, ba naopak jeho využití bude mít v budoucnu stoupající tendenci zejména pro nově vznikající aplikace v mikro- a nanotechnologickém odvětví. (Jiříkovský 2007)



Obrázek 9: Funkce měření profilů konfokálním mikroskopem (Jiříkovský 2007)

2.3 Výhody a nevýhody KM

V této podkapitole bych chtěl porovnat vlastnosti konfokální a fluorescenční mikroskopie a na jejich základě následně specifikovat hlavní výhody a nevýhody.

Fluorescenční mikroskope předpokládá nekonečně malou tloušťku preparátu (vzorku). Při zkoumání silnějších vzorků je kvalita zobrazení nepříznivě ovlivňována překrýváním obrazu roviny, do níž je mikroskop právě zaostřen (ohnisková rovina), neostrými obrazy rovin ležících mimo zaostření. V konfokální mikroskopii dosahujeme lepšího rozlišení, daného detekcí světla pouze v rovině ostrosti. Fluorescenčním mikroskopem lze pozorovat pouze vzorky o menší tloušťce, než je hloubka ostrosti objektivu daného mikroskopu. Hloubka ostrosti závisí na jeho numerické apertuře. U fluorescenční mikroskopie sledujeme, nebo zaznamenáváme celé zorné pole tím, že je celý vzorek ozářen, zatímco v konfokální mikroskopii je zorné pole skenováno jedním nebo dvěma světelnými paprsky. (Sehadová 2011)

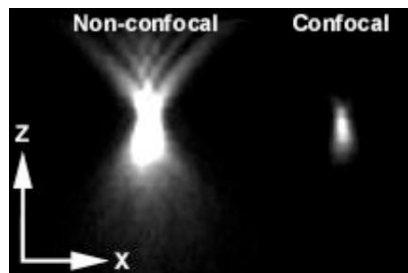
Mezi hlavní výhody konfokální mikroskopie patří: (Škoda 2017)

- největší výhodou konfokálního mikroskopu je, že dokáže eliminovat signál z rovin mimo zaostření viz obrázek 10,
- tím, že je z každé roviny zaostření vytvořen jeden obrázek, lze zaostřit do jakékoliv roviny objektu bez fyzického řezání,
- možnost využít optickou tomografii – 3D rekonstrukce obrazu získávání obrazů z více rovin,

- můžeme pozorovat i objemnější živé objekty,
- optické rozlišení v ose Z je 0,5 μm .

Naopak nevýhodami jsou:

- vyžaduje mimořádně silné zdroje světla a speciální technologii pro detekci fotonů z horizontální roviny
- je zatěžována statistickým šumem, jenž je závislý na počtu detekovaných fotonů
- oproti fluorescenčnímu mikroskopu je 5 – 10x dražší



Obrázek 10: Rozlišení konfokálního mikroskopu oproti nekonfokálnímu (Škoda 2017)

3 Aplikace konfokálního mikroskopu

Konfokální mikroskopie jakožto prostředku pro měření, se využívá, jak již bylo několikrát zmíněno v předchozích kapitolách, v mnoha oborech. Konkrétní studie zabývající se aplikací konfokální mikroskopie v praxi budou shrnuty v podkapitole níže.

3.1 Praktické studie

První studii, kterou se budu zabývat, prováděla Rafaela Aliaj (2021) z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Jejím cílem v této studii bylo, zda se s využitím konfokální mikroskopie dají rozpoznat nepůvodní rysy systémů na čipech integrovaných obvodů. Měření probíhalo konfokálním mikroskopem s laserovým skenováním (LSCM) zkonstruovaného firmou Zeiss. Tento výzkum dospěl k závěru, že konfokální mikroskop může být velkým přínosem při odhalování padělaných integrovaných obvodů, neboť nepovolené čipy obsahují na svém povrchu padělané stopy, které jsou konfokálním mikroskopem snadno identifikovatelné.

Ludmila Skálová et al. (2008) ve své studii zkoumali možnosti využití laserové řádkovací konfokální mikroskopie z pohledu strojírenské technologie. Zejména bylo jejich hlavním cílem ověřit vhodnost použití konfokálního mikroskopu pro mikrostrukturní analýzu strojírenských materiálů. Výzkum byl prováděn na půdě Fakulty strojní ČVUT s využitím zdejšího konfokálního mikroskopu Olympus LEXT OLS 3000. Z multifázových ocelí s vysokou pevností byly vyrobeny miniaturní vzorky pro zkoušku rázem v ohybu. Výsledkem jejich

analýzy je, že konfokální mikroskop je vhodným nástrojem pro mikrostrukturní analýzu, a to hlavně kvůli jeho schopnosti vytvořit trojrozměrný obraz, díky kterému je možné sledovat lomovou plochu po destrukci zkoumaných vzorků.

Další aplikací konfokální mikroskopie do praxe může být měření drsnosti povrchu, ať už jako celku nebo jen jeho konkrétních vlastností. Jednou z publikací zabývajících se drsnostmi povrchů je studie Ai Hongrua et al. (2017) vydaná časopisem RSC Advances. Cílem této studie bylo změřit a porovnat hodnoty Wenzelova faktoru drsnosti r s těmi, které byly předem spočítány. Wenzelův profil drsnosti r je faktor popisující drsnost povrchu, která ovlivňuje jeho hydrofobicitu. Je funkcí výšky povrchové nerovnosti. Ke změření faktoru použili tři hydrofobní povrchy se stejnou strukturou a dospěli k závěru, že použití laserového konfokálního mikroskopu při tomto měření bylo vhodné a spolehlivé, jelikož naměřené r se přesně rovná původní definici faktoru drsnosti.

$$\cos \theta^* = r * \cos \theta \quad (3.1)$$

Zdroj: (Hongru et al. 2017)

Kde: θ^* je zjevný kontaktní úhel

θ je rovnovážný kontaktní úhel

r je faktor drsnosti

Olena Flys et al. (2020) prováděli výzkum, ve kterém bylo jejich cílem porovnat a vyhodnotit výhody a nevýhody čtyř různých měřících metod měření povrchů. Jednou z nich byla i metoda konfokální mikroskopie. Pro každé měření se pomocí aditivních technologií vyrobily vzorky z korozi-vzdorné oceli 316L, kterou známe zejména v podobě chirurgických nástrojů. Výsledkem prováděného výzkumu a hlavní výhodou metody konfokální mikroskopie oproti ostatním byla, že při měření tato metoda poskytla nejméně bodů z nezaostřené roviny, což vedlo ke snížení nejistot měření. Díky této vlastnosti došlo ke zpřesnění a zkvalitnění výsledného obrazu, ze kterého se i následující hodnoty povrchu staly přesnějšími.

Katja Klauer et al. (2018) ve své studii, publikované časopisem Engineering Science and Technology, an International Journal, zkoumali a vyhodnocovali konfokálním mikroskopem vlivy optického povrchového topografického měření na získaných funkčních parametrech drsností. Takto změřené hodnoty následně porovnali s předem získanými a vypočítanými parametry. Z výsledků vyplývá, že hodnoty drsnosti povrchu zkoumaných válců získaných pomocí konfokální mikroskopie odpovídají parametrům předem spočítaným.

Další výzkumnou prací, ve které se využívala data naměřená metodou konfokální mikroskopie, je od Tobiae Pahla et al. (2021) z německé univerzity v Kasselu. Jejich cílem v této práci bylo zjištění vlastností 3D modelu povrchu, jenž byl dále převeden na 2D strukturu. K získání dat pro vyhodnocení závěru využili simulaci interakce mezi světlem a povrchem vzorku, která se provádí dvěma rigorózními metodami, jimiž jsou: metoda konečných prvků a metoda analýzy vázaných vln. Z těchto dat vyplynulo, že druhy 2D struktur trpí zejména difrakčními účinky, které na jedné straně vedou k systematickým odchylkám měření a ke snížené přesnosti numerických modelů na straně druhé.

4 Drsnost povrchu

Břit nástroje, kterým se obrábí různé plochy obrobku, po sobě zanechávají stopy, čímž vzniká drsnost povrchu. Řešení struktury povrchu je možné provádět s pomocí redukce do roviny kolmé k povrchu obrobku. Z této struktury je možné následně sestavit profil, který dodává všechny další informace o 2D parametrech. Pokud je potřeba získat informace i o 3D parametrech nerovnosti povrchu, používají se bezdotykové metody. Jednou z těchto metod je použití konfokálních mikroskopů. (Bumbálek et al. 1989)

Drsnost povrchů pozorovaných vzorků po obrábění je ovlivňována spoustou různých parametrů. Hlavními takovými parametry jsou:

- nástroj,
- samotný obrobek,
- stroj,
- prostředí.

Nejvíce dílčích parametrů ovlivňujících drsnost povrchu je u nástroje, kterým jsou plochy obráběny. Například při broušení je drsnost ovlivněna nástrojem, zejména parametrem materiálu, ze kterého je zrno. Dalšími důležitými faktory jsou velikost, ostrost a počet břitů nástroje, geometrie zrna, případně jeho křehkost a tepelná vodivost. Dále je povrch ovlivněn vlastnostmi složek a stavbou nástroje, tzn. jaký je druh a pevnost vazby zrna a pojiva, počet zrn na jednotkové ploše a tepelná vodivost broušícího kotouče. (Holešovský 2022)

Důležitou roli u výsledné drsnosti povrchu hraje i samotný obrobek. Hlavně se jedná o jeho plasticitu a pevnost, dále pak o tvrdost povrchu, tepelnou vodivost nebo způsob zpracování. (Holešovský 2022)

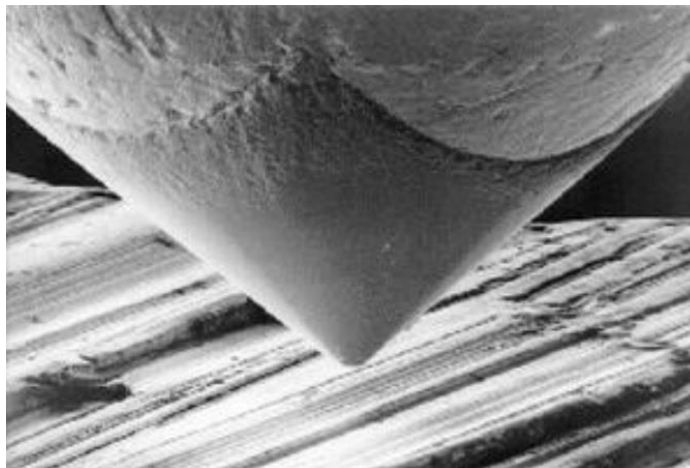
Dalším činitelem, který taktéž ovlivňuje povrch a jeho drsnost je stroj. Zejména se jedná o jeho konstrukci a možnost vytvoření potřebných podmínek procesu. (Holešovský 2022)

4.1 Kontaktní měření drsnosti povrchu

Nejrozšířenějšími přístroji pro měření drsnosti povrchu dotykovou metodou jsou dotykové profiloměry. Pro získání hodnot, ze kterých se následně vyhodnocují parametry drsnosti (parametry drsnosti budou blíže specifikovány v podkapitole 4.3), využívají profiloměry doteku diamantového hrotu s měřeným povrchem. Tento hrot s velmi malým zaoblením se buď rovnoměrnou rychlostí posouvá po měřeném povrchu, nebo se v druhém případě posouvá zkoumaná plocha pod hrotem měřicího přístroje. Pohybem hrotu po ploše vznikají výškové změny polohy hrotu způsobených nerovnostmi sledovaného povrchu. Tyto změny umožňují jednoduché vyhodnocení charakteristiky povrchu definovaných normami. Změny mohou být rovněž zaznamenávány ve formě profilogramů, což jsou přístroje, jejichž výsledkem jsou grafické záznamy profilu. (Bumbálek et al. 1989)

Správnost měření ovlivňuje několik kritérií:

- poloměr zaoblení hrotu profiloměru,
- měřicí síla,
- vrcholový úhel měřicího hrotu.



Obrázek 11: Diamantový hrot měřicího přístroje (Svoboda 2022)

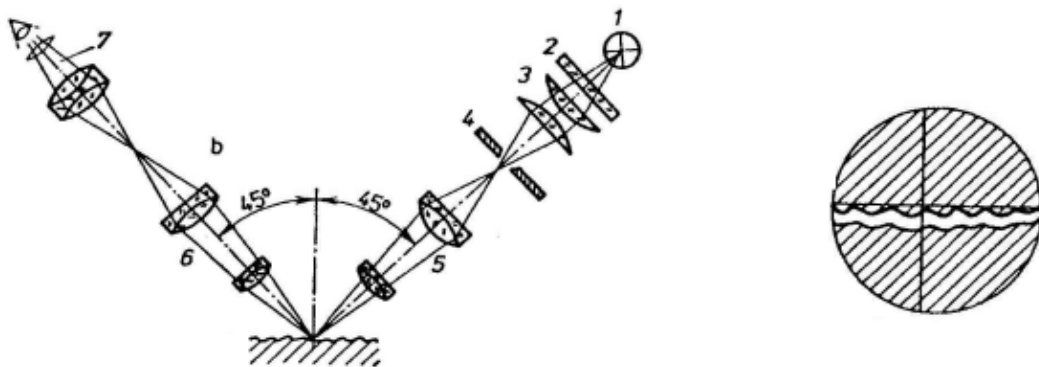
4.2 Bezkontaktní měření drsnosti povrchu

V dnešní době se stále více využívá bezdotykových měřicích přístrojů a metod, a to hlavně z důvodu, že při měření není kontrolovaný povrch nijak poškozen, využívá nedestruktivního způsobu sběru dat. Získaná data bezdotykovými měřicími přístroji se zpracovávají jiným způsobem, než je tomu u přístrojů dotykových. Na základě naměřených dat je nejprve

provedeno sestavení dané plochy, ze které se poté vyhodnocují parametry drsnosti povrchu a jeho textura. Přístroje vyhodnocující parametry drsnosti touto metodou pracují ve většině případech na principu optických metod. Tyto přístroje umožňují kvantitativní měření drsnosti. (Bumbálek et al. 1989)

Jednou z metod měření drsnosti povrchu bezdotykovou metodou je metoda konfokální mikroskopie. Této metodě byla věnována samostatná kapitola 2, ve které jsou kromě principu popsány i veškeré výhody či nevýhody této metody.

Další metodou využívanou ke zkoumání mikrogeometrie povrchu je metoda světelného řezu. Její princip spočívá v tom, že pozorovaný povrch je osvětlen svazkem rovnoběžných paprsků procházejících úzkou štěrbinou. V kolmém směru na dopadající paprsek pozorujeme mikroskopem osvětlené místo. Osvětlené místo se díky nerovnosti povrchu jeví jako světlý zvlňený proužek nesoucí informace o pozorovaném povrchu. (Fiala, Kraus 2016)



Obrázek 12: Metoda světelného řezu při zkoumání drsnosti povrchu (Fiala, Kraus 2016)

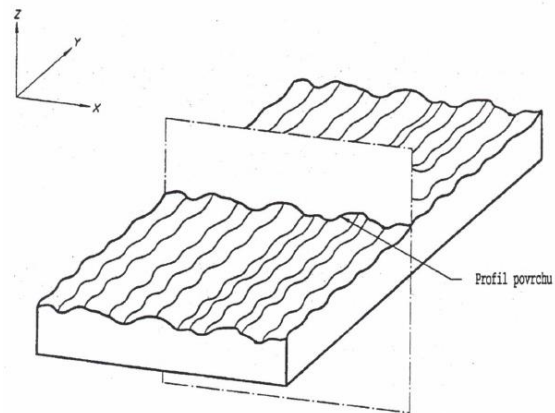
Existují i další metody, které je vhodné zmínit, avšak se jimi nebudu zabývat, jelikož nejsou předmětem této práce. Mezi tyto metody patří metoda nosného podílu, která využívá pro sběr dat narušení totálního odrazu světla od povrchu. Metoda mřížkové projekce používá osnovu rovnoběžných přímek tvořících rastr. Případné nerovnosti povrchu se projeví narušením sítěky rastru zakřivenými čarami. V neposlední řadě se rovněž využívají metody používající interferenci světla nebo laser. Do těchto metod spadá již zmiňovaný konfokální mikroskop.

4.3 Parametry povrchu

Při posuzování drsnosti povrchu, ať už dotykovou, nebo bezdotykovou metodou, se sledují tři parametry profilů, ze kterých se skládá celkový profil povrchu, viz obrázek 13. Jedná se o tyto geometrické parametry definované normou ČSN EN ISO 4287 (1999):

- P-parametr: parametr vypočtený ze základního profilu, je součtem R a W – parametrů,

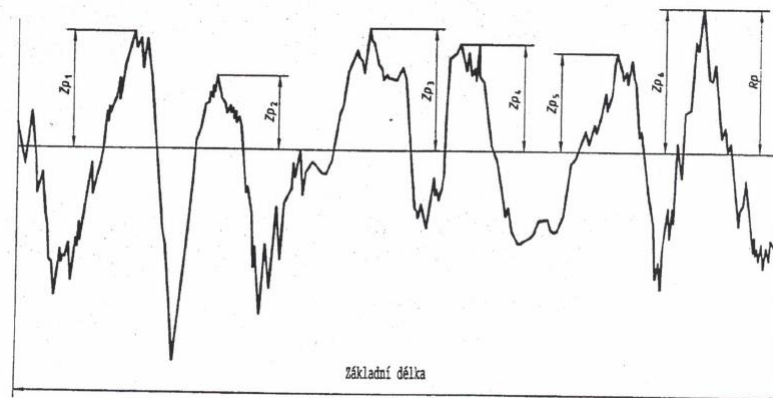
- R-parametr: parametr vypočtený z profilu drsnosti,
- W-parametr: parametr vypočtený z profilu vlnitosti.



Obrázek 13: Profil povrchu (ČSN EN ISO 4287 1999)

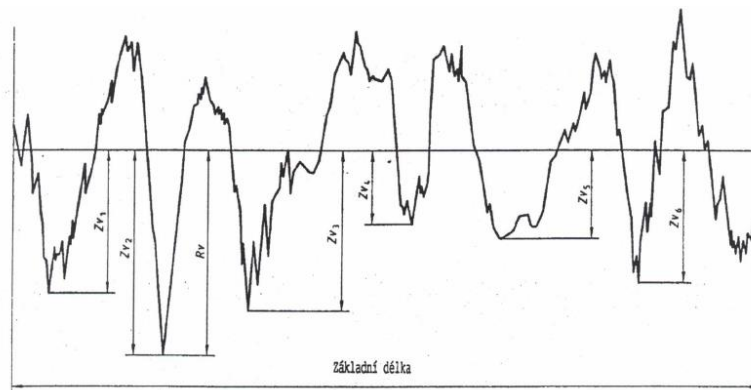
4.3.1 Výškové parametry drsnosti

Největší výška výstupku profilu P_p , R_p , W_p – definována jako výška Z_p nejvyššího výstupku profilu v rozsahu základní délky viz obrázek 14.



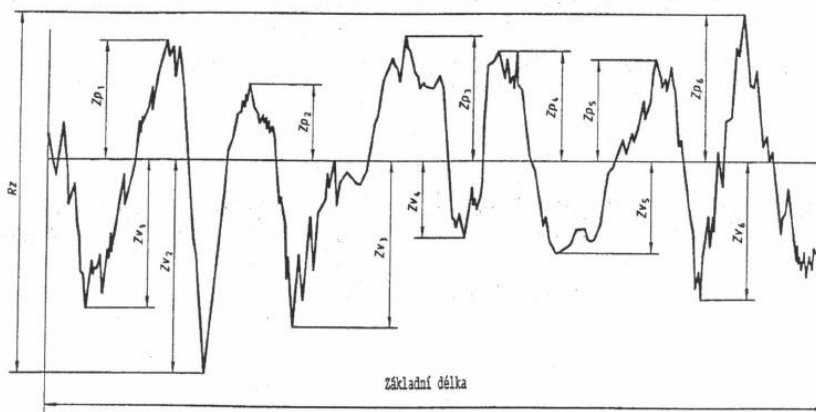
Obrázek 14: Největší výška výstupků profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)

Největší hloubka prohlubně profilu P_v , R_v , W_v – hloubka Z_v nejnižší prohlubně profilu v rozsahu základní délky viz obrázek 15.



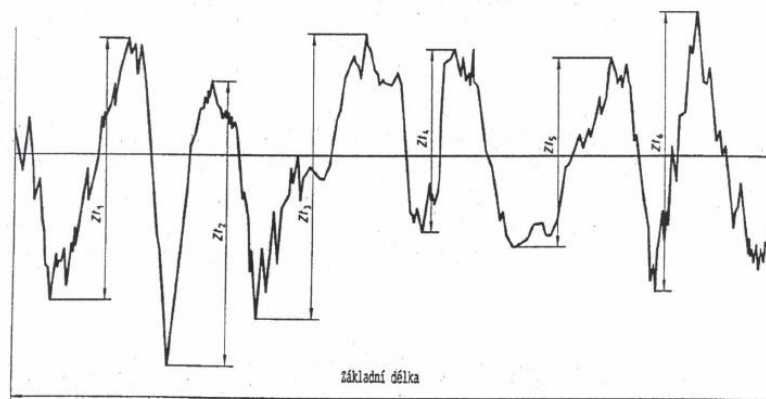
Obrázek 15: Největší hloubka prohlubní profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)

Největší výška profilu P_z , R_z , W_z – součet výšky Z_p nejvyššího výstupku a hloubky Z_v nejnižší prohlubně v rozsahu základní délky viz obrázek 16.



Obrázek 16: Největší výška profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)

Průměrná výška prvků profilu P_c , R_c , W_c – aritmetický průměr výšek Z_t prvků v rozsahu základní délky viz obrázek 17.



Obrázek 17: Výška prvků profilů (ČSN EN ISO 4287 1999)

Celková výška profilu Pt , Rt , Wt – součet výšky Zp nejvyššího výstupku a hloubky Zv nejnižší prohlubně v rozsahu základní délky, standardně je $Pz = Pt$ (v tomto případě se doporučuje používat označení Pt).

Dalšími výškovými parametry jsou průměrné hodnoty pořadnic, jejichž seznam je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam výškových parametrů (průměrné hodnoty pořadnic)

Název	Označení	Vzorec
Průměrná aritmetická úchylka	Pa, Ra, Wa	$Pa, Ra, Wa = \frac{1}{l} * \int_0^l Z(x) dx$
Průměrná kvadratická úchylka	Pq, Rq, Wq	$Pq, Rq, Wq = \sqrt{\frac{1}{l} * \int_0^l Z^2(x) dx}$
Šikmost (skewness)	Psk, Rsk, Wsk	$Rsk = \frac{1}{Rq^3} * \left[\frac{1}{lr} * \int_0^{lr} Z^3(x) dx \right]$
Špičatost (kurtosis)	Pku, Rku, Wku	$Rku = \frac{1}{Rq^2} * \left[\frac{1}{lr} * \int_0^{lr} Z^4(x) dx \right]$

Zdroj: vlastní zpracování na základě normy ČSN EN ISO 4287

4.3.2 Plošné parametry drsnosti

Plošné parametry jsou výsledkem trojrozměrného snímání a vyhodnocování zkoumaného povrchu na celé měřené ploše. Tyto parametry výrazně dopomáhají k jednoznačnému určení struktury povrchu hlavně z důvodu, že poskytují komplexní informace o drsnosti povrchu na celé měřené ploše. Seznam nejčastěji vyhodnocovaných plošných parametrů drsnosti je sepsán v tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam plošných parametrů

Název	Označení	Vzorec
Největší výška výstupku	Sp	---
Největší hloubka prohlubně	Sv	---
Největší výška	Sz	$Sz = Sp + Sv$
Celková výška	St	$St = Sz$
Průměrná aritmetická úchylka	Sa	$Sa = \frac{1}{A} * \iint_A Z(x,y) dx dy$

Průměrná kvadratická úchylnka	Sq	$Sq = \sqrt{\frac{1}{A} * \iint_A Z^2(x, y) dx dy}$
Šikmost (skewness)	Ssk	$Ssk = \frac{1}{Sq^3} * \left[\frac{1}{A} * \iint_A Z^3(x, y) dx dy \right]$
Špičatost (kurtosis)	Sku	$Sku = \frac{1}{Sq^4} * \left[\frac{1}{A} * \iint_A Z^4(x, y) dx dy \right]$
Poměr rozvinuté plochy	Sdr	---

Zdroj: (SPIP User's Guide - Roughness Parameters *nedatováno*)

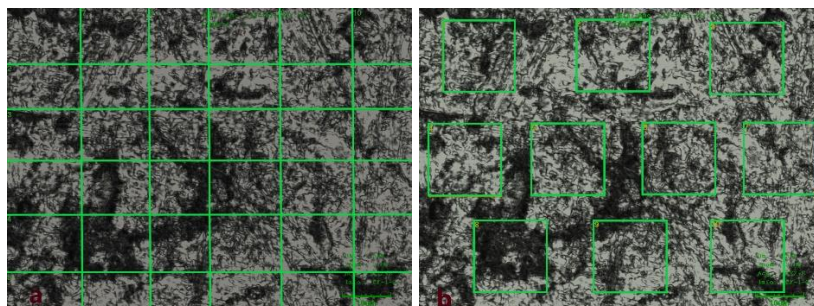
5 Experiment

Cílem experimentu prováděného na konfokálním mikroskopu LEXT OLS 3000 od společnosti Olympus je ze získaného souboru hodnot vyhodnotit profilové, resp. plošné parametry na vybraných vzorcích A - D. Z tohoto souboru následně zanalyzovat, jak se od sebe liší parametry naměřené profilově oproti těm vyhodnocovaným z plochy. V druhé části je vytyčeným úkolem zjistit, jak se budou plošné parametry měnit v závislosti na velikosti plochy, ze které budou vyhodnocovány. Cíl třetí části je velmi podobný tomu z druhé s tím rozdílem, že parametry budou analyzovány z jedné plochy o stejné velikosti. Měnit se však bude velikost filtru λ_c (cut off λ_c) nabízeného SW mikroskopu.

5.1 Analýza profilových a plošných parametrů

Všechny vzorky byly nasnímány na dvou místech (př. A1, A2) s tím, že každé místo bylo následně zaznamenáno při použití šesti různých módů (různé objektivy a přiblížení). Doporučeným módem pro měření drsnosti povrchů od společnosti Olympus je měření objektivem 50 s přiblížením 3x. Na získaných fotografiích povrchu odlišnými objektivy či přiblížením probíhalo měření již zmiňovaných profilových, resp. plošných parametrů. Pro získání souboru dat pro vyhodnocování parametrů, ať už profilových, nebo plošných, jsem prováděl měření na deseti pozicích sledovaného povrchu vzorku. Při měření profilových parametrů jsem zvolil pět měření v ose X a dalších pět v ose Y (obrázek 18a). Naopak pro měření plošných parametrů byla využita plocha o velikosti 185 x 185 pixelů (obrázek 18b). Při získávání dat nebyl použit žádný filtr vlnové délky, který nabízí SW konfokálního mikroskopu LEXT OLS 3000.

Vzhledem k přímému doporučení společnosti Olympus jsem se při své analýze zaměřil zejména na hodnoty měřené objektivem 50 s trojnásobným zvětšením. Analýza měření dalšími módy bude přiložena v příloze 1.



Obrázek 18: Měření parametrů: a) měření profilových parametrů, b) měření plošných parametrů

Z důvodu, že program konfokálního mikroskopu nabízí vyhodnocení více profilových parametrů než parametrů plošných, vycházel jsem pro jejich vzájemné porovnání z nabídky plošných parametrů. Porovnání jsem prováděl z průměrných hodnot jednotlivých měření na každém vzorku s tím, že jako nástroj pro demonstraci odchylek parametrů jsem zvolil jejich rozdíl, viz tabulka 3.

Tabulka 3: Tabulka parametrů [μm] při objektivu 50 a přiblížení 3x

		Objektiv 50x, ZOOM 3x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	3,3169	2,6125	5,9294	2,0529	0,8305	0,9872
	Plošně	5,3934	3,6792	9,0726	1,9311	0,8106	0,9671
	Rozdíl	2,0765	1,0667	3,1432	0,1218	0,0199	0,0201
	Rel. rozdíl	0,385	0,290	0,346	0,059	0,024	0,020
Vzorek A2	Profilově	3,6235	2,5872	6,2107	1,9829	0,8018	0,9761
	Plošně	5,4863	3,896	9,3823	1,8783	0,7861	0,9608
	Rozdíl	1,8628	1,3088	3,1716	0,1046	0,0157	0,0153
	Rel. rozdíl	0,340	0,336	0,338	0,053	0,020	0,016
Vzorek B1	Profilově	2,363	1,5741	3,937	1,4478	0,6136	0,7336
	Plošně	4,1625	2,2139	6,3764	1,3978	0,6316	0,7503
	Rozdíl	1,7995	0,6398	2,4394	0,05	0,018	0,0167
	Rel. rozdíl	0,432	0,289	0,383	0,035	0,028	0,022
Vzorek B2	Profilově	3,1386	2,9344	6,0729	2,0597	0,8988	1,1249
	Plošně	4,358	4,6279	8,9859	2,1101	0,9496	1,1259
	Rozdíl	1,2194	1,6935	2,913	0,0504	0,0508	0,001
	Rel. rozdíl	0,280	0,366	0,324	0,024	0,053	0,001
Vzorek C1	Profilově	2,789	2,0073	4,7963	1,8253	0,7078	0,8391
	Plošně	4,3928	3,6576	8,0504	1,7489	0,7187	0,849
	Rozdíl	1,6038	1,6503	3,2541	0,0764	0,0109	0,0099
	Rel. rozdíl	0,365	0,451	0,404	0,042	0,015	0,012
Vzorek C2	Profilově	2,6995	2,6207	5,3202	2,0474	0,859	0,9838
	Plošně	3,8573	3,8056	7,6629	1,946	0,8197	0,9475

	Rozdíl	1,1578	1,1849	2,3427	0,1014	0,0393	0,0363
	Rel. rozdíl	0,300	0,311	0,306	0,050	0,046	0,037
Vzorek D1	Profilově	2,5823	2,0266	4,6089	1,8289	0,7899	0,933
	Plošně	3,7646	3,2362	7,0008	1,871	0,7802	0,9154
	Rozdíl	1,1823	1,2096	2,3919	0,0421	0,0097	0,0176
	Rel. rozdíl	0,314	0,374	0,342	0,023	0,012	0,019
Vzorek D2	Profilově	2,606	1,1871	3,7931	1,3095	0,4887	0,6335
	Plošně	3,402	2,0388	5,4408	1,3177	0,5524	0,707
	Rozdíl	0,796	0,8517	1,6477	0,0082	0,0637	0,0735
	Rel. rozdíl	0,234	0,418	0,303	0,006	0,115	0,104

Zdroj: vlastní zpracování

Ze souboru měřených hodnot v tabulce 3 je patrné, že největších odchylek mezi plošnými a profilovými parametry nabývá parametr největší výšky profilu (R_z , resp. S_z), a to u všech vzorků podrobených experimentu při měření objektivem 50 s přiblížením 3x. Vůbec největší absolutní odchylkou je hodnota rozdílu $3,2541 \mu\text{m}$ u vzorku C1, zatímco minimální absolutní rozdíl se vyskytuje u vzorku D2, jehož hodnota je $1,6477 \mu\text{m}$. Na druhou stranu nejmenších absolutních rozdílů je docíleno u vyhodnocení parametrů aritmetické průměrné úchyly (R_a , resp. S_a) a kvadratické průměrné úchyly (R_q , resp. S_q). Intervalem, ve kterém se pohybují hodnoty rozdílů těchto parametrů, je $I = < 0,001; 0,0735 > \mu\text{m}$.

Při porovnání parametrů v relativních hodnotách je naopak zřejmé, že nejvyšších procentuálních odchylek je dosaženo u parametrů nejvyšší výšky výstupku (R_p , resp. S_p), a to u vzorku B1 až 43,2 %. Stejně jako v absolutních číslech je i v relativních hodnotách dosaženo nejmenších odchylek u parametrů aritmetické průměrné úchyly (R_a , resp. S_a) a kvadratické průměrné úchyly (R_q , resp. S_q), kde nejvyšší relativní rozdíl nabývá hodnoty 5,3 % u vzorku B2. Vzhledem k faktu, že každý ze vzorků je jiný, není možné sledované parametry různých vzorků porovnávat mezi sebou.

Analogickým způsobem byly analyzovány i vzorky v příloze 1, u kterých jsem dospěl k totožným výsledkům.

5.2 Analýza plošných parametrů v závislosti na velikosti plochy

V této části experimentu jsem se zaměřil na vzorek A z podkapitoly 5.1, konkrétně na snímek A1 provedený objektivem 50 při přiblížení 3x. Pro měření jsem zvolil postup zvolení si velikosti plochy, ze které se následně programem mikroskopu vyhodnotily plošné parametry

drsnosti povrchu. Pro dostatečný soubor dat jsem vybral pět různých velikostí ploch, které byly umístěny do deseti pozic na snímku (stejný způsob jako v podkapitole 5.1 obrázek 18b). Z každé pozice jsem získal hodnoty parametrů a následně z jejich průměru vyhodnocoval velikosti odchylek oproti průměrným hodnotám obdrženy z ostatních velikostí ploch. Toto porovnání jsem provedl stejným způsobem i při použití všech velikostí filtrů λc , které nabízí LEXT. Jedná se o velikosti filtrů 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 a 1/50.

Pro demonstraci výsledků vlivu velikosti plochy na plošné parametry drsnosti jsem vybral hodnoty vyhodnocené bez použití filtru, viz tabulka 4. Výsledky měření s filtry budou k dispozici v příloze 2.

Tabulka 4: Vliv velikosti plochy na plošné parametry drsnosti [μm]

Bez použitého filtru λc						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,5178	3,2372	7,755	1,9108	0,8025	0,9624
150 x 150	5,2019	3,7933	8,9952	1,9439	0,8159	0,9737
185 x 185	5,4306	3,7191	9,1497	1,9304	0,8098	0,9654
210 x 210	5,465	3,8163	9,2813	1,9244	0,8069	0,9631
250 x 250	5,8579	3,8737	9,7316	1,9346	0,8125	0,9713
Průměr	5,29464	3,68792	8,98256	1,92882	0,80952	0,96718
Abs. odchylka	0,348	0,180	0,491	0,009	0,004	0,004
Rel. odchylka	0,066	0,049	0,055	0,005	0,005	0,004

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 4 ukazuje, že výsledky hodnocení absolutních odchylek nabývají největších hodnot u parametru největší výšky profilu, tj. parametr Sz. V tomto případě, tedy měření bez filtru λc , se konkrétně jedná o hodnotu 0,491 μm . Druhého extrému, minimální absolutní odchylky, nabývají parametry průměrné aritmetické a kvadratické úchylky (Sa, resp. Sq). Hodnota se v tomto případě rovná 0,004 μm .

Z pohledu relativních čísel se jedná o hodnoty pohybující se do 7% odchylky od průměrné hodnoty parametrů získaných z různých velikostí plochy. Zanedbatelných odchylek dosahuje parametr průměrné výšky profilu Sc a stejně jako v případě absolutních čísel parametry průměrné aritmetické a kvadratické úchylky (Sa, resp. Sq). Jedná se o odchylky do 0,5 %

od průměrné hodnoty. Největší, šestiprocentní, odchylky nabývá parametr největší výšky výstupku S_p .

U měření přiložených v příloze 2, u kterých byl využit stejný postup vyhodnocení, bylo dosaženo analogických výsledků v absolutních i relativních číslech.

5.3 Analýza vlivu filtru λc na plošné parametry drsnosti

V této podkapitole jsem zvolil velmi podobný přístup sběru dat pro analýzu jako v podkapitole 5.2. Každou velikost plochy z podkapitoly 5.2 jsem využil k získání hodnot plošných parametrů. Na zkoumaném snímku A1 se zvolenou velikostí plochy jsem při měření aplikoval filtr λc . SW LEXT následně vyhodnotil parametry drsnosti povrchu, ze kterých bylo možné provést analýzu vlivu velikosti filtru λc na plošné parametry drsnosti.

Tabulka 5: Vliv filtru λc na plošné parametry drsnosti [μm] na ploše o velikosti 250 x 250 pixel

Velikost plochy 250 x 250 pixel						
Filtr λc	S_p	S_v	S_z	S_c	S_a	S_q
0	5,8579	3,8737	9,7316	1,9346	0,8125	0,9713
1/3	5,7737	3,8319	9,6056	1,9257	0,8078	0,9663
1/5	5,8396	4,0175	9,857	1,9231	0,8016	0,9582
1/10	5,5982	4,0926	9,6908	1,9025	0,7824	0,938
1/20	5,4992	4,2165	9,7158	1,8441	0,7465	0,9016
1/50	5,4813	4,29	9,7713	1,6658	0,6573	0,8178
Průměr	5,67498	4,05370	9,72868	1,86597	0,76802	0,92553
Abs. odchylka	0,149	0,146	0,058	0,074	0,044	0,044
Rel. odchylka	0,026	0,036	0,006	0,040	0,057	0,047

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 5 představuje výsledky analýzy vlivu filtru na ploše o velikosti 250 x 250 pixel s tím, že v tomto případě absolutní odchylky nepřesahují 0,15 μm . Největší odchylkou je hodnota 0,149 μm u parametru největší výšky výstupku S_p , zatímco nejmenších odchylek nabývají parametry průměrné aritmetické a kvadratické úchyly (S_a , resp. S_q), konkrétně 0,044 μm . Pokud uvážím vliv velikosti plochy z podkapitoly 5.2 na plošné parametry a porovnáím ho s vlivem použití filtru, tak absolutní odchylky prvních tří parametrů v tabulce 5 oproti ostatním nevykazují o tolik větší rozdíl, jako tomu bylo například v tabulce 4 při analýze vlivu velikosti plochy.

Výsledky absolutních odchylek významně ovlivnily i výsledky relativních hodnot, kdy nejnižší hodnotu odchylky 0,6 % od průměrné hodnoty vykazuje parametr největší výšky profilu Sz. U tohoto parametru se při ostatních analýzách naopak docílovalo jedné z největších odchylek. Naprostým opakem je vliv na parametry průměrné aritmetické a kvadratické úchylky (Sa, resp. Sq), které při tomto měření dosahují největších relativních odchylek. V případě průměrné aritmetické úchylky Sa je to až 5,7 % od průměrné hodnoty, což by bylo v předchozích analýzách naprosto extrémně vysoké číslo.

Téměř totožné výsledky představují i analýzy na ostatních velikostech plochy, ve kterých rovněž docházelo ke snížení odchylek prvních třech parametrů, a naopak ke zvýšení posledních třech. Tyto výsledky budou přiloženy v příloze 3.

5.4 Diskuze výsledků provedených analýz

Na základě analýzy profilových a plošných parametrů, provedené v podkapitole 5.1, lze usoudit, že způsob měření parametrů drsnosti povrchu má určitý vliv na výsledky sledovaných parametrů v tomto experimentu. Pokud se v první řadě zaměřím na parametry, které jsou vyhodnocovány přímým způsobem, tak jsem schopen sledovat hodnoty odchylek profilových parametrů od parametrů vyhodnocovaných z plochy o velikosti 185 x 185 pixel, které dosahují poměrně zanedbatelných velikostí. Hodnoty odchylek plošných a profilových parametrů se v první části tabulky 3, kde se vyskytují přímo vyhodnocované parametry, pohybují v rozmezí 34 až 38 % s tím, že v některých případech dosahují odchylky až 45 %. Přímými vyhodnocovanými parametry jsou:

- parametr nejvyšší výšky výstupku Rp (Sp),
- parametr největší hloubky prohlubně Rv (Sv),
- parametr největší výšky profilu Rz (Sz).

Z těchto parametrů se následným výpočtem dají získat zbylé parametry v tabulce 3. U těchto vypočtených parametrů je naprosto opačný trend velikosti odchylek, jenž se pohybují v zanedbatelných číslech. Zejména tedy u parametrů průměrné aritmetické (Ra, resp. Sa) a kvadratické úchylky (Rq, resp. Sq), kdy u většiny typů studovaných vzorků nepřesahuje hodnota odchylky 5 % hranici. Výjimkou je vzorek D2, u kterého je hodnota relativního rozdílu rovna 11,5 %, což už není zanedbatelným faktorem při zisku dat měření. Zřejmě nejvyrovnanějším parametrem je parametr průměrné výšky profilu Rc (Sc), kde se hodnoty odchylek pohybují od 4 do 6 % s jednou výchytkou u vzorku D2, kdy je hodnota odchylky rovna 0,6 %.

Z této analýzy vyplývá skutečnost, že pokud je primárním cílem studie vyhodnocení a získání výsledků parametrů získávaných přímým způsobem, tak záleží na principu měření profilovým způsobem nebo plošným, jelikož odchylky mezi těmito způsoby nabývají poměrně vysokých hodnot, které mohou správný výsledek měření ovlivnit. Naopak pokud je cílem vyhodnocení parametrů vypočítávaných, tak na principu měření nezáleží, protože odchylky mezi plošným a profilovým měřením jsou zanedbatelné.

V druhé části experimentu, podkapitole 5.2, s názvem „Analýza plošných parametrů v závislosti na velikosti plochy“ jsem se zaměřil na hodnoty plošných parametrů vyhodnocované na různých velikostech plochy. Stejně jako v předchozí části experimentu se lze zaměřit na přímo vyhodnocované parametry drsnosti povrchu a dále na parametry vypočítávané ze vzorce. V případě přímo vyhodnocovaných parametrů jsem schopen konstatovat fakt, že velikosti odchylek mezi měřeními na plochách o různých rozměrech se nepohybují v příliš vysokých číslech. Jedná se o odchylky hodnot pohybující se v rozmezí 4,9 až 6,6 % od průměrné hodnoty provedených měření. Maximální hodnoty odchylky, tedy 6,6 %, dosahuje parametr největší výšky výstupku S_p . U vypočítávaných parametrů, jenž jsou v tabulce 4 v posledních třech sloupcích, lze u výsledků analýzy sledovat odchylky zanedbatelných velikostí. Maximální hodnoty nabývá v tomto případě parametr průměrné aritmetické úchylnosti S_a a parametr průměrné výšky profilu S_c , a to konkrétně 0,5 % odchylky od průměrné hodnoty.

Vzhledem k těmto výsledkům je možné usoudit, že vliv velikosti plochy na plošné parametry nemá zásadní vliv, jelikož největší odchylka od průměrné hodnoty byla u parametru S_p 6,6 %. I přes výsledky experimentu je však nutné dát si pozor především na volbu velikosti plochy zejména z hlediska, aby bylo dosaženo změřené dostatečné části nasnímané fotografie povrchu vzorku.

Cílem polední části experimentu bylo zjistit vliv velikosti filtru na plošné parametry drsnosti povrchu. Z výsledků tohoto měření je patrné výrazné snížení hodnot relativních odchylek prvních třech parametrů od průměrné hodnoty. Oproti ostatním částem experimentu se zároveň i zvýšily velikosti odchylek vypočítávaných parametrů, což má za následek vyrovnaní rozdílů mezi těmito parametry a parametry vyhodnocovanými přímým způsobem. Dokonce u vypočítávaných parametrů nabývají odchylky vyšších hodnot než ostatní parametry, a to od hodnoty 4 % do hodnoty 5,7 %. Vůbec nejnižší relativní odchylky dosahuje parametr největší výšky profilu, konkrétně 0,6 % od průměrné hodnoty z měření.

Závěr

Cílem práce v první části bylo ze získaného souboru dat naměřeného na vzorcích podrobených experimentu A – D vyhodnotit, zda se od sebe liší parametry měřené profilovým a plošným způsobem. Soubor hodnot, ze kterých byla následně provedena analýza, jsem získal z měření na každém ze vzorků v deseti pozicích, ať už se jednalo o profilové, nebo plošné měření. Výsledkem této části bylo zjištění, že parametry, které nejsou dopočítávány přes vzorce, jsou zatíženy výraznou odchylkou, některých případech až 43,2 % od průměrné hodnoty. Těmito parametry jsou R_p (S_p), R_v (S_v) a R_z (S_z), jenž jsou v tabulce 3, 4, 5 vždy v prvních třech sloupcích. Naopak odchylka u dopočítávaných parametrů R_c (S_c), R_a (S_a) a R_q (S_q) je zanedbatelná a nemá na ně tedy volba způsobu měření vliv. Při měření je tedy na uživateli, aby si stanovil cíl, které parametry pro něj budou důležité, a podle toho zvolit metodu, z níž bude vycházet.

V druhé části, kde bylo hlavním vytyčeným cílem zkoumat vliv velikosti zvolené plochy na plošné parametry, jsem se zaměřil pouze na vzorek A1 nasnímaný objektivem 50 a trojnásobným přiblížením. U přímo vyhodnocovaných parametrů se v tomto případě odchylka mezi jednotlivými výsledky z různých ploch pohybovala v rozmezí 4,9 až 6,6 % od průměrné hodnoty. Na vypočítávané parametry rovněž nemá zvolená velikost plochy vliv, jelikož největší odchylkou je hodnota 0,5 %. Vzhledem k výsledkům však doporučuji při měření zvolit vhodnou velikost plochy, aby bylo dosaženo relevantních výsledků hlavně z důvodu zaznamenání dostatečné celkové zaznamenané plochy na snímku vzorku.

Třetí část byla zaměřená na vliv použitého filtru λ_c o různých velikostech při měření plošných parametrů. Sběr dat probíhal tak, že u každé velikosti filtru jsem z deseti pozic na snímku vzorku vyhodnotil parametry drsnosti povrchu a následně zprůměrované hodnoty porovnal mezi sebou a zjišťoval již zmiňovaný vliv filtru λ_c . Výsledky této části experimentu vyvrátily mou hypotézu, která předpokládala zanedbatelný vliv u parametrů S_p , S_v a S_z . V relativních hodnotách jsem předpokládal odchylku od průměrné hodnoty mezi 20 až 30 % u těchto plošných parametrů. Nicméně velikosti odchylek se u všech parametrů pohybovaly v rozmezí 2,6 až 5,7 %. Výjimkou byl výsledek parametru S_z , který při tomto experimentu dosáhl odchylky 0,6 % od průměrné hodnoty.

Pro všechny části experimentu jsem využil konfokálního mikroskopu LEXT OLS 3000 od společnosti Olympus.

Použitá literatura

ALIAJ, Rafaela, 2021. *The Analysis of Decapsulated Chip Surface with Confocal Microscopy*. online. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlině. Získáno z: <http://hdl.handle.net/10563/49843>

BUMBÁLEK, Bohumil, ODVODY, Vladimír a OŠŤÁDAL, Bohuslav, 1989. *Drsnost povrchu*. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury.

ČSN EN ISO 4287, 1999. *Geometrické požadavky na výrobky (GPS) - Struktura povrchu: Profilová metoda - Termíny, definice a parametry struktury povrchu*. . 1999. Český normalizační institut.

FIALA, Jaroslav a KRAUS, Ivo, 2016. *Povrchy a rozhraní*. 2. přepracované vydání. Praha: České vysoké učení technické v Praze. ISBN 978-8-01-05881-7.

FLYS, O., BERGLUND, J. a ROSEN, B.-G., 2020. Using confocal fusion for measurement of metal AM surface texture. *Surface Topography: Metrology and Properties*. duben 2020. Vol. 8, no. 2, pp. 024003. DOI 10.1088/2051-672X/ab84c3.

HÁJKOVÁ, Z., BAUEROVÁ, P., FEJFAR, A. a ŠLOUF, M., 2018. Elektronový mikroskop – klíč k odhalení tajemství mikro- a nanosvěta. *Chemické listy*. 15 únor 2018. Vol. 112, no. 2, pp. 128–134.

HALLIDAY, David, RESNICK, Robert a WALKER, Jearl, 2000. *Fyzika, část 4, Elektromagnetické vlny - Optika - Relativita*. online. Vutium, Prometheus. [Viděno 19 leden 2022]. ISBN 978-80-214-1868-4. Získáno z: <https://is.muni.cz/publication/493019/cs/Fyzika-cast-4-Elektromagneticke-vlny-Optika-Relativita/Halliday-Resnick-Walker>

HOLEŠOVSKÝ, František, 2022. *Integrita obráběného povrchu*. . Praha. 2022.

HONGRU, Ai, XIANGQIN, Li, SHUYAN, Shi, YING, Zhang a TIANQING, Liu, 2017. Measurement of Wenzel roughness factor by laser scanning confocal microscopy. *RSC Advances*. 20 leden 2017. Vol. 7, no. 12, pp. 7052–7059. DOI 10.1039/C6RA26897H.

JIŘIKOVSKÝ, KAREL, 2007. Laserový konfokální řádkovací mikroskop | MM Průmyslové spektrum. www.mmspektrum.com. online. 25 duben 2007. [Viděno 23 listopad 2021]. Získáno z: <https://www.mmspektrum.com/clanek/laserovy-konfokalni-radkovaci-mikroskop>

JEROME, W. Gray Jay a PRICE, Robert L., 2018. *Basic Confocal Microscopy*. online. Cham, SWITZERLAND: Springer International Publishing AG. [Viděno 21 listopad 2021].

ISBN 978-3-319-97454-5.

Získáno

z:

<http://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=5625468>

KLAUER, K., EIFLER, M., SEEWIG, J., KIRSCH, B. a AURICH, J. C., 2018. Application of function-oriented roughness parameters using confocal microscopy. *Engineering Science and Technology, an International Journal*. 1 červen 2018. Vol. 21, no. 3, pp. 302–313. DOI 10.1016/j.jestch.2018.04.004.

KUBITSCHECK, Ulrich, 2013. *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. online. Weinheim, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated. [Viděno 21 listopad 2021]. ISBN 978-3-527-67161-8. Získáno z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=1166318>

LAKOWICZ, Joseph R. a MASTERS, Barry R., 2008. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics*. 2008. Vol. 13, no. 2, pp. 029901.

LEDNICKÝ, František, 2009. *Mikroskopie a morfologie polymerů*. online. 1. Technická univerzita v Liberci. [Viděno 2 únor 2022]. ISBN 978-80-7372-486-3. Získáno z: <https://katalog.vsb.cz/records/4c567d77-6e63-4142-98a8-11121d52203b?locale=cs>

MALÝ, Petr, 2013. *Optika*. online. Prague, CZECH REPUBLIC: Karolinum Press. [Viděno 21 listopad 2021]. ISBN 978-80-246-2793-9. Získáno z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=6371462>

OTÉPKOVÁ, Lucie, 2021. Characterization of Surfaces Using Confocal Microscopy. online. 20 květen 2021. Získáno z: <http://hdl.handle.net/10563/47287>

PAHL, Tobias, HAGEMEIER, Sebastian, BISCHOFF, Jörg, MANSKE, Eberhard a LEHMANN, Peter, 2021. Rigorous 3D modeling of confocal microscopy on 2D surface topographies. *Measurement Science and Technology*. 1 září 2021. Vol. 32, no. 9, pp. 094010. DOI 10.1088/1361-6501/abfd69.

PLÁŠEK, Jaromír, 1996. Nové metody optické mikroskopie. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*. 1996. Vol. 41, no. 1, pp. 1–24.

RYZÍ, Adriana, 2016. *Recent Trends in Evaluation of Surface Topography Using Light Microscopy*. online. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlině. Získáno z: <http://hdl.handle.net/10563/39132>

SEHAĐOVÁ, HANA, 2011. Fluorescenční a konfokální mikroskopie - PDF Free Download. online. 2011. [Viděno 22 listopad 2021]. Získáno z: <https://adoc.pub/fluorescenni-a-konfokalni-mikroskopie.html>

SKÁLOVÁ, Ludmila, STAŇKOVÁ, Hana a MAŠEK, Bohuslav, 2008. *Možnosti a využití laserové řádkovací konfokální mikroskopie*. online. Fakulta strojní ČVUT.

[Viděno 22 listopad 2021]. ISBN 978-80-01-04039-3. Získáno z:
<http://dspace5.zcu.cz/handle/11025/22403>Accepted: 2017-01-
26T09:52:32ZjournalAbbreviation: Possibilities and applications of laser scanning confocal
microscopy

SPiP User's Guide - Roughness Parameters, nedatováno. online. [Viděno 31 březen 2022].
Získáno z:
[http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#RoughnessParameters/Roughness_Param
eters.htm](http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#RoughnessParameters/Roughness_Parameters.htm)

SVOBODA, Jakub, 2022. Bezkontaktní měření drsnosti povrchu u součástí z plastů a
kompozitů. online. 2022. [Viděno 4 duben 2022]. Získáno z:
<https://dspace.tul.cz/handle/15240/163473>Accepted: 2022-02-26T04:52:45Z

ŠKODA, RNDr Jan, 2017. Konfokální mikroskopie a nové trendy ve fluorescenční
mikroskopii. . 2017. pp. 48.

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Graf relativní citlivosti oka na vlnové délce (Halliday, Resnick, Walker 2000)	10
Obrázek 2: Schéma šíření paprsků po dopadu na rozhraní dvou prostředí	11
Obrázek 3: Velikost difrakce světla v závislosti na průměru štěrbině (Halliday, Resnick, Walker 2000)	12
Obrázek 4: Jednoduchý světelný mikroskop: 1) zdroj světla, 2) clona, 3) kondenzor, 4) stolek, 5) objektivy, 6) tubus, 7) okulár, 8) makrometrický šroub, 9) mikrometrický šroub (Lednický 2009)	13
Obrázek 5: Princip zobrazení světelného mikroskopu (Ryzí 2016)	14
Obrázek 6: Ukázka výstupu z elektronového mikroskopu: a) topografie, b) materiálový kontrast (Hájková et al. 2018)	16
Obrázek 7: Schéma fluorescenčního mikroskopu (Otépková 2021)	17
Obrázek 8: Schéma principu laserového konfokálního mikroskopu	19
Obrázek 9: Funkce měření profilů konfokálním mikroskopem (Jiřikovský 2007)	20
Obrázek 10: Rozlišení konfokálního mikroskopu oproti nekonfokálnímu (Škoda 2017)	21
Obrázek 11: Diamantový hrot měřicího přístroje (Svoboda 2022)	24
Obrázek 12: Metoda světelného řezu při zkoumání drsnosti povrchu (Fiala, Kraus 2016)	25
Obrázek 13: Profil povrchu (ČSN EN ISO 4287 1999)	26
Obrázek 14: Největší výška výstupků profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)	26
Obrázek 15: Největší hloubka prohlubní profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)	27
Obrázek 16: Největší výška profilu (ČSN EN ISO 4287 1999)	27
Obrázek 17: Výška prvků profilů (ČSN EN ISO 4287 1999)	27
Obrázek 18: Měření parametrů: a) měření profilových parametrů, b) měření plošných parametrů	30
Tabulka 1: Seznam výškových parametrů (průměrné hodnoty pořadnic)	28
Tabulka 2: Seznam plošných parametrů	28
Tabulka 3: Tabulka parametrů [μm] při objektivu 50 a přiblížení 3x	31
Tabulka 4: Vliv velikosti plochy na plošné parametry drsnosti [μm]	33
Tabulka 5: Vliv filtru λ_c na plošné parametry drsnosti [μm] na ploše o velikosti 250x250 pixel	34

Příloha 1

Příloha obsahuje všechna další měření plošných a profilových parametrů [μm] prováděná při různých objektivích a přiblížení.

		Objektiv 5x, ZOOM 1x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	331,3795	393,5447	724,9242	94,7892	46,28	70,9
	Plošně	372,4467	416,5328	788,9794	92,7527	45,6998	68,3511
	Rozdíl	41,0672	22,9881	64,0552	2,0365	0,5802	2,5489
	Rel. rozdíl	0,110	0,055	0,081	0,021	0,013	0,036
Vzorek A2	Profilově	311,2585	311,3947	622,6532	75,8496	44,0202	55,9957
	Plošně	359,6104	427,1697	786,7801	89,2187	44,8788	56,5286
	Rozdíl	48,3519	115,775	164,1269	13,3691	0,8586	0,5329
	Rel. rozdíl	0,134	0,271	0,209	0,150	0,019	0,009
Vzorek B1	Profilově	175,3102	158,4667	333,7769	63,8608	38,8367	44,8289
	Plošně	339,1223	326,7798	665,9021	70,9749	39,7163	45,32
	Rozdíl	163,8121	168,3131	332,1252	7,1141	0,8796	0,4911
	Rel. rozdíl	0,483	0,515	0,499	0,100	0,022	0,011
Vzorek B2	Profilově	241,6697	194,2925	435,9621	40,7432	19,8497	33,8312
	Plošně	402,886	349,1249	752,0109	41,6102	19,2295	32,4152
	Rozdíl	161,2163	154,8324	316,0488	0,867	0,6202	1,416
	Rel. rozdíl	0,400	0,443	0,420	0,021	0,031	0,042
Vzorek C1	Profilově	194,7955	174,1547	368,9502	62,0207	35,9625	42,502
	Plošně	368,3983	325,1512	693,5496	68,4136	37,67	44,9289
	Rozdíl	173,6028	150,9965	324,5994	6,3929	1,7075	2,4269
	Rel. rozdíl	0,471	0,464	0,468	0,093	0,045	0,054
Vzorek C2	Profilově	228,8474	170,2741	399,1216	36,4093	19,2001	30,4866
	Plošně	382,4919	378,9982	761,4901	41,8278	19,6935	31,5614
	Rozdíl	153,6445	208,7241	362,3685	5,4185	0,4934	1,0748
	Rel. rozdíl	0,402	0,551	0,476	0,130	0,025	0,034

Vzorek D1	Profilově	228,0985	240,2153	468,3138	41,1459	18,5935	32,7391
	Plošně	363,7827	377,2631	741,0458	38,5632	17,5892	30,5517
	Rozdíl	135,6842	137,0478	272,732	2,5827	1,0043	2,1874
	Rel. rozdíl	0,373	0,363	0,368	0,063	0,054	0,067
Vzorek D2	Profilově	182,6884	172,352	355,0404	64,6058	35,4631	42,0278
	Plošně	308,1664	342,3875	650,5539	68,5212	35,5347	41,7782
	Rozdíl	125,478	170,0355	295,5135	3,9154	0,0716	0,2496
	Rel. rozdíl	0,407	0,497	0,454	0,057	0,002	0,006

		Objektiv 10x, ZOOM 1x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	65,168	78,0456	143,2136	22,3986	11,2758	13,9304
	Plošně	87,9539	107,0728	195,0268	22,5573	11,6306	14,0547
	Rozdíl	22,7859	29,0272	51,8132	0,1587	0,3548	0,1243
	Rel. rozdíl	0,259	0,271	0,266	0,007	0,031	0,009
Vzorek A2	Profilově	66,8699	57,2012	124,0711	22,9919	11,8325	14,2344
	Plošně	85,66	107,4701	193,1301	22,6765	11,6378	13,8582
	Rozdíl	18,7901	50,2689	69,059	0,3154	0,1947	0,3762
	Rel. rozdíl	0,219	0,468	0,358	0,014	0,016	0,026
Vzorek B1	Profilově	44,3979	38,0924	82,4903	19,4297	9,8799	11,9112
	Plošně	75,0118	82,8098	157,8216	19,433	10,5139	12,3192
	Rozdíl	30,6139	44,7174	75,3313	0,0033	0,634	0,408
	Rel. rozdíl	0,408	0,540	0,477	0,000	0,060	0,033
Vzorek B2	Profilově	52,0458	49,8116	101,8573	17,7714	9,0115	12,068
	Plošně	89,5776	98,8967	188,4743	18,3366	8,5021	11,9412
	Rozdíl	37,5318	49,0851	86,617	0,5652	0,5094	0,1268
	Rel. rozdíl	0,419	0,496	0,460	0,031	0,057	0,011
Vzorek C1	Profilově	47,6051	43,8051	91,4102	18,4009	10,1462	12,1866
	Plošně	98,6658	89,6893	188,3551	18,4116	10,01	11,7848
	Rozdíl	51,0607	45,8842	96,9449	0,0107	0,1362	0,4018

	Rel. rozdíl	0,518	0,512	0,515	0,001	0,013	0,033
Vzorek C2	Profilově	41,4432	39,0693	80,5125	14,5263	7,3348	10,0543
	Plošně	89,6917	96,1214	185,8131	15,4364	7,6046	10,2482
	Rozdíl	48,2485	57,0521	105,3006	0,9101	0,2698	0,1939
	Rel. rozdíl	0,538	0,594	0,567	0,059	0,035	0,019
Vzorek D1	Profilově	54,8007	49,5363	104,3369	17,626	7,8002	11,0998
	Plošně	81,0885	91,4595	172,548	17,3957	8,1368	11,3733
	Rozdíl	26,2878	41,9232	68,2111	0,2303	0,3366	0,2735
	Rel. rozdíl	0,324	0,458	0,395	0,013	0,041	0,024
Vzorek D2	Profilově	41,2998	36,6508	77,9506	18,1294	8,8767	10,8503
	Plošně	59,5556	69,9668	129,5224	18,6365	9,6803	11,4097
	Rozdíl	18,2558	33,316	51,5718	0,5071	0,8036	0,5594
	Rel. rozdíl	0,307	0,476	0,398	0,027	0,083	0,049

		Objektiv 20x, ZOOM 1x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	19,5416	19,441	38,9826	6,2756	3,1732	3,9435
	Plošně	27,8553	27,3828	55,2381	6,282	3,1496	3,8655
	Rozdíl	8,3137	7,9418	16,2555	0,0064	0,0236	0,078
	Rel. rozdíl	0,298	0,290	0,294	0,001	0,007	0,020
Vzorek A2	Profilově	18,0518	20,8265	38,8783	6,477	3,2126	4,0593
	Plošně	28,558	31,5389	60,0969	6,4608	3,2927	4,0102
	Rozdíl	10,5062	10,7124	21,2186	0,0162	0,0801	0,0491
	Rel. rozdíl	0,368	0,340	0,353	0,003	0,024	0,012
Vzorek B1	Profilově	13,3932	11,5633	24,9565	5,3327	2,7481	3,4235
	Plošně	18,9098	19,5331	38,4429	5,0366	2,6433	3,3161
	Rozdíl	5,5166	7,9698	13,4864	0,2961	0,1048	0,1074
	Rel. rozdíl	0,292	0,408	0,351	0,056	0,038	0,031
	Profilově	14,0168	13,2705	27,2873	6,3837	2,448	3,5037

Vzorek B2	Plošně	27,9692	30,7038	58,6729	5,6848	2,5267	3,632
	Rozdíl	13,9524	17,4333	31,3856	0,6989	0,0787	0,1283
	Rel. rozdíl	0,499	0,568	0,535	0,109	0,031	0,035
Vzorek C1	Profilově	11,5457	14,5554	26,1011	5,1515	2,5389	3,2411
	Plošně	33,1943	32,3177	65,5121	5,1534	2,6332	3,2761
	Rozdíl	21,6486	17,7623	39,411	0,0019	0,0943	0,035
	Rel. rozdíl	0,652	0,550	0,602	0,000	0,036	0,011
Vzorek C2	Profilově	14,108	10,88	24,988	4,2173	2,0098	2,9249
	Plošně	23,5582	27,2039	50,7621	4,289	2,1049	2,9623
	Rozdíl	9,4502	16,3239	25,7741	0,0717	0,0951	0,0374
	Rel. rozdíl	0,401	0,600	0,508	0,017	0,045	0,013
Vzorek D1	Profilově	14,3479	11,4661	25,814	4,8972	1,9482	2,8735
	Plošně	23,2052	23,0967	46,3019	4,658	2,092	3,037
	Rozdíl	8,8573	11,6306	20,4879	0,2392	0,1438	0,1635
	Rel. rozdíl	0,382	0,504	0,442	0,049	0,069	0,054
Vzorek D2	Profilově	12,4926	10,023	22,5156	4,6335	2,1785	2,8351
	Plošně	20,2471	21,9964	42,2436	4,7818	2,3646	2,8984
	Rozdíl	7,7545	11,9734	19,728	0,1483	0,1861	0,0633
	Rel. rozdíl	0,383	0,544	0,467	0,031	0,079	0,022

		Objektiv 50x, ZOOM 1x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	3,665	2,6861	6,3511	1,6418	0,8016	0,9649
	Plošně	5,2109	4,1642	9,3751	1,5613	0,786	0,9509
	Rozdíl	1,5459	1,4781	3,024	0,0805	0,0156	0,014
	Rel. rozdíl	0,297	0,355	0,323	0,049	0,019	0,015
Vzorek A2	Profilově	4,3426	3,0131	7,3557	1,5892	0,8067	0,989
	Plošně	5,7639	5,3135	11,0774	1,5665	0,7999	0,9859
	Rozdíl	1,4213	2,3004	3,7217	0,0227	0,0068	0,0031
	Rel. rozdíl	0,247	0,433	0,336	0,014	0,008	0,003

Vzorek B1	Profilově	3,1117	2,3969	5,5085	1,4446	0,7867	0,9584
	Plošně	4,2975	2,6671	6,9646	1,3878	0,7303	0,8761
	Rozdíl	1,1858	0,2702	1,4561	0,0568	0,0564	0,0823
	Rel. rozdíl	0,276	0,101	0,209	0,039	0,072	0,086
Vzorek B2	Profilově	3,5986	3,7037	7,3023	1,8072	1,0226	1,2603
	Plošně	5,0217	5,9094	10,9311	1,8256	1,0324	1,2022
	Rozdíl	1,4231	2,2057	3,6288	0,0184	0,0098	0,0581
	Rel. rozdíl	0,283	0,373	0,332	0,010	0,009	0,046
Vzorek C1	Profilově	3,5898	2,4634	6,0531	1,3586	0,737	0,8957
	Plošně	5,0831	3,7018	8,7849	1,4653	0,7415	0,884
	Rozdíl	1,4933	1,2384	2,7318	0,1067	0,0045	0,0117
	Rel. rozdíl	0,294	0,335	0,311	0,073	0,006	0,013
Vzorek C2	Profilově	2,9329	2,3049	5,2378	1,4186	0,8315	0,9659
	Plošně	4,6162	4,038	8,6542	1,5985	0,8849	1,0114
	Rozdíl	1,6833	1,7331	3,4164	0,1799	0,0534	0,0455
	Rel. rozdíl	0,365	0,429	0,395	0,113	0,060	0,045
Vzorek D1	Profilově	2,8217	2,4457	5,2674	1,3763	0,7847	0,9727
	Plošně	4,068	3,0329	7,1009	1,5709	0,8245	0,962
	Rozdíl	1,2463	0,5872	1,8335	0,1946	0,0398	0,0107
	Rel. rozdíl	0,306	0,194	0,258	0,124	0,048	0,011
Vzorek D2	Profilově	3,0306	1,9268	4,9573	1,414	0,6936	0,8517
	Plošně	4,7857	3,3298	8,1155	1,3849	0,6714	0,813
	Rozdíl	1,7551	1,403	3,1582	0,0291	0,0222	0,0387
	Rel. rozdíl	0,367	0,421	0,389	0,021	0,032	0,045

		Objektiv 100x, ZOOM 1x					
		Rp (Sp)	Rv (Sv)	Rz (Sz)	Rc (Sc)	Ra (Sa)	Rq (Sq)
Vzorek A1	Profilově	1,0288	0,9976	2,0265	0,4049	0,2155	0,2842
	Plošně	1,5654	1,5616	3,127	0,3697	0,185	0,2532
	Rozdíl	0,5366	0,564	1,1005	0,0352	0,0305	0,031
	Rel. rozdíl	0,343	0,361	0,352	0,087	0,142	0,109

Vzorek A2	Profilově	1,5024	1,5153	3,0177	0,5299	0,2882	0,4111
	Plošně	2,2276	2,0719	4,2995	0,418	0,2179	0,307
	Rozdíl	0,7252	0,5566	1,2818	0,1119	0,0703	0,1041
	Rel. rozdíl	0,326	0,269	0,298	0,211	0,244	0,253
Vzorek B1	Profilově	1,0089	0,844	1,8529	0,3579	0,2554	0,3215
	Plošně	1,1003	0,9972	2,0975	0,2623	0,1614	0,2072
	Rozdíl	0,0914	0,1532	0,2446	0,0956	0,094	0,1143
	Rel. rozdíl	0,083	0,154	0,117	0,267	0,368	0,356
Vzorek B2	Profilově	1,7159	1,9191	3,635	1,3138	0,6111	0,7497
	Plošně	2,3336	2,3278	4,6614	0,5578	0,3264	0,444
	Rozdíl	0,6177	0,4087	1,0264	0,756	0,2847	0,3057
	Rel. rozdíl	0,265	0,176	0,220	0,575	0,466	0,408
Vzorek C1	Profilově	0,908	0,8382	1,7461	0,3385	0,2056	0,2633
	Plošně	1,1927	1,4151	2,6078	0,3425	0,1925	0,2392
	Rozdíl	0,2847	0,5769	0,8617	0,004	0,0131	0,0241
	Rel. rozdíl	0,239	0,408	0,330	0,012	0,064	0,092
Vzorek C2	Profilově	0,9985	0,8818	1,8803	0,3505	0,1728	0,231
	Plošně	1,2846	1,5448	2,8293	0,272	0,1343	0,1835
	Rozdíl	0,2861	0,663	0,949	0,0785	0,0385	0,0475
	Rel. rozdíl	0,223	0,429	0,335	0,224	0,223	0,206
Vzorek D1	Profilově	1,2851	0,7707	2,0558	0,5053	0,2848	0,3614
	Plošně	1,259	1,4456	2,7046	0,376	0,1859	0,2363
	Rozdíl	0,0261	0,6749	0,6488	0,1293	0,0989	0,1251
	Rel. rozdíl	0,020	0,467	0,240	0,256	0,347	0,346
Vzorek D2	Profilově	0,8014	0,8965	1,6978	0,3058	0,1842	0,2513
	Plošně	1,091	1,0968	2,1878	0,2448	0,1472	0,1857
	Rozdíl	0,2896	0,2003	0,49	0,061	0,037	0,0656
	Rel. rozdíl	0,265	0,183	0,224	0,199	0,201	0,261

Příloha 2

Příloha obsahuje všechna další měření plošných parametrů [μm] prováděná při použití různých velikostí filtru λ_c .

Při použití filtru $\lambda_c = 1/3$						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,6461	3,1553	7,8014	1,9216	0,8067	0,9677
150 x 150	4,912	3,6181	8,5301	1,9273	0,8046	0,9607
185 x 185	5,4579	3,7055	9,1634	1,9204	0,8032	0,9615
210 x 210	5,4608	3,7357	9,1965	1,9093	0,8013	0,9545
250 x 250	5,7737	3,8319	9,6056	1,9257	0,8078	0,9663
Průměr	5,25010	3,60930	8,85940	1,92086	0,80472	0,96214
Abs. odchylka	0,377	0,182	0,555	0,005	0,002	0,004
Rel. odchylka	0,072	0,050	0,063	0,003	0,003	0,004

Při použití filtru $\lambda_c = 1/5$						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,7146	3,2043	7,9189	1,8845	0,8014	0,9585
150 x 150	4,9107	3,6614	8,5721	1,9193	0,8021	0,9574
185 x 185	5,4085	3,7108	9,1193	1,9255	0,8019	0,9589
210 x 210	5,4504	3,8406	9,291	1,9049	0,7973	0,9502
250 x 250	5,8396	4,0175	9,857	1,9231	0,8016	0,9582
Průměr	5,26476	3,68692	8,95166	1,91146	0,80086	0,95664
Abs. odchylka	0,362	0,203	0,565	0,013	0,001	0,003
Rel. odchylka	0,069	0,055	0,063	0,007	0,002	0,003

Při použití filtru $\lambda_c = 1/10$						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,6705	3,3443	8,0148	1,904	0,7948	0,9537

150 x 150	4,7283	3,7446	8,473	1,9071	0,7859	0,9396
185 x 185	5,2429	3,7431	8,9861	1,9044	0,7837	0,9379
210 x 210	5,262	3,824	9,086	1,8989	0,7837	0,9341
250 x 250	5,5982	4,0926	9,6908	1,9025	0,7824	0,938
Průměr	5,10038	3,74972	8,85014	1,90338	0,78610	0,94066
Abs. odchylka	0,321	0,167	0,485	0,002	0,003	0,005
Rel. odchylka	0,063	0,045	0,055	0,001	0,004	0,006

Při použití filtru $\lambda c = 1/20$						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,2367	3,4469	7,6836	1,8187	0,745	0,8972
150 x 150	4,6546	3,7091	8,3637	1,849	0,7525	0,9054
185 x 185	5,0277	3,7757	8,8033	1,8503	0,7481	0,904
210 x 210	5,2821	3,9474	9,2295	1,8331	0,7439	0,898
250 x 250	5,4992	4,2165	9,7158	1,8441	0,7465	0,9016
Průměr	4,94006	3,81912	8,75918	1,83904	0,74720	0,90124
Abs. odchylka	0,396	0,210	0,588	0,011	0,002	0,003
Rel. odchylka	0,080	0,055	0,067	0,006	0,003	0,003

Při použití filtru $\lambda c = 1/50$						
Plocha [pixel]	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
100 x 100	4,2872	3,3894	7,6766	1,6517	0,6618	0,819
150 x 150	4,4973	3,6602	8,1575	1,6722	0,6628	0,8203
185 x 185	5,1483	3,7843	8,9326	1,6575	0,6563	0,8156
210 x 210	5,4772	3,8512	9,3285	1,6657	0,6583	0,818
250 x 250	5,4813	4,29	9,7713	1,6658	0,6573	0,8178
Průměr	4,97826	3,79502	8,77330	1,66258	0,65930	0,81814
Abs. odchylka	0,469	0,220	0,685	0,006	0,002	0,001
Rel. odchylka	0,094	0,058	0,078	0,004	0,004	0,001

Příloha 3

Příloha obsahuje všechna další měření plošných parametrů [μm] prováděná při použití různých velikostí ploch.

Velikost plochy 100 x 100 pixel						
Filtr λ_c	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
0	4,5178	3,2372	7,755	1,9108	0,8025	0,9624
1/3	4,6461	3,1553	7,8014	1,9216	0,8067	0,9677
1/5	4,7146	3,2043	7,9189	1,8845	0,8014	0,9585
1/10	4,6705	3,3443	8,0148	1,904	0,7948	0,9537
1/20	4,2367	3,4469	7,6836	1,8187	0,745	0,8972
1/50	4,2872	3,3894	7,6766	1,6517	0,6618	0,819
Průměr	4,51215	3,29623	7,80838	1,84855	0,76870	0,92642
Abs. odchylka	0,167	0,097	0,106	0,076	0,044	0,046
Rel. odchylka	0,037	0,030	0,014	0,041	0,057	0,049

Velikost plochy 150 x 150 pixel						
Filtr λ_c	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
0	5,2019	3,7933	8,9952	1,9439	0,8159	0,9737
1/3	4,912	3,6181	8,5301	1,9273	0,8046	0,9607
1/5	4,9107	3,6614	8,5721	1,9193	0,8021	0,9574
1/10	4,7283	3,7446	8,473	1,9071	0,7859	0,9396
1/20	4,6546	3,7091	8,3637	1,849	0,7525	0,9054
1/50	4,4973	3,6602	8,1575	1,6722	0,6628	0,8203
Průměr	4,81747	3,69778	8,51527	1,86980	0,77063	0,92618
Abs. odchylka	0,191	0,051	0,184	0,073	0,042	0,042
Rel. odchylka	0,040	0,014	0,022	0,039	0,054	0,046

Velikost plochy 185 x 185 pixel						
Filtr λc	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
0	5,4306	3,7191	9,1497	1,9304	0,8098	0,9654
1/3	5,4579	3,7055	9,1634	1,9204	0,8032	0,9615
1/5	5,4085	3,7108	9,1193	1,9255	0,8019	0,9589
1/10	5,2429	3,7431	8,9861	1,9044	0,7837	0,9379
1/20	5,0277	3,7757	8,8033	1,8503	0,7481	0,904
1/50	5,1483	3,7843	8,9326	1,6575	0,6563	0,8156
Průměr	5,28598	3,73975	9,02573	1,86475	0,76717	0,92388
Abs. odchylka	0,146	0,028	0,118	0,074	0,043	0,043
Rel. odchylka	0,028	0,007	0,013	0,040	0,056	0,046

Velikost plochy 210 x 210 pixel						
Filtr λc	Sp	Sv	Sz	Sc	Sa	Sq
0	5,465	3,8163	9,2813	1,9244	0,8069	0,9631
1/3	5,4608	3,7357	9,1965	1,9093	0,8013	0,9545
1/5	5,4504	3,8406	9,291	1,9049	0,7973	0,9502
1/10	5,262	3,824	9,086	1,8989	0,7837	0,9341
1/20	5,2821	3,9474	9,2295	1,8331	0,7439	0,898
1/50	5,4772	3,8512	9,3285	1,6657	0,6583	0,818
Průměr	5,39958	3,83587	9,23547	1,85605	0,76523	0,91965
Abs. odchylka	0,085	0,044	0,065	0,071	0,043	0,041
Rel. odchylka	0,016	0,011	0,007	0,038	0,056	0,045