



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# CÍLENÁ MODIFIKACE HROTŮ VYUŽITELNÝCH PRO VYBRANÉ MĚŘICÍ MÓDY MIKROSKOPU ATOMÁRNÍCH SIL

CONTROLLED MODIFICATION OF TIPS USABLE FOR SELECTED MEASUREMENT MODES OF ATOMIC  
FORCE MICROSCOPY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Lišková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2024

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1955/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Kateřina Lišková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Cílená modifikace hrotů využitelných pro vybrané měřicí módy mikroskopu atomárních sil

### Zadání diplomové práce:

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na vhodnou (laboratorně dostupnou) modifikaci hrotů použitelných pro zobrazovací mód a/nebo silovou spektroskopii mikroskopu atomárních sil.
- Na základě literární rešerše vybrat jednu/dvě nejvhodnější modifikace hrotů a experimentálně ověřit možnost realizace.
- Modifikované hroty využít pro zobrazení povrchu různých materiálů (ideálně polotuhé materiály) a/nebo pro stanovení lokálních mechanických vlastností pomocí silové spektroskopie.
- Diskutovat možnosti využití cílové modifikace hrotů vedoucí ke kvalitnějším a spolehlivějším výsledkům z mikroskopu.
- Kriticky zhodnotit svoji práci a vyvozovat z výsledků logické závěry.

### Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Kateřina Lišková  
studentka

-----  
Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Předložená diplomová práce se zabývá modifikací hrotů standardně používaných v mikroskopii atomárních sil a jejich následným využitím ke stanovení mechanických vlastností vybraných hydrogelových systémů na lokální úrovni. Pro cílenou modifikaci byla vybrána metoda fixace mikročástice na nosník, který byl úspěšně modifikován pomocí částic melaminové pryskyřice. Nejdříve byly měřeny mechanické vlastnosti vybraného zástupce fyzikálně síťovaných hydrogelů (polysacharid agaróza), které byly hodnoceny na základě Youngova modulu pružnosti, adhezni síly a práce. Získané výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými pomocí dvou komerčně dostupných nosníků lišících se jak ve tvaru, tak v základních parametrech, jako je konstanta pružnosti a rezonanční frekvence. Následně byl ověřován vliv nastavené působící síly nosníku na vzorek (*Setpoint*). Využitelnost modifikovaných nosníků byla testována i na vybraném zástupci iontově síťovaných hydrogelů (alginát sodný síťovaný vícemocnými ionty). V rámci experimentální části diplomové práce bylo ověřeno, že použití nosníků s vyšší styčnou plochou vede ke spolehlivějším výsledkům z hlediska spolehlivosti a reprodukovatelnosti, vzhledem k tomu, že do finální hodnoty Youngova modulu je zahrnut nejenom příspěvek polymerního řetězce, ale i póru. Při stanovování mechanických hodnot je důležité uvést nejenom používaný nosník a jeho vlastnosti, ale také veškeré ostatní experimentální parametry, jejichž změna může ovlivnit finální hodnoty Youngova modulu stanovené na mikroúrovni mikroskopií atomárních sil.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mikroskopie atomárních sil, silová spektroskopie, modifikace hrotů, mechanické vlastnosti, Youngův modul pružnosti, hydrogely, polysacharidy.

## **ABSTRACT**

This master's thesis deals with the modification of tips commonly used in atomic force microscopy and their following utilization for determining the mechanical properties of selected hydrogel systems at the local level. For targeted modification, a method of micro-particle fixation on a cantilever was chosen, which was successfully modified using melamine resin particles. Initially, the mechanical properties of a selected representative of physically cross-linked hydrogels (agarose polysaccharide) were measured, which were evaluated based on the Young's modulus of elasticity, adhesive force, and work. The obtained results were compared with values measured using two commercially available cantilevers differing in both shape and basic parameters such as spring constant and resonance frequency. Subsequently, the influence of the setpoint force applied to the sample by the cantilever was verified. The usability of modified cantilevers was also tested on a selected representative of ionically cross-linked hydrogels (sodium alginate cross-linked with multivalent ions). Within the experimental part of the master's thesis, it was verified that the use of cantilevers with a higher contact area leads to more reliable results in terms of reliability and reproducibility, considering that the final value of the Young's modulus includes not only the contribution of the polymer chain but also the pores. When determining mechanical values, it is important to specify not only the cantilever used and its properties but also all other experimental parameters, the change of which may affect the final values of the Young's modulus determined at the micro level by atomic force microscopy.

## **KEYWORDS**

Atomic force microscopy, force spectroscopy, tip modification, mechanical properties, Young's modulus, hydrogels, polysaccharides.

LIŠKOVÁ, Kateřina. *Cílená modifikace hrotů využitelných pro vybrané měřicí módy mikroskopu atomárních sil*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156926>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Kateřina Lišková

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala zejména vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Martinu Kadlecovi, za jejich rady a pomoc při zpracování práce, nadšení pro vědu a vždy dobrou náladu. Poděkování patří také Ing. Šimonu Klimoviči za pomoc při průběhu modifikace. Velký vděk patří rodině a přátelům, za jejich psychickou podporu při celém studiu.*

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
2.1	Mikroskopie atomárních sil .....	9
2.1.1	Nosník AFM .....	10
2.1.2	Rezonanční frekvence a konstanta pružnosti .....	10
2.1.3	Kalibrace nosníku .....	11
2.2	Režimy zobrazování .....	12
2.2.1	Kontaktní režim .....	12
2.2.2	Pokleповý režim .....	12
2.2.3	Bezkontaktní režim .....	13
2.3	Silová spektroskopie .....	13
2.4	Výhody a omezení AFM .....	15
2.5	Modifikace hrotu a mikroskopie chemických sil .....	17
2.5.1	Aplikace mikroskopie chemických sil .....	18
2.5.2	Samouspořádané monovrstvy .....	18
2.5.3	Koloidní částice, mikrokuličky .....	20
2.5.4	Uhlíkové nanotrubičky .....	21
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>23</b>
3.1	Rychlá metoda přípravy modifikovaného hrotu pomocí SiO <sub>2</sub> kuličky .....	23
3.2	Měření interakcí hydrofobních částic ve vodných roztocích pomocí AFM .....	24
3.3	Výroba uhlíkových nanotrubicových AFM nosníků .....	24
3.4	Modifikace hrotu pomocí uhlíkových nanotrubiček dielektroforézou .....	26
3.5	Silanová modifikace nosníků Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	28
3.6	Měření tření mezi silanovými hroty a grafitem .....	29
3.7	Interakce hrot – substrát na modifikovaných alkanthiolových površích .....	30
3.8	Modifikace hrotu samouspořádanými monovrstvami .....	31
3.9	Shrnutí poznatků z literární rešerše o dané problematice .....	31
<b>4</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
5.1	Použité chemikálie .....	33
5.2	Použité přístroje .....	33
5.3	Použité nosníky .....	34

5.4	Příprava vzorků .....	37
5.4.1	Agarózový hydrogel .....	37
5.4.2	Alginátový hydrogel .....	38
5.5	Optimalizace modifikace nosníků.....	38
5.5.1	Modifikace nosníku pomocí polystyrenových částic.....	38
5.5.2	Modifikace nosníku pomocí částic melaminové pryskyřice.....	39
5.6	Mikroskopie atomárních sil .....	39
5.6.1	Nastavení měření .....	39
5.6.2	Měřicí režim ( <i>Contact Mode Force Mapping</i> ) .....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
6.1	Výsledky optimalizace modifikace nosníků .....	42
6.2	Rovnice používané pro výpočet Youngova modulu pružnosti .....	43
6.3	Měření mechanických vlastností agarózového hydrogelu .....	44
6.4	Vliv hodnoty <i>Setpointu</i> na Youngův modul pružnosti.....	51
6.5	Měření mechanických vlastností alginátového hydrogelu.....	52
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>66</b>
9.1	Seznam zkratek .....	66
9.2	Seznam symbolů .....	66

# 1 ÚVOD

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je velmi užitečná technika pro zkoumání povrchu materiálů na nanometrové úrovni jak v plynném, tak kapalném prostředí. Kromě trojrozměrného zobrazování povrchů s velkým rozlišením lze AFM použít pro stanovení mechanických vlastností materiálů v nanoměřítku (na lokální úrovni) za využití silové spektroskopie. Výsledky zkoumaných parametrů silně závisí na vlastnostech nosníku a hrotu, jako je například velikost, tuhost či materiál.

Modifikace hrotu umožňuje kontrolovat tyto vlastnosti, což může vést ke zlepšení citlivosti, rozlišení a funkčnosti AFM. Tato úprava rozšiřuje využití mikroskopie atomárních sil, přičemž lze sledovat interakce mezi definovaným hrotem a povrchem vzorku, či upravit měřicí sondu tak, aby byla vhodnější pro stanovenou aplikaci.

Cílem této diplomové práce je modifikovat hrot pomocí vybrané metody na základě literární rešerše, přičemž bylo zvoleno připevňování mikročástice na nosník. Experimentálně jej využít pro stanovení lokálních mechanických vlastností (Youngův modul, adhezní práce, adhezní síla) polotuhých materiálů, přičemž byl pro studium zvolen agarózový a alginátový hydrogel.

V teoretické části diplomové práce je popsána mikroskopie atomárních sil, zobrazovací režimy a silová spektroskopie. Dále jsou zde uvedeny výhody a omezení této techniky a rozepsány metody modifikace hrotů. Uvedená literární rešerše se věnuje postupům a využitím různých funkcionalizací hrotů a nosníků. Následující experimentální část se věnuje popisu používaných nosníků, chemikálií a přístrojů. Zahrnuje přípravu měřených vzorků, popisuje postup modifikace nosníků, nastavení přístroje a vyhodnocení naměřených dat. V závěrečné části práce jsou výsledky diskutovány.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM – *Atomic Force Microscopy*) je zobrazovací technika patřící do oboru mikroskopie skenovací sondou (SPM – *Scanning Probe Microscopy*), jež byla vyvinuta v roce 1986 Binnigem a kol. [1]. Rychle se stala populární metodou pro zobrazování vzorků a charakterizaci mechanických vlastností povrchů vzorků v nanoměřítku. AFM je považována za všestrannou a výkonnou mikroskopii, jelikož jako jediná poskytuje zobrazování jak vodivých, tak i nevodivých vzorků s vysokým rozlišením v atomovém měřítku [2].

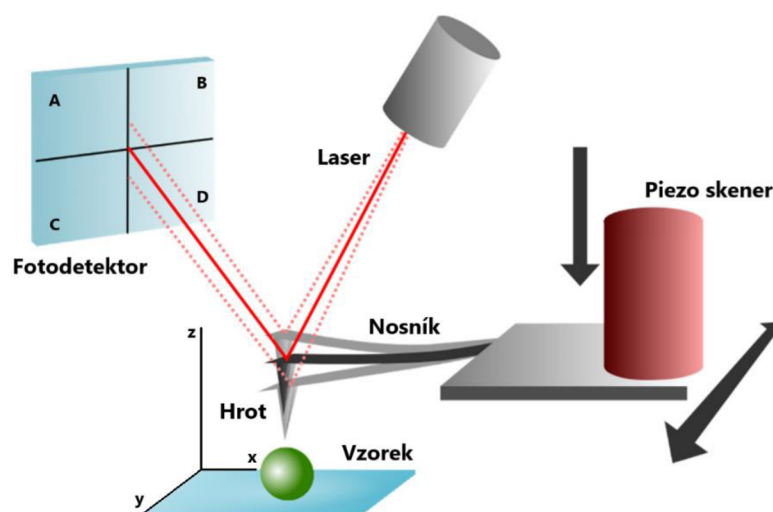
Princip AFM je založen na interakcích mezi povrchem vzorku a ostrým hrotem (*tip*), který je upevněn na ohebném nosníku (*cantilever*). Jakmile se nosník s hrotem přiblíží k povrchu vzorku, dojde k vychýlení nosníku směrem ke vzorku nebo od něj v závislosti na přitažlivých a odpuzivých působících silách (obrázek 1). Ohýbání nosníku ovlivňují interakční síly, jako jsou elektrostatické síly, van der Waalsovy síly nebo chemické vazby. Rastrováním povrchu pak dochází k ohybu nosníku také v horizontální poloze.

Vychýlení nosníku se měří pomocí odrazu laserového paprsku, který se odráží od zadní strany nosníku a dopadá na fotodetektor [3]. Míra ohybu nosníku odpovídá posunu laserového paprsku. Fotodetektor je rozdělen do 4 kvadrantů označených jako A, B, C a D. Vertikální výchylku (*vertical deflection*) lze vypočítat z horní a dolní poloviny detektoru a boční natočení nosníku (*lateral deflection*) lze vypočítat porovnáním levé a pravé poloviny detektoru. Celková výchylka nosníku je definována jako (1):

$$((A + B) - (C + D)). \quad (1)$$

Ta je pak normalizována na součet (2):

$$(A + B) + (C + D). \quad (2)$$



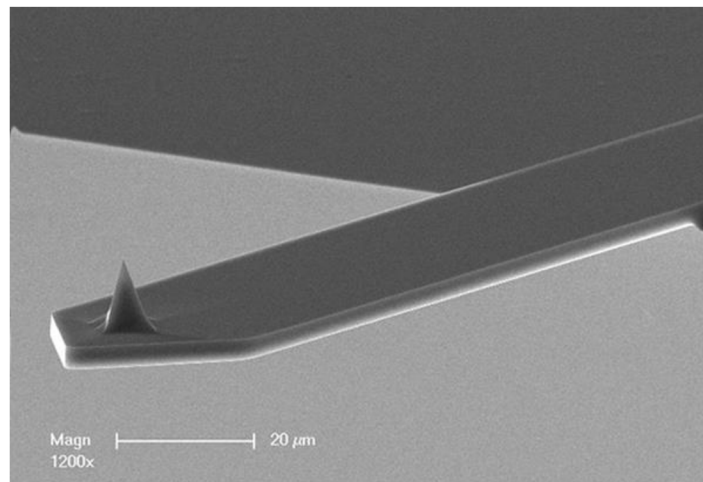
Obrázek 1: Princip mikroskopie atomárních sil [4].

Zpětnovazební regulační smyčka upravuje polohu nosníku v ose *z* tak, aby byla udržena konstantní výchylka nosníku, nebo konstantní působící síla mezi hrotem a povrchem vzorku.

Nosník je posouván po povrchu vzorku pomocí piezoelektrických skenerů a v každém bodě je měřen a zaznamenáván ohyb nosníku nebo síla. Tyto hodnoty jsou převedeny do počítačového programu, který je následně využije ke generování 2D i 3D obrazu povrchu vzorku nebo vyhodnocení dalších charakteristik, jako je míra adheze či Youngův modul [2].

### 2.1.1 Nosník AFM

Sonda AFM se skládá ze tří dílčích částí: čip, nosník a hrot. Čip slouží jako platforma pro uchycení nosníku s hrotem. Jedná se o tuhou část, která je uchopitelná pinzetou a je nainstalována do držáku sondy. Nosník je část, která je ohýbána na základě interagujících sil se vzorkem a definuje tuhost sondy. Hrot, nacházející se na konci nosníku, interaguje s měřeným vzorkem (obrázek 2) [5].



Obrázek 2: Nosník s hrotem zobrazen pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu [6].

Komerčně dostupné nosníky jsou vyráběny nejčastěji z křemíku, či nitridu křemíku. Vykazují spíše hydrofilní charakter, jelikož jsou pokryty aminovými a oxidovými polárními skupinami. V závislosti na aplikaci se volí nosník s vhodnými rozměry a materiály. Nosníky pro mikroskopii atomárních sil mají většinou tvar písmene V, aby byla zvýšena jejich boční tuhost. Obvykle mají délku 100–200  $\mu\text{m}$ , šířku 20–40  $\mu\text{m}$  a tloušťku 0,5–1  $\mu\text{m}$  [7]. Existuje však řada různých tvarů, přičemž výběr správné geometrie je klíčový parametr pro daný experiment. Nosníky s ostrými hroty lze použít k měření povrchu materiálů s drobnými detaily (například oblast buňky v nanometrovém měřítku), zatímco ploché nosníky bez hrotů jsou vhodné pro měření plochých vzorků [8].

Horní vrstva nosníku bývá pokryta reflexní vrstvou zlata pro zvýšení odrazivosti laserového paprsku do detektoru. Toho se využívá zejména při měření v kapalném prostředí, kde je snížena odrazivost nosníku z důvodu vyššího indexu lomu, než má vzduch. Čím více se světlo láme, tím méně se odrazí.

### 2.1.2 Rezonanční frekvence a konstanta pružnosti

Každý nosník je charakteristický svojí rezonanční frekvencí a konstantou pružnosti. Rezonanční frekvence nosníku se pohybuje v rozsahu od jednotek kHz až po několik stovek kHz. Vysoká rezonanční frekvence  $f_0$  umožňuje rychlé zobrazování povrchu vzorků. Pro pravoúhlé nosníky je dána vztahem (3):

$$f_0 = 0,162 \frac{t}{l^2} \sqrt{\frac{E}{\rho}}, \quad (3)$$

kde  $t$  je tloušťka nosníku,  $l$  je délka nosníku,  $E$  udává Youngův modul pružnosti a  $\rho$  představuje hustotu materiálu [9].

Konstanta pružnosti udává tuhost nosníku v N/m a lze ji vypočítat z geometrie nosníku. Pro nosníky ve tvaru písmene V se konstanta pružnosti vypočítá pomocí následující rovnice (4):

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{4L^3}, \quad (4)$$

kde  $w$  je šířka nosníku,  $t_c$  udává jeho tloušťku,  $E$  představuje Youngův modul a  $L$  je délka nosníku [10].

Avšak rozměry nosníku není snadné měřit a pro jejich stanovení je zapotřebí dobrý rastrovací elektronový mikroskop. Konstanty pružnosti a hustota materiálu jsou neurčité zejména u nosníku z nitridu křemíku. Nosníky jsou vyráběny chemickým napařováním, což vede k amorfni struktuře s nejasnou stechiometrií a zbytkovým napětím. Kromě toho se často vyskytuje na nosnících zlatý povlak, který také mění jeho mechanické vlastnosti. Výběr správné konstanty pružnosti je klíčový v závislosti na daném experimentu a měřeném vzorku. Nízká konstanta pružnosti je vhodná pro měkké vzorky, jelikož minimalizuje jejich deformaci a také významně zvyšuje citlivost měření síly, která je široce používána pro studium intramolekulárních interakcí mezi makromolekulami [11]. U nosníků s vysokou konstantou pružnosti může dojít k deformaci či poškození vzorku, aniž by došlo k jeho vychýlení [12].

### 2.1.3 Kalibrace nosníku

Před každým měřením je nutné provést kalibraci nosníku, což může být problematické, jelikož jeho tloušťka a mechanické vlastnosti vlivem pokovování nemusí být dobře známy a časem zpravidla dochází k mechanickému opotřebení nosníku. Navržené metody kalibrace lze rozdělit do čtyř kategorií. První kategorie je porovnání s referenčním nosníkem o známé tuhosti. Zahrnuje přiložení hrotu nosníku na úzký referenční nosník a změření polohy hrotu vzhledem k referenčnímu nosníku s určitou přesností pomocí optické mikroskopie. Tato metoda není vhodná pro kalibraci s vysokými konstantami pružnosti [13].

Další metodou kalibrace je měření tepelné fluktuace využívající volné vibrace nosníku. Jedná se o jednoduchou a široce používanou metodu, která je často implementována v mnoha komerčních AFM. Avšak často je nejasné, jak velkou část v tepelných vibracích tvoří hluk z okolí, což vede k systematickým chybám při výpočtu konstanty pružnosti [14].

Třetí metoda kalibrace je pomocí přidávání částic k nosníku. Tato metoda je složitá na provedení a často destruktivní. Připojenou částici je třeba samostatně zvážit, což je častým zdrojem chyb [15].

Poslední metoda stanovení konstanty pružnosti vychází z měření rezonanční frekvence, fyzikálních rozměrů a vlastností materiálu. Metoda je často využívána díky své jednoduchosti a nedochází při ní k poškození nosníku a hrotu [16].

## 2.2 Režimy zobrazování

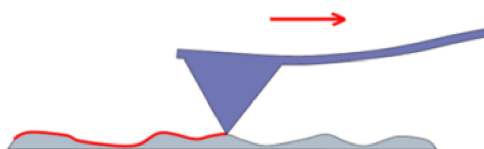
### 2.2.1 Kontaktní režim

Provozní režimy AFM byly vyvíjeny postupem času, kdy nejjednodušším z nich je kontaktní režim, známý také jako statický. Hrot nosníku se nepřetržitě dotýká povrchu skenovaného vzorku (obrázek 3). Působící síly mezi hrotem a povrchem vzorku v tomto režimu jsou van der Waalsovy odpudivé síly krátkého dosahu. Lze je vypočítat podle Hookova zákona na základě změn výchylky nosníku. V provozním režimu konstantní výšky (*Constant Height Mode*) skener mikroskopu udržuje pevný konec nosníku na hodnotě konstantní výšky. Vychýlení nosníku při skenování odráží topografii zkoumaného vzorku. Hlavní výhodou režimu konstantní výšky je rychlost skenování, která je omezena pouze rezonanční frekvencí nosníku. Nevýhodou je, že měřené vzorky musí být dostatečně hladké a při měření měkkých vzorků (polymery, biologické vzorky, hydrogely) může dojít k jejich zničení a poškrábání vlivem přímého kontaktu hrotu se vzorkem [17].

V provozním režimu konstantní síly (*Constant Force Mode*) je výchylka nosníku monitorována a udržována zpětnou vazbou na přednastavené hodnotě tak, aby byla udržena výchylka i síla konstantní, zatímco vertikální posun skeneru (výška nehybné části nosníku) se mění a udává topografii zkoumaného povrchu vzorku. Rychlost skenování je zde nižší, jelikož je omezena dobou odezvy systému zpětné vazby [18].

Kontaktní režim poskytuje vysoké rozlišení obrazu skenovacích povrchů, avšak častěji dochází k opotřebování nebo poškození hrotu a vzorku vlivem třecí síly. Tento režim není vhodný pro zobrazování měkkých biologických materiálů, neboť může dojít k jejich deformaci, což vede ke znehodnocení měření. Nejlepších výsledků je dosaženo na vzorcích s tvrdými povrchy [19].

Pro tento režim je vhodné použít dlouhé nosníky s nízkou konstantou pružnosti ( $<1 \text{ N/m}$ ) a nízkou rezonanční frekvencí ( $<15 \text{ kHz}$ ).

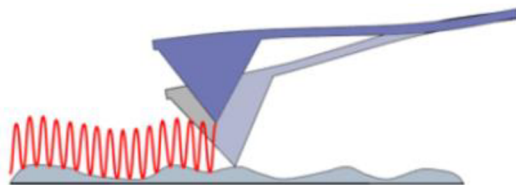


Obrázek 3: Kontaktní režim [20].

### 2.2.2 Poklepový režim

U poklepového režimu je nosník rozkmitán velmi blízko své rezonanční frekvence díky piezoelektrickému prvku instalovanému v AFM. Amplituda této oscilace je nastavena na hodnotu pohybující se kolem 100 nm. Nosník se dostává do cyklického kontaktu s povrchem vzorku a získává dostatek energie k odtržení se od něj. Změna amplitudy oscilace udává topografii povrchu (obrázek 4). Přestože se hrot nosníku dotýká vzorku pouze krátce, rozlišení je téměř srovnatelné s rozlišením kontaktního režimu. Kromě toho je poškození hrotu a vzorku minimalizováno díky velmi krátkému kontaktu. U velmi tvrdých vzorků však může dojít k poškození hrotu a nosníku v důsledku vysoké frekvence kmitání [21].

Pro tento režim se používají krátké nosníky s vysokými konstantami pružnosti ( $>40$  N/m) a vysokými rezonančními frekvencemi ( $>100$  kHz). Poklepový režim se používá pro zobrazování ve vzduchu i kapalném médiu, zejména pro měkké vzorky, které vyžadují vysoké rozlišení [22].

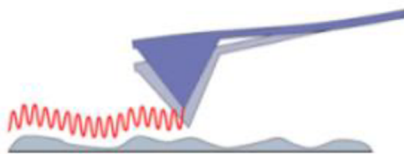


Obrázek 4: Poklepový režim [20].

### 2.2.3 Bezkontaktní režim

V bezkontaktním režimu nosník osciluje konstantní frekvencí mírně nad jeho rezonanční frekvencí (100–400 kHz) a amplituda kmitu je zde 1–10 nm. Nosník se pohybuje nad povrchem vzorku a jelikož nedochází ke kontaktu hrotu se vzorkem, nepůsobí zde žádné odpuzivé síly (obrázek 5). Nosník je tedy vychylován vlivem sil působících na velké vzdálenosti, kterými jsou zejména přitažlivé van der Waalovy síly. Jakmile se hrot více přiblíží k povrchu (do 10 nm), sníží se frekvence a amplituda oscilace. Zpětná vazba řídí pohyb skeneru ve směru osy  $z$  a posouvá nosník tak, aby oscilační frekvenci a amplitudu vrátila na původní hodnoty. Tato změna vzdálenosti je převedena jako topografie vzorku. Nevýhodou tohoto režimu je, že rychlost skenování je nižší než při kontaktním režimu a poskytuje nižší rozlišení [23].

Bezkontaktní režim zabraňuje destrukci vzorku, kontaminaci hrotu a značně snižuje tření mezi hrotem a vzorkem, což je výhodné při měření měkkých povrchů. Avšak při atmosférickém tlaku a pokojové teplotě se na vzorku vytváří tenká vrstva vody, která může způsobit nechtěný kontakt hrotu se vzorkem. Tomuto lze předejít při výběru tužšího nosníku o vysoké konstantě pružnosti (20–100 N/m) a vysoké rezonanční frekvenci, která zajistí rychlejší měření [22].



Obrázek 5: Bezkontaktní režim [20].

## 2.3 Silová spektroskopie

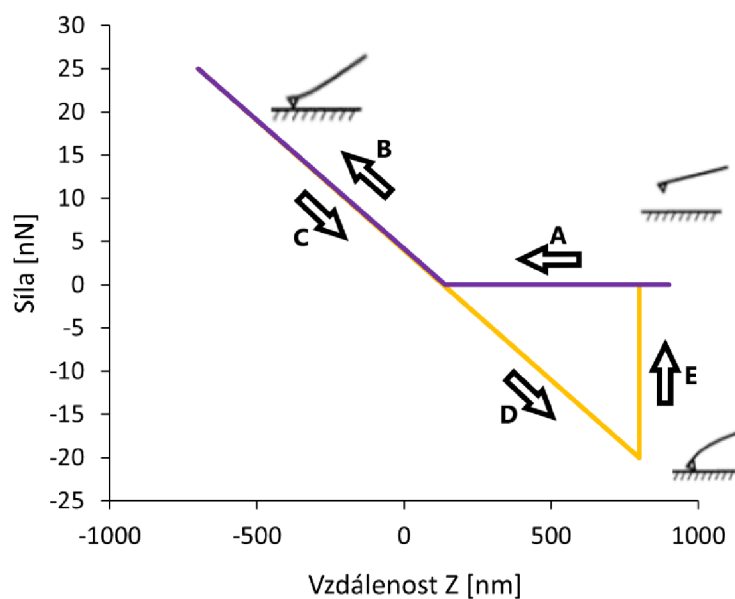
Potenciál AFM se neomezuje pouze na zobrazování, ale i na zaznamenávání působících sil již od 20 pN [24].

Silová spektroskopie zahrnuje měření sil mezi povrchem vzorku a hrotem. Poskytuje naměřené mechanické vlastnosti v nanoměřítku, jako je adheze, tuhost, elasticita nebo tření. Tyto mechanické vlastnosti lze získat převodem silových křivek na křivky síly jako funkce vzdálenosti mezi nosníkem a vzorkem. AFM je schopna získat křivky síla – vzdálenost na každém druhu povrchu a pro každý druh prostředí s vysokým bočním (25 nm), vertikálním

(0,01 nm) a silovým (1 pN) rozlišením. Spolehlivě charakterizovat vlastnosti vzorku vyžaduje přesné řízení interakce mezi hrotem a vzorkem, k čemuž je nezbytný hrot s dobře definovanou geometrií a chemií povrchu [25].

Křivky jsou poté analyzovány pomocí fyzikálních teoretických modelů, jako je například Hookův zákon určující tuhost nebo Hertzův model, pomocí kterého lze vypočítat Youngův modul pružnosti. Tyto modely budou řešeny níže, u rovnice (5) [26].

Křivka síla – vzdálenost neboli silová křivka zobrazuje vertikální ohyb nosníku v závislosti na aplikované síle. Tento ohyb se měří mezi vzorkem a pevně přichycenou druhou stranou nosníku. Fialová křivka znázorňuje pohyb nosníku směrem ke vzorku a oranžová křivka znázorňuje oddalování nosníku od vzorku (obrázek 6). Pokud je nosník a vzorek daleko od sebe, nepůsobí mezi nimi žádné síly (oblast A). Jakmile se nosník přibližuje ke vzorku, mezi hrotem a vzorkem působí přitažlivé síly, což způsobuje vychýlení nosníku směrem ke vzorku (záporná přitažlivá síla). Když přitažlivá síla překoná konstantu pružnosti, hrot se dostane do kontaktu s povrchem vzorku (oblast B). Hrot je v odpudivém kontaktu se vzorkem a přední strana nosníku je tlačena směrem od vzorku. Adheze mezi hrotem a vzorkem udržuje kontakt, i když je zde přítomna síla tahu nosníku (oblast C, D). Nakonec tahová síla překoná adhezi a hrot se vytrhne z kontaktu se vzorkem (oblast E). Tato tahová síla může sloužit jako měřítko adheze [27, 28].



Obrázek 6: Křivka síla – vzdálenost [28].

Existuje několik teorií popisujících elastickou deformaci vzorku. Nejznámější tři teorie vyvinuli Hertz, Johnson-Kendall-Roberts (JKR) a Derjaguin-Müller-Toporov (DMT) [29, 30].

Nejrozšířenějším matematickým modelem pro stanovení modulu pružnosti je Hertzův model, který je definován jako (5):

$$F = \frac{4E}{3(1 - \nu^2)} \sqrt{R} (D)^{3/2}, \quad (5)$$

kde  $F$  je aplikovaná síla na vzorek,  $D$  je vtažení neboli hloubka vtisku,  $R$  je poloměr hrotu,  $E$  je Youngův modul a  $\nu$  je Poissonovo číslo, což je konstanta, která popisuje odezvu

materiálu na deformaci při mechanickém namáhání. Jedná se o poměr mezi relativní změnou šířky a relativní změnou délky materiálu při jeho deformaci. Typické hodnoty Poissonova čísla se pro většinu materiálů pohybují od 0 do 0,5 [31]. V Hertzově modelu je adheze vzorku zanedbána, zatímco ostatní dvě teorie ji berou v úvahu vně (DMT) nebo uvnitř (JKR) kontaktní plochy. Hertzova teorie může být aplikována pouze tehdy, když je adhezní síla mnohem menší než maximální zatížení. Teorii JKR lze aplikovat v případě velkých hrotů a měkkých vzorků s velkou adhezí, kdežto teorii DMT v případě malých hrotů a tuhých vzorků s malou adhezí [32].

## 2.4 Výhody a omezení AFM

Mikroskopie atomárních sil poskytuje jedinečné rozlišení, které umožňuje měření a zobrazování v nanoměřítku. Dokáže zobrazovat nejmenší detaily na subnanometrové či atomové úrovni. Pro měření lze použít jakýkoliv vzorek přes tvrdé materiály, jako je sklo, keramika, až po měkké a biologické vzorky, jako jsou polymery, biomolekuly, buňky a tkáně. Další velkou výhodou je to, že skenování vzorků může probíhat v různých prostředích, jako je vzduch, dusík, ale i kapalném prostředí, což je využíváno zejména pro měření biologických systémů a polotuhých hydratovaných vzorků (hydrogely). Výsledné snímky zahrnují 3D topografii, tudíž lze charakterizovat drsnost povrchu, měřit tloušťku filmu nebo analyzovat povrchové defekty. Kromě měření povrchu je AFM schopná poskytnout informace o mechanických vlastnostech v nanoměřítku, jako je elasticita, tuhost a adheze. Jelikož se jedná o nedestruktivní techniku, AFM nevyžaduje žádné barvení nebo značení substrátu, či pokovování vzorků jako tomu je u rastrovací elektronové mikroskopie. Dalším benefitem je, že AFM může pracovat za okolních podmínek bez zdlouhavé přípravy vzorků.

I mikroskopie atomárních sil má však několik omezení a nevýhod, které musí být optimalizovány podle specifických požadavků experimentu. Jedná se o pomalou zobrazovací techniku, kde získání snímku s vysokým rozlišením může trvat několik desítek minut až pár hodin, což je velká překážka u experimentů citlivých na čas, zejména u měření biologických vzorků [2]. Další nevýhodou je omezená životnost nosníků. Ty se mohou časem nebo během měření zničit, což může zvýšit celkové náklady na experiment. Nežádoucím efektem je silový drift nosníku, což je významný problém v mikroskopii atomárních sil. Bylo zjištěno, že hlavním zdrojem silového driftu je samotný nosník a často používané zlaté povlaky na horní straně [33]. Základním předpokladem pro měření sil v AFM je ten, že nosník ohýbají pouze působící síly. Síla  $F$  se určí pomocí Hookova zákona (6):

$$F = -k \Delta z . \quad (6)$$

$$F = -k (z_{\text{hrot}} - z_0) , \quad (7)$$

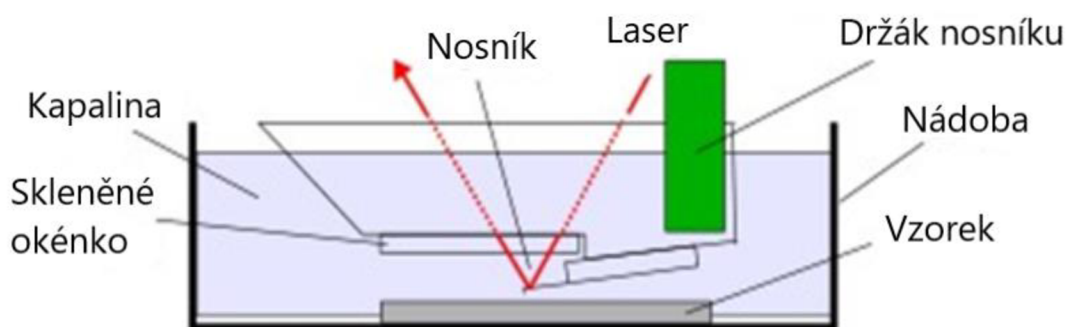
kde  $k$  je konstanta pružnosti a  $z_{\text{hrot}}$  určuje okamžitou výchylku hrotu. Z toho vyplývá, že poloha hrotu s nulovým zatížením  $z_0$  nezávisí na čase. Bylo však zjištěno, že  $z_0$  není konstantní a výrazně se pohybuje [34]. Tento silový drift je způsoben zejména zlatým povlakem na horní straně nosníku, který se používá pro lepší odraz laseru do fotodiody, a tím

je získán větší signál. Vyskytuje se zde však nežádoucí jev, a to bimetalický efekt. Jde o fyzikální jev, díky kterému jsou konzoly s jednostranným povlakem velmi citlivé na změny teploty a vzniká nepříznivý ohyb [35]. Kromě toho adsorpce látek nebo elektrochemické reakce v kapalném prostředí mírně mění povrchové napětí obou ploch. Tyto změny povrchového napětí nejsou stejné na spodní a horní straně, takže tento rozdíl taktéž způsobuje ohyb nosníku. Odstranění zlata sice vede k několikanásobnému snížení odraženého světla, ale je tak docíleno udržení konstantní polohy hrotu s nulovým zatížením [36].

Měření je citlivé na okolní podmínky, jak na teplotu a vlhkost prostředí, tak i na otřesy a vibrace z okolí. Všechny tyto aspekty mohou negativně ovlivnit měření a způsobit artefakty na snímcích. Artefakty mohou vznikat i při měření v pokleповém nebo kontaktním režimu, kdy povrch vzorku obsahuje ostré prvky s poloměrem menším než poloměr hrotu, měřený obraz se poté skládá z kombinace tvaru hrotu a povrchu. Když se hrot dotýká povrchu vzorku, může dojít k poškození nebo deformaci vzorku, zejména u měkkých substrátů [17]. Opotřebení hrotu může zvětšit jeho poloměr, což snižuje kvalitu obrazu a může také vést ke zvýšení adheze mezi hrotem a vzorkem [37].

Při zobrazování realizovaném v okolním vzduchu se podél rozhraní hrot – vzorek vytvoří kapalný meniskus, zejména kvůli hydrofilní povaze hrotu vyrobeného z křemíku. Vzniklá kapilární síla může být několikrát větší než součet ostatních přítomných sil. Pro snížení či eliminaci této síly se měření provádí v kapalině [38].

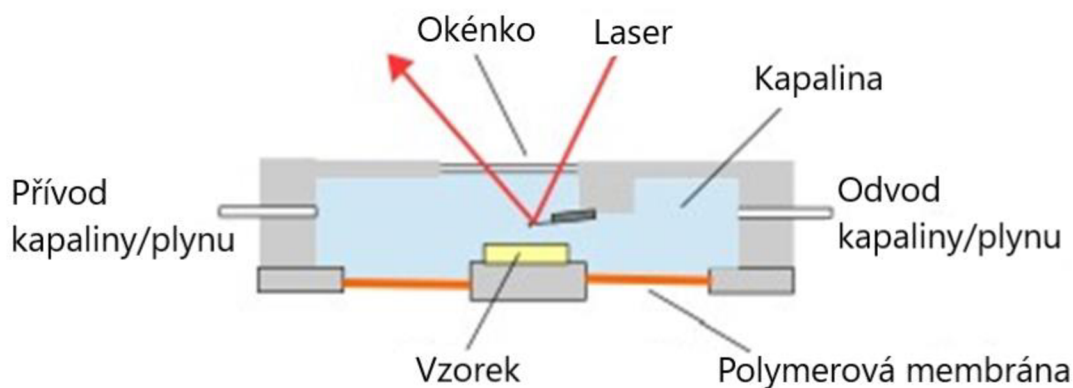
I zde mohou nastat problémy, kdy přítomnost kapaliny může ovlivnit stabilitu nosníku a vnést do měření šum. K překonání tohoto problému se používají kapalinové cely (*liquid cell*), kde je eliminována povrchová kontaminace a je možné zobrazování biologických vzorků *in situ* [39].



Obrázek 7: Otevřená kapalinová cela [39].

V otevřené cele je vzorek i nosník uložen v malé nádobě s malým množstvím kapaliny (obrázek 7). Nosník je umístěn na speciálním držáku se skleněným okénkem.





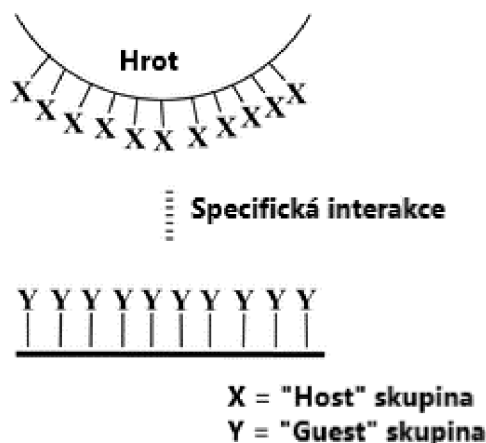
Obrázek 8: Uzavřená kapalinová cela [39].

Uzavřená kapalinová cela neboli environmentální cela je tvořena nahoře skleněnou deskou a dole polymerovou membránou (obrázek 8). Vzorek a nosník jsou umístěny v dolní a horní části cely. Cela se utěsní a kapalina je přivedena dovnitř. Uzavřenou celu lze použít i pro měření v inertním plynném prostředí, avšak v praxi je její použití mnohem těžší než použití otevřené cely. Získání snímků s uzavřenou celou může trvat i několik dní [39].

## 2.5 Modifikace hrotu a mikroskopie chemických sil

Hlavní nevýhodou mikroskopie atomárních sil je nedostatečný zisk chemických informací, což neumožňuje identifikaci chemických funkčních skupin na povrchu nebo mapování prostorové distribuce těchto chemických funkčních skupin na povrchu vzorku. Informace o chemické povaze materiálu mají velký význam v oblasti tribologie, biokompatibilitě, adhezi mezi polymery a kovy a v chemickém rozpoznávání. Hroty, používané pro AFM zobrazování nebo silovou spektroskopii, mohou být funkcionalizovány živými buňkami, inertními částicemi nebo biomolekulami, což otevírá nové možnosti pro měření specifických interakcí mezi modifikovanými hroty a povrchy vzorků [40].

Použití chemicky funkcionalizovaných hrotů pro AFM zobrazování se nazývá mikroskopie chemických sil (CFM), která umožňuje měřit nekovalentní chemické a biologické interakce jako funkci vzdálenosti hrot – vzorek a zkoumat funkční skupiny v rozsahu mikro až nanoměřítku [41].



Obrázek 9: Chemicky modifikovaný hrot s funkčními skupinami X tvořící specifickou interakci s funkčními skupinami Y na povrchu vzorku [42].

Mikroskopie chemických sil měří adhezi, respektive třecí síly mezi funkčními skupinami na hrotu nosníku (X) a funkčními skupinami navázanými na povrchu substrátu (Y) za využití specifických interakcí, jako jsou hydrofobně – hydrofilní interakce, vodíkové vazby, van der Waalsovy síly nebo coulombické interakce (obrázek 9). To umožňuje modifikovanému hrotu generovat kontrast mezi oblastmi obsahujícími různé chemické funkční skupiny a poté mapovat jejich prostorovou distribuci na povrchu [42].

### 2.5.1 Aplikace mikroskopie chemických sil

Mikroskopie chemických sil je technika, která kombinuje silovou citlivost AFM s chemickým rozlišováním. Toho je dosaženo modifikací nosníku s kovalentně připojenými molekulami, které jsou zakončeny funkčními skupinami nebo biologickými molekulami. Použitím vhodné modifikace hrotu lze dosáhnout chemicky specifického měření povrchu na základě definované interakce hrot – vzorek. Doposud byly povrchové úpravy hrotu využity ke zkoumání základních adhezních a třecích sil na rozhraní pevná látka – kapalina a biologických interakcí [43]. Dále byla mikroskopie chemických sil využita v materiálovém výzkumu pro stanovení pKa povrchových funkčních skupin, zkoumání chemických vlastností a chemických reakcí v místním měřítku na povrchu vzorku, natahování biomolekul, přímé měření mezimolekulárních sil v roztoku a zobrazení hydrofilních a hydrofobních kontrastů [44].

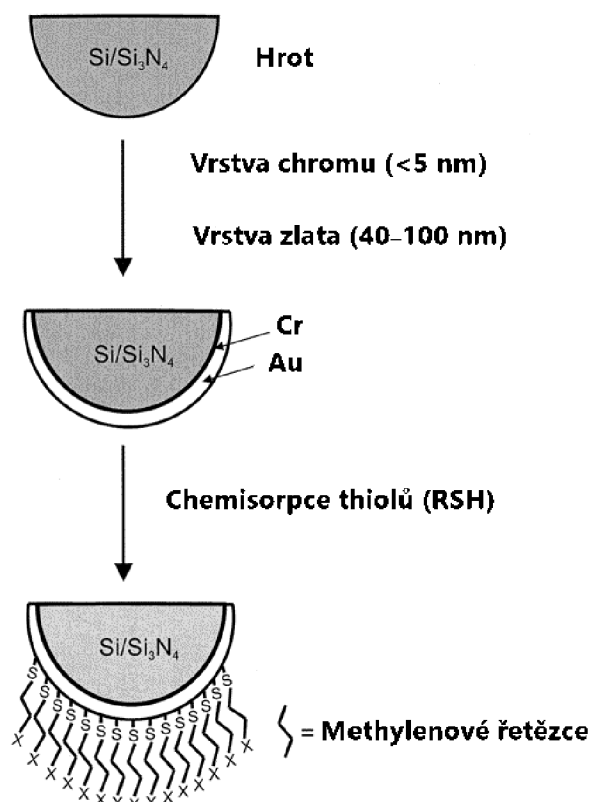
### 2.5.2 Samouspořádané monovrstvy

V mikroskopii chemických sil jsou často používané samostatně sestavené monovrstvy (SAM – *self-assembled monolayer*). Jedná se o upořádané molekulární sestavy vytvořené adsorpcí povrchově aktivní látky na pevném povrchu. Tvoří se jednoduchým ponořením substrátu do roztoku povrchově aktivní látky, kde hnací silou pro tvorbu 2D vrstvy je tvorba chemických vazeb molekul s povrchem a mezimolekulární interakce [45].

#### *Alkanthioly*

Uspořádané monovrstvy thiolů na zlatě jsou široce používány od doby, kdy je před 14 lety objevili Nuzzo a Allara [46]. Thioly obsahují na jednom konci thiolovou skupinu (SH), nazývanou také „merkaptó“ skupina. Jejich obecná chemická struktura je R–SH nebo  $R(CH_2)_nSH$ , pokud obsahují alkylový řetězec. Alkanthioly se spontánně vážou na zlato a tvoří těsně sbalenou krystalickou nebo tekutě krystalickou monovrstvu (obrázek 10) [46].

Zlato je relativně inertní kov, který nemá stabilní povrchový oxid, tudíž jej lze jednoduše očistit od fyzikálně a chemicky adsorbovaných nečistot. Poskytuje silnou specifickou interakci se sírou, která umožňuje tvorbu stabilních monovrstev [47].



Obrázek 10: Modifikace hrotu pomocí thiolové monovrstvy,  $R$  v  $RSH$  představuje alkylový řetězec s koncovou skupinou  $X$  ( $X=CH_3, COOH, OH, NH_2$ ) [48].

Modifikace hrotu pomocí alkanthiolových monovrstev v prvním kroku zahrnuje pokrytí hrotu vrstvou zlata (40–100 nm) napařováním nebo napařováním. Pro zvýšení adheze zlaté vrstvy k nitridu křemíku se nanáší tenká vrstva chrómu nebo titanu o tloušťce 2–5 nm. Poté se hroty ponoří do zředěného thiolového roztoku (0,1–1,0 mM) na několik hodin. Vhodné rozpouštědlo se volí podle rozpustnosti daného alkanthiolu. Nejčastěji používané rozpouštědlo je ethanol [47]. Alkanthioly se adsorbují z roztoku na povrchy ušlechtilých kovů a vytvářejí jednovrstvé filmy s hydrofobním povrchem, vysokou stabilitou při pokojové teplotě a s výrazně nižší povrchovou energií, než má povrch samotného kovu [49].

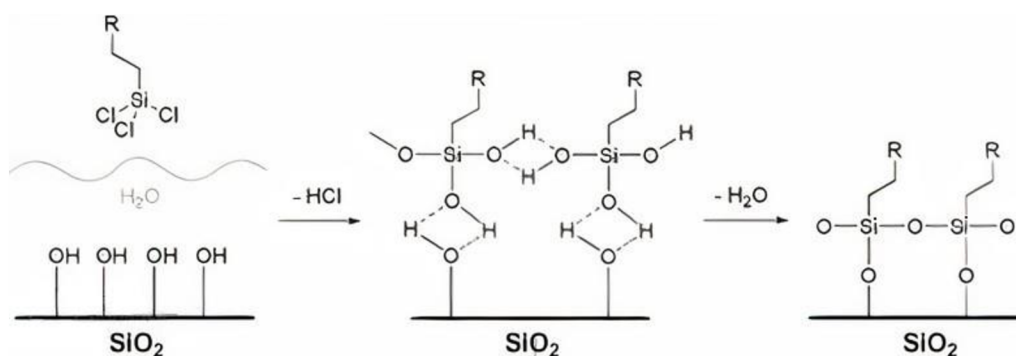
Adsorpci alkanthiolů na povrchu zlata lze považovat za oxidační adici vazby S–H na povrch zlata, po níž následuje redukční eliminace vodíku. Vazba je velmi silná a desorpce organosíry z povrchu zlata je velmi pomalá [45].

Samouspořádané monovrstvy (SAM) jsou považovány za slibný molekulární systém pro mnoho technologických aplikací díky své snadné přípravě, vysokému strukturnímu řádu, stabilitě a snadné modifikaci povrchových vlastností pomocí funkčních skupin, jako je karboxyl (–COOH), hydroxyl (–OH), methyl (–CH<sub>3</sub>), acetát (–COCH<sub>3</sub>), nebo amino (–NH<sub>2</sub>) skupina [27].

Nevýhodou této modifikace je, že poloměr hrotu se může výrazně zvětšit vlivem pokovování, což může vést ke snížení rozlišení. Během pokovování je nutné se vyvarovat zahřívání nosníku, jelikož rozdíly v koeficientech tepelné roztažnosti zlata a nitridu křemíku mohou způsobit jeho nevratné ohnutí [50].

## Silany

Alkylsiloxany jsou další široce používanou třídou molekul, schopných tvořit samouspořádané monovrstvy. Aktivní koncovou skupinou je  $\text{SiR}_3$ , kde R je obvykle chlor, ethoxy ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), nebo další skupiny [51]. Nejčastěji jsou využívány trichlorsilany. Silanizační reakce je založena na naroubování alifatických řetězců na povrch oxidu křemičitého za vzniku organosilanových vrstev (obrázek 11). Před modifikací musí být povrchy křemíkových hrotů očištěny, aby bylo vytvořeno více vazebných hydroxylových skupin na povrchu a odstraněny organické kontaminanty. Pro očištění je využíván Piranha roztok, nebo ošetření ozonem s následným promytím alkalickými a kyselými roztoky [52].



Obrázek 11: Průběh silanizační reakce [53].

Silanizační reakce probíhá ve třech krocích. V prvním kroku jsou alifatické řetězce fyzikálně adsorbovány prostřednictvím trichlorsilanových skupin na povrch hydratovaného oxidu křemičitého. Jakmile jsou trichlorsilanové skupiny dostatečně blízko substrátu, dojde k hydrolyzaci. V důsledku toho se alifatické řetězce vážou pomocí vodíkových vazeb k silanolovým skupinám na povrchu substrátu. Po eliminaci vody jsou alifatické řetězce připojeny k povrchu oxidu křemičitého skrze  $\text{Si-O-Si}$  kovalentní vazby za vzniku polysiloxanových monovrstev. Tato metoda mění chemii povrchu bez nutnosti pokovování [54].

Vytvořené organosilanové monovrstvy (SAM) lze dále modifikovat přímo na hrotu. K tomu jsou často využívány amino skupiny pro navázání různých biologických ligandů, jako je antigen či protilátka. Pomocí AFM pak lze studovat vazebné síly působící mezi nimi [55].

Modifikace křemíkových hrotů pomocí organosilanových vrstev je jednoduchý a nenáročný způsob, jak změnit strukturu skenovacího hrotu, avšak je nutné zmínit i několik nevýhod. Používané trichlorsilany a trialkoxysilany jsou velmi citlivé na vlhkost, tudíž může dojít k jejich hydrolyzaci dřív, než k fyzikální adsorpci na povrch křemíku a jsou tak náchylné k mechanickému odstranění. Nelze také odhadnout počet vzniklých silanolových skupin, jelikož se vyskytují potíže s řízením procesu polymerace alkylsilanu během hydrolyzy na povrchu. Vlivem toho nelze zjistit přesnou tloušťku a složení alkylsilanové vrstvy na povrchu hrotu [56].

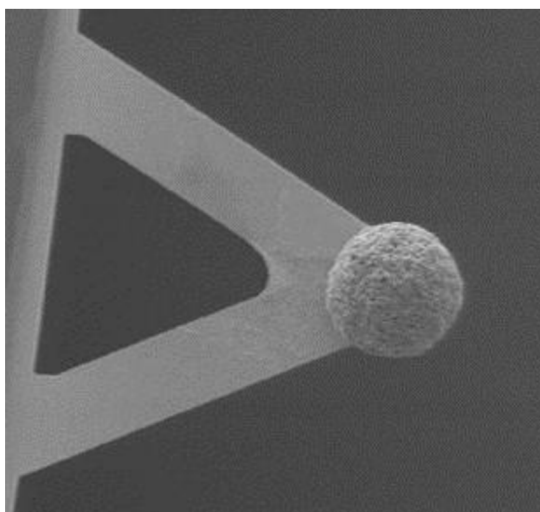
### 2.5.3 Koloidní částice, mikrokuličky

Dalším oblíbeným způsobem úpravy hrotu je připevnění kuličky o velikosti stovek nanometrů až jednotek mikrometrů přímo na hrot nosníku AFM. Jde o techniku koloidní sondy. Tento

způsob byl poprvé demonstrován Duckerem a kol. [57], kteří přilepovali kuličku oxidu křemičitého na hrot pomoci mikromanipulátoru.

Existuje mnoho způsobů výroby mikrokuliček, často však tyto mikrokuličky vykazují nerovný povrch. Částice mohou být potaženy vrstvou fyzikálně absorbovaných nebo vázaných molekul, která je udržuje v disperzi a zabraňuje agregaci [26].

V současné době jsou nejpoužívanějšími částicemi pro modifikaci hrotu mikrokuličky oxidu křemičitého. Zejména kvůli tomu, že jejich povrch je relativně hladký a lze jej snadno modifikovat, což je využíváno zejména v biologických výzkumech kvůli široké škále kovalentních vazebných reakcí, které lze použít k navázání peptidů, proteinů, oligonukleotidů a dalších biologických materiálů na povrch kuličky [58].



Obrázek 12: Nosník s přilepenou částicí MgO o velikosti 65  $\mu\text{m}$  [59].

Existují různé způsoby jak přilepit mikrokuličku k nosníku. Nejčastěji jde o lepení například pomocí termoplastů, což jsou nezesíťované polymery, které tají při určité teplotě (obrázek 12). Dále se často používá epoxid s přísadkou rozpouštědla, čímž dochází ke snížení jeho viskozity a při odpaření se epoxid vytvrdí. Alternativou jsou dvousložková epoxidová lepidla, která se po smíchání zesíťují. Velkou nevýhodou používání lepidel je kontaminace nosníku [30].

Zavedení techniky koloidní sondy otevřelo nové možnosti pro studium mezičásticových sil a interakce mezi mikrometrovými částicemi a povrchy. To vedlo k velké rozmanitosti výzkumu založeného na této metodě [60].

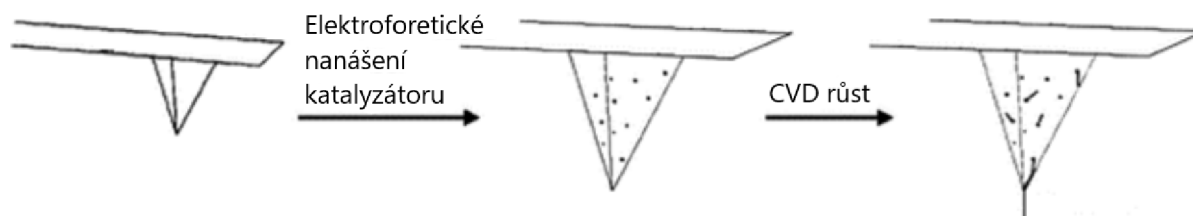
#### 2.5.4 Uhlíkové nanotrubičky

Běžně komerčně dostupné nosníky obsahují pyramidové hroty s poloměrem zakřivení 10–50 nm. Takto velký poloměr zakřivení omezuje účinnost hrotů při zobrazování malých útvarů na povrchu měřeného vzorku. Existují ostré hroty s menším poloměrem zakřivení (5 nm), avšak takové hroty vykazují omezenou stabilitu v důsledku vysoké křehkosti [61].

Uhlíkové nanotrubičky (CNT) jsou vhodné pro použití jako hroty nosníku pro mikroskopii atomárních sil díky jejich extrémně velkým poměrům stran a chemické a mechanické odolnosti. Jejich malý poloměr zakřivení (2–4 nm) a vysoké poměry stran poskytují zlepšení bočního rozlišení [62]. Při velkých kompresních silách se CNT ohýbají bez zlomení a když je

aplikovaná síla odstraněna, CNT obnoví svoji původní konformaci s malou nebo žádnou plastickou deformací [63].

Hroty lze modifikovat přímou mechanickou montáží vícevláknových (MWCNT) či jednovláknových (SWCNT) uhlíkových nanotrubiček na křemíkové hroty pomocí akrylového lepidla. Dalším způsobem je pěstování jednotlivých nanotrubiček přímo na hrotech pomocí chemického nanášení z plynné fáze (CVD) [64].



Obrázek 13: Modifikace hrotu SWCNT pomocí CVD [64].

Jde o metodu pro výrobu 2D nanomateriálů na různých substrátech. Při této metodě se často používají kovové katalyzátory, které slouží jako centra růstu pro nanotrubičky. Mezi nejčastěji používané katalyzátory patří nikl, kobalt a železo. Ty jsou nanášeny ve formě malých nanočástic na substrát před zahájením procesu CVD. Prekurzorové materiály jsou ve formě páry podrobeny reakci nebo rozkladu na substrátu ve vakuu za zvýšené teploty. Na substrátu následně probíhá růst uhlíkových nanotrubiček, jejichž směr růstu může být ovlivněn různými parametry, jako jsou teplota, tlak a doba expozice (obrázek 13) [65].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V odborné literatuře je popsáno několik metod, které lze využít pro modifikaci hrotu mikroskopu atomárních sil. Modifikace ovlivňují vlastnosti hrotu a schopnost provádět měření na atomární úrovni. Velmi často zahrnují připevnění uhlíkových nanotrubiček či jiné mikročástice na nosník nebo ponoření nosníku do roztoků alkylsilanů či thiolů, za vytvoření samouspořádaných monovrstev. Různé způsoby modifikace se liší jak metodou přípravy a použitých chemikálií či procesů, tak aplikací těchto modifikovaných hrotů. Každá modifikace závisí na konkrétních cílech a požadavcích experimentu.

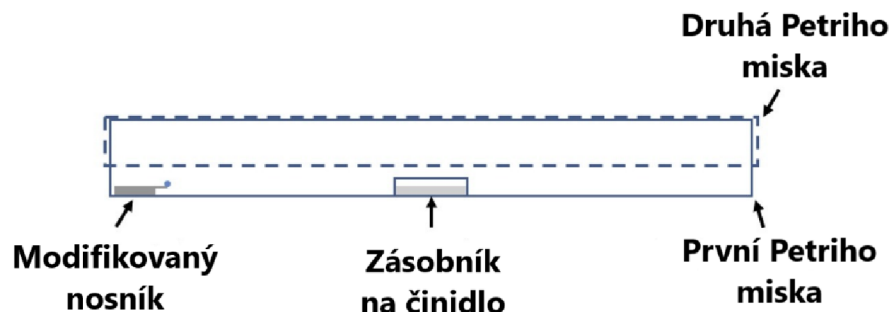
#### 3.1 Rychlá metoda přípravy modifikovaného hrotu pomocí SiO<sub>2</sub> kuličky

V této studii se Babel a kol. [66] zabývali postupem přípravy hydrofobně modifikovaného nosníku pro měření adhezní síly na površích vzorků. Dále byla pozornost věnována recyklaci neboli odstranění částice z hrotu za použití nedestruktivní metody. Koloidní částice na hrotu může podléhat kontaminaci nebo může docházet k degradaci její funkcionalizační vrstvy, což omezuje životnost a reprodukovatelnost nosníku při měření silových interakcí.

Byly používány kuličky oxidu křemičitého o průměru 19,59 μm dodané společností Microparticles GmbH. Částice byly dispergovány v ethanolu a ošetřeny v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut pro odstranění kontaminace a poté byly vyčištěny plazmou v kyslíkové atmosféře. Takto připravené částice byly nanášeny na vzorek křemíku, který byl zalit do epoxidové pryskyřice, předem leštěn, sonifikován v deionizované vodě a opláchnut ethanolom.

Následně bylo na krycí sklíčko nanášeno UV lepidlo (Ber-Fix® UV Gel), které bylo rozetřeno druhým sklíčkem do tenké vrstvy. Nosník byl dán do hlavice AFM a namočen do lepidla. Poté byla hlavice posunuta nad částice SiO<sub>2</sub>, kdy došlo k přilepení částice k nosníku. Nakonec došlo k vytvrzení lepidla pod UV lampou a čištění plazmou.

Nosníky byly umístěny na Petriho misku obsahující zásobník na činidlo a byly dány do sušárny o teplotě 115 °C, kde probíhala funkcionalizace nosníku. Nejprve bylo do zásobníku přidáno 50 μl silanu, Petriho miska byla přikryta druhou Petriho miskou a funkcionalizace probíhala po dobu 2 hodin (obrázek 14). Po odpaření bylo do zásobníku přidáno 100 μl vody pro vytvrzování.



Obrázek 14: Schéma funkcionizace nosníku v Petriho miskách [66].

Pomocí modifikovaného nosníku byla měřena adheze mezi nosníkem a povrchem vzorku SiO<sub>2</sub>. Vzorek byl funkcionalizován surfaktantem Aerosol22 v 60 ml 10<sup>-2</sup> mol/l roztoku KCl

o pH 3 upraveného pomocí HCl. Silové působení (*Setpoint*) mezi nosníkem a povrchem vzorku bylo nastaveno na 75 nN.

Při recyklaci, tedy oddělení částice od nosníku, bylo využíváno plazmové čištění. Po plazmovém čištění může být částice odstraněna z nosníku vodou, ethanolem nebo acetonem. Pro zabránění možné kontaminace reflexního povrchu nosníku při oplachování je možné použít mikromanipulátor [66].

### 3.2 Měření interakcí hydrofobních částic ve vodných roztocích pomocí AFM

V následující studii Naoyuki Ishida [67] měřil pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) interakční síly mezi částicí oxidu křemičitého a malou vzduchovou bublinou ve vodných roztocích.

V této práci byly použity sférické částice oxidu křemičitého o průměru 4–10  $\mu\text{m}$ . Před použitím byly částice promyty v zahřátém ethanolovém roztoku po dobu 10 minut a následně ponořeny 10 minut do 5 obj. % roztoku peroxidu vodíku. Poté byly částice opláchnuty teplou čistou vodou a ponořeny do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,005 mol/l. Nakonec byly oplachovány čistou vodou do té doby, než bylo výsledné pH neutrální. Poté byly sušeny po dobu 12 hodin ve vakuu a uloženy do exsikátoru.

Vyčištěná částice byla přilepena k nosníku z nitridu křemíku (SN-AF01, 100  $\mu\text{m}$ ) pomocí epoxidového lepidla (Araldite). Následně došlo k hydrofobizaci částice a to tak, že byl modifikovaný nosník ponořen do 0,003 M roztoku dodecyltrichlorsilanu (DTS) v toluenu. Poté byl promyt chloroformem, acetonem, ethanolem a vakuově vysušen.

Pro odhadnutí stupně hydrofobizace nosníků byly stejně upraveny desky z oxidu křemičitého a pomocí goniometru byl měřen kontaktní úhel metodou přisedlé kapky. Hydrofobní povrch vykazoval úhel větší než 90°. Konstanty pružnosti použitých nosníků se pohybovaly od 0,2 do 0,4 N/m.

Jelikož byly částice i bublina záporně nabitě, naměřené silové křivky vykazovaly odpudivou sílu ve velkých vzdálenostech. Po odpudivé síle působila mezi povrchy dlouhá přitažlivá síla [67].

### 3.3 Výroba uhlíkových nanotrubicových AFM nosníků

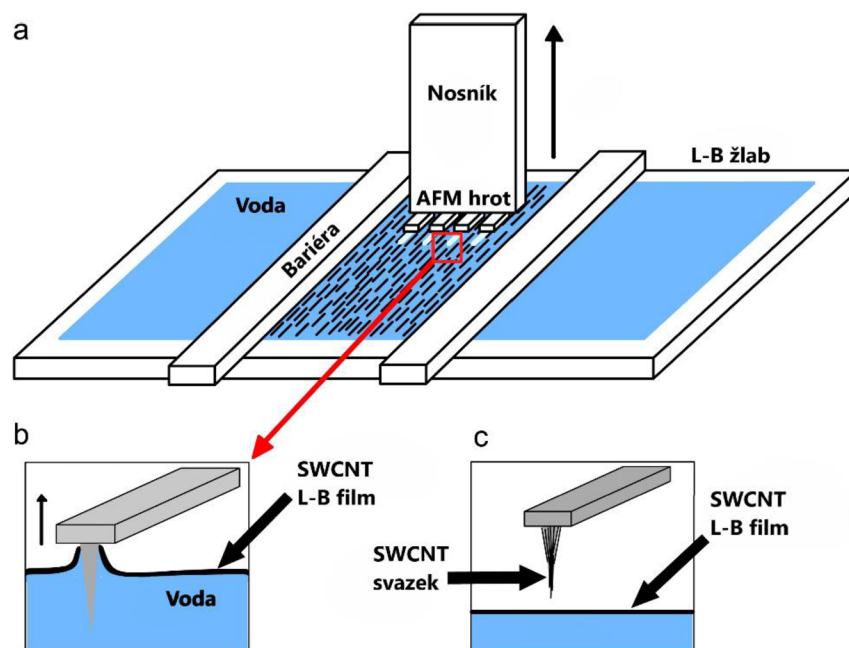
Jae-Hyeok Lee a kol. [68] modifikovali nosníky uhlíkovými nanotrubicemi pomocí Langmuir–Blodgett techniky.

Použité jedностěnné uhlíkové nanotrubice (SWCNT) byly vyrobeny pomocí metody obloukového výboje. Nanotrubice byly karboxylovány chemickou oxidací ponořením do roztoku směsi koncentrované kyseliny sírové (98 hm. %) a kyseliny dusičné (70 hm. %) v objemovém poměru 1:3. Reakční směs byla sonifikována po dobu 4 hodin při 70 °C. Následně byla zfiltrována přes 0,2  $\mu\text{m}$  pórovitý anodisk a promývána deionizovanou vodou do dosažení pH 7. Získané SWCNT byly po dobu 1 hodiny dispergovány v ultrazvukovém sonifikátoru 100 ml povrchově aktivního činidla Triton X-100 o 2,5 hm. %. Po sonifikaci byl roztok SWCNT centrifugován po dobu 4 hodin při 6 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl poté dekantován a roztok SWCNT byl opět zfiltrován přes 0,2  $\mu\text{m}$  pórovitý anodisk a promyt methanolem pro odstranění povrchově aktivní látky. Získané karboxylované SWCNT následně reagovaly s 4-aminothiofenolem v přítomnosti



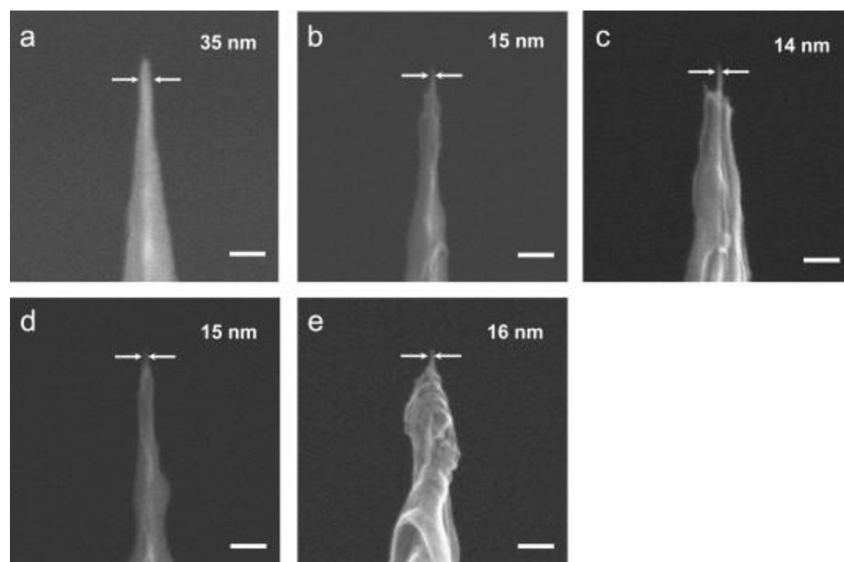
1-[2-(dimethylamino)propyl]-3-ethylkarbodiimid hydrochloridu a N-hydroxysukcinimidu za vzniku SWCNT modifikované thiofenylem (SWCNT-SH). Následně byly rozpuštěny v chloroformu.

Nosníky AFM byly umístěny na vodní hladinu a vzorek byl opatrně rozptýlen na toto rozhraní voda – vzduch. Po odpaření rozpouštědla zůstaly hydrofobní svazky SWCNT na rozhraní voda – vzduch a následně byly bariéry stlačeny do vytvoření tlaku 50 mN/m. Pomocí této metody byly SWCNT nanесeny na nosníky AFM (obrázek 15). Pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu bylo ověřeno uchycení SWCNT na hrot nosníku.



Obrázek 15: Experimentální uspořádání pro výrobu SWCNT modifikovaných hrotů pomocí Langmuir–Blodgett techniky [68].

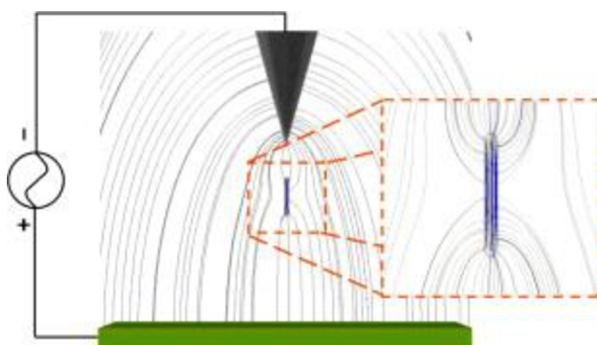
Bylo zjištěno, že SWCNT-SH se sestavují do svazků o délce 1  $\mu\text{m}$  a průměru 15–20 nm. Tato metoda přinesla mnoho výhod, jednou z nich je správná orientace SWCNT na konci nosníku (obrázek 16). Navázané SWCNT na nosník jsou mechanicky stabilní díky silným interakcím mezi svazky. Další výhodou je možnost hromadné výroby, jelikož se využívá velká plocha souvislého Langmuirova filmu SWCNT, do kterého lze ponořit více nosníků najednou [68].



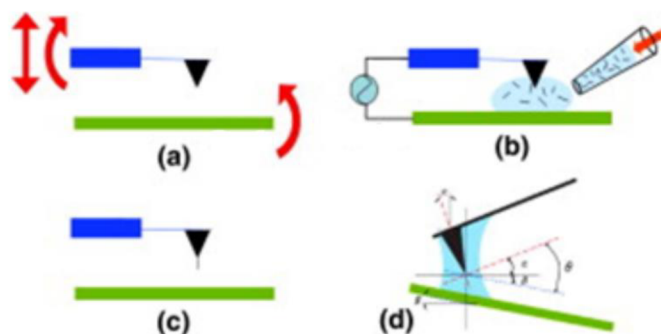
Obrázek 16: Snímky modifikovaných hrotů pomocí uhlíkových nanotrubic [68].

### 3.4 Modifikace hrotu pomocí uhlíkových nanotrubiček dielektroforézou

Park a kol. [69] se úspěšně podařilo modifikovat hrot uhlíkovou nanotrubicí (CNT) pomocí dielektroforézy. Uhlíková nanotrubička byla použita jako polarizovatelná částice, která měla dipólový moment způsobený střídavým polem. Jakmile byly uhlíkové nanotrubičky rozptýleny do média a elektrické pole bylo aplikováno na médium, polarizované CNT se přesunuly do oblasti silného pole a uhlíkové nanotrubičky byly vyrovnány podél elektrické siločáry (obrázek 17). Hrot měl ostrý tvar a protielektroda byla ve tvaru destičky. Tato nesymetrická geometrie způsobila nejednotné elektrické pole a v důsledku toho se CNT v médiu přesunuly na konec hrotu nosníku, kde byla největší intenzita pole.

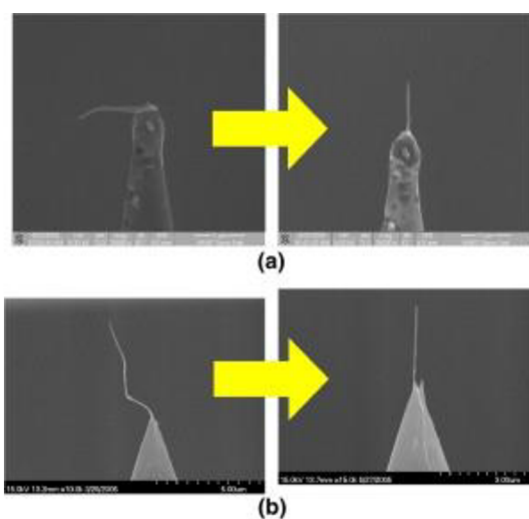


Obrázek 17: Schéma znázorňující siločáry elektrického pole mezi hrotem a destičkou [69].



Obrázek 18: Schéma experimentálního zařízení pro nanášení CNT na hrot AFM pomocí dielektroforézy [69].

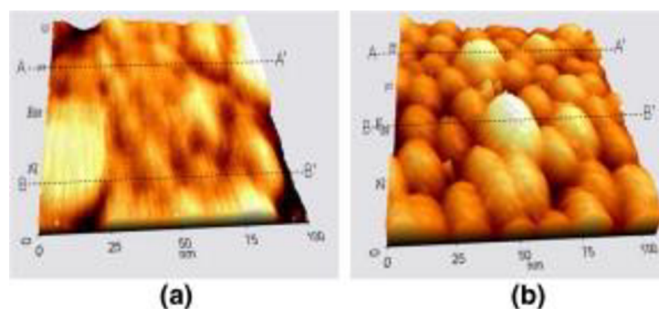
Použitý roztok obsahoval CNT purifikované působením kyseliny a centrifugací. Elektrické části obsahovaly ohmmetr a funkční generátor. Poté, co bylo aplikováno elektrické pole z funkčního generátoru, bylo nakapáno malé množství roztoku mezi hrot a elektrodu, přičemž bylo nutné dávat pozor na to, aby do roztoku nebyla ponořena horní vrstva nosníku, jež umožňuje odraz laseru do fotodetektoru. Poté bylo vyčkáno několik minut na vyschnutí rozpouštědla a ulpění nanotrubičky na hrot (obrázek 18).



Obrázek 19: Řízení směrovosti a přímosti CNT pomocí FIB [69].

Pro úpravu směru CNT na hrotu byl použit fokusovaný iontový paprsek (FIB). Při zaostření iontového paprsku na hrot uhlíková nanotrubička nejen změnila směr do vzpřímeného tvaru, ale dochází k jejímu narovnání (obrázek 19).

Pro ověření funkčnosti modifikovaných hrotů byly měřeny zlaté částice o velikosti 10 až 20 nm, které byly rozprostřeny na křemíkovém substrátu. Povrch vzorku byl měřen v bezkontaktním režimu a získané snímky byly porovnány se snímky získanými pomocí měření s komerčně dostupnými hroty.



Obrázek 20: Snímky AFM pořízené v bezkontaktním režimu komerčním hrotem (a) a modifikovaným CNT hrotem (b) [69].

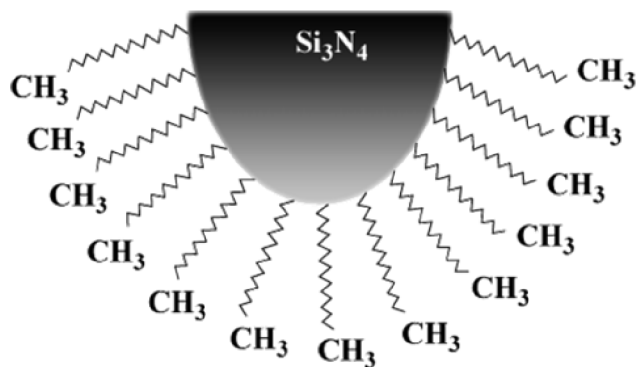
Snímek vlevo (obrázek 20) získaný pomocí komerčně dostupného hrotu neposkytuje zobrazení menších detailů, jelikož poloměr hrotu je na zobrazování tak malých částic příliš velký. Na snímku vpravo získaného pomocí modifikovaného hrotu s CNT lze vidět jednotlivé částice a jejich velikosti dosahující 20 nm. Po zkontrolování modifikovaného hrotu pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu bylo ověřeno, že hrot ani uhlíková nanotrubičky nebyly měřením poničeny [69].

### 3.5 Silanová modifikace nosníků $\text{Si}_3\text{N}_4$

V další studii byla zkoumána metoda pro výrobu modifikovaných nosníků pomocí trichlorsilanů tvořících stabilní samouspořádanou monovrstvu (SAM) na povrchu nosníku z nitridu křemíku. Headrick a kol. [70] používali pyramidální hroty  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ve tvaru písmene V s poloměrem hrotu 5–40 nm od společnosti Veeco. Konstanty pružnosti činily 0,06 N/m a 0,32 N/m. Jako měřené substráty byly použity leštěné křemíkové plátky.

Nosníky byly vyčištěny buď opláchnutím chloroformem nebo ponořením do zahřátého Piranha roztoku (110 °C) směsi kyseliny sírové (95,5 obj. %) a peroxidu vodíku (30 obj. %) v poměru 7:3 po dobu 15–20 minut.

Hroty a vzorky byly odmaštěny a vyčištěny v chloroformu a ponořeny na jednu minutu do 49 % roztoku HF k odstranění nativní oxidové vrstvy. Poté byly opláchnuty deionizovanou vodou. Hroty byly ponechány na vzduchu 10–15 minut a vzorky byly vysušeny proudícím dusíkem. Přes noc byly nosníky i vzorky ponořeny do roztoků oktadecyltrichlorsilanu (OTS) o koncentraci 2,0 mM nebo (11-bromundecyl)trichlorsilanu (BrTS) o koncentraci 5,0 mM. Roztoky alkylsilanů byly připraveny ve směsi rozpouštědel hexadekanu a chloroformu v objemovém poměru 4:1. Hroty a vzorky byly po odstranění z roztoků alkylsilanů opláchnuty chloroformem a vysušeny.



Obrázek 21: Znárodnění hrotu z nitridu křemíku potaženého filmem SAM zakončeným methylovou skupinou [70].

Pro sledování změn v povrchové chemii hrotů  $\text{Si}_3\text{N}_4$  po silanizaci byl použit rastrovací elektronový mikroskop. K potvrzení tvorby monovrstev alkylsilanů na površích vzorků byl měřen kontaktní úhel a byla provedena elipsometrická měření pro charakterizaci tloušťky monovrstev.

Byla měřena adhezní síla ve vodném prostředí mezi hroty modifikovanými pomocí OTS a nativními substráty (slída, grafit,  $\text{SiO}_2$ ) a vzorky potaženými methylem a SAM (obrázek 21). Velká adhezní síla byla naměřena mezi hroty zakončenými methylem a hydrofobními povrchy. Menší síly byly naměřeny na slídě, oxidovaném křemíku a monovrstvách modifikovaných karboxylovými skupinami.

Silné adhezní interakce pozorované ve vodě mezi hydrofobními hroty a hydrofobními vzorky jsou přisuzovány silám vzniklé vyloučením rozpouštědla. Když jsou hrot i vzorek chemicky podobné rozpouštědлу, adhezní síly jsou minimální.

Při měření adhezní síly ve vodě mezi modifikovanými hroty pomocí monovrstev vede k menším odpudivým silám na slídě, křemíku a monovrstvách zakončených karboxylovou funkční skupinou, než na monovrstvách zakončených methylovou skupinou.

Jelikož je těžké zabránit či kontrolovat kontaminaci hrotu a zničení monovrstvy během měření, je obvyklé zaznamenávat velké odchylky, což omezuje reprodukovatelnost [70].

### 3.6 Měření tření mezi silanovými hroty a grafitem

V následující studii se Khalil a kol. [71] zabývali rozdílem tření mezi komerčně dostupnými a modifikovanými hydrofobními hroty a grafitem. Byly použity nosníky vyrobené z nitridu křemíku. Hroty byly modifikovány pomocí silanů. Aby se vytvořily silné vazby, muselo být roubování silanů prováděno pouze na hrotech, které byly předem hydroxylovány.

Hroty byly ponořeny do roztoku Piranha připraveného ze 70 % kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96 hm. %) a 30 % peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 hm. %). Roztok byl zahříván na 50 °C po dobu 30 minut. Hroty byly vyčištěny dvakrát destilovanou a deionizovanou vodou v ultrazvukové lázni a poté vysušeny dusíkem. Hroty se tak staly velice hydrofilními s vysokou hustotou silanolových skupin ( $\text{Si-OH}$ ). Po provedené hydroxylaci byly hroty umístěny na 12 hodin do roztoku tetrachlormethanu a hexadecyltrichlorsilanu v poměru 3:1. Tento krok byl proveden v ultrazvukové lázni, aby se odstranily silany, které nebyly naroubovány nebo fyzikálně absorbovány. Takto připravené modifikované hroty byly hydrofobní.

Následně bylo sledováno tření mezi modifikovanými hroty a grafitovým povrchem. Bylo zjištěno, že použití hydrofobního modifikovaného hrotu vyvolává menší tření, než bylo naměřeno při měření s hydrofilním neošetřeným hrotem. Zvýšení kontaktního zatížení vedlo ke zvýšení tření, zatímco změny rychlosti skenování neměly na změny tření žádný vliv [71].

### 3.7 Interakce hrot – substrát na modifikovaných alkanthiolových površích

Vegte a kol. [42] pozorovali interakce mezi funkcionalizovaným nosníkem a substrátem, jako jsou vodíkové vazby, van der Waalsovy síly a Coulombické interakce mezi hrotem a substrátem. K modifikaci nosníků byly použity samouspořádané alkanthiolové monovrstvy a substráty s různými funkčními skupinami ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  a  $-\text{CONH}_2$ ). Pomocí Johnson-Kendall-Robertsovy (JKR) teorie adhezni mechaniky byly vypočteny povrchové volné energie a počet interagujících molekul a sil v jedné vazbě. Z měření bočních sil byly stanoveny koeficienty tření a byla prokázána přímá závislost mezi třením a naměřenými adhezni silami. Byla měřena adhezni síla závislá na pH a bylo prokázáno, že lze stanovit hodnoty pKa povrchových ionizovatelných skupin.

Na komerčně dostupné nosníky z nitridu křemíku byla nejprve nanášena malá vrstva chromu o tloušťce 2 nm, která sloužila k lepší adhezi zlata. Následně bylo nanášeno malé množství zlata (75 nm) za použití tepelného výparníku. Pro zabránění ohybu nosníku byla jeho zadní část taktéž potažena zlatem o tloušťce 40 nm.

Byly používány substráty, které byly vyrobeny tepelným odpařováním zlata na čerstvě rozštěpené slídě. Slidový plátek byl zahříván ve vakuové komoře výparníku po dobu 6 hodin při tlaku 0,01 Pa a 400 °C.

Po aplikaci zlata byly nosníky i substráty umístěny do 1–3 mM roztoku požadovaného thiolu v ethanolu po dobu 12 hodin. Těsně před použitím byly substráty a nosníky vyjmuty a opláchnuty ethanolom a vysušeny v proudu plynného dusíku.

Pro modifikaci substrátu s různými funkčními skupinami byl používán mikrokontaktní tisk ( $\mu\text{CP}$ ). Polydimethylsiloxanová razítka (PDMS) obsahovala funkční skupiny ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  a  $-\text{CONH}_2$ ) a různé alkanthioly.

Všechna měření byla prováděna v ethanolu nebo ve vodě pomocí zařízení Topometrix Explorer AFM s otevřenou kapalinovou celou.

Silové interakce mezi funkcionalizovaným hrotem a modifikovaným substrátem byly zkoumány pomocí křivek síla – vzdálenost. Přitažlivá síla v části křivky udává adhezi mezi hrotem a vzorkem. U hrotu, který je modifikovaný skupinou  $\text{CH}_3$ , byly zjištěny malé adhezni síly, jelikož zde hrají roli pouze van der Waalsovy síly. U skupin, které jsou schopny vázat vodík ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  a  $-\text{CONH}_2$ ), byly naměřeny větší adhezni síly.

Z výpočtů pomocí teorie JKR bylo zjištěno, že interakce vodíkových vazeb (např. skupina  $\text{CONH}_2$  a skupina  $\text{COOH}$ ) mají malé nebo dokonce záporné mezifázové energie, které vedou k vysokým adhezni silám. Zatímco van der Waalsovy síly (např. skupina  $\text{CH}_3$  a skupina  $\text{CONH}_2$ ) vykazují vysoké mezifázové volné energie, tudíž malé adhezni síly. Kombinace hrot – substrát s vodíkovou vazbou vykazovaly vysoké koeficienty tření a van der Waalsovy síly nízké koeficienty tření. Závislost pH na adhezni síle byla prokázána pomocí interakcí  $\text{COOH}$  skupin mezi hrotem a substrátem. Při nízkých hodnotách pH ( $\text{pH} = 1\text{--}4$ ) jsou skupiny kyselin stále protonovány a za velikost naměřené adhezni síly je zodpovědná vodíková vazba.

Jakmile se pH zvyšuje, COOH skupiny se deprotonují a stávají se záporně nabité. Jelikož mají hrot i vzorek stejnou funkční skupinu COOH, hrot i vzorek se nabíjí záporně, což má za následek odpuzivý Coulombický příspěvek k celkové adhezivní síle mezi hrotem a vzorkem. Čím větší je pH, tím je větší odpuzivá síla a snižuje se adhezivní síla [42].

### **3.8 Modifikace hrotu samouspořádanými monovrstvami**

Vezenov a kol. [72] využili mikroskopii chemických sil (CFM) ke studiu adhezivních sil mezi povrchy epoxidové pryskyřice a samouspořádanými monovrstvami (SAM). Byl zkoumán i vliv kapalného prostředí, ve kterém bylo prováděno měření.

Použité substráty byly křemíkové substrátové disky (wafery) potažené adhezivní vrstvou chrómu o tloušťce 5 nm a následně zlatem o tloušťce 100 nm pomocí tepelného výparníku s elektronovým paprskem. Byly používány nosníky s hroty z nitridu křemíku ve tvaru písmene V od společnosti Veeco, které byly potaženy chrómem a zlatem. Použité thioly pro přípravu monovrstev byly čištěny rekrystalizací nebo vakuovou destilací. Thiolátové monovrstvy byly vytvořeny hned po nanesení kovů a ponořením do 2–3 mM roztoku ethanolu s funkcionalizovanými thioly po dobu 2 hodin. Smíšené monovrstvy kyseliny 16-merkaptoundekanové a hexadekanthiolu na hrotech AFM byly vytvořeny ponořením do 1 mM celkové koncentrace thiolu v ethanolovém roztoku. Tvorba monovrstvy byla ověřena rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS) a měřením kontaktního úhlu na plochých křemenných substrátech potažených zlatem nebo stříbrem.

Během měření byl zaznamenáván průhyb nosníku, který byl přepočten na sílu pomocí konstanty pružnosti nosníku. Adhezivní interakce mezi různými funkčními skupinami byly stanoveny z křivek síla – vzdálenost. Bylo zjištěno, že u polárních samouspořádaných monovrstev vede vyšší obsah vody ke snížení adheze, kdežto u nepolárních samouspořádaných monovrstev nastává opačný jev [72].

### **3.9 Shrnutí poznatků z literární rešerše o dané problematice**

Z literární rešerše bylo zjištěno, že mezi často používané metody modifikace nosníků mikroskopu atomárních sil patří nanesení thiolové či silanové monovrstvy na nosník. To je využíváno například pro rozpoznávání biomolekul či studium chemických reakcí na molekulární úrovni za pomoci funkcionalizace hrotu různými biomolekulami či ligandy. Dalším typem je připevnění částice na konec nosníku, čemuž bude věnována pozornost v experimentální části. Modifikace nosníku byla využita pro měření lokálních mechanických vlastností povrchu různých hydrogelů. Výsledky měření pomocí modifikovaných nosníků byly srovnány s komerčně dostupnými nosníky.

## 4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat rešerši zaměřenou na vhodnou modifikaci hrotů použitelných pro silovou spektroskopii mikroskopu atomárních sil. Na základě zmíněné rešerše vybrat nejvhodnější metodu modifikace hrotů a experimentálně ověřit možnost realizace v místě pracoviště (FCH VUT). Modifikované hroty následně využít pro stanovení lokálních mechanických vlastností vybraných materiálů pomocí silové spektroskopie.

Jako druh modifikace byla vybrána metoda fixace částice na nosník. Tato modifikace byla vybrána za účelem stanovení mechanických vlastností hydrogelů na mikroúrovni, jejichž charakteristikou se zabývá výzkumná skupina Biokol na FCH VUT. Toto měření se provádí pomocí silové spektroskopie s využitím kontaktního módu. Měření komerčně dostupnými ostrými hroty v kontaktním režimu vede nejen k poškození vzorku a hrotu, ale bylo předpokládáno, že se jednou měřicí hrot dostane do póru a jednou měří povrch polymerního řetězce, což by mohlo vést k velkým směrodatným odchylkám měřených mechanických vlastností, jako je například Youngův modul pružnosti. Pro zvýšení reprodukovatelnosti výsledků je nutné rozdíly v měření póru respektive řetězce eliminovat. Toho jsme chtěli dosáhnout právě zmíněnou modifikací nosníku.

Pomocí modifikovaného nosníku byla kromě Youngova modulu pružnosti měřena i adhezní práce a síla 2 hm. % agarózového hydrogelu a 1 hm. % alginátového hydrogelu, jakožto důležité parametry charakterizující mechanické vlastnosti materiálů. Získané výsledky byly porovnány s naměřenými výsledky pomocí komerčně dvou dostupných nosníků. Jeden typu SNL-10 obsahoval ostrý hrot s poloměrem 2 nm, zatímco druhý typu MLCT-SPH-10UM-DC obsahoval místo hrotu 10  $\mu\text{m}$  kuličku.



## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této diplomové práce popisuje použité chemikálie, nosníky, metody při modifikaci nosníků a práci s mikroskopem atomárních sil. Součástí experimentální části je i ucelený přehled informací týkajících se především modifikace nosníků a pokročilé práce s mikroskopem atomárních sil. Vše je sepsáno stylem, aby čtenář diplomové práce mohl předloženou experimentální část použít jako návod pro práci s AFM a případně pro modifikaci nosníků.

### 5.1 Použité chemikálie

- Agaróza  
Sigma-Aldrich  
CAS: 9012-36-6  
EEO: 0,23–0,27
- Demineralizovaná voda  
Milli-Q  
PURELAB-flex, ELGA-LabWater, USA
- Destilovaná voda
- Polystyrenové částice (PS), 1  $\mu\text{m}$   
Sigma-Aldrich  
89904-5ML-F
- Isopropylalkohol  
PENTA s.r.o.  
CAS: 67-63-0  
Číslo šarže: 2404080419
- Epoxid  
AKASEL A/S  
Sériové číslo: 25101117  
Šarže: MJXLE
- Vytvrzovadlo  
AKASEL A/S  
Sériové číslo: 25101213  
Šarže: LRURX
- Částice melaminové pryskyřice (MF-R), 5  $\mu\text{m}$   
microParticles GmbH

### 5.2 Použité přístroje

- Mikroskop atomárních sil  
Bruker  
JPK NanoWizard® 4
- Magnetická míchačka s ohřevem  
Heidolph Instruments MR Hei-Tec
- Analytické váhy  
Ohaus Pioneer PA214CM

- Analytické váhy  
Denver Instrument SS4A

### 5.3 Použité nosníky

Ze zkušeností z předešlé vypracované bakalářské práce byly vybrány následující komerční nosníky. Ty se liší jak tvarem a velikostmi, tak vlastnostmi, které mají vliv na měření.

#### TESPA-V2

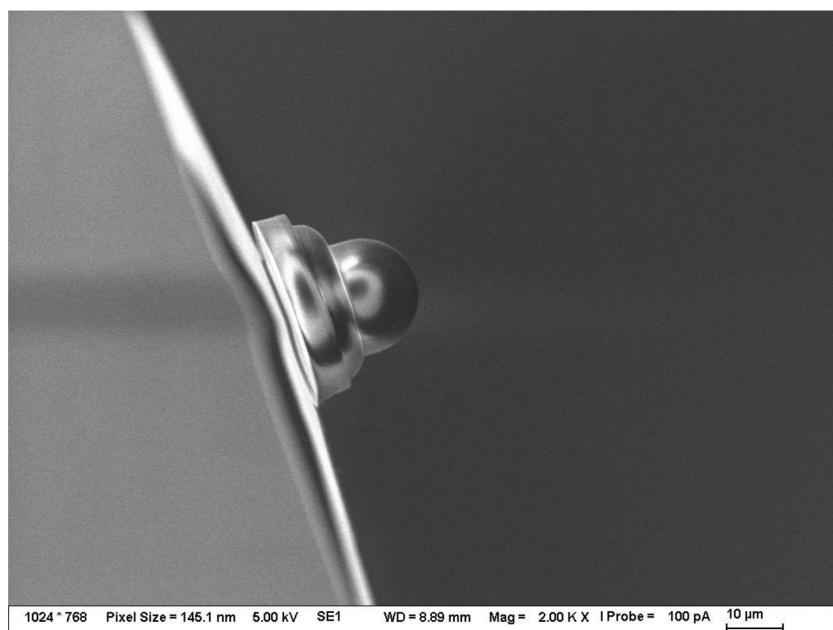
Tento nosník je velmi tuhý s konstantou pružnosti od 19 do 55 N/m a rezonanční frekvencí pohybující se v rozmezí od 270 do 370 kHz. Nosník je dlouhý 125  $\mu\text{m}$ , široký 40  $\mu\text{m}$  s tloušťkou 3,3  $\mu\text{m}$ . Je vyroben z křemíku s příměsí antimonu. Zadní strana je pokryta hliníkovou reflexní vrstvou pro zvýšení odrazivosti až 2,5krát. Nosník obsahuje hrot, který je upevněn na jeho konci. Má obdélníkový tvar s poloměrem hrotu 7 nm. Vzhledem k vysokým hodnotám rezonanční frekvence a konstanty pružnosti je tento nosník vhodný zejména pro měření v bezkontaktním režimu. Jedná se o novější verzi nosníku TESP-V2, jež neobsahuje reflexní vrstvu hliníku. Nosníky byly zakoupeny v balení po deseti kusech od firmy Bruker. Více informací o nosníku lze najít na stránkách dodavatele [73].

#### SNL-10

Tento čip obsahuje čtyři nosníky ve tvaru písmene V, na jejichž konci jsou upevněny hroty. Každý nosník je charakteristický svojí velikostí, konstantou pružnosti a rezonanční frekvencí. Jedna strana obsahuje dva nosníky označené písmeny „A“ a „B“ a druhá strana obsahuje nosníky „C“ a „D“. Nosník označený písmenem „A“ má rezonanční frekvenci 65 kHz a konstantu pružnosti 0,35 N/m, je dlouhý 120  $\mu\text{m}$  a široký 25  $\mu\text{m}$ . Nosník „B“ má rezonanční frekvenci 23 kHz a konstantu pružnosti 0,12 N/m. Je větší než nosník „A“, jeho délka dosahuje 205  $\mu\text{m}$  a šířka 40  $\mu\text{m}$ . Na opačné straně se nachází nosník „C“ s rezonanční frekvencí 65 kHz, konstantou pružnosti 0,24 N/m, délkou 120  $\mu\text{m}$  a šířkou 20  $\mu\text{m}$ . Vedle něj je nosník označený písmenem „D“, který má nejnižší konstantu pružnosti a rezonanční frekvenci a to 0,06 N/m a 18 kHz. Je dlouhý 205  $\mu\text{m}$  a široký 25  $\mu\text{m}$ . Na konci každého nosníku se vyskytuje velmi ostrý hrot s poloměrem 2 nm. Všechny nosníky jsou vyrobeny z nitridu křemíku a jejich zadní vrstva je potažena reflexní vrstvou zlata, opět pro zvýšení odrazivosti, zejména v kapalném médiu. Výrobce Bruker uvádí, že se jedná o všestranné nosníky, vhodné pro měření téměř jakéhokoliv vzorku v jakémkoliv prostředí [74].

#### MLCT-SPH-10UM-DC

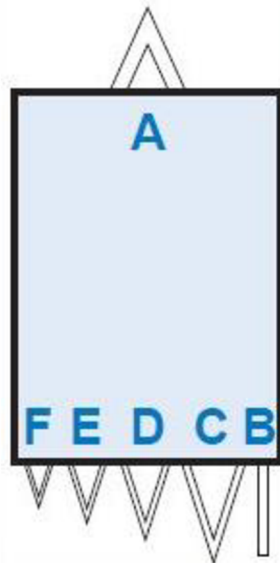
Dalším používaným typem nosníku byl MLCT-SPH-10UM-DC. Tyto nosníky jsou specifické tím, že na jejich konci se nachází místo hrotu kulička s průměrem 10  $\mu\text{m}$  (obrázek 22). Nosníky byly vyrobeny za účelem nahradit potřebu výroby koloidních sond pomocí nosníků, kuliček a lepidla.



Obrázek 22: Kulička na nosniku typu MLCT-SPH-10UM-DC zobrazena pomocí SEM (2 000× zvětšení).

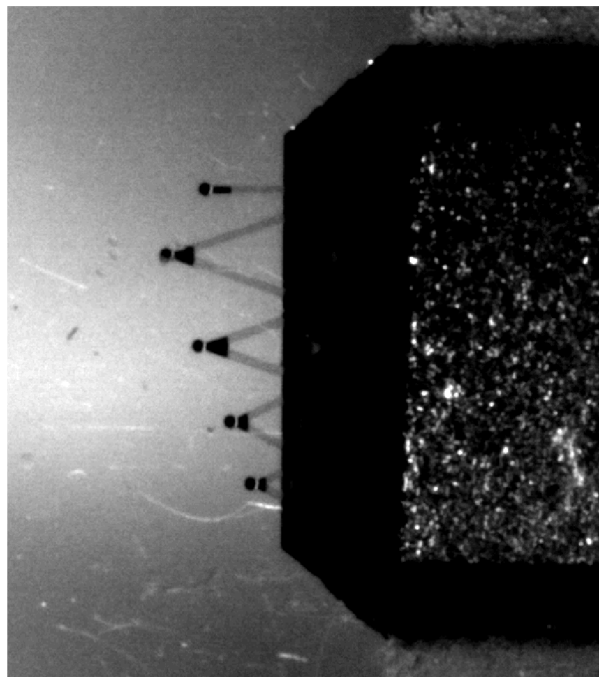
Jeden čip obsahuje šest nosníků označených písmenem „A“ až „F“ lišících se délkou, šířkou, rezonanční frekvencí i konstantou pružnosti (Obrázek 23). Vyšší počet nosníků na čipu poskytuje uživateli větší výběr a úsporu času při měření různých vzorků.

Nosník označený písmenem „A“ je dlouhý 175  $\mu\text{m}$ , široký 22  $\mu\text{m}$ , jeho rezonanční frekvence má hodnotu 6 kHz a konstanta pružnosti 0,080 N/m. Má tvar písmene V. Nosník „B“ nacházející se na opačné straně čipu má obdélníkový tvar o délce 210  $\mu\text{m}$  a šířce 20  $\mu\text{m}$ . Resonanční frekvence tohoto nosníku je 3,5 kHz a konstanta pružnosti 0,020 N/m. Nosník „C“ je nejdelší, má tvar písmene V, dosahuje 310  $\mu\text{m}$  a je 20  $\mu\text{m}$  široký. Má nejnižší hodnotu konstanty pružnosti a rezonanční frekvence a to pouze 0,010 N/m a 3,0 kHz. Další nosník označený písmenem „D“ je kratší než nosník „C“, má 225  $\mu\text{m}$ , je stejně široký a má stejný tvar. Jeho rezonanční frekvence činí 4,0 kHz a konstanta pružnosti 0,035 N/m. Nosník „E“ je dlouhý 140  $\mu\text{m}$  a široký 18  $\mu\text{m}$ , rezonanční frekvence vykazuje hodnotu 8,0 kHz a konstanta pružnosti 0,155 N/m, jeho tvar je také písmeno V. Poslední nosník stejného tvaru označený jako „F“ je nejmenší, dosahuje délky 85  $\mu\text{m}$  se šířkou 18  $\mu\text{m}$ . Je zřejmé, že čím kratší nosník je, tím je pevnější a jeho hodnoty rezonanční frekvence a konstanty pružnosti jsou vyšší, v tomto případě 17 kHz a 0,70 N/m.



Obrázek 23: Umístění nosníků na čipu MLCT-SPH-10UM-DC označených písmeny "A" až "F" [75].

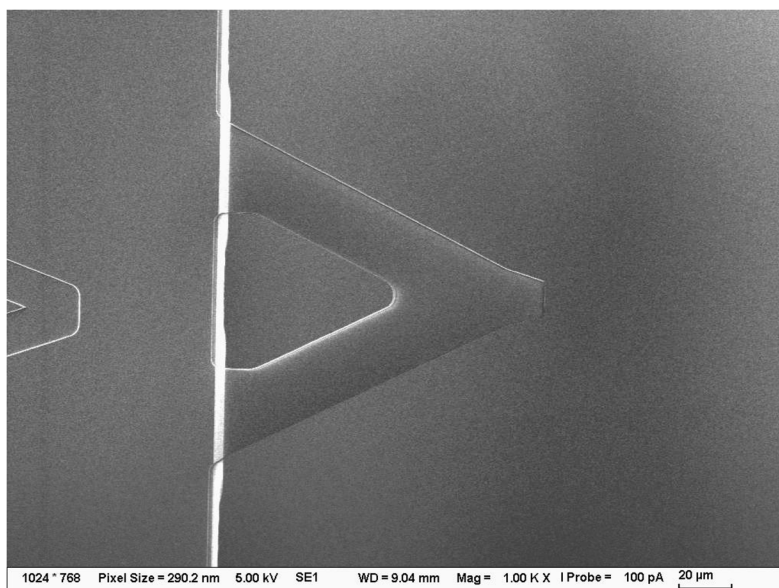
Nosníky i kuličky jsou vyrobeny z nitridu křemíku. Celá zadní strana není potažena žádnou reflexní vrstvou, což sice výrazně snižuje odraz dopadajícího laseru, zato nevzniká nežádoucí ohyb nosníku díky bimetalickému efektu diskutovaném v kapitole (2.4). Jen na koncích všech nosníků se nachází část pokryta reflexní vrstvou zlata, pro zvýšení odrazivosti laseru a dosažení signálu na detektoru (obrázek 24) [75].



Obrázek 24: Nosníky typu MLCT-SPH-10UM-DC zobrazeny pomocí kamery v AFM, na jejichž konci je vrstva zlata.

## NP-O10

Posledním používaným typem nosníku byly NP-O10. Jedná se o nosníky, které neobsahují hrot, a proto jsou vhodné pro vlastní funkcionalizaci molekulami nebo modifikaci pomocí částic. Čip obsahuje na každé straně dva nosníky ve tvaru písmene V (obrázek 25).



Obrázek 25: Nosník bez hrotu typu NP-O10 zobrazený pomocí SEM (1 000× zvětšení).

Nosník označený jako „A“ má dle výrobce rezonanční frekvenci 65 kHz a jeho konstanta pružnosti je 0,35 N/m. Je dlouhý 115  $\mu\text{m}$  a široký 25  $\mu\text{m}$ . Další nosník označený písmenem „B“ má hodnotu rezonanční frekvence 23 kHz a konstantu pružnosti 0,12 N/m. Jeho délka je 200  $\mu\text{m}$  a šířka 40  $\mu\text{m}$ . Na opačné straně se nachází nosník „C“ s délkou 115  $\mu\text{m}$ , šířkou 20  $\mu\text{m}$ , rezonanční frekvencí 56 kHz a konstantou pružnosti 0,24 N/m. Poslední nosník označený písmenem „D“ má nejmenší jak rezonanční frekvenci 18 kHz, tak i konstantu pružnosti 0,06 N/m. Je 200  $\mu\text{m}$  dlouhý a 25  $\mu\text{m}$  široký. Nosníky jsou vyrobeny z nitridu křemíku a zadní strana je pokryta reflexní vrstvou zlata. Další podrobnosti jsou k dispozici na webových stránkách dodavatele Bruker [76].

Všechny zmíněné nosníky byly vybrány z důvodu rozdílných tvarů a parametrů (konstanta pružnosti, rezonanční frekvence, rozměry, ...), kdy pomocí nosníků byly měřeny mechanické vlastnosti povrchů vzorků a získané hodnoty byly diskutovány a porovnány.

## 5.4 Příprava vzorků

### 5.4.1 Agarózový hydrogel

Pro měření mechanických vlastností byl vybrán 2 hm. % agarózový hydrogel z důvodu předchozích zkušeností a návaznosti na bakalářskou práci a reprodukovatelné přípravy. Do kádinky bylo na analytických vahách naváženo takové množství agarózy, aby po přidání deionizované vody byla výsledná hmotnostní koncentrace 2 hm. %. Kádinka byla přikryta alobalem, aby se neodpařovalo disperzní prostředí a nedocházelo ke koncentračním změnám. Kádinka byla umístěna do vodní lázně a ta byla umístěna na magnetickou míchačku a zahřívána na 80 °C při 300 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby

se suspenze stala průhlednou a vytvořil se sol rozpuštěním agarózy ve vodě díky jejím termoreverzibilním vlastnostem. Poté byl sol nalit do Petriho misky s cílem vytvořit co možná nejrovnější povrch po celém objemu. Po vychladnutí a gelaci byla na vzorek nalita deionizovaná voda a miska byla zakryta parafilmem, aby bylo zabráněno vysušení a zakoncentrování hydrogelu. Takto připravený vzorek byl na druhý den měřen pomocí AFM.

#### **5.4.2 Alginátový hydrogel**

Další vzorek, který byl v této práci používán z důvodu zastoupení iontově síťovaného hydrogelu byl alginátový hydrogel. Vzniká interakcemi záporně nabitých skupin na řetězcích alginátu s kladně nabitými ionty vápníku. Tento hydrogel byl připraven v rámci jiné závěrečné práce následujícím způsobem. Ke 4 ml 1,25 hm. % roztoku alginátu (připraveného den předem) byl přidán 1 ml suspenze uhličitanu vápenatého o koncentraci 10 g/100 ml. Po zamíchání a důkladné homogenizaci byl ke směsi přidán 1,25 ml 1 M glukono delta lakton (GDL). Směs byla opět míchána po dobu 30 sekund a ponechána 24 hodin v exsikátoru. Výsledná koncentrace takto připraveného hydrogelu činila 1 hm. %. Hydrogel byl následně po zalití deionizovanou vodou měřen v Petriho misce pomocí AFM.

### **5.5 Optimalizace modifikace nosníků**

#### **5.5.1 Modifikace nosníku pomocí polystyrenových částic**

Pro modifikaci hrotu nosníku na FCH VUT byly z důvodu dostupnosti vybrány polystyrenové (PS) částice o velikosti 1  $\mu\text{m}$ . Dodaná suspenze PS částic od Sigma Aldrich byla pro naše účely příliš koncentrovaná, proto bylo potřeba připravit zředěnější směs. K jedné kapce polystyrenových částic bylo přidáno 10 ml deionizované vody nebo 10 ml isopropylalkoholu. V obou případech byla následně pomocí pipety nakápnuta kapka připravené suspenze na podložní sklíčko. Na druhé podložní sklíčko bylo nanášeno epoxidové lepidlo, které bylo vytvořeno smícháním epoxidu a tvrdidla v hmotnostním poměru 50:6. Vytvrzení lepidla probíhalo po dobu 24 hodin. Lepidlo bylo potřeba na podložním sklíčku dobře rozprostřít do tenké okem téměř nedetekovatelné vrstvy, nejlépe pomocí krycího sklíčka. Obě připravená sklíčka s částicemi a lepidlem byla umístěna na podstavec mikroskopu pod hlavicí AFM s již umístěným nosníkem. Nejprve byl na modifikaci vybrán nosník s hrotem typu TESP-V2, kdy byl předpoklad, že na hrot se bude lépe uchycovat lepidlo a částice. Nosník umístěný v hlavici AFM byl přiblížen k podložnímu sklíčku s lepidlem a pomocí piezoelektrického translátoru došlo k doteku nosníku a lepidla. Nosník zde byl ponechán 5 sekund pro dostatečné uchycení lepidla na hrot. Následně byl nosník oddálen od lepidla a přiblížen k podložnímu sklíčku s polystyrenovými kuličkami. Stejným postupem byl nosník namočen do roztoku polystyrenových částic. Následně došlo k oddálení nosníku a vytvrzení lepidla. Nosníky byly poté sledovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Výsledky a jejich diskuzi lze nalézt v kapitole (6.1).

## 5.5.2 Modifikace nosníku pomocí částic melaminové pryskyřice

Na základě s našimi instrumentálním vybavením, kdy bylo těžké nalepit kuličku na nosník, byla domluvena spolupráce s výzkumným centrem CEITEC. Nosník byl modifikován pomocí částice melaminové pryskyřice o velikosti 5  $\mu\text{m}$  dostupných ve vodné suspenzi. Jedná se o termosetický plast vyrobený z melaminu a formaldehydu. Vykazuje mechanickou, tepelnou a chemickou stabilitu. Pro modifikaci byl použit nosník NP-O10 bez hrotu. Kapka mikročástic byla pomocí pipety nanášena a rozprostřena na podložní sklíčko, přičemž bylo odpařeno disperzní prostředí. Na druhé podložní sklíčko bylo aplikováno dvousložkové epoxidové lepidlo a do velmi tenké vrstvy rozetřeno. Obě podložní sklíčka byla umístěna pod mikroskop a nosník byl přiblížen k lepidlu. Mikroskop atomárních sil byl kombinovaný s inverzním optickým mikroskopem, takže byla možná přímá vizualizace mikročástic a nosníku. Jakmile byl nosník přiblížen k lepidlu, byl pomocí šroubů na AFM posouván horizontálně po podložním sklíčku tak, aby na něm ulpěla co nejtenčí vrstva lepidla. Posouvání bylo zastaveno v době, kdy nosník nezanechával stopu lepidla na sklíčku. Následně byl nosník přesunut nad částice, kde byla pomocí mikroskopu vybrána oblast s jednou částicí. K té byl nosník přiblížen a díky nanášenému lepidlu byla částice na nosník nalepena. Ověření nalepení bylo zkoumáno pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Výsledky jsou uvedeny v kapitole (6.1).

Byly připraveny také nosníky s melaminovou pryskyřicí obohacené karboxylovými skupinami, které v této práci nebyly diskutovány, ale v budoucnosti mohou být využity pro zkoumání interakcí s hydrofilními látkami.

## 5.6 Mikroskopie atomárních sil

### 5.6.1 Nastavení měření

Všechna měření v této diplomové práci probíhala pomocí mikroskopu atomárních sil JPK NanoWizard® 4 NanoScience od firmy Bruker. Prvním krokem bylo zapnutí programu JPK SPM Desktop (*JPK Scanning Probe Microscope control program*). Vybraný nosník byl pinzetou vložen do držáku (*holderu*) a pomocí šroubu utáhnut tak, aby nedocházelo k žádnému pohybu. Držák byl poté přesunut do hlavice AFM a otočen o  $90^\circ$  do uzamčené polohy. Hlavice AFM byla opatrně přesunuta nad vzorek tak, aby nebyla poničena kamera, potažmo vzorek pod hlavicí. Ve zmíněném programu v záložce *Spectroscopy* byl zvolen měřicí režim (*Contact Mode Force Mapping*). Jedná se o kontaktní měřicí mód založený na silové spektroskopii. Výchylka nosníku je monitorována a vzdálenost nosníku od povrchu vzorku se mění tak, aby byla udržena konstantní výchylka a konstantní síla. Dalším krokem bylo přiblížení a zapnutí kamery a světla tak, aby byl čip s nosníky jasně viditelný na obrazovce. Po zapnutí laseru bylo potřeba jej zaměřit na reflexní plochu nosníku pomocí dvou šroubů umístěných na pravé části hlavice AFM, které umožňují vertikální i horizontální pohyb laseru. Pro nasměrování odraženého laseru od zadní strany nosníku doprostřed fotodetektoru tvořeného čtyřmi kvadranty bylo potřeba pohybovat dvěma šrouby na levé části hlavice AFM. Pokud nebyl zobrazen žádný signál odraženého laseru ve sloupci v pravé části obrazovky, bylo nutné pootočit zrcátkem ovládaným šroubem, nacházejícím se uprostřed hlavice AFM. Zrcátko se používá při změně prostředí (např. vzduch, voda), ve kterém probíhá

měření, jelikož různá prostředí mají odlišné indexy lomu. Jakmile byl laser umístěn doprostřed fotodetektoru a bylo dosaženo co nejvyššího signálu (alespoň 1,5 V), došlo ke kalibraci nosníku. Ta se provádí pro zjištění přesné hodnoty konstanty pružnosti a rezonanční frekvence nosníku pomocí analýzy tepelného šumu, dostupnou přímo v používaném programu. Pro kalibraci bylo nutné zvolit v nabídce používaný nosník, médium, ve kterém měření probíhalo (voda) a okolní teplota, která byla ponechána na 25 °C. Tento krok je nutný provést před každým měřením. Výrobce sice tyto hodnoty uvádí, ale jedná se pouze o orientační a experimentálně stanovené hodnoty na vzduchu a jelikož všechna měření byla prováděna ve vodě, byly očekávány jiné hodnoty. Podle kalibrace byla automaticky nastavena také hodnota *Setpoint*. Jedná se o klíčový parametr udávající sílu působící mezi hrotem a povrchem vzorku, uváděný v jednotkách nN. Čím je naměřena vyšší konstanta pružnosti podle kalibrace, tedy pokud se jedná o tužší nosník, tím vyšší hodnotu *Setpointu* systém nastaví. Dalším krokem bylo manuální přiblížení nosníku k povrchu vzorku po krocích 1 000, 500, 100, 50 a 10  $\mu\text{m}$ . Jelikož nelze okem sledovat přesné přiblížení nosníku k povrchu vzorku, bylo nutné přejít k automatickému přiblížení pomocí piezoelektrického translátoru po krocích 15  $\mu\text{m}$ . Úspěšnost přiblížení byla rozpoznána rozsvícením zeleného trojúhelníku a zobrazení zelené úsečky uprostřed šedého sloupce. Následně mohlo být zahájeno měření.

### 5.6.2 Měřicí režim (*Contact Mode Force Mapping*)

Pro měření mechanických vlastností vzorků byl vybrán kontaktní mód, ve kterém se připevněná část nosníku vertikálně pohybuje tak, aby byla udržena konstantní výchylka volné části nosníku a konstantní působící síla mezi vzorkem a hrotem. Pomocí tohoto režimu lze zjistit například adhezi a Youngův modul pružnosti z naměřených silových křivek.

V používaném měřicím režimu lze nastavit hodnoty, které mají vliv na průběh měření. Prvním parametrem je již zmiňovaný *Setpoint*, který byl ve většině případů měření udržován pod hodnotou 1 nN. Pokud je používán nosník s nízkou konstantou pružnosti, je vhodné zvolit nižší hodnotu *Setpointu*. To samé platí i pro měřený vzorek, čím je měkčí, tím je vhodné udržovat tuto hodnotu níž. Při vysokých hodnotách *Setpointu* může dojít ke zlomení nosníku nebo poničení struktury na povrchu vzorku vlivem přílišného zanoření hrotu do povrchu. Při kalibraci nosníku se hodnota *Setpointu* nastaví tak, aby odpovídala pružnosti nosníku, na uživateli je, aby si jej dále upravil podle typu měřeného vzorku.

Dalším parametrem, který lze měnit, je *Z Length*, což je parametr udávající rozsah pohybu hrotu ve směru osy z během skenování povrchu vzorku. Vyšší hodnota poskytuje vyšší rozsah pohybu hrotu, což sice zpomaluje proces skenování, ale je vhodná pro vzorky s nerovným povrchem, přičemž je sníženo riziko poškození vzorku nebo hrotu. Avšak zvyšováním této hodnoty může dojít ke snížení citlivosti a rozlišení. Byla zvolena konstantní hodnota pro dosažení reprodukovatelných výsledků a to 0,8  $\mu\text{m}$ .

Hodnota *Z Speed* udává rychlost pohybu hrotu ve směru osy z, což je pohyb kolmý na povrch vzorku. Nižší hodnoty vedou k pomalejšímu pohybu skenování, což je vhodné k dosažení vyšší přesnosti a citlivosti měření. Pro veškerá měření byla tato hodnota nastavena na 2  $\mu\text{m/s}$ .

Dalším parametrem je *Contact Time*, jehož hodnoty se pohybovaly od 2 do 3 sekund, jedná se o dobu, kdy zůstává hrot v kontaktu se vzorkem, než dojde opět k oddálení. Příliš krátká



doba může vést k nedostatečnému kontaktu mezi hrotem a povrchem vzorku, což může způsobit nepřesnosti v měření, avšak příliš dlouhá doba kontaktu může vést k velkému tlaku na vzorek a dojít k poničení či zlomení hrotu. Tuto hodnotu je potřeba optimalizovat tak, aby bylo dosaženo jak kvalitních snímků povrchu, tak dostatečné citlivosti při měření povrchových vlastností a zároveň aby byla chráněna integrita vzorku i hrotu.

Předposlední volitelnou hodnotou je *Scan Size* udávající velikost skenované oblasti, která byla ve všech experimentech ponechána na přednastavené hodnotě a to  $10 \times 10 \mu\text{m}$ .

Poslední nastavitelnou veličinou je *Pixels*, která udává rozlišení skenu. Tato hodnota byla nastavena na  $8 \times 8$ , z čehož bylo získáno 64 silových křivek, což bylo dostatečné množství pro potřebné účely.

### ***Vyhodnocení měření***

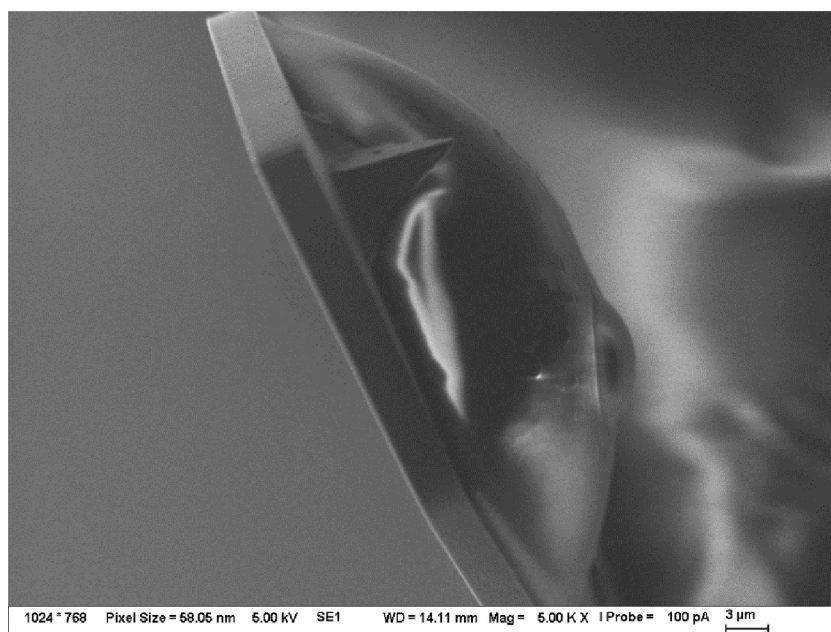
Naměřené experimenty byly vyhodnocovány pomocí programu *JPK Data Processing*. Po otevření uloženého měření byla vybrána možnost *Batch Processing*, kde byl zvolen proces *Hertz-fit*. Byly zobrazeny silové křivky a v záložce *Elasticity Fit* byly uvedeny parametry, které byly měněny podle používaného typu nosníku a hrotu (*Model Type*, *Tip Shape*, *Tip Radius*, *Poisson Ratio*). *Model Type* byl ve všech případech měření nastaven na *Hertz/Sneddon*, což jsou modely, využívány pro výpočet Youngova modulu pružnosti, zahrnující geometrii hrotu. *Tip Shape* byl v případě měření pomocí nosníku SNL-10 zvolen na *Triangular Pyramid*, jelikož tvar hrotu nosníku je trojúhelníková pyramida. V případě měření pomocí nosníku typu MLCT-SPH-10UM-DC byla jako tvar hrotu zvolena možnost *Sphere* a ve volbě *Tip Radius* byl zvolen pro tento typ nosníku poloměr kuličky na  $5 \mu\text{m}$ . Ve volbě *Poisson Ratio* byla tato hodnota ponechána ve všech experimentech na 0,5, což je hodnota používaná pro biologické vzorky, zejména kvůli vysokému obsahu vody [77]. Získané hodnoty Youngova modulu byly uloženy a diskutovány v kapitole (6.3).

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Výsledky optimalizace modifikace nosníků

Pro modifikaci hrotů pomocí připevnění mikročástice byly dle dostupnosti vybrány polystyrenové částice o velikosti 1  $\mu\text{m}$ . První pokusy byly provedeny s nosníkem typu TESPA-V2, jelikož čip obsahuje pouze jeden nosník s hrotem, což se zdálo jednodušší pro uchycení částice na daný nosník. Také se jedná o velmi tuhý nosník s konstantou pružnosti 42 N/m, který je odolnější vůči mechanickému namáhání. Modifikace byly prováděny tak, jak jsou popsány v experimentální části, avšak některé kroky bylo nutno optimalizovat. Při prvních pokusech se jevílo, že dochází ke smývání epoxidového lepidla z hrotu při přiblížení nosníku do roztoku polystyrenových mikročástic. Proto bylo zvoleno rozpouštědlo (isopropylalkohol), ve kterém se epoxidová pryskyřice, jakožto pojivový materiál, nerozpustí. Po odpaření původního rozpouštědla byly mikročástice smíchány s isopropylalkoholem a takto přichystané částice byly nanášeny na hrot. Bylo vyzkoušeno několik přístupů, například smíchání lepidla s mikročásticemi přímo na jednom podložním sklíčku a poté přiblížení se hrotem. Další způsob spočíval v tom, že po nanesení lepidla na hrot bylo přiblíženo nosníkem k vysušené kapce mikročástic s vyšší koncentrací, za účelem dosažení vyšší pravděpodobnosti uchycení kuličky na hrot. Bohužel však všechny zmiňované pokusy byly neúspěšné, jelikož nebylo možné určit, kde přesně se částice nachází.

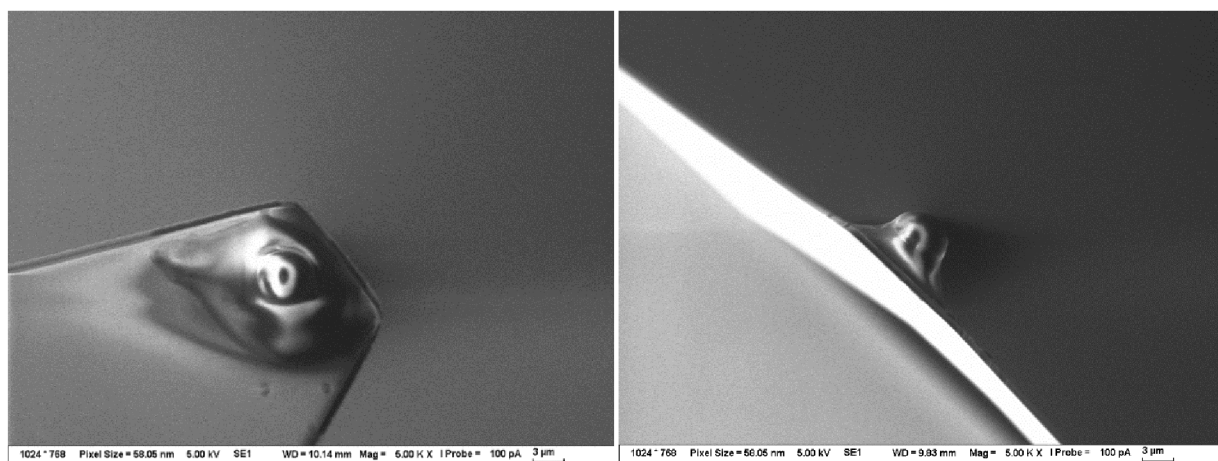
Jedním z problémů, který se vyskytl, bylo nanesení správného množství lepidla na hrot. Jakmile došlo k přiblížení nosníku k podložnímu sklíčku s lepidlem, tak na nosníku ulpělo velké množství lepidla (obrázek 26).



Obrázek 26: Nosník s hrotem typu TESPA-V2 s epoxidovým lepidlem zobrazený pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu.

Proto bylo důležité lepidlo na podložním sklíčku rozetřít do velmi tenké vrstvy. Z obrázku (obrázek 26) je zřejmé, že lepidlo bylo zejména na nosníku a ne na požadovaném hrotu. Z tohoto důvodu byly objednány nosníky bez hrotu NP-O10 a ty byly následně modifikovány.

S dostupným experimentálním vybavením však bylo téměř nemožné určit místo, kde se částice nachází a následně se k ní přiblížit nosníkem. Z tohoto důvodu byl osloven výzkumný ústav CEITEC, jelikož disponují mikroskopem atomárních sil, který je kombinovaný s inverzním optickým mikroskopem, jenž umožňuje sledovat výskyt částic v reálném čase a je možné se ke konkrétní částici přiblížit nosníkem a zafixovat ji na něj. Na CEITECu byla provedena úspěšná modifikace nosníku typu NP-O10 dle postupu popsáném v experimentální části (obrázek 27).



Obrázek 27: Nalepená částice melaminové pryskyřice o velikosti 5 µm pomocí epoxidu na nosník typu NP-O10.

## 6.2 Rovnice používané pro výpočet Youngova modulu pružnosti

Pro výpočet Youngova modulu pružnosti vzorků byl používán Hertz/Sneddonův model, který bere v úvahu reálný tvar hrotu AFM, zahrnuje Poissonovo číslo materiálu, sílu nosníku působící na vzorek (*Setpoint*), hloubku vtisku a poloměr hrotu. Původní Hertzův model, který byl diskutován v kapitole (2.3), byl definován pro hrot s tvarem kruhového paraboloidu a výpočet Youngova modulu pružnosti zachycuje zmiňovaná rovnice (5).

Program *JPK Data Processing* počítá Youngův modul pružnosti na základě naměřených dat a definování tvaru hrotu ve výběru *Tip Shape*. Pro sférickou sondu je rovnice následující (8):

$$F = \frac{E}{(1 - \nu^2)} \left[ \frac{a^2 + R_s^2}{2} \ln \frac{R_s + a}{R_s - a} - aR_s \right], \quad (8)$$

kde  $F$  je působící síla hrotu na povrch vzorku,  $E$  je Youngův modul pružnosti,  $\nu$  představuje Poissonovo číslo nastavené pro všechny experimenty na hodnotu 0,5,  $R_s$  udává poloměr kuličky a  $a$  je poloměr kontaktní oblasti vytvořené mezi kuličkou a povrchem vzorku.

Pro kuželový tvar hrotu software používá pro výpočet Youngova modulu pružnosti rovnici (9):

$$F = \frac{E}{(1 - \nu^2)} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} D^2, \quad (9)$$

kde  $\alpha$  označuje poloviční úhel kužele nosníku a  $D$  udává indentaci neboli hloubku vtisku.

Pro získání Youngova modulu pružnosti je analyzována silová křivka, popsána v kapitole (2.3), která poskytuje informace o tom, jak je vzorek deformován v závislosti na aplikované síle. Youngův modul je odvozován ze sklonu první části horní křivky, která představuje lineární oblast deformace. Čím strmější je část křivky, tím vyšší je hodnota Youngova modulu materiálu.

### 6.3 Měření mechanických vlastností agarózového hydrogelu

Po úspěšné modifikaci nosníku pomocí přilepení melaminové pryskyřice na jeho konec, byl nosník dále využíván v kontaktním měřicím módu AFM založeném na silové spektroskopii, za účelem stanovení mechanických vlastností vybraných vzorků.

Nejprve byly měřeny mechanické vlastnosti 2 hm. % agarózového hydrogelu, konkrétně Youngův modul pružnosti, adhezní práce a adhezní síla.

Pro porovnání získaných výsledků pomocí modifikovaného nosníku byly vybrány dva komerčně dostupné nosníky, první typu SNL-10 s ostrým hrotem a druhý typu MLCT-SHP-10UM-DC s kuličkou místo hrotu o průměru 10  $\mu\text{m}$ .

#### Nosník typu NP-O10 s částicí melaminové pryskyřice

Prvním nosníkem používaným ke stanovení Youngova modulu pružnosti 2 hm. % agarózového hydrogelu, byl nosník modifikovaný částicí melaminové pryskyřice. Pro jeho výpočet byl v programu *JK Data Processing* zvolen typ nosníku kulička (*Sphere*) a jako poloměr kuličky byly zvoleny 2,5  $\mu\text{m}$ . Byly připraveny čtyři nosníky na dvou čípech způsobem popsáným v experimentální části v kapitole (5.5.2). Naměřené Youngovy moduly pružnosti, směrodatné odchylky a nastavené hodnoty *Setpointů* jsou uvedeny v následujících tabulkách.

V případě prvního čipu byla veškerá měření provedena pomocí většího nosníku s konstantou pružnosti vypočtenou dle kalibrace na 0,019 N/m a rezonanční frekvencí 4,124 kHz (tabulka 1). Měření s menším tužším nosníkem u prvního čipu nebylo možné, jelikož nešlo spustit, pravděpodobně vlivem přílišného zanořování nosníku do vzorku.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí modifikovaného nosníku na prvním čipu.

1. čip – Modifikovaný nosník s melaminovou pryskyřicí				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,300	39 310	54 120	138
2	1,017	126 700	66 540	53
3	0,263	3 311	1 458	44
4	0,200	12 830	7 942	62

První dvě měření byla provedena na stejném místě agarózového hydrogelu a další dvě měření byla provedena jiný den na totožně připraveném agarózovém hydrogelu. Odlišné výsledné hodnoty Youngova modulu mohou být způsobeny jiným měřeným místem, kdy

v případě prvních dvou měření byla měřena tužší místa, což dokazuje nehomogenitu hydrogelu na mikro úrovni.

Z naměřených dat je také zřejmé, že čím vyšší byla nastavena hodnota *Setpointu*, tedy působící síla nosníku na vzorek, tím větší byl naměřen Youngův modul pružnosti. Tato závislost bude více diskutována v kapitole (6.4).

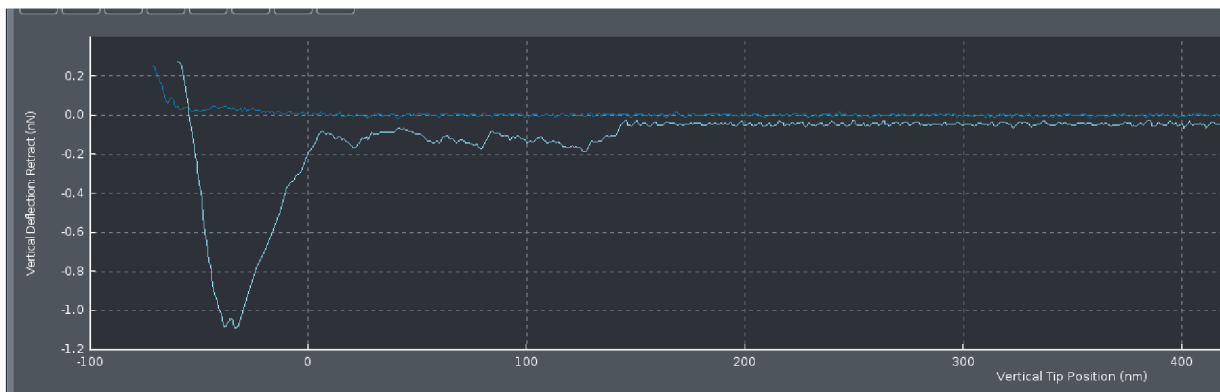
V případě druhého čipu bylo první měření provedeno pomocí menšího tužšího nosníku s konstantou pružnosti dle kalibrace 0,186 N/m a rezonanční frekvencí 15,68 kHz. Zbytek hodnot byl naměřen pomocí většího pružnějšího nosníku s konstantou pružnosti 0,016 N/m a rezonanční frekvencí 4,123 kHz (tabulka 2).

*Tabulka 2: Naměřené hodnoty 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí modifikovaného nosníku na druhém čipu. První měření bylo provedeno tužším nosníkem, zbylé měření měkčím.*

2. čip – Modifikovaný nosník s melaminovou pryskyřicí				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,500	15 970	7 920	50
2	0,369	51 070	70 620	138
3	0,591	48 400	49 680	103
4	0,910	60 930	77 530	127

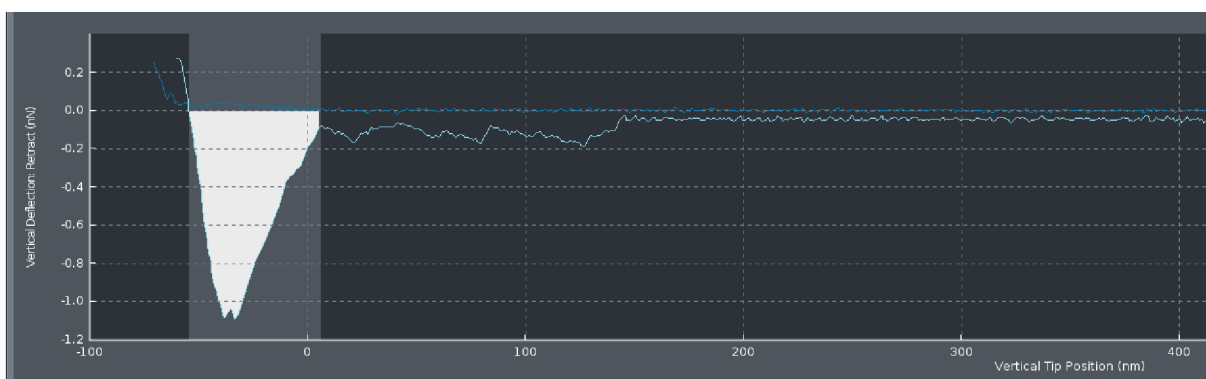
Měření pomocí většího nosníku nebylo moc úspěšné, při vyšších hodnotách působící síly docházelo k vnoření nosníku do povrchu agarózového hydrogelu a při nižších hodnotách se nosník oddaloval od povrchu vzorku. Jakákoliv změna nastavitelných parametrů (*Setpoint*, *Z Speed*, *Z Length*, *Contact Time*) diskutovaných v kapitole (5.6.2) tento problém nedokázala vyřešit. Také naměřené hodnoty Youngova modulu pružnosti vykazují směrodatné odchylky vyšší než 100 %. Všechny tyto problémy mohou být způsobeny přítomností lepidla, nebo samotné částice, která vykazuje hydrofilní charakter udávaný dodavatelem, takže mohlo docházet k nežádoucí interakci s přítomnou vodou, ve které bylo měření prováděno.

Větší interakce s vodou dokazuje i naměřená silová křivka a vyznačená oblast znázorňující adhezni práci. Silová křivka udává grafické znázornění působící síly mezi nosníkem a povrchem vzorku v závislosti na jejich vzájemné vzdálenosti. Tmavě modrá křivka znázorňuje přibližování hrotu k povrchu vzorku a světle modrá křivka udává oddalování hrotu od povrchu. Hrot je přitahován k povrchu vzorku i při oddalování, což vede k záporným hodnotám síly zobrazené na grafu (obrázek 28).



Obrázek 28: Silová křivka získaná při měření 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí modifikovaného nosníku.

Znázorněná plocha pod osou  $x$  ohraničená silovou křivkou udává adhezní práci (obrázek 29). Jedná se o míru práce potřebné k oddělení hrotu od povrchu vzorku. Průměrná hodnota adhezní práce byla softwarem vypočtena na  $(2,342 \cdot 10^{-17} \pm 2,037 \cdot 10^{-17})$  J. Adhezní síla odpovídající nejnižšímu bodu na spodní silové křivce byla vypočtena na 1,092 nN, což je nejvyšší naměřená hodnota v porovnání s ostatními nosníky.



Obrázek 29: Adhezní práce naměřená mezi modifikovaným nosníkem a 2 hm. % agarózovým hydrogelem.

### Nosník typu SNL-10

Dále byl pro měření mechanických vlastností 2 hm. % agarózového hydrogelu vybrán nosník SNL-10, který obsahuje hrot s poloměrem 2 nm. Konstanta pružnosti nosníku byla podle kalibrace nastavena na 0,282 N/m a rezonanční frekvence na 15,84 kHz. Měření bylo provedeno pětkrát a hodnoty *Setpointu*, Youngova modulu pružnosti, směrodatné odchylky a procentuální odchylky jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka 3).

Tabulka 3: Naměřené hodnoty 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí nosníku SNL-10.

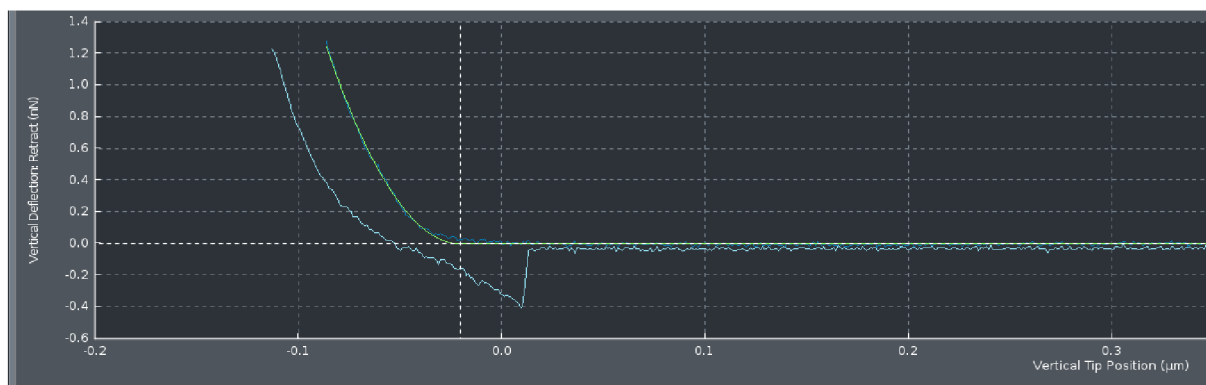
SNL-10				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,350	139 300	51 410	37
2	1,281	146 600	87 210	59
3	0,700	440 700	216 400	49
4	1,176	442 700	348 100	79
5	1,663	506 200	394 300	78

Při nastavené působící síle hrotu na povrch vzorku (*Setpoint*) pod hodnotu 1 nN se hrot oddaloval od vzorku a měření neproběhlo celé do konce, ale bylo samo předběžně ukončeno. To značí, že se hrot oddaloval od vzorku a působící síla nebyla dostačující. Při *Setpointu* nastaveném na 1,663 nN bylo měření také po chvílce vypnuto. Zde naopak mohlo docházet k pronikání hrotu do povrchu vzorku. Ideální hodnota *Setpointu* byla určena kolem 1 nN, kdy měření vydrželo nejdéle běžet.

Z tabulky 3 si lze povšimnout, že i při podobných hodnotách *Setpointu* (1,176 a 1,281 nN) byly získány poměrně odlišné hodnoty Youngova modulu pružnosti. To mohlo být způsobené odlišným místem měření a nehomogenitou vzorku. Podobné hodnoty Youngova modulu můžeme pozorovat při nastaveném *Setpointu* 0,700 a 1,176 nN, kdy bylo měřeno stejné místo, avšak odchylka u vyššího *Setpointu* je značně vyšší, což mohlo být způsobeno tím, že toto měření poskytlo dvakrát více naměřených hodnot, než došlo k přerušení měření. To následně vedlo k větší variabilitě v naměřených datech.

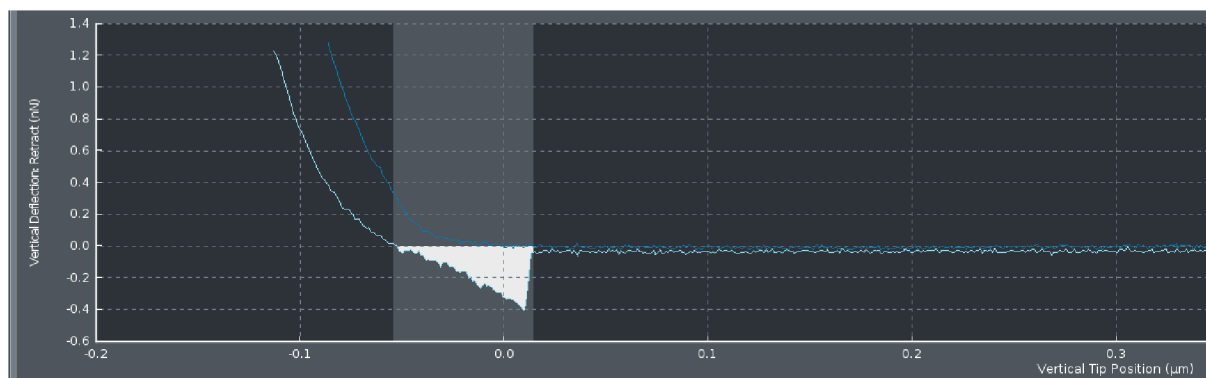
Nosníkem typu SNL-10 byly naměřeny obecně nejvyšší hodnoty Youngova modulu pružnosti 2 hm. % agarózového hydrogelu, jelikož se jedná o ostrý hrot, který může vyvolávat lokální napětí na vzorku, což může vést k vyšším hodnotám Youngova modulu pružnosti. To je také zřejmé z jednotky Youngova modulu pružnosti. Je vyjádřen v pascálech, což je jednotka udávající množství síly působící na jednotkovou plochu. Tlak vyvinutý stejnou silou na menší ploše je vyšší, než tlak vzniklý na větší ploše.

Opět byla vybrána reprezentativní silová křivka, znázorňující působící sílu mezi hrotem SNL-10 a povrchem 2 hm. % agarózového hydrogelu v závislosti na jejich vzdálenosti (obrázek 30).



Obrázek 30: Silová křivka získaná při měření 2 hm. % agaróзовého hydrogelu pomocí nosníku SNL-10.

Vyznačená plocha pod osou  $x$  určující adhezní práci naměřenou mezi nosníkem SNL-10 a 2 hm. % agaróзовým hydrogelem (obrázek 31) byla vypočtena na  $(2,747 \cdot 10^{-17} \pm 0,750 \cdot 10^{-17})$  J. Adhezní síla působící mezi nosníkem a povrchem vzorku byla stanovena na 402 pN.



Obrázek 31: Adhezní práce naměřená mezi nosníkem SNL-10 a 2 hm. % agaróзовým hydrogelem.

U měření s ostrými hroty by bylo žádoucí, aby byl poloměr hrotu zkontrolován před i po každém měření (např. pomocí SEM), aby bylo zohledněno a monitorováno opotřebení hrotu, které může způsobit větší odchylky v naměřených hodnotách Youngova modulu pružnosti.

Je také důležité brát v potaz velikost pórů v gelové struktuře. Dle literatury byla průměrná velikost pórů 2 hm. % agaróзовého hydrogelu stanovena pomocí kryoSEM na 200 nm [78]. Jelikož byla pomocí ostrého hrotu (SNL-10) s poloměrem 2 nm měřena plocha  $10 \times 10 \mu\text{m}$ , v průběhu měření může hrot skenovat jak polymerní řetězec, tak pór. Odlišné tuhosti a interakce hrotu s pórem a řetězcí mohou způsobit variabilitu v naměřených datech Youngova modulu pružnosti a tím zvyšovat směrodatnou odchylku. Tento problém byl vyřešen při měření povrchů pomocí kuličky o poloměru 5 mikrometrů, kde velikosti pórů v řádech nanometrů nemají velký vliv na výsledky měření Youngova modulu pružnosti a vzniklé odchylky.



### Nosník typu MLCT-SPH-10UM-DC

Posledním nosníkem, kterým byly měřeny mechanické vlastnosti 2 hm. % agarózového hydrogelu byl typ MLCT-SPH-10UM-DC, který místo hrotu obsahoval 10  $\mu\text{m}$  kuličku z nitridu křemíku. Poloměr kuličky byl tedy v programu pro výpočet Youngova modulu pružnosti zvolen na 5  $\mu\text{m}$ . Při nastavování a pohybu laseru musí uživatel dbát na to, aby laserem mířil na špičku nosníku, na které se nachází odrazivá vrstva zlata. Zbytek povrchu nosníku odrazivost neposkytuje, a tak není možné najít žádný signál z laseru, nezbytný pro spuštění měření. U ostatních nosníků se tento problém nevyskytuje, jelikož obsahují odrazivou vrstvu na celé vrchní ploše nosníku.

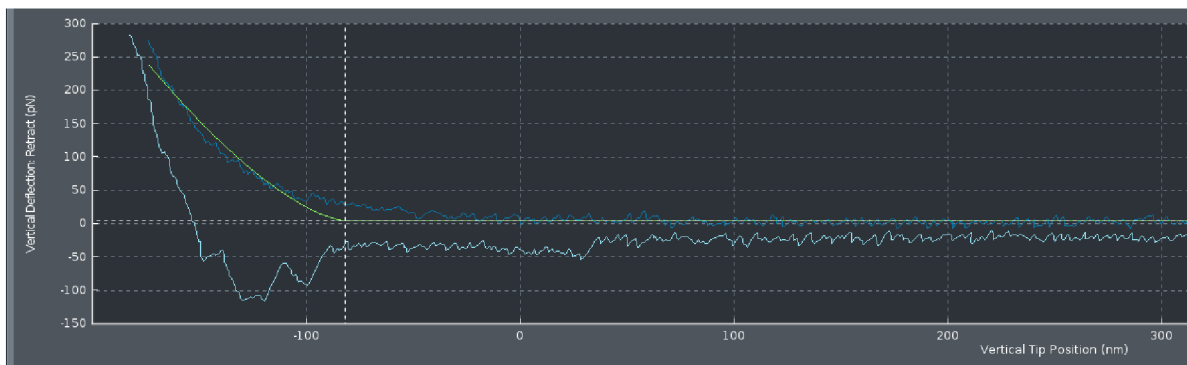
Měření s největším nosníkem na čipu označený písmenem „C“ nebylo možné realizovat, jelikož po kalibraci nosníku se hodnota konstanty pružnosti nastavila na 0,000 N/m a nešlo spustit měření, proto byly následující experimenty prováděny s druhým největším hrotem označeným písmenem „D“, jehož konstanta pružnosti dle kalibrace činila 0,008 N/m a rezonanční frekvence 25,56 kHz (obrázek 23). Jelikož se jedná o měkký nosník s nízkou konstantou pružnosti, bylo měření prováděno při *Setpointu* menším než 0,5 nN. Při vysokých hodnotách působící síly by mohlo dojít ke zlomení nosníku.

Byla provedena tři měření 2 hm. % agarózového hydrogelu, jejichž výsledné průměrné hodnoty Youngova modulu pružnosti, směrodatné odchylky a působící přitlačné síly jsou znázorněny v následující tabulce (tabulka 4).

Tabulka 4: Naměřené hodnoty 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí nosníku MLCT-SPH-10UMDC.

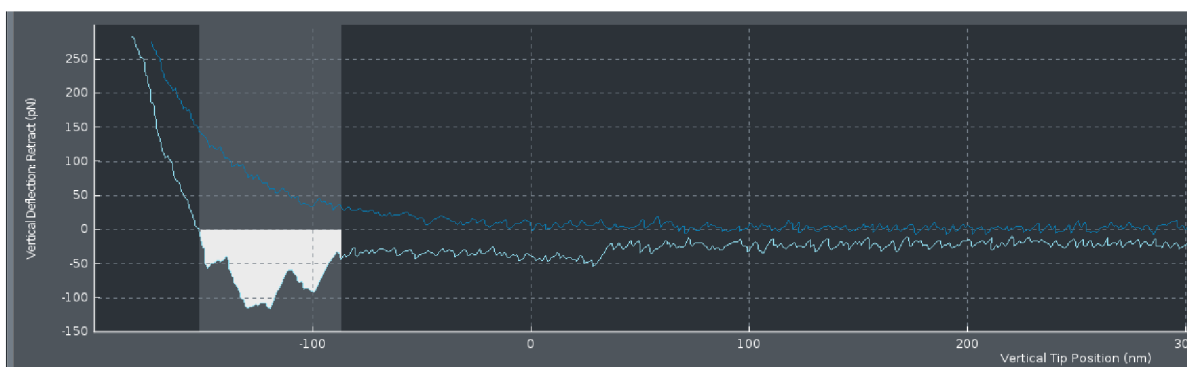
MLCT-SPH-10UM-DC				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,380	3 659	524	14
2	0,328	3 049	1 128	37
3	0,256	1 956	289	15

Pomocí nosníku s kulatou sondou byly naměřeny nejmenší hodnoty Youngova modulu pružnosti, vlivem většího rozptýlení sil při působení sondy na povrch vzorku a vlivem větší měřicí plochy, přičemž nedocházelo ke zvyšování lokálního napětí a tím i Youngova modulu pružnosti, jako tomu bylo u měření ostrými hroty. Lze také pozorovat, že měření s kulatou částicí na nosníku poskytovalo malé směrodatné odchylky Youngova modulu pružnosti, jelikož nedocházelo k výraznému mechanickému poškození povrchu vzorku ani opotřebování měřicí sondy, což je častým důvodem variability naměřených dat. Kulatý hrot může lépe reagovat na mikroskopické nerovnosti povrchu vzorku, což vede ke konzistentnějším a spolehlivějším měřením Youngova modulu pružnosti a nízkým směrodatným odchylkám, projevující se také v silových křivkách, které vykazovaly předpokládaný tvar křivky síla – vzdálenost (obrázek 32).



Obrázek 32: Silová křivka získaná při měření 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí nosníku MLCT-SPH-10-UM-DC.

Rovnoměrná síla kulatého hrotu, působící na povrch hydrogelu je také spjatá s tím, že hodnoty adhezní práce (obrázek 33) naměřené pomocí kulaté sondy jsou nižší, než hodnoty naměřené ostrým hrotem. Průměrná hodnota adhezní práce naměřená mezi kulatým hrotem a agarózovým hydrogelem činí  $(1,348 \cdot 10^{-17} \pm 0,661 \cdot 10^{-17})$  J. Adhezní síla byla vypočtena na 115,6 pN, což je také doposud nejnižší naměřená hodnota. Kulička je vyrobená z nitridu křemíku, tudíž k navýšení adhezní síly nepřispívaly nežádoucí interakce mezi měřicí sondou, povrchem hydrogelu, či měřicím prostředím (vodou).



Obrázek 33: Adhezní práce naměřená mezi nosníkem MLCT-SPH-10UM-DC a 2 hm. % agarózovým hydrogelem.

Ed-Daoui a kol. [79] měřili Youngův modul pružnosti 2,5 hm. % agarózového hydrogelu pomocí analyzátoru textury (LFRA – *Leatherhead Food Research Association texture analyzer*) a dosáhli výsledné hodnoty 274,6 kPa. Hodnota je vyšší než námi získané hodnoty Youngova modulu pružnosti 2 hm % agarózového hydrogelu pomocí AFM. To může být způsobeno rozdílnou koncentrací hydrogelu a také tím, že AFM měří pouze povrch materiálů, kdežto u jiné metody může do výsledné hodnoty Youngova modulu pružnosti přispívat celý měřený objem vzorku. Samotné nastavení a parametry instrumentálních technik mají významný vliv na získané hodnoty Youngova modulu pružnosti. Tato skutečnost komplikuje srovnávání výsledků z různých metod, jelikož různé metody měření generují rozdílné hodnoty.

V tabulce (tabulka 5) lze vidět porovnání naměřených adhezních prací mezi povrchem agarózového hydrogelu a používanými nosníky. Pro ostrý hrot byla naměřena nejvyšší adhezní práce, která narůstá u ostrého hrotu při kontaktu s povrchem vzorku, jelikož může

lépe pronikat do mikroskopických nerovností povrchu vzorku, což může způsobit zvýšenou adhezi. Naopak naměřená adhezní práce nosníkem MLCT-SPH-10UM-DC s kuličkou byla nejnižší, větší kontaktní plocha vede ke snížení lokálního tlaku a nižší adhezi. Kulatý hrot má také menší tendenci pronikat do mikroskopických nerovností povrchu vzorku ve srovnání s ostrým hrotem.

Tabulka 5: Souhrn naměřených adhezních prací pro 2 hm. % agarózový hydrogel různými nosníky.

Nosník	Adhezní práce [J]	Směrodatná odchylka [J]	Směrodatná odchylka [%]
SNL-10	$2,747 \cdot 10^{-17}$	$0,750 \cdot 10^{-17}$	27
Modifikovaný nosník	$2,342 \cdot 10^{-17}$	$2,037 \cdot 10^{-17}$	87
MLCT-SPH-10UM-DC	$1,348 \cdot 10^{-17}$	$0,661 \cdot 10^{-17}$	49

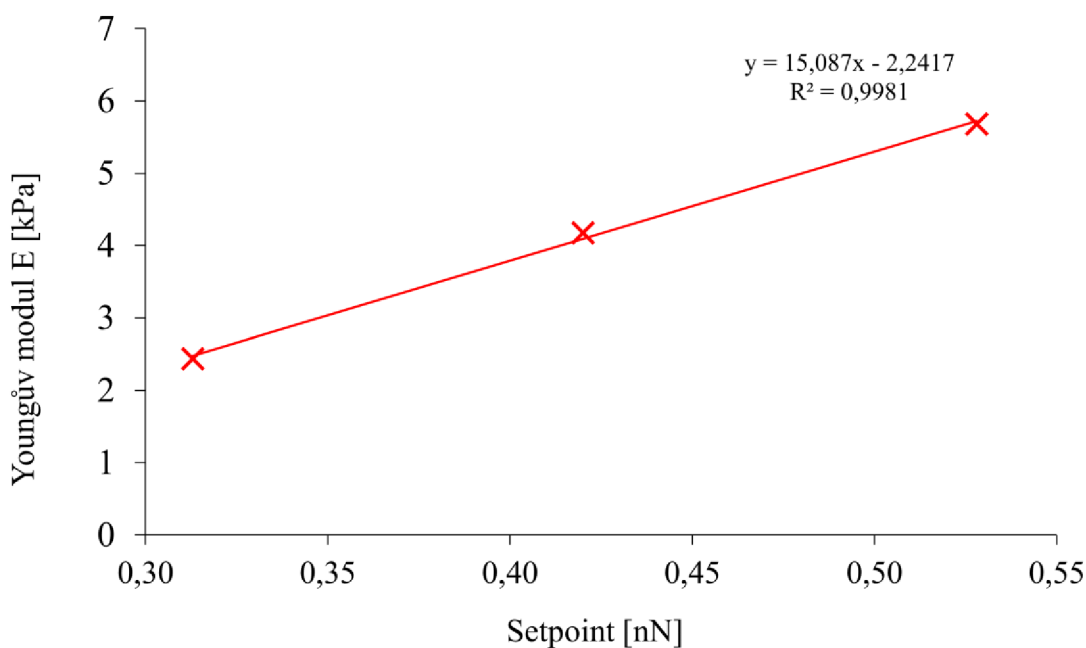
#### 6.4 Vliv hodnoty *Setpointu* na Youngův modul pružnosti

V této kapitole byl zkoumán vliv působící síly nosníku MLCT-SPH-10UM-DC (*Setpoint*) na povrch vzorku na naměřené hodnoty Youngova modulu pružnosti. Tento nosník byl vybrán, jelikož poskytoval dle nízkých směrodatných odchylek nejpřesnější hodnoty naměřeného Youngova modulu pružnosti. Měření bylo provedeno třikrát na stejném místě povrchu 2 hm. % agarózového hydrogelu za zvyšování hodnoty *Setpointu* (tabulka 6).

Byl použit nosník označený písmenem „D“, tentokrát byla dle kalibrace nastavena hodnota konstanty pružnosti na 0,011 N/m a rezonanční frekvence 38,19 kHz. Dle této kalibrace byl *Setpoint* automaticky nastaven na 0,05 nN, což je velice malá hodnota a jak již bylo zmíněno v experimentální části, je potřeba si ji upravit tak, aby odpovídala měřenému vzorku i používanému nosníku a aby se sonda dostatečně přiblížila k povrchu vzorku a bylo možné spustit měření. V našem případě to byla hodnota 0,313 nN.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty 2 hm. % agarózového hydrogelu pomocí nosníku MLCT-SPH-10UM-DC.

MLCT-SPH-10UM-DC				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,313	2 439	308	13
2	0,420	4 177	421	10
3	0,528	5 683	985	17



Obrázek 34: Závislost Youngova modulu pružnosti na hodnotě Setpointu pro 2 hm. % agarózový hydrogel.

Z tabulky 6 i grafu (obrázek 34) vyplývá, že s rostoucí působící silou nosníku na povrch vzorku lineárně roste hodnota Youngova modulu pružnosti, což je zřejmé ze základní definice, kde je Youngův modul pružnosti definován jako poměr napětí a jím vyvolané deformace, kde je napětí přímo úměrné působící síle. Pomocí tohoto grafu je tato problematika názorně představena. Při interpretaci hodnot Youngova modulu pružnosti je žádoucí uvádět jak hodnotu *Setpointu*, tak vlastnosti a tvar používaného hrotu, které ovlivňují naměřené výsledky.

V budoucnu by bylo vhodné stanovit hodnotu *Setpointu* co nejnižší, aby se minimalizoval vliv působící síly na získaný Youngův modul pružnosti a zároveň zajistit dosažení relevantních výsledků s nízkou variabilitou.

Stanovení Youngova modulu pružnosti pomocí AFM je velmi komplexním úkolem, jelikož je měřen na lokální mikroskopické úrovni a je potřeba definovat spoustu parametrů a proměnných (např. působící síla, konstanta pružnosti a tvar nosníku, Poissonovo číslo, ...). Proto je k hodnotám Youngova modulu pružnosti získaných z naměřených dat pomocí AFM třeba přistupovat s opatrností a bez znalosti parametrů, při kterých měření probíhalo, není možné je mezi sebou objektivně porovnávat.

## 6.5 Měření mechanických vlastností alginátového hydrogelu

Kromě fyzikálně síťovaného agarózového hydrogelu, byla dále provedena charakterizace mechanických vlastností pomocí AFM iontově síťovaného 1 hm. % alginátového hydrogelu. Byl používán modifikovaný nosník a nosník s kuličkou. Nosník SNL-10 byl vyřazen dle předchozích měření agarózového hydrogelu, jelikož pomocí ostrého hrotu byly naměřeny vysoké hodnoty Youngova modulu s velkým rozptylem a mohlo docházet k poškození hrotu i vzorku, což mohlo vést k nepřesným výsledkům a vyšším směrodatným odchylkám.

### Nosník typu NP-O10 s částicí melaminové pryskyřice

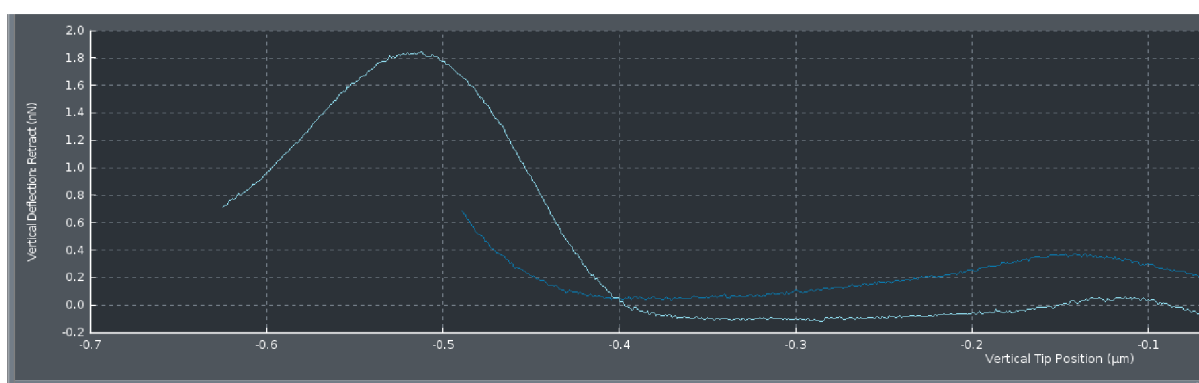
První bylo provedeno měření pomocí modifikovaného nosníku, s cílem ověřit výsledky, které byly doposud získány, i pro jinak síťovaný hydrogel. Byl použit tužší nosník s konstantou pružnosti 0,189 N/m a rezonanční frekvencí 15,67 kHz.

Alginátový hydrogel bylo nutné měřit co nejdříve po procesu gelace (1 hodina od přípravy), jelikož postupem času docházelo k synerezi neboli stárnutí gelu a smršťování struktury za procesu vytlačování disperzního prostředí, kdy se vzorek odlepoval od dna Petriho misky a díky nedostatečnému upevnění jej nebylo možné měřit.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty 1 hm. % alginátového hydrogelu pomocí modifikovaného nosníku.

Modifikovaný nosník s melaminovou pryskyřicí				
Číslo měření [-]	Setpoint [nN]	Youngův modul [Pa]	Směrodatná odchylka [Pa]	Směrodatná odchylka [%]
1	0,500	860	327	38
2	0,854	1 459	1 039	71
3	0,854	1 517	1 334	88

První měření nebylo dokončeno až do stanoveného konce, jelikož se nosník začal oddalovat od povrchu vzorku, pravděpodobně vlivem nastavené nízké síly působení hrotu na vzorek (*Setpoint*). Oproti tomu, obě měření s nastavenou přítlačnou silou 0,854 nN proběhla až do konce (64 skenů), neboť nedocházelo k významnému oddalování ani zanořování hrotu do povrchu alginátového hydrogelu. Z naměřených výsledků plyne, že pro měření 1 hm. % alginátového hydrogelu bylo potřeba působit vyšší silou nosníku na povrch vzorku, aby bylo možné spustit měření (tabulka 7). Avšak směrodatné odchylky Youngova modulu pružnosti naměřeného pro alginátový hydrogel jsou výrazně vyšší než pro agarózový hydrogel. Také musela být některá naměřená data vyřazena (obrázek 35) a to z důvodu nesplnění tvaru silové křivky, tudíž nebylo možné softwarem vypočítat hodnotu Youngova modulu pružnosti.

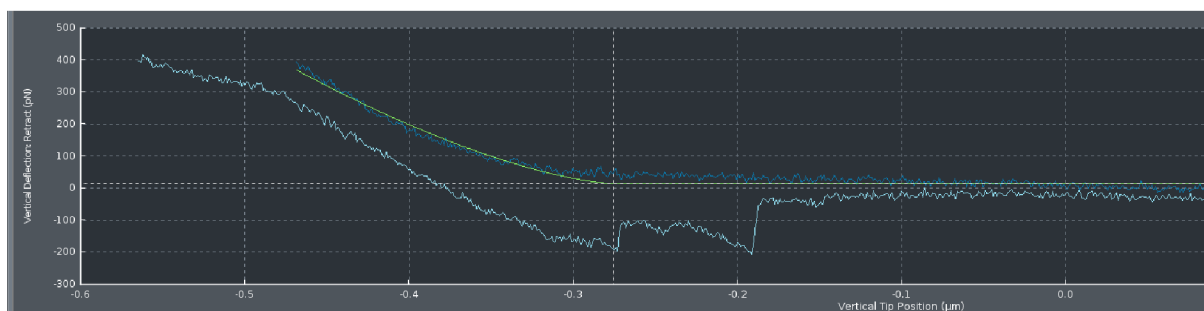


Obrázek 35: Ukázka vyřazené silové křivky z naměřených dat.

Důvodem přítomnosti vyššího počtu silových křivek, jež nesplňovaly předpokládaný tvar u měření povrchu alginátového hydrogelu, mohla být již zmíněná synereze, kdy docházelo k jeho odlepoování a pohybu, což mohlo znehodnotit měření. Dalším důvodem výskytu

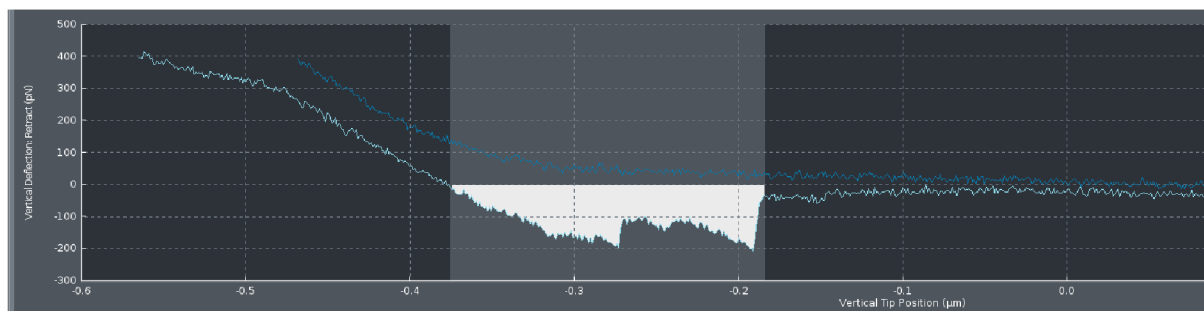
nepřesných silových křivek může být nedostatečná rovnost povrchu měřeného hydrogelu, což je velice důležitý faktor. Výškové rozdíly v povrchu mohou způsobit nepřesný kontakt hrotu s povrchem, což může vést k nespolehlivým výsledkům a nežádoucím výchytkám v silových křivkách. Pro budoucí měření je vhodné optimalizovat přípravu tak, aby nedocházelo k pohybu hydrogelu v Petriho misce a aby byl připraven dostatečně rovný povrch.

Aby byla zachována konzistence s předchozími měřeními i pro toto měření byla vybrána silová křivka, jejíž tvar se co nejvíce podobal předpokládanému tvaru silové křivky, pozorované například při charakterizaci agarózového hydrogelu (obrázek 30). Na grafu lze sledovat kromě jednoho kontaktu hrotu se vzorkem i opětovný skok hrotu do vzorku, což může být zapříčiněno právě měřeným nerovným povrchem (obrázek 36).



Obrázek 36: Silová křivka ziskána při měření 1 hm. % alginátového hydrogelu pomocí modifikovaného nosníku.

Adhezní práce vytvořená mezi modifikovaným nosníkem a 1 hm. % alginátovým hydrogelem byla vypočtena na  $(1,576 \cdot 10^{-17} \pm 0,725 \cdot 10^{-17})$  J. Adhezní síla byla stanovena na 207,8 pN (obrázek 37).

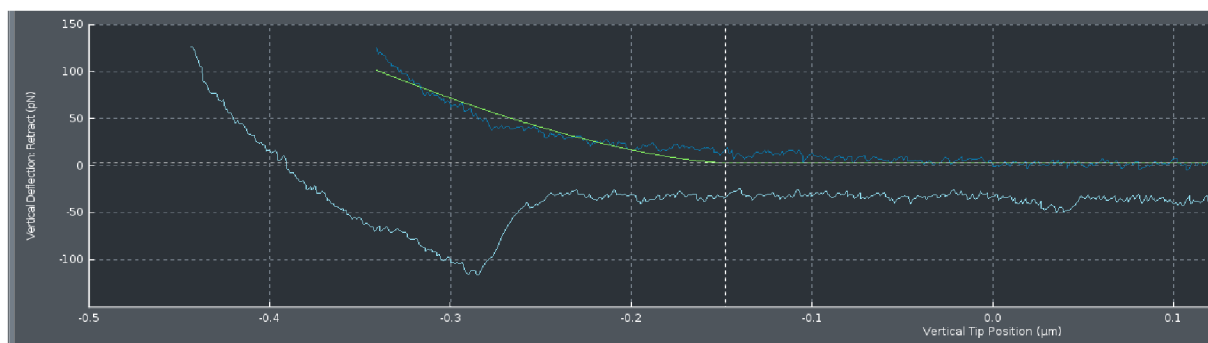


Obrázek 37: Adhezní práce naměřená mezi modifikovaným nosníkem a 1 hm. % alginátovým hydrogelem.

### Nosník typu MLCT-SPH-10UM-DC

Následně bylo provedeno měření pomocí nosníku MLCT-SPH-10UM-DC s 10 μm kuličkou místo hrotu, kdy konstanta pružnosti nosníku byla dle kalibrace stanovena na 0,007 N/m a rezonanční frekvence byla naměřena na 16,52 kHz. Hodnota působící síly nosníku na povrch vzorku činila 0,134 nN.

Měření proběhlo pouze jednou, jelikož se při každém dalším pokusu měření hrot oddaloval nebo zanořoval do vzorku, což neumožňovalo spustit měření, i přestože byla hodnota síly měněna. Pouze jedno měření bylo dokončeno bez přerušení za získání 64 naměřených silových křivek. Jedna z nich je zobrazena níže (obrázek 38).

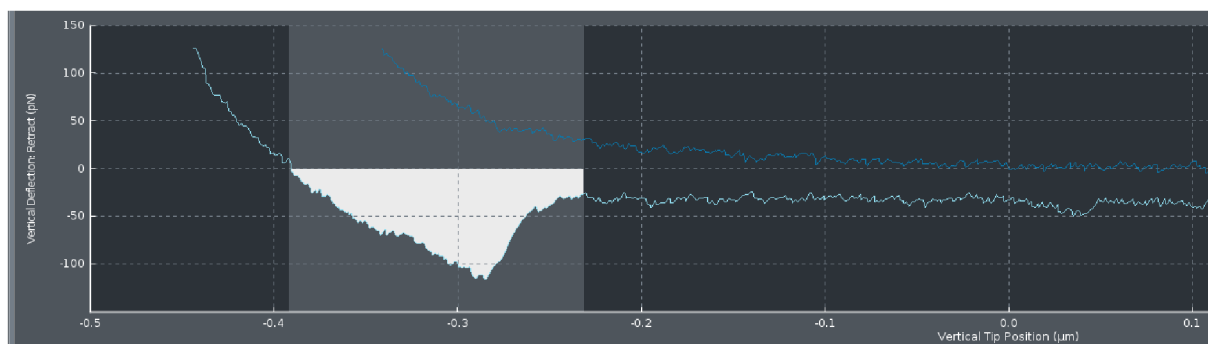


Obrázek 38: Silová křivka získaná při měření 1 hm. % alginátového hydrogelu pomocí nosníku MLCT-SPH-10UM-DC.

Youngův modulu pružnosti 1 hm. % alginátového hydrogelu byl stanoven na  $(382 \pm 159)$  Pa. Ten vyšel o řád nižší než pro agarózový hydrogel za použití stejného nosníku (i při vyšší působící síle). Na výsledek může mít vliv nižší koncentrace polymeru v alginátovém hydrogelu, což vede k nižší tuhosti struktury.

Solbu a kol. [80] měřili Youngův modul pružnosti pomocí mikroskopie atomárních sil 1,5 hm. % alginátového hydrogelu s 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , jehož hodnota činila  $(2\,265 \pm 564)$  Pa. V rámci chyby měření tato hodnota koresponduje se získanou hodnotou měřenou pomocí modifikovaného nosníku, kde naměřená hodnota Youngova modulu pružnosti vyšla  $(1\,459 \pm 1\,039)$  Pa při nastavené hodnotě *Setpointu* na 0,854 nN. Rozdíly hodnot mohou být způsobeny odlišnou přípravou a koncentrací alginátového hydrogelu, či vlivem použití jiného nosníku, kdy k měření povrchu používali hrot s poloměrem 30 nm, přičemž působení ostrých hrotů na zkoumaný povrch hydrogelů může vést k vyšším naměřeným hodnotám Youngova modulu pružnosti. Je možné, že námi naměřené hodnoty Youngova modulu pružnosti jsou nižší kvůli nedostatečně zesítené struktuře hydrogelu. Měření muselo být provedeno hodinu po přípravě, aby nedocházelo k pohybu hydrogelu, což však nemusela být dostatečná doba pro vytvoření kompletní polymerové struktury.

Hodnota adhezni práce naměřená mezi nosníkem s kuličkou a 1 hm. % alginátového hydrogelu byla vypočtena na  $(1,551 \cdot 10^{-17} \pm 0,518 \cdot 10^{-17})$  J. Adhezni síla byla zjištěna z nejnižšího bodu vykresleném silovou křivkou a činí 116,6 nN (obrázek 39).



Obrázek 39: Adhezni práce naměřená mezi nosníkem MLCT-SPH-10UM-DC a 1 hm. % alginátovým hydrogelem.

## 7 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo provést vhodnou modifikaci hrotů a experimentálně ověřit možnost realizace této modifikace v místě pracoviště, kde diplomová práce vznikala. Hlavní motivací bylo stanovení mechanických vlastností vybraných hydrogelů. Bylo předpokládáno, že při měření povrchů hydrogelů pomocí ostrých hrotů dochází nejen k poničení hrotu či povrchu vzorku, ale vlivem malého poloměru hrotu a nehomogenní struktury povrchu hydrogelů na nanoúrovni jsou získány při měření mechanických vlastností velké směrodatné odchylky. Z tohoto důvodu a také na základě literární rešerše byla vybrána možnost modifikace hrotů pomocí uchycení mikročástice na konec nosníku, pro zvětšení kontaktní měřicí plochy a tím zprůměrování naměřených hodnot.

Z počátku probíhaly snahy o modifikaci nosníku za pomoci instrumentálního vybavení na FCH VUT. Ukázalo se však, že absence optického mikroskopu v tandemu s AFM neumožňovala přesné uchycení mikročástice na nosník. Za tímto účelem byl osloven výzkumný ústav CEITEC, jelikož vlastní adekvátní instrumentální vybavení, vhodné pro realizaci stanoveného úkolu. Za těchto podmínek již byl hlavní cíl, tedy úspěšně provést modifikaci nosníku, splněn. Byl vybrán nosník typu NP-O10, který neobsahuje hrot a je určen přímo pro tyto účely. Na konec nosníku byla nalepena kulička melaminové pryskyřice o průměru 5  $\mu\text{m}$ , jelikož se tyto částice běžně využívají na pracovišti CEITEC pro danou aplikaci.

Modifikované nosníky byly následně použity pro stanovení Youngova modulu pružnosti, adhezní práce a adhezní síly působící mezi nosníkem a povrchem 2 hm. % agarózového hydrogelu. Pro měření byl vybrán kontaktní mód, který využívá silovou spektroskopii, jež detekuje působící síly mezi povrchem vzorku a hrotem. Analýzou silových křivek pomocí programu *JPK Data Processing* a Hertz/Sneddon modelu byly vypočteny uvedené mechanické vlastnosti. Pro porovnání naměřených hodnot pomocí modifikovaného nosníku byly vybrány dva komerční nosníky. Jedním z nich je typ SNL-10 s ostrým hrotem 2 nm. Druhým je nosník typu MLCT-SPH-10UM-DC, který naopak místo hrotu obsahuje kuličku z nitridu křemíku o průměru 10  $\mu\text{m}$ .

Bylo naplněno očekávání a konkrétně to, že ostrý hrot vyvolává lokální napětí na povrchu vzorku, což může vést k vysokým hodnotám Youngova modulu pružnosti a vlivem pórovité struktury při měření jak pórů, tak polymerních řetězců dochází k navýšení směrodatných odchylek naměřených dat. V kontaktním měřicím režimu, který byl v diplomové práci používán, může docházet k poškození či ulomení hrotu, nebo narušení povrchu měřeného vzorku, což nepříznivě ovlivňuje naměřená data. Nosníky s ostrými hroty poskytují vysoké rozlišení při zobrazování struktury povrchů materiálů, ale zdají se být méně vhodné pro měření mechanických vlastností za využití silové spektroskopie z důvodů uvedených výše.

Naopak měření mechanických vlastností pomocí nosníku MLCT-SPH-10UM-DC s kuličkou vykazovalo nízké směrodatné odchylky a nízké naměřené hodnoty Youngova modulu pružnosti, pravděpodobně vlivem rozprostření sil a větší měřicí plochy sondy na povrchu hydrogelu. U nosníků s kuličkami nedochází k mechanickému poškození povrchu vzorku vedoucí k variabilitě naměřených dat, jako tomu může být u ostrých hrotů a zdá se, že



jsou ideálními měřicími sondami využívanými pro stanovení mechanických vlastností pomocí kontaktního režimu.

Měření povrchu pomocí modifikovaného nosníku poskytovalo vysoké odchylky naměřeného Youngova modulu pružnosti, pravděpodobně vlivem přítomného lepidla či částice, vykazující hydrofilní charakter. Ten se projevoval i na naměřené adhezní práci a síle, které byly vyšší než u měření pomocí komerčně dostupného nosníku s kuličkou místo hrotu. Uchycení částice na nosník způsobí změnu v konstantě pružnosti a rezonanční frekvenci nosníku, což může mít také významný vliv na měření. Do budoucna by bylo vhodné použít pro modifikaci nosníku ke stanovení mechanických vlastností hydrogelů více inertní materiál, jež nevykazuje vysokou adhezní sílu mezi nosníkem a vzorkem. V budoucnu mohou být také využity i vyrobené nosníky s přilepenou kuličkou melaminové pryskyřice s COOH skupinami, pro měření interakcí s hydrofilními látkami.

Následně byl zkoumán vliv nastavené působící síly (*Setpoint*) na naměřené hodnoty Youngova modulu pružnosti 2 hm. % agarózového hydrogelu za využití nosníku MLCT-SPH-10UM-DC. Bylo zjištěno, že čím je působící síla nosníku na povrch hydrogelu vyšší, tím je naměřen vyšší Youngův modul pružnosti. Na měření Youngova modulu pružnosti má vliv tedy nejen hodnota působící síly, ale i tvar a vlastnosti nosníku. Je proto důležité při každém měření definovat zmíněné parametry.

Závěrem byl měřen také povrch 1 hm. % alginátového iontově síťovaného hydrogelu, kdy byly stanoveny jeho mechanické vlastnosti pomocí modifikovaného nosníku a komerčního nosníku s kuličkou. Vzhledem k výsledkům předchozího měření byl nosník s ostrým hrotem vyřazen. Měření bylo náročnější, jelikož vlivem synergeze docházelo k odlepování hydrogelu od dna Petriho misky, což znehodnocovalo měření. Získané hodnoty Youngova modulu pružnosti pomocí modifikovaného nosníku byly porovnány s literaturou [80] a bylo zjištěno, že v rámci směrodatné odchylky se hodnoty shodují.

Výhledem do budoucna by mohla být optimalizace měření mechanických vlastností hydrogelů s jiným typem síťování. Je žádoucí optimalizovat přípravu tak, aby byl minimalizován pohyb hydrogelu v Petriho misce a zajištěn rovný povrch, jako tomu bylo u agarózového hydrogelu. Cílem do budoucna je, aby se z měření AFM stala univerzální metoda pro stanovení mechanických vlastností polotuhých materiálů na mikroúrovni.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BINNIG, G., C. F. QUATE a Ch. GERBER. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 1986, **56**(9), 930–933. ISSN 0031-9007. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930
- [2] GULATI, Karan a Taiji ADACHI. Profiling to Probing: Atomic force microscopy to characterize nano-engineered implants. *Acta Biomaterialia*. 2023, **170**, 15–38. ISSN 17427061. doi:10.1016/j.actbio.2023.08.006
- [3] Seeing Atoms and Clusters on Surfaces. In: *Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerenes*. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2023-11-18], s. 59–87. ISBN 978-0-323-48057-4. doi:10.1016/B978-0-323-48057-4.00004-9
- [4] DEMIR-YILMAZ, Irem, Pascal GUIRAUD a Cécile FORMOSA-DAGUE. The contribution of Atomic Force Microscopy (AFM) in microalgae studies: A review. *Algal Research*. 2021, **60**, 102506. ISSN 22119264. doi:10.1016/j.algal.2021.102506
- [5] MILCZAREK, Michał, Dariusz M. JARZĄBEK, Piotr JENCZYK, Kamil BOCHENEK a Maciej FILIPIAK. Novel paradigm in AFM probe fabrication: Broadened range of stiffness, materials, and tip shapes. *Tribology International*. 2023, **180**, 108308. ISSN 0301679X. doi:10.1016/j.triboint.2023.108308
- [6] PR-UM-PFIR-A-10. *Bruker: Probes*. <https://www.brukerafmprobes.com/p-4110-pr-um-pfir-a-10.aspx>
- [7] VERBIEST, G.J. a M.J. ROST. Resonance frequencies of AFM cantilevers in contact with a surface. *Ultramicroscopy*. 2016, **171**, 70–76. ISSN 03043991. doi:10.1016/j.ultramic.2016.07.018
- [8] STEWART, Martin P., Adrian W. HODEL, Andreas SPIELHOFER, Cedric J. CATTIN, Daniel J. MÜLLER a Jonne HELENIUS. Wedged AFM-cantilevers for parallel plate cell mechanics. *Methods*. 2013, **60**(2), 186–194. ISSN 10462023. doi:10.1016/j.ymeth.2013.02.015
- [9] CHEN, C. Julian. *Introduction to scanning tunneling microscopy*. Third edition. New York, NY: Oxford University Press, 2021. Monographs on the physics and chemistry of materials, 69. ISBN 978-0-19-885655-9.
- [10] YU, Qingkai, Guoting QIN, Chinmay DARNE, Chengzhi CAI, Wanda WOSIK a Shin-Shem PEI. Fabrication of short and thin silicon cantilevers for AFM with SOI wafers. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2006, **126**(2), 369–374. ISSN 09244247. doi:10.1016/j.sna.2005.10.019
- [11] VIANI, M. B., T. E. SCHÄFFER, G. T. PALOCZI, L. I. PIETRASANTA, B. L. SMITH, J. B. THOMPSON, M. RICHTER, M. RIEF, H. E. GAUB, K. W. PLAXCO, A. N. CLELAND, H. G. HANSMA a P. K. HANSMA. Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 1999, **70**(11), 4300–4303. ISSN 0034-6748, 1089-7623. doi:10.1063/1.1150069

- [12] KÁMÁN, Judit, Róbert HUSZÁNK a Attila BONYÁR. Towards more reliable AFM force-curve evaluation: A method for spring constant selection, adaptive lever sensitivity calibration and fitting boundary identification. *Micron*. 2019, **125**, 102717. ISSN 09684328. doi:10.1016/j.micron.2019.102717
- [13] SENDEN, Tim a William DUCKER. Experimental Determination of Spring Constants in Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 1994, **10**(4), 1003–1004. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la00016a600
- [14] TIAN, Yanling, Chongkai ZHOU, Fujun WANG, Kangkang LU a Dawei ZHANG. A novel compliant mechanism based system to calibrate spring constant of AFM cantilevers. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2020, **309**, 112027. ISSN 09244247. doi:10.1016/j.sna.2020.112027
- [15] CLEVELAND, J. P., S. MANNE, D. BOCEK a P. K. HANSMA. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments*. 1993, **64**(2), 403–405. ISSN 0034-6748, 1089-7623. doi:10.1063/1.1144209
- [16] SADER, John E., Ian LARSON, Paul MULVANEY a Lee R. WHITE. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 1995, **66**(7), 3789–3798. ISSN 0034-6748, 1089-7623. doi:10.1063/1.1145439
- [17] MAGONOV, Sergei N. a Myung-Hwan WHANGBO. *Surface Analysis with STM and AFM: Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis*. 1. vyd. B.m.: Wiley, 1995 [vid. 2023-12-18]. ISBN 978-3-527-29313-1. doi:10.1002/9783527615117
- [18] ZHOU, Yuxiao a Jing DU. Atomic force microscopy (AFM) and its applications to bone-related research. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2022, **176**, 52–66. ISSN 00796107. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2022.10.002
- [19] KIRROU, Ilham a Mohamed BELHAQ. Effect of contact stiffness modulation in contact-mode AFM under subharmonic excitation. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*. 2013, **18**(10), 2916–2925. ISSN 10075704. doi:10.1016/j.cnsns.2013.02.008
- [20] *The nanowizard AFM Handbook. JPK Instruments.*  
<https://www.manualslib.com/manual/1228808/Jpk-Instruments-Nanowizard-Afm.html>
- [21] LOU, Zhichao, Yao ZHANG, Yanjun LI a Lei XU. Study on microscopic physical and chemical properties of biomass materials by AFM. *Journal of Materials Research and Technology*. 2023, **24**, 10005–10026. ISSN 22387854. doi:10.1016/j.jmrt.2023.05.176
- [22] JOSHUA, A.M., G. CHENG a E.V. LAU. Soft matter analysis via atomic force microscopy (AFM): A review. *Applied Surface Science Advances*. 2023, **17**, 100448. ISSN 26665239. doi:10.1016/j.apsadv.2023.100448
- [23] KAMRUZZAHAN, A.S.M., Ferry KIENBERGER, Cordula M. STROH, Jörg BERG, Ralf HUSS, Andreas EBNER, Rong ZHU, Christian RANKL, Hermann J. GRUBER a Peter HINTERDORFER. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM. *Biological Chemistry*. 2004, **385**(10) [vid. 2023-12-18]. ISSN 1431-6730. doi:10.1515/BC.2004.124

- [24] FORMOSA-DAGUE, Cécile, Raphaël Emmanuel DUVAL a Etienne DAGUE. Cell biology of microbes and pharmacology of antimicrobial drugs explored by Atomic Force Microscopy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018, **73**, 165–176. ISSN 10849521. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.022
- [25] CAPPELLA, B. a G. DIETLER. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*. 1999, **34**(1–3), 1–104. ISSN 01675729. doi:10.1016/S0167-5729(99)00003-5
- [26] BUTT, Hans-Jürgen, Brunero CAPPELLA a Michael KAPPL. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*. 2005, **59**(1–6), 1–152. ISSN 01675729. doi:10.1016/j.surfrep.2005.08.003
- [27] CARPICK, Robert W. a Miquel SALMERON. Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with Atomic Force Microscopy. *Chemical Reviews*. 1997, **97**(4), 1163–1194. ISSN 0009-2665, 1520-6890. doi:10.1021/cr960068q
- [28] KOETNIYOM, W., T. SUHATCHO, A. TREETONG a T. THIWAWONG. AFM force distance curve measurement for surface investigation of polymers compound blend with metal nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*. 2017, **4**(5), 6205–6211. ISSN 22147853. doi:10.1016/j.matpr.2017.06.117
- [29] HERTZ, Heinrich. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *crll*. 1882, **1882**(92), 156–171. ISSN 0075-4102, 1435-5345. doi:10.1515/crll.1882.92.156
- [30] DERJAGUIN, B.V, V.M MULLER a Yu.P TOPOROV. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1975, **53**(2), 314–326. ISSN 00219797. doi:10.1016/0021-9797(75)90018-1
- [31] CHOI, Jinsol, Lyndon BASTATAS, Eunhee LEE, Kiiio Tony MUTISO a Soyeun PARK. Mechanical characterization of multi-layered lipid nanoparticles using high-resolution AFM force spectroscopy. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2022, **113**, 283–292. ISSN 1226086X. doi:10.1016/j.jiec.2022.06.003
- [32] MAUGIS, Daniel. Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1992, **150**(1), 243–269. ISSN 00219797. doi:10.1016/0021-9797(92)90285-T
- [33] CHURNSIDE, Allison B., Ruby May A. SULLAN, Duc M. NGUYEN, Sara O. CASE, Matthew S. BULL, Gavin M. KING a Thomas T. PERKINS. Routine and Timely Sub-picoNewton Force Stability and Precision for Biological Applications of Atomic Force Microscopy. *Nano Letters*. 2012, **12**(7), 3557–3561. ISSN 1530-6984, 1530-6992. doi:10.1021/nl301166w
- [34] SULLAN, Ruby May A., Allison B. CHURNSIDE, Duc M. NGUYEN, Matthew S. BULL a Thomas T. PERKINS. Atomic force microscopy with sub-picoNewton force stability for biological applications. *Methods*. 2013, **60**(2), 131–141. ISSN 10462023. doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.029
- [35] EDWARDS, Devin T. a Thomas T. PERKINS. Optimizing force spectroscopy by modifying commercial cantilevers: Improved stability, precision, and temporal

- resolution. *Journal of Structural Biology*. 2017, **197**(1), 13–25. ISSN 10478477. doi:10.1016/j.jsb.2016.01.009
- [36] EDWARDS, Devin T., Jaevyn K. FAULK, Aric W. SANDERS, Matthew S. BULL, Robert WALDER, Marc-Andre LEBLANC, Marcelo C. SOUSA a Thomas T. PERKINS. Optimizing 1- $\mu$ s-Resolution Single-Molecule Force Spectroscopy on a Commercial Atomic Force Microscope. *Nano Letters*. 2015, **15**(10), 7091–7098. ISSN 1530-6984, 1530-6992. doi:10.1021/acs.nanolett.5b03166
- [37] WESTRA, K. L., A. W. MITCHELL a D. J. THOMSON. Tip artifacts in atomic force microscope imaging of thin film surfaces. *Journal of Applied Physics*. 1993, **74**(5), 3608–3610. ISSN 0021-8979, 1089-7550. doi:10.1063/1.354498
- [38] WEI, Z.Q., C. WANG a C.L. BAI. Surface imaging of fragile materials with hydrophobic atomic force microscope tips. *Surface Science*. 2000, **467**(1–3), 185–190. ISSN 00396028. doi:10.1016/S0039-6028(00)00783-4
- [39] Liquid Scanning with Atomic Force Microscopy. *AFM workshop*. <https://www.afmworkshop.com/newsletter/liquid-scanning-with-an-atomic-force-microscope>
- [40] ITO, Takashi, Shaida IBRAHIM a Iwona GRABOWSKA. Chemical-force microscopy for materials characterization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(3), 225–233. ISSN 01659936. doi:10.1016/j.trac.2009.12.008
- [41] LIANG, Jian a Julio M. FERNÁNDEZ. Mechanochemistry: One Bond at a Time. *ACS Nano*. 2009, **3**(7), 1628–1645. ISSN 1936-0851, 1936-086X. doi:10.1021/nn900294n
- [42] VAN DER VEGTE, Eric W. a Georges HADZIIOANNOU. Scanning Force Microscopy with Chemical Specificity: An Extensive Study of Chemically Specific Tip–Surface Interactions and the Chemical Imaging of Surface Functional Groups. *Langmuir*. 1997, **13**(16), 4357–4368. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la970025k
- [43] NOY, Aleksandr. *Handbook of molecular force spectroscopy*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-49987-1.
- [44] NOY, Aleksandr, C. Daniel FRISBIE, Lawrence F. ROZSNYAI, Mark S. WRIGHTON a Charles M. LIEBER. Chemical Force Microscopy: Exploiting Chemically-Modified Tips To Quantify Adhesion, Friction, and Functional Group Distributions in Molecular Assemblies. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, **117**(30), 7943–7951. ISSN 0002-7863, 1520-5126. doi:10.1021/ja00135a012
- [45] ULMAN, Abraham. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*. 1996, **96**(4), 1533–1554. ISSN 0009-2665, 1520-6890. doi:10.1021/cr9502357
- [46] NUZZO, Ralph G. a David L. ALLARA. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1983, **105**(13), 4481–4483. ISSN 0002-7863, 1520-5126. doi:10.1021/ja00351a063

- [47] BAIN, Colin D., E. Barry TROUGHTON, Yu Tai TAO, Joseph EVALL, George M. WHITESIDES a Ralph G. NUZZO. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society*. 1989, **111**(1), 321–335. ISSN 0002-7863, 1520-5126. doi:10.1021/ja00183a049
- [48] TAKANO, Hajime, Jeremy R. KENSETH, Sze-Shun WONG, Janese C. O'BRIE a Marc D. PORTER. Chemical and Biochemical Analysis Using Scanning Force Microscopy. *Chemical Reviews*. 1999, **99**(10), 2845–2890. ISSN 0009-2665, 1520-6890. doi:10.1021/cr9801317
- [49] CUMURCU, Aysegul, Jordi DIAZ, Ian D. LINDSAY, Sissi DE BEER, Joost DUVIGNEAU, Peter SCHÖN a G. JULIUS VANCOSO. Optical imaging beyond the diffraction limit by SNEM: Effects of AFM tip modifications with thiol monolayers on imaging quality. *Ultramicroscopy*. 2015, **150**, 79–87. ISSN 03043991. doi:10.1016/j.ultramic.2014.12.001
- [50] FUJIHIRA, Masamichi, Hiroki OKUI a Fuminobu SATO. Scanning Probe Microscopies as Chemical Force microscopy for Self-assembled Monolayers. In: Allen J. BARD, Martin STRATMANN, Eliezer GILEADI, Michael URBAKH, Ernesto J. CALVO, Patrick R. UNWIN, Gerald S. FRANKEL, Digby MACDONALD, Stuart LICHT, Hans J. SCHÜFER, George S. WILSON, Israel RUBINSTEIN, Masamichi FUJIHIRA, Patrik SCHMUKI, Fritz SCHOLZ, Christopher J. PICKETT a James F. RUSLING, ed. *Encyclopedia of Electrochemistry*. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2007 [vid. 2023-12-20]. ISBN 978-3-527-30250-5. doi:10.1002/9783527610426.bard100602
- [51] ITO, Takashi, Madoka NAMBA, Philippe BÜHLMANN a Yoshio UMEZAWA. Modification of Silicon Nitride Tips with Trichlorosilane Self-Assembled Monolayers (SAMs) for Chemical Force Microscopy. *Langmuir*. 1997, **13**(16), 4323–4332. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la9609783
- [52] ITO, Takashi, Daniel CITTERIO, Philippe BÜHLMANN a Yoshio UMEZAWA. Observation of Silver and Hydrogen Ion Binding to Self-Assembled Monolayers Using Chemically Modified AFM Tips. *Langmuir*. 1999, **15**(8), 2788–2793. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la980661y
- [53] SILBERZAN, P., L. LEGER, D. AUSSERRE a J. J. BENATTAR. Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers. *Langmuir*. 1991, **7**(8), 1647–1651. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la00056a017
- [54] BARATTIN, Régis a Normand VOYER. Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chemical Communications*. 2008, (13), 1513. ISSN 1359-7345, 1364-548X. doi:10.1039/b614328h
- [55] ROS, Robert, Falk SCHWESINGER, Dario ANSELMETTI, Martina KUBON, Rolf SCHÄFER, Andreas PLÜCKTHUN a Louis TIEFENAUER. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, **95**(13), 7402–7405. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi:10.1073/pnas.95.13.7402

- [56] O'CALLAHAN, Brian, Odeta QAFOKU, Viktor BALEMA, Oscar A. NEGRETE, Ali PASSIAN, Mark H. ENGELHARD a Katrina M. WATERS. Atomic Force Microscopy and Infrared Nanospectroscopy of COVID-19 Spike Protein for the Quantification of Adhesion to Common Surfaces. *Langmuir*. 2021, **37**(41), 12089–12097. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/acs.langmuir.1c01910
- [57] DUCKER, William A., Tim J. SENDEN a Richard M. PASHLEY. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature*. 1991, **353**(6341), 239–241. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi:10.1038/353239a0
- [58] STÖBER, Werner, Arthur FINK a Ernst BOHN. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1968, **26**(1), 62–69. ISSN 00219797. doi:10.1016/0021-9797(68)90272-5
- [59] KAUPPI, Annika, Karin M. ANDERSSON a Lennart BERGSTRÖM. Probing the effect of superplasticizer adsorption on the surface forces using the colloidal probe AFM technique. *Cement and Concrete Research*. 2005, **35**(1), 133–140. ISSN 00088846. doi:10.1016/j.cemconres.2004.07.008
- [60] SEGEREN, L. H. G. J., B. SIEBUM, F. G. KARSSENBERG, J. W. A. VAN DEN BERG a G. J. VANCSO. Microparticle adhesion studies by atomic force microscopy. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2002, **16**(7), 793–828. ISSN 0169-4243, 1568-5616. doi:10.1163/156856102760136418
- [61] CHEUNG, Chin Li, Jason H. HAFNER a Charles M. LIEBER. Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, **97**(8), 3809–3813. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi:10.1073/pnas.050498597
- [62] HUDSPETH, Q.M., K.P. NAGLE, Y.-P. ZHAO, T. KARABACAK, C.V. NGUYEN, M. MEYYAPPAN, G.-C. WANG a T.-M. LU. How does a multiwalled carbon nanotube atomic force microscopy probe affect the determination of surface roughness statistics? *Surface Science*. 2002, **515**(2–3), 453–461. ISSN 00396028. doi:10.1016/S0039-6028(02)01955-6
- [63] STEVENS, Ramsey M. New carbon nanotube AFM probe technology. *Materials Today*. 2009, **12**(10), 42–45. ISSN 13697021. doi:10.1016/S1369-7021(09)70276-7
- [64] HAFNER, Jason H., Chin Li CHEUNG a Charles M. LIEBER. Direct Growth of Single-Walled Carbon Nanotube Scanning Probe Microscopy Tips. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, **121**(41), 9750–9751. ISSN 0002-7863, 1520-5126. doi:10.1021/ja992761b
- [65] POTTATHARA, Yasir Beeran, Yves GROHENS, Vanja KOKOL, Nandakumar KALARIKKAL a Sabu THOMAS. Synthesis and Processing of Emerging Two-Dimensional Nanomaterials. In: *Nanomaterials Synthesis*. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2023-12-22], s. 1–25. ISBN 978-0-12-815751-0. doi:10.1016/B978-0-12-815751-0.00001-8

- [66] BABEL, B. a M. RUDOLPH. Fast preparation and recycling method for colloidal probe cantilevers in hydrophobic mapping applications. *MethodsX*. 2019, **6**, 651–659. ISSN 22150161. doi:10.1016/j.mex.2019.03.010
- [67] ISHIDA, Naoyuki. Direct measurement of hydrophobic particle–bubble interactions in aqueous solutions by atomic force microscopy: Effect of particle hydrophobicity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, **300**(3), 293–299. ISSN 09277757. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.02.003
- [68] LEE, Jae-Hyeok, Won-Seok KANG, Bung-Sam CHOI, Sung-Wook CHOI a Jae-Ho KIM. Fabrication of carbon nanotube AFM probes using the Langmuir–Blodgett technique. *Ultramicroscopy*. 2008, **108**(10), 1163–1167. ISSN 03043991. doi:10.1016/j.ultramic.2008.04.073
- [69] PARK, June-Ki, Jong-Hong LEE, Chang-Soo HAN, Hong-Sung KIM a Kyu-Ho HWANG. Morphology control and integration of the carbon nanotube tip for AFM. *Current Applied Physics*. 2006, **6**, e220–e223. ISSN 15671739. doi:10.1016/j.cap.2006.01.044
- [70] HEADRICK, Jill E. a Cindy L. BERRIE. Alternative Method for Fabricating Chemically Functionalized AFM Tips: Silane Modification of HF-Treated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Probes. *Langmuir*. 2004, **20**(10), 4124–4131. ISSN 0743-7463, 1520-5827. doi:10.1021/la036425r
- [71] JRADI, Khalil, Marjorie SCHMITT a Sophie BISTAC. Influence of the surface chemistry on the nanotribological behaviour of (AFM tip/graphite) couples. *Applied Surface Science*. 2012, **258**(10), 4687–4697. ISSN 01694332. doi:10.1016/j.apsusc.2012.01.061
- [72] VEZENOV, Dmitri V., Andrew V. ZHUK, George M. WHITESIDES a Charles M. LIEBER. Chemical Force Spectroscopy in Heterogeneous Systems: Intermolecular Interactions Involving Epoxy Polymer, Mixed Monolayers, and Polar Solvents. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, **124**(35), 10578–10588. ISSN 0002-7863, 1520-5126. doi:10.1021/ja025951m
- [73] TESP-V2. *bruker: Probes*. <https://www.brukerafmprobes.com/p-3844-tespa-v2.aspx>
- [74] SNL-10. *Bruker: Probes*. <https://www.brukerafmprobes.com/p-3693-snl-10.aspx>
- [75] MLCT-SPH-10UM-DC. *Bruker: Probes*. <https://www.brukerafmprobes.com/p-4101-mlct-sph-10um-dc.aspx>
- [76] NP-O10. *Bruker: Probes*. <https://www.brukerafmprobes.com/p-3433-np-o10.aspx>
- [77] DIMITRIADIS, Emiliós K., Ferenc HORKAY, Julia MARESCA, Bechara KACHAR a Richard S. CHADWICK. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal*. 2002, **82**(5), 2798–2810. ISSN 00063495. doi:10.1016/S0006-3495(02)75620-8
- [78] TRUDICOVA, Monika, Jiri SMILEK, Michal KALINA, Marcela SMILKOVA, Katerina ADAMKOVA, Kamila HRUBANOVA, Vladislav KRZYZANEK a Petr SEDLACEK. Multiscale Experimental Evaluation of Agarose-Based Semi-



- Interpenetrating Polymer Network Hydrogels as Materials with Tunable Rheological and Transport Performance. *Polymers*. 2020, **12**(11), 2561. ISSN 2073-4360. doi:10.3390/polym12112561
- [79] ED-DAOUI, A., M. BENELMOSTAFA a M. DAHMANI. Study of the viscoelastic properties of the agarose gel. *Materials Today: Proceedings*. 2019, **13**, 746–751. ISSN 22147853. doi:10.1016/j.matpr.2019.04.036
- [80] AKBARZADEH SOLBU, Anita, Andre KOERNIG, Joachim S. KJESBU, Daria ZAYTSEVA-ZOTOVA, Marit SLETMOEN a Berit L. STRAND. High resolution imaging of soft alginate hydrogels by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers*. 2022, **276**, 118804. ISSN 01448617. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118804

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 9.1 Seznam zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
SMP	mikroskopie skenovací sondou
DMT	Derjaguin-Müller-Toporov teorie
JKR	Johnson-Kendall-Roberts teorie
SAM	samouspořádané monovrstvy
CNT	uhlíková nanotrubiice
MWCNT	vícestěnná uhlíková nanotrubiice
SWCNT	jednostěnná uhlíková nanotrubiice
CVD	chemická depozice z plynné fáze
CFM	mikroskopie chemických sil

### 9.2 Seznam symbolů

$f_0$	rezonanční frekvence	[Hz]
$t$	tloušťka nosníku	[m]
$l$	délka nosníku	[m]
$E$	Youngův modul	[Pa]
$\rho$	hustota materiálu	[kg/m <sup>3</sup> ]
$k$	konstanta pružnosti	[N/m]
$w$	šířka nosníku	[m]
$F$	aplikovaná síla na vzorek	[m]
$D$	hloubka vtisku hrotu	[m]
$R$	poloměr hrotu	[m]
$\nu$	Poissonovo číslo	[–]
$z_0$	poloha hrotu s nulovým zatížením	[m]
$z_{\text{hrot}}$	okamžitá výchylka hrotu	[m]
$R_s$	poloměr kuličky	[m]
$a$	poloměr kontaktní oblasti	[m]
$\alpha$	poloviční úhel kužele nosníku	[°]