

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 2: Fyzika

Dynamický rozptyl světla

Dynamic light scattering

Autor: Martin Čmel
Škola: Gymnázium Jiřího Wolкера Prostějov
Kraj: Olomoucký
Vedoucí: Mgr. Robert Stárek
Konzultant: RNDr. Miroslav Ježek, Ph.D.

Prostějov 2020

Poděkování

Chtěl bych velmi poděkovat Mgr. Robertu Stárkovi, který se mnou strávil hodiny v laboratoři a věnoval mi obrovské množství svého času. Také pak RNDr. Miroslavu Ježkovi za pomoc, odborné poznámky a cenná vysvětlení problematiky. Umožnili mi přístup na katedru optiky PřF UP, bez kterého by tato práce nevznikla. Opravdu moc mě toho naučili a otevřeli mi úplně nové okno do světa fyziky. Těchto zkušeností si nesmírně cením a obou dvou si velmi vážím. Velký dík patří také RNDr. Janě Soukupové z katedry chemie PřF UP, která nám umožnila přístup ke komerčnímu přístroji. Děkuji také i všem ostatním, kteří mě v práci podporovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedenou v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Prostějově dne

Annotation

This work describes the analysis of nanoparticles in solutions by the dynamic light scattering method. The aim of the work is to construct an apparatus, which will be able to detect light scattered from observed samples. Unlike commercial devices, with our apparatus we will have the opportunity to modify experimental and software instrumentation for enhancing the sensitivity of the method. From the fluctuations of the scattered light we evaluate the so-called autocorrelation function, which characterizes speed of these fluctuations. By fitting this function, we determine the diffusion coefficients of particles, which correspond to the velocity of particles in solution. We are then able to calculate the hydrodynamic radius using Stokes-Einstein relationship, which indicates the particle size in the sample. In this work I define the properties of our apparatus and contrast with different settings. I successfully compare our results with those measured using a commercially available device and find minimum differences.

Keywords: Dynamic light scattering; autocorrelation function; diffusion coefficient; hydrodynamic radius; nanoparticles

Anotace

Tato práce se zabývá analýzou nanočástic v roztocích metodou dynamického rozptylu světla. Cílem práce je sestavení aparatury, která bude detekovat světlo rozptýlené z pozorovaných vzorků. Na rozdíl od komerčních přístrojů, s naší aparaturou budeme mít možnost modifikovat experimentální i softwarové vybavení s cílem zlepšení citlivosti této metody. Z fluktuací rozptýleného světla vyhodnocujeme tzv. autokorelační funkci, která vypovídá o rychlosti těchto fluktuací. Fitováním této funkce určíme difúzní koeficienty částic, které vypovídají o rychlosti pohybu částic v roztoku. S nimi jsme pak schopni pomocí Stokes-Einsteinova vztahu vypočítat hydrodynamický poloměr, který vypovídá o velikosti částic ve vzorku. V práci definuji vlastnosti naší aparatury a porovnávám výsledky s různými prvky v aparatuře či jejím odlišném nastavení. Naše výsledky úspěšně srovnávám s komerčně používaným přístrojem a shledávám minimální rozdíly.

Klíčová slova: Dynamický rozptyl světla; autokorelační funkce; difúzní koeficient; hydrodynamický poloměr; nanočástice

Obsah

ÚVOD	6
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 Rozptyl světla.....	7
1.2 Dynamický rozptyl světla.....	10
1.2.1 Požadavky na zdroj světla.....	11
1.2.2 Autokorelační funkce.....	12
1.2.3 Difúzní koeficient.....	14
1.2.4 Hydrodynamický poloměr.....	15
2 METODIKA	16
2.1 Experimentální vybavení.....	16
2.2 Aparatura.....	19
2.3 Zpracování dat.....	21
2.3.1 Vyhodnocení autokorelační funkce.....	21
2.3.2 Fitování.....	23
2.3.3 Distribuce částic.....	23
2.3.4 Příprava vzorku.....	24
3 EXPERIMENT	26
3.1 Justáž.....	26
3.2 Vlastní výsledky.....	28
3.2.1 Referenční vzorky.....	28
3.2.2 Srovnání vlivu rozdílných optických výkonů.....	32
3.2.3 Porovnání výsledků s různými optickými vlákny.....	34
3.2.4 Srovnání vzorků o různých koncentracích.....	37
3.2.5 Porovnání naší aparatury a komerčního přístroje.....	38
ZÁVĚR	44
REFERENCE	45
SEZNAM PŘÍLOH	48

ÚVOD

Lidstvo se již od svého počátku snažilo pochopit podstatu a chování světla. Jako první se ho pokusili popsat již antičtí filozofové jako Pythagoras, Demokritos nebo Aristoteles. Tak vznikl fyzikální obor *optika*, který se zabývá elektromagnetickým zářením (jehož součástí je i světlo). Zabývá se světlem samotným, jeho šířením a interakcemi s prostředím. Jedním z jevů, který optika popisuje, je rozptyl světla, kterým se zabývá právě má práce. Jde o jednu z možných interakcí světla s okolním prostředím. Při rozptylu záření (např. světla) se může část paprsku odchýlit od svého původního směru pohybu vlivem působení daného optického prostředí. Takovýto jev běžně pozorujeme např. při průchodu světla kouřem nebo mlhou.

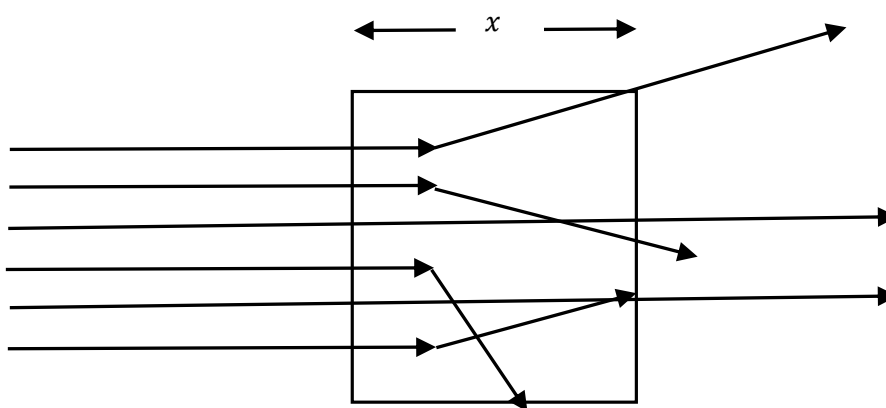
Dynamický rozptyl světla (DLS) je jednou z metod měření velikosti částic, která se zakládá právě na rozptylu světla. Tato metoda měří Brownův pohyb částic (náhodný pohyb částic vzniklý jejich srážením) v roztocích. Míra Brownova pohybu je určena detekováním fluktuací (změn) množství světla rozptýleného z tohoto roztoku v čase. Z fluktuací je pak možné pomocí Stokes–Einsteinovy rovnice určit *velikost částic* v roztoku. Malé částice se pohybují rychleji, fluktuace jsou pak vyšší, velké částice jsou pomalejší, fluktuace nižší. Dynamický rozptyl světla lze využít pro určení velikosti částic v submikronové oblasti, částic o rozměrech v řádu od 1 do 1000 nm (např. nanočástice, proteinové roztoky, agregáty, polymery). Znalost rozměrů těchto částic se poté dá dále využít na poli medicíny nebo farmacie [6], [9].

Cílem mé práce je sestrojít aparaturu, která bude na základě metody dynamického rozptylu světla schopna určit velikost částic zkoumané látky. Tato experimentální platforma umožní testovat odlišné metody pro zlepšení a zpřesnění DLS. Můžeme v ní měnit prvky po stránce vybavení i po stránce programů, které zpracovávají data. Mnou naměřené velikosti srovnám s hodnotou naměřenou u té samé látky na komerčně používaném přístroji a porovnáme, jak se velikosti liší. Dalším cílem je zjistit, na jaké nejnižší nutné koncentraci částic v roztoku bude sestrojená aparatura ještě fungovat. Práce je rozdělena na část teoretickou, praktickou a metodiku práce. V teoretické části jsou popsány fakta a vztahy, na nichž se veškeré měření zakládá. Věnuji se popisu rozptylu a poté fungování metody DLS. Praktická část zpracovává vlastní měření, tedy získaná data, jejich interpretaci a určenou velikost částic. Metodika práce se detailněji věnuje vytvořené aparatuře, jejím částem a volbě konkrétního vybavení a metod zpracování dat pro co nejlepší výsledky.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rozptyl světla

Rozptyl (difúze) světla je jedna z možných interakcí světla s hmotou, při které na sebe fotony a částice hmoty vzájemně působí. Část světelného paprsku se tím může odklonit od svého původního směru šíření (Obr. 1). Tím se zeslabí původní intenzita paprsku procházejícího optickým prostředím. Příklady rozptylu od uspořádaných částic, kdy se směr šíření fotonů mění, jsou odraz (reflexe), lom (refrakce) a ohyb (difrakce) světla. Při metodě DLS se však uvažuje pouze rozptyl od nepravidelně se pohybujících částic v *roztocích* [12], [13].

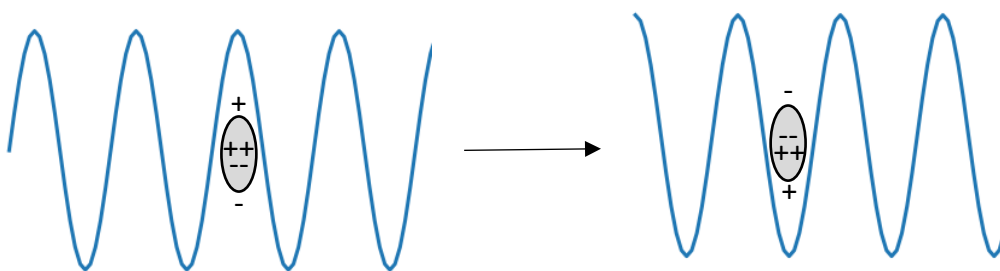


Obrázek 1: Zeslabení intenzity paprsku při rozptylu. Pokud se rozptýlí všechno světlo, pak se nám roztok jeví jako neprůhledný (mléko). Naopak jestliže je rozptýlená část světla příliš malá, látka se zdá průhledná (čistá voda).

Rozptyl se dělí na pružný (elastický) a nepružný (neelastický). Pokud mají rozptýlené fotony přesně takovou energii jako před interakcí (stejnou vlnovou délku), jedná se o rozptyl elastický. Jestliže se energie fotonů rozptylem změní, tzn. vlnová délka světla se změní, jde o rozptyl neelastický. Mezi nepružné rozptyly patří také QELS (quasi elastic light scattering). Při tomto jevu si fotony ponechávají téměř tu samou energii. K tomuto typu rozptylu dochází v roztocích, ve kterých *Brownův pohyb* způsobuje *nepravidelný pohyb částic*.

Brownův pohyb je náhodný pohyb mikroskopických částic v kapalině nebo plynu [4]. Vlivem tepelného pohybu se molekuly v roztoku neustále srážejí. Částice s vyšší energií se pohybují rychleji než ty s nižší. Směr i síla srážek jsou náhodné, tudíž i okamžitá poloha částic je náhodná. Rychlost Brownova pohybu závisí na teplotě tekutiny, proto se při DLS udržuje konstantní teplota roztoku. Tímto jevem se objasňuje difúze částic v roztoku, které se rozptylují – difundují z míst s vyšší koncentrací, tak aby se celková entropie systému zvyšovala. Entropie vyjadřuje míru neurčitosti (neuspořádanosti) systému a přirozeně se zvyšuje. V práci tedy popisují pouze *roztoky* s rozpuštěnými částicemi. Metody, které pracují na základě rozptylu světla v roztocích, si na základě měření Brownova pohybu kladou za cíl zjistit informace o rozpuštěných částicích, např. jejich velikost, molekulární hmotnost či tvar.

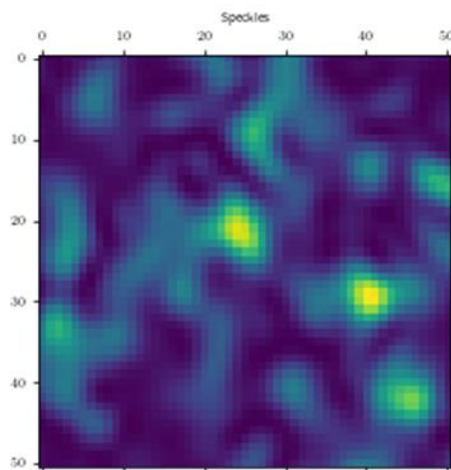
Částice v roztoku přichází do styku se světlem, které se roztokem šíří. Tím začne světlo pohybovat *nábojem* těchto částic a přemění je v kmitající *dipóly*. Elektrický dipól je objekt, jehož náboj je uspořádaný takovým způsobem, že jedna část objektu má náboj kladný a druhá záporný. Částice přitom mají velikost menší nebo srovnatelnou s vlnovou délkou světla. Vlivem elektromagnetického pole se částice v okolí vlnění chovají jako dipóly, jejichž náboj osciluje společně s frekvencí vnějšího elektrického pole příchozího světla. Tedy na koncích částice se střídavě tvoří kladný a záporný náboj, viz. Obr. 2. Dipóly následně samy začnou do okolí emitovat elektromagnetické záření, jehož intenzita závisí na směru šíření a polarizaci příchozího světla.



Obrázek 2: Otočení náboje dipólu při styku s vlnícím se světlem v průběhu času. Částice přitom začne sama emitovat záření.

Rozptýlené světlo, které zachycuje detektor, poté vzniká *interferencí* rozptylů od jednotlivých částic. Interference neboli skládání vlnění je jev, kdy spolu dvě a více elektromagnetických vln interagují a v závislosti na fázi se buď zeslabují nebo zesilují (destruktivní nebo konstruktivní interference). Fáze představuje posunutí vln v čase [18]. Částice začnou emitovat záření s různým fázovým posuvem, který se nepravidelně mění s neuspořádaným pohybem částic. Ve výsledku se na ploše detektoru objeví interferenční obrazec, na kterém se střídají tmavá místa (došlo k destruktivní interferenci) a světlá místa (konstruktivní interference). Světlé skvrny (*speckles*) se na ploše detektoru v čase náhodně mění v důsledku náhodného prostorového uspořádání částic, tedy náhodné interference.

Pro nejvyšší amplitudu fluktuací by měl detektor sledovat ideálně pouze jednu skvrnu v čase. Pokud je plocha detektoru příliš malá, sleduje se sice malé množství skvrn, ale ne dostatečné množství světla. Výsledky měření pak nebudou přesné kvůli nedostatku akumulovaných dat a nepříznivému poměru signálu a šumu. Pokud bude detektor naopak sledovat příliš velké množství částic, pak je sice intenzita světla dostatečná, ale fluktuace slabé, protože dojde ke středování více fluktuací. Proto se zvětšují vlastní světlé skvrny. Umístěním detektoru dále od rozptylujících částic se světlá místa zvětší, ale přitom se sníží intenzita pozorovaného světla. Velikost ozářené skvrny na ploše detektoru závisí také nepřímo úměrně na průměru laserového paprsku. Proto se v praxi využívá různých optických čoček na maximální zaostření laseru. Simulaci rozložení intenzity na ploše detektoru vidíme na Obr. 3.



Obrázek 3: Matematická simulace intenzity světla na ploše detektoru, kde vidíme tmavá a světlá místa, která vznikla v důsledku konstruktivní a destruktivní interference.

1.2 Dynamický rozptyl světla

Tato metoda je založena na faktu, že když světlo prochází roztokem s rozpuštěnými částicemi, část paprsku se rozptýlí do všech okolních směrů. Často se uvádí také pod názvem QELS (quasi elastic light scattering) nebo fotonová korelační spektroskopie PCS (photon correlation spectroscopy). Metoda vyžaduje výpočetní techniku a citlivý detektor, který je schopen detekovat jednotlivé fotony. Jde o poměrně novou měřicí metodu. Při DLS se měří intenzita rozptýleného světla na jednom daném úhlu po velmi krátkých časových intervalech (řády stovek nanosekund). Naměřená hodnota se s časem mění, protože díky Brownovu pohybu mění polohu i částice v roztoku. Krátké časové intervaly se volí proto, aby byly zachyceny i rychlé *fluktuaace* (změny) v intenzitě detekovaného záření. I nepatrný pohyb částice totiž způsobí podstatnou změnu v intenzitě rozptýleného záření, a protože se částice v roztoku pohybují poměrně rychle, je třeba provést až $5 \cdot 10^6$ měření intenzity rozptylu za sekundu. Celkové měření probíhá většinou od 1 do 10 minut. Podle charakteristických fluktuací rozptýleného světla v čase lze pak experimentálně určit *difúzní koeficient* částic v roztoku. Jedná se o fyzikální veličinu, která informuje o rychlosti pohybu částic v roztoku. Značí se písmenem D a její jednotkou je $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Pokud je v roztoku více různě rozptylujících částic, zjišťuje se distribuce několika difúzních koeficientů. Malé částice se pohybují rychleji než velké, protože na ně působí menší třecí síly s rozpouštědlem. Pomocí Stokes–Einsteinova vztahu pak hodnota difúzních koeficientů vypovídá o *rozměrech* rozptylujících částic. Cílem DLS je tedy určit velikost částic rozpuštěných v roztoku [8], [13], [17].

Podmínky pro metodu DLS jsou:

- dostatečná koncentrace částic, při nízké koncentraci nedochází k potřebnému rozptylu
- rozpouštědlo v roztoku musí být průhledné
- roztok zkoumané látky by neměl absorbovat světlo na použité vlnové délce
- index lomu částic v roztoku by se měl lišit od indexu lomu rozpouštědla
- roztok by měl během měření rozptylu zůstat ve stálých termodynamických podmínkách

Pro výpočet velikosti rozptylujících částic je nutná také znalost teploty roztoku a viskozita¹ rozpouštědla na dané teplotě.

Při vlastním rozptylu začnou částice emitovat záření s různým fázovým posunem, který se nepravidelně mění v důsledku Brownova pohybu. Intenzita rozptýleného světla, kterou zachycuje detektor, závisí na vyzařovací charakteristice dipólu a díky interferenci i na konkrétní prostorové konfiguraci rozptylujících částic. Jelikož se ale částice pohybují, mění se také prostorové rozdělení rozptýleného světla a tím i detekovaná intenzita. Při měření vybíráme malou oblast prostoru, ve kterém měříme tuto fluktuující intenzitu dostatečně citlivým detektorem. Pokud se částice pohybují rychleji, fluktuuje rychleji také intenzita rozptýleného světla. Jestliže jsou částice pomalejší, intenzita fluktuuje pomaleji. Rychlost částic v roztoku závisí na třecí síle mezi nimi a rozpouštědlem. Čím větší částice v roztoku, tím je vyšší třecí síla a menší jejich výsledná rychlost. S malou rychlostí se pomalu mění také fluktuace.

1.2.1 Požadavky na zdroj světla

Při DLS se pracuje s elektromagnetickým vlněním, které je charakterizováno konkrétní vlnovou délkou λ a rychlostí. Rychlost šíření světla ve vakuu je stanovena $c = 299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Pro výpočet rychlosti v daném prostředí se c podělí absolutním indexem lomu optického prostředí, který se značí n .

Záření vhodné pro DLS musí být monochromatické, kolimované, koherentní a polarizované. Monochromatické světlo má pouze jednu danou vlnovou délku. Na různých vlnových délkách se totiž záření rozptyluje různě. Kolimované světlo se šíří v podobě rovnoběžných paprsků. Obě tyto podmínky jsou pouze ideální. V praxi jim nejlépe vyhovuje laser. Koherentní vlnění má stejný směr kmitání na jedné frekvenci bez fázového šumu, tedy nemění se fázový rozdíl v čase. Takové vlnění potom může být zaostřeno do velmi tenkého paprsku. Koherence a polarizace umožňují také nutnou interferenci rozptylovaného záření. Laser koherentní vlnění produkuje a jeho světlo je zároveň přirozeně polarizované, tedy vektor intenzity elektrického pole kmitá jedním určitým způsobem [18].

¹ Vnitřní tření kapaliny závisí na složení rozpouštědla, které je dohledatelné v tabulkách, případně ho lze změřit např. viskozimetrem.

1.2.2 Autokorelační funkce

Vlastní užitečná informace se z rozptýleného světla získává až výpočtem tzv. *autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla*. Tato funkce je dána srovnáním intenzity signálů v různém čase. Značí se $G_2(\tau)$ a zachycuje střední hodnotu součinů intenzit, které jsou vzájemně posunuty v čase o hodnotu τ (korelační čas = lag time). Vyjadřuje se ve tvaru Rov. 1.1.

$$G_2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau) dt \approx \frac{1}{T} \sum_{i=0}^{N-1} I(t_i)I(t_i + \tau)\Delta t \quad (1.1)$$

Výraz na pravé straně odpovídá praktickému diskrétnímu případu, ve kterém pravidelně po celkovou dobu T vyhodnocujeme součiny okamžitých intenzit, celkem N -krát, a počítáme střední hodnotu. Okamžitou intenzitou $I(t_i)$ myslíme průměrnou intenzitu v krátkém časovém intervalu $(t_i; t_i + \Delta t)$.

Pro porovnání více funkcí je výhodnější používat *normovanou autokorelační funkci intenzity rozptýleného světla* ve tvaru:

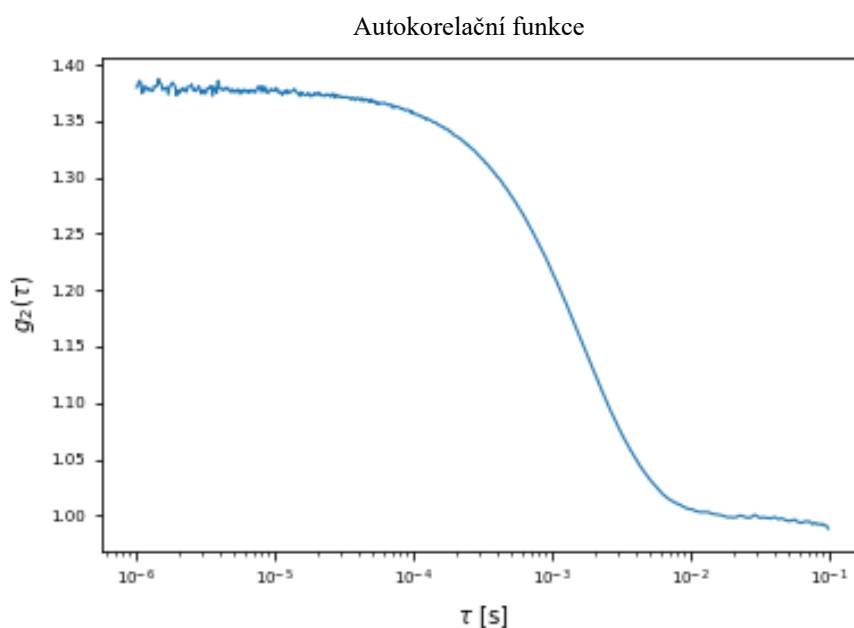
$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \cdot \langle I(t + \tau) \rangle} \quad (1.2)$$

V Rov. 1.2 je $\langle I \rangle$ střední intenzita rozptýleného světla vyjádřená vztahem Rov. 1.3.

$$\langle I \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \approx \frac{1}{T} \sum_{i=0}^{N-1} I(t_i)\Delta t \quad (1.3)$$

Čím větší je posun τ , tím méně jsou si srovnávané signály podobné, méně korelované. Úplně nekorelované (odlišné) intenzity mají $g_2 = 1$ pro všechna τ . Čím větší je korelace, tím větší hodnoty nabývá g_2 na počátku, pro nízká τ . Pro klasické chaotické světlo nabývá $g_2(0) = 2$, ale funkce může nabývat i vyšších hodnot. Pro vyšší τ jsou si intenzity stále méně podobné a funkce typicky exponenciálně klesá. U malých částic, které se pohybují rychle, fluktuuje rychle také měřená intenzita. Korelace posunutých signálů proto klesá prudce. U velkých částic intenzita fluktuuje pomaleji, korelace klesá také pomaleji.

Jelikož za sekundu pořídíme až $5 \cdot 10^6$ záznamů intenzity, měření probíhá až 10 minut a autokorelační funkce je obvykle počítána z přibližně 300 různých τ , musí dojít až k $1,5 \cdot 10^9$ součinům a součtům za sekundu, abychom vyhodnotili autokorelace v reálném čase. Pro tento výpočet je obvykle využíván autokorelátor, speciální hardware připojitelný k počítači, který je schopný takto velké množství dat zpracovat v reálném čase. V našem případě ale využíváme přístroj zvaný časově-digitální převodník, tzv. „timetag“, který zaznamenává čas dopadu jednotlivých fotonů na detektor a tato data poté předává počítači. Postup, kterým z těchto značek získávám autokorelační funkci popisují v kapitole 2.3.1. Díky metodě multi-tau není také nutné provést výpočty v plném rozlišení po celou dobu měření, ale autokorelační funkci vzorkujeme s plným rozlišením jen pro malé korelační časy. S rostoucím korelačním časem snižujeme hustotu vzorkování. Protože přesnost autokorelační funkce závisí statisticky na množství fotonů, čím vyšší je množství zachycených fotonů, tím vyšší je přesnost autokorelace. O množství rozptýlených fotonů za jednotku času rozhoduje pak hlavně výkon laseru a koncentrace roztoku. Počet zachycených fotonů lze proto zvýšit jak výkonem laseru, tak prodloužením doby měření. Příklad autokorelační funkce vidíme na Obr. 4.



Obrázek 4: Normovaná autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla.

1.2.3 Difúzní koeficient

Jestliže se zkoumá roztok s částicemi jedné velikosti a tvaru, pak je teoretická autokorelační funkce rozptýlených intenzit vyjádřena ve vztahu Rov. 1.4.

$$g_2(\tau) = (A \cdot e^{-B\tau})^2 + 1 \quad (1.4)$$

Hodnota τ je korelační doba (lag time), interval, po kterém jsou měřeny intenzity. A, B jsou fitovací parametry.

Zmíněný difúzní koeficient, který charakterizuje rychlost pohybu částic v roztoku, pak závisí právě na parametru B , vlnové délce záření λ , úhlu θ , pod kterým je rozptyl detekován, a na indexu lomu rozpouštědla n :

$$D = \frac{B}{\left(\frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2}\right)^2} \quad (1.5)$$

Pro určení difúzního koeficientu D musí být známý parametr B , který se určí z teoretické autokorelační funkce $g_2(\tau)$. Parametr A není pro určení velikosti částic potřebný, nemůže však být ve funkci opomíjen. Při fitování do experimentálně naměřené autokorelační funkce počítač dosadí nejpodobnější možnou funkci s parametry A, B , které tím určí. Hledání nejlepšího možného fitu tedy znamená minimalizování rozdílu mezi naměřenou a teoretickou funkcí, minimalizování velikosti χ^2 (kapitola 2.3.2).

Pokud se v roztoku vyskytuje více různých typů částic, lišících se tvarem nebo velikostí, teoretická autokorelační funkce se zapisuje ve tvaru:

$$g_2(\tau) = (A_1 \cdot e^{-B_1\tau} + A_2 \cdot e^{-B_2\tau} + \dots + A_n \cdot e^{-B_n\tau})^2 + 1 \quad (1.6)$$

Opět se funkce nafituje a určí se parametry $A_1, B_1, A_2, B_2, \dots, A_n, B_n$, které funkci nejlépe odpovídají. Hodnoty B_1, B_2, \dots, B_n jsou poté dosazeny pro výpočet odpovídajících difúzních koeficientů D_1, \dots, D_n . Existuje více metod, jak tento fit provést, ale jejich přehled a popis sahá za rámec této práce. Metodu, kterou jsem použil popisují podrobněji v kapitole 2.3.3.

1.2.4 Hydrodynamický poloměr

Již dříve bylo zmíněno, že cílem DLS je obvykle určit rozměry částic v roztoku. Získané difúzní koeficienty D_1, D_2, \dots vypovídají právě o rozměrech, přesněji o *hydrodynamických poloměrech* částic. Hydrodynamický poloměr částice r_h odpovídá poloměru sférické částice se stejným difúzním koeficientem. Lze ho vyjádřit ze Stokes-Einsteinova vztahu ve tvaru Rov. 1.7.

$$r_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (1.7)$$

T je absolutní teplota roztoku, $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$ Boltzmanova konstanta, D difúzní koeficient a η viskozita rozpouštědla. Podle získaných difúzních koeficientů D_1, D_2, \dots je možno tímto postupem dopočítat hledané rozměry $r_{h,1}, r_{h,2}, \dots$ částic v roztoku. Jelikož hydrodynamický poloměr vypovídá o rozměru koule, může být určen také objem částice, tedy její velikost. To však neznamená, že tvarem částice musí být koule, může se jednat o tvary naprosto odlišné. Pokud se neklade důraz na přílišnou přesnost, můžeme tvrdit, že r_h částice odpovídá poloměru koule o stejném objemu, která by se pohybovala rozpouštědlem vlivem Brownova pohybu stejně rychle. Částice však při tomto odhadu nesmí mít příliš neobvyklý tvar, např. být velmi dlouhá a tenká nebo naopak moc krátká a široká. Hydrodynamické poloměry částic, které se pomocí DLS zkoumají, se obvykle nacházejí v intervalu od 1 nm do 1000 nm. Částice menší než $r_h = 1 \text{ nm}$ rozptylují příliš málo a autokorelační funkce pak nemůže být přesně určena, a tedy nepřesně vyjde i hydrodynamický poloměr. Na druhou stranu na částice větší než $r_h = 1000 \text{ nm}$ většinou působí příliš velká tíhová síla a nutí je sedimentovat. Proto ke konci nedojde k žádnému rozptylu a autokorelační funkce pak bude zkreslená, protože částice se nepohybují pouze v důsledku difúze. Takto velké částice už jsou pozorovatelné mikroskopem a jejich velikost se již často měří jinými metodami, které nejsou tak složité jako DLS a mohou rozměry určovat přesněji.

2 METODIKA

2.1 Experimentální vybavení

- **laser**

Jako zdroj světla pro metodu DLS jsme použili laserovou diodu emitující záření o vlnové délce 810 nm se šířkou spektra menší než 1 nm a maximálním výkonem 50 mW. Výkon laseru bylo možné měnit regulací čerpacího proudu tak, aby u různých vzorků zůstávalo množství rozptýleného světla přibližně stejné. Společně s laserovou diodou byl využíván regulátor teploty, tak aby laser pracoval v konstantních tepelných podmínkách. (Obr. 23).

- **optické vlákno**

Optické vlákno (Obr. 24) se využilo ve dvou případech. Zaprvé jím bylo vedeno světlo z laseru do kolimátoru a zadruhé se do optického vlákna šířilo rozptýlené záření, které pak bylo vedeno do detektoru. V prvním případě se jednalo o jednomodové vlákno s průměrem jádra 5 μm a ve druhém o vlákno multimodové o průměru 62,5 μm .

- **kolimátor**

Kolimátor usměrní světlo, které vychází z optického vlákna, do svazku rovnoběžných paprsků. Tím se zvýší také intenzita světla v daném směru. Světlo se kolimuje pomocí sady různých čoček. Konkrétně použitý kolimátor s ohniskovou vzdáleností 11 mm nese označení 60FC-0-A11-02 (Obr. 25).

- **neutrální filtr**

Neutrální (šedý, ND) filtr oslabuje intenzitu světla tak, že absorbuje jeho část. Pokud se paprsek z laseru netlumí, množství rozptýleného světla je příliš vysoké a mohlo by dojít k poškození detektoru. Může se zdát, že když se sníží výkon laseru, není šedý filtr třeba. Laser však vydává optimální světlo pro experiment až od určité intenzity, proto se nastaví vyšší výkon a světlo se pak omezí ND filtrem. U málo rozptylujících vzorků (např. látek při nízkých koncentracích) se filtr sundával, protože i při vysoké intenzitě bylo množství rozptýleného světla nedostatečné. Díky tomu mohla být intenzita rozptylovaného světla stejná jako u více rozptylujících vzorků. Použitý neutrální filtr NE30A má optickou hustotu 3.0 a oslabí světlo na vlnové délce 810 nm přibližně 100x (Obr. 26).

- **půlvlnná destička**
Půlvlnná destička (half-wave plate) je tenký krystal z dvojlomného² materiálu, který mění rovinu polarizace lineárně polarizovaného záření. Půlvlnná destička byla umístěna v otočné montáži, mohlo se s ní tedy rotovat a různě měnit směr výsledně lineárně polarizovaného světla. Otočila se tak, aby byl svazek v kyvetě vertikálně polarizovaný. Její umístění v aparatuře vidíme na Obr. 27.
- **spojné čočky**
Spojná čočka zaostřuje (fokusuje) přicházející rovnoběžné paprsky do jednoho místa. V naší aparatuře je jedna čočka použita k zaostření kolimovaného svazku do kyvety se vzorkem, druhá pak usměrní rozptýlené světlo do optického vlákna a tím následně do detektoru (Obr. 27). Jedná se o dva modely s označením A220TM-B a ohniskovou vzdáleností 11 mm.
- **kyveta**
Průhledná spektroskopická kyveta obsahovala vzorek zkoumané látky. Celá pak byla zasazena do držáku vytisknutého na 3D tiskárně. Držák měl tvar kvádra s otvory pro kyvetu, příchozí a rozptýlené světlo (Obr. 28).
- **clona**
Clona s nastavitelnou mírou uzavření definovala úhlový rozsah rozptylovaného světla tak, aby byl co nejbližší 90°. Tím se sice snížila intenzita měřeného detekovaného světla, ale také množství nežádoucího okolního elektromagnetického vlnění. V aparatuře ji vidíme na Obr. 27 mezi čočkou a frekvenčním filtrem.
- **frekvenční filtr**
Aby se při měření omezil vliv okolního záření, byl použit frekvenční filtr (band-pass filter), který propustí vlnění s frekvencí pouze v určitém rozsahu a ostatní záření s odlišnou frekvencí oslabí (prakticky odrazí nebo pohltí). Náš filtr propouštěl vlnovou délku okolo 810 nm, tedy rozptýlený laser, a intenzitu dalšího okolního světla snížil. Opět je vidět na Obr. 27.

² Velikost indexu lomu krystalu závisí na konkrétní orientaci krystalu a polarizaci světla.

- **detektor**
Rozptýlené světlo ze vzorku je detekováno lavinovou fotodiodou (APD) v Geigerově módu. Jedná se o velice citlivý polovodičový fotodetektor, který je v tomto režimu schopný rozlišit jednotlivé fotony. Proto se musel co nejvíce omezit přístup okolního elektromagnetického záření, který by data z citlivého detektoru mohl zkreslit. Celá aparatura byla při měření překryta papírovou deskou a tmavou plachtou. Také světla v laboratoři se musela před začátkem experimentu vypnout, jinak by se APD mohla zničit (nad 5 MHz fotonů). Pokaždé když lavinová fotodioda detekuje foton, vytvoří elektrický puls. Čím více zachycených fotonů, tím více generovaných elektrických pulsů za jednotku času. Proto vyjadřujeme intenzitu rozptýleného světla v jednotkách frekvence. Pulsy pak detektor vyšle do timetagu. I když na APD nedopadá žádné světlo, mohou vznikat elektrické pulsy vlivem teplených reakcí v polovodiči. Ve srovnání se signálem však nejsou nijak četné a měření příliš nezkreslí. Používaná lavinová fotodioda je produkt firmy Excelitas s označením SPCM AQ4C (Obr. 29).
- **Timetag**
Time Tagger je časově-digitální převodník, který přijímá elektrické impulsy z APD a měří čas příchodu tohoto pulzu vztahený vzhledem k začátku měření. Tato data pak ukládá a předává počítači. Timetag dokáže měřit čas příchodu jednotlivých pulsů s rozlišením až 3 ps. Z dat o čase a množství fotonů se pak v počítači softwarově určí autokorelační funkce. Námi používaný přístroj nese označení Time Tagger 20 od firmy Swabian Instruments na Obr. 30.
- **ZetaSizer Nano ZS**
Komerčně používaný přístroj od firmy Malvern Panalytical, se kterým srovnávám hodnoty naměřené na mé aparatuře [14]. Využívá se k určení velikosti, ale i dalších vlastností (např. elektroforetická mobilita, viskozita) různých proteinů a nanočástic. Je schopný určit velikost částic o průměru od 0,3 nm do 10 μm. K tomuto měření využívá stejně jako my metodu DLS. Pracuje se světlem vlnové délky 633 nm a rozptylovým úhlem 178° (Obr. 31).

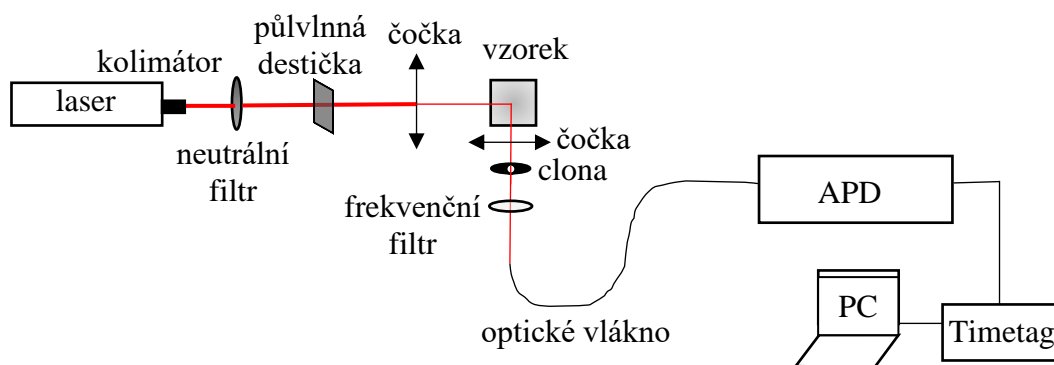
2.2 Aparatura

Světlo z laseru je optickým vláknem vedeno do kolimátoru, kde se sadou čoček usměrní do svazku rovnoběžných paprsků. Laser rovnoběžný s rovinou stolu prochází kolmo ND filtrem, půlvlnnou destičkou a spojnou čočkou.

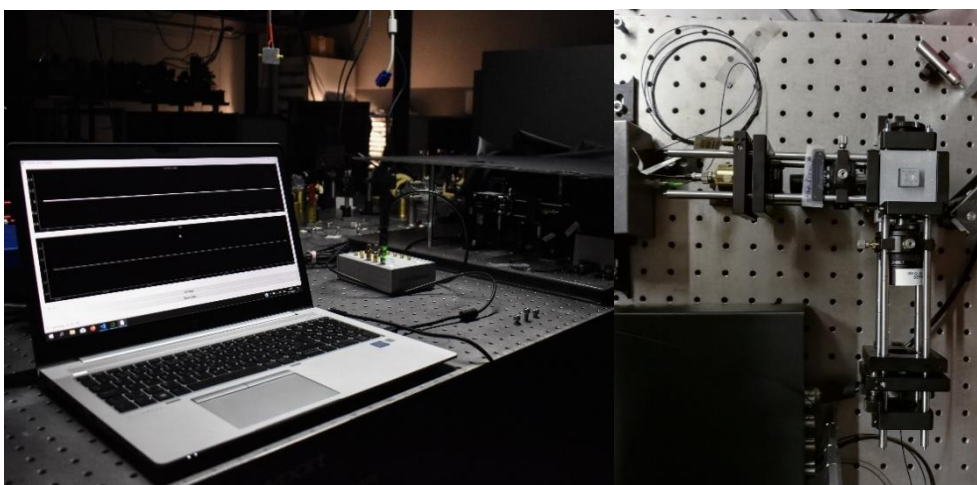
Půlvlnná destička se v montáži otočila tak, aby vstupní světlo bylo lineárně polarizované ve vertikálním směru. Spojná čočka se umístila tak, aby byl průměr paprsku v kyvetě co nejmenší (v řádech desetin mm). Po průchodu čočkou již světlo vstoupilo do vzorku v kyvetě. Zde došlo k požadovanému rozptylu. Pohled na část aparatury, kterou projde laser před vstupem do vzorku, vidíme na Obr. 32.

Světlo se začalo rozptylovat pod úhlem 90° (kolmo na původní laserové záření). Další spojná čočka pak rozptýlené vlnění usměrnila do optického vlákna, které vedlo světlo do detektoru. Za čočkou byla umístěna uzavřená clona s otvorem průměru přibližně 1 mm. Tato clona sice omezila intenzitu detekovaného světla, ale zajistila, aby se měřilo v dobře definovaném rozptylovém úhlu. Za clonou se dále nacházel frekvenční filtr, který redukoval šíření okolního světla do detektoru. Část aparatury, která pracovala s rozptýleným světlem, vidíme na Obr. 33.

Rozptýlené záření, které prošlo clonou a frekvenčním filtrem, potom dopadalo na čelo optického vlákna, kterým bylo dále vedeno do lavinové fotodiody. Signál z APD byl připojen k časově-digitálnímu převodníku, který předával počítači informace o času příchodu jednotlivých fotonů. Na obrazovce počítače tak můžeme sledovat množství detekovaných fotonů v reálném čase a z dat vypočítat autokorelační funkci. Obr. 5 ukazuje náčrt celé aparatury. Během měření byla aparatura překryta černou deskou a plachtou, viz. Obr. 34. Celou aparaturu a příklad měření vidíme na Obr. 6.



Obrázek 5: Nákres celé aparatury s vyznačenými částmi.



Obrázek 6: Vpravo je kompletní část aparatury, kterou prochází laser a rozptýlené světlo. Vlevo vidíme vlastní podobu měření.

2.3 Zpracování dat

2.3.1 Vyhodnocení autokorelační funkce

Když detektor zachytí foton, vyšle elektrický puls k časově-digitálnímu převodníku. Uložená data z Timetaggeru tedy informují o časech detekce fotonů naměřených s určitým časovým rozlišením. Pro určení autokorelační funkce je klíčový vztah Rov. 1.2. Okamžitá intenzita $I(t)$ v časovém intervalu $(t; t + \Delta t)$ odpovídá množině časových značek s indexem i , jejichž čas příchodu t_i leží v intervalu $(t; t + \Delta t)$. Tento fakt vyjádříme Rov. 2.1, kde n je operátor, který udává počet prvků v množině, tedy množství odpovídajících fotonů [1], [10].

$$I(t) = n(\{i \ni t_i = t\})/\Delta t \quad (2.1)$$

Výraz Rov. 1.2 bez normování lze vyjádřit pomocí časových značek takto:

$$\begin{aligned} I(t) \cdot I(t + \tau) &= n(\{i \ni t_i = t\})n(\{j \ni t_j = t + \tau\}) \\ \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle &= \sum_k n(\{i \ni t_i = t_k\})n(\{j \ni t_j = t_k + \tau\})/(T - \tau) \\ \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle &= n(\{(i, j) \ni t_i = t_j - \tau\})/(T - \tau) \end{aligned} \quad (2.2)$$

Poslední krok v Rov. 2.2. je výsledkem publikace [10] a říká, že součiny a součty lze nahradit počítáním všech dvojic značek (i, j) , takových, že rozdíl času příchodů $(t_j - t_i)$ leží v intervalu $(\tau; \tau + \Delta\tau)$, pro každé τ a $\Delta\tau$, které chceme vyhodnocovat. Hodnota t_j odpovídá časové značce, kdy přišel j -tý foton v intervalu Δt v čase s posunem $t + \tau$. Lomené závorky značí středování hodnot intenzit z celé doby měření.

Druhým výsledkem publikace je algoritmus, který umožní toto počítání udělat efektivně. Takto získaný výraz je třeba normovat počtem použitých značek.

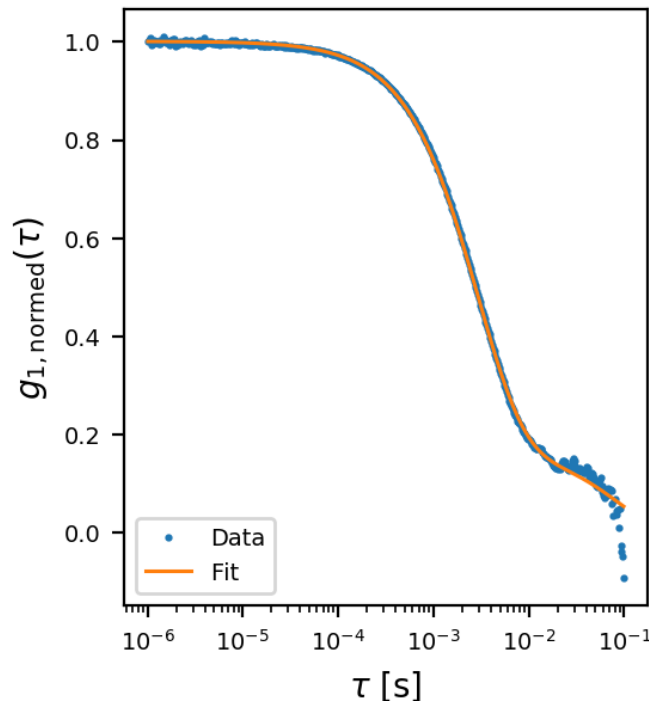
Celou rovnici autokorelační funkce pak můžeme přepsat následovně:

$$\hat{g}_2(\tau) = \frac{n(\{(i, j) \ni t_i = t_j - \tau\})/(T - \tau)}{n(\{i \ni t_i \leq T - \tau\})n(\{j \ni t_j \geq \tau\})\Delta\tau} \quad (2.3)$$

Tato metoda zahrnuje multi-tau algoritmus [11], který optimalizuje počítání prvků. Funkce není vyhodnocována v plném rozlišení ve všech bodech, ale vypočtou se podstatná data na malých korelačních časech a pro velká τ již můžeme volit větší velikost intervalu $\Delta\tau$. Tím se proces několikrát zkrátí.

V našem případě metoda vyhodnocuje autokorelační funkci v bodech, které tvoří geometrickou posloupnost (jeden bod je násobkem druhého). Protože dochází k určení funkce při hodnotách času, které pokrývají několik řádů (od mikrosekund po desítky sekund), osa x v grafu funkce se uvádí v logaritmické škále. Zlogaritmováním přejde geometrická posloupnost v aritmetickou a body jsou pak rovnoměrně rozděleny. K vyhodnocení autokorelační funkce jsme využili knihovnu `pycorrelate` programovacího jazyku Python [1]. Celým procesem se tedy vytvoří graf s experimentálně určenou autokorelací na ose y a průběhem času na ose x .

Pro snazší fitování převádím intenzitní autokorelaci g_2 na autokorelaci elektrické intenzity g_1 podle Siegertova teorému $g_2(\tau) = 1 + \beta(g_1(\tau))^2$, kde β je hloubka modulace. Příklad normované autokorelace elektrické intenzity vidíme na Obr. 7.



Obrázek 7: Normovaná autokorelační funkce elektrické intenzity s fitem.

2.3.2 Fitování

Máme teoretický model funkce $g_2(\tau)$ s parametry A, B (Rov. 1.4) a autokorelační funkci z naměřených dat. Fitováním se hledají takové parametry A, B , aby graf $g_2(\tau)$ dobře odpovídal experimentálním datům. Fitem se určí parametry modelu, určeného funkcí $g_2(\tau)$, v měřených argumentech $x_1, x_2 \dots x_N$ tak, aby teoretický předpis co nejpřesněji odpovídal naměřeným hodnotám $y_1, y_2 \dots y_N$.

Z konstanty B je pak možné vypočítat difúzní koeficient D (Rov. 1.5) a následně hydrodynamický poloměr r_h (Rov. 1.7).

Při fitování se určuje součet druhých mocnin vzdáleností mezi naměřenými a vypočtenými hodnotami [2], [19]. Označuje se jako χ^2 a určí se jako:

$$\chi^2 = \sum_{j=0}^{N-1} w_j (y_j - f(x_j))^2 \quad (2.4)$$

Čím menší je kvadrát chi, tím lépe odpovídá fit naměřené funkci. Faktor w_j odpovídá váze fitu pro jednotlivé body a druhá mocnina v čitateli argumentu brání výskytu záporných hodnot vzdáleností. Náš fitovací program kladl větší fitovací váhu datům na začátku funkce a v oblasti poklesu. Tedy fit se více orientuje podle přesnějších dat. Bodům s velkými korelačními časy program přiřazuje menší význam kvůli jejich velkému šumu. Fit je na Obr. 7.

2.3.3 Distribuce částic

Pokud se v roztoku vyskytují dvě a více různých částic lišících se velikostí, jedna exponenciální funkce podle Rov. 1.4 není pro fit vhodná. Došlo by totiž k vyhodnocení jednoho „průměrného“ difúzního koeficientu částic, tudíž pak jednoho nepřesného poloměru pro různé částice. Aby se stanovilo více jedinečných difúzních koeficientů z více parametrů $B_1, B_2, \dots B_n$ pro různé částice, zapisuje se teoretická autokorelační funkce ve tvaru Rov. 1.6, využitím sumace pak ve tvaru Rov. 2.5.

$$g_2(\tau) = \left(\sum_{i=1}^N A_i \cdot e^{-B_i \tau} \right)^2 + 1 \quad (2.5)$$

Pro určení možné distribuce částic o různých difúzních koeficientech (~velikostech) jsme se inspirovali metodou CONTIN [15]. Tato metoda využívá regularizace. K omezení množství možných částic v roztoku (tak aby jejich výsledná distribuce odpovídala realitě) je fit regularizován hledáním nejmenší možné špičatosti. Cílem je minimalizovat velikost výrazu:

$$\chi^2 + \alpha^2 \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} (B''(\Gamma))^2 d\Gamma \quad (2.6)$$

Kvadrát chi χ^2 opět představuje vzdálenost mezi naměřenými a fitovanými body. Člen $B''(\Gamma)$ vypovídá o zakřivení výsledné distribuce velikostí částic. Tento proces se tedy snaží minimalizovat χ^2 (s cílem odpovídajícího fitu) a zároveň maximálně snížit velikost integrálu, tak aby bylo množství různých částic v roztoku reálné. Parametr α je volitelný. Pokud bude $\alpha = 0$, bude nalezen nejlepší možný fit, ale příliš rozmanitá (nereálná) distribuce částic v roztoku. Naopak jestliže je α příliš velké, bude sice nalezena reálná distribuce velikostí částic, ale fit nebude odpovídat naměřené funkci. Proto musí být α vhodně zvoleno.

Nakonec se fitem určí parametry $A_1, B_1, A_2, B_2, \dots, A_n, B_n$, které funkci nejlépe odpovídají. Hodnoty B_1, B_2, \dots, B_n , jsou poté dosazeny pro výpočet odpovídajících difúzních koeficientů D_1, D_2, \dots, D_n .

2.3.4 Příprava vzorku

Příprava vzorku je při metodách týkajících se rozptylu světla stěžejním bodem, protože prach či jiné nečistoty v kyvetě snižují přesnost měření. Používané vybavení, jako injekční stříkačky a kyvety, proto muselo být při přípravě vzorku do maximální možné míry čisté. Někdy jsem používal také různé filtry, které při manipulaci s používanými látkami brání výskytu nečistot.

Většinu testovacích vzorků tvořilo polotučné mléko naředěné vodou (pro přesnější měření destilovanou) o určitém poměru. K přípravě roztoků jsem používal obyčejnou injekční stříkačku se stupnicí po desetínách ml a maximálním definovaným objemem o velikosti 1 ml. Optická kyveta měla objem přibližně 4,5 ml. Roztok v poměru 1:10 jsem vytvořil z odebraných 4 ml destilované vody a 0,4 ml mléka. Pro poměry 1:100, 1:1 000 a 1:10 000 jsem zopakoval předešlý proces (pro 1:100 1x, pro 1:1 000 2x, pro

1:10 000 3x), přičemž jsem místo čisté vody použil již vytvořený roztok v kyvetě. Pro přípravu poměru 1:100 000 jsem už místo injekční stříkačky pracoval s mikropipetou. Ze vzorku 1:10 jsem odebral 40 μ l a dořdil je 4 ml vody. Tak vznikla směs 1:1000. Ze 40 μ l této směsi a dalších 4 ml vody jsem pak získal vzorek 1:100 000. Roztoky o poměrech 1:1 000 000 a 1:10 000 000 jsem s mikropipetou a roztokem 1:10 vytvořil obdobným způsobem. Když se určovala minimální nutná koncentrace vzorku, dostali jsme se na roztoky mléka o poměru až 1:100 000 000. Pro tento poměr jsem do mikropipety nabral 40 μ l mléka a smíchal je s 4 ml destilované vody. Tak vznikl přibližně 1% roztok. Následně jsem tento proces 3x opakoval, čímž jsem se dostal na poměr 1:100 000 000. Poměr 1:30 byl dotvořen z 1 ml roztoku 1:10 a 3 ml vody.

K porovnání naměřených výsledků z přístroje ZetaSizer a naší aparatury jsem připravil roztoky latexových nanokuliček o daných velikostech (průměrech) 100, 400 a 900 nm. Každý typ nanokuliček byl namíchan s vodou ve třech poměrech – 1:10, 1:100, 1:1000. Tak vzniklo celkem 9 vzorků označených písmeny od A do I.

Při přípravě těchto roztoků jsem se snažil o maximální možnou čistotu, tedy i kvalitu vzorku. Všechny kyvety jsem nejprve vyfoukal stlačeným vzduchem, vypláchl demineralizovanou vodou, znovu vypláchl demineralizovanou vodou, která prošla 20 μ m filtrem, a nakonec vyfoukal znovu stlačeným vzduchem. K ředění roztoků jsem používal demineralizovanou vodu, kterou jsem protlačil přes filtr na injekční stříkačce a využil jsem jehly na stříkačce, která funguje jako přirozený filtr proti prachu. K nabrání latexových kuliček jsem využil opět mikropipetu. Z 300 μ l latexových nanokuliček (částice byly zakoupeny v základním již 1% $\frac{w}{v}$ roztoku) a 2700 μ l filtrované demineralizované vody jsem vytvořil 10% roztok. Opakováním tohoto procesu s 10% vzorkem jsem se dostal na 1% roztok, dalším opakováním s 1% směsí na koncentraci 1:1000. Po celou dobu jsem pracoval s gumovými rukavicemi a průběžně jsem vyplachoval a ofukoval používané injekční stříkačky, jehly a filtry.

3 EXPERIMENT

3.1 Justáž

- **Rovnoběžnost paprsku s rovinou stolu**

Nezbytnou podmínkou kvalitního DLS je zaručení rovnoběžnosti kolimovaného paprsku s rovinou stolu. Tím se zajistí, že laserové záření prochází kolmo na ND filtr a čočku a také vstoupí do kyvety se vzorkem v požadovaném místě (ve výšce od roviny stolu, ve které vystoupilo z kolimátoru). Rovnoběžnosti s rovinou stolu se docílilo pomocí dvou shodných uzavřených clon (otvory o průměru přibližně 1 mm) [16]. Otvory clon se nastavily tak, aby se nacházely ve stejné výšce, a clony se umístily asi 10 cm se za sebe. Poté se kolimátor musel prostorově otočit tak, aby světlo z laseru procházelo oběma clonami souběžně. Díky justáži kolimátoru se tedy světlo šířilo rovnoběžně s rovinou stolu a středem aparatury.

- **Nastavení intenzity laseru**

Nejprve jsme se pomocí sCMOS kamery pokoušeli spatřit laserový svazek v kyvetě s roztokem vody a mléka. Na poměrech 1:5 a 1:10 se nám to nepodařilo. U vzorku 1:30 jsme snížili objem v kyvetě na polovinu a již jsme paprsek při pohledu shora viděli.

Dalším cílem bylo zjistit, jaké množství fotonů bude muset APD detekovat. Maximální možná frekvence fotodiody je totiž 5 MHz, frekvence vhodná pro měření mezi 100 kHz až 300 kHz. Zde jsme použili optický měřič výkonu (power meter) a pracovali s původním optickým výkonem laseru 33 mW. Bez zapnutí laseru naměřil výkon okolního osvětlení 0,6 nW, s laserem pak 9 nW. Rozdílem těchto hodnot jsme přibližně určili optický výkon rozptýleného laseru, tedy 8,4 nW. Práci s power meterem vidíme na Obr. 35.

Přibližné množství fotonů jsme vypočítali pomocí následujícího vztahu:

$$n = \frac{P\lambda}{ch} \quad (3.1)$$

Hodnota n je hledané množství fotonů, P naměřený výkon, λ vlnová délka (810 nm), c rychlost světla a h odpovídá Planckově konstantě o velikosti $6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s. Po dosazení známých hodnot dojdeme k přibližnému počtu

fotonů $n \approx 34 \cdot 10^9$. I kdyby na detektor po rozptylu dopadlo pouze 1 % tohoto množství za sekundu, bylo by to stále příliš mnoho. Proto jsme začali používat ND filtry a zároveň jsme snížili optický výkon laseru z původních 33 mW na 1,7 mW. Nejprve jsme vyzkoušeli 2 filtry NE530B–B od firmy Thorlabs, kde každý propustí 1,3 % původní intenzity laseru.

Potom jsme začali měřit množství fotonů, které se skutečně rozptýlily pod úhlem 90° (Obr. 36). S prázdnou kyvetou bylo detekováno 5000 fotonů za 100 ms, tedy frekvence 50 kHz („dark counts“). U roztoku mléka a vody v poměru 1:1000 se nám podařilo dostat na frekvenci 400 kHz. Pro roztok 1:10 000 jsme naměřili 8000 fotonů za 100 ms, tedy 80 kHz, a pro čistou vodu 55 kHz. Ve finální aparatuře jsme nakonec dva filtry NE530B-B nahradili filtrem NE30-A, který ztlumí intenzitu laseru 100x. Dva filtry již dále nebyly třeba, protože na snížení rozptýlené intenzity se začala podílet také clona a celá aparatura byla přikryta černou plachtou (téměř žádné vnější osvětlení). Navíc poloha čoček byla po finální justáži také jiná.

- **Nastavení irisky a čoček**

Clona (=iriska) o různé míře uzavření přesněji definovala rozptyl na úhlu 90° . Snížila také intenzitu detekovaného světla. Některé vzorky jsme schválně naměřili s otevřenou a pak i zavřenou iriskou, abychom mohli porovnat výsledné grafy. Významnou roli hrálo uzavření clony při porovnávání různých velkých optických vláken, kdy ovlivňovala hloubku modulace signálu.

Spojná čočka před kyvetou se umístila přibližně tak, aby byl průměr paprsku v kyvetě co nejmenší (v řádech desetin mm). Finální polohu čoček jsem doladil podle aktuálně detekovaného množství fotonů, které odpovídalo danému umístění čočky (Obr. 36). Na počítači jsem sledoval měřené hodnoty a čočky nastavil tak, aby byly co nejvyšší (také intenzita světla co největší).

- **Nastavení HWP**

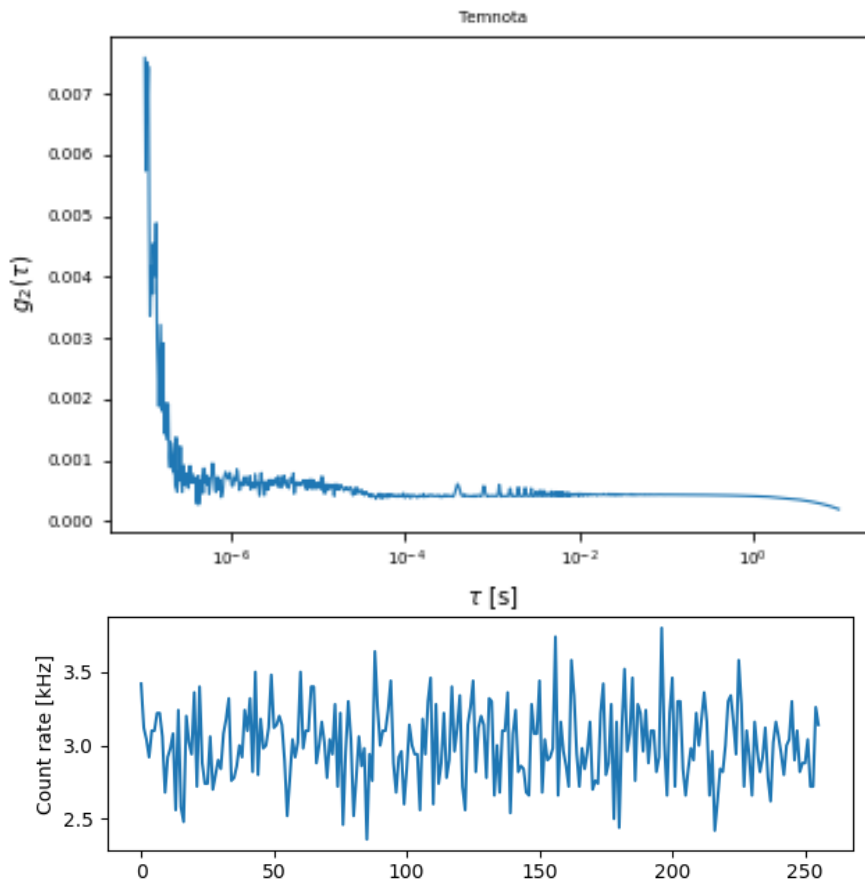
Půlvlnná destička se v montáži otočila tak, aby polarizovaný laser dosahoval nejvyšší možné intenzity. Intenzitu jsem určoval za polarizujícím děličem svazku na odrazném portu podle hodnot naměřených na měřiči optického výkonu. V aparatuře se při tom nenacházela kyveta ani žádná fokusující čočka. Nejvyšší hodnoty jsem docílil při otočení montáže destičky o 47° , což odpovídá vertikálně polarizovanému světlu.

3.2 Vlastní výsledky

3.2.1 Referenční vzorky

V následujících grafech můžeme vidět vypočtenou autokorelační funkci a frekvenci dopadu fotonů. První graf ukazuje pokles korelace ($g_2(\tau)$ - osa y) v průběhu času (τ [s] - osa x), druhý pak frekvenci detekovaných fotonů v jednotce kHz (count rate [kHz] - osa y) v čase (osa x).

Zde na prvních grafech Obr. 8 můžeme vidět výsledky naměřené u aparatury bez vzorku (tzv. dark counts):

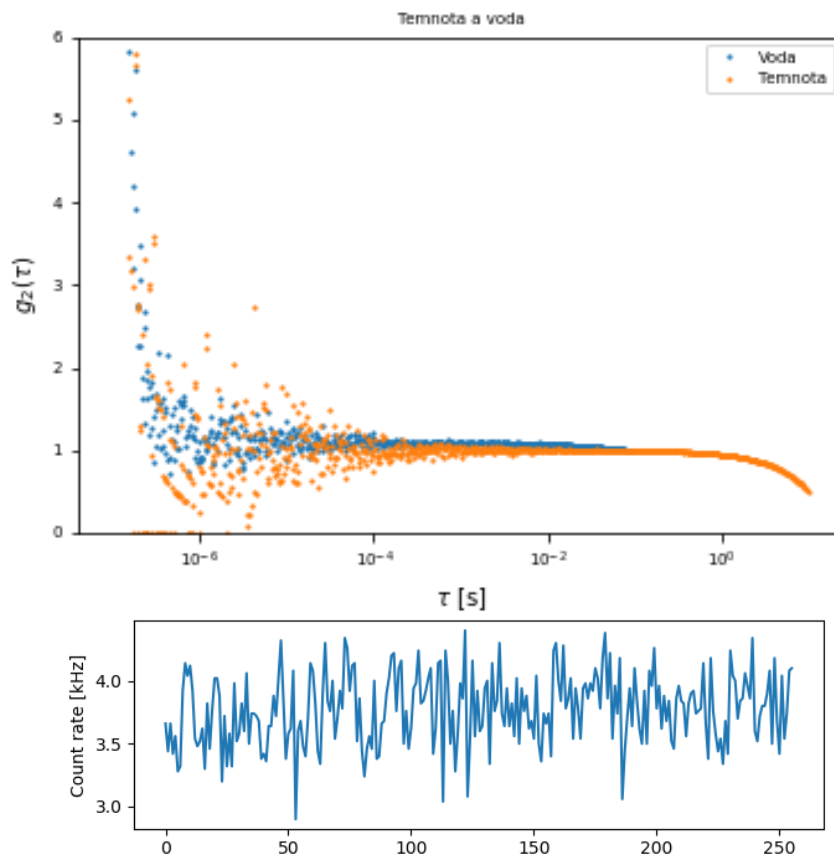


Obrázek 8: Graf nenormované autokorelační funkce a frekvence dopadů prázdné aparatury.

V prvním grafu vidíme očekávaný rychlý pokles autokorelační funkce, protože nedochází k žádnému rozptylu od vzorku. Vysoké hodnoty korelace kolem času 100 ns však neodpovídají realitě. Jedná se nejspíš o kombinovaný efekt detektoru a Timetagu. Proto vyhodnocujeme velikost částic z autokorelační funkce až od hodnoty 500 ns, kde počáteční artefakt nehraje

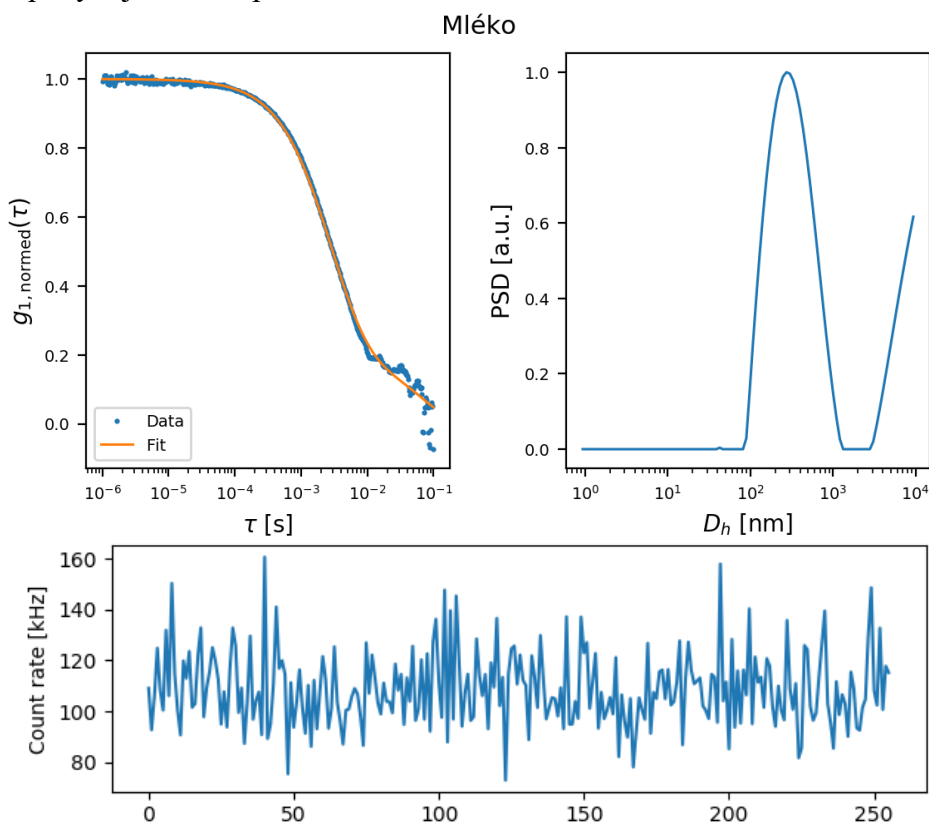
roli. Při tomto měření detekujeme vlastně okolní „nechtěný“ signál. Také proto se na druhém grafu frekvence zachycených fotonů pohybuje pouze okolo hodnoty 3 kHz (u mléka např. 100 kHz). Cílem tohoto měření je určit množství okolního světla v laboratoři. Díky těmto naměřeným hodnotám jsme pak zjistili, jak faktory v laboratoři (např. osvětlení nebo černá plachta, kterou byla aparatura překryta) ovlivňují množství světla, které detekuje fotodioda. V důsledku těchto poznatků jsme následně upravili podmínky v laboratoři tak, aby byla frekvence fotonů u aparatury bez vzorku co nejmenší.

Dalším referenčním vzorkem je čistá voda, kterou na Obr. 9 srovnávám s aparaturou bez vzorku. Na začátku opět vidíme artefakt v podobě velké korelace a následuje rovná část, kde nedochází k žádné korelaci (shodě signálů). S časem pro větší tau ubývá šum. Voda již rozptyluje určitou část světla, ale ta je tak malá, že se při detekování prakticky vůbec neprojeví. Frekvence dosahuje přibližně stejných hodnot jako u prázdné aparatury, protože rozptyl je příliš nízký.



Obrázek 9: Srovnání autokorelačních funkcí vody a prázdné aparatury. Vidíme, že funkce klesají velmi podobně. Dole je frekvence detekčních událostí vody.

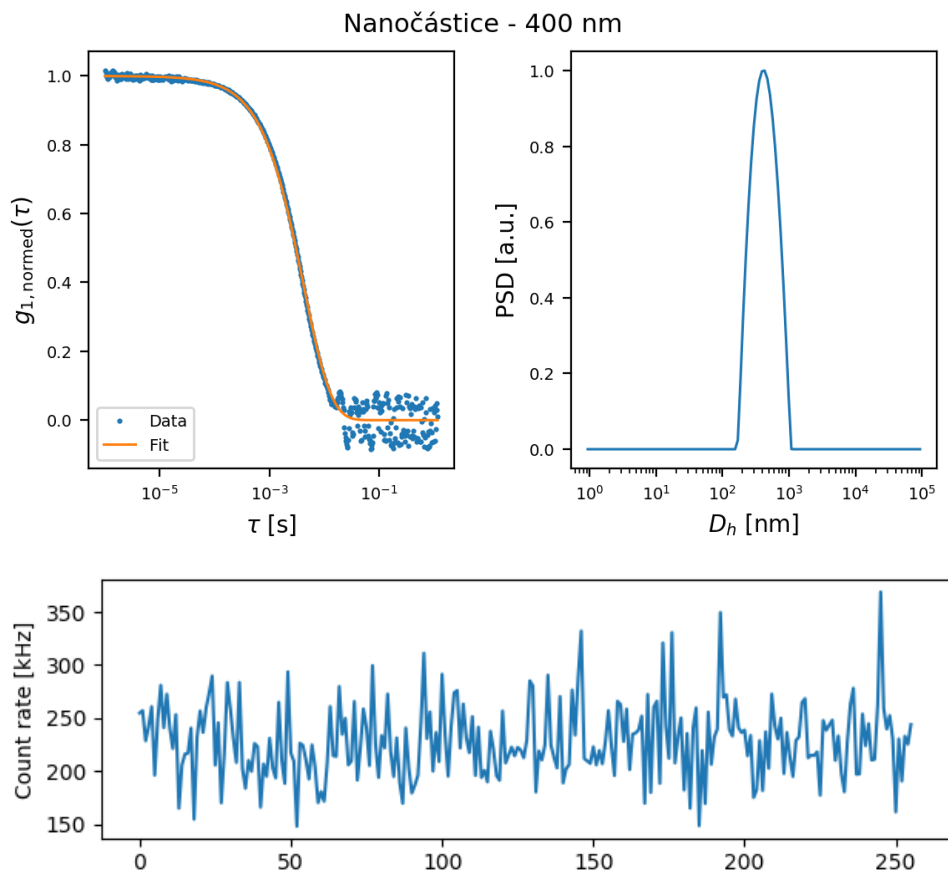
Třetím vzorkem je již roztok mléka s vodou v poměru 1:1000 na Obr. 10. Znáznorněna jsou zde přímo naměřená data a výsledná fitovaná křivka. Pokles probíhá pomaleji než u vody a křivka úplně klesne až v čase okolo 1 setiny. Pomalejší pokles autokorelace je dán vyšší podobností signálů naměřených v různých časech. Tuto vyšší podobnost způsobují právě částice mléka, které jsou větší než u vody, a proto se pohybují v roztoku pomaleji. Frekvence se již pohybuje okolo optimálních 120 kHz.



Obrázek 10: Normovaná autokorelační funkce, její fit, frekvence a výsledná distribuce velikostí částic mléka.

Vidíme také již graf distribuce velikostí částic s konkrétními hodnotami. I když jsme původně chtěli vyhodnocovat hydrodynamické poloměry, tak graf distribuce reprezentuje hydrodynamické průměry v jednotkách nm (D_h [nm] – osa x). Osa y u grafu distribuce velikostí vyjadřuje poměrné zastoupení různě velkých částic v roztoku, jednotku nemá (PSD = particle size distribution, [a.u.] = arbitrary unit). Důvodem změny z poloměrů na průměry byl fakt, že přístroj, se kterým jsme hodnoty srovnávali, počítal právě průměry. Aby bylo porovnání názornější, pracovali jsme také s průměry. Zde naměřené velikosti částic se pohybují v průměrech okolo 300-400 nm, což přibližně odpovídá skutečným mléčným lipidům.

Posledním referenčním vzorkem na Obr. 11 jsou latexové nanokuličky o průměru 400 nm namíchané v roztoku s demineralizovanou vodou v poměru 1:100. Autokorelace klesne dříve než u mléka v čase před 1 setinou. Frekvence je zde trochu vyšší, kolem 240 kHz. Průměr latexových nanokuliček by měl odpovídat 400 nm. V grafu se určený hydrodynamický průměr pohybuje mírně nad 400 nm.

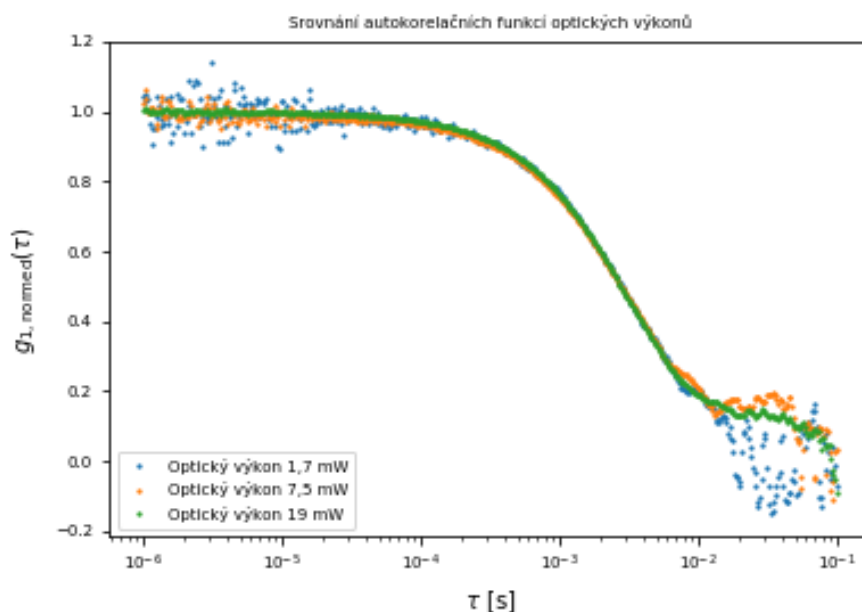


Obrázek 11: Data o roztoku latexových nanokuliček s průměrem 400 nm. Vlevo nahoře vidíme normovanou autokorelační funkci a její fit, vpravo výslednou distribuci hydrodynamických průměrů. Dole je pak frekvence detekčních událostí.

3.2.2 Srovnání vlivu rozdílných optických výkonů

V následujících grafech je znázorněn vliv optického výkonu laseru na kvalitu měření. Výkon zvyšujeme přidáním čerpacího proudu laseru. Ve všech případech se jedná o roztok mléka s vodou v poměru 1:1000. Porovnávané výkony jsou 1,7 mW, 7,5 mW a 19 mW.

První graf na Obr. 12 ukazuje srovnání autokorelačních funkcí. Vidíme, že autokorelační funkce jsou u výkonů 1,7 a 7,5 mW v čase od 1 μ s do 100 μ s zašuměné. Výkon 19 mW má průběh nejplynulejší. Čím je funkce méně zašuměná, tím bude lépe fitovatelná a výsledné průměry budou přesnější.



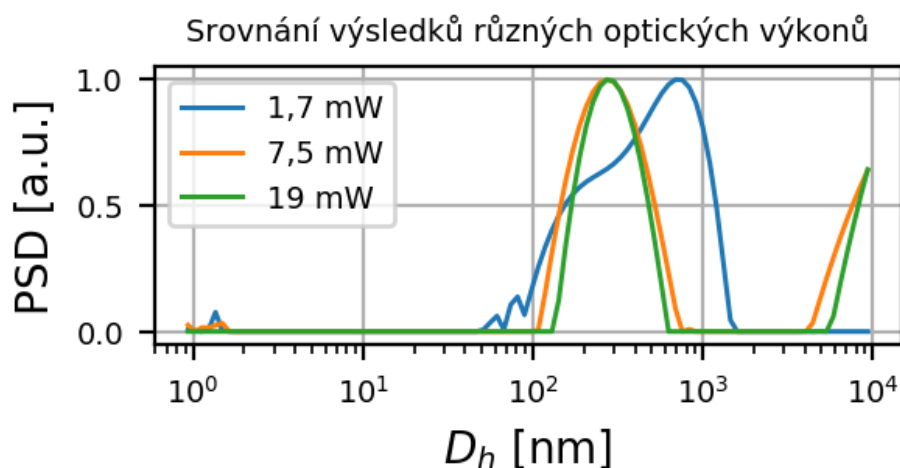
Obrázek 12: Srovnání autokorelačních funkcí při rozdílných optických výkonech laseru.

Následující Tab. 1 ukazuje srovnání přibližných frekvencí detekčních událostí při různých optických výkonech. Nejvyšší hodnoty dosáhl logicky nejvyšší výkon.

Tabulka 1: Frekvence detekčních událostí při odlišných optických výkonech laseru.

Optický výkon	1,7 mW	7,5 mW	19 mW
Frekvence	50 kHz	100 kHz	200 kHz

Na Obr. 13 jsou srovnané výsledné průměry stejného roztoku mléka 1:1000 při všech 3 různých optických výkonech. Vidíme, že hodnoty při výkonu 1,7 mW se od ostatních značně liší, proto nejspíš nebudou příliš pravdivé. Při tomto výkonu je rozptyl nedostatečný. Průměry u 7,5 mW a 19 mW znázorňují stejnou hodnotu. Graf nejvyššího výkonu je však užší, a tedy přesněji definuje hledaný průměr.



Obrázek 13: Distribuce průměrů velikostí částic mléka při optických výkonech laseru 1,7 mW, 7,5 mW a 19 mW.

Z tohoto experimentu vyplývá, že čím vyšší bude optický výkon laseru, tudíž pak detekovaná frekvence, tím bude autokorelační funkce plynulejší. Její fit bude pak přesnější a s ním i výsledné hydrodynamické průměry. Na druhou stranu, citlivá fotodioda má určitou horní mez intenzity, která odpovídá frekvenci detekčních událostí 5 MHz, od které už hrozí poškození. Nakonec jsme zvolili intenzity s hodnotami frekvence mezi 100 až 200 kHz, které přináší poměrně přesné výsledky a dioda se při nich nesaturuje.

3.2.3 Porovnání výsledků s různými optickými vlákny

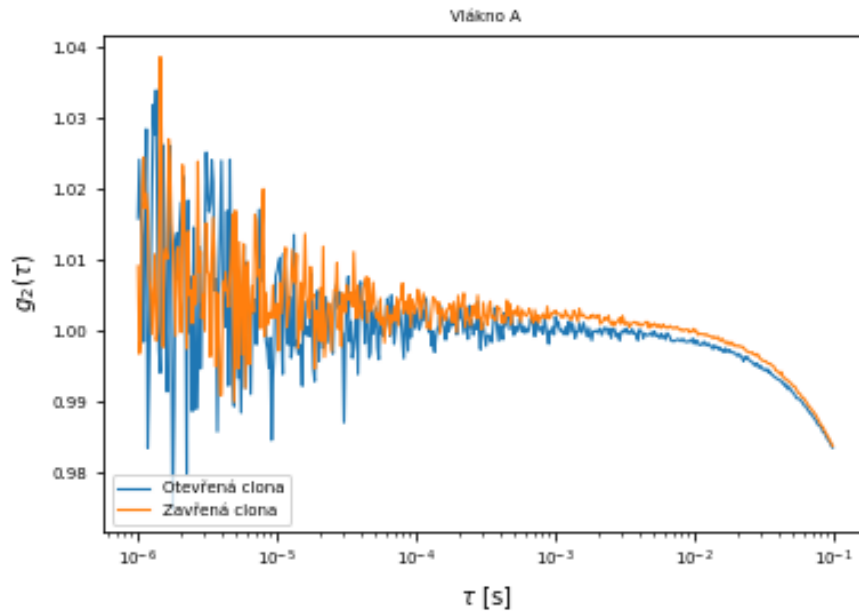
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda průměr vláken hraje roli v měření. V tomto pokusu srovnávám vliv velikosti jádra používaného optického vlákna na hloubku modulace. Hloubka modulace odpovídá rozdílu mezi hodnotou autokorelace na začátku (nejvyšší hodnoty) a hodnotou 1. Tato hodnota popisuje, jak výrazně se autokorelační signál projevuje. Čím je tedy hloubka modulace vyšší, tím lépe a přesněji vyhodnocuji velikosti částic. Z toho důvodu nejsou autokorelace v tomto experimentu fitované a normované, jako u ostatních měření. Porovnávám zde surová naměřená data. Vláken jsem měl k dispozici celkem 5, tedy 5 různých velikostí průměrů jader v rozmezí 400-5 μm . Vlákná jsou označena písmeny A až E viz. Tab. 2.

Tabulka 2: Pět vláken o průměrech jader od 400 do 5 μm , které jsem označil písmeny A až E.

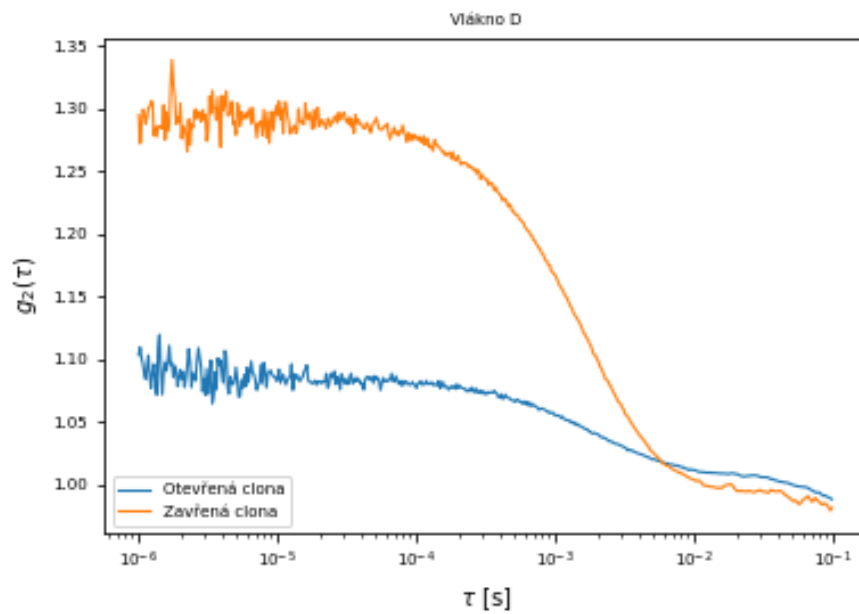
Vlákno	A	B	C	D	E
Velikost jádra	400 μm	200 μm	100 μm	62,5 μm	5 μm

Jako referenční vzorek jsem použil roztok mléka s vodou v poměru 1:1000. Vlákná A až D byla naměřena vždy s otevřenou a poté zavřenou clonou, takže porovnávám i výsledky s rozdílným nastavením irisky. E již bylo naměřeno pouze se zavřenou iriskou. Frekvenci detekovaných fotonů jsem se u různých vláken a nastaveních irisky snažil udržovat přibližně stejnou okolo 100 kHz. Toho jsem docílil regulací čerpacího proudu laserové diody. Změny signálů mezi různými vlákny by tím pádem neměly být dány změnou frekvence.

Nejdříve jsem naměřil vlákno A. Na Obr. 14 vidíme, že při uzavřené cloně dosahuje hloubka modulace vyšších hodnot. Další vlákna B a C dosáhla s uzavřenou clonou vyšších hloubek modulací než vlákno A viz. Tab. 3. Na Obr. 15 s vláknem D o průměru 62,5 μm se hloubka modulace s uzavřenou clonou dále zvýšila a vidíme, že se výrazně zvětšuje rozdíl mezi hloubkami modulace u zavřené a otevřené clony. Proto bylo poslední vlákno E měřeno již jen se zavřenou iriskou.

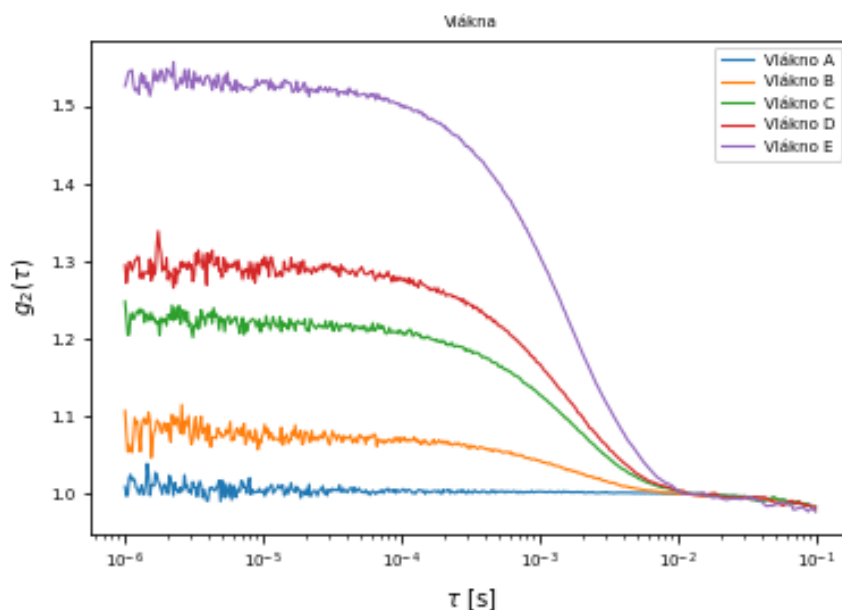


Obrázek 14: Nenormovaná autokorelační funkce u vlákna A při otevřené a zavřené cloně.



Obrázek 15: Nenormovaná autokorelační funkce u vlákna D při otevřené a zavřené cloně.

Graf na Obr. 16 vyobrazuje všechna vlákna s uzavřenou clonou. Nejvyšší modulace dosáhlo vlákno E. V Tab. 3 přibližně srovnávám naměřené hloubky modulací $\Delta = \max - \min$. Uzavření clony přineslo v každém případě lepší výsledky. Clona tedy sice zmenší množství fotonů, které detekuje APD (frekvenci detekcí), ale přesněji definuje rozptylový úhel a zvýší hloubku modulace.



Obrázek 16: Srovnání nenormovaných autokorelačních funkcí optických vláken s různě velkými jádry při uzavřené cloně.

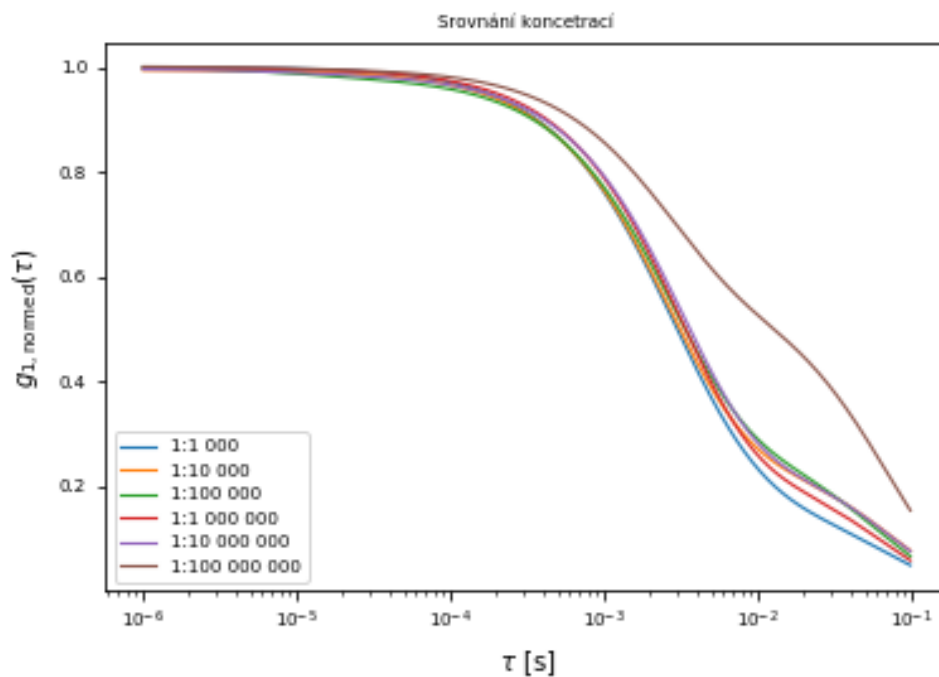
Z měření tedy vyplývá, že se zmenšováním průměru jádra vlákna při uzavřené cloně se zvyšuje hloubka modulace. Nejvyšší hodnoty dosáhlo vlákno s nejmenšími 5 μm . Bohužel u vláken s menšími jádry se snižuje také frekvence detekčních událostí. Za rozumný kompromis jsme zvolili vlákno s průměrem jádra 62,5 μm . Vytváří dostatečnou hloubku modulace i dostatečnou frekvenci dopadu fotonů.

Tabulka 3: Srovnání hloubky modulace u optických vláken s různě velkými průměry jader při různých nastaveních clony.

Velikost vlákna	iriska	max	min	Δ
400 μm	Otevřená	1?	1	0
400 μm	Zavřená	1,005?	1	0,005
200 μm	Otevřená	1,010	1	0,010
200 μm	Zavřená	1,075	1	0,075
100 μm	Otevřená	1,070	1	0,070
100 μm	Zavřená	1,220	1	0,220
62,5 μm	Otevřená	1,080	1,012	0,068
62,5 μm	Zavřená	1,300	1	0,300
5 μm	Zavřená	1,550	1	0,550

3.2.4 Srovnání vzorků o různých koncentracích

Jedním z původních cílů mé práce bylo určit minimální možnou koncentraci roztoku, který budeme schopni naměřit. Jako referenční vzorek jsem zvolil naředěné mléko s vodou. Začal jsem s koncentrací 1:1000. Další roztoky odpovídají 10x více naředěnému předchozímu roztoku. Při tomto experimentu můžu zároveň srovnat, zda se výsledky u stejné látky liší při jiné koncentraci v roztoku. Stejně jako u srovnávání vláken i zde jsem se snažil regulovat frekvenci u různých koncentrací tak, aby byla kolem 100 kHz. Odlišné výsledky vzorků by tedy neměly být způsobeny odlišnou frekvencí při detekci rozptylu. V grafu na Obr. 17 vidíme vyhodnocené autokorelační funkce na všech měřených koncentracích:



Obrázek 17: Srovnání fitů autokorelačních funkcí roztoků mléka při různých koncentracích.

Nejnižší naměřená koncentrace byla 1:100 000 000. Laser jsem bez ND filtru nastavil na maximální výkon 35 mW. O nižší koncentraci jsem se již nepokoušel, protože bych již nebyl schopen nastavit dostatečně vysokou frekvenci detekčních událostí. Funkce se zde již poměrně liší od ostatních koncentrací, takže by stejně ještě nižší koncentrace nejspíš neprodukovaly příliš kvalitní výsledky. V závěru křivky 1:100 000 000 se zvyrazňuje také artefakt v podobě zpomalení poklesu. Tento efekt způsobuje nedostatečná

doba měření vzhledem k poslední vyhodnocované korelaci (v nejpozdějším čase). Artefakt se zhoršuje při nižší frekvenci detekčních událostí.

Odlíšné výsledky u nejnižší koncentrace získáváme v důsledku málo rozptylujícího vzorku. Frekvence detekčních událostí již není dostatečná, a tudíž ani fit není přesný (viz. experiment s různými optickými výkony).

U dvou nejnižších měřených koncentrací se také objevovaly náhlé výstupy frekvence na hodnoty kolem 600 kHz a poté rychlý pokles zpět na 100 kHz. Tento jev můžeme vysvětlit větší, nejspíše prachovou částicí, jež při nízkých koncentracích rozptýlí signál srovnatelný s mlékem. Rozptyl od stejného množství prachu při vyšších koncentracích se v převažujícím rozptylu mléka více ztratí.

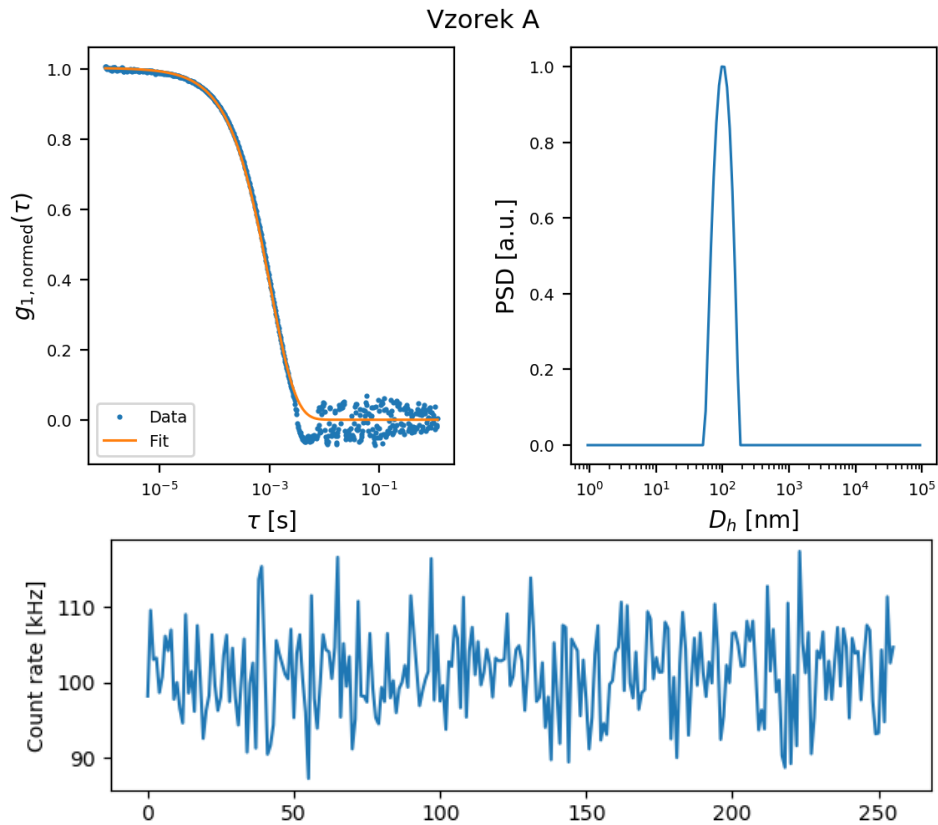
3.2.5 Porovnání naší aparatury a komerčního přístroje

Poslední částí experimentu je srovnání mých výsledků s výsledky naměřenými na přístroji ZetaSizer Nano ZS. Jako referenční vzorky jsem použil roztoky latexových nanokuliček s průměry 100, 400 a 900 nm. Každý typ částic jsem naředil v poměrech 1:10, 1:100 a 1:1000. Celkem jsem tedy měl 9 vzorků, které jsem označil písmeny A až I viz. Tab. 4. U všech vzorků jsem se snažil držet frekvenci na 100 kHz.

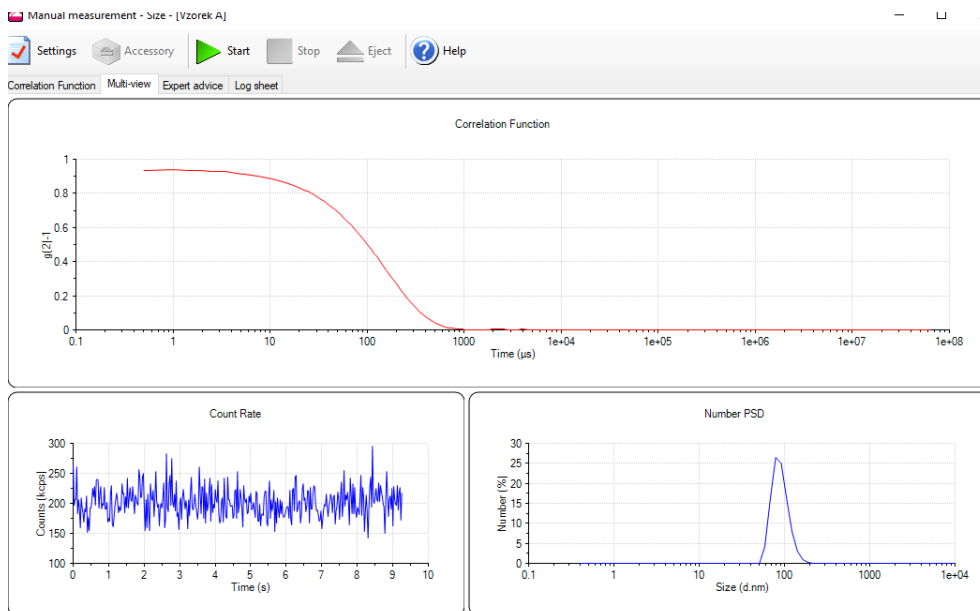
Tabulka 4: Označení vzorků s roztoky latexových nanokuliček, které jsem porovnával s přístrojem ZetaSizer Nano ZS.

	1:10	1:100	1:1000
100 nm	A	B	C
400 nm	D	E	F
900 nm	G	H	I

První referencí je vzorek A, na kterém konkrétně srovnám naše data a ZetaSizer. Na našich finálních datech na Obr. 18 vidíme normovanou autokorelační funkci v podobě jednotlivých vypočtených dat a jejich fit. Vyhodnocený průměr odpovídá 100 nm, které by vzorek skutečně měl mít. Frekvence detekce se pohybuje kolem 100 kHz. Na Obr. 19 jsou vykreslena data přístroje. ZetaSizer pracuje na odlišném úhlu rozptylu a s jinou vlnovou délkou laseru než naše aparatura, takže funkce příliš srovnatelné nejsou, klesají ale přibližně ve stejném čase ($1000 \mu\text{s} = 10^{-3} \text{s}$). Průměr neodpovídá přesně 100 nm, ale spíše 80 nm. Frekvence, se kterou toto zařízení pracuje, dosahuje hodnot kolem 200 kHz.

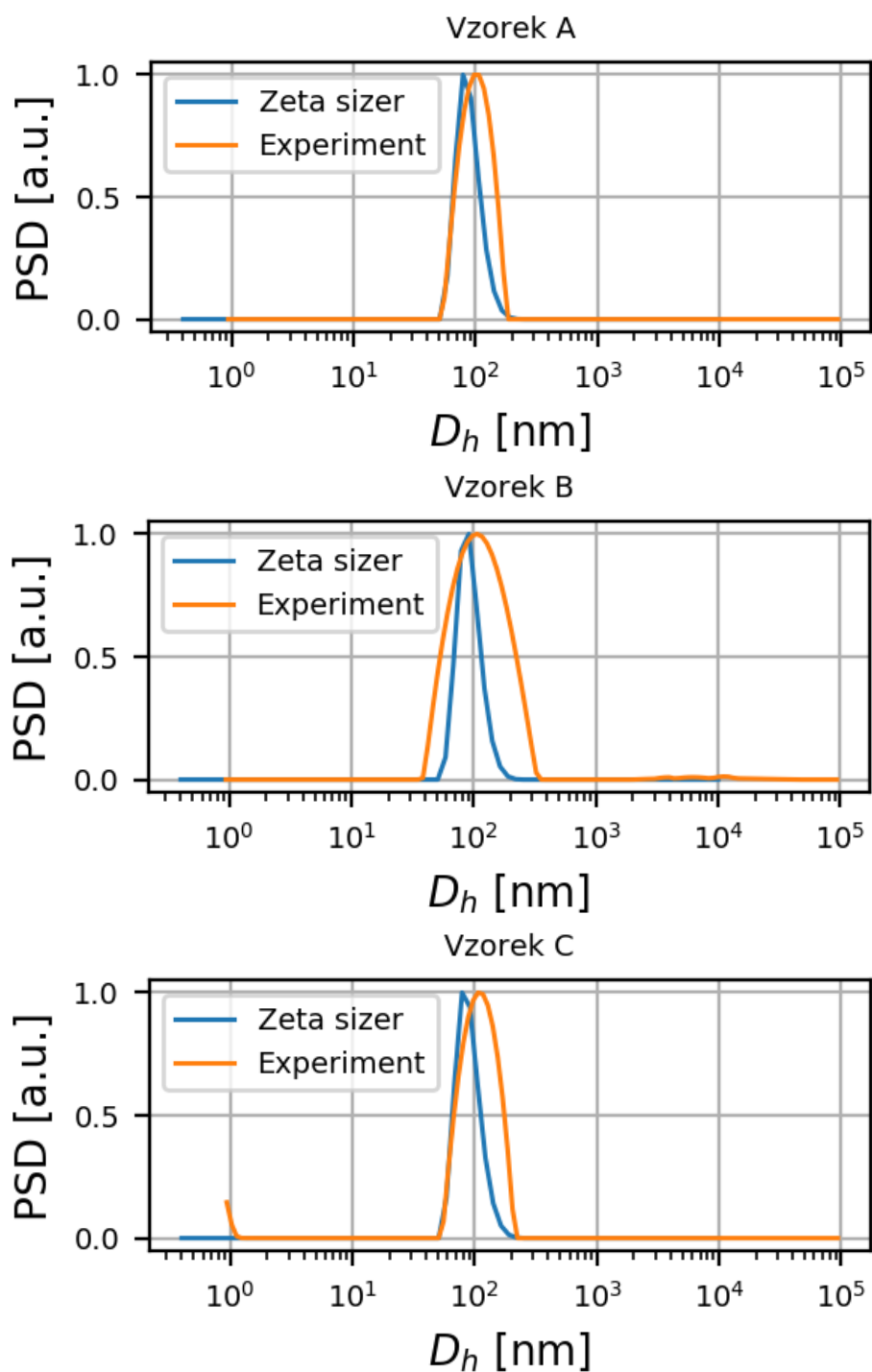


Obrázek 18: Normovaná autokorelační funkce, její fit, frekvence detekcí a distribuce částic vzorku A na naší aparatuře.

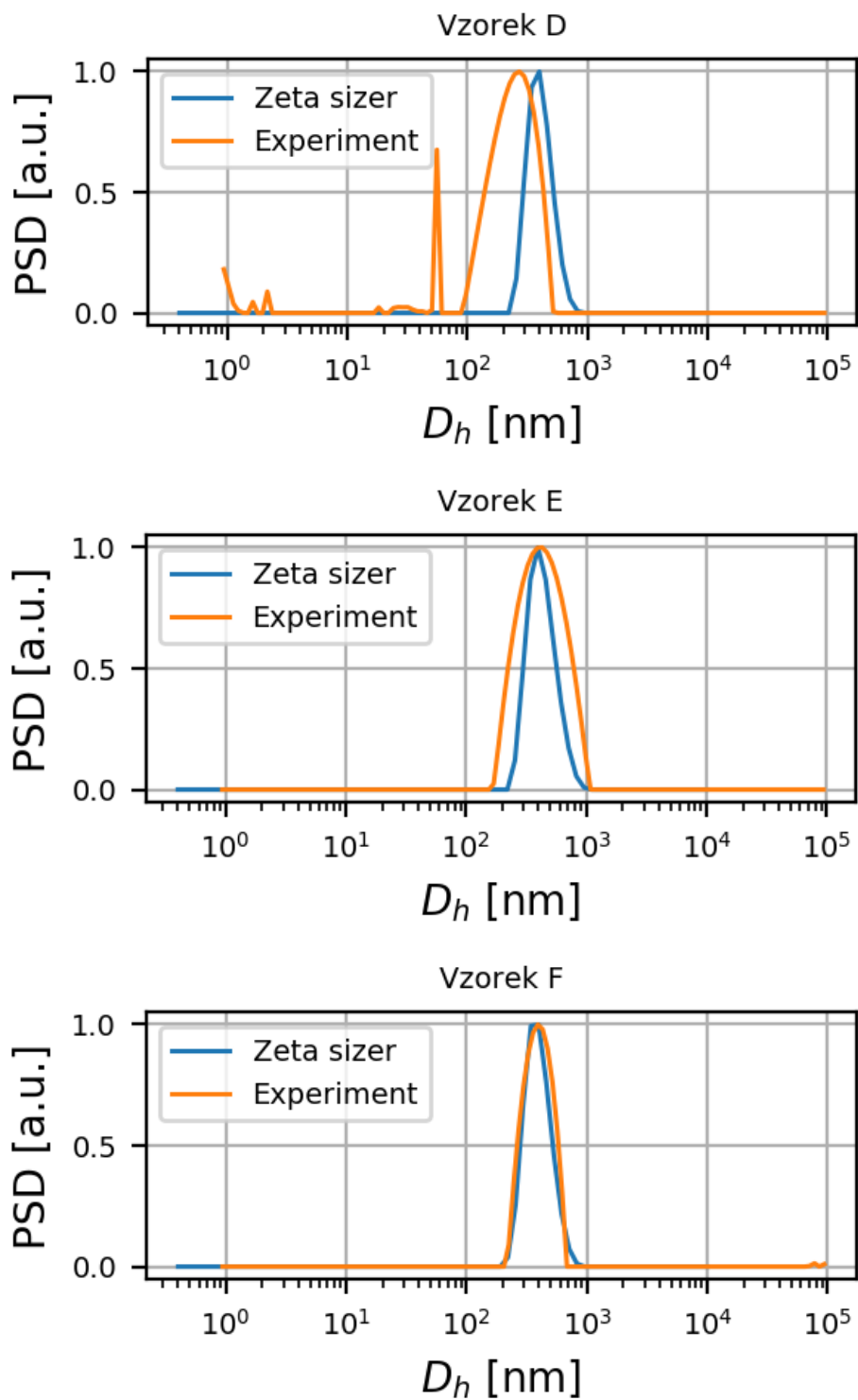


Obrázek 19: Fit normované autokorelační funkce, frekvence detekčních událostí a výsledná distribuce velikostí vzorku A na ZetaSizeru.

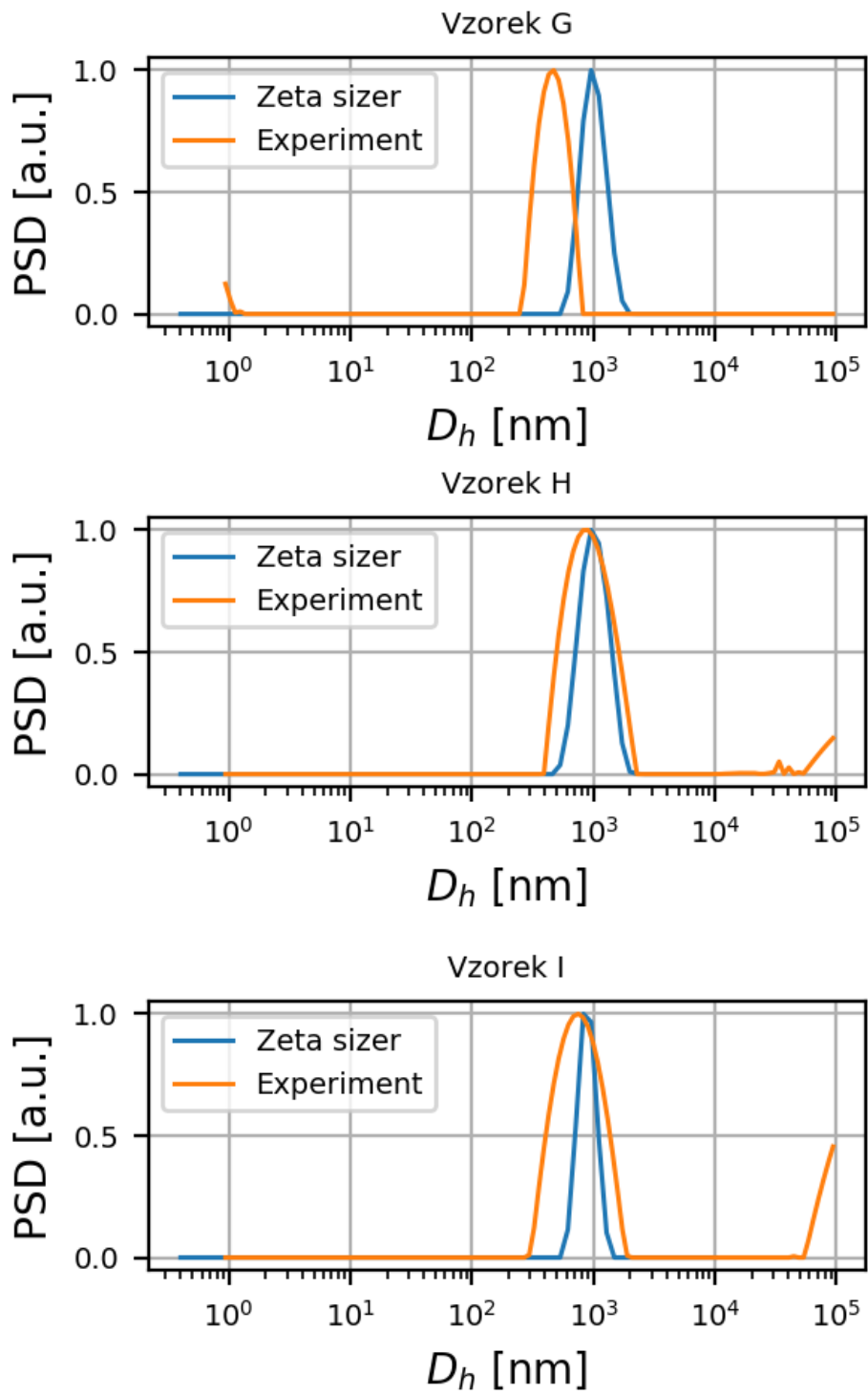
Vlastní porovnání mých dat a výsledků přístroje provádím vykreslením vyhodnocených průměrů do jednoho grafu. Na Obr. 20 až Obr. 22 vidíme srovnané velikosti všech vzorků. Konkrétní hodnoty jsou v Tab. 5.



Obrázek 20: Srovnání distribucí velikostí částic vzorků A, B a C z naší aparatury a komerčního přístroje. Nominální průměr částic vzorků byl 100 nm.



Obrázek 21: Srovnání distribucí velikostí částic vzorků D, E a F z naší aparatury a komerčního přístroje. Nominální průměr částic vzorků byl 400 nm.



Obrázek 22: Srovnání distribucí velikostí částic vzorků G, H a I z naší aparatury a komerčního přístroje. Nominální průměr částic vzorků byl 900 nm.

Tabulka 5: Finální srovnání hydrodynamických průměrů z naší aparatury a z přístroje.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ředící poměr	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10	1:10 ²	1:10 ³
Nominální v.(nm)	100	100	100	400	400	400	900	900	900
Experiment (nm)	100	105	110	295	400	400	500	900	800
ZetaSizer (nm)	80	90	80	400	400	400	990	950	900
Δ (nm)	20	15	30	105	0	0	490	50	100

V tomto experimentu jsme dokázali, že hydrodynamické průměry naměřené na naší aparatuře jsou srovnatelné s výsledky komerčního přístroje Zetasizer Nano ZS. U vzorků A, B a C s nejmenšími částicemi o průměru 100 nm, viz. Obr. 20, se naše hodnoty a hodnoty přístroje podobají a pohybují se opravdu kolem 100 nm. Pokud je tato nominální velikost vzorku skutečná, tak dokonce naše aparatura zde dosáhla i přesnějších výsledků. U ostatních vzorků s většími částicemi o velikosti 400 nm a 900 nm dosahuje naše aparatura zhruba stejně přesných výsledků jako ZetaSizer pro normální a nízké koncentrace.

Pouze při vysokých koncentracích jsou naše výsledky méně přesné než měření přístroje. Konkrétně se jedná zejména o vzorek D viz. Obr. 21, kde se výsledky liší o 105 nm a o vzorek G viz. 22, kde došlo k největšímu nesouladu mezi měřeními. U vzorku D se na naší aparatuře objevili také nečekané hodnoty okolo 60 nm které budou nejspíš chybné. Oba tyto nepřesné výsledky vznikly při poměrech 1:10, tedy ze vzorků s nejvyšší měřenou koncentrací. Tento fakt si vysvětlují možností několika násobného rozptylu v koncentrovaném roztoku. Výsledné velikosti jsou při tomto jevu vyhodnoceny menší než ve skutečnosti, což by odpovídalo i našemu případu [13]. ZetaSizer pracuje na vyšším rozptylovém úhlu než naše aparatura, proto jeho vyhodnocování není vícenásobným rozptylem tolik ovlivněno.

ZÁVĚR

Podářilo se nám sestřojit funkční aparaturu, která dokáže metodou dynamického rozptylu světla analyzovat nanočástice v roztoku. Vyhodnotili jsme hydrodynamické průměry od 100 nm do 900 nm. Porovnali jsme výsledky měření s různým nastavením prvků v aparatuře. Zjistili jsme, že při vyšším optickém výkonu laseru, tedy vyšší frekvenci detekčních událostí (100–200 kHz), získáme více dat, ze kterých se přesněji vyhodnotí autokorelační funkce. Ukázali jsme, že optická vlákna s menšími jádry dosahují vyšší hloubky modulace signálu, tedy pak opět kvalitnější autokorelační funkce. Tomuto faktoru pomůže také uzavření clony před detekčním vláknem. Dokázali jsme, že výsledky se u látky naředěné v různých koncentracích výrazně neliší. Při tom jsme naměřili také nejnižší koncentraci potřebnou pro naši aparaturu, na které získáme data alespoň přibližně odpovídající realitě. Na závěr jsme porovnali výsledky naší aparatury s komerčně používaným přístrojem ZetaSizer Nano ZS. U sedmi vzorků z devíti byly výsledné průměry velmi podobné, u zbylých dvou se částečně lišily. Pokud je však nominální velikost částic pravdivá, tak naše aparatura ve čtyřech případech dosáhla přesnějších výsledků než přístroj. Nepřesných výsledků jsme dosáhli při vysokých koncentracích nejspíš v důsledku vícenásobného rozptylu v roztoku.

Hlavní výhodou naší experimentální aparatury je fakt, že na rozdíl od komerčních přístrojů ji nyní můžeme dále modifikovat po stránce změny experimentálního vybavení i po stránce úpravy používaných programů pro zpracování dat. To nám komerční přístroj neumožní. Můžeme testovat různé nápady a teorie na zpřesnění metody DLS. Pohyb částic lze totiž modulovat různými vnějšími vlivy, např. akustickými vlnami (ultrazvukem) [3], [7], [20] nebo magnetickým polem [5]. Pokud se takto podaří částice rozkmitat na známých frekvencích, bude teoreticky možné měřit při nižších koncentracích ale stejném výkonu laseru, čímž zvýšíme citlivost metody. Naši analýzu můžeme dále zpřesnit použitím silnějšího laseru, který poskytne silnější detekční signál, nebo použitím více detektorů či supravodivých detektorů. Zajímavé by byly také analýzy vzorků, ve kterých se vyskytuje více částic různých velikostí. U komplexních vzorků by mohla být analýza zefektivněna využitím metod strojového učení, například využitím umělých neuronových sítí pro predikci distribuce velikostí částic z měřených korelací.

REFERENCE

- [1] Cross-correlation of point processes. *Pycorrelate* [online]. 2018 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://pycorrelate.readthedocs.io/en/latest/theory.html>
- [2] Curve fitting. *Scipy Lecture Notes* [online]. California: The Regents of the University of California, 2019 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: http://scipy-lectures.org/intro/scipy/auto_examples/plot_curve_fit.html
- [3] ERPELDING, M., R. M. GUILLERMIC, B. DOLLET, et al. Investigating acoustic-induced deformations in a foam using multiple light scattering. *Physical Review E*. 2010, **82**(2). DOI: 10.1103/PhysRevE.82.021409. ISSN 1539-3755. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.82.021409>
- [4] FEYNMAN, Richard P., Robert B. LEIGHTON a Matthew L. SANDS. *The Feynman lectures on physics* [online]. New millennium ed. New York: Basic Books, 2010 [cit. 2020-04-03]. ISBN 04-650-2382-7.
- [5] GIMENEZ, Alejandro J., Gabriel LUNA-BÁRCENAS, Isaac C. SANCHEZ a J. MARTIN YÁÑEZ-LIMÓN. Nanowire light scattering variation induced by magnetic alignment. *Journal of Applied Physics*. 2014, **116**(7). DOI: 10.1063/1.4893551. ISSN 0021-8979. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4893551>
- [6] HUSTON, A.L., J.B. DELEHANTY a I.L. MEDINTZ. Quantum Dots for Biomedicine. *Optics & Photonics News*. 2017, **8**(1047-6938), 8.
- [7] CHEN, Mian, Feiyan CAI, Chen WANG, et al. Observation of Metal Nanoparticles for Acoustic Manipulation. *Advanced Science*. 2017, **4**(5). DOI: 10.1002/advs.201600447. ISSN 21983844. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/advs.201600447>

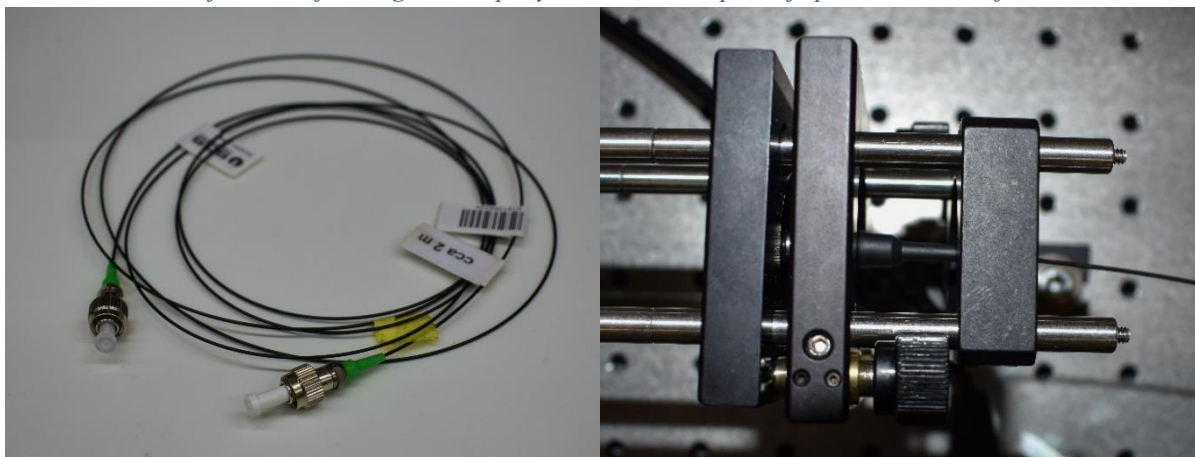
- [8] KASZUBA, Michael, David MCKNIGHT, Malcolm T. CONNAH, Fraser K. MCNEIL-WATSON, Ulf NOBBMANN, Jason CORBETT a Fraser K. MCNEIL-WATSON. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008, **10**(5), 823-829. DOI: 10.1007/s11051-007-9317-4. ISSN 1388-0764. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-007-9317-4>
- [9] KATRUKHA, Eugene A., Marina MIKHAYLOVA, Hugo X. VAN BRAKEL, Paul M. VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, Anna AKHMANOVA, Casper C. HOOGENRAAD a Lukas C. KAPITEIN. Probing cytoskeletal modulation of passive and active intracellular dynamics using nanobody-functionalized quantum dots. *Nature Communications*. 2017, **8**(1), 8. DOI: 10.1038/ncomms14772. ISSN 2041-1723. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ncomms14772>
- [10] LAURENCE, Ted A., Samantha FORE a Thomas HUSER. Fast, flexible algorithm for calculating photon correlations. *Optics Letters*. 2006, **31**(6). DOI: 10.1364/OL.31.000829. ISSN 0146-9592. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-31-6-829>
- [11] LIU, Wei, Jin SHEN a Xianming SUN. Design of Multiple-Tau Photon Correlation System Implemented by FPGA. *2008 International Conference on Embedded Software and Systems*. IEEE, 2008, 2008, , 410-414. DOI: 10.1109/ICCESS.2008.7. ISBN 978-0-7695-3287-5. Dostupné také z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4595590/>
- [12] ØGENDAL, Lars. *Light Scattering a brief introduction* [online]. Kodaň, 2019 [cit. 2020-04-03]. Dostupné také z: https://www.nbi.dk/~ogendal/personal/lho/LS_brief_intro.pdf
- [13] ØGENDAL, Lars. *Light Scattering Demystified Theory and Practice* [online]. Kodaň, 2019 [cit. 2020-04-03]. Dostupné také z: https://www.nbi.dk/~ogendal/personal/lho/lightscattering_theory_and_practice.pdf

- [14] PETERS, Rainer. *ZetaSizerPatent*. 2000. Spojené státy americké. 6016195. Uděleno 2000.
- [15] PROVENCHER, Stephen W. *CONTIN: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic or Integral Equations*. Německo, 1982.
- [16] RUSSO, Paul. *DLS Alignment* [online]. Georgia, 2018 [cit. 2020-04-03]. Dostupné také z: <https://macro.lsu.edu/howto/DLS%20Alignment.pdf>
- [17] RUSSO, Paul. *Dynamic Light Scattering Minicourse* [online]. Georgia, 2012 [cit. 2020-04-03]. Dostupné také z: http://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Characterization/DLS/PaulRussoLSU2012DLS_Minicourse.pdf
- [18] SALEH, Bahaa E. A. a Malvin Carl TEICH. *Základy fotoniky: Fundamentals of photonics*. Praha: Matfyzpress, 1996. ISBN 80-858-6300-6, Sv. 1, str.68, Sv. 2, str.229
- [19] Scipy.optimize.curve_fit. *SciPy* [online]. California: The Regents of the University of California, 2019 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.optimize.curve_fit.html
- [20] WANG, Xue Z., Lande LIU, Rui F. LI, Richard J. TWEEDIE, Ken PRIMROSE, Jason CORBETT a Fraser K. MCNEIL-WATSON. Online characterisation of nanoparticle suspensions using dynamic light scattering, ultrasound spectroscopy and process tomography. *Chemical Engineering Research and Design*. 2009, **87**(6), 874-884. DOI: 10.1016/j.cherd.2008.12.014. ISSN 02638762. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876208003638>

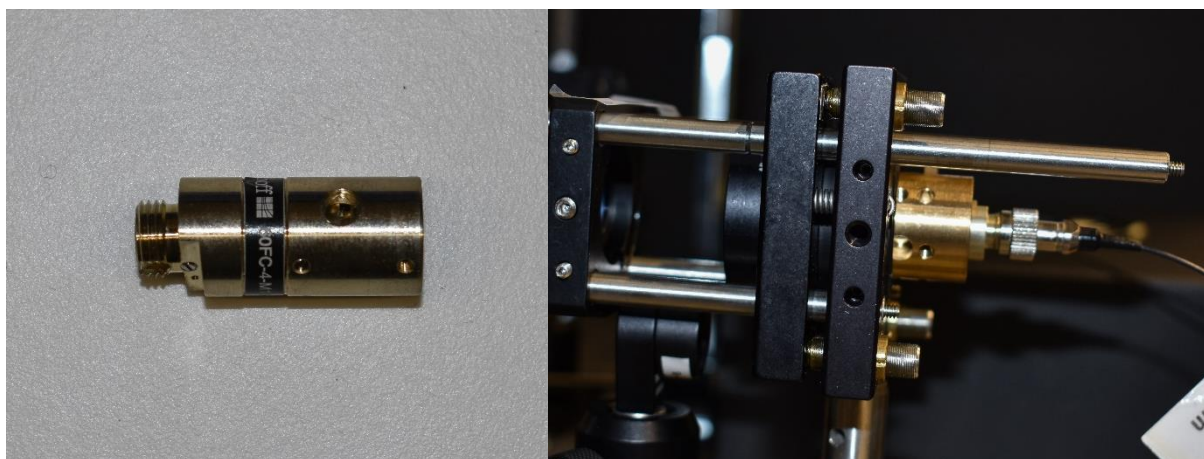
SEZNAM PŘÍLOH



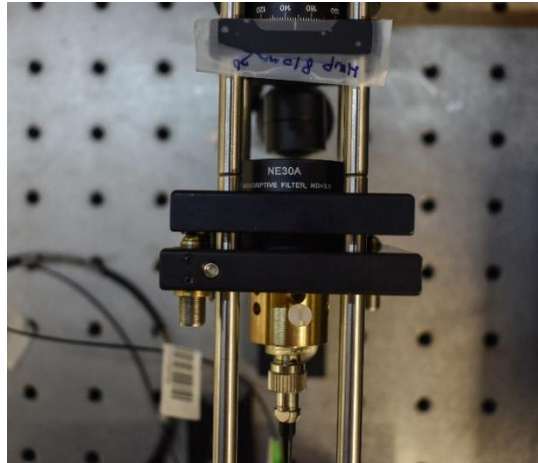
Obrázek 23: Zdroj laseru a jeho regulátor teploty vidíme vlevo. Vpravo je pak vlastní emitující laserová dioda.



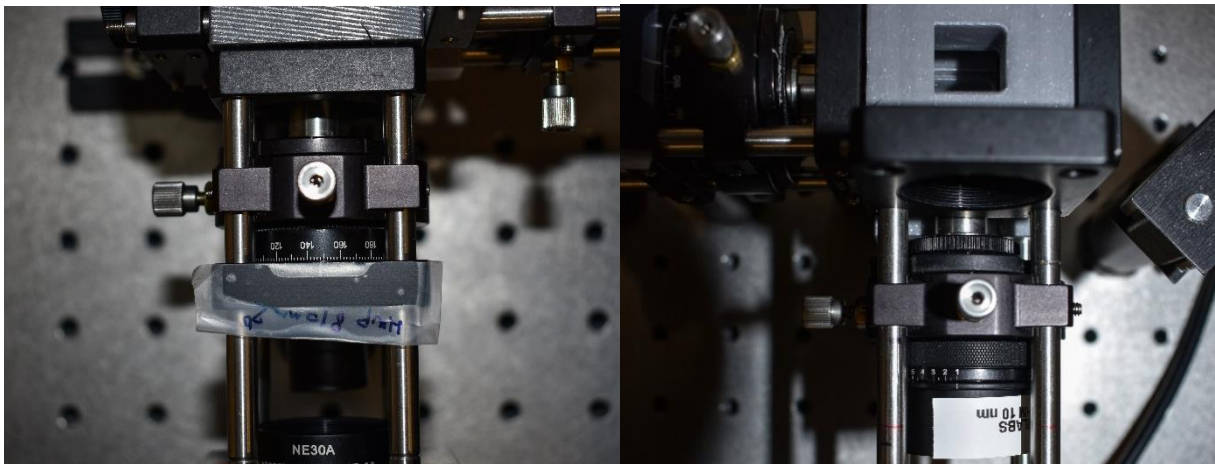
Obrázek 24: Používané optické vlákno s průměrem jádra $62,5 \mu\text{m}$. Vpravo je pak zasazené v aparatuře.



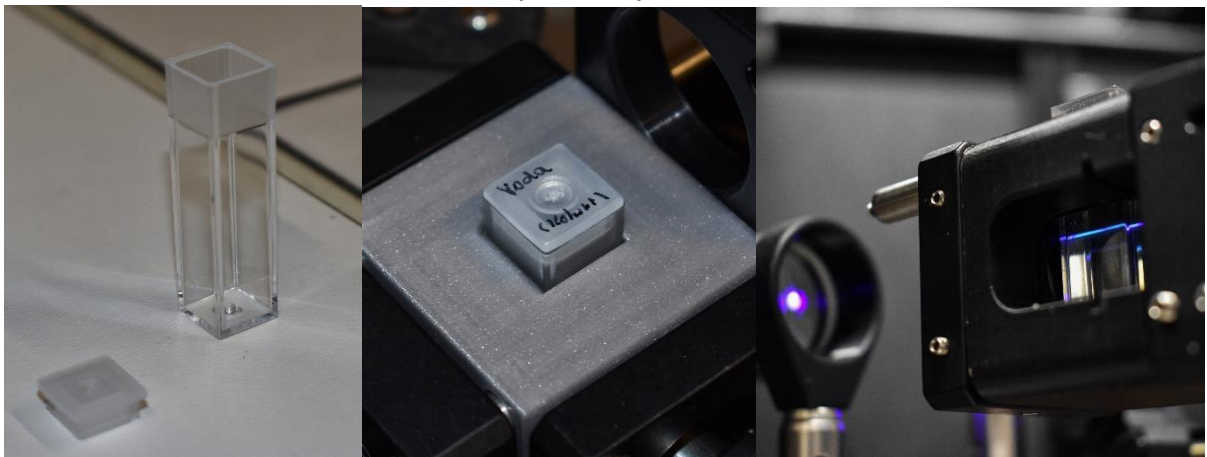
Obrázek 25: Kolimátor, který vytváří paprsek laseru. Vpravo je pak umístěný v aparatuře.



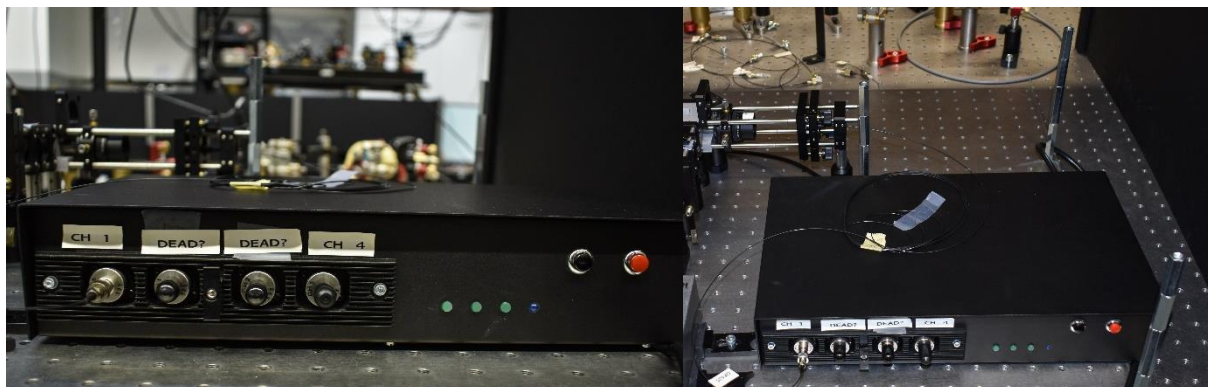
Obrázek 26: ND filtr umístěný za kolimátorem.



Obrázek 27: Vlevo jsou za sebou zespoda zařazeny pŕlvlnná destička a spojná čočka, která zaostřuje paprsek do držáku pro vzorek. Vpravo vidíme shora dolŕ další čočku, která fokusuje rozptŕlené světlo do detektoru, clonu a frekvenční filtr.



Obrázek 28: Spektroskopická kyveta. Vlevo prázdná, uprostřed se vzorkem v aparatuře a vpravo s procházejícím paprskem.



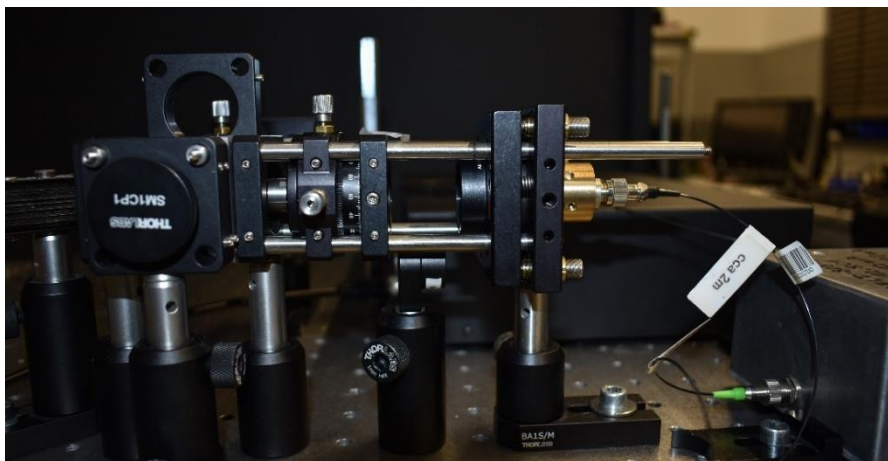
Obrázek 29: Lavinová fotodioda – APD (avalanche photodiode).



Obrázek 30: Time Tagger 20 od firmy Swabian Instruments.



Obrázek 31: ZetaSizer Nano ZS z oficiálních stránek firmy Malvern Panalytical.
<https://www.malvernpanalytical.com/en>.



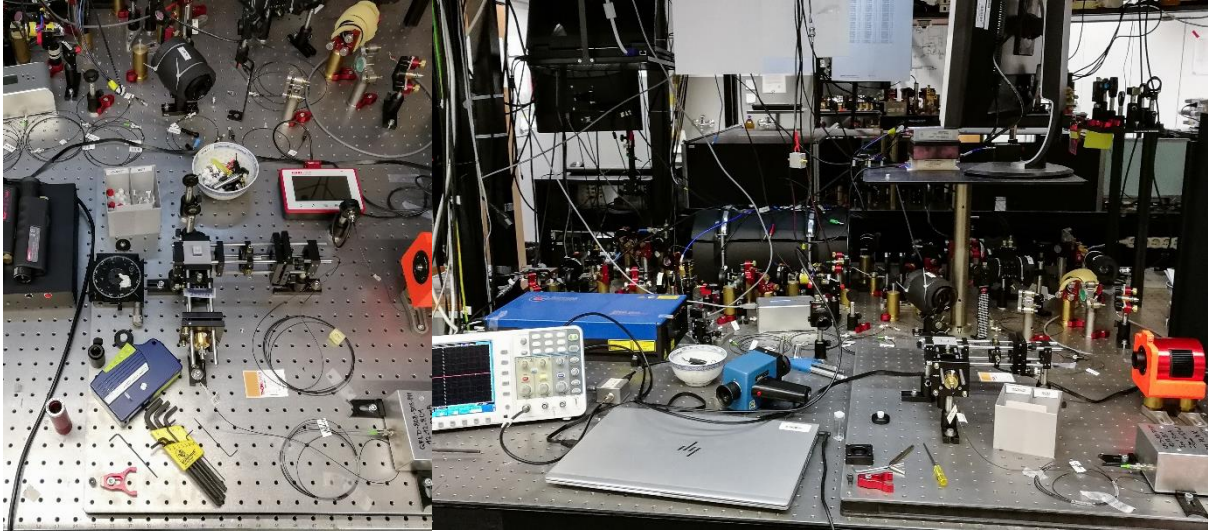
Obrázek 32: Prvky aparatury, kterými projde laser před vstupem do vzorku. Zprava jde o kolimátor, ND-filtr, půlvlnnou destičku a spojnou čočku.



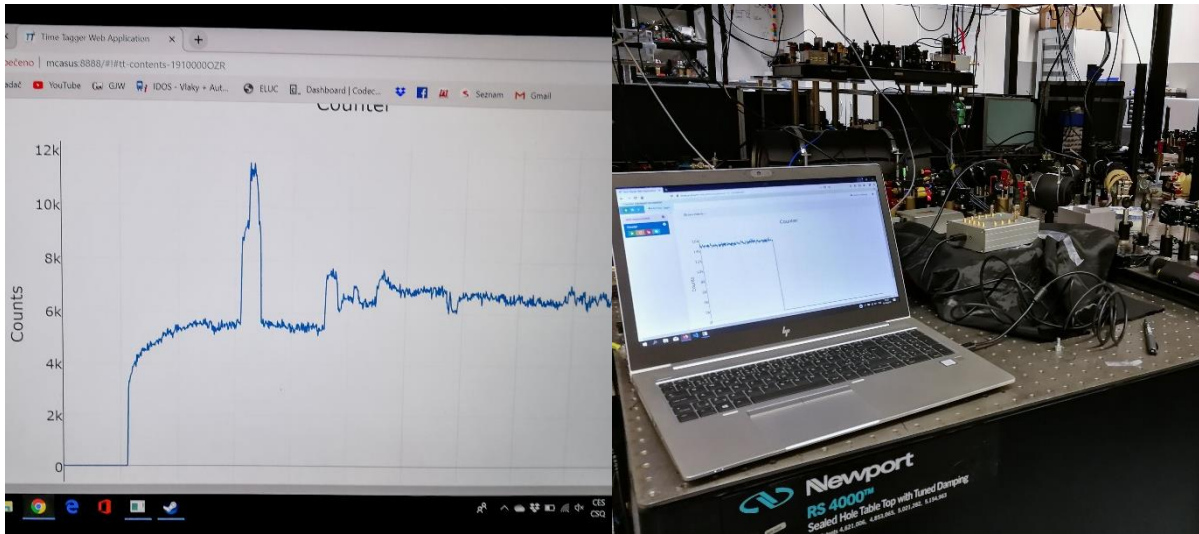
Obrázek 33: Zleva fotky vidíme držák na kyvetu, spojnou čočku, nastavitelnou clonu, frekvenční filtr a detekční vlákno.



Obrázek 34: Celá aparatura překrytá černou deskou a plachtou, aby se redukovalo množství okolního světla v laboratoři. Vlevo vidíme vyřezaný otvor pro vkládání vzorku.



Obrázek 35: Měření velikosti optického výkonu laseru.



Obrázek 36: Frekvence dopadu fotonů, podle které jsme nastavili finální polohu čoček.