

Techniky přípravy mikrotomových řezů plastů

Jakub Foltýn

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jakub Foltýn**
Osobní číslo: **T15224**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Techniky přípravy mikrotomových řezů plastů**

Zásady pro vypracování:

Práce popisuje současné možnosti přípravy mikrotomových řezů plastových dílů pro optickou mikroskopii. Mikrotomové řezy jsou náročné na přípravu a vyžadují zručnost operátora. Je rozdíl pokud se připravuje řez z plastu plněného a neplněného, jaké jsou vhodné nože, úhly nastavení nožů, a také jak vhodně upnout vzorek či zda jej nezalít do pryskyřice. Práce podá ucelený přehled v dané oblasti.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Rheological and morphological properties of dispersed polymeric materials: filled polymers and polymer blends-Helmut Münstedt

Failure analysis on Moulded parts of DELRIN and ZYTEL using Microscopic Techniques-Edith Böhme

Filled polymers:science and industrial applications-Jean L. Leblanc

Rheology of filled polymer systems-Aroon V. Shenoy

Microtomes and Microtome Knives A Review and Proposed

Classification-F.Mohammed, T.F. Arishiya, S. Mohamed

Microtomy and Paraffin-Geoffrey Rolls

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání bakalářské práce:

2. ledna 2018

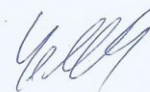
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 1. března 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 7.5.2018.....



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi přípravy mikrotomových řezů polymerních materiálů pro mikroskopii. Na začátku práce je stručně popsána historie a jednotlivé typy mikrotomů. Další část se zabývá volbou vhodného nože pro danou aplikaci. Detailněji je popsána příprava tenkých a ultratenkých řezů jak pro světelnou, tak i pro transmisní elektronovou mikroskopii. V poslední části práce jsou vystíněny rozdíly mezi řezy z plněného, měkkého či tvrdého polymeru.

Klíčová slova: mikrotomové řezy, mikrotom, mikroskopie

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with possibilities of preparation of microtome cuts of polymer materials for microscopy. At the beginning of the thesis is briefly described history and individual types of microtomes. The next section deals with the selection of the right knife for given application. In detail, the preparation of thin and ultra-thin sections for both light and transmission electron microscopy is described. In the last part of the thesis, there are described differences between cuts from filled, soft and hard polymers.

Keywords: microtome cuts, microtome, microscopy

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Lubomírovi Beníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a podporu při tvorbě této bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 MIKROTOM	10
1.1 HISTORIE	10
1.2 TYPY MIKROTOMŮ	11
2 MIKROTOMOVÉ NOŽE	14
2.1 ÚHEL NOŽE	20
2.1.1 PŘÍLIŠ MALÝ ÚHEL	21
2.1.2 PŘÍLIŠ STRMÝ ÚHEL	21
3 PŘÍPRAVA TENKÝCH A ULTRATENKÝCH ŘEZŮ	24
3.1 PŘÍPRAVA TENKÝCH VZORKŮ PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII	25
3.1.1 PREPARÁTY PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII	26
3.2 PŘÍPRAVA ULTRATENKÝCH ŘEZŮ PRO TRANSMISNÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII	28
3.2.1 PREPARÁTY PRO TRANSMISNÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII	32
4 MIKROTOMOVÉ ŘEZY	33
4.1 ŘEZ PLNĚNÝCH PLASTŮ	33
4.2 ŘEZ KOMPOZITŮ	34
4.3 ŘEZ MĚKKÉHO A TVRDÉHO PLASTU	35
ZÁVĚR	37
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK.....	42

ÚVOD

Plasty se začaly rozvíjet ve 20. století a postupně nahrazují dříve používané materiály, jako jsou sklo, dřevo, kovy a jiné. K nahrazení těchto materiálů došlo prakticky ve všech odvětvích průmyslu. Největší výhodou plastů, kromě srovnatelných vlastností, představuje cena, což se projevilo na tom, že v dnešní době jsou téměř na každém našem kroku. Velice důležitým odvětvím je výzkum a objevování nových polymerů, které by byly co nejlevnější a měly co nejlepší vlastnosti pro konkrétní aplikace. Mimo to probíhá neustálé vylepšování stávajících polymerů. Proto, aby mohly být zkoumány a vylepšovány, je nutné znát mikroskopickou strukturu.

Morfologie polymerů se zabývá studiem nadmolekulární struktury polymerů, přičemž se jedná především o uspořádání polymerních řetězců v krystalických a amorfních oblastech. Strukturu lze zkoumat pomocí řady metod např. difrakce záření, mikroskopii, diferenciální kalorimetrií atd. Pro použití těchto metod je nutné odebrat malou část polymeru.

Tato bakalářská práce pojednává o konkrétní přípravě tenkých řezů pro světelnou mikroskopii a ultratenkých řezů pro transmisní elektronovou mikroskopii. Jedná se o velmi složitý mechanismus se zaměřením na přesnost a zkušenosti obsluhy. Jaký typ mikrotomu, nože a úhel nože použít pro jednotlivé polymery. Jestli je rozdíl mezi řezem z plněného, měkkého a tvrdého plastu.

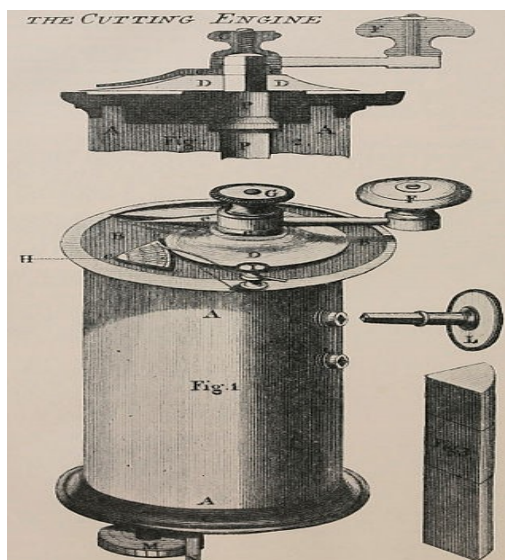
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROTOM

Mikrotom je mechanický nástroj, který se používá převážně v medicíně v oblasti histologie ke zhotovení velmi tenkých řezů tkání. Tyto řezy se pak využívají ve světelné i elektronové mikroskopii. Používají se speciální nože ze skla, kovu a diamantu v závislosti na typu vzorku a požadované tloušťce. Mezi hlavní části přístroje patří svorka na upevnění vzorku, nůž a posuvný mechanismus sloužící k posunu vzorku nahoru a dolů pomocí mikrometrického šroubu, kterým se dá nastavit určitá tloušťka řezu. Běžná tloušťka u tenkých řezů se pohybuje v rozmezí 0,5 - 50 mikrometrů a pro velmi tenké řezy je to 60 - 500 nanometrů. Optimální tloušťka u polymerů se pohybuje mezi 10 - 20 mikrometry. Doporučuje se však připravit úseky od 25 mikrometrů a menší, aby se lépe zjistily případné poruchy. [1–3]

1.1 Historie

Na Obr. 1. je znázorněn náčrt prvního mikrotomu, který byl vynalezen George Adamsem v roce 1770 a sestrojen společností Cummings. Jednalo se o ruční mikrotom, kde tělo přístroje je ze slonoviny a vrch je tvořený kovem ve tvaru zvonu. Vzorek byl upevněn ve válci a pomocí rukojeti došlo k otáčení řezné čepele, což vyvolalo řez o požadované tloušťce. Po každém řezu byl materiál zvedán právě o tuto tloušťku díky šroubu. Sloužil hlavně k řezání vzorků dřeva.



Obr. 1. Schéma mikrotomu společnosti Cummings [4]

Andrew Pritchard v roce 1835 vynalezl model, který byl pevně připevněn k okraji stolu a díky tomu se během řezu nepohyboval. Nůž byl ručně tažený kolem mosazné desky, což zajistilo tenké řezy. Byl určen pro zhotovení řezů ze dřeva. Tento mikrotom je vyobrazen

na Obr. 2. Chevalier poprvé v oboru použil termín mikrotom, což bylo v roce 1839. Inženýři Rudolf Jung a Rudolf Thoma navrhli první mikrotom, který se začal vyrábět sériově, a tak započali novou éru v histologii. Zajímavostí je, že se do vývoje zapojil i český vědec Jan Evangelista Purkyně. Modelu Purkyně patří podle některých zdrojů prvotní použití v praxi. Původ mikrotomu není zcela jasný, protože fáze jednotlivých vylepšení nejsou dostatečně zdokumentovány a za mikrotom lze považovat i samostatný nůž. [1,3–5]



Obr. 2. Mikrotom Andrew Pritcharda [6]

1.2 Typy mikrotomů

Existuje celá řada mikrotomů v závislosti na požadavcích jak výrobce, tak i na způsobu použití. Mezi nejčastěji využívané jsou řazeny dva z nich, a to rotační a sáňkový, kdy každý z nich jinak pracuje. V prvním případě je nůž upevněný a vzorek se pohybuje, přičemž v druhém případě jde přesně o opak. Dále je lze jednoduše rozdělit na manuální, poloautomatické a plně automatické. [1,7]

Mezi manuální patří:

- houpající
- zmrazovací (kryostat)
- sáňkový
- ultramikrotom
- vibrační
- rotační

Automatické:

- laserový
- automatický mikrotom

Houpající mikrotom:

Přístroj se svou konstrukcí řadí mezi jedny nejstarší vůbec. Název mu byl přiřazen právě vůli houpavému rameni. Je relativně levný a používá se zejména pro krájení parafinových bločků. Skládá se ze tří mobilních částí, což nám zaručuje určitou spolehlivost a také minimální údržbu.[1]

Kryostat:

Jedná se o přístroj, který je velmi podobný klasickému mikrotomu. Liší se tím, že jde o uzavřený systém s vlastním chlazením, a tak dochází k trvalému chlazení podložky, nože i samotného preparátu. Teplota chlazení se pohybuje nejčastěji kolem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. I u kryostatu je možné nastavit různé šířky řezu, kde se tato šířka volí typu a velikosti řezaného materiálu. U modernějších přístrojů je šířka řezu nastavována pomocí ovládacího panelu elektronicky. Největším problémem při krájení kryostatem je rozmazávání preparátu, které může být způsobeno nedostatečným zmrazením preparátu. V tomto případě se používá sprej, který vytemperuje okolí kryostatu.[1,7]

Sáňkový mikrotom:

Mikrotom, který je určen k řezání velkých bloků s průměrnou tloušťkou řezu 10 - 60 mikrometrů. Tloušťka řezu se nastavuje pomocí mikrometrického šroubu, díky němuž se zajistí konstantní tloušťka řezu. Vzorek je pevně připevněn neapolskými svorkami a nůž se pohybuje proti němu dopředu. Sklon nože k rovině řezu i ke směru řezu je možné libovolně měnit. Samotný přístroj je velmi těžký a díky tomu i velice stabilní a nepodléhá případným vibracím. Konstrukce umožňuje snadné a rychlé odstranění hrubých částí. Na Obr. 3. je možné vidět sáňkový mikrotom Leica SM2010R od společnosti Leica Biosystems.[1,8]



Obr. 3. Sáňkový mikrotom Leica SM2010R [8]

Rotační mikrotom:

Název rotační vychází z rotačního zařízení opatřené klikou, které způsobuje postup materiálu shora směrem k noži. Jedná se tedy o typ mikrotomu, kde je nůž pevně upevněný a proti němu se pohybuje vzorek. Svěrák sloužící k uchycení vzorku umožňuje zpracování vzorků různých velikostí i tvarů. Bloček s materiálem se pohybuje nahoru a dolů ve svislé rovině vzhledem k noži. Na obr. 4. je znázorněn poloautomatický rotační mikrotom Leica RM2255 s plochým nožem od společnosti Leica Biosystems, přičemž obsluhovat tento přístroj může dostatečně vyškolený pracovník. U tohoto typu je možné nastavení jak rychlosti, tak i požadované tloušťky řezu. Jedná se o univerzální mikrotomy k získání středních až tenkých preparátů v rozmezí tloušťky 0,5 - 60 mikrometrů. Samotná konstrukce je těžší než houpací a stabilnější proti případným vibracím. Je vhodný pro výrobu sériových řezů, které se pak využívají ve světelné mikroskopii. [1,9–13]



Obr. 4. Rotační mikrotom Leica RM2255 [11]

2 MIKROTOMOVÉ NOŽE

Kritickým faktorem při přípravě polymerního vzorku o optimální tloušťce je volba mikrotomového nože. Vedle mikrometrického šroubu patří k nejdůležitějším součástem mikrotomu, přičemž zaručuje kvalitní řez polymeru. Výběr správného nože závisí převážně na zkušenostech obsluhujícího personálu. Nejčastěji se používají buď nože z tvrdé oceli, nebo nože skleněné. Ostří nože je možné brousit pomocí brousících kamenů nebo použití brousícího prášku. Vůbec jako první se použilo ostří žiletky, nicméně toto ostří se rychle ztupilo a bylo nahrazené broušeným sklem. Mikrotomový řez prakticky začíná i končí ostře ohraničenou hranou bez vady. Lze nalézt i jednorázové nože, které však nemají velké uplatnění. [1,14]

Mikrotomové nože se rozdělují na základě materiálu, z něhož jsou vyrobené:

- Jednorázové nože
- Ocelové nože
- Nerezové nože
- Z karbidu wolframu
- Skleněné nože
- Diamantové nože
- Safírové nože

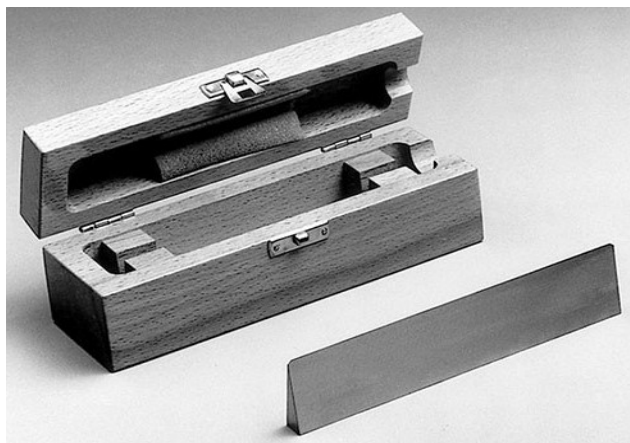
Jednorázové nože:

Jedná se o zesílené žiletky, které jsou upevněny ve speciálním držáku. Nože musí být pevně uchyceny, aby došlo k omezení vibrací během řezu. Pomocí těchto nožů je možné vytvářet vysoce kvalitní řezy, a proto nahrazují nože, které se běžně používají. Jsou vyrobené z vysoce kvalitní nerezové oceli. V některých případech pro zvýšení pevnosti a prodloužení doby řezání se okraje nožů potahují chromem nebo platinou. Nože potažené teflonem mají využití v kryostatu, protože mají redukovanou odolnost proti řezání a dosahují minimálního tření. U menšího a tenčího jednorázového nože dochází také k dřívějšímu vytemperování na teplotu v komoře kryostatu než u běžného nože, čímž se minimalizuje doba při výměně nože nebo při úpravě teploty.

Ocelové nože:

Jedná se o mikrotomové nože vyrobené z vysoce kvalitní uhlíkové oceli nebo z nástrojové oceli, která má ztvrzený okraj, díky tepelnému zpracování. Tato ocel by měla mít určitou

pevnost při zvýšené teplotě, odolnost proti korozi a opotřebení. Nože by měly být v nejlepším případě zcela vytvrzené a bez nečistot. Ocel, jenž je zpevněna pouze povrchově, ztrácí svoje ostří velmi rychle a vytvrzená oblast se odstraní opakovaným ostřením. Ocel lze jednoduše rozdělit na konstrukční a nástrojovou. Jedná se však pouze o orientační rozdělení, protože záleží na účelu použití, nikoliv skupiny oceli. Na Obr. 5. je možné vidět ukázkou ocelového nože.



Obr. 5. Ocelový nůž [15]

Nože z tvrdé oceli se vyrábí ve třech různých provedeních pro různé typy polymerů. U měkkých pěnových materiálů musí být úhel ostří ostrý, takže se volí nůž plankonkávní. Zatímco u měkkých polymerů a kaučuků se volí nůž, u kterého je okraj tvořen dvěma plochami, z nichž jedna má strmější úhel. A podobně i u tvrdých plastů platí, že nejlepšími výsledky dosahují nože dlátovité. Při použití tvrdých ocelových nožů je nutné dbát na pečlivost při řezání, protože může dojít k jejich prohnutí, což se projeví ohnutím čepele nahoru či dolů. V Tab. 1. jsou uvedeny doporučené úhly nožů pro nejběžněji používané polymery.

Tab. 1. Doporučené úhly nožů pro běžné polymery [14]

Polymer	úhel ostří nože
ABS, ASA, SAN, PPS, PVC	45°
PA, POM, PP	30°
PE, PIB	15°
PS pěny	Plankonkávní

Z oceli se také vyrábějí nerezové nože, které mají největší využití ve zmrazovacím mikrotomu. Jedná se o tvrzenou, nerezovou ocel a tepelně ošetřenou, čímž se zbaví všech nečistot. Nože obsahují navíc 12 až 15% chromu. [1,2,14]

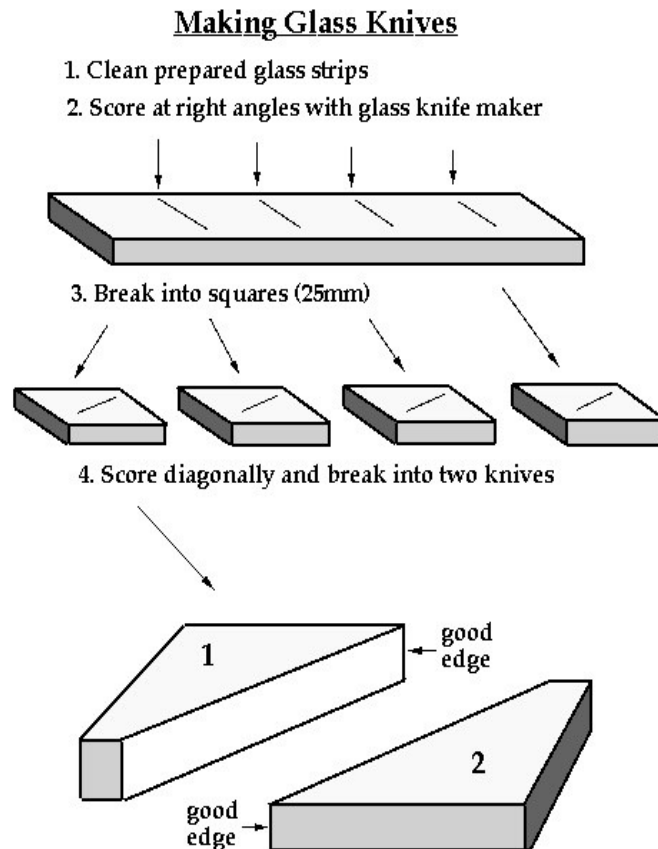
Nože z karbidu wolframu:

Jedná se o nože vyrobené z vysoce kvalitního karbidu wolframu. Jedná se o téměř nemagnetické nože s tvrdostí stokrát větší než u běžné tvrzené nástrojové oceli. Díky velké tvrdosti se jedná o nože, které mají vysokou odolnost proti opotřebení, ale právě kvůli značné tvrdosti jsou velice křehké a musí se s nimi manipulovat opatrně. Pomocí těchto nožů je možné provést až 30000 řezů na jedno ostření. Tyto nože jsou doporučované pro řezání PA a POM.[1,3]

Skleněné nože:

Skleněné nože se vyrábějí přirozeným lámáním skleněné desky, což poskytuje velmi dobrou ostrost řezné čepě. Takto vyrobené nože jsou vhodné pro řezání plastových vzorků o tloušťce 1 až 10 mikrometrů. Vzhledem k tomu, že čerstvě vyrobené nože jsou tak ostré, je možné řezat i plast, který nelze řezat dokonalým ocelovým nožem z důvodu vytváření jemných vlnek na povrchu. Řezné hrany skleněných nožů používané pro konvenční použití jsou rovnoběžné s povrchem skla, zatímco u nožů používaných v ultramikrotomii jsou umístěny proti tloušťce skla nebo přes tloušťku skla. Jedná o tvrdé nože se značnou křehkostí, a proto je nutná opatrná manipulace. Mimořádnou výhodou těchto nožů je nenákladnost na výrobu ve srovnání s ocelovými noži. Kvalita nožů se v průběhu skladování zhoršuje a není vhodné je uskladňovat, z důvodu možných změn v toku nebo při zatížení skla po zlomení a možné přítomnosti oxidačních nečistot ve vytvrzeném skle po výrobě, z čehož vyplývá, že skleněné nože by měly být připravovány těsně před jejich aplikací. Nože, které mají úhel klínu menší než 30° jsou vhodné pro řezání vzorků PP s tloušťkou menší než 10 mikrometrů. Přesný popis výroby skleněných nožů je na Obr. 6. Samotný postup se skládá ze 4 dílčích kroků:

- Očištění připravených skleněných pásků
- Umístění pásku v pravém úhlu vzhledem k noži na výrobu skleněných nožů
- Rozdělení na čtverce
- Umístění čtverečků šikmo a zlomení na dva nože se správným úhlem [1,16]

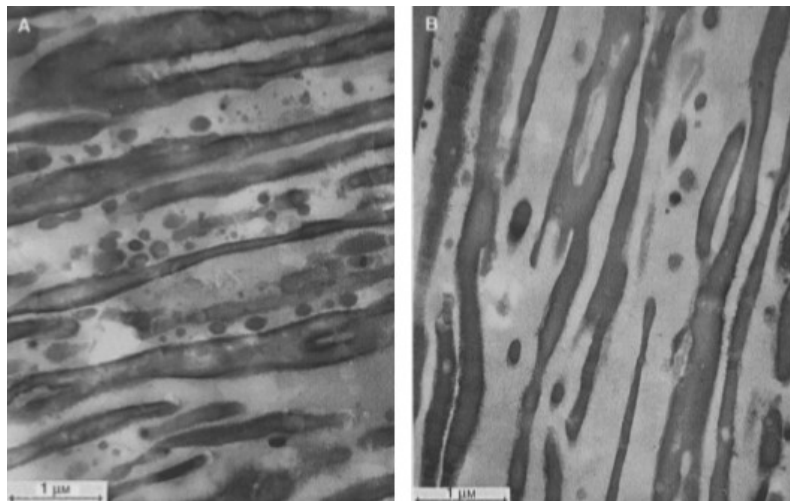


Obr. 6. Výroba skleněných nožů [16]

Diamantové nože:

Diamantové nože musí být vyrobené z vysoce kvalitních diamantů, které jsou zcela bez vad. Používají se i přes jejich velkou cenu, protože mají vynikající tvrdost a tudíž jsou nože extrémně odolné. Nejvíce se používají k řezání velmi tenkých řezů prostřednictvím ultramikrotomu.

Zvláštním případem je použití oscilačního diamantového nože. Jedná se o diamantový nůž s úhlem čepel nože 45° , který je navíc vybaven oscilátorem. Hlavní účel vývoje tohoto nože bylo snížení artefaktů, které jsou výsledkem komprese. Tyto artefakty způsobené právě kompresí jsou téměř eliminované. Pod mikroskopem nebyly nalezeny žádné další řezné artefakty ve srovnání s řezy, které byly získány pomocí nože bez oscilace. Rozdíl mezi použitím diamantového nože s úhlem čepel 35° a oscilujícím diamantovým nožem je znázorněn na Obr. 7. Oba řezy byly provedeny při pokojové teplotě, přičemž řezanou polymerní směsí byla směs PE a PP. [1,17,18]



Obr. 7. Ultratenké úseky řezané diamantovým nožem s úhlem nože 35° (A) a úseky získané oscilujícím diamantovým nožem (B) [18]

Safírové nože:

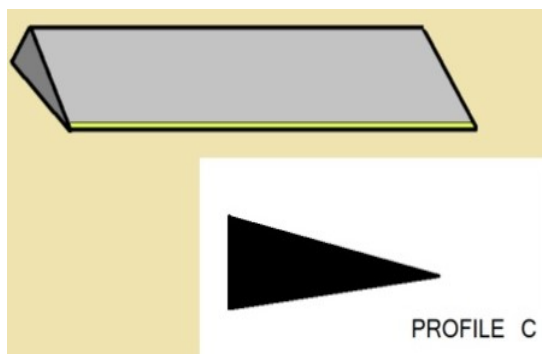
Jedná se o nože, které jsou vyrobené z jednoho pevného kusu safíru. Je uměle vytvořený z monokrystalu oxidu hlinitého při přesně definovaných teplotních podmínkách. Safírové nože mají vyšší tvrdost než nože z karbidu wolframu či skla, čímž je zajištěna dlouhodobá životnost ostří čepule pro všechny typy materiálů. Jediné omezení těchto nožů je velikost bločku, protože okraj nože je limitován na velikost 11 milimetrů. Pro tento typ nože je vyžadován speciální typ nože.

Podle profilu okraje nože se dělí na:

- Klínovitý
- Plankonkávní
- Bikonkávní
- Dlátovitý

Klínovitý:

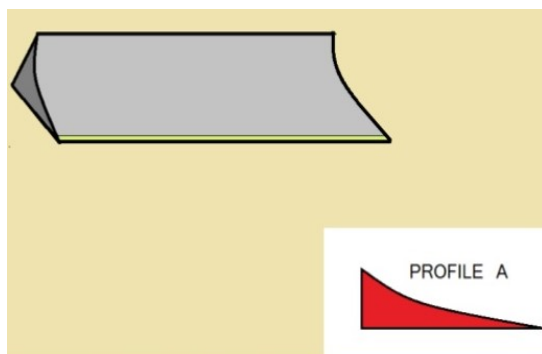
Klínovitý nůž má vyšší tuhost než nůž plankonkávní nebo bikonkávní a díky tomu lze použít pro řezání tvrdších materiálů. Díky výrazně silné povaze klínu nelze tento typ nože naostřit stejně dobře jako u typu plankonkávního nebo konkávního. Nejčastější využití má při řezání materiálu vloženém v parafínovém vosku, zmrzlých kryostatických řezů a malých materiálů vložených do syntetické pryskyřice. Schéma klínovitého nože je vyobrazeno v Obr. 8.



Obr. 8. Klínovitý nůž [19]

Plankonkávní:

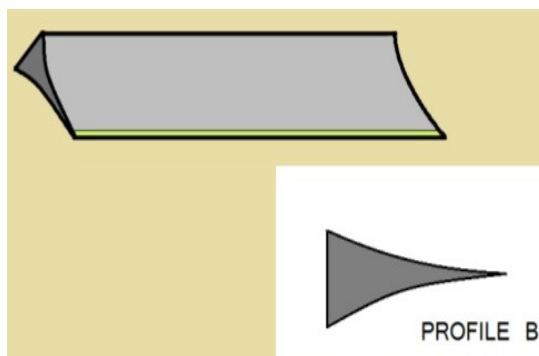
Plankonkávní nůž má horní plochu vydutou a dolní rovnou. Používá se zejména pro řezání tvrdých materiálů, ale může být také využit pro řez měkkých materiálů, které jsou zabudovány do parafinového vosku. Nůž by měl být umístěn šikmo k řezanému materiálu a rovná plocha musí vždy směřovat k bločku. Tyto nože jsou dodávány s různým stupněm konkávnosti. Ukázka je na Obr. 9.



Obr. 9. Plankonkávní nůž [19]

Bikonkávní:

Bikonkávní nůž má obě plochy vyduté. Nůž je extrémně ostrý a používá se u rotačního mikrotomu k řezání měkkých celoidinových bločků s vloženým materiálem nebo pěnových směsí. Nože nejsou vhodné pro tvrdé materiály, protože dochází k vibraci okraje, což vyvolá vznik jevu zvaný boulení. Pro největší účinnost a dosažení co nejlepšího výsledku by měl být nůž při řezání materiálu v šikmé poloze. Znázorněn na Obr. 10.

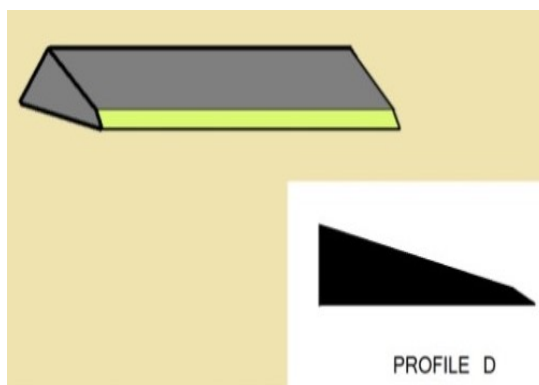


Obr. 10. Bikonkávní nůž [19]

Dlátovitý:

Dlátovitý nůž je určen pro řezání tvrdých a tuhých materiálů, protože má největší stabilitu ze všech zmíněných profilů, a proto se používá právě pro nejtvrdší materiály. Zároveň v důsledku zkosení nože se však jedná o nůž, který je nejméně ostrý. Své využití tedy nachází při řezání bločků ze syntetické pryskyřice, tvrdých materiálů zabudovaných v parafínovém vosku a velkých voskových bloků. Dlátovitý typ je znázorněn na Obr. 11.

Broušení všech ocelových nožů se provádí tak, že se brousí zkosení na každé straně nože, což platí pro plankonkávní, bikonkávní, klínovité a u dlátovitých se brousí uhlová plocha profilu.[1]



Obr. 11. Dlátovitý nůž [19]

2.1 Úhel nože

Ideální úhel nože pro řezání jakéhokoliv materiálu při použití libovolného mikrotomu, bez ohledu na tvrdosti by představoval nekonečně tenkou rovinu, která by byla orientována rovnoběžně s rovinou řezu. Ovšem nekonečně tenkou rovinu nelze vyrobit a objevuje se pouze v geometrických knihách. Proto skutečné nože představují kompromis nebo skupinu kompromisů, spojené s fyzikálními zákony, dostupným materiálem, náklady a technikou, která

je potřeba na výrobu. Musí mít měřitelnou tloušťku, aby byla během řezu stabilní. Všechny mikrotomové nože bez ohledu zda se jedná o jednorázové či brousitelné mají klín tvarované části. Celý nůž by mohl být teoreticky hladký s postupným sklonem k přední hraně. Nicméně, při ostření by to vyžadovalo odstranění celé jedné vrstvy nože. V praxi je proto konečné zkosení nože vždy strmější, které může být symetrické na obou stranách, ale nemusí. Sklon nože tak umožňuje snadnější ostření, kdy se odstraňuje pouze plocha zkoseného povrchu. U mikrotomu je středová čára průřezem nože, která je umístěna v úhlu k hlavnímu směru pohybu a není tak rovnoběžná s rovinou řezu, jako by to bylo u ideálního nekonečně dlouhého tenkého nože, což je nutné v důsledku zkosení. Tento kompromis vzhledem k ideálnímu noži má dva negativní dopady.[14,20]

2.1.1 Příliš malý úhel

V tomto případě je nůž držen tak, že vzorek se pohybuje rovnoběžně s osou klínu, což by odpovídalo ideálnímu noži. Zkosení nože by pak bylo pevně přitisknuté na vzorek a řezem by se aplikoval tlak na vzorek. Tato skutečnost je nežádoucí a existuje několik možných důsledků, které závisí na vlastnostech vzorku, nožů a na tom jak je dobře vzorek upevněn.

- Je-li materiál příliš měkký, dochází k tření a následnému poškození vzorku. Nejčastějším výsledkem střídavě silný řez. Tohoto jevu se může také dosáhnout, že není nůž nebo držák vzorku pevně zajištěn a může se pohybovat pod tlakem.
- Pokud je materiál tvrdý nebo je použit vibrační nůž, nemusí být tlak způsobený stlačením materiálu, ale může dojít k ohnutí nože nahoru. Dochází tak k částečnému řezu a vzniká vlnitý vzor na povrchu bločku nazývaný žaluzie.
- Nadměrné posunutí bločku dopředu může způsobit, že se vzorek odtrhne z držáku vzorku.

2.1.2 Příliš strmý úhel

Nůž je zvednutý do strmého úhlu mezi středovou čarou v průřezu nože a osou pohybu, tak že spodní strana klínu se již nadále nepohybuje. Horní plocha klínu vždy tlačí na neřezanou část vzorku nad řeznou hranou, což způsobí určitou deformaci vzorku. Opět existuje několik důsledků:

- Pokud je nůž pohyblivý a vzorek je tvrdý, může dojít k ohnutí nože dolů a k jeho následnému sklouznutí do bločku se vzorkem.

- V případě tvrdého vzorku může dojít k roztržení vzorku. Vznikají tak čáry, které jsou rovnoběžné s okrajem nože, v místech kde byla tvrdá část ostře ohnuta a zlomena.

Obecně není příliš výhodné ohýbání řezu, avšak chyby spojené s malým úhlem způsobují větší poškození vzorku než chyby způsobené příliš strmým úhlem. Správný úhel nože by tedy měl být nastaven následujícím způsobem:

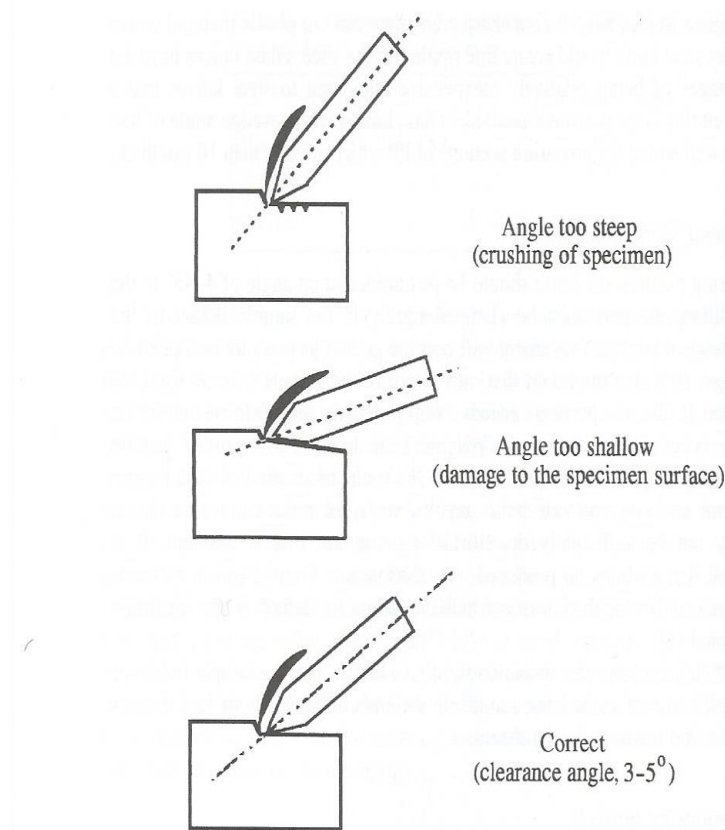
1. Umístění spodní plochy rovnoběžně se vzorkem a rovinou pohybu
2. Zvednutí úhlu o $\frac{1}{2}$ stupně (pokud je to možné) nad úhlem úkosu, aby se zamezilo případnému sklouznutí spodní plochy přes bloček vzorku. Mimo to může dojít k poškození způsobené třením.

Důsledky nesprávného úhlu nože se budou lišit kvůli rozdílu:

- Typu vzorku
- Fixační a zpracovatelské vlastnosti
- Pohyblivosti nože

Nutné zvážení i vlastností samotných nožů, které mohou být vyráběny v různých profilech a odlišnými úhly. Správný úhel nože je vlastností typu nože a konečného sklonu. Ten se může lišit u každého výrobce a při opětovném ostření se může změnit. Pro snížení rizika se proto doporučuje profesionální ostření, čímž se zamezí změna úhlu nože.

Schématické znázornění chyb je uvedeno na Obr. 12. V prvním případě se jedná o deformaci způsobenou příliš strmým úhlem nože, kde dochází k rozdrčení vzorku. Ve druhém případě se jedná o příliš malý úhel nože, což má za následek poškození povrchu vzorku. Poslední zobrazuje správný úhel nože. [14,20]



Obr. 12. Schéma vlivu úhlu nože [14]

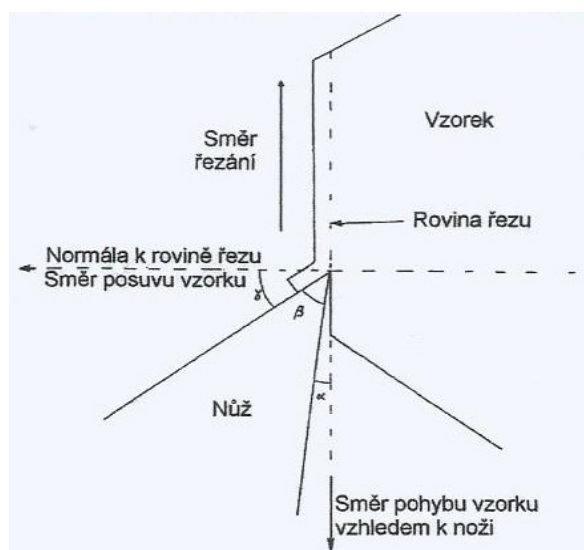
Známky chvění na povrchu vzorku kromě úhlu sklonu nože může vyvolat:

- Tupý nůž - řešením je ostření nože nebo nový nůž
- Vzorek není řádně upevněn
- Materiál je příliš měkký
- Příliš velká plocha povrchu vzorku[14]

3 PŘÍPRAVA TENKÝCH A ULTRATENKÝCH ŘEZŮ

Připravené vzorky se používají k přímému určení, případně zkoumání vnitřní struktury s velkou vypovídací schopností a malým rizikem vzniku artefaktů. Jedná se o metodu, která je vysoce žádaná a často aplikována. Pro světelnou mikroskopii se využívají tenké řezy a pro TEM to jsou pak ultratenké řezy. Princip přípravy jednotlivých řezů je prakticky stejný, avšak co se týče provedení, času a potřebné techniky se značně liší. Tato skutečnost se projeví hlavně na nákladech. Základní technika řezání v oblasti polymerů byla převzata z medicíny, kde se jedná o řezy tkání. Na rozdíl od živých tkání je u polymerů problém s nastavením řezatelnosti. Polymery jsou buď tvrdé, dobře řezatelné nebo měkké, které lze do určité míry ztuhlout.

Pro získání řezu je nezbytná separace tenké vrstvy z povrchu zkoumaného polymeru, přičemž dochází ke vtlačení ostří nože do polymeru. Při řezu dochází k deformaci polymeru, což se projeví určitým porušením. Proto je nutné uvědomit si faktory, které mají vliv na samotný řez: úhel nože β , odklon ostří α , sklon γ , tloušťka řezu, rychlost řezání a průřez vzorku. Schéma geometrie řezu je znázorněno na obr. 13. Úhel nože je nastavitelný a měl by být volen tak, aby poskytl optimální výkon. Mikrotomový nůž může být opatřen zkoseným nožem tzv. fazetou. Při řezání tenkých a ultratenkých řezů nelze zajistit úspěšný řez, protože neexistují základní parametry pro nastavení řezu. Nutnost vyzkoušení pro jednotlivý polymer a použitého zařízení.[9,21]



Obr. 13. Geometrie řezu [9]

3.1 Příprava tenkých vzorků pro světelnou mikroskopii

Mezi typické polymerní materiály, které lze zkoumat ve světelném mikroskopu patří extrudáty, lisované díly, plněné polymery, vlákna a filmy příliš tlusté na to, aby došlo k přenosu světla. Tenké vzorky lze připravit téměř všemi druhy mikrotomů dostupnými na trhu, za předpokladu, že mají pevnou základnu. V některých případech se můžeme ještě setkat s mohutným typem sáňkového mikrotomu, kde se všechna nastavení provádějí ručně a posun bločku je realizován opět ručně. V tomto případě je však zhotovení tenkých řezů velmi obtížné a je nahrazováno použitím především rotačního mikrotomu, který je ovládán motoricky s ručně nastavitelným nožem a vzorkem. Zde získání tenkých řezů není tak obtížné jako u sáňkového mikrotomu. Důležitou roli zde hraje výběr nože a jeho úhel při řezu. Úhel nože by měl být v rozmezí 40 - 45°. Materiál musí být pevně uchycen v držáku, ale bez příliš velkého tlaku z důvodu nerovnoměrné tloušťky uvnitř řezací části. Příprava vzorku pro světelnou mikroskopii zahrnuje dvě fáze. V první fázi dochází k samotnému řezu materiálu s cílem získání tenkého bločku. Druhá fáze spočívá v nanesení získaného bločku na podložní sklo a poté překrytí krycím sklíčkem.[3,9,18,22]

Pokud není možné materiál upnout přímo do držáku, je možné ho zalít do pryskyřice. Takto upravený materiál se může odřezávat ve formě tenkých pásků, které jsou následně přesunuty na podložní sklo.

Druhým způsobem je možnost upnutí pouze části vzorku, která má být řezána. Využívá se zde pryskyřic, jejíž doba vytvrzování se pohybuje kolem dvou až deseti minut. Volná část by neměla být příliš vysoká, tak aby bylo zamezeno ohýbání při řezu. Pomocí pinzety je vzorek umístěn na podložní sklo, které je opatřeno vrstvou kanadského balzámu. Díky pinzetě dochází také ke stlačení vzorku do balzámu a zabraňuje se tak případnému kroucení. Čím je pásek tenčí, tím má větší tendenci ke zkroucení. Poté je pečlivě přiloženo krycí sklíčko a rovněž přitlačováno pinzetou nebo ručně. Připravený preparát se zahřívá na horké desce s teplotou 50 – 60 °C po dobu 5 - 10 minut. Na sestavu je umístěno závaží s plochým dnem, přičemž dochází k vytlačování vzduchových bublinek z kanadského balzámu. Při ochlazení se zahřáté závaží vymění za studené s přibližně stejnými rozměry. Rychlým ochlazením zabráníme smrštění balzámu a tím i vrácení do zkrouceného stavu neboli stavu původního. Připravený preparát lze použít pro mikroskopii, kde můžeme provádět kontrolu a sledovat požadované vlastnosti materiálu. Ukázka takto připraveného vzorku je na Obr. 14. [3]



Obr. 14. Vzorek připravený v kanadském balzámu [3]

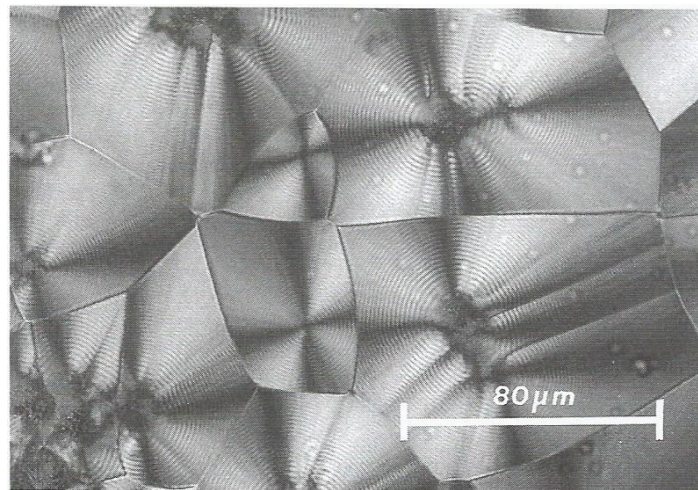
3.1.1 Preparáty pro světelnou mikroskopii

Jako první se provádí mikroskopické ohledání materiálu pomocí stereomikroskopu. Jedná se o levný a snadno dostupný přístroj. Stereomikroskop má boční nebo horní osvětlení, kdy se jedná o odražené světlo. Dochází zde k odhalení předběžných chyb ve vzorku. Díky malému zvětšení lze lehce vybrat správné místo, ze kterého bude vzorek odebrán, protože podává informace o případných závadách materiálu. U transparentních nebo částečně transparentních materiálů je možné sledovat složení vzorku i pod jeho povrchem. Transparentní vzorky obvykle o tloušťce menší než 100 mikrometrů je možné přímo namontovat na podložní sklo s krycím skleněným sklíčkem. Tento způsob může být dostačující při zvětšení, které je menší než 100-násobné. Pokud je požadované zvětšení větší, je nutné použití montážních médií za účelem snížení odrazu od povrchu.

Pro podrobnější hodnocení polymerů ve formě tenkých řezů nebo filmů se používají světelné mikroskopy, které pracují v režimu procházejícího světla. Řez může být uložen na podložním sklíčku volně, ale nejčastěji se provádí uložení řezu v kapce oleje na podložním sklíčku a následné překrytí krycím sklíčkem. Výsledný kontrast je definován rozdílem indexů lomu mezi vzorkem a olejem. Pro polymery je typické použití parafinového oleje s indexem lomu 1,5. Krystalizaci polymerů je možné sledovat tzv. Hot-stage mikroskopií. Jedná se o velmi účinnou a rozšířenou metodu, která slouží pro zkoumání morfologických změn při teplotě tání a dalších přechodových teplot s doplňkovou tepelnou analýzou. Stejnou teplotu jak pod vzorkem, tak nad vzorkem zajišťuje pírka s topnými tělesy.

Při pozorování polymerů v odraženém světle je nutné zvýšení odrazivosti, které se provádí buď vakuovým napařením, nebo katodovým naprášením.[9,18,22]

Preparát pod světelným mikroskopem Obr. 15., kde se jedná o HDPE krystalizovaném při 123 °C.[1]



Obr. 15. HDPE pod světelným mikroskopem [14]

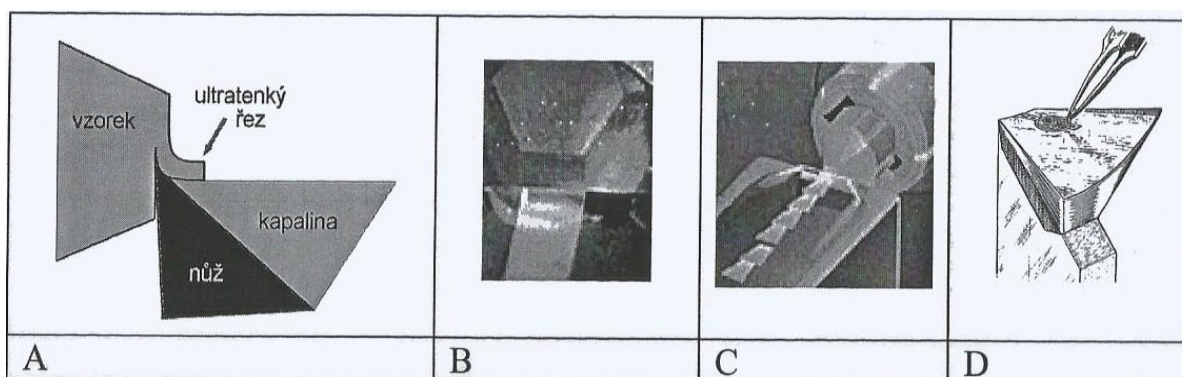
3.2 Příprava ultratenkých řezů pro transmisní elektronovou mikroskopii

K přípravě ultratenkých řezů se používá speciální mikrotom nazývaný ultramikrotom. Na Obr. 16. je uveden ultramikrotom Leica EM UC7, který umožňuje snadnou přípravu ultratenkých částí, ale i průmyslových vzorků pro TEM, SEM, AFM a LM. Lze připravit vzorky s tloušťkou 50 – 100 nanometrů, což zajišťuje dobrou propustnost pro elektrony. Vyžadují výbornou zručnost a zkušenost operátora. Nelze předpokládat, že stačí pouhé pročtení manuálu k přístroji. Na trhu se objevuje velké množství literatury, od základní literatury až po různé návody výrobců. Dokonce existují speciální kurzy, které se zabývají pouze touto problematikou. [9,23,24]



Obr. 16. Ultramikrotom Leica EM UC7 [23]

Existuje celá řada ultramikrotomů, přičemž mezi základní části patří tyč, jejíž konec slouží k upevnění vzorku. Vzorek je posouván kývavým pohybem nahoru a dolů. Využívají se zde nože skleněné nebo diamantové. Řezání pomocí diamantového nože mělo velké uplatnění k získání velmi tenkých řezů pro TEM. Zkušený operátor se setkává s problémem při volbě parametrů řezání, mezi které patří úhel nože, odklon, rychlost řezu a nastavení vodní hladiny. Tyto parametry musí být uzpůsobeny konkrétním vlastnostem daného materiálu. Jedná se o sériové řezy (Obr. 17. A), kdy každý jednotlivý řez posouvá ten předcházející a vzniká tak film tvořený z řezů (Obr. 17. B). Nachází se na hladině kapaliny (Obr. 17. C) a poté se odebírá pomocí mikroskopické síťky (Obr. 17. D). [9,25]



Obr. 17. Schéma řezu (A), vanička s řezem (B), film řezů na hladině (C), mikroskopická síťka s řezy (C) [9]

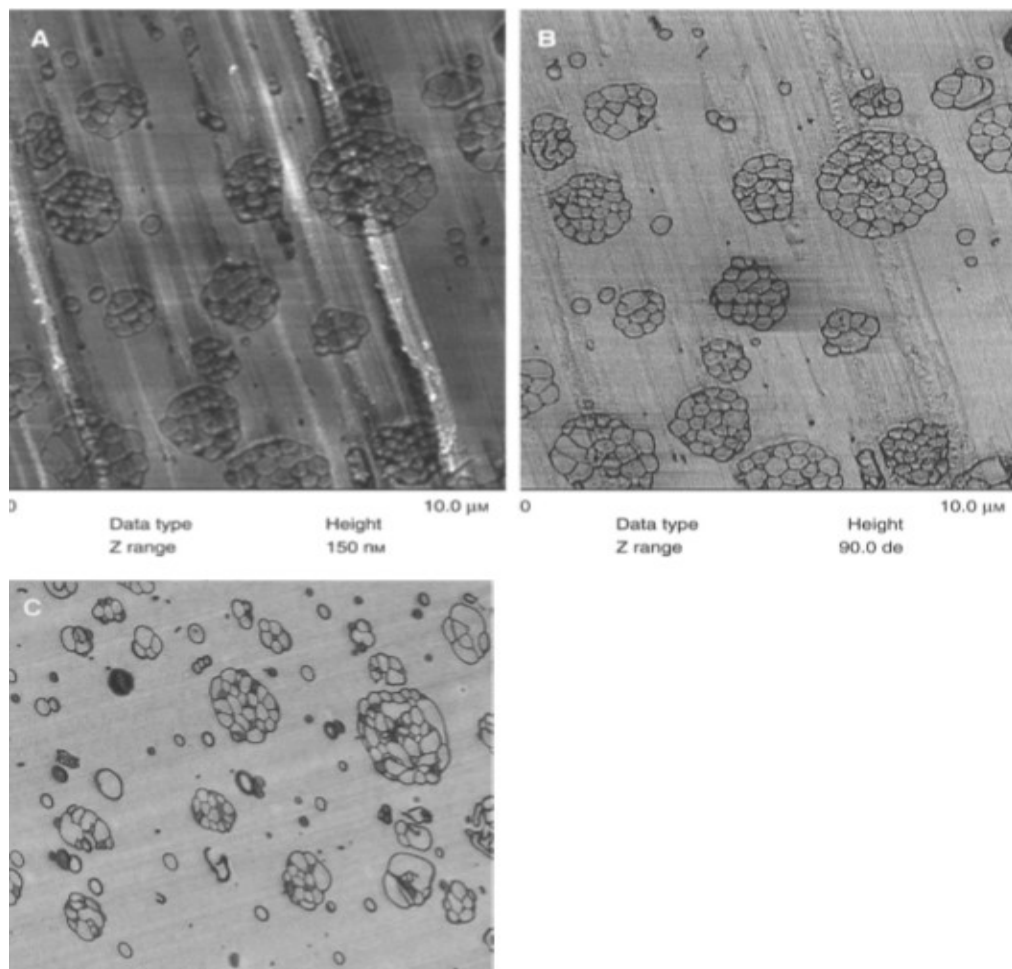
Tloušťku řezů na hladině vody určují interferenční barvy, které by měli být pro každý řez stejné. Nejvhodnější tloušťka se projevuje zlatou či šedivou barvou řezů. Pro získání požadované tloušťky (50 až 100 nanometrů) je nezbytné dodržet maximální rozměr řezané plochy do 0,1 milimetru šíře řezu a délce řezu 0,2 milimetru. Proto je před řezáním nutné dbát na výběr místa, ze kterého se získá konečný řez, jenž se v dalším kroku použije jako vzorek pro hodnocení v mikroskopii. Objevují se různé druhy držáků vzorku, ale velice důležité je místo, kde samotný řez probíhá. Nezbytné je vytvoření pyramidy, která určuje konečné rozměry řezu. Pyramidu lze seřezávat žiletkou, přímo nožem, nebo za použití speciální frézky. Po této úpravě se vzorek upne a provede řez. Pokud je vzorek příliš malý na upnutí do držáku, je nutné ho zalít do příslušného polymerního materiálu. Může se použít libovolný polymerní systém, který je snadno řezatelný např. PMMA. Využívají se zde také pryskyřice určené k tomuto použití, přičemž jejich vlastnosti lze modifikovat dle potřeby. U polymerů se setkáváme s určitým omezením, vyplývajícím z možné fyzikálně chemické interakce složek pryskyřice se zkoumaným vzorkem. Může se zde objevit i botnání, což se projeví určitým ovlivněním pozorované struktury. Většinou však nedochází k ovlivnění botnáním a tak nedojde ke smísení vytvrzené pryskyřice se vzorkem. Polymerní vzorek se do zalévací polymerní pryskyřice zakotví díky nerovnostem na povrchu. Materiály, které jsou měkké při pokojové teplotě, je nutno zalévat do vytvrzovacího média. Pro řezání tohoto vzorku je nutná úprava, která se může provádět dvojím způsobem.

- Chemicky ztužením
- Nastavením teploty řezu

Chemické ztužování se využívá např. při metodě kontrastování. Kde úkolem je dosažení uspokojivého kontrastu pro TEM obraz. Dochází k selektivnímu uložení těžkého prvku

v atomárně dispergované formě. Proto se v praxi musí dodržovat určité bezpečnostní opatření se zacházením chemických látek, jelikož se používají zdraví škodlivé chemikálie. Charakter vzorku určuje postup kontrastování i volbu kontrastovacího média. Čas kontrastování a koncentraci roztoku je nutné prozkoušet, takže je jasná větší spotřeba vzorků nařezaného materiálu. Používá se celá řada kontrastních látek např. OsO_4 , RuO_4 , směsi uranu, wolframu a jiné. [9,18]

Doplňkové zobrazení pomocí TEM a AFM je užitečné pro lepší zobrazení a pochopení morfologické struktury materiálů a to hlavně u směsí a kopolymerů. Srovnání těchto dvou metod je zobrazené na Obr. 18. Povrchové nedokonalosti jsou nejlépe vidět na Obr. 18. (A), menší známky artefaktů lze vidět na Obr. 18. (B). Tyto obrazy jsou získané pomocí metody AFM u polymeru HIPS při použití kryoultramikrotomu při teplotě $-110\text{ }^\circ\text{C}$. Srovnání s obrazem na Obr. 18. (C) získaným metodou TEM, kde byl vzorek získán při pokojové teplotě a následně vystaven parám OsO_4 , ukazuje detailní strukturu HIPS a důkazy určité komprese v řezu.



Obr. 18. Obrazy získané metodou AFM (A,B) a metodou TEM (C) [18]

Teplotu řezu měníme tak, aby byla pod teplotou skelného přechodu vzorku, tudíž je vzorek ve sklovitém stavu. Současně se mění i rozměry ultramikrotomu. Jedná se o speciální zařízení pracující při nízkých teplotách, které se nazývá kryoultramikrotom. Přístroj bývá vybaven chladicí komorou jak nože, tak i vzorku, jednotlivým chlazením pro nůž a vzorek. V dnešní době mají nejmodernější přístroje automatické ovládání teplot přes počítač. Voda zde nemůže být použita jako tekutina ve vaničce, protože by při nízkých teplotách zamrzla. Používají se tedy směsi různých kapalin, které při těchto teplotách nezamrzají. Řezání v rozmezí teplot od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ je poměrně jednoduché, protože řez plove na dané kapalině. Při potřebě nižších teplot, např. $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ musí být použit suchý nůž, přičemž manipulace s ultratenkými řezy a jejich kladení na síťku je velice složité. Kryoultramikrotom musí také omezit nahromadění mrazu, protože ovlivňuje řezání při nízkých teplotách. Pomocí řasy se pak ultratenké řezy odstrkují rovnou na mikroskopickou síťku. Vedle řasy se k tomuto úkonu může použít jemný odmaštěný zvířecí chlup. Při použití této metody dochází ke tření a rozrušení chemických vazeb, což se projeví vzniklým nábojem řezů. Náboj je redukován až úplně eliminován dalším přístrojem, který je znám pod názvem deionizátor.

Deformací, ke které dochází při řezání ultratenkých řezů, se rozumí jejich smrštění ve směru řezu. Ve výsledku má tedy řez menší velikost, než je velikost řezné plochy. Míra smrštění vzorku závisí na podmínkách řezu a také na vlastnostech zkoumaného materiálu. V dnešní době lze tomuto problému zabránit či aspoň snížit pomocí tzv. vibračního nože.

Vibrační nůž osciluje rovnoběžně s rovinou řezu a ke směru řezání kolmo. Kmitočet se pohybuje v řádech několika set kHz. Nůž díky oscilaci výrazně snižuje deformaci při řezu, což se projeví přibližně stejnou velikostí řezu jakou má řezná plocha. Dále dochází k nárůstu modulu pružnosti a tím i ke zvýšené tuhosti vzorku. Jedná se o závislost mechanických vlastností na rychlosti deformace.

Je lehké si všimnout, že příprava ultratenkých řezů je velice namáhavá a těžká činnost, která klade důraz na zručnost a zkušenost operátora s vysokou dávkou času. Dílčí přístroje na přípravu preparátu nepatří mezi levnou záležitost, což se výrazně projeví na nákladech pro přípravu. Nutno dbát na to, že tímto způsobem se získají informace o vzorku jen ve velmi malém rozsahu a k určení celého vzorku je nutné provést další dílčí experimenty.[9,18]

3.2.1 Preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii

S preparátem pro TEM je obtížné manipulovat přímo, proto se používá jemná pinzeta k uchycení. Ultratenký řez, který plave na vodní hladině, se může přenášet pomocí sítky, kde velikost ok se pohybuje v rozmezí desítek mikrometrů. V případě, že částice je menší než velikost oka sítky, jsou položeny na podložní film. Existují filmy kolodiové, formvarové, nebo uhlíkové.

Při požadavku ultratenkého filmu s mikroskopickými otvory tzv. děrovaná blány lze tento film vyrobit vysušením kolodiového nebo formvarového filmu za přítomnosti srážedla. Mimo to se používají i děrované blány, které jsou pokryté uhlíkem, jenž je na blánu napařen. Děrované blány mohou být jak komerční, tak vyrobené v laboratoři. Děrované blány pak nacházejí uplatnění při vystředování mikroskopu nebo korekci stigmatismu. Dále se používá jako podklad na podložení vzorku, což umožní překlenout pásmo velkých děr v síťce. Díky tomu je vzorek pevněji držen a dochází tak ke snížení či eliminaci pohybu vzorku při focení.

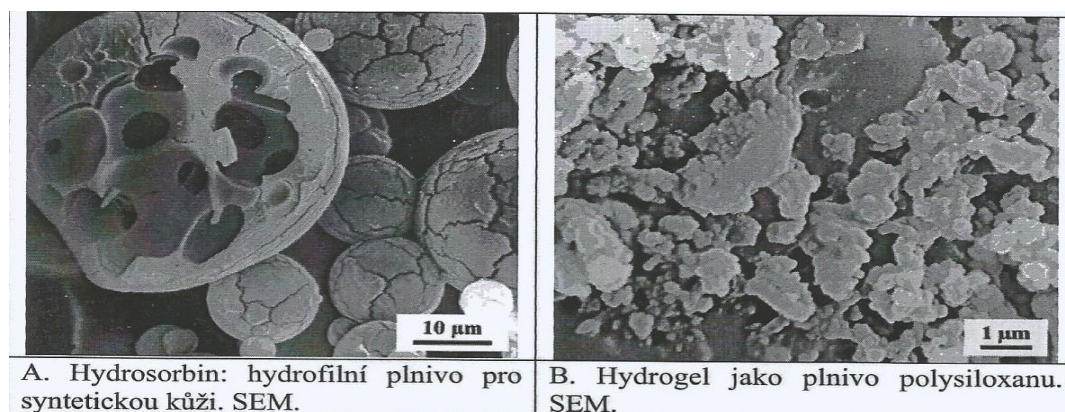
V TEM je nutné rozptýlení malých částic na podložní fólii, případně zabudováním do fólie. Nanesení je možno provádět různými způsoby, přičemž vhodný způsob a koncentraci je nezbytné vyzkoušet. Nejjednodušší způsob spočívá v jednoduchém nanesení kapky disperze na podložní fólii. Problém může nastat při splavení nosné blány ze sítky či vznik agregátů za současného vysychání kapky. Spolehlivý způsob nanesení disperze je díky tzv. mikrofixírky, kdy se jedná o velmi jemný rozprašovač. Rozprašování má za důsledek, že nedochází ke slučování částic disperze na okrajích při vysychání kapek. Po úplném vysušení lze zvýšit kontrast pro mikroskopování pomocí těžkého kovu stínováním. [9,22]

Mikroskopie slouží ke zjištění morfologie daného polymeru, přičemž se jedná o studium struktury, tvaru, formy. Ke studiu morfologie polymerů se používají i jiné způsoby, mezi které patří např. difrakce záření X (širokoúhlá WAXS a maloúhlová SAXS) nebo diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) [9]

4 MIKROTOMOVÉ ŘEZY

4.1 Řez plněných plastů

Plnivo způsobuje změny ve fyzikálních a chemických vlastnostech výsledného plastu, protože látka na makromolekulární úrovni vykonává funkci pojiva a zároveň určuje základní vlastnosti. Jako přísadu lze použít plnivo, stabilizátor, mazivo, barvivo, změkčovadlo, iniciátor, tvrdidlo atd. Nejčastějším důvodem vytváření plněných polymerů je snížení ceny materiálu, nikoliv jeho vyztužení. Modul pružnosti stoupá s přidáním tuhé, anorganické látky, což se ve výsledku projeví zvýšenou tuhostí materiálu. Plnivo nemusí být pouze anorganická látka, ale lehčí a pevnější plnivo může být např. mletý grafit, který má za účel zvýšení elektrické vodivosti. Některé polymerní plniva se využívají díky své speciální funkci, přičemž částice plniva u plněného polymeru se v průběhu přípravy nemění. Úkolem těchto plniv může být, aby polymerní matrice byly v konečné aplikaci rozpustné ve vodě či vodní páře, které jsou při normálních podmínkách v těchto látkách nerozpustné. Do neprodyšné matrice z PVC se přidává částicové plnivo, což se výsledku projeví vytvořením tzv. umělé kůže nebo se vytvoří permeabilní film pro vodu se silikonovou maticí nepropustnou pro vodu. Oba tyto případy příklady jsou zobrazeny na Obr. 19. [26,27]



Obr. 19. Polymerní plniva do polymerní matrice [27]

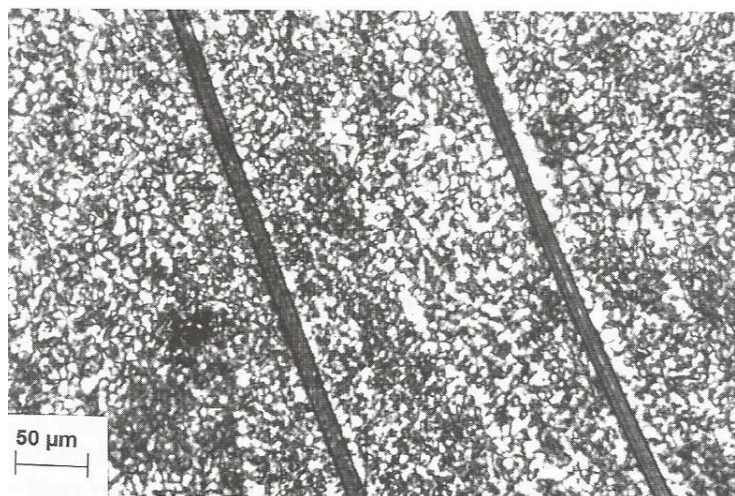
Na pevnostní vlastnosti materiálu působí přítomnost plniva většinou negativně. Je to způsobené nízkou adhezí mezi maticí a plnivem, protože při deformaci dochází k lomu na rozhraní těchto fází. Ke zlepšení vlastností lze povrch plniva opracovat, čímž se docílí tenké vrstvy, která slouží jako kompatibilizátor.

Při výběru plniva je nutno dbát na jeho funkci v materiálu, dostupnosti a v neposlední řadě na jeho ceně. Mezi hlavní vlastnosti u plněných polymerů anorganickou směsí je zřetelně

lepší objemová stálost, což se projeví zachováním velikosti a tvaru po vytvarování ve formě. Snížení hořlavosti taky patří k využívaným funkcím, což znamená volbu správného plniva, které se při zvýšené teplotě rozkládá, a vzniklé produkty eliminují nebo inhibují hoření.[27]

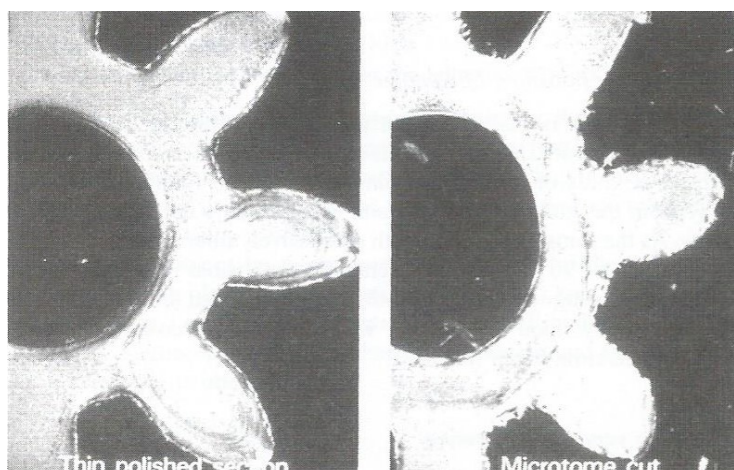
4.2 Řez kompozitů

Kompozity nejsou lehce zpracovatelné pomocí mikrotomu, a proto si zaslouží zvláštní pozornost. Pro kompozity vyztužené skleněnými vlákny nebo vlákny uhlíkovými je doporučován pilový mikrotom nebo za použití diamantové drátu. Ve většině případů je požadována tloušťka řezu od 10 do 20 mikrometrů. Nicméně vysoké kvality, která je požadována se dosáhne jen zřídka, což je způsobené přetržením vláken v průběhu řezu vzorku. Z těchto důvodů je nezbytné použití technik broušení a leštění. Pro snadnější manipulaci je vzorek zaléván do epoxidové pryskyřice. Vzorek je nejprve stlačen do PE formy s kyanoakrylátovým lepidlem a poté se zalije epoxidovou pryskyřicí. Po 8 hodinách sušení je vzorek míchán a leštěn pomocí standartních technik. Ukázka kompozitu pod mikroskopem je znázorněna v Obr. 20.



Obr. 20. Nylon 6,6 – kevlarový kompozit [14]

Ovšem nezbytné je upozornit, že přílišné leštění vede k rychlejšímu odstranění měkkého matricového materiálu, než u tvrdšího vláknitého vyztužení. Použitím diamantové pasty na leštění se dosáhne ostrého přechodu na hranici skleněných vláken, protože pasta přednostně odstraňuje matici. Obsah a orientaci skelných vláken lze snadno zjistit pomocí světelné mikroskopie. Na Obr. 21. lze vidět rozdíl mezi leštěným profilem a profilem získaný pomocí mikrotomu, kdy leštěný profil nevykazuje žádné protahování či poškození na rozdíl od mikrotomu.[14]



Obr. 21. Tenký leštěný vzorek, Mikrotomový řez [14]

4.3 Řez měkkého a tvrdého plastu

Kvalita vyrobeného filmu se značně liší v závislosti na použitém polymeru. Pro mikrotom je obtížné řezání jak měkkého plastu, tak i tvrdého. Měkké polymery mohou během řezání mikrotomem podléhat deformaci a mimo to je možný i vznik artefaktů. U tvrdých a křehkých polymeru může docházet k tomu, že mikrotomový nůž během řezu prokluzuje. Určitých výhod při řezání tvrdých materiálů lze dosáhnout jejich měkčením vhodným rozpouštědlem, čímž se získá kratší doba řezu a zároveň i rovnoměrnějšího dělení materiálu. Také bylo zjištěno, že některé tvrdé polymery, které bobtnají rozpouštědlem, mohou vykazovat lepší výsledky z hlediska kvality povrchu.

Mezi artefakty způsobené řezem na mikrotomu lze zařadit:

- Rovnoběžné pruhy se směrem řezu v důsledku poškození řezného nože
- Vlnky tvořené bočním stlačením vzorku, kde příčinou je tupé ostří
- Znamky chvění způsobené příliš velkým sklonem nože
- Tlakové stopy způsobené působením pinzety při přesunu vzorku

Úhel ostří mezi rovinou řezu a horní stranou nože je dalším důležitým faktorem, který je typický pro každý jednotlivý vzorek a liší se tak jeden vzorek od vzorku druhého. Úhel musí být volen tak, aby nedošlo k žádné deformaci vzorku. Velký úhel se volí pro tvrdé a široké vzorky. Je-li však až příliš velký, mohou se na povrchu objevovat nežádoucí škrábance.

Alternativou i z hlediska ceny je přístroj, který umožňuje získat tenké řezy tvrdých polymerů s vysokou molekulovou hmotností nebo silně krouticích elastomerů. Vzorky musí být nejdříve přilepené na podložní sklíčko, které je pak připevněné na horní desku přístroje.

Tato deska je upevněna na třech kuličkových ložiskách, které jsou umístěné ve tvaru trojúhelníku. Horní deska se ručně otáčí kolem spodní desky tzv. osmičkovým pohybem. Spodní deska má nastavitelnou výšku a je zde také umístěn diamantový řezný kotouč. Kuličková ložiska zajišťují, že řezy jsou rovnoběžné a materiál je velice snadno odstraňován. Vysoce reprodukovatelné, paralelní tenké řezy lze připravovat s minimálními zkušenostmi.

Mikro-hoblík se používá na přípravu vzorku pro infračervenou nebo mikroskopickou analýzu. Tento přístroj dokáže vytvořit rovnoměrnou tloušťku řezu v intervalu 5 – 20 mikrometrů z povrchu téměř jakéhokoliv polymeru. Objevují se zde dva druhy ostří. V prvním případě je ostří z karbidové oceli, což slouží k získání tenkých vrstev téměř všech polymerů. Ve druhém případě je čepel vyrobená z diamantu a používá se pro krájení tvrdých polymerů.[14]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo podat ucelený přehled v oblasti přípravy mikrotomových řezů polymerních materiálů se zaměřením na správnou volbu mikrotomu, mikrotomového nože a nastavení řezného úhlu nože pro různé druhy polymerů.

V první části práce se pojednává o tom, co to mikrotom je a k čemu se nejvíce používá. Jsou zde popsány základní části přístroje a samotný princip fungování. Výhodou je, že tímto způsobem lze získat široký interval hodnot pro tloušťku vzorku a to od desítek mikrometrů až stovek nanometrů. Dále je zde stručně popsán vývoj mikrotomu s následným výkladem různých typů mikrotomů, přičemž každý typ je specifický pro danou aplikaci.

Následně jsou popsány jednotlivé typy mikrotomových nožů. Volba správného nože je velice důležitá, protože na něm závisí kvalita výsledného řezu. Pod pojmem kvalitní řez se rozumí řez bez jakýchkoliv nežádoucích artefaktů. Na trhu jsou čtyři základní druhy mikrotomových nožů dle jejich profilu: klínovitý, plankonkávní, bikonkávní a dlátovitý. Nože mohou být vyrobené téměř ze všeho, avšak největší využití nachází nože vyrobené z oceli. Pro získání ultratenkých řezů se nejvíce využívají nože diamantové díky své tvrdosti, což se však projeví na výsledné ceně. Proto, aby nedošlo ke vzniku artefaktů, musí být zvolen správný úhel nože, který nemůže být příliš malý, ani příliš strmý.

Třetí část práce se zabývá přípravou tenkých a ultratenkých řezů. Tyto řezy se používají ke zkoumání morfologické struktury polymerů. Princip získání řezů je stejný, avšak problematičtější je příprava ultratenkých řezů, což se projeví na provozních nákladech. Světelnou mikroskopií lze zkoumat extrudáty, lisované díly, plněné polymery, vlákna a filmy. Manipulace spočívá v jednoduchém nanesení řezu na podložní sklo a následným překrytím krycím sklíčkem. Příprava vzorku u TEM je složitá, a proto vyžaduje větší zkušenost operátora.

Poslední kapitola pojednává o samotných řezech z plněného, měkkého či tvrdého polymeru.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] F. Mohammed, F. Mohammed, T.F. Arishiya, A Review and Proposed classification, 2012, Vol. 19, pp. 43–50
- [2] L. Guryča, Konstrukce nože k přípravě polymerních vzorků pro účely optické mikroskopie, bakalářská práce, UTB ve Zlíně, Zlín, 2005
- [3] E. Böhme, Failure Analysis Using Microscopic Techniques, Dupont Engineering Polymers, Switzerland, 1990
- [4] G.M. Smith, Transactions of the American Microscopical Society, 1915, Vol. 34, pp. 71–129
- [5] H. B. Fitch, Microtomes , Eucom Medical Bulletin, Frankfurt
- [6] Science Museum Group, Early microtome, England, Collection online, dostupné z <https://collection.sciencemuseum.org.uk/objects/co8040> [cit. 23.04.2018]
- [7] M. Szöke, Zpracování bioptického vzorku zmrazovací technikou, bakalářská práce, ZČU v Plzni, Plzeň, 2016
- [8] Sliding Microtome, Leica SM2010R, Brochure, 2017
- [9] F. Lednický, Mikroskopie a morfologie polymerů, Liberec: Technická univerzita, 2009, ISBN 978-80-7372-486-3
- [10] A. Teclová, Imunohistochemická diagnostika nemalobuněčných karcinomů plic v bronchiální mikroexcizi, bakalářská práce, MU v Brně, Brno, 2014
- [11] Rotary Microtome, Leica RM2255, Instruction Manual, 2009
- [12] Rotary Microtome, Leica RM2155, Instruction Manual, 2000
- [13] Leitz Rotary Microtome 1512, User Manual, 1981
- [14] J. Scheirs, Compositional and Failure Analysis of polymers: A Practical Approach, NY: Wiley, 2000, ISBN 0-471-62572-8
- [15] Agar Scientific [online] dostupné z <http://www.agarscientific.com/microtome-knives.html> [cit. 23.04.2018]
- [16] University of Delaware [online] dostupné z <http://www1.udel.edu/biology/Wags/b617/micro/micro.htm> [cit. 2.05.2018]
- [17] D. Studer, H. Gnaegi, Minimal Compression of Ultrathin Sections with Use of an Oscillating Diamond Knife, Journal Microscopy, 2000, Vol. 197, pp. 94–100

- [18] L.C. Sawyer, D.T. Grubb, Polymer microscopy, NY: Chapman and Hall, 1987, ISBN 978-0412257100
- [19] K.Faris, Microtome Knife Profile, Presentation, 2014,
dostupné z <http://www.slideshare.net/farisk2/microtome-knife-profile>
- [20] C. Scouten, Knife Angle in Microtomy, Leica Microsystems, 2011
- [21] G. Rolls, Microtomy and Paraffin Section Preparation, Leica Microsystems, 2010
- [22] L. Ropek, Moderní metody hodnocení polymerů, bakalářská práce, VUT v Brně, Brno, 2012
- [23] Ultramicrotome, Leica EM UC7, Brochure, 2016
- [24] B.S.B. Newman, E. Borysko, M. Swerdlow, Ultra-Microtomy by a New Method, 1949, Vol. 43, pp. 183–199.
- [25] S.D. Trayner, Improvement of Microtome Cutting Process of Carbon Nanotube Composite Sample Preparation for TEM Analysis, 2014
- [26] P. Stuchlík, Polymery jako konstrukční materiály, bakalářská práce, UTB ve Zlíně, Zlín, 2011
- [27] F. Lednický, Mikroskopie a morfologie polymerů, Liberec: Technická univerzita, 2009, ISBN 978-80-7372-487-0

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABS	Akrylonitrilbutadienstyren
ASA	Akrylonitril-styren-akrylát
AFM	Mikroskopie atomárních sil
DSC	Dynamická skenovací kalorimetrie
HDPE	Vysokohustotní polyethylen
HIPS	Houževnatý polystyren
LM	Světelná mikroskopie
PA	Polyamid
PE	Polyethylen
PMMA	Polymethylmethakrylát
POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PPS	Polyfenylsulfid
PVC	Polyvinylchlorid
PS	Polystyren
SAN	Styren-akrylonitril
SAXS	Maloúhlová difrakce rentgenového záření
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
WAXS	Širokoúhlová difrakce rentgenového záření
°C	Stupeň celsia

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Schéma mikrotomu společnosti Cummings [4].....	10
Obr. 2. Mikrotom Andrew Pritcharda [6].....	11
Obr. 3. Sáňkový mikrotom Leica SM2010R [8]	13
Obr. 4. Rotační mikrotom Leica RM2255 [11]	13
Obr. 5. Ocelový nůž [14]	15
Obr. 6. Výroba skleněných nožů [16].....	17
Obr. 7. Ultratenké úseky řezané diamantovým nožem s úhlem nože 35° (A) a úseky získané oscilujícím diamantovým nožem (B) [18].....	18
Obr. 8. Klínovitý nůž [19]	19
Obr. 9. Plankonkávní nůž [19].....	19
Obr. 10. Bikonkávní nůž [19]	20
Obr. 11. Dlátovitý nůž [19].....	20
Obr. 12. Schéma vlivu úhlu nože [15]	23
Obr. 13. Geometrie řezu [9].....	24
Obr. 14. Vzorek připravený v kanadském balzámu [3].....	26
Obr. 15. HDPE pod světelným mikroskopem [15].....	27
Obr. 16. Ultramikrotom Leica EM UC7 [23]	28
Obr. 17. Schéma řezu (A), vanička s řezem (B), film řezů na hladině (C), mikroskopická síťka s řezy (C) [9].....	29
Obr. 18. Obrazy získané metodou AFM (A,B) a metodou TEM (C) [18]	30
Obr. 19. Polymerní plniva do polymerní matrice [27]	33
Obr. 20. Nylon 6,6 – kevlarový kompozit [15]	34
Obr. 21. Tenký leštěný vzorek, Mikrotomový řez [15]	35

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Doporučené úhly nožů pro běžné polymery [15]	15
--	----