

Universität Osnabrück, Institut für Umweltsystemforschung

# **Parametrisierung eines eindimensionalen Modells zur Selbstdiffusion von Polymeren**

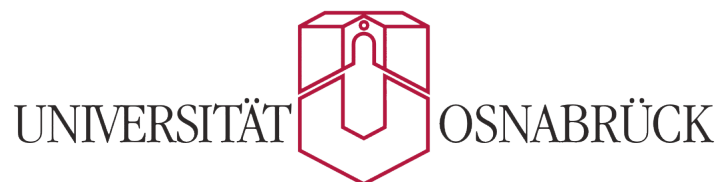
**Bachelorarbeit im Rahmen des Studiengangs  
B.Sc. Angewandte Systemwissenschaft**

Etienne Ott

8. August 2013

Etienne Ott  
Mtr.-Nr.: 942046  
Sommersemester 2013

Erstprüfender: Prof. Dr. Martin Steinhart - Institut für Chemie neuer Materialien  
Zweitprüfender: Prof. Dr. Horst Malchow - Institut für Umweltsystemforschung  
Betreuer: Sachar Ichilmann, M.Sc. - Institut für Chemie neuer Materialien





# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Problemstellung</b>	<b>2</b>
<b>2 Stand der Forschung</b>	<b>4</b>
2.1 Diffusion . . . . .	4
2.2 Fluorescence Recovery After Photobleaching . . . . .	4
2.3 Selbstgeordnete nanoporöse Aluminiumoxidmembranen . . . . .	4
2.4 Intensitätsprofil von Laserstrahlen . . . . .	4
<b>3 Methoden</b>	<b>6</b>
3.1 Fluoreszenz . . . . .	6
3.2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop . . . . .	6
3.3 FRAP . . . . .	8
3.3.1 Farbstoff . . . . .	8
3.3.2 Bleichungsreaktion . . . . .	8
3.3.3 Messungen mit FRAP . . . . .	8
3.4 Materialien . . . . .	9
3.4.1 Natives Polybutadien . . . . .	9
3.4.2 Farbstoffmarkiertes Polybutadien . . . . .	9
3.4.3 Rhodamin-6G . . . . .	10
3.4.4 Aluminiumoxid-Membran . . . . .	11
3.5 Experimente . . . . .	11
3.5.1 Herstellung der Proben . . . . .	11
3.5.2 Experimentablauf . . . . .	13
<b>4 Modellierung</b>	<b>14</b>
4.1 Anfangsbedingung . . . . .	14
4.1.1 Lichtintensität . . . . .	14
4.1.2 Bleichung . . . . .	15
4.2 Lösung der Diffusionsgleichung . . . . .	16
4.3 Numerische Berechnung . . . . .	17
<b>5 Auswertung</b>	<b>20</b>
5.1 Analyse der Daten . . . . .	20
5.2 Parametersuche . . . . .	21
5.2.1 Korrelation . . . . .	22
<b>6 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
6.1 Messdaten . . . . .	24
6.2 Parametrisierung des Modells . . . . .	25
6.3 Fehleranalyse . . . . .	26
6.4 Fazit und Ausblick . . . . .	27
<b>7 Anhang</b>	<b>28</b>



# 1 Problemstellung

Für die Arbeit mit Polymeren im chemisch-biologischem Bereich ist es notwendig den Diffusionskoeffizienten zu kennen, der angibt wie schnell sich Konzentrationsunterschiede durch Diffusion ausgleichen. Der Mechanismus von Selbstdiffusion, die Diffusion von Molekülen innerhalb einer Menge von gleichartigen Molekülen, ist hinreichend bekannt und in der Literatur beschrieben (siehe 2.1). Die zu untersuchenden Polymere können mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden, um die Konzentration der markierten Moleküle unter Laserlicht sichtbar zu machen.

Die Diffusion von Polymeren ist insbesondere daher interessant, da diese in einer Vielzahl von chemischen und biologischen Zusammenhängen auftreten und auch in der technischen Entwicklung von Medikamenten eine wichtige Rolle spielen.

*Fluorescence Recovery After Photobleaching* (siehe 3.3), oder FRAP, ist eine Methode die Diffusionsdynamik und typische Kenngrößen der Diffusion für bestimmte Substanzen zu bestimmen. Dabei wird die Diffusion in Volumensystemen, z.B. in chemischen oder biologischen Proben, betrachtet und der Diffusionskoeffizient anhand der Messungen bestimmt. Es liegt nahe die Diffusion auf eine Dimension zu beschränken, um die Berechnung zu vereinfachen. Dies ist beispielsweise möglich, indem nanoporöses Aluminiumoxid verwendet wird, womit nur Diffusion in eine Richtung durch die Membran hindurch zugelassen wird. In der vorliegenden Arbeit werden dazu solche Membranen benutzt um Diffusion mittels FRAP zu untersuchen, was bisher in der Literatur noch nicht unternommen wurde.

Die Beschreibung des Systems geschieht anhand eines eindimensionalen Modells. Dieses Modell basiert auf bekannten Diffusionsgesetzen und berücksichtigt die experimentellen Methoden und Gegebenheiten der FRAP-Methode. Anhand der Messdaten der Experimente kann das Modell parametrisiert werden. Diejenigen Parameter mit der höchsten Korrelation mit den Messdaten beschreiben damit näherungsweise die physikalischen Größen des betrachteten Systems, u.A. der Diffusionskoeffizient.



## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Diffusion

Die Differentialgleichungen, die häufig benutzt werden um den diffusiven Transport von Stoffen zu modellieren, gehen auf die Arbeit von A. Fick [6] zurück. Fick betrachtete den Massenfluss von einzelnen Partikeln in und aus einem Probevolumen und leitete damit Gleichungen für die Diffusion her.

Um Differentialgleichungen analytisch zu lösen, werden häufig Fundamentallösungen eingesetzt.[7] Diese werden mit der Anfangsbedingung gefaltet, um die analytische Lösung zu erhalten. Für eindimensionale Diffusion wird die Fundamentallösung auch Diffusionspropagator oder Hitzekern genannt, da die Gleichung zum konduktiven Transport von Wärme identisch zur Diffusion ist.[8, 9]

### 2.2 Fluorescence Recovery After Photobleaching

Die experimentelle Methode *Fluorescence Recovery after Photobleaching* wurde 1976 erstmals von Axelrod et al. [10] beschrieben und ist seitdem ein häufig eingesetztes Mittel zur Bestimmung des Diffusionsverhaltens von Substanzen in chemischen und biologischen Proben. Die mathematische Beschreibung wurde u.A. von Soumpasis[11] und Wolf[12] näher untersucht. Zusätzlich existieren zahlreiche Publikationen über die allgemeine Beschreibung und den experimentellen Ablauf von FRAP-Messungen[13, 14] und Publikationen zu spezifischen Experimentdesigns oder Proben, wie z.B. von Bräckmans[15, 19], Cheng[16], Wong[17] und Lopez[18] beschrieben.

### 2.3 Selbstgeordnete nanoporöse Aluminiumoxidmembranen

Masuda et al.[5] beschreiben in ihrer Publikation die Herstellung von AAO-Membranen (*Anodisches Aluminiumoxid*) mittels elektrolytischer Oxidation von reinem Aluminium. Poinern et al.[4] gehen in einem neueren Übersichtsartikel auf die Fortschritte in der Steuerung der Selbstordnungsmechanismen ein. Die Membranen bestehen aus  $Al_2O_3$ , welches bei der verwendeten Porengröße im sichtbaren Spektrum durchsichtig ist. Eine solche Membran enthält Felder parallel angeordneter, zylindrischer Poren, die lokal hexagonale Domänen bilden. Die Poren weisen eine enge Verteilung im Durchmesser auf und besitzen eine einheitliche Tiefe.

### 2.4 Intensitätsprofil von Laserstrahlen

Die mathematische Formulierung der tatsächlichen Ort-Intensität-Funktion von Laserstrahlen geschieht auf Basis verschiedener Modi[1, 2] von Gaußstrahlen. Die Intensität eines Gaußstrahls fällt orthogonal zur Ausbreitungsachse in Form einer Gaußfunktion ab. Da alle Laser in der Praxis Teil einer optischen Anlage sind, muss ebenso die Fokussierung der Laserstrahlen berücksichtigt werden. Self[3] beschreibt die Fokussierung von Laserstrahlen.





## 3 Methoden

### 3.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz beschreibt ein Phänomen, bei dem photoaktive Moleküle durch eingestrahktes Licht angeregt werden und die so absorbierte Energie bei Rückkehr in den Grundzustand emittieren. Ein Teil der absorbierten Energie geht dabei in Wärme über, weswegen das emittierte Photon immer eine höhere Wellenlänge als das absorbierte Photon besitzt.

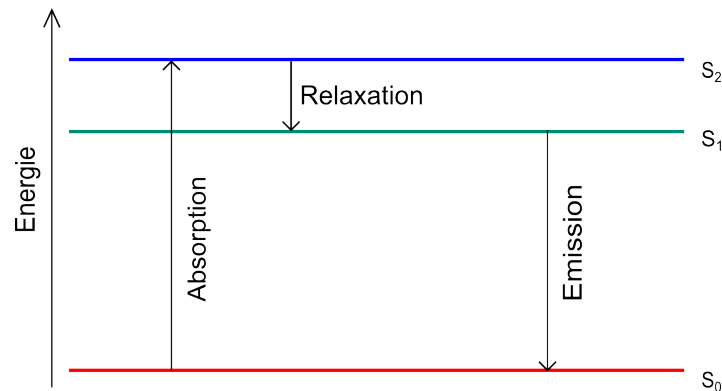


Abbildung 3.1: Jablonski-Diagramm von Fluoreszenz

Abbildung 3.1 veranschaulicht die Energielevel beim Prozess der Fluoreszenz. Die Absorption des eingestrahkten Lichts hebt die freien Molekülelektronen von ihrem Grundzustand  $S_0$  auf den angeregten Zustand  $S_2$  an. Nach Relaxation in Form von Molekülrotation oder Gitterschwingungen befindet sich das Elektron in dem niedriger gelegenen Zustand  $S_1$  und emittiert schließlich ein Photon beim Übergang in den Grundzustand  $S_0$ .

Fluoreszierende Moleküle oder funktionelle Gruppen<sup>1</sup> werden auch Fluorophore genannt. Bekannt ist Fluoreszenz durch Fluorophore, die Licht im Ultraviolett-Bereich absorbieren und im sichtbaren Bereich emittieren, wodurch sie im Dunkeln leuchten, wenn sie mit UV-Licht bestrahlt werden.

### 3.2 Konfokales Laser Scanning Mikroskop

Die Fluoreszenz von Molekülen kann in einem CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*[21]) genutzt werden, um eine Probe schichtweise in einer gewünschten Tiefe zu scannen. Durch die Änderung der Wellenlänge bei Fluoreszenz kann das emittierte Licht von dem eingestrahkten Licht getrennt und so Störungen in der Messung vermieden werden. Ein CLSM nutzt die Eigenschaft der Konfokalität<sup>2</sup> um nur Licht aus der betrachteten Tiefenebene in den Detektor zu lassen.

<sup>1</sup>Eine funktionelle Gruppe ist eine Atom- oder Molekülgruppe, die an Moleküle gebunden sein kann und dessen chemische und physikalische Eigenschaften wesentlich beeinflusst, z.B. die Hydroxygruppe an Alkoholen und Zuckern.

<sup>2</sup>Bedeutet: Die Foki zweier optischer Elemente stimmen überein.

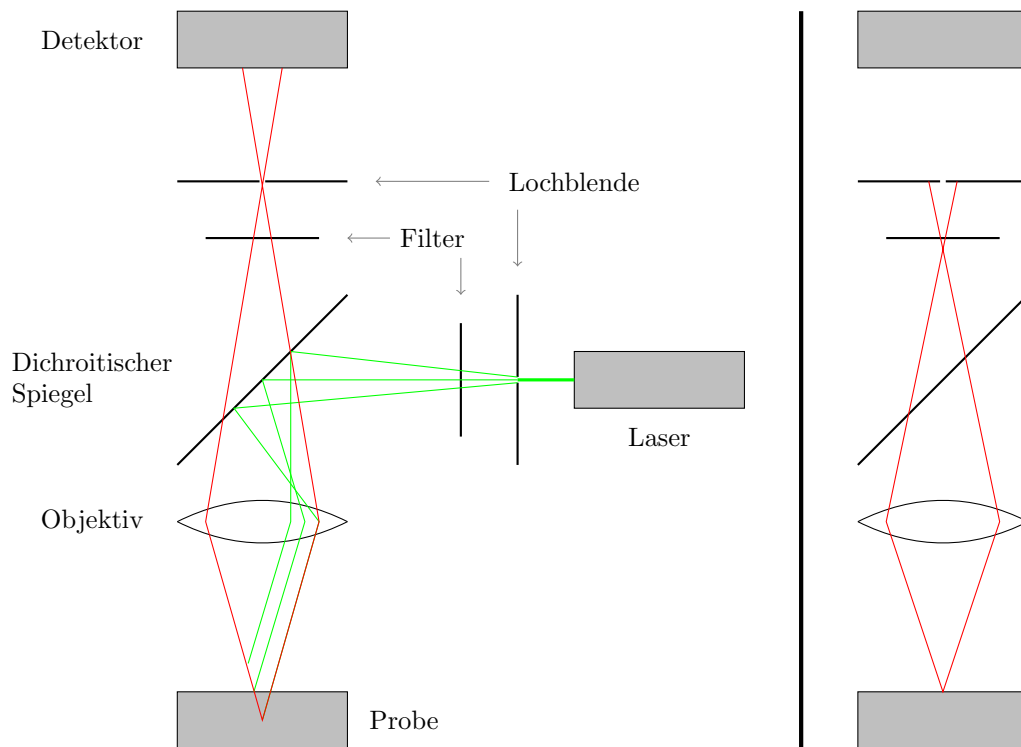


Abbildung 3.2: Prinzipieller Aufbau eines *Confocal Laser Scanning Microscope*  
Entnommen aus [20] und [21]

Abbildung 3.2 zeigt den wesentlichen Aufbau<sup>3</sup> eines CLSM. Ein dichroitischer Spiegel ist ein optisches Element, das nur Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert, während Licht anderer Wellenlängen passieren kann. Der Spiegel ist so eingestellt, dass er das einfallende Laserlicht reflektiert und höhere Wellenlängen passieren lässt. Die beiden eingezeichneten Filter sind ebenso auf die verwendeten Wellenlängen eingestimmt und blockieren alle anderen Wellenlängen.

Auf der linken Seite ist der Strahlverlauf eingezeichnet, der einem Fokus in der Mitte der Probe entspricht. Zu sehen ist, wie der einfallende, grün eingezeichnete Laserstrahl von dem dichroitischen Spiegel reflektiert wird und in das Objektiv fällt. Der Laserstrahl ist durch die erste Lochblende bereits in ein divergierendes Profil gebeugt worden. Dadurch fallen die nicht-parallelen Komponenten des Strahls in unterschiedlichen Winkeln in das Objektiv ein und werden durch dieses so gebeugt, dass sie mehrere Ebenen der Probe beleuchten. Die fluoreszierenden Moleküle in der Probe absorbieren das einfallende Licht und emittieren das rot eingezeichnete Fluoreszenzlicht.

Das Fluoreszenzlicht der Probe wird wiederum durch das Objektiv gebeugt und trifft auf die obere Lochblende. Nur das Licht aus einer Ebene, die im unteren Fokus des Objektivs liegt, gelangt vollständig durch die obere Lochblende, da der obere Fokus des Objektivs genau in der Öffnung der Lochblende liegt. Im rechten Teil der Abbildung ist gezeigt, wie Licht aus einer Ebene, die nicht im Fokus des Objektivs liegt, kaum durch die obere Lochblende gelangt, da der Fokus bereits unterhalb liegt.

Das Scannen der Probe in der x-y-Ebene geschieht meistens durch zwei weitere Schwenkspiegel, die hier nicht eingezeichnet sind. Die Tiefe des Fokus wird durch Verschieben der Probe auf der z-Achse mittels Piezo-Elektronik oder Feinmotorik eingestellt. Dazu wird meist eine Probendicke von 50-500 $\mu\text{m}$  gewählt.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroskop<sup>4</sup> ist ein CLSM, das im Wesentlichen dem hier beschriebenen Aufbau entspricht. Es wurden zwei Laser mit den Wellenlängen 405nm und 515nm verwendet; die Emissionsfilter entsprechend 445nm und 550nm. Das Objektiv ist ein Öl-Immersionsobjektiv

<sup>3</sup>Nicht maßstabsgetreu.

<sup>4</sup>Das Mikroskop 'Fluoview' am Institut für Biophysik an der Universität Osnabrück. Die Anlage basiert auf dem Modell 'LSM FV1000' von Olympus. Eine genaue Beschreibung der Anlage ist auf der Internetpräsenz des Instituts für Biophysik zu finden. [22]

mit 60-facher Vergrößerung.

### 3.3 FRAP

FRAP beschreibt eine Methode zum Messen des Diffusionsverhalten von farbstoffmarkierten Proben, wobei ein Bereich der Probe mit einem Lichtpuls gebleicht und die Diffusion von dem ungebleichten in den gebleichten Bereich gemessen wird. Zunächst wird die Probe mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzt. Da die Messung der Konzentration über die Fluoreszenz geschieht, wird mit FRAP das Diffusionsverhalten des Farbstoffs gemessen. Um Substanzen zu untersuchen, die selbst nicht fluoreszieren, müssen diese mit einem geeigneten Farbstoff kovalent markiert werden.

Nach dem Einrichten des Mikroskops wird die Probe mit einem starken Lichtpuls bestrahlt, wodurch in dem betroffenen Bereich der Farbstoff durch eine photolytische Reaktion gebleicht wird. Nach dem Lichtpuls wird die Konzentration des Farbstoffs an der gebleichten Stellen als Funktion der Zeit gemessen, während dieser aus dem Bereich höherer Konzentration in den Bereich hinein diffundiert.

Üblicherweise wird für die FRAP-Methode ein CLSM verwendet, da diese für den Experimentablauf gut geeignet sind. Andere Typen sind etwa Zwei-Photon-CLSM oder Weißlicht-basierte Mikroskope.

#### 3.3.1 Farbstoff

Ein geeigneter Farbstoff darf das Diffusionsverhalten des zu untersuchenden Moleküls nicht beeinflussen. Dies kann unter Anderem dadurch verursacht werden, dass der Farbstoff die Molmasse des Moleküls signifikant erhöht. Zudem können polare funktionelle Gruppen oder solche mit starken Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu Clusterbildung der Moleküle führen. Diese Einflüsse müssen vermieden werden, da sonst fälschlicherweise der Diffusionskoeffizient der farbstoffmarkierten Moleküle gemessen wird, dieser aber nicht mit dem der unmarkierten Moleküle übereinstimmt.

Der Farbstoff muss kovalent an das Molekül gebunden sein. Effektiv verändert dies das Molekül, was den Diffusionskoeffizienten verändert. Unter den oben genannten Bedingungen ist aber davon auszugehen, dass diese Änderungen geringfügig ausfallen.

Für die Messung der Konzentration des Farbstoffs ist es wichtig, dass das gemessene Signal der Fluoreszenz linear proportional zur Konzentration des Farbstoffs ist. Daher ist es auch notwendig, dass die Probe nicht mit dem Farbstoff übersättigt ist.

#### 3.3.2 Bleichungsreaktion

Ein Fluorophor muss bestimmte Eigenschaften aufweisen damit dieses für FRAP geeignet ist. Eine Eigenschaft ist, dass eine irreversible Photolyse-Reaktion erster Ordnung existiert, die das Fluorophor von der aktiven in eine inaktive Form umwandelt. Die inaktive Form darf keine Fluoreszenz aufweisen, die die Messung der aktiven Form beeinflussen könnte. Es ist notwendig, dass die Reaktion irreversibel ist und der Kinetik erster Ordnung folgt, da die Berechnungen zur Bleichung dies voraussetzen.

Eine notwendige Annahme hierbei ist, dass die Bleichung deutlich schneller als die Diffusion abläuft, damit in dem Zeitraum der Bleichung kein nennenswerter Konzentrationsausgleich geschieht.

#### 3.3.3 Messungen mit FRAP

Der Ablauf einer FRAP-Messung teilt sich in zwei Phasen:

1. Bleichen des ausgewählten Bereichs
2. Messen der Fluoreszenz im gebleichten Bereich während des Zeitraums des Konzentrationsausgleichs

**Bleichung** Zunächst wird ein möglichst homogener Bereich der Probe ausgewählt, der gebleicht werden soll. Üblicherweise liegt der Bereich an der Oberfläche der Probe, bis hin zu einer Tiefe von mehreren Hundert Mikrometern. Die Transparenz der Probe spielt dabei eine entscheidende Rolle. Geht beim

Durchdringen der Probe zu viel Licht verloren, oder wird dieses zu sehr gestreut, ist die Probe nicht für FRAP geeignet.

Die Wahl der Lichtquelle hängt von dem Absorptionsmuster des verwendeten Farbstoffs ab. Häufig werden Laser oder Quecksilberlampen mit entsprechenden Filtern verwendet. Das eingestrahlte Licht muss näherungsweise dem Absorptionsmaximum des Farbstoffs entsprechen, damit das Fluoreszenzlicht deutlich wird und störendes Streulicht minimiert wird.

Die Bleichung geschieht durch Einstrahlen des Lichts in den ausgewählten Bereich der Probe. Die Geometrie des gebleichten Bereichs ist dabei auch von der verwendeten Lichtquelle abhängig. Neben Kreis- und Zylinderformen werden häufig *Gaußkegel* verwendet (siehe Abschnitt 2.4). Die Leistung der Lichtquelle und die Belichtungszeit sind idealerweise so zu wählen, dass in dem Bereich die Farbstoffkonzentration nicht auf Null sinkt. Ist der Bereich dagegen nicht stark genug gebleicht, ist das Verhältnis von Signal zu Rauschen zu klein. Zudem ist eine kurze Belichtungszeit nötig, um zu verhindern, dass bereits während des Bleichens ein Konzentrationsausgleich stattfindet.

**Messung** Unmittelbar nach Ende der Bleichung beginnt die Messung der Fluoreszenz als Funktion der Zeit. Ein geeigneter Versuchsaufbau macht es möglich dieselbe Lichtquelle zur Bleichung und zur Messung zu verwenden. Dabei wird die Intensität des eingestrahnten Lichts zum Beispiel mit einem Neutralfilter<sup>5</sup> um mindestens drei Größenordnungen reduziert. Dies soll verhindern, dass das eingestrahlte Licht zur Messung den Farbstoff weiter bleicht.

Moderne CLSM erlauben eine Messung in jedem Punkt der x-z-Ebene<sup>6</sup>. Alternativ dazu reicht es die Gesamtintensität über die z-Achse zu messen. Für die spätere Berechnung der Regeneration werden die Messdaten aufsummiert.

## 3.4 Materialien

### 3.4.1 Natives Polybutadien

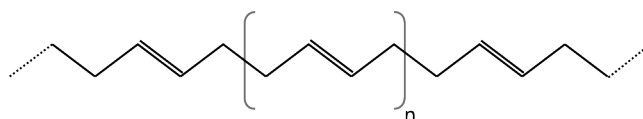


Abbildung 3.3: Ausschnitt eines trans-1,4-Polybutadien Moleküls

In Abbildung 3.3 ist ein Ausschnitt eines Polybutadien-Moleküls dargestellt, wobei die Wiederholungseinheit des Polymers in Klammern gekennzeichnet ist. Das verwendete Polybutadien lag in reiner, nicht vernetzter Form zweier Sorten vor, die für die Herstellung der Proben (siehe 3.5.1) benutzt wurden. Tabelle 3.1 gibt die Stoffgrößen<sup>7</sup> beider Sorten an.

Sorte	$M_p$	$M_w$	$M_n$	PDI
1	34700	34400	33500	1.03
2	4630	4600	4470	1.03

Tabelle 3.1: Stoffgrößen des verwendeten Polybutadiens

### 3.4.2 Farbstoffmarkiertes Polybutadien

Das Polybutadien zur Verwendung in den Experimenten wurde mit einem Perylen-Derivat kovalent markiert. Perylen-Derivate sind Moleküle, die durch die Addition von funktionellen Gruppen an das Perylen-Molekül gebildet werden. Der Farbstoff ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die rot gekennzeichnete

<sup>5</sup>Ein Neutralfilter reduziert die Intensität von Licht für alle Wellenlängen um das gleiche Maß.

<sup>6</sup>Die Ebene orthogonal zur Membranebene x-y. Die Ausbreitungsachse des Lichtstrahls befindet sich in der x-z-Ebene. Da der Aufbau üblicherweise radialsymmetrisch ist, sind alle x-z-Ebenen gleich zu behandeln.

<sup>7</sup>PDI: Polydispersitätsindex

Gruppe ist die Bindungsstelle, an die das Polybutadien-Molekül gebunden ist. Die Perylen-Grundstruktur ist blau markiert.

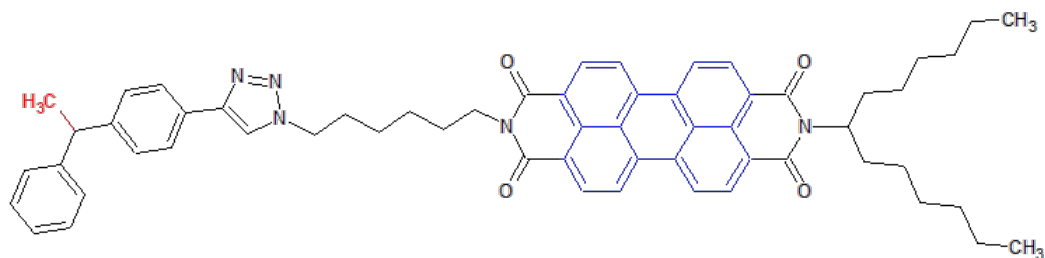


Abbildung 3.4: Perylen-Derivat

Das Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs ist unbekannt. In den Experimenten wurde eine Laserwellenlänge von  $405\text{nm}$  verwendet, da diese das stärkste Signal aufwies. Tabelle 3.2 listet die Stoffgrößen des Polybutadiens auf, an die der Farbstoff gebunden wurde.

Sorte	$M_p$	$M_w$	$M_n$	PDI
3	37600	37400	36400	1.03

Tabelle 3.2: Stoffgrößen des farbstoffmarkierten Polybutadiens

### 3.4.3 Rhodamin-6G

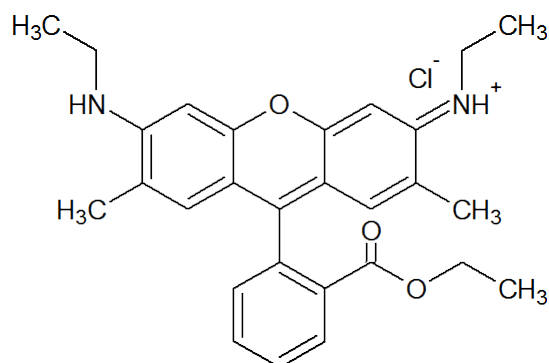


Abbildung 3.5: Struktur von Rhodamin-6G

Abbildung 3.5 zeigt die Struktur eines Rhodamin-6G Moleküls. Das verwendete Rhodamin-6G lag in einer  $10\mu\text{M}$  Ethanollösung<sup>8</sup> vor und wurde aus dem Handel bezogen. Die Abbildungen 7.1 und 7.2 im Anhang zeigen die Absorptions- und Emissionsspektren von Rhodamin-6G. Die Peaks entsprechen  $530\text{nm}$  und  $552\text{nm}$ .

Bei der Herstellung der Proben (siehe 3.5.1) wurde das Rhodamin-6G dabei nicht an das Polybutadien gebunden, sondern in Mischung gegeben.

<sup>8</sup>Labortypisches Ethanol von 96% Reinheit.

### 3.4.4 Aluminiumoxid-Membran

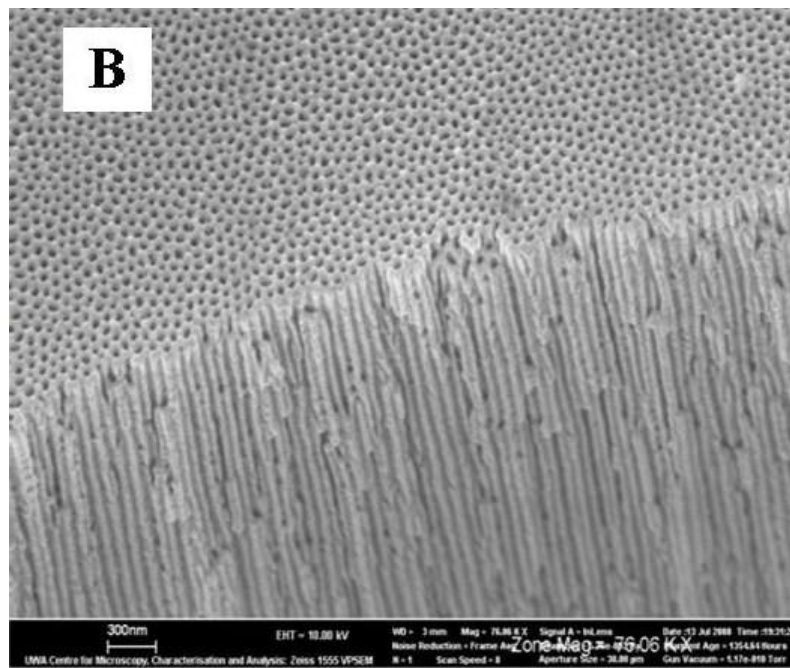


Abbildung 3.6: Darstellung einer AAO-Membran

*Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development*  
*G. Poinern & N. Ali & D. Fawcett, Materials V4 No3, 2011*

Abbildung 3.6 zeigt die Darstellung einer AAO-Membran. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Membranen sind einseitig offen und am Boden geschlossen. Die Membrandicke beträgt  $60\mu\text{m}$  und der Porendurchmesser  $60\text{nm}$ . Die Membranen wurden nach der Zwei-Stufen-Methode von Masuda et al. [5] hergestellt. Dabei waren die Membranen zunächst noch mit der Aluminium-Anode verknüpft. Das restliche Aluminium wurde entfernt, sodass nur die Membran mit geschlossenem Boden verblieb.

## 3.5 Experimente

Es wurden Experimente anhand zwei verschiedener Experimentdesigns durchgeführt. In der ersten Experimentserie wurde die Diffusion des Farbstoffs Rhodamin-6G in Polybutadien untersucht. In der Zweiten wurde die Selbstdiffusion des Polymers mittels den farbstoffmarkierten Proben untersucht. Da die Proben nicht mit Farbstoff übersättigt sein dürfen, wurden Proben unterschiedlicher Konzentration hergestellt.

Name	Polymerprobe	Laserwellenlänge	Filterwellenlänge	Farbstoff
Experiment 1	Probe 1	515nm	550nm	Rhodamin-6G
Experiment 2	Probe 4	405nm	445nm	Perylen-Derivat

Tabelle 3.3: Experimentserien

### 3.5.1 Herstellung der Proben

**Farbstoffmarkierte Polybutadien-Proben** Die Polymer-Proben für die zweite Experimentserie wurden hergestellt, indem das farbstoffmarkierte Polybutadien mit nativem Polybutadien der Sorte 2 (siehe 3.4.1) verdünnt wurde, um eine geeignetere Konzentration zu erreichen. Dafür wurde etwas des farbstoffmarkierten Polymers abgewogen und anschließend mit der gewünschten Menge nativem Polybutadien in ein

Schüttelglas gegeben. Anschließend wurde eine hinreichende Menge Toluol zugegeben, um das Polymer vollständig zu lösen. Die Proben wurden geschüttelt, bis keine sichtbaren Reste des Polymers vorhanden waren. Schließlich wurde das Toluol unter kontrollierten Bedingungen bei Raumtemperatur abgedampft.

Tabelle 3.4 listet die hergestellten Proben auf. Die Massenkonzentration des farbstoffmarkierten Polybutadiens ist relativ zur Masse des reinen Polymers angegeben. Die molare Konzentration ist damit nahezu identisch, da der Farbstoff eine vielfach kleine molekulare Masse als das Polybutadien aufweist und daher die molekulare Masse des farbstoffmarkierten Polybutadiens kaum verändert. Die absolute Konzentration wurde nicht erhoben, da die Konzentration der ursprünglichen Probe des Perylenderivats unbekannt ist.

	Verwendete Polymersorte	Konzentration (relativ)
Probe 3	Sorte 1	1:8
Probe 4	Sorte 1	1:29

Tabelle 3.4: Hergestellte Polymer-Proben für Experiment 2

**Rhodamin-6G in Polybutadien** Die Polymer-Proben der ersten Experimentserie wurden ähnlich wie die des Perylenderivats hergestellt. Das Rhodamin-6G lag in einer Ethanolösung vor. Da Polybutadien nicht in Ethanol löslich ist, wurde ebenso Toluol zugegeben. Tabelle 3.5 listet die hergestellten Proben auf. Die Angabe bezieht sich auf die molare Konzentration des Rhodamin-6G in der Polymerprobe nach dem Abdampfen.

	Verwendete Polymersorte	Konzentration (molar)
Probe 1	Sorte 2	$3.7 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$
Probe 2	Sorte 2	$30 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}}$

Tabelle 3.5: Hergestellte Proben für Experiment 1

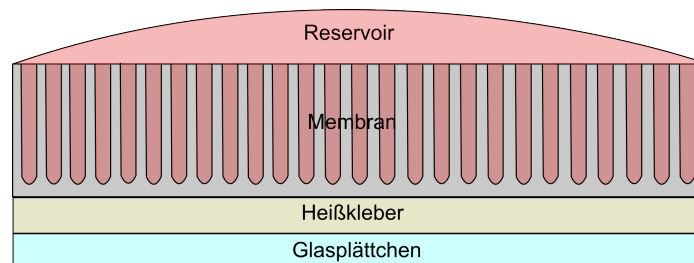


Abbildung 3.7: Aufbau der Probe für Experiment 1

**Fixierung und Infiltration der Membran** Abbildung 3.7 zeigt den Aufbau der Probe, die in Experiment 1 verwendet wurde. Die Membran wurde zunächst mit Heißkleber auf einem Glasplättchen fixiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Rhodamin-6G/Polybutadien-Mischung auf die Membran gegeben. Die Infiltration der Membran geschah für einige Minuten bei Raumtemperatur.

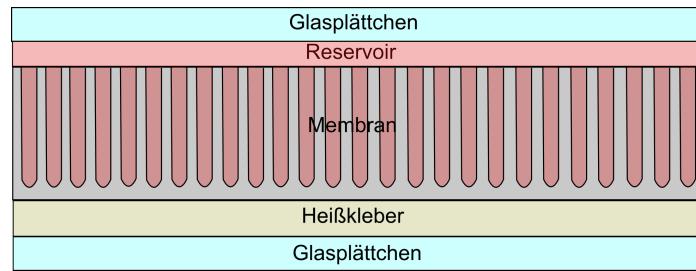


Abbildung 3.8: Aufbau der Probe für Experiment 2

Abbildung 3.8 zeigt den Aufbau der Probe, die in Experiment 2 verwendet wurde. Diese wurde zunächst wie oben beschrieben hergestellt. Die Infiltration geschah für ca. 15s auf einem Heizfeld bei einer Temperatur von 120-130°C. Im Anschluss wurde ein zweites Glasplättchen auf das Reservoir gelegt und außerhalb des Messbereichs mit Heißkleber fixiert.

### 3.5.2 Experimentablauf

Der Experimentablauf wurde anhand der in der Literatur beschriebenen Experimentdesigns durchgeführt und an die Gegebenheiten des Mikroskops angepasst. Insbesondere macht die Software des Mikroskops es notwendig die vergangene Zeit zwischen Ende der Bleichung und Beginn der Messung zu ermitteln, da diese Verzögerung später beim Berechnen der Modelldaten berücksichtigt werden muss.

1. Einrichten der Instrumente
2. Positionierung der Probe
3. Referenzmessung
4. Beginn der Bleichung
5. Ende der Bleichung nach 30-35s
6. Rekonfiguration der Instrumente und Messung der Verzögerung von Ende der Bleichung bis Beginn der Messung
7. Beginn der Messung mit abgeschwächtem Laser
8. Kontinuierliche Messung in regelmäßigen Intervallen von 1-2s
9. Ende Messung nach 750-1500s



## 4 Modellierung

Nach Fick[6] lässt sich Diffusion in der Form einer partiellen Differentialgleichung als Summe einer Quellfunktion und der örtlichen Ableitung des Massenflusses beschreiben:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = f[C(x, t)] - \frac{\partial}{\partial x} J_C(x, t)$$

In dem hier betrachteten System existiert keine Quellfunktion, da die Bleichung irreversibel ist. Im Folgenden ist daher  $f = 0$ . Das erste Fick'sche Gesetz besagt, dass der Massenfluss einer Probeffläche proportional zum Konzentrationsgradienten ist.

$$J_C(x, t) = D_x \cdot \nabla C(x, t)$$

In einer Dimension reduziert sich der Gradient zur ersten räumlichen Ableitung der Konzentration, wodurch sich die Differentialgleichung auf das Produkt der zweiten räumlichen Ableitung und einem Faktor  $D_x$  reduziert. Der Proportionalitätsfaktor  $D_x$  wird auch Diffusionskoeffizient genannt. Im Folgenden wird der Ort mit  $z$  bezeichnet.

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} = D_z \frac{\partial^2}{\partial z^2} C(z, t) \quad (4.1)$$

### 4.1 Anfangsbedingung

Für die analytische Lösung der Differentialgleichung 4.1 ist es notwendig eine Anfangsbedingung zu kennen. Da unser Modell die Regeneration<sup>1</sup> des Farbstoffs beschreibt, muss die Anfangsbedingung die Verteilung des Farbstoffs unmittelbar nach der Bleichung beschreiben. Diese leitet sich aus der Reaktionskinetik der Bleichungsreaktion und der Lichtintensität des Lasers her.

#### 4.1.1 Lichtintensität

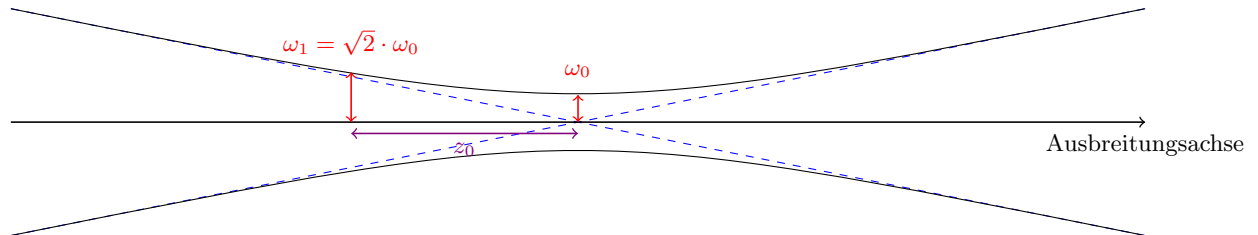


Abbildung 4.1: Profil eines Gauß-Strahls in einer Ebene entlang der Ausbreitungsachse

Abbildung 4.1 zeigt das Profil eines Laserstrahl entlang der Ausbreitungsrichtung, beschrieben als Gauß-Strahl. Die äußeren Grenzlinien kennzeichnen den Abstand, in dem die Intensität auf  $\frac{1}{e^2}$  des Werts entlang der Ausbreitungsachse abgefallen ist. Eingezeichnet sind die beiden Kenngrößen  $\omega_0$  und  $z_0$ . Dabei ist  $\omega_0$  die Strahltaile, also der minimale Strahlradius im Fokus.  $z_0$  bezeichnet den Radius der sogenannten Rayleighzone, innerhalb der sich der Strahlradius nur wenig ändert. Für die Beziehung zwischen  $\omega_0$  und  $z_0$  gilt:

<sup>1</sup>Die Gesamtmenge des Farbstoffs in der gesamten Probe regeneriert nicht. Gemeint ist der Konzentrationsausgleich im gebleichten Bereich nach der Bleichung.

$$z_0 = \frac{\pi n \omega_0^2}{\lambda}$$

$\lambda$ : Wellenlänge des Lasers,  $n$ : Brechungsindex des Mediums

Für die Intensität des Strahls am Punkt  $z$  im Abstand  $\rho$  von der Ausbreitungsachse gilt:

$$I(\rho, z) = I_0 \cdot \left( \frac{\omega_0}{\omega(z)} \right)^2 \cdot e^{-2\left(\frac{\rho}{\omega(z)}\right)^2}$$

$$\text{mit } I_0 = \frac{2P}{\pi \omega_0^2} \text{ und } \omega(z) = \sqrt{\omega_0^2 \cdot \left(1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2\right)}.$$

$P$  ist die Gesamtleistung des Laserstrahls. Im Folgenden betrachten wir die Intensität entlang der Ausbreitungsachse. Mit  $\rho = 0$  reduziert sich die Gleichung auf:

$$I(0, z) = I_0 \cdot \left( \frac{\omega_0}{\sqrt{\omega_0^2 \left(1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2\right)}} \right)^2 \cdot e^0$$

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \quad (4.2)$$

Gleichung 4.2 beschreibt nun die Lichtintensität entlang der Strahlachse als Funktion des Abstands  $z$  vom Fokus. Abbildung 4.2 zeigt die Intensität als Funktion des Orts  $z$  für Werte von  $I_0 = 1$  und  $z_0 = 5 \mu m$ .<sup>2</sup>

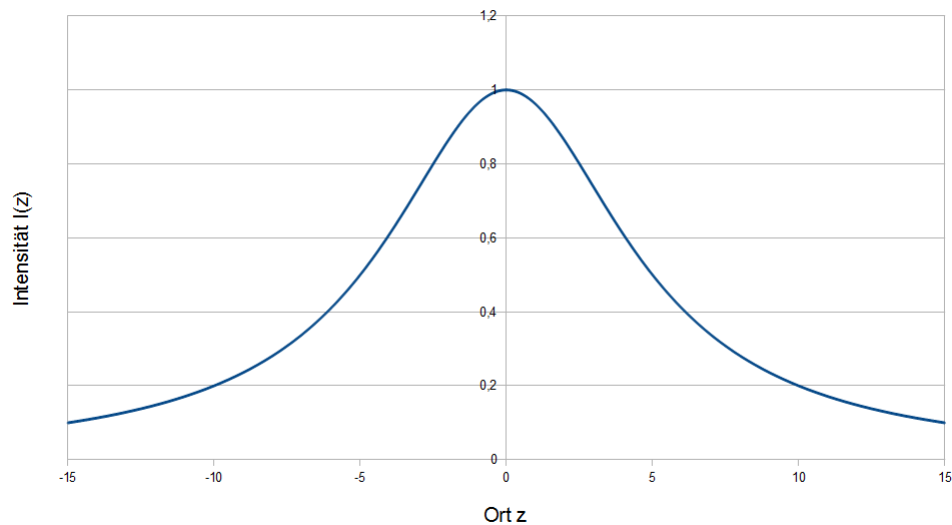


Abbildung 4.2: Intensität  $I(z)$  entlang der Strahlachse

### 4.1.2 Bleichung

Wie in 3.3.2 erläutert, lässt sich die Bleichung als Reaktion 1. Ordnung beschreiben:

$$\frac{dC(z, t)}{dt} = -\alpha I(z) \cdot C(z, t)$$

$\alpha$ : Bleichrate,  $I(z)$ : Lichtintensität aus Gleichung 4.2

<sup>2</sup>Diese Werte sind beliebig und dienen nur zur Veranschaulichung.

Wir berechnen nun, wie stark die Konzentration  $C(z, t)$  des Farbstoffs durch die Bleichung sinkt. Dabei beginnt der Laserpuls bei konstanter Gesamtleistung zum Zeitpunkt  $t = -T$  und dauert bis zum Zeitpunkt  $t = 0$  an. Zu Beginn der Bleichung herrscht überall die Konzentration  $C_0$ . Wir berechnen mittels *Trennen der Variablen*:

$$\frac{dC(z, t)}{C(z, t)} = -\alpha I(z) dt$$

$$\int_{C_0}^{C(z, 0)} \frac{1}{C^*} dC^* = \int_{-T}^0 -\alpha I(z) dt$$

$C(z, 0)$  ist die von uns gesuchte Funktion, die die Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  beschreibt und für die weitere Rechnungen die Anfangsbedingung darstellt.

$$[\ln(C^*)]_{C_0}^{C(z, 0)} = [-\alpha I(z)t]_{-T}^0$$

$$\ln(C(z, 0)) - \ln(C_0) = -\alpha T I(z)$$

$$\ln(C(z, 0)) = \ln(C_0) - \alpha T I(z)$$

$$C(z, 0) = e^{\ln(C_0) - \alpha T I(z)}$$

$$C(z, 0) = e^{\ln(C_0)} \cdot e^{-\alpha T I(z)}$$

$$C(z, 0) = C_0 \cdot e^{-\alpha T I(z)} \quad (4.3)$$

Gleichung 4.3 ist das Resultat und beschreibt die Anfangsbedingung der Konzentration für  $t = 0$ .

## 4.2 Lösung der Diffusionsgleichung

Die Fundamentallösung für Gleichung 4.1 ist:

$$H(z, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot \exp\left(\frac{-z^2}{4Dt}\right)$$

Gegeben sind nun die Anfangsbedingung und die allgemeine Lösung der Diffusionsgleichung im Zeitraum der Regeneration. Um die spezielle Lösung der Diffusionsgleichung zu finden, muss der die Fundamentallösung mit der Anfangsbedingung gefaltet werden:

$$C(z, t) = C(z, 0) \otimes H(z, t)$$

$$C(z, t) = \int_{\mathbb{R}} H(z - \tau, t) \cdot C(\tau, 0) d\tau$$

Da die AAO-Membran einseitig geschlossen ist, muss zusätzlich eine Randbedingung eingeführt werden. An der Unterseite der Poren kann der Farbstoff nur nach oben hin diffundieren. Daher muss der Massenfluss an der Unterseite gleich Null sein. Dies wird durch die Neumann-Randbedingung dargestellt. Das ist möglich, da die Funktion der Startbedingung als gerade Funktion auf ganz  $\mathbb{R}$  fortgesetzt werden kann. (siehe [7])

$$C(z, t) = \int_0^\infty (H(z - \tau, t) + H(z + \tau, t)) \cdot C(\tau, 0) d\tau$$

Die Anfangsbedingung hat den Nullpunkt im Fokus des Laserstrahls, was nun jedoch nicht mehr mit dem Nullpunkt der Fundamentallösung übereinstimmt, da wir durch die Neumann-Randbedingung den

Nullpunkt an die Unterseite der Membran gesetzt haben. Daher muss die Funktion der Anfangsbedingung verschoben werden, was im Folgenden durch den Parameter  $z_M$  abgebildet wird.

$$C(z, t) = \int_0^\infty (H(z - \tau, t) + H(z + \tau, t)) \cdot C(\tau - z_M, 0) d\tau$$

Nach Einsetzen der Terme für die Anfangsbedingung und der Fundamentallösung ergibt sich schließlich:

$$C(z, t) = \int_0^\infty \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \left( \exp\left(\frac{-(z - \tau)^2}{4Dt}\right) + \exp\left(\frac{-(z + \tau)^2}{4Dt}\right) \right) \cdot C_0 e^{-\alpha TI(\tau - z_M)} d\tau$$

$$C(z, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot \int_0^\infty \left( \exp\left(\frac{-(z - \tau)^2}{4Dt}\right) + \exp\left(\frac{-(z + \tau)^2}{4Dt}\right) \right) \cdot e^{-\alpha TI(\tau - z_M)} d\tau$$

Mittels Gleichung 4.2 kann die Intensität weiter aufgelöst werden:

$$I(\tau) = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{\tau}{z_0}\right)^2}$$

$$C(z, t) = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot \int_0^\infty \left( \exp\left(\frac{-(z - \tau)^2}{4Dt}\right) - \exp\left(\frac{-(z + \tau)^2}{4Dt}\right) \right) \cdot \exp\left(\frac{K}{1 + \left(\frac{\tau - z_M}{z_0}\right)^2}\right) d\tau \quad (4.4)$$

mit  $K = \alpha TI_0$

Es ergibt sich schließlich Gleichung 4.4. Diese Gleichung beschreibt die Konzentration entlang der Strahlachse am Ort  $z$  zum Zeitpunkt  $t$  während der Regeneration.  $K$  wurde als neuer Parameter eingeführt und vereint das Produkt der drei Parameter  $\alpha$ ,  $I_0$  und  $T$ . Dies hat den Vorteil, dass weder  $\alpha$  noch  $I_0$  bestimmt werden müssen.  $K$  beschreibt damit wie stark der Farbstoff gebleicht wird. Da die Bleichung als Reaktion erster Ordnung geschieht und daher dem exponentiellen Zerfall folgt, lässt sich  $K$  damit über das Signal unmittelbar vor und nach der Bleichung abschätzen.

$$K \approx -\ln\left(\frac{C(0)}{C(-T)}\right)$$

Die Gleichung 4.4 besitzt Singularitäten für  $t = 0$ . Bei Betrachtung der Funktionswerte in der Umgebung von  $C(z, 0)$  fällt auf, dass sich die Funktion stetig mit  $C(z, 0) = 0$  fortsetzen lässt. Es handelt sich also um hebbare Singularitäten.<sup>3</sup> Bei der numerischen Berechnung kann dies entsprechend berücksichtigt werden.

### 4.3 Numerische Berechnung

$$T(z, t, \tau) = \left( \exp\left(\frac{-(z - \tau)^2}{4Dt}\right) - \exp\left(\frac{-(z + \tau)^2}{4Dt}\right) \right) \cdot \exp\left(\frac{K}{1 + \left(\frac{\tau}{z_0}\right)^2}\right)$$

Die innere Funktion  $T$  der Gleichung 4.4 kann numerisch einfach berechnet werden. Wir verwenden dazu das Verfahren *Proceeding to the Limit* (siehe [23] Seite 90).

$$\int_0^\infty T(z, t, \tau) \approx \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} (T(z, t, (n-1)\Delta\tau) + T(z, t, n\Delta\tau))$$

$$\frac{1}{2} (T(z, t, (n-1)\Delta\tau) + T(z, t, n\Delta\tau)) < \epsilon \quad \forall n > N$$

Dabei wird die Funktion in Intervalle der Breite  $\Delta\tau$  aufgeteilt und diese Intervalle mittels der Trapezregel aufsummiert. Statt einer festen Obergrenze wird das Integral solange ausgewertet, bis die Intervallsummen kleiner als ein beliebiges  $\epsilon$  werden. Dieses Verfahren ist für Funktionen ausgelegt, die monoton

<sup>3</sup>Ein formaler Beweis ist an dieser Stelle nicht angegeben.

fallend sind und gegen Null konvergieren. Die innere Funktion  $T$  ist nicht monoton fallend, sondern steigt zunächst auf ein Maximum an, das von den Werten für  $D$  und  $t$  abhängt. Das Verfahren kann dennoch angewandt werden, wenn zusätzlich eine Grenze  $L$  eingeführt wird, unter der das Integral stets ausgewertet wird und erst oberhalb von  $L$  die Evaluierung anhand von  $\epsilon$  stattfindet. Eine numerische Berechnung des Maximums zeigt, dass  $L = 100$  ausreichend ist, um die Funktion mit Werten von  $D \cdot t < 10^{20} \mu m^2$  zu integrieren.

Dieses Verfahren kann nun algorithmisch umgesetzt werden. Algorithmus 1 zeigt wie die Funktion  $C(z, t)$  in der vorliegenden Arbeit berechnet wurde. Dabei ist davon auszugehen, dass die Variablen und Konstanten in einem geeigneten Scope<sup>4</sup> deklariert und gespeichert werden.

```

koeffizient = C0/sqrt(4*pi*D*t);
gesamtSummeTau = 0;
tau = 0;
alterWert = 0;
neuerWert = 0;
summeTau = epsilon+1;
while summeTau > epsilon  $\vee$  tau < L do
    tau += deltaTau;
    neuerWert = innereFunktion(z, t, tau);
    summeTau = deltaTau*0.5*(alterWert+neuerWert);
    gesamtSummeTau += summeTau;
    alterWert = neuerWert;
end
datenPunkt = new DataPoint(z, t, gesamtSummeTau*koeffizient);

```

**Algorithmus 1:** Berechnung eines Datenpunkts von  $C(z, t)$

Die innere Funktion  $T$  wird dabei berechnet durch den Algorithmus 2.

```

innereFunktion(z,t,tau)
return (exp(-(z-tau)*(z-tau)/(4*D*t)) + exp(-(z+tau)*(z+tau)/(4*D*t))) *
exp(K/(1+((tau-zM)*(tau-zM)/(z0*z0))));

```

**Algorithmus 2:** Innere Funktion des Integrals

Für die spätere Auswertung ist es sinnvoll die Datenpunkte für einen Zeitpunkt  $t$  zusammenzufassen, da die Auflösung nach der Tiefe  $z$  hier nicht behandelt wird. Dazu werden die Werte über die berechnete Tiefe mittels der Trapezregel integriert. Algorithmus 3 zeigt wie die Werte von  $C(t)$  in der vorliegenden Arbeit berechnet wurden.

---

<sup>4</sup>Der Scope ist der Programmbereich, in dem auf die Variablen zugegriffen werden kann.

```

koeffizient = C0/sqrt(4*pi*D*t);
summeZ = 0;
alterWertZ = 0;
for  $z = 0; z \leq zMax; z += deltaZ$  do
    gesamtSummeTau = 0;
    tau = 0;
    alterWert = 0;
    neuerWert = 0;
    summeTau = epsilon+1;
    while  $summeTau > epsilon \vee tau < L$  do
        tau += deltaTau;
        neuerWert = innereFunktion( $z, t, tau$ );
        summeTau = deltaTau*0.5*(alterWert+neuerWert);
        gesamtSummeTau += summeTau;
        alterWert = neuerWert;
    end
    summeZ += deltaZ*0.5*(alterWertZ+gesamtSummeTau*koeffizient);
    alterWertZ = gesamtSummeTau*koeffizient;
end
datenPunkt = new DataPoint(t, summeZ);

```

**Algorithmus 3:** Berechnung eines Datenpunkts von  $C(t)$

# 5 Auswertung

## 5.1 Analyse der Daten

Die Steuerungs- und Messsoftware des verwendeten CLSM speichert das gemessene Signal als Rasterdaten ab. Die Einstellungen der Anlage, wie etwa die Laserwellenlänge oder die Geometrie des Scanbereichs, werden ebenfalls in der Form von Metadaten abgespeichert. Um die Daten verwerten zu können, müssen diese in Bildform exportiert werden. Dabei findet eine Projektion der Signalstärke auf eine gewählte Farbpalette statt. Da die Anzahl unterschiedlicher, geordneter Farben einer Farbpalette meistens kleiner als der Wertebereich des Signals ist, muss eine geeignete Projektion gewählt werden, sodass möglichst wenig Information verloren geht.

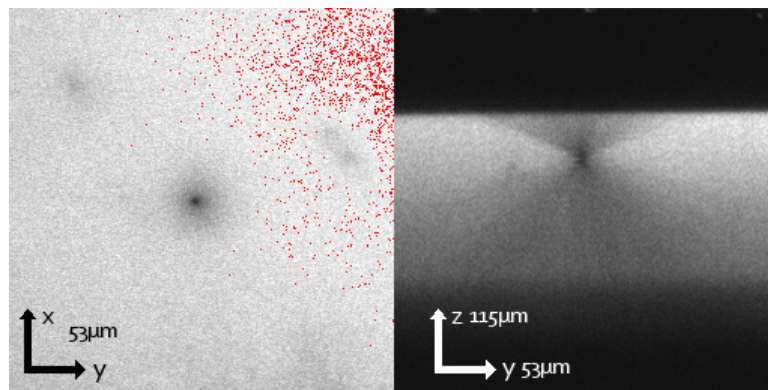


Abbildung 5.1: Beispiel der Messdaten kurz nach dem Bleichen der Probe

In Abbildung 5.1 sind zwei Ansichten der Messdaten aus Experiment 2 zu einem Zeitpunkt kurz nach dem Bleichen der Probe dargestellt. Die optische Achse des Mikroskops entspricht der z-Achse. Auf der linken Seite ist die Ansicht in der x-y-Ebene parallel zur Probenhorizontale dargestellt. Die Farbpalette stellt dabei niedrige Signale mit Schwarz und hohe Signale mit weiß dar. Rot stellt Signale überhalb des Bereichs der Farbpalette dar. Deutlich zu sehen ist der gebleichte Bereich, der durch die Laserbestrahlung entstanden ist.

Auf der rechten Seite ist die Ansicht in der x-z-Ebene, also in der Probenvertikalen, dargestellt. Die Ebene schneidet die Ansicht in der linken Hälfte genau in der Mitte des Lochs. Das Bild ist umgekehrt dargestellt. Das heißt, dass die Membranunterseite der oberen Kante im Bild entspricht. Die Oberseite der Membran ist nicht eindeutig erkennbar, da diese mit Polymer beschichtet ist und daher der Übergang zwischen Membran und freiem Polymer fließend ist. Mittig in der Membran ist das kegelförmige Profil des Laserstrahls erkennbar. Für das menschliche Auge kaum sichtbar sind die Signalunterschiede entlang der Strahlachse in der Mitte. Das Signal ist am schwächsten genau im Fokus des Kegels und nimmt in beide Richtungen mit dem Abstand zum Fokus zu.

Nachdem die Projektion auf eine Farbskala durchgeführt wurde, können die Bilder mit geeigneten Werkzeugen analysiert werden, um beispielsweise das Signal entlang einer Achse zu summieren. Wir verwenden ImageJ<sup>1</sup>, um entlang der Strahlachse im gebleichten Bereich ein Helligkeitsprofil zu erstellen. Dabei wird ein schmaler Bereich möglichst mittig ausgewählt und die Helligkeit über die horizontale y-Achse des gewählten Bereichs (etwa  $2,2\mu\text{m}$ ) gemittelt. Dies führt zu weniger Rauschen als würde nur die zentrale Pixelspalte betrachtet. Das Resultat ist das Helligkeitsprofil der z-Achse, beispielhaft dargestellt in Abbildung 5.2.

<sup>1</sup><http://rsbweb.nih.gov/ij/>

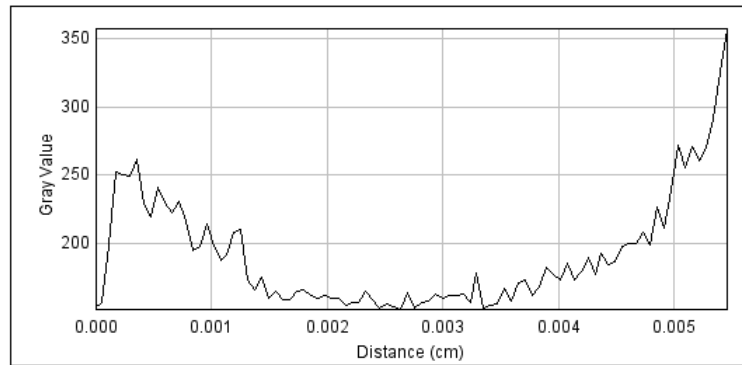


Abbildung 5.2: Beispiel eines Helligkeitsprofil entlang der z-Achse

Im Profil erkennbar ist ein Bereich mit minimaler Signalstärke. Dies entspricht dem Fokus des Laserprofils, bei dem die Bleichung am stärksten ist. Nach links hin nimmt die Intensität weiter zu, bis bei dem linken Rand des Profils die Unterseite der Membran erreicht ist und die Intensität abrupt abnimmt. Nach rechts hin nimmt die Intensität ebenso zu, bis am rechten Rand die Oberseite der Membran erreicht ist, die in die freie Polymerschicht übergeht.

Für jeden Messzeitpunkt wird nun das Profil ermittelt. Um die Daten mit den berechneten Modelldaten vergleichbar zu machen, wird für jeden Messzeitpunkt über das Profil integriert und die Summe als Wert für diesen Zeitpunkt gesetzt. Mithilfe einer Referenzmessung vor der Bleichung wird dieser Wert zusätzlich normiert. Damit beschreiben die Werte nun die Konzentration des Farbstoffs zum Messzeitpunkt entlang der Strahlachse.

## 5.2 Parametersuche

Das in 4.2 vorgestellte Modell enthält insgesamt vier Parameter, die alle wesentlichen Einfluss auf die Berechnung haben. Um diejenigen Werte der Parameter zu ermitteln, die die größtmögliche Übereinstimmung mit den Messdaten haben, wird eine Parametersuche durchgeführt. Dabei werden verschiedene Parametersätze benutzt und das Modell mit jedem Satz durchgerechnet. Anschließend wird die Korrelation der berechneten Daten mit den Messdaten berechnet. Derjenige Parametersatz mit der höchsten Korrelation zu den Messdaten entspricht damit der bestmöglichen Annäherung des Modells an die Messdaten.

Üblicherweise wird ein Raster über den Parameterraum<sup>2</sup> gelegt und die Punkte auf dem Raster als Menge von Parametersätzen benutzt. Es ist ebenso möglich beliebige Punkte entlang einer Kurve zu benutzen, was bei einer nicht-linearen Abhängigkeit des Modellverhaltens von den Parametern sinnvoll sein kann. Existiert beispielsweise ein Parameter, der ab einem bestimmten Schwellwert starken Einfluss auf das Modellverhalten gewinnt, ist es sinnvoll die Punkteschar um diesen Schwellwert dichter zu wählen als über oder unter dem Schwellwert.

Für eine Parametersuche wird also zunächst ein geeigneter Bereich im Parameterraum ausgesucht. Dabei ist zu beachten, dass ein Modell mehr als einen Punkt im Parameterraum haben kann, an dem die Korrelation lokal maximal ist. Gegebenenfalls sind mehrere Maxima sinnvolle Parametersätze für das System, das das Modell beschreibt. Eine Unterscheidung muss daher anhand des zu untersuchenden Systems getroffen werden.

<sup>2</sup>Der Parameterraum ist ein kartesischer Raum mit den Parametern als Koordinatenachsen. Ein Punkt im Parameterraum entspricht genau einem Parametersatz.



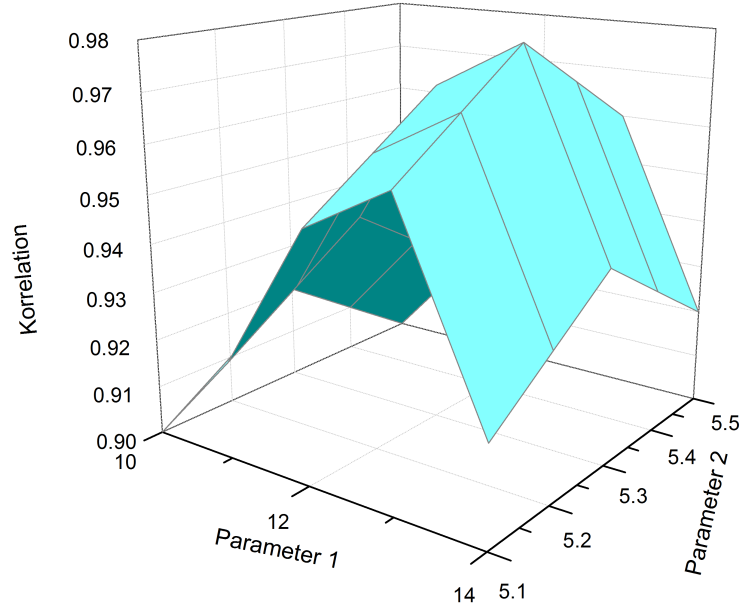


Abbildung 5.3: Beispiel einer Parametersuche

In Abbildung 5.3 ist ein Beispiel für eine Parametersuche dargestellt. Die horizontalen Achsen entsprechen den variierten Parametern und die vertikale Achse der Korrelation des zugehörigen Parametersatzes mit den Messwerten. Zu sehen ist, dass ein lokales Maximum existiert. Der optimale Parametersatz ist in der Umgebung des dargestellten Maximums zu suchen. Eine weitere Parametersuche mit höherer Auflösung in der Umgebung des Maximums ergibt eine bessere Annäherung an das Optimum. Falls das lokale Maximum auf dem Rand des untersuchten Gebiets liegt, muss das Gebiet in die entsprechende Richtung erweitert und verschoben werden, bis ein eindeutiges Maximum innerhalb der Grenzen auftritt.

### 5.2.1 Korrelation

Die Korrelation der berechneten Daten mit den Messdaten ermittelt sich über den empirischen Korrelationskoeffizienten, entnommen aus [24]:

$$\text{corr}(x_i, y_i) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (5.1)$$

Dabei entspricht  $x_i$  den berechneten Daten und  $y_i$  den Messdaten zum Zeitpunkt  $i$ . Wenn die Datenreihen auf der Zeitachse nicht gleich skaliert sind, muss eine der Zeitreihen entsprechend interpoliert werden. Ebenso müssen die Zeitreihen beide gleich viele Elemente enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in Algorithmus 4 dargestellte Implementation benutzt, um den Korrelationskoeffizienten zu bestimmen.

```

function correlation(double[] series1, double[] series2)
int length = series1.length > series2.length ? series2.length : series1.length;
double xAv = 0, yAv = 0;
for int index=0; index<length; index++ do
    xAv += series1[index];
    yAv += series2[index];
end
xAv = xAv/length;
yAv = yAv/length;
double sumCovariance = 0, sumDivX = 0, sumDivY = 0;
for int index=0; index<length; index++ do
    sumCovariance += (series1[index]-xAv)*(series2[index]-yAv);
    sumDivX += (series1[index]-xAv)*(series1[index]-xAv);
    sumDivY += (series2[index]-yAv)*(series2[index]-yAv);
end
return sumCovariance/sqrt(sumDivX*sumDivY);

```

**Algorithmus 4:** Berechnung der Korrelation zweier Datenreihen

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Messdaten

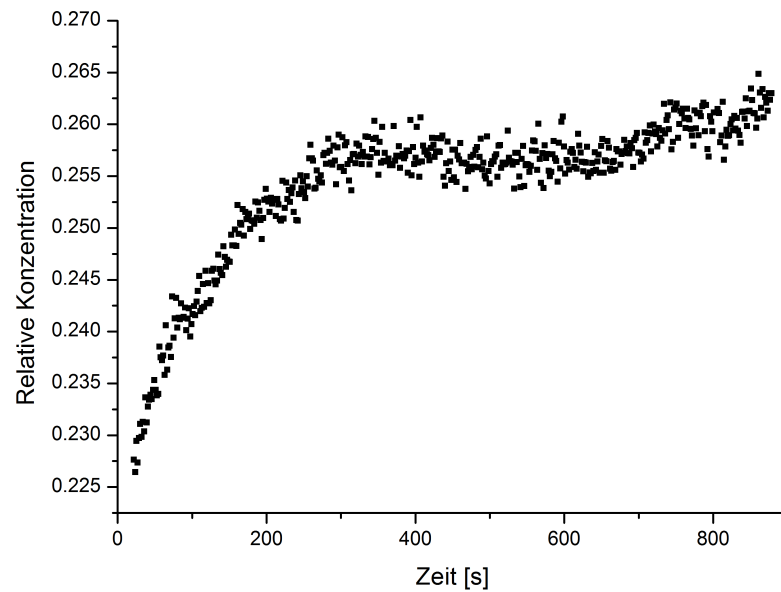


Abbildung 6.1: Messdaten nach der Auswertung mit relativer Konzentrationsangabe

**Experiment 1** Abbildung 6.1 zeigt die Messdaten des Experiments 1 mit Rhodamin-6G. Die Konzentration ist relativ zur Referenzmessung angegeben.

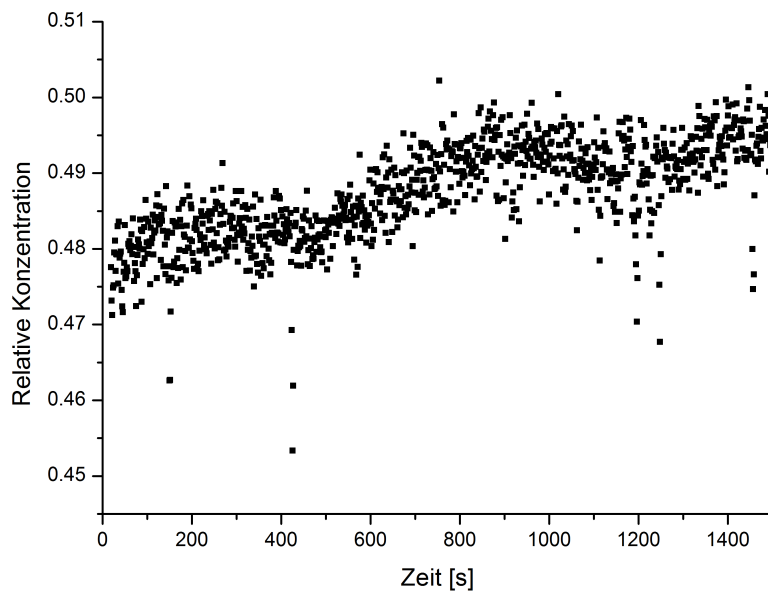


Abbildung 6.2: Messergebnisse des Experiments 2

**Experiment 2** Abbildung 6.2 zeigt die Messdaten des Experiments 2 mit farbstoffmarkiertem Polybutadien. Die Daten, die in Experiment 2 gewonnen wurden, zeigen zu große Schwankungen um für die Auswertung geeignet zu sein. Es kann nicht eindeutig zwischen linearem und dem erwarteten sigmoidem Verhalten unterschieden werden. Die Anpassung der Modellparameter an die Messdaten ist damit nicht möglich.

Die Selbstdiffusion von Polymeren geschieht deutlich langsamer als die Diffusion von freien Farbstoffen innerhalb von Polymeren. Es ist wahrscheinlich, dass die Zeitskala, die für die Experimente angelegt worden ist, nicht ausreichend war um die Regeneration zu untersuchen. Ein längerer Untersuchungszeitraum hätte, sofern sich das System wie erwartet verhält, zu einer deutlicheren Regeneration geführt. Dadurch wäre die Varianz der Datenpunkte weniger stark ins Gewicht gefallen und eine Parametersuche wäre möglich gewesen.

## 6.2 Parametrisierung des Modells

D	$80 \frac{\mu m^2}{s}$
$z_0$	$3.7 \mu m$
K	2.6
$C_0$	0.27
Korrelationskoeffizient	0.961

Tabelle 6.1: Ergebnis der Parametersuche für Experiment 1

Tabelle 6.1 zeigt das Ergebnis der Parametersuche und den optimalen Parametersatz für Experiment 1. Die übrigen Parameter wurden anhand der Messdaten parametrisiert und imitieren die Experimentparameter:

$z_M$	$27\mu m$
$\epsilon$	$0.0005$
$z_{min}$	$0\mu m$
$z_{max}$	$60\mu m$
$\Delta z$	$0.5\mu m$
$t_{min}$	$22s$
$t_{max}$	$880s$
$\Delta t$	$1.72s$
$\Delta \tau$	$0.1$

Tabelle 6.2: Übrige Parameter für Experiment 1

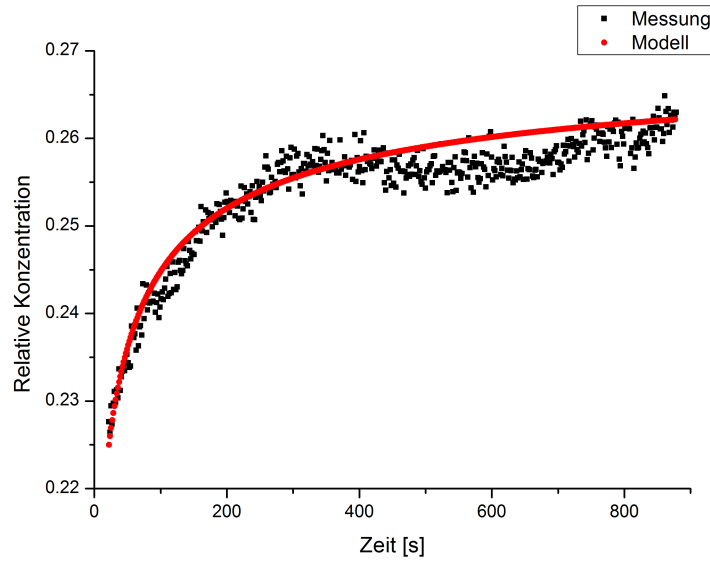


Abbildung 6.3: Vergleich der Messdaten von Experiment 1 mit den berechneten Modelldaten

Abbildung 6.3 zeigt die Messdaten von Experiment 1 im Vergleich mit den berechneten Modelldaten, die mit den oben beschriebenen Parametersatz berechnet wurden.

### 6.3 Fehleranalyse

- Die Membran war nach der Infiltration nicht gleichmäßig mit dem Polymer besetzt. Das Modell nimmt eine homogene Verteilung des Polymers in der Membran an. Abweichungen davon führen zu einer geringeren Korrelation der erwarteten Werte zu den Messwerten.
- Das Verhalten von Polymeren in begrenzten Geometrien weicht von dem in Volumensystemen ab (siehe Ok et al.[25] und Schönhals et al.[26]). Die Effekte der Poren auf das Diffusionsverhalten des Polymers sind daher nicht eindeutig bekannt. Es ist daher möglich, dass sich Polybutadien aufgrund solcher Effekte in der Membran anders verhält, als es die Fick'schen Gesetze beschreiben.
- Aufgrund der kleinen Probegröße ist die Messung sensitiv gegenüber der Positionierung der Probe und der Probekammer. Eine Verschiebung der Probe von wenigen Mikrometern, bei gleichbleibender Messungsgeometrie, führt bereits zu einer sichtbaren Verschiebung des Mikroskop-Bilds. Während der Messung von Experiment 1 konnte eine Verschiebung von ca.  $1.5\mu m$  und bei Experiment 2 von ca.  $2.5\mu m$  beobachtet werden. Bei der Auswertung der Messdaten muss die Messungsgeometrie manuell eingelesen werden, welche dann automatisch auf alle Messwerte angewandt

wird. Eine automatische Anpassung der Geometrie ist technisch möglich, lag aber außerhalb des Rahmens der vorliegenden Arbeit. Daher entstand bei der Auswertung ein systematischer Fehler, da der ausgewertete Bereich im Lauf der Messung gegenüber der Ausgangsposition verschoben wurde. Da die Probe außerhalb der Hauptachse weniger stark gebleicht ist, wurden die Messwerte bei der Auswertung etwas höher eingelesen, als sie es tatsächlich sind.

- Für die korrekte Berechnung der Modellwerte wurde angenommen, dass der Farbstoff während der Messung nicht nachbleicht. Bei der Konfiguration des Mikroskops und einem Testversuch mit Rhodamin-6G wurde jedoch klar, dass eine Nachbleichung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, da die Laserleistung in dem verwendeten Versuchsaufbau maximal um einen Faktor von ca. 50 reduziert werden kann. Da das Mikroskop die Probe in einem Raster scannt, wurden daher alle Bereiche der Probe gleichmäßig zusätzlich gebleicht.
- Die photolytischen Reaktionen, die zur Bleichung der Farbstoffe führen, sind nicht abschließend bestimmt. Die Annahme, dass diese Reaktionen der Kinetik erster Ordnung folgen, ist daher nicht gesichert und nur modellhaft.
- Natives Polybutadien in einer Polymerschmelze<sup>1</sup> vernetzt sich zunehmend an der Luft, bis es schließlich vollständig vernetzt ist und den Charakter einer Schmelze verliert. Obwohl viele Moleküle dennoch in einem vernetzten Polymer diffundieren können, verringert diese Vernetzung den Diffusionskoeffizienten von Substanzen innerhalb des Polymers. Bei der Herstellung der Proben für Experiment 2 kann es durch die kurzzeitige Erhitzung zu vermehrter Vernetzung des Polybutadiens gekommen sein. Ebenso werden Polymerproben im Lauf der Zeit unweigerlich zunehmend vernetzt. Das farbstoffmarkierte Polybutadien konnte nicht für die Experimente frisch hergestellt werden, weswegen von einem gewissen Grad an Vernetzung ausgegangen werden muss.

## 6.4 Fazit und Ausblick

Die ursprüngliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit bezog sich auf den Diffusionskoeffizienten der Selbstdiffusion von Polybutadien. Das Experiment, das Rhodamin-6G in Polybutadien betrachtet, war als Vergleich gedacht. Da jedoch das Experiment 2 keine brauchbaren Daten ergab, bezieht sich daher die Auswertung auf Experiment 1. Sowohl im Experimentaufbau, als auch in der Auswertung, unterscheiden sich beide Experimente nur gering. Es ist davon auszugehen, dass die beschriebene Vorgehensweise für beliebige Farbstoffe und Polymere, die die Voraussetzungen für FRAP-Messungen erfüllen, anwendbar ist.

Die Parameter mit der höchsten Korrelation für Experiment 1 ergaben einen Wert des Diffusionskoeffizienten von  $80 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  für Rhodamin-6G. In der Literatur existieren keine Vergleichswerte für die Diffusion in Polybutadien. Gendron et al.[27] geben einen Wert von  $300 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$  in Wasser an. Es scheint plausibel, dass Rhodamin-6G einen geringeren Diffusionskoeffizienten in dem deutlich zähflüssigeren Polybutadien besitzt.

Der Fehlschlag von Experiment 2 ist möglicherweise auf eine ungeeignete Zeitskala des Experiments und eine gewisse Vernetzung der Probe zurückzuführen (siehe 6.3). Farbstoffmarkierte Proben mit kürzerer Kettenlänge, und folglich schnellerer Diffusion, sind für FRAP-Experimente besser geeignet. In der vorliegenden Arbeit musste aufgrund der gegebenen farbstoffmarkierten Polymerprobe Polybutadien mit hohem Molekulargewicht gewählt werden. Alternativ ist es möglich Versuche bei höheren Temperaturen durchzuführen. Allerdings führt dies neben erschwerten Versuchsbedingungen zur der Möglichkeit, dass die Polymerproben während des Experiments vernetzen und damit die Daten massiv stören.

---

<sup>1</sup>In einer Schmelze sind Polymere hauptsächlich flüssig, weisen aber auch gewisse Eigenschaften von Nicht-newtonschen Flüssigkeiten auf. Viele Polymere gehören Substanzen an, die Gläser genannt werden und statt einer punktierten Schmelztemperatur einen Temperaturbereich besitzen, in dem die Substanzen zunehmend weicher werden.

## 7 Anhang

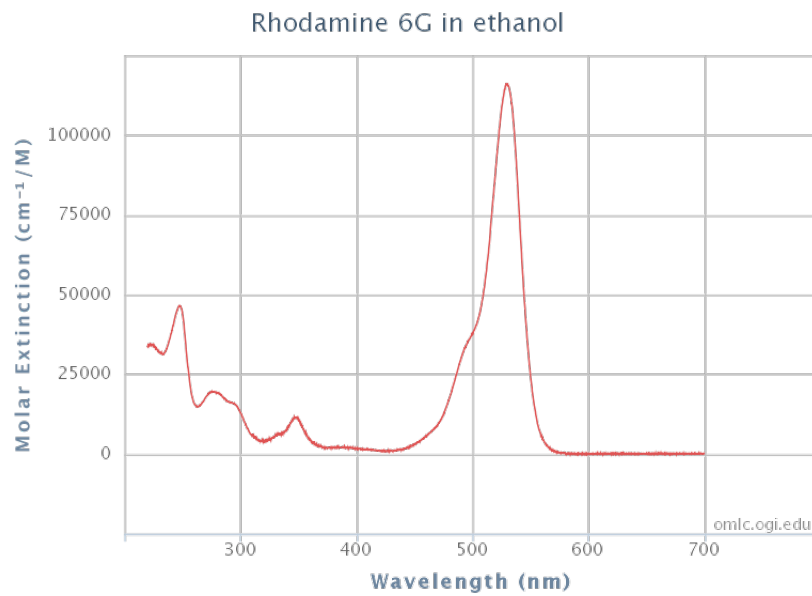


Abbildung 7.1: Absorptionsspektrum von Rhodamin-6G  
<http://omlc.org.edu/spectra/PhotochemCAD/html/083.html> Zugriff 06.08.13

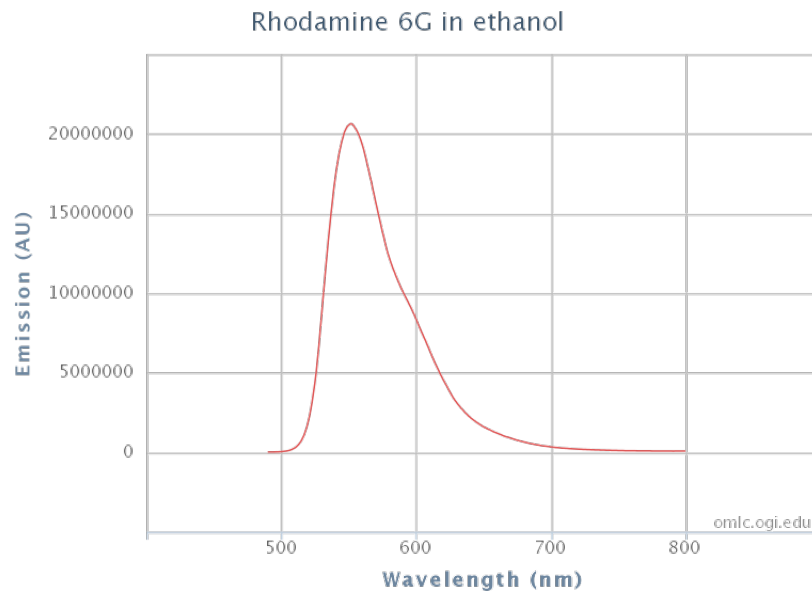


Abbildung 7.2: Emissionsspektrum von Rhodamin-6G  
<http://omlc.org.edu/spectra/PhotochemCAD/html/083.html> Zugriff 06.08.13



# Literaturverzeichnis

- [1] *Optik, Licht und Laser*, Dieter Meschede, Teubner Studienbücher Physik 2005, ISBN 3-519-13248-6
- [2] *Photonics and Lasers: An Introduction*, Richard S. Quimby, John Wiley & Sons Inc. 2006, ISBN 9780471719748
- [3] *Focusing of spherical Gaussian beams*, Sidney A. Self, Applied Optics V22 No5, 1983
- [4] *Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development* Gerrard Eddy Jai Poinern & Nurshahidah Ali & Derek Fawcett, Materials V4 No3 487-526, 2011
- [5] *Self-Ordering of Cell Configuration of Anodic Porous Alumina with Large-Size Pores in Phosphoric Acid Solution*, Hideki Masuda & Kouichi Yada & Atsushi Osaka, Japanese Journal of Applied Physics V37 No11A 1340-1342, 1998
- [6] *Über Diffusion* Adolf Fick, Annalen der Physik V170 No1 59-86, Wiley Verlag 1855
- [7] *Partial Differential Equations 2. Ausgabe*, Lawrence C. Evans, Graduate Studies in Mathematics V19, American Mathematical Society 2010
- [8] *Analysis of Heat Equations on Domains*, El Maati Ouhabaz, London Mathematical Society Monograph Series V31, Princeton University Press 2005
- [9] *Modeling diffusion in restricted systems using the heat kernel expansion*, Bahman Ghadirian & Tim Stait-Gardner & Reynaldo Castillo & William S. Price, Journal of Chemical Physics V132 234108, American Institute of Physics 2010
- [10] *Mobility Measurements By Analysis Of Fluoresence Photobleaching Recovery Kinetics*, D. Axelrod & D. E. Koppel & J. Schlessinger & E. Elson & W. W. Webb, Biophysical Journal V16 1055-1069, 1976
- [11] *Theoretical Analysis of Fluoresence Photobleaching Recovery Experiments*, D. M. Soumpasis, BIO-PHYS. J. V41 95-97, Biophysical Society 1983
- [12] *Theory of fluoresence recovery after photobleaching measurements on cylindrical surfaces*, David E. Wolf, Biophysical Journal V61 487-493, Biophysical Society 1992
- [13] *Advanced Fluorescence Microscopy Techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*, Hellen C. Ishikawa-Ankerhold & Richard Ankerhold & Gregor P. C. Drummen, Molecules V17 4047-4132, 2012
- [14] *Fluoresence Recovery After Photobleaching: A versatile Tool for Mobility and Interaction Measurements in Pharmaceutical Research*, Tom K. L. Meyvis & Stefaan C. De Smedt & Patrick Van Oostveldt & Joseph Demeester, Pharmaceutical Research V16 No8 1153-1162, Plenum Publishing Corporation 1999
- [15] *Three-Dimensional Fluoresence Recovery after Photobleaching with the Confocal Scanning Laser Microscope*, Kevin Braeckmans & Liesbeth Peeters & Niek N. Sanders & Stefaan C. De Smedt & Koseph Demeester, Biophysical Journal V85 2240-2252, Biophysical Society 2003
- [16] *Diffusion in Mesoscopic Probes in Aqueous Polymer Solutions Measured by Fluoresence Recovery after Photobleaching*, Yu Cheng & Robert K. Prud'homme & James L. Thomas, Macromolecules V35 8111-8121, American Chemical Society 2002

- [17] *Fluorescence Recovery after Photobleaching Measurements of Polymers in a Surface Forces Apparatus*, Janet S. S. Wong & Liang Hong & Sung Chul Bae & Steve Granick, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics V48 2582-2588, Wiley Periodicals 2010
- [18] *Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Experiments under conditions of uniform disk illumination, Critical Comparison of Analytical Solutions and a new mathematical method for calculation of Diffusion Coefficient D*, André Lopez & Laurence Dupou & Anne Altibell & Joel Trotard & Jean-Francois Tocanne, Biophysical Journal V53 963-970, Biophysical Society 1998
- [19] *Line FRAP with the Confocal Laser Scanning Microscope for Diffusion Measurements in Small Regions of 3-D Samples*, Kevin Braeckmans & Katrien Remaut & Roosmarijn E. Vandenbroucke & Bart Lucas & Stefaan C. De Smedt & Joseph Demeester, Biophysical Journal V92 2172-2183, Biophysical Society 2007
- [20] <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>, Zugriff 25.02.13
- [21] *Theoretical Basis of Confocal Microscopy*, Robert H. Webb, Methods in Enzymology V307, Academic Press 1999
- [22] <http://www.biologie.uni-osnabrueck.de/Calm-OS/index.php?cat=Microscopes&page=Olympus%20LSM%20Fluoview>  
Zugriff 17.05.13
- [23] *Numerical Integration*, Philip J. Davis & Philip Rabinowitz, Blaisdell Publishing Company 1967
- [24] *Angewandte Statistik*, Lothar Sachs & Jürgen Hedderich, Springer 2009, ISBN 978-3-540-88901-4
- [25] *Confinement Effect on Chain Dynamics and Local Chain Order in Entangled Polymer Melts*, Salim Ok & Martin Steinhart & Anca Serbescu & Cornelius Franz & Fabian Vaca Chavez & Kay Saalwächter, Macromolecules V43 4429-4434, American Chemical Society 2010
- [26] *Polymers in nanoconfinement: What can be learned from relaxation and scattering experiments?*, A. Schönhals & H. Goering & Ch. Schick & B. Frick & R. Zorn, Journal of Non-Crystalline Solids V351 2668-2677, Elsevier 2005
- [27] *Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy*, P.O. Gendron & F. Avaltroni & K.J. Wilkinson, Journal of Fluorescence V18 No6 1093-1101, Springer 2008