

Versuchstitel:

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Versuchstermin:
26. Januar 2021
5. Februar 2021

Santiago Rodriguez (■■■■■■■■■■), Birge Sükrü Tok (■■■■■■■■■■)

Abgabetermin:
20. Februar 2021

BetreuerIn:
Dr. rer. nat. Steffen
Hackbarth

Bewertung:

Man messe die zeitaufgelöste Fluoreszenz sowie Polarisation der dabei emittierten Photonen eines Pheophorbid A Photosensibilisators bei Bestrahlung mit einem gepulsten Laser in unterschiedlichen Stoffgemischen und anschliesend nach Einbettung in Mizellen mithilfe der statistischen Messmethode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Durch Auswertung und Vergleich der zeitlichen Pulse eines Referenzsignals mit denen der durch Fluoreszenz ausgelösten Photonen wird die Fluoreszenz unter verschiedenen Umständen untersucht und dadurch die weiterhin bestehende Lumineszenz des Photosensibilisators im Gemisch nachgewiesen.

Einleitung, Theorie und Aufbau

Einleitung

Im Gebiet der Photodynamischen Therapie (PDT) ist die Einführung von Photosensibilisatoren (PS) mithilfe von Trägersystemen in organische Zellen eine neue Methode zur harmlosen Bekämpfung von Tumorzellen in von Krebs befallenen Patienten durch Bestrahlung mit gewöhnlichen Licht. Photosensibilisatoren sind photophysikalisch aktive Moleküle, die bei Anregung durch Photonen unterschiedlicher Frequenzen Fluoreszenz und Phosphoreszenz aufweisen und dabei zytotoxisches Singulett-Sauerstoff aus den in deren Umgebung vorhandenem Sauerstoff erstellen. Bei Einführung in Tumorzellen bietet sich hiermit also eine Möglichkeit der gezielten Abtötung krebsartiger Gewebe. Phäophorbid a ist ein bekannter, aus Pflanzengewebe vergleichsweise einfach zu gewinnender PS, ist aber auch hydrophob und somit in der wässrigen Umgebung von Zellen schlecht einsetzbar ohne einen amphiphilen Trägersystem. Aus diesem Grund ist die Einbettung in Mizellen und die Folgen mit und ohne dieser Einbettung für die Fluoro- und Phosphoreszenzeigenschaften des PS in unterschiedlichen Stoffgemischen aus Ethanol und Wasser zu untersuchen. Zur Untersuchung der Fluoreszenz von Phäophorbid a wird die Fluoreszenzintensität und -Abklingzeit bei Bestrahlung einer Lösung des PS in unterschiedlichen Stoffgemischen gemessen. Ziel ist es, die Abnahme der Fluoreszenz bei Wassergemischen im Vergleich zu Ethanolgemischen und die erneute Zunahme der Fluoreszenz in den Wassermilieus nach Einbettung des PS in Mizellen nachzuweisen. Da aber die angestrebte Zeitauflösung zur Messung der charakteristischen Fluoreszenzabklingzeit im Pikosekundenbereich $[\Delta t] = 10^{-12} \text{s}$ liegt, wird zur Messung selbiger auf das Verfahren der zeitkorrelierten Einzelpho-

tonenzählung zurückgegriffen. Bei diesem Messverfahren werden mithilfe eines gepulsten Lasers "einzelne" Photonen gezählt indem die periodische Wiederholung der identischen Pulse während der Messung statistisch als ein einzelnes Signal oder Teilchen ausgewertet wird.

Theorie

Fluoreszenz entsteht in einem PS -oder allgemein in einem Fluorophor- durch die Emission von Photonen bei unterschiedlichen Übergängen von Elektronen aus energetisch angeregten Zuständen. Stößt ein Photon einer groß, bzw. kurz genügen Energie und Wellenlänge λ_{ph} inelastisch gegen ein Elektron in einem niedrigen Energieniveau S_{n-1} , so kann dieser mit der Energie $E = \frac{hc}{\lambda_{ph}}$ die Energiedifferenz zwischen den beiden Niveaus $E_S - E_{S-1} \Delta E$ ausgleichen und auf ein höheres Energieniveau S_n angeregt werden. Aus diesen kann der Elektron wieder durch Emission eines Photons der Wellenlänge $\lambda_{fl} \leq \lambda_{ph}$ auf das niedrigere Niveau absteigen. Mögliche Übergänge werden vom Jablonski Diagramm des Materials angegeben.

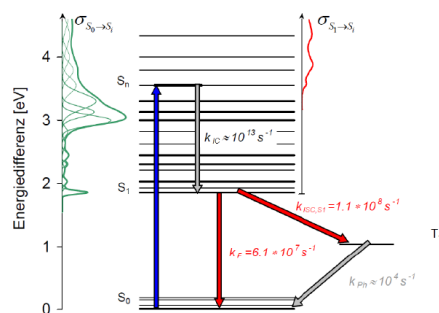


Abbildung 1: Jablonski-Diagramm für Pheophorbid a in Ethanol als Schema der Energiedifferenzen zum Grundzustand S_0 [7]

Die Übergänge erfolgen auch relativ schnell solange der Übergang quantenmechanisch erlaubt ist, d.h. dass keine Spinumkehr erfolgen muss. Denn beim Übergang nach energetisch unterschiedlichen Niveaus müssen Elektronen bestimmte quantenmechanische Voraussetzungen erfüllen. Gibt es mehrere Elektronen in einem gleichen energetischen Zustand, so müssen diese nach den paulischen Ausschließungsprinzip unterschiedliche Spins $s = \pm 1$ aufweisen, da keine zwei Elektronen im gleichen Shell die gleichen Quantenzahlen besitzen dürfen. Ist dies der Fall, dann ist bei einer geraden Anzahl n an Elektronen in einem Zustand die Gesamtsumme, $S = \sum_{i=1}^n s_i = 0$ der Spinquantenzahlen null, bzw. die Multiplizität $2|S| + 1 = 1$, und die Elektronen werden als gepaart bezeichnet. Man spricht in dem Fall von einem Singulett Zustand des Systems. Ist hingegen die Anzahl der Elektronen ungerade, so gilt $S = \pm 1$, also Multiplizität $2|S| + 1 = 3$ und man spricht von einem Triplett Zustand des Systems. Bei einem strahlungsfreien Übergang in einen oberen Energiezustand kann sich -obwohl Grundsätzlich verboten- die Spin-Quantenzahl eines Elektrons verändern und das System vom Singulett zum Triplett-Zustand in einem Intersystem Crossing übergehen. Wenn diese gilt, dann muss das Elektron vor der Rückkehr in den Grundzustand nochmals dessen Spin wechseln, was sehr unwahrscheinlich ist und somit zeitlich länger - bis zu mehreren Stunden- brauchen kann. Dies ist die Ursache für die schwache aber langlebige Phosphoreszenz, während ein Fluorophor keine weitere Fluoreszenz aufweisen kann.

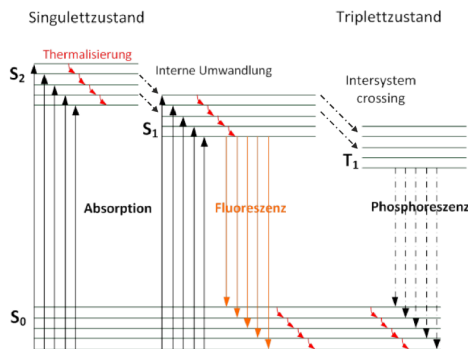


Abbildung 2: Schema der möglichen Übergangsprozesse vom S_1 zum S_0 Zustand []

Je größer die Übergangswahrscheinlichkeit ist, desto kürzer ist die davon vorgegebene Abklingzeit der Lichtemission, bis auf Leuchtzeiten von wenigen Piko-sekunden. Letzteres ist bei Fluoreszenz dann der Fall, da diese viel wahrscheinlicher stattfinden kann, wobei die Intensität und Energie der ausgeleuchteten Photonen aufgrund mehrerer innerer Prozesse zwischen den sogenannten Schwingungszuständen in den Energi-

veaus -darunter strahlungsfreie, aber dennoch Energie abgebende Internal Conversion Prozesse- niedriger sein kann, als die Intensität und Energie der eingestrahlten Photonen. Für die Energie und somit Wellenlänge der Photonen aus der Fluoreszenz gilt somit $\lambda_{fl} \leq \lambda_{ph}$, während es für die Intensität ein Maß für das Verhältnis zwischen ein- und ausgestrahlte Photonen unter dem Begriff der Quantenausbeute Φ_{Fl} gibt mit $\Phi_{Fl} = \frac{k_{Fl}}{k_{Fl} + k_{sonst}}$. Aus dieser Quantenausbeute ist somit die natürliche Lebensdauer mithilfe der gemessenen Fluoreszenz-Abklingzeit berechenbar.

Aufbau

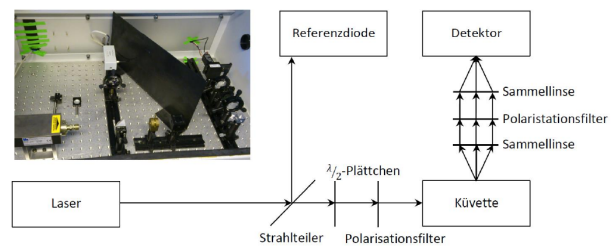


Abbildung 3: Messaufbau[7]

Der Aufbau des Versuches besteht aus einer optischen Anordnung bei der das Signal eines gepulsten Lasers durch einen Strahlteiler in zwei identische Teilsignale gespalten wird. Bei dem Laser handelt es sich hierbei um einen Becker und Hickl BHL-600 der im Wellenlängenbereich von $\lambda = 652nm$ arbeitet, mit einer minimalen Pulsdauer von bis zu $50 - 60ps$ und einer Frequenz von ca. $50MHz$. [2]

Der eine Strahl wird hierbei auf eine Referenzdiode umgelenkt während der andere weiterhin durch ein $\lambda/2$ -Plättchen sowie einen Polarisationsfilter verläuft -wobei diese jeweils bei unterschiedlichen Einstellungen die Intensität des einfallenden Laserstrahls regulieren-, bevor es auf eine transparente Küvette mit dem Untersuchungsgegenstand im inneren trifft. Bei der Referenzdiode handelt es sich um einen Becker und Hickl PHD-400. Fluoreszenzsignale, die von der Küvette nach Anregung des PS ausgestrahlt werden, werden dann von zwei Sammellinsen nach Passage durch einen weiteren Polarisationsfilter sowie Interferenz- oder Graufilter auf einen Detektor fokussiert, der mit einem Photomultiplier (PMT) sowie einen Constant Fraction Discriminator (CFD) das Messsignal aufnimmt. Das hierbei verwendete Gerät ist ein Hamamatsu H10721 Series PMT Photosensormodul der im Spektralbereich bis zu $\lambda = 700nm$ arbeitet. [4]

Die Intensitätsmessung wird hierbei also von der Zeitmessung entkoppelt, indem die Messung den zeitlichen Unterschied zwischen Fluoreszenzemissionen am Detektor und Laserpulsen an der Referenzdiode misst. Um Pile-Up Effekte zu minimieren wird die Messung zusätzlich am Detektor gestartet und dann mit dem Pulsen des Referenzsignals verglichen anstatt umgekehrt zu verfahren wie in der klassischen Einzelphotonenzählung -somit heißt diese Messmethode auch inverse Einzelphotonenzählung.

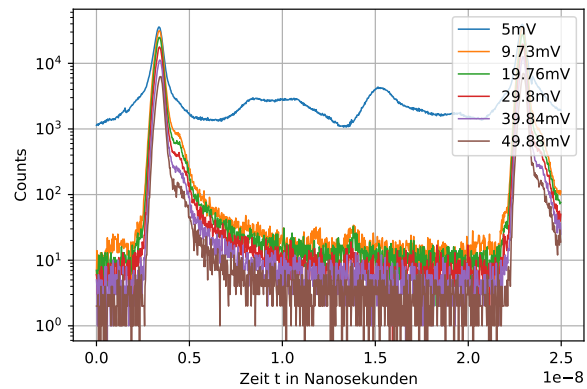


Abbildung 4: Messungen zur Optimierung des Schwellwertes

Optimierung der Messparameter und Überprüfung des Aufbaus

Zur Minimierung von Störfaktoren; wie Rausch, Reflexionen im Strahlenverlauf oder elektrischen Signalaufnahme müssen zuerst die Messparameter angepasst werden. Hierfür wurden Schwellwert zu Messungsaufnahme, Betriebsspannung des Photomultipliers (PM-Spannung) und die Intensität des Laserstrahls variiert und die Messkurven verglichen. Bei den Messungen hierzu wurde eine Streuküvette verwendet, welche weder Fluoreszenz noch Phosphoreszenz aufweist, um ein möglichst reines Signal zu messen. Außerdem wurde ein Graufilter vor den Photomultiplier gestellt, um den Detektor auf die Anregungswellenlänge empfindlich zu machen, die ansonsten vom Interferenzfilter ausgeschlossen werden. Folgende Messparameter wurden zusätzlich festgelegt: Messzeit 20 Sekunden, Gain: 2. Offset 21 ns.

Die Messungen für die Schwellwerte 5 mV und 49.86 mV wurden auf den ersten Blick ausgeschlossen, da diese jeweils viel zu hohen Rausch und vergleichsweise sehr niedrige Signalstärken erfasst haben. Des Weiteren wurde aus diesen Messungen insbesondere drei Messungen (für die Schwellwerte 19.76 mV, 29.8 mV und 39.84 mV) berücksichtigt, da diese einen vergleichsweise guten Ausgleich zwischen dem Rausch und der Signalstärke aufgewiesen hatten.

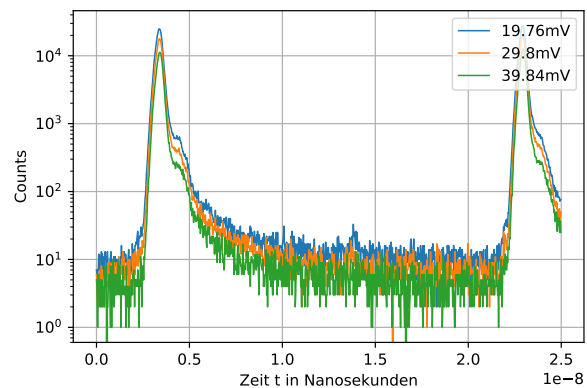


Abbildung 5: Auswahl der berücksichtigten Messungen zur Optimierung des Schwellwertes

Optimierung des Schwellwertes

Mit den oben genannten Parametern und einer festgesetzten PM-Spannung bei 800 V sowie ein Öffnungswinkel des $\lambda/2$ -Plättchens bei ca. 40° , wodurch eine hohe Intensität des Strahls ermöglicht wird, wurden Messungen für den Schwellwert bei 5mV, 9.73mV, 19.76mV, 29.8mV, 39.84mV, 49.88mV aufgenommen.

Daraus hervorgehend wurde beschlossen den Schwellwert auf 29.8 mV zu stellen, da dieser ein gutes Signal-Rausch verhältnis aufwies. Der Schwellwert von 19.76 mV wurde ausgeschlossen, da dessen Abfallartefakt („Buckel“) bei 4-5 ns die Kurve deutlich stört. Im Vergleich hierzu, ist dieser Buckel zwar weniger disruptiv bei 39.84 mV, so fällt aber der Peak auch deutlich niedriger. Aus diesem Grunde wurde der Schwellwert 29.8 mV als die bessere Kompromisslösung beurteilt, die zwischen diesen drei Werten in Frage kommt.

Optimierung der Betriebsspannung des Photomultipliers (PM-Spannung)

Mit dem im vorherigen Abschnitt festgelegtem Schwellwert wurde nun die PM-Spannung variiert, um so eine angepasste Spannung zur Minimierung der Fehlauflösungen des Photomultipliers zu ermitteln. Hierfür wurden Messungen für PM-Spannungen von 600V, 650V, 700V, 750V, 800V, 850V, 900V, 950V und 1000V durchgeführt. Für PM-Spannungen von 600V und 650V wurden keine Events erfasst. Dies wird dadurch begründet, dass wegen der niedrigen Spannung nicht genügend Elektronen von den Platten des Photomultipliers freigesetzt wurden, um eine Messung auszulösen.

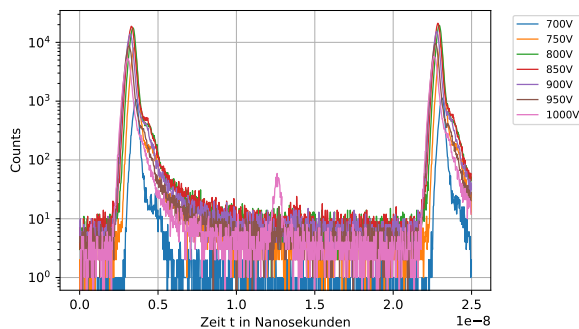


Abbildung 6: Messungen zur Optimierung der PM-Spannung

Die Messung für PM-Spannungen von 700V, 950V und 1000V wurden weiterhin ausgeschlossen; da jeweils bei 700V das Signal nicht vollständig erfasst wurde und da bei 950V und 1000V sekundäre Signale ausgezeichnet durch einen Peak zwischen zwei Signalen festgestellt werden könnten, waren diese als ungeeignet erachtet worden. Die sekundären Signale werden durch Reflexionen in den elektrischen Leitungen des Messaufbaus erklärt, da deren Länge ungefähr der Verzögerung dieser entspricht. Diese Fehlerquelle war zuvor auf einer vergleichbaren Stärke wie das Signal selbst, weshalb der Messaufbau kontrolliert und der Versuch am 26.2. abgebrochen werden musste. 750V wurde ausgeschlossen, da hier die Signalstärke im Vergleich schwach ist. Somit wurden die Messungen für 800V, 850V und 900V verglichen.

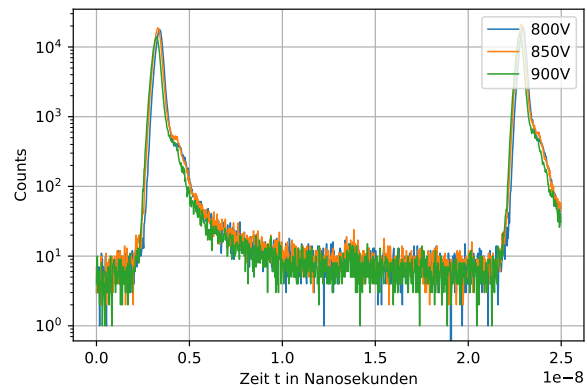


Abbildung 7: Auswahl der berücksichtigten Messungen zur Optimierung der PM-Spannung

Aus diesem Vergleich hervorgehend, wurde entschieden die Betriebsspannung bei 800V beizubehalten, da bei 900V das Signal vergleichsweise schwächer ist und der Buckel bei 850V prägnanter ist.

Optimierung der Intensität

Letzterlich wurde die Intensität des Lasers durch Änderung des Winkels des $\lambda/2$ -Plättchens variiert. Es wurden Messungen bei ca. Öffnungswinkeln von 0° , 22.5° , 45° , 67.5° und 90° aufgenommen, und die Countraten aufgezeichnet.

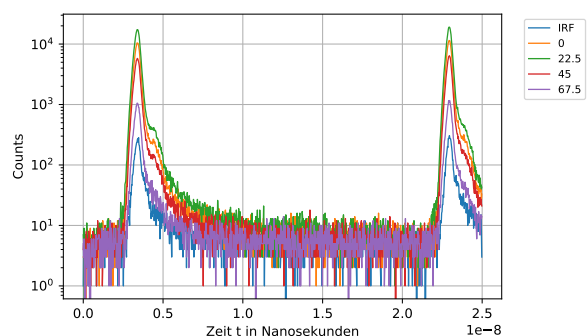


Abbildung 8: Messungen zur Optimierung der Laserintensität

Die Messungen für 0° und 90° wurden aus dem Vergleich ausgeschlossen, da dessen Signalstärken deutlich schwächer abschnitten als die anderen.

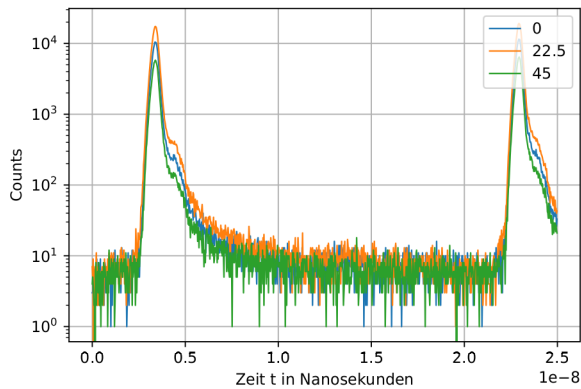


Abbildung 9: Auswahl der berücksichtigten Messungen zur Optimierung der Laserintensität

Aus dem Vergleich hervorgehend wurde anschließend eine Einstellung des $\lambda/2$ -Plättchens auf 67.5° entschieden, da diese trotz eines schwächeren Signals, den besseren Abfall nach einem Peak, also einen abgerundeteren Buckel, aufweist. Außerdem ist es sinnvoll keine zu hohe Intensität auszuwählen, da sonst der Peak-Pileup-Effekt zu stark ausgeprägt werden würde.

Pheophorbid a Lösung in Wasser-Ethanol-Gemisch

Es wird am Anfang dieser Messreihe die Fluoreszenz von Pheophorbid a in Ethanol bei unterschiedlichen optischen Dichten nachgewiesen und im Anschluss die Abnahme der Fluoreszenz in wasserhaltigen Gemischen aufgrund der Hydrophobie der PS Moleküle. Doch zuvor wurde so wie bei der letzten Messung mit der Streuküvette das Peak-Pile-Up-Effekt anhand der Variation des $\lambda/2$ -Plättchens nun mit der Phäophorbid a Lösung untersucht. Von nun an wurden alle Messungen ebenfalls mit dem Interferenzfilter anstatt des Graufilters durchgeführt.

Messung der Intensität

Die Intensität des Lasers wird durch Änderung der Winkeinstellung des $\lambda/2$ -Plättchens variiert. Es wurden Messungen bei Öffnungswinkel von ca. $0^\circ, 22.5^\circ, 45^\circ, 67.5^\circ$ und 90° aufgenommen, und die Countraten aufgezeichnet.

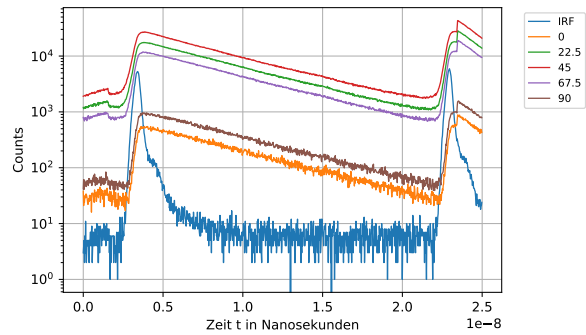


Abbildung 10: Messungen zur Optimierung der Laserintensität

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, sind die Messreihen mit dem stärksten Signal diejenigen mit Einstellungen näher an 45° . Bei Öffnungswinkel, die von diesem Wert, gegen 0° oder 90° abweichen, wird das Signal jedoch schwächer. Um womögliche Peak-Pile-Up Effekte zu erkennen wurde zusätzlich nun bei Einstellungen von $90^\circ, 67.5^\circ$ und 45° ein Fit der Messwerte mit Residuen und χ^2/dof^2 Werten ausgerechnet nach der Modellfunktion $f(x) = \sum_{i=1}^2 a_i \cdot e^{-b_i x} + c$.

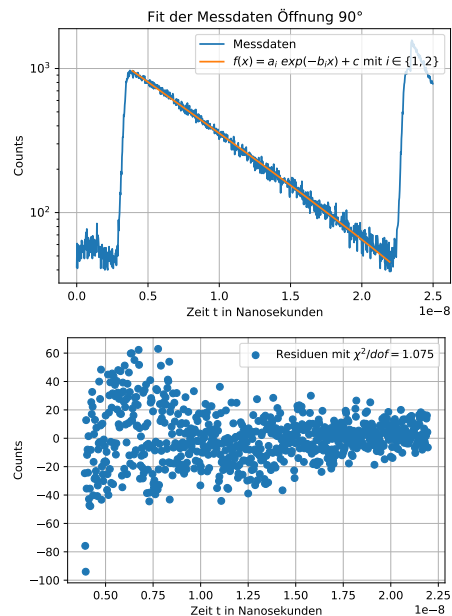


Abbildung 11: Fits 90 Grad Lambda-Gate

Bei dem ersten Fit wurde das Signal mit einem Öffnungswinkel von 90° des $\lambda/2$ -Gates gemessen. Der angepasste Fit im Abfallbereich der Fluoreszenz weist mit einem Wert von $\chi^2/dof = 1.075$ und Residuen innerhalb von ± 100 Counts eine ziemlich gute Näherung zum gemessenen Signal.

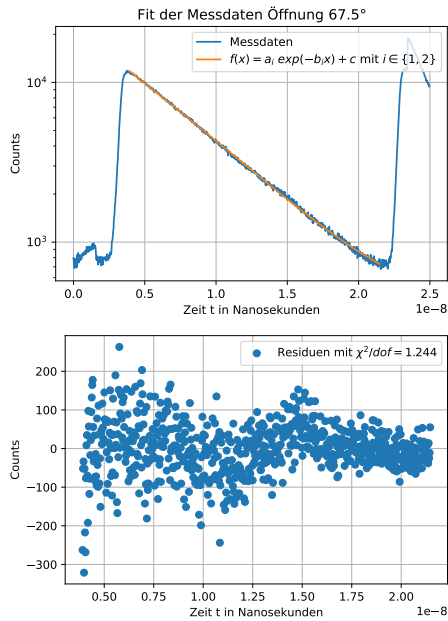


Abbildung 12: Fits 67.5 Grad Lambda-Gate

Eine deutliche Verschlechterung gegenüber, dafür aber mit einem um eine volle Größenordnung stärkeren Signal versehen, stellt bei einem Öffnungswinkel von 67.5° des $\lambda/2$ -Gates der Fit des Signals oben mit einem Wert von $\chi^2/dof = 1.244$ und Residuen in einem Bereich von ± 300 Counts.

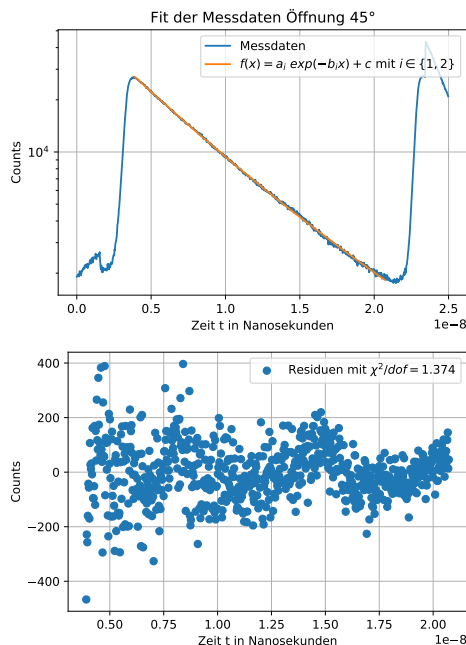


Abbildung 13: Fits 45 Grad Lambda-Gate

Anscheinend führen stärkere Signale zu größeren

Abweichungen des exponentiell zu erwartenden Abfalls von dem gemessenen Signal. Letztere Schlussfolgerung sieht sich mit dem letzten Fit für die Messung mit einem Öffnungswinkel von 45° des $\lambda/2$ -Gates verstärkt, da bei dieser Öffnung das Signal am stärksten und der Fit dafür am meisten von den Messwerten abweicht, mit einem Wert von $\chi^2/dof = 1.374$ und Residuen in einem sehr breiten Bereich von ± 400 Counts. Diese stärkere Streuung der Messwerte, die außerdem am Anfang der Messung in der Nähe des Peaks am meisten zu beobachten ist, führt zur Schlussfolgerung, dass der Peak-Pile-Up Effekt verantwortlich dafür ist, da sich Signale von Photonen am Detektor bei größeren Laserintensitäten anhäufen und somit Ausreißer deutlich vergrößert werden können. Aufgrund dessen erachtet sich für die folgenden Messungen als Kompromiss zwischen Signalstärke und Vermeidung des Pile-Up-Effektes die Wahl der 67.5° Einstellung für das $\lambda/2$ -Gate.

Messung der Reabsorption

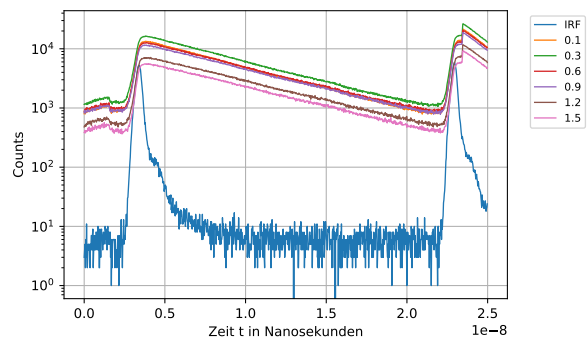


Abbildung 14: Messungen bei verschiedenen Pheo-Anteilen und optischen Dichten

Für die nächste Messung wurde die Reabsorption von Photonen aufgrund der Menge an Phäophorbid a in einer Ethanol-Lösung mithilfe von unterschiedlichen Stoffanteilen und somit optischen Dichten nachgewiesen. Die genauen Angaben zur Bestimmung der Stoffmenge für die erzielten optischen Dichten befinden sich im Anhang, ebenso wie die Fits, die erstellt wurden um die Abklingzeiten τ zu bestimmen. Diese sind nämlich abhängig von der optischen Dichte, da bei höheren ODs die Reabsorption von Photonen zu einer künstlichen Verlängerung der Abklingzeit führen würde.

Abklingszeiten		
OD	τ_1	τ_2
0.1	$(7.74 \pm 0.02)ns$	$(7.58 \pm 0.018)ns$
0.3	$(7.28 \pm 0.014)ns$	$(7.48 \pm 0.017)ns$
0.6	$(8.62 \pm 0.012)ns$	$(8.84 \pm 0.014)ns$
0.9	$(9.33 \pm 0.013)ns$	$(9.56 \pm 0.015)ns$
1.2	$(10.46 \pm 0.026)ns$	$(10.12 \pm 0.023)ns$
1.5	$(10.09 \pm 0.022)ns$	$(10.52 \pm 0.025)ns$

Man bemerkt, dass bis auf OD 0.1 zu 0.3 die Abklingszeiten im allgemeinen länger werden, je höher die optische Dichte ist. Dies führt zu einem verstärkten Grund dafür zu verdächtigen, dass die Reabsorption bei genug großer OD des PS die Messung der Abklingszeit beeinflussen kann. Insofern ist für den Referenzwert der Fluoreszenzlebensdauer die Messung mit der kleinsten OD -hier 0.1- zu nehmen.

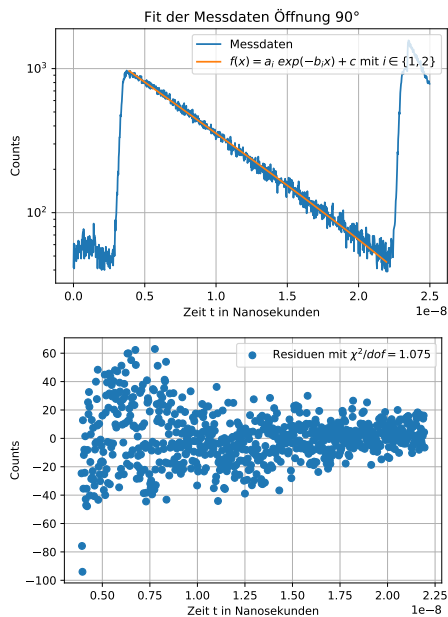


Abbildung 15: Fit und Residuen für OD = 0.1

Dieser Fit mit Residuen im Bereich ± 80 und $\chi^2 = 1.075$ stammt aus der Messung zu den Intensitäten und wurde ebenfalls bei einer OD von 0.1 gemessen. Dabei kamen folgende Werte für die Abklingszeiten zustande

$$\tau_1 = (6.19 \pm 0.005)ns \quad \tau_2 = (6.19 \pm 0.005)ns$$

Messung der Fluoreszenz

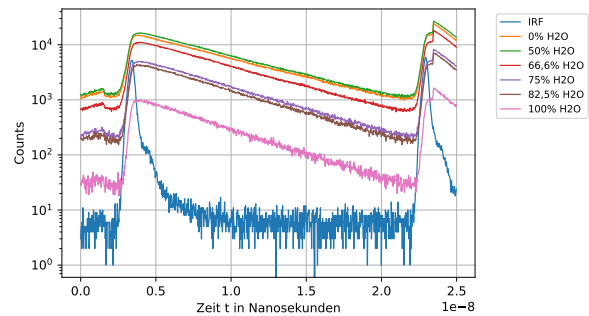


Abbildung 16: Messungen bei verschiedenen Wasseranteilen

Anschließend wurde die Fluoreszenz von den Phäophorbid in unterschiedlichen Stoffgemischen von Wasser und Ethanol untersucht. Insbesondere war dabei nachzuweisen, dass aufgrund der Hydrophobie des Phäophorbids a die Fluoreszenz bei steigenden Wasseranteilen abnimmt. Dies ist in der Abbildung oben daran zu erkennen, dass die Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale bei steigenden Wasseranteilen ab 50% stark abnimmt. Bei 100% Wasser ist das Signal dann am schwächsten.

Pheophorbid a Lösung in Wasser-Ethanol-Gemisch mit Triton X-100 Tensid

Im folgenden wurde den Gemischproben mit 82,5% und 100% Wasseranteil im Lösungsmittel jeweils 5 und 2 Tropfen Triton X-100 zugeführt und deren Fluoreszenz gemessen. Deren Verläufe wurden nun mit den Verläufen ohne die Zufuhr von Triton-X100 verglichen.

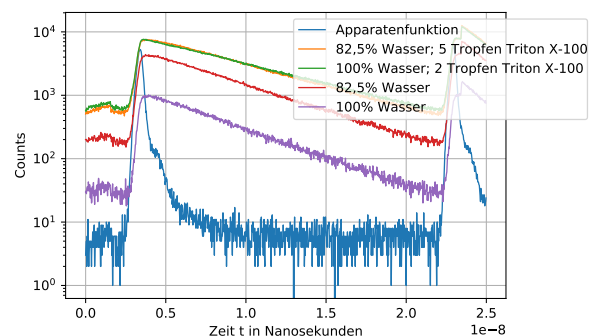


Abbildung 17: Messungen der Fluoreszenz Ausgewählter Wasser-Ethanol-Gemischen als Lösungsmittel mit und ohne Triton X-100

Wie in Abbildung zu sehen ist, sind die Intensitäten gestiegen. Das Triton X-100 löst durch Mizellenbildung um die Pheophorbid a Moleküle das wasserunlösliche PS im Wasser. Dies ermöglicht eine homogenere Verteilung des Farbstoffes, auf einem zu in einer Ethanol-Lösung vergleichbarem Niveau. Dadurch wird die Kollisionswahrscheinlichkeit mit Photonen des Lasers erhöht, was wiederum diese Entwicklung erklärt.

Daraufhin wurden die Anisotropien (r) der 100%igen Wasserlösung mit Triton X-100 und der Ethanol-Lösung ausgerechnet und grafisch dargestellt.

$$r = \left| \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right| [6] \quad (1)$$

Hierbei sind I_{\parallel} und I_{\perp} die Fluoreszenzintensitäten der zur Eingangspolarisation parallel und senkrecht polarisierten Photonen. Um diese zu ermitteln, wurde der Polarisationsfilter vor dem PMT variiert, und 2 Winkel -hier 0° und 90° - gewählt. Hierbei müssen die beiden Winkel zueinander um 90° versetzt sein. Es ist zu erwarten, dass die Anisotropie der Probe mit dem Tensid deutlich langsamer abfällt; da durch die sogenannte Rotationsdiffusion, welche während der Anregung eines Moleküls das Übergangsdipolmoment dessen um einen Winkel verdreht wird, die Anisotropie beeinflusst wird.

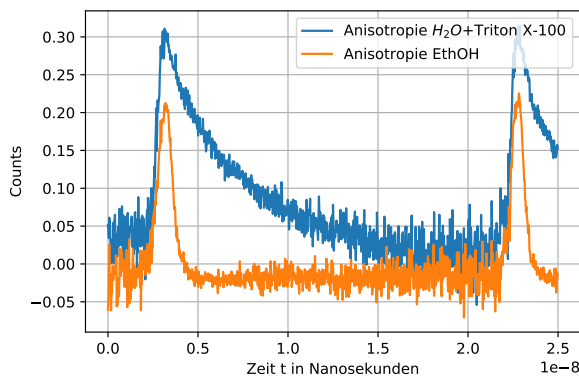


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Anisotropien, Bereinigt von Rechnerfehlern

Mit diesen Messungen ist diese Erwartung erfüllt. Wie aus Abbildung 18 klar wird, fällt die Anisotropie bei einer Lösung von Pheophorbid in Wasser mit Triton X-100 deutlich langsamer ab.

Bei der grafischen Darstellung ergaben sich zunächst irrsinnige Resultate, welche jedoch nach Bereinigung der irrelevanten Intervalle den Erwartungen entsprachen. Diese irrsinnigen Resultate können durch Überschneidung der Kurven wegen Rausch begründet werden, wodurch der Wert des Zählers unter null liegt, was wiederum ein der Programmiersprache und der

Computertechnik zu Grunde liegenden Fehler hervorbringt. Diese Stellen wurden wiederum teilweise manuell korrigiert. Eine unkorrigierte Grafische Darstellung (Abbildung 20) und mehr zur Fehlersuche in der Diskussion.

Ergebnisse und Diskussion

Ergebnisse

Aus den in den oberen Sektionen besprochenen Messungen ist zu entnehmen, dass die Fluoreszenz des Pheophorbid a Photosensibilisators in Wasser aufgrund von Hydrophobie stark abnimmt und nach Einbettung in Mizellen wieder auf einen vergleichbaren Intensitätsniveau steigt wie bei einer reinen Ethanol-Lösung. Die Abklingzeit der Fluoreszenz des Phäophorbid a wurde in Abhängigkeit der Reabsorption untersucht und befindet sich im Nanosekundenbereich mit einem lediglich bezüglich der electronic response time unkorrigierten Wert von $\tau = (6.19 \pm 0.005)ns$. Auch wurde die Anisotropie des PS festgestellt und grafisch gezeigt, wobei man die langsamere Abnahme der selbigen in Wasser mit Triton X100 im Vergleich zu Ethanol sehen kann.

Diskussion

Die Messergebnisse stimmen im Groben ganzen mit den theoretischen Erwartungen überein, doch einige "Outliers" wie die abnehmende Abklingzeit von OD 0.1 zu 0.3 oder auch Unsicherheiten in den gemessenen Werten und Plots bleiben vorhanden. Insbesondere beim Vergleich des ausgerechneten Wertes der Abklingzeit $\tau = (6.19 \pm 0.005)ns$ mit dem aus der Literatur $\tau_L = (5.9 \pm 0.1)ns$ [1] fällt auf, dass diese im allgemeinen zu übereinstimmen scheinen, aber auch dass die bestimmte Unsicherheit im Fit mit hoher Wahrscheinlichkeit unterschätzt wurde, da diese um zwei Größenordnungen niedriger ist als die, die in der Literatur angegeben wird, trotz ähnlichen Messmethoden und Geräten. Der Grund hierfür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an der Vernachlässigung mehrerer Fehler- und Unsicherheitsquellen beim erstellen der Modelfunktion, auf die unten gesondert eingegangen wird. Ebenso wird die Korrektur der Werte für die Anisotropie besprochen.

Fits

Die nichtlinearen Fits wurden nach der vereinfachten Modelfunktion

$$f(t) = a1 \cdot e^{-b1t} + a2 \cdot e^{-b2t} + c [6]$$

alleine ausgerechnet. Diese Modelfunktion sollte aber eigentlich als Teil eines Convolution-Integrals

$$f_m(t) = \int_{\tau=0}^t f(\tau)IRF(t - \tau)d\tau \quad [8]$$

gefittet worden sein, der die Apparaturkurve $IRF(t)$ und somit die electronic response time des Detektors einbezogen hätte. Letztere ist nämlich nicht fehlerfrei, sondern wird aufgrund mehrerer Unsicherheiten beim Empfangen eines Photons als Signal zu einer entsprechenden Verzerrung des echten Fluoreszenzsignals $f(t)$ bei dem gemessenen Signal $f_m(t)$ führen. Dies musste am Ende vernachlässigt werden, da die `scipy.optimize` Funktionen von `curve.fit` (Fit nach der Methode der kleinsten Quadrate) und `quad` (Integration) nicht in der Lage waren, auf sinnvolle Parameter zu konvergieren. Ein Fit mit dem Programm TCSPCV3 Beta war auch ausgeschlossen, da sich dieser unter Linux mit Wine nicht ohne weiteres ausführen lässt und die `.sdt` Dateiformate ohne Konvertierung auf `.asc` weiterhin nicht damit gelesen werden konnten. Insofern müssen alle Fits mit einer zusätzlichen Unsicherheit betrachtet werden, die aufgrund der fehlenden Einbeziehung der IRF bei der Bestimmung der Fits zustande kommen würden.

Anisotropien

Wie im Abschnitt zur Pheophorbid a Lösung in Wasser-Ethanol-Gemisch mit Triton X-100 erwähnt, wurde bei der Berechnung der Anisotropien eine Korrektur vorgenommen, da ohne diese die Anisotropie einen höchst sporadischen und unintuitiven Verlauf liefert.

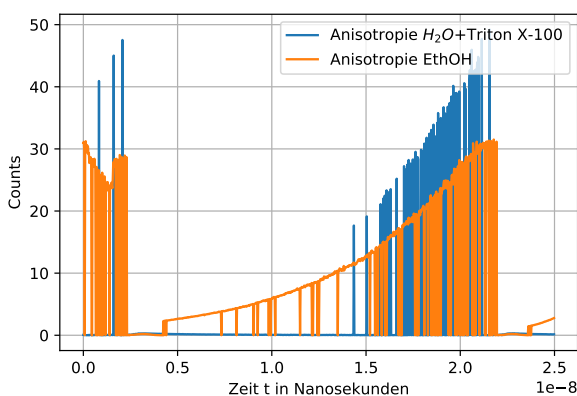


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Anisotropien, ohne Korrektur

Die Ursache wurde durch schrittweise Analyse des Fehlers entdeckt. Zunächst wurden die importierten Messreihen kontrolliert, indem diese vorübergehend

Grafisch dargestellt wurden. In diesem Schritt konnten keine Probleme festgestellt werden. Daraufhin wurde die Differenz im Zähler (verkleinert), $\frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{6000}$, für die tritonhaltige Probe grafisch dargestellt. Diese Darstellung wurde dann mit der dazugehörigen unkorrigierten Darstellung der Anisotropie verglichen.

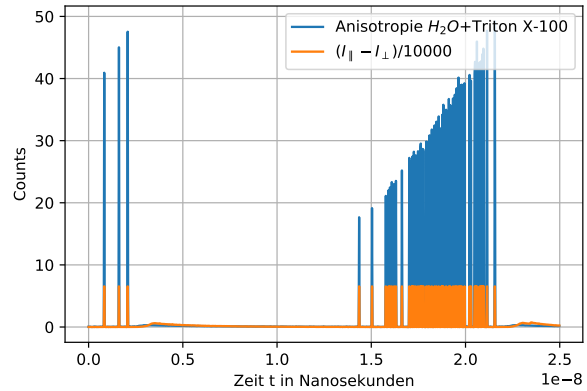


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Fehleranalyse zur Differenz im Zähler

Aus diesem Vergleich wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Fehlerquelle im Zähler der Gleichung 1 steckt. Bei Betrachtung dieser Werte löste sich ein Muster auf, woraus eine Hypothese aufgestellt wurde:

Wenn $I_{\parallel} < I_{\perp}$ so ist $I_{\parallel} - I_{\perp} < 0$, wodurch es zu einem sogenannten „Underflow-Fehler“ kommt.

Dies folgt direkt aus der Funktionsweise von Computern, und wie diese Zahlen abspeichern. Kurz zusammengefasst: Die Funktion, die diese Daten importiert hat, und für die Programmiersprache verständlich formatiert hat, wurde mit der Grundannahme konzipiert, dass diese Daten nur positive Werte aufnehmen können. Dies ist zwar aus einer leistungsorientierten Sicht äußerst attraktiv, da so weniger Ressourcen – in diesem Falle hauptsächlich Cache und Arbeitsspeicher – verbraucht werden; aber für die Weiterbearbeitung mit der Möglichkeit von negativen Werten als Resultat fatal. Tatsächlich wird so ein Wert von -1 zu 65535. Um diesen Fehler vorzubeugen, müssen die Messungen in einem anderen Format – oft Typ genannt – abgespeichert werden. Hier eignet sich ein „Signed-Integer“, also ein Ganzzahlenwert mit Vorzeichen (Signum), der eine höhere Bitgröße – in diesem Fall von `uint16` zu `int32`, wobei das `u` bei `uint` für „Unsigned“ steht.

Schlussfolgerungen und Fazit

Trotz der oben angegebenen Unsicherheiten und Vereinfachungen im Modell sind die Ergebnisse im Allgemeinen konsistent mit der Theorie und die weiterhin bestehende Fluoreszenz von Pheophorbid a in wasser-

haltigen Milieus nach Einbettung innerhalb von Mizellen nachgewiesen. Eine Anwendung als PS in solchen Umgebungen, so wie im inneren von Zellen, ist möglich ohne die Fluoreszenz des Phäophorbides zu beeinträchtigen, was die Rolle desselben in der photodynamischen Therapie zu einer realistischen Möglichkeit werden lässt.

Acknowledgements

Wir danken Herrn Dr. Steffen Hackbarth, für die wiederholte Justage am 26.02. und für die Kontrolle des Messaufbaus und der Dadurch erloschenen Fehlerquelle.

Literatur

- [1] Röder B, Hanke T, Oelckers S, and Hackbarth S und Symietz C. "Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems". In: *J. Porphyrins Phthalocyanines* **4** (2000), pp. 37–44.
- [2] Becker Hickl GmbH. "BHL-600 BHLP-700 Red and Near-Infrared Picosecond Diode Laser Modules". In: (2004).
- [3] Karlsruhe institut für Technologie Institut für Biologische Grenzflächen 4. *Praktikum Instrumentelle Bioanalytik Versuch: Fluoreszenzspektroskopie*. URL: https://www.ioc.kit.edu/luy/downloads/fluoreszenz_bioanalytik.pdf (visited on 02/17/2021).
- [4] Hamamatsu Photonics K. K. *Metal Package PMT Photosensor Modules H10720/H10721 Series, Datasheet*.
- [5] Hamamatsu Photonics K. K. *PHOTOMULTIPLIER TUBES Basics and Applications THIRD EDITION (Edition 3a)*. 2007.
- [6] Hackbarth S. *ZEITKORELLIERTE EINZELPHOTONENZÄHLUNG - VERSUCHSSKRIPT*. 2020. URL: <https://www-pbp.physik.hu-berlin.de/Lehre/SPC/SKRIPT-SPC.pdf> (visited on 02/15/2021).
- [7] Hackbarth S. *Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung - Versuchsskript*. 2020. URL: <https://www-pbp.physik.hu-berlin.de/Lehre/SPC/SPCSkript.pdf>.
- [8] Becker W. *The bh TCSPC Handbook*. 2012.

Anhang

TCSPC

February 20, 2021

1 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Santiago.R, Birge.T

```
[1]: import numpy as np
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import scipy as sp
from scipy.optimize import curve_fit
from scipy import stats
import sdtfile as sdt
data_path = '5.2.2021/'
```

Versuchsprotokoll

Aufbaumesswerte: -Wellenlänge des Lasers von $\lambda = 652nm$ - $OD = 2,4$ der Phäophorbid Lösung -Optische Weglänge von $10mm$ an der Küvette -Betriebsspannung des Detektors $V_d = 0,8V$ -Polarisationsfilter 90°

SDT File Test

```
[2]: DataTest = sdt.SdtFile('datatest.sdt')
DataTest.header.revision
```

[2]: 28

```
[3]: print(DataTest)
```

SdtFile

```
datatest.sdt
FileRevision
  revision: 12
  module type: Unknown
*IDENTIFICATION
  ID          : SPC Setup & Data File
  Title       : datatest
  Version     : 1 725
  Revision    : 10 bits ADC
  Date        : 01-26-2021
  Time        : 14:07:32
```

```

    Author      : Unknown
    Company     : Unknown
    Contents    :
*END
BlockType
mode: MEAS_DATA_FROM_FILE
contents: PAGE_BLOCK
dtype: uint16
compress: False
BlockType
mode: MEAS_DATA_FROM_FILE
contents: PAGE_BLOCK
dtype: uint16
compress: False
shapes:
(1, 1024)
(1, 1024)

```

```
[4]: print(DataTest.info)
```

```

*IDENTIFICATION
ID       : SPC Setup & Data File
Title    : datatest
Version  : 1 725
Revision : 10 bits ADC
Date     : 01-26-2021
Time     : 14:07:32
Author   : Unknown
Company  : Unknown
Contents :
*END

```

```
[5]: print(DataTest.measure_info[1])
```

```

[(b'14:01:36', b'01-26-2021', b'3095020008', 0, 19.764706, 80., -1.496063, 5.,
-2.1259842, 4, 4., 5.e-08, 2, 25.006105, 5.490196, 94.90196, 1024, 1, 1, 1, 2,
20.000261, 20.000261, 1, 83, 0, 4, 0., 128, 1, 0, b'SPC-300', 5., 1, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, 0, 0, 0., 0, 0, 64, 1, 0, 0, 0, 0, 1, 0, 2.4233809e-27, 457179136,
1245184, (0, 1, 3.85186e-34, 19464192, 20316486, 23658850, 4.242894e-38,
4.628615e-38, 5.032806e-38, 6.2450323e-38, 5.9144475e-38, 7.1633996e-38,
7.6409666e-38, 7.273619e-38, 30540233, 7.2736364e-38), (500, 534, 32244216,
1.2637207e-37, 42599015, 52888264, 1.1873271e-36, 1096, 1204, 1374, 1479, 1545,
113903280), 129042282, 140511298, 149882994, 149621010, 2332, 2284, 2326, 2304,
2207, (2.0226568e-33, 1.3122564e-33, 150145358, 146802935, 3.6416654e-34,
124847985))]

```

```
[6]: int(DataTest.measure_info[0].scan_x)
```

```
[6]: 64
```

```
[7]: len(DataTest.data)
```

```
[7]: 2
```

```
[8]: DataTest.data[1].shape
```

```
[8]: (1, 1024)
```

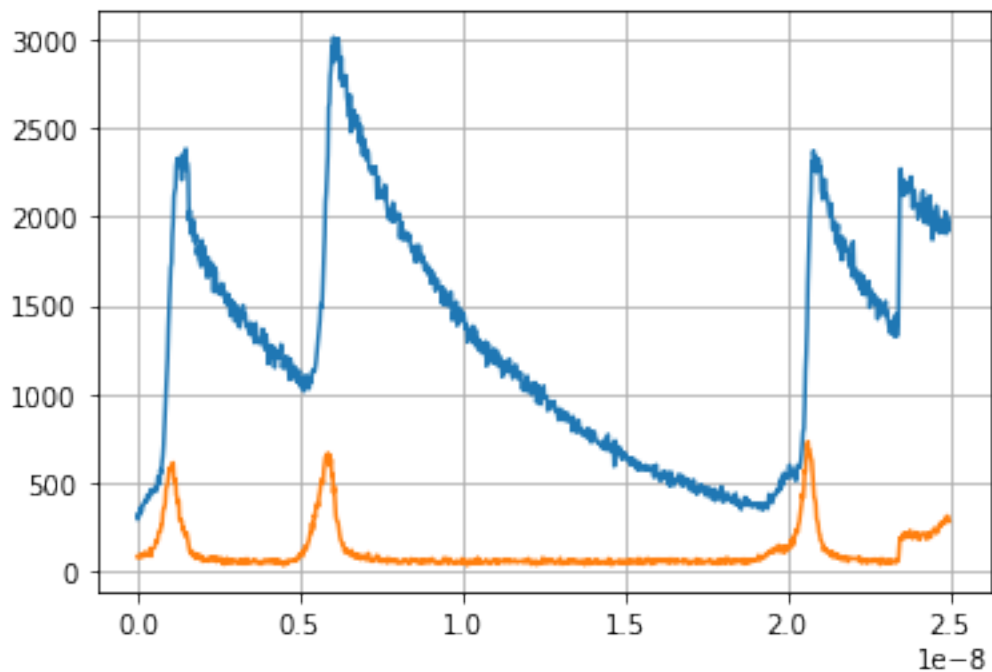
```
[9]: print(DataTest.data[0][0])
```

```
[ 297  326  310 ... 2005 1917 1968]
```

```
[10]: print(DataTest.times[0])
```

```
[0.00000000e+00 2.44140628e-11 4.88281256e-11 ... 2.49267581e-08  
2.49511722e-08 2.49755862e-08]
```

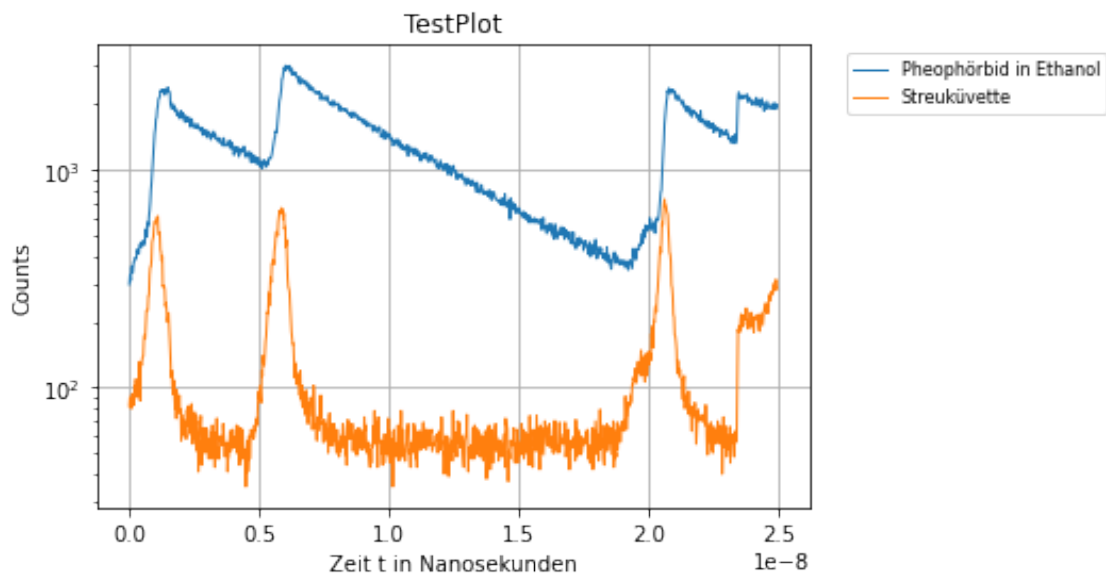
```
[11]: plt.plot(DataTest.times[0],DataTest.data[0][0])  
plt.plot(DataTest.times[1],DataTest.data[1][0])  
plt.grid(True)
```



Datenauswertung Funktion

```
[12]: def SDT_Auswertung(DataPath, Labels, file_name):
    sdt_data = sdt.SdtFile(DataPath)
    for i in range(0, len(sdt_data.data)):
        plt.plot(sdt_data.times[i], sdt_data.data[i][0], label= Labels[i],
        →linewidth=1.0)
    plt.xlabel('Zeit t in Nanosekunden')
    plt.ylabel('Counts')
    plt.yscale("log")
    plt.legend(bbox_to_anchor=(1.04,1), loc="upper left", prop={'size': 8})
    plt.grid(True)
    plt.savefig('Plots/' + file_name + '.pdf', bbox_inches="tight", dpi=1200)
    plt.title(file_name)
    plt.show
```

```
[13]: PlotNamen = ['Pheophörbid in Ethanol', 'Streuküvette']
SDT_Auswertung('datatest.sdt', PlotNamen, 'TestPlot')
```



Nicht Lineare Fit Funktion

Für den Fit der Messdaten wird die gemessene Funktion für die Fluoreszenz $f_m(t)$ mit dem Integral der Apparaturfunktion $IRF(t - \tau)$ und der echten Funktion für die Fluoreszenz $f(\tau)$ gleichgesetzt als $f_m(t) = \int_{\tau=0}^t f(\tau) IRF(t - \tau) d\tau$ und $f(\tau)$ mit der exponentiellen Modellfunktion $f(\tau) = a \cdot e^{-b\tau} + c$ mit Parametern a, b und $c \in \mathbb{R}$ gefittet.

```
[14]: # Define model function to be used to fit the IRF:
def gauss(x, a_g, b_g, c_g):
```

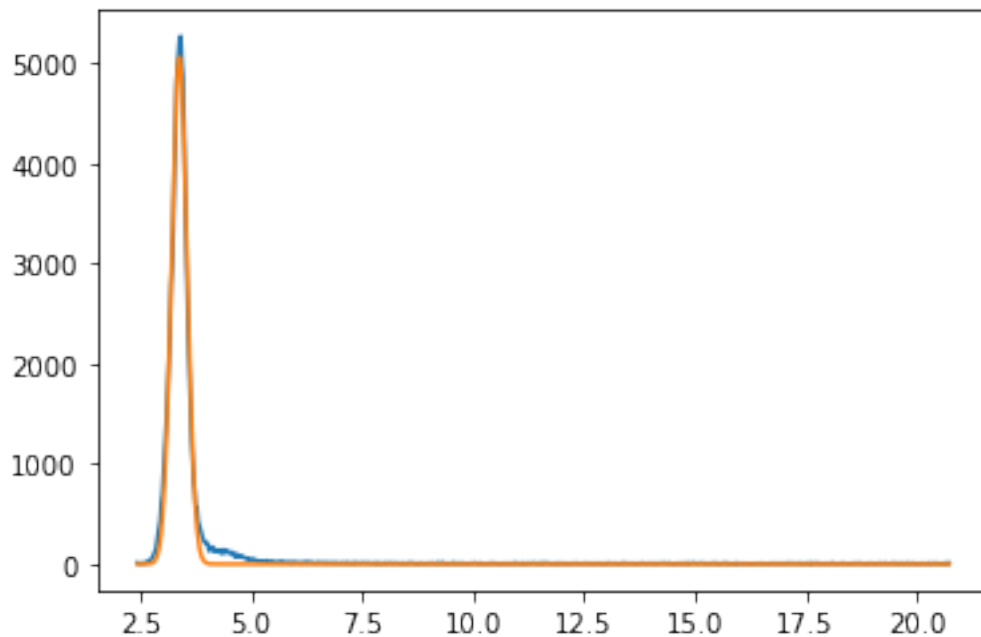


```

    y=a_g*np.exp(-((x-b_g)**2)/(2*c_g**2))
    return y
FitData=sdt.SdtFile(data_path+'phão_reabsorption.sdt')
set_number = 0
xdata = FitData.times[set_number][100:850]*1e9
ydata = FitData.data[set_number][0][100:850]
coeff_g, var_matrix = curve_fit(gauss, xdata, ydata)
hist_fit = gauss(xdata, *coeff_g)
plt.plot(xdata, ydata)
plt.plot(xdata, hist_fit, label='Fitted data')
print(coeff_g)

```

[5.06962350e+03 3.38369167e+00 1.73201590e-01]



```

[15]: from scipy.integrate import quad
from scipy.stats import norm
import numpy as np
a_g, b_g, c_g = coeff_g
def f(x,a1,b1,a2,b2,c):
    gauss = a_g*np.exp(-((x-b_g)**2)/(2*c_g**2))
    return gauss*a1*np.exp(-b1*x)+a2*np.exp(-b2*x)+c
def IntFit(xs,a1,b1,a2,b2,c):
    return [quad(f,x0,x,args=(a1,b1,a2,b2,c))[0] for x in xs]
#p0 = np.array([2.60393921e+04, 1.69429390e-01, 8.28698883e+01])
FitData=sdt.SdtFile(data_path+'phão_reabsorption.sdt')
set_number = 1

```

```
xdata = FitData.times[set_number][100:850]*1e9
ydata = FitData.data[set_number][0][100:850]
x0 = FitData.times[set_number][150]*1e9
#popt, pcov = curve_fit(IntFit,xdata,ydata)
#popt, pcov
```

```
[16]: #yfit = IntFit(xdata,*popt)
      #plt.plot(xdata,yfit)
      #plt.plot(xdata,ydata)
```

Hinweis: Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Implementierung eines Algorithmus, der die obigen Fits mittels dem Reconvolutionsintegral bestimmen kann, wurde unten auf einen Exponential mit zwei Termen der Fit durchgeführt und die IRF vernachlässigt. Dies hat zur Konsequenz, dass die bestimmten Abklingzeiten der Fluoreszenz deutlich fehlerbehafteter sind, doch jedoch geht die Erstellung eines Algorithmus in Python für Fits mit Integralen über Gauß oder ähnlichen Verteilungen samt der zu fittenden Funktion über die Anforderungen dieses Praktikums

Die vereinfachte Fit-Funktion ist eine Exponentialfunktion aus zwei Termen und einer Konstante $f(t) = a1 \cdot e^{-b1t} + a2 \cdot e^{-b2t} + c$ und wird lediglich beschränkt auf das Intervall der Abklingzeit $t_i \in [t_0, t]$, die durch den exponentiell abfallenden Funktionsbereich $f'(t_i) < 0$ gekennzeichnet wird, gefittet.

```
[17]: def DecayFit(x, a, a2, b, b2, c):
      return a*np.exp(-b*x)+a2*np.exp(-b2*x)+c
```

```
[18]: def SPC_Fit(data_set, set_number, left_bound,
      →right_bound,title_of_plot,savefile,file_format="pdf"):
      ## Plottet werte nach DecayFit
      # title_of_plot: String, Fügt zum title nach Messdaten den string hinzu
      # savefile: String, name der Output grafiken. Zu finden unter Plots
      # file_format: String, pdf oder png nach geschmack. Für die menge an
      →grafiken im protokoll empfohlen: pdf
      #

      FitData = sdt.SdtFile(data_set)
      xax = FitData.times[set_number]
      yax = FitData.data[set_number][0]
      xdata = FitData.times[set_number][left_bound:right_bound]
      ydata = FitData.data[set_number][0][left_bound:right_bound]
      pop, pcov = curve_fit(DecayFit, xdata, ydata,maxfev=5000)
      perr = np.sqrt(np.diag(pcov))
      # Do ChiSq
      chisq = sp.stats.chisquare(f_obs=ydata, f_exp=DecayFit(xdata, *pop))
      lab = "$f(x)=a_i~exp(-b_ix)+c$ mit $i$ in {1,2}$"
      #Plot Fit
      plt.figure(0)
      plt.plot(xax,yax, label="Messdaten")
```

```

plt.plot(xdata, DecayFit(xdata, *popt), label=lab)
plt.title("Fit der Messdaten "+title_of_plot)
plt.xlabel('Zeit t in Nanosekunden')
plt.ylabel('Counts')
plt.yscale("log")
plt.legend(loc="upper right")
plt.grid(True)
plt.savefig('Plots/' + savefile + "_Fit." + file_format, bbox_inches="tight",
→dpi=1200)
plt.show()
# Plot Residuals
plt.figure(2)
plt.plot(xdata,ydata-DecayFit(xdata, *popt),'o', label="Residuen mit  $\chi^2/$ 
→dof=$"+ str(round(chisq[0]/len(ydata-len(popt)),3)))
plt.xlabel('Zeit t in Nanosekunden')
plt.ylabel('Counts')
plt.legend(loc="upper right")
plt.grid(True)
plt.savefig('Plots/' + savefile + "_Resid." + file_format,
→bbox_inches="tight", dpi=1200)
plt.show()
print("ai=",popt[0],"+-", perr[0],",",popt[1],"+-", perr[1])
print("tau=1/bi=",1/popt[2],"+-", 1/popt[2]*perr[2]/popt[2] ,",",1/
→popt[3],"+-", 1/popt[3]*perr[3]/popt[3])
print("c=", popt[4],"+-", perr[4])
print("ReducedChisq=",str(round(chisq[0]/len(ydata-len(popt)),3)), ",
→P-Value=", chisq[1])
print(len(ydata),len(DecayFit(xdata, *popt)))

```

0. Test mit Streuküvette

bei unterschiedlichen Schwellwerten von 5 – 50mV mit einer Detektorspannung von 800V und danach mit einem Schwellwert von $V_{Sch} = 29.8mV$ bei unterschiedlichen Detektorspannungen 600 – 1000V Collection: 20 sekunden Gain = 2 Offset = 21 Lambda-Gate = 40° Graufilter

```

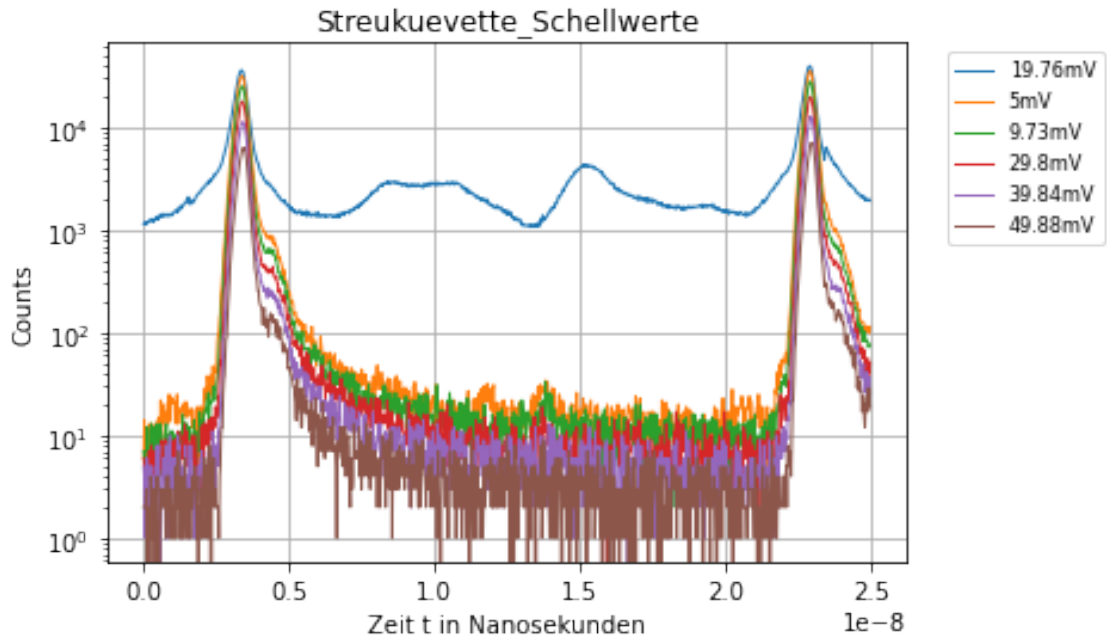
[19]: Schellwerte = ['19.76mV', '5mV', '9.73mV', '29.8mV', '39.84mV', '49.88mV'] #in
→Milivolt
Spannungswerte = ['700V', '750V', '800V', '850V', '900V', '950V', '1000V'] #in Volt

```

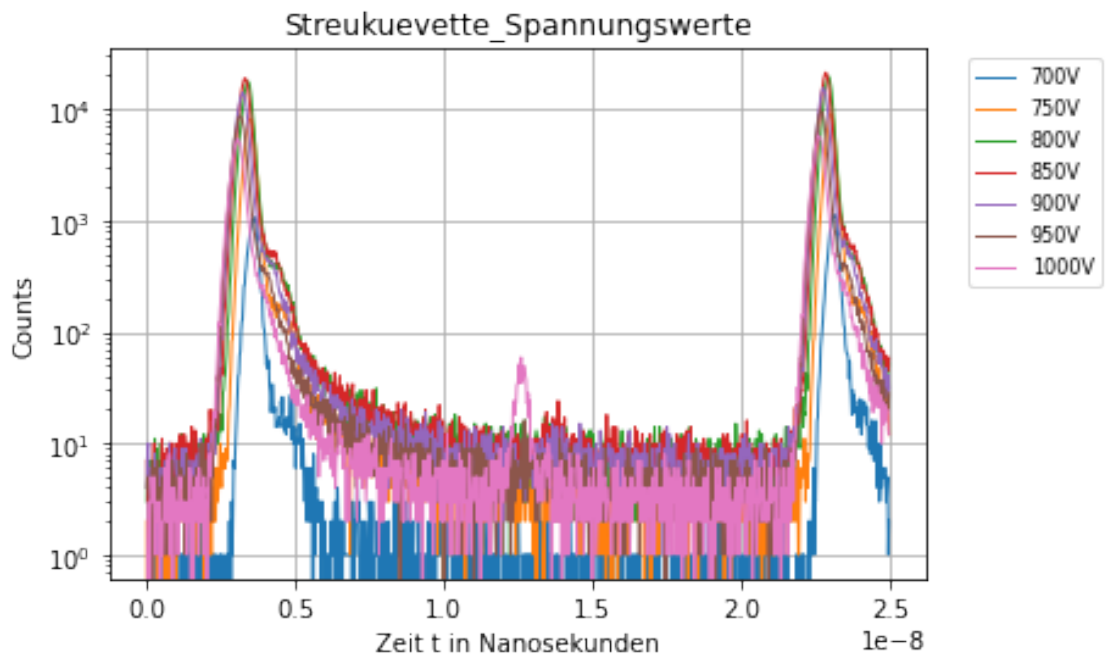
```

[20]: SDT_Auswertung(data_path+'streukuvette_schellwerte.
→sdt', Schellwerte, 'Streukuevette_Schellwerte')

```



```
[21]: SDT_Auswertung(data_path+'streukuvette_spannungswerte.sdt', Spannungswerte,
→ 'Streukuevette_Spannungswerte')
```

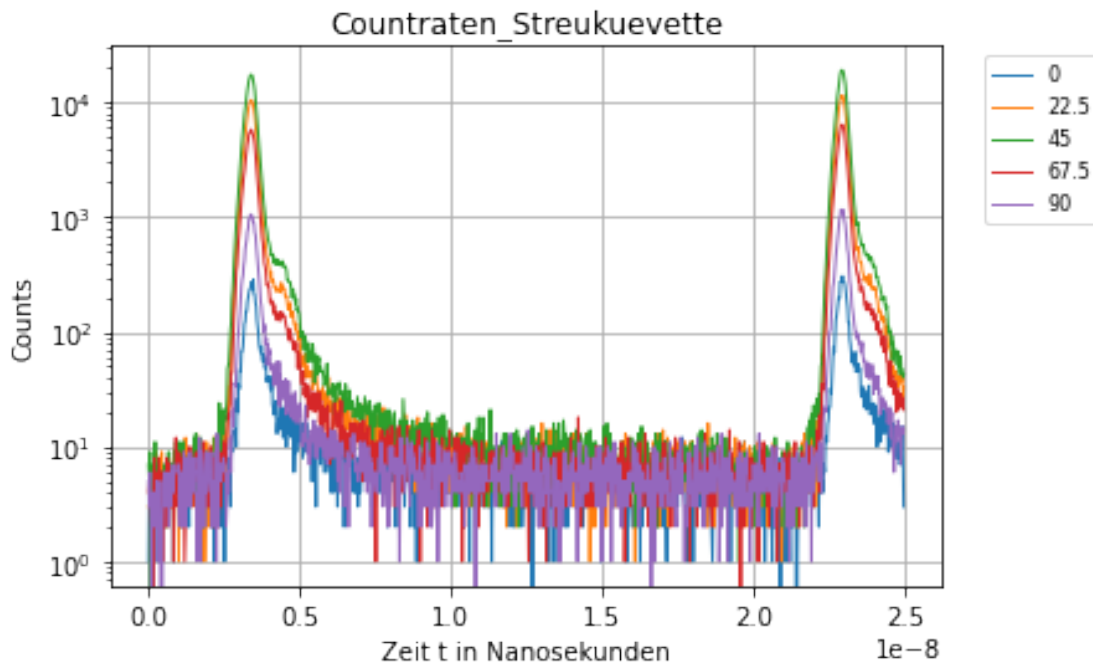


1. Countsraten Test mit Streuküvette

Apparatur-Test bei unterschiedlichen Countsraten von $1e3 - 1e6$ Collection: 20 Sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain = 2 Offset = 21 Lambda-Gate = $0^\circ-90^\circ$ Graufilter

```
[22] : Countsraten_CFD = [2.7e3,5.2e4,8.6e4,3e4,6.5e3]
       Countsraten_TAC = [2.5e3,5e4,8.2e4,2.84e4,6.2e3]
       Countsraten_ADC = [8.3e2,2e4,3.2e4,1.1e4,2.3e3]
       Lambda_Gate = [0,22.5,45,67.5,90]
```

```
[23] : SDT_Auswertung(data_path+'streukuvette_countsraten.sdt', Lambda_Gate, □
       →'Countraten_Streukuevette')
```

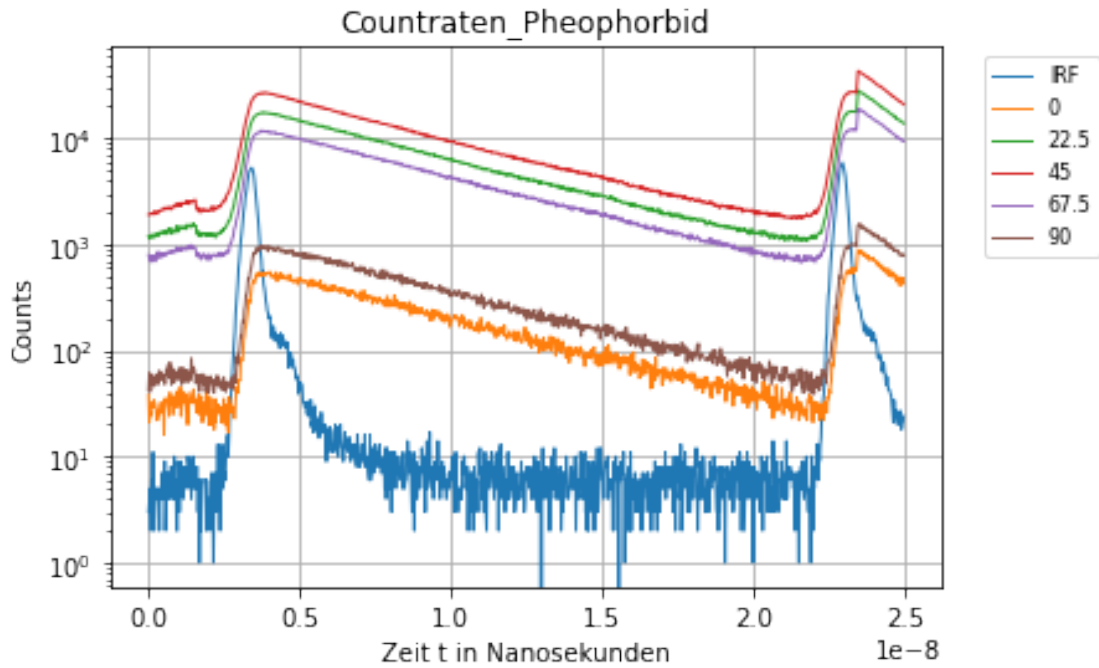


2. Test mit Pheophorbid a Lösung in Ethanol

bei OD von 0.1, bzw. Stoffmengen von $V_{Ph} = 60ul$ und $V_{Eth} = 1440ul$ und unterschiedlichen Countsraten Collection: 5 sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain = 2 Offset = 21 Lambda-Gate_Apparatefunktion = 67.5° Passfilter Notiz: Overflow nach 15.7 sekunden bei 45°

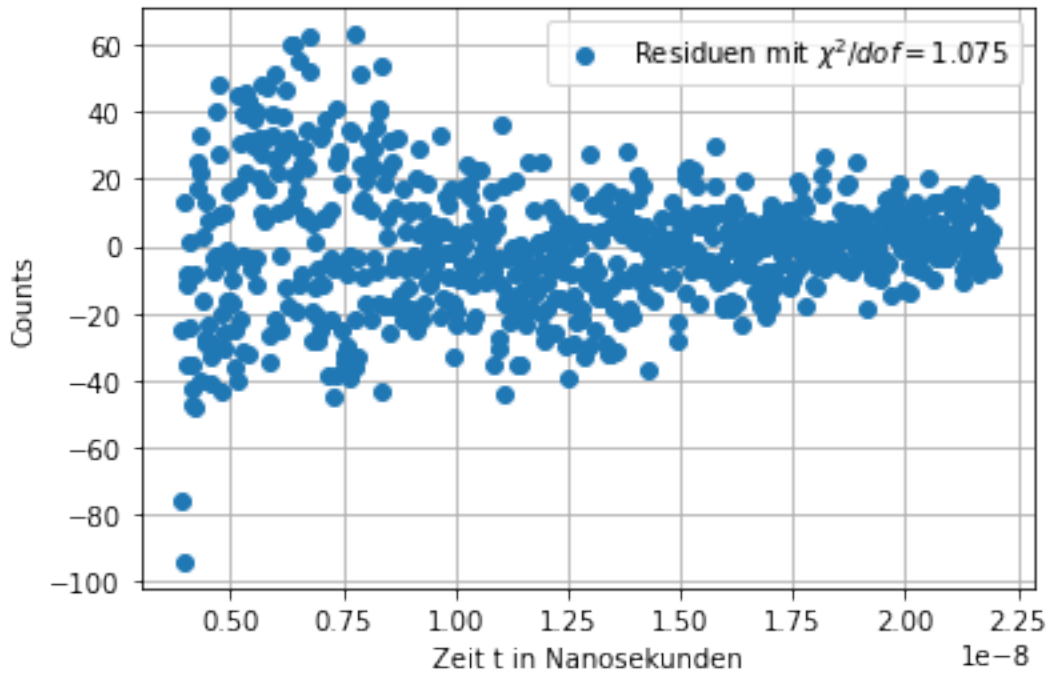
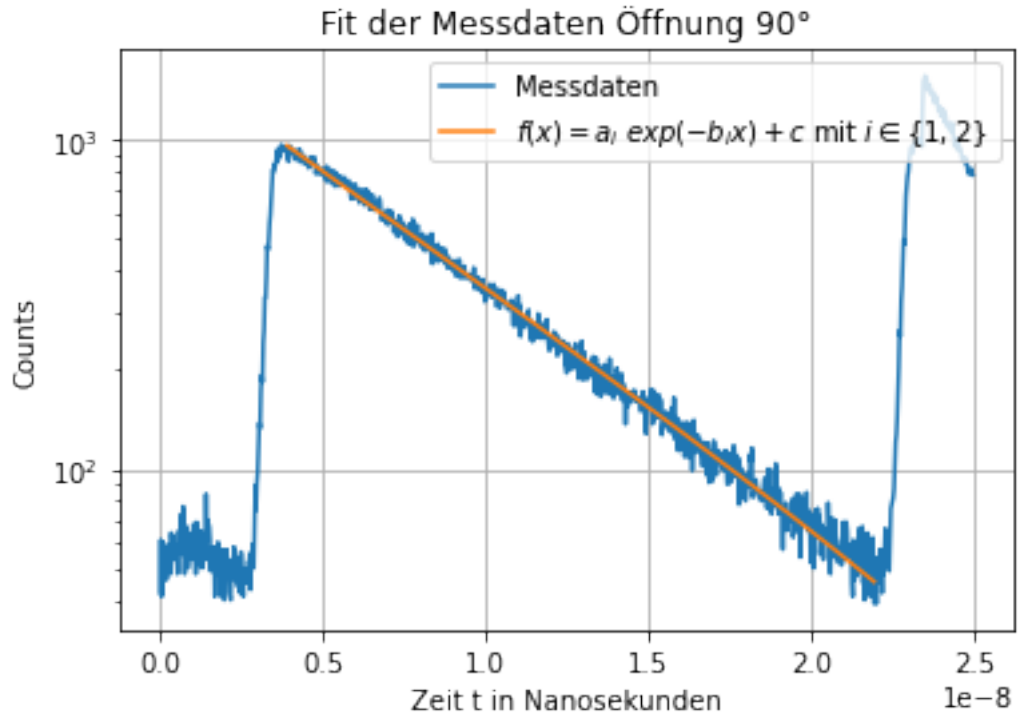
```
[24] : Countsraten_CFD = [1.5e5,5.45e6,8.95e6,3.48e6,6.4e3,2.64e5]
       Countsraten_TAC = [1.4e5,2.8e6,3.57e6,2.13e6,6.2e3,2.42e5]
       Countsraten_ADC = [4.3e4,7.9e5,9.47e5,6.28e5,2.3e3,7.49e4]
       Lambda_Gate = ['IRF',0,22.5,45,67.5,90]
```

```
[25] : SDT_Auswertung(data_path+'phao01_countsraten.sdt', Lambda_Gate, □
       →'Countraten_Pheophorbid')
```



```
[26]: SPC_Fit(data_path+'phao01_countsraten.sdt',5,160,900,'Öffnung 90°',
→'phao_counts_fit_90degree')
```

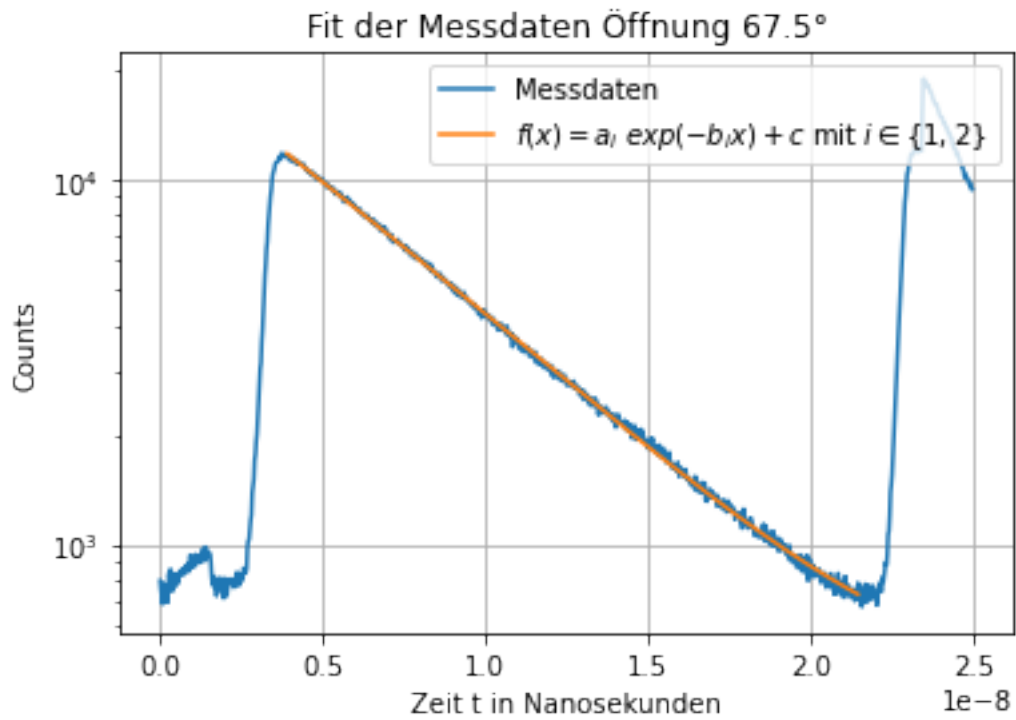
/home/santi/anaconda3/lib/python3.7/site-packages/ipykernel_launcher.py:14:
RuntimeWarning: invalid value encountered in sqrt

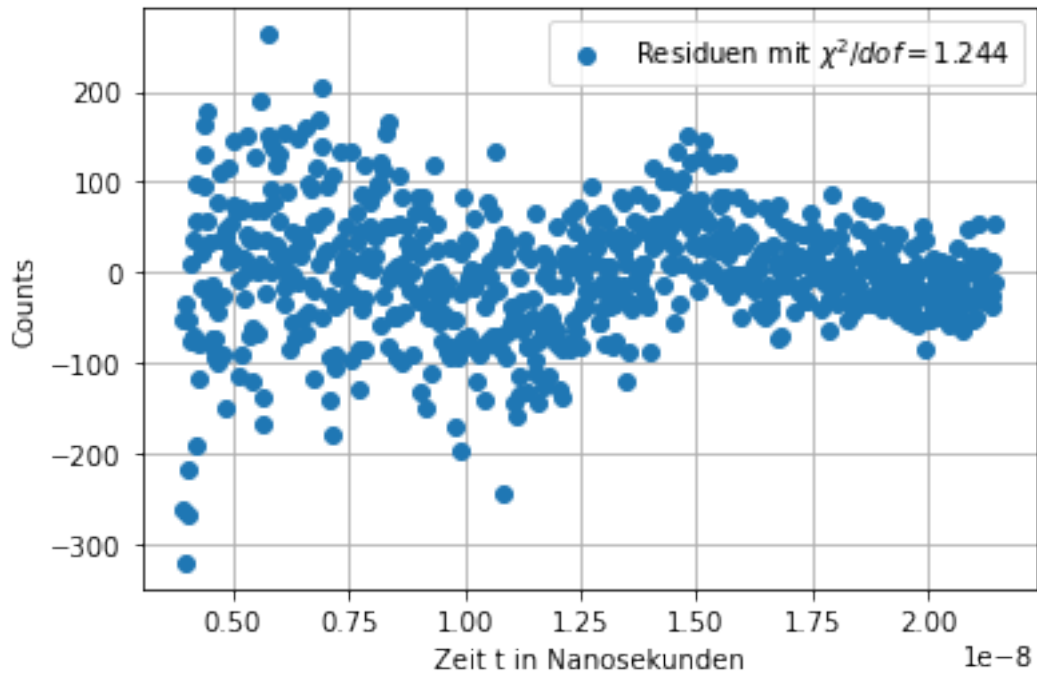


ai= 911.2457777719975 +- nan , 911.0956427417901 +- nan

tau=1/bi= 6.192784783736812e-09 +- 5.709097802512523e-06 ,
6.1925357011677165e-09 +- 5.714002281771825e-06
c= -7.169331187447161 +- 10.138704886774045
ReducedChisq= 1.075 , P-Value= 0.0725429995970515
740 740

```
[27]: SPC_Fit(data_path+'phäo01_countsraten.sdt',4,160,880,'Öffnung 67.5°',  
→'phao_counts_fit_67_5degree')
```





```

ai= 422407.04472007824 +- 586476450.9696982 , -401140.8614000073 +-
586475958.1062504
tau=1/bi= 8.577008998244667e-09 +- 1.2490643161022085e-07 , 8.7597297725991e-09
+- 1.3623227041978013e-07
c= 749.4207977392168 +- 681.9855926220348
ReducedChisq= 1.244 , P-Value= 7.133981176443176e-06
720 720

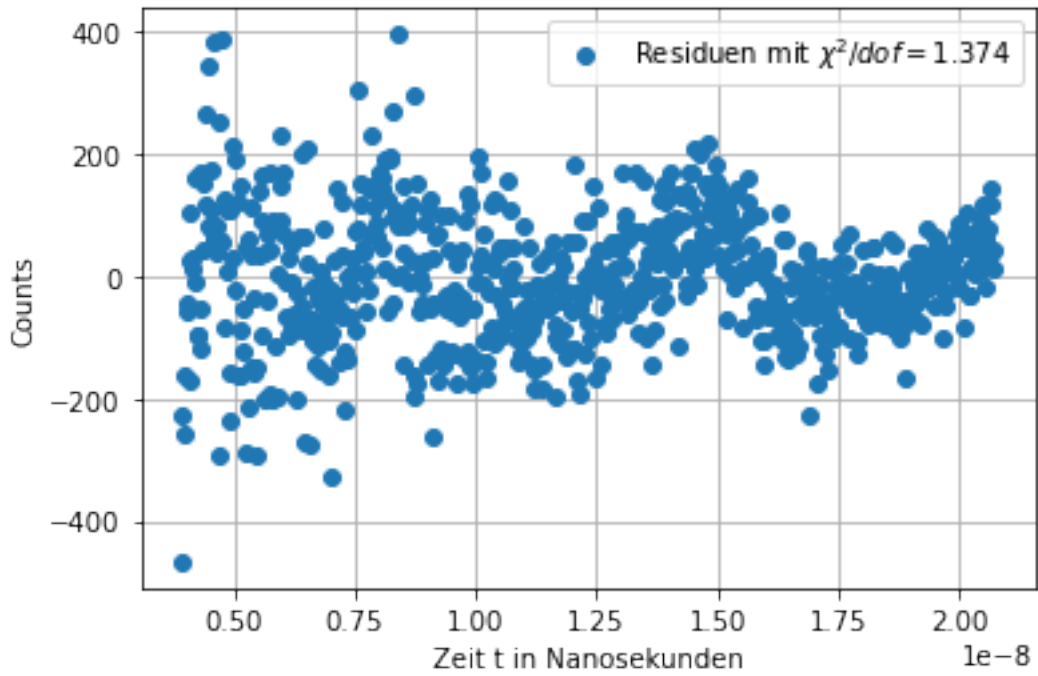
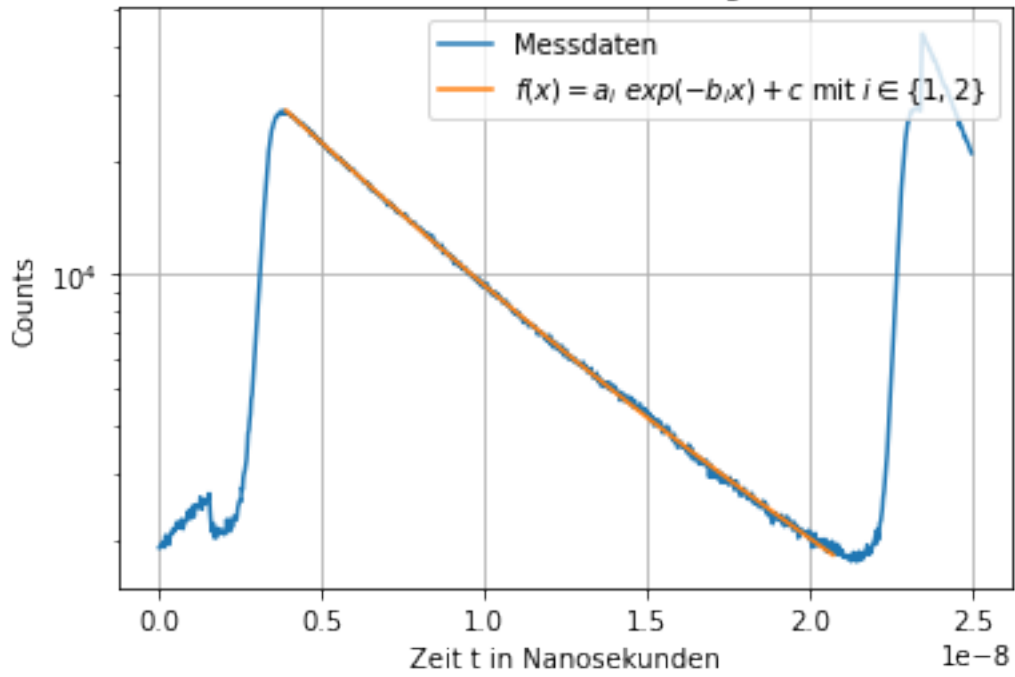
```

```

[28]: SPC_Fit(data_path+'phäo01_countsraten.sdt',3,160,850,'Öffnung 45°',
↳'phao_counts_fit_45degree')

```

Fit der Messdaten Öffnung 45°



$a_i = 47180.89378002288 \pm 14770.74613355725$, $8470.281791174746 \pm$

```
14502.58903666248
tau=1/bi= 4.908667203320355e-09 +- 5.894472091013826e-10 ,
1.0534908551582388e-08 +- 9.807042526409541e-09
c= -50.60602281950364 +- 727.1787374411069
ReducedChisq= 1.374 , P-Value= 1.8405887514984396e-10
690 690
```

3. Reabsorption mit unterschiedlichen Pheophorbid a Lösungen in Ethanol

bei OD von 0.1-1.5 Collection: 5 sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain
= 2 Offset = 21 Lambda-Gate = 67.5° Passfilter

Ausrechnen der Stoffmengen

```
[29]: OD = np.array([0.1,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5])
```

```
[30]: 2.4/OD*100
```

```
[30]: array([2400.      ,  800.      ,  400.      ,  266.66666667,
           200.      ,  160.      ])
```

```
[31]: 1500/(2.4+OD)*2.4/3
```

```
[31]: array([480.      , 444.44444444, 400.      , 363.63636364,
           333.33333333, 307.69230769])
```

```
[32]: 1500/(2.4+OD)*OD
```

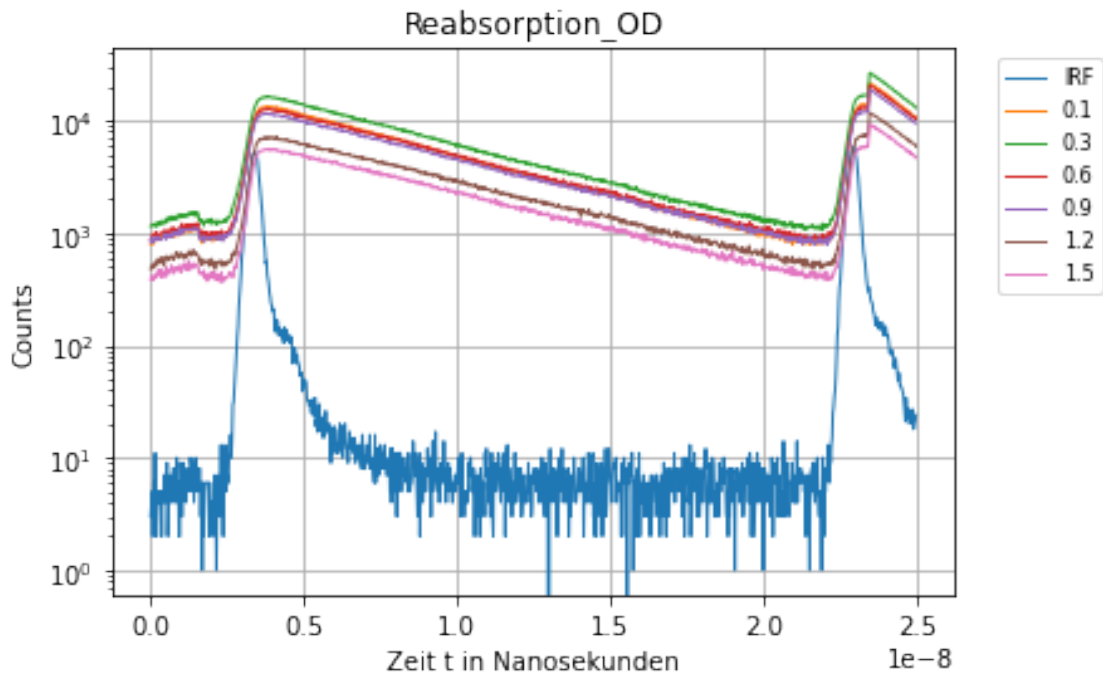
```
[32]: array([ 60.      , 166.66666667, 300.      , 409.09090909,
           500.      , 576.92307692])
```

```
[33]: #Funktionsrechner
      #N = Gesamte Stoffmenge in Microliter
      #Z_OD = Ziel Optische Dichte
      #OD_0 = Ursprüngliche Optische Dichte
      def Stoffmenge_OD(N,Z_OD,OD_0):
          N_1 = N_0/(OD_0+OD)*OD_0
          N_2 = N_0/(OD_0+OD)*OD
          return N_1,N_2
```

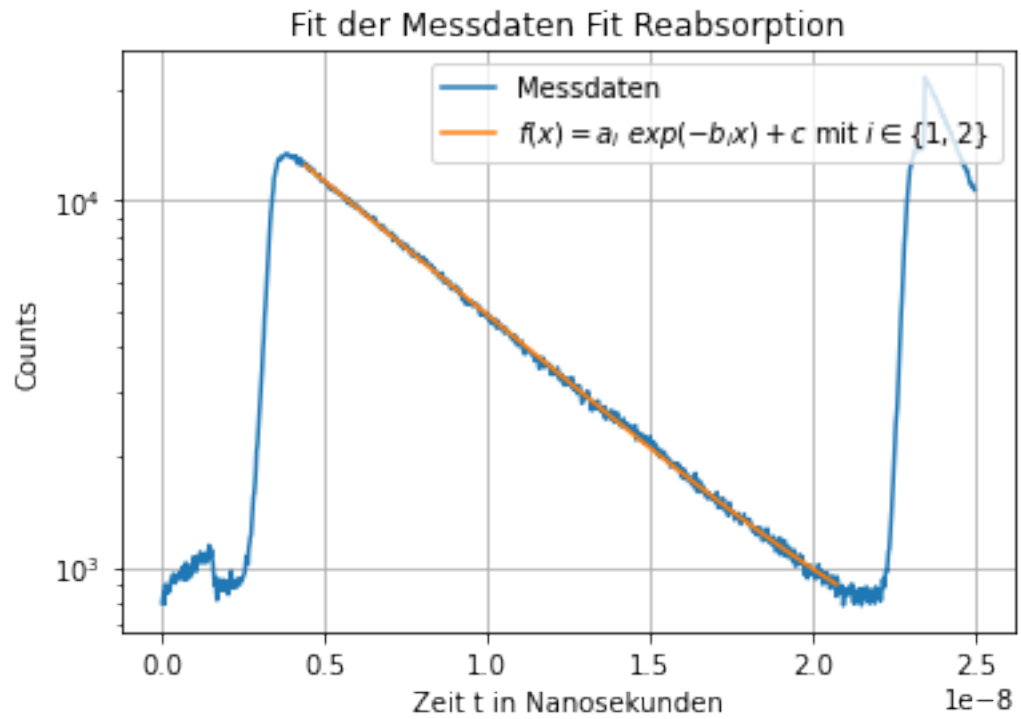
Messungen

```
[34]: OD = ['IRF',0.1,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5]
```

```
[35]: SDT_Auswertung(data_path+'phäo_reabsorption.sdt', OD, 'Reabsorption_OD')
```



```
[36]: SPC_Fit(data_path+'phäo_reabsorption.sdt',1,180,850,'Fit Reabsorption',
        →'phao_reab_fit1')
```





```

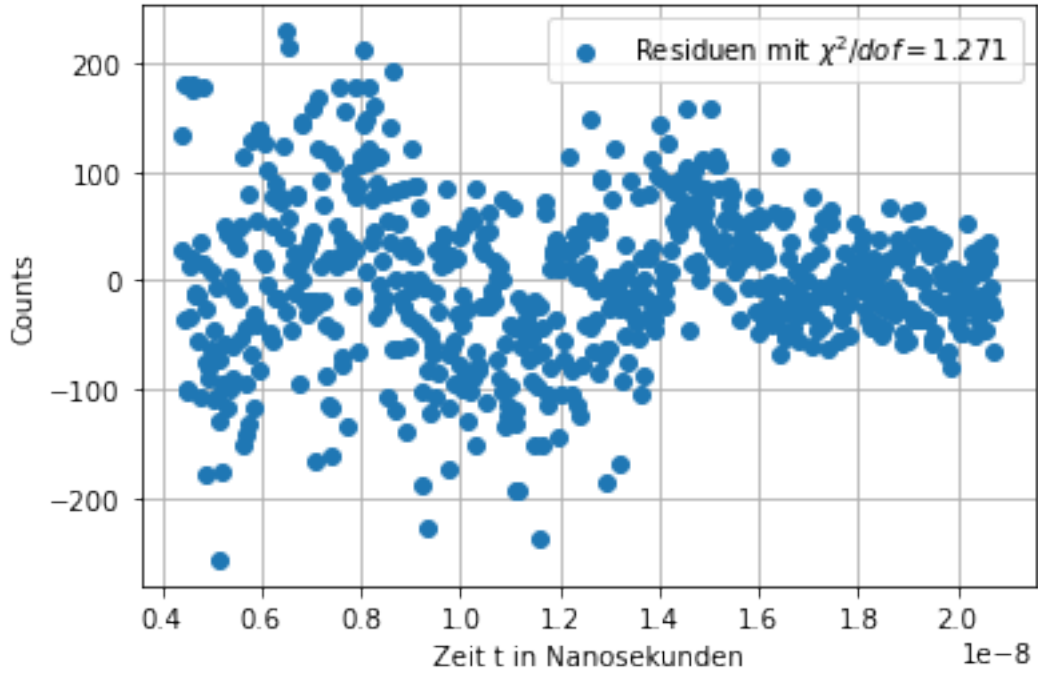
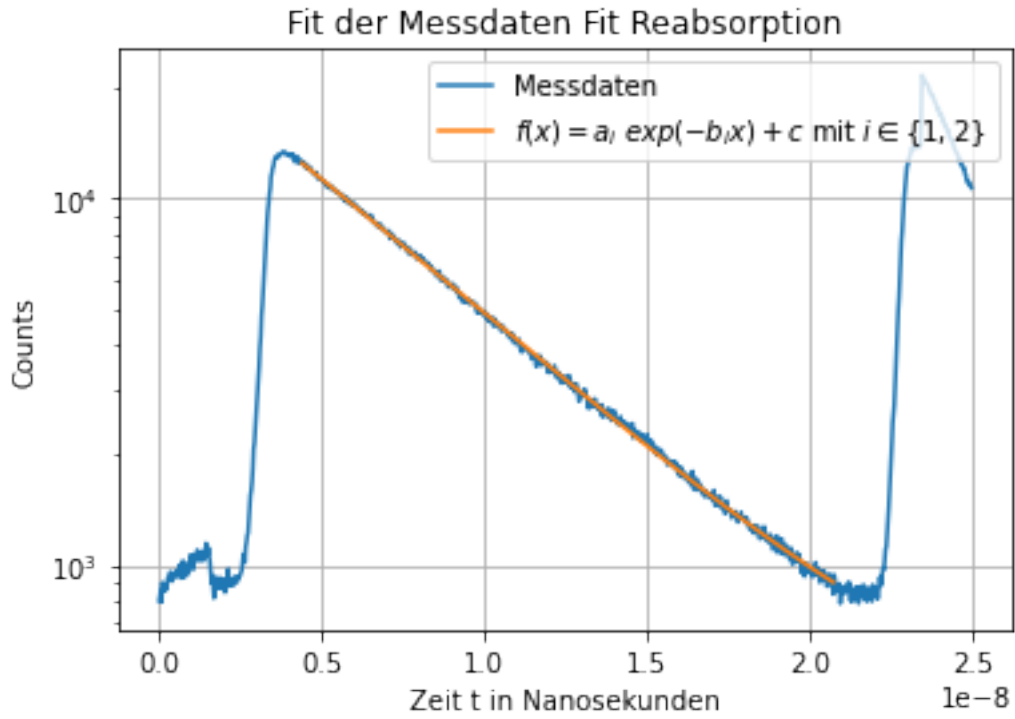
ai= -312579.54485316115 +- 753000181.263113 , 337849.4902637667 +-
753000548.364008
tau=1/bi= 7.739293470963729e-09 +- 1.9930849861185659e-07 ,
7.576663746896579e-09 +- 1.785770865697932e-07
c= 459.90319705894154 +- 756.58760950367
ReducedChisq= 1.271 , P-Value= 1.9462622219425486e-06
670 670

```

```

[37]: for i in range(1,4):
        SPC_Fit(data_path+'phäo_reabsorption.sdt',i,180,850,'Fit Reabsorption',
        ↳'phao_reab_fit')

```



$a_i = -312579.54485316115 \pm 753000181.263113$, $337849.4902637667 \pm$

753000548.364008

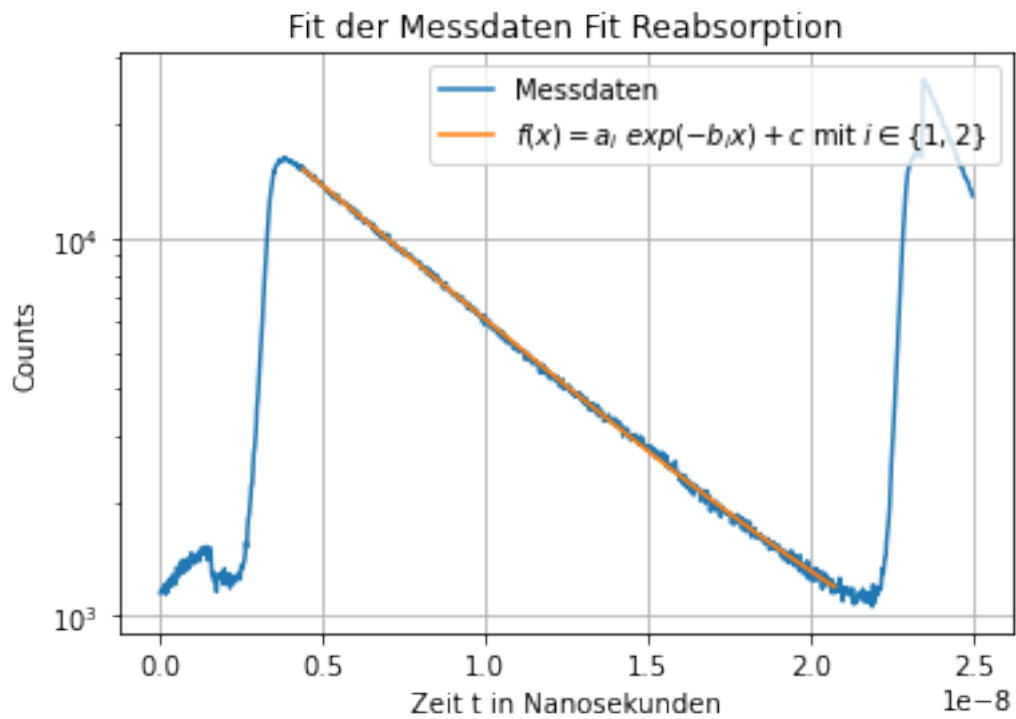
$\tau = 1/b_i = 7.739293470963729e-09 \pm 1.9930849861185659e-07$,

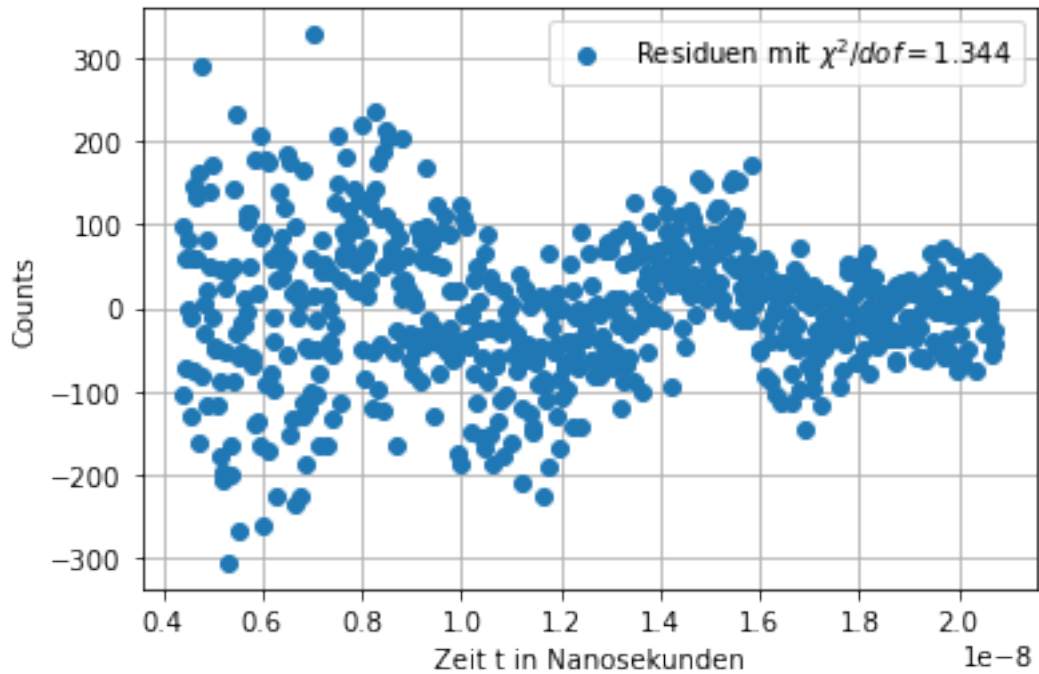
$7.576663746896579e-09 \pm 1.785770865697932e-07$

$c = 459.90319705894154 \pm 756.58760950367$

ReducedChisq= 1.271 , P-Value= 1.9462622219425486e-06

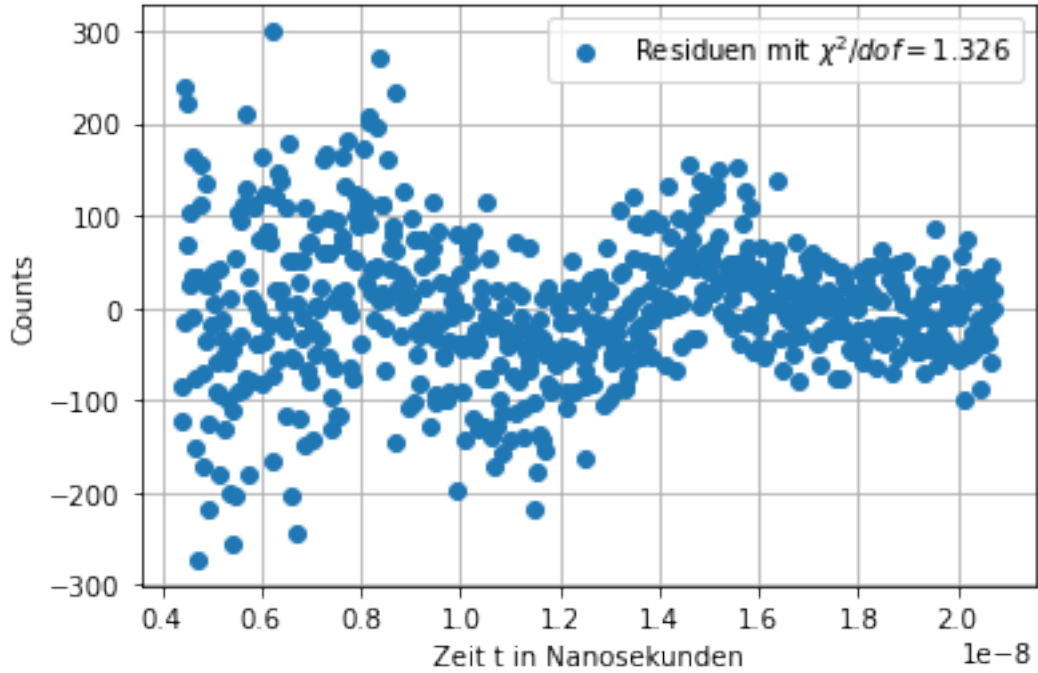
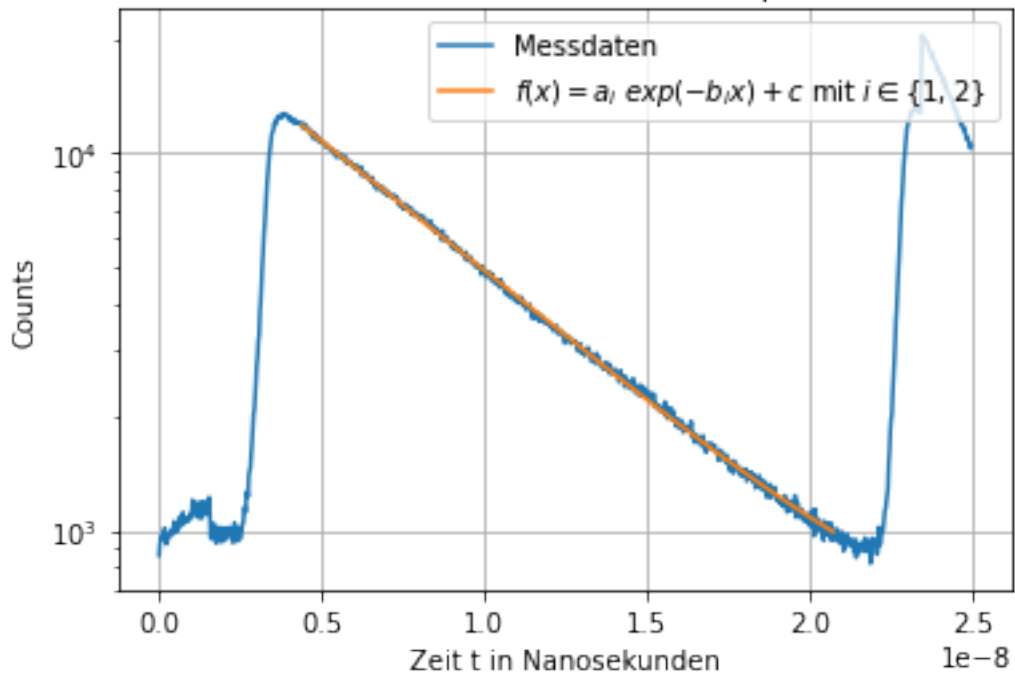
670 670





$a_i = 261118.79490116826 \pm 384251164.09517825$, $-230392.8823720249 \pm 384250900.47072893$
 $\tau = 1/b_i = 7.2832783900416835e-09 \pm 1.4187482722527844e-07$,
 $7.47959572324998e-09 \pm 1.6714389092332722e-07$
 $c = 449.6583631760009 \pm 714.9812234455497$
 ReducedChisq= 1.344 , P-Value= $4.982966984996177e-09$
 670 670

Fit der Messdaten Fit Reabsorption



$a_i = 341388.9409984178 \pm 397884456.5883294$, $-318862.6641052218 \pm$

397883911.00596964

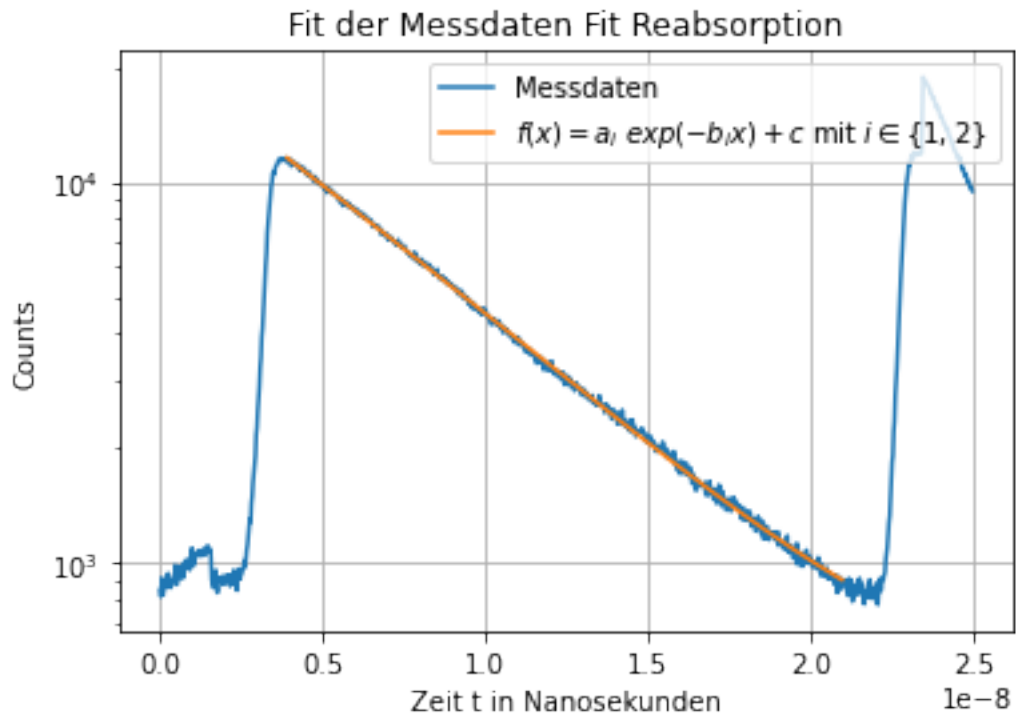
$\tau=1/b_i = 8.62409426072528e-09 \pm 1.234439356615075e-07$, $8.840105956165622e-09$
 $\pm 1.3774926312467565e-07$

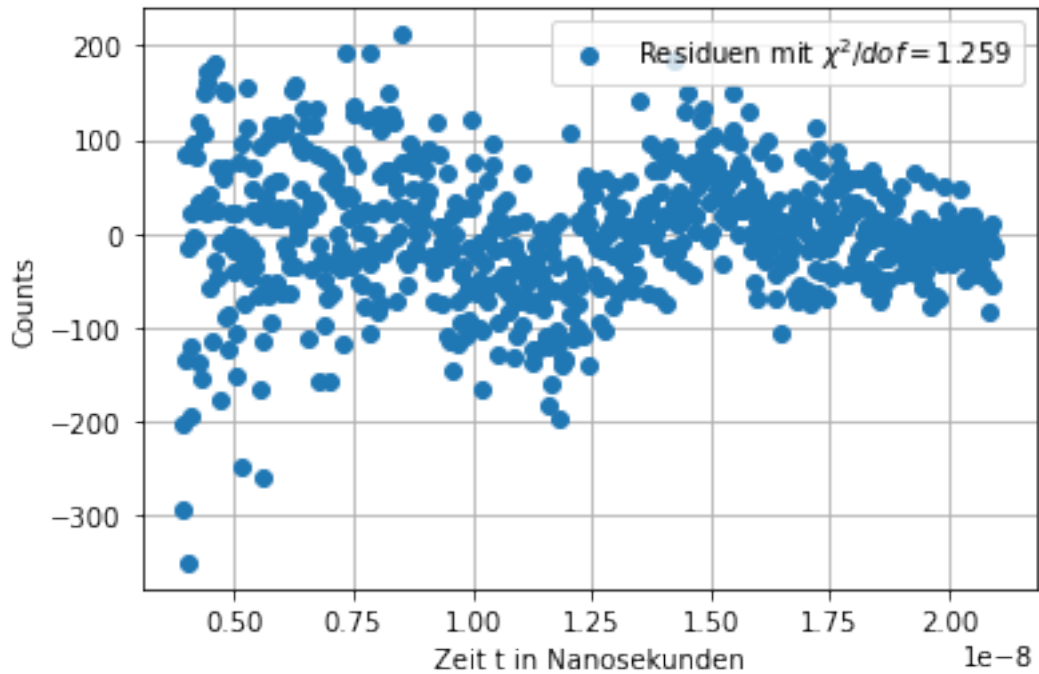
$c = 702.0725756061667 \pm 766.0390007190655$

ReducedChisq= 1.326 , P-Value= $2.424156007417096e-08$

670 670

```
[38]: SPC_Fit(data_path+'phäo_reabsorption.sdt',4,160,860,'Fit Reabsorption',  
→'phao_reab_fit1')
```





```

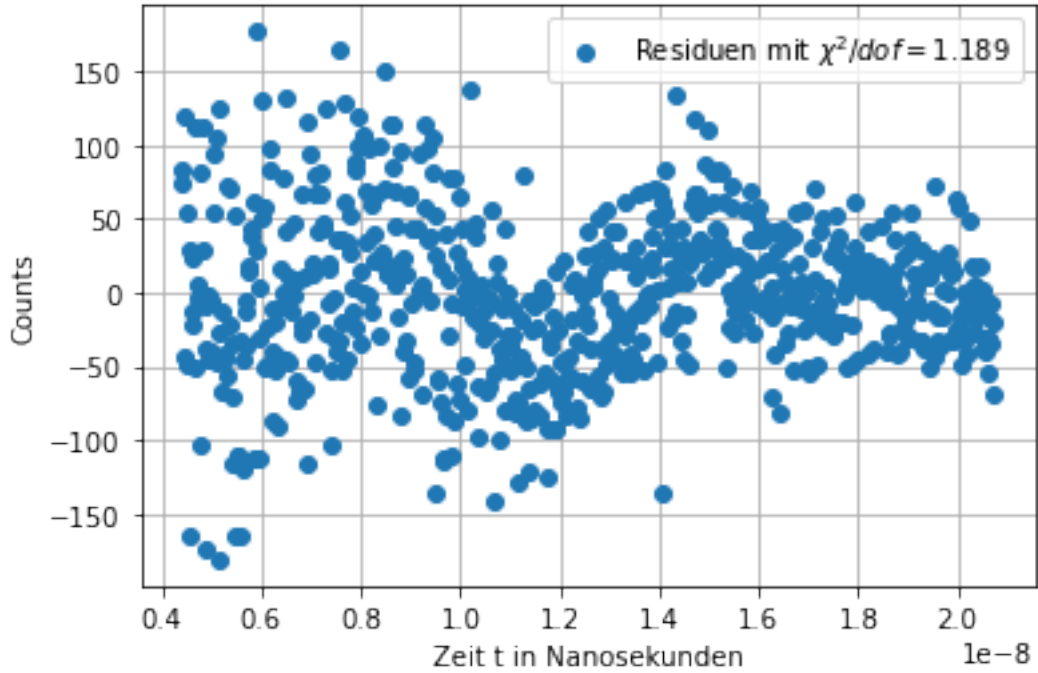
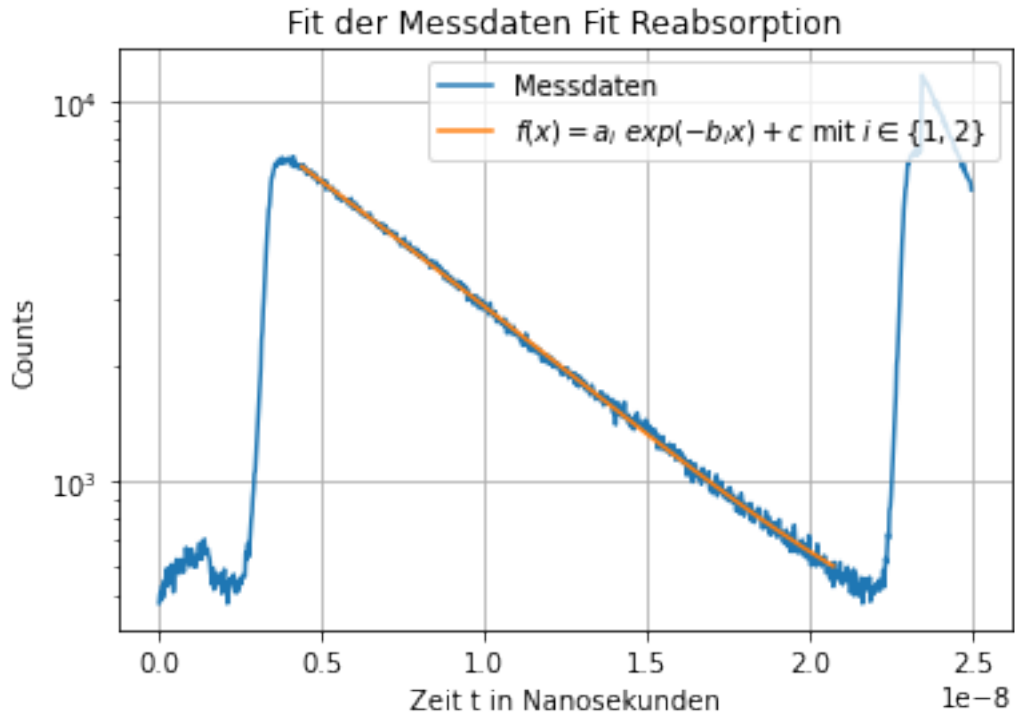
ai= 364532.93255717866 +- 422378197.8376763 , -344740.75199464505 +-
422377457.003807
tau=1/bi= 9.330559014692358e-09 +- 1.3197130794778488e-07 ,
9.562978911307343e-09 +- 1.4581797425129496e-07
c= 860.1228150036703 +- 895.5960459618763
ReducedChisq= 1.259 , P-Value= 3.1462999861016893e-06
700 700

```

```

[39]: SPC_Fit(data_path+'phäo_reabsorption.sdt',5,180,850,'Fit Reabsorption',
↳'phao_reab_fit1')

```



$a_i = -186227.0311967205 \pm 274036248.04792875$, $198161.69074521036 \pm$

274037605.21695405

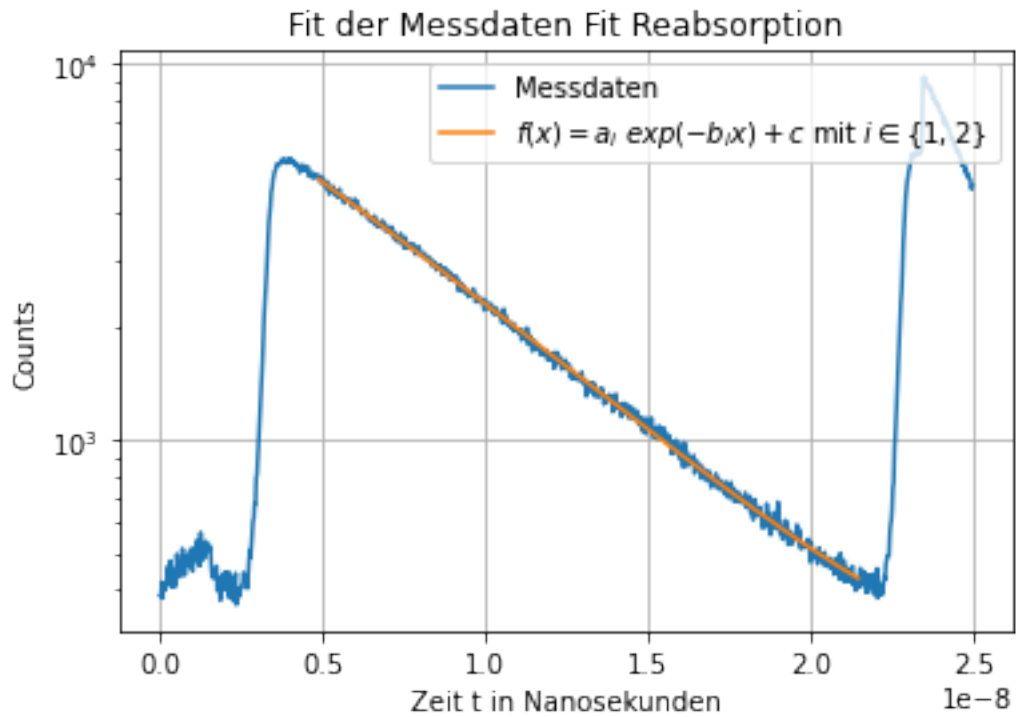
$\tau = 1/b_i = 1.046440323162372e-08 \pm 2.60455162207841e-07$, $1.0121636710810711e-08$
 $\pm 2.30054093199325e-07$

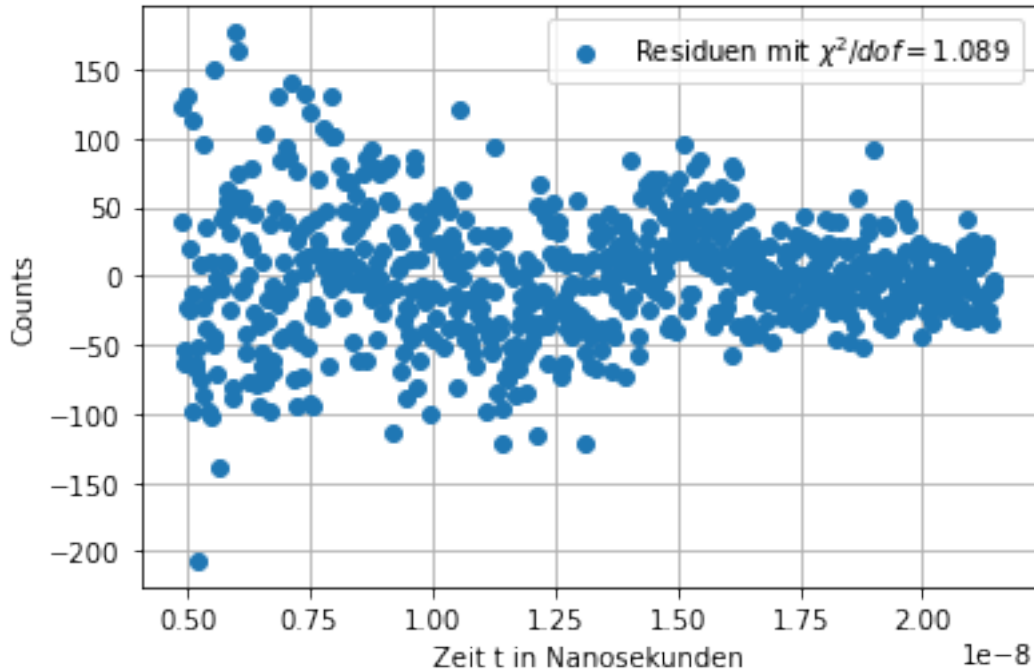
$c = 725.7233794265439 \pm 1560.91610919402$

ReducedChisq= 1.189 , P-Value= 0.0004686370247945138

670 670

```
[40]: SPC_Fit(data_path+'phäo_reabsorption.sdt',6,200,880,'Fit Reabsorption',  
→'phao_reab_fit1')
```





```
ai= 119332.94479090422 +- 124947598.78579633 , -109954.38302367581 +-
124946506.90378353
tau=1/bi= 1.0098551640271815e-08 +- 2.1670090388009828e-07 ,
1.0527404424320833e-08 +- 2.535368102722098e-07
c= 495.4285607394066 +- 1310.6047310279273
ReducedChisq= 1.089 , P-Value= 0.05123599482702629
680 680
```

4. Fluoreszenz von Phäophorbid bei unterschiedlichen Proportionen von Ethanol-Wasser

OD von 0.6, $V_{Ph} = 300ul$ und unterschiedliche Anteile von $V_{LM} = 1200ul$ an Wasser/Ethanol
 Collection: 5 sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain = 2 Offset = 21
 Lambda-Gate = 67.5° Passfilter

```
[41]: Anteile_Ethanol = np.array([1,1/2,1/3,1/4,1/5,0])*1200
Anteile_Wasser = np.array([0,1/2,2/3,3/4,4/5,1])*1200
print(Anteile_Ethanol,Anteile_Wasser)
```

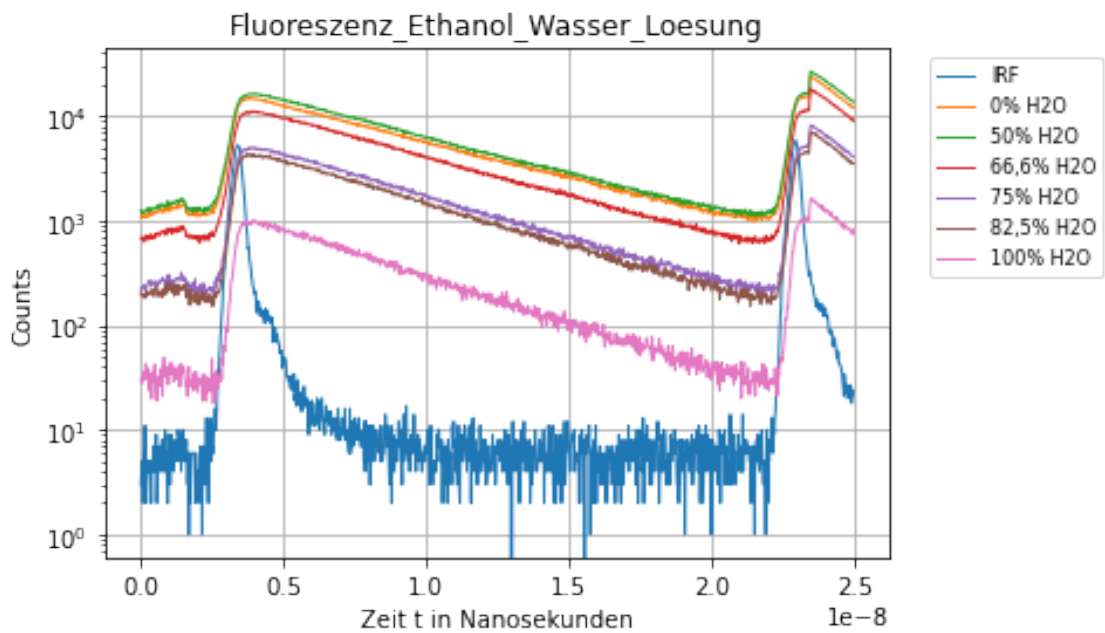
```
[1200.  600.  400.  300.  240.    0.] [  0.  600.  800.  900.  960. 1200.]
```

```
[42]: 960/3
```

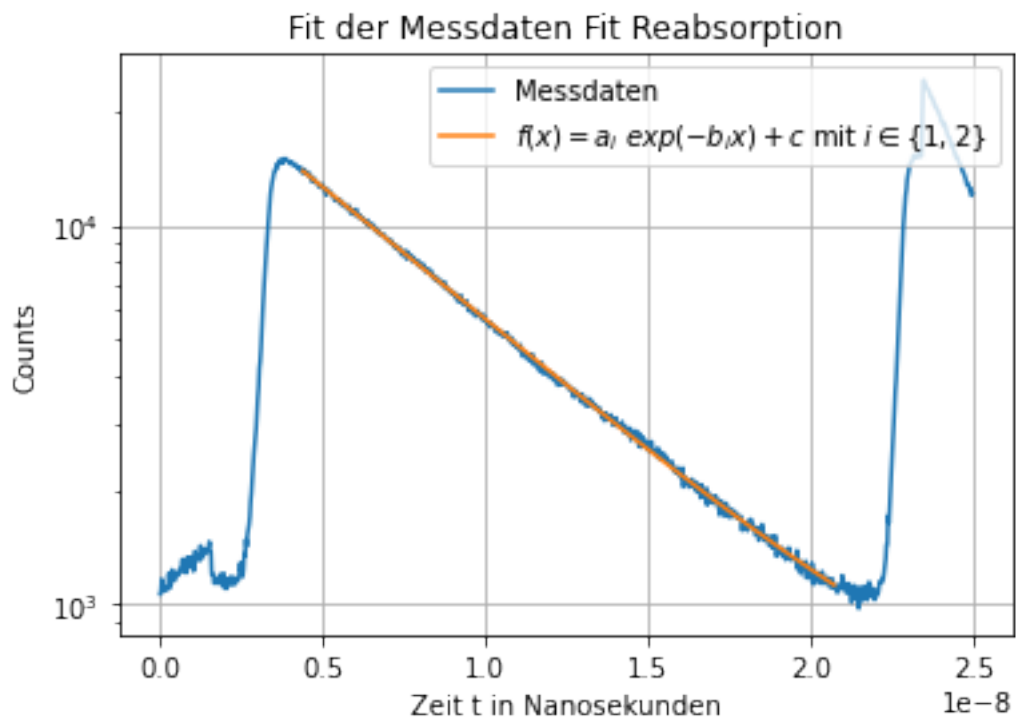
```
[42]: 320.0
```

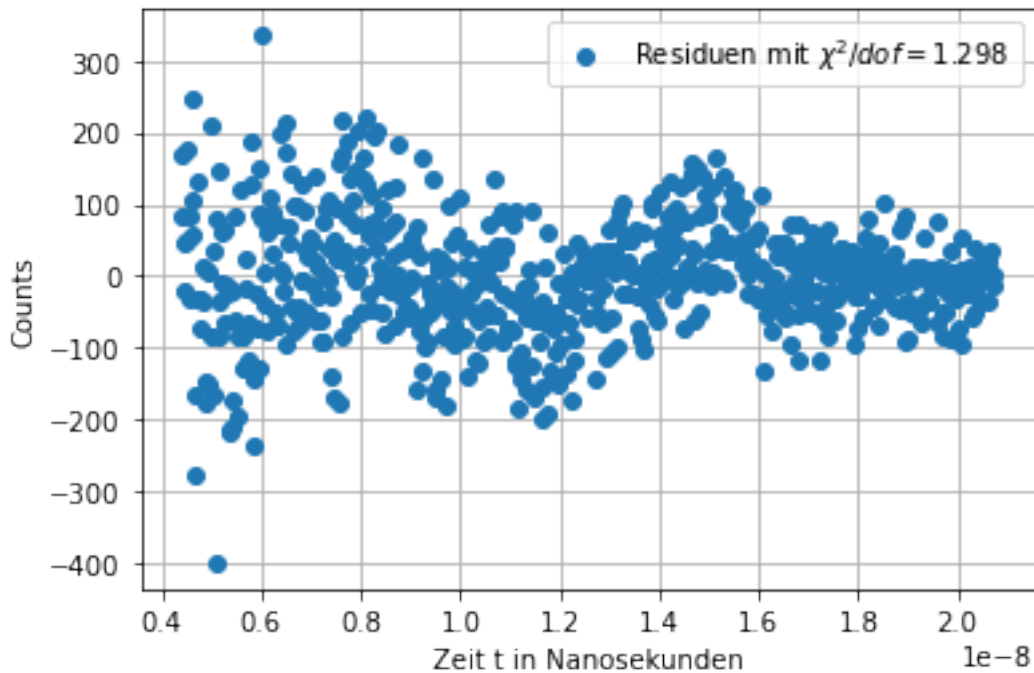
```
[43]: Anteile = ['IRF', '0% H2O', '50% H2O', '66,6% H2O', '75% H2O', '82,5% H2O', '100% H2O']
```

```
[44]: SDT_Auswertung(data_path+'korrektur_phäo_fluoreszenz_wasser_ethanol.sdt',  
→Anteile, 'Fluoreszenz_Ethanol_Wasser_Loesung')
```



```
[45]: SPC_Fit(data_path+'korrektur_phäo_fluoreszenz_wasser_ethanol.sdt',1,180,850,'Fit_  
→Reabsorption', 'phao_fluoh20_fit1')
```





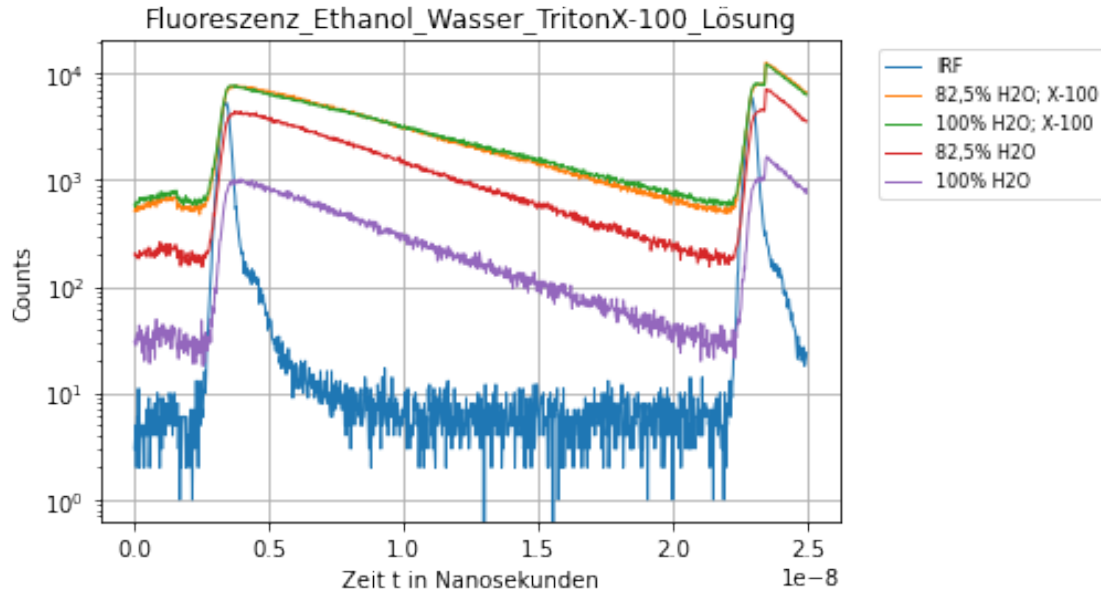
```
ai= 230526.25888223754 +- 355344201.2676038 , -202841.6537405858 +-
355343886.0782705
tau=1/bi= 7.42198771769973e-09 +- 1.5534218429755547e-07 , 7.627309996445974e-09
+- 1.8383987558402605e-07
c= 400.1942309437659 +- 736.0846565822068
ReducedChisq= 1.298 , P-Value= 2.3834919808362236e-07
670 670
```

5. Fluoreszenz von Phäophorbid in Wasser bei Zugabe von Triton X-100 Detergenzmittel

OD von 0.6, $V_{ph} = 300\text{ul}$ und unterschiedliche Anteile von $V_{LM} = 1200\text{ul}$ an Wasser/Ethanol mit 2 Tropfen Triton X-100 bei 100% Wasser und bei 82,5% Wasser ca. 5 Tropfen Collection: 5 Sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain = 2 Offset = 21 Lambda-Gate = 67.5° Passfilter

```
[46]: Anteile = ['IRF', '82,5% H2O; X-100', '100% H2O; X-100', '82,5% H2O', '100% H2O']
```

```
[47]: SDT_Auswertung(data_path+'phäo_fluoreszenz_wasser_ethanol_tritonx100.sdt',
↳Anteile, 'Fluoreszenz_Ethanol_Wasser_TritonX-100_Lösung')
```



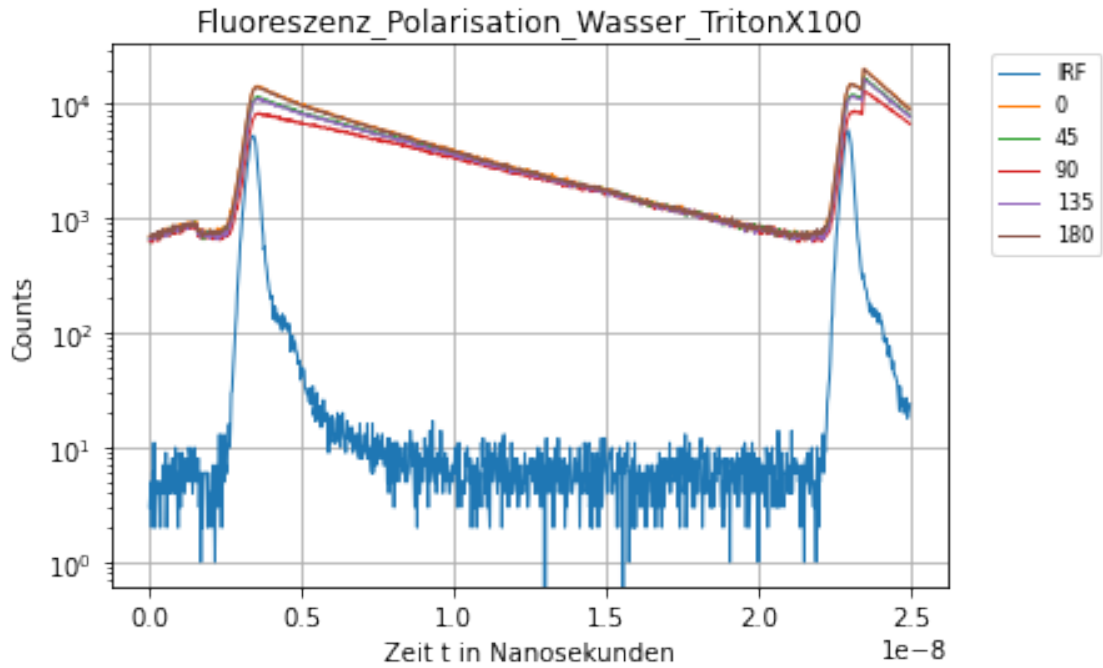
6. Fluoreszenz von Phäophorbid in Wasser/ Triton X-100 Detergenzmittel bei unterschiedlichen Polarisationsfilter Einstellungen

OD von 0.6, $V_{Ph} = 300 \mu\text{l}$ $V_{LM} = 1200 \mu\text{l}$ von Wasser mit 2 Tropfen Triton X oder Ethanol Collection: 5 Sekunden Schellwert = 29.8 mV Detektorspannung = 800 V Gain = 2 Offset = 21 Lambda-Gate = 67.5° Passfilter

```
[48]: Polarisationsfilter = ['IRF', 0, 45, 90, 135, 180]
```

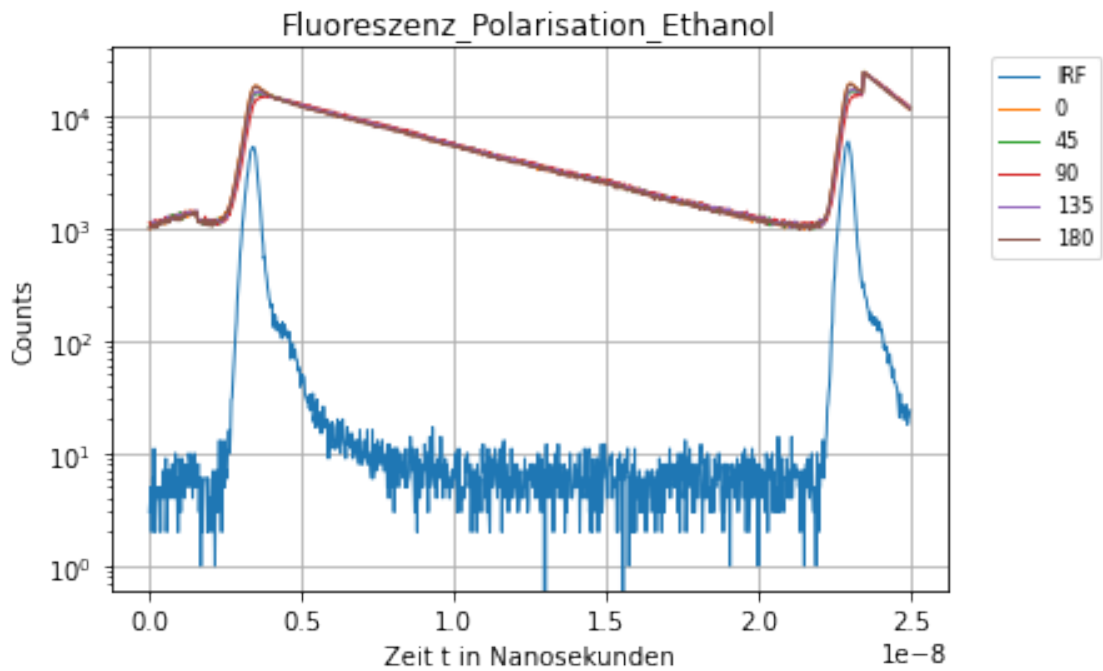
1. Messung mit Wasser/Triton X-100

```
[49]: SDT_Auswertung(data_path+'phäo_polarisation_wasser_ethanol_tritonx100.sdt',
    ↳Polarisationsfilter, 'Fluoreszenz_Polarisation_Wasser_TritonX100')
```



2. Messung mit Ethanol

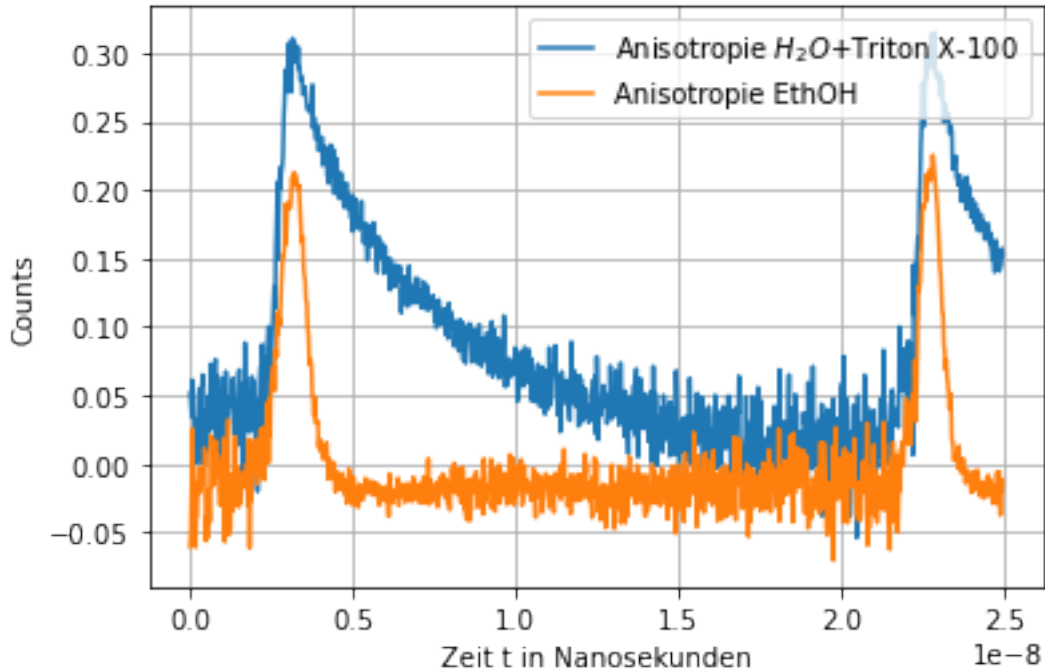
```
[50]: SDT_Auswertung(data_path+'korrektur_phao_polarisation_ethanol.sdt',
    ↪Polarisationsfilter, 'Fluoreszenz_Polarisation_Ethanol')
```



Anisotropie

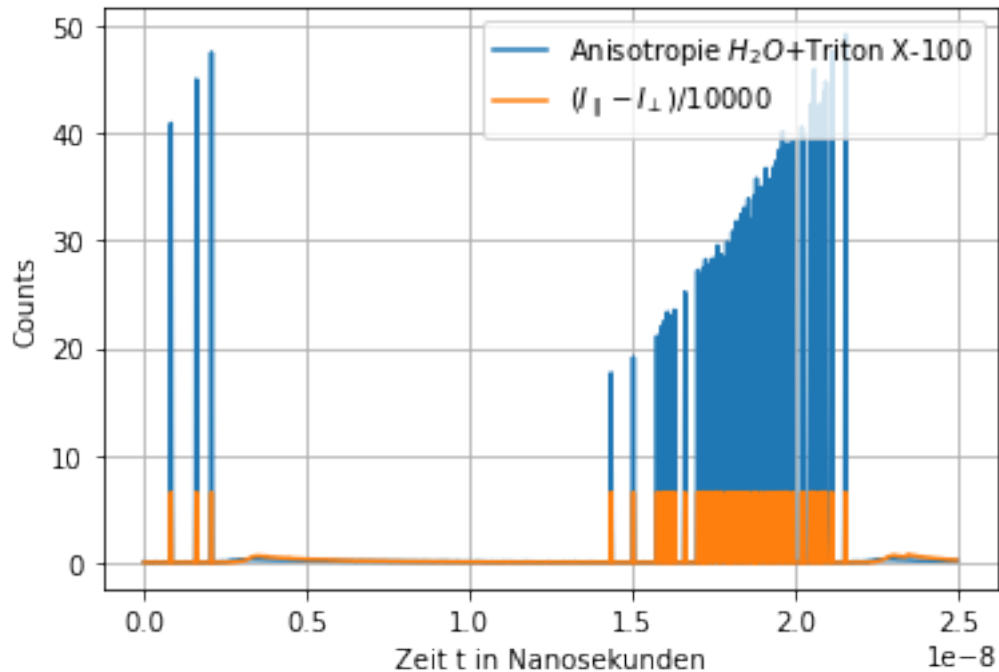
```
[51]: #Anisotropie
sdt_data = sdt.SdtFile(data_path+'phäo_polarisation_wasser_ethanol_tritonx100.
→sdt')
begin = 100
end = 655
I_p = sdt_data.data[1][0].astype('int32')
I_p = I_p.astype('int32')
I_s = sdt_data.data[3][0].astype('int32')
I_s = I_s.astype('int32')
times = sdt_data.times[0]
plt.figure(0)
ani_triton = (I_p-I_s)/(I_p+I_s)
plt.plot(times,ani_triton, label="Anisotropie $H_{20}$+Triton X-100")
print(sdt_data.times[0])
sdt_data = sdt.SdtFile(data_path+'korrektur_phäo_polarisation_ethanol.sdt')
begin = 100
end = 174
I_p = sdt_data.data[1][0].astype('int32')
I_p = I_p.astype('int32')
I_s = sdt_data.data[3][0].astype('int32')
I_s = I_s.astype('int32')
ani_triton = (I_p-I_s)/(I_p+I_s)
plt.plot(times,ani_triton,label="Anisotropie EthOH")
plt.title
plt.xlabel('Zeit t in Nanosekunden')
plt.ylabel('Counts')
plt.legend(bbox_to_anchor=(1,1), loc="upper right")
plt.grid(True)
plt.savefig('Plots/' + "Anisotropie.pdf", bbox_inches="tight", dpi=1200)
plt.show()
```

```
[0.00000000e+00 2.44140628e-11 4.88281256e-11 ... 2.49267581e-08
2.49511722e-08 2.49755862e-08]
```



```
[52]: #Anisotropie mit Error
sdt_data = sdt.SdtFile(data_path+'phäo_polarisation_wasser_ethanol_tritonx100.
→sdt')
times = sdt_data.times[0]
I_p = sdt_data.data[1][0]
I_s = sdt_data.data[3][0]
plt.figure(0)
ani_triton = np.abs(I_p-I_s)/(I_p+I_s)
plt.plot(times,ani_triton, label="Anisotropie $H_{20}$+Triton X-100")
print(sdt_data.times[0])
sdt_data = sdt.SdtFile(data_path+'korrektur_phäo_polarisation_ethanol.sdt')
ani_triton = (I_p-I_s)/10000
plt.plot(times,ani_triton,label="$(I_{\parallel}-I_{\perp})/10000$")
plt.title
plt.xlabel('Zeit t in Nanosekunden')
plt.ylabel('Counts')
plt.legend(bbox_to_anchor=(1,1), loc="upper right")
plt.grid(True)
plt.savefig('Plots/' + "Anisotropie3.pdf", bbox_inches="tight", dpi=1200)
plt.show()
```

```
[0.00000000e+00 2.44140628e-11 4.88281256e-11 ... 2.49267581e-08
2.49511722e-08 2.49755862e-08]
```



```
[53]: #Fehleranalyse Step by Step
indexes = []
for idx,val in enumerate((I_p-I_s)/(I_p+I_s)):
    if val > 1:
        indexes.append(idx)
print("Zähler", (I_p-I_s)[indexes])
print("Parallel", I_p[indexes])
print("Senkrecht", I_s[indexes])
# Muster erkennbar, hilft das aber auch für alle
# Hypothese: Wenn (I_p-I_s<0, gibt es einen fehler)
for i in indexes:
    if (I_p[i]>I_s[i]):
        print("Hypothese Wiederlegt")
print("done")
# Das sieht nach einem Underflow error aus!
print(I_p.dtype)
# numpy.uint16 Unsigned integer (0 to 65535)
# UNDERFLOW ERROR!!!!!! Keine Negativen zahlen zulässig!
```

```
Zähler [65535 65513 65508 65531 65488 65495 65507 65491 65518 65527 65534 65499
65504 65528 65525 65528 65533 65484 65504 65518 65514 65529 65511 65511
65498 65494 65480 65535 65500 65520 65504 65517 65512 65511 65515 65529
65532 65480 65469 65494 65506 65489 65533 65528 65499 65497 65500 65473
65449 65533 65534 65497 65524 65532 65492 65497 65520 65530 65532 65503]
Parallel [ 800  716  675 1852 1687 1531 1473 1435 1395 1418 1392 1281 1187 1221
```

```
1188 1157 1184 1131 1154 1136 1098 1138 1131 1146 1078 1081 1033 1030
 991 983 950 1012 946 903 926 889 915 862 842 858 837 792
 857 837 821 815 789 794 759 766 785 693 763 764 753 726
 723 733 685 649]
Senkrecht [ 801 739 703 1857 1735 1572 1502 1480 1413 1427 1394 1318 1219 1229
1199 1165 1187 1183 1186 1154 1120 1145 1156 1171 1116 1123 1089 1031
1027 999 982 1031 970 928 947 896 919 918 909 900 867 839
 860 845 858 854 825 857 846 769 787 732 775 768 797 765
 739 739 689 682]
done
uint16
```

[]: