

Praktikumsanleitung zur  
**Fourier–Transform Infrarotspektroskopie  
an Proteinen**

---

Fortgeschrittenen-Praktikum am  
Institut für Angewandte Physik der  
Universität Tübingen

Assistent: A. Gerlach  
Raum: C7 A29  
Tel.: 29 73362



Tübingen  
Oktober 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Vorbemerkungen</b>	<b>4</b>
1.1. Laserschutz	4
1.2. Lehr- und Lernziele	4
1.3. Vorkenntnisse	4
1.4. Leitfaden zur Vorbereitung	4
1.5. Literatur	5
<b>2. Infrarotspektroskopie an Proteinen</b>	<b>6</b>
2.1. Schwingung von Molekülen	6
2.2. Absorption im infraroten Spektralbereich	6
2.3. Aufbau von Proteinen	7
2.4. Infrarotspektroskopie an Proteinen	8
2.5. Absorptionsbanden der Peptidgruppe	9
2.6. Die Beiträge der Aminosäureseitenketten	11
<b>3. Das Fourier–Transform Spektrometer</b>	<b>12</b>
3.1. Das Interferogramm	12
3.2. Die Fourier–Transformation	14
3.3. Apodisation	14
3.4. Zerofilling	15
3.5. Auflösungsverbesserung	15
3.5.1. Höhere Ableitungen	15
3.5.2. Fourier-Selbstdekonvolution	15
3.5.3. Feinstrukturverstärkung	16
3.6. Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse	16
3.7. Sekundärstrukturanteile einiger Proteine	17
<b>4. Versuchsdurchführung</b>	<b>18</b>
4.1. Präparation der Proben	19
4.2. Bedienung FTIR	19
4.3. Vorversuche	19
4.4. Die Amid-I–Bande von Proteinen	20
<b>5. Auswertung</b>	<b>21</b>
5.1. Vorversuche	22
5.2. Die Amid-I–Bande von Proteinen	22

<b>A. Anhang</b>	<b>24</b>
A.1. Optische Dichte . . . . .	24
A.2. Proben . . . . .	24
A.2.1. Präparation des Puffers . . . . .	24
A.2.2. Präparation der Proben . . . . .	24
A.3. Gnuplot . . . . .	25
A.4. Abgabe der Auswertung . . . . .	27

# 1. Vorbemerkungen

## 1.1. Laserschutz

### Warnung!

Sie arbeiten bei diesem Versuch mit einem Gerät, in dessen Inneren ein Laser mit der Leistung von  $1\text{ mW}$  arbeitet. Gelangt der Laserstrahl ungeschwächt in Ihr Auge, so kann dieses geschädigt werden. Aus Gründen des Laserschutzes ist jede in der Versuchsanleitung nicht genannte Veränderung der Apparatur zu unterlassen.

## 1.2. Lehr- und Lernziele

Ziel des Versuches ist es, Sie mit einem modernen Verfahren der Infrarotspektroskopie vertraut zu machen. Sie sollen mit Hilfe der Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie die Sekundärstruktur von Proteinen untersuchen. Dabei lernen Sie auch wesentliche Schritte zur Präparation von biologischen Proben kennen.

## 1.3. Vorkenntnisse

Dieser Abschnitt soll Ihnen als Leitfaden für die Vorbereitung auf den Versuch dienen. Die weiter unten angeführten Punkte erheben durchaus nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen Sie zum eigenständigen Durcharbeiten der einschlägigen Literatur animieren. Unter diesem Aspekt sind auch die Literaturangaben am Ende dieses Abschnittes zu verstehen.

## 1.4. Leitfaden zur Vorbereitung

1. Schwingung von Molekülen
2. Absorptionsbanden von Peptiden
3. Fourier-Transformation
4. Michelson-Interferometer
5. Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie

## 1.5. Literatur

- Erwerb der Grundkenntnisse
  1. E. Hecht, *Optik*, Oldenburg, 2001.
  2. W. Demtröder, *Molekülphysik*, Oldenburg, 2003.
  3. F. Schreiber, *Physik der weichen und biologischen Materie*, Vorlesungsmanuskript, Universität Tübingen, 2005.
- Zur Vertiefung und Ergänzung
  1. H. Günzler, H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, 2003.
  2. A. Barth, C. Zscherp, *What vibrations tell us about proteins*, Quart. Rev. Biophys. 35(4), 369–430 (2002)
  3. J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana and F. M. Goñi, *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy*, Prog. Biophys. Molec. Biol. 59(1) 23–56 (1993)
  4. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J. M. Ruyschaert, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy*, Subcell. Biochem 23 329–450 (1994)
  5. W. K. Surewicz, H. H Mantsch, D. Chapman, *Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment*, Biochem. 32(2), 389–394 (1993)

## 2. Infrarotspektroskopie an Proteinen

### 2.1. Schwingung von Molekülen

Die Wechselwirkung eines Moleküls mit einem Strahlungsfeld ist direkt proportional zum Dipolmoment des Moleküls (siehe auch Lehrbücher der Atom- und Molekülphysik). Absorption oder Emission von Strahlung wird deshalb nur beobachtet, wenn sich dabei das Dipolmoment des Moleküls verändert; Multipolübergänge höherer Ordnung werden hier nicht berücksichtigt. Entscheidend für die Beobachtung von Strahlung ist deshalb der Aufbau des Moleküls. So zeigen zweiatomige Moleküle mit gleichen Atomen (z.B.  $N_2$ ,  $O_2$ ) bei Schwingungsanregung oder Rotation keine Änderung des Dipolmoments und damit keine Absorption oder Emission von Strahlung.

Die Anzahl der möglichen Schwingungsformen von mehratomigen Molekülen läßt sich auf einfache Art ableiten; Jedes einzelne Atom kann Bewegungen in den 3 Richtungen des Raumes ausführen, ein System von  $N$  Atomen verfügt deshalb über  $3N$  Bewegungsfreiheitsgrade. Da jedoch 3 Bewegungskombinationen zu Rotationen um den Massenschwerpunkt und weitere 3 Bewegungskombinationen zu Translationen des Massenschwerpunktes führen, beträgt die Zahl der Schwingungsfreiheitsgrade  $Z$  nur noch  $3N - 6$ . Bei linearen Molekülen kommen nur 2 Rotationsfreiheitsgrade vor, da die Rotation um die Molekülachse mit keiner Bewegung der Atome oder des Massenschwerpunktes verbunden ist. In diesem Fall gibt es deshalb  $Z = 3N - 5$  Schwingungsfreiheitsgrade. Für jeden dieser Schwingungsfreiheitsgrade findet man eine sogenannte Normalmode. Hierbei schwingen die an der Normalmode beteiligten Atome mit der gleichen Frequenz und fester Phase zueinander. Jeder Normalmode ist eine bestimmte Schwingungsfrequenz zugeordnet.

### 2.2. Absorption im infraroten Spektralbereich

Absorbiert ein Molekül Licht im infraroten Spektralbereich, geht es in einen höher angeregten Schwingungszustand über. Absorption kann nur stattfinden, wenn sich während einer Schwingung das Dipolmoment der betreffenden Atomgruppierung ändert. Die Intensität einer Absorptionsbande ist proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung relativ zum Gleichgewichtszustand. Dies wird verursacht bei Streckschwingungen durch Änderung der Bindungslängen, bei Deformations- und Biegeschwingungen durch Änderung von Bindungswinkeln. Die Frequenz, bei der eine Schwingung absorbiert, hängt von den reduzierten Massen der beteiligten Atome, der Kraftkonstante der Bindung, der Bindung zu den Nachbaratomen und der Kopplung mit anderen Molekülschwingungen ab. Sie berechnet sich für ein zweiatomiges Molekül (mit verschiedenen Atomen) nach

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (2.1)$$

wobei  $\nu$  die Schwingungsfrequenz,  $k$  die Kraftkonstante und  $\mu$  die reduzierte Masse ist.

Es ist üblich, nicht die Frequenzen selbst anzugeben, sondern die energieproportionalen Wellenzahlen, die sich aus dem Kehrwert der Wellenlänge ergeben. Für die Wellenzahl  $\tilde{\mu}$  ist die Einheit  $\text{cm}^{-1}$  gebräuchlich.

Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	10000
Wellenlänge / $\mu\text{m}$	10	5	3.33	2.5	2	1.67	1.25	1

**Tabelle 2.1.:** Wellenzahl und Wellenlänge

## 2.3. Aufbau von Proteinen

Stellt man sich eine lange Proteinkette vor, so gibt es im Prinzip sehr viele Möglichkeiten wie diese Kette gefaltet werden kann. Eine erste wesentlich Randbedingung besteht in der speziellen Eigenschaft der Peptidbindung (siehe Abb. 2.1), die eine planare Anordnung der CO- und NH-Gruppen im Peptid fordert. Eine Peptidkette besteht folglich aus starren Blättchen, die über zwei Bindungswinkel,  $\phi$  und  $\psi$ , mit je einem C-Atom verknüpft sind (siehe Abb. 2.2). Auf Grund der Randbedingungen können nur bestimmte Werte der Bindungswinkel auftreten. Zusätzlich spielen Wasserstoffbrückenbindungen für die Ausbildung der Struktur eine sehr große Rolle. Hier sind es im wesentlichen die Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen der NH- und der CO-Gruppe des Rückgrats aufgebaut werden. Bei der Struktur unterscheidet man die Primär- und die Sekundärstruktur der Proteine. Erstere beschreibt die Sequenz der Aminosäuren, während letztere die spezielle räumliche Anordnung nah benachbarter Aminosäuren beschreibt.

### Sekundärstrukturen

#### $\alpha$ -Helix

Die  $\alpha$ -Helix ist eine stabförmige Struktur, bei der eine eng aufgewickelte Polypeptidhauptkette den inneren Teil des Stabes bildet. Die Seitenketten sind in dieser schraubenartigen Anordnung nach außen gerichtet (siehe Abb. 2.3).

Die  $\alpha$ -Helix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH- und den CO-Gruppen des Rückgrates stabilisiert. Dabei bildet die CO-Gruppe einer Aminosäure eine Wasserstoffbrücke zu der NH-Gruppe der Aminosäure, die in der Sequenz vier Reste vor ihr liegt. Alle CO- und NH-Gruppen der Hauptkette sind an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt. Der Abstand zwischen benachbarten Resten entlang der Helixachse ist  $1.5 \text{ \AA}$ , die Verdrehung in der Helixachse  $100^\circ$ . Die Ganghöhe der  $\alpha$ -Helix beträgt  $5.4 \text{ \AA}$ . In den Proteinen findet man nur rechtsgängige  $\alpha$ -Helices. Der Anteil des Proteins, der in einer  $\alpha$ -Helix gefaltet ist, kann zwischen unterschiedlichen Proteinen stark variieren.

#### $\beta$ -Faltblatt

Während sich bei der  $\alpha$ -Helix die Wasserstoffbrückenbindung zwischen nahe benachbarten Aminosäuren ausbilden, werden die Wasserstoffbrücken in der  $\beta$ -Faltblattstruktur zwischen verschiedenen Strängen gebildet (siehe Abb. 2.4). Die  $\beta$ -Faltblattstruktur gibt

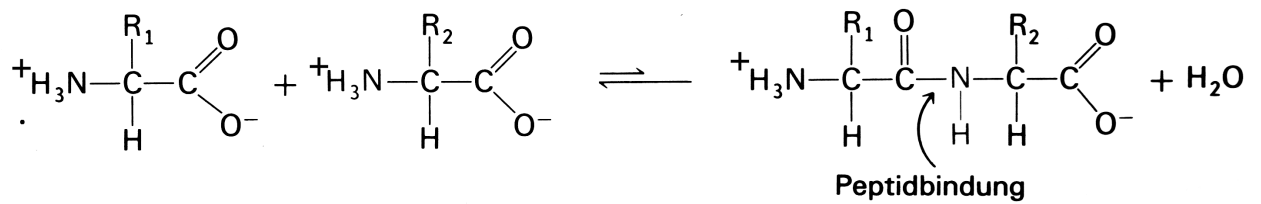


Abbildung 2.1.: Struktur und Entstehung einer Peptidbindung durch Abspaltung von H<sub>2</sub>O.

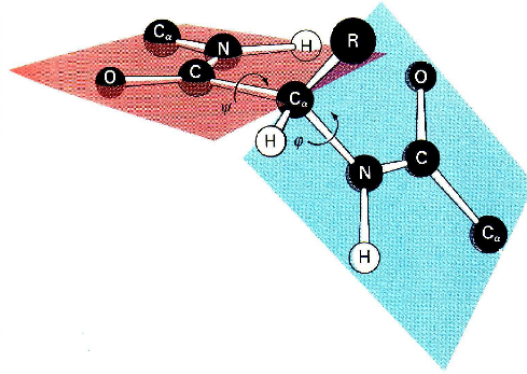


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der Peptidbindung.

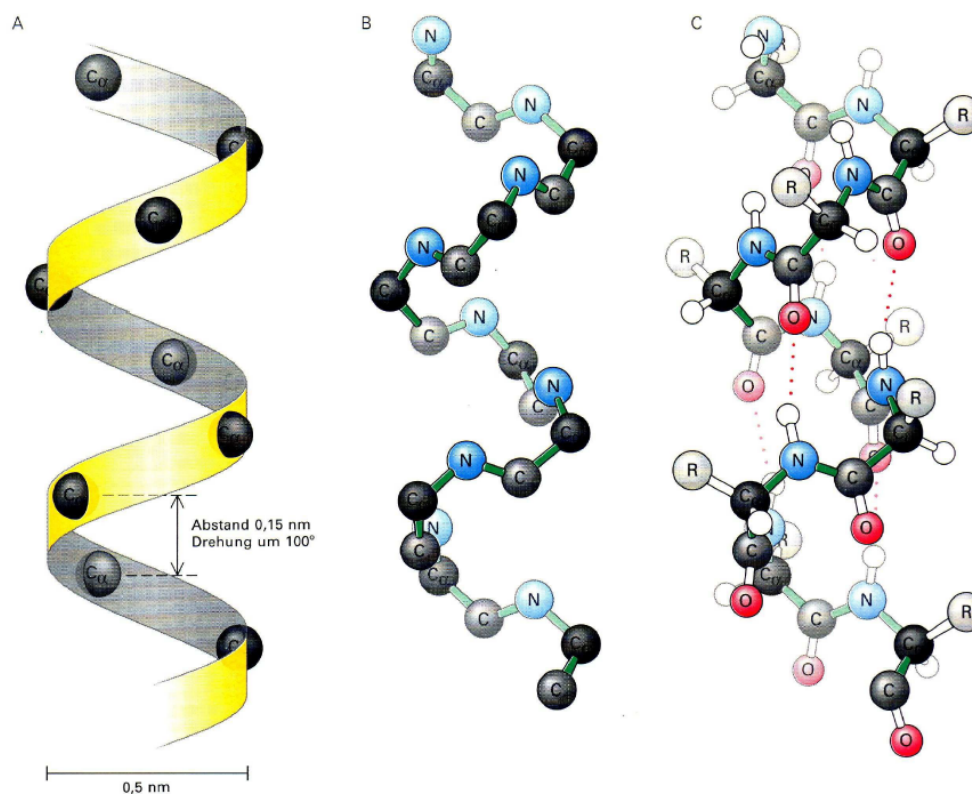
platten- oder stabförmige Strukturen. In einem  $\beta$ -Faltblatt ist die Polypeptidkette praktisch völlig gestreckt. Benachbarte Stränge in einem  $\beta$ -Faltblatt können dieselbe Richtung aufweisen (paralleles  $\beta$ -Faltblatt) oder entgegengesetzt verlaufen (antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt).

## 2.4. Infrarotspektroskopie an Proteinen

Für das Verständnis biologischer Reaktionen gewinnt die Infrarotspektroskopie zunehmend an Bedeutung, insbesondere weil sie Informationen liefert, die mit Methoden der Strukturaufklärung wie NMR, Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse nicht erhalten werden. Sie erlaubt Aussagen über die Struktur und die Umgebung des Proteinrückgrats und vieler Aminosäureseitenketten. Sie macht dynamische Vorgänge zugänglich, wie zum Beispiel die Änderung von Bindungslängen und -geometrien im Verlauf einer Proteinreaktion, die Modifizierung chemischer Gruppen (z.B. Protonierung) oder die veränderte Ladungsdichte einer chemischen Bindung.

Die Empfindlichkeit moderner Infrarotspektrometer ist heute prinzipiell groß genug, um mit speziellen Techniken die Beiträge einzelner Aminosäuren zu detektieren. Ein Protein liefert jedoch im Absorptionsspektrum eine Vielzahl überlappender Banden des Peptidrückgrats (Amidbanden; 2.2) und der Aminosäureseitenketten.

Darüberhinaus werden die Peptid-C=O-Moden von einer starken Wasserbande bei ca.  $1650 \text{ cm}^{-1}$  überlagert, die zwar, im Vergleich zu den Moden der Aminosäureseitenketten, einen schwachen Extinktionskoeffizienten ( $20 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) besitzt, aber bereits bei einer Schichtdicke von  $10 \mu\text{m}$  aufgrund des hohen Wassergehaltes der Proben zu einer



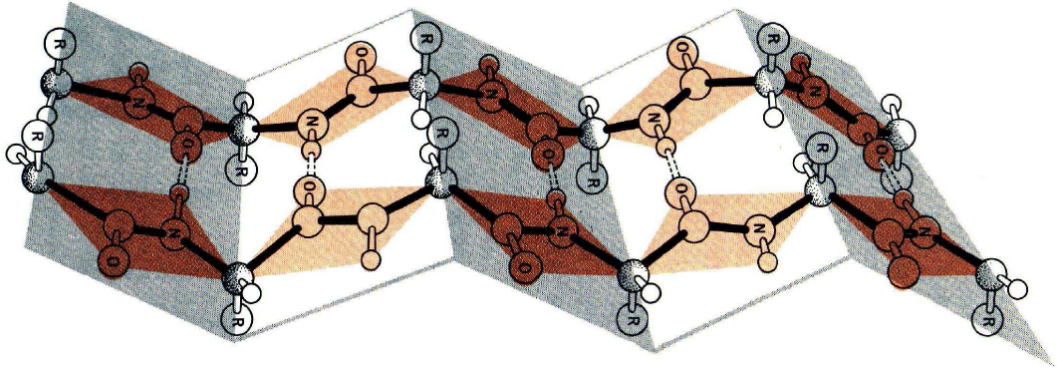
**Abbildung 2.3.:** Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Helix.

optischen Dichte von 1 führt (d.h. nur 10% des eingestrahnten Lichtes wird transmittiert). Zur Definition der optischen Dichte siehe Anhang [A.1](#).

## 2.5. Absorptionsbanden der Peptidgruppe

Einer (hypothetischen) freien, planaren Peptidgruppe können 9 Schwingungsmoden zugeordnet werden, die mit abnehmender Wellenzahl der Absorptionsbande als Amid-A, -B und Amid-I bis -VII bezeichnet werden. Für Strukturuntersuchungen ist besonders die Amid-I-Schwingung von Bedeutung. Für die Amid-I-Schwingung, zu der ca. 80% die C=O-Valenzschwingung der Carbonylpeptidgruppe beiträgt, kann die Lage der Absorptionsbanden mit der Sekundärstruktur des betreffenden Polypeptids korreliert werden. Dies wird dadurch verursacht, daß die exakte Geometrie und damit die Lage und Intensität der  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel die Amid-I-Bande verändern (starke Wechselwirkung und Veränderung der Dipolwechselwirkung zwischen den C=O-Schwingungen). Die genaue Analyse der Amid-I-Bande kann daher in Verbindung mit mathematischen Verfahren zur Trennung überlappender Absorptionsbanden (Fourier-Selbstdekonvolution) Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen liefern.

Ein Wasserstoff-Deuterium-Austausch (H/D-Austausch) im Peptid, wie er zum Beispiel in D<sub>2</sub>O-Lösung auftritt, verändert die Massen der schwingenden Atome und damit die Schwingungsfrequenz und die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum. Dabei ist die Bandenverschiebung abhängig von der Sekundärstruktur: die schwache hochfrequente



**Abbildung 2.4.:** Schematische Darstellung der  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Amid-I-Bande von  $\beta$ -Faltblatt und Schleifen ( $\approx 1670 \text{ cm}^{-1}$ ) wird oft mit ca.  $10 \text{ cm}^{-1}$  am stärksten zu niedrigen Wellenzahlen verschoben, während bei allen anderen Sekundärstrukturelementen die Verschiebung nur wenige  $\text{cm}^{-1}$  beträgt. Tab. 2.2 zeigt eine Zusammenstellung der Amid-I-Moden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Die Amid-II-Bande (40...60% N-H Biegeschwingung, 18...40% C-N Streckschwingung, ca. 10% C-C Streckschwingung) zeigt gegenüber der Amid-I-Bande eine weitaus größere Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch. Sie wird um etwa  $100 \text{ cm}^{-1}$  zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Dabei ändert sich der Charakter der Schwingung. Sie ist hauptsächlich eine C-N Streckschwingung und enthält keine Anteile der N-H Biegeschwingung mehr. Diese Eigenschaft ermöglicht die Kontrolle des Deuterierungsgrades des Proteins über das Verschwinden des Amid-II- und das Entstehen des sog. Amid-II'-Signals bei  $1450 \text{ cm}^{-1}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ . Ein ähnlicher Effekt tritt bei der Amid-A-Bande auf.

Sekundärstruktur	Bandenposition in $\text{H}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$		Bandenposition in $\text{D}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
$\alpha$ -Helix	1654	1648 ... 1657	1652	1642 ... 1660
$\beta$ -Faltblatt	1633	1623 ... 1641	1630	1615 ... 1638
	1684	1674 ... 1695	1679	1672 ... 1694
Schleifen	1672	1662 ... 1686	1671	1653 ... 1691
Ungeordnet	1654	1642 ... 1657	1645	1639 ... 1654

**Tabelle 2.2.:** Amid-I-Moden verschiedener Sekundärstrukturelemente.

*Quelle:* nach E. Goormaghtigh et al. (1994), *Subcellular Biochemistry* 23, 405. Anmerkung: Oft tauchen in ähnlichen Tabellen unterschiedliche Bandenpositionen für die hochfrequente Bande von parallelem und antiparallelem  $\beta$ -Faltblatt auf. Dies beruht auf der berechneten Bandenposition (für  $\beta$ -parallel). Experimentell kann jedoch nicht zwischen parallelem und antiparallelem  $\beta$ -Faltblatt unterschieden werden.

Abhängig von der Stabilität der Proteinstruktur zeigen die verschiedenen Bereiche des Proteins unterschiedliche H/D-Austauschgeschwindigkeiten, was zur Zuordnung der Absorptionsbanden zu einzelnen Sekundärstrukturelementen genutzt werden kann.

## 2.6. Die Beiträge der Aminosäureseitenketten

Im Bereich der Amid-I-Bande tragen auch Aminosäureseitenketten zur Absorption bei, insbesondere wenn sie C=O-Gruppen enthalten. Es sind dies Tyr, Lys, Phe, Glu, Asp. Diese tragen etwa 10...15% zur Gesamtabsorption in diesem Spektralbereich bei. Der Einfluß der jeweiligen Proteinumgebung (Solvation, pH-Wert, Dielektrizitätskonstante) auf die Absorptionseigenschaften der Seitenketten macht es unmöglich, die jeweils genaue Lage der Absorptionsbanden aufgrund von Modellspektren der Aminosäuren in wässriger Lösung vorherzusagen. Abb. 2.5 gibt einen Überblick über die verschiedenen Aminosäureseitenketten.

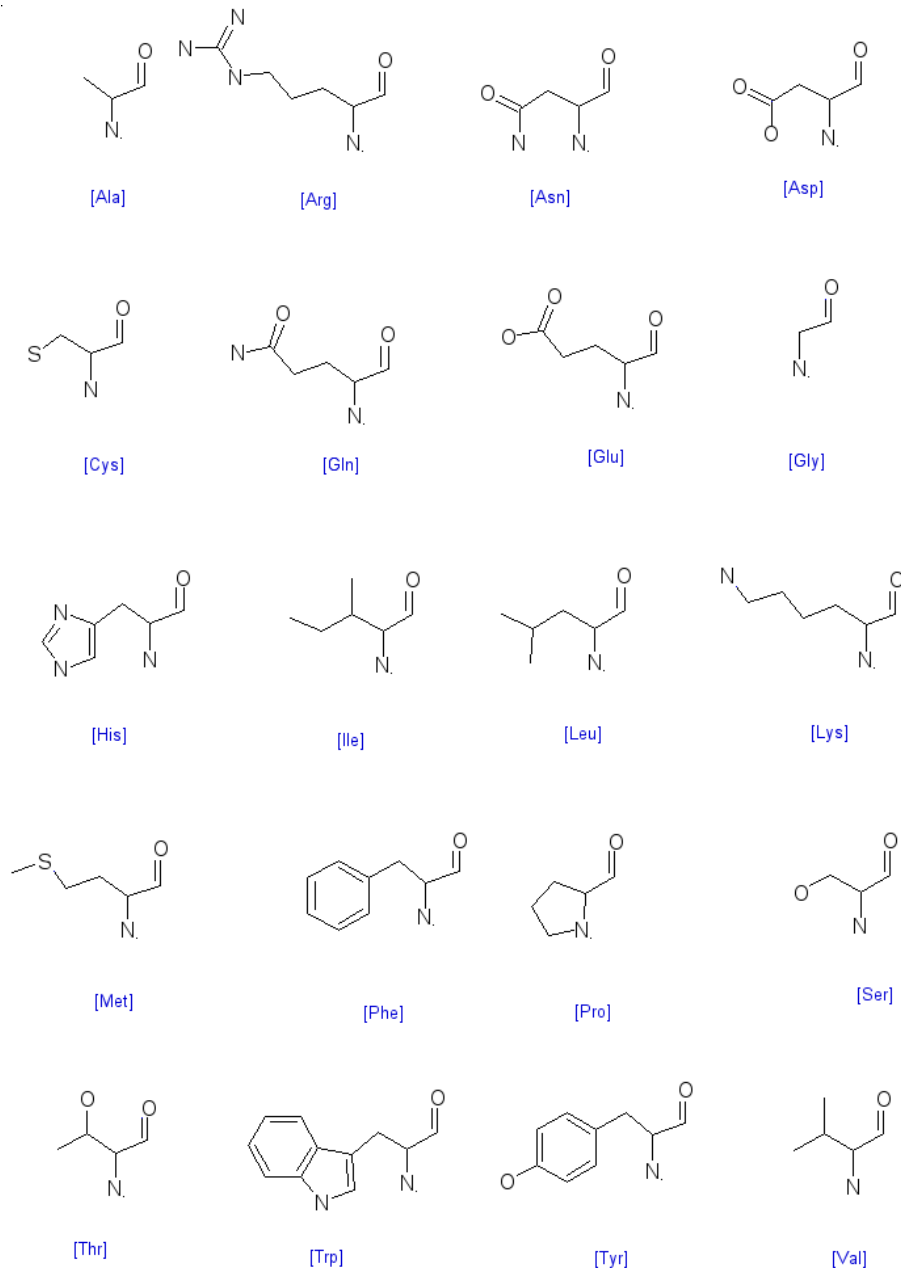


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung von Aminosäureseitenketten

# 3. Das Fourier–Transform Spektrometer

In modernen Meßgeräten zur Bestimmung der Infrarottransmission und in der Raman-spektroskopie werden meist Fourier–Transformations–Spektrometer (FT–Spektrometer) eingesetzt. Ein solches Spektrometer besitzt als Herzstück statt eines Monochromators (dispersives Spektrometer, wie z.B. Spektrometer für den sichtbaren Spektralbereich) ein Michelson–Interferometer (siehe Abb. 3.1). Dabei wird durch teilreflektierende Spiegel die zu messende Strahlung in zwei Strahlbündel zerlegt, welche anschließend zur Interferenz gebracht werden.

Im Vergleich zur herkömmlichen dispersiven Infrarotspektroskopie hat die FT-Spektroskopie folgende Vorteile zu bieten:

- Eine erhebliche Zeitersparnis entsteht dadurch, daß ein komplettes Spektrum sehr viel schneller aufgenommen werden kann.
- Parallele Messung aller Frequenzen
- Weil bei der FT-Spektroskopie der Strahl nicht durch Spalte eingengt werden muß, steht eine höhere Lichtintensität zur Verfügung, was sich in einem besseren Signal–Rausch–Verhältnis ausdrückt.
- Wegen der Kontrolle der Spiegelposition durch einen HeNe–Laser ist die Genauigkeit der Wellenlängebestimmung sehr hoch.

## 3.1. Das Interferogramm

Im FT–Spektrometer wird das Spektrum der Probe nicht direkt gemessen. Stattdessen erhält man zunächst ein sog. Interferogramm, das mittels Fourier–Transformation in ein Spektrum umgerechnet wird. Das Interferogramm wird durch ein Michelson–Interferometer erzeugt (siehe Abb. 3.1). Das Interferogramm ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit der Position des Spiegels  $S_2$ .

Das von einer Quelle ausgehende Licht wird durch eine halbdurchlässige Platte  $P_1$  (die reflektierende Schicht  $S$  befindet sich auf der Rückseite) in zwei Komponenten, Lichtbündel I und II, aufgespalten. Das transmittierte Licht (I) durchläuft eine zweite Platte  $P_2$  identischer Dicke und wird von einem genau senkrecht stehenden Spiegel  $S_1$  in sich zurückreflektiert. Von der Spiegelschicht  $S$  des halbdurchlässigen Spiegels wird ein Teil des rücklaufenden Lichtes dann auf den Schirm (Detektor) gelenkt. Das zweite Lichtbündel (Bündel II) werde von  $S$  nach oben reflektiert; es durchläuft ein zweites Mal die Glasplatte  $P_1$ , wird am Spiegel  $S_2$  in sich zurückgeworfen. Sein durch  $S$  transmittierter Anteil fällt ebenfalls auf den Schirm (Detektor) und interferiert dort mit Bündel I. Durch Verschieben des Spiegels  $S_2$  längs der Strahlachse läßt sich der Gangunterschied zwischen den beiden Lichtbündeln

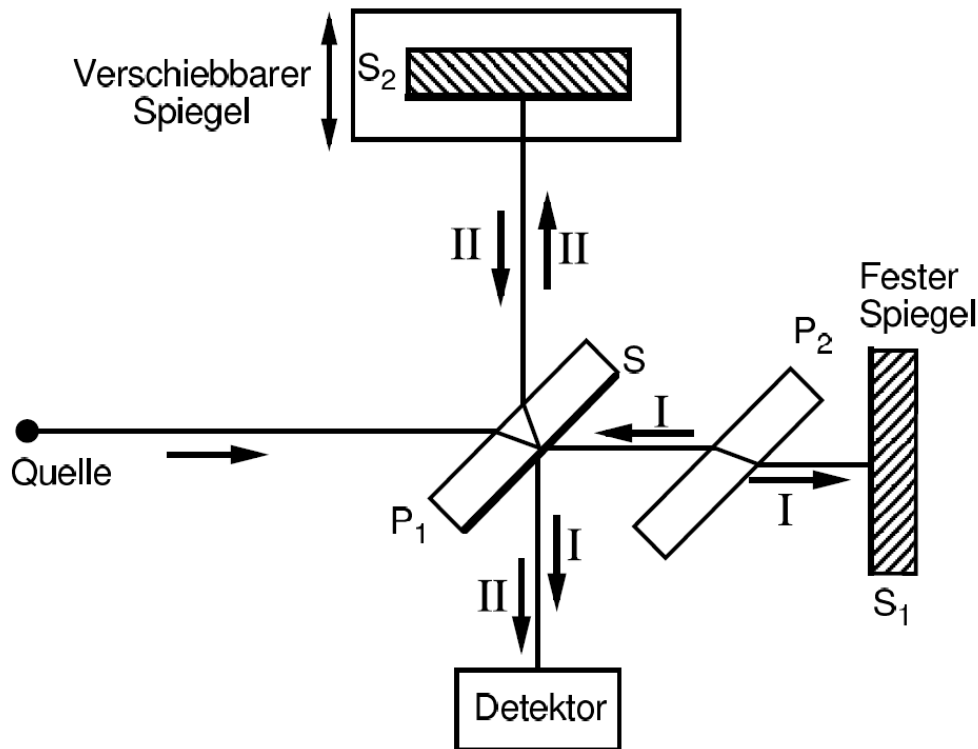


Abbildung 3.1.: Michelson-Interferometer

variieren. Die Nullstellung, d.h. die Einstellung, bei der beide Strahlengänge genau gleich sind, läßt sich am besten mit weißem Licht überprüfen: Die Verwendung von weißem Licht ist vorteilhaft, da dort die Kohärenzlänge extrem kurz ist und so die Nullstellung exakt bestimmt werden kann. Der dabei vorliegende Phasenunterschied von  $\pi$  rührt daher, daß Bündel I an der Außenfläche des Spiegels, Bündel II an der Innenfläche reflektiert wurde. Die Kompensationsplatte  $P_2$  wird im Michelson-Interferometer verwendet, um auch für spektral breitbandiges Licht beide Strahlengänge exakt identisch zu führen. Da beide Lichtbündel die Glasplatten gleich oft (dreimal) durchqueren, erfahren sie auch die gleiche Dispersion.

Im Falle von monochromatischem Licht erhält man als Interferogramm eine Kosinusfunktion. Dies wird zur Kontrolle der Spiegelposition ausgenutzt, indem das Licht eines HeNe-Lasers ( $632\text{ nm}$ ) ebenfalls in das Interferometer eingekoppelt wird. An den Nulldurchgängen des Laser-Interferogramms wird das Infrarot-Interferogramm digitalisiert. Aus der Wellenlänge des Lasers ergibt sich, daß die Nulldurchgänge einen Abstand von  $1/31600\text{ cm} = \lambda_{\text{HeNe}}/2$  besitzen, was zu einer Wellenzahlkalibrierung des Gerätes mit einer Genauigkeit in der Größenordnung von  $0.01\text{ cm}^{-1}$  führt.

Das Interferogramm einer polychromatischen Lichtquelle ist durch einen Punkt maximaler Interferenz (Weißlichtposition, Gangunterschied Null) gekennzeichnet, an dem sich das Licht aller Frequenzen konstruktiv überlagert, da die Abstände zwischen dem festen und beweglichen Spiegel gleich sind. An allen anderen Punkten ist die Bedingung für konstruktive Interferenz nur für wenige Wellenlängen aus dem Spektrum erfüllt, während andere destruktiv überlagern (geringe Kohärenz von weißem Licht).

## 3.2. Die Fourier–Transformation

Die Intensität am Detektor  $I(x)$  als Funktion der Spiegelposition  $x$  (das Interferogramm) und die Intensität  $S(\nu)$  als Funktion der Wellenzahl  $\nu = \lambda^{-1}$  des Lichtes (das sog. Einkanalspektrum) stellen ein Fourier–Transformiertenpaar dar:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \exp(2\pi i \nu x) dx \quad (3.1)$$

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\nu) \exp(-2\pi i \nu x) d\nu \quad (3.2)$$

Natürlich kann in der Praxis kein kontinuierliches Interferogramm unendlicher Ausdehnung gemessen werden. Stattdessen wird eine endliche Anzahl  $N$  von Interferogrammpunkten im Abstand  $\Delta x$  digitalisiert. Ersetzt man  $x$  durch  $n\Delta x$ ,  $\nu$  durch  $k\Delta\nu$  und das Integral durch eine Summe, so erhält man die diskrete Fourier–Transformation

$$S(k\Delta\nu) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \exp\left(\frac{2\pi i k \Delta\nu n \Delta x}{N}\right) \Delta x. \quad (3.3)$$

Die berechneten Punkte im Frequenzraum besitzen den Abstand

$$\Delta\nu = \frac{1}{N\Delta x} \quad (3.4)$$

Der Punkteabstand  $\Delta\nu$ , der die spektrale Auflösung bestimmt, ist also umgekehrt proportional zum Spiegelweg und der Anzahl der Meßpunkte. Probleme, die bei der diskreten Fourier–Transformation entstehen, und deren Korrektur werden in den nächsten Abschnitten besprochen.

## 3.3. Apodisation

Wegen der endlichen Länge der gemessenen Interferogramme kann es bei der Fourier–Transformation zu Artefakten kommen. Das bei  $x = x_{max}$  abgeschnittene Interferogramm kann als Produkt eines Interferogramms unendlicher Ausdehnung mit einer Rechteckfunktion aufgefaßt werden. Die Rechteckfunktion hat die Werte Eins für  $0 \leq x \leq x_{max}$  und Null sonst. Als Folge dessen entstehen neben der eigentlichen Bande Nebenminima und –maxima. Die Amplitude des größten Nebenminimums macht 22% der Amplitude des Hauptmaximums aus.

Dieser störende Effekt kann umgangen werden, indem man das Interferogramm statt mit der Rechteckfunktion mit einer anderen Funktion multipliziert, die sich sanfter an Null annähert. Solche Funktionen werden Apodisationsfunktionen genannt. Weil durch die Apodisation Informationen an den Rändern des Interferogramms verloren gehen, ist eine Verschlechterung der Auflösung bzw. eine Linienverbreiterung die Folge. Die Apodisationsfunktionen sind darauf optimiert, daß trotz starker Unterdrückung der Nebenmaxima eine geringe Verbreiterung des Hauptmaximums resultiert.

## 3.4. Zerofilling

Wegen der endlichen Abstände der Stützpunkte des Interferogramms und des daraus berechneten Spektrums kann es vorkommen, daß schmale Banden, die zwischen den Stützstellen liegen, mit verringerter Amplitude wiedergegeben werden. Dieser Fehler kann durch folgenden Trick ausgeglichen werden: Vor der Durchführung der Fourier-Transformation werden an das Interferogramm Nullen angehängt (Zerofilling). Dies entspricht einer Näherung eines Interferogramms das bei höherer spektraler Auflösung (d.h. längerem Spiegelweg) aufgenommen wurde. Dadurch wird der Abstand zwischen den Punkten des Spektrums kleiner, allerdings ohne daß sich die spektrale Auflösung verbessert. Auf diese Weise wird zwischen den Stützstellen des Spektrums interpoliert.

## 3.5. Auflösungsverbesserung

Die Amid-I-Bande von Proteinen besteht meist aus mehreren Banden, die für die verschiedenen Sekundärstrukturen charakteristisch sind. Diese Einzelkomponenten überlappen sich zu einer konturlosen Bande. Daher werden Verfahren angewandt, um das Spektrum in die Einzelkomponenten aufzulösen, also um das Spektrum zu entwirren (Dekonvolution). Hierbei handelt es sich nicht um eine tatsächliche nachträgliche Verbesserung der spektralen Auflösung, sondern um Methoden, welche die Feinstruktur des Spektrums hervorheben. Drei Methoden seien hier vorgestellt und ihre Effekte auf eine Absorptionsbande beschrieben.

### 3.5.1. Höhere Ableitungen

Es ergibt sich jeweils eine schmalere Bande, die bei der 2. (4.) Ableitung ein negatives (positives) Vorzeichen hat.

**Vorteil:** Läßt sich fast mit jedem Programm durchführen

**Nachteil:** Prominente Seitenbanden mit anderen Vorzeichen, die die Interpretation bei komplizierten Spektren erschweren.

### 3.5.2. Fourier-Selbstdekonvolution

Man nutzt die Eigenschaft der Fourier-Transformation, bzw. des Interferogramms aus, daß die Information über die Feinstruktur des Spektrums bei großen Spiegelauslenkungen registriert wird. Wenn man diesen Teil des Interferogramms stärker gewichtet, ist daher die Feinstruktur im Spektrum stärker hervorgehoben und die Banden erscheinen schärfer. Man macht dies, indem man das Interferogramm mit einer Exponentialfunktion multipliziert.

**Vorteil:** Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen, wie im unbearbeiteten.

**Nachteil:** Man braucht spezielle Programme, zwei Parameter sind frei wählbar, was zu einer gewissen Subjektivität der Ergebnisse führt. Überdekonvolution mit dem Auftreten von Artefakten ist möglich.

### 3.5.3. Feinstrukturverstärkung

Wenn man vom Originalspektrum eine geglättete Version des gleichen Spektrums abzieht, wird die Grobstruktur eliminiert, und die Feinstruktur bleibt übrig. Die Banden werden schärfer. Zur Vermeidung von negativen Nebenbanden wird das geglättete Spektrum mit einem Faktor  $\leq 1$  (etwa 0.9) multipliziert.

**Vorteil:** Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen wie im unbearbeiteten. Läßt sich mit fast jedem Programm durchführen. Das „Auflösungsvermögen“ ist mit der Fourier–Selbstdekonvolution vergleichbar.

**Nachteil:** Das Auftreten von Artefakten ist ebenfalls möglich.

## 3.6. Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse

Das FTIR-Spektrum der Amid-I–Bande wird mit obigen Verfahren bearbeitet. Man erhält ein Spektrum, in dem die Feinstruktur deutlicher hervorgehoben ist und in dem man die Position der zugrundeliegenden Einzelkomponenten des Spektrums erkennen kann. An diesen Stellen werden dann Banden angefittet und aus der Fläche der Banden die Sekundärstrukturanteile berechnet. Trotz der weiter unten aufgeführten Probleme ist die Übereinstimmung der Infrarotergebnisse mit den aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Anteile recht gut. Die maximalen Abweichungen sind etwa 15%. Zu bedenken ist auch, daß bei der Analyse der Kristallstruktur je nach Definition der Kriterien für die Sekundärstrukturen bis zu 20% Variation auftreten können. Die Infrarotspektroskopie eignet sich insbesondere dazu,  $\beta$ –Faltblattstrukturen zu detektieren. Mögliche Probleme dabei sind:

- Der Schluß von Bandenpositionen auf die Sekundärstruktur ist nicht eindeutig. Dies führt insbesondere bei hochhelikalen Proteinen zu Fehlern. Die  $\alpha$ –Helix erzeugt offensichtlich (und theoretisch nachvollziehbar) nicht nur eine Bande bei  $1654\text{ cm}^{-1}$ , sondern auch Nebenbanden bei niedrigeren Wellenzahlen. Diese werden in der Sekundärstrukturanalyse einem  $\beta$ –Faltblatt zugeordnet.
- Die Extinktionskoeffizienten der Sekundärstrukturelemente werden oft als gleich angenommen. Dies ist insbesondere falsch für die beiden Banden des  $\beta$ –Faltblatts. Die hochfrequente Bande bei  $1684\text{ cm}^{-1}$  ist wesentlich schwächer als die bei  $1633\text{ cm}^{-1}$ .
- Der Abzug der Wasserbande ( $\text{H}_2\text{O}$ ) im Amid-I–Bereich ist nicht ganz einfach und beeinflußt die relativen Flächenanteile der angefitteten Kurven. Daher werden die Experimente oft in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt, welches im Bereich der Amid-I–Bande nicht so stark absorbiert.
- Im Bereich der Amid-I–Bande absorbieren auch Seitengruppen, die etwa 15...20% der Absorption ausmachen können. Ein Abzug dieses Beitrages ist problematisch, weil die Absorption der Seitenketten von ihrer Umgebung im Protein abhängt.
- Wenn man das aus dem Fit rekonstruierte Spektrum so bearbeitet wie das Originalspektrum, sollte natürlich das Gleiche herauskommen. Dies wird oft nicht kontrolliert.

### 3.7. Sekundärstrukturanteile einiger Proteine

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Sekundärstrukturanteile einiger Proteine, die aus einer Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden.

Proteine	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Schleifen	Sonstiges
Myoglobin	77 ... 88	0	7 ... 12	7 ... 11
Phosphoglyceratkinase	30	23	20	27
Papain	26 ... 29	22 ... 29	18 ... 23	25 ... 30
Alkoholdehydrogenase	25 ... 29	36 ... 40	19	12 ... 20
Trypsin Inhibitor	21 ... 26	26 ... 45	16 ... 24	13 ... 29
Elastase	10	40 ... 47	26 ... 28	16 ... 24
Chymotrypsinogen	12	49	23	16
9-Chymotrypsin	8 ... 11	35 ... 50	25 ... 27	14 ... 30
Trypsinogen	9	56		
Concanavalin	2 ... 3	44 ... 65	22 ... 25	10 ... 28

**Tabelle 3.1.:** Sekundärstrukturanteile einiger Proteine.

*Anmerkung:* Man beachte die z.T. erheblichen Unsicherheiten bei den Sekundärstrukturanteilen durch unterschiedliche Definitionen der Sekundärstrukturen.

## 4. Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung werden Proben von Poly-L-Lysin, Papain und Myoglobin verwendet.

**Poly-L-Lysin (M(Poly-L-Lysin) ca. 6 kDa)** Wird zur Trennung/Aufreinigung von Proteinen aus Zellen verwendet sowie in der Genetik beim Arbeiten mit DNA/RNA (z.B. als Beschichtung für Objektträger).

**Papain (M(Papain) ca. 23 kDa, mehr als 230 Aminosäuren)** Das Enzym Papain (siehe Abb. 4.1) wird vorwiegend aus dem Milchsafte des Melonenbaums (*Carica papaya*) gewonnen. Es wird verwendet als Zusatz zu Reinigungsmitteln, als Weichmacher für Fleisch, zur Entfernung von Trübstoffen in Bier, zur Wundheilung, zur Senkung der Viskosität in Tiernahrung. Es hat eine allgemein milde, beruhigende Wirkung auf den Magen und hilft bei der Verdauung von Proteinen.

**Myoglobin (M(Myoglobin) ca. 18 kDa, 153 Aminosäuren)** Myoglobin (siehe Abb. 4.1) wird z.B. aus Pferdeherz gewonnen, es ist ein Hämhaltiges Protein, das eine hohe Affinität zu Sauerstoff hat. Es dient der Speicherung von Sauerstoff in den Muskeln und gibt den Muskeln die rote Farbe.

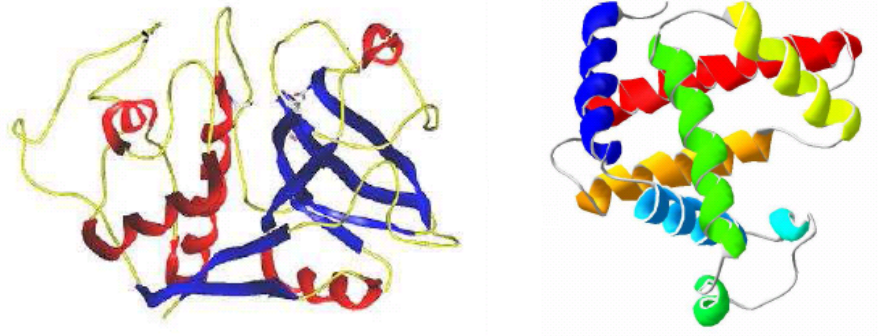


Abbildung 4.1.: Struktur von Papain (links) und Myoglobin (rechts).

## 4.1. Präparation der Proben

Folgende Proben werden benötigt:

- **Poly-L-Lys**, 2 mg gelöst in 100  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O
- **Papain**, 1 mg gelöst in 100  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O Phosphatpuffer pH 7.4
- **Myoglobin**, 1.5 mg gelöst in 100  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O Phosphatpuffer pH 7.4

Zur Messung werden für eine 20 mm Transmissionszelle (siehe Abb. 4.2) mit einer Schichtdicke von ca. 50  $\mu\text{m}$  etwa 50  $\mu\text{l}$  Probenflüssigkeit benötigt.

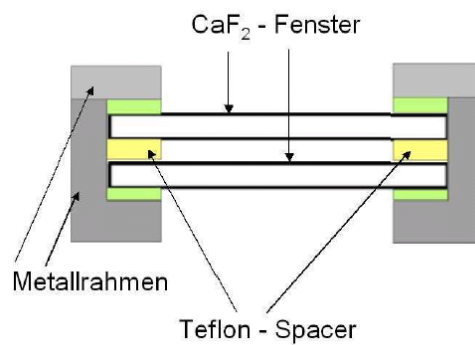


Abbildung 4.2.: Aufbau der Transmissionszelle.

## 4.2. Bedienung FTIR

Zur Ansteuerung des FTIR-Spektrometers wird das Programm OPUS verwendet. Nach dem Start des Programms werden im Menü *Measure/Advanced Measurement* die Meßparameter eingestellt. Als Meßbereich wird 1000  $\text{cm}^{-1}$  bis 4000  $\text{cm}^{-1}$  gewählt, für die Wellenlängenauflösung 2  $\text{cm}^{-1}$ . Es empfiehlt sich zunächst als Pfad für die Dateien den lokalen Pfad D:\fpraktik anzugeben. Die Daten liegen zunächst als Binärform vor, können zur weiteren Verarbeitung der Daten aber unter dem Menüpunkt *File/Save as* auch im ASCII-Format in Form einer Tabelle abgespeichert werden.

Es wird zunächst immer eine Hintergrundmessung sowie anschließend eine Probenmessung durchgeführt.

## 4.3. Vorversuche

- Nehmen Sie ein Spektrum mit einer leeren Transmissionszelle bei geöffnetem Probenraum auf (sog. Leerspektrum). Diskutieren Sie die beobachteten Absorptionsbanden mit dem Betreuer.
- Schließen Sie den Probenraum und öffnen Sie die Trockenluftzufuhr. Wiederholen Sie die vorgehende Messung mehrmals im Abstand von ca. 5 Minuten. Diskutieren Sie

die Ergebnisse. Bestimmen Sie die erforderlichen Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.

- Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ , sowie einer  $\text{D}_2\text{O}$  Probe mit einer kleinen Verunreinigung von  $\text{H}_2\text{O}$  (ca. 1%) auf.

#### **4.4. Die Amid-I-Bande von Proteinen**

Nehmen Sie die Absorptionsspektren in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einer Wellenlängenauflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  von folgenden Proteinen auf:

- Papain und Poly-L-Lysin stellvertretend für Proteine mit gemischten Sekundärstrukturanteilen
- Myoglobin stellvertretend für Proteine mit hohem Helixanteil

Verwenden Sie bei allen Transmissionsmessungen die Flüssigkeitszelle mit  $\text{CaF}_2$ -Fenstern und variablen Spacern. Reinigen Sie bei jedem Probenwechsel die gesamte Flüssigkeitszelle.

## 5. Auswertung

Im folgenden ist die Auswertung der FTIR-Messungen beschrieben (§ kennzeichnet optionale Teilaufgaben). Zur Analyse der Daten benötigen Sie ein Programm, mit dem die Spektren dargestellt und bearbeitet werden können. Dazu empfehlen wir GNUPLOT, ein leistungsfähiges und frei verfügbares Programm (siehe Anhang A.3 für weitere Informationen). Jedes andere Plotprogramm, welches ASCII-Tabellen als Quelldaten akzeptiert, kann selbstverständlich ebenfalls benutzt werden. Die komplette Auswertung bitte fristgerecht entweder in Schriftform oder als pdf-file per E-Mail an den Assistenten schicken (Adresse siehe Anhang A.4).

Abbildung 5.1 zeigt einige beispielhafte Messungen von Papain, Poly-L-Lysin, Myoglobin sowie der Lösungsmittel H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O.

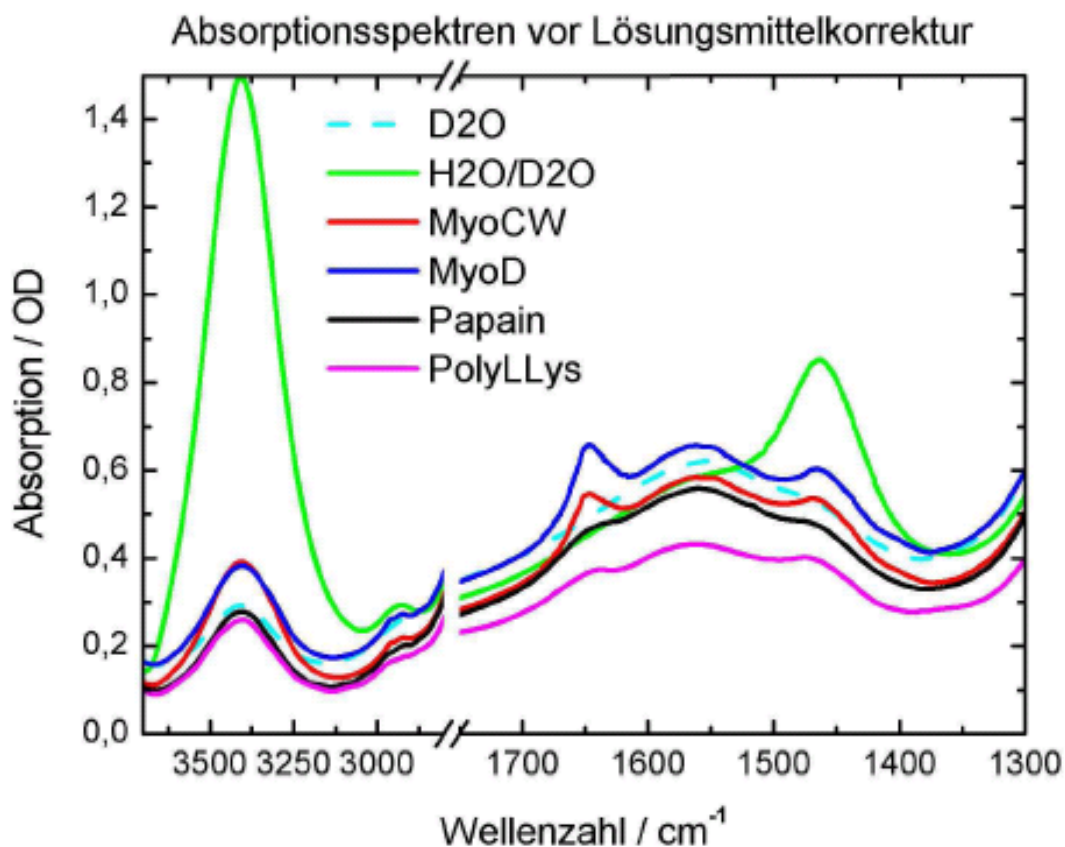


Abbildung 5.1.: Beispiele für Spektren.

## 5.1. Vorversuche

- Bestimmen Sie aus den Strukturen im Leerspektrum der Transmissionszelle die Dicke des Probenraums.
- Diskutieren Sie die Spektren (FTIR offen und geschlossen mit Trockenluftspülung)
- Bestimmen Sie die Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.
- Bestimmen Sie das reine Absorptionsspektrum von D<sub>2</sub>O sowie H<sub>2</sub>O.
- Schätzen Sie die H<sub>2</sub>O-Konzentration der D<sub>2</sub>O Probe ab.

## 5.2. Die Amid-I-Bande von Proteinen

- Diskutieren Sie einen möglichen H<sub>2</sub>O-Gehalt der Papain-, Poly-L-Lysin- und Myoglobinproben an Hand der Spektren.
- Subtrahieren Sie von den Probenmessungen das Hintergrundspektrum des Puffers. Lokalisieren Sie die typischen Banden der Proteine im Bereich  $1400\text{ cm}^{-1}$  bis  $1700\text{ cm}^{-1}$  und der Amid-A-Bande.
- Weshalb eignen sich andere Wellenlängenbereiche nicht zur Auswertung?
- Analysieren Sie nun das Absorptionsspektrum von Papain im Bereich der Amid-I-Banden. Machen Sie zunächst die Basislinienkorrektur, indem Sie zwischen  $1600\text{ cm}^{-1}$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$  einen linearen Untergrund vom Absorptionsspektrum abziehen. Näherungsweise entspricht dies einer Subtraktion der Seitenkettenabsorption.
- Identifizieren Sie die Einzelbanden im obigen Spektralbereich entsprechend Tabelle 5.1.
- Fitten Sie das Absorptionsspektrum mit einem Multi-Gauß-Fit. Benutzen Sie dazu als Startwerte für den Fit die Angaben in Tabelle 5.1. Starten Sie den Fit zunächst mit den gegebenen Zentralwellenlängen und Halbwertsbreiten (FWHM), und optimieren Sie in einem zweiten Schritt den Fit durch Freigeben dieser Parameter. Integrieren Sie nun die Fitkomponenten und bestimmen Sie daraus die Sekundärstrukturanteile. Dabei wird angenommen, daß die Extinktion durch die verschiedenen Sekundärstrukturen im Bereich der Hauptbande näherungsweise konstant ist. Die hochfrequenten Nebenbanden der  $\beta$ -Faltblattstruktur sollen bei diesem Verfahren ignoriert werden, da man sonst den  $\beta$ -Flächenanteil doppelt zählen würde.  
‡ Integrieren Sie das Absorptionsspektrum in den in Tabelle 5.1 genannten Grenzen und ermitteln Sie aus den so erhaltenen Flächen die Sekundärstrukturanteile. Ignorieren Sie dabei den Bereich zwischen  $1682\text{ cm}^{-1}$  und  $1689\text{ cm}^{-1}$ .
- Diskutieren Sie die Werte im Vergleich zu denen aus der Röntgenstrukturanalyse (siehe Tabelle 3.1), sowie Probleme und Fehlerquellen der Sekundärstrukturanalyse mittels Infrarotspektroskopie.

<b>Bandenparameter / <math>cm^{-1}</math></b>			<b>Sekundärstruktur</b>
Bereich	Maximum	FWHM	
1613 ... 1637	1632	20	$\beta$ -Faltblatt
1637 ... 1648	1640	20	Ungeordnet
1648 ... 1662	1655	20	$\alpha$ -Helix
1662 ... 1682	1675	20	Schleifen
1682 ... 1689	1685	20	$\beta$ -Faltblatt

**Tabelle 5.1.:** Typische Wellenlängenbereiche verschiedener Sekundärstrukturen

# A. Anhang

## A.1. Optische Dichte

Die optische Dichte ergibt sich aus dem Lambert–Beerschen Gesetz, das die Absorption von Strahlung beim Durchgang durch ein homogenes Medium beschreibt:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c d}, \quad (\text{A.1})$$

wobei  $I_0$  die Intensität der einfallenden Strahlung,  $I$  die Intensität der Strahlung nach Durchgang durch das homogene Medium mit dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , der Konzentration  $c$  und der Dicke  $d$  beschreibt.

Den Exponenten faßt man zur dimensionslosen Größe der optischen Dichte „ODßusammen.“

## A.2. Proben

### A.2.1. Präparation des Puffers

Für die Proben ist ein Phosphatpuffer mit den pH–Wert 7.4 erforderlich. Für diesen Puffer wird  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  benötigt. Der pH–Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentrationen  $c$  zu

$$\text{pH} = \text{pK}_S + \log \frac{c_{\text{Base}}}{c_{\text{Säure}}}. \quad (\text{A.2})$$

Für den  $\text{pK}_S$ –Wert findet man in der Literatur

$$\text{pK}_S \left( \text{H}_2\text{PO}_4^- \longleftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} \right) = 7.2 \quad (\text{A.3})$$

Damit ergibt sich zusammen mit dem einzustellenden pH–Wert  $c_{\text{Base}}/c_{\text{Säure}} = 1.6$ . Wir wählen daher für den Versuch  $c_{\text{Säure}} = 1 \text{ mM}$  und  $c_{\text{Base}} = 1.6 \text{ mM}$ . Zur Herstellung der Pufferlösung mit dem Volumen  $V$  berechnen wir aufgrund des Molgewichts  $M$ <sup>1</sup> die Masse  $m$  der gelösten Teilchen entsprechend

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{MV} \quad \text{bzw.} \quad m = MVc. \quad (\text{A.4})$$

### A.2.2. Präparation der Proben

Zur Probenpräparation stehen verschiedene Proteine im Tiefkühlschrank im Chemielabor ( $-20^\circ\text{C}$ ) zur Verfügung. Tabelle A.1 gibt einen Überblick über die Proteine und empfohlenen Konzentrationen. Um eine Verunreinigung der Proben möglichst gering zu halten,

---

<sup>1</sup> $M(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136.1 \text{ g/mol}$  und  $M(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 174.2 \text{ g/mol}$

wurde jeweils eine geringe Menge des Proteins in einen kleineren Glasbehälter abgefüllt (Sekundärproben). Bitte zur Probenpräparation nur die Sekundärproben benutzen und die Originalproben stets im Kühlschrank lagern.

Protein	Konzentration / $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Myoglobin	15
Papain	10
Poly-L-Lysin	20

**Tabelle A.1.:** Konzentration der verwendeten Proteine in Lösung

Für einen Versuch wird jeweils ein Probenvolumen von ca.  $100\ \mu\text{l}$  benötigt. Da die Genauigkeitsgrenze der Waage bei etwa  $0.1\ \text{mg}$  liegt, müssen Sie vorsichtig und sehr genau arbeiten. Zum Abwiegen ist die Probenwaage im Chemielabor zu benutzen. Dabei jeweils ein Wägebapier auf die Waage auflegen und die Waage neu austarieren. Dann die erforderliche Menge mit einem Spatel auf das Wägebapier aufbringen. Diese Menge in ein Gefäß geben, anschließend das Wägebapier nochmals wiegen und über diese Differenzmessung die eingebrachte Probenmenge bestimmen.

Falls das genaue Abwiegen nicht gelingt, kann das Probenvolumen auch verdoppelt werden. Dann die erforderliche Menge des Puffers mit einer Pipette hinzufügen. Verschließen und beschriften Sie das Gefäß.

### A.3. Gnuplot

*Gnuplot* ist ein interaktives Plotprogramm, das für alle gängigen Betriebssysteme frei verfügbar ist. Mit *Gnuplot* können Daten aus ASCII-Dateien in 2D- oder 3D-Darstellung geplottet werden. Die Ausgabe kann auf eine Vielzahl von Geräten/Formaten erfolgen (z.B. X11-Terminal, ASCII-Terminal, PS-, PDF-, PNG-Datei). Neben der interaktiven Steuerung ist es ebenfalls möglich, *Gnuplot* über ein Skript zu steuern. Tabelle A.2 enthält eine Liste der empfohlenen Dokumentation. In der *Gnuplot*-Kommandozeile ist außerdem eine Online-Hilfe verfügbar.

Homepage	<a href="http://www.gnuplot.info/">http://www.gnuplot.info/</a>
Download	<a href="http://www.gnuplot.info/download.html">http://www.gnuplot.info/download.html</a>
Dokumentation allgemein	<a href="http://www.gnuplot.info/documentation.html">http://www.gnuplot.info/documentation.html</a>
Ausführliches Handbuch (PDF)	<a href="http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.pdf">http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.pdf</a>
Online Handbuch (HTML)	<a href="http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.html">http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.html</a>
sehr gute Kurzanleitung	<a href="http://www.duke.edu/hpgavin/gnuplot.html">http://www.duke.edu/hpgavin/gnuplot.html</a>

**Tabelle A.2.:** Download und Dokumentation zu *Gnuplot*

Im Folgenden werden an einem Beispielspektrum (FTIR-Spektrum von KBr) einige Plotmöglichkeiten von *Gnuplot* gezeigt. Hier ein kurzer Ausschnitt aus der Datei von kbr.dat

```
#
# KBr Testmessung FTIR
```

```
# 10.03.2005
#
7500.54795    1.63501
7498.61930    1.57173
7496.64069    1.57159
7494.76198    1.56722
...
```

Diese Daten können nach dem Aufruf von Gnuplot mit dem Kommando **plot** dargestellt werden

```
gnuplot> plot "kbr.dat" using 1:2 title 'KBr Testmessung FTIR'
```

Dies erzeugt einen Graph der Daten in einem Standardfenster. Zur Gestaltung des Plots können die folgenden Kommandos verwendet werden:

Titel:	> set title "KBr Testmessung FTIR"
Bezeichnung der x-Achse	> set xlabel "Wellenlaenge"
Bezeichnung der y-Achse	> set ylabel "Absorption"
Datenbereich der x-Achse	> set xrange [0.001:0.005]
Datenbereich der y-Achse	> set yrange [20:500]
automatische Skalierung	> set autoscale
Markierung setzen	> set label "Marke" at 0.003, 260
alle Markierungen loeschen	> unset label
logarithmische Skalierung	> set logscale
logarithmische Skalierung y-Achse	> unset logscale; set logscale y
setzen der Skalierung x-Achse	> set tics xtics (0.002,0.004,0.006)
automatische Ticks x-Achse	> unset tics; set xtics auto

Die Daten können zum Beispiel mit Hilfe des folgenden Skriptes geplottet werden:

```
# Gnuplot script for plotting data file "kbr.dat"
# This file is called kbr.gpl
set autoscale
unset log
unset label
set xtics auto
set ytics auto
set title "KBr-Testmessung 10.03.2005 FTIR"
set xlabel "[cm-1]"
set ylabel "Absorption"
set key 0.01,100
set label "Yield Point" at 0.003,260
```

Die Umlenkung des Plots in eine Postscriptdatei wird mit folgenden Kommandos erreicht:

```
gnuplot> set out 'plotfile.ps'
gnuplot> set term postscript enhanced color
gnuplot> replot
```

An das Spektrum läßt sich eine beliebige Funktion mit folgenden Kommandos fitten und darstellen

```
gnuplot> l(x) = a*x=b
gnuplot> a = 1; b = 1
gnuplot> fit f1(x) 'linear.dat' using 1:2 via a, b
gnuplot> plot 'linear.dat' using 1:2 w points, l(x) w lines
```

Daten lassen sich auch mit Bezierkurven oder Splines glätten. Um den Datensatz geglättet zu plotten, wird einfach nach dem plot-Kommando die Glättungsfunktion angegeben:

```
gnuplot> plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```

Dabei gibt der Wert im Klammern das Gewicht der einzelnen Punkte an: Je kleiner der Wert, desto mehr Punkte werden bei der Berechnung der Splines einbezogen. Die geglätteten Daten können auch wieder in eine ASCII-Datei ausgegeben werden, indem die Ausgabe zuvor in eine Tabelle umgelenkt wird.

```
gnuplot> set out 'kbr_smooth.dat'
gnuplot> set term table
gnuplot> plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```

## A.4. Abgabe der Auswertung

Bitte senden Sie Ihre Auswertung an folgende Adresse (schriftlich oder per E-Mail):

```
=====
Dr. Alexander Gerlach
Lehrstuhl fuer Physik der biologischen und molekularen Materie
Institut fuer Angewandte Physik
Universitaet Tuebingen
Auf der Morgenstelle 10, Raum C7 A29
D-72076 Tuebingen
```

```
Phone: ++49 7071 29 73362
FAX: ++49 7071 29 5110
E-Mail: alexander.gerlach@uni-tuebingen.de
=====
```