

Versuchsanleitung V3 - Teil 2

Betreuer: P. Fischer, E. Peter, A. Spreen

2 Gitterspektrometer

2.1 Einleitung

In diesem Praktikumsabschnitt bauen wir ein Gitterspektrometer auf und verwenden es, um die für spektroskopische Messungen kritischen Geräteparameter kennenzulernen. In den auf Moodle verfügbaren Videos (S1 - S4, rot markiert) erläutern wir euch außerdem das Prinzip der Spektroskopie, die grundlegenden Bestandteile eines Spektrometers und ihre Funktionen. Außerdem könnt ihr die Experimente dort jederzeit noch einmal von uns erklärt und durchgeführt anschauen.

2.2 Auflösungsvermögen eines Gitter-Spektrometers („S1 – Einleitung zum Spektroskopie-Versuch“)

Heutzutage werden holographisch erzeugte Reflexionsgitter zur spektralen Zerlegung von Licht bevorzugt. Diese sind preiswert, nutzen das Licht fast vollständig aus und können abbildende Eigenschaften aufweisen (z.B. Hohlspiegelgeometrie). Die folgende Abbildung zeigt das Anwendungsschema eines solchen Gitters.

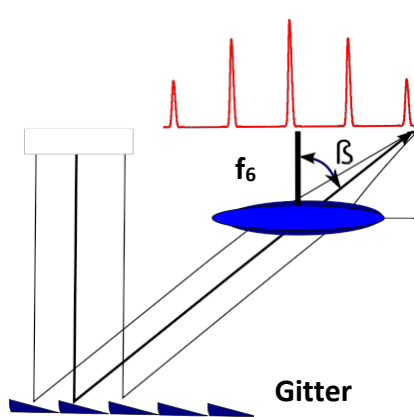


Abb. 7: Das Reflexionsgitter wird mit parallelem Licht (schwarz gezeichnet) beleuchtet und reflektiert es - im Unterschied zu einem einfachen Spiegel - in alle Raumrichtungen mit dem Winkel β . Die rot gezeichnete Kurve in der Abbildung zeigt beispielhaft für den Rotlichtanteil, dass dadurch Reflexionsmaxima erzeugt werden. Diese sind abhängig von β , d.h. es gibt Abstrahlwinkel, unter denen besonders viel Licht und Winkel, unter denen kaum Licht reflektiert wird. Die Lage der Maxima ist dabei wellenlängenabhängig, wodurch in der Summe hinter dem Gitter ein Regenbogenspektrum erzeugt wird. Diese Wellenlängenabhängigkeit ist die spektroskopisch genutzte Eigenschaft von Gittern. (Siehe Folgeabbildung)

In der Abbildung sind die Gitterstege keilförmig und lenken daher besonders viel Licht in eine bestimmte Vorzugsrichtung. Man wählt diese Vorzugsrichtung so, dass bestimmte Wellenlängenbereiche stark reflektieren und spricht in diesem Zusammenhang von **geblazten** Gittern: z.B. ist das von uns verwendete Gitter auf 500nm geblazed und daher im 500nm-Bereich besonders lichtstark. Weitere Kenngrößen des Gitters sind sein **Gitterabstand** (= Gitterkonstante; bei uns: $D = \frac{1\text{mm}}{1200} = 833\text{nm}$) und die Breite der lichtdurchlässigen Spalten dazwischen (**Breite b**). Bei Reflexionsgittern gibt es nur reflektierende Bereiche, sodass hier $D = b$ zu setzen ist. Die in der Abbildung rot gezeichnete Intensitätskurve genügt folgender mathematischen Funktion:

$$I(\sin \beta) = \left(\frac{\sin(x)}{x} \right)^2 \left(\frac{\sin(N * y)}{\sin(y)} \right)^2 ; \quad x = \frac{\pi b}{\lambda} \sin \beta ; \quad y = \frac{\pi D}{\lambda} \sin \beta$$

Diese Funktion hat ihre Maxima an den Stellen, an denen $y = \left\{ \frac{\pi D}{\lambda} \sin \beta \right\}$ den Wert: $m \cdot \pi$; ($m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$) aufweist, also bei:

$$\sin \beta_m = m \frac{\lambda}{D}; \quad m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (6)$$

Dies ist die zentrale Gleichung für ein Gitter: Der Auslenkwinkel β_m , unter dem das Gitter maximal reflektiert, ist demnach proportional zur Beugungsordnung m und zur Wellenlänge λ des reflektierten Lichtes. Nach Formel (6) ist der Auslenkwinkel β für langwelliges Licht größer. Dieser Zusammenhang ermöglicht es, Gitter zur Zerlegung von Licht zu verwenden.

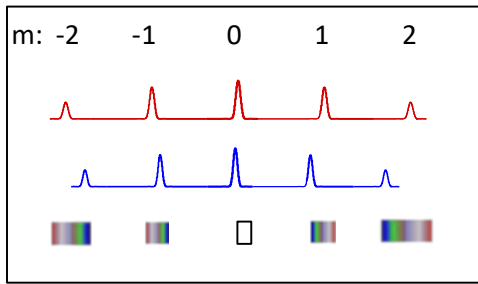


Abb. 8: Die Lage der Maxima stimmt bei lang- und kurzwelligem Licht nicht genau überein. Überlagern sich die verschiedenfarbigen, reflektierten Lichtanteile (was in der Anwendung automatisch passiert), entsteht pro Beugungsordnung ein Regenbogenmuster. Je größer die Beugungsordnung m , umso ausgedehnter das Muster und umso besser nach Gleichung (7) die Auflösung.

2.2.1 Auflösung eines Spektrometers

Im Zusammenhang mit dem Auflösungsvermögen werden folgende Begriffe verwendet:

<p>Auflösungsvermögen</p>	<p>theoretische Fähigkeit, eine Wellenlängendifferenz von $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ noch aufzulösen. Die Kenngröße</p> $\Delta\lambda/\lambda = (N * m)^{-1} \quad (7)$ <p>folgt aus dem Rayleigh-Kriterium und hängt nur von Anzahl beleuchteter Gitterspalten N und der genutzten Beugungsordnung m ab. Beispiel: Für ein Gitter mit $N = 5000$ ausgeleuchteten Spalten (unser Fall) ergibt sich für grünes Licht ($\lambda = 500\text{nm}$) bei der ersten Beugungsordnung ($m = 1$): $\Delta\lambda = 500\text{nm}/(5000 * 1) = 0.1\text{nm}$.</p>
<p>Winkeldispersion</p>	<p>Wenn man die Wellenlänge um den kleinen Betrag $\Delta\lambda$ vergrößert, vergrößert sich der Auslenkwinkel um den Betrag $\Delta\beta$. Das Verhältnis $\Delta\beta/\Delta\lambda$ kennzeichnet diesen Zusammenhang und kann aus (6) berechnet werden:</p> $\Delta\beta/\Delta\lambda = m/(D * \cos \beta) \quad (8)$ <p>Demnach verbessern kleinere Gitterkonstanten D und höhere Beugungsordnungen m die Auflösung. Die Nutzung höherer Beugungsordnungen ist aber aus zwei Gründen schwierig: zum einen sinkt die Lichtausbeuten mit zunehmendem m; zum anderen können höhere Beugungsordnungen gegenseitig überlappen.</p>
<p>Lineardispersion (LD)</p>	<p>Das Verhältnis zwischen der Länge (Δx) des Regenbogenmusters und dem darauf abgebildeten Wellenlängenbereich ($\Delta\lambda$) ist im starken Maße von der Brennweite der abbildenden Linse (bei uns f_6) abhängig. Wegen $\Delta x/\Delta\lambda = (\Delta x/\Delta\beta) * (\Delta\beta/\Delta\lambda)$ erhält man mit Gl. (8) und den geometrischen Relationen von Abb.9 folgenden Zusammenhang zwischen Dispersion und Gittereigenschaften:</p> $\Delta x/\Delta\lambda = f_6 * m/D \quad (9)$
<p>effektive Bandbreite (λ_e)</p>	<p>Die bisherigen Ergebnisse gelten nur, wenn an der Blende ein sehr enger Spalt eingestellt wird. Endliche Spaltbreiten (z.B. $S_p = 100\mu\text{m}$) ergeben eine geringere Auflösung $\Delta\lambda_e$:</p> $\Delta\lambda_e = S_p * (\Delta\lambda/\Delta x) \quad (10)$ <p>Die hier benötigte Größe $\Delta\lambda/\Delta x$ kann man durch Messungen bestimmen oder mit Gl. 9 aus den optischen Parametern berechnen (f_6 ist die Brennweite der abbildenden Linse)</p>

Die für die Anwendung wichtigsten Kenngrößen sind die gerade noch unterscheidbaren Wellenlängendifferenzen ($\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$). Diese können als theoretische Größe aus Gl. 7 berechnet werden, wobei sich der theoretische Wert bei „unendlich schmal“ eingestelltem Spalt ergeben würde. Praktisch relevanter ist nach Gl. (10) die bei endlicher Spaltöffnung tatsächlich noch erreichbare Auflösung.

2.3 Aufbau des Spektrometers

(„S1 – Einleitung zum Spektroskopie-Versuch“ und „S2 – Bedienung und Kalibrierung eines Spektrometers“)

Die Abbildung zeigt die Anordnung der optischen Elemente:

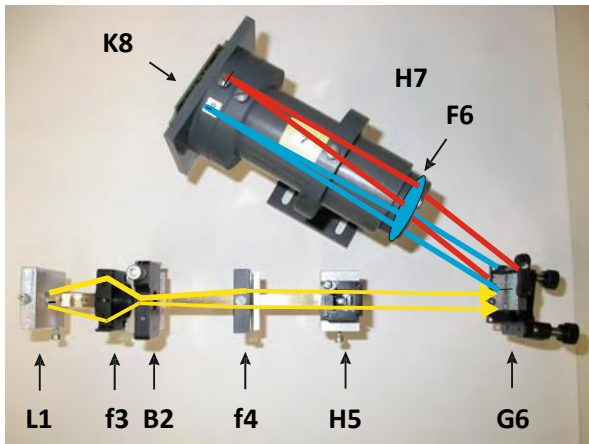


Abb. 9: Aufbau des Spektrometers und Strahlengang:

L1: Halterung für Lichtleitkabel;

f3 = 17mm Kondensorlinse;

B2: einstellbarer Blendenspalt;

f4 = 60mm: Kollimatorlinse;

H5: Küvettenhalter;

G6: Reflexionsgitter mit justierbarer Halterung;

H7: Halterungsröhre mit Linse **f6 = 150mm** und Kamera (K8).

Wir beschreiben nun Prinzip und Aufbau des Gerätes:

1. **Beleuchtung:** Lichtquelle L1 und Blende B2 werden im Abstand von 75mm positioniert (Abstandsmessung: immer zwischen rechten Kanten der Halterungen). Die Linse f3 mit der Brennweite 17mm soll die Leuchtfläche vergrößert auf den Blendenspalt abbilden, die dazu notwendige Position der Linse und die resultierende Vergrößerung sind zu bestimmen.
Hinweis: siehe Praktikumsteil Mikroskopie
2. **Abbildung des Spalts auf dem Gitter:** Die Linse f4 mit der Brennweite 60mm hat zum Blendenspalt (B2) einen Abstand von 60mm und erzeugt daher paralleles Licht, welches über die Küvette H5 zum Gitter G6 gelangt.
3. **Abbildung des vom Gitter reflektierten Lichts:** Das Gitter(G6) reflektiert das ankommende Licht in die unterschiedlichen Beugungsordnungen $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$; d.h. im Umkreis des Gitters werden verschiedene Regenbogenmuster sichtbar.
4. **Justage des Gitters:** Wir ersetzen die Kamera durch einen Auffangschirm (nicht gezeigt) und zentrieren das Regenbogenmuster mithilfe der Justierschrauben (am G6-Halter) so, dass der gelbe Spektralbereich mittig auf dem Bildschirm zu sehen ist. Abschließend wiederholen wir die Justage mit aufgesetzter, laufender Kamera (Ziel nun: maximale Lichtintensität einstellen).

2.4 Beschreibung des Kameraprogramms und des Delay-Generators:

Für den Aufbau des Spektrometers und die späteren Messungen benötigen wir das Programm "LineCam" dessen Bedienung wir kurz vorstellen. Dieses Programm wird wie folgt benutzt:

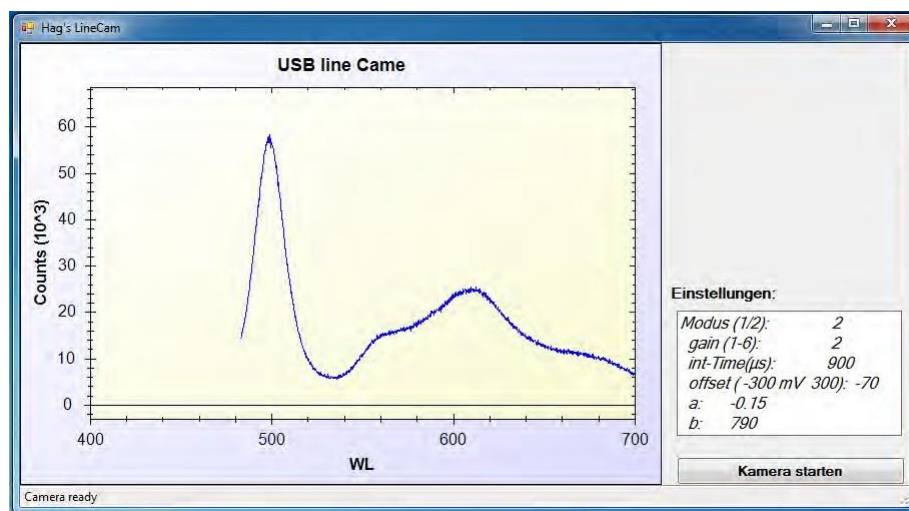
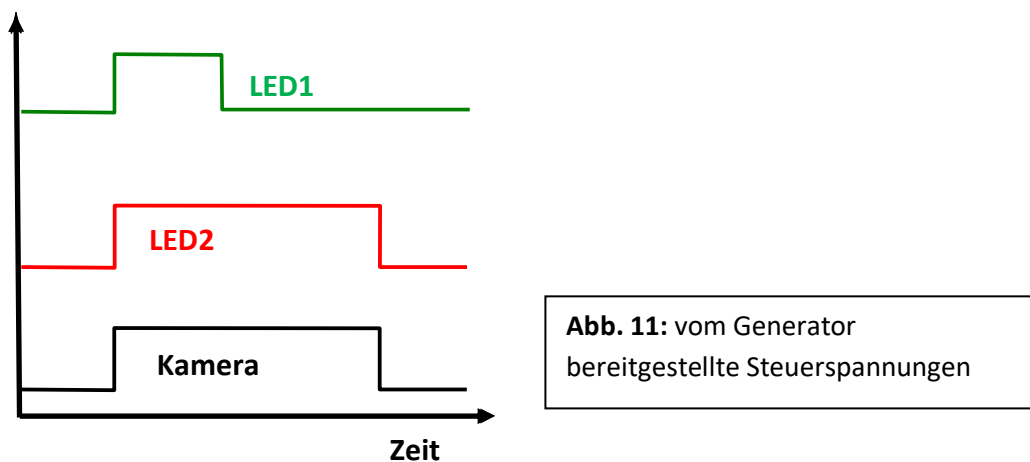


Abb. 10: Steuerprogramm für die Kamera: Kameraeinstellungen werden ins Einstellungsfeld eingetragen und anschließend die Messungen mit dem Button gestartet.

1. Mithilfe des „**Einstellung**“-**Feldes** können der Gain, die Integrationszeit und der Kameraoffset geändert werden. Dazu sind die alten Werte zu überschreiben; die Eingaben werden aber erst nach erneutem "Kamera starten" wirksam!
2. Im **Modus 1** kann die Kamera freilaufend gestartet/angehalten werden (der Button wechselt dabei seine Bezeichnung).
3. Im **Modus 2** können Messungen ausgeführt und anschließend auch gespeichert werden. Ist Modus 2 gesetzt, sind folgende Schritte zur Durchführung einer Messung notwendig:
 - **Im Kameraprogramm:** der Button mit der Aufschrift "Kamera starten" wird betätigt worauf der Button seine Aufschrift wechselt, die Kamera messbereit wird und auf ein Startsignal (=Triggersignal) wartet. Dieses Startsignal wird im nächsten Schritt durch den Delay-Generator erzeugt.
 - **Delay-Generator:** Wir erzeugen das Triggersignal mit dem Start-Button des Generators. Ohne dass es erkennbar ist, führt die Kamera daraufhin Messungen mit einer Geschwindigkeit von 481 Spektren/Sekunde aus. Diese Spektren werden zwar gemessen, aber erst im folgenden Schritt angezeigt.
 - **Im Kameraprogramm:** Um die gemessenen Spektren zu sehen, betätigen wir nun den Button mit der Aufschrift: "Kamera triggern; dann Enter". Wir können anschließend die Spektren betrachten (scrollen) und bei Bedarf speichern. Danach kann eine weitere Messung ausgeführt werden.

Der Delay-Generator steuert den Messablauf und produziert dafür auf Knopfdruck folgende Spannungsverläufe:



Ausgangssignale des Generators:

1. **LED1:** Diese LED wird auf die BR-Küvette gesteckt und aktiviert mit ihrem Grünlicht das Photosystem. Dauer und Höhe (=Helligkeit der LED) des Impulses können am Generator eingestellt werden (Voreinstellung: Delay 0,1s; Pulsdauer 0,9s).
2. **LED2:** Diese LED ist am Halter L1 befestigt. Sie erzeugt für die Dauer der Messung weißes Messlicht. Länge und Höhe des Impulses können ebenfalls am Generator eingestellt werden (Voreinstellung: Delay 0s; Pulsdauer 2s).
3. **Kamera-Signal:** dieses Signal folgt der LED2; es ist mit der Kamera verbunden und aktiviert/triggert diese.

2.5 Einstellung des Spektrometers für eine Messung:

(„S2 – Bedienung und Kalibrierung eines Spektrometers“)

Generell gilt: Je mehr Licht für eine optische Messung verwendet wird, umso besser das Signal/Rausch Verhältnis und umso besser die Qualität der Messung:

Erklärung: Ist n die pro Zeiteinheit registrierte Lichtmenge (d.h. das Signal), so ist \sqrt{n} die Standardabweichung des Signals und der Ausdruck $\frac{n}{\sqrt{n}} = \sqrt{n}$ das Signal/Rausch Verhältnis (Dies folgt daraus, dass die zur Beleuchtung verwendeten thermischen Lichtquellen Poisson-verteilte Strahler sind).

Folge: je mehr Messlicht verwendet wurde, umso besser die Datenqualität. Demgegenüber steht aber die Belastung der Probe, die durch zu viel Messlicht beschädigt oder zerstört werden kann.

Im Folgenden wollen wir die relevanten Kamera- und Versuchsparameter (Gain, Integrationszeit, Spaltblende und Lichtstärke) optimal einstellen. Wir vermessen als Kontrolle eine wassergefüllte Küvette und starten dazu das Kameraprogramm im Modus 1. Anschließend stellen wir die Versuchsparameter wie folgt ein:

1. Die Integrationszeit (Kamera) legt die Belichtungsdauer der Kamera/des Empfängers fest. Wir wählen die Integrationszeit etwas kleiner, als die von uns gewünschte Zeitauflösung für die Messung. Beispiel: wir wollen das Verhalten eines Photosystems im ms-Bereich untersuchen. Dazu muss die Integrationszeit ≤ 1 ms sein.
2. Je nach Spaltbreite (Spektrometer) gelangt mehr oder weniger Licht auf die Probe. Prinzipiell günstig sind also große Spaltbreiten. Wir müssen aber verhindern, dass ein zu groß eingestellter

Spalt die spektrale Auflösung zu stark vermindert. Dazu müssen wir die effektive Bandbreite unseres Spektrometers berechnen (siehe Gl. 10 und Abschnitt 2.2.1) und mit der von uns gewünschten Auflösung vergleichen. Beispiel: falls wir eine Auflösung von wenigstens 1nm wünschen, darf die effektive Bandbreite nicht kleiner als 1nm sein.

3. Der Gain (Kamera) verstärkt die Anzahl der von der Kamera gezählten Photonen (d.h. die Counts), ohne jedoch die tatsächlich zur Messung verwendete Lichtmenge zu beeinflussen. Es ist daher immer günstig, einen geringen bzw. mittleren Gain einzustellen: Wir wählen einen Wert von 2.
4. Lichtintensität (weiße LED): Nach Einstellung der bisherigen Parameter erhöhen wir die Lichtintensität bei laufender Kamera auf den maximal möglichen Wert (das Spektrum darf nirgends übersteuert sein). Falls wir Kenntnis haben, dass eine empfindliche Probe diese Intensität nicht überstehen würde, müssten wir natürlich mit entsprechend weniger Licht arbeiten. Um dann dennoch eine vergleichbare Datenqualität zu erreichen, müssen wir n Messungen ausführen und die für eine hohe Datenqualität erforderliche Lichtmenge auf diese.

2.6 Eichung des Spektrometers („S2 – Bedienung und Kalibrierung eines Spektrometers“)

Zur Wellenlängen-Eichung des Spektrometers wird das Kameraprogramm im Modus 1 verwendet. Die Umrechnung von Kamerapixeln (i) auf Wellenlängen ($W \cdot L$) soll nach der Gleichung $W \cdot L = a \cdot i + b$ erfolgen. Die beiden Umrechnungsparameter a und b müssen dazu wie folgt bestimmt und eingegeben werden:

- Zunächst wird a auf den Wert 1 gesetzt und die Kamera mit dieser Einstellung gestartet. Das Programm zeigt nun auf der WL-Achse die Pixelpositionen direkt an.
- Zur Eichung werden Interferenzfilter der Wellenlängen $\lambda_1 = 436\text{nm}$; $\lambda_2 = 575\text{nm}$; $\lambda_3 = 675\text{nm}$ nacheinander in den Strahlengang gebracht und die jeweilige Lage des Intensitätsmaximums ($\text{max}_1, \text{max}_2, \text{max}_3$) notiert (dazu Maus in die Abbildung bewegen und mit der rechten Maustaste die Option "Punktwerte anzeigen" aktivieren).
- mit den erhaltenen drei Punktpaaren (max_i, λ_i) wird die Ausgleichsgerade berechnet (z.B. mit Excel) und anschließend die so gefundenen a, b Parameter ins Programm eingegeben. Nach Neustart der Kamera werden dann vom Programm auf der WL-Achse die Wellenlängen angezeigt. Zur Kontrolle: Näherungen für die Parameter sind $a = -0.15$; $b = 700$.

2.7.1 Aufgabe (Protokoll): Bestimmung der effektiven Bandbreite des Spektrometers mit zwei Interferenzfiltern („S4 – Rechnungen zur Spektroskopie“)

Wir hatten oben gesehen, dass die effektive Bandbreite eine wichtige Kenngröße unseres Spektrometers darstellt. Wir können diese Größe wie folgt erhalten: Unsere Kamerazeile hat eine Länge von $x = 35\text{mm}$ und ist in 2048 Pixel unterteilt. Nach der Eichung wissen wir, bei welchen Pixelpositionen $x_{\text{max}1}, x_{\text{max}2}$ Licht der Wellenlängen $\lambda_{\text{max}1}, \lambda_{\text{max}2}$ abgebildet wird. Aus diesen Angaben können wir $\Delta\lambda$ und Δx berechnen. Mit diesen experimentell ermittelten Angaben können wir nach Gl. 10 die effektive Bandbreite $\Delta\lambda_e$ des Spektrometers als von S_p abhängige Formel angeben. Für einen auf $100\mu\text{m}$; $250\mu\text{m}$ bzw. 1mm eingestellten Spalt lassen sich nun die jeweiligen möglichen Auflösungen errechnen.

Alternativ dazu berechnen wir die effektive Bandbreite auch gemäß den Gleichungen 9 und 10 aus den *optischen Daten* unseres Versuchsaufbaus. **Führen Sie im Protokoll beide Rechnungen durch! Geben Sie auch an, welcher Spaltbreite wir uns bei einer gewünschten Auflösung von maximal 1nm noch leisten dürfen und diskutieren Sie, wie wir die Auflösung unabhängig der Spaltbreite steigern können.**

2.7.2 Aufgabe (Protokoll): Allgemeine Fragen zur Spektroskopie

Beantworten Sie kurz die folgenden Fragen:

- I. Nennen Sie zwei Möglichkeiten, die Auflösung eines Gitterspektrometers zu erhöhen.
- II. Weißes (voller sichtbarer Spektralbereich), paralleles Licht fällt auf ein optisches Beugungsgitter. Sie betrachten das entstehende Beugungsmuster. Was passierte hauptsächlich mit dem Licht am Gitter, dass Sie im Beugungsmaximum der nullten Ordnung ($m=0$) sehen
- III. Was versteht man unter einem geblazten Gitter?

Machen Sie sich mit der Lage der Beugungsmaxima auf dem Papierstreifen vertraut („S2 – Bedienung und Kalibrierung eines Spektrometers“) und fertigen Sie dazu für das Protokoll eine Skizze an. Die Skizze soll die Maxima für folgende m -Werte zeigen: $m = -1, 0, 1, 2$. Markieren Sie auf der Skizze das geblazte Maximum.

2.8 Versuch: Bestimmung des Spektrums von Chlorophyll α

(„S1 – Einleitung zum Spektroskopie-Versuch“ und „S3 – Experimente zur Spektroskopie“)

Aus der Formel für die Extinktion (E) $E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$ (1. Form des Lambert-Beerschen Gesetzes) erhalten wir die Extinktion durch Messung von Probenspektrum (SP) und Referenzspektrum (SR), es gilt: $\frac{I_0}{I} = SR/SP$. Da wir das Spektrum einer propanolischen Chlorophyll α -Lösung (SP) bestimmen wollen, dient neben dieser Probe eine Küvette mit reinem Isopropanol als Referenz (SR). Die Versuchseinstellungen werden immer mit der Referenz vorgenommen (im Modus 1 nach Abschnitt 2.4; Hinweis: da wir langsam messen können, wählen wir eine Integrationszeit von $1000\mu\text{s} = 1\text{ms}$). Die eigentliche Messung und Speicherung der Referenz- und Proben-Spektren erfolgen im Modus 2 nach Abschnitt 2.4)

Im Resultat der Messung erhalten wir sowohl für die Probe als auch für die Kontrolle je 1000 Spektren. Zur Auswertung berechnen wir mit MatLab den Mittelwert der Spektren und anschließend zusammen mit dem Referenzspektrum das Extinktionsspektrum des Farbstoffes.

Aufgabe (Protokoll): Chlorophyll-Konzentration

Welche Chlorophyll-Konzentration hatte die unter 2.7 gemessene Lösung (als Extinktionskoeffizient verwenden Sie bitte die 1. und 2. Form des Lambert-Beerschen Gesetzes für folgende Parameter: Chlorophyll α in 96% Ethanol bei $\lambda = 664 \text{ nm}$: $\varepsilon \approx 74500 \frac{\text{l}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$ mit Küvettendicke $d = 1 \text{ cm}$

2.9 Versuch: Messung eines Bakteriorhodopsin-Zyklus

2.9.1 Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) ist ein mikrobielles, membranständiges Photosystem, welches nach Lichtenregung einen Photozyklus durchläuft und als Protonenpumpe dient (**BR ist eines der am besten verstandenen Membranproteine, daher gibt es unzählige Literatur dazu im Internet!**). Im Grundzustand liegt das Absorptionsmaximum von BR bei etwa 570nm. Durch die Belichtung mit Grünlicht bildet sich unter anderem ein intermediärer Zustand **M**, der ein verschobenes Absorptionsmaximum bei 412nm aufweist und innerhalb weniger ms wieder zum Grundzustand relaxiert. Diese während des Photozyklus' auftretenden spektralen Änderungen können gemessen werden und ermöglichen Aussagen über die Eigenschaften des Photosystems. Die Prozesse liegen jedoch beim Wildtyp-BR im unteren Grenzbereich unserer Zeitauflösung. Um den Photozyklus mit unserem Spektrometer gut untersuchen zu können, verwenden wir daher eine Mutante von BR verwendet: D96N. Bei dieser ist ein bestimmter Schritt innerhalb des Zyklus stark verlangsamt. Auf molekularer Ebene heißt dies: Der Austausch von Aspartat 96 durch Asparagin verlangsamt die Reprotonierung des Proteins, welche zurück zum Grundzustand führt, da Aspartat 96 im WT als Protonendonator fungiert.

2.9.2 Durchführung:

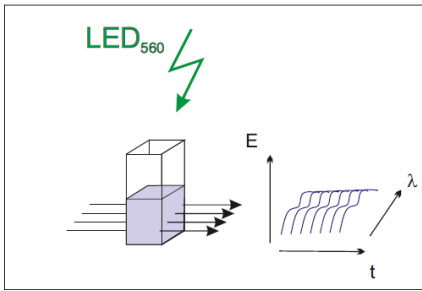


Abb. 12: Die Küvette mit Bakteriorhodopsin (D96N). Bei Beleuchtung mit einer grünen LED durchläuft das BR spektrale Änderungen. Diese Änderungen, die den ablaufenden Photozyklus repräsentieren, werden durch die Kamera aufgezeichnet.

Zur Vorbereitung der Messung wird die BR-Küvette in die Küvettenhalterung eingesetzt. Nun werden im kontinuierlichen Modus 1 die Parameter für die Messung möglichst passend eingestellt, hierbei kann auch die aktivierende Grünlicht LED eingesetzt werden, um abzuschätzen, wie stark die dadurch induzierten spektralen Änderungen sind. Anschließend erfolgt die Messung im Modus 2.

2.9.3 Berechnung der Spektren

Die erhaltenen Spektren werden gespeichert und durch eine Auswerteroutine in MatLab verarbeitet. Da uns die spektralen Veränderungen interessieren, die durch die Photoaktivierung von BR ausgelöst werden, benötigen wir als Referenz ein Spektrum von unbelichtetem BR. Dazu werden bei der Auswertung die ersten 40 Spektren der Messung (bei denen die grüne LED noch nicht angeschaltet war) gemittelt. Dieses Dunkelspektrum wird anschließend von allen belichteten Spektren des Messdatensatzes abgezogen. Anschließend wird die Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit und der Wellenlänge dargestellt. Aus dieser Auftragung soll für den Übergang M -> Grundzustand die Zeitkonstante τ abgeschätzt bzw. berechnet werden (man legt einen exponentiellen Prozess zugrunde: $A(t) = A_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$)

2.9.4 Aufgabe (Protokoll): Bestimmung der Zeitkonstante τ („S4 – Rechnungen zur Spektroskopie“)

Bestimmen Sie die Zeitkonstante τ und zeichnen diese in das erhaltene Spektrum. (Sollten Sie die Daten fitten, bitte Grafik und Fitparameter mitangeben).

2.10 Protokoll/ Auswertung

Diskutieren Sie im Zusammenhang mit durchgeführten Messungen (Videos) u.a. folgende Punkte (aber nicht einfach nur als Verweise auf das Skript!):

1. Aufbau und Funktionsweise eines Spektrometers (Skizze, Beschreibung wichtiger Bestandteile)
2. Beschreibung des Prozesses der Kalibrierung/Eichung
3. Aufgabe: Bedeutung und Berechnung der effektiven Bandbreite
4. Aufgabe: Allgemeine Fragen zur Spektroskopie
5. **Versuch: Bestimmung des Spektrums von Chlorophyll a**
 - i. Versuchsziel
 - ii. Versuchsdurchführung
 - iii. Qualitative Beschreibung des erhaltenen Spektrums
 - iv. Aufgabe: Berechnung der Chlorophyll-Konzentration
6. **Versuch: Messung eines Bakteriorhodopsin-Zyklus**
 - i. Versuchsziel
 - ii. Versuchsdurchführung
 - iii. Qualitative Beschreibung des erhaltenen Spektrums
 - iv. Aufgabe: Bestimmung der Zeitkonstante τ