

**Spektrofotometrin
historiaa, toiminta ja sovelluksia
– esimerkkinä klorofyllin määrittäminen**

Nelly Heiskanen

Kandidaatin tutkielma

Kemian opettajankoulutusyksikkö

Kemian laitos

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

9.3.2016

Ohjaajat: Heli Sirén

Maija Aksela

Sisällys

1.	Johdanto	1
2.	Spektroskopian kehittyminen	2
2.1.	Määritelmiä	2
2.2.	Spektroskopian historiasta	3
2.3.	Spektrofotometrin kehittyminen – makrosta nanoteknologiaan	7
3.	Spektrofotometrin toiminta	9
3.1.	Teoreettinen perusta	9
3.1.1.	Sähkömagneettinen säteily	9
3.1.2.	Absorptio ja emissio	10
3.1.3.	Lambert-Beerin laki	12
3.2.	Spektrofotometrin rakenne	14
3.2.1.	Säteilyn lähteet	14
3.2.2.	Monokromaattorit	15
3.2.3.	Näytetila ja kyvetit	15
3.2.4.	Detektorit eli ilmaisimet	16
3.2.5.	Lukeman ilmoittaminen	17
3.2.6.	Tyypillisimpiä malleja	18
3.3.	Rajoitukset ja tarkkuus	21
3.4.	Sovellukset	23
3.4.1.	Lääketieteellisiä sovelluksia	23
3.4.2.	Spektrofotometrin käyttö satelliittimittauksissa	23
3.4.3.	Spektrofotometri rikostutkimuksessa	24
3.4.4.	Ilmanlaadun tutkimus spektrofotometrillä	24
3.4.5.	Spektrofotometri ruoan laadun valvonnassa	25
3.4.6.	Spektrofotometri prosessianalytiikassa	25
4.	Klorofyllin määrittäminen spektrofotometrillä	26
4.1.	Klorofyllin rakenne	26
4.2.	Klorofyllin absorptiospektri	27
4.3.	Klorofyllin absorptiospektrin määrittäminen pinaatista Vernierin UV-Vis – spektrofotometrillä	28
5.	Yhteenveto	29
6.	Lähteet	30
7.	Liitteet	34

1. Johdanto

Analyttinen kemia on tieteenala, joka tutkii ja kehittää metodeja, laitteita ja strategioita keräämään tietoa alkuaineista ja yhdisteistä, sekä niiden luonteesta ajassa ja avaruudessa.¹ Sillä on lukuisia sovelluksia yhteiskunnassa, esimerkiksi lääketieteellisessä käytössä. Analyttisen kemian kehittyminen merkitsee paljon myös muiden tieteenalojen kehittymiselle.² Analyttisistä menetelmistä (LIITE 1) spektroskopia ja kromatografia ovat yleisimmin käytettyjä.³ Ne molemmat soveltuvat sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen tutkimukseen. Näkyvän valon spektrometritekniikka on todennäköisesti laajiten käytetty analyttinen tekniikka. Spektroskopian merkittävyyttä analyttisenä tekniikkana kuvaa hyvin myös suuri lukumäärä myönnettyjä Nobelin palkintoja.⁴⁻⁶

Spektrofotometria on yksi vanhimmista analyttisistä tekniikoista ja se jatkaa kehittymistään vastatakseen modernin tieteen tarpeita.⁷ Erilaisilla spektrometriaan perustuvilla analyysilaitteilla, kuten UV-, Vis-, IR-, ja NMR-spektrometreillä on vakiintunut asema nykyaikaisissa laboratorioissa. Analyysilaitteiden hallinta on oleellista monilla eri tieteenaloilla ja osaaminen on yhteydessä arkielämän turvallisuuteen.⁸ Lisäksi historian näkökulmasta uusien analyysimenetelmien kehittäminen on kulkenut rinnan uusien laiteinnovaatioiden kanssa.⁹ Analyysimenetelmiä kehittävän henkilön tulee tietää, mikä on hänen käyttämänsä laitteen toimintaperiaate.¹⁰ Lisäksi hänen on osattava verifioida sopivin analyysimenetelmä, ymmärtää laitteen antaman tuloksen merkitys ja osattava soveltaa menetelmiä laaja-alaisesti.

Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on antaa lyhyt, mutta kattava kokonaiskuva ensimmäisistä spektroskooppisista tutkimuksista keskittyen kuvaamaan spektrofotometrian historiaa, selittää näkyvän valon alueen spektrometrin eli spektrofotometrin toiminnan perusteet ja toimintaperiaate, sekä antaa esimerkkejä spektrofotometrisestä tutkimuksesta yhteiskunnassa. Tutkielma on suunnattu opettajille hyödynnettäväksi spektrofotometrian teoriataustana ja käytettäväksi innostavien esimerkkien poimimiseen sen nykypäivän sovelluksista. Tarkemmin on esitetty klorofyllin UV/Vis-spektrin määrittäminen, koska se soveltuu hyvin myös oppilastyöksi lukiotasolla. Spektroskopia ja aineen rakenteen määrittäminen on keskeinen sisältö lukion toisella kurssilla uusien lukion opetussuunnitelman perusteiden¹¹ (2015) mukaan. Näkyvä valo on ainoa sähkömagneettisen säteilyn muoto, jonka pystymme havaitsemaan paljaalla silmällä, joten se on myös opiskelijoille tutuin, mutta silti mielenkiintoinen tutkimuskohde.

2. Spektroskopian kehittyminen

2.1.Määritelmiä

Spektroskopia on IUPAC:in määritelmän mukaan tutkimusala, joka tutkii sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutuksia aineen kanssa tai säteilyä jota aine itse tuottaa.¹² Silloin kun tietoa tutkittavasta alkuaineesta ja sen komponenteista kerätään mittaamalla, puhutaan spektrometriasta. Sana ”metry” viittaa mittaamiseen ja ”spectrum” kuvaamiseen. Laitetta, joka mittaa sähkömagneettista spektriä, kutsutaan spektrometriksi.

Spektrometrin edeltäjiä ovat olleet spektroskoopit, spektrografi¹³ ja erilaiset kolorimetrit¹⁴. Spektroskooppi on laite, joka mahdollisti optisen spektrin havaitsemisen ja tutkimisen.¹² Sen kehittyneempi muoto on spektrografi, joka on spektroskoopin ja kameran yhdistelmä. Se pystyy siis tallentamaan valokuvana spektroskoopilla muodostetun spektrin. Kolorimetrien keksiminen perustui intuitiiviseen oletukseen siitä, että saman aineen tummempi liuos on myös konsentraatioltaan suurempi.¹⁴ Ensimmäisillä kolorimetreillä verrattiin siis silmämääräisesti liuosten värisävyjä. Tällöin tutkittavan näyteliuoksen konsentraatio pääteltiin tunnetun liuoksen intensiteettiin vertaamalla. Esimerkiksi Nesslerin putkien käyttäminen on kolorimetrinen menetelmä.

IUPAC¹² luokittelee spektrokemialliset menetelmät yleisesti aineessa tapahtuvan energian siirtymistavan mukaan absorptio-, emissio- ja fluoresenssispektroskopiaksi. Absorptio on energian vastaanottamista ja emissio energian luovuttamista säteilynä. Fluoresenssi tarkoittaa emissiota, joka tapahtuu spontaanisti absorption jälkeen. Luokittelu voidaan tehdä myös tutkittavan aineen eli analyytin mukaan joko atomi- tai molekyyli-spektroskopiaksi. Lisäksi usein käytetään aallonpituusalueen tai vuorovaikutuksen mukaista jakoa, kuten esimerkiksi näkyvän valon (Vis) spektroskopia ja ydinmagneettisen resonanssin (NMR) spektroskopia.¹⁵ Spektroskooppisia tekniikoita kehitetään jatkuvasti ja niitä myös yhdistellään muihin analyttisen kemian tekniikoihin detektoreiksi eli aineiden tunnistuslaitteiksi. Esimerkiksi kaasukromatografian (GC) detektorina toimii usein massaspektrometri (GC-MS) ja nestekromatografian (LC) detektorina UV-spektrofotometri (LC-UV). Spektroskopiaan liittyvästä nimestään huolimatta massaspektrometriä ei kuitenkaan luokitella spektroskopian alalajiksi, koska se perustuu yhdisteiden ja niiden hajoamistuotteiden tunnistamiseen mm. massan ja varauksen avulla eikä valon absorptioon. Liitteessä 1 on kuvattuna erilaisia analyttisiä tekniikoita.

Spektrometrit ovat tyypillisesti jaettu ja nimetty sähkömagneettisen säteilyn alueen mukaan. (LIITE 2) Esimerkiksi IR- ja UV-spektrometri. Näkyvän valon (Vis) ja ultraviolettialueiden sähkömagneettista säteilyä mittaavaa laitetta kutsutaan spektrofotometriksi. Nimi viittaa menetelmän perusteisiin eli fotonien energian absorboitumisen tutkimiseen.³ Näkyvän valon alueelle käytettävä tunnus ”Vis” tulee englanninkielisestä sanasta ”visible”. Spektrofotometriä kuvataan tarkemmin kappaleessa 3.2. Spektrofotometrin rakenne. Spektrometriaan liittyvää sanastoa on kerätty liitteeseen 3.

2.2. Spektroskopian historiaa

Ensimmäiset ihmisten havainnoimat spektrit ovat olleet mitä todennäköisimmin sateenkaaria.^{13,16} Ihminen on osannut valmistaa sateenkaarimaisen spektrin jo 1200-luvulta lähtien.¹⁷ Esimerkiksi Leonardo da Vinci kuvasi, miten sateenkaaren värit voidaan muodostaa asettamalla vesilasi sopivalle etäisyydelle ikkunasta. Varhaisimpia kirjoitettuja kuvauksia valon taittumisesta väreiksi prisman läpi ovat tehneet Della Porta (1593) ja Descartes (1637). 1600-luvulla värien syntymistä ovat pyrkineet selittämään myös Kircher (1646), Marcus Marchi (1648), M. C. de la Chambre (1650) ja Robert Boyle (1664). Heidän tutkimuksensa viitoittivat tietä Newtonin tutkimuksille.

Kiinnostuneena värien alkuperästä englantilainen Sir Isaac Newton johti auringon valoa pienen aukon läpi prismaan, jossa valo taittui heijastaen spektrin pimennetyn huoneen seinälle.¹⁶ Tekemällä mittauksia spektrin väreistä hän keksi valon sisältävän säteitä, jotka taittuvat lävistäessään prisman kullekin säteelle ominaisessa kulmassa ja muodostavat spektrin, jossa värit punainen, keltainen, vihreä, sininen ja violetti esiintyivät kasvavan taittumiskulman mukaisessa järjestyksessä. Heijastaessaan ensimmäisessä prismassa taittuneet eriväriset säteet kulkemaan toisen prisman kautta tietyissä kulmissa, Newton pystyi myös muuttamaan eriväriset säteet takaisin valkoiseksi valoksi. Tästä hän päätteli valkoisen valon sisältävän kaikki sateenkaaren värit. Tämä uusi teoria valon luonteesta ja värien alkuperästä julkaistiin Philosophical Transactions of the Royal Society -lehdessä vuonna 1671. Newton oli ensimmäinen tutkija, joka käytti sanaa ”spektrum”, ja joka kuvaili artikkelissaan valoa hiukkasluonteiseksi.¹⁷ Teoriaansa perusteella Newton onnistui selittämään sateenkaaren syntymisen. Hän rakensi sen aikaisia teleskooppeja.¹⁶ Tutkimuksillaan Newton avasi tien spektroskopialle. Huomattavaa on kuitenkin, että yleiskäsityksestä poiketen Newton ei ollut ensimmäinen, joka tutki värien taittumista prisman avulla.¹⁷

Spektroskopian alkuaikoina tutkimuksia tehtiin myös liekkikokeina. Luultavasti ensimmäiset analyttiset liekkikokeet teki Margraff vuonna 1762.¹³ Vuonna 1827 brittiläinen astronomi, William Herchelin poika, John F. W. Herchel¹⁸ julkaisi ominaiset värit natriumin, kaliumkarbonaatin, kalkin, strontiumin, litiumin, magnesiumin, bariumsulfaatin, kuparin ja raudan suoloille. Lisäksi hän totesi, että liekkien avulla emittoituva spektri olisi hyvä keino määrittää näyte ja jopa kertoa erittäin tarkkoja aineiden pitoisuuksia.¹⁹ Herchelin artikkelin innoittamana H. F. Talbot teki omia kokeitansa, joista hän päätteli, että suolojen värit ovat peräisin niiden sisältämistä alkuaineista ja yhdisteistä.¹⁶ Hän ehdottikin, että liekkikokeet voisivat olla käytännöllisiä eri aineiden kvalitatiivisessa määrittämisessä. M. A. Masson rakensi ensimmäisen liekkiemissiospektroskoopin vuonna 1851.²⁰ Eräitä nykyaikaisten spektrofotometriä edeltäjiä olivat myös erilaiset kolorimetrit, joissa liuoksen konsentraatio pyrittiin selvittämään värin vahvuuden perusteella.¹⁴ Tällaisia värien intensiteettien vertailuun perustuvia menetelmiä olivat esimerkiksi vuonna 1845 Carl Heinen kehittämä mineraalivesien bromipitoisuuden määrittäminen ja 1800-luvun lopulla keksityt Nesslerin putket ja Jules Duboscqin kehittämä kolorimetri.

Ensimmäiset matemaattiset yhteydet liuoksen värin ja konsentraation välillä esittivät toisistaan tietämättä ranskalainen Pierre Bouguer vuonna 1728 ja saksalainen Johann Heinrich Lambert vuonna 1769.¹⁴ He esittivät, että yhtä paksut kerrokset samaa ainetta absorboivat yhtä suuret osat niihin saapuvasta valosta eli valon intensiteetti pienenee eksponentiaalisesti absorboitavassa aineessa. Vuonna 1852 saksalainen August Beer todisti, että teoria on voimassa myös liuksille ja että absorboitavan valon intensiteetti riippuu yhtä lailla liuenneen aineen konsentraatiosta kuin valon kulkeman matkan pituudesta. Ensimmäinen absorptiota mittaava laite oli ns. ”Color comparator” eli väriä vertaava laite, jossa absorbanssin mittaaminen noudatti Beerin lakia. Nykyään yhtälö tunnetaan Lambert-Beerin lakina (1). Yhtälö kuvaa näytteen absorbanssia (A), joka kertoo logaritmisuhteen valon säteilytehon (P_{λ}^0) ja lähetetyn eli alkuperäisen valon säteilytehon (P_0) välillä aallonpituudella λ .

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_{\lambda}^0}{P_0} \right) = \epsilon c l, \quad (1)$$

missä ϵ on molaarinen absorptiokerroin, c on konsentraatio ja l on valon liuoksessa kulkema matka.¹

Pian Newtonin havaintojen jälkeen hollantilainen matemaatikko ja fyysikko Christian Huygens esitti teoriansa valon aaltoluonteesta vuonna 1678.²⁰ Hän ei kuitenkaan pystynyt perustelemaan teoriaa uskottavasti, minkä vuoksi käsitys valon hiukkasluonteesta säilyi vallitsevana. Vuonna 1801 englantilainen Thomas Young onnistui todistamaan valon aaltoluonteen keksimiensä valon interferenssin ja kaksoisrakokokeen avulla.²¹ Käsitys säteilystä laajeni, kun näkyvän valon säteilyn ulkopuolella olevat infrapuna- ja ultraviolettisäteily löydettiin 1800-luvun alussa.¹⁶ Vuonna 1800 Willian Herschel²² suoritti kokeita, joissa hän mittasi prisman läpi kulkeneen auringonvalon spektrin lämpötiloja. Huomattava lämpötilan nousu tapahtui alueella, joka oli taipunut vähemmän kuin näkyvä valo. Tällä tavoin hän todisti, että on olemassa infrapunasäteilyä eli säteilyä ”punaisen värin alapuolella”. Ultravioletti eli ”violetin yläpuolella” olevan säteilyn löysi saksalainen fyysikko J. W. Ritter vuonna 1801¹⁶ altistaessaan valolle herkkää hopeakloridia spektrin eri sävyille. Hämmästyksekseen hopeakloridi tummui eniten alueella, joka taittui violettiä väriä enemmän.

1800-luvun alussa spektroskopian kehitykseen vaikutti suuresti auringon spektrin kuvaaminen.¹⁷ Auringon spektrin tummat viivat havaitsi ensimmäisenä englantilainen tiedemies William H. Wollaston vuonna 1802.^{16,17,20} Tunnetummin käytetään kuitenkin nimitystä Fraunhoferin viivat, koska saksalainen optikko Joseph von Fraunhofer teki merkittävän työn tutkiessaan ja nimetessään systemaattisesti auringon spektrin tummia viivoja vuonna 1814. Suurimmat viivat hän nimesi A:sta H:hon ja yhteensä hän havaitsi noin 500 tummaa viivaa. Vuonna 1868 Anders J. Ångström määrittä 1000 Fraunhoferin viivaa ja esitti ne yksikössä 10^{-10} m.¹⁶ Tämä yksikkö nimettiin keksijänsä mukaan. 1 ångström (Å) on 10^{-10} m.

Auringon spektrin tummat viivat ihmetyttivät tiedemiehiä, kunnes vuonna 1859 Kirchhoff ja Bunsen keksivät, että jokaisella alkuaineella on oma ja ainutlaatuinen spektri.²³ Tämän havainnon perusteella voitiin tulkita auringon spektrin tummien viivojen johtuvan auringon pinnalla olevista kaasuista. He tunnistivat myös kaksi uutta alkuainetta, jotka ovat cesium ja rubidium.^{13,16} Heidän tutkimustensa innoittamana löydettiin vielä muitakin uusia alkuaineita.¹⁶ Merkittävää spektroskopian kehittymiselle oli heidän tutkimuksensa näkyvän valon käyttömahdollisuuksista analytiikassa.

Alkuaineiden tunnistaminen näkyvän valon spektristä oli kuitenkin rajallista, koska käytössä ollut Bunsenlamppu pystyi höyrystämään vain rajoitetun määrän alkuaineita.¹⁶ Sähköisen kaarilampun keksiminen mahdollisti alkuaineiden lämmittämisen 5000 °C asteeseen, jolloin

pystyttiin tutkimaan useampien alkuaineiden spektrejä. Tämän kehityksen ansiosta sveitsiläinen J. J. Balmer havaitsi vedyn spektrin vuonna 1885. Tutkiessaan vedyn spektriä hän havaitsi alkuaineiden emittoivan valoa kullekin alkuaineelle ominaisilla aallonpituuksilla. Tämän havainnon perusteella Balmer keksi matemaattisen yhtälön, joka kuvasi vedyn emittoimia aallonpituuksia (λ). Yhtälö tunnetaan keksijänsä mukaan nimellä Balmerin sarja.²³ Kaavassa n kuvaa vedyn elektronikuoria.

$$\lambda_n = \lambda_0 n^2 / (n^2 - 2^2), \quad (2)$$

Muutamaa vuotta myöhemmin ruotsalainen fyysikko Johannes Rydberg muokkasi Balmerin kaavaa niin, että se soveltuu yleisemmälle tasolle.²⁰ Kaava sai muodon

$$\frac{1}{\lambda} = R_H \left[\left(\frac{1}{n^2} \right) - \left(\frac{1}{m^2} \right) \right], \quad (3)$$

missä m, n ovat vedyn elektronikuoria, $m, n \in \mathbb{Z}, m > n$. λ on emittoitu aallonpituus ja R_H on Rydbergin vakio.

Matemaattisen teorian yhteyttä atomin rakenteeseen ei kuitenkaan osattu vielä selittää. Vuonna 1900 saksalainen fyysikko Max Planck kuvasi valon kvanttiluonteen.²³ Planckin tutkimukset ja Albert Einsteinin selitykset valosähköisestä ilmiöstä vuonna 1905 sekä kaavat energian kvantittumisesta johtivat Niels Bohrin keksimän atomimallin esittämiseen vuonna 1913.^{20,23} Tämä atomimalli selitti Balmerin sarjojen yhteyden atomin rakenteen ja spektrin välillä.¹⁶ Bohrin mallin mukaan alkuaineelle tunnusomainen spektri syntyy elektronien liikkeestä eri energiatasojen välillä, jolloin elektroni joko absorboi tai emittoi energiaa.

Absorbanssia mittaavien valokennojen eli ilmaisimien keksiminen edisti ensimmäisten spektrofotometriä rakentamista 1930-luvulla.¹⁶ Tuolloin oli todellinen kiire kehittää laboratorioteknologiaa. Tekniikat syntyivät toisen maailmansodan tarpeiden myötä.²⁴ Analytiikkaa tarvittiin sotavarusteisiin tarvittavan kumin syntetisointiin, pommien valmistamiseen ja lääketieteessä penisilliinin rakenteen määrittämiseen. Esimerkiksi A-vitamiinia tarvittiin, koska sen tärkeimmän lähteen, kalanmaksan, kuljettamisen Atlantin yli oli estynyt. Vaihtoehtona pidettiin hain maksaa, mutta ensin piti selvittää A-vitamiinin tarkka pitoisuus maksassa. Vuonna 1941 National Technical Laboratories valmisti ensimmäisen UV-valolla toimivan spektrofotometrin, jolla pystyttiin nopeasti määrittämään A-vitamiinin kvantitatiivinen pitoisuus. Ensimmäinen kaupallinen spektrofotometri valmistui vuonna 1948.¹³ Spektrometrian kehittymistä on kuvattu myös liitteessä 4.

2.3. Spektrofotometrin kehittyminen – makrosta nanoteknologiaan

Spektroskopian hyödyntäminen spektrofotometrilaitteiden valmistuksessa on kehittynyt vuosisatojen aikana paljon.^{7,24} Kehitys on havaittavissa analyysitulosten tarkkuudessa⁹, automaattisesti suoritettujen operaatioiden määrän kasvussa⁷ sekä laitteiden koon pienentymisessä. Esimerkiksi vuonna 1666 Newton tarvitsi pelkästään auringon valon muodostaman spektrin tutkimiseen kokonaisen huoneen,²⁵ koska hänen spektroskooppinsa pituus oli raosta linssiin 10–12 jalkaa (3,0–3,7 m), linssistä spektriin 10 jalkaa (3,0 m) ja näin muodostetun spektrin koko oli noin 6 tuumaa (1,8 m).²⁶ Tällä hetkellä esimerkiksi Vernier myy spektrofotometriä²⁷, jonka koko on 15 cm x 9 cm x 4 cm eli se on noin tavallisen voipaketin kokoinen.

Spektrofotometrien yleistymiseen vaikuttivat niiden helppokäyttöisyys, nopeus ja tarkkuus, sekä toisen maailmansodan vauhdittama laboratoriokulttuurin muutos²⁴. Esimerkiksi 1900-luvun alkupuolella A-vitamiinipitoisuuden tutkiminen kesti vallitsevalla menetelmällä vähintään kuukauden ja tulokset hyväksyttiin, mikäli arvot eivät eronneet toisistaan enempää kuin 25 %. Spektrofotometrin avulla tutkimus pystyttiin suorittamaan muutamassa minuutissa 99 % tarkkuudella, lisäksi vielä ilman koe-eläinten käyttöä. Tarkkuuden kasvamisen mahdollistivat 1930-luvulla kehitetyt valokennot eli detektorit. Ne korvasivat tutkijan silmän, jonka tarkkuudesta spektrien tutkiminen oli aikaisemmin riippunut. Nykyisin detektori on valomonistinputki tai fotodiodirividetektori.

Nykyaikaiset spektrofotometrit koostuvat edelleenkin samoista perusosista kuin mistä 1930-luvun laitteet.^{3,9} Kehitystä on viety eteenpäin parantelemalla näitä perusosia eli säteilyn lähdettä, monokromaattoria ja välineitä mitata näytteen läpi kulkeneen valon intensiteettiä.⁷ Tarkkuuteen vaikuttavia muutoksia ovat olleet linssien korvaaminen peileillä, lasimaisen piidioksidioptiikan, deuteriumlamppujen ja wolframi-halogeenilamppujen, sekä hilan käyttäminen. Peilit osoittautuivat linssistä paremmiksi optisiksi moduuleiksi, koska ne ehkäisevät säteilyn monokromaattista poikkeamaa kohdistamalla valoa samaan kohtaan kaikilla aallonpituuksilla. Luonnollisen kvartsin korvaaminen lasimaisella piidioksidilla mahdollisti alhaisempien aallonpituusalueiden käyttämisen. UV-alueelle päästiin myös käyttämällä wolframilamppujen tilalla deuteriumlamppuja säteilyn lähteenä. Deuteriumlamppujen hyötynä on ollut myös pitkäikäisyys, säteilyn tasaisuus ja suuri energia.

Monokromaattorin tarkkuutta voitiin kasvattaa valitsemalla dispersioivaksi välineeksi prisman tai filterin sijaan hila.⁹ Myös näytteeseen pääsevän aallonpituusalueen

pienentäminen lisäsi tarkkuutta, mutta samalla se myös pienensi intensiteettiä. Tämä heikensi resoluutiota ja sen vuoksi yleensä päädyttiinkin käyttämään analyysiin parhaiten sopivinta ratkaisua. Varhaisimmissa laitteissa haluttu säteilyn aallonpituus säädettiin käsin, mutta mikroprosessorien keksiminen 1970-luvulla mahdollisti siirtymisen automaattiseen aallonpituusalueen valintaan, aallonpituudesta toiseen siirtymiseen (engl. scanning) ja spektrin reaaliaikaiseen piirtämiseen paperille. Mikroprosessorit ohjelmoitiin säätelemään monokromaattorista ulos tulevaa säteilyä ja sen avulla pystyttiin suorittamaan tiedonkäsittelyä. Mikroprosessorien keksiminen ja tietokoneiden kehittyminen mahdollisti elektronisten näyttöpäätteiden käyttämisen.⁷ Pian sen jälkeen opittiin siirtämään määrittystietoa printterille ja tietokoneisiin. Tämä säästi aikaa ja vähensi virheitä, koska manuaalista kopioimista ei enää tarvittu. Absorbanssikäyrän ensimmäisen ja toisen derivaatan laskeminen on yksi näistä tärkeistä tiedon käsittelyn operaatioista, jotka nopeuttavat luotettavan kvantitatiivisen ja kvalitatiivisen analyysin saamista. Niiden avulla mittauksen resoluutiota voidaan parantaa ja päällekkäiset absorptiopiikit voidaan määrittää. Mikroprosessoreita käytetään nykyäänkin, esimerkiksi kännyköissämme. 1980-luvulla monokromaattorin koko kasvoi hiukan, koska käytettiin suurempia valon ulostuloaukkoja, jotka mahdollistivat suuremman energian kohdistumisen tutkittavaan aineeseen.⁹

Tyypillisesti ensimmäisissä spektrofotometreissä käytettiin ilmaisimina eli detektoreina vakuumifotoputkia.⁹ Niiden mittausalue rajoittui kuitenkin 340-600 nanometriin. Piisirujen käyttö vakuumifotoputkissa paransi tunnistettavan signaalialueen leveyttä, tarkkuutta, nopeutta ja pienensi osien kokoa. Hyvän hinta-laatu-suhteen takaamiseksi alettiin käyttää kahta ilmaisinta. Alle 630 nm aallonpituuksille käytettiin kohtuuhintaista fotomonistinputkea ja yli 630 nm alueille melko herkkiä mikrosiruja. Kvalitatiiviseen analyysiin on historiallisesti ollut paras valinta kaksisäde optiikka, koska siinä näytteen absorbanssia voidaan vertailla samanaikaisesti vertailukohteen kanssa.⁹ Kvantitatiiviseen analyysiin on käytetty yksisädeoptiikkaa. Niiden lisäksi on kehitetty jaetun säteen optiikka, joka toimii kompromissina yksi- ja kaksisäde optiikalle. Laitteiden koon pienenemiseen on vaikuttanut suuresti fotodiodirivien käyttö detektoreina (kts. 2.2.4. Detektorit eli ilmaisimet s.16) Nykyaikaisilla nanospektrofotometreillä pystytään määrittämään mikroskooppisten näytteiden spektrejä nanometrin resoluutiolla.²⁸ Tällaisia ovat esimerkiksi Craic Technologies'in FLEXTM UV-Vis-NIR mikrospektrofotometri, Thermo Scientific'in²⁹ Nanodrop One/One^C ja TITERTEK-BERTHOLD'in³⁰ Colibri.

3. Spektrofotometrin toiminta

3.1. Teoreettinen perusta

Spektrofotometrin toiminta perustuu sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutukseen aineen kanssa.³ Se mittaa kerrallaan joko absorptiota tai emissiota ja laskee mittaustuloksesta Lambert-Beerin lain avulla tutkittavan aineen absorbanssin (yhtälö 1 s.5) tai transmittanssin (yhtälö 8 s.13) prosenttisuuden. Transmittanssi ilmoittaa näytteen läpi kulkeneen säteilyn säteilytehon suhteen näytteen läpi menevään säteilytehoon.¹

3.1.1. Sähkömagneettinen säteily

Sähkömagneettisella säteilyllä tarkoitetaan valon nopeudella kulkevaa sähkömagneettista aaltoliikettä, jolla on myös hiukkasten ominaisuuksia.¹ Sähkömagneettinen säteily on jatkuvaa läpi koko sähkömagneettisen spektrin.³ (LIITE 2) Tällaista säteilyä on esimerkiksi radioaallot, röntgensäteily ja näkyvä valo (Kuva 1).

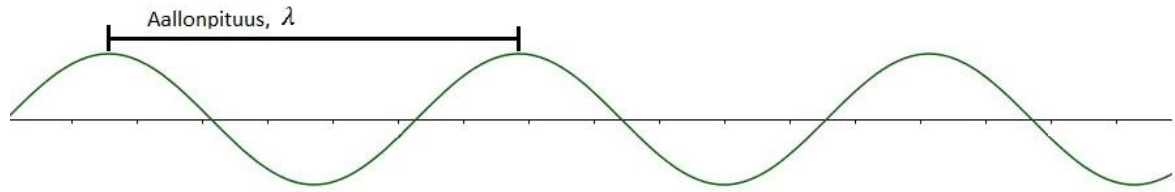
RADIO- AALLOT	MIKRO- AALLOT	INFRA- PUNA	NÄKYVÄ VALO	ULTRA- VIOLETTI	RÖNTGEN- SÄTEILY	GAMMA- SÄTEILY
------------------	------------------	----------------	----------------	--------------------	---------------------	-------------------

Kuva 1 Sähkömagneettisen säteilyn spektri.¹⁵ Säteily on jatkuvaa läpi koko spektrin ja se on jaettu osiin aallonpituuksien mukaan. Näkyvän valon osuus spektristä on huomattavan pieni.

Sähkömagneettista säteilyä kuvataan tyypillisesti aallonpituuden (kuva 2) tai taajuuden avulla. Eri taajuuden omaava säteily vaikuttaa aineisiin eri tavalla.¹⁵ Aallonpituuden (λ) ja taajuuden (ν) suhdetta kuvataan yhtälöllä (4).³ Aallonpituus on verrannollinen valon nopeuteen $c \approx 3 \cdot 10^{10}$.

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (4)$$

Aallonpituus vaihtelee muutamista mikrometreistä muutamiin metreihin.³ Sen yksikkö on joko nm tai Å = Ångström. UV-valon aallonpituus on 190 nm-360 nm ja näkyvän valon aallonpituus 350-700 nm. Monokromaattisella säteilyllä tarkoitetaan säteilyä, joka koostuu vain yhdestä aallonpituudesta.



Kuva 2 Sähkömagneettisen säteilyn liikettä kuvataan aaltoliikkeenä.³ Kahden samassa vaiheessa olevan pisteen välistä etäisyyttä kutsutaan aallonpituudeksi.

Sähkömagneettinen säteily sisältää aina tietyn verran energiaa.³ Säteilyn energiayksikköä kutsutaan fotoniksi eli valohiukkaseksi tai energiakvantiksi. Ne kuvaavat säteilyn hiukkasluonnetta. Fotonin sisältämä energia (E) on suhteessa säteilyn taajuuteen (ν) ja näin myös sen aallonpituuteen (λ).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (5)$$

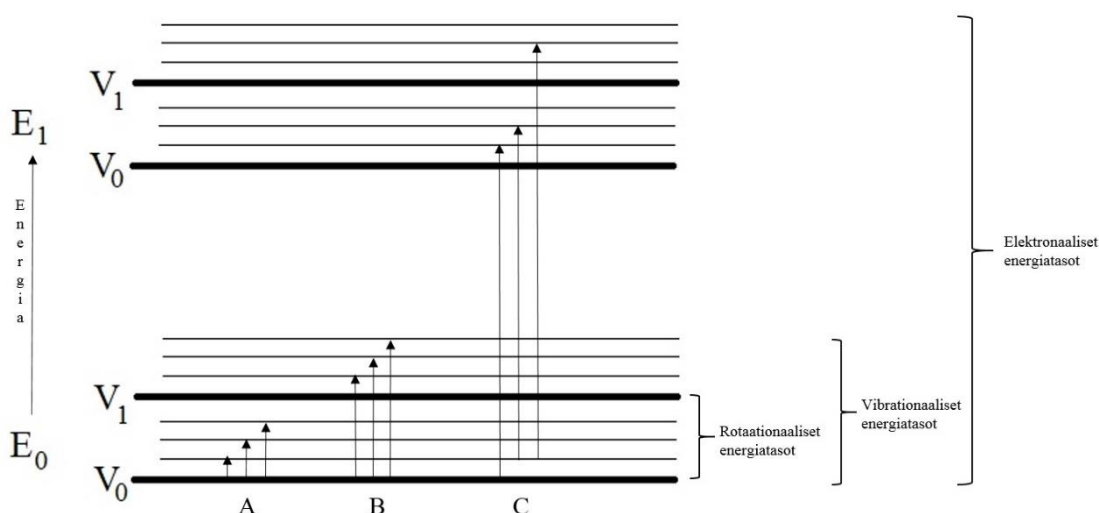
Kaavassa h on Planckin vakio ($h = 6,62 \times 10^{-34}$ Js) ja c on valon nopeus tyhjiössä ($c = 3 \times 10^8$ m/s)

3.1.2. Absorptio ja emissio

Sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutusta, jossa fotoni luovuttaa energiansa aineelle, kutsutaan absorptioksi.³ Esimerkiksi värien näkeminen johtuu aineen absorptiosta ja komplementtivärien heijastumisesta ihmissilmään. Aineen absorboidessa säteilyä sen energiatasot virittyvät ylemmälle energiatasolle yhtälön (5) mukaisesti.¹⁵ Viritystilat ovat hetkellisiä ja ne palautuvat pian takaisin perustilaan. Virittäytymiseen tarvittu energia menetetään usein lämpönä tai kineettisenä energiana molekyylien välisissä törmäyksissä. Emissioksi kutsutaan viritystilan purkautumista säteilynä.¹² Kun viritystilan purkautuminen voidaan havaita valona, kyse on luminesenssista. Myös fluoresenssi ja fosforenssi ovat luminesenssin muotoja. (LIITE 3)

Aineen virittyminen on mahdollista atomissa tai molekyylissä tapahtuvien kolmen eri prosessin kautta ja niitä kutsutaan rotaatio- (pyöriminen), vibratio- (värähdys) ja elektroniseksi (sähköinen) siirtymiksi.³ Koska siirtyvä energia on kvantittunutta, absorptio tapahtuu aina siirtymästä ja analyyttistä riippuen tietyillä energiatasoilla, siirtynyttä energiaa vastaavalla aallonpituusalueella. Vähiten energiaa virittäytymiseen vaatii pyörimiseen liittyvä siirtymä, jossa molekyylin pyörimisenergia virittää elektronit korkeammalle energiatasolle. Tällaisia siirtymiä tapahtuu mikroaalto- ja kaukoinfrapuna-alueilla. (LIITE 2) Seuraavaksi vähiten energiaa tarvitaan värähdys siirtymään, jolla tarkoitetaan atomien tai

atomiryhmien keskinäisen värähtelyn energian kasvua. Näitä siirtymiä tapahtuu lähi- ja keski-infrapuna-alueilla. Huomattavaa on, että värähdyssiirtymän lisäksi tapahtuu aina myös pyörimissiirtymä. Eniten energiaa tarvitaan sähkösiirtymiin, joissa valenssielektronien energiatasot kasvavat fotonin energian verran. Sähkösiirtymiä tapahtuu ainoastaan UV- ja näkyvän valon alueella. Spektrometrien määrittämä absorptiospektri muodostuu näiden siirtymien summasta. Syntyvä absorptiospektri on sitä tarkempi mitä vähemmän erilaisia siirtymiä tapahtuu. Mikroaalto- ja kaukoinfrapuna-alueella tapahtuu vain pyörimissiirtymiä, joten absorptiospektri on täsmällinen viivaspektri. Lähi- ja keski-infrapuna-alueella spektri muodostuu pyörimis- ja värähdyssiirtymistä, joten spektri koostuu useammista piikeistä tai ”verhokäyristä”. Näkyvän valon alueella tapahtuu sekä pyörimis-, värähdys- että sähkösiirtymiä. Näitä siirtymävaihtoehtoja on lukuisia, mistä johtuen näkyvän valoalueen absorptiospektri on loivasti aaltoileva horisontaalinen kuvaaja.



Kuva 3 Sähkömagneettisen säteilyn absorboitumisessa tapahtuvat siirtymät kuvattuna energiadiagrammin avulla.³ A: Rotaationaalisia siirtymiä.. B: Rotaationaalisia ja vibrationaalisia siirtymiä. C: Rotaationaalisia, vibrationaalisia ja elektronaalisia siirtymiä.

Molekyylien elektronien virittämiseen tarvittava energian on atomin elektronien viritystiloja suurempi, joten tällaiset spektrit kuvataan usein UV- tai näkyvän valon alueella.¹⁵ Kaikki molekyylit eivät absorboi näkyvää valoa, vaan absorptio riippuu funktionaalisten ryhmien ja sidosten läsnäolosta.³ Absorptioaallonpituus ja sen intensiteetti riippuvat tästä absorboivasta sidoksesta tai ryhmästä eli kromoforista. Aallonpituus määräytyy virittämiseen tarvittavan energian mukaan, mutta intensiteetti on riippuvainen siirtymien todennäköisyydestä ja viritystilan polaarisuudesta. Molekyyleillä π - eli kaksois- ja kolmoissidokset, sekä n eli valenssielektronikuoren parilliset sitoutumattomat elektronit

aiheuttavat suuren osan virittäytymisistä. Valenssikuoren elektronit, jotka eivät osallistu sidoksiin, sekä kovalenttisiin yksöissidoksiin osallistuvat σ elektronit eivät absorboi UV- ja näkyvän valon aallonpituusalueilla, koska niiden sisältämä energia ei riitä elektronien virittämiseen. Normaalisti virittyvä elektroni siirtyy molekyylin miehittämättömälle hajottavalle orbitaalille, joita ovat π^* ja σ^* -orbitaalit. Tavallisimmat siirtymät ovat π ja n -orbitaaleilta π^* -orbitaalille. Siirtymiä kuvataan nuolilla $\pi \rightarrow \pi^*$ ja $n \rightarrow \pi^*$. Alle 200 nm aallonpituuksilla sitoutumaton n -orbitaali voidaan virittää myös σ^* -orbitaalille.

Muutoksia kromoforien tyypilliseen kykyyn absorboida valoa aiheuttavat analyysiolosuhteet, liuotin, auksokromit ja kromoforit. Auksokromit eivät itse absorboi valoa, mutta vuorovaikutuksessa kromoforin kanssa ne voivat muuttaa absorptiota tai absorboitavaa aallonpituutta ylös- tai alaspäin. Punasiirtymä siirtää absorption aallonpituusmaksimia korkeammalle ja sinisiirtymä vastaavasti matalammalle aallonpituudelle. Hyperkrominen ilmiö kasvattaa molaarista absorptiota ja hypokrominen ilmiö vähentää sitä. Auksokromeja ovat esimerkiksi halogeenit, hydroksyyli- ja aminoryhmät. Tyypillisimpiä kromoforeja ja auksokromeja on taulukoitu liitteessä 5. Pienet muutokset molekyylin valoon reagoimattomassa osassa eivät vaikuta merkittävästi sen spektriin. Molekyyllissä toisistaan erillään olevat kromoforit absorboivat valoa itsenäisesti ja sen vaikutus intensiteettiin on additiivinen. Konjugoidut kromoforit aiheuttavat punasiirtymää ja intensiteetin kasvua. Mikäli tutkittava molekyyli ei aktivoidu valosta, siitä voidaan synteettisesti valmistaa johdannainen tai kompleksi, joka absorboi valoa.

3.1.3. Lambert-Beerin laki

Lambert-Beerin laki on spektrofotometrin toiminnan tärkein yhtälö.¹⁰ Sen mukaan ideaaliliuoksella on lineaarinen suhde liuenneen aineen konsentraation ja absorbanssin välillä, mikäli valon kulkema matka aineessa on vakio. Jokaisella aineella on oma molaarinen absorptiokertoimensa, joka on molekyylille tunnusomainen tietyssä liuottimessa. Yhtälöstä (1) käytetään myös nimeä Beerin laki tai Beer-Lambert-Bouguerin laki. Yhtälö kuvaa näytteen absorbanssia (A), joka kertoo logaritmisuhteen valon säteilytehon (P_λ^0) ja lähetetyn eli alkuperäisen valon säteilytehon (P_0) välillä aallonpituudella λ .

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_\lambda^0}{P_0} \right) = \epsilon c l, \quad (1)$$

missä ϵ on molaarinen absorptiokerroin, c on konsentraatio ja l on valon liuoksessa kulkema matka.

Lambert-Beerin laki pätee ainoastaan monokromaattiselle säteilylle ja pienille konsentraatioille.¹ Säteilytehon (P) tilalla on käytetty myös suuretta intensiteetti (I).⁸ Intensiteetti kuvaa säteilyn absorboitumista näytteeseen. Tällöin absorbanssille saadaan arvo jakamalla näytteeseen tuleva alkuperäinen valon intensiteetti (I_0) aallonpituudella λ näytteen läpi kulkeneen valon intensiteetillä (I).

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (6)$$

IUPAC:in määritelmän mukaan säteilyn intensiteetillä tarkoitetaan säteilytehoa kaikilla aallonpituuksilla muuttumattomalla kulmalla Ω .¹ Sen yksikkö on W sr^{-1} . Säteilyteho kuvaa emittoituneen, läpi kulkeneen tai absorboituneen säteilyn aikaansaaman sähkövirran tehoa. Säteilytehon SI-yksikkö on joule per sekunti (Js^{-1}) tai vatti (W). Lambert-Beerin laki voidaan esittää myös yksinkertaisemmassa muodossa, missä $\varepsilon = a$ eli molaarinen absorptiokerroin ja $l = b$ eli näytteen läpi valon kulkema matka.¹⁶

$$A = abc \quad (7)$$

Myös transmittanssi määritellään näytteen läpi kulkeneen valon säteilytehon ja näytteeseen lähetetyn valon säteilytehon suhteena.

$$T = \frac{P_\lambda}{P_\lambda^0} \quad (8)$$

Kun sijoitetaan transmittanssi Lambert-Beerin lakiin (1), huomataan että transmittanssi ja absorbanssi ovat toisiinsa nähden logaritmisessa suhteessa.

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} \quad (9)$$

3.2. Spektrofotometrin rakenne

Spektrometrien perusosia voidaan hahmottaa viiden eri osan avulla. Ne ovat valon lähde, monokromaattori, näyte, detektori eli ilmaisimien ja tulosten keruu- ja tulostusyksikkö eli tietokone tai digitaalinen näyttö.³



Kuva 4 Spektrofotometrin tyypillinen rakenne.³

3.2.1. Säteilyn lähteet

Spektrofotometrin säteilylähteen tärkein tehtävä on tuottaa säteilyä (energiaa) halutulla aallonpituusalueella³ ja tasaisella intensiteetillä⁸ koko analyysin ajan. Näkyvän valon alueella käytetyin säteilyn lähde on wolframihehkulamppu. Ne tuottavat sähkömagneettista säteilyä aallonpituudelta 320 nm aina 2,5 μm asti. Nykyään käytetään kuitenkin enemmän hieman kalliimpia, mutta käyttöikänsä huomattavasti pitkäikäisempiä wolframi-halogenilamppuja.

UV-alueilla käytetyimpiä lamppuja ovat vety- ja deuteriumpurkauslamput.³ Niiden käyttö vaatii matalan paineen, sekä jännitteen ja niiden aallonpituusalue on 185-375 nm. Deuteriumlampulla on kolminkertainen valaisuteho kuin vetylampulla. Lamppujen seinämät on yleensä tehty kvartsista, koska lasi ei ole UV-säteilylle läpinäkyvää.

3.2.2. Monokromaattorit

Monokromaattorin tehtävänä on eristää polykromaattisesta säteilystä haluttu monokromaattinen aallonpituusalue eli kimppu säteilyä samalla aallonpituudella.⁸ Monokromaattoreita on paljon erilaisia, mutta tyypillisimmät niistä ovat prismalla tai hilalla toimivia. Peilien ja linssien tehtävä monokromaattorissa on fokusoida säteily prismaan tai hilaan, jotka dispersoivat eli erottelevat aallonpituudet toisistaan. Tällöin halutut aallonpituudet esiintyvät monokromaattisena säteilynä.³ Valon ulostuloaukko toimii ei-toivottujen aallonpituuksien suodattajana, mikä takaa spektrin puhtauden. Monokromaattorit ovat usein koteloitu pölyn ja muiden kontaminaatioiden estämiseksi.⁸ Toisinaan käytetään myös optisia filttäreitä joko monokromaattorin tilalla heikkolaatuisimmissa spektrometreissä tai hilallisissa monokromaattoreissa³ estämään korkeamman tason säteilyä.

Prismallisia monokromaattoreja käytetään UV- ja näkyvän valon alueilla, koska ne toimivat paremmin lyhyemmillä aallonpituuksilla epälineaarisen dispersion takia.³ UV-alueilla on huomattava käyttää kvartsista tai sulatetusta piidioksidista valmistettua prismaa, koska lasi absorboi UV-säteilyä. Hilallisia monokromaattoreita voidaan käyttää koko spektrin määrittämisalueella. Ne ovatkin osittain syrjäyttäneet prismalliset monokromaattorit.³ Erityisesti sitä käytetään IR-alueella, koska se tuottaa tasaisen dispersion myös pitemmillä aallonpituuksilla. Hiloissa tapahtuva dispersio on riippumaton säteilyn aallonpituudesta, mutta sen intensiteetti vaihtelee aallonpituuden mukaan. Hiloissa on UV-Vis -alueella tyypillisesti 15 000-30 000 uurretta per tuuma (2,54 cm) ja ne on päällystetty kiiltävillä materiaaleilla kuten alumiinilla. Niiden hankala valmistus näkyy myös hinnassa. Kopioimalla alkuperäinen hila voidaan valmistaa edullisempia hiloja. Pääsääntöisesti hiloille pätee sääntö: Mitä isompi hila, sitä parempi aallonpituuksien erottelukyky.

3.2.3. Näytetila ja kyvetit

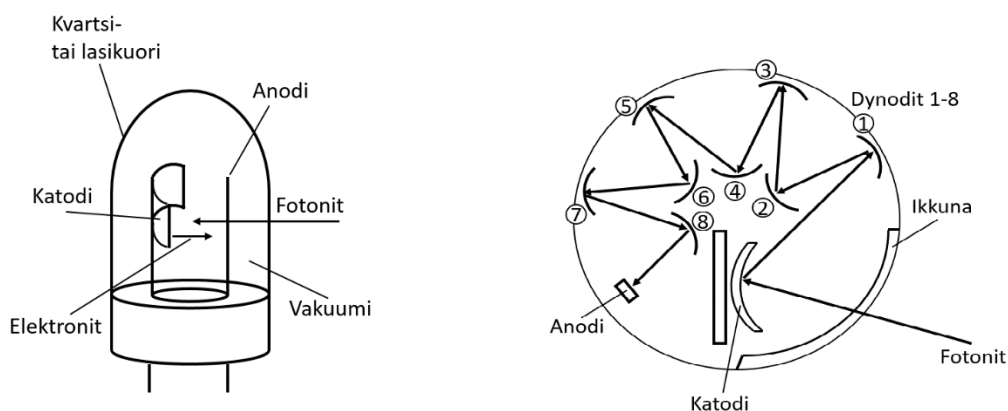
Tyypillisesti UV/Vis-spektrofotometreillä mittaukset tehdään liuosnäytteistä.³ Näyteastia on noin 1 cm leveä kyveti. Se on valmistettu silikamateriaalista, joka ei absorboi tai reflektoi UV-alueen säteilyä. UV-alueelle käytetään yleensä kvartsista tai sulatetusta piidioksidista valmistettuja kyvettejä ja näkyvän valon alueelle silikaattilasisia tai edullisempia muovisia kyvettejä.⁸ Kyvettien tulee olla puhtaita, sillä esimerkiksi sormenjälkien rasva aiheuttaa vääristymiä absorptiospektriin. Lisäksi kyvettien tulee olla asetettuina kohtisuoraan saapuvaa säteilyä kohden. Vertailunäytteiden tulee olla samansuuntaisesti asetettuna kuin näytteen. Myös kyvettien tulee olla samanlaisia ominaisuuksiltaan.

3.2.4. Detektorit eli ilmaisimet

Detektorin tehtävä spektrofotometrissä on muuttaa sähkömagneettinen säteily elektronivirraksi, joka mitataan sähkövirtana tai jännitteenä.⁸ Tyypillisimpiä UV-Vis -alueen detektoreita ovat elektroniputket, valomonistinputket, fotodiodit ja fotodiodirivit. Myös erilaiset detektorit ovat riippuvaisia säteilyn aallonpituudesta.

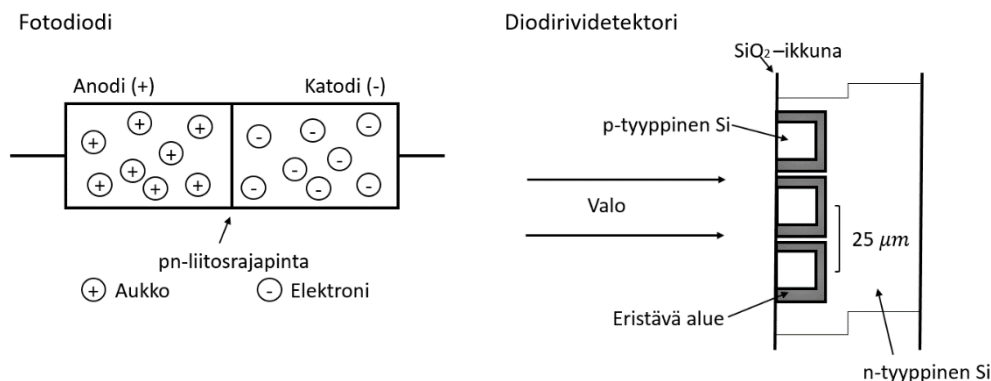
Elektroniputki on fotoemissiivisen katodin ja anodin yhdistelmä.³ Sen toiminta perustuu valosähköiseen ilmiöön. Saapuvan fotonin osuessa katodiin se emittoi elektronin, joka kulkeutuu jännitteen alaisena anodille. Tämä aiheuttaa sähkövirran, joka voidaan suurentaa ja mitata. (kuva 5) Koska fotoemissiivinen pinnoite reagoi eri tavalla riippuen aallonpituudesta, spektrin eri alueille on omat elektrodinsa eli dynodinsa.

Valomonistinputken toiminta perustuu myös valosähköiseen ilmiöön.³ Siinä fotoemissiivisen katodin ja anodin välille on asennettu elektrodisarja, jonka tehtävänä on kasvattaa sähkövirtaa. Elektrodeja kutsutaan dynodeiksi eli elektronin monistajiksi. Fotonin osuessa fotoemissiiviseen pintaan, katodilta emittoituu primäärinen elektroni, joka kiihdytetään kohti dynodia, josta irtoaa sekundäärisiä elektroneja. Yleensä tämä jatkuu kymmenen kertaa ja lopulta elektronit saapuvat anodille (kuva 5). Valomonistinputki on elektroniputkea herkempi detektor ja se mahdollistaa pienempien intensiteettien mittaamisen, joten spektrofotometrissä pystytään käyttämään pienempiä aukkoja, mikä puolestaan kasvattaa laitteen resoluutiota. UV-Vis -alueelle suosittu valomonistinputki on nimeltään 1P28. UV-alueelle on kehitetty myös oma ilmaisim, joka ei reagoi näkyvään valoon.



Kuva 5 Elektroniputken rakenne sivusta kuvattuna ja valomonistinputken rakenne ylhäältä päin katsottuna..⁸

Diodirivi detektorit (diode array detectors, DAD) koostuvat sadoista piifotodiodien sarjoista, jotka on asennettu vierekkäin piikristallille tai -sirulle³ (kuva 6). Jokaiseen fotodiodiin on kytketty oma muistikondensaattori, joka varastoi ja yhdistää elektronien tuottaman virran. Muisti luetaan jaksollisella varauksen purkamisella, joka kestää noin 5-100 ms. Diodirivien etuna on koko spektrin kuvaaminen kerralla ja laajempi säteilyn vastaanottoalue kuin valomonistinputkissa. Fotodiodirivi reagoi säteilyyn joka on 190 - 1100 nm eli UV-alueelta lähi-infrapunaan asti. Lisäksi niiden kvanttihyötysuhde eli ilmaisimen havaitsemien ja todellisten fotonien suhdeluku on parempi. Digikameroissa käytettävät CCD-kennot (charge-coupled device) ovat myös eräänlaisia fotodiodirivi ilmaisimia.



Kuva 6 Fotodiodin toiminta perustuu valokvanttien aikaansaamaan varauksen kuljettamiseen pn-liitosrajapinnan läpi, mikä synnyttää valokvantille verrannollisen sähkövirran.⁸ Diodirivi detektor koostuu useista vierekkäin asennetuista fotodiodeista.

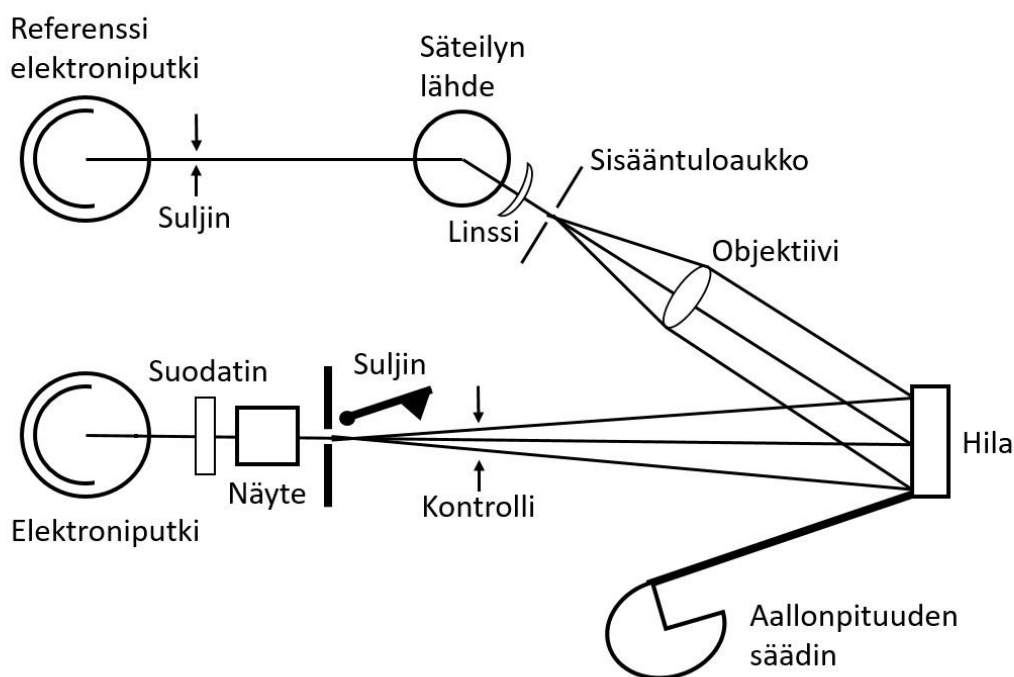
3.2.5. Lukeman ilmoittaminen

Spektrofotometrin antama ulostulosignaali näkyy lukuarvona joko laitteeseen sisäänrakennetussa näyttöpaneelissa tai siihen liitettävällä tietokoneen näyttöruudulla.⁷ Useimmissa spektrofotometreissä käytetään digitaalisia Led-näyttöjä. Detektorin tiedot välittyvät näytölle analogisesta signaalilukijasta, tallentimilta tai digitaalisista jännitemittareista. Mikroprosessorien keksiminen nosti tarvetta kehittää automaattisia tiedonkäsittelyoperaatioita. Absorbanssin ja transmittanssin ilmoittamisen lisäksi spektrofotometreillä voidaan suorittaa muuttuvan aallonpituusoperaatioita kineettisillä testeillä, absorbanssien suhteiden laskemisella, absorptio mittaamisella useammalla yksittäisellä aallonpituudella tai halutulla aallonpituusalueella. Erilaisten tiedonkäsittelyoperaatioiden avulla saadaan tutkimustuloksia luotettavammiksi, nopeammiksi ja tosiperäisimmiksi. Esimerkiksi absorbanssikäyrässä tapahtuvia muutoksia voidaan tarkkailla laskemalla kuvaajan derivaattoja. Ensimmäisen ja toisen derivaatan laskeminen on tärkeää varsinkin silloin, kun absorptiospektrin kuvaajien päällekkäisyys estää luotettavan kvantitatiivisen tai kvalitatiivisen tutkimuksen.

3.2.6. Tyypillisimpiä malleja

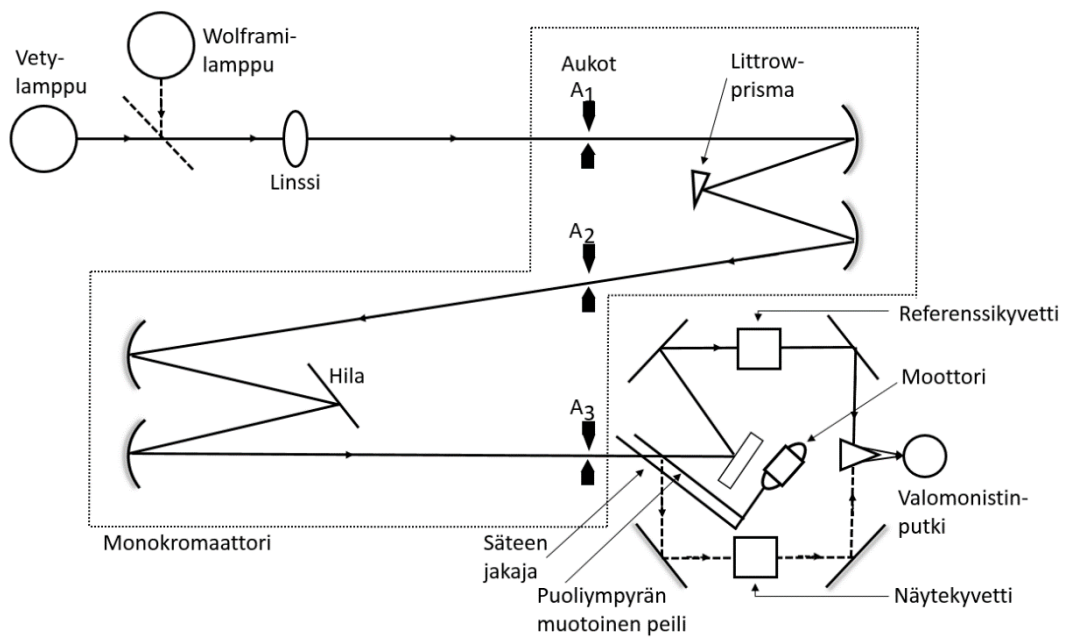
Spektrofotometrien rakenteissa on paljon eroja eri valmistajien kesken.³ Spektrofotometrit vaihtelevat analyysiin tarvittavan tarkkuuden ja laitteelle sopivan myyntihinnan löytämisestä riippuen. Rakenteeltaan tyypillisimpiä malleja ovat yksisäde-, kaksisäde- ja fotodiodirivispektrofotometrit.

Yksisädespektrofotometrit (kuva 7) ovat muihin käytössä oleviin laitteisiin nähden tekniikaltaan yksinkertaisimpia ja edullisempia.³ Niissä näytteeseen johdetaan monokromaattista valoa Bauschen ja Lombin ristikon avulla. Absorbanssi mitataan valomonistimella. Tulokset voidaan esittää joko analogisesti tai digitaalisesti riippuen laitteesta. Tällaisia laitteita ovat esimerkiksi Bouch ja Lomb Spectronic 20 ja Thermo Spec20³¹ –spektrofotometrit. Hieman kalliimmat yksisädespektrometrit säätävät aallonpituuden automaattisesti ja skannaavat näytteen eli analysoivat näytteen spektrin moneen kertaan automaattisesti halutulla aallonpituusalueella. Laitteet ovat myös yhdistettävissä tietokoneeseen. Tällainen on esimerkiksi Global Waterin PhotoLab 6600.



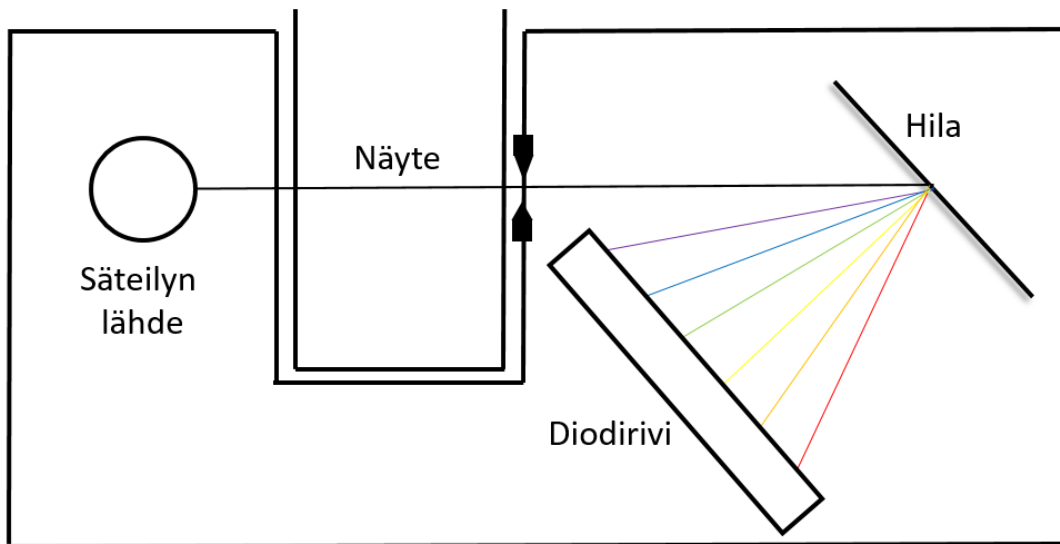
Kuva 7 Yksisädespektrometrin rakenne.³

Kaksisädespektrometrit (kuva 8) sisältävät yksisädespektrometreistä poiketen kahteen saman osaan jaettua yhtä intensiivistä valoaaltoa, joista toinen menee referenssikyvettiin ja toinen näytetilaan.⁸ Ne mahdollistavat näytteen ja taustan samanaikaisen vertailun, minkä avulla laite voi korjata absorptiospektriä automaattisesti P/P_0 suhteesta. Valon lähteenä käytetään yleensä wolframi- ja deuteriumlampun yhdistelmää tai ksenonlamppua.³¹ Valon dispersioon käytetään yleensä Cherzy-Turnerin hilallista monokromaattoria, jolloin säde jaetaan kahteen yhtä suureen osaan joko valoa jakavan tai puoliläpäisevän peilin avulla. Näistä jakavan peilin tekniikalla varustettu laite on yleensä resoluutioltaan parempi, mutta puoliläpäisevän peilin omaava on yksinkertaisempi ja kooltaan pienempi. Alkujaan kaksisädetekniikka kehitettiin parantamaan yksisäteisten spektrofotometriä herkkyyttä, mutta kehityksen myötä moderneista yksisädespektrometreistä on tullut nopeampia, herkempiä ja taloudellisimpia.³ Kaksisädetekniikka on silti vielä hieman yksisädetekniikkaa herkempi, joten laitteen valintaan vaikuttaa se, mihin analyysiin sitä käytetään.



Kuva 8 Kaksisädespektrometrin rakenne eroaa yksisädespektrometrin rakenteesta monokromaattorin jälkeen, jolloin säde jaetaan kulkemaan referenssinäytteeseen sekä näytteeseen.¹⁵ Kuvassa Cary model 14 spektrofotometrin rakenne.

Suunnittelultaan uusimman UV-Vis -spektrofotometrin rakenne perustuu fotodiodirivin käyttöön detektorina.³¹ Se mahdollistaa koko spektrin kuvaamisen muutamassa millisekunnissa. Muista spektrofotometreistä poiketen polykromaattinen valo heijastetaan suoraan näytteeseen ja vasta sen jälkeen hajotetaan dispersoivan hilan avulla fotodiodiriville³² (kuva 9). Spektrit vietään ulkoisen tietokoneen videomonitorille. Tästä johtuen laitteilla on aiempaa pienemmän koko, joka tekee niistä helpommin liikuteltavia. Laitteen resoluutio riippuu fotodiodirivin koosta.³ Lisäksi fotodiodirivi helpottaa seosten analysoimista, koska useamman mittauspisteen avulla kvantitatiivisten mittausten luotettavuus kasvaa. Diodirivispektrofotometreillä voidaan mitata jopa kuuden aineen seoksia, joiden spektriviivat osuvat osittain päällekkäin.



Kuva 9 Diodirivispektrometrin rakenne.³ Polykromaattinen valo ohjataan suoraan näytteeseen ja hajotetaan vasta sen jälkeen polykromaattorissa diodiriville.

3.3.Rajoitukset ja tarkkuus

Spektrofotometrien toiminta on altis monille virheille.³ Poikkeamat Lambert-Beerin laista (Yhtälö 1 sivulla 8) voidaan luokitella kemiallisiin ja instrumentaalisiin virheisiin. Todellisia poikkeamia aiheuttavat tutkittavan yhdisteen liian suuret konsentraatiot. Ne kasvattavat valon heijastumista näytteestä, mikä vääristää mitattua absorbanssia. Transmittanssin ja absorbanssin logaritmisesta suhteesta johtuen (Yhtälö 9 sivulla 15) suhteellinen virhe kasvaa suureksi hyvin suurilla ja pienillä konsentraatioilla. Konsentraation lisäksi heijastusindeksin muutoksia voi aiheuttaa virheellisesti valittu tausta. Tästä johtuen liuotin valitaan näytteen kanssa koostumukseltaan samanlaiseksi. Esimerkiksi orgaanisten yhdisteiden kanssa ei käytetä vettä liuottimena. Monet tuloksia vääristävistä tekijöistä voidaan korjata laskennallisesti.

Muita kemiallisia tekijöitä absorbanssin muutoksiin ovat liuottimien vaikutukset tutkittavan aineen absorptioon, absorboivan aineen läsnäolo epätasapainossa, tutkittavan aineen esiintyminen sekä dimeerinä että monomeerinä ja useamman tutkittavan aineen samanaikainen läsnäolo liuoksessa.³ Lisäksi tutkittavan molekyylin hajoaminen, ionisaatio, hydrolyysi, polymerisaatio, kompleksinmuodostus koaguloituminen, fluoresenssi ja näytteessä olevat epäpuhtaudet vaikuttavat absorptioon.¹⁵ Kemiallisten tekijöiden vaikutuksia voidaan estää esimerkiksi pH- puskuroinnilla tai lisäämällä ligandia kelaattien muodostumiseksi ja liuoksen ionivahvuutta lisäämällä.³

Spektrofotometrissä riippuvia virhelähteitä ovat monokromaattisen valon tasaisuus, puhtaus ja intensiteetti, valon heijastuminen laitteen sisällä uudelleen näytteeseen, hajavalon kohina ja optisten osien luotettavuus.¹⁵ Eri laitteilla mitatut absorbanssit ovat harvoin täysin samanlaisia.³ Spektrofotometriä luotettavuutta tarkastellaan analyysin oikeellisuuden, toistotarkkuuden, herkkyyden ja resoluution avulla.³³ Analyysin oikeellisuudella eli luotettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten etäisyyttä todellisesta arvosta.¹⁵ Toistotarkkuus kuvaa toistettujen määritysten tasaisuutta eli etäisyyttä toisistaan. Laitteen herkkyys ilmoittaa pienimmän luotettavasti mitattavissa olevan sähkövirran.³³ Laitteen resoluutiolla tarkoitetaan laitteen kykyä tuottaa monokromaattista valoa.³⁴ Näiden lisäksi laitteiden luotettavuus tutkitaan konsentraatiolineaarisuuden, hajavalon ja signaali-kohina-suhteen avulla.

Spektrometrin luotettavuus riippuu sen kaikista osista. Valon lähde vaikuttaa säteilyn puhtauteen, tasaisuuteen ja intensiteettiin.¹⁵ Laitteen resoluutio ja näytteeseen osuvan säteilyn samavaiheisuus ovat riippuvaisia monokromaattorin toiminnasta. Tarkemmin sanottuna monokromaattorin resoluutio riippuu dispersoivan hilan valon hajotuskyvystä eli hilan urien lukumäärästä tuumalla tai jos prismaa käytetään, prisman materiaalista ja geometrisesta suunnittelusta.³ Lisäksi monokromaattorissa valon ulostulorako vaikuttaa spektrivyyden aallonpituuksiin. Mikäli säteilyn intensiteetti ja detektorin herkkyys ovat riittäviä, spektrivyyden puhtautta voidaan kasvattaa ulostulorakoa pienentämällä. Monokromaattinen valo on edellytys Lambert-Beerin lain toimivuudelle. Hyvän resoluution avulla pystytään erottelemaan toisiaan lähellä olevat absorptiopiikit. Elektrodien ja valomonistinputkien virheettömin toiminta-alue on absorbanssiarvojen 0,1 ja 1,5 välillä Lambert-Beerin lain mukaan logaritmisten virheiden minimoimiseksi.³ Näytteet tuleekin tarpeen mukaan laimentaa tai konsentroida halutulle alueelle pääsemiseksi. Toiminta-alueen määrittämisessä huomioidaan myös hajavalon ja kohinan aiheuttamat virheet.

Hajavaloksi kutsutaan dispersiotonta säteilyä, joka osuu detektorille.³² Sitä syntyy esimerkiksi pölyn, lian tai viallisten optisten pintojen aiheuttamasta säteilyn siroinnasta, rakojen reunojen diffraktiosta ja monokromaattorin sisäpintojen heijastuksista. Hajavallo voi aiheuttaa virheitä etenkin CCD-kennoja käyttävissä diodirivispektrometreissä, koska niissä kaikki aallonpituudet detektoidaan samanaikaisesti. UV-Vis- alueella merkittävin kohina on ns. piikkikohina, joka aiheutuu detektorin sähkövirran vaihteluista elektroneja emittoivalla pinnalla.³ Virheitä aiheuttaa myös lämpökohina, joka johtuu elektronien liikkumisen synnyttämästä lämmöstä. Signaali-kohina-suhteeksi kutsutaan lukua, joka kuvaa halutun säteilyn signaalin suhdetta hajavalon ja muun kohinan aiheuttamaan signaaliin. Diodirivi spektrofotometrit ovat alttiimpia kohinasta ja fluoresoivasta valosta johtuville virheille, koska ne ovat yksisädespektrometrejä. Niiden antamien spektrien yksittäiset virheet voidaan kuitenkin korjata matemaattisella käsittelyllä.¹⁰

Luotettavien analyysitulosten saamiseksi spektrofotometri laite tulee aina kalibroida ennen käyttöä.³ Kalibroinnilla tarkoitetaan laitteen toiminnan tarkastamista ja säätämistä. Vertaamalla laitteella mitattuja absorbanssiarvoja ja aallonpituuksia tunnettujen aineiden vastaaviin arvoihin ja määrittämällä hajonta nähdään laitteen sen hetkinen toimintakyky. Referenssinäytteitä ja tuloksia voi hankkia esimerkiksi National Institute of Standards and Technology –yrityksestä.³⁵ Analyysimenetelmiä voidaan myös validoida eli kehittää rutiinimittauksiin sopiviksi ilman että joka mittauksella tehdään laitekalibrointi.³

3.4.Sovellukset

UV-Vis –spektrofotometriaa käytetään hyväksi monissa eri tutkimussovelluksissa. Tässä luvussa on mainittuna niistä muutama. Sen lisäksi, että spektrofotometriaa käytetään itsessään analyttisenä tekniikkana, sitä käytetään yleisesti hyödyksi myös muiden analyttisten erotuslaitteiden detektoreina kuten esimerkiksi kromatografialla erotettujen analyttien identifioinnissa.³

3.4.1. Lääketieteellisiä sovelluksia

UV-Vis -spektrofotometriaa on käytetty lääketieteessä pitkään.¹⁰ Spektrofotometrinen sovellusten määrä on hieman laskenut, koska kvantitatiiviseen määrittämiseen on tullut tehokkaampia menetelmiä. Kuitenkin kliinisessä tutkimuksessa sillä on monia sovelluskohteita ja laaja käyttö aineiden kvantitoinnissa. Moniin tutkimuksiin UV-Vis –spektrofotometrian tekee käyttökelpoiseksi menetelmäksi sen helppous ja monipuolisuus, sekä tutkimuskohteena olevien aineiden vesiliukoisuus. Vesi sopii erityisen hyvin liuottimeksi UV- ja näkyvän valon alueella. Yleisesti käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa entsyymien reaktionopeuden analysointi, kolorimetriset ja kineettiset analyysit, immunologiset määritykset, porfyriinin määrittäminen, hemoglobiinin mittaaminen ja proteiinien analysointi.

3.4.2. Spektrofotometrin käyttö satelliittimittauksissa

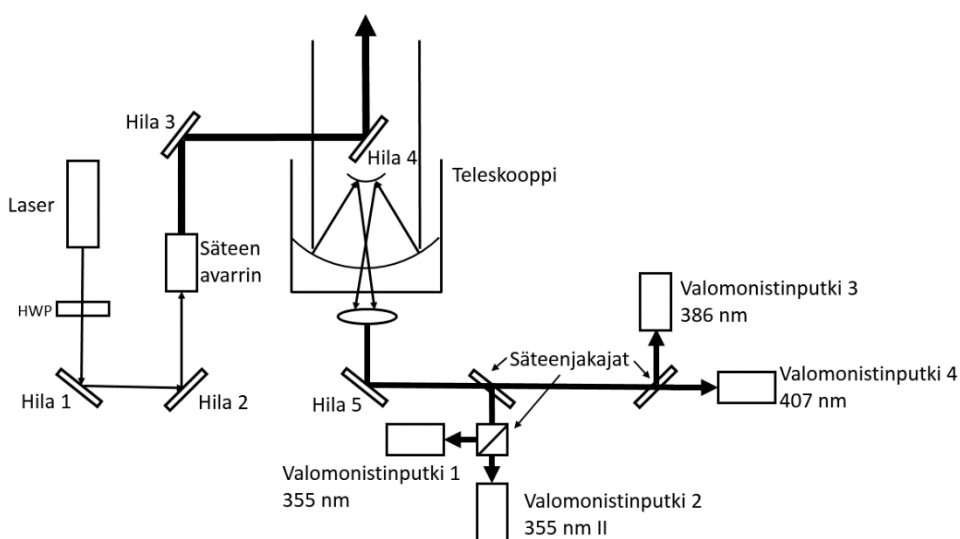
Jo 1800-luvulla avaruutta pyrittiin tutkimaan spektroskooppisin menetelmin Fraunhoferin spektrin innoittamana.¹⁶ 1990-luvulla avaruuteen lähetetty Hubble avaruusteleskooppi hyödyntää UV- ja Vis- aallonpituuksia avaruuden kuvantamiseen.³⁶ Nykyäänkin avaruutta tutkitaan spektroskooppisin menetelmin. Avaruudessa olevien satelliittien kaukokartoituslaitteiden toiminta perustuu spektrofotometriaan. Laitteiden avulla voidaan kerätä tietoa myös maan tilasta, kuten mittaamalla ilmakehän hiilidioksidia tai otsonipitoisuutta sekä lumen, jään ja pilvien määrää.³⁷ Mittaukset voivat auttaa ennustamaan tulivuorten purkauksia ja tuhkapilvien leviämisaluetta. Vuonna 2004 avaruuteen laukaistiin Aura-satelliitti, jonka mukana on suomalais-hollantilais-valmisteinen spektrofotometriaa hyödyntävä OMI-mittauslaite, jonka avulla saadaan merkittävää tietoa ilmakehän koostumuksesta ja ilmanlaadusta.³⁸

3.4.3. Spektrofotometri rikostutkimuksessa

UV-Vis-spektrofotometrilaitetta käytetään rikostutkimuksessa yleensä tutkimuskohteen värin analysointiin.³⁹ Laite soveltuu löydettyjen tekstiilikuitujen tai hiusnäytteiden vastaavuuden selvittämiseen. Mustan ja sinisen musteen tutkiminen asiakirjojen aitouden ja laillisuuden selvittämisen yhteydessä onnistuu myös spektrofotometrisesti. UV-spektrin avulla voidaan analysoida värittömiä tai valkoisia näytteitä, kuten autojen läpinäkyvän maalipinnan lohkeamien vastaavuutta löydettyihin muovin palasiin. Kiinteiden näytteiden tutkiminen tapahtuu pinnasta heijastuvan valon mittaamisella. Spektrofotometrillä tunnistetaan myös huumausaineita. Luonnollisesti spektrofotometriä käytetään myös erilaisten seosten pitoisuuksien määrittämiseen.

3.4.4. Ilmanlaadun tutkimus spektrofotometrillä

Nykyaikaiset ilmansaasteiden optiset kaukokartoituslaitteet LIDAR (engl. light detecting and ranging) ja DIAL (engl. differential absorption and scattering) perustuvat ilman hiukkasten ja molekyylien, sekä niiden pitoisuuksien tunnistamiseen UV-Vis -säteilyn perusteella.¹⁰ Systeemin rakenne poikkeaa hieman tavallisista spektrofotometreistä, koska niissä lasersäde osoitetaan ilmakehään ja ilman hiukkasista takaisin siroonnut Rayleigh-säteily havainnoidaan valodetektorilla. Hiukkasten konsentraatiot määritetään kuitenkin Lambert-Beerin lain avulla. LIDAR-järjestelmien avulla ilman puhtautta voidaan määrittää kolmiulotteisesti jopa useiden kilometrien alueelta. Lisäksi LIDAR-järjestelmä voidaan suunnitella helposti siirrettäväksi tutkimusyksiköksi.



Kuva 10 LIDAR-järjestelmän rakenne.⁴⁰ Järjestelmän valonlähteenä toimii neodyymirikastettu yttrium-alumiini-granaattikide laser (Nd:YAG).

3.4.5. Spektrofotometri ruoan laadun valvonnassa

Ruoan laadun tarkkailuun käytetään monenlaisia menetelmiä, koska ruoka sisältää useita erilaisia ravintoaineita. Lisäksi ruoan laatuun vaikuttaa monet tekijät, kuten ulkonäkö, väri, maku ja ruoan koostumus.⁴¹ UV-Vis-spektrofotometriä käytetään yleensä ruoan värin analysointiin, kuten esimerkiksi valkoviinin laadun arvioinnissa.⁴² Myös ruoan sokeripitoisuutta voidaan mitata spektrofotometrillä.⁴¹ Lisäksi UV-Vis-spektrofotometriä käytetään ruokaöljyjen laadun arvioinnissa ja puhtauden sekä aitouden tarkkailemisessa. Valmistetun rasvan laatua voidaan arvioida anisidiinipitoisuudella. Se antaa tietoa heikompilaatuisten öljyjen rasvan hapettumisesta eli aldehydien muodostumisesta rasvaan. Rasvojen pilaantumista voidaan tutkia rasvan peroksidiabsorptiolla spektrofotometrisesti. Kolmas tapa tutkia öljyn laatua on määrittää sen värin avulla karoteeni- ja klorofyllipitoisuudet. Karoteenit kertovat öljyn sisältämästä antioksidanttipitoisuudesta, joten mitä korkeampi öljyn karoteenipitoisuus on, sitä laadukkaampaa öljy on. Klorofylli puolestaan aiheuttaa öljyyn lievää happamuutta ja on yhteydessä öljyn pro-oksianttien pitoisuuksiin: Mitä pienempi klorofyllipitoisuus on, sitä laadukkaampaa öljy on.

3.4.6. Spektrofotometri prosessianalytiikassa

UV-Vis-absorptiota on käytetty prosessianalytiikassa hyödyksi jo yli 60 vuotta.¹⁰ Spektrofotometria mahdollistaa reaaliaikaiseen tuotantotehokkuuden, turvallisuuden ja ympäristövaikutusten seurannan laajalti kemian ja petrokemian teollisuudessa. Esimerkiksi rikkidioksidin (SO_2) ja typpioksidien (NO_x), sekä elohopean, aromaattisten yhdisteiden ja halogeenipäästöjen seuranta tehdään UV-Vis-analysointilaitteilla. Raakaöljyn jalostuksessa ja kaasun valmistuksessa fotometrianalysointilaitteilla valvotaan Clausin prosessia. Myös muualla petrokemian ja kemian teollisuudessa käytetään laajasti UV/Vis-analysointilaitteita.

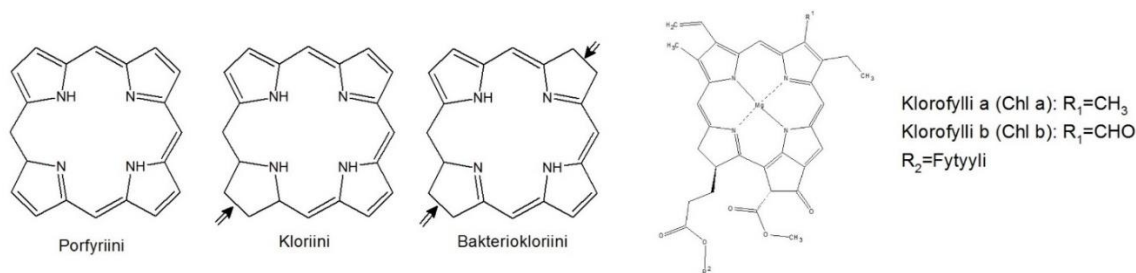
Lääketieteellisessä prosessiteollisuudessa näitä analysointilaitteita on antibioottien valmistamisessa niiden konsentraation määrittämisessä, jotta tuotteen kerääminen esimerkiksi nestekromatografiakolonneihin osataan aloittaa ja lopettaa oikea-aikaisesti. Myös paperin valmistuksessa käytetään fotometrisiä UV-analysointilaitteita ruskean massan ligniinin konsentraation seurantaan. Teollisten prosessien analysointiin tarkoitettavat laitteet ovat hieman tavallisia laboratorioissa käytettäviä spektrofotometrejä kestävämpiä rakenteeltaan, koska niiden tulee kestää tuotantotilojen karut olosuhteet, joita ovat värinä, lämpötilan ja kosteuden vaihtelut ja likaiset näytteet. UV-analysointilaitteiden tulee täyttää prosessin mittakaavan sähköiset vaatimukset.

4. Klorofyllin määrittäminen spektrofotometrillä

Ihmiset ja eläimet tarvitsevat happea elääkseen. Happea syntyy fotosynteesissä eli yhteyttämisreaktiossa, joka tapahtuu vihreiden kasvien, levien ja puiden lehtivihreässä.⁴³ Klorofylli on lehtivihreässä oleva orgaaninen molekyyli, joka osallistuu fotosynteesiin varauksen siirtäjänä ja kuljettajana. Nämä fotofysikaaliset ja elektrokemialliset ominaisuudet riippuvat klorofyllimolekyylien rakenteesta. Spektrofotometrian avulla voidaan tutkia erilaisten klorofyllien rakennetta ja pitoisuuksia.

4.1. Klorofyllin rakenne

Klorofyllimolekyylit ovat porfyriinien johdannaisia, joiden keskusatomina on magnesium.⁴³ Porfyriini on syklinen tetrapyrroli, jonka pelkistettyä muotoa kutsutaan kloriiniksi, systemaattiselta nimeltään 17,18-dihydroporfyriiniksi. Sitäkin pelkistetympi molekyyli on 7,8,17,18-tetrahydroporfyriini, jota sanotaan bakteriokloriiniksi. Kloriinia on runsaasti kasveissa ja levissä, mutta bakteriokloriinia löytyy nimensä mukaisesti bakteeri-organismeista. Molemmat näistä molekyyleistä ovat klorofyllimolekyyliä ja tärkeitä biologisesti.

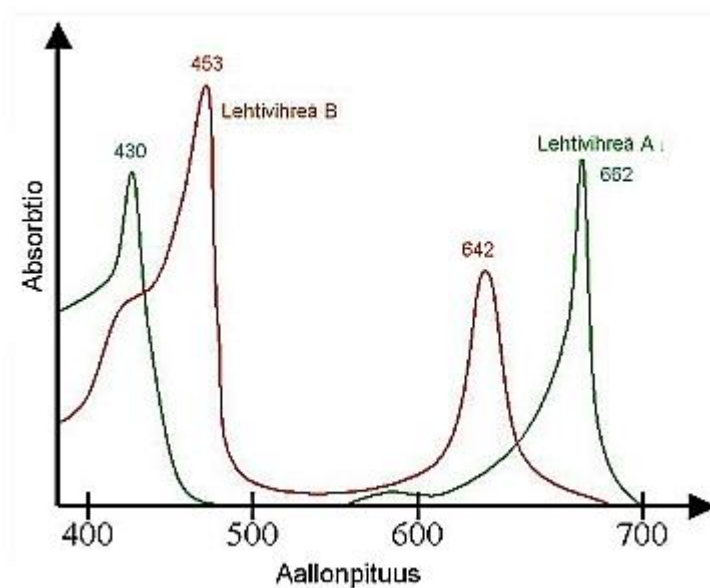


Kuva 11 Porfyriinin, kloriinin, bakteriokloriinin ja klorofylli a:n sekä b:n rakennekaavat.⁴³ Kaikki klorofyllimolekyylit ovat porfyriinin johdannaisia ja klorofylli-a ja -b eroavat toisistaan molekyylin seitsemänteen hiileen kiinnittyneiden substituenttiryhmiensä osalta.

Luonnossa yleisin esiintyvä klorofyllimolekyyli on klorofylli-a ja toiseksi yleisin klorofylli-b.⁴³ Ne esiintyvät lehtivihreässä yleensä suhteessa 3:1, mutta suhde vaihtelee kasvin ja sen elinympäristön mukaan. Klorofylli-a ja -b eroavat melko paljon rakenteeltaan, joten myös niiden absorptiospektrit eroavat toisistaan. Ulkonäöltään molemmat klorofyllit ovat vihreitä eli heijastavat vihreän valon aallonpituuksia, samoin kuin bakteriokloriinit, vaikka absorptiospektreissä onkin eroja.

4.2.Klorofyllin absorptiospektri

Klorofyllit absorboivat sähkömagneettista säteilyä lähes koko näkyvän valon aallonpituusalueella (330-1050 nm).⁴³ Erilaisista absorptiospektreistä huolimatta kaikki klorofyllimolekyylit heijastavat valoa 500-600 nm eli vihreän valon aallonpituusalueella, jonka vuoksi näemme ne vihreinä pigmentteinä. (kuva 12) Klorofylli-a:n absorptiopiikit ovat aallonpituuksilla 430 nm ja 660 nm, ja klorofylli-b:n 450 nm ja 640 nm kohdilla. Luonnon materiaaleja tutkittaessa klorofyllin absorptiospektri vaihtelee huomattavasti, koska erilaisten klorofyllimolekyylien suhteellinen osuus riippuu käytetystä lähteestä ja sen elinympäristöstä.



Kuva 12 Klorofylli a:n ja b:n absorptiospektri.⁴³ Spektristä on nähtävissä hyvin klorofyllin absorptiopiikit ja vihreän valon alue noin 500-600 nm, jolla klorofylli ei absorboi näkyvää valoa. Vihreä valo heijastuu klorofylli-molekyyleistä ja siksi näemme ne vihreinä.

Klorofyllin absorptiopiikkejä sinisellä ja punaisella aallonpituusalueella kutsutaan B (myös Soret) tai Q -joukoiksi.⁴³ Piikit muodostuvat yksittäisten elektronien siirtymien absorption kokonaisabsorptiosta. Siirtymät tapahtuvat pääsääntöisesti kahden ylimmän miehittyneen molekyyliorbitaalin (HOMO, HOMO-1 π -orbitaalin) ja kahden alimman miehittymättömän molekyyliorbitaalin (LUMO, LUMO+1 π^* -orbitaalin) välillä. Neljän molekyyliorbitaalin avulla voidaan ennustaa klorofyllimolekyylien elektroniorbitaalirakennetta, optisia ominaisuuksia sekä hapetus-pelkistyskykyä. Sähköisten siirtymien lisäksi klorofyllimolekyylien absorptiospektri muodostuu värähdys- ja pyörimissiirtymistä. Molekyylit voivat myös menettää energiaa molekyylien sisäisen konversion, värähdyn vapautumisen tai fluoresenssin välityksellä.

4.3.Klorofyllin absorptiospektrin määrittäminen pinaatista Vernierin UV-Vis –spektrofotometrillä²⁷

Valmista klorofyllinäyte:

1. Punnitse puhtaita pinaatin lehtiä 0,5 g ja leikkaa tai revi ne pienemmiksi palasiksi huumareeseen.
2. Hienonna pinaattia huumareessa.
3. Sekoita hienonnettuun pinaattiin 20 ml 70 % isopropanolia (70:30 v/v, i-propanoli:vesi). Vaihtoehtoisesti voit käyttää liottimena 50:50 v/v etanoli:vesi seosta.
4. Anna seoksen seistä noin 10 min.
5. Suodata seos suodatinpaperin ja suppilon avulla puhtaaseen dekantterilasiin.

Valmistelee spektrofotometri ajoa varten:

6. Yhdistä UV-Vis spektrofotometri USB-kaapelilla tietokoneeseen (Logger Pro-ohjelma) tai LabQuestiin.
7. Käynnistä tiedonkeruu ohjelma ("Start data-collection" program) ja valitse "uusi" tiedostot-valikosta ("New", "File-menusta").
8. Mittausaallonpituusalue on 380–740.

Kalibroi spektrofotometri:

9. Valmista taustanäyte eli täytä noin $\frac{3}{4}$ osaa kyvetistä käyttämälläsi liuottimella.
10. Aseta kyvetti spektrofotometriin kirkas puoli valonlähteeseen päin.
11. Avaa LabQuestistä sensorit-valikko tai Logger Prosta koe-valikko ja valitse kalibroi. ("Sensors" tai "Experiment menu" -> "Calibrate")
12. Valitse sitten lopeta kalibrointi ("Finish Calibration") ja paina sen jälkeen OK.

Määritä klorofyllin absorptiospektri:

13. Tyhjennä kyvetti ja huuhtelee se muutaman kerran klorofyllinäytteellä. Täytä kyvetti näytellä siten, että liuos pinta jää noin $\frac{3}{4}$ osaa kyvetin korkeudesta.
14. Aseta kyvetti spektrometriin.
15. Määritä absorptiospektri valitsemalla aloita tiedonkeruu ("Start data-collection").
16. Analysoi spektriä. Huomaa, että piikkien absorbanssilukemat tulee olla alle 1,5 A. Jos näin ei ole, laimenna näyte ja suorita analyysi uudestaan.

5. Yhteenveto

Spektroskopian alkuhistoriasta on nähtävissä, että fysiikan, matematiikan ja kemian tieteidenalojen ylittyminen vaikutti suuresti spektroskooppisten menetelmien syntymiseen. Fyysikot, kuten esimerkiksi Newton ja Einstein, kuvasivat valon luonnetta, joka sai kemistit tutkimaan valon yhteyttä eri alkuaineisiin. Spektroskooppisten tulosten käsittelyyn tarvittiin matemaattisia yhtälöitä, joiden avulla saadaan yhteys mitattavan parametrin ja yhdisteen rakenteen välille. Yhtälöistä mainittakoon Balmerin ja Rydbergin yhtälöt atomin rakenteen ja näkyvän valon spektrin välille sekä Lambertin ja Beerin yhtälöt absorptioon ja konsentraation välille.

Tyypillisimpiä spektrofotometrejä ovat yksisäde- ja kaksisädespektrofotometrit. Niiden toiminta perustuu valon absorptioon tai emissioon ja Lambert-Beerin lakiin. Mikroprosessorien keksiminen mahdollisti automaattisten toimintojen lisäämisen näihin laitteisiin. Tekniikan kehittyessä ja komponenttien pienentyessä kehitettiin aiempien spektrofotometriä rakenteesta poikkeavat, polykromaattista valoa hyödyntävät diodirivispektrofotometrit. Ne soveltuvat hyvin kouluopetukseen niiden kompaktin koon ja edullisen hinnan, sekä suhteellisen laadukkaan mittaustuloksen puolesta. Spektrofotometrejä on mahdollista käyttää oppilasryhmien kanssa myös esimerkiksi kemianluokissa Gadolinissa.⁴⁴

Spektrofotometrialla on lukemattomia käytännön sovellutuksia esimerkiksi lääketieteessä, avaruuden tutkimisessa, rikostutkimuksessa, ilman ja ruoan laadun valvonnassa, sekä teollisuuden prosessianalytiikassa. Yleensä tekniikkaa käytetään kuitenkin värien tai pitoisuuksien analysointiin. Monipuolisuuden vuoksi se tarjoaa mielenkiintoisen aiheen lukio-opetukseen. Oppilaan arkielämään läheisiä sovelluksia ovat muun muassa veren hemoglobiinin määrittäminen ja syötävien öljyjen laaduntarkkailu. Kenties hieman mielenkiintoisempi esimerkki on erilaisten kuitujen vastaavuuden selvittäminen rikostutkimuksessa. Myös klorofylli tarjoaa mielenkiintoisen tutkimuskohteen spektrofotometrillä tutkittavaksi. Ensinnäkin klorofylliä voi helposti uuttaa luonnon aineista, kuten pinaatista, levästä tai lehdistä. Toiseksi klorofyllin osuus kasvien fotosynteesissä on merkittävää, mikä puolestaan lisää sen tutkimisen merkitystä. Kolmanneksi klorofyllin absorptiospektrin tutkimisella voidaan selvittää arkipäivän ongelmia, kuten öljyjen laatua, värien syntymistä tai vaikka valon varastoimista kemialliseksi energiaksi. Analytiikan käyttäminen tuskin tulee vähenemään tulevaisuudessakaan.

6. Lähteet

1. IUPAC., ed. *Compendium of chemical terminology*. 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997. 10.1351/goldbook.
2. University of Helsinki. Laboratory of analytical chemistry. <http://www.helsinki.fi/kemia/analyttinen/>. Updated 2015. Luetu 1.1.2016
3. Christian GD. *Analytical chemistry*. 6th ed. ed. Hoboken, NJ: Wiley; cop. 2003:xix, 828 s.
4. MIT Massachusetts Institute of Technology. MIT spectroscopy - nobel prizes. <http://web.mit.edu/spectroscopy/history/nobel.html>. Luetu 5.1.2016
5. Nobel Media AB 2014. All nobel prizes in chemistry . http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/. Luetu 8.1.2016
6. Nobel Media AB 2014. All nobel prizes in physics. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/. Luetu 8.1.2016
7. Altemose IR, DeLong LE, Locke LE. Topics in chemical instrumentation: Evolution of instrumentation for UV/vis spectrophotometry: Part II. *J Chem Educ*. 1986;63(11):A262-A266. Accessed 7 August 2013. Luetu 10.1.2016
8. Higson S. *Analytical chemistry*. Oxford: Oxford University Press; 2004:1 online resource (ix, 453 p.).
9. Altemose IR. Topics in chemical instrumentation: Evolution of instrumentation for UV-visible spectrophotometry. part I. *J Chem Educ*. 1986;63(9):A216-A223. Accessed 7 August 2013.
10. Meyers RA. *Encyclopedia of analytical chemistry : Applications, theory and instrumentation*. Chichester: Wiley; 2000:15 osaa (xxi, 13970 p.).
11. Opetushallitus. Lukion opetussuunnitelman perusteet 2015. Luetu 1.3.2016
12. Inczédy J, Lengyel T, Ure AM. *COMPENDIUM OF ANALYTICAL NOMENCLATURE - definitive rules 1997*. 3.th ed. IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry; 1997. http://iupac.org/publications/analytical_compendium/.
13. Burns DT. One hundred years of atomic spectroscopy, 1874-1974. *Proc Anal Div Chem Soc*. 1975;12(5):155-8. doi: 10.1039/ad9751200155.
14. Hudson J. *Suurin tiede, kemian historia*. Art house; 1995.
15. Kaur H. *Instrumental methods of chemical analysis*. Meerut, IND: Pragati Prakashan; 2010.

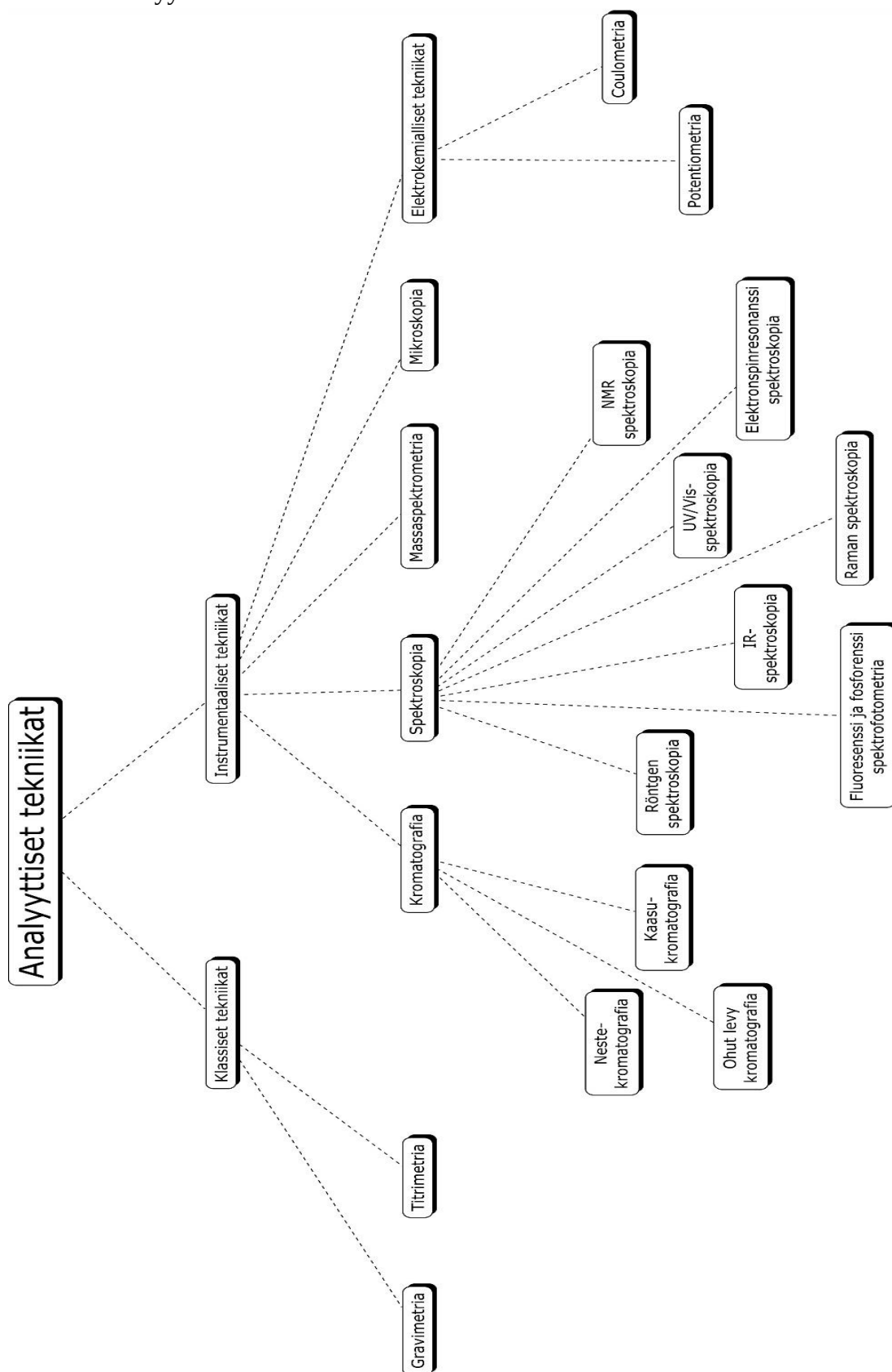
16. Thomas NC. The early history of spectroscopy. *J Chem Educ.* 1991;68(8):631-4. doi: 10.1021/ed068p631.
17. Burns DT. Towards a definitive history of optical spectroscopy. part I. simple prismatic spectra: Newton and his predecessors. *J Anal At Spectrom.* 1987;2(4):343-347. Accessed 28 January 2015.
18. Herschel JFW. On the absorbtion of light by coloured media, and of the colours on the prismatic spectrum exhibited by certain flames; with an account of a ready mode of determining the absolute dispersive power of any medium, by direct experiment. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* 1823;9(Part two):445.
19. Herschel JFW, Bart. MA. Light. In: *Treatises on physical astronomy, light and sound. contributed to the encyclopaedia metropolitana.* London and Glasgow, Richard Griffin company; 1827:438-341-583.
<http://archive.org/stream/treatisesonphysi00hersrich#page/n9/mode/1up>.
20. Thomsen V. A timeline of atomic spectroscopy. *Spectroscopy.* 2006;21(10):32-42. Luettu 16.1.2016
21. G.F.S. Thomas young's place in the history of the wave theory of light. *Journal of the Franklin Institute.* 1931;212(1):131-133. Accessed 29 August 2014.
22. Herschel W. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1800;90(1 January):284-292.
23. Quack M. Frontiers in spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2011;150:533-565. Accessed 4 March 2015. doi: 10.1039/c1fd00096a.
24. Mukhopadhyay R. The rise of instruments during world war II. *Anal Chem (Washington, DC, U S).* 2008;80(15):5684-5691. doi: 10.1021/ac801205u.
25. Newton I. A letter of mr. isaac newton, professor of the mathematics in the university of cambridge; containing his new theory about light and colours. *Phil. Trans.* 1. January 1671;6(69-80):3075-3087.
26. Thorburn Burns D. Towards a definitive history of optical spectroscopy - part II. introduction of slits and collimator lens. spectroscopes available before and just after kirchoff and bunsen's studies. *J Anal At Spectrom.* 1988;3(1):285-291. Accessed 28 January 2015.
27. Vernier Software & Technology, LLC. **SpectroVis plus spectrophotometer.**
<http://www.vernier.com/products/sensors/spectrometers/visible-range/svis-pl/>.
Updated 2015. Luettu 20.1.2016
28. Craic Technologies. Nanospectrophotometer.
http://www.microspectra.com/component/content/article/52-craictech/254-nanospectrophotometer?gclid=CjwKEAiAgeW2BRDDtKaTne77ghgSJACq2U4byYkQ-zVYEqcvsmbaPVlm1l7kCZvcIa6PQTZBUXn7dxoCp-jw_wcB. Updated 2012.
Luettu 1.3.2016

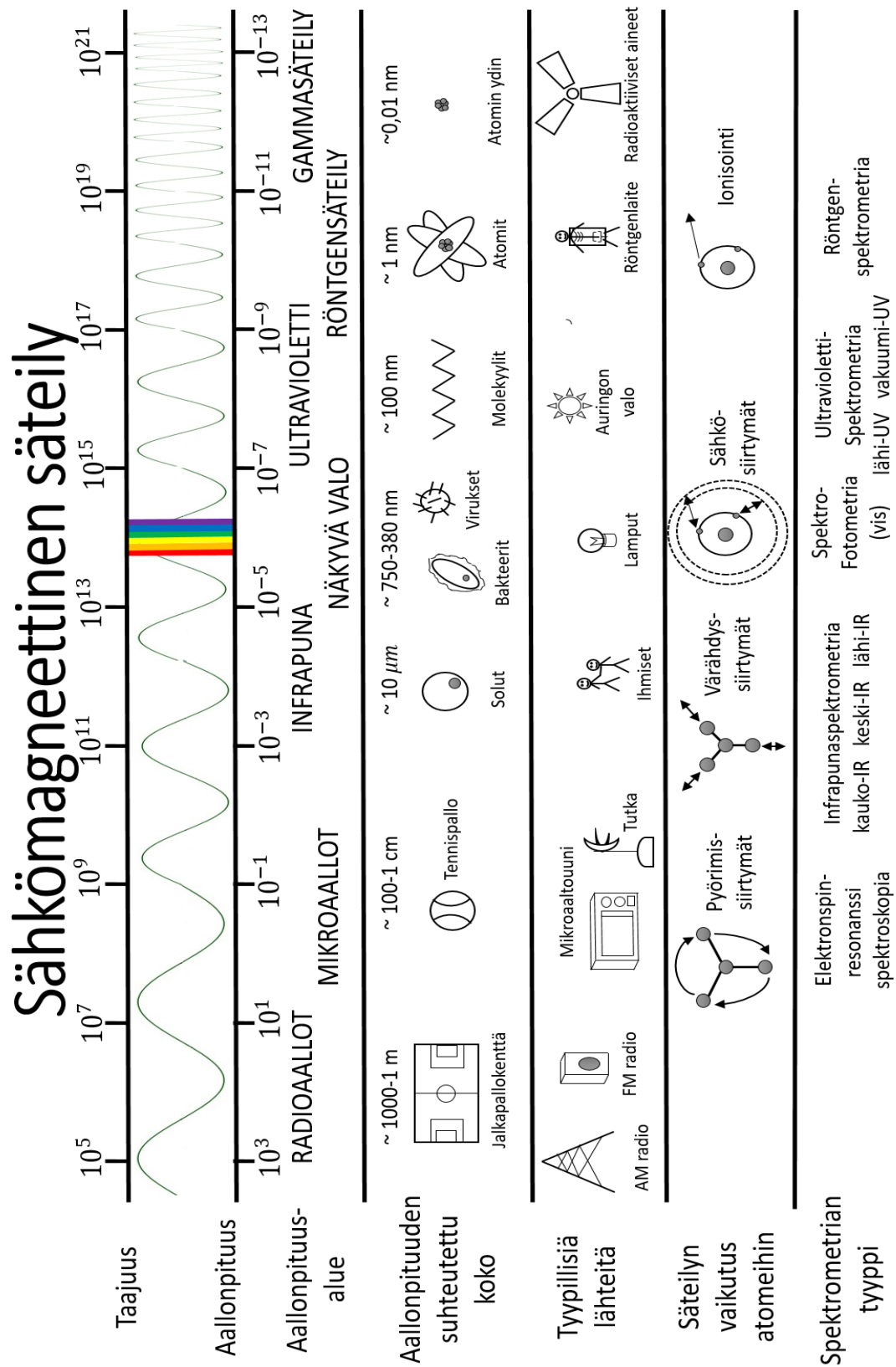
29. Thermo Scientific. Nanodrop one/one^c UV-vis spectrophotometer. <http://www.nanodrop.com/ProductOneOverview.aspx>. Updated 2013. Luettu 1.3.2016
30. TITERTEK-BERTHOLD. Colibri microvolume spectrometer. http://www.bertholdds.com/colibri-microvolume-spectrometer_9.html. Luettu 1.3.2016
31. Czegan DAC, Hoover DK. UV-visible spectrometers: Versatile instruments across the chemistry curriculum. *J Chem Educ.* 2012;89(3):304-309. Accessed 31 August 2015. doi: 10.1021/ed200776x.
32. Gaertner AA, Yoon HW, Germer TA. Chapter 3 - dispersive methods. *Experimental Methods in the Physical Sciences.* 2014;46:67-95. doi: <http://dx.doi.org.libproxy.helsinki.fi/10.1016/B978-0-12-386022-4.00003-0>.
33. Measurement Computing. **Accuracy, precision, resolution & sensitivity.** <http://kb.mccdaq.com/KnowledgebaseArticle50043.aspx>. Updated 2015. Luettu 20.2.2016
34. Keppy NK, Allen M. Understanding spectral bandwidth and resolution in the regulated laboratory. http://www.analiticaweb.com.br/newsletter/02/AN51721_UV.pdf. Updated 2008. Luettu 12.2.2016
35. The National Institute of Standards and Technology (NIST). **Welcome to the NIST chemistry WebBook** . <http://webbook.nist.gov/>. Updated 2016. Luettu 1.2.2016
36. Turnshek DA, Bohlin RC, Williamson II RL, Lupie, L ja Koornneef, J. An atlas of hubble space telescope photometric, spectrometric and polarimetric calibration objects. *The Astronomical Journal.* 1990;99(4):1243. Luettu 30.1.2016
37. Bruegge CJ, Davies R, Schwandner FM, Seidel FC, eds. *Spectrophotometry applications: Remote sensing.* ; 2014Experimental Methods in the Physical Sciences; No. 46.
38. Ilmatieteenlaitos. OMI-mittauslaitteella entistä tarkempi kuva ilmakehän koostumuksesta. <http://ilmatieteenlaitos.fi/tiedote/1130936328>. Updated 2005. Luettu 3.2.2016
39. Houck MM, Siegel JA. *Fundamentals of forensic science, applications of UV/visible spectroscopy in forensic science.* 3.th ed. Elsevier; 2015.
40. Liu B, Wang Z, Cai Y, et al. Compact airborne raman lidar for profiling aerosol, water vapor and clouds. *Opt Express.* 2014;22(17):20613-20621. Accessed 17 February 2016. doi: 10.1364/OE.22.020613.
41. Nawrocka A, Lamorska J. Determination of food quality by using spectroscopic methods. In: Grundas S, Stepniewski A, eds. *Advances in agrophysical research.* ; 2013. 10.5772/52722.

42. Whitworth J. Shimadzu DU launch for UV/vis spectrophotometer.
<http://www.foodqualitynews.com/Lab-Technology/Food-quality-analysis-with-UV-visible-spectrophotometer>. Updated 2015. Luettu 5.2.2016
43. Nikkonen T. *Structure-property relationships and self-assembly of chlorophyll derivatives in development of light-harvesting structures and materials*. [Academic Dissertation]. ; 2015.
44. Kemian opetuksen keskus Kemma. Kemianluokka gadolin - kiehtovaa kemiaa kaikille!
<http://www.luma.fi/kemma/kemianluokka-gadolin>. Updated 2013. Luettu 9.3.2016

7. Liitteet

Liite 1 – Analytyttiset tekniikat



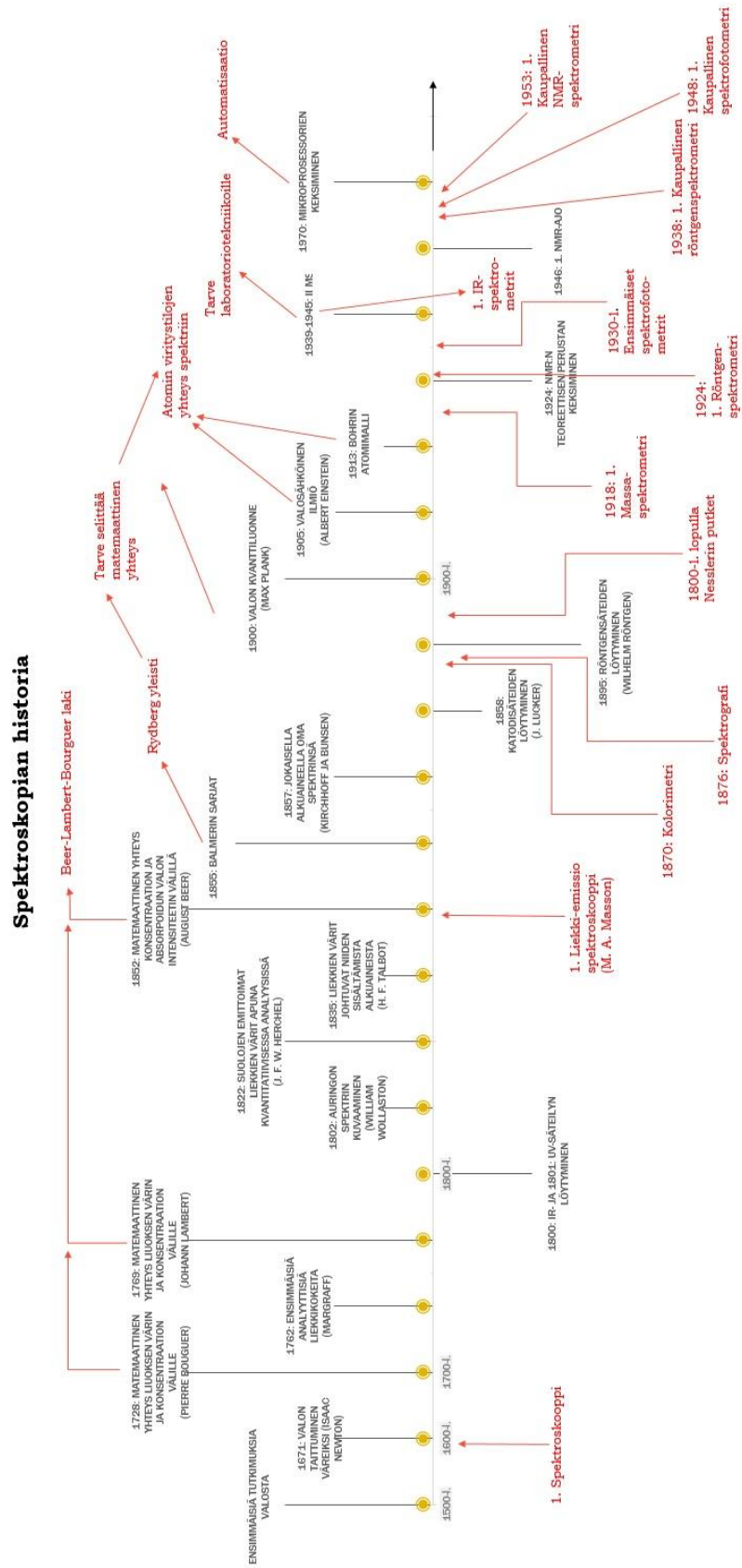


Liite 3 – Spektrometrian termejä

Spektrometrian sanasto	
Absorbanssi	Logaritminen suhde näytteeseen saapuvan ja sen läpimenneen säteilytehon välillä. ¹ Absorbanssi lasketaan Lambert-Beerin lain mukaisesti.
Absorptio	Absorptio on ilmiö, jossa säteilyn energia siirtyy aineeseen. ¹
Analyysin oikeellisuus	Analyysin oikeellisuudella eli luotettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten eroa todellisesta arvosta. ¹⁵
Analyysin herkkyys	Laitteen herkkyys ilmoittaa pienimmän luotettavasti mitattavissa olevan sähkövirran. ³³
Analyytin kemia	Analyytin kemia on tieteenala, joka tutkii ja kehittää metodeja, laitteita ja strategioita keräämään tietoa alkuaineista ja yhdisteistä, sekä niiden luonteesta ajassa ja avaruudessa. ¹
Dynodi	Dynodi on valomonistinputken elektrodi. ⁸
Elektroninen siirtymä	Elektroninen siirtymä eli sähkösiirtymä tapahtuu, kun elektroni liikkuu eri energiatasojen välillä. ³ Korkeammalle energiatasolle siirryttäessä saapuva säteily absorboituu elektroniin ja palatessaan matalammalle energiatasolle energiaa emittoituu eli elektroni luovuttaa säteilyä.
Elektroniputki	Elektroniputki on fotoemissiivisen katodin ja anodin yhdistelmä. ³ Sen toiminta perustuu valosähköiseen ilmiöön. Saapuvan fotonin osuessa katodiin se emittoi elektronin, joka kulkeutuu jännitteen alaisena anodille. Tämä aiheuttaa sähkövirran, joka voidaan suurentaa ja mitata.
Emissio	Atomin viritystilän purkautuessa energiaa siirtyy molekulaarisesta kokonaisuudesta sähkömagneettiseen kenttään. ³ Tätä ilmiötä kutsutaan emissioksi.
Fluoresenssi	Kemiallinen ilmiö, jossa atomi ensin absorboi säteilyä ja sen jälkeen emittoi säteilyä spontaanisti. ¹
Fosforenssi	Fosforenssi kuvaa pitkäkestoista luminesenssia. ¹
FTIR	Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopiassa (FTIR eli Fourier - transform Infrared) tutkitaan aineita infrapuna-alueella valon interferenssiä apuna käyttäen. ¹⁵
IR-spektrometria	Atomien ja molekyylien tutkimista infrapunasäteilyllä, joka saa atomeissa aikaan pyörimis- ja värähtelysiirtymiä. ¹⁵ Syntyvä spektri on kullekin aineelle ominainen.

Kalibrointi	Luotettavien analyysitulosten saamiseksi laite tulee aina kalibroida ennen käyttöä. ³ Kalibroinnilla tarkoitetaan laitteen toiminnan tarkastamista ja säätämistä vertaamalla sen mittaamia absorbansseja ja aallonpituusarvoja tunnettujen aineiden vastaaviin arvoihin.
Kolorimetri	Kolorimetrien eli värintunnuslaitteistojen toiminta perustuu intuitiiviseen oletukseen siitä, että saman aineen tummempi liuos on myös konsentraatioiltaan suurempi. ¹⁴ Kolorimetrin avulla verrataan silmämääräisesti liuosten värisävyjä. Konsentraatio päätellään tunnetun liuoksen konsentraation avulla. Esimerkiksi Nesslerin putkien käyttäminen on kolorimetrinen menetelmä.
Kromofori	Kromoforilla tarkoitetaan molekyylin funktionaalista ryhmää tai sidosta, joka absorboi säteilyä. ³ Absorptioaallonpituus ja sen intensiteetti riippuvat tästä absorboivasta sidoksesta tai ryhmästä.
Luminesenssi	Luminesenssi on spontaani emissio, joka tapahtuu sähkösiirtymän tai värähdyssiirtymän purkautuessa. ¹
Monokromaattinen säteily	Sähkömagneettinen säteily on polykromaattista eli erilaisia aallonpituuksia sisältävää säteilyä. Monokromaattinen säteily (samavaiheisen aaltoliikkeen säteily) tarkoittaa säteilyä, jolla on sama aallonpituus. ⁸
NMR-spektrometria	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR, engl. nuclear magnetic resonance) perustuu atomien ytimien sähkömagneettisten ominaisuuksien mittaamiseen. ¹⁵ Tämä tarkoittaa sitä, että asetettaessa tutkittava aine magneettikenttään, se absorboi energiaa radiotaajuudella sähkömagneettisessa kentässä.
Optinen spektroskopia	Systeemien tutkiminen niiden tuottaman tai vastaanottaman elektromagneettisen säteilyn avulla vakuuissa. ¹ Spektroskooppiset ominaisuudet ilmoitetaan aallonpituuksina.
Polykromaattinen säteily	Valkoinen valo on polykromaattista säteilyä eli säteilyä, jossa esiintyy kaikkia kyseisen alueen aallonpituuksia. ⁸
Raman spektroskopia	Raman spektroskopia perustuu ramansironnan tutkimiseen tyypillisesti näkyvän valon alueella. ¹⁵ Toisin sanoen aineiden ominaisuuksien tunnistaminen tapahtuu värähtely- ja pyörimissiirtymien taajuuksien avulla.
Rotaatiosiihtymä	Rotaatio- eli värähdyssiirtymä tapahtuu, kun molekyylin pyörimisenergia virittää elektronit korkeammalle energiatasolle. ³ Tällaisia siirtymiä esiintyy mikroaalto- ja kaukoinfrapuna-alueilla.
Resoluutio	Resoluutiolla tarkoitetaan laitteen kykyä tuottaa monokromaattista valoa. ³⁴ Se tarkoittaa myös laitteen erotuskykyä.

Spektrografi	Spektrografi on spektroskoopin ja kameran yhdistelmä eli laite, jolla tutkittava spektri pystytään tallentamaan kuvana. ¹³
Spektroskopia	Spektroskopia on IUPAC:in määritelmän mukaan tutkimusala, joka tutkii sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutuksia aineen kanssa tai säteilyä, jota aine itse tuottaa. ¹²
Spektrometria	Tutkittavan alkuaineen ja sen komponenttien tutkimista mittaamalla sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutusta aineen kanssa tai säteilyä, jota aine itse tuottaa. Sana ”metry” viittaa mittaamiseen ja ”spectrum” kuvaamiseen. ¹²
Spektrometri, spektrofotometri	Laite, joka mittaa sähkömagneettisen säteilyn spektriä. ¹²
Spektroskooppi	Spektroskooppi on laite, joka mahdollisti optisen spektrin havaitsemisen ja tutkimisen. ¹²
Säteilyn intensiteetti, I	Säteilyn intensiteetti kuvaa säteilytehoa (P) kiinteällä kulmalla (Ω) kaikilla aallonpituuksilla (λ). ¹ Matemaattinen yhtälö: $I = dP/d\Omega$. Si-järjestelmän mukainen yksikkö $W\ sr^{-1}$.
Säteilyteho	Säteilyteho kuvaa energiaa, joka emittoituu, siirtyy tai tulee vastaanotettua säteilynä. ¹ SI-yksikkö on $Js^{-1} = W$.
Transmittanssi	Suhde näytteen läpäisseen säteilytehon ja näytteeseen lähetetyn säteilytehon välillä. ¹ (Yhtälö 7)
Toistotarkkuus	Toistotarkkuus kuvaa toistettujen määritysten tasaisuutta eli eroa toisistaan. ¹⁵
Valomonistinputki	Valomonistinputken toiminta perustuu valosähköiseen ilmiöön. ³ Siinä fotoemissiivisen katodin ja anodin välille on asennettu elektrodisarja, jonka tehtävänä on kasvattaa sähkövirtaa. Elektrodeja kutsutaan dynodeiksi eli elektronin monistajiksi. Fotonin osuessa fotoemissiiviseen pintaan, katodilta emittoituu primäärinen elektroni, joka kiihdytetään kohti dynodia, josta irtaoo sekundäärisiä elektroneja.
Vibraatiosiiirtymä	Vibraatiosiiirtymä on värähdysiiirtymä, jolla tarkoitetaan atomien tai atomiryhmien keskinäisen värähtelyn energian kasvua. ³ Tällaisia siirtymiä tapahtuu lähi- ja keski-infrapuna-alueilla.



Liite 5 – Kromoforit ja auksokromit

Taulukko I Tyypillisimpiä kromoforeja ja niiden absorptiomaksimeja.^{3,15}

Tyypillisimpiä kromoforeja ja niiden absorptiomaksimeja		
Kromofori	Ryhmä	λ_{max} , nm
Alkaani	– C – C –	135
Alkeeni	– C = C –	190
Amiini	– NH ₂	195
Ketoni	– C = O	195, 270–285
Aldehydi	– CHO	210
Nitro	– NO ₂	210
Nitriitti	– ONO	220–230
Eetteri	– O –	185
Esteri	– COOR	205
Fenyyli	– C ₆ H ₅	250
Bromidi	– Br	208
Jodidi	– I	260

Taulukko II Tyypillisimpiä auksokromeja ja niiden aiheuttamat muutokset.¹⁵

Tyypillisimpiä auksokromeja		
Sinisiirtymää aiheuttavat ryhmät	– OH, – NH ₂ , – COCH ₃ , – NHCOCH ₃	
Punasiirtymää aiheuttavat ryhmät	Happamat tai negatiiviset ryhmät emäksisissä liuoksissa: – NO ₂ , – NO, – CO, – CN	Emäksiset tai neutraalit ryhmät happamissa liuoksissa: – OH, – OR, – NR ₂ , – NHPh, – NH ₂