

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Rudolf Aro

**Kuumutussüsteemiga kulonomeetrilise Karl  
Fischeri titraatori parameetrite valideerimine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Lauri Jalukse, PhD

Ivo Leito, PhD

Tartu 2015

# Sisukord

<b>Sissejuhatus</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade</b> .....	<b>5</b>
1.1 Karl Fischeri reaktsioon.....	5
1.2 Mahtanalüütiline Karl Fischeri tiitrimine .....	6
1.3 Kulonomeetiline Karl Fischeri tiitrimine .....	7
1.4 Lõpp-punkti määramise viisid .....	9
1.5 Kõrvalreaktsioonid .....	10
1.6 Proovi sisestamise meetodid.....	11
1.7 Reagendid .....	12
1.8 Mõõtemääramatus .....	13
<b>2. Eksperimentaalne osa</b> .....	<b>15</b>
2.1 Kasutatud aparatuur .....	15
2.1.1 Metrohm 831 KF Coulometer.....	15
2.1.2 Metrohm 874 Oven Sample Processor .....	15
2.1.3 Tiamo .....	16
2.1.4 Kasutatud reagendid.....	16
2.1.5 Gravimeetiline standardlahus .....	16
2.2 Mõõtesüsteemi parameetrite valideerimine .....	17
2.2.1 Titraatori parameetrite valideerimine.....	17
2.2.2 Kuumutussüsteemi valideerimine .....	21
2.3 Lineaarsuse hindamine .....	23
2.4 Avastamispiiri hindamine.....	23
2.5 Metoodika väljatöötamine puitgraanulite veesisalduse määramiseks .....	24
2.5.1 Proovi kirjeldus .....	24
2.5.2 Prooviettevalmistus.....	25
2.5.3 Ahju parameetrite optimeerimine .....	25
2.5.4 Puidu termiline lagunemine .....	28
2.5.5 Mõõtmiste tulemused.....	28
2.6 Metoodika väljatöötamine D-lutsiferiini veesisalduse määramiseks .....	30
2.6.1 Proovi kirjeldus .....	30
2.6.3 Analüüsimeetod ja mõõtetulemused .....	33
<b>3. Mõõtemääramatuse hindamine</b> .....	<b>35</b>
3.1 Mõõtemääramatuse hindamine erinevatele mõõtesituatsioonidele .....	35
3.1.1 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades otsesisestust.....	38

3.1.2 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi.....	38
3.1.3 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks.....	39
3.1.4 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, hõlmab lisaks kasutatud seadmele kulonomeetreid laiemalt .....	40
3.1.5 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, mis hõlmab lisaks kasutatud seadmele kulonomeetreid laiemalt ning proovi hoidmist ebamõistlikel tingimustel .....	41
3.1.6 Mõõtemääramatuse arvutamine kahele probleemsele reaalsele proovile .....	42
<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>43</b>
<b>Summary .....</b>	<b>45</b>
<b>Kasutatud kirjandus .....</b>	<b>47</b>
<b>Lisad .....</b>	<b>49</b>
Lisa 1 .....	49
Lisa 2 .....	50
Lisa 3 .....	51
Lisa 4 .....	52
Lisa 5 .....	54
Lisa 6 .....	55
Lisa 7 .....	56
Lisa 8 .....	57
Lisa 9 .....	58
Lisa 10 .....	62
Lisa 11 .....	63

# Sissejuhatus

Aastal 1935 viis Saksa keemik Karl Fischer esmakordselt läbi veesisalduse mahtanalüütilise tiitrimise joodiga. Ta avastas, et lisades Bunseni reaktsioonile suures ülehulgas vääveldioksiidi, on võimalik määrata veesisaldust mittevesilahustes. See avastus on osutunud erakordselt viljakaks ning samale reaktsioonimehhanismile tuginedes on välja töötatud rida erinevaid solvendisüsteeme ja tiitrimise tehnilisi lahendusi määramaks veesisaldust erinevates proovides. Käesolevaks ajaks on Karl Fischer'i nime kandev tiitrimine muutunud *de facto* standardmeetodiks veesisalduse määramisel.

Veesisalduse määramiseks Karl Fischeri meetodil on kaks tehnilist lahendust: mahtanalüütiline tiitrimine ja kulonomeetiline tiitrimine. Aja jooksul on täiustatud reaktsioonide ja solventide keemilist poolt, võttes kasutusele ohutumaid ja ajas stabiilsemaid reagente. Samuti on täiustatud seadmeid, mille üheks näiteks on tahkete proovide kuumutusahju lisamine, mis teeb võimalikuks väga selektiivselt keerulistes tahketes proovimaatriksites veesisaldust mõõta. Tänu täiendustele on nüüdseks tegu laialt levinud meetodiga veesisalduse määramiseks toiduainetes, polümeerides, ravimites ning ka erinevates solventides. [1]

Karl Fischeri meetod on väga võimekas ning laialdaselt kasutatav kui primaarmedod (vt. Lisa 1). Samas on Karl Fischeri tiitrimisel mitmeid eksperimendiparameetreid ning määramatuse allikaid, mis on tähelepanuväärselt vähe läbi uuritud. Käesoleva töö eesmärk on valideerida reaalse tahkete proovide analüüsiks kasutatav kuumutusüsteemiga kulonomeetiline Karl Fischeri titraator ning sealjuures viia läbi põhjalik mõõtemääramatuse alane analüüs. Eksperimentaalses osas on kasutatud kulonomeetrist Karl Fischeri titraatorit 831 KF Coulometer ning proovide kuumutussüsteemi 874 Oven Sample Processor. Mõlemad seadmed on tootnud Metrohm AG Šveitsis. Käesolev uurimustöö on osa rahvusvahelisest projektist SIB64 METefnet, mis toimub Euroopa Metroloogiauringute programmi (EMRP) raames. Selle projekti eesmärgiks on arendada üheseid põhimõtteid, meetodeid ning seadmeid SI jälgitavuse loomiseks veesisalduse määramisel väga erinevates tahketes ainetes (vt. Lisa 2).

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Karl Fischeri reaktsioon

Karl Fischeri meetod põhineb niinimetatud Karl Fischeri (edaspidi KF) reaktsioonil:

Esimene etapp [1]:



Teine etapp [1]:



Reaktsioonid kulgevad kontrollitud tingimustel range stöhhiomeetriaga. Ühe mooli joodiga ( $\text{I}_2$ ) reageerib üks mool vett ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Esimeses etapis reageerivad alkohol ( $\text{ROH}$ ), vääveldioksiid ( $\text{SO}_2$ ) ja alus ( $\text{R}'\text{N}$ ), andes alküülsulfiti soola ( $[\text{R}'\text{NH}]\text{SO}_3\text{R}$ ). Teises etapis oksüdeerib jood alküülsulfiti soola alküülsulfaadi soolaks ( $[\text{R}'\text{NH}]\text{SO}_4\text{R}$ ), milleks kulub stöhhiomeetriline kogus vett. Ühe mooli joodiga reageerib üks mool vett. [1] [2] [3]

KF reaktsiooni kulgemist kontrollib reaktsioonikeskkonnas olev vesi. Kui veesisaldus on kõrgem kui  $1 \text{ mol/dm}^3$ , on eelistatud Bunseni reaktsioon. Sellisel juhul reageerib ühe joodi molekuliga kaks vee molekuli. [1]

Bunseni reaktsioon [4]:



KF reaktsioonile on iseloomulik optimaalne pH vahemik. Selle tagamiseks sisaldavad reagentid aluseid ja reagentil on märkimisväärne puhvermahtuvus. Reaktsiooni tasakaalukonstant  $K$  on konstantne vaid  $\text{pH}^1$  vahemikus 5.5 – 7.5. pH optimaalses vahemikus on KF reaktsiooni stöhhiomeetria 1 : 1 ning reaktsiooni saagis on 100 %.

Kui pH on alla viie, kasvab  $K$  lineaarselt pH-ga. Kui pH on üle seitsme ja poole, kasvab  $K$  kõrvalreaktsioonide tõttu. Lisaks mõjutab reaktsiooni kiirust ka jodiidioonide kontsentratsioon. Jood reageerib jodiidioonidega, moodustades trijodiidioone, mis mõjutab KF reaktsiooni tasakaalu. [1] [5] [6]

---

<sup>1</sup> pH on mõõdetud kombineeritud klaaselektroodiga, elektrolüüdina kasutati küllastunud LiCl lahust metanoolis. Praktilise rakenduse jaoks annab see meetod piisava täpsuse.

## 1.2 Mahtanalüütiline Karl Fischeri tiitrimine

Mahtanalüütilisel ehk volumeetrilisel KF tiitrimisel lisatakse büretiga joodi sisaldav reagent lahusesse. Tänapäevased büretid suudavad reagente doseerida täpsusega kuni 0.25 µl. Mahtanalüütilist tiitrimist sobib kasutada, kui veesisaldus proovis on vahemikus 100 mg/kg kuni 100%. Võimalik on analüüsida pastasid ning ka tahkeid aineid, asetades nad otse mõõterakku. Mahtanalüütilise tiitrimise korral arvutatakse proovi veesisaldus kulunud titrandi ruumala järgi. Selle meetodi puuduseks on reagentide ebastabiilsus ajas, mistõttu on vajalik määrata enne mõõtmist titrandi tiiter (tiitrimislahuse kontsentratsioon). [1]

Mahtanalüütilisel KF tiitrimisel kasutatakse kahte tüüpi titrante: ühekomponentsed ning kahekomponentsed.

**Ühekomponentse** tiitrimise puhul on kõik tiitrimiseks vajalikud reagensid ühes lahuses. Mõõterakku valatakse tavaliselt metanool. Mõõterakku nimetatakse kinnist anumaks, kus toimub uuritav reaktsioon. See peab olema võimalikult hästi suletud, et vähendada väliskeskkonna mõjutusi (eeskätt õhuniiskuse ligipääsu reagentidele). Taolise süsteemi kasutamine on lihtsam ning reagensid on üldiselt odavamad. [7]

**Kahekomponentse** tiitrimise korral on titrandis ainult jood ja alkohol. Ülejäänud reagensid on lahuses, mis valatakse mõõterakku, kuhu lisatakse ka proov. Kahekomponentsed reagensid on võrreldes ühekomponentsetega kallimad. Samas on kahekomponentsed reagensid stabiilsemad. [7]

Mahtanalüütilise süsteemi kasutusvõimalused määrab ära tema ehitus. Kuna tegemist on mahtanalüütilise meetodiga, siis määrab lõpptulemuse täpsuse ja tõesuse reagentide doseerimise täpsus, samuti titrandi tiitri täpsus. Titrandi täpsuseks doseerimiseks kasutatakse spetsiaalseid dosaatoreid. Nendes olevate liikuvate detailide kulumine võib mõjutada mõõtetulemusi. Kuigi uuemad seadmed lubavad doseerida kuni 0.25 µl eraldusvõimega (vähim ruumalade vahe, mida doseeriv seade veel eristada suudab), ei tähenda see seda, et tiitrimist võib läbi viia eraldusvõime piiril. Lisaks on vajalik erinevate veesisalduste määramiseks kasutada erineva tiitriga reagente ning reagentide tiitrid ei ole ajas stabiilsed. Need asjaolud muudavad mahtanalüütilise süsteemi kasutamise tülikamaks ning suurendavad mõõtemääramatust.

### 1.3 Kulonomeetriline Karl Fischeri tiitrimine

Kulonomeetriline KF tiitrimise korral saadakse vee tiitrimiseks vajalik jood elektrolüüsil.

Reaktsioon anoodil:



Reaktsioon katoodil:



Tiitrimise käigus tekkinud joodi kogus mõõdetakse elektri hulga kaudu ehk kulonomeetriliselt. Kulonomeetrilise KF tiitrimise korral genereeritakse reaktsiooniks vajalik jood otse mõõterakus. Selleks kasutatakse nn. generaatorelektroodi. Kulonomeetrilised süsteemid sobivad veesisalduste määramiseks vahemikus alates 1 mg/kg kuni 5%. Tiitritud vee kogus arvutatakse Faraday elektrolüüsi seaduse alusel [1] [8]:

$$m = \left(\frac{Q}{F}\right) * \left(\frac{M}{z}\right) \quad (6)$$

Kus  $m$  on elektroodil eraldunud aine mass,  $Q$  on süsteemi läbinud laengu hulk,  $M$  on aine molaarmass,  $z$  on ülekantud elektronide arv ning  $F$  on Faraday arv  $96\,485 \text{ C/mol}^{-1}$ . [1]

Kulonomeetrilise tiitrimise eelduseks on, et elektrokeemiline reaktsioon kulgeb ühtlikult ning efektiivsusega 100%<sup>2</sup>. [1] [9] Meetodi oluliseks eeliseks on see, et puudub vajadus titrandi kontsentratsiooni (tiitrit) määrata ehk standardiseerida. [10] Kuna voolutugevus on mõõdetav väga kõrge täpsusega ja see täpsus on ajas püsiv, ei ole regulaarne kalibreerimine vajalik. Teiseks, kuna jood genereeritakse alles analüüsi ajal, on kasutatavad reagentid stabiilsed, ei ole vaja reagendi tiitrit ajas määrata. Kuna reaktsioonil on kindel stöhhioomeetria ja voolutugevus ning aega mõõdetakse kõrge täpsusega, on tegemist primaarmedodiga (vt. Lisa 1). Kolmandaks, reaktsiooniks vajalikud ained on kõik mõõtelahuses, mistõttu puudub vajadus seda analüüsi ajal juurde lisada. Neljandaks, puuduvad liikuvad osad ja rakk on paremini väliskeskkonnast isoleeritud. Kõigi nende omaduste tõttu on kulonomeetriline süsteem mahtanalüütilisest täpsem ning sobivam just väikeste veesisalduste määramiseks.

Kulonomeetrilisi KF titraatoreid on kahte tüüpi: diafragma generaatorelektroodiga ning diafragma generaatorelektroodiga. Mõlemat tüüpi elektroodid on valmistatud platinast.

**Diafragma generaatorelektroodi** korral on mõõterakus vaid üks reagent, mis muudab süsteemi kasutamise lihtsamaks. Diafragma süsteem saavutab kiiremini tööseisundi,

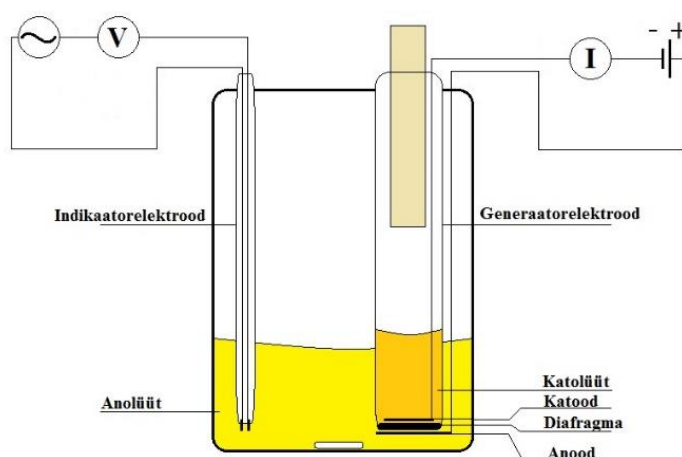
---

<sup>2</sup> KI lahustes saab joodi genereerida 99.9999+ % efektiivsusega. [9]

lühendades seeläbi analüüsidele kuluvat aega. Generaatorelektroodi katoodi- ja anoodiruumid ei ole füüsiliselt eraldatud. Diafragma ülesannet täidab joodi genereerimise ajal katoodile tekkiv gaasilise vesiniku kiht. Tootjate sõnul välistab elektrodide spetsiaalne kuju joodi katoodil tagasi jodiidiks redutseerumise. Katseliselt on kindlaks tehtud, et absoluutset kaitset joodi tagasi redutseerumise eest selline lahendus siiski ei paku. [11] Süstemaatiline hälve on suurusjärgus 10 µg [12] ning kui analüüsitakse kõrgema veesisaldusega proove ei ole selle süstemaatilise hälbe mõju väga suur. Väga madalaid veesisaldusi mõõtes aga toob see kaasa tulemuste süstemaatilise kõrgenemise kuni mõne protsendi ulatuses. [13] [14]

**Diafragmaga generaatorelektroodi** korral on mõõterakus ning generaatorelektroodi katoodiruumis erinevad reagentid. Generaatorelektroodi anood ja katood on füüsiliselt eraldatud diafragmaga. Diafragma on poorne keraamiline plaat, mis takistab lahuste segunemist, võimaldades samal ajal ionidel liikuda ühest lahusest teise. Kui süsteem on pikemat aega kasutamata seisnud, kulub tööseisundi saavutamiseks mitmeid tunde. See on põhjustatud diafragma poorsele pinnale aja jooksul adsorbeeruvast niiskusest ja selle niiskuse desorptsioon ning difusioon anolüüti võtab aega. Samuti on süsteemi puhastamine aeganõudev. Kuna aga anood ja katood on üksteisest eraldatud, on välistatud joodi tagasi redutseerumine ja sellega on tagatud kõrgeim võimalik täpsus. Kasutades sobivaid reagente on võimalik analüüsida ka selliseid lahuseid, mis sisaldavad aineid, mis traditsiooniliselt ei võimalda edukat KF tiitrimist. Näiteks ketoonid ja aldehüüdid reageerivad metanooliga, kusjuures reaktsiooni üheks saaduseks on vesi. Selle reaktsiooni vältimiseks kasutatakse madalama reaktsioonivõimega alkohole, näiteks metoksüetanool või glükoetereid. [1]

*Joonis 1. Diafragmaga generaatorelektroodiga mõõteraku skeem.*





## 1.4 Lõpp-punkti määramise viisid

Kui Karl Fischer meetodi välja töötas oli tal tiitrimise lõpp-punkti võimalik määrata vaid visuaalselt. Kuigi sel viisil on võimalik tööd teha, nõuab see eksperimentaatorilt väga suurt vilumust. Lõpp-punkti saabudes hakkab lahus reageerimata joodi tõttu kollakaks värvuma, kusjuures värvus tekib järk-järgult ning analüüsi lõpp-punktile vastav värvus sõltub kasutatavatest lahustitest. Protoonsetes (näiteks metanool) ja aprotoonsetes (näiteks kloroform) lahustites on lõpp-punkti värvus erinev. Selle tõttu on visuaalse lõpp-punkti määramise korral meetodikat keeruline automatiseerida. [1]

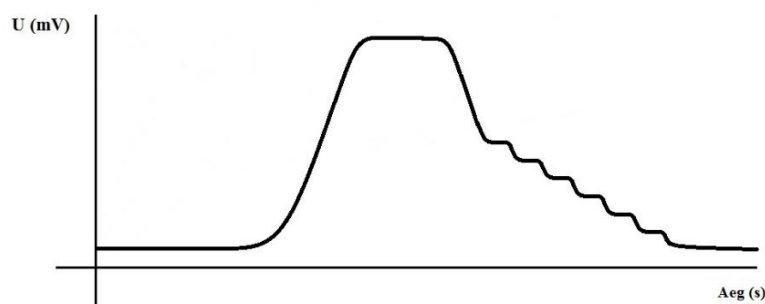
Vahepealsel ajal on elektrokeemilised meetodid jõudsalt arenenud ning KF tiitrimisel kasutatakse kõige laiemalt kahest plaatinaelektroodist koosnevat indikaatorelektroodide paari. Kasutatakse ka kahe platinast rõngaselektroodiga indikaatorelektroodisüsteeme. KF tiitrimisel kasutatakse kahte elektromeetrilist lõpp-punkti määramise viisi. [1]

**Amperomeetriline meetod**, indikaatorelektroodidele rakendatakse konstantne pinge ning selle tulemusel elektrodipaari läbivat voolutugevust mõõdetakse. Kummalgi elektroodil kulgeb elektrokeemiline reaktsioon. Katoodreaktsiooni esitab võrrand 7, anoodreaktsiooni esitab võrrand 8. Analüüsi alguses on reaktsioonikeskkonnas väga vähe joodi ning elektroode läbib minimaalne vool. Kui vesi on ära tiitritud, siis vaba joodi tekkimisel reaktsioonikeskkonda voolutugevus kasvab järsult ning see hetk loetakse tiitrimise lõpp-punktiks. Seda meetodit kasutatakse peamiselt jodomeetrilistel tiitrimistel vesikeskkonnas. [1]



**Voltmeetriline meetod**, indikaatorelektroodide vahel hoitakse väikest, konstantset alalis- või vahelduvvoolu. Mõõtmiste ajal varieerub elektroodide potentsiaalide vahe, mida siis mõõdetakse. Kuna vahelduvvoolu kasutamisel on meetod tundlikum, kui alalisvoolu kasutamisel, siis KF tiitrimisel kasutatakse peaaegjalikult vahelduvvoolu. Voltmeetrilise meetodi korral on muutused tiitrimisgraafikul suuremad ja hüpe on kõrgem. Seetõttu eelistatakse praktikas just seda meetodit. Joonis 2 esitab sellisel meetodil saadud tiitrimisgraafikut. [1]

Joonis 2. Tiitrimisgraafik voltmeetrilisel tiitrimisel.



Voltmeetrilise meetodi korral määratletakse tiitrimise lõpp-punkt mingi kindla potentsiaalide vahe kaudu, mille saavutamisel reagenti lisamine mõõterakku peatatakse (või vähendatakse triivi algse väärtuseni) ning loetakse, et lõpp-punkt on saavutatud. Kui see potentsiaal on liiga madal, siis on lõpp-punkti saavutamiseks vajalik joodi ülehulk liiga suur. Kui potentsiaal on liiga kõrgeks määratud, siis tiitrimist ei saa läbi viia, sest seda potentsiaali ületab juba tiitrimise alguses tiitrimislahuses olev potentsiaal ning selle saavutamiseks ei ole vaja lahusesse genereerida või lisada vaba joodi. [1]

Elektrokeemiliste meetoditega võib kaasnedagi mingil määral ületitiitrimine, kuid see tiitrimine on tehtav siiski väga hea korduvusega. Lisaks ei ole see tundlik värviliste proovide analüüsil, mis tekitab probleeme lõpp-punkti visuaalsel määramisel. [1]

## 1.5 Kõrvalreaktsioonid

Kulonomeetrilise KF tiitrimise rakus toimuvad keemilised reaktsioonid on üsna keerulised ja tundlikud. Reaktsioonides esinevad tasakaalud omavahel konkureerivate reaktsioonide vahel. KF tiitrimisel on arvukalt erinevaid realisatsioone. Mahtanalüütilistes süsteemides kasutatakse ühe- ja kahekomponentseid reagente, kulonomeetriliste süsteemide jaoks on omad reagentid. Sellise mitmekesisuse tõttu on kaheldav ühtse reaktsioonimehhanismi olemasolu. [15] [16]

Analüüsides suuri veekoguseid ning kasutades reagente, mis sisaldavad vähemaktiivseid alkohole, võib paralleelreaktsiooni käigus moodustuda vesiniksulfit. [15] See muudab reaktsiooni stöhhiomeetriat, mis sejärel ei ole enam rangelt 1 : 1. Lisaks on täheldatud erinevusi ühe- ja kahekomponentsete reagentide vahel, mis viitab erinevate mehhanismide olemasolule. [15] Kahekomponentse reagenti korral esineb tasakaal metüülsulfiti ja vesiniksulfiti vahel. Vee liias reageerib joodiga eelistatult vesiniksulfit. Ühekomponentses reagentis tekib tasakaal alküülsulfiti ja joodi vahel varem. Tänu sellele reageerib alküülsulfit

joodiga kiiremini kui vesiniksulfit jõuab moodustuda. Tavarakenduses KF analüüsi niivõrd suurte veekoguste analüüsiks ei kasutata. [15]

Lisaks tekivad ajas joodi hüdrolüüsi produktid, reaktsioonid 9 ja 10. Selle vähendamiseks on kasutusele võetud väiksema aktiivsusega alkoholid, näiteks metoksüetanool ja dietüleen glükool monoetüül eeter. Aluselises lahuses on võimalik jodeeritud aluste moodustumine. [15] Selle tõttu on reagenti tiiter ajas ebastabiilne ja tulemuseks on reagenti kasutusaja lühenemine.



## 1.6 Proovi sisestamise meetodid

Proovi mõõterakku sisestamiseks on kaks meetodit: otsesisestus ja kuumutusmeetod.

**Otsesisestus** on kõige levinum proovi sisestamise viis. Proov süstitakse otse mõõterakku läbi septumi. Sellist meetodit on lihtne ja odav kasutada, kuna spetsiaalseid seadmeid vaja ei ole. Kogenud kasutaja suudab sellisel viisil saavutada väga hea korduvuse katsete vahel. Meetod on väga sobiv vedelate proovide jaoks, aga tahkete proovide korral on puuduseks proovi lahustamise vajadus. Mõnikord pole proovi võimalik lahustada, siis sisestatakse proov tahkel kujul otse mõõterakku ja vesi ekstraheerub mõne aja jooksul proovist. Taoline meetod on ajakulukas ning korduvused ei ole kõige paremad, kuna raku avamisel pääseb osaliselt raku ka ümbritsev õhk. Kuna mõõtelahusesse viiakse aine, mis seal ei lahustu, ei saa sama lahust hiljem enam kasutada. [1]

**Kuumutusmeetod** on välja töötatud, et lahendada tahkete ning tiitrimiskeskonnas mitte lahustuvate proovide otsesisestusel tekkivad probleemid. Otsesisestuse korral viiakse mõõterakku kogu proov, mis toob kaasa kõrvalreaktsioonide toimumise võimaluse ehk siis võib olla häiritud selektiivsus. See on eriti problemaatiline ravimitööstuses, kus analüüsitakse väga keerulisi ühendeid. Selle vältimiseks on välja töötatud nn. kuumutusmeetod. Proov asetatakse viaali, mis suletakse. Seejärel pannakse viaal ahju, mille temperatuur on piisav, et vabastada (aurustada ja samas ka difusioon kontsentratsiooni gradiendi tõttu gaasi faasi) vesi proovist. Vabanenud vesi kantakse gaasi (näiteks õhk või N<sub>2</sub>) vooluga mõõterakku, kasutades spetsiaalset seadet, mis puhub kuiva gaasi (nõelaga läbi septumi) viaali ning samaaegselt imeb niisket gaasi viaalist välja ja kannab raku. Taoline meetod lubab uurida tahkeid aineid ilma neid lahustamata. Lisa 3 esitab kuumutussüsteemi skeemi. **Tõrge! Ei leia viiteallikat.** Kuna mõõterakku juhitakse vaid kandegaas koos proovist lendunud komponentidega, langeb

segavate mõjude (kõrvalreaktsioonide) oht ning ühe koguse reagentiga on võimalik teha oluliselt rohkem analüüse, vähendades seeläbi süsteemi ülalpidamiskulusid. Samas tuleb kontrollida, et kasutatav gaas oleks võimalikult kuiv. Selleks juhitakse gaas läbi molekulaarsõelte, mida tuleb optimaalse tulemuse saamiseks regulaarselt vahetada. Kasutatava kandegaasi liigne veesisaldus võib kaasa tuua probleeme, näiteks kordusmõõtmiste suur erinevus või reagenti kiire ammendumine.

Kõrvalreaktsioonide toimumist täielikult siiski välistada ei saa, sest kuumutades lenduvad lisaks veele ka proovi muud lenduvad komponendid. Ilmselt olulisim oht kuumutusmeetodi juures tekib aga selliste materjalidega, mis kuumutades lagunevad, eraldades vett. Selliste ainete hulka kuuluvad näiteks kõik suhkrud ja polüsahhariidid, sealhulgas kõik tselluloosipõhised materjalid (paber, puuvill jt.). Selliste ainete analüüsimisel peab olema kuumutusrežiimi valimisel väga ettevaatlik. Soovitav on kasutada kindlasti kandegaasina keemiliselt inertset gaasi, mis ei sisalda hapnikku ja seeläbi ei oksüdeeriproovi.

Erinevad tootjad pakuvad laias spektris kuumutussüsteemidega KF titraatoreid. Mõned seadmed on manuaalseks kasutamiseks, kuhu saab korraga panna vaid ühe proovi. Teistel seadmetel on proovisisestussüsteemid, mille abil saab automaatselt analüüsida suurt arvu proove. Viimased neist võimaldavad tiitrimise automatiseerimist. [17] [18]

## **1.7 Reandid**

Kuna kasutajad analüüsivad väga erinevaid proovimaatrikseid, milles on erinev keemiline koostis ja erinevad lenduvad lisandid, on vajadus ka erinevate reagentide järele. Diafragma süsteemidele on eraldi anolüüdi ja katolüüdi lahused. Samas võib mõnel juhul kasutada diafragma süsteemi anolüüdilahust ka diafragma süsteemiga. Lisaks on tehtud edusamme reagentide ohutumaks muutmiseks. Välja on töötatud reandid, kus metanool on asendatud metoksüetanooli või mõne muu vähem lenduva alkoholiga. Lisaks on püridiin asendatud imidasooliga. Pikema süsinikahelaga alkohole kasutades ei ole reaktsiooni stõhhiomeetria enam siiski üks ühele. See tuleneb alkoholide erinevast reageerimisvõimest ja selliseid alkohole KF tiitrimisel alkoholkomponendina kasutada ei saa. Laialdaselt kasutatakse KF tiitrimist erinevate naftasaaduste veesisalduse määramiseks. Selleks, et mittepolaarsed komponendid lahustuksid, lisatakse mõõtelahusesse kloroformi. Spetsiaalsed reandid on välja töötatud ketoone ja aldehüüdi sisaldavate lahuste analüüsiks. Võimalike kõrvalreaktsioonide tõttu on nende reagentide kasutamine piiratud vaid diafragma süsteemidele. [1]

## 1.8 Mõõtemääramatus

Kuigi mõõtmist teostades soovitakse määrata tõelist väärtust, ei ole see kahjuks võimalik ning tulemusena saadakse mõõteväärtus, millele omistatakse mõõtemääramatus. Mõõtemääramatus on olemasoleva info põhjal mõõtesuurusele omistatud suuruse väärtuste hajuvust iseloomustav mittenegatiivne parameeter. Mõõtemääramatus sisaldab süstemaatilistest efektidest tulenevaid komponente, nagu parandite või etalonidele omistatud suuruse väärtustega seotud komponente, aga ka mõõtesuuruse määratluse määramatust. Sageli ei ole süstemaatilise efekti hinnanguid paranditena arvesse võetud, vaid kaasatud nendega seotud mõõtemääramatuse komponentidena. Parameetriks võib olla näiteks standardhälve, mida nimetatakse standardmääramatuseks (või selle teatud kordne), või antud kattetõenäosusega vahemiku poollaius. Mõõtemääramatus sisaldab üldjuhul palju komponente. Mõnda neist saab hinnata määramatuse A-tüüpi hindamismeetodil, mõõdiste seeriaste statistiliste jaotustega ja iseloomustada standardhälvetega. Teisi komponente, mida saab hinnata määramatuse B-tüüpi hindamismeetodil, saab samuti iseloomustada standardhälvetega, hinnatud tõenäosusjaotuste alusel, mis põhinevad kogemusel või täiendaval infol. [19]

Mõõtemääramatuse põhjused on jagatud kaheks komponendiks: niinimetatud juhuslikud ning süstemaatilised. Juhuslikeks komponentideks nimetatakse mõõtetulemuse ettearvamatut varieerumist ühe ja sama mõõtmise mitmekordsel läbiviimisel. Süstemaatiline komponent mõjutab ühe ja sama mõõtmise mitmekordsel läbiviimisel mõõtetulemust ennustataval viisil.

Üldjuhul esitatakse mõõtemääramatus laiendatud standardmääramatuse kujul, kasutades kattetegurit  $k = 2$ . Kui  $k$  on 2, siis on tõeline väärtus selle määramatusega piiritletud väärtuste vahemikus 95 %-se tõenäosusega.

Mõõtetulemuse mõõtemääramatust on võimalik hinnata või arvutada peamiselt kahe omavahel üsna erineva meetodika kohaselt: ISO GUM (lühend sõnadest: International Organization for Standardization, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ja Nordtest. [20] [21])

ISO GUM meetod eeldab kõikide tulemust mõjutavate faktorite identifitseerimist ning seejärel on vajalik nende arvuline karakteriseerimine. Arvutused viiakse läbi mõõtemudeli baasil. Kus ilmutatud suurustele leitakse mõõtemääramatuse hinnangud. Mudelis mitte ilmutatud kujul olevad tulemust mõjutavad tegurid, mis ei ole mudelis algselt ilmutatud, üritatakse tuvastada ja seejärel mudelisse lisada. Iga üksiku mõjuva faktori kindlaks tegemine on väga keeruline ja ajakulukas. Viimasest tuleneb selle meetodi puudus, kui mingit välist mõjutajat ei suudeta tuvastada või ei suudeta tema poolt avaldatavat mõju kvantitatiivselt hinnata, siis jääb see tegur

üldjuhul ka kahjuks arvestamata, mis ei tähenda samas, et selle teguri mõju millegi poolest väiksemaks või olematuks jääks. Selle meetodi puuduseks on sageli vähemal või suuremal määral alahinnatud määramatuse hinnangu saamine. [22]

Nordtesti meetod ei eelda kõikide mõju avaldavate faktorite identifitseerimist. Kõik taolised mõjutajad võetakse arvesse summaarsena. Samas ei ole sellest võimalik välja tuua iga faktori osakaalu, kuna teada on vaid nende mõjutuste summa. Praktika on näidanud, et tulenevalt süstemaatilise komponendi hindamise viisist võib Nordtesti meetod anda pigem ülehinnatud määramatuse hinnangu kui alahinnatud. Käesolevas töös on rakendatud Nordtesti lähenemist. [21] Sealjuures on korduvust ja korratavust mõjutavad parameetrid valideerimise andmetest eraldi välja ekstraheeritud. Süstemaatilise komponendi hindamiseks on kasutatud jälgitavaid gravimeetrilisi mõõtmisi.

Käesoleva töö üheks eesmärgiks on anda mõõtemääramatuse hinnang mitte ainult kasutatud süsteemile vaid analoogsetele süsteemidele laiemalt ning anda hinnang ka mõõtemääramatusele, kui on tegemist keerulisema reaalse prooviga, mis ei pruugi olla ajas stabiilne ja võib proovi ettevalmistuse käigus kas siduda või ära anda analüüti.

## **2. Eksperimentaalne osa**

### **2.1 Kasutatud aparatuur**

#### **2.1.1 Metrohm 831 KF Coulometer**

Käesolevas töös kasutati Karl Fischeri kulonomeetriliste tiitrimiste teostamiseks Šveitsis Metrohmi poolt toodetud kulonomeetrit marginumbriga 831 KF. Titraator suudab töötada nii diafragma kui ka diafragma generaatorelektroodidega. Seadme töö juhtimiseks ning meetodite loomiseks ning muutmiseks on juhtpult. Titraatori saab ühendada printeriga, et analüüsile tulemused kohe välja printida ning dokumenteerida. Standardseades tuleb proovid rakku sisestada käsitsi, kasutades selleks süstalt või juhtides rakku gaasivool. [23] Kui seadmega on ühendatud arvuti, millele on paigaldatud vajalik tarkvara (Tiamo), saab titraatori parameetreid muuta ja andmeid töödelda arvutiga.

Sellel seadmepool on mitmeid parameetreid, mida kasutajal on võimalik muuta. Tiitrimise lõpp-punkti määramist saab mõjutada muutes nii indikaatorelektroodide potentsiaali, kui tiitrimise kiirust, mille juures fikseeritakse analüüsi lõpp-punkt. Võimalik on muuta ka joodi genereerimiseks kasutatavat voolutugevust ja indikaatorelektroodidele rakendatavat voolutugevust. Lisaks on kombineeritud parameeter tiitrimise kiiruse kontrollimiseks, see sisaldab endas mitut komponenti, mille varieerimise tulemusel muutub nii tiitrimise kiirus, kui ka tiitrimisgraafikute profiil. Seadme pilt on toodud Lisas 4.

#### **2.1.2 Metrohm 874 Oven Sample Processor**

Oven Sample Processor (edaspidi nimetatud kuumutusüsteem või ahi) on automatiseeritud seade proovide ettevalmistamiseks ning kulonomeetri mõõterakku viimiseks. Käesolevas töös kasutati 831 KF titraatoriga tarkavariselt ühilduvat Metrohmi poolt toodetud seadet marginumbriga 874. Seadmepool on "rakis" kuhu saab asetada viaalid proovidega, korraga mahutab süsteem kuni 35 proovi. Masin on võimeline konditsioneerima mõõterakku ning proovisisestussüsteemi. Seade tööpehikuteks on proovi kuumutamine, et vabaneks vesi, mis edasi juhitakse kulonomeetrisse mõõterakku. Selleks on ahi, kuhu viaal prooviga langetatakse, et viia too soovitud temperatuurile ning edasi ülekandesüsteem vee juhtimiseks mõõterakku. Kuumutusüsteemi tööd kontrollitakse arvuti kaudu tarkvaraga Tiamo (vt. järgmist peatükki), kus saab kindlaks määrata analüüsitingimused, proovi koguse ning hiljem andmeid töödelda. Seadme pilt on Lisas 4.

### **2.1.3 Tiamo**

Tiamo on tarkvara, mis on välja töötatud Metrohmi poolt, et muuta oma seadmete töö automatiseerimist ning andmetöötlust lihtsamaks ja kiiremaks. Programm lubab manipuleerida seadmete parameetritega ning jälgida töö käiku reaalselt. Kui analüüs on lõpule viidud salvestatakse tulemus automaatselt andmebaasi ja kuvatakse andmed ning graafikud. Vajadusel saab programmi konfigureerida saatmaks teateid probleemidest e-mailile. Ekraanitõmmised programmist on toodud Lisas 4.

### **2.1.4 Kasutatud reagentid**

Eksperimentide läbiviimisel kasutati anolüüdina HYDRANAL Coulomat AG-Oil'i ning katolüüdina HYDRANAL Coulomat CG'd. Reagenti seisukorra jälgimisel lähtuti mõõtesüsteemi triivist ooterežiimis, vee mõõterakku difundeerumise kiirusest ajas. Otsesisestusel loeti rahuldavaks triivi väärtuseks alla 10 µg/min, heaks alla 5 µg/min. Kuumutussüsteemiga olid vastavad väärtused 20 µg/min ja 10 µg/min. Juhul, kui reagent oli vananenud, vahetati korraga nii anolüüt kui ka katolüüt. Täpsem kirjeldus on toodud Lisas 5.

### **2.1.5 Gravimeetriline standardlahus**

Nii kulonomeetri, kui kuumutussüsteemi parameetrite valideerimiseks kasutati peamiselt gravimeetrilist standardlahust (edaspidi nimetatud standardlahus), mille veesisaldus on jälgitav ja väga madala mõõtemääramatusega. Kulonomeetri parameetrite valideerimisel sisestati proov mõõterakku süstla abil ning proovi kogus arvutati lahusega ning tühja süstla masside vahest. Kuumutussüsteemi valideerimisel lisati lahus eelnevalt suletud viaali süstla abil. Standardlahuse valmistamiseks segati omavahel kokku LC puhtusega metanool ning MilliQ vesi, valmistamise eeskiri on toodud Lisas 6. Lisaks standardlahusele villiti teise samasugusesse pudelisse puhas metanool. Viimast kasutati metanoolist endast tuleneva veesisalduse arvesse võtmiseks. Mõlemat lahust valmistati ligikaudu üks liiter. Suurema koguse korral on väikeste fluktuatsioonide (nt. võimalik vee sisseimbumine läbi korgi) mõju summaarsele veesisaldusele väiksem. Analüüside vahel hoiti nii standardlahust kui puhast metanooli kuivboksis. Igal mõõtepäeval määrati puhta metanooli veesisaldus uuesti ning selle suhtes arvutati standardlahuse referentsväärtus konkreetsetel päeval. Otsesisestuseks kasutati üldiselt 5 ml mahuga süstlaid Braun, mis olid varustatud tihendiga ning piisavalt pika nõelaga, et proov lisada otse mõõtelahusesse vältimaks võimalikke kadusid. Enne analüüsi lasti kuumutussüsteemi klaasviaalidel ja korkidel tasakaalustuda vähemalt 24 tundi. Kõikides mõõteseriates titraatori parameetrite valideerimisel on teostatud vähemalt 8 paralleelmõõtmist ning kuumutussüsteemi parameetrite valideerimisel vähemalt 3 paralleelmõõtmist. Lisaks arvutati selle töö käigus välja



ka gravimeetrilise standardlahuse mõõtemääramatus. Saadud tulemus on väga väike ning lõpptulemusele täheldatavat mõju ei avalda.

## 2.2 Mõõtesüsteemi parameetrite valideerimine

Mõõtesüsteemi erinevate parameetrite mõju välja selgitamiseks jagati süsteem kaheks osaks. Esimene osa on titraator ise ning teine osa on kuumutussüsteem. Mõlema osa valideerimisel võeti referentspunktiks süsteemide vaikeseaded. Nendest lähtudes varieeriti parameetreid vastavalt süsteemide võimekusele.

### 2.2.1 Titraatori parameetrite valideerimine

Varieeriti järgmiseid titraatori parameetreid: polaristasioonivoolu tugevus, tiitrimise kiirus, mõõtepunktide tihedus, lõpp-punkti määramine tiitrimise kiiruse ning lõpp-punkti määramine indikaatorelektroodi potentsiaali alusel. Katsetes kasutati alati diafragma generaatorelektroodi mille korral on eelistatud joodi genereerimiseks kasutatava voolutugevuse automaatne seadistamine. Süsteem kasutab väärtuseid 0, 100, 200 ja 400 mA. Kuna protsess on analüüsi käigus automaatne, siis seda väärtust eraldi ei varieeritud. Küll aga on selle väärtuse varieerimine hõlmatud tiitrimise kiiruse varieerimises. Nimetatud katsete käigus on varieeritud koos teiste parameetritega ka joodi genereerimise voolutugevust.

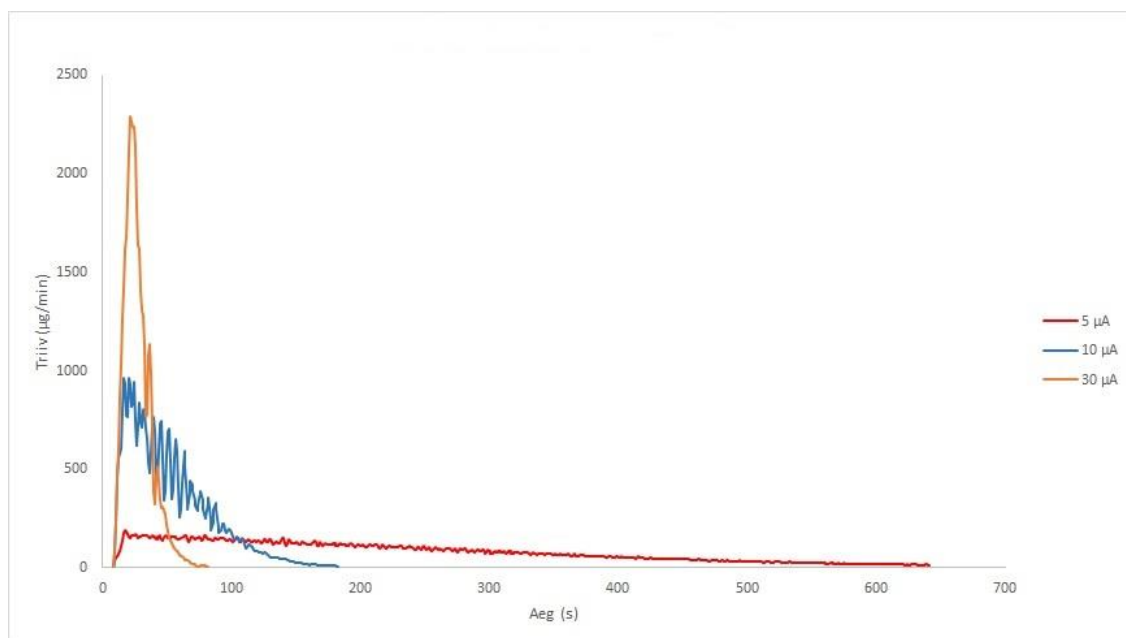
Kõikide parameetrite valideerimisel kasutati ühte standardlahust.

**Polarisatsioonivoolu tugevus** on reaalne vahelduvvoolu tugevus, mida rakendatakse kahele plaatinale indikaatorelektroodile. Süsteemis saab määrata kindla polarisatsioonivoolu tugevuse väärtuse, mida seade mõõtmiste ajal hoiab. Selleks, et hoida kindlat voolutugevust peab süsteem tiitrimise käigus järk-järgult muutma elektrodide vahelist potentsiaalide vahet, kusjuures lõpp-punkti saabumisel kasvab etteantud voolutugevuse hoidmise jaoks vajalik potentsiaalide vahe hüppeliselt ning seda kasutatakse lõpp-punkti määramiseks ja nimetatakse voltmeetriliseks meetodiks. Varieerimisel kasutati voolutugevusi: 5  $\mu\text{A}$ , 10  $\mu\text{A}$  ja 30  $\mu\text{A}$ . Kõikidest varieeritud titraatori parameetritest avaldas nende muutmine kõige suuremat mõju. Nimelt on tiitrimise maksimaalne kiirus 30  $\mu\text{A}$  korral ligi 10 korda suurem kui 5  $\mu\text{A}$  polaristasiooni voolutugevuse korral. Sellest tulenevalt on ka 5  $\mu\text{A}$  korral tiitrimise aeg umbes 7 korda pikem. Pikem tiitrimise aeg toob kaasa mõõtmistulemuste kõrgema standardhälbe. Põhjuseks on triivi ebastabiilsus ajas, mida pikem on tiitrimise aeg seda enam suhteline mõju kasvab tulemusele). Tabel 1 esitab saadud tulemused. Titraatori tiitrimiste profiilide erinevus tulid selgelt välja ka tiitrimise graafikutelt (Joonis 3).

Tabel 1. Indikaatorelektroodi polarisatsioonivoolu tugevuse varieerimise mõju veesisalduse määramisele. Kõik tulemused on saadud 7 mõõtmise keskmisena.

	Polarisatsioon (μA)	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Tiitrimise aeg (s)	Maksimaalne tiitrimise kiirus (μg/min)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
Mõõteseeria I	10	5150	34	201	966	5145	5	0.09
	30	5139	12	104	2241	5145	6	-0.11
Mõõteseeria II	10	5149	17	242	893	5145	4	0.08
	5	5032	58	697	188	5145	113	-2.24

Joonis 3. Tiitrimise graafikud erinevate indikaatorelektroodi polarisatsioonivoolu tugevustel



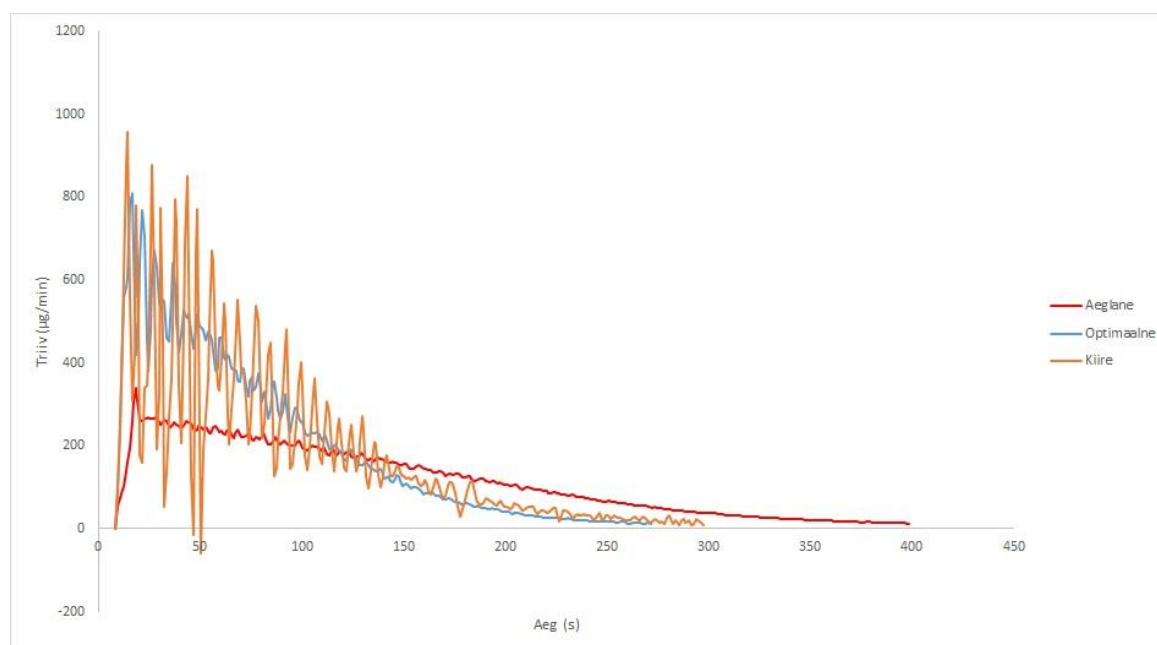
Parameeter „tiitrimise kiirus“ (graafikutel nimetatud „triiv μg/min“) määrab ära, milline on maksimaalne tiitrimise kiirus (maksimaalne generaatorelektroodile rakendatav voolutugevus) ja milline on minimaalne tiitrimise kiirus. Lisaks määrab see parameeter, millise indikaatorelektroodide vahelise potentsiaalide vahe juures rakendub minimaalne tiitrimise kiirus. Titratoril on kolm sisseehitatud seadistust: „aeglane“ (slow), „optimaalne“ (optimal) ja „kiire“ (fast). Valideerimise eksperimentides kasutati kõiki kolme seadet. Eelnimetatud parameetreid on võimalik ka käsitsi määrata, kuid sellisel juhul paisuks töö maht väga suureks. Erinevate seadete korral mõõtetulemustes suuri erinevusi ei esinenud. Seeriavahelised tulemuste erinevused jäävad seeriasiseste standardhälvete piiridesse. Selgelt eristusid seeriad vaid standardhälvete ja tiitrimise aegade poolest. Mõlemad olid suurimad „aeglase“ tiitrimiskiiruse kasutamisel. Tiitrimise ajad „optimaalne“ ja „kiire“ tiitrimiskiiruse korral olid väga sarnased.

„Kiire“ tiitrimiskiirus peaks tagama kiireima analüüsi, kuid praktikas see nii ei olnud. Põhjuseks võib olla tiitrimise kiiruse märkimisväärne ebastabiilsus, kui kasutada tiitrimise režiimi „kiire“. Tabel 2 esitab nimetatud analüüside tulemused. Tiitrimise graafikud erinevaid seadeid kasutades on toodud Joonisel 4. Saadud tulemuste põhjal on alust väita, et kolmest võimalikust tiitrimise kiirusest on „optimaalne“ tavakasutuseks kõige sobivam. Tavakasutuse all on silmas peetud olukorda, kus proovis olev absoluutne vee kogus on umbes 1000 µg. Teised tiitrimise kiirused võivad olla sobivad mõnes spetsiifilisemas olukorras. Seade „aeglane“ sobib juhtudeks, kui vee absoluutne kogus proovis on väga väike, joodi genereerimise kiirus on piiratud ning oht ületitrimiseks on väiksem. Seade „kiire“ aitab hoida tiitrimisaegu lühematena, kui absoluutne veekogus proovis on väga suur, üle 10 mg või on muul põhjusel oluline, et tiitrimine toimuks kiiresti (näiteks võimalikud reaktsioonid proovis, mille käigus tekib vett).

Tabel 2. Tiitrimise kiiruse varieerimise tulemused.

Tiitrimise kiirus	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Tiitrimise aeg(s)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
"Aeglane"	5140	45	443	5135	5	0.10
"Optimaalne"	5153	22	284	5135	18	0.35
"Kiire"	5152	36	304	5135	17	0.32

Joonis 4. Tiitrimise graafikud erinevate tiitrimise kiirustega.



Mõõtepunktide tiheduse juures varieeriti andmepunktide tihedust ajas. Antud süsteemi minimaalne aeg kahe mõõtepunkti vahel on 1 sekund. Lisaks viidi mõõtmisi läbi intervalliga 2 ja 3 sekundit. Süsteemi poolt võimaldatud minimaalne aeg tekitas kahtlusi. Nimelt on

elektrokeemilise reaktsiooni jaoks üks sekund väga pikk aeg. Seetõttu uuriti tootjalt, milline on titraatori töösükkel. Selgus, et see parameeter muudab ajaakent, mille jooksul teeb süsteem läbi mitu erinevat operatsiooni. Süsteemi toimimise kirjeldus etappide kaupa on ära toodud Lisas 7. Saadud tulemused viitavad sellele, et selle parameetri varieerimine mõõtetulemustele olulist mõju ei avalda. Tabel 3 koondab antud katsete tulemused.

*Tabel 3. Mõõtepunktide tiheduse varieerimise katsete tulemused.*

Aeg mõõtepunktide vahel (s)	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Tiitrimise aeg (s)	Referentsisaldus (mg/kg)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
1	5142	17	114	5141	1	0.03
2	5161	19	140	5141	21	0.41
3	5159	15	126	5141	19	0.36

Lõpp-punkti määramine tiitrimise lõpus toimub indikaatorelektroodide vahelise potentsiaalide vahe muutust ja joodi genereerimise kiirust jälgides. Viimasel neist on kaks võimalikku seadet: suhteline ning absoluutne triiv. Triivina on siin nimetatud indikaatorelektroodi poolt mõõdetud vee tegelikku või näilist difusiooni kiirust raku antud ühikuga  $\mu\text{g}/\text{min}$ . Suhtelise triivi korral fikseerib titraator mõõtmise alguses algse triivi väärtuse, nn. baastriivi, mis tuleneb õhust (atmosfäärist) vee difundeerumisest mõõterakku ning võtab selle nullpunktiks. Suhtelise triivi väärtus liidetakse sellele algsele väärtusele ning analüüsi lõpetamiseks peab triiv langema allapoole nende väärtuste summat. Absoluutse triivi korral ei võeta algset triivi väärtust arvesse ning analüüsi lõpetamiseks peab triivi väärtus langema alla sisestatud absoluutse triivi väärtust. Tootja soovib kasutada lõpp-punkti määramiseks suhtelist triivi. Selle põhjuseks on see, et siis mõõtesüsteem realselt jälgib ja arvestab algset triivi väärtust mis võib olenevalt seadetest, raku õhutihedusest, reagentidest, niiskuse realsest väärtusest õhus ning kandegaasi kuivusest olla väga erinev. Tavakasutuse jaoks on aktsepteeritavaks baastriiviks  $\sim 20 \mu\text{g}/\text{min}$ . Kui sellise baastriivi juures määrata lõpp-punktiks absoluutne triiv  $10 \mu\text{g}/\text{min}$ , siis süsteem seda tõenäoliselt mõistliku aja jooksul ei saavuta. Käesoleva töö raames on reagenti vahetatud ning raku puhastatud lühema intervalliga, kui tavakasutuses ning vastuvõetavaks baastriiviks on  $\sim 10 \mu\text{g}/\text{min}$ . Mõõtmisi teostati nii absoluutse kui suhtelise triivi seadega, esimese seeria tulemused viitasid, et absoluutne triiv on madalate veesisalduste määramiseks sobivam. Seetõttu korrati katset, mis kinnitas esmaseid järeldusi. Saadud tulemusi kajastab Tabel 4.

Tabel 4. Lõpp-punkti määramine absoluutse ja suhtelise triivi alusel.

Lõpp-punkti määramise alus	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Algne triiv ( $\mu\text{g}/\text{min}$ )	Tiitrimise aeg (s)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
Suhteline triiv $5 \mu\text{g}/\text{min}$	5086	32	6	151	5132	-46	-0.90
Suhteline triiv $5 \mu\text{g}/\text{min}$	4824	8	2	180	4802	22	0.46
Absoluutne triiv $5 \mu\text{g}/\text{min}$	5129	16	6	208	5132	-3	-0.06
Absoluutne triiv $5 \mu\text{g}/\text{min}$	4815	7	2	200	4802	13	0.15

Kui lõpp-punkti määratakse voltmeetrilise meetodiga, siis saab süsteemile ette anda indikaatorelektroodi potentsiaali, mille saavutamisel loetakse tiitrimine lõppenuks. Seda parameetrit varieeriti kolme erineva väärtuse 40 mV, 50 mV ja 60 mV vahel. Selle parameetri erinevate väärtuste korral ei täheldatud tiitrimistulemustes olulisi erinevusi. Ainsaks silmapaistvaks muutuseks oli pikem tiitrimise aeg, kui lõpp-punkti potentsiaaliks fikseeriti 60 mV. Saadud tulemusi kajastab Tabel 5.

Tabel 5. Mõõtetulemused määrares lõpp-punkti indikaatorelektroodi potentsiaali alusel ning kasutades erinevaid lõpp-punkti kriteeriumi väärtusi.

Lõpp-punkti kriteerium (mV)	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Tiitrimise aeg (s)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
50	5129	29	171	5132	-3	-0.06
40	5142	20	177	5132	10	0.20
60	5139	23	244	5132	7	0.14

## 2.2.2 Kuumutussüsteemi valideerimine

Kuumutussüsteemil on võimalik varieerida ahju temperatuuri ning kandegaasi voolukiirust. Ahju skeem on toodud Lisas 3. Titraatori parameetrite juures on võimalik rakendada ühest lähenemist, suurem osa proovidest on lahuse kujul ning segunemine mõõterakus ei võta kuigi kaua aega. Sama lähenemist ei ole kuumutussüsteemi juures mõlemale parameetrile mõistlik rakendada, sest analüüsiks sobiv ahju temperatuur on tugevalt sõltuv uuritava proovi omadustest. Ühele proovile sobiv temperatuur võib teisele olla kas liiga madal või liiga kõrge. Seega tuleb optimaalne ahju temperatuur iga proovi jaoks eraldi määrata. Detailsema meetodi arendamise juhend on esitatud Lisas 8. Kandegaasi voolukiirus määrab ära, kui suur hulk kuiva kandegaasi juhatakse ajahikus mõõterakku. Seadme tootja andis selle parameetri kohta vaid

soovitusliku väärtuste vahemiku: 40 ml/min kuni 60 ml/min. Eksperimentides kandegaasi voolukiiruse mõju väljaselgitamiseks lähtuti nendest väärtustest. Katseseeriad viidi läbi kandegaasi voolukiirustega 40 ml/min, 50 ml/min ja 60 ml/min. Proovideks valiti standardlahus (vt. peatükk 2.1 Kasutatud aparaat), üheprotsendilise veesisaldusega standardaine (vt. Lisa 9**Tõrge! Ei leia viiteallikat.**) ja alfa-D-laktoosi monohüdraat veesisaldusega umbes 5% (vt. Lisa 9). Kõikide proovide mõõteseriade tulemused on üldjoontes kokkulangevad. Suurim erinevus referents veesisaldusest saadi madalaima kandegaasi voolukiirusega. Keskmise voolukiirusega olid erinevused paar korda väiksemad ning omavahel küllalt sarnased. Ühe protsendilise veesisaldusega referentsmaterjaliga oli suurima voolukiiruse korral erinevus arvutuslikust ligilähedane keskmise kandegaasi voolukiirusega seeria omale. Samas standardlahuse korral on suurima voolukiiruse korral erinevus minimaalne. See võib tuleneda proovide erinevast olekust. Tabelid 6, 7 ja 8 esitavad nende katsete tulemused.

*Tabel 6. Kandegaasi voolukiiruse varieerimine, proov: ühe protsendilise veesisaldusega referentsmaterjal.*

Proov: 1% CRM Kandegaasi voolukiirus (ml/min)	Veesisaldus (mg/kg)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Tiitrimisaeg (s)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
40	9617	9700	638	83	0.86
50	9675	9700	642	25	0.26
60	9674	9700	658	26	0.27

*Tabel 7. Kandegaasi voolukiiruse varieerimine, proov: alfa-D-laktoosi monohüdraat.*

Proov: alfa-D-laktoosi monohüdraat Kandegaasi voolukiirus (ml/min)	Veesisaldus (mg/kg)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Tiitrimisaeg (s)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
40	50095	49748	677	-347	0.70
50	49863	49748	586	-115	0.23
60	49744	49748	552	4	0.01

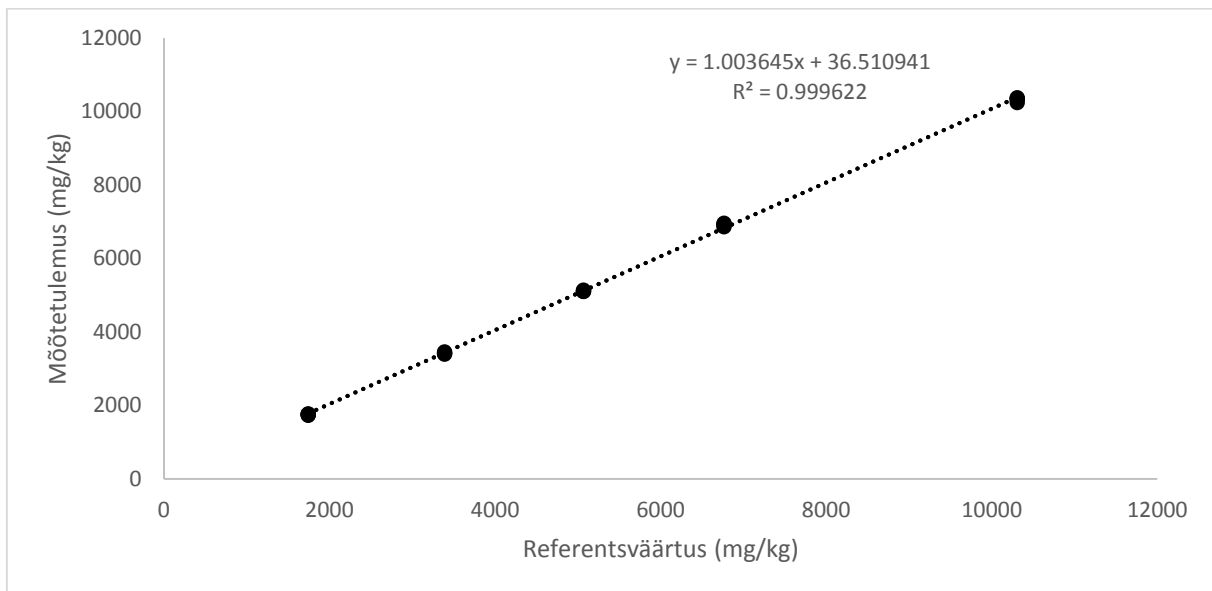
*Tabel 8. Kandegaasi voolukiiruse varieerimine, proov: standardlahus.*

Proov: standardlahus Kandegaasi voolukiirus (ml/min)	Veesisaldus (mg/kg)	Referents veesisaldus (mg/kg)	Tiitrimisaeg (s)	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
40	5243	5209	850	34	0.65
50	5220	5209	735	11	0.22
60	5305	5209	786	96	1.85

## 2.3 Lineaarsuse hindamine

Kuumutussüsteemi lineaarsuse hindamiseks teostati viiest mõõteseeriast koosnev eksperiment. Prooviks võeti standardlahus (vt. peatükk 2.1 Kasutatud aparatuur). Iga mõõteseeria koosnes kolmest - neljast sõltumatust mõõtmisest ning iga mõõteseeria teostati erineva veesisalduse juures. Saadud seeriade tulemused keskmistati ning koostati korrelatsioonigraafik telgedes mõõtetulemus vs. referents veesisaldus, Joonis 5. Lineaarsuse hindamiseks kasutati vabaliikme standardhälvet. Vabaliige on vaid 1.3 korda suurem oma standardhälbest seega võib vabaliikme lugeda nulliks. Lineaarsust iseloomustava korrelatsioonikoefitsendi ruudu väärtuseks saadi  $R^2 = 0.99991$ . Tulemustest on näha, et arvutuslik referentsväärtus ja mõõdetud veesisaldus on väga heas lineaarses korrelatsioonis.

Joonis 5. Kuumutussüsteemi lineaarsuse hindamine.



## 2.4 Avastamispiiri hindamine

Mõõtesüsteemi avastamispiiri hindamine viidi läbi kahele situatsioonile. Esimesel juhul võeti eesmärgiks anda hinnang titraatori avastamispiirile otsesisestusega ja teisel juhul kuumutussüsteemile. Otsesisestuse avastamispiiri hindamise aluseks võeti ICH<sup>3</sup> juhend, kus ühe avastamispiiri definitsioonina kasutatakse signaal – müra suhet vahemikus 2.1 – 3. KF tiitrimisel võeti müraks süsteemi baastriiv, kuna see väärtus on ajas muutuv, siis ei saa seda üheselt defineerida. Eksperimentide käigus, väga madalaid veesisaldusi mõõtes, saavutati taoline olukord momendiks, kui ära oli tiitritud 1.4 µg vett. See väärtus sõltub: mõõteraku

<sup>3</sup> International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

konditsioonist, kasutatavast meetodist ning proovist. Kuumutusüsteemiga avastamispiiri hindamiseks kasutati blank viaalide mõõtetulemusi. Analüüsid teostati ühe meetodiga 9-l erineval päeval, iga päev mõõdeti kolme blank viaali veesisaldus. Nende mõõteseriade suhteline kogutud standardhälve oli 6.6%, arvestades, et keskmine blank viaal oli veesisaldusega 38 µg, saadi kogutud standardhälveks 2.5 µg. ICH pakub ühe avastamispiiri hindamise võimalusena: 3.3 kordne tühianalüüside standardhälve jagatud kalibreerimissirge tõusuga (valem 11). [24] Seda lähenemist rakendades saadi kuumutusüsteemi avastamispiiriks 8.2 µg.

$$DL = \frac{3.3 * \sigma}{S} \quad (11)$$

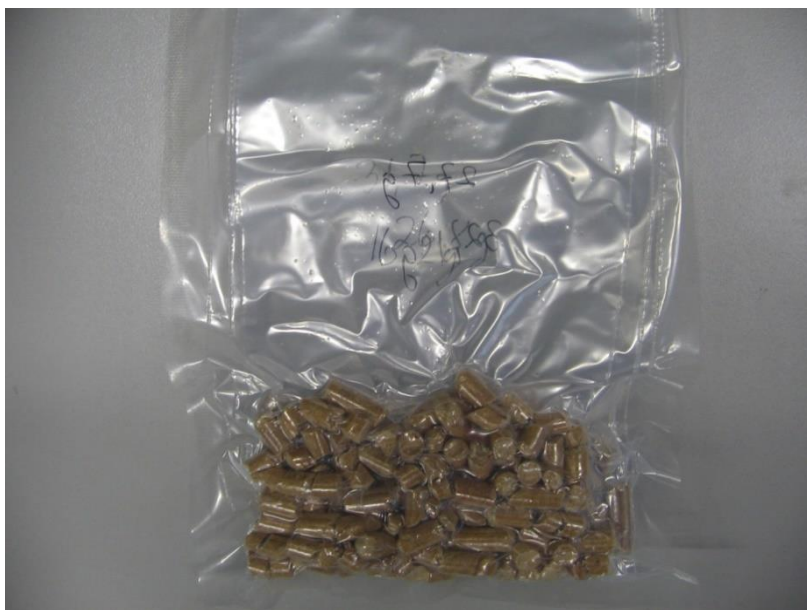
## **2.5 Metoodika väljatöötamine puitgraanulite veesisalduse määramiseks**

### **2.5.1 Proovi kirjeldus**

Proovid saadeti võrdlusmõõtmiste uuringu raames, mille korraldajaks oli Tehnologisk Institut Taanist. Proovid saabusid laborisse suletuna kilekottidesse. Kile materjaliks on LD-PE (madala tihedusega polüetüleen), koti mõõtmed on 15 cm x 25 cm ja kile paksus 0.04 mm. Iga pakend sisaldab ligikaudu 25 g proovi ning need on omakorda pakendatud kilekottides (vt. Joonis 6). Sellisest pakendist hiljem loobuti, kuna võrdlusmõõtmiste käigus selgus, et sellest pakendist difundeerub vesi intensiivselt läbi ning pakendi sees tekib puitgraanulites omakorda niiskusesisalduse ebahomogeensus. Taolise pakendi kogupindala on 0.075 m<sup>2</sup>, vee difusioon on taolise pakendi korral umbes 0.5 g-ni ööpäevas. [25] Seda kinnitasid NIR meetodiga sooritatud mõõtmised koostööpartneri Turkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastirma Kurumu (TUBITAK) laboris. Nii peenestatud kui peenestamata proovide analüüsid, mis näitasid, et graanuli pinnal on märksa vähem vett, kui graanuli sees, seega, olles pakendatud sellisesse kilesse graanulid sisuliselt kuivasid aja jooksul.



Joonis 6. Puitgraanulid pakendis.



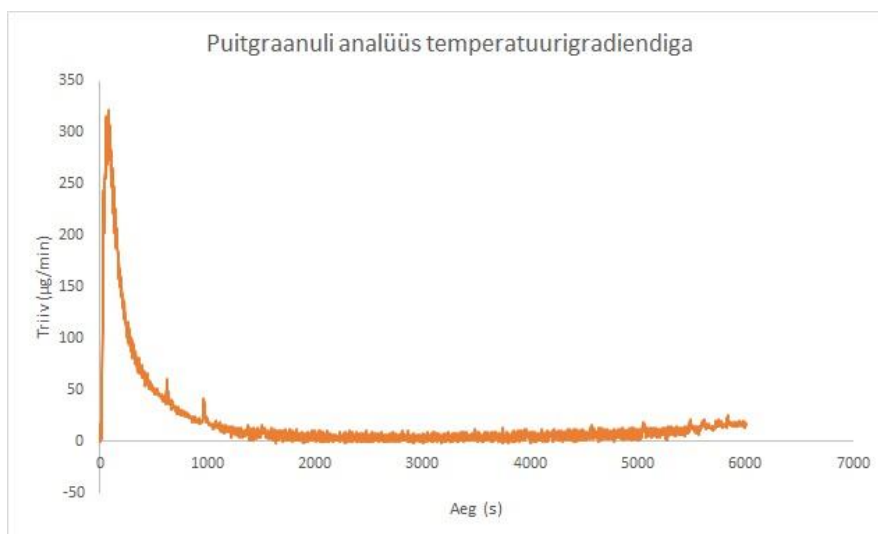
### 2.5.2 Prooviettevalmistus

Kasutatav O-cKF süsteem võimaldab analüüsida nii purustatud proovimaterjali kui ka terveid graanuleid. Loogilise arutluse teel jõuti järelduseni, et vajalik on proovi eelnev purustamine: juhul, kui analüüsida terveid graanuleid, jääb määramata osa graanuli sisemuses asuvat vett, mis ei jõua küllaltki lühikese analüüsiaja jooksul graanulist välja difundeeruda. Hilisemad tulemused projekti SIB64 METefnet koostööpartneritelt näitasid, et analüüsides purustamata proove saadi süstemaatiliselt madalamaid veesisaldusi. Võrdlusmõõtmise tulemusi kajastab Lisa 10. Käesolevas töös kasutati ühe mõõteseria tarvis ühe väikese pakendi sisu ehk ligi 25 grammi proovi. Pakendi sisu puistati uhmrisse, seejärel peenestati ning segati proovimaterjal läbi, et saavutada piisav homogeniseeritus. Prooviettevalmistus kestis ligikaudu 10 minutit. Purustamiseks võeti suurem proovikogus vähendamaks graanulite vaheliste erinevuste mõju. Pakendi eri osades olnud graanulite saastumise ulatus on tõenäoliselt erinev. Pakendi avamise hetke aeg ning suhtelise õhuniiskuse märgiti ülesse. Kaaluti ka võimalust proov purustada pakendi sees, kuid pakkematerjal osutus selle otstarbe jaoks liiga nõrgaks.

### 2.5.3 Ahju parameetrite optimeerimine

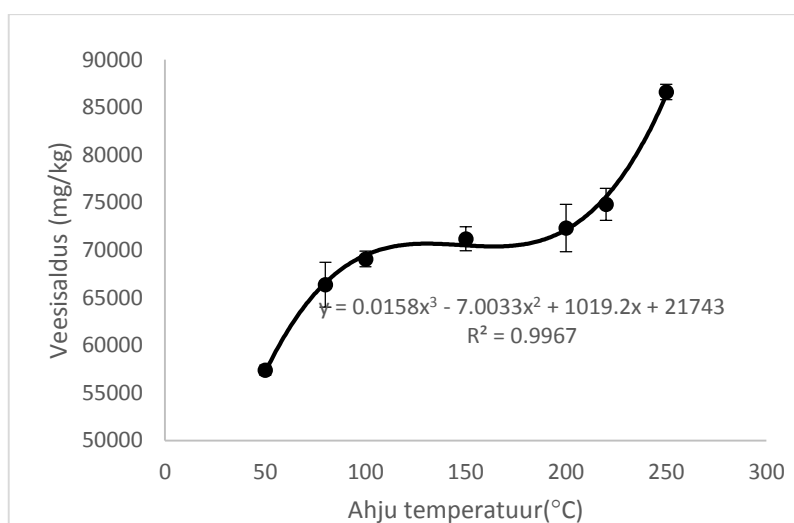
Esimese sammuna tehti proovile temperatuurigradiendiga analüüs. Analüüsi aeg oli 100 minutit ning gradiendi kiiruseks  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . temperatuurivahemikus  $50 - 250^{\circ}\text{C}$ . Suurem osa proovis olnud veest vabanes analüüsi alguses, kuid alates umbes 78-ndast minutist hakkas proovist uuesti vabanema vett, mis vastab temperatuurile ligikaudu  $210^{\circ}\text{C}$ . See viitab prooviga toimuvale võimalikule lagunemisele, mille käigus tekib vesi (Joonis 7).

Joonis 7. Temperatuurigradiendiga analüüs 50°C – 250°C, 2°C/min.

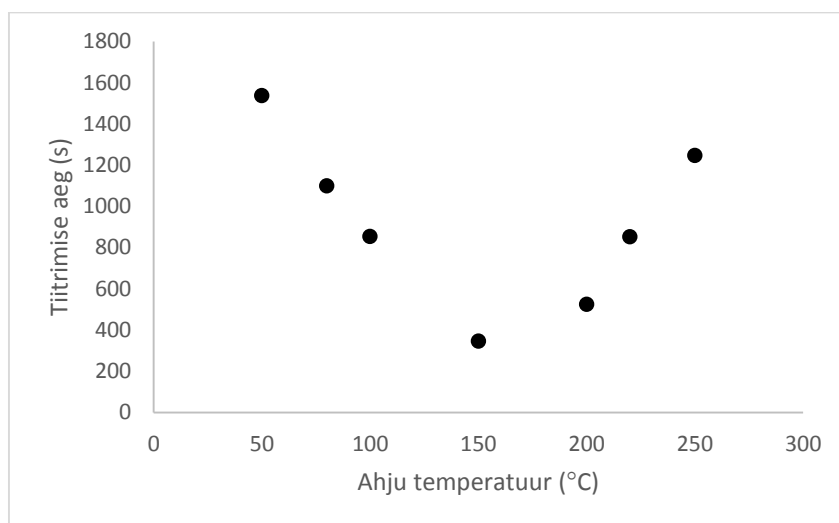


Tekkinud kahtluste kinnitamiseks teostati analüüsid real erinevatel konstantsetel temperatuuridel. Temperatuurideks valiti 50°C, 80°C, 100°C, 150°C, 200°C, 220°C ning 250°C. Selgus, et on olemas tugev seos rakendatud temperatuuri ning tulemuseks saadud veesisalduse vahel. Kõige suuremad erinevused on temperatuuride vahemikus 50°C kuni 80°C ja 220°C kuni 250°C. Temperatuurivahemikus 80°C kuni 220°C on temperatuuri mõju mõõdetud veesisaldusele väiksem. Joonis 8 kujutab leitud veesisalduse sõltuvust ahju temperatuurist. Ahju temperatuur mõjutas oluliselt ka tiitrimise aega. Madalatel ja kõrgetel temperatuuridel võttis tiitrimine oluliselt rohkem aega kui keskmistel temperatuuridel (Joonis 9).

Joonis 8. Korrelatsioon veesisalduse ning ahju temperatuuri vahel. Iga punkt on keskmine kolmest mõõtetulemusest.



Joonis 9. Korrelatsioon tiitrimise aja ning ahju temperatuuri vahel. Iga punkt on keskmine kolmest mõõtetulemusest.



Joonis 10. Erinevatel temperatuuridel analüüsitud proovid peale analüüsi läbiviimist, alustades vasakult: 50°C, 150°C, 200°C, 210°C, 220°C, 230°C, 240°C, 250°C.



Saadud tulemused viitavad järgmistele asjaoludele. Madalamatel temperatuuridel ei ole ahju temperatuur piisav, et proovis olev absorbeerunud vesi vabaneks efektiivselt: vesi vabaneb aeglaselt ja mitte täielikult. Sellele viitavad nii madalamatel temperatuuridel teostatud analüüside pikemad ajad kui ka saadud madalamad veesisaldused.

Kõrgemate temperatuuride korral on suhteliselt kõrgem veesisaldus põhjustatud proovi osalisest lagunemisest ja selle käigus vabanevast veest. [26] Sellele viitavad ka pikemad analüüside ajad: proovi lagunemine on aeglane protsess ja vesi vabaneb järk-järgult. Lisaks teostati analüüsi temperatuuridel 200°C, 210°C, 230°C ja 240°C. Analüüsitud proovide visuaalsel hindamisel (vt. Joonis 10) on selgelt näha, et alates temperatuurist 220°C on proovi värvus võrreldes algsega tumenenud, mis täiendavalt kinnitab proovi osalist lagunemist.

Lähtudes saadud tulemustest valiti puitgraanulite proovi analüüsiks ahju temperatuuriks 150°C. Sellisel temperatuuril on analüüsi aeg minimaalne (enamasti 6 – 10 minutit), mis vähendab keskkonnast tulenevate mõjutuste osakaalu mõõtetulemusele ning seeläbi vähendab ka

mõõtetulemuse mõõtemääramatust. See temperatuur piisav vee kiireks vabanemiseks ilma, et proov hakkaks lagunema.

Lisaks ahju temperatuurile fikseeriti titraatori ekstraktsiooniajaks 300 sekundit. Ekstraktsiooniaeg on parameeter, millega määratud aja jooksul ei lõpeta süsteem analüüsi ka siis kui lõpp-punkti tingimused on täidetud. See on vajalik selleks, et juhul, kui proovis olev vesi ei hakka kohe alguses vabanema (sest proov ei kuumene etteantud temperatuurini silmapilkselt), ei lõpetaks titraatori analüüsi vaid ootaks ära vee vabanemise alguse. See aeg määrati analüüsides tiitrimise graafikut 150°C juures. See aeg on piisav, et vesi jõuaks vabanema hakata olles samal ajal piisavalt lühike, et mitte muuta kogu analüüsi liiga pikaks.

#### **2.5.4 Puidu termiline lagunemine**

Puit on ehituselt keeruline segu erinevatest polümeeridest. Põhiosa puidu massist moodustavad tselluloos ning ligniin. Tselluloos laguneb temperatuurivahemikus 250°C – 400°C ning annab terava piigi termogravimeetrilisel analüüsil. Selle käigus muundub lenduvateks ühenditeks umbes 90% algsest tselluloosi massist. Ligniin laguneb kolmes etapis: esimene etapp on vahemikus 115°C – 225°C, teine etapp 225°C – 360°C ja kolmas etapp 360°C – 500°C. Ligniini muundub ligi 40% algsest polümeeri massist mittelenduvateks ühenditeks. Eelolevad andmed on saadud analüüsides kommertsiaalselt saadaval olevaid polümeere, mitte reaalseid puiduproove analüüsides. Reaalsete proovide korral lisandub asjaolu, et erinevate puiduliikidel erineb mingil määral ka nende polümeerne koostis. Sellest tulenevalt tuleb iga puiduliigi jaoks analüüsimeetodika optimeerida vastavalt proovi termilistele omadustele. Ainuüksi kolme erineva puiduliigi võrdluses erines esimese lagunemise etapi algtemperatuur kuni 50°C võrra. [26]

Puidus on vesi kolmel erineval kujul: vaba veena, seotud veena ja tselluloosi molekuli koosseisus olevad -OH ja -H rühmad. Vaba vesi aurustub ilma lisaenergiat vajamata. Seotud vesi asub väljaspool puidu struktuuri ning moodustab puidu polümeeridega keemilisi sidemeid. Seetõttu on tema vabastamiseks vaja anda talle piisavalt energiat, et side polümeeriga katkeks. Polümeeri piisavalt kuumutades hakkab see lagunema ning selles olevatest -OH ja -H rühmadest moodustub vesi. [26] Käesoleva töö raames oli eesmärgiks välja töötada meetod vaba ja seotud vee sisalduse määramiseks puitmaterjalis.

#### **2.5.5 Mõõtmiste tulemused**

Puitgraanulite veesisalduse mõõtmisel kasutati eelnevalt kirjeldatud meetodit. Iga mõõteseeria koosnes kolmest paralleelmõõtmisest. Mõõtmiste korduvus oli sedavõrd väikese arvu

paralleelmõõtmiste kohta küllaltki hea: suhteline standardhälve on suurusjärgus 0.1%. Seega oli korduvus vaid ca. 3 korda kõrgem kui standardlahusel, samas kui puitgraanulite korral on tegu reaalseste proovidega. Sellest tulenevalt esinevad proovides ebahomogeensused. Kahjuks ei ole täpset selgust, millisest puuliigist on analüüsitud proovid valmistatud, kuid sellest sõltub millise polümeerse koostisega proovimaterjal on. Tulemustest võib järeldada, et välja töötatud meetod on sobilik seda tüüpi puiduproovide veesisalduse määramiseks. Korduvusest problemaatilisem on mõõtmiste päevadevaheline korratavus. Põhjuseks on proovide ebastabiilsus ajas. Eksperimentidest järeldus, et kui ruumi õhuniiskus on umbes 20%, siis proovi veesisaldus ajas väheneb küllaltki kiiresti: kui proovi hoiti lahtiselt, siis langes veesisaldus proovis ühe tunni jooksul 7.1 g/100g-lt 6.3 g/100g-ni. Seega on lubatav proovi avamine ja lahtiselt hoidmine vaid väga lühikese aja jooksul, kuna veesisaldus on tasakaaluline ning olenevalt keskkonnast võib see kas kasvada või kahaneda.

*Tabel 9. Veesisaldus puitgraanulites.*

Kuupäev	Mõõtmiste arv	Veesisaldus (g/100g)	Standardhälve (g/100g)	Standardhälve (%)
07.01.2015	3	6.9	0.18	2.6
28.01.2015	3	7.1	0.13	1.8
29.04.2015	3	6.7	0.080	1.2
05.05.2015	3	6.7	0.044	0.66
14.05.2015	3	6.9	0.10	1.5

Eelnevaid järeldusi toetavad ka puitgraanulite proovide võrdlusemõõtmiste tulemused. Erinevates laborites (vt. Lisa 10) saadi küllalt erinevaid tulemusi. Seejuures ilmnes ka üldine tendents, et kõrgemal kuumutustemperatuuril saadi kõrgemad veesisaldused. Asetades need tulemused graafikule, mis koostati selle töö raames analüüsides proove erinevatel temperatuuridel, saadi iseloomuliku kujuga sõltuvus (Joonis 8). Analüüsides võrdlusemõõtmise tulemusi tulid välja ka antud võrdlusemõõtmise puudused:

- Proovid saadeti laboritesse ebasobivates pakendites, millest vesi saab läbi difundeeruda ja sellest tuleneb veesisalduse muutus ajas mida on raske kvantiseerida.
- Puudus üldine unifitseeritud põhimõtte proovide käsitlemise ning proovide ettevalmistamise jaoks.
- Meetodite jaoks, kus kasutatakse kõrgendatud temperatuure, ei olnud reguleeritud analüüsitemperatuur. Proovi termilisest ebastabiilsusest tulenevalt on see suur puudus.

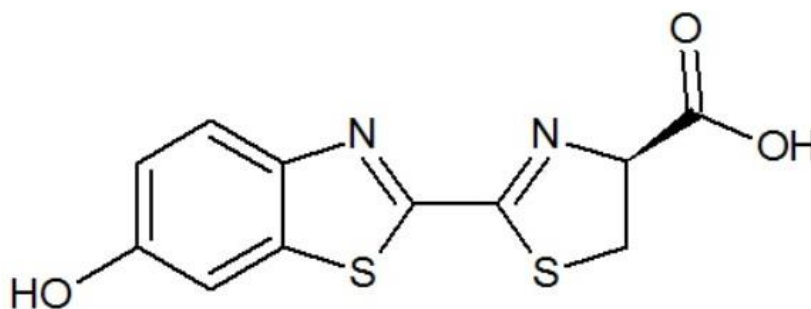
Ilmnenud probleemide valguses on võrdlusmõõtmiste korraldaja ning mõned osavõtnud laborid ilmutanud valmisolekut uue võrdlusmõõtmise läbiviimiseks.

## 2.6 Metoodika väljatöötamine D-lutsiferiini veesisalduse määramiseks

### 2.6.1 Proovi kirjeldus

D-lutsiferiini kasutatakse meditsiinis bioloogiliste protsesside uurimiseks ja biogeneetilistes uuringutes geenide kaardistamiseks. D-lutsiferiini (struktuur Joonis 11) omaduste kohta on vähe infot. Termiliste omaduste kohta on vaid CAS SciFinder`'s ennustatav sulamistemperatuur. Kuna tegu on orgaanilise ühendiga, siis on eeldatav, et mingist temperatuurist algab lagunemine. Tulenevalt OH rühma esinemisest molekulis ei saa välistada, et lagunemise käigus võib ka vett vabaneda. Erinevalt puitgraanulitest, on tegu hinnalise ainega, mistõttu on vajalik meetod välja töötada palju väiksema proovikogusega. Mõõtmistes kasutatud proov oli juba pulbri kujul, tänu millele puudus vajadus väikeseid proovi koguseid eelnevalt peenestada.

Joonis 11. D-lutsiferiini struktuur.



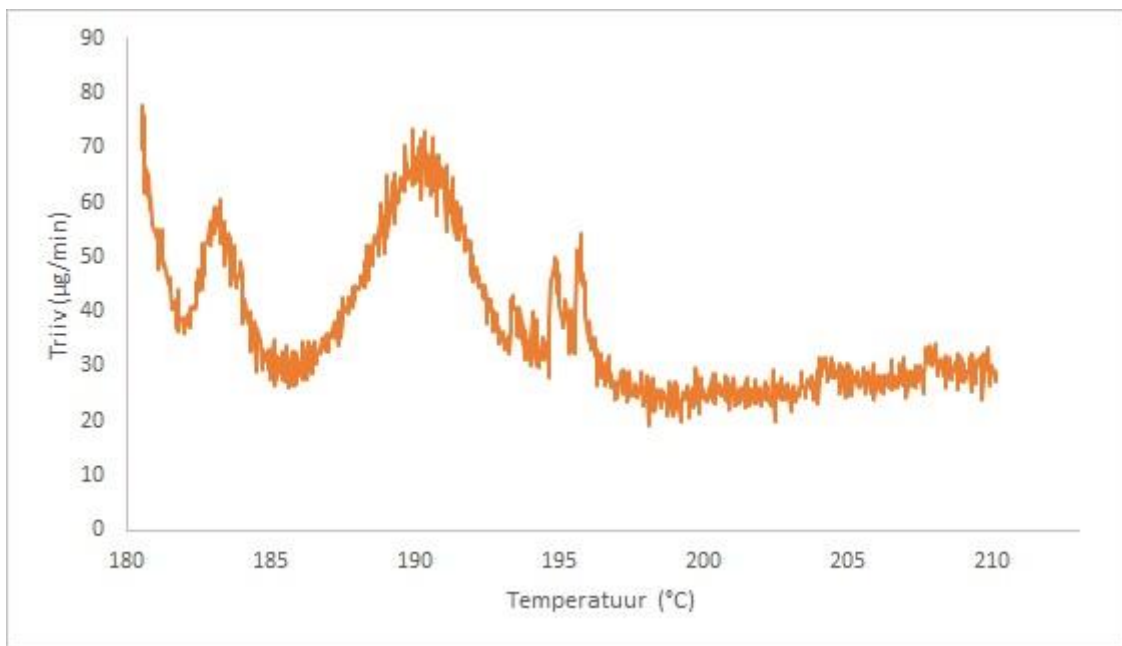
### 2.6.2 Termiliste omaduste uurimine

Eelnevalt välja toodud asjaolud tingisid selle, et proovile analüüsimetoodika väljatöötamisel tuli alustada täiesti algusest. Ehk siis rakendati tundmatu proovi meetodi arendamise eeskirja (vt. Lisa 8). Esimene analüüs tehti temperatuuriprogrammiga. Selle analüüsi eesmärgiks oli saada vastus proovi termiliste omaduste kohta: kas proov laguneb mingil temperatuuril, kas lagunemisel vabaneb vett, kas eelnevalt toimub vee vabanemine ja kui, siis millisel temperatuuril see toimub. Lisaks annab esimene analüüs ka jämeda hinnangu proovi veesisaldusele, mida järgnevates katsetes saab täpsustada kasutada sobivamaid kaalutisi. Nimelt on esimese proovi kaalutis eesmärgipäraselt väga väike – kui peaks juhtuma, et proovist vabaneb väga suurel hulgal vett, ei kulutaks see liialt palju reagendi töövõimet. Teisalt vähendab see samuti võimaliku saastumise ulatust kui proov peaks lagunema. Temperatuuriprogrammiga analüüsi tulemused viitasid selgelt kahele vee vabanemise

piirkonnale. Lisaks selgus, et kõrgematel temperatuuridel proov laguneb. Viimasega kaasnevad ilmselt mitmesugused protsessid, keemine, aurustumine, kondenseerumine, mille tulemusel saastub ahjusüsteemi proovisisestusosa. Seetõttu osutus vajalikuks proovisüsteemi lahti võtmine ning puhastamine iga kord, kui proov oli viaalis lagunenu.

Esimene temperatuuriprogramm oli vahemikus 100°C – 210°C, 5°C/min. Vee vabanemise eri etappide paremaks mõistmiseks teostati uue temperatuuriprogrammiga analüüs, mis hõlmas väiksemat temperatuurivahemikku ning kasutas aeglasemat gradienti. Analüüsi graafikult (Joonis 12) on näha, et proovil on kaks vee vabanemise etappi, esimene saavutab oma maksimumi ligikaudu 181°C juures ning teine 190°C ringis. See analüüs teostati temperatuurivahemikus 180°C kuni 210°C ning pärast analüüsi oli visuaalselt näha, et proov oli lagunenu (Joonis 15).

Joonis 12. D-lutsiferiini analüüs temperatuuriprogrammiga, 180°C - 210°C , 5°C/min.



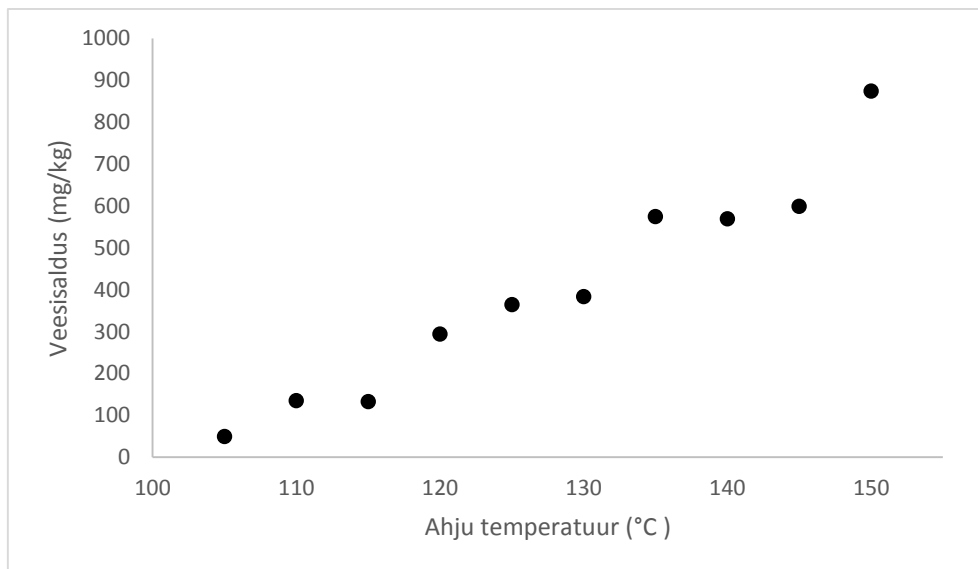
Viimane analüüs andis selgeid viiteid, milliste temperatuuride juures vesi vabaneb. Nende oletuste kinnitamiseks teostati seeria mõõtmisi konstantsel temperatuuril. Seetõttu otsustati edasi uurida hetkel käsitletava proovi omadusi ning seejärel kogutud eksperimentaalsetele andmetele tuginedes välja töötada konkreetsele proovile kohane analüüsimeetod.

Lähtudes teise temperatuuriprogrammiga analüüsi tulemustest, otsustati teha esimesed mõõtmised temperatuuridel: 181°C, 190°C ja 200°C. Lisaks tehti referentsanalüüs 105°C juures, et omada paremat võrdluspunkti. Pärast analüüsi 181°C juures selgus, et juba sellel temperatuuril toimub proovi lagunemine. Seetõttu jäeti analüüsid kahel kõrgemal temperatuuril

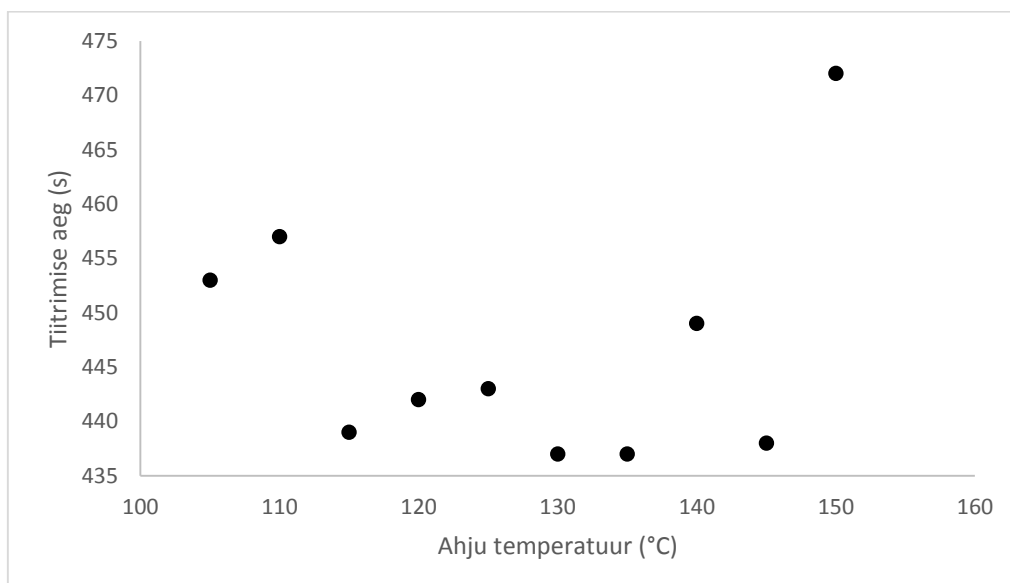
ära ning teostati need analüüsid hoopis madalamatel temperatuuridel, 150°C ja 160°C. Kaududel temperatuuridel oli proovides analüüside järel silmaga tuvastatav värvuse muutus. See omakorda viitab mingile keemilisele muutusele proovis.

Kuna analüüsil 105°C juures värvuse muutust ei täheldatud, siis teostati mõõtmised temperatuuridel 120°C ja 140°C. Neist kummalgi temperatuuril analüüsitud proovide korral ei olnud näha värvuse muutust. Seega järeldati, et keemiline muutus toimub temperatuurivahemikus 140°C – 150°C. Selle kindlamaks määratlemiseks koostati uus katseseeria temperatuurivahemikus 105°C – 150°C, tulemused on Joonis 13. Selgus, et proovi värvus muutub, alates temperatuurist 145°C, viidates keemilisele muundumisele proovis.

Joonis 13. D-lutsiferiini veesisalduse ja ahju temperatuuri korrelatsioon.

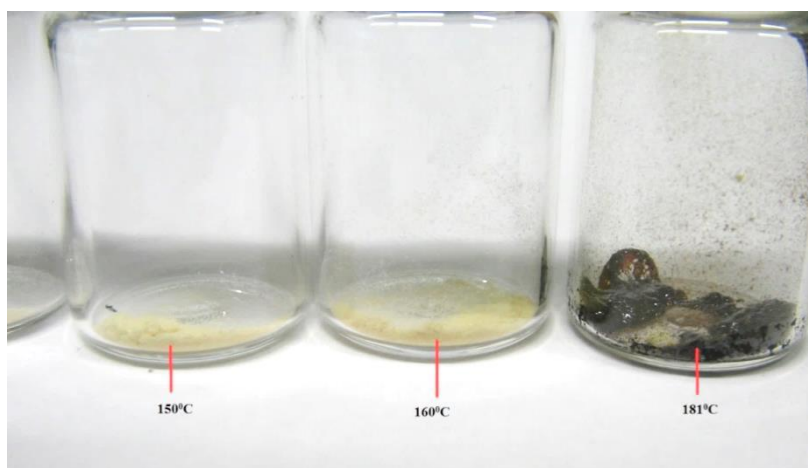


Joonis 14. D-lutsiferiin, tiitrimise aja ja temperatuuri korrelatsioon.

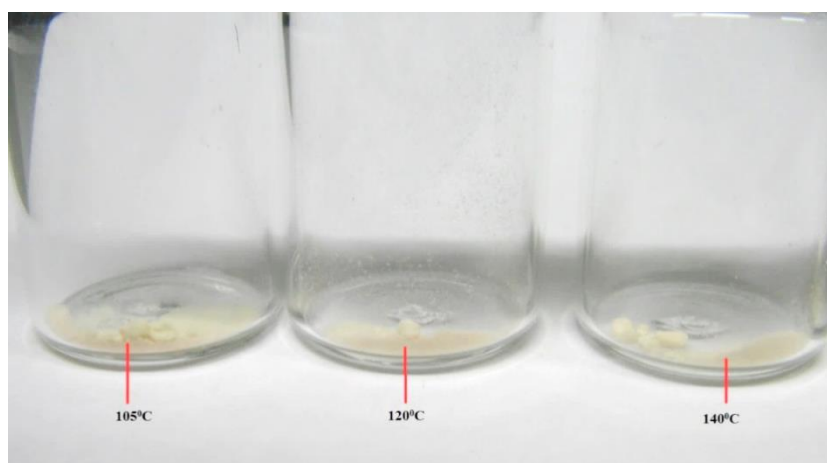




Joonis 15. D-lutsiferiin pärast analüüse temperatuuridel 150°C, 160°C ja 181°C.



Joonis 16. D-lutsiferiin pärast analüüse temperatuuridel 105°C, 120°C ja 140°C.



### 2.6.3 Analüüsimeetod ja mõõtetulemused

Eelnevatele tulemustele tuginedes valiti lutsiferiini analüüsides ahjusüsteemi temperatuuriks 140°C. Madalama temperatuuri korral vabaneb väiksem kogus vett ning kõrgema temperatuuri kasutamisel toimuvad proovis keemilised muutused. Selleks, et proov jõuaks vee vabanemiseks piisavalt soojeneda kasutati ekstraktsiooniga 300 sekundit.

Hindamaks valitud meetodi sobivust proovile viidi mõõtmised läbi kolmel päeval, iga mõõteseeria koosnes kolmest paralleelmõõtmisest. Viaalidest endast tuleneva vee hulga määramiseks kasutati igas seerias kolme tühja viaali, mis analüüsiti sama meetodiga. Tabel 10 esitab mõõtetulemused.

Tabel 10. D-lutsiferiini veesisalduse mõõtetulemused temperatuuril 140°C.

Kuupäev	Mõõtmiste arv	Veesisaldus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Standardhälve (%)
27.04.2015	3	473	9	2
29.04.2015	3	458	19	4
05.05.2015	3	525	129	25
11.05.2015	3	535	58	11
14.05.2015	3	531	64	12

Veesisaldus uuritud proovis on madal: eksperimendiseeria tulemuste aritmeetiline keskmine on 500 mg/kg vett proovis. Madalate veesisalduste jaoks oleks otstarbekas kasutada võimalikult suurt kaalutist, kuid proov on hinnaline ning see piirab analüüsiks võetavaid koguseid. D-lutsiferiini proovile leiti optimaalsetes tingimustes vähest proovi kogust kasutades analüüsimeetod ja teostati edukalt korratavuse katsed.

### 3. Mõõtemääramatuse hindamine

Töö raames teostati suur arv mõõtmisi väga erinevate proovidega ning kahe erineva proovisisestusviisiga. Tänu sellele on võimalik anda mõõtemääramatuse hinnangud erinevatele mõõtesituatsioonidele. Suur läbi viidud mõõtmiste arv erinevatel päevadel annab võimaluse iseloomustada nii süsteemi enda võimekust kui ka reaalseid olukordi, mis on seotud reaalse proovi iseärasustega. Mõõtemääramatust võib vaadata järgmise alajaotuse kohaselt. Siinkohal on toodud mõõtesituatsioonide loetelu mõõtemääramatuse kasvu järjekorras:

1. Kulonomeetrilise süsteemi enda mõõtemääramatus (kasutades väga lihtsa proovi otsesisestust mõõterakku).
2. Kulonomeetrilise süsteemi mõõtemääramatus kasutades väga lihtsas proovis vee määramiseks kuumutussüsteemi.
3. Kulonomeetrilise süsteemi mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks.
4. Kulonomeetrilise süsteemi mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks (varieeritud analüüsi meetodikad).
5. Kulonomeetrilise süsteemi mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, hõlmates lisaks erinevaid kasutatud meetodikaid ning proovi eelnevat hoidmist ja ettevalmistust erinevatel tingimustel. Ehk siis tingimused mis reaalselt eksisteerivad reaalse proovi võrdlusmõõtmistel kui ühte ja sama proovi hoitakse eelnevalt ja ka valmistatakse ette erinevatel labori keskkonnatingimustel ning mõõdetakse erinevate analüüsi programmidega erinevatel seadmetel.

#### 3.1 Mõõtemääramatuse hindamine erinevatele mõõtesituatsioonidele

Eelpool välja toodud situatsioonidele mõõtemääramatuse hindamiseks arvutati välja järgmised komponendid:

- Proovi ettevalmistuse „robustsuse“ komponent  $u(SR_s)$ . Selle arvutusliku komponendi eesmärk on anda hinnang proovi ettevalmistusele olukorras, kus proov on mingi aja (proovi ettevalmitusaeg) erinevates keskkonnatingimustes, mida võib lugeda niiskusesisalduse määramise seisukohast normaalseteks tingimusteks. Sisuliselt hõlmab see komponent endas ka proovi lühiajalist stabiilsust. Komponent arvutati kahe erineva proovi mõõtetulemustest. Proovideks valiti alfa-D-laktoosi monohüdraat ning kaltsiumoksaaladi monohüdraat. Nende proovide kasuks otsustati põhjusel, et tegu on

monohüdraatidega, mis on varemates mõõtmistes ennast näidanud küllalt stabiilsetena. Seega oli teada küllalt täpselt nende esialgne veesisaldus ning selle abil sai hõlpsasti leida keskkonna mõjutuse. Robustsuse hindamiseks varieeriti proovide hoiustamise variatsiooni erinevatel keskkonna õhuniiskustingimustel. Proove hoiti lahtiselt veidi üle tunni kolmes erinevas keskkonnas: eksikaatoris suhtelise õhuniiskusega 0%, hügrostaadis suhtelise õhuniiskusega 100% ning laboris suhtelise õhuniiskusega umbes 20%. Proovid asetati lahtiselt Petri tassidele, vältimaks olukorda, kus anuma põhjas olnud proov ei saa väliskeskkonnast mõjutatud.

- Korratavus otsesisestusega  $u(R_{cKF})$ . Korratavus arvutati standardlahuse mõõtetulemustest. Tulemused saadi titraatori parameetrite valideerimise katseseeriast, mõõtmiste referentsseeriast, mis teostati sama meetodiga ning samade süsteemi parameetritega. Saadud standardhälvetest arvutati kogutud standardhälve. Kuna kasutatud standardlahus ei ole ajas väga stabiilne, siis iga mõõteseeria eel määrati puhta metanooli veesisaldus, mida hoiti samades tingimustes. Saadud väärtusega korrigeeriti mõõtetulemust. Seetõttu kasutati arvutustes mitte 10 vaid 8 seeria tulemusi. Kahel korral ei tehtud puhta metanooli veesisalduse määramist ning korrektsuse huvides neid tulemusi selles arvutuses ei kasutatud. Selle komponendi mõõtmised teostati ühe kuu vältel.
- Korratavus kuumutussüsteemiga,  $u(R_{ocKF})$ . Algselt plaaniti kasutada selle komponendi arvutamisel nii standardlahuse kui ka üheprotsendilise veesisaldusega standardaine (CRM, Lisa 9) mõõtetulemusi. Andmeid analüüsid selgus, et standardaine tootja poolt omistatud mõõtemääramatus on niivõrd suur, et kõik mõõteseeriade keskmised mõõtetulemused jäid lubatud piiridesse. Seega arvutati see määramatuse komponent standardlahuse mõõtetulemustest. Arvutustesse kaasati eraldiseisvate ning eri aegadel valmistatud standardlahusete mõõtetulemused. Mõõteseeriad teostati ühe kuu vältel.
- Korratavus kuumutussüsteemiga analüüsid realseid proove  $u(R_{ocKF_s})$ . Selle komponendi arvutamisel tehti valik kõikidest analüüsitud proovidest. Arvutused tehti eraldi madala ja kõrge veesisaldusega proovidele. Põhjuseks on see, et madalaid veesisaldusi mõõtes on väliste tegurite mõju suurem, kui kõrgete sisalduste korral. Tulemuseks oli see, et madalatele veesisaldustele oli võimalik  $u(R_{ocKF_s})$  komponent arvutada kolme ning kõrgete veesisalduste jaoks kuue erineva proovi ruutkeskmisena. Iga prooviga tehti vähemalt kaks mõõteseariat erinevatel päevadel.

- Seadme ning meetodika robustsust hindav komponent  $u(S_{O_cKF})$ . Selle komponendi alla koondati kõikide parameetrite varieerimisel saadud mõõtetulemused. See hõlmab endas nii kulonomeetri mõõtesüsteemi parameetrite varieerimise tulemusi kui kuumutussüsteemi parameetri (kandegaasi voolukiirus) varieerimise tulemusi. Kuumutussüsteemi temperatuuri mõju siinjuures ei arvestata, kuna see parameeter on väga sõltuv proovi termilistest omadustest. Seetõttu tuleb see parameeter eksperimentaalselt määrata igale proovile eraldi.
- Proovi ekstreemsetes tingimustes hoidmise komponent  $u(S_{s\_ex})$ . Nimetatud komponent koondab enda alla nii ajas väga ebastabiilse veesisaldusega proovide mõõtetulemused kui ka selliste proovide tulemused, mida hoiti mitteoptimaalsetes tingimustes. Mitteoptimaalsete tingimuste all on mõistetud atmosfääri, kuna suhteline õhuniiskus on ajas üsna ebastabiilne. Olenevalt proovi omadustest võib tema veesisaldus atmosfääritingimustel tasakaalustudes hoidmisel ja proovi ettevalmistusel nii kasvada kui ka kahaneda. Hügrostaadis kasvab proovide veesisaldus kuni tasakaalu saavutumiseni. Selliselt määratletuna kajastab  $u(S_{s\_ex})$  olukorda, kus probleemseid proove analüüsitakse käsitsedes ja hoides neid avatult.
- Kulonomeetri mõõtesüsteemi süstemaatiline komponent  $bias_{cKF}$ , võtab arvesse KF reaktsiooni stöhhiomeetria vastavust ning voolumõõtmise ja integreerimise tõesust. Selle komponendi arvutamisel võeti arvesse erinevate seeriade standardlahuste otsesisestusega tehtud mõõtetulemused. Kokku arvestati nelja standardlahuse mõõteseeria tulemusi mis olid saadud viie kuu jooksul.
- Kuumutussüsteemi ja kulonomeetrilise mõõtesüsteemi süstemaatiline komponent  $bias_{O\_cKF}$ , võtab arvesse KF reaktsiooni stöhhiomeetria vastavust ning voolumõõtmise ja integreerimise tõesust ning lisaks ka vee KF reagenti poolt vee absorbeerimise saagist rakus tingimustel kus proovist üle/läbi juhitud kuiva lämmastikku barboteeritakse mõõterakku. See komponent arvutati standardlahuse kuumutussüsteemiga tehtud mõõteseeriade tulemustest. Arvutustes kasutatud standardlahused on valmistatud üksteisest täiesti iseseisvalt, erineval ajal ning erinevates keskkonnatingimustes. Mõõtmised teostati ka 1% CRM materjaliga. Kõik mõõtetulemused jäid standardaine referentsväärtuse laiendmõõtemääramatuse piiridesse. Seetõttu oldi selle referentsmaterjali tulemuste alusel sunnitud järelutama, et kuumutussüsteemiga kulonomeetrilise KF titraatori süstemaatiline komponent on kindlasti väiksem toodud

väärtusest. Standardlahuse mõõtmised andsid detailsemad tulemused süstemaatilise komponendi hindamiseks.

### 3.1.1 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades otsesisestust

Vastavalt Nordtesti meetodile koosneb mõõtemääramatus siin kahest komponendist: korduvus ja süstemaatiline komponent, vt. allolevat valemit nr. 12. Mõõtmised on teostatud standardlahusega (vt. peatükk 2. Eksperimentaalne osa). Arvutusmudel: standardlahuse mõõtetulemuste standardhälbe ruudule liideti kulonomeetri süstemaatilise komponendi ruut ning nende summast võeti ruutjuur. Hinnatud mõõtemääramatus näitab seda, millisel parimal võimalikul tasemel konkreetne kulonomeetriline süsteem on võimeline mõõtma (Tabel 11). Leitud mõõtemääramatus kehtib vaid lihtsate proovide korral, kui on välistatud kõik segavad mõjutajad (ebapiisav selektiivsus, vee neeldumine proovis või vee eraldumine proovist eeltötluse käigus või proovi lagunemine).

$$u_c = \sqrt{u(R_{cKF})^2 + bias_{cKF}^2} \quad (12)$$

Tabel 11. Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades otsesisestust.

Suhteline liitstandardmääramatus ja selle komponendid	
$u(R_{cKF})$	0.405%
$bias_{cKF}$	0.239%
$u_c$	0.470%

### 3.1.2 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi

Selle situatsiooni mõõtemääramatuse hindamisel kasutati kuumutussüsteemiga sooritatud gravimeetrilise standardlahuse mõõtetulemusi. (teada on veesisaldus väga madala mõõtemääramatusega) Sarnaselt eelmisele situatsioonile, oli standardlahusele võimalik kaalumisanndmetest välja arvutada referents veesisaldus. Arvutusmudel: kuumutussüsteemiga referentsproovi mõõtetulemuste standardhälbe ruudule liideti kuumutussüsteemi süstemaatilise komponendi ruut ning võeti summa ruutjuur. Saadud tulemus annab määramatuse vaid kasutatud mõõtesüsteemile ning seda vaid referentsproovi analüüsid (Tabel 12). Eelpool toodi välja, et sooviti kasutada ka üheprotsendilise veesisaldusega referentsaine (CRM) tulemusi, kuid see osutus võimatuks referentsväärtuse liiga suure mõõtemääramatuse tõttu (liitstandardmääramatus ca. 3%). Süstemaatilise komponendi arvutamisel kasutatud andmed ja valemid on toodud Lisas 11.

$$u_c = \sqrt{u(R_{OcKF})^2 + bias_{OcKF}^2} \quad (13)$$

Tabel 12. Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi.

Suhteline liitstandardmääramatus ja selle komponendid	
$u(R_{O_{cKF}})$	0.463%
$bias_{SO-cKF}$	0.551%
$u_c$	0.720%

### 3.1.3 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks

Käesolevas situatsioonis kaasati arvutustesse lisaks referentsproovidele ka reaalseid proove, millel on tihti oluliselt keerulisem proovimaatriks, kui referentsproovidel. Lisaks võivad reaalsed proovid olla ajas referentsproovidest ebastabiilsema veesisaldusega või termiliselt ebastabiilsed. Erinevalt eelnevatest situatsioonidest arvestab käesolev situatsioon ka erinevusi madala veesisaldusega proovide ning kõrge veesisaldusega proovide vahel. Nimelt jagati reaalsed proovid vastavalt nende veesisaldustele kahte gruppi. Madala veesisaldusega, kuni 1 % massist, ja kõrge veesisaldusega, üle 1 % massist. Sellest tulenevalt on selle situatsiooni mõõtemääramatus antud eraldi kõrge ja madala veesisaldusega proovidele (Tabel 13). Arvutusmudel: reaalse proovide mõõtetulemustest arvutatud standardhälvete ruutkeskmise ruudule liideti kuumutussüsteemi süstemaatilise komponendi ruut ja nende summast võeti ruutjuur:

$$u_c = \sqrt{u(R_{O_{cKF\_s}})^2 + bias_{O_{cKF}}^2} \quad (14)$$

Tabel 13. Kulonomeetri suhteline standardmääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks.

Suhteline liitstandardmääramatus ja selle komponendid		
	Madalad sisaldused	Kõrged sisaldused
$u(R_{O_{cKF\_s}})$	7.74%	1.78%
$bias_{SO-cKF}$	0.551%	0.551%
$u_c$	7.76%	1.87%

### 3.1.4 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, hõlmab lisaks kasutatud seadmele kulonomeetreid laiemalt

Uurimustöö eesmärgiks on anda mõõtemääramatuse hinnang kuumutussüsteemiga kulonomeetritele KF titraatoritele endile kui ka hinnatud koos kuumutussüsteemiga osale. Lisaks oli eesmärgiks anda mõõtemääramatuse hinnang erinevate proovide hoidmisest ja eeltötlusest tulenevate muutuste kohta. Varieerides erinevaid mõõteparameetreid on võimalik anda hinnang sisuliselt erinevate meetodikate kasutamisest tuleneva mõõtemääramatuse kasvu kohta. Selliselt püstitatud eksperimendi tingimused hõlmavad siis sisuliselt nii erinevaid titraatoreid kui ka erinevaid prooviettevalmistuse viise ning tingimusi. Selleks toodi arvutusmudelisse juurde seadme parameetrite varieerimisest tulenev komponent ning proovi ettevalmistamise robustsusest tulenev komponent. Sarnaselt eelnevale situatsioonile on ka see mõõtemääramatuse hinnang antud eraldi nii madala kui kõrge veesisaldusega proovidele (Tabel 14). Arvutusmudel: ruutjuur reaalse proovide mõõtetulemustest arvatud standardhälvete ruutkeskmise, prooviettevalmistuse robustsuse, süsteemi parameetrite varieerimise ning kuumutussüsteemiga kulonomeetri süstemaatilise komponendi ruutude summast:

$$u_c = \sqrt{u(R_{OcKF_s})^2 + u(SR_s)^2 + u(S_{OcKF})^2 + bias_{OcKF}^2} \quad (15)$$

Tabel 14. Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, hõlmates kulonomeetreid laiemalt.

Suhteline liitstandardmääramatus ja selle komponendid		
	Madalad sisaldused	Kõrged sisaldused
$u(R_{OcKF_s})$	7.74%	1.78%
$u(SR_s)$	0.439%	0.439%
$u(S_{OcKF})$	0.546%	0.546%
$bias_{SO-cKF}$	0.551%	0.551%
$u_c$	7.79%	1.99%



### 3.1.5 Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, mis hõlmab lisaks kasutatud seadmele kulonomeetreid laiemalt ning proovi hoidmist ebamõistlikel tingimustel

Reaalne olukord laboris ei ole pahatihti vastavuses optimaalsega. Reaalsetes laborites eksisteerivad sageli väga erinevad ja halvasti kontrollitud niiskustingimused, samuti ebapiisavad teadmised ja kogemused. Nendest asjaoludest võib tuleneda märkimisväärne lisa-mõõtemääramatus. Kirjeldatud situatsiooni modelleerimiseks lisati mõõtemääramatuse arvutusse komponent  $u(S_{s\_ex})$ , mis arvestab proovi ebamõistlikku hoiustamist ja eeltöötlemist. See on lahti mõtestatud olukorrana, kui proovi hoitakse pikema aja vältel (üle 24 tunni) lahtiselt väga erinevates keskkonnatingimustes. See toob kaasa veesisalduse muutuse proovis, mille suund ja suurus olenevad nii proovi algsest veesisaldusest kui ka omadustest. Kuna madala ja kõrge veesisaldusega proovide juures on väliste mõjutuste osakaal erinev, siis arvutati sellele situatsioonile mõõtemääramatus nii madala kui kõrge veesisaldusega proovide jaoks eraldi (Tabel 15). Arvutusmudel: ruutjuur reaalse proovide mõõtetulemustest arvatud standardhälvete ruutkeskmise, prooviettevalmistuse robustsuse, proovi erinevates tingimustes hoidmisest tuleneva komponendi, süsteemi parameetrite varieerimise ning kuumutussüsteemiga kulonomeetri süstemaatilise komponendi ruutude summast:

$$u_c = \sqrt{u(R_{OckF_s})^2 + u(SR_s)^2 + u(S_{s\_ex})^2 + u(S_{OckF})^2 + bias_{OckF}^2} \quad (16)$$

Tabel 15. Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks, hõlmates kulonomeetreid laiemalt, proovi hoiustamist ja ettevalmistamist.

Suhteline liitstandardmääramatus ja selle komponendid		
	Madalad sisaldused	Kõrged sisaldused
$u(R_{OckF_s})$	7.74%	1.78%
$u(SR_s)$	0.439%	0.439%
$u(S_{s\_ex})$	5.42%	2.03%
$u(S_{OckF})$	0.546%	0.546%
$bias_{O-cKF}$	0.551%	0.551%
$u_c$	9.49%	2.84%

### 3.1.6 Mõõtemääramatuse arvutamine kahele probleemsele reaalsele proovile

Käesoleva töö piiratud mahu tõttu otsustati mõõtemääramatuse arvutus eraldi välja tuua vaid kahele reaalsele proovile, kusjuures valiti probleemsed proovid: lutsiferiin ja puitgraanul. Neist esimene jääb madala veesisaldusega proovide gruppi ja teine kõrgete veesisaldustega proovide gruppi. Lutsiferiin osutus kõigist töös uuritud proovidest kõige probleemsemaks ja andis suurima suhtelise päevasise standardhälbe. Mõõtemääramatuse väljendamiseks kasutati ülal kirjeldatud situatsiooni: „Kulonomeetri mõõtemääramatus kasutades kuumutussüsteemi reaalse proovide analüüsiks“ ning nende proovide mõõtemääramatus on antud 3 mõõtmise kohta (Tabel 16). Kuna need mõõtmised tehti ühe mõõtesüsteemiga, siis on vajalik arvutusmudelisse kaasata mõlemale proovile sama seadme süstemaatiline komponent, samas korratavuse komponent  $u(R_{\text{sample}})$  arvutati kummalegi proovile eraldi:

$$u_c = \sqrt{u(R_{\text{sample}})^2 + bias_{O-cKF}^2} \quad (17)$$

Tabel 16. Mõõtemääramatuse arvutamine kahele reaalsele proovile

Komponendid		
	Lutsiferiin	Puitgraanul
$u(R_{\text{sample}})$	13.4%	1.40%
$bias_{O-cKF}$	0.551%	0.551%
$u_c$	13.4%	1.50%

## Kokkuvõte

Käesolev töö on osa projektist SIB64 METefnet (<http://www.metef.net/>), mille eesmärgiks on luua metrooloogiline tugi veesisalduse usaldusväärseks määramiseks tahketes proovides - välja töötada uusi meetodeid ning referentsmaterjale. Konkreetselt käesoleva töö eesmärgiks oli kuumutussüsteemiga kulonomeetrilise Karl Fischeri titraatori kõigi parameetrite valideerimine ning mõõtemääramatuse hindamine reaalses tahketes proovide analüüsiks. Töö tulemusena viidi läbi mõõtemääramatuse hindamine kasutades valideerimisel saadud reaalses proovide ja gravimeetriselt valmistatud standardite analüüsi tulemuste andmestikku erinevate mõõtesituatsioonide jaoks. Eksperimentaalses osas on läbi viidud ligikaudu 1000 mõõtmist 17 erineva proovimatriksiga. Kõiki projektis uuritud proove ei olnud käesolevas töös võimalik käsitleda, kuna töö oleks kujunenud kohatult mahukaks. Veesisaldused proovides varieerusid vahemikus 0.01 kuni 23 g/100g (0.01 – 23%). Valideerimise tulemusena selgus, et vaid üks titraatori parameetritest omab suuremat mõju mõõtetulemusele, selleks on indikaatorelektroodi polarisatsioonivoolu tugevus. Selle parameetri suur mõju tuleneb asjaolust, et voolutugevuse muutmine toob kaasa maksimaalse tiitrimise kiiruse olulise muutuse, mis omakorda mõjutab tiitrimise aega. Viimasest sõltub küllaltki tugevalt mõõtetulemuse korduvus ja täpsus, seda eriti, kui analüüsi aeg pikeneb üle 15 minuti. Sellisel juhul omavad keskkonna mõjutused (triivi väärtuse muutumine analüüsi käigus) suurt kaalu lõpptulemusele ning seda on raske kvantitatiivselt arvesse võtta.

Kulonomeetri suhteliseks liitstandardmääramatuseks kasutades vaid otsesisestust kujunes 0.5% mõõtetulemusest. Kasutades kuumutussüsteemi, saadi suhteliseks liitstandardmääramatuseks 0.7%, mis näitab, et kuumutussüsteemi määramatuse panus kogumääramatuse kujunemisesse ei ole suurem süsteemi enda määramatusest. Tulemustest võib järeldada, et kuumutussüsteem on insenertehniliselt hästi konstrueeritud

Kuna kuumutussüsteem sobib väga paljude proovide analüüsiks, siis erinevate reaalses proovide analüüsile anti mõõtemääramatuste hinnangud eraldi. Lisaks jagati proovid kahte gruppi: madala veesisaldusega (kuni 1 g/100g) ja kõrge veesisaldusega (rohkem, kui 1 g/100g) Madala veesisaldusega proovide korral saadi suhteliseks liitstandardmääramatuseks 7.8% ja kõrgete veesisalduste korral 1.9%.

Käesoleva töö rakendusala laiendamiseks anti mõõtemääramatuse hinnangud ka teistele sarnastele mõõtesüsteemidele, mille jaoks toodi arvutusmudelisse uus liige, mis püüab võtta arvesse parameetrite erinevusest tingitud määramatuse. Madala veesisaldusega proovide korral

saadi suhteliseks liitstandardmääramatuseks 7.8% ja kõrgete veesisaldusega proovide korral 2.0%. Lisades juurde komponendi arvestamiseks proovide hoidmist ebanõistlikes tingimustest, saadi madala ja kõrge veesisaldusega proovide korral suhtelise liitstandardmääramatuse umbkaudseteks hinnanguteks vastavalt 10% ja 3%. Need mõõtemääramatuse hinnangud iseloomustavad hästi probleemset tüüpi reaalseid proove.

Lisaks anti mõõtemääramatuse hinnangud eraldi kahele konkreetsele reaalsele proovimaatriksile. Esimene proov oli lutsiferiin, mille keskmiseks veesisalduseks saadi 0.05 g/100g ning suhteliseks liitstandardmääramatuseks sellele proovile saadi 13% (absoluutne liitstandardmääramatus: 0.007 g/100g). Teine proov oli puitgraanul keskmise veesisaldusega 6.8 g/100g, suhtelise liitstandardmääramatusega 1.5% (absoluutne liitstandardmääramatus: 0.20 g/100g).

Eksperimentide tulemusena leiti, et titraatori parameetrid omavad mõõtemääramatuse hinnangu kujunemisel küllalt suurt kaalu (olles reaalsete proovide korra kogumääramatusest kuni 10%). Reaalsete proovide korral peab kuumutussüsteemi temperatuur olema küllalt täpselt defineeritud ning see on eriti oluline selliste proovide korral, mis on termiliselt ebastabiilsed. Töö üheks väärtuslikumaks tulemuseks on detailsete eeskirjade välja töötamine puiduproovide ja lutsiferiini veesisalduse määramiseks cKF meetodiga. Puidu proovi maatriks ja samuti lutsiferiin on väga komplitseeritud, sest on veesisalduse mõttes ebastabiilsed ning liigselt kuumutamisel lagunevad vee eraldumisega.

Kui kuumutussüsteemi temperatuur välja jätta omab mõõtemääramatuse hinnangu kujunemisele kõige suuremat kaalu proov ise. Olenevalt proovi tüübist võib proovi komponent moodustada kuni 99% kogumääramatusest, mis võib tulla proovi veesisalduse ebastabiilsusest, see võib muutuda küllalt kiiresti sõltuvalt teda ümbritsevast keskkonnast. Lisaks võib probleeme tekitada proovi ebahomogeensus, mille tulemusena ei ole ühe proovi lõikes veesisaldus enam sama. Proovi omadustest tulenevat mõõtemääramatuse komponenti saab vähendada, rakendades korrektseid töövõtteid, kuid sellest hoolimata ei ole võimalik saavutada keskkonna mõjutusest vaba olukorda. Käesoleva töö tulemustest selgus, et reaalse proovi veesisalduse ebastabiilsusest tuleneb kogumääramatuse kõige suurem komponent. Kulonomeetrisel süsteemi mõõtemääramatuse osa on oluliselt väiksem. Seda kinnitavad ka võrdlusmõõtmiste tulemused. Seadmete manuaalidest saadud mõõtemääramatuse hinnangud on tühised võrreldes reaalsete proovide poolt põhjustatud mõõtemääramatusega. Puitgraanulite proovi kohta kogutud tulemused esitati ka projekti METefnet koostööpartneritele edasiseks diskussiooniks.

# **Validation of Coulometric Karl Fischer titrator with an oven system**

Rudolf Aro

## **Summary**

This thesis is part of an international project SIB64 METefnet (<http://www.metef.net/>), which aims to develop new methods and reference materials for reliable moisture content determination in solid samples. The focus of this thesis was to validate all parameters of the coulometric Karl Fischer titrator equipped with an oven and to give measurement uncertainty estimates for different analysis situations, including analysis of real samples. Around 1000 analyses with 17 different sample matrixes were made. The analysis of two samples of high practical interest and quite problematic for O-cKF method. The water content of the samples varied between 0.01 to 23 g/100g. During validation, it was found that only one parameter of the coulometric titrator had a significant influence on the result – polarization current between indicator electrodes. Changing this parameter altered the maximum speed of titration, therefore it had a strong effect on the titration times. Longer titration time has a negative impact on repeatability and accuracy, especially if the analysis takes longer than 15 minutes. In the latter case, interfering effects from the surroundings (most importantly, diffusion of water into the cell) become important and they are very difficult to quantify.

When analysing only reference samples with direct injection, a fairly low relative combined standard uncertainty of 0.5% was obtained. Interestingly, when using the oven system, the relative combined standard uncertainty was 0.7% which implies that the uncertainty originating from the oven is not bigger than that from the system itself. In the beginning of the thesis, it was expected, that the oven system will contribute more to the uncertainty. However, it seems that the oven system is well engineered.

Because the oven system can be utilized to analyse a wide variety of samples, separate measurement uncertainty estimation was carried out for the analysis of real samples. In addition, samples were divided into two groups: low water content (up to 1 g/100g) and high water content (more than 1 g/100g). A relative combined standard uncertainty of 7.8% was obtained for samples with a low water content and 1.9% with high water content.

To broaden the scope of this thesis, measurement uncertainty estimation was also carried out for other measurement systems, by including an additional uncertainty component, which takes into account differences in the parameters used. For samples with a low water content, a relative

combined standard uncertainty of 7.8% was obtained, for samples with a high water content a relative combined standard uncertainty of 2.0% was obtained. When a component that takes into account sample storage under non-optimal conditions, relative combined standard uncertainties of 9.5 % (low water content) and 2.8% (high water content) were obtained. The latter estimates characterizes very well water content instability of real samples.

Additionally, measurement uncertainty estimations were made for two samples separately. One of these was luciferin acid, which had an average water content of 0.05 g/100g, a relative standard measurement uncertainty of 13% was obtained. The second sample chosen was wood pellets, which had an average water content of 6.8 g/100g. For the latter, a relative standard measurement uncertainty of 1.5% was acquired.

It was found, that in some situations, the uncertainty component from variances in system parameters can have a significant contribution to the overall uncertainty budget (up to 10% in some cases). In addition, the temperature of the oven system must be carefully defined when analysing real samples, which becomes critical with samples that are thermally unstable. One of the most valuable outputs of this work are the detailed measurement procedures developed for moisture content determination in wood pellets and luciferin, both of which are difficult samples.

If the temperature of the oven system is excluded, the largest contributor to the uncertainty budget is the sample. Its contribution is highly dependent on the sample type and can reach up to 99% of the total uncertainty budget, as result of moisture content instability. In addition, insufficient sample homogenization can cause problems, leading to differences within the sample. The uncertainty contribution from the sample can be minimized with proper working procedures, however, a situation free from random effects cannot be achieved. It can be concluded, that the uncertainty component from sample instability is far larger than the component from the coulometric titrator. This claim is supported by interlaboratory comparison results: uncertainty from the manuals of the systems used is minute compared to the complications of a real sample. The information gathered on wood pellets was presented to the participants of the METefnet project for further discussion.

# Kasutatud kirjandus

- [1] Bruttel, P.; Schlink, R. *Water determination by Karl Fischer Titration, Swizerland: Metrohm Ltd.* 2006.
- [2] Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, New York: W. H. Freeman and Company, 1995, pp 511-513.
- [3] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, 1992, pp 393-395.
- [4] Qiaoqiao, Z.; Yanwei, Z.; Zhi, Y.; Shujie, W.; Zhihua, Z.; Junhu, Z.; Kefa, C. Kinetic and thermodynamic studies of the Bunsen reaction in the sulfureiodine thermochemical process. *Int. J. Hydrogen Energy*. **2013**, 38, 8614-8624.
- [5] Sherman, F.; Kuselman, I. Stoichiometry and chemical metrology: Karl Fischer reaction. *Accred. Qual. Assur.* **1992**, 4, 230-234.
- [6] Cedergren, A. Determination of Kinetics of the Karl Fischer Reaction Based on Coulometry and True Potentiometry. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 784-791.
- [7] *HYDRANAL Product Line Overview*;  
[http://creschem.com/sites/default/files/Hydranal%20Product%20Line%20Overview\\_0.pdf](http://creschem.com/sites/default/files/Hydranal%20Product%20Line%20Overview_0.pdf) viimati alla laetud 25.05.2015.
- [8] Raudsepp, J.; Past, V.; Koorits, A. Elektrolüütide lahuste omadusi. Tartu, 1985, pp. 31-35.
- [9] Marinenko, G.; Taylor, J. K. High-Precision Coulometric Iodometry. *Anal. Chem.* **1967**, 39, 13.
- [10] Dominguez, V. C.; McDonald, C. R.; Johnson, M.; Schunk, D.; Kreuter, R.; Sykes, D.; Wigton, B. T.; Chohan, B. S. The Characterization of a Custom-Built Coulometric Karl Fischer Titration Apparatus. *J. Chem. Educ.* **2010**, 87, 9.
- [11] Larsson, W.; Cedergren, A. Coulometric Karl Fischer titration of trace water, *Talanta*, **2004**.
- [12] Larsson, W.; Cedergren, A. Coulometric Karl Fischer titration of trace water in diaphragm-free cells. *Talanta*, **2005**, 65, 1349-1354.
- [13] Lanz, M.; De Caro, C. A.; Rüegg, K.; De Agostini, A. Coulometric Karl Fischer titration with diaphragm-free cell: Cell design and applications. *Food Chem.* **2006**, 96, 431-435.
- [14] Farazmand, M.; Beigi, M. A. A.; Torkestani, K.; Zand, K. E. Construction of a Pyridine-Free Karl Fischer Reagent for Trace Determination of Water in Non-aqueous Media by Coulometric Detection. *Anal. Lett.* **2003**, 36, 5, 933-954.

- [15] Grünke, S. Main and side reactions in the Karl Fischer solution. *Food Control*, **2001**, 12, 419-426.
- [16] Katoh, H.; Fujimoto, Y.; Kuwata, S. A Study of the Cathode Reaction in Karl Fischer Coulometric Titration. *Anal. Sci.* **1991**, 7.
- [17] Kestens, V.; Conneely, P.; Bernreuther, A. Vaporisation coulometric Karl Fischer titration: A perfect tool for water determination of difficult matrix reference materials. *Food Chem.* **2008**, 106, 1454-1459.
- [18] Metrohm, *Karl Fischer titration*; [http://www.massco.com/es/iqoq/doc\\_view/1234-003-kf-en-low](http://www.massco.com/es/iqoq/doc_view/1234-003-kf-en-low) viimati alla laetud 25.05.2015.
- [19] *EVS 758:2009*, Eesti Standardikeskus, Tallinn, 2009.
- [20] Joint Committee for Guides in Metrology, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement; [http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf) viimati alla laetud 19.05.2015.
- [21] Magnusson, B.; Näykk, T.; Hovind, H.; Kyrzell, M. *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*; <http://www.nordtest.info/index.php/technical-reports/item/handbook-for-calculation-of-measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories-nt-tr-537-edition-3.html> viimati alla laetud 19.05.2015.
- [22] Leito, I.; Viitak, A. *Kvaliteeditagamine analüütilises keemias*, TTÜ kirjastus: Tallinn, 2007, pp 42-61.
- [23] Karina, G. *Propaan ja iso-butaan gaasisegus vee sisalduse analüüs kulonomeetrilisel Karl Fischeri meetodil*. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 2009.
- [24] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1); [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) viimati alla laetud 21.05.2015.
- [25] Aas, A.-M. *Poliimeersete kiled veeauru permeabluse mõõtmised*. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 2010.
- [26] Randriamanantena, T.; Razafindramisa, F. L.; Ramanantsizehena, G.; Bernes, A.; Lacabane, C. *Thermal Behaviour of Three Woods of Madagascar by Thermogravimetric Analysis in Inert Atmosphere*. Ettekanne konverentsil "High-Energy Physics International Conference", Madagascar, 2009.



# Lisad

## Lisa 1

### Primaarmetodile esitatavad nõuded

- primaarmetod ei nõua kalibreerimist analüüdiga – puudub kalibreerimisgraafik,
- primaarmetodi kõik olulised määramatuse allikad on teada ja arvuliselt hinnatavad,
- primaarmetodil saadud tulemuste mõõtemääramatus on madal.

## Lisa 2

### Ülevaade projektist SIB64 METefnet

<http://www.metef.net/>

Veesisalduse analüüs tahketes proovides on üsna keeruline. Käesoleval hetkel on üldiselt aluseks võetud erinevate proovimatriksite juhtumil massikadu proovi kuumutamisel. Proovis olnud vee kogus arvutatakse massikaost. Selle meetodi oluliseks puuduseks on, et lisaks veele võivad lenduda ka muud komponendid. Lisaks võib osa vett jääda veel proovi. Kuna taoline meetod on hetkel referentsmeetodiks teiste seadmete kalibreerimisele, siis siin tehtud vead akumulēeruvad ja vead suurenevad. Tulemuseks on toodete ebahühtlane kvaliteet, liigne energiakulu ning keskkonna saastamine. Eelnevale lisaks on tihti iga proovi jaoks veesisalduse mõõdis spetsiifiliselt selle proovi jaoks defineeritud.

Projekti väljundid:

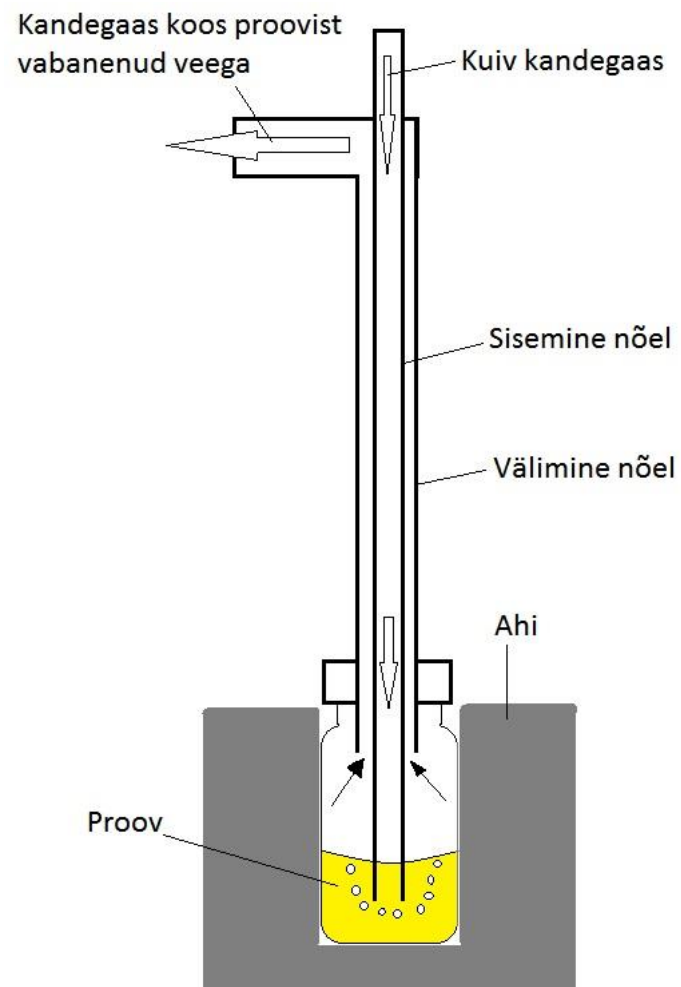
- Arendada üheseid meetodeid vee massifraktsiooni määramiseks ning uusi primaarstandardeid nende meetodite baasil.
- Täiendada kulonomeetrist Karl Fischeri titraatorit.
- Luua efektiivsed üldprintsipiibid veesisalduse määramise SI jälgitavuse tagamiseks.
- Arendada uusi CRM-e või modifitseerida olemasolevaid saavutamaks optimaalne veesisalduse määramise täpsus.
- Arendada meetodeid transpordist tuleneva veesisalduse muutuse kvantiseerimiseks ja vähendamiseks.
- Arendada uus SI jälgitavusega kalibreerimiskeskus pinna veesisalduse määramise instrumentidele.
- Arendada mudeleid, mis määramatuse hinnangu andmisel arvestaksid lokaalseid veesisalduse variatsioone. Lisaks arendada mõõtemääramatuse hindamise vahendid valitud tööstuslikele rakendustele.
- Luua läbipõimunud ning välja arendatud veesisalduse määramise infrastruktuur Euroopas.

Projektis osalevad: Mittatekniikan Keskus, Biroul Roman de Metrologie Legala, Centre Technique des Industries Aérauliques et Thermiques, Cesky Metrologicky Institut Brno, Teknologisk Institut, Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica, NPL Management Limited, Turkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastirma Kurumu, Univerza v Ljubljani, Tartu Ülikool.

Mitmed Euroopa instrumenditootjad, akrediteeritud laborid ning tööstuslikud veesisalduse mõõtesüsteemide kasutajad Aasiast, Ameerikast ja Aafrikast on näidanud huvi antud projekti väljundite suhtes.

## Lisa 3

### Kuumutussüsteemi tööskeem



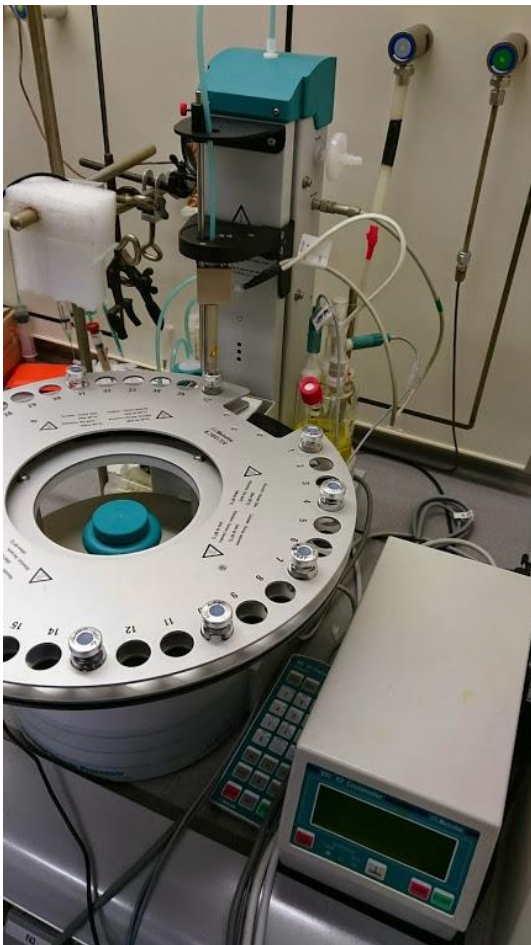
## Lisa 4

Kasutatud seadmete fotod

*Joonis 17. Kasutatud mõõterakk diafragma generaatorelektroodiga.*



*Joonis 18. Kuumutussüsteem, 874 Oven Sample Processor*





## Lisa 5

### Reagendi vahetamine kulonomeetrilisel KF titraatoril

1. Titraator välja lülitada ja generaator- ning indikaatorelektroodid lahti ühendada.
2. Rakk aluse pealt ära tõsta.
3. Generaatorelektrood välja tõsta, sellelt ülemine osa eemaldada ning katoodiruumi lahus välja valada. NB! Kui on kasutusel diafragma elektrood, pole eraldi katoodiruumi.
4. Rakust lahus välja valada ning jälgida, et magnetsegaja kaduma ei läheks.
5. Eemaldada muud detailid raku küljest.
6. Rakk pesta puhta veega mitu korda, kui mustusest lahti ei saa, siis kasutada ka harja. Kui ka sellest jääb väheks, appi võtta pesuvahend. Seejärel rakku loputada etanooliga mitu korda ning jätta rakk kuivaks nõrguma.
7. Indikaatorelektrood loputada etanooliga puhtaks ning asetada puhtale paberile kuivama.
8. Generaatorelektrood loputada etanooliga puhtaks ning jätta seisma etanooliga katoodiruumis. Korra paari kuu jooksul või vastavalt vajadusele puhastada generaatorelektroodi kontsentreeritud väävelhappe ning 30% vesinikperoksiidiga.
  - a. Generaatorelektrood asetada keeduklaasi ja fikseerida käpaga anuma põhjast mõne millimeetri kõrgusele.
  - b. Valada katoodiruumi mõne sentimeetri kõrgune väävelhappe kogus ning lisada viimasest ca kümme korda väiksem kogus vesinikperoksiidi.
  - c. Lasta toimida ca. 30 minutit.
  - d. Loputada kogu süsteem ja elektroodid puhtaks etanooliga.
9. Nii rakk kui generaatorelektrood kuivatada fööni abil, et seal olev vesi desorbeeruks.
10. Kui kõik detailid on puhastatud ning kuivatatud, panna elektroodid rakku tagasi ning uus reagent sisse valada. Juhul, kui ei kasutata originaaltihendeid, keerata teflonlindist uued tihendid.

## Lisa 6

### Standardlahuse valmistamine ning analüüsimine cKF meetodil

1. Metanooli võtmine.
  - 1.1. Anumal lasta tasakaalustuda umbes 24 tundi atmosfääritingimustel.
  - 1.2. Anum septumiga kaaluda (kasutades võimalikult kõrge resolutsiooniga kaalu).
  - 1.3. Anumasse valada metanool ja kohe septumiga sulgeda, et vähendada saastumist.
2. Metanooli veesisalduse määramine.
  - 2.1. Teha mõõteseeria puhta metanooli otsesisestusega, et kindlaks määrata metanooli algne veesisaldus. Proov võtta läbi septumi ning selleks ajaks torgata läbi septumi „kuivati“ – molekulaarsõeltega täidetud süstal.
  - 2.2. Kui on kavas mõõtmised kuumutussüsteemiga, siis teha juurde mõõtmised kuumutussüsteemiga.
3. Vee lisamine.
  - 3.1. Kaaluda anum koos metanooliga ning arvutada lisatud metanooli mass.
  - 3.2. Kui on lisatud metanooli kogus teada, arvutada selle põhjal välja, kui palju vett tuleb lisada, et saavutada soovitud veesisaldus, arvestada sealjuures puhta metanooli veesisaldust.
  - 3.3. Võtta süstlasse vastav kogus väga puhast vett.
  - 3.4. Lisada anumasse vesi läbi septumi.
  - 3.5. Kaaluda anum uuesti ning arvutada masside vahest välja anumasse lisatud täpne vee kogus. Sellest omakorda arvutada välja saadud lahuse veesisaldus.
4. Standardlahuse veesisalduse määramine:
  - 4.1.1. Otsesisestus – Kolm kuni viis korduvat tulemust (esimesed süstid on kõrgendatud tulemustega pea alati, neid arvutustes ei kasuta), realselt ca kaheksa süsti.
    - 4.1.1.1. Kogu vajaminev proovi kogus võtta ühte süstlasse ning samal ajal torgata septimist läbi „kuivati“.
    - 4.1.1.2. Proovide massid arvutada süstla massivahedest enne ja pärast süste.
  - 4.1.2. Kuumutusmeetod – kolm blank mõõtmist seeria alguses millele järgneb kuus paralleelmõõtmist prooviga, kaalutiselt võimalikult ühesugused.
    - 4.1.2.1. Viaalid ning korgid peavad tasakaalustuma enne kasutamist vähemalt 24 tundi. Blank viaalid võimalusel sulgeda eri ajahetkedel prooviettevalmistuse jooksul.
    - 4.1.2.2. Proov lisada viaalidesse süstlaga läbi septumi ning kasutada „kuivati“ ülerõhu vältimiseks.
    - 4.1.2.3. Võimalusel vältida proovide pikaagset seismist, kuna nende veesisaldus on ajas ebapüsiv.

Parema võrdluse huvides teostada mõõtmised nii otsesisestuse, kui kuumutussüsteemiga samal päeval.

## **Lisa 7**

### **Kulonomeetrilise Karl Fischeri titraatori Metrohm KF 831 ühe mõõtepunkti saamise põhimõte**

1. Kulonomeeter genereerib joodi mingi kindlaksmääratud aja konstantse voolutugevusega.
2. Joodi genereerimine lõpetatakse ning mõõterakus oleval reagentil lastakse homogeniseeruda kindel aeg.
3. Eelmise punkti ajal arvutab kulonomeeter joodi genereerimiseks kulunud kulonite arvu.
4. Saadud tulemus saadetakse kas kontrollarvutisse või titraatori juhtmoodulisse.
5. Indikaatorelektroodide vahelise potentsiaali alusel arvutab kulonomeeter sobiliku joodi genereerimise voolutugevuse järgmise tsükli jaoks.
6. Tsükkel algab uuesti punktist 1.



## **Lisa 8**

### **Meetodi arendamise etapid tundmatule proovile**

#### **1. Esimene gradient**

- 1.1. Proovi kogus minimaalne, kasutades analüütilist kaalu mitte alla 10 mg.
- 1.2. Gradient teha laias temperatuurivahemikus, näiteks 50-250°C ning temperatuuri muutumise kiirusega 10°C/min.
- 1.3. Tulemused kanda graafikule ning leida temperatuur, mille juures vee vabanemine aset leiab. Sellel analüüsil saab proovi ligikaudse veesisalduse, kuna analüüs on liiga pikk täpsema tulemuse saavutamiseks.
  - 1.3.1. Kui vee vabanemist proovist ei ole võimalik tuvastada, korrata katset suurema proovikogusega.

#### **2. Teine gradient**

- 2.1. Proovi kogus muuta nii, et absoluutne vee kogus proovis oleks ~1000 µg.
- 2.2. Temperatuurivahemik teha kitsamaks ja vähendada gradiendi kiirust. Programmi alg- ning lõpptemperatuurid valida selliselt, et nende vahele jääks eelmisel korral tuvastatud vee vabanemise temperatuur.

#### **3. Sobiv meetod**

- 3.1. Paremat korduvust on võimalik saavutada kasutades meetodeid konstantse temperatuuriga.
- 3.2. Konstantse temperatuuriga jääb ära ahju jahutamine analüüside vahel, lühendades oluliselt analüüsideks kuluvat aega.
- 3.3. Temperatuur võiks vastata vee vabanemise maksimumile, eeldusel, et proov sellel temperatuuril ei lagune.

#### **4. Valideerimine**

- 4.1. Analüüsid erinevatel temperatuuridel. Mõõtmisi võiks teostada vähemalt kolmel erineval temperatuuril. Üheks mõõtepunktiks eelnevalt väljavalitud temperatuur. Teised mõõtmised teostada nii all- kui ülalpool seda temperatuuri, 10°C sammudega. Igal temperatuuril teostada vähemalt kolm kordusmõõtmist.
- 4.2. Korratavuse hindamiseks teostada mõõtmised veel kahel erineval päeval välja valitud temperatuuril, kummalgil päeval kolm paralleelmõõtmist.

## Lisa 9

Joonis 21. 1% veesisaldusega sertifitseeritud referentsmaterjal.



### Certificate of Analysis

#### Apura<sup>®</sup> Reference Material

#### Water Standard oven 1 %, 1 g = 10 mg H<sub>2</sub>O Solid water standard for the Karl Fischer oven method

1.88054

Lot No.: F1762554

Certified Reference material for the water determination acc. to Karl Fischer using a Karl Fischer oven and other oven techniques for the determination of water.

##### Method of analysis

For certification the water content was determined acc. to ISO 760 with the Karl Fischer oven method.

**Water content:** 0.97 % H<sub>2</sub>O (equivalent to 9.7 mg/g H<sub>2</sub>O)

**Measurement uncertainty:** ± 0.03 % H<sub>2</sub>O (equivalent to 0.3 mg/g H<sub>2</sub>O)

Equivalent to the expanded measurement uncertainty with coverage factor k = 2 for 95% coverage probability.

##### Standardisation

Measured by means of a Karl Fischer coulometer in combination with a Karl Fischer oven at an oven temperature of 170 °C and an extraction time of 600 sec. The measurement value was additionally checked by thermogravimetry\*, as independent procedure.

##### Application

The water standard oven 1% is intended for use as a reference material for checking the accuracy of coulometric and volumetric water determinations acc. to ISO 760 using a Karl Fischer oven and thermobalances.

##### Recommendations for use:

- The oven standard can be used in a temperature range of 150 °C and 400 °C.
- A minimum heating time (extraction time) of 300 sec to 600 sec is recommended.
- The weight-in quantity for the KF oven technique is usually in the range of 80 mg to 300 mg.
- Setting parameters for the oven like minimum temperature and heating time as well as optimum sample size of the standard substance could vary depending on the used instrument.

##### \* Supplement to thermogravimetry:

Determination of the weight loss (isotherm at 150 °C and 300 sec, in nitrogen atmosphere)

Measurement uncertainty: ± 0.05 % (0.5 mg/g)

**Date of release:** 2013/05/23

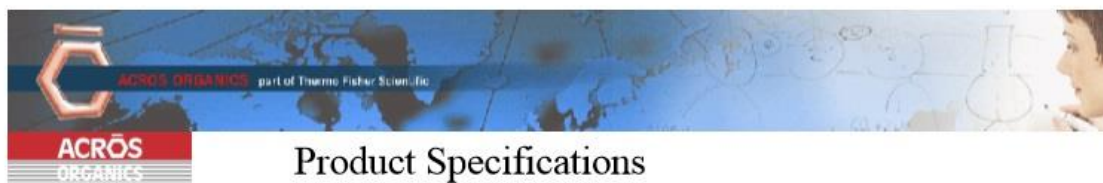
**Minimum shelf life:** 2016/02/28

Dipl. Ing. Ayfer Yildirim  
(Head of Analytical Laboratory)

Merck KGaA · Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Germany: +49 6151 72-0

EMD Millipore Corp. · 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA: +1-781-533-6000

Joonis 22. Alfa-D-laktoosi monohüdraadi spetsifikatsioon.

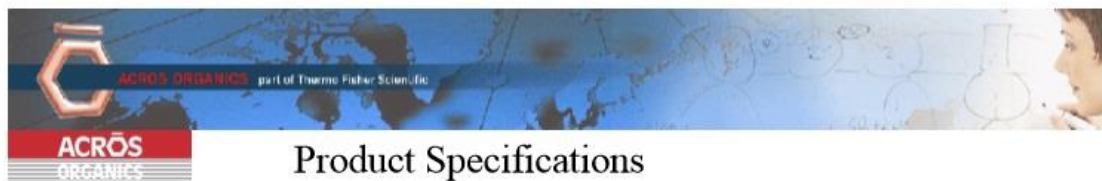


<b>Product</b> 12509	<b>General Product Data</b>
<b>alpha-D-Lactose monohydrate, 99.5+%, 2-4% beta-isomer</b>	Version 3
	CAS No 5989-81-1
	Molecular weight 360.30
	Molecular formula C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> · H <sub>2</sub> O
	Linear formula

**Product Specifications**

Appearance	white or almost white crystalline powder
Infrared spectrometry	Authentic
TLC	>=99.50 %
Loss on drying	=<0.5 % (80°C, 2 h)
Heavy metals (as Pb)	=<5 ppm
Sulfated ash	=<0.1 %
Water	4.5 to 5.5 % (K.F.)
Specific optical rotation	+54.4° to +55.9° (20°C, 589 nm) (c=10, H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> ) On dry substance
Acidity/alkalinity	=<0.4 ml 0.1N NaOH/6g
Absorbance	Passes test
Appearance of solution	Passes test
Microbial contamination	Passes test

Acros Organics ENA23, zone 1, nr 1350, Janssen Pharmaceuticaalaan 3a, B-2440 Geel, Belgium  
Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: <http://www.acros.com>  
1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410, USA  
Fax 201-796-1329



## Product Specifications

**Product** 40388

Calcium oxalate monohydrate, 98%, extra pure

### General Product Data

Version 2  
CAS No 5794-28-5  
Molecular weight 146.11  
Molecular formula  $C_2CaO_4 \cdot H_2O$   
Linear formula  $(COO)_2Ca \cdot H_2O$

### Product Specifications

Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder
Infrared spectrometry	Authentic
Assay	$\geq 97.5$ wt% (as oxalate) (on dry substance)
Loss on drying	$\leq 13$ % (1 g, 200°C, 3 h)
Insolubles	$\leq 0.3$ % (in HCl)
Iron (Fe)	$\leq 200$ ppm
Apparent density	0.3 to 0.5 g/cm <sup>3</sup>
Particle Size/Sieve anal.	$\geq 95$ % (passing through 45 micron)

Acros Organics

ENAZ3, zone 1, nr 1350, Janssen Pharmaceuticaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium  
Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: <http://www.acros.com>  
1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410, USA  
Fax 201-796-1329

**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

## Certificate of Analysis

**Product Name:** POTASSIUM CITRATE TRIBASIC MONOHYDRATE  
purum p.a., >= 99.0 % NT  
**Product Number:** 60153  
**Batch Number:** BCBN7473V  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 6100-05-6  
**Formula:** HOC(COOK)(CH<sub>2</sub>COOK)<sub>2</sub> • H<sub>2</sub>O  
**Formula Weight:** 324.41  
**Quality Release Date:** 10 SEP 2014

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	CRYSTALS
TITRATION (NT) HClO <sub>4</sub> 0.1M	99.0 - 101.0 %	99.0 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (< 3.5 NTU)	CLEAR (<3.5 NTU)
SOLUBILITY (METHOD)	0.5G IN 10ML WATER	0.5G IN 10ML WATER
PH	7.5 - 9.0	8.0
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
CALCIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
CADMIUM (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
SODIUM (ICP)	≤ 1500 MG/KG	< 1500 MG/KG
NICKEL (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
LEAD (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
ZINC (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
TOTAL SULFUR AS SO <sub>4</sub> (ICP)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG
CHLORIDE (CL)	≤ 50 MG/KG	< 50 MG/KG



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Lisa 10

Tabel 17. Preliminary comparisons with biofuels (wood pellets) projekti SIB64\_METefnet raames.

Original data						
Laboratories <sup>4</sup>	Method	Sample	approx Sample mass mg	Temperature °C	Humidity %rh	Water content %
INRIM	Grinding +cKF	1	20	220		8.88
INRIM	Grinding +cKF	1	20	220		8.56
INRIM	Grinding +cKF	1	20	220		8.58
INRIM	Grinding +cKF	2	20	220		8.17
INRIM	Grinding +cKF	1	30	110		7.35
INRIM	Grinding +cKF	2	30	110		7.31
INRIM	Water vapor detection	1	25	220		9
INRIM	Water vapor detection	2	25	220		9.02
INRIM	Water vapor detection	1	5	110		7.44
INRIM	Water vapor detection	2	5	110		7.54
NPL	Water vapor detection	1	8-21			8.35
NPL	Water vapor detection	2	13-23			7.82
MIKES	Water trap		243100	105		7.68
MIKES	Water trap		236540	105		7.81
MIKES	Water trap		205440	105		7.68
MIKES	Water trap		225950	105		7.76
MIKES	Water trap		240120	105		7.73
MIKES	Water trap		197000	105		7.60
UT	Grinding +cKF	1	20-30	103	46	7.34
UT	Grinding +cKF	1	20-31	103	21.5	6.43
UT	Grinding +cKF	2	20-32	103	32.4	7.13
UT	Grinding +cKF	2	20-33	103	32.4	7.14
UT	Grinding +cKF	2	20-34	103	32.4	7.31

<sup>4</sup> INRIM - Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica NPL – NPL Management Limited

MIKES – Mittatekniikan Keskus

UT – Tartu Ülikool

NPL – National Physical Laboratory

## Lisa 11

Süsteemaatilise komponendi arvutamise andmed ja valemid kuumutusüsteemile.

Tähis- tus	Referents sisaldus (mg/kg)	Mõõtetulemus (mg/kg)	Standardhälve (mg/kg)	Standardhälve (%)	Mõõtmiste arv	Erinevus (mg/kg)	Erinevus (%)
Lahus 3-1	4926	4945	6	0.13	5	19	0.38
Lahus 3-2	4926	4976	18	0.36	5	50	1.0
Lahus 3-3	4926	4942	36	0.74	5	-3	-0.05
Lahus 4	5074	5102	29	0.56	3	28	0.56
Lahus 5	5209	5220	17	0.33	5	11	0.22

Kogitud standardhälbe arvutusvalem, nr. 18.

$$S_{kogitud} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2 + \dots + (n_k - 1)S_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}} \quad (18)$$

Süsteemaatilise komponendi arvutamine valem, nr. 19.

$$bias = \sqrt{\frac{(\Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \dots + \Delta_N^2)}{N}} \quad (19)$$

# Litsents

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Rudolf Aro

(sünnikuupäev: 12.08.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Kuumutussüsteemiga kulonomeetrilise Karl Fischeri titraatori parameetrite valideerimine“,

mille juhendajad on Lauri Jalukse ja Ivo Leito

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **03.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **27.05.2015**