

Tekniikan kandidaatintyö

**Raudan eri hapetuslukujen analysointi
liuosnäytteistä**

Lappeenranta 2018

Janne Holappa

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

School of Engineering Science

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Kandidaatintyö 2018

Janne Holappa

Raudan eri hapetuslukujen analysointi liuosnäytteistä

Työn ohjaajat: TkT Ritva Tuunila ja DI Paula Vehmaanperä

32 sivua, 11 kuvaa, 5 taulukkoa

Hakusanat: rauta(II), rauta(III), Fe(II), Fe(III), kokonaisrautapitoisuus, titraus, spektrofotometria, kromatografia, elektroforeesi

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, millaisilla menetelmillä voidaan analysoida raudan hapetuslukuja liuosnäytteistä. Työn kirjallisessa osassa etsittiin käyttökelpoisia analyysimenetelmiä tieteellisestä kirjallisuudesta. Kokeellisessa osassa käytettiin menetelmiä itse valmistetun näytteen rautapitoisuuksien analysointiin, minkä jälkeen eri menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa sekä näytteen todellisiin rautapitoisuuksiin.

Raudan hapetuslukujen määrittämiseen voidaan käyttää redox-titrausta, spektrofotometriaa, kromatografiaa tai kapillaarielektroforeesia. Spektrofotometriset menetelmät ovat eniten käytettyjä, ja niissä voidaan hyödyntää useita eri reagensseja värillisten rautayhdisteiden muodostamiseen analyysiä varten.

Kokeellisessa osassa määritettiin näytteen, jonka rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet olivat 10 mg/l, rautapitoisuuksia käyttäen kaliumpermanganaattititrausta, kapillaarielektroforeesia sekä spektrofotometristä menetelmää, jossa reagenssina toimi 1,10-fenantroliini. Elektroforeesi ja spektrofotometria soveltuivat hyvin näytteen rautapitoisuuksien määrittämiseen, mutta titrauksella ei saatu määritettyä näytteen rautapitoisuuksia riittävän luotettavasti.

SISÄLLYSLUETTELO

KIRJALLINEN OSA	4
1 JOHDANTO	4
2 HAPETTUMINEN JA PELKISTYMINEN	4
2.1 Hapetusluku.....	5
2.2 Raudan hapetusluvut.....	6
3 RAUDAN HAPETUSLUKUJEN MÄÄRITTÄMINEN	7
3.1 Spektrofotometriset menetelmät.....	8
3.1.1 1,10-Fenantroliini.....	8
3.1.2 Batofenantroliini	10
3.1.3 Ferrotsiini	11
3.2 Titrimetria	13
3.3 Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi	14
3.4 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	14
3.5 Ionikromatografia.....	15
3.6 Yhteenvedo menetelmistä.....	16
KOKEELLINEN OSA	18
4 KOEJÄRJESTELYT JA MITTAUSTULOSTEN KÄSITTELY	18
4.1 Titraus kaliumpermanganaatilla.....	19
4.2 Spektrofotometrinen määrittäminen 1,10-fenantroliinilla	19
4.3 Määrittäminen kapillaarielektroforeesilla	22
4.4 Mittaustulosten tilastollinen käsittely	23
5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	24
5.1 Titraus.....	24

5.2 Spektrofotometria	26
5.3 Kapillaarielektroforeesi	28
5.4 Yhteenveto kokeellisesta osasta	28
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	30
LÄHDELUETTELO	33

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Rauta on neljänneksi yleisin alkuaine maankuoressa ja se on avainasemassa useissa teollisissa ja luonnossa tapahtuvissa prosesseissa, kuten fotosynteesissä (Briat, 2007). Luonnossa rautaa esiintyy kiinteiden mineraalien lisäksi monissa nestemäisissä matriiseissa, kuten merivedessä, makeissa vesissä sekä kaivosvesissä. Lisäksi monet teollisuuden vesivirrat ja talousvedet sisältävät rautaa. Koska rauta on erittäin yleinen ja usein olennainen komponentti laajassa näytematriisien kirjossa, sen analysointi on monissa tapauksissa tarpeellista.

Liuosnäytteiden rautapitoisuus määritetään yleensä kokonaisrautapitoisuutena, jolloin raudan hapetusasteita ei huomioida. Raudan hapetusasteet vaikuttavat kuitenkin muun muassa raudan kemiallisiin ja sähkökemiallisiin ominaisuuksiin, vesiliukoisuuteen sekä biosaatavuuteen, joten niiden tutkiminen on usein tarpeellista. Monissa kemiallisissa prosesseissa raudan hapetusasteiden tunteminen voi myös auttaa ymmärtämään prosessin sisällä tapahtuvia ilmiöitä.

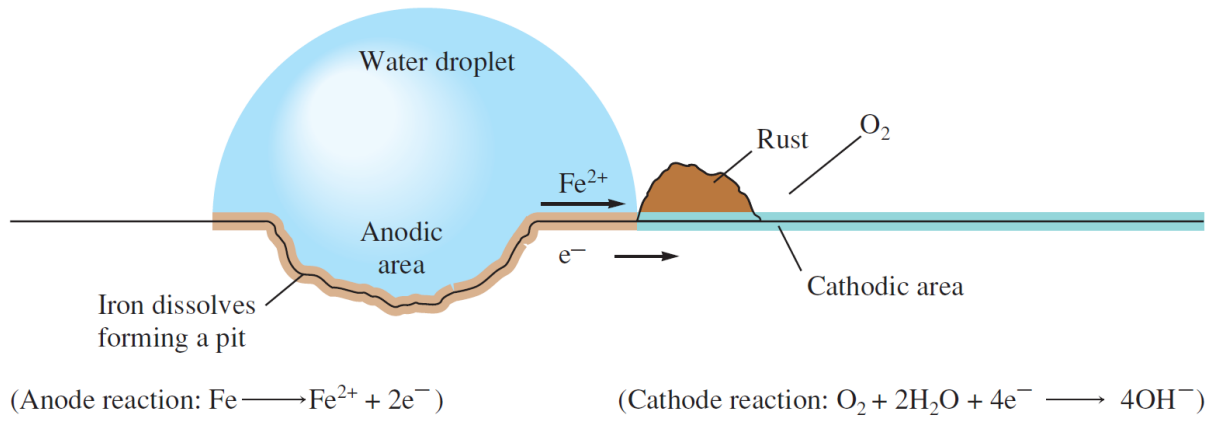
Tämän työn kirjallisen osan tarkoitus on selvittää, millaisia menetelmiä on käytetty raudan hapetuslukujen määrittämiseksi liuosnäytteistä. Työssä tarkastellaan menetelmien toimintaperiaatteita, luotettavuutta sekä soveltuvuuksia erilaisille näytteille. Kokeellisessa osassa tutkitaan spektrofotometrian, redox-titrauksen ja kapillaarielektroforeesin soveltuvuutta raudan hapetuslukujen määrittämiseen synteettisestä näytteestä, minkä jälkeen saatuja tuloksia verrataan toisiinsa sekä näytteen todellisiin rautapitoisuuksiin.

2 HAPETTUMINEN JA PELKISTYMINEN

Hapettumisella tarkoitetaan kemiallista reaktiota, jossa aine luovuttaa elektroneja ja sen hapetusluku kasvaa. Vastaavasti aineen pelkistyessä se vastaanottaa elektroneja, jolloin sen

hapetusluku pienenee. Hapettuminen ja pelkistyminen ovat puolireaktioita, ja ne tapahtuvat aina keskenään samanaikaisesti muodostaen hapetus-pelkistysreaktion.

Hapetus-pelkistysreaktioilla on suuri merkitys monissa teollisissa ja luonnossa tapahtuvissa prosesseissa. Tunnettuja hapetus-pelkistysreaktioita ovat esimerkiksi palamisreaktiot sekä kiinteän raudan ruostuminen, jossa ilmassa tai vedessä oleva happi hapettaa raudan samalla itse pelkistyen. Tällöin raudan pinnalle muodostuu huokoinen ja veteen liukenematon kerros ruskeita rauta(III)oksidaa ja -hydroksidaa eli ruostetta. Ruostumisen periaate on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1 Raudan hapettuminen ja ruosteen muodostuminen hapen pelkistyessä ja veden läsnä ollessa. (Zumdahl & Zumdahl, 2007)

2.1 Hapetusluku

Hapetusluku eli hapetusaste ilmoittaa, kuinka monta elektronia atomi on vastaanottanut tai luovuttanut (Clark, 2013). Koska elektronin varaus on -1, jokainen luovutettu elektroni kasvattaa atomin hapetuslukua yhdellä ja vastaavasti jokainen vastaanotettu elektroni laskee hapetuslukua yhdellä. Puhtaan alkuaineen hapetusluku on siis aina 0, sillä se ei ole luovuttanut tai vastaanottanut elektroneja hapetus-pelkistysreaktiossa.

Hapetuslukujen määrittämisen pääasiallinen tarkoitus on selvittää, mitkä aineet ovat kemiallisessa reaktiossa hapettuneet ja mitkä pelkistyneet (Clark, 2013). Lisäksi hapetuslukuja käytetään yhdisteiden nimeämisessä; esimerkiksi Fe_2O_3 ja FeO ovat raudan oksideja, jotka on raudan hapetusasteiden perusteella nimetty rauta(III)oksidiksi ja rauta(II)oksidiksi.

Liuosnäytteiden sisältämän raudan tyypillinen käyttäytyminen selittyy tarkastelemalla raudan hapetuslukuja, sillä ne vaikuttavat merkittävästi useisiin raudan ominaisuuksiin.

2.2 Raudan hapetusluvut

Kemiallisesti puhdas rauta on varsin reaktiivista ja luonnossa hyvin harvinaista. Rauta esiintyykin tavallisesti oksideina, suoloina tai muina yhdisteinä, joiden muodostuessa rauta on tyypillisesti hapettunut. Kuten useimmat siirtymämetallit, rauta voi muodostaa yhdisteitä useilla eri hapetusasteilla. Rauta esiintyy kuitenkin valtaosassa sen muodostamia yhdisteitä hapetusluvulla +2 (rauta(II) eli kahdenarvoinen rauta) tai +3 (rauta(III) eli kolmenarvoinen rauta) (Wiberg & Holleman, 2001). Rautapitoisten liuosnäytteiden analysoinnissa tarkastelun kohteena on tavallisesti kokonaisrautapitoisuus, joka koostuu rauta(II)- ja rauta(III)-yhdisteistä.

Kahdenarvoinen rauta voi muuttua kolmenarvoiseksi sellaisessa hapetus-pelkistysreaktiossa, jossa se hapettuu. Vastaavasti kolmenarvoinen rauta voi muuttua kahdenarvoiseksi pelkistymällä. Yhtälössä (1) on esitetty kahdenarvoisen raudan hapettuminen kolmenarvoiseksi raudaksi ja yhtälössä (2) kolmenarvoisen raudan pelkistyminen kahdenarvoiseksi raudaksi. Nämä puolireaktiot muodostavat yhdessä hapetus-pelkistysreaktion, jossa kahdenarvoinen rauta hapettuu samanaikaisesti kolmenarvoisen raudan pelkistyessä. Tämä kokonaisreaktio on esitetty yhtälössä (3).



Rauta(III) on rakenteeltaan stabiilimpi kuin rauta(II), minkä seurauksena monet rauta(II)-yhdisteet, kuten suurin osa sen muodostamista suoloista, hapettuvat helposti rauta(III)-muotoon ilmakehän hapen vaikutuksesta (Greenwood & Earnshaw, 1984). Tämä hapetus-pelkistysreaktio tapahtuu kuitenkin hyvin hitaasti, jos rautaa sisältävän liuoksen pH-arvo on pienempi kuin 3 (Wehli, 1990). Raudan hapetuslukuja määritettäessä on siis erittäin tärkeää, että näyte säilytetään happamissa olosuhteissa ja analysoidaan mahdollisimman pian sen ottamisen jälkeen.

Rauta(II) on tyypillisesti vesiliukoista neutraaleissa pH-olosuhteissa, mutta rauta(III) ei ole (Illinois Department of Public Health, 2010). Tämän takia esimerkiksi vesijohto- tai kaivovedessä esiintyvä rauta(II) on usein täydellisesti liuennut, mutta rauta(III) voi ilmetä punertavan ruskeina saostumina, jotka laskeutuvat painovoiman vaikutuksesta vesiasian pohjalle. Rauta(III) voi kuitenkin muodostaa vesiliukoisia kompleksiyhdisteitä monien orgaanisten ja epäorgaanisten ligandien kanssa (Vance, 1994).

3 RAUDAN HAPETUSLUKUJEN MÄÄRITTÄMINEN

Raudan hapetuslukuja määrittämiseen liuosnäytteistä käytetään tavallisesti spektrofotometrisiä menetelmiä niiden yksinkertaisuuden sekä luotettavuuden vuoksi. Näissä menetelmissä näyte käsitellään reagenssilla, joka kompleksoi raudan värilliseksi yhdisteeksi. Spektrofotometrisillä menetelmillä voidaan tyypillisesti määrittää näytteen kokonaisrautapitoisuus ja joko rauta(II)- tai rauta(III)-pitoisuus, minkä jälkeen tuntemattomaksi jääneen raudan pitoisuus saadaan kokonaisraudan ja tunnetun raudan pitoisuuksien erotuksesta. Kannettavien spektrofotometrieni ansiosta menetelmiä voidaan tarvittaessa käyttää myös kenttäolosuhteissa.

Raudan hapetuslukuja määrittämiseksi on spektrofotometrinen menetelmien lisäksi kehitetty kromatografisia ja elektroforeettisia menetelmiä. Näille menetelmille on tyypillistä, että rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuus voidaan määrittää samanaikaisesti yhdellä ajolla.

Spektrofotometriisiin menetelmiin verrattuna nämä menetelmät vaativat kuitenkin kalliimman laitteiston sekä enemmän ammattitaitoa analyysin tekijältä.

Raudan redox- eli hapetus-pelkistystitraus, jossa näytteeseen lisätty titrantti hapettaa kahdenarvoisen raudan kolmenarvoiseksi raudaksi, on helppo ja edullinen tapa määrittää näytteen rauta(II)- tai kokonaisrautapitoisuus, jos näytteessä on runsaasti (yli 1 g/l) rautaa. Menetelmän skaalaaminen pienempiin rautapitoisuuksiin on kuitenkin haasteellista.

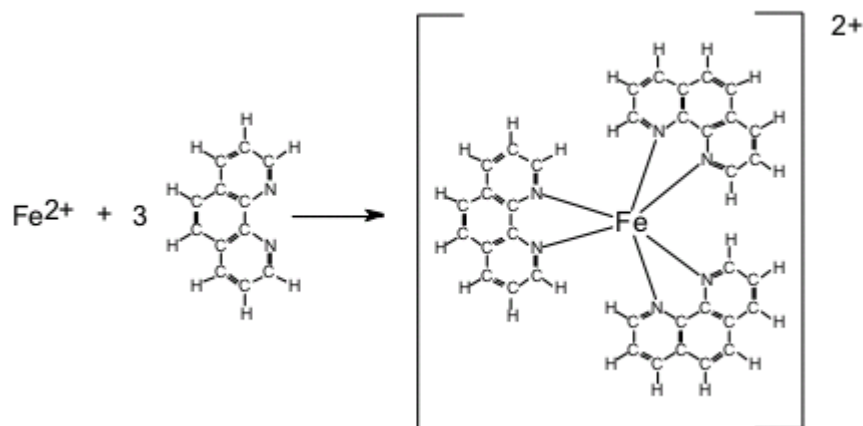
3.1 Spektrofotometriset menetelmät

Spektrofotometria on analyysimenetelmä, joka perustuu siihen, että kemialliset yhdisteet absorboivat valoa eri tavoin. Spektrofotometrisessä määityksessä näytettä valaistaan eri valon aallonpituuksilla, minkä jälkeen sen absorboiman valon määrä mitataan. Epäorgaanisen kemian analyyseissä käytetään tyypillisesti ultraviolettisäteilyä (UV) aallonpituusalueella 200-380 nm ja näkyvää valoa (VIS) aallonpituusalueella 380-780 nm. (Marczenko & Balcerzak, 2000)

Raudan määrittystä varten on kehitetty useita spektrofotometrisiä menetelmiä, jotka eroavat toisistaan pääasiassa raudan kompleksointiin käytettävän reagenssin osalta. Tässä työssä esitellään reagenssit 1,10-fenantroliini, batofenantroliini sekä ferrotsiini.

3.1.1 1,10-Fenantroliini

Fortune ja Mellon (1938) ovat kehittäneet menetelmän, joka perustuu rauta(II)-ionin ja 1,10-fenantroliinin muodostaman kompleksi-ionin spektrofotometriseen tarkasteluun. Tämä menetelmä on nykyäänkin laajalti käytetty sen helppouden, nopeuden, tarkkuuden sekä alhaisten kustannusten ansiosta. Raudan ja 1,10-fenantroliinin muodostama kompleksi ($[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$) on väriltään punertavan oranssi, ja sen absorbanssimaksimi on aallonpituudella 508 nm. Kompleksin muodostumisreaktio on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2 $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ -kompleksin muodostuminen rauta(II)-ionista ja kolmesta 1,10-fenantroliinimolekyylistä. (Mountain Empire Community College, n.d.)

1,10-Fenantroliinimenetelmää käytetään tavallisesti kokonaisrautapitoisuuden määrittämiseen siten, että näytteissä oleva rauta(III) pelkistetään käsittelyn alussa rauta(II)-muotoon. Tämän jälkeen rauta(II)-pitoisuus, joka vastaa nyt kokonaisrautapitoisuutta, määritetään spektrofotometrisesti. Tätä perusmenetelmää käyttämällä näytteen sisältämän raudan hapetusasteet jäävät selvittämättä. Menetelmää on kuitenkin mahdollista soveltaa myös hapetusasteiden määrittämiseen ottamalla kaksi erillistä osanäytettä, joista toisen sisältämää kolmenarvoista rautaa ei pelkistetä kahdenarvoiseksi raudaksi. Rauta(II)-pitoisuus määritetään tällöin pelkistämättömästä osanäytteestä ja kokonaisrautapitoisuus normaaliin tapaan pelkistetystä osanäytteestä (American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 1975). Lopuksi rauta(III)-pitoisuus voidaan laskea näytteen kokonaisrauta- ja rauta(II)-pitoisuuksien erotuksesta.

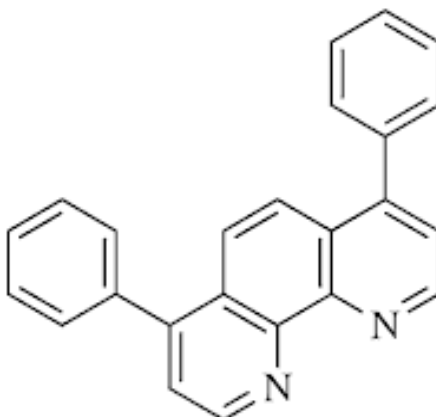
Harvey, Smart ja Amis (1955) muokkasivat 1,10-fenantroliinimenetelmää siten, että näytteen rauta(II)- ja kokonaisrautapitoisuus voidaan määrittää samalla kertaa. Muokattu menetelmä perustuu siihen, että rauta(II):n muodostamalla $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ -kompleksilla ja rauta(III):n muodostamalla $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ -kompleksilla on sama absorbanssivakio aallonpituudella 396 nm, joten keskenään yhtä vahvojen rauta(II)- ja rauta(III)-liuosten spektrit leikkaavat toisensa tällä aallonpituudella. Lisäksi $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ ei aiheuta merkittävää absorbanssia aallonpituudella 512 nm, jolta rauta(II)-pitoisuus luetaan. Kokonaisrautapitoisuus voidaan siis määrittää

aallonpituudelta 396 nm ja rauta(II)-pitoisuus aallonpituudelta 512 nm. Rautapitoisuuksien välisen suhteen määrittämiseksi tarkemmin tuloksille voidaan suorittaa yksinkertainen laskennallinen korjaus, jossa huomioidaan $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ -kompleksin aiheuttama absorbanssi aallonpituudella 512 nm. Korjausta varten kalibrointisuora tulee muodostaa rauta(II)-pitoisuuksien lisäksi myös rauta(III)-pitoisuuksille.

1,10-Fenantroliini on suosittu reagenssi raudan spektrofotometrisessä määrittämisessä, koska se on edullista ja sillä saadut tulokset ovat tyypillisesti tarkkoja (Schilt, 1969). 1,10-Fenantroliinin käytölle on kuitenkin muutamia rajoitteita. Reagenssin käyttö ei ole mahdollista, jos näyte sisältää hopeaa tai vismuttia, sillä ne muodostavat sakan sen kanssa. Myös elohopea, kadmium, sinkki ja molybdeeni muodostavat sakkoja, mutta reagenssin käyttö voi niiden läsnä ollessa onnistua, mikäli sitä lisätään ylimäärin tai näytteen pH-arvoa säädetään. Virhettä voivat aiheuttaa myös syanidi ja kromi (pitoisuus yli 10 mg/l), koboltti ja kupari (pitoisuus yli 5 mg/l) sekä nikkeli (pitoisuus yli 2 mg/l). (Fortune & Mellon, 1938)

3.1.2 Batofenantroliini

Batofenantroliinia (4,7-difenyyl-1,10-fenantroliini) käytetään raudan kompleksointiin, jos halutaan analysoida hyvin pieniä rautapitoisuuksia selektiivisesti. Sen avulla voidaan määrittää jopa 1–100 $\mu\text{g/l}$ rauta(II)-pitoisuuksia (Schilt, 1969). Batofenantroliini muodostaa rauta(II)-kompleksin, jonka absorbanssimaksimi on aallonpituudella 533 nm. Batofenantroliinin rakenne on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3 Batofenantroliinin rakenne. (Vallée, 2015)

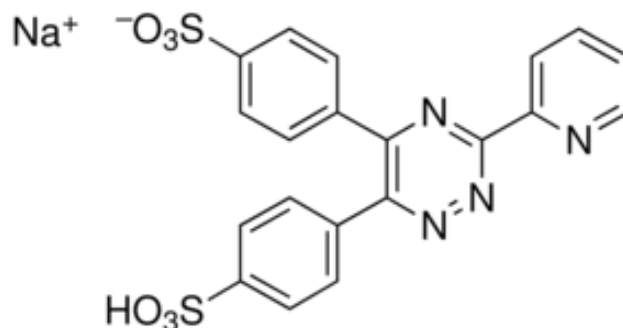
Pollock ja Miguel (1967) käyttivät batofenantroliinia kahdenarvoisen raudan määrittämiseen näytematriisissa, joka sisälsi kahdenarvoiseen rautaan nähden 1000-kertaisen määrän kolmenarvoista rautaa. He käsitelivät näytteen monoammoniumfosfaatilla ja natriumasetaatilla, minkä jälkeen näyte siirrettiin erotussuppiloon neste-nesteuuttoa varten. Suppiloon lisättiin etanoliin liuotettua batofenantroliinia ja kloroformia, minkä jälkeen sitä sekoitettiin ja faasien annettiin erottua. Lopulta orgaaninen faasi, joka nyt sisälsi kompleksoituneen raudan, erotettiin mittapullon. Näyte laimennettiin mittapullon tilavuuteen etanolilla, minkä jälkeen se analysoitiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 540 nm.

Batofenantroliinin käytön etuja muihin reagensseihin verrattuna ovat sen selektiivisyys ja herkkyys sekä mahdollisuus analysoida $\mu\text{g/l}$ -pitoisuuden näytteitä. Reagenssi on kuitenkin erityisesti 1,10-fenantroliiniin verrattuna kallista.

3.1.3 Ferrotsiini

Stookey (1970) esitteli ensimmäisenä ferrotsiinin (3-(2-pyridyyli)-5,6-bis(4-fenyylisulfonihapon natriumsuola)) käyttömahdollisuuksia kokonaisraudan spektrofotometrisessä määrittämisessä. Rauta(II) muodostaa ferrotsiinin kanssa vakaan

kompleksin, joka on väriltään kirkkaan aniliininpunainen, ja jonka absorbanssimaksimi on aallonpituudella 562 nm. Ferrotsiinin rakenne on esitetty kuvassa 4.



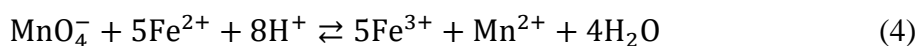
Kuva 4 Ferrotsiinin rakenne. (Watson Noke Scientific, 2018)

Viollier et al. (2000) kehittivät alkuperäistä ferrotsiinin menetelmää siten, että näytteestä voidaan määrittää kokonaisraudan lisäksi rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet. Tässä menetelmässä näytteestä määritetään heti ferrotsiinin lisäämisen jälkeen rauta(II)-pitoisuus, joka sisältää myös kolmenarvoisen raudan aiheuttaman virheen. Seuraavaksi rauta(III) pelkistetään, jolloin kokonaisrautapitoisuus voidaan analysoida. Lopuksi ratkaistaan todelliset rautapitoisuudet laskennallisesti.

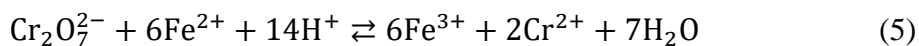
Ferrotsiinin käytön suurin etu on sen erinomainen herkkyys: ferrotsiini-rauta(II)-kompleksin molaarisen absorptiovakion arvo on absorbanssimaksiminsa kohdalla $27900 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ -kompleksille vastaava arvo on $11000 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Suurempi absorptiokertoimen arvo tarkoittaa sitä, että yhdiste absorboi valoa voimakkaammin ja aiheuttaa täten korkeamman piikin spektriin. Lisäksi ferrotsiinia käytettäessä ainoastaan Cu(I) ja Co(II) on todettu aiheuttavan häiriöitä raudan määrittämisessä, joten ferrotsiinilla on hyvin laaja käyttöalue (Stookey, 1970).

3.2 Titrimetria

Rauta(II)- sekä kokonaisrautapitoisuuksia voidaan määrittää titraamalla näyteliuos kaliumpermanganaatilla (KMnO_4) tai kaliumdikromaatilla ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), jotka hapettavat kahdenarvoisen raudan kolmenarvoiseksi raudaksi. Liuoksen värin muutos ilmoittaa titrauksen päätepisteen, jossa kaikki rauta(II) on hapettunut. Liuoksen väri muuttuu kaliumpermanganaattia käytettäessä värittömästä vaaleanpunaiseksi ja kaliumdikromaattia käytettäessä vihreästä violetiksi. Titrauksen päätyttyä hapettuneen raudan määrä voidaan laskea reaktioyhtälöiden stoikiometriian avulla. (University of the West Indies, 2008) Jos titraus tehdään kaliumpermanganaatilla, tapahtuva kokonaisreaktio on yhtälön (4) mukainen.



Kaliumdikromaattia käytettäessä vastaava reaktioyhtälö on muotoa (5).



Reaktioyhtälöiden stoikiometriasta nähdään, että 1 mol manganaattia hapettaa 5 mol kahdenarvoista rautaa ja vastaavasti 1 mol dikromaattia hapettaa 6 mol kahdenarvoista rautaa.

Kaliumpermanganaattiin verrattuna kaliumdikromaatin etuja ovat mahdollisuus käyttää sitä primaaristandardina ja sen reagoimattomuus suolahapon sekä orgaanisten yhdisteiden kanssa. Toisin kuin kaliumpermanganaatti, kaliumdikromaatti vaatii kuitenkin toimiakseen happamat olosuhteet sekä erillisen indikaattorin. Indikaattorina voidaan käyttää esimerkiksi difenyyliamiinia. Näyteliuoksia valmistettaessa ne tulee hapottaa rikkihapolla, sillä suolahappo ja typpihappo aiheuttavat titrauksessa häiriötä. (University of Delhi, n.d.)

3.3 Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi

Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi (CZE) on erotus- ja analyysimenetelmä, joka perustuu varauksellisten komponenttien liikkuvuuteen sähkökentässä. Menetelmässä tutkittava näyte injektoidaan tietyn pH-arvon puskuriliuosta sisältävään kapillaariin, minkä jälkeen systeemiin luodaan sähkökenttä. Tämä saa näytteen komponentit liikkumaan kapillaarin läpi eri nopeuksilla. Kapillaarin loppupuolella on detektori, joka havaitsee erotetut komponentit niiden kulkiessa sen ohitse. (Prince Technologies, n.d.)

Liuosnäytteen rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet voidaan määrittää samanaikaisesti kapillaarivyöhyke-elektroforeesin avulla (Pozdniakova, Padarauskas & Schwedt, 1997). Tässä menetelmässä kahdenarvoinen rauta kompleksoidaan selektiivisesti 1,10-fenantroliinilla ja kolmenarvoinen rauta CDTA:lla (sykloheksaani-trans-1,2-diamiinitetra-asetatti), minkä jälkeen näyte injektoidaan kapillaariin. Kapillaari on varustettu UV-detektorilla, joka mittaa näytteen absorbanssin aallonpituudella 254 nm. Näytteelle optimaalinen pH on 2,0–2,4 ja puskuriliuokselle 9,0.

Kapillaarivyöhyke-elektroforeesin käytön etuna on nopea analyysiaika – näytteestä voidaan määrittää sekä kahden- että kolmenarvoisen raudan pitoisuus yhdellä ajolla, jonka kesto on alle kolme minuuttia. Menetelmää voidaan käyttää näytteille, joiden rauta(II)-pitoisuus on 0,1–5 mg/l ja rauta(III)-pitoisuus 0,2–10 mg/l.

3.4 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

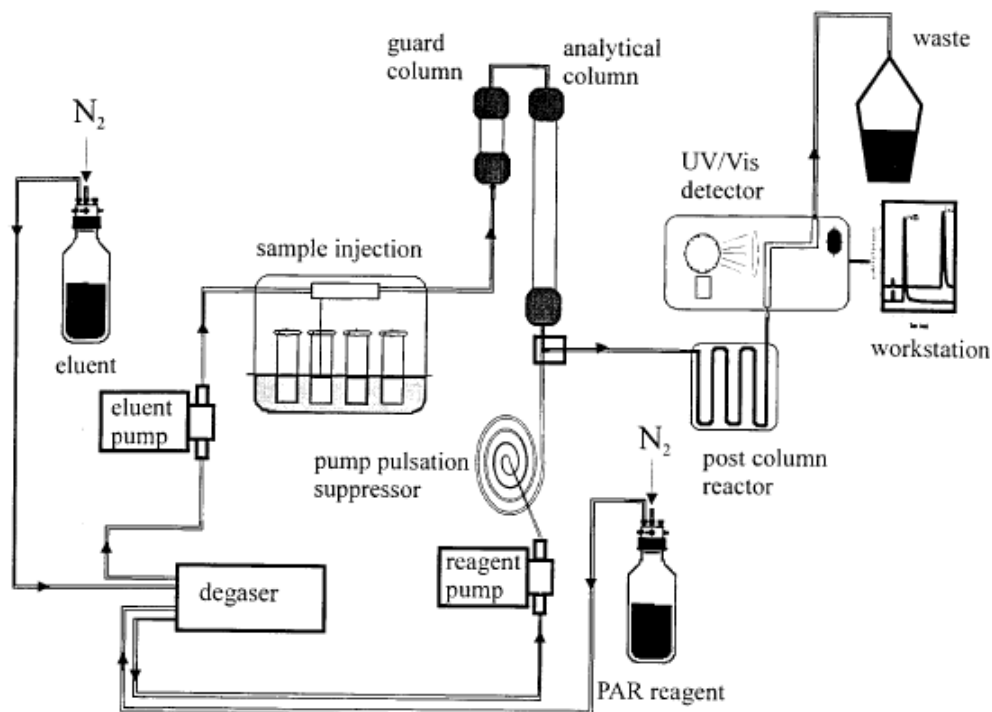
Kromatografisissa erotus- ja analyysimenetelmissä näytteen sisältämät komponentit jakautuvat kahden faasin välille. Näyte kulkee liikkuvan faasin eli eluentin mukana paikallaan pysyvän eli stationaarisen faasin lävitse. Komponentit, jotka vuorovaikuttavat vahvasti stationaarisen faasin kanssa läpäisevät sen hitaammin kuin ne komponentit, joiden vuorovaikutus stationaarisen

faasin kanssa on vähäistä. (Higson, 2004) Toisistaan erottuneiden komponenttien pitoisuudet voidaan havaita ja analysoida detektorin avulla.

Senyuva, Sarica ja Özden (2002) ovat esittäneet menetelmän rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuuksien määrittämiseksi mittausalueella 0,05–2,5 mg/l korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) avulla. Menetelmässä näyte kulkee 2,6-pyridiinidikarboksyylihappopohjaisen eluentin mukana analyysikoloniin, jossa rauta(II) ja rauta(III) erottuvat toisistaan. Tämän jälkeen komponentit sekoittuvat PAR:n (4-(2-pyridylazo)resorcinol) kanssa, jolloin muodostuu värillisiä rautakomplekseja. Kompleksien absorbanssit mitataan UV-detektorilla aallonpituudella 521 nm.

3.5 Ionikromatografia

Schnell, Ratering ja Jansen (1998) ovat esittäneet menetelmän, jossa kahden- ja kolmenarvoisen raudan sekä kahdenarvoisen mangaanin pitoisuudet voidaan määrittää samanaikaisesti ionikromatografian avulla. Mittausalue on tässä menetelmässä kummallekin raudalle 5–500 μM (n. 0,28–28 mg/l). Menetelmässä käytetään täysin metallivapaata kromatografisysteemiä, jonka kaavio on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5 Raudan määrittämiseen käytetty kromatografisysteemi. (Schnell, Ratering & Jensen, 1998)

Menetelmässä eluentina käytetty tartraattipuskuri kuljettaa näytteen suojakolonnin läpi analyysikolonniin, joka on täytetty polymeeripäällystetyllä kationinvaihtohartsilla. Määritettävät komponentit kulkevat kolonnin läpi eri nopeuksilla, minkä jälkeen ne päätyvät reaktoriin, jossa ne käsitellään PAR:lla. Syntyvien rauta(II)- ja rauta(III)-kompleksien absorbanssit mitataan aallonpituudella 520 nm UV-VIS –detektorin avulla.

3.6 Yhteenveto menetelmistä

Taulukossa I on esitetty kirjallisessa osassa esiteltyjen menetelmien tyypillisiä mitta-alueita, häiritseviä komponentteja sekä muita huomionarvoisia asioita. Taulukkoon on myös listattu ne rautapitoisuudet, joita menetelmillä voidaan analysoida. Koska kokonaisrautapitoisuus on yleisesti liuosnäytteissä rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuuksien summa, voidaan kolmas tuntematon pitoisuus laskea, jos kaksi pitoisuutta tunnetaan.

Taulukko I Yhteenveto esitellyistä raudan määrittämenetelmistä.

Menetelmä	Voidaan analysoida	Tyypillinen mittausalue	Häiritsevät komponentit	Muuta huomioitavaa
Spektrofotometria, 1,10-fenantroliini	Fe ²⁺ , Fe _{tot}	0,1 - 10 mg/l (Fe ²⁺)	Ag, Bi, Ni, Co, Cu, Cr, CN ⁻	Esitetyistä reagensseista halvin. Ei sovi näytteille, jotka sisältävät Ag tai Bi
Spektrofotometria, batofenantroliini	Fe ²⁺ , Fe _{tot}	Ei raportoitu	Cu, Co, Ni, Zn, Cd	Esitetyistä reagensseista kallein. Mahdollista analysoida ppb-tason rautamääriä
Spektrofotometria, ferrotsiini	Fe ²⁺ , Fe _{tot}	0,05 - 5 mg/l (Fe ²⁺)	Co, Cu, CN ⁻	-
Ionikromatografia	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	0,28 - 28 mg/l (Fe ²⁺) 0,28 - 28 mg/l (Fe ³⁺)	Ei raportoitu	Tarvitaan UV-detektori sekä jälkikolonnireaktio
Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	0,05 - 2,5 mg/l (Fe ²⁺) 0,05 - 2,5 mg/l (Fe ³⁺)	Ei raportoitu	Tarvitaan UV-detektori sekä jälkikolonnireaktio
Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	0,1 - 5 mg/l (Fe ²⁺) 0,2 - 10 mg/l (Fe ³⁺)	Ei raportoitu	Tarvitaan UV-detektori
Titraus käyttäen KMnO ₄ tai K ₂ Cr ₂ O ₇	Fe ²⁺ , Fe _{tot}	-	Cl ⁻ , HNO ₃	Vaatii toimiakseen g/l-tason rautapitoisuuden

KOKEELLINEN OSA

Kokeellisessa osassa määritettiin kahden- ja kolmenarvoista rautaa sisältävän näytteen hapetuslukuja käyttäen kaliumpermanganaattititrausta, kapillaarielektroforeesia sekä spektrofotometristä menetelmää, jossa hyödynnettiin 1,10-fenantroliinia.

4 KOEJÄRJESTELYT JA MITTAUSTULOSTEN KÄSITTELY

Työssä käytettiin puhdasvettä ja kaikki käytetyt kemikaalit olivat analyysilaatua. Mitta-astiat olivat tarkkuudeltaan A-luokkaa. Lasiastiat happopestiin standardin SFS 3044 mukaisesti täyttämällä ne noin 0,1 M typpihapolla ja antamalla niiden seistä vähintään yön yli. Pesuhappo valmistettiin väkevästä typpihaposta (65 %, Merck).

Kummallekin raudalle valmistettiin 500 ml kantaliuos, jonka pitoisuus oli 1000 mg/l. Rauta(II)-kantaliuos valmistettiin liuottamalla 2,489 g kidevedellistä rauta(II)sulfaattia ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Riedel-de Haën) veteen, johon oli lisätty 1,5 ml väkevää rikkihappoa (95–97 %, Merck) raudan hapettumisen estämiseksi. Rauta(III)-kantaliuos valmistettiin veteen, johon oli lisätty 2 ml väkevää rikkihappoa raudan liukenemisen edistämiseksi. Liuokseen punnittiin 3,617 g rauta(III)nitraattia ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, Merck). Kun kaikki rauta oli liuennut, liuokset laimennettiin mittapullon tilavuuteen vedellä.

Kokeellisia määrittämiä varten valmistettiin kantaliuoksista näyte, joka sisälsi 10 mg/l Fe(II) sekä 10 mg/l Fe(III). Näytteen kokonaisrautapitoisuus oli täten 20 mg/l. Näytteen kokonaisrautapitoisuus mitattiin kokeiden alussa sekä lopussa atomiabsorptiospektrometrisesti liekkimenetelmällä (FAAS) standardin SFS 3047 mukaisesti. FAAS-mittauksilla vahvistettiin, että näytteen kokonaisrautapitoisuus pysyi ajan kuluessa samana. Mittauksissa käytetty laite oli Thermo Scientific iCE 3300 Atomic Absorption Spectrometer. Muut kantaliuoksista valmistetut kalibrointi- ja työliuokset käytettiin samana päivänä niiden valmistuksen kanssa.

4.1 Titraus kaliumpermanganaatilla

Näytteen rauta(II)-pitoisuuden määrittämiseksi titrattiin 10 ml osanäytteitä kaliumpermanganaatilla. Kaliumpermanganaatista valmistettiin 0,1 M kantaliuos liuottamalla 15,803 g kaliumpermanganaattia (Merck) veteen ja laimentamalla liuoksen tilavuus litraksi. Titranteina käytetyt liuokset valmistettiin kantaliuksesta laimentamalla. Titrantit valmistettiin ja käytettiin saman päivän aikana.

Titrauksissa käytettiin 10 ml byrettiä, josta titranttia tiputettiin magneettisekoitettuun näyteastiaan. Titrauksen päätepiste havaittiin siten, että näyte muuttui värittömästä heikon vaaleanpunaiseksi ja säilytti värin yli 30 sekunnin ajan. Tämän jälkeen laskettiin reagoineen raudan määrä titrantin kulutuksen ja reaktioyhtälön (4) stoikiometrian avulla.

Titrauksissa käytettiin titrantteja, joiden kaliumpermanganaattipitoisuudet olivat 2,5 mM, 0,25 mM ja 0,125 mM.

4.2 Spektrofotometrinen määrittäminen 1,10-fenantroliinilla

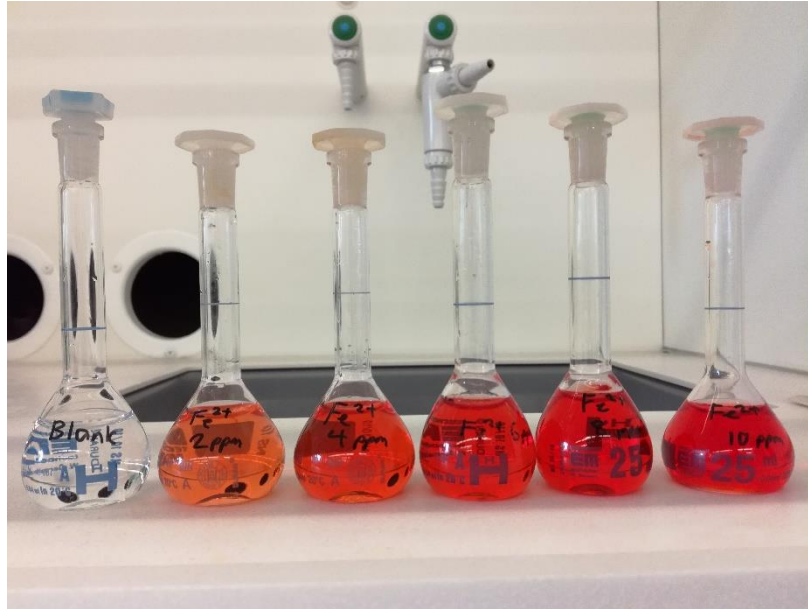
Spektrofotometrisessä analyysissä näytteen rautapitoisuudet määritettiin Harveyn, Smartin ja Amisin (1955) kehittämällä menetelmällä, jossa hyödynnetään 1,10-fenantroliinia raudan kompleksoinnissa värillisiksi yhdisteiksi. Reagenssiliuos, jonka pitoisuus oli 0,3 %, valmistettiin liuottamalla 0,750 g 1,10-fenantroliinimonohydraattia ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, Merck) veteen, jonka lämpötila oli noin 90 °C ja laimentamalla liuos tilavuuteen 250 ml. Mittauksissa käytettiin puskuriliuoksena 0,2 M kaliumvetyftalaattiliuosta, joka valmistettiin liuottamalla 4,084 g kaliumvetyftalaattia ($C_8H_5KO_4$, Merck) veteen 100 ml mittapullossa ja laimentamalla liuoksen tilavuudeksi 100 ml. Puskuriliuoksen pH oli noin 4.

Mittaukset tehtiin Jasco V-670 -spektrofotometrillä ja niissä käytettiin halkaisijaltaan 10 mm kvartsikyvettejä. Spektrit mitattiin aallonpituusvälillä 380–600 nm käyttäen 100 nm/min

nopeutta ja 1 nm mittausintervallia. Spektrien taustana käytettiin rautaa sisältämätöntä nollanäytettä, joka valmistettiin lisäämällä veteen sama määrä reagenssia sekä puskuria kuin näytteisiin ja laimentamalla liuos tilavuuteen 25 ml. Mittausten välissä näytekyvetti huuhdeltiin seuraavaksi mitattavalla liuksella.

Kantaliuoksista valmistettiin kummallekin raudalle kalibroitiliuokset, joiden pitoisuudet olivat 2, 4, 6, 8 ja 10 mg/l. Kalibroitiliuokset ja näytteet valmistettiin 25 ml mittapulloihin, ja niihin lisättiin halutun rautapitoisuuden lisäksi 10 ml 0,3 % fenantroliiniliuosta, mikä on riittävä ylimäärä värin nopeaan ja täydelliseen muodostumiseen (Harvey, Smart & Amis, 1955). Tämän jälkeen pulloon lisättiin 5 ml 0,2 M kaliumvetyftalaattipuskuria näytteen pH:n säätämiseksi välille 3–5, jolloin rautojen kalibroitisuorat leikkaavat toisensa aallonpituudella 396 nm. Lopulta liuoksen tilavuudeksi laimennettiin 25 ml lisäämällä pulloon vettä. Koska kolmenarvoisen raudan muodostama $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ -kompleksi ei ole stabiili, kalibroitiliuokset ja näytteet mitattiin välittömästi niiden valmistamisen jälkeen.

Kalibroitiliuoksia valmistettaessa huomattiin, että $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ -kompleksi on väriltään voimakkaan punainen ja $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ -kompleksi haaleamman keltainen. Rauta(II)-kalibroitiliuokset on esitetty kuvassa 6 ja rauta(III)-liuokset kuvassa 7.



Kuva 6 Rauta(II)-kalibrintiliuokset, joiden pitoisuudet olivat (vasemmalta oikealle): 0, 2, 4, 6, 8 ja 10 mg/l.



Kuva 7 Rauta(III)-kalibrintiliuokset, joiden pitoisuudet olivat (vasemmalta oikealle): 0, 2, 4, 6, 8 ja 10 mg/l.

Tutkittavia näytteitä verrattiin rauta(II)-kalibrintisuoriin aallonpituuksilla 396 sekä 512 nm. Aallonpituudelta 396 nm luettiin näytteen kokonaisrautapitoisuus ja aallonpituudelta 512 nm

alustava rauta(II)-pitoisuus. Näytteen rauta(III)-pitoisuudelle voitiin tällöin laskea alustava arvo näiden erotuksesta. Tarkkojen rautapitoisuuksien selvittämiseksi tehtiin laskennallinen korjaus. Korjausta varten luettiin rauta(III)-kalibrointisuoralta alustavaa rauta(III)-pitoisuutta vastaava absorbanssi aallonpituudella 512 nm, joka vähennettiin näytteen luetusta absorbanssista aallonpituudella 512 nm. Tällöin saatiin selville näytteen se absorbanssi, joka aiheutui aallonpituudella 512 nm ainoastaan rauta(II)-kompleksin vaikutuksesta. Tämän absorbanssin avulla luettiin tarkka rauta(II)-pitoisuus, joka vähennettiin kokonaisrautapitoisuudesta tarkan rauta(III)-pitoisuuden määrittämiseksi.

4.3 Määrittys kapillaarielektroforeesilla

Näytteen rautapitoisuudet määritettiin kapillaarielektroforeesilla käyttäen Lappeenrannan teknillisessä yliopistossa kehitettyä menetelmää. Menetelmässä käytetty puskuriliuos valmistettiin liuottamalla 2,6-pyridiiniidikarboksylihappoa (Merck) ja tetrametyyliammoniumhydroksidia (Merck) veteen. Käytetty analysilaitte oli diodirividetektorilla (DAD) varustettu Beckman Coulter P/ACE™ MDQ.

Rauta(II)- ja rauta(III)-kantaliuoksista valmistettiin kalibrointiliuokset, jotka sisälsivät 1, 5, 10, 15 ja 20 mg/l kumpaakin rautaa. Elektroferogrammiin muodostuneiden piikkien pinta-alat määritettiin integroimalla, minkä jälkeen näytteen rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet määritettiin vertaamalla niiden muodostamien piikkien pinta-aloja kalibrointisuoraan. Kokonaisrautapitoisuus määritettiin laskemalla rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet yhteen.

4.4 Mittaustulosten tilastollinen käsittely

Kaikissa käytetyissä analyysimenetelmissä suoritettiin kolme mittausta, joiden avulla tuloksille laskettiin epävarmuudet 95 % luottamustasolla. Mittaustulosten keskiarvon laskemisen jälkeen laskettiin keskihajonta yhtälöllä (6).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

jossa	s	keskihajonta
	n	mittausten lukumäärä
	x_i	mittaustulos
	\bar{x}	mittaustulosten keskiarvo

Keskiarvon keskihajonta laskettiin yhtälöllä (7).

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

jossa	$s_{\bar{x}}$	keskiarvon keskihajonta
-------	---------------	-------------------------

Epävarmuus laskettiin yhtälöllä (8).

$$u = k \cdot s_{\bar{x}} \quad (8)$$

jossa	u	epävarmuus
	k	kattavuuskerroin

Kattavuuskertoimelle käytettiin 95 % luottamuvälillä arvoa 2. Kaikki tulokset raportoitiin muodossa $\bar{x} \pm u$.

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

5.1 Titraus

Valmistetun näytteen rauta(II)-pitoisuuden määrittämiseksi otettiin 10 ml osanäytteitä, jotka titrattiin lisäämällä niihin titrantina käytettyä kaliumpermanganaattiliuosta sen verran, että liuoksen väri muuttui värittömästä haalean vaaleanpunaiseksi. Näytteen sisältämä rauta(II)-pitoisuus laskettiin reaktioyhtälön (4) stoikiometrian sekä titrantin kulutuksen avulla. Titrauksilla saadut tulokset ja niiden poikkeamat näytteen todellisesta rauta(II)-pitoisuudesta on esitetty taulukossa II.

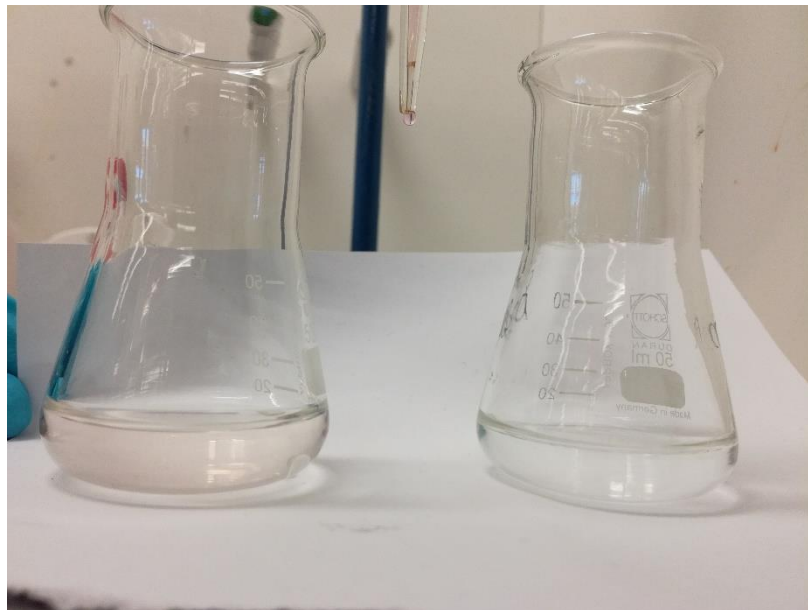
Taulukko II Titrausten tulokset. Titratut näytteet olivat tilavuudeltaan 10 ml ja niiden rauta(II)-pitoisuudet olivat 10 mg/l.

Titranin pitoisuus, mM	2,5	0,25	0,125
Havaittu Fe(II)-pitoisuus, mg/l	23,50 ± 2,03	13,82 ± 0,28	11,96 ± 0,28
Poikkeama todellisesta pitoisuudesta, mg/l	13,50	3,82	1,96
Poikkeama todellisesta pitoisuudesta, %	135	38,2	19,6

Taulukosta II nähdään, että laimeamman titrantin käyttäminen paransi tulosten tarkkuutta huomattavasti. Titranin laimentaminen on kuitenkin käytännöllistä vain tiettyyn pisteeseen asti, sillä laimeampi titrantti aiheuttaa haaleamman värin muutoksen titrauksen päätepisteessä ja vaikeuttaa sen havaitsemista. Kuvissa 8 ja 9 on esitetty titrauksen värin muutokset 0,25 mM ja 0,125 mM titrannteja käytettäessä.



Kuva 8 Näytteen väri titrauksen alussa (vas.) ja lopussa (oik.), kun titrantin pitoisuus oli 0,25 mM.



Kuva 9 Näytteen väri titrauksen lopussa (vas.) ja alussa (oik.), kun titrantin pitoisuus oli 0,125 mM.

Kuvasta 9 nähdään, että titrauksessa tapahtuva värin muutos on laimeimmalla käytetyllä titrantilla hyvin haalea. Kuitenkin taulukon II mukaan tuloksen poikkeama näytteen todellisesta

rauta(II)-pitoisuudesta on tällä titrantilla lähes 20 %. Titrauksista saatujen tulosten valossa näyttää siltä, että 10 mg/l on liian pieni rauta(II)-pitoisuus määritettäväksi luotettavasti kaliumpermanganaattititrauksella.

5.2 Spektrofotometria

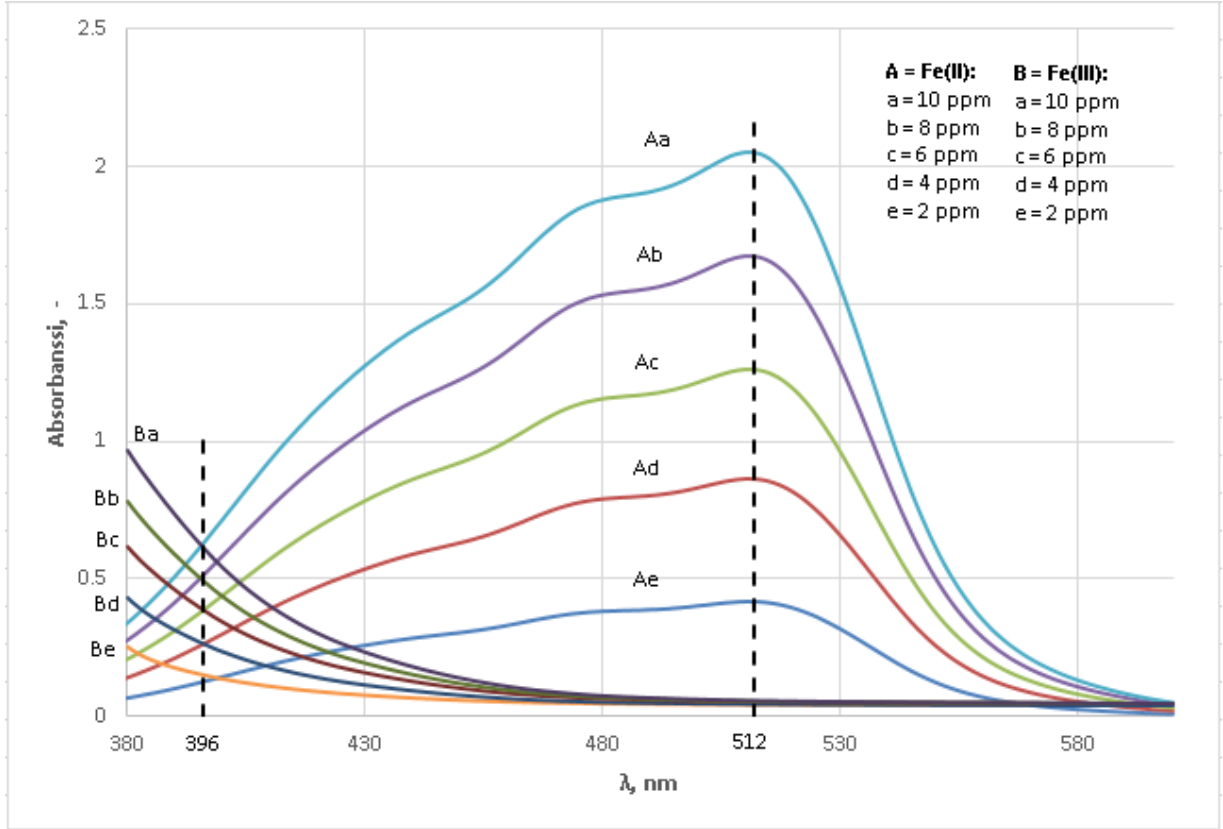
Näytteen rauta(II)- ja kokonaisrautapitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti vertaamalla sen absorbanssia rauta(II)-liuoksilla tehtyihin kalibrointisuoriin aallonpituuksilla 512 ja 396 nm. Rauta(III)-pitoisuus määritettiin laskennallisesti. Tämän jälkeen määritettiin näytteelle tarkempi rauta(II)/rauta(III)-suhde rauta(III)-kalibrointiliuosten avulla. Spektrofotometrisen määrittelyn tulokset ja niiden poikkeamat näytteen todellista rautapitoisuuksista on esitetty taulukossa III.

Taulukko III Raudan spektrofotometrisen määrittelyn tulokset. Näytteen todellinen kokonaisrautapitoisuus oli 20 mg/l ja rauta(II)- sekä rauta(III)-pitoisuudet olivat 10 mg/l.

	Fe_{tot}	Fe(II)	Fe(III)
Havaittu pitoisuus, mg/l	18,40 ± 0,03	8,74 ± 0,05	9,66 ± 0,02
Poikkeama todellisesta, mg/l	-1,60	-1,26	-0,34
Poikkeama todellisesta, %	7,98	12,56	3,40

Taulukosta III nähdään, että näytteen mitattu rauta(II)-pitoisuus poikkesi eniten ja laskettu rauta(III)-pitoisuus vähiten todellisista pitoisuuksista. Mitattu kokonaisrautapitoisuus poikkesi kuitenkin lähes 8 % näytteen todellisesta kokonaisrautapitoisuudesta, ja koska rauta(III)-pitoisuus määritettiin laskennallisesti kokonaisrautapitoisuuden ja rauta(II)-pitoisuuden avulla, havaittu kokonaisrautapitoisuus vaikutti suoraan laskettuun rauta(III)-pitoisuuteen. Jos kaikki rauta olisi siis havaittu, tulokseksi saatu rauta(III)-pitoisuus olisi ollut yli 10 mg/l.

Kokonaisrautapitoisuuden määrittelyssä tapahtunutta virhettä voidaan selittää tarkastelemalla kalibrointiliuosten spektrejä, jotka on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10 Rauta(II)- ja rauta(III)-kalibrointiliuosten spektrit aallonpituusvälillä 380–600 nm.

Teorian mukaan 1,10-fenantroliinilla kompleksoitujen keskenään yhtä vahvojen rauta(II)- ja rauta(III)-liuosten spektrien pitäisi leikata toisensa aallonpituudella 396 nm, sillä tällä aallonpituudella raudan ja fenantroliinin muodostamilla rauta(II)- ja rauta(III)-komplekseilla on sama absorbanssivakio (Harvey, Smart & Amis, 1955). Kuvassa 10 nähdään kuitenkin leikkauspisteissä poikkeamia, jotka aiheuttavat virhettä menetelmällä määritettyihin kokonaisrauta- ja rauta(III)-pitoisuuksiin. Suurin poikkeama nähdään pitoisuuden 2 mg/l kalibrointiliuksilla, joiden leikkauspiste poikkeaa noin 3 nm teoreettisesta leikkauspisteestä. Menetelmän tarkkuus on siis mahdollisesti heikentynyt liuosten pitoisuuksien laskiessa 2 mg/l-tasolle.

5.3 Kapillaarielektroforeesi

Näytteen rautapitoisuudet määritettiin kapillaarielektroforeesin avulla. Menetelmässä mitattiin kapillaarissa kulkevan näytteen absorbanssia DAD-detektorin avulla, jolloin rautojen poistuminen kapillaarista muodosti piikit elektroferogrammiin. Näytteen rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet määritettiin vertaamalla muodostuneiden piikkien pinta-aloja kalibrointisuoraan, ja kokonaisrautapitoisuus määritettiin laskemalla rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet yhteen. Elektroforeesin tulokset ja niiden poikkeamat näytteen todellisista pitoisuuksista on esitetty taulukossa IV.

Taulukko IV Kapillaarielektroforeesilla määritetyt rautapitoisuudet sekä niiden poikkeamat näytteen todellisista rautapitoisuuksista, jotka olivat 20 mg/l (Fe_{tot}) ja 10 mg/l (Fe(II) sekä Fe(III)).

	Fe_{tot}	Fe(II)	Fe(III)
Tulos, mg/l	20,71 ± 0,41	9,68 ± 0,39	11,24 ± 0,63
Poikkeama todellisesta, mg/l	0,71	-0,32	1,24
Poikkeama todellisesta, %	3,54	3,18	12,36

Taulukosta IV nähdään, että elektroforeesilla määritetyt kokonaisrauta- ja rauta(II)-pitoisuudet olivat melko tarkkoja, sillä ne poikkesivat todellisista pitoisuuksista alle 4 %. Rauta(III)-pitoisuus poikkesi kuitenkin todellisesta pitoisuudesta yli 12 %. Taulukosta nähdään myös, että tulosten epävarmuudet olivat melko suuria – rauta(III)-pitoisuuden epävarmuus oli lähes 6 % mittaustulosten keskiarvosta. Epävarmuus selittyy sillä, että elektroferogrammin pohjaviiva ei ollut täysin tasainen, vaan siinä näkyvä kohina oli kohtalaisen suurta rautojen muodostamien piikkien pieniin kokoihin nähden.

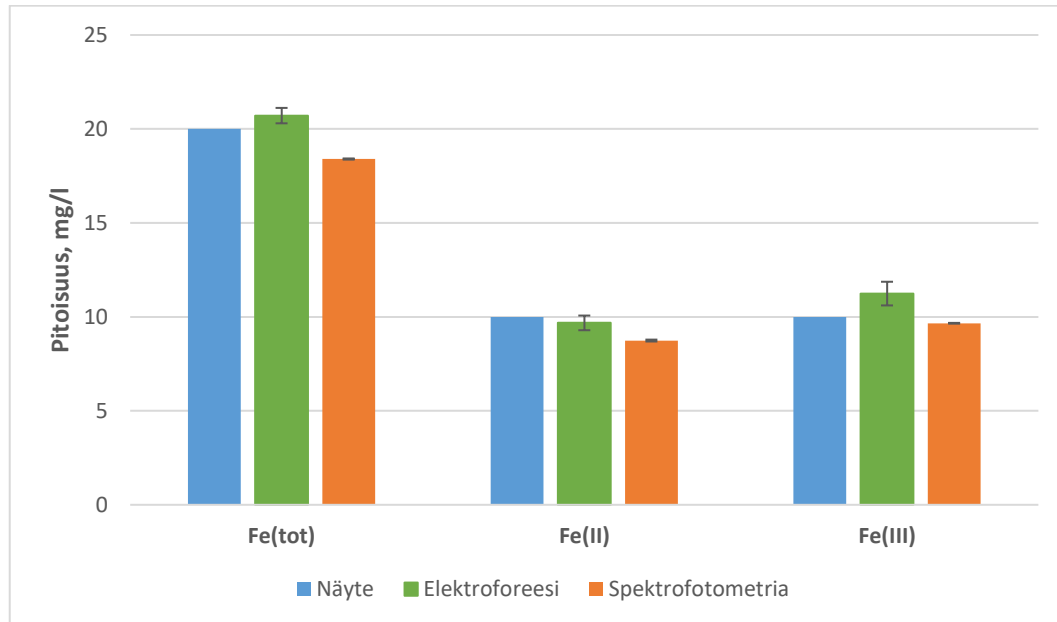
5.4 Yhteenvedo kokeellisesta osasta

Kokeellisessa osassa valmistettiin näyte, jonka rauta(II)- ja rauta(III)-pitoisuudet olivat 10 mg/l. Näytteen kokonaisrautapitoisuus oli siis 20 mg/l. Näytteen rautapitoisuuksia analysoitiin

kaliumpermanganaattititrauksella, spektrofotometrialla sekä kapillaarielektroforeesilla. Näytteen kokonaisrautapitoisuus tarkastettiin myös kokeellisen osan aikana kahdesti atomiabsorptiospektrometrisesti liekkimenetelmällä standardin SFS 3047 mukaisesti. Määritysten tulokset sekä niiden poikkeamat näytteen todellisista rautapitoisuuksista on esitetty kokonaisuudessaan taulukossa V ja elektroforeesin sekä spektrofotometrian osalta kuvassa 11.

Taulukko V Kaikkien kokeellisessa osassa tehtyjen määritysten tulokset. Näytteen Fe(II)- ja Fe(III)-pitoisuudet olivat 10 mg/l ja kokonaisrautapitoisuus 20 mg/l.

Analyysi	Fe(II)		Fe(III)		Fe _{tot}	
	Tulos, mg/l	Poikkeama todellisesta, %	Tulos, mg/l	Poikkeama todellisesta, %	Tulos, mg/l	Poikkeama todellisesta, %
AAS 1	-	-	-	-	19,50 ± 0,07	2,51
AAS 2	-	-	-	-	21,02 ± 0,01	5,10
Titraus, 2,5 mM KMnO ₄	23,50 ± 2,03	135	-	-	-	-
Titraus, 0,25 mM KMnO ₄	13,82 ± 0,28	38,20	-	-	-	-
Titraus, 0,125 mM KMnO ₄	11,96 ± 0,28	19,60	-	-	-	-
Spektrofotometria	8,74 ± 0,05	12,56	9,66 ± 0,02	3,40	18,40 ± 0,03	7,98
Kapillaarielektroforeesi	9,68 ± 0,39	3,18	11,24 ± 0,63	12,36	20,71 ± 0,41	3,54



Kuva 11 Elektroforeesin ja spektrofotometrian tulokset verrattuna näytteen todellisiin rautapitoisuuksiin.

Taulukosta V ja kuvasta 11 nähdään, että kapillaarielektroforeesilla saatiin tarkimmat tulokset kokonaisrauta- ja rauta(II)-pitoisuuksille, mutta tulosten epävarmuudet olivat melko suuria. Spektrofotometrialla sen sijaan saatiin tarkin tulos rauta(III)-pitoisuudelle, ja tulosten epävarmuudet olivat hyvin pieniä. Lisäksi nähdään, että spektrofotometrialla sekä elektroforeesilla saatiin tulokseksi korkeampi rauta(III)- kuin rauta(II)-pitoisuus. On siis mahdollista, että näytteen rauta(II)-rauta(III)-tasapaino siirtyi happokäsittelystä huolimatta ajan myötä hieman raudan(III) puolelle. Taulukosta V nähdään myös, että titrauksella määritetyn rauta(II)-pitoisuuden poikkeama todellisesta pitoisuudesta oli laimeimmallakin titrantilla lähes 20 %.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän työn kirjallisessa osassa etsittiin kirjallisuudesta menetelmiä, joita on käytetty raudan hapetuslukujen analysointiin liuosnäytteistä. Kokeellisessa osassa valmistettiin näyte, jonka rauta(II)- sekä rauta(III)-pitoisuudet olivat 10 mg/l ja kokonaisrautapitoisuus 20 mg/l. Näytteen

rautapitoisuudet määritettiin käyttämällä kaliumpermanganaattititrausta, Lappeenrannan teknillisessä yliopistossa kehitettyä kapillaarielektroforeesimenetelmää sekä Harveyn, Smartin ja Amisin (1955) kehittämää spektrofotometristä menetelmää, joka perustuu 1,10-fenantroliinin käyttöön.

Raudan hapetuslukuja voidaan analysoida spektrofotometrialla, kromatografialla, kapillaarielektroforeesilla tai redox-titrauksella. Spektrofotometriset menetelmät ovat eniten käytettyjä, sillä ne ovat yksinkertaisia, luotettavia ja kustannustehokkaita. Tavallisesti spektrofotometrisissä määrityksissä käytetään reagenssina 1,10-fenantroliinia, mutta erityistapauksissa voidaan tarkentaa tuloksia ja laajentaa käyttöaluetta käyttämällä kalliimpaa reagenssia, kuten batofenantroliinia tai ferrotsiinia. Spektrofotometrian käyttöä rajoittaa kuitenkin sen alttius muiden näytteessä mahdollisesti olevien komponenttien aiheuttamille virheille. Näitä virheitä voidaan eliminoida käyttämällä kromatografiaa tai elektroforeesia, jotka ovat spektrofotometriaa monimutkaisempia menetelmiä. Titraus sen sijaan on helppo, nopea sekä taloudellinen määritysmenetelmä, mutta se vaatii toimiakseen muita menetelmiä suuremman rautapitoisuuden.

Kokeellisessa osassa määritettiin näytteen rautapitoisuuksia titrauksella, spektrofotometrialla sekä kapillaarielektroforeesilla. Titrausten yhteydessä huomattiin, että titrantin laimentaminen tarkensi mittaustuloksia merkittävästi – kun titrantti laimennettiin pitoisuudesta 2,5 mM pitoisuuteen 0,125 mM, tulosten poikkeama näytteen todellisesta pitoisuudesta laski 135 %:sta 20 %:iin. Titrantti laimentaminen vaikeutti kuitenkin samalla titrauksen päätepisteen havaitsemista. Titrauksella ei saatu riittävän luotettavasti määritettyä näytteen rautapitoisuuksia, mikä oli odotettavissa, sillä titrauksen tiedettiin vaativan toimiakseen muita käytettyjä menetelmiä suuremman rautapitoisuuden (taulukko I). Titraus voisi siis toimia paremmin testattua väkevämmälle näytteelle.

Näytteen kokonaisrauta-, rauta(II)- sekä rauta(III)-pitoisuudet määritettiin onnistuneesti kapillaarielektroforeesilla ja spektrofotometrialla. Elektroforeesilla saadut tulokset olivat rauta(II)- ja kokonaisrautapitoisuuksien osalta lähempänä näytteen todellisia pitoisuuksia; rauta(II)-pitoisuuden poikkeama oli 3,2 % ja kokonaisrautapitoisuuden 3,5 %.

Spektrofotometrialla saatujen tulosten epävarmuudet olivat kuitenkin merkittävästi pienempiä, suurimmillaan 0,05 mg/l. Työssä tehtyjen kokeiden perusteella kumpikin menetelmä oli siis käyttökelpoinen analysoidun näytteen rautapitoisuuksien määrittämiseksi, mutta parhaat tulokset saatiin elektroforeesilla.

Jatkotutkimuksessa voitaisiin verrata kromatografisilla menetelmillä saatavia tuloksia tässä työssä tutkituilla menetelmillä saatuihin tuloksiin. Kaliumpermanganaattititrausta tulisi kokeilla suuremman rauta(II)-pitoisuuden näytteille ja titrauksia olisi mahdollista tehdä myös kaliumdikromaatilla. Spektrofotometriaa voitaisiin myös kokeilla eri reagensseilla. Lisäksi rinnakkaismittausten määrän kasvattaminen pienentäisi mahdollisesti mittausepävarmuuksia.

LÄHDELUETTELO

American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 1975. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 14th ed. Washington, DC: American Public Health Association, pp. 207-213.

Briat, J., 2007. Iron Dynamics in Plants, *Advances in Botanical Research*, Vol. 46, p. 137.

Clark, J., 2013. *Oxidation states (oxidation numbers)*, [online]. Saatavissa: <https://www.chemguide.co.uk/inorganic/redox/oxidnstates.html> [Viitattu 11.1.2018]

Fortune, W.B. & Mellon, M.G., 1938. Determination of Iron with o-Phenanthroline: a spectrophotometric study, *Industrial and Engineering Chemistry – Analytical edition*, Vol. 10(2), pp. 60-54.

Greenwood, N. & Earnshaw A., 1984. *Chemistry of the Elements*. Oxford: Pergamon Press Ltd., pp. 1263-1274.

Harvey, A.E., Smart, J.A. & Amis, E.S., 1955. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Iron(II) and Total Iron with 1,10-Phenanthroline, *Analytical Chemistry*, Vol. 27(1), pp. 26-29.

Higson, S., 2004. *Analytical Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, pp. 211-212

Illinois Department of Public Health, 2010. *Iron In Drinking Water*, [online]. Saatavissa: <http://www.idph.state.il.us/envhealth/factsheets/ironfs.htm> [Viitattu 8.2.2018]

Marczenko, Z. & Balcerzak, M., 2000. *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 26-52.

Mountain Empire Community College, n.d. *Chemical Reactions*, [online]. Saatavissa: <http://water.me.vccs.edu/courses/env211/lesson6.htm> [Viitattu 18.1.2018]

Podzdniakova, S., Padarauskas, A. & Schwedt, G., 1997. Simultaneous determination of iron(II) and iron(III) in water by capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 351(1), pp. 41-48.

Pollock, E. & Miguel, A., 1967. Determination of iron(II) in the presence of thousand-to-one ratio of iron(III) using bathophenanthroline, *Analytical Chemistry*, Vol. 39(2), p. 272.

Prince Technologies, n.d. *Introduction to Capillary Electrophoresis*, [online]. Saatavissa: <http://www.princetechnologies.eu/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/> [Viitattu 5.2.2018]

Senyuva, H., Sarica, D. & Özden, T., 2002. Simultaneous Determination of Fe(II) and Fe(III) in Pharmaceutical Samples by Post-Column Derivatization/HPLC, *Turkish Journal of Chemistry*, Vol. 25(3), pp. 425-430.

Schilt, A., 1969. *Analytical Applications of 1,10-phenanthroline and Related Compounds*. Oxford: Pergamon Press Ltd., pp. 56-59.

Schnell, S., Ratering, S. & Jansen, K.-H., 1998. Simultaneous determination of iron(III), iron(II), and manganese(II) in environmental samples by ion chromatography, *Environmental Science and Technology*, Vol. 32(10), pp. 1530-1537.

Stookey, L.L., 1970. Ferrozine – A New Spectrophotometric Reagent for Iron, *Analytical Chemistry*, Vol. 42(7), pp. 779-781.

Suomen Standardisoimisliitto, 1980. SFS 3044 – *Veden, lietteen ja sedimentin metallipitoisuudet. Määrittäminen atomiabsorptiospektrometrisesti liekkimenetelmällä. Yleisiä periaatteita ja ohjeita*. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.

Suomen Standardisoimisliitto, 1980. SFS 3047 – *Veden, lietteen ja sedimentin metallipitoisuudet. Määrittäminen atomiabsorptiospektrometrisesti liekkimenetelmällä. Erityisohjeita kadmiumille, koboltille, kuparille, lyijylle, nikkelille, raudalle ja sinkille.* Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.

University of Delhi, n.d. *Redox titrations*, [pdf]. Saatavissa: http://vle.du.ac.in/file.php/154/5_expt_4_inorg_labmanual.pdf [Viitattu 1.2.2018]

University of the West Indies, 2008. *Determination of iron using potassium dichromate: Redox indicators*, [online]. Saatavissa: http://wwwchem.uwimona.edu.jm/lab_manuals/c10expt31.html [Viitattu 1.2.2018]

Vallée, F, 2015. Bathophenanthroline. Julkaisussa: A. Charette, ed., *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Reagents for Heteroarene Functionalization*, 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons Inc., p. 31.

Vance, D., 1994. IRON – THE ENVIRONMENTAL IMPACT OF A UNIVERSAL ELEMENT, *National Environmental Journal*, Vol. 4(3), pp. 24-25.

Viollier, E., Inglett P., Hunter K., Roychoudhury, P. & Van Cappellen, P., 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters, *Applied Geochemistry*, Vol. 15(6), pp. 785-790.

Watson Noke Scientific, 2018. *Ferrozine Monosodium salt CAS 69898-45-9*, [online]. Saatavissa: <https://www.watsonnoke.com/ferrozine-monosodium-salt-cas-69898-45-9/> [Viitattu 31.1.2018]

Wehli, B., 1990. Redox reactions of metal ions at mineral surfaces. Julkaisussa: W. Stumm, ed., *Aquatic Chemical Kinetics: Reaction Rates of Processes in Natural Waters*, 1st ed. New York: John Wiley & Sons Inc., pp. 324-327.

Wiberg, E. & Holleman, A., 2001. *Inorganic Chemistry*. California: Academic Press, p. 1440.

Zumdahl, S.S. & Zumdahl S.A., 2007. *Chemistry*. 7th ed. Boston: Houghton Mifflin Company, pp. 814-815.