



Raita Martiskainen

Nanoselluloosan pintavarauksen määrittäminen konduktometrisellä titrauksella

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

14.11.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Raita Martiskainen
Otsikko:	Nanoselluloosan pintavarauksen määrittäminen konduktometrisellä titrauksella
Sivumäärä:	36 sivua + 3 liitettä
Aika:	14.11.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Professori Antti Haapala Yliopettaja Jukka Niiranen

Opinnäytetyön aiheena oli nanoselluloosan pintavarauksen, toisin sanoen karboksyyli-
lipitoisuuden, määrittäminen konduktometrisellä titrauksella. Työn tavoitteena oli testata
erilaisia tapoja määrittää lineaaristen alueiden leikkauspisteet konduktometrisellä
titrauksella saaduista titrauskäyristä ja saatujen tulosten perusteella arvioida parhai-
ten soveltuva tapa nanoselluloosanäytteiden karboksyyli-
lipitoisuuden määrittämiseen. Lisäksi tavoitteena oli arvioida käytössä olevan titrausmenetelmän toistettavuutta ja
oikeellisuutta sekä tutkia TEMPO-avusteisen hapetuksen reaktioajan vaikutusta
nanoselluloosan karboksyyli-
lipitoisuuteen.

Työ toteutettiin analysoimalla erilaisia kaupallisia sekä TEMPO-avusteisella hapetuk-
sella itse valmistettuja nanoselluloosanäytteitä. Esimittauksissa kaupallisten näyttei-
den karboksyyli-
lipitoisuudet määritettiin käsittelemällä titrauksista saatu data sekä
RStudiolla että kuvankäsittelyohjelmalla. Saatuja tuloksia verrattiin valmistajan ilmoit-
tamiin karboksyyli-
lipitoisuuksiin. Tulosten perusteella todettiin, että kuvankäsittelyoh-
jelma soveltuu paremmin näytteiden karboksyyli-
lipitoisuuden määrittämiseen. Mene-
telmän toistettavuutta ja oikeellisuutta arvioitiin tarkemmilla mittauksilla määrittämällä
tuloksista keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta sekä vertaamalla mit-
taamalla saatuja pitoisuuksia valmistajan ilmoittamiin pitoisuuksiin t-testillä.

Itse valmistettujen TEMPO-hapetettujen näytteiden karboksyyli-
lipitoisuus nousi 45 mi-
nuutin reaktioajan jälkeen ja oli korkeimmillaan 90 minuutin reaktioajalla. Optimaai-
liseksi reaktioajaksi TEMPO-avusteisessa hapetuksessa arvioitiin 75–90 minuuttia.
Toistettavuusmittauksissa kahden näytteen suhteellisiksi keskihajonnoiksi saatiin
6,67 ja 6,32 %. Suhteelliset keskihajonnat arvioitiin pieniksi ja menetelmä sen myötä
toistettavaksi. Oikeellisuusmittaukset kuitenkin osoittivat, että mittaamalla saadut tu-
lokset erosivat merkittävästi tunnetusta arvosta 95 %:n luottamustasolla. Menetel-
mää voisi vielä jatkossa kehittää parempien tulosten saamiseksi.

Avainsanat:	Nanoselluloosa, pintavaraus, konduktometrinen titraus, TEMPO-avusteinen hapetus
-------------	--

Abstract

Author: Raita Martiskainen
Title: The Determination of Surface Charge of Nanocellulose with Conductometric Titration
Number of Pages: 36 pages + 3 appendices
Date: 14 November 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Supervisors: Antti Haapala, Professor
Jukka Niiranen, Principal Lecturer

The topic of this thesis work was the determination of surface charge, i.e. the carboxyl content, of nanocellulose by conductometric titration. The aims of the project were to test two different methods to determine the intersection points of the linear portions of the titration curves obtained with conductometric titration, to evaluate the suitability of these methods in the determination of carboxyl content of nanocellulose samples, to evaluate the repeatability and trueness of the method, and to study the effect of reaction time in TEMPO-mediated oxidation on the carboxyl content of nanocellulose.

Different kinds of commercial nanocellulose samples, as well as samples prepared with TEMPO-mediated oxidation, were analyzed with conductometric titration. In the first series of analyses, the carboxyl content of the commercial samples was determined by processing the data obtained from the titrations with RStudio and an image processing program, and the results were compared with the carboxyl content given by the manufacturer. The results showed that the image processing program is a more suitable method in the determination of carboxyl content of nanocellulose. The repeatability and trueness of the method were evaluated by doing another series of more extensive measurements, by calculating the mean, standard deviation and relative standard deviation from the results, and by comparing the results of the measurements to the known carboxyl content of the samples with a t-test.

The carboxyl content of TEMPO-oxidized samples increased after a reaction time of 45 minutes and was at its highest with a reaction time of 90 minutes. The results suggested that the ideal reaction time for TEMPO-mediated oxidation is 75–90 minutes. The relative standard deviations of two samples were 6.67 and 6.32 %, and the method was seen to have good repeatability. However, the results of the t-test showed that the measured carboxyl content of a commercial nanocellulose sample differed significantly from the known value within 95 % confidence level, which suggests that the method could be further developed.

Keywords: Nanocellulose, surface charge, conductometric titration, TEMPO-mediated oxidation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Nanoselluloosan valmistus, ominaisuudet ja käyttösovellukset	2
3	Pintavarauksen merkitys ja analyysimenetelmät	6
4	TEMPO-avusteinen hapetus	9
5	Materiaalit ja laitteet	12
5.1	Laitteet	12
5.2	Reagenssit	14
5.3	Näytteet	14
6	Työn suoritus	15
6.1	Nanoselluloosan valmistus TEMPO-avusteisella hapetuksella	15
6.2	Konduktometrinen titraus	20
7	Tulokset	23
7.1	Esimittaukset ja eri tulostenkäsittelytapojen soveltuvuuden arviointi	23
7.2	TEMPO-reaktioajan vaikutus nanoselluloosan karboksyyliipitoisuuteen	27
7.3	Menetelmän toistettavuus	28
7.4	Menetelmän oikeellisuus	30
8	Yhteenveto	32
	Lähteet	35

Liitteet

Liite 1: R-skripti

Liite 2: Nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuudet esimittauksissa

Liite 3: Nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuudet toistettavuus- ja oikeellisuusmittauksissa

Lyhenteet

- BC: *Bacterial cellulose*, bakteeriselluloosa. Bakteerien avulla glukoosista tuotettu nanoselluloosa.
- CNC: *Cellulose nanocrystals*, selluloosananokiteet. Voimakkaiden happojen avulla valmistettu nanoselluloosa.
- CNF: *Cellulose nanofibrils*, selluloosananofibrillit. Mekaanisella käsittelyllä valmistettu nanoselluloosa.
- SEM: *Scanning electron microscopy*, pyyhkäiselektronimikroskopia.
- TEM: *Transmission electron microscopy*, läpäiselektronimikroskopia.
- TEMPO: 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyyli. Orgaaninen yhdiste, jota käytetään muun muassa selluloosakuitujen kemiallisessa esikäsittelyssä.
- TOCN: *TEMPO-oxidized cellulose nanofibers*, TEMPO-hapetetut selluloosananokuidut.

1 Johdanto

Selluloosananomateriaali eli nanoselluloosa on selluloosakuitua sisältävistä raaka-aineista valmistettua materiaalia, jonka ulkoisista mitoista ainakin yksi on suuruusluokkaa 1–100 nanometriä. Sitä valmistetaan muun muassa puusta, kasveista, eläimistä tai bakteerien avulla erilaisilla mekaanisilla, kemiallisilla ja entsyymaattisilla menetelmillä. [1, s. 8.]

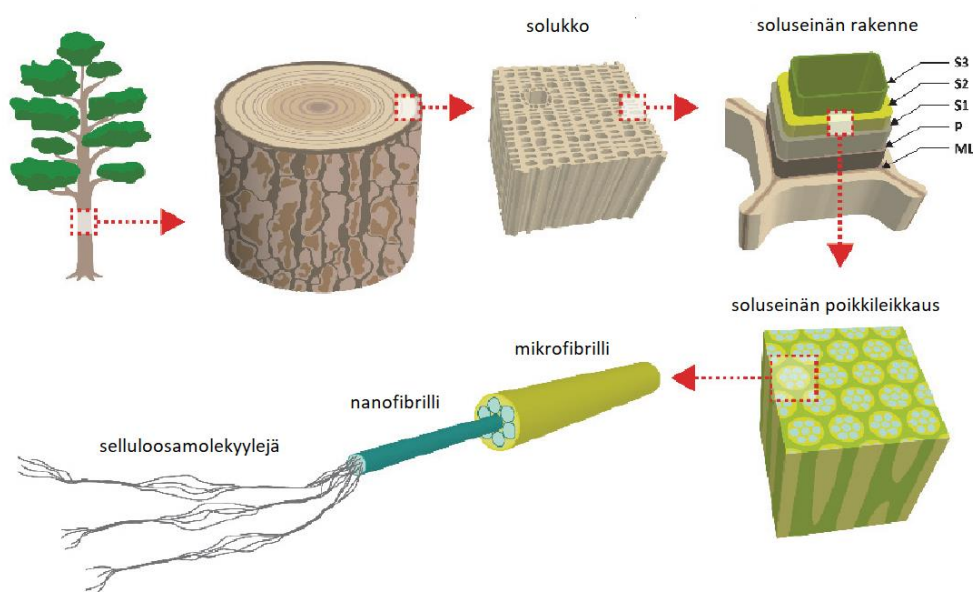
Selluloosan hyvän saatavuuden sekä siitä valmistettujen nanomateriaalien ympäristöystävällisyyden ja monipuolisten ominaisuuksien vuoksi kiinnostus nanoselluloosan valmistukseen ja käyttöön on lisääntynyt erityisesti viime vuosikymmenien aikana. Nanoselluloosaa voidaan käyttää esimerkiksi parantamaan paperin, kartongin, komposiitin sekä erilaisten pakkausmateriaalien ominaisuuksia, minkä lisäksi yhtenä merkittävänä tekijänä on mahdollisuus muovin korvaamiseen näissä käyttökohteissa. Lisäksi nanoselluloosaa voidaan hyödyntää esimerkiksi elintarvike- ja lääketieteellisyydessä. [1, s. 6–8.]

Yksi tärkeä nanoselluloosan ominaisuus on partikkelien pintavarauus, jota voidaan analysoida muun muassa konduktometrisellä titrauksella, ja jolla on merkittävä vaikutus esimerkiksi partikkelien stabiilisuuteen vesiliuoksessa sekä niiden fysikaalisiin ja kemiallisiin vuorovaikutuksiin [2, s. 2619]. Tämän opinnäytetyön aiheena oli testata konduktometrisen titrauksen menetelmää, joka on luotu Itä-Suomen yliopiston metsätieteiden osastolla SCAN-testimenetelmän [3] pohjalta. Työn tavoitteena oli testata kahta erilaista tapaa määrittää titrauskäyrien lineaaristen alueiden leikkauspisteet, ja niiden avulla laskettujen karboksyyli- ja karbonyyli-ryhmien perusteella arvioida, kumpi tapa soveltuu paremmin nanoselluloosänäytteiden pintavarauksen määrittämiseen käytössä olevalla titrausmenetelmällä. Lisäksi arvioitiin menetelmän oikeellisuutta ja toistettavuutta sekä tutkittiin TEMPO-avusteisen hapetuksen reaktioajan vaikutusta nanoselluloosan pintavaraukseen. Työ toteutettiin analysoimalla erilaisia nanoselluloosänäytteitä, joista osa oli itse valmistettuja ja osa kaupallisia.

Opinnäytetyö tehtiin Itä-Suomen yliopiston Joensuun kampuksen metsätieteiden osastolla, jossa tehdään metsiin, metsätalouteen ja uusiutuviin luonnonvaroihin kohdistuvaa tutkimusta erilaisissa EU-rahoitteisissa projekteissa sekä yhteistyössä eri yritysten ja organisaatioiden kanssa [4].

2 Nanoselluloosan valmistus, ominaisuudet ja käyttösovellukset

Selluloosa on puiden ja kasvien soluseinän pääkomponentti ja luonnossa eniten esiintyvä polymeeri. Puiden ja kasvien solukko sisältää selluloosakuituja, jotka edelleen koostuvat pienemmistä mikro- ja nanofibrilleistä. Nanofibrillit rakentuvat pitkistä selluloosamolekyyleistä (kuva 1). [5, s. 72; 6, s. 18.]



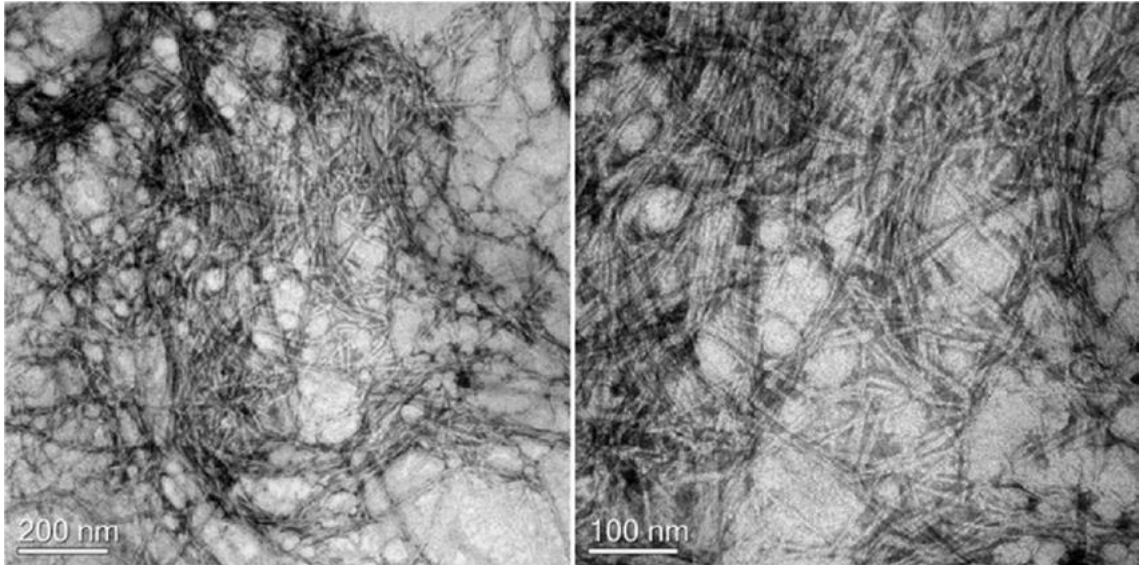
Kuva 1. Selluloosakuidun rakenne [mukaillen 6, s. 21].

Puusta valmistetaan sellua eli selluloosamassaa keittämällä puuhaketta natriumhydroksidi- ja sulfidiliuoksessa korkeassa paineessa. Käsittelyllä erotetaan puuainees selluloosakuiduiksi ja poistetaan siitä ligniini. Sellu pestään, valkaisuetaan, kuivataan ja leikataan arkeiksi. [7.]

Nanoselluloosa voidaan jakaa kolmeen eri pääluokkaan valmistusmenetelmän sekä materiaalin koon ja ominaisuuksien perusteella. Selluloosananofibrillejä (*cellulose nanofibrils*, CNF) valmistetaan pääasiassa puusta ja sellumassasta mekaanisella käsittelyllä. Mikrofiibrillit, jotka muodostavat soluseinän, erotetaan toisistaan eli fibrilloidaan käsittelemällä kuituja esimerkiksi jauhimella tai fluidisaattorilla. Erilaisilla kemiallisilla ja entsyymaattisilla esikäsittelyillä voidaan edistää kuitujen fibrilloitumista. Selluloosananokiteitä (*cellulose nanocrystals*, CNC) valmistetaan puun ja kasvien lisäksi vaippaeläimistä ja bakteeriselluloosasta voimakkaiden happojen avulla, mikä aiheuttaa selluloosakuitujen fibrillien katkeamisen poikittaisesti. Lopuksi materiaali käsitellään mekaanisesti. Bakteeriselluloosaa (*bacterial cellulose*, BC) pystyy valmistamaan osa bakteereista, kuten *Acetobacter xylinum*. Nämä bakteerit muodostavat polymeraatiolla glukosista selluloosaa. Myös bakteeriselluloosaa voidaan jatkokäsitellä mekaanisesti tai kemiallisesti. [1, s. 8–14.]

Nanoselluloosalla on monia samoja ominaisuuksia kuin selluloosalla, kuten hydrofiilisyyttä, helppo kemiallinen muokattavuus sekä kyky muodostaa monipuolisia kuiturakenteita. Lisäksi nanoselluloosa on kokonsa ja suuren ominaispinta-alansa vuoksi reaktiivista ja hyvin sitoutumiskykyistä. [1, s. 8.] Eri tavoin valmistetut nanoselluloosatyyppit eroavat toisistaan niin ominaisuuksien kuin käyttösovellustenkin osalta.

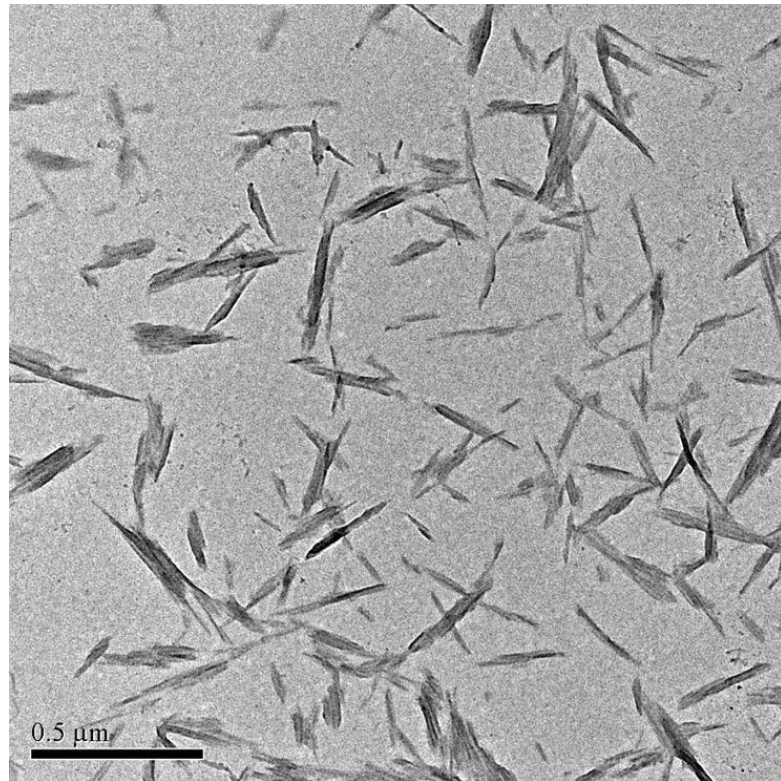
Mekaanisesti valmistetut selluloosananofibrillit ovat taipuisia ja haaroittuneita, leveydeltään muutamia kymmeniä nanometrejä ja pituudeltaan useita mikrometrejä (kuva 2).



Kuva 2. Lämpäisyelektronimikroskooppikuva (TEM) selluloosananofibrilleistä [8, s. B].

Selluloosananofibrilleillä on taipumus aggregoitua kuitujen pinnalla olevien vapaiden hydroksyyliyhymien johdosta. Erilaisilla kemiallisilla ja entsyymaattisilla esikäsittelyillä on mahdollista tuottaa pienikokoisempaa materiaalia, jonka pinta-vaaraus on lisäksi erilainen verrattuna käsittelemättömiin selluloosananofibrilleihin. Selluloosananofibrillejä käytetään esimerkiksi paperin, kartongin, komposiittien, päällysteiden ja rakennusmateriaalien valmistuksessa. [1, s. 9–11.]

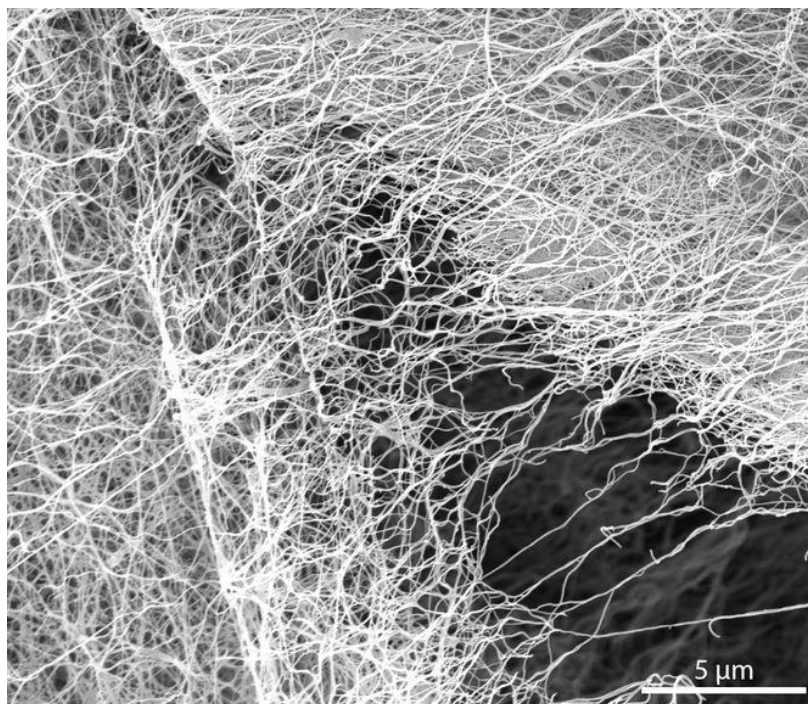
Selluloosananokiteet ovat rakenteeltaan sauvamaisia, ja niiden leveys on useimmiten 2–20 nanometriä pituuden vaihdellessa 100 nanometristä 1 mikrometriin (kuva 3).



Kuva 3. TEM-mikroskooppikuva selluloosananokideliuoksesta [9].

Toisin kuin selluloosananofibrillit, selluloosananokiteet eivät ole haaroittuneita ja taipuisia johtuen niiden kiteisyydestä. Rikkihapon avulla valmistetut selluloosananokiteet ovat voimakkaasti negatiivisesti varautuneita niiden pinnalle muodostuvien sulfaattiesteriryhmien ansiosta, eivätkä näin ollen aggregoidu, kun taas suolahapon avulla valmistetut selluloosananokiteet ovat vain heikosti varautuneita. Selluloosananokiteitä voidaan hyödyntää esimerkiksi nanokomposiiteissa, minkä lisäksi niiden nestekideominaisuudet tekevät niistä kiinnostavan kohteen muun muassa erilaisiin kalvosovelluksiin, kuten elektronisiin näyttöihin. [1, s. 11–12.]

Bakteeriselluloosalla on verkkomainen rakenne, joka muodostuu nauhamaisista noin 20–100 nanometrin levyisistä fibrilleistä ja edelleen hienommista, 2–4 nanometrin levyisistä fibrilleistä (kuva 4).



Kuva 4. TEM-mikroskooppikuva bakteriselluloosasta [10].

Bakteriselluloosa on kestävä, helposti muokattavaa ja erittäin hydrofiilistä, minkä lisäksi se omaa korkean vedenpidätyskyvyn. Bakteriselluloosaa voidaan hyödyntää lääketieteellisissä sovelluksissa, kuten haavasidoksissa, keinoihossa ja verisuoni-implanteissa, mutta myös esimerkiksi elintarviketeollisuudessa. [1, s. 13.]

Nanoselluloosan ominaisuuksia voidaan tutkia muun muassa erilaisilla kuituanalysointilaitteilla, pyyhkäisy- ja läpäisyelektronimikroskopialla (SEM, TEM) sekä kromatografian ja spektrometrian eri menetelmillä [1, s. 58].

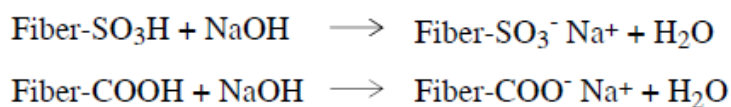
3 Pintavarauksen merkitys ja analyysimenetelmät

Selluloosakuidut ja niiden komponentit sisältävät varauksellisia ryhmiä, kuten heikkoja karboksyyli-ryhmiä ($-\text{COOH}$) ja vahvoja sulfoniryhmiä ($-\text{SO}_3\text{H}$). Ne vaikuttavat muun muassa materiaalin pinta-aktiivisuuteen, yksittäisten kuitujen sekä kuitujen ja kemikaalien väliseen vuorovaikutukseen, kuitujen turpoamiseen, metallien sitomiseen, reologisiin ominaisuuksiin, termiseen stabiilisuuteen

sekä valmiiden paperituotteiden lujuteen ja optisiin ominaisuuksiin. [2, s. 2619; 3, s. 1.]

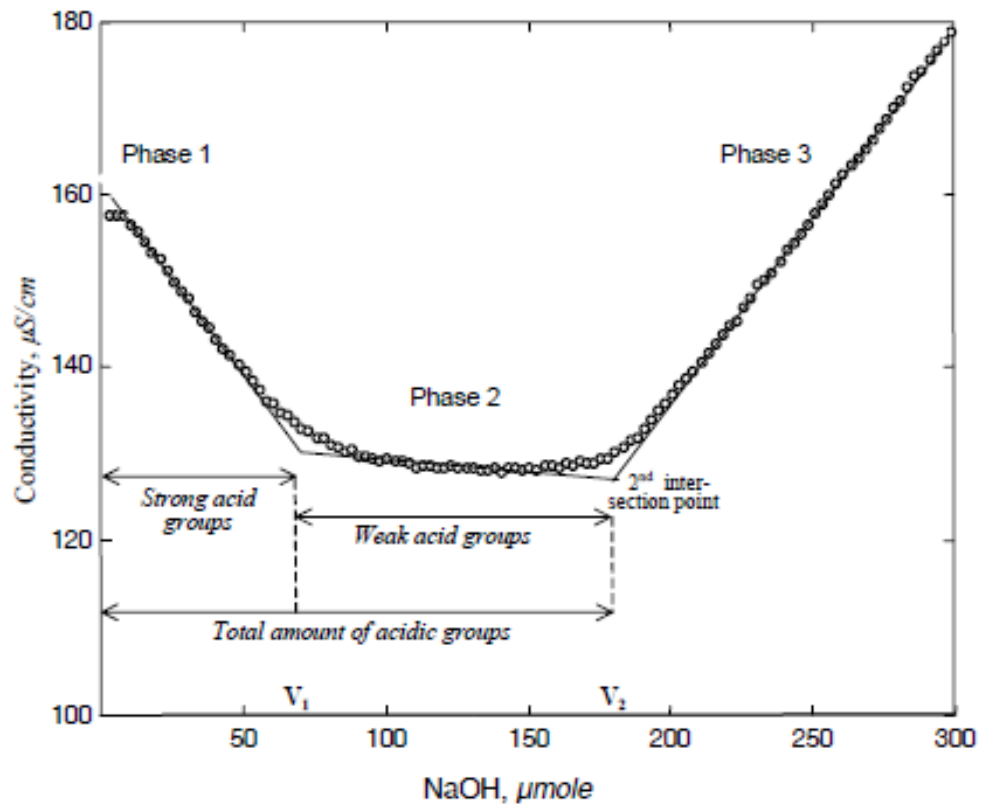
Pintavaraus aiheuttaa hylkimisvoiman partikkelien välillä ja tekee niiden vesiliuoksista stabiileja, mikä on olennaista erityisesti selluloosananokiteiden kohdalla. Pintavarauksen tuominen selluloosananofibrilleihin sen sijaan vähentää fibrilloitumiseen vaadittavaa energiankulutusta. Pintavarauksen tuomat ominaisuudet ovat merkittäviä selluloosananomateriaalien tutkimuksessa, sillä niiden myötä saadaan tuotettua vakaata ja homogeenistä lopputuotetta. [2, s. 2619.] Selluloosamateriaalien varausta voidaan määrittää useilla menetelmillä, joista yleisimpiin kuuluvat konduktometrinen titraus, potentiometrinen titraus, magnesiume-luutio, polyelektrolyyttiadsorptio ja zetapotentialin mittaaminen [3, s. 1].

Katzin ym. vuoden 1984 julkaisussa [11] esiteltiin menetelmä nanoselluloosan sulfoni- ja karboksyyli-ryhmien pitoisuuden määrittämiseksi yhdellä konduktometrisellä titrauksella. Julkaisuun perustuva Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committeeen SCAN-CM 62:02 -testimenetelmä [3] kuvaa konduktometrisen titrauksen menetelmän selluloosan kokonaisvarauksen (karboksyyli- ja sulfonihapporyhmien kokonaispitoisuus) määrittämiseksi. Ensin kuidut protonoidaan suolahapolla, jolloin kuitujen pinnalla olevat happoryhmät vastaanottavat vedyn (H^+) vastaionina. Kun näytettä titrataan sen jälkeen natriumhydroksidilla, karboksyyli- ja sulfonihapporyhmät reagoivat natriumhydroksidin kanssa. Natriumionit (Na^+) liittyvät vastaioneina karboksyyli- ja sulfonihapporyhmiin ja hydroksidi-ionit (OH^-) neutraloivat lohjenneet protonit (kuva 5). [3, s. 2.]



Kuva 5. Konduktometrisessä titrauksessa kuitujen pinnalla olevat karboksyyli- ja sulfonihapporyhmät reagoivat lisätyn natriumhydroksidin kanssa [3, s. 2].

Näytteen johtokykyä mitataan titrauksen ajan, ja tuloksista muodostetaan titrauskäyrä johtokyvystä titrausliuoksen kulutuksen funktiona (kuva 6).



Kuva 6. Selluloosanäytteen pintavarauksen määrittäminen konduktometrisellä titrauksella [3, s. 2].

Titrauksen alussa näytteen johtokyky laskee, kun sen sisältämät vahvat happoryhmät eli sulfonihapporyhmät neutraloidaan natriumhydroksidilla. Tämän jälkeen johtokyky pysyy melko tasaisena, kun heikot karboksyyli-ryhmät neutraloituvat. Lopussa johtokyky taas nousee, kun natriumhydroksidia lisätään ylimäärin. Titrausta jatketaan, kunnes johtokyky nousee lineaarisesti. Näytteen karboksyyli- ja sulfonihapporyhmien kokonaispitoisuus voidaan määrittää sovittamalla suorat käyrän lineaarisiin alueisiin ja määrittämällä toisen ja kolmannen suoran leikkauspisteestä kuluneen titrausliuoksen tilavuus. Pitoisuus lasketaan kaavalla 1. [3, s. 2–3.]

$$X = \frac{C_t \cdot V_2}{m} \quad (1)$$

X on sulfoni- ja karboksyyli-ryhmien kokonaispitoisuus ($\mu\text{mol/g}$)

C_t on natriumhydroksidiliuoksen pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)

V_2 on kuluneen NaOH-liuoksen tilavuus toisen ja kolmannen suoran leikkauspisteessä (l)

m on näytteen massa (g).

Samoin näytteen pelkkä karboksyyli-ryhmien pitoisuus voidaan laskea määrittämällä titrauskäyrästä kaksi leikkauspistettä: ensimmäisen ja toisen suoran leikkauspiste (V_1) sekä toisen ja kolmannen suoran leikkauspiste (V_2). Tällöin pitoisuus lasketaan V_2 ja V_1 :n erotuksen avulla, toisin sanoen titrauksen toisen vaiheen aikana kuluneen titrausliuoksen avulla (kaava 2).

$$X = \frac{C_t \cdot (V_2 - V_1)}{m} \quad (2)$$

Titrauksen toisessa vaiheessa näytteen sisältämät karboksyyli-ryhmät neutraloituvat. Konduktometrisellä titrauksella voidaan siis määrittää myös erikseen karboksyyli- ja sulfonihapporyhmien pitoisuus, vaikkakin menetelmä voi yliarvioida sulfonihapporyhmien määrän [3, s. 1]. Kun kyseessä on selluloosinäyte, joka ei sisällä sulfoniryhmiä, titrauskäyrän alusta puuttuu selkeä vaihe, jossa johtokyky laskee. Tällöin näytteeseen voidaan lisätä tunnettu määrä suolahappoa analyysin selkeyttämiseksi. Titrauskäyrä muistuttaa sellaisen näytteen titrauskäyrää, joka sisältää myös sulfoniryhmiä, mutta sulfoniryhmien sijaan alussa titrataan näytteeseen lisättyä suolahappoa. [11, s. 50–51.] Näytteeseen voidaan lisäksi lisätä natriumkloridia, mikä aiheuttaa ionien jakautumisen tasaisemmin kuitujen pinnan ja liuoksen välillä ja johtaa tarkempaan titrauksen päätepisteisiin [12, s. 1457].

4 TEMPO-avusteinen hapetus

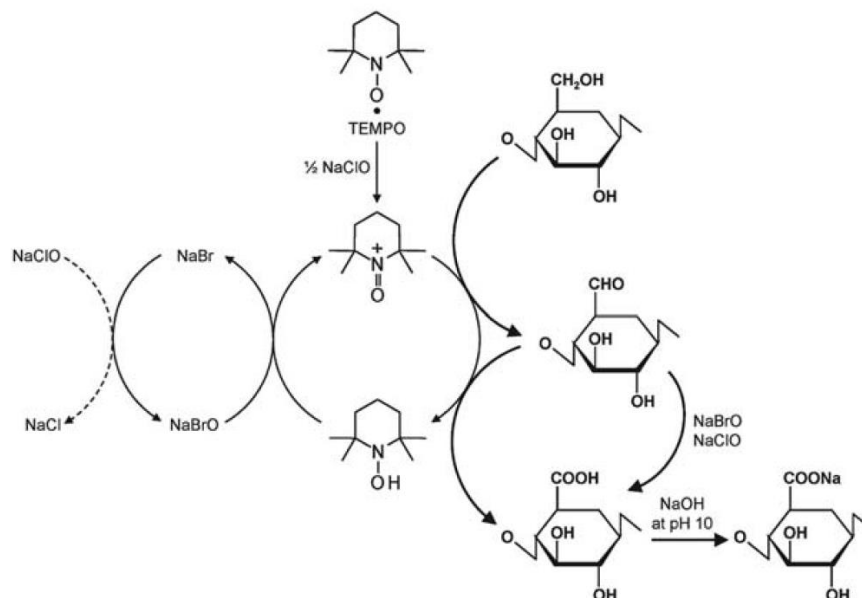
Selluloosananofibrillien valmistus pelkällä mekaanisella käsittelyllä vaatii paljon energiaa, mikä lisää myös tuotannon kustannuksia. Prosessin

energiankulutusta voidaan vähentää esikäsittelemällä kuituja kemiallisesti ennen mekaanista hajotusta. Lisäksi käsittelyllä on vaikutus selluloosananofibrilien ominaisuuksiin, kuten partikkelien kokoon ja pintavaraukseen. [1, s. 19.]

Yksi yleisesti käytetty kemiallinen esikäsitteily on TEMPO (2,2,6,6-tetrametyyli-piperidiini-1-oksyli) -avusteinen hapetus, jossa kuitujen pinnalla olevat vapaat hydroksyyliyhdytysryhmät hapetetaan karboksylaattiryhmiksi [1, s. 19; 5, s. 73].

TEMPO-avusteisen hapetuksen tuloksena selluloosakuitujen välille ei muodostu voimakkaita vetysidoksia ja ne on näin ollen helpompi hajottaa mekaanisesti. Mekaanisen hajotuksen jälkeen saatu tuote koostuu yksittäisistä nanokuiduista ja on usein homogeenisempää kuin ilman esikäsitteilyä. Saatujen nanokuitujen pituus on samaa kokoluokkaa kuin pelkällä mekaanisella käsittelyllä valmistettujen, mutta leveys on usein pienempi. [1, s. 19–20.] TEMPO-avusteinen hapetus tekee myös nanoselluloosan vesiliuoksista vakaampia yksittäisten nanoselluloosakuitujen välisen voimakkaamman hylkimisvoiman ansiosta. [1, s. 24.]

Selluloosan TEMPO-avusteista hapetusta ovat tutkineet muun muassa Isogai ym. [5]. Reaktiossa selluloosan C6-hiilen primääriset hydroksyyliyhdytysryhmät hapetuvat natriumkarboksylaattiryhmiksi vesiliuoksessa pH:ssa 10–11 TEMPO:n, natriumbromidin ja natriumhypokloriitin läsnä ollessa [5, s. 73] (kuva 7).



Kuva 7. Selluloosan C6-hydroksyyliiryhmien hapettuminen C6-karboksylaattiryhmiksi TEMPO-avusteisessa hapetuksessa [5, s. 73].

Isogain ym. menetelmässä [5] selluloosasta tehdään veteen liuos, jota sekoitetaan huoneenlämpötilassa. Seokseen lisätään vesi-TEMPO-natriumbromidiliuos ja sen jälkeen natriumhypokloriittiliuosta reaktion käynnistämiseksi. Seoksen pH:ta mitataan reaktion ajan ja sitä säädetään natriumhydroksidiliuoksella niin, että pH pysyy arvossa 10. Kun seoksen pH pysyy 10:ssä ilman natriumhydroksidin lisäämistä, kuidut suodatetaan ja huuhdellaan vedellä. [5, s. 79.]

Reaktiossa selluloosafibrillien pinnalle muodostuu huomattava määrä karboksylaattiryhmiä: selluloosamolekyylien joka toisen glykosyyliyksikön C6-hydroksyyliiryhmä hapettuu karboksylaattiryhmäksi. Kun TEMPO-avusteisella hapetuksella käsitellyt selluloosakuidut hajotetaan kevyesti mekaanisesti esimerkiksi homogenisaattorilla tai ultraäänihomogenisaattorilla, saadaan karboksylaattiryhmien aiheuttaman partikkelien välisen hylkimisvoiman ansiosta yksittäisiä TEMPO-hapetettuja selluloosananokuituja (TOCN), joiden leveys on 3–4 nanometriä ja pituus useita mikrometrejä. [5, s. 71, 76–77.]

Suodatetusta reaktioliuoksesta on mahdollista myös kierrättää käytetty TEMPO, mikä laskee huomattavasti menetelmällä tuotettujen selluloosamateriaalien kustannuksia [5, s. 80].

5 Materiaalit ja laitteet

5.1 Laitteet

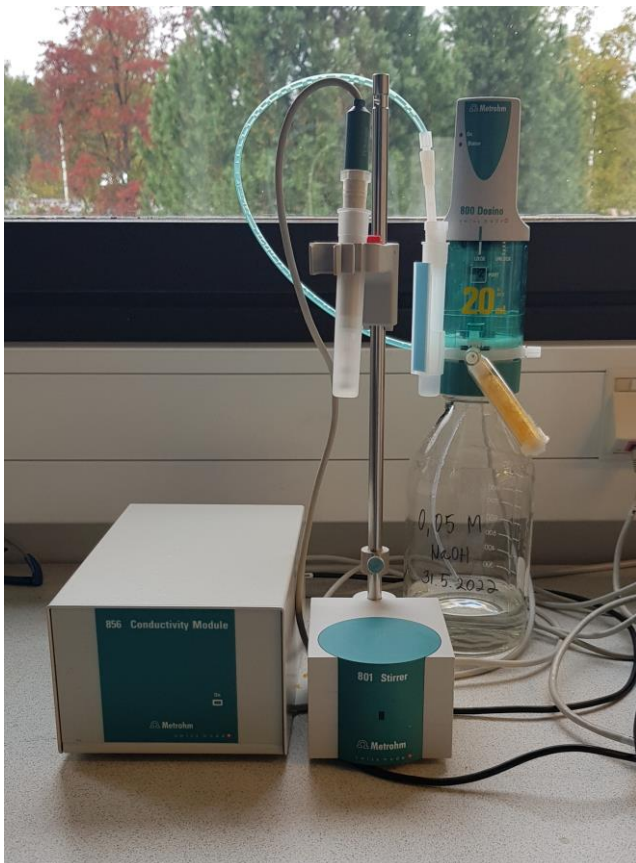
TEMPO-avusteisella hapetuksella käsiteltyjen selluloosakuitujen mekaaniseen hajotukseen käytettiin GEA Lab Homogenizer PandaPLUS 2000 -homogenisaattoria (kuva 8). Näytettä kierrätetään laitteiston läpi korkealla paineella, mikä aiheuttaa näytteen hajoamisen pienemmiksi partikkeleiksi.



Kuva 8. GEA Lab Homogenizer PandaPLUS 2000 -homogenisaattori.

Kuituja analysoitiin työn eri vaiheissa Valmet Fiber Image Analyzer FS5 -kuituanalysointilaitteella, joka määrittää kuva-analyysin avulla tutkittavien kuitujen ominaisuuksia, kuten pituuden, paksuuden ja eri kokoisten partikkelien määrän näytteessä. Näytteiden kylmäkuivaukseen käytettiin Christ® ALPHA 1–4 LD plus

-kylmäkuivuria. Konduktometrinen titraus tehtiin Metrohmin laitteistolla (kuva 9), joka koostui Metrohm 856 Conductivity Module -johtokykykymittarista, Metrohm 801 Stirrer -magneettisekoittajasta ja Metrohm 807 Dosing Unit -annostelijasta. Laitteisto oli kytketty tietokoneeseen ja sitä ohjattiin Metrohm tiamo™ -titrausohjelmalla (versio 2.5 light).



Kuva 9. Metrohmin titrauslaitteisto, jota ohjataan tietokoneella.

Lisäksi työssä käytettiin seuraavia laitteita:

- Ohaus® Pioneer™ -analyysivaaka
- L & W Desintegrator (Lorentzen & Wettre, code 003, type 964026, no 1027)
- Büchner-suppilo (10 cm) ja imupullo (1 l)
- polypropeeni-suodatinkangas (Sigma Aldrich, Z104256, läpäisevyys 25 cfm)
- Sartorius Analytic -analyysivaaka
- IKA® EUROSTAR 20 digital -sekoittaja
- Mettler Toledo SevenCompact -pH-mittari
- IKA® T18 digital ULTRA TURRAX® -sekoittaja.

5.2 Reagenssit

TEMPO-avusteisessa hapetuksessa käytössä olevat reagenssit ja liuokset olivat 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyli (98 %, Acros Organics), natriumbromidi ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich), natriumhypokloriittiliuos (Supelco®, Merck KGaA) ja etanoli (96 %, VWR Chemicals). TEMPO-avusteisessa hapetuksessa ja konduktometrisessä titrauksessa käytettiin tislattua vettä, muuten käytössä oli ionivaihdettu vesi. Lisäksi työssä käytettiin seuraavia reagensseja ja liuoksia:

- suolahappo (37 %, Merck KGaA)
- natriumhydroksidi (Supelco®, Merck KGaA)
- kaliumvetyftalaatti (99,5 %, Sigma-Aldrich)
- fenoliftaleiini (0,1 % liuos 50 % etanolissa).

5.3 Näytteet

Opinnäytetyössä analysoitiin kolmea kaupallista nanoselluloosanäytettä (Cellulose Lab, Kanada). Kaikki näytteet olivat TEMPO-avusteisella hapetuksella käsiteltyjä selluloosananokidenäytteitä geelimuodossa eri karboksyyliipitoisuuksilla. Näytteiden tiedot on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Cellulose Labin nanoselluloosanäytteiden ilmoitetut karboksyyli-
pitoisuudet, kuitujen koko ja näytteiden kuiva-ainepitoisuus.

Näytteen nimi	Ilmoitettu kar- boksyyli- pitoisuus (mmol/g)	Kuitujen leveys (nm)	Kuitujen pituus (nm)	Kuiva-ainepi- toisuus (%)
CNC TEMPO Low	0,2	5–20	140–200	8
CNC TEMPO Medium	1,2	5–20	140–200	1,68
CNC TEMPO High	2,0	5–20	140–200	1,12

Lisäksi analyyseihin valmistettiin itse TEMPO-avusteisella hapetuksella kymmenen nanoselluloosanäytettä eri reaktioajoilla. Näytteet valmistettiin kuivatusta koivun liukoselluloosa-arkista, joka sisältää valmistajan ilmoituksen mukaan noin 95 % selluloosaa, 0,2 % mannoosia ja 4,8 % ksyloosia.

6 Työn suoritus

6.1 Nanoselluloosan valmistus TEMPO-avusteisella hapetuksella

TEMPO-hapetettuja selluloosananofibrillinäytteitä valmistettiin itse kymmenen kappaletta. Käytetty menetelmä on luotu Itä-Suomen yliopiston metsätieteiden osastolla ja perustuu Isogain ym. tutkimukseen TEMPO-hapetettujen selluloosananokuitujen valmistusmenetelmistä ja ominaisuuksista [5].

Koivun liukoselluloosa-arkkia leikattiin halkaisijaltaan noin 1 cm:n kokoisiksi paloiksi, joita punnittiin noin 12 g näytettä kohti. Näytteet hajotettiin mekaanisesti 1200 ml:ssa ionivaihdettua vettä L&W Desintegrator -laitteella. Seokset suodatettiin imusuodatuksella ja kuidut kerättiin talteen. Näytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

TEMPO-avusteisessa hapetuksessa vedessä hajotettuja, suodatettuja kuitunäytteitä punnittiin kosteuspitoisuus huomioon otuna 10 g näytettä kohti. Kuidut

sekoitettiin 750 ml:aan tislattua vettä 1000 ml:n dekantterilasissa, kunnes seoksen koostumus oli tasainen. Sekoitusta jatkettiin nopeudella 400 kierrosta minuutissa ja seoksen pH:ta mitattiin koko reaktion ajan. Seokseen lisättiin liuos, jossa 50 ml:aan tislattua vettä oli liuotettu 125 mg TEMPO:a ja 1250 mg natriumbromidia. Reaktio käynnistettiin lisäämällä seokseen 50 ml natriumhypokloriittiliuosta. Seoksen pH säädettiin ensin suolahappoliuoksella (1 mol/l) 10,5:een, minkä jälkeen pH:ta säädettiin koko reaktion ajan natriumhydroksidiliuoksella (1 mol/l) niin, että pH-arvo pysyi välillä 10,0–10,2. Kuva 10 esittää käynnissä olevaa reaktiota. Reaktion pysäyttämiseksi seokseen lisättiin 50 ml etanolia.

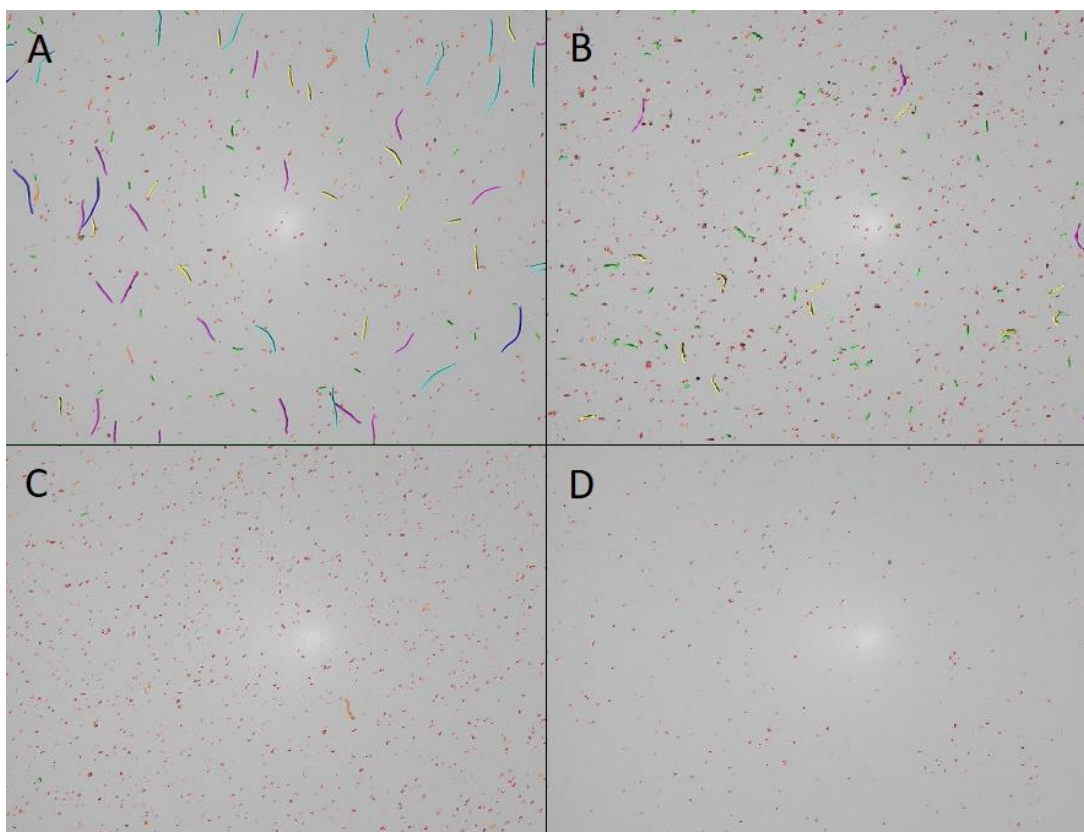


Kuva 10. TEMPO-avusteinen hapetus.

TEMPO-avusteinen hapetus toteutettiin 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 ja 150 minuutin reaktioajoilla. Reaktion päätyttyä seokset suodatettiin imusuodatuksella. Lopuksi kuidut huuhdeltiin neljä kertaa 125 ml:lla tislattua vettä. Kuidut kerättiin talteen ja näytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

TEMPO-hapetetuista selluloosakuiduista valmistettiin 1-prosenttiset liuokset 500 ml:aan ionivaihdettua vettä. Liuoksia sekoitettiin Turrax-sekoittajalla 5 minuutin ajan nopeudella 25 000 kierrosta minuutissa tasaisen liuoksen saamiseksi. Liuokset homogenisoitiin homogenisaattorilla kolmella syklillä, joissa paine säädettiin 500, 600 ja 700 bariin. Lyhyintä reaktioaikaa lukuun ottamatta kaikista näytteistä saatiin lopputuotteena läpikuultava, paksu geeli. Mitä pidempi reaktioaika näytteellä oli, sitä paksumpi geeli saatiin tuotettua.

Liuoksista otettiin näytteet sekä ennen homogenisointia että jokaisen syklin jälkeen. Noin 0,5 ml:n kokoinen näyte sekoitettiin 250 ml:aan ionivaihdettua vettä Turrax-sekoittajalla ja näytteet analysoitiin kuituanalysointilaiteella. Näin kuitujen hajoamista nanomateriaaleiksi voitiin seurata jokaisen homogenisointisyklin jälkeen (kuva 11, taulukko 2).



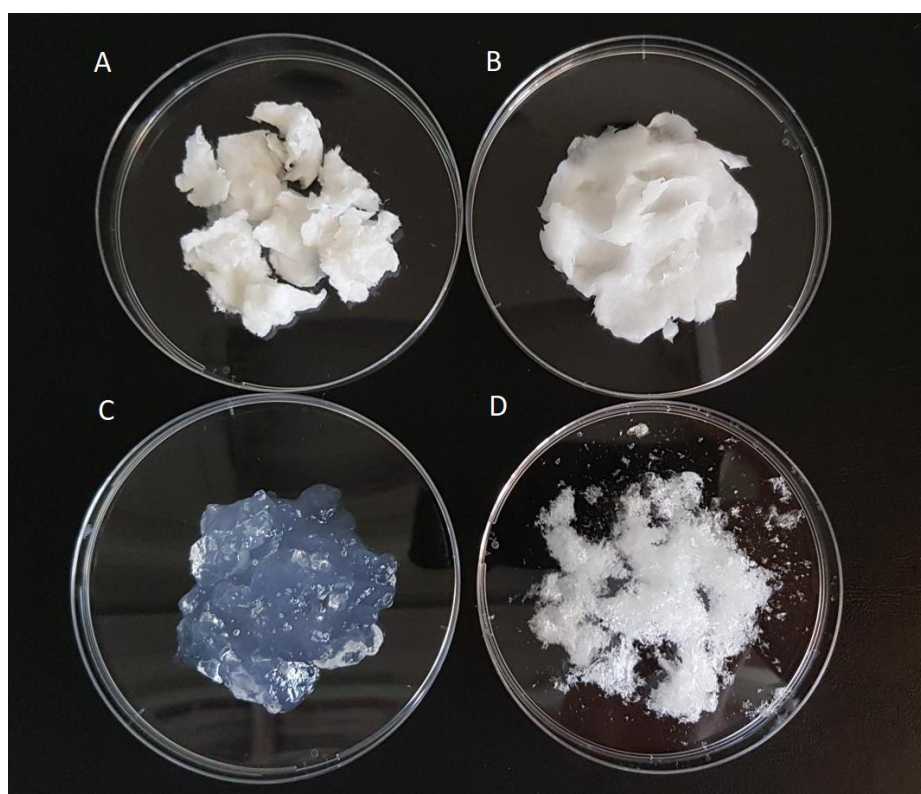
Kuva 11. Kuituanalyssaattorilla kuvattuja TEMPO-hapetettuja selluloosakuituja vesiliuoksessa ennen homogenisointia (A) sekä yhden (B), kahden (C) ja kolmen (D) homogenisointisyklin jälkeen. Eri värit merkitsevät eri kokoisia kuituja ja partikkeleita liuoksessa. Näytteen TEMPO-reaktioaika oli 90 minuuttia.

Ennen homogenisointia kuvan 11 näyteliuoksessa oli runsaasti suurikokoisia kuituja (pituus $\geq 200 \mu\text{m}$). Ensimmäisen syklin jälkeen kuitujen määrä kasvoi, kun kuidut hajosivat pienemmiksi, mutta laite luokitteli ne kokonsa puolesta edelleen kuiduiksi. Homogenisoinnin edetessä kuitujen määrä laski murtoosaan alkuperäisestä ja vastaavasti hienoaineeksi luokiteltujen partikkelien ($< 200 \mu\text{m}$) määrä nousi. Materiaalin hajotessa pienemmäksi partikkelien määrä kasvoi ensin huomattavasti, kunnes kolmen syklin jälkeen liuos oli jo niin homogeenistä ja partikkelit niin pieniä, että laite havaitsi enää vähän optisen dektektiorajan (noin $1 \mu\text{m}$) ylittäviä partikkeleita (taulukko 2).

Taulukko 2. TEMPO-hapetetusta näytteestä (reaktioaika 90 minuuttia) mitattuja kuitujen ja partikkeleiden määriä homogenisoinnin aikana.

Homogenisointi- syklien määrä	Kuituja ($\geq 200 \mu\text{m}$)	Partikkeleita ($< 200 \mu\text{m}$)
0	53 660	519 643
1 (500 bar)	62 201	1 068 562
2 (600 bar)	4 836	1 085 912
3 (700 bar)	427	315 178

Kolmella syklillä homogenisoituja nanoselluloosageelejä pakastettiin kahden vuorokauden ajan, minkä jälkeen näytteitä kylmäkuivattiin 0,34 mbar:in paineessa 76 tunnin ajan. Kuvassa 12 on esitetty tyypillisen näytteen koostumus käsittelyn eri vaiheissa.



Kuva 12. TEMPO-hapetettua nanoselluloosaa käsittelyn eri vaiheissa. Mekaanisesti vedessä hajotetut ja suodatetut selluloosakuidut ennen TEMPO-käsittelyä (A), TEMPO-käsitellyt suodatetut kuidut (B), nanoselluloosageeli homogenisoinnin jälkeen (C) ja kylmäkuivattu nanoselluloosa (D). Kuvatun näytteen TEMPO-reaktioaika oli 90 minuuttia.

Kylmäkuivattuja näytteitä säilytettiin eksikaattorissa, ja niistä valmistettiin näyte-liuokset konduktometriin titrauksiin (luku 6.2).

6.2 Konduktometrinen titraus

Nanoselluloosanäytteiden konduktometrinen titraus tehtiin Itä-Suomen yliopiston metsätieteiden osastolla luodulla menetelmällä, joku perustuu Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committeeen SCAN-CM 65:02 -testimenetelmään [3].

Konduktometriseen titraukseen valmistettiin natriumhydroksidista titrausliuos, jonka pitoisuus oli 0,05 mol/l. Liuoksen pitoisuus tarkistettiin titraamalla kaliumvetyftalaattiliuosta NaOH-liuoksella käyttäen fenoliftaleiinia indikaattorina. NaOH-liuoksen pitoisuus laskettiin sen titrauskulutuksesta kolmen rinnakkaismäärityksen keskiarvona. NaOH-titrausliuoksen pitoisuudeksi määritettiin 0,04891 mol/l.

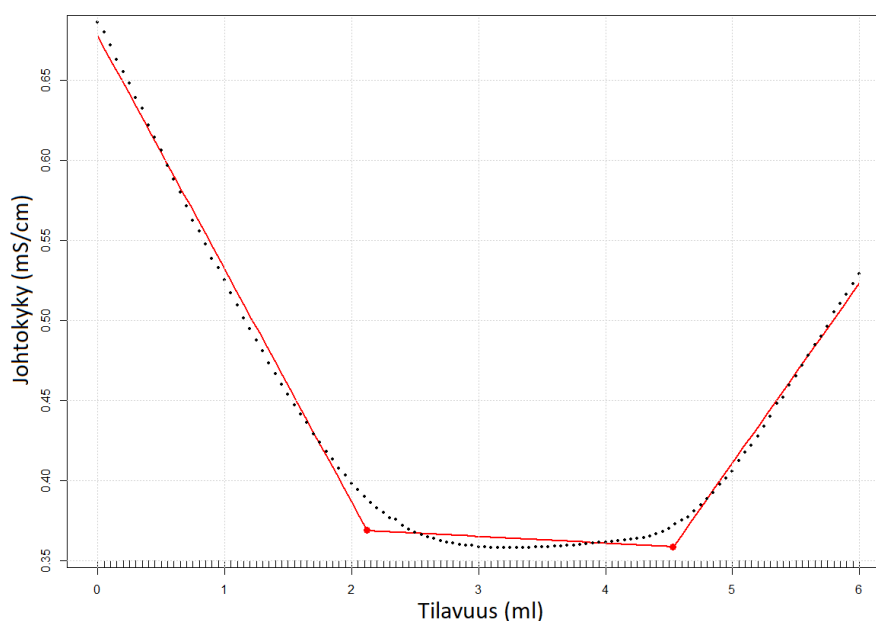
Kylmäkuivattuja näytteitä punnittiin 100–110 mg ja tarkat punnitustulokset kirjattiin ylös. Näytteisiin lisättiin 100 ml tislattua vettä, minkä jälkeen niitä sekoitettiin 2 minuutin ajan Turrax-sekoittajalla nopeudella 12 000 kierrosta minuutissa. Konduktometrisessä titrauksessa näytettä sekoitettiin ensin 30 sekunnin ajan, minkä jälkeen näytteeseen lisättiin 2,5 ml suolahappoa (0,1 mol/l). Näytettä sekoitettiin jälleen 30 sekunnin ajan ennen titrauksen aloitusta. Varsinaisessa titrauksessa näytteeseen lisättiin automaattisella annostelijalla NaOH-titrausliuosta 50 µl:n annoksina noin 2 sekunnin välein. Näytettä sekoitettiin jatkuvasti ja titrausta jatkettiin, kunnes titrausliuosta oli lisätty yhteensä 6 millilitraa. Laite mittaa näytteen johtokyvyn jokaisen lisäyksen jälkeen ja ohjelma piirtää näytteelle automaattisesti titrauskäyrän, jossa on näytteen johtokyky (mS/cm) kulutetun titrausliuoksen (ml) funktiona.

Analyysien ensimmäisessä vaiheessa kaikista näytteistä tehtiin kolme rinnakkaismääritystä. Kaupallisten nanoselluloosanäytteiden titrauskäyristä määritettiin kolmen suoran leikkauspisteet V_1 ja V_2 kahdella eri tavalla

karboksyyliipitoisuuden laskemiseksi, ja saatuja tuloksia verrattiin valmistajan ilmoittamiin karboksyyliipitoisuuksiin.

Tapa 1

Näytteen titrauskäyrä piirrettiin RStudiolla titrausohjelmasta saadun datan avulla. Kuvaajaan sovitettiin kolmesta suorasta koostuva paloittain lineaarinen malli, josta määritettiin suorien leikkauspisteet V_1 ja V_2 (kuva 13).



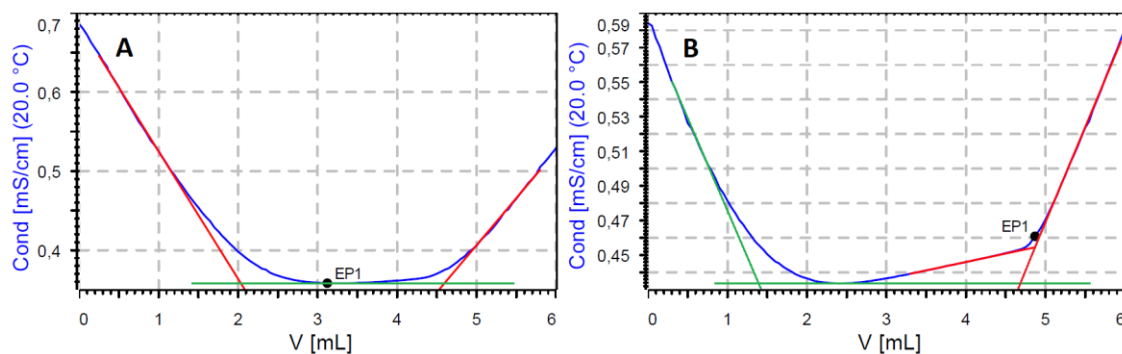
Kuva 13. Titrauskäyrään sovitettiin RStudiolla kolmesta suorasta koostuva paloittain lineaarinen malli.

Suorien leikkauspisteille annetaan ensin alkuarvot, jotka ovat mahdollisimman tarkkoja arvioita leikkauspisteiden x-arvoille, ja joiden perusteella ohjelma sovitaa paloittain lineaarisen mallin pienimmän neliösumman menetelmällä. Sovitettu malli ja leikkauspisteet voivat vaihdella jonkin verran riippuen asetetuista alkuarvoista, tai malli voi pysyä samana riippumatta siitä, mitkä alkuarvot leikkauspisteille antaa. Näytteen karboksyyliipitoisuus laskettiin saaduista leikkauspisteistä kaavalla 2. Käytetty R-skripti on esitetty liitteessä 1.

Tapa 2

Metrohm tiamo™ -titrausohjelma piirtää näytteelle titrauskäyrän ja etsii siitä kaksi lineaarista aluetta, joihin ohjelma sovittaa automaattisesti suoran. Tyypilliselle nanoselluloosanäytteelle, joka sisältää karboksyyliiryhmiä, ohjelma sovittaa suoran titrauksen ensimmäiseen vaiheeseen, missä johtokyky laskee jyrkästi, sekä kolmanteen vaiheeseen, jossa karboksyyliiryhmien neutraloinnin jälkeen johtokyky jälleen nousee. Koska ohjelma ei etsi lineaarista keskialuetta ja sovita suoraa titrauskäyrän toiseen vaiheeseen, jossa karboksyyliiryhmät neutraloidaan ja johtokyky pysyy jotakuinkin tasaisena, on puuttuva suora piirrettävä muulla tavoin leikkauspisteiden V_1 ja V_2 määrittämiseksi.

Tässä tapauksessa puuttuva suora piirrettiin kuvaan kuvankäsittelyohjelmalla kuvaajan alimman pisteen kautta x-akselin suuntaisesti (kuva 14A). Näytteestä ja titrauskäyrän mallista riippuen titrausohjelma toisinaan etsii lineaarisen alueet ja sovittaa suorat automaattisesti titrauskäyrän ensimmäiseen ja toiseen tai toiseen ja kolmanteen vaiheeseen. Näissä tapauksissa kuvaan piirrettiin kuvankäsittelyohjelmalla kaikki puuttuvat suorat (kuva 14B). Titrauksen ensimmäisestä tai kolmannesta vaiheesta, jossa johtokyky laskee tai nousee jyrkästi, arvioitiin silmämääräisesti lineaarinen alue, jonka kautta piirrettiin puuttuva suora. Lisäksi titrauksen toiseen vaiheeseen piirrettiin jo olemassa olevan suoran lisäksi kuvaajan alimman pisteen kautta x-akselin suuntainen suora. Suorien leikkauspisteet V_1 ja V_2 määritettiin mahdollisimman tarkasti kuvan asteikolta ja näytteen karboksyyliipitoisuus laskettiin kaavalla 2.



Kuva 14. Titrausohjelman titrausraportista tallennetut kuvat. Punaisella merkityt suorat ovat titrausohjelman automaattisesti sovittamia, ja vihreät suorat on piirretty kuvaan kuvankäsittelyohjelmalla. Titrauskäyrän mallista riippuen kuvankäsittelyohjelmalla piirrettiin yksi (A) tai kaksi (B) suoraa.

Eri tavoin määritetyillä leikkauspisteillä laskettuja karboksyyliipitoisuuksia verrattiin valmistajan ilmoittamiin karboksyyliipitoisuuksiin. Tulosten perusteella arvioitiin, kumpi tapa määrittää leikkauspisteet soveltuu jatkossa paremmin käyttöön erilaisten nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuuden määrittämisessä. Työn ensimmäisessä vaiheessa analysoitujen itse valmistettujen TEMPO-hapetettujen nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuus määritettiin kyseisellä, paremmin käyttöön soveltuvalla tavalla. Tuloksien perusteella tutkittiin TEMPO-reaktioajan vaikutusta karboksyyliipitoisuuteen.

Analyysien toisessa vaiheessa sekä kaupallisista että itse valmistetuista nanoselluloosanäytteistä valittiin yksi, joista määritettiin karboksyyliipitoisuus kymmenellä rinnakkaisnäytteellä. Tulosten perusteella arvioitiin konduktometrisen titrausmenetelmän toistettavuutta ja oikeellisuutta.

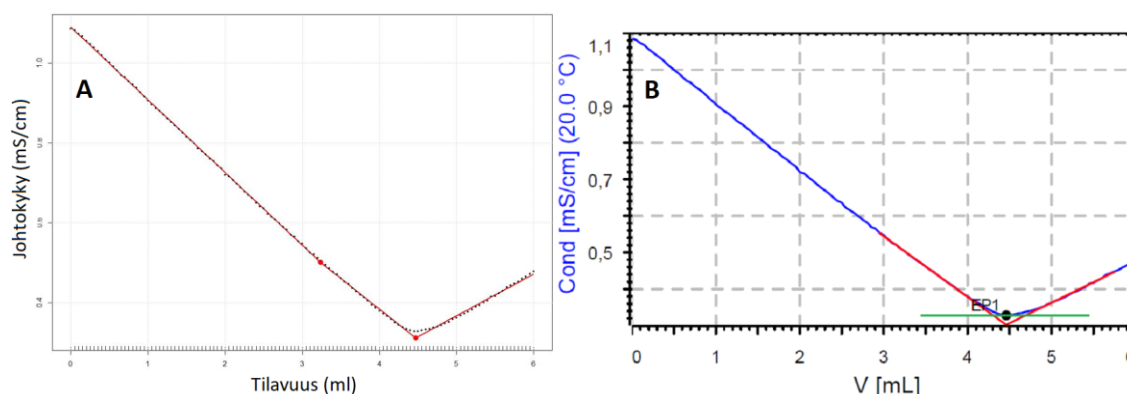
7 Tulokset

7.1 Esimittaukset ja eri tulostenkäsittelytapojen soveltuvuuden arviointi

Analyysien ensimmäisessä vaiheessa kaikista näytteistä tehtiin esimittaukset kolmella rinnakkaisnäytteellä. Tarkat mittaustulokset on esitetty liitteessä 2. Kaupallisten nanoselluloosanäytteiden titrauskäyrien leikkauspisteet määritettiin

kahdella eri tavalla (ks. luku 6.2). Mittaamalla saadut karboksyyliipitoisuudet laskettiin ja tuloksia verrattiin valmistajan ilmoittamiin pitoisuuksiin.

Kaupallisten nanoselluloosanäytteiden valmistajan ilmoittamat karboksyyliipitoisuudet olivat 0,2 mmol/g, 1,2 mmol/g ja 2,0 mmol/g. Kuvissa 15 ja 16 havainnollistetaan kolmen suoran leikkauspisteiden (V_1 ja V_2) määrittämistä titrauskäyrästä kahdella eri tavalla eli paloittain lineaarisella mallilla ja kuvankäsittelyohjelmalla.

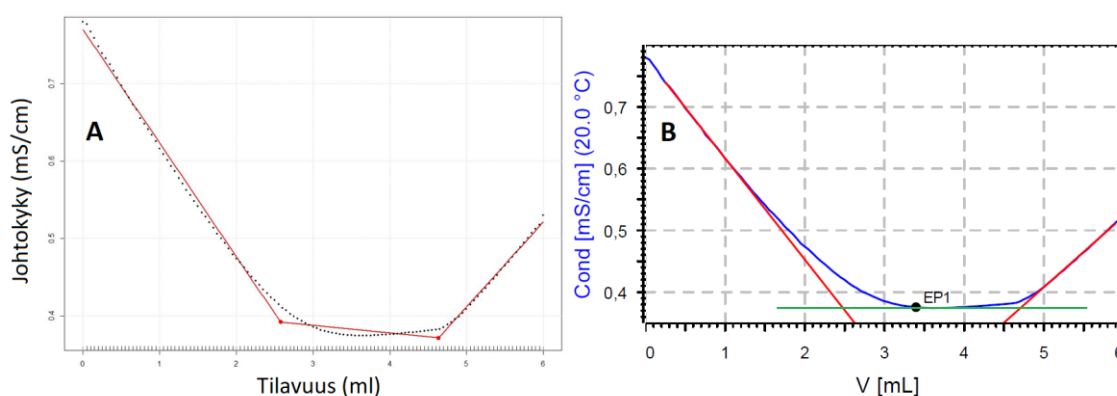


Kuva 15. Titrauskäyrät nanoselluloosanäytteestä, jonka valmistajan ilmoittama karboksyyliipitoisuus on 0,2 mmol/g. RStudiolla piirretty titrauskäyrä, johon on sovitettu kolmesta suorasta koostuva paloittain lineaarinen malli (A) sekä titrausohjelmiston piirtämä titrauskäyrä, johon on piirretty kuvankäsittelyohjelmalla x-akselin suuntainen suora alimman pisteen kautta (B).

Kuvan 15 esimerkkikäyrät kuuluvat näytteelle, jonka ilmoitettu karboksyyliipitoisuus oli 0,2 mmol/g. Paloittain lineaarisella mallilla suorien leikkauspisteiden x-arvoiksi määritettiin 3,23 (V_1) ja 4,47 (V_2), ja näytteen laskettu karboksyyliipitoisuus oli 0,571 mmol/g. Kuvankäsittelyohjelmalla suorien leikkauspisteiden x-arvoiksi arvioitiin 4,29 (V_1) ja 4,70 (V_2) ja näytteen karboksyyliipitoisuudeksi laskettiin 0,189 mmol/g. Pienissä pitoisuuksissa titrauksen toinen vaihe, jossa karboksyyliiryhmät neutraloidaan, on lyhyt. Titrauskäyrän muoto muistuttaa V-kirjainta, ja titrauksen toisesta vaiheesta, jossa karboksyyliiryhmät neutraloidaan, on vaikea havaita lineaarista aluetta. Paloittain lineaarinen malli sovitaa pienimmän neliösumman menetelmällä keskimmäisen suoran jyrkällä kulmakertomella käyrän ensimmäiseen vaiheeseen ensimmäisen suoran jatkoksi.

Kuvankäsittelyohjelmalla keskimmäisen suoran voi sen sijaan piirtää aina x-akselin suuntaisesti, vaikka lineaarista aluetta olisi vaikea havaita. Näin ollen pienissä pitoisuuksissa titrauskäyrästä määritetyt leikkauspisteiden V_1 ja V_2 arvot voivat erota toisistaan huomattavasti riippuen siitä, käytetäänkö paloittain lineaarista mallia vai piirretäänkö titrauksen toisen vaiheen suora kuvankäsittelyohjelmalla x-akselin suuntaisesti. Tämä johtaa myös huomattavaan eroon laskutussa karboksyylipitoisuudessa.

Suuremmissa karboksyylipitoisuuksissa titrauskäyrän muoto muistuttaa U-kirjainta (kuva 16).



Kuva 16. Titrauskäyrä nanoselluloosanäytteestä, jonka valmistajan ilmoittama karboksyylipitoisuus on 1,2 mmol/g. RStudiolla piirretty titrauskäyrä kolmesta suorasta koostuvalla paloittain lineaarisella mallilla (A) ja titrausohjelmiston titrauskäyrä, johon on piirretty kuvankäsittelyohjelmalla x-akselin suuntainen suora alimman pisteen kautta (B).

Mitä suurempi karboksyylipitoisuus on, sitä pidempi on titrauksen toinen vaihe, jossa näytteen sisältämät karboksyyliyhdyt neutraloidaan. Kolmesta suorasta koostuva paloittain lineaarinen malli muistuttaa enemmän titrausohjelman sovitamia ja kuvankäsittelyohjelmalla piirrettyjä suoria. Paloittain lineaarisella mallilla kuvan 16 näytteen leikkauspisteiden x-arvoiksi määritettiin 2,57 (V_1) ja 4,63 (V_2), ja näytteen laskettu karboksyylipitoisuus oli 0,960 mmol/g. Kuvankäsittelyohjelmalla suorien leikkauspisteiden x-arvoiksi arvioitiin 2,49 (V_1) ja 4,69 (V_2) ja näytteen karboksyylipitoisuudeksi laskettiin 1,025 mmol/g. Leikkauspisteiden V_1

ja V_2 arvoissa on vähemmän vaihtelua kuin pienemmissä pitoisuuksissa, ja näin ollen myös lasketut karboksyylipitoisuudet ovat lähempänä toisiaan.

Taulukkoon 3 on koottu kaikkien kaupallisten nanoselluloosanäytteiden mittamalla saadut pitoisuudet kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvona molemmilla tavoilla määritettynä. Kaikki mittaustulokset on esitetty liitteen 2 taulukossa 1.

Taulukko 3. Kaupallisten nanoselluloosanäytteiden ilmoitetut ja mittaamalla saadut karboksyylipitoisuudet kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvona.

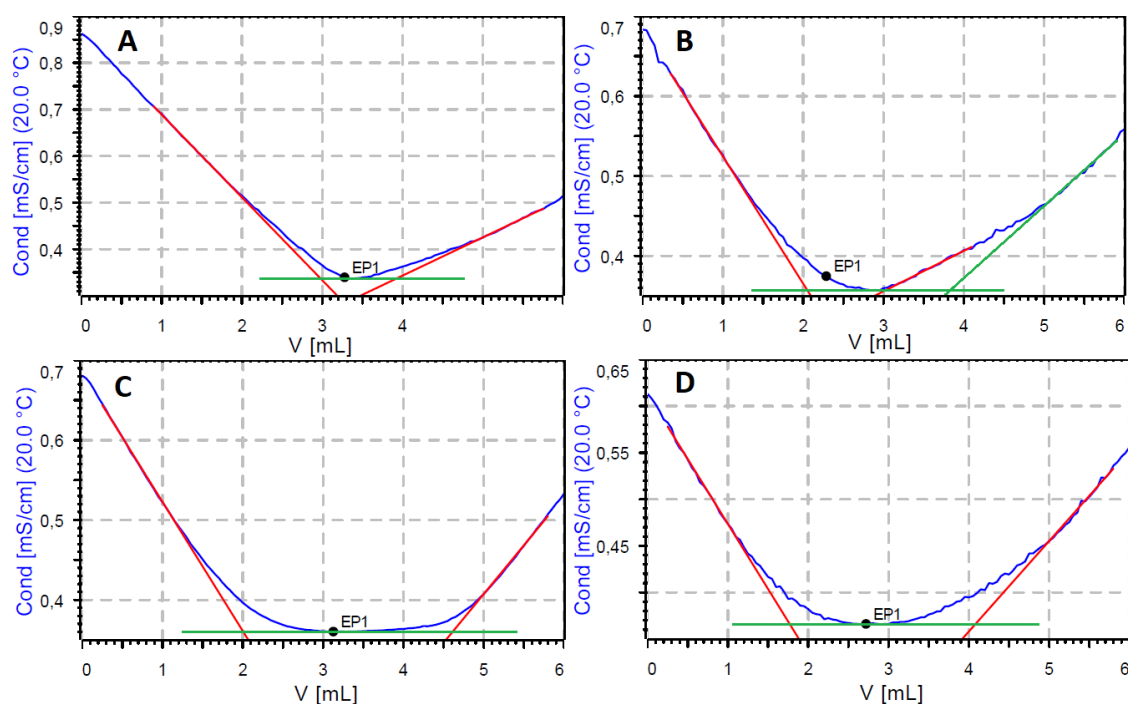
Näyte	Valmistajan ilmoittama karboksyylipitoisuus (mmol/g)	Mitattu karboksyylipitoisuus (mmol/g, paloittain lineaarinen malli)	Mitattu karboksyylipitoisuus (mmol/g, kuvankäsittelyohjelma)
CNC TEMPO Low	0,2	0,557	0,215
CNC TEMPO Medium	1,2	0,960	1,036
CNC TEMPO High	2,0	1,520	1,569

Näytteen, jonka karboksyylipitoisuudeksi oli ilmoitettu 0,2 mmol/g, keskiarvoksi saatiin paloittain lineaarisella mallilla 0,557 mmol/g ja kuvankäsittelyohjelmalla 0,215 mmol/g. Paloittain lineaarisella mallilla määritetty pitoisuus on siis huomattavasti suurempi kuin ilmoitettu pitoisuus, kun taas kuvankäsittelyohjelman avulla määritetty pitoisuus on hyvin lähellä ilmoitettua. Näytteillä, joiden ilmoitetut karboksyylipitoisuudet olivat 1,2 ja 2,0 mmol/g, mitattujen pitoisuuksien eroavaisuus eri tulostenkäsittelytapojen välillä oli pienempi (0,960 ja 1,036 mmol/g; 1,520 ja 1,569 mmol/g). Kyseisillä näytteillä mittaamalla määritetyt pitoisuudet olivat tavasta riippumatta pienempiä kuin valmistajan ilmoittamat pitoisuudet.

Tulosten perusteella arvioitiin, että tapa 1, eli titrauskäyrän lineaaristen alueiden leikkauspisteiden määrittäminen kuvankäsittelyohjelmalla, soveltuu paremmin nanoselluloosanäytteiden karboksyylipitoisuuden määrittämiseen. Työn muissa määrittämissä käytettiin tätä tulostenkäsittelytapaa.

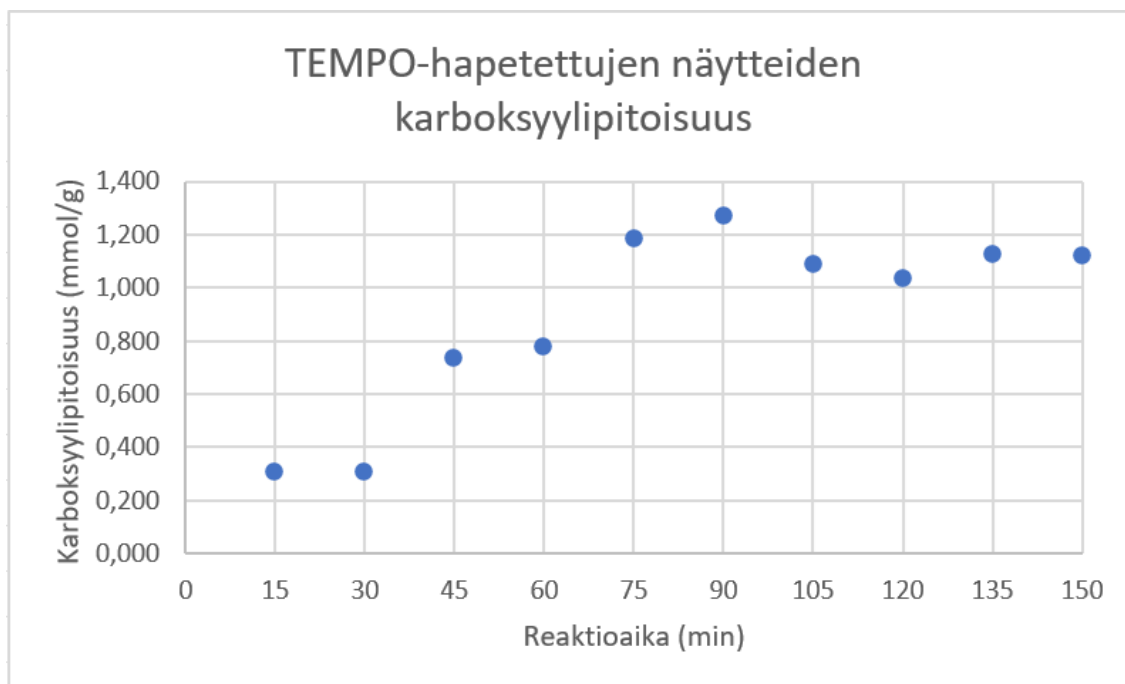
7.2 TEMPO-reaktioajan vaikutus nanoselluloosan karboksyyliipitoisuuteen

TEMPO-avusteisella hapetuksella valmistettiin kymmenen näytettä eri reaktioajoilla (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 ja 150 minuuttia). Näytteet valmistettiin ja niiden karboksyyliipitoisuus määritettiin luvuissa 6.1 ja 6.2 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Kuvassa 17 on havainnollistettu eri reaktioajoilla valmistettujen näytteiden titrauskäyriä esimerkkikuvoin.



Kuva 17. Itse valmistettujen TEMPO-hapettujen nanoselluloosanäytteiden titrauskäyriä eri TEMPO-reaktioajoilla: 15 minuuttia (A), 60 minuuttia (B), 90 minuuttia (C) ja 150 minuuttia (D).

Näytteiden karboksyyliipitoisuudet laskettiin kolmen rinnakkaismäärittelyn keskiarvona (kuva 18). Kaikki mittaustulokset on esitetty liitteen 2 taulukossa 2.



Kuva 18. TEMPO-avusteisella hapetuksella valmistettujen nanoselluloosanäytteiden mitatut karboksyyliipitoisuudet kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvoina.

TEMPO-hapetetun näytteen karboksyyliipitoisuus oli 15 minuutin reaktioajalla 0,307 mmol/g. Pitoisuus ei noussut 30 minuutin reaktioajalla. 45 minuutin reaktioajalla karboksyyliipitoisuus oli yli kaksinkertaistunut 0,732:een millimooliin grammassa, mutta 60 minuutin reaktioajalla pitoisuudessa ei tapahtunut merkittävää nousua. 75 minuutin reaktioajalla pitoisuus oli noussut jälleen jyrkästi (1,183 mmol/g). Karboksyyliipitoisuus oli korkeimmillaan 90 minuutin reaktioajalla (1,267 mmol/g), minkä jälkeen pitoisuudessa ei havaittu merkittäviä muutoksia. Tulosten perusteella pääteltiin, että optimaalinen reaktioaika TEMPO-avusteisessa hapetuksessa on 75–90 minuuttia.

7.3 Menetelmän toistettavuus

Menetelmän toistettavuudella tarkoitetaan tulosten yhtäpitävyyttä, kun määrytykset tehdään samasta näytteestä, samoissa olosuhteissa ja lyhyellä aikavälillä. Menetelmä, tekijä, laite ja laboratorio ovat samat kaikissa määrytyksissä.

Tuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin eli suhteellinen keskihajonta. [13, s. 29–31; 14, s. 14.]

Keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta määritettiin yhdestä kaupallisesta nanoselluloosanäytteestä (CNC TEMPO Low) sekä yhdestä itse valmistetusta TEMPO-näytteestä (reaktioaika 90 minuuttia) kymmenellä rinnakkaismäärityksellä. Keskiarvo ja keskihajonta laskettiin MS Excelin KESKIARVO- ja KESKIHAJONTA.S.-funktioilla. Suhteellinen keskihajonta laskettiin keskihajonnan ja keskiarvon avulla kaavalla 3.

$$\text{suhteellinen keskiarvo} = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Kahden tutkitun näytteen mittaustuloksista määritetyt keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat on esitetty taulukossa 4. Kaikki mittaustulokset on esitetty liitteessä 3.

Taulukko 4. Toistettavuusmittauksien tuloksista lasketut keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat.

Näyte	Keskiarvo (mmol/g)	Keskihajonta (mmol/g)	Suhteellinen keskihajonta (%)
CNC TEMPO Low	0,158	0,011	6,67
TEMPO (90 min)	1,112	0,070	6,32

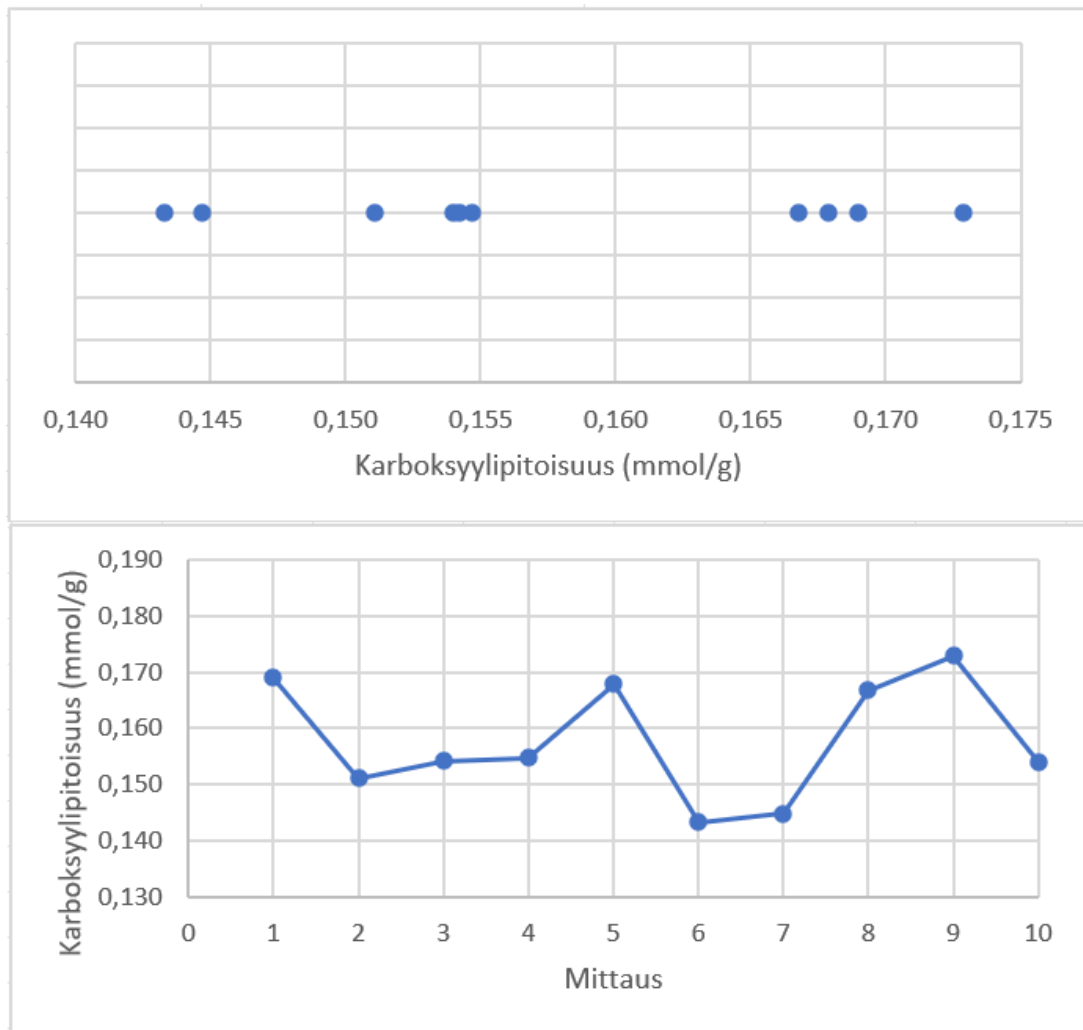
Kaupallisen nanoselluloosanäytteen (CNC TEMPO Low) kymmenestä rinnakkaisnäytteestä mittaamalla saatujen karboksyyliipitoisuuksien keskiarvo oli 0,158 mmol/g, keskihajonta 0,011 mmol/g ja suhteellinen keskihajonta 6,67 %.

TEMPO-avusteisella hapetuksella (90 minuuttia) valmistetun näytteen keskiarvoksi laskettiin 1,112 mmol/g, keskihajonnaksi 0,070 mmol/g ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 6,32 %. Suhteelliset keskihajonnat arvioitiin hyväiksi ja menetelmä näin ollen toistettavaksi.

7.4 Menetelmän oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuudella tarkoitetaan useista toistoista saatujen suureen mitattujen arvojen keskiarvon ja suureen vertailuarvon yhtäpitävyyttä. Oikeellisuutta voidaan arvioida käyttämällä varmennettua vertailumateriaalia, osallistamalla vertailumittauksiin, tekemällä saantokokeita tai vertaamalla menetelmää yleisesti hyväksytyyn referenssimenetelmään. [13, s. 27.] Tässä opinnäytetyössä oikeellisuutta arvioitiin määrittämällä karboksyyliipitoisuus kaupallisesta nanoselluloosanäytteestä (CNC TEMPO Low) kymmenellä rinnakkaismäärityksellä ja vertaamalla mittaamalla saatuja tuloksia valmistajan ilmoittamaan pitoisuuden kaksisuuntaisella t-testillä.

Analysoidun näytteen valmistajan ilmoittama karboksyyliipitoisuus oli 0,2 mmol/g. Mittaamalla saatuja tuloksia on havainnollistettu kuvassa 19 piste- ja viivakaaviolla. Tarkat mittaustulokset sekä niiden laskettu keskiarvo ja keskihajonta on esitetty liitteessä 3.



Kuva 19. Kymmenestä rinnakkaisnäytteestä määritetyt karboksyylipitoisuudet piste- ja viivakaaviolla havainnollistettuna näytteestä, jonka valmistajan ilmoittama karboksyylipitoisuus oli 0,2 mmol/g. Mittaamalla saadut tulokset vaikuttavat likimain normaalijakautuneilta sekä toisistaan riippumattomilta.

Saadut tulokset analysoitiin kaksisuuntaisella t-testillä, jossa mittaamalla saatuja arvoja verrattiin tunnettuun arvoon eli valmistajan ilmoittamaan pitoisuuteen 95 %:n luottamustasolla.

Testisuure t_{lask} laskettiin kaavalla 4.

$$t_{lask} = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s/\sqrt{n}} \quad (4)$$

t_{lask} on testisuure

\bar{x} on rinnakkaismääriytyksien keskiarvo

μ_0 on näytteen ilmoitettu pitoisuus

s on rinnakkaismääriytyksien otoskeskihajonta

n on havaintojen lukumäärä.

Testisuureen arvoksi laskettiin 12,653. Kriittinen arvo t_{crit} määritettiin MS Excelin T.KÄÄNT.-funktioilla, ja sen arvoksi saatiin 2,262. Koska $t_{lask} > t_{crit}$, näytteestä mitaamalla saadut tulokset eroavat merkitsevästi valmistajan ilmoittamasta karboksyyliipitoisuudesta 95 %:n luottamustasolla.

8 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli testata konduktometrisen titrauksen menetelmää nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuuden määrittämisessä. Työssä pyrittiin selvittämään kahden eri tavan soveltuvuutta titrauskäyrän lineaaristen alueiden leikkauspisteiden määrittämiseen sekä arvioimaan menetelmän toistettavuutta ja uusittavuutta. Lisäksi tavoitteena oli tutkia TEMPO-avusteisen hapetuksen reaktioajan vaikutusta nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuuksiin.

Kaupallisten nanoselluloosanäytteiden titrauskäyristä määritettiin lineaaristen alueiden leikkauspisteet kahdella eri tavalla. Ensimmäinen tapa oli kolmesta suorasta koostuvan paloittain lineaarisen mallin sovittaminen titrauskäyrään RStudiolla. Ohjelmalla määritettiin suorien leikkauspisteet ja niiden avulla laskettiin näytteiden karboksyyliipitoisuus. Toisessa tavassa titrausohjelman automaattisesti sovittamien suorien lisäksi titrauskäyrään piirrettiin puuttuvat suorat manuaalisesti kuvankäsittelyohjelmalla, ja suorien leikkauspisteet luettiin silmä-määräisesti kuvaajan x-asteikolta. Tuloksia verrattiin näytteiden valmistajan ilmoittamiin karboksyyliipitoisuuksiin.

Lähes kaikki mittaamalla saadut karboksyyliipitoisuudet olivat pienempiä kuin valmistajan ilmoittamat pitoisuudet riippumatta siitä, kumpaa tapaa käytettiin. Paloittain lineaarinen malli osoittautui ongelmalliseksi etenkin sellaisten näytteiden kohdalla, joiden karboksyyliipitoisuus on pieni. Kuvankäsittelyohjelman käytössä virhettä taas aiheuttaa tekijän oma harkinta lineaaristen alueiden arvioimisessa silloin, kun puuttuva suora piirretään titrauksen ensimmäiseen tai kolmanteen vaiheeseen. Titrauksen toiseen vaiheeseen, jossa johtokyky pysyy jotakuinkin tasaisena, suora voidaan sen sijaan aina piirtää samalla tavalla alimman pisteen kautta x-akselin suuntaiseksi. Tulosten perusteella todettiin, että kuvankäsittelyohjelma soveltuu paremmin titrauskäyrän lineaaristen alueiden leikkaus pisteiden määrittämiseen ja näytteen karboksyyliipitoisuuden laskemiseen.

TEMPO-avusteisella hapetuksella valmistettiin itse kymmenen nanoselluloosänäytettä eri reaktioajoilla. Näytteiden karboksyyliipitoisuus ei noussut ensimmäisen 30 minuutin aikana. 45 minuutin reaktioajan jälkeen pitoisuus alkoi nousta, ja korkeimmillaan se oli 90 minuutin reaktioajalla. Tuloksien perusteella pääteltiin, että korkean karboksyyliipitoisuuden saavuttamiseksi TEMPO-avusteisen hapetuksen reaktioajan tulisi olla 75–90 minuuttia. Pidempi reaktioaika ei ole tehokkuuden kannalta enää kannattava.

Toistettavuusmittauksissa karboksyyliipitoisuus määritettiin laajemmalla mittausarjalla kahdesta näytteestä. Mittaamalla saaduista pitoisuuksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Suhteelliseksi keskihajonnaksi saatiin kaupallisella nanoselluloosänäytteellä 6,67 % ja itse valmistetulla TEMPO-hapetetulla näytteellä 6,32 %. Suhteelliset keskihajonnat arvioitiin melko pieniksi ja menetelmä näin ollen toistettavaksi.

Analyysimenetelmän oikeellisuutta arvioitiin määrittämällä karboksyyliipitoisuus kaupallisesta nanoselluloosänäytteestä kymmenellä rinnakkaisnäytteellä ja vertaamalla saatuja tuloksia valmistajan ilmoittamaan pitoisuuteen kaksisuuntaisella t-testillä. T-testin tulokset osoittivat, että mittaamalla saadut pitoisuudet erosivat merkitsevästi valmistajan ilmoittamasta pitoisuudesta 95 %:n luottamustasolla. Valmistajan ilmoittamien karboksyyliipitoisuuksien tarkkuudesta ei

kuitenkaan ollut tietoa, sillä pitoisuuksille ei ollut ilmoitettu mahdollista vaihteluväliä.

Työn tavoitteet saavutettiin hyvin ja menetelmän toimivuudesta saatiin arvokasta lisätietoa. Menetelmää olisi mahdollista vielä jatkossa kehittää parempien tulosten saamiseksi. Tulevaisuudessa voisi esimerkiksi testata, miten suolan lisääminen näytteeseen vaikuttaa titrauskäyrän muotoon ja lineaaristen alueiden arviointiin, ja sen myötä tulosten oikeellisuuteen. Lisäksi olisi hyödyllistä tutkia menetelmän uusittavuutta, jolloin saataisiin tietoa kuvankäsittelyohjelman toimivuudesta karboksyyliipitoisuuden määrittämisessä silloin, kun analyysin tekijä ja ajankohta vaihtelevat.

Lähteet

- 1 Kangas, Heli. 2014. Opas selluloosananomateriaaleihin. Espoo: VTT.
- 2 Foster, E. J.; Moon, R. J.; Agarwal, U. P.; Bortner, M. J.; Bras, J.; Camarero-Espinosa, S.; Chan, K. J.; Clift, M. J.; Cranston, E. D. & Eichhorn, S. J. 2018. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chemical Society Reviews* 47(8), s. 2609–2679.
- 3 SCAN-CM 65:02. Total acidic group content. 2002. Stockholm: Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committee.
- 4 Metsätieteiden osasto. Verkkoaineisto. Itä-Suomen yliopisto. <<https://www.uef.fi/fi/yksikko/metsatieteiden-osasto>>. Luettu 4.6.2022.
- 5 Isogai, Akira; Saito, Tsuguyuki & Fukuzumi, Hayaka. 2011. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*. 3, s. 71–85.
- 6 Kekäläinen, Kaarina. 2016. Microfibrillation of pulp fibres: the effects of compression-shearing, oxidation and thermal drying. Väitöskirja. Oulun yliopisto. Jultika-tietokanta.
- 7 Kuinka sellua valmistetaan? Verkkoaineisto. UPM. <<https://www.upmpulp.com/fi/vastuullinen-sellu/kuinka-sellua-valmistetaan/>> Luettu 9.10.2022.
- 8 Oh, Kyudeok; Lee, Jee-Hong; Wanhee, Im; Rajabi-Abhari, Araz & Lee, Hak Lae. 2017. The Role of Cellulose Nanofibrils in Structure Formation of Pigment Coating Layers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*.
- 9 CNC (Cellulose Nanocrystals) or NCC (Nanocrystalline Cellulose). 2022. Verkkoaineisto. Cellulose Lab. <<https://www.celluloselab.com/our-products/cnc-ncc-cellulose-nanocrystals/>>. Luettu 18.8.2022.
- 10 Asare, Emmanuel & Roy, Ipsita. 2021. Bacterial Cellulose, a green biodegradable polymer with many varied applications. Verkkoaineisto. <<https://www.ecofunco.eu/news/bacterial-cellulose-green-biodegradable-polymer-many-varied-applications>>. 8.7.2021. Luettu 18.8.2022.
- 11 Katz, S.; Beatson, R.P. & Scallan, A.M. 1984. The determination of strong and weak acidic groups in sulphite pulps. *Svensk Papperstidning* 87, s. 48–53.

- 12 Scallan, A.M.; Katz, S. & Argyropoulos, D.S. Conductometric titration of cellulosic fibres. 1989. Cellulose and Wood Chemistry and Technology, s. 1457–1471.
- 13 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. VTT. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu: 4.6.2022.
- 14 Elintarviketurvallisuusvirasto EVIRA. 1997. Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. Helsinki: EVIRA.

R-skripti

```
# Luetaan data
datakehikko <- read.table('CNC_TEMPO_Medium_A.txt',header=TRUE)
m <- 0.1095
C <- 0,04891

library(segmented)

# Lineaarinen malli
lineaarinen_malli <- lm(y~x,data=datakehikko)

# Paloittain lineaarinen malli, psi=c(3,4.5) antaa alkuarvot katkaisu-
pisteille
paloittain_lineaarinen_malli <- segmented(lineaari-
nen_malli,seg.Z=~x,psi=c(3,4.5))

# Katkaisupisteet
xbrake <- summary(paloittain_lineaarinen_malli)$psi[,2]
# Ennustetut arvot katkaisupisteissä
ybrake <- predict.segmented(paloittain_lineaarinen_malli,new-
data=data.frame(x=xbrake),se.fit=TRUE)

# Sovituskuvaaja
plot(paloittain_lineaarinen_malli,col='red',lwd=2,xlab='Tilavuus
(ml)',ylab='Johtokyky (mS/cm)',main='Titrauskäyrä')
points(datakehikko$x,datakehikko$y,pch=16,cex=0.5)
points(xbrake,ybrake$fit,pch=16,col='red')
grid()
print(xbrake)
print(ybrake)

# Näytteen karboksyyliipitoisuus
V1 <- summary(paloittain_lineaarinen_malli)$psi[1,2]
V2 <- summary(paloittain_lineaarinen_malli)$psi[2,2]
karboksyyliipitoisuus <- (V2-V1)/m*C
cat('karboksyyliipitoisuus = ',round(karboksyyliipitoisuus,3))
```

Esimerkkikoodi 1. Paloittain lineaarisen mallin sovittamisessa ja näytteen karboksyyliipitoisuuden määrittämisessä käytetty R-skripti. Esimerkinäytteen (CNC TEMPO Medium, rinnakkaisnäyte A) massa on 0,1095 g ja suorien leikkauspisteille annetut alkuarvot ovat 3 ja 4,5. Muokattu Veli-Matti Taavitsaisen R-skriptistä.

Nanoselluloosanäytteiden karboksyyli­pitoisuudet esimit­tauksissa

Taulukko 1. Esimit­tauksissa mitatut kaupallisten nanoselluloosanäytteiden karboksyyli­pitoisuudet kolmella rinnakkaisnäytteellä.

Näyte	Valmistajan ilmoittama karboksyyli­pitoisuus (mmol/g)	Mitatut karboksyyli­pitoisuudet (mmol/g, paloittain lineaarinen malli)	Mitatut karboksyyli­pitoisuudet (mmol/g, kuvankäsittelyohjelma)
CNC TEMPO Low	0,2	0,505	0,243
		0,571	0,189
		0,594	0,212
CNC TEMPO Medium	1,2	0,941	1,014
		0,978	1,069
		0,960	1,025
CNC TEMPO High	2,0	1,489	1,505
		1,548	1,600
		1,523	1,601

Taulukko 2. Esimittauksissa mitatut TEMPO-avusteisella hapetuksella valmistettujen nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuudet kolmella rinnakkaisnäytteellä.

Reaktioaika (min)	Mitatut karboksyyliipitoisuudet (mmol/g)			Keskiarvo (mmol/g)
15	0,254	0,448	0,219	0,307
30	0,316	0,281	0,319	0,305
45	0,751	0,754	0,691	0,732
60	0,789	0,748	0,795	0,777
75	1,192	1,160	1,196	1,183
90	1,285	1,286	1,229	1,267
105	1,057	1,111	1,093	1,087
120	0,982	1,053	1,067	1,034
135	1,078	1,119	1,176	1,124
150	1,121	1,100	1,130	1,117

Nanoselluloosanäytteiden karboksyyliipitoisuudet toistettavuus- ja oikeellisuusmittauksissa

Taulukko 1. Nanoselluloosanäytteiden mitatut karboksyyliipitoisuudet toistettavuus- ja oikeellisuusmittauksissa kymmenellä rinnakkaisnäytteellä.

Mittaus	Mitattu karboksyyliipitoisuus (mmol/g)	
	CNC TEMPO Low	TEMPO (90 min)
1	0,169	1,095
2	0,151	1,126
3	0,154	1,144
4	0,155	1,111
5	0,168	1,143
6	0,143	0,920
7	0,145	1,163
8	0,167	1,147
9	0,173	1,150
10	0,154	1,120
Keskiarvo (mmol/g)	0,158	1,112
Keskihajonta (mmol/g)	0,011	0,070
Suhteellinen keskihajonta (%)	6,67	6,32