

Final Report 2012/856 AMi

SET UP AND VALIDATION OF A TITRIMETRIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF THE ACTIVE INGREDIENT ACTIVE CHLORINE AND PHYSICAL-CHEMICAL ANALYSIS ON THE TEST PRODUCT VIRES 5

Study program:

2012/856 AMi

Contract n.:

PPR12012016002

Sponsor:VIRES 5 Bvba
Bredabaan 926
2990 Wuustwezel
BELGIUMStudy Monitor:BSL BIOSERVICE Scientific Laboratories GmbH
Behringstrasse 6/8
82152 Planegg
GERMANYTest product:

VIRES 5

Study Director:
(Marta Lanata)*Marta Lanata*Released on:*May 25th 2012*

This test report cannot be reproduced partially without a written approval of the Test Facility

Eurofins Biolab S.r.l.

Società con Socio unico sottoposta

a direzione e coordinamento della società

Eurofins Scientific Italia S.r.l.

parte di Eurofins Scientific Group

<http://pharma.eurofins.com/>Via Bruno Buozzi, 2
20090 Vimodrone (MI) - Italia

Tel. + 39-022507151

Fax + 39-0225071599

biolab@eurofins.comwww.eurofins.itwww.biolab.it

C.SOC. € 100.000 i.v.

P. IVA 00762140960

C.F. 03765750157

REA MI 966696

D-U-N-S 429117112

CIT005 4-385

INDEX


COMPLIANCE WITH GOOD LABORATORY PRACTICE	3
QUALITY ASSURANCE STATEMENT	4
SUMMARY	5
INTRODUCTION	5
FILING	5
PROCEDURES.....	6
TEST PRODUCT	6
TEST SAMPLE	6
A1 EXPERIMENTAL REPORT 2012/856 AM – SET UP AND VALIDATION OF A LABORATORY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF THE ACTIVE INGREDIENT ACTIVE CHLORINE IN THE TEST PRODUCT VIRES 5	7
TEST METHOD	7
EXPERIMENTAL DESIGN.....	7
CALCULATIONS	9
RESULTS	9
A2 EXPERIMENTAL REPORT 2012/856 AM –PHYSICAL-CHEMICAL ANALYSIS ON THE TEST PRODUCT VIRES 5.....	10
TEST METHOD	10
EXPERIMENTAL DESIGN.....	10
RESULTS	11
DEVIATION.....	11
CONCLUSIONS.....	11
ADDENDA.....	11

COMPLIANCE WITH GOOD LABORATORY PRACTICE

I the undersigned declare that the studies described in this report have been conducted under my supervision and in compliance with the following standards of Good Laboratory Practice:

- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring - OECD principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997) – Environment Directorate – Organisation for Economic Co- Operation and Development , Paris 1998.
- Legislative decree n. 50 of March the 2nd, 2007. Enforcement of Community Directives 2004/9/CE e 2004/10/CE, concerning the inspection and verification of Good Laboratory Practice and the drawing of the legislative, regulatory and administrative dispositions relative to the application of Good Laboratory Practice rules, to the control of their application on the assays performed on the chemical substances (GU n.86 of April the 13th , 2007).
- United States Food and Drug Administration, Title 21 Code of Federal Regulations Part 58, Federal Register 22 December 1978, and subsequent amendments.
- Decree of the Italian Ministry of Health October the 12th 2010, certification N. 121/2010 authorizing Eurofins Biolab S.r.l. to perform analyses in compliance with the principles of good laboratory practices (<http://www.eurofins.it>).

There were no circumstances that may affect the quality or integrity of the study


Study Director
(Marta Lanata)

May 25th 2012
Date 0

QUALITY ASSURANCE STATEMENT

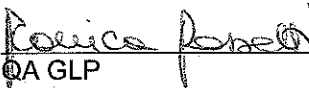
The study was assessed for compliance with the approved study program and the Standard Operating Procedures of Eurofins Biolab Srl.

The study and/or the test facility were periodically inspected by the Quality Assurance unit according to the corresponding SOPs. These inspections and audit were carried out by the Quality Assurance unit, personnel independent of staff involved in the study.

The undersigned hereby certifies the dates on which the inspections have been carried out and reported to the Director of the Study and to Eurofins Biolab's S.r.l. Management:

PHASE OF STUDY	DATE OF INSPECTION / REPORTING
Pre-experimental period	//
Experimental period	//
Post-experimental period	//
Documentation: - Study program - Raw data - Final report	May, 18 th 2012 May, 25 th 2012 May, 25 th 2012

This report accurately reflects the raw data.


 QA GLP
 (M. Rossetti)

May 25th 2012
 DATE /

SUMMARY

The aim of the study was to set up and validate, according to the SANCO/3030/99 rev.4 guidelines, a titrimetric method for the quantification of the active ingredient active chlorine in the test product VIRES 5 and to perform physical-chemical analysis on it. The parameters evaluated were:

- Specificity
- Linearity
- Precision
- Intermediate precision

Accuracy and specificity against the placebo were not determined because the product has been produced electrochemically and so there are no raw material and placebo.

The following physical-chemical analyses were performed on the test product:

- pH
- ORP (oxidation/reduction potential)
- Total chlorides (see addendum 5 for method)

The method proved to be specific, linear and precise

Results section reports the values obtained in detailed tables.

INTRODUCTION

On behalf of VIRES 5 Bvba it was performed a study aimed to set up and validate (according to SANCO guidelines) a method for the quantification of the active ingredient active chlorine. The study was performed at the Test Facility Eurofins Biolab S.r.l. of Vimodrone (MI) – via B. Buozzi n. 2 (Italy).

EXPERIMENTATION	START	END	RESEARCHER
A.1_Set up and Validation of a titrimetric method for the quantification of the active ingredient active chlorine in the test product VIRES 5	May the 21 st , 2012	May the 25 th , 2012	J.De Castro M.Lanata
A.2_Physical-chemical analysis on the test product VIRES 5	May the 24 th , 2012	May the 25 th , 2012	J.De Castro

BIBLIOGRAPHY

SANCO/3030/99 rev.4 – Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (Part A, Section 4) and Annex III (Part A, Section 5) of Directive 91/414.

Analytical methods for waters APAT/IRSA-CNR – APAT manual and guidelines 29/2003 – Section 4000, n. 4090

FILING

The study program, all raw data are filed in the archives of Eurofins Biolab S.r.l. for ten years after the issuing of the final report.

The retained sample of the product will be filed until the expiry date provided by the Sponsor.

At the end of the conservation period, the Sponsor may request an extension of the conservation of all or part of the products for a further period, or their restitution. A suitable agreement shall be drafted in this case.

Eurofins Biolab S.r.l.

Società con Socio unico sottoposta

a direzione e coordinamento della società

Eurofins Scientific Italia S.r.l.

parte di Eurofins Scientific Group

<http://pharma.eurofins.com/>

Via Bruno Buozzi, 2

20090 Vimodrone (MI) - Italia

Tel. + 39-022507151

Fax + 39-0225071599

biolab@eurofins.com

www.eurofins.it

C.SOC. € 100.000 i.v.

P. IVA 00762140960

C.F. 03765750157

REA MI 966696

D-U-N-S 429117112

CIT005 4-385

www.biolab.it

PROCEDURES

All procedures used during this study are recorded in the Eurofins Biolab S.r.L Procedures Manual.

TEST PRODUCT

Name: VIRES 5

Description: purified water with increased OrpV value

Composition Declared By The Sponsor:

Ingredient	%w/w
H ₂ O	99.69
NaCl	0.26
HclO+Ocl	0.05

The characterisation of the test product is under Sponsor responsibility

Storage: the tested samples were stored at room conditions until the beginning of the study

Waste procedure: the tested samples will be discarded after the analytical tests according to local current laws.

TEST SAMPLE

Clear colourless liquid contained in a white plastic bottle.

Formula code n.: np
Batch n.: 23107
Manufacture date: July the 22nd, 2011
Expiry date: July the 24th, 2014
I.D.: 12.1213-S
Receiving n.: EUITVI-25706
Receiving date: May the 8th, 2012

A1_Experimental Report 2012/856 AM – Set up and validation of a titrimetric method for the quantification of the active ingredient active chlorine in the test product VIRES 5

TEST METHOD

Titrimetric

EXPERIMENTAL DESIGN

Parameters under investigation

Specificity

Method specificity was evaluated proving that the blank did not consume any titrant.

Linearity

Method linearity was performed in order to verify the ability of the method to obtain test results, within a given range, which were directly proportional to the concentration of the active ingredient in the sample. The linearity of the method was evaluated at five different concentrations corresponding to 50%, 75%, 100%, 125%, 150 % of the active in the sample. Each concentration level was prepared once. The titrant volume corresponding to the active ingredient was plotted against the weight of the sample. Linear regression coefficient of each line fitting the data (R^2) was calculated along with its equation. The confidence interval at 95% for the intercept was calculated.

Precision

Method precision was carried out in order to express the degree of agreement amongst individual test results when the method was carried out under the same operating conditions. It was expressed as RSD% of six assay results, of the sample, obtained in the same analytical session.

Intermediate precision

Intermediate precision of the method: was performed in order to express within-laboratories variations: different analyst and new analytical session. It was expressed as RSD% of six assay results, of the sample, obtained in the same analytical session.

Acceptance criteria

Parameters	Measurement Unit	Acceptability criterion
Specificity	-	No volume of titrant consumed
Linearity	R^2	>0.99 The confidence interval at 95% for the intercept contains zero
Precision/ Intermediate Precision	RSD%	$RSD\% = 0.67 \times 2^{[1 - 0,5 \log A]m}$ C is the analyte concentration as a fraction (es. 1 ppm = 0,000001). In this case C= 0.0005 for HClO+Ocl RSD%=4.21%
Accuracy	% Recovery	The confidence interval at 95% for the recovery contains 100%

Reactants

- Potassium iodide (Sigma-Aldrich, batch SZBB2800V)
- Starch solution (Fluka, batch MKB66659)
- Acetic acid (Sigma-Aldrich, batch SZBB1820V)

Eurofins Biolab S.r.l.

Società con Socio unico sottoposta

a direzione e coordinamento della società

Eurofins Scientific Italia S.r.l.

parte di Eurofins Scientific Group

<http://pharma.eurofins.com/>

Via Bruno Buozzi, 2
20090 Vimodrone (MI) - Italia

Tel. + 39-022507151

Fax + 39-0225071599

biolab@eurofins.com

www.eurofins.it

www.biolab.it

C.SOC. € 100.000 i.v.

P. IVA 00762140960

C.F. 03765750157

REA MI 966696

D-U-N-S 429117112

CIT005 4-385

- Water (Milli Q)

Standard

- Sodium thiosulphate 0.1M (Sigma Aldrich, batch SZBB1320V, ex. Date 6/12)
- Iodine 0.1N (Carlo Erba, batch T126261D, ex.date 6/12) (see addendum 4)
- Sodium thiosulphate 0.01M (Fluka, batch SZBB0910, Scad.3/13)

Equipment

- Ordinary laboratory equipment

SET UP**Specificity (Working solutions preparation)**Sample

About 60 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

Method1

12.5 ml of glacial acetic acid diluted (12 g of glacial acetic acid in 100 ml of water) and 1 g of KI have been added to the sample. The solution has been titrated with sodium thiosulphate 0.1 M using starch as indicator.

The active concentration was too low to be titrated using sodium thiosulphate 0.1 M, so sodium thiosulphate 0.01N was used for the validation.

Method2

12.5 ml of glacial acetic acid diluted (12 g of glacial acetic acid in 100 ml of water) and 1 g of KI have been added to the sample. The solution has been titrated with sodium thiosulphate 0.01 M using starch as indicator.

Sodium thiosulphate 0.01M has been prepared from a standard diluting it in water (1liter), the final assay has been checked:

Sodium thiosulphate 0.01M assay check (double titration)

50 ml of sodium thiosulphate solution 0.01M have been titrated with iodine 0.1N using starch as indicator.

The method 2 is specific, it has been validated

VALIDATION**Linearity**Sample 50%

About 30 g of test product was exactly weighed into a 250 ml flask.

Sample 75%

About 45 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

Sample 100%

About 60 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

Sample 125%

About 75 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

Eurofins Biolab S.r.l.

Società con Socio unico sottoposta

a direzione e coordinamento della società

Eurofins Scientific Italia S.r.l.

parte di Eurofins Scientific Group

<http://pharma.eurofins.com/>

Via Bruno Buozzi, 2

20090 Vimodrone (MI) - Italia

Tel. + 39-022507151

Fax + 39-0225071599

biolab@eurofins.com

www.eurofins.it

www.biolab.it

C.SOC. € 100.000 i.v.

P. IVA 00762140960

C.F. 03765750157

REA MI 966696

D-U-N-S 429117112

CIT005 4-385

Sample 150%

About 90 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

Precision / Intermediate precision
Sample solution (six preparations)

About 60 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

CALCULATIONS

The percentage content of Cl_2 was calculated as follows:

$$\%w/w Cl_2 = \frac{Cl_2 (mg)}{W_{sample}} * 100$$

$$Cl_2 (mg) = V_{Na_2S_2O_3} (ml) \times f_c \times 0.3546^*$$

*1 ml of 0.01M sodium thiosulphate is equivalent to 0.3546 mg of active chlorine.

Where:

f_c = molarity correction factor
 W_{sample} = sample weight (mg)

RESULTS

Sodium thiosulphate 0.01M assay: 0.010M (see Addendum 2)

Specificity

The method proved to be specific, no titrant was consumed from blank.

Linearity

Method Linearity was proven on the sample on 5 different concentration levels: 50%, 75%, 100%, 125% and 150% of the amount of active chlorine in the sample. All acceptance criteria were satisfied (see Addendum 2).

Linearity	
R^2	0,9984
Slope	0,0003
Intercept	-0.1918
Confidence interval at 95% for the intercept	[4837.2805 ; -4837.2805]

Precision

Method precision was proven preparing 6 different samples in the same analytic session. (see Addendum 2).

Average Cl_2 assay %	RSD %
0.01 %	0.42%

Intermediate Precision

Intermediate precision was proven preparing 6 different samples in the same analytic session, with a different analyst on a different day with respect to the precision (see Addendum 2).

Average Cl ₂ assay %	RSD %
0.01 %	1.44%

Precision/Intermediate precision statistic

The percentage assay of chlorine obtained from the precision and intermediate precision were averaged (see Addendum 3).

A2_Experimental Report 2012/856 AM –Physical-chemical analysis on the test product VIRES 5

TEST METHOD

Titrimetric

EXPERIMENTAL DESIGN

Parameters under investigation

The following physical-chemical analyses were performed on the test product:

- pH
- ORP (oxidation/reduction potential)
- Total chlorides (see addendum 5 for method)

Reactants

- Phenolphthalein (Sigma, batch 80080)
- Ethanol (Panreac, batch 267020)
- Potassium chromate (Sigma Aldrich, batch MKBF2111V)
- Water Milli Q (produced in situ)

Standard

- Silver nitrate 0.1N (Aldrich, batch BCBH0959V, ex.date 06/12) (see addendum 6)

Equipment

- Burette
- Automatic titrator, Crison titromatic
- Electrode Mettler Toledo DM 140-SC
- Electrode Crison 50 14 T
- pHmeter, Crison GLP-21
- Ordinary laborator equipment

Procedure:

1_pH measurement has been performed potentiometrically on the product as it

2_ORP measurement has been performed on the product as it

3_Total chlorides (see addendum 7):

Take 100ml of sample and transfer to a 250ml flask, add a few drops of phenolphthalein indicator. Verify that the sample is located around pH 8, if not, adjust the value using H₂SO₄ 0.5M or NaOH 1M. Add 1 ml of potassium chromate solution and titrate with 0.1N silver nitrate until the indicator turns red

finish.

In parallel, perform a blank test.

RESULTS

Parameters	Results
pH	7.39
ORP	751 mV
Total chlorides (see addendum 7)	3.56 mg/ml

DEVIATION


No deviation has been recorded from study program.

CONCLUSIONS

The method described identified as 2012/856 AMi-MdP (see Addendum 1) proved to be specific, linear, precise and was successfully validated.

ADDENDA

ADDENDUM	TITLE	NUMBER OF PAGES
N.1	2012/856AMi-MdP	1
N.2	EXCEL TABLE VALIDATION	1
N.3	STATISTIC PRECISION/INTERMEDIATE PRECISION	1
N.4	IODINE CoA	1
N.5	Analytical methods for waters APAT/IRSA-CNR – APAT manual and guidelines 29/2003 – Section 4000, n. 4090. Method A1	5
N.6	SILVER NITRATE CoA	1
N.7	EXCEL TABLE CHLORIDE	1

	Test Facility Certification M.S. 121/2010	Report No.: 2012/856 AMi-MdP
		Version: English
		Page: 1 of 1
		Print date: May 25 th 2012

TITRIMETRIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF ACTIVE CHLORINE

Aim: Analytical method for the quantification of the active ingredient active chlorine

Range: Active chlorine: 3.0 mg ÷ 8.9 mg

Reactants

- Potassium iodide
- Starch solution
- Acetic acid
- Water (Milli Q)

Apparatus

- Burette 25 ml

Standard:

Sodium thiosulphate (0.01M)

Sample solution (double preparation)

About 60 g of test product were exactly weighed into a 250 ml flask.

METHOD

12.5 ml of glacial acetic acid diluted (12 g of glacial acetic acid in 100 ml of water) and 1 g of KI are added to the sample. The solution is titrated with sodium thiosulphate 0.01 N using starch as indicator.

CALCULATIONS

The percentage content of Cl₂ is calculated as follows:

$$\%w/w \text{ Cl}_2 = \frac{\text{Cl}_2 (\text{mg})}{W_{\text{sample}}} * 100$$

$$\text{Cl}_2 (\text{mg}) = V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} (\text{ml}) \times f_c \times 0.3546^*$$

*1 ml of 0.01M sodium thiosulphate is equivalent to 0.3546 mg of active chlorine.

Where:

f_c = molarity correction factor

W_{sample} = sample weight (mg)

Method prepared and approved by:

Date:

Marta Lanata

May 25th 2012

Marta Lanata (Study Director)

Eurofins Biolab S.r.l.
 Società con Socio unico sottoposta
 a direzione e coordinamento della società
 Eurofins Scientific Italia S.r.l.
 parte di Eurofins Scientific Group
<http://pharma.eurofins.com/>

Via Bruno Buozzi, 2
 20090 Vimodrone (MI) - Italia
 Tel. + 39-022507151
 Fax + 39-0225071599
biolab@eurofins.com
www.eurofins.it www.biolab.it

C.SOC. € 100.000 i.v.
 P. IVA 00762140960
 C.F. 03765750157
 REA MI 966696
 D-U-N-S 429117112
 CIT005 4-385

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	2012/856 AM								
2									
3					Cl PM	35,45	g/mol		
4	1 ml of sodium thiosulphate 0,1M is equivalent to 3,546 mg of active chlorine								
5	Thiosulphate assay determination								
6	V thiosulphate 0,01N (ml)	V iodine 0,1N (ml)		Average					
7	50	5,02	0,010	0,010					
8	50	4,98	0,010						
9		Thiosulphate assay	0,010	mg Cl2	0,3546				
10									
11	Precision								
12	sample weight (mg)	Thiosulphate assay	titrant (ml)	Cl2 (mg)	Cl2 (mmol)	%w/w Cl2	Average	RSD%	
13	60013,0	0,01	16,05	5,69	0,08	0,009	0,010	0,42	
14	60006,3		16,10	5,71	0,08	0,010			
15	60024,5		16,20	5,74	0,08	0,010			
16	59996,5		16,20	5,74	0,08	0,010			
17	60018,6		16,10	5,71	0,08	0,010			
18	59995,3		16,20	5,74	0,08	0,010			
19									
20	Linearity								
21		sample weight (mg)	titrant (ml)	Cl2 (mg)	Cl2 (mmol)	%w/w Cl2	Average	RSD%	
22	50%	32330,7	8,55	3,03	0,04	0,009	0,009	1,40	
23	75%	45565,9	12,30	4,36	0,06	0,010			
24	100%	62316,4	16,45	5,83	0,08	0,009			
25	125%	75056,8	19,70	6,99	0,10	0,009			
26	150%	92749,2	25,10	8,90	0,13	0,010			
27									
28									
29									
30	Slope	0,000269655				sample weight (mg)	titrant (ml)	Calculated weight (mg)	
31	Intercept	-0,191755901				32330,7	8,55	32418,3	
32	correlation	0,999184993				45565,9	12,30	46325,0	
33	R2	0,99837065				62316,4	16,45	61715,1	
34						75056,8	19,70	73767,5	
35						92749,2	25,10	93793,1	
36									
37	Slope (a)	1,00000	7,27596E-12	intercept (b)		Confidence interval of b (95%)			
38	dev.st (a)	0,023323875	1520,201294	dev.st (b)		L+	4837,2805		
39	r2	0,99837065	1110,190855	dev.st (y)		L-	-4837,2805		
40	F	1838,224697	3	df					
41	SSreg	2265655569	3697571,203	SSresid					
42			3,182	t (n-2 degrees of freedom)					
43									
44	Intermediate Precision								
45	sample weight (mg)	Thiosulphate assay	titrant (ml)	Cl2 (mg)	Cl2 (mmol)	%w/w Cl2	Average	RSD%	
46	59793,6	0,01	15,60	5,53	0,08	0,009	0,010	1,44	
47	59301,5		16,10	5,71	0,08	0,010			
48	60112,9		16,20	5,74	0,08	0,010			
49	60620,0		16,20	5,74	0,08	0,009			
50	59946,2		16,20	5,74	0,08	0,010			
51	59945,7		16,20	5,74	0,08	0,010			
52									
53									

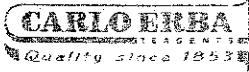
25/5/12 HL
1/3

ADDENDUM 3

25/5/12 ML
/2

A	B	C	D	E
1				
2	DATA PROCESSING OF METHOD:			
3	TITLE: 2012/856AM			
4	Setup and validation of UPLC-UV method for determination of active chlorine			
5		0,05	% active chlorine	
6	replies			
7	a	0,009	% active chlorine	
8	b	0,009		
9	c	0,010		
10	d	0,010		
11	e	0,010		
12	f	0,010		
13	g	0,010		
14	h	0,010		
15	i	0,010		
16	l	0,010		
17	m	0,010		
18	n	0,010		
19	number of tests =	12		
20	Sort data in ascending (from C7:C18)			
21	test of Dixon r max $(X_1 - X_{n-2}) / (X_n - X_2)$	0,118	Valid	There are no outliers
22	test of Dixon r min $(X_3 - X_1) / (X_{n-1} - X_1)$	-0,073	Valid	
23				
24				
25	media	0,010	% active chlorine	
26	standard deviation of repeatability (S)	0,0004	% active chlorine	
27	RSDr %	1,02	%	
28				
29	Definition of C (mass/mass)	0,0005	mg/mg	
30	Horwitz equation: %RSD _R = 2 ^(1+0,5logC)	6,28		
31	Repeatability: %RSD _R = %RSD _r * 0,67	4,21	Valid	
32				
33				
34	Valid			
35	Invalid			
36				
37	There are outliers			
38	There are no outliers			

ADDENDUM 4



Direzione, Uffici e Stabilimento Carlo Erba Reagenti
 Strada Rivoltana Km 6.77
 20090 Rodano (MI)
 Telefono 02-95325.1
 Fax 02-95325.317/320

Capitale Sociale € 5.150.000 i.v.
 R.I. C.F., P.IVA n. 01273980964
 R.E.A. Milano n. 1662256

S.Q.A. CERTIFICATO ISO 9001: 2008 N° 038

Certificate of Analysis

PRODUCT : IODINE 0.1N RPE
CODE : 456036
LOT N° : T126261D
EXPIRING DATE : 2013/05
PACKAGING DATE : 26/04/2011

EDITION 1

TEST	U.M.	SPECIFICATION	RESULT
Description	-	Brown red liquid	Conform
Identification	-	Positive	Positive
Titration factor	-	0.998 ± 1.002	1.001

Statistical sampling executed in conformity with $\sqrt{n} + 1$ and CER CQ000 procedure

Approve Date : 31/05/2011

Not signed electronically issued document

QUALITY CONTROL RESPONSIBLE

G. DEDOTTI

4090. Cloruro

Numerosi cloruri si trovano in natura come minerali, fra questi i più abbondanti sono: salgemma e sale marino (NaCl), silvite (KCl), carnallite ($\text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Lo ione cloruro costituisce lo 0,045% della crosta terrestre, mentre l'acqua di mare contiene 19,4 g Cl/L.

È contenuto in numerosissimi composti inorganici di interesse industriale (sodio, calcio e alluminio cloruro). Soluzioni acquose di acido cloridrico trovano larghissimo impiego nelle attività manifatturiere; il cloruro di sodio viene utilizzato in metallurgia, nella concia delle pelli, nelle produzioni del vetro e delle ceramiche.

I composti dello ione cloruro sono generalmente solidi cristallini, stabili a temperatura ambiente e molto solubili in acqua, ad eccezione del piombo cloruro e del cloruro di mercurio (I), che danno composti covalenti poco solubili.

Concentrazioni tipiche di cloruri in acque lacustri risultano comprese tra 2 e 10 mg/L; in acque fluviali le concentrazioni appaiono molto diversificate anche se raramente superano i 50 mg/L. Per il dosaggio dello ione cloruro nelle acque vengono qui presentati tre metodi per titolazione:

- A1 - Titolazione diretta con nitrato di argento in ambiente neutro o leggermente basico.
- A2 - Titolazione diretta con cloruro di mercurio (II) in ambiente acido.
- B - Titolazione diretta con nitrato di argento in ambiente acido.

Due di essi (A1 e A2) comportano il rilevamento del punto finale mediante viraggio di un indicatore interno, mentre il metodo B contempla la titolazione per via potenziometrica. I metodi consentono il dosaggio del cloruro libero e di quello legato spostabile da Ag(I) o da Hg(II) nelle condizioni di reazione.

METODO A1 - Titolazione argentometrica con indicatore

1. Principio del metodo

Titolazione degli ioni cloruro con una soluzione di nitrato d'argento in ambiente neutro o leggermente basico, in presenza di cromato di potassio come indicatore: dopo la precipitazione quantitativa del cloruro d'argento, si ha colorazione rosso mattone, persistente, del cromato d'argento.

2. Campo di applicazione

Questo metodo, applicabile alle acque di scarico, superficiali e sotterranee, consente il dosaggio dei cloruri in acque relativamente limpide, non troppo colorate e che non contengano una quantità troppo elevata di cationi, i quali diano origine al pH di lavoro a osso- o idrossido-sali oppure a idrossidi poco solubili, o di anioni, che possono dare luogo a precipitati con lo ione argento o con lo ione cromato (indicatore), o di specie chimiche che complessino lo ione Ag(I) o che riducano detto ione o lo ione cromato (vedi Capitolo 3).

Alcune di queste interferenze, se presenti in piccola quantità, possono essere eliminate o minimizzate con trattamenti opportuni.

 COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

Nel campione sottoposto alla titolazione con una soluzione di nitrato di argento 0,1 N (come indicato nel metodo) si possono dosare da 3,5 a 70 mg di cloruri (1÷20 mL di titolante) corrispondenti a 35 ± 700 mg/L se si usano 100 mL di acqua da analizzare; la titolazione è ancora possibile con una soluzione 0,015 N di AgNO_3 , ma l'apprezzamento del viraggio è più difficile e quindi meno accurato.

3. Interferenze e cause di errore

Possono interferire specie complessanti o precipitanti l'argento.

Interferiscono gli ioni bromuro, ioduro, cianuro, tiocianato e arseniato che vengono calcolati come cloruri; ioduri e tiocianati falsano anche il punto di viraggio per fenomeni di adsorbimento. L'interferenza dei solfuri, tiosolfati e solfiti può essere rimossa aggiungendo, all'ebollizione, una soluzione di perossido d'idrogeno al 30%. Gli ortofosfati interferiscono se presenti in concentrazione superiore a 250 mg/L, poichè precipitano come fosfato d'argento.

Il ferro (III), in concentrazione superiore a 10 mg/L, maschera il punto finale della titolazione. A seconda della quantità, i cationi piombo e bario precipitano con il cromato, i cationi idrolizzabili (alluminio, ferro, bismuto, stagno, zinco, ecc.) possono precipitare al pH di titolazione, i cationi colorati (rame, nichel, cobalto) disturbano l'apprezzamento del viraggio. L'eventuale colorazione o torbidità del campione può essere eliminata mediante preliminarmente trattamento con una sospensione di idrossido di alluminio e/o con carbone attivo.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio e buretta graduata di volume opportuno.

6. Reattivi

Si debbono utilizzare reattivi di grado analitico.

6.1 *Acqua esente da cloruri*

Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua bidistillata o deionizzata e distillata.

6.2 *Soluzione di riferimento di nitrato d'argento 0,1 N*

Sciogliere circa 17 g di nitrato d'argento (AgNO_3) in acqua e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL.

Portare a volume con acqua, avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione. L'esatta concentrazione di questa soluzione deve essere controllata, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, titolando con la stessa 20,0 mL della soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N (6.3), secondo le modalità descritte al Paragrafo 7.2. Tale controllo va effettuato almeno in doppio, prima di iniziare la serie di analisi. Lo scarto tra due prove non deve superare 0,2 mL.

Il calcolo della normalità esatta N della soluzione si effettua nel modo seguente:

$$N = \frac{N_1 \cdot 20}{V}$$

dove:

N_1 = normalità della soluzione di cloruro di potassio (6.3);

V = volume (mL) della soluzione di AgNO_3 impiegato nella titolazione e corretto del bianco.

La soluzione deve essere conservata in recipiente di vetro scuro.

6.3 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N

Trasferire 7,4501 g di cloruro di potassio (KCl), previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180°C e raffreddato in essiccatore, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

6.4 Soluzione di cromato di potassio

Sciogliere 50 g di cromato di potassio (K_2CrO_4) in poca acqua. Aggiungere nitrato d'argento fino ad incipiente formazione di precipitato rosso. Lasciar sedimentare per 12 ore circa, filtrare e portare il filtrato ad 1 litro con acqua.

6.5 Soluzione di fenoltaleina

Sciogliere 50 g di fenoltaleina in 500 mL di etanolo al 95% e portare ad 1 litro con acqua. Aggiungere, goccia a goccia, una soluzione di idrossido di sodio 0,01 M, fino alla comparsa di un colore rosa pallido.

6.6 Soluzione di perossido di idrogeno al 30%

6.7 Soluzione di acido solforico circa 0,5 M

Aggiungere molto lentamente e sotto raffreddamento 28 mL di acido solforico (H_2SO_4) ($d=1,84$) a 500 mL di acqua. Dopo raffreddamento diluire ad 1 litro con acqua.

6.8 Soluzione di idrossido di sodio circa 1 M

Sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH) in acqua e diluire ad 1 litro.

6.9 Sospensione di idrossido di alluminio

Sciogliere 125 g di allume potassico ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) in 1000 mL di acqua. Scaldare a 60°C e aggiungere 55 mL di soluzione acquosa concentrata di ammoniaca, lentamente e agitando. Lasciare a riposo per circa 1 ora, quindi travasare la sospensione in una bottiglia e lavare ripetutamente il precipitato con acqua per decantazione, fino a che le acque di lavaggio siano esenti da cloruri.

6.10 Carbone attivo

7. Procedimento

7.1 Pretrattamento

La soluzione da titolare deve essere limpida, incolore e priva delle sostanze interferenti. Portare 100 mL di campione decantato (o un'aliquota misurata diluita a 100) a pH 8,3 con NaOH 1 M (6.8) o H_2SO_4 0,5 M (6.7) in presenza di fenoltaleina. Se necessario filtrare at-

traverso membrana filtrante da 0,45 μm . Lavare il precipitato più volte con 2-5 mL di acqua. Sul filtrato determinare i cloruri.

Se sono presenti sostanze riducenti, quali solfiti, solfuri, tiosolfati, ecc., portare 100 mL di campione (o un'aliquota) a pH 8,3 in presenza di fenoltaleina, eventualmente filtrare e lavare il precipitato. Aggiungere 1 o più mL di soluzione di H_2O_2 (6.6), portare all'ebollizione per pochi minuti e verificare il pH alla fenoltaleina (6.5). Se si forma un precipitato filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione, dopo correzione del pH e dopo filtrazione su membrana, rimane torbido e/o colorato, aggiungere a 100 mL di campione (o a un'aliquota) - portato a pH 8,3 - 3 mL di sospensione di idrossido di alluminio (6.9).

Agitare, lasciar decantare, filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione pretrattato (o aliquota) da sottoporre alla titolazione è ancora colorato, aggiungere 5 g di carbone attivo, filtrare, lavare il filtro e sul filtrato determinare i cloruri.

7.2 Titolazione

Prelevare 100 mL esatti di campione, oppure un volume inferiore esattamente noto, che viene diluito a 100 mL a seconda del contenuto di ione cloruro: in genere si preleva una quantità tale che il contenuto di cloruro non superi 70 mg.

Qualora si voglia controllare se la concentrazione di cloruri nel campione sia superiore o inferiore a 1200 mg/L, conviene prelevare un'aliquota di 30 mL.

Verificare che il campione si trovi intorno a pH 8. Se così non fosse, aggiustare il valore mediante acido solforico 0,5 M (6.7) o idrossido di sodio 1 M (6.8).

Aggiungere 1 mL di soluzione di cromato di potassio (6.4) e titolare con nitrato d'argento 0,1 N (6.2), fino a viraggio rosso persistente.

È indispensabile eseguire, nelle stesse condizioni, una prova in bianco su un'aliquota di 100 mL di acqua, trattata in modo analogo al campione.

8. Calcoli

La concentrazione dello ione cloruro è espressa dalla formula:

$$\text{Cl}^- (\text{mg/L}) = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 35,45 \cdot 1000}{V}$$

dove:

a = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il campione;

b = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il bianco;

N = normalità della soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2);

V = volume (mL) di campione d'acqua prelevato;

35,45 = peso equivalente del cloruro.

Se per la titolazione occorrono più di 10 mL della soluzione di riferimento 0,1 N di nitrato d'argento, la concentrazione dei cloruri nel campione è virtualmente superiore a 1200 mg/L, qualora si siano prelevati 30 mL di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 250 mg/L di cloruro hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio) · 100, pari al 4% e un'accuratezza del 2%.

COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

traverso membrana filtrante da 0,45 μm . Lavare il precipitato più volte con 2÷5 mL di acqua. Sul filtrato determinare i cloruri.

Se sono presenti sostanze riducenti, quali solfiti, solfuri, tiosolfati, ecc., portare 100 mL di campione (o un'aliquota) a pH 8,3 in presenza di fenoltaleina, eventualmente filtrare e lavare il precipitato. Aggiungere 1 o più mL di soluzione di H_2O_2 (6.6), portare all'ebollizione per pochi minuti e verificare il pH alla fenoltaleina (6.5). Se si forma un precipitato filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione, dopo correzione del pH e dopo filtrazione su membrana, rimane torbido e/o colorato, aggiungere a 100 mL di campione (o a un'aliquota) - portato a pH 8,3 - 3 mL di sospensione di idrossido di alluminio (6.9).

Agitare, lasciar decantare, filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione pretrattato (o aliquota) da sottoporre alla titolazione è ancora colorato, aggiungere 5 g di carbone attivo, filtrare, lavare il filtro e sul filtrato determinare i cloruri.

7.2 Titolazione

Prelevare 100 mL esatti di campione, oppure un volume inferiore esattamente noto, che viene diluito a 100 mL a seconda del contenuto di ione cloruro: in genere si preleva una quantità tale che il contenuto di cloruro non superi 70 mg.

Qualora si voglia controllare se la concentrazione di cloruri nel campione sia superiore o inferiore a 1200 mg/L, conviene prelevare un'aliquota di 30 mL.

Verificare che il campione si trovi intorno a pH 8. Se così non fosse, aggiustare il valore mediante acido solforico 0,5 M (6.7) o idrossido di sodio 1 M (6.8).

Aggiungere 1 mL di soluzione di cromato di potassio (6.4) e titolare con nitrato d'argento 0,1 N (6.2), fino a viraggio rosso persistente.

E indispensabile eseguire, nelle stesse condizioni, una prova in bianco su un'aliquota di 100 mL di acqua, trattata in modo analogo al campione.

8. Calcoli

La concentrazione dello ione cloruro è espressa dalla formula:

$$\text{Cl}^-(\text{mg/L}) = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 35,45 \cdot 1000}{V}$$

dove:

a = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il campione;

b = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il bianco;

N = normalità della soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2);

V = volume (mL) di campione d'acqua prelevato;

35,45 = peso equivalente del cloruro.

Se per la titolazione occorrono più di 10 mL della soluzione di riferimento 0,1 N di nitrato d'argento, la concentrazione dei cloruri nel campione è virtualmente superiore a 1200 mg/L, qualora si siano prelevati 30 mL di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 250 mg/L di cloruro hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio) · 100, pari al 4% e un'accuratezza del 2%.

Certificate of Analysis

Product Name: SILVER NITRATE SOLUTION
volumetric, AgNO₃ 0.1M 0.1N
Product Number: 319430
Product Brand: Fluka
Molecular Formula: AgNO₃
Molecular Mass: 169.87
CAS Number:

TEST	SPECIFICATION	LOT BCBH0959V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	CLEAR LIQUID	CLEAR LIQUID
TITRATION (METHOD)	ARGENTOMETRIC	ARGENTOMETRIC
TITRATION (MOLARITY)	0.0950 - 0.1050 N	0.1005 N
REMARKS ON TITRATION	--	TRACEABLE TO NIST SRM #999B
EXPIRATION DATE	36 MONTHS	NOV 2014
QUALITY RELEASE DATE	15 DEC 2011	



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, additional lot specific tests may be included for further information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

ADDENDUM #

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	2012/856AM							
2								
3	Blank volume (ml)	0,11						
4	MW Cl	35,45						
5	Concentration AgNO3 (N)		titrant volume (ml)	Chloride (mmol)	mg Chloride	Chloride (mg/ml)	Average chloride (mg/ml)	Standard Error%
6	0,1005	20	20,12	2,011005	71,29	3,56	3,56	0,50
7	0,1005	20	20,02	2,000955	70,93	3,55		

1 di 2

XXF

24/5/12

Reg 79/12 P 6/10

Viste e tabella excel

24/5/12 MC