

Universita' Degli Studi Di Roma "La Sapienza"

Corso di Laurea Specialistica in
Scienze Applicate ai Beni Culturali

A.A. 2010-2011

Esame di: [Laboratorio di Chimica del Restauro](#)

PhD M.P. Sammartino

Dr. G. Visco

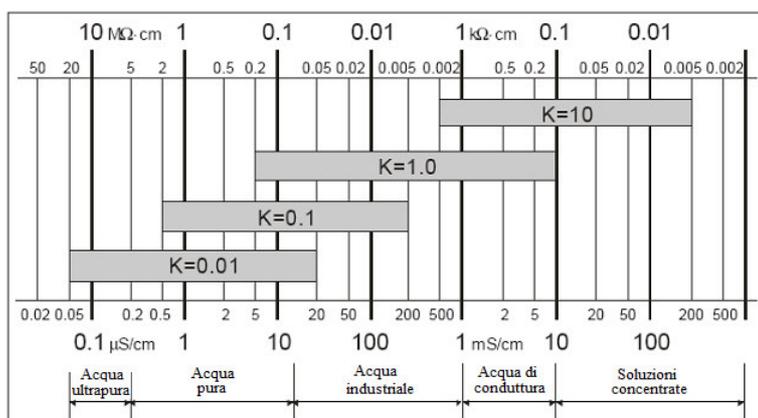
Dr. G. Guida

PhD S. H. Plattner

L'analisi delle acque ultrapure:

*prova preliminare di un'esperienza in laboratorio ai limiti della
rilevabilità e relative problematiche*

Studentessa: [Chiara Dal Bosco](#)



INDICE

<i>Introduzione</i>	p. 3
Definizione di acqua ultrapura	p. 7
Metodi di purificazione	p. 8
Metodi analitici	p. 10
 <i>Parte sperimentale e risultati</i>	p. 14
Strumentazione utilizzata	p. 14
Misure di pH	p. 16
Misure di conducibilità	p. 17
Misure spettrofotometriche	p. 18
Rapporto qualità/prezzo	p. 20
 <i>Conclusioni</i>	p. 21
 <i>Appendice</i>	p. 22
 <i>Bibliografia</i>	p. 23

INTRODUZIONE

La crescente sensibilità delle tecniche analitiche¹ rende necessario disporre di acque per l'analisi di sempre più elevata purezza, come testimonia il continuo aggiornamento degli standard stabiliti da organismi internazionali quali ASTM (American Society for Testing and Materials), CAP/NCCLS (College of American Pathologists/National Committee for Clinical Laboratory Standards), USP (United States Pharmacopeia) e ISO (International Organization for Standardization).

Questa esigenza è particolarmente sentita nel settore dell'archeometria, in cui la preziosità e l'unicità dei manufatti studiati impone, nella logica di un campionamento il meno invasivo possibile, di minimizzare la quantità di materiale prelevato e di massimizzarne la quantità di informazioni ottenibile. L'analisi di tracce e ultratracce risulta inoltre determinante nel caso dell'identificazione di residui organici rinvenuti in antichi vasi.

L'esperienza di laboratorio qui descritta ha riguardato l'analisi comparativa di sette acque pure ed ultrapure da utilizzare nella cromatografia (preparazione della fase mobile, del campione, ecc.). Poiché, infatti, sia i rivelatori ad assorbimento nell'UV che gli spettrometri di massa sono sensibili a contaminanti organici (TOC), la qualità dell'acqua, sia dal punto di vista del contenuto organico che inorganico, ha un impatto diretto sul LOD ottenibile.

Le sette acque analizzate si differenziano nelle specifiche dichiarate dai produttori (vedi Tabella 1) a seconda del sistema di purificazione impiegato:

1) Bidistillatore Büchi Fontavapor 285 modificato in un tridistillatore mediante separazione del circuito di raffreddamento, alimentato con acqua di rubinetto, da quello di distillazione, in cui circola acqua distillata del dipartimento di Chimica; l'acqua così prodotta viene poi filtrata tra due filtri di 0.47 e 0.2 micron e conservata in bottiglie di polietilene lavate tre volte.

Figura 1. Bidistillatore Büchi Fontavapor 285, modificato in modo da produrre acqua tridistillata



¹ La spettroscopia ad assorbimento atomico, la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente e gli strumenti per la cromatografia lavorano normalmente nell'ordine delle parti per bilione e parti per trilione.

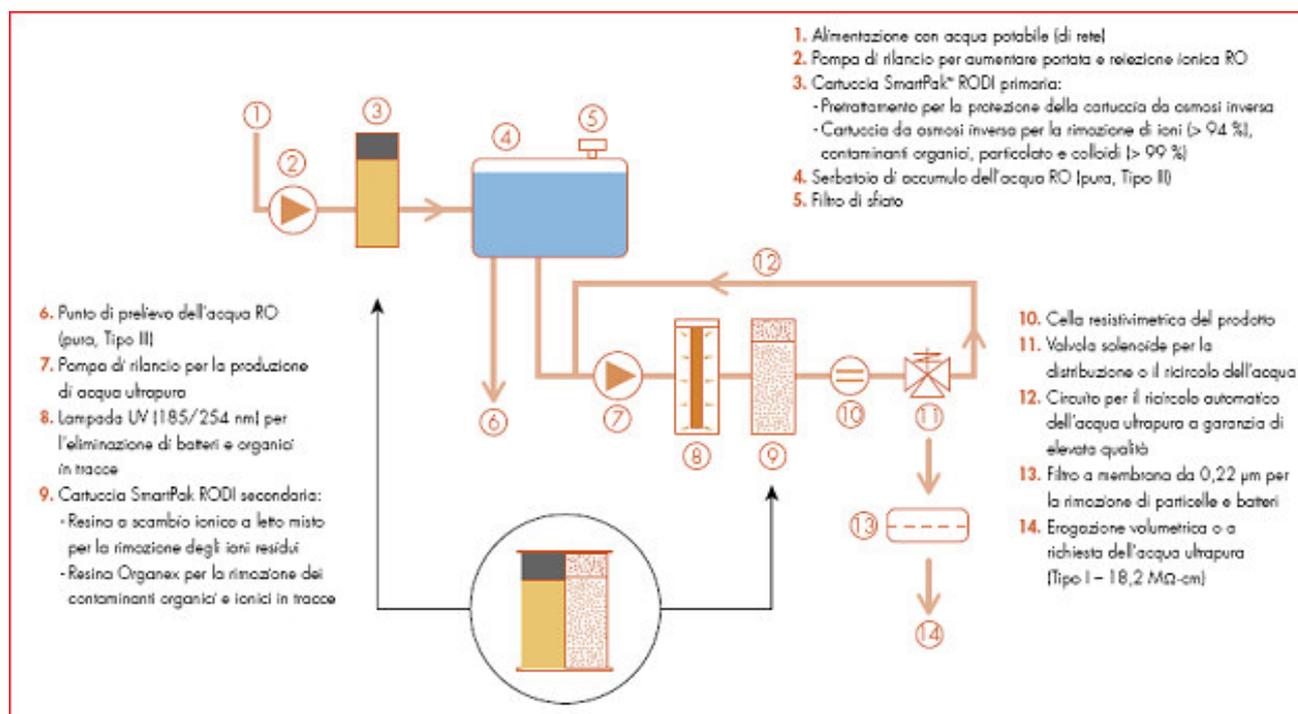
2) Acqua prelevata dalla facoltà di Farmacia, prodotta mediante Millipore Direct-Q3 Ultrapure Water System (18.2 MΩ·cm).

L'acqua potabile di rete, dopo essere stata pressurizzata da una pompa, viene fatta passare attraverso il blocco di purificazione SmartPak, a doppia cartuccia, brevettato per produzioni > di 1000 litri di acqua, che include:

- pretrattamento con carboni attivi e filtrazione a 0,5µm
- cartuccia RO (osmosi inversa), che rimuove più del 95% dei contaminanti di natura ionica e del 99% dei contaminanti organici con peso molecolare superiore a 100 Dalton
- miscela di resine a scambio ionico a letto misto e carboni attivi.

L'acqua purificata attraverso la cartuccia RO viene raccolta nel serbatoio da 6 litri o da 30 litri, da cui si può prelevare acqua di "Grado Laboratorio" di Tipo III secondo le specifiche ASTM, mentre una parte viene prelevata e fatta ricircolare, per mezzo della pompa di ricircolo, attraverso una miscela di resine a scambio ionico a letto misto e carboni attivi. Si ottiene così acqua a "Grado Reagente" di Tipo I secondo ASTM, Grado I secondo ISO 3696, prelevata attraverso un filtro finale da 0,22 µm che la priva di particelle, microrganismi e colloidali. Il sistema è dotato anche di lampada UV a doppia lunghezza d'onda (185-254 nm) per la fotossidazione delle sostanze organiche e la riduzione della carica batterica.

Figura 2. Schema a blocchi del sistema di purificazione Millipore Direct-Q3



3) Acqua prodotta dal sistema Millipore Milli-Q ZFMQ 230 04 del laboratorio del prof. Campanella (18 MΩ·cm).

Figura 3. Sistema di purificazione Millipore Milli-Q ZFMQ 230 04 del laboratorio del prof. Campanella



4) Acqua prodotta dal sistema Millipore Milli-Q del laboratorio del prof. Ferri (18 M Ω -cm). A differenza del sistema Direct-Q3, il Milli-Q deve essere alimentato con acqua distillata, non essendo dotato di cartuccia per osmosi inversa. Inoltre non monta lampade UV.

Figura 4. Sistema di purificazione Millipore Milli-Q del laboratorio del prof. Ferri



5-7) Acque prodotte da Merck, Sigma Aldrich-Fluka e Carlo Erba. L'unica fase del sistema di purificazione adottato che viene dichiarata da Merck e Carlo Erba è il filtraggio a 0.2 μ m.

Tabella 1. Dati relativi alle acque in esame

Acqua	χ (μ S/cm)	TOC/max abs.UV	sist.purificazione	scadenza/tempo di vita	costo	applicazione
Merck LiChrosolv 1.15333.9010	≤ 1 (a 25°C)	≤ 5 mAU a 210 nm ≤ 0.5 mAU a 254 nm	filtraggio finale a 0.2 μ m	31/07/2010	170 € (10 L)	LC
Fluka 00612 (Sigma Aldrich)	≤ 2 (a 25°C)	n.d.	n.d.	n.d.	41.50 € (5 L)	IC
Water Plus RS (Carlo Erba)	≤ 0.1 (a 90°C)	≤ 0.1 ppm ≤ 5 mAU a 210 nm ≤ 0.5 mAU a 254 nm	filtraggio finale a 0.2 μ m	n.d.	7 € (2.5 L) 4 € (1 L)	HPLC
Millipore Direct-Q3 (Dip.Farmacia)	0.056 (a 25°C) (≈ 18.2 M Ω -cm)	<5 ppb	osmosi inversa, resine a scambio anionico e cationico, filtro a carboni attivi, UV (185 e 254 nm)	2-3 anni UV: 2 anni	strumento+installazione: 3640 € cartuccia SmartPak:355€ filtro 0.22 μ m:106 € UV:150 € portata max: 0.6 L/min	HPLC,GC/MS, ICP/MS,AA, TOC
Millipore Milli-Q (lab. prof. Campanella)	0.055 (a 25°C) (≈ 18 M Ω -cm)	<10 ppb ?*	filtri a carboni attivi, resina cationica e anionica	2-3 anni resine:3000- 5000 ore	modello fuori produzione portata max: 1.5 L/h kit di ricambio delle cartucce +installazione:1500 €	HPLC,GC, ICP/MS,AA
Millipore Milli-Q (lab. prof. Ferri)	0.055 (a 25°C) (≈ 18 M Ω -cm)	<10 ppb ?*	filtri a carboni attivi, resina cationica e anionica			HPLC,GC, ICP/MS,AA
* dati dedotti per analogia col modello Direct-Q3 privo di lampada UV						

Definizione di acqua ultrapura

L'acqua di grado reagente, o ultrapura, può essere definita come un'acqua che non contiene sostanze che possano interferire con una procedura di laboratorio, influenzandone positivamente o negativamente i risultati. L'acqua distillata ordinaria normalmente non è pura; essa contiene gas disciolti, sostanze organiche volatili distillate con l'acqua e sostanze non volatili trascinate dal vapore sotto forma di "spray" durante la distillazione. La concentrazione di tutte queste impurezze è generalmente molto bassa, tanto che l'acqua distillata viene impiegata per molte analisi senza ulteriore purificazione, ma interferisce nell'analisi di sostanze in traccia. Lo stato di purezza dell'acqua può anche essere compromesso da contaminanti provenienti dai distillatori, dalle tubazioni, dai rubinetti e dai contenitori, che, se di materiale non idoneo, possono cedere contaminanti diversi a seconda della loro natura.

La purezza dell'acqua può essere definita da indici diversi, in relazione al metodo impiegato. Il più comune fa riferimento alla resistenza specifica che, per un'acqua di adeguata purezza, non deve essere inferiore a $0.5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (conducibilità specifica = $2\mu\text{S}/\text{cm}$).²

Sulla base di tale parametro è stata definita tentativamente una scala di purezza (Tabella 2).

Tabella 2. Classificazione dell'acqua in base al grado di purezza

Qualità dell'acqua	Conducibilità massima $\mu\text{S}/\text{cm}$	Contenuto elettroliti mg/L
Estremamente pura	0,055	<0,0001
Ultrapura	0,1	0,01-0,02
Molto pura	1	0,2-0,5
Pura	10	2-5

Altro criterio di valutazione della purezza dell'acqua, relativo alla presenza di sostanze organiche, è quello che si basa sulla durata della colorazione del permanganato di potassio (Tabella 3).

Tabella 3. Classificazione dell'acqua in base alla durata (t°) della colorazione del KMnO_4

Grado di purezza	t° minuti	Conducibilità $\mu\text{S}/\text{cm}$	Materiale disciolto mg/L
I	60	0,06	0,01
II	60	1,0	0,1
III	10	1,0	1,0
IV	10	5,0	2,0

A seconda dell'applicazione analitica, degli obiettivi e del costo dell'indagine si tratterà quindi di scegliere il tipo di acqua più adatto. Gli enti per la standardizzazione e la certificazione di qualità suddividono l'acqua ultrapura in classi o tipi sulla base di limiti chimici o fisici misurabili

² La resistenza specifica, ρ , è definita come il reciproco della conducibilità specifica, χ ($\rho = 1/\chi$), con $\chi = F\sum_i c_i Z_i \mu_i$, dove F è il Faraday, c_i , Z_i e μ_i sono, rispettivamente la concentrazione, la carica e la mobilità dello ione i -esimo. A 25°C , la conducibilità equivalente ($F\mu$) per gli ioni H^+ e OH^- è, rispettivamente, di $350 \Omega^{-1}\text{cm}^2$ e $200 \Omega^{-1}\text{cm}^2$, per cui a $\text{pH}=7$ e a 25°C ($[\text{H}^+]=[\text{OH}^-]=10^{-7} \text{ mol}/\text{L}$), $\chi=0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$, che è la conducibilità teorica di un'acqua priva di contaminanti ionici ($\rho=18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

(essenzialmente resistività a 25°C, pH a 25°C e quantità di TOC (Total Organic Carbon) e di sostanze solide disciolte) che vengono aggiornati con il miglioramento della sensibilità e accuratezza degli strumenti. L'ISO individua tre gradi di purezza (1, 2, 3 in ordine decrescente), mentre ASTM e CAP/NCCLS, rispettivamente, quattro e tre tipi a purezza decrescente (v. Tabella 4).

Tabella 4. Livelli massimi di contaminanti in acqua altamente purificata

Contaminante	Parametro	ISO 3696 (1987)			ASTM (D1193-91)				NCCLS (1988)			Pharmacopoeia	
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo I	Tipo II	Tipo III	EP (20°C)	USP
Ioni	Resistività a 25°C / MΩ·cm	10	1	0.2	18.0	1.0	4.0	5.0	>10	>1	>0.1	>0.23	>0.77
	Conduttività a 25°C μS·cm ⁻¹	0.1	1.0	5.0	0.056	1.0	0.25	0.2	<0.1	<1	<10	<4.3	<1.3
Acidità / Alcalinità	pH a 25 °C	-	-	5.0–7.5	-	-	-	5.0–8.0	-	-	5.0–8.0	-	-
Organici	Contenuto totale /p.p.b. (μg/l)	-	-	-	50	50	200	-	<50	<200	<1000	<500	<500
Totale solidi	mg/kg	-	1	2	-	-	-	-	0.1	1	5	-	-
Colloidi	Silicia/μg/mL	-	-	-	<3	<3	<500	-	<0.05	<0.1	<1	-	-
Batteri	CFU/mL	-	-	-	-	-	-	-	<10	<1000	-	<100	<100

Metodi di purificazione

La produzione di acqua di elevata purezza è un processo estremamente delicato, in quanto ogni fase di purificazione costituisce anche una potenziale fonte di contaminazione: ad esempio, un elemento che può determinare in misura notevole il grado di purezza dell'acqua distillata è il materiale del quale è costituito il distillatore, che, generalmente, può essere o metallico o di vetro. Si ricorre di solito al metallo per distillare grossi quantitativi di acqua e al vetro quando si desidera ottenere acqua distillata di più elevato grado di purezza. Nel caso di distillatori metallici (rame, ottone, bronzo) l'acqua prodotta può contenere fino a 9 μg/L di Zn, 26 μg/L di Pb e 11 μg/L di Cu. Valori molto più bassi si ottengono nel caso di distillatori di vetro (rispettivamente, per Zn, Pb, Cu: <1 μg/L, <2 μg/L e <5 μg/L).

Tutti i distillatori richiedono periodici interventi di pulizia, la cui frequenza è da correlare direttamente alla durezza dell'acqua di alimentazione. Nei casi di acqua molto dura può risultare vantaggioso addolcire l'acqua prima di introdurla nel distillatore, mediante resina scambiatrice cationica che può poi essere rigenerata. Può anche essere utile, prima della distillazione, un passaggio dell'acqua di alimentazione su carbone per eliminare il materiale organico presente. Il passaggio del distillato su colonne a letto misto può essere necessario nel caso in cui si desideri acqua a basso contenuto ionico (concentrazioni massime di 0.1 μg/L, equivalenti a una conduttività di 0.06 μS/cm). In commercio sono disponibili sistemi di purificazione aggiuntivi, già pronti da adattare all'uscita del contenitore dell'acqua distillata. In questi sistemi, basati sull'impiego di resina scambiatrice di ioni, le colonne vanno periodicamente sostituite e rigenerate in laboratorio o inviate alla casa costruttrice per la rigenerazione. Tali sistemi sono anche dotati, sia in entrata che in

uscita, di conduttimetri incorporati che forniscono indicazioni circa il fattore di guadagno in purezza dell'acqua distillata.

Per quanto concerne le tubazioni, i materiali più idonei per la loro realizzazione sono stagno, ottone stagnato, acciaio inossidabile, plastica e vetro. Lo stagno è il migliore, ma è anche assai costoso, per cui un accettabile compromesso è rappresentato da materiale plastico o da vetro con guarnizioni in teflon.

Anche le resine a scambio ionico possono contaminare l'acqua, rilasciando piccole quantità di sostanze organiche. Inoltre, alcuni tipi di resine non rimuovono tutti i tipi di ioni presenti. Perciò, premesso che il risultato finale sarà tanto migliore quanto migliore è la qualità dell'acqua di partenza, è importante, al fine di produrre un'acqua di elevata purezza, utilizzare, nel giusto ordine, una combinazione di diverse tecnologie in grado di rimuovere la maggior parte dei contaminanti (vedi Figura 5).

Figura 5. Risultati ottenibili con le singole tecniche di purificazione

	Distillazione	Deionizzazione	Filtrazione	Osmosi inversa	Adsorbimento	Ultrafiltrazione	Ossidazione UV
Solidi ionizzati disciolti	E/B	E	S	B	S	S	S
Sostanze organiche disciolte	B	S	S	B	E	B	B
Gas ionizzati disciolti	S	E	S	S	S	S	S
Particelle	E	S	E	E	S	E	S
Batteri	E	S	E	E	S	E	B
Pirogeni	E	S	S	E	S	E	S

E - eccellente • B - buono • S - scarso

I composti ionici e quelli organici vengono eliminati efficacemente mediante osmosi inversa ed elettrodeionizzazione, combinate con resine a scambio ionico, filtri a carboni attivi e processi di foto-ossidazione UV.³ L'utilizzo di quest'ultima tecnica ha dimostrato⁴ di produrre acque significativamente più pure, con una concentrazione di TOC tipicamente inferiore a 5 µg/L, la qual cosa, specialmente nel caso della LC-MS, ha permesso di incrementare il rapporto segnale/rumore, ottenendo cromatogrammi con un fondo meno intenso e un minor numero di picchi spurii, cioè un LOD inferiore, oltre che di migliorare la sensibilità, riducendo il rischio di competizione delle sostanze organiche con l'analita nel legarsi alla fase fissa. Alcune sostanze organiche inoltre sono complessanti, quindi è importante limitarne il più possibile la presenza per evitare interferenze nell'analisi IC (Ionic Chromatography).

³ In particolare, l'irradiazione a lunghezze d'onda inferiori a 242.4 nm provoca la formazione di ozono a partire dall'ossigeno disciolto nell'acqua: $O_2+h\nu \rightarrow O+O$; $O+O_2+M \rightarrow O_3+M$ (M= altra specie che assorbe l'eccesso di energia liberata dalla reazione, permettendo alla molecola di ozono di coesistere). La successiva fotolisi dell'ozono produce radicali idrossilici ($O_3+h\nu \rightarrow O^*+O_2$; $O^*+H_2O \rightarrow 2HO^*$) che ossidano le sostanze organiche disciolte nell'acqua e le trasformano in biossido di carbonio. Quest'ultimo in acqua forma ioni bicarbonato e carbonato che vengono rimossi mediante resine a scambio ionico. L'irraggiamento UV a 254 nm fornisce, inoltre, l'energia adeguata per danneggiare il DNA di batteri e virus, inattivandoli.

⁴ C.Regnauld, I.Kano, D.Darbouret, S.Mabic: Ultrapure water for liquid chromatography-mass spectrometry studies, Journal of Chromatography A, 1030 (2004).

Questa fase di purificazione è anche utile per prolungare il tempo di vita della colonna cromatografica, evitando che contaminanti organici la inquinino creando dei blocchi che originerebbero elevate contropressioni e variazioni nei tempi di ritenzione.

La scelta di contenitori adeguati per lo stoccaggio dell'acqua ultrapura non è meno importante del processo di purificazione stesso. Infatti ogni materiale, seppure in grado diverso (nel range dei $\mu\text{g/L}$ e ng/L), rilascia sostanze contaminanti: l'acqua conservata in bottiglie di plastica può essere contaminata da formiati, acetati, ftalati (componenti dei plastificanti, principalmente impiegati nel PVC) e da additivi antiossidanti aggiunti al polietilene (es.: 2,6-di-tert-butil-1,4-benzochinone). Nemmeno i costosi polimeri perfluorurati (PFA o FEP) rappresentano la soluzione migliore per ogni applicazione. Il vetro poi, se di bassa qualità, ha un rilascio significativo di ioni alcalini, dell'ordine dei ppm. Le varie industrie chimiche produttrici di acqua ultrapura sono alla continua ricerca di nuovi materiali sempre più inerti (con rilascio minimo di sostanze organiche), per garantire il massimo grado di purezza dell'acqua prodotta, associando ad essa anche una data di scadenza, determinata da test sul comportamento a lungo termine dei materiali di stoccaggio.

In generale, i contenitori per acque ultrapure dovrebbero essere costituiti da vetro esente da borosilicati, o da polietilene a basso contenuto di sostanze estraibili. Inoltre, il materiale dovrebbe essere opaco per evitare il passaggio della luce, che potrebbe indurre uno sviluppo algale nel serbatoio. La realizzazione di contenitori con pareti interne dalla superficie liscia è un ulteriore accorgimento in grado di limitare l'adesione di batteri alle pareti e la conseguente formazione di biofilm. Inoltre, la chiusura ermetica realizzata in teflon assicura una barriera efficace al passaggio di contaminanti dall'aria.

Nella tabella seguente si riporta il tipo di contenitore relativo alle acque che, tra quelle analizzate, sono vendute già confezionate.

Acqua	Contenitore
A	Vetro neutro di grado farmaceutico
D	Polietilene ad alta densità molecolare
F	Acciaio teflonato

Metodi analitici

Una volta prodotta e imbottigliata scegliendo i materiali più idonei, l'acqua ultrapura viene sottoposta a una serie di test analitici sui parametri che ne definiscono il grado di purezza secondo gli standard, al fine di garantire le specifiche del prodotto finale.

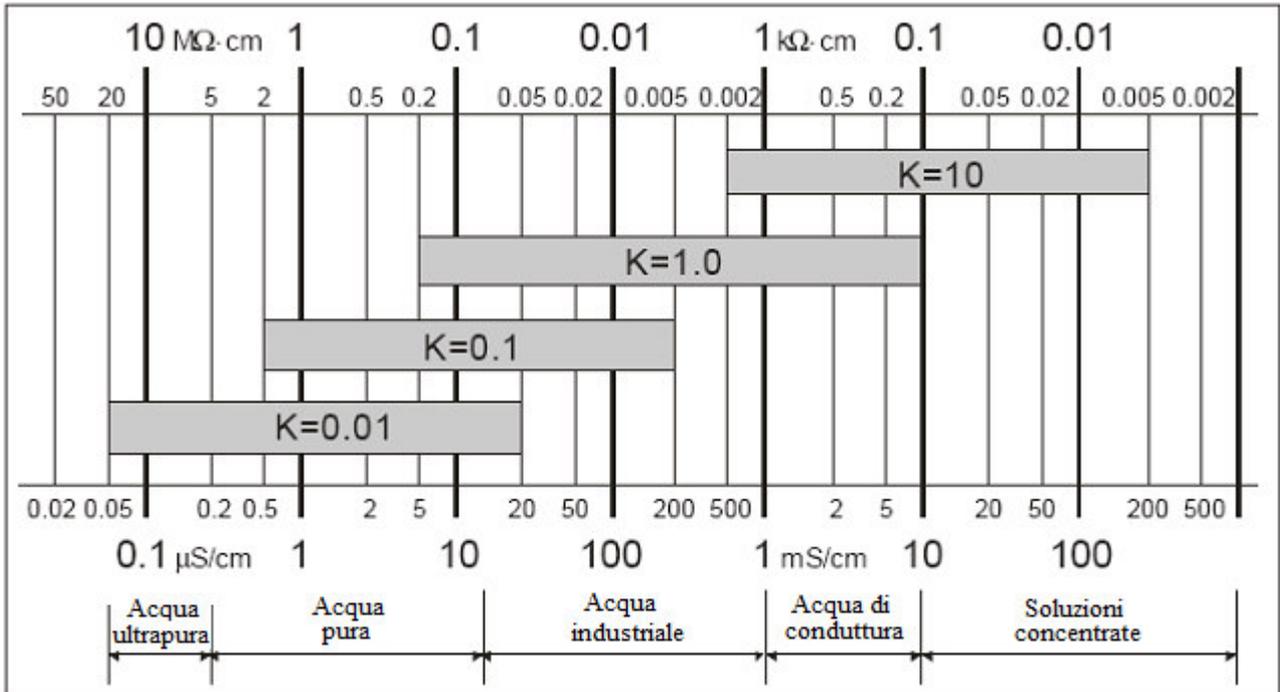
I principali strumenti di base dei laboratori di analisi delle acque possono essere individuati in: potenziometri (pHmetro), elettrodi iono-selettivi, conduttimetri, analizzatori per il carbonio, spettrofotometri (visibile, UV, IR), spettrometri ad assorbimento atomico e cromatografi (liquido, ionico, gascromatografo). Ovviamente, nel caso dell'analisi di acque ultrapure sono necessari strumenti sofisticati, capaci di effettuare misure estremamente accurate.

Per quanto riguarda le misure di conducibilità/resistività, esse vengono effettuate applicando un potenziale elettrico⁵ tra due elettrodi immersi nella soluzione da testare. La conducibilità viene determinata dal voltaggio e dall'intensità di corrente prodotta all'interno della cella conduttimetrica. Maggiore è la superficie dell'elettrodo, maggiore sarà, per un dato voltaggio, l'intensità della corrente generata, quindi l'accuratezza della misura migliora quanto più piccola è la costante di cella ($K=L/S$, dove L è la distanza tra gli elettrodi ed S la loro superficie). Per ottenere un segnale elevato, non soggetto a interferenze, è necessario che la costante di cella sia minore di 0.2 cm^{-1} .

⁵ $<1.2 \text{ V}$, per evitare la dissociazione dell'acqua a livello degli elettrodi che inizia a 1.23 V . Inoltre, per limitare il fenomeno delle resistenze parassite, è indispensabile utilizzare corrente alternata a bassa frequenza (circa 100 Hz).

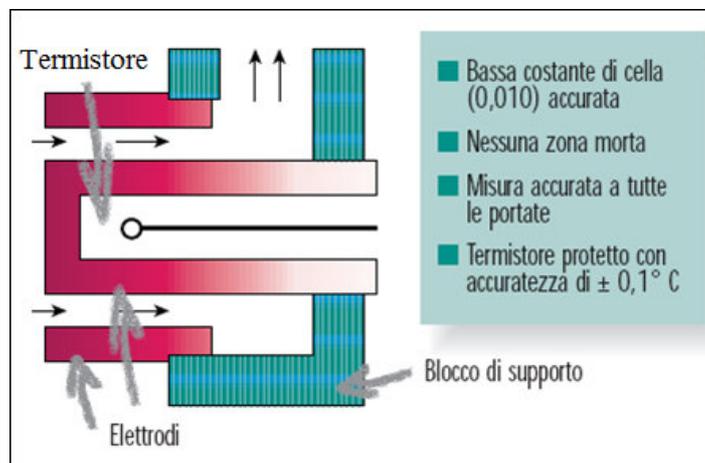
Non esiste una cella in grado di misurare l'intera scala di conducibilità con sufficiente accuratezza. Di conseguenza, a seconda della scala di misura, vengono utilizzate celle con costante diversa (vedi Figura 6).

Figura 6. Intervalli indicativi dei valori di conducibilità/resistività misurati con diverse costanti di cella



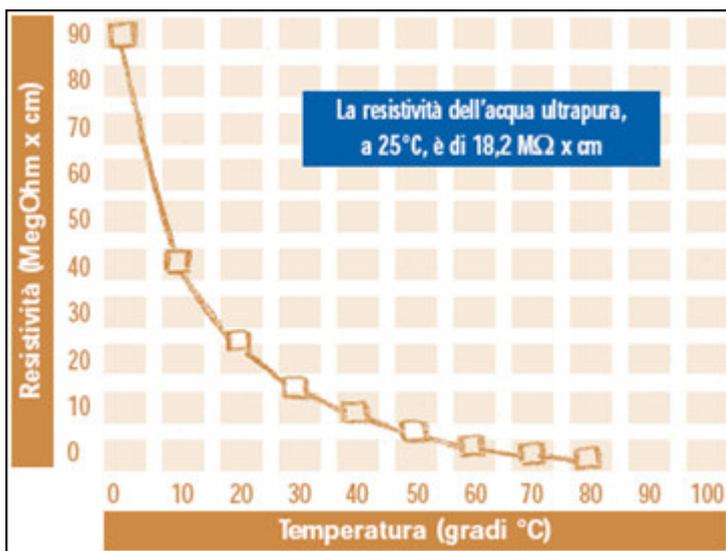
Esistono in commercio celle con una costante di 0.01 cm^{-1} , appositamente progettate per misurare la resistività di acque di purezza elevata. La geometria coassiale di tali celle (vedi Figura 7), realizzata inserendo un elettrodo centrale in un elettrodo tubolare, impedisce che la distanza tra gli elettrodi (e quindi la costante di cella e la conseguente accuratezza della misura) vari nel tempo. Infatti, se l'elettrodo centrale si avvicina a un lato dell'elettrodo esterno, contemporaneamente si allontana dall'altro, mantenendo invariata la distanza media tra i due elettrodi.

Figura 7. Cella di tipo coassiale



Poiché la resistività è funzione della temperatura (vedi Figura 8), a causa dell'aumento con la temperatura della conducibilità equivalente degli ioni e del prodotto ionico dell'acqua, la maggior parte degli strumenti di misura è dotata, oltre che di un termistore, di un circuito per la compensazione automatica della temperatura, che permette di riportare la lettura alla temperatura standard di 25°C, mediante tavole di conversione che forniscono il coefficiente di temperatura della resistività. Per misure su acque ultrapure è necessaria un'accuratezza di $\pm 0.1^\circ\text{C}$, sia per la misura di temperatura che per la compensazione della resistività.

Figura 8. Resistività dell'acqua in funzione della temperatura



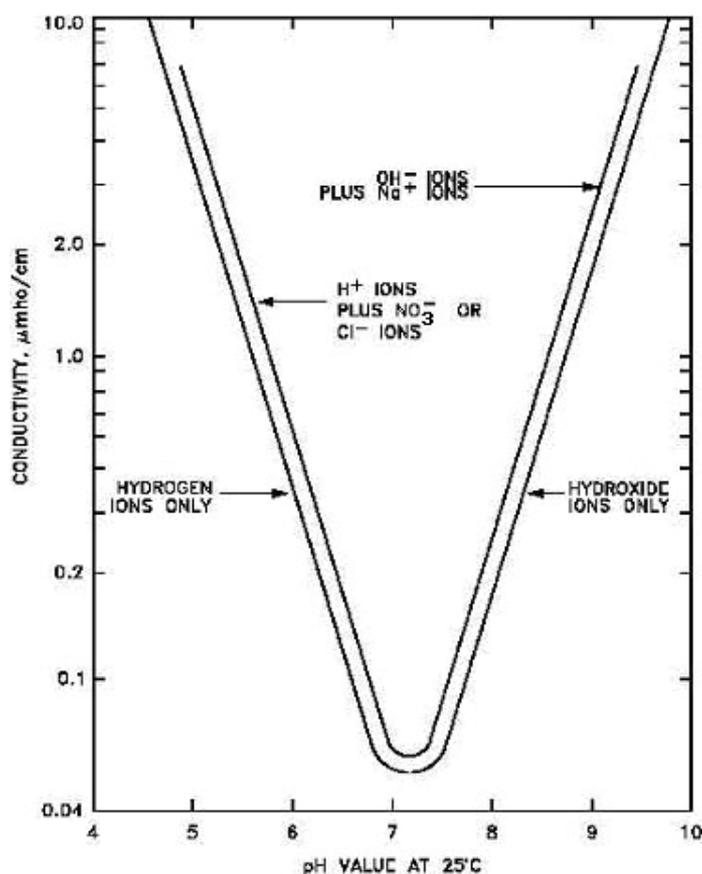
La misura del pH di un'acqua ultrapura è resa problematica da due fattori: il primo è legato alla capacità dell'acqua ultrapura di essere un ottimo solvente per tutti i contaminanti con cui viene in contatto, primo tra tutti la CO_2 atmosferica. Il secondo fattore dipende da un limite intrinseco dei pHmetri, progettati per misurare il pH di acque contenenti una ragionevole concentrazione di ioni. Se si immerge un elettrodo di riferimento ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$) in acqua ultrapura, l'elevata differenza di concentrazione tra l'elettrodo e la soluzione determina la formazione di correnti parassite all'interfaccia acqua/elettrodo di riferimento e la diffusione del KCl dall'elettrodo nella soluzione, dando luogo a fluttuazioni nella misura.

Una soluzione tecnica a questi problemi consiste nell'effettuare misure sotto corrente di azoto e nell'aggiungere all'acqua KCl come elettrolita di supporto per tamponare la forza ionica.

In alternativa, è possibile desumere i valori di pH da quelli di conducibilità, essendo le due grandezze correlate tra loro, come mostrato in Figura 9, nel caso di soluzioni con tracce di HCl e NaOH .

Condizione essenziale per la stima del pH da misure di conducibilità è che l'acqua sia priva di qualsiasi altra specie ionica. Infatti, un'acqua a $\text{pH}=7.00$ e a 25°C , contenente 0.1 mg/L di NaCl (acqua tra molto pura e ultrapura, secondo la Tabella 2), darebbe, assumendo per gli ioni Cl^- e Na^+ una conducibilità equivalente di 75.5 e $50.9 \text{ } \Omega^{-1}\text{cm}^2$ rispettivamente, una conducibilità di $0.25 \text{ } \mu\text{S/cm}$ ($\rho = 3.96 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), che per un'acqua priva di NaCl corrisponderebbe a $\text{pH}=6.23$ o a $\text{pH}=8.00$.

Figura 9. Influenza di tracce di NaOH e HCl sulla conducibilità dell'acqua.

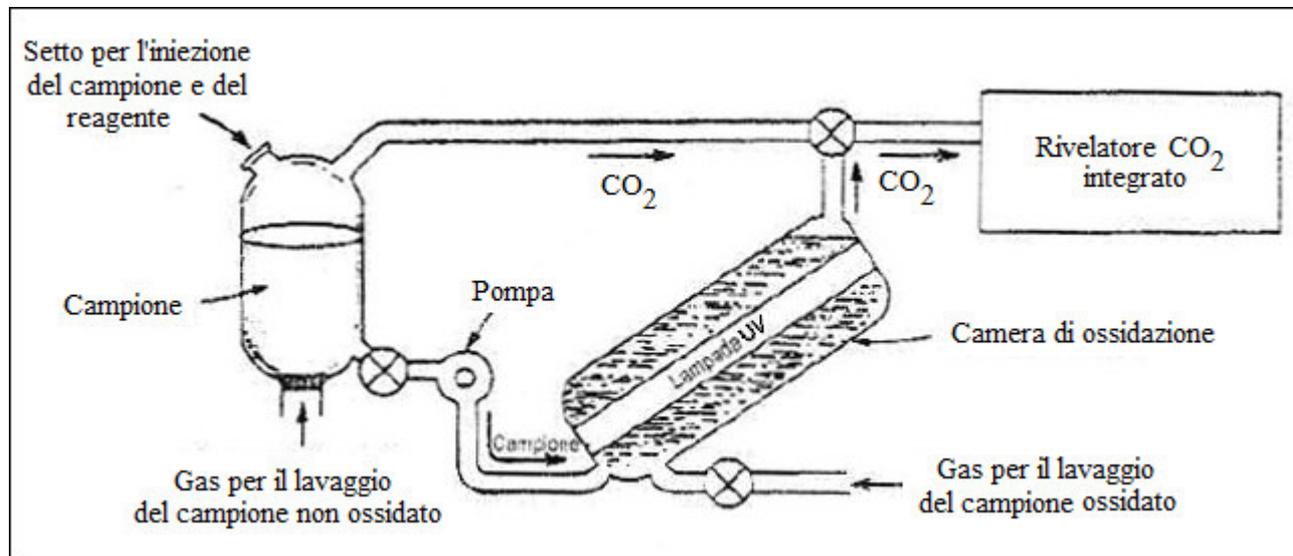


Il miglior mezzo di valutazione del contenuto organico di un campione d'acqua consiste nella misura del carbonio organico totale (TOC).⁶ Essa è basata sulla determinazione della CO₂ prodotta dall'ossidazione totale del materiale organico disciolto (vedi Figura 10): al campione viene aggiunto un agente ossidante (normalmente il perossidissolfo di potassio, K₂S₂O₈) attivato da luce ultravioletta, e acido fosforico, che rende quantitativa la reazione di decomposizione dei carbonati (CO₃²⁻ + 2H₃O⁺ → 3H₂O + CO₂↑) con produzione di CO₂, che viene allontanata facendo gorgogliare azoto. Il campione così privato del carbonio inorganico viene quindi pompato in una camera di ossidazione provvista di lampada UV (184.9 nm), in cui avviene la reazione di fotolisi dell'acqua con produzione di radicali idrossilici HO· estremamente reattivi (H₂O + hv → HO· + H), i quali ossidano rapidamente i composti organici disciolti (composti organici + HO· → CO₂ + H₂O).

⁶ Il carbonio può essere presente nelle acque sotto forma di specie inorganiche (carbonati, bicarbonati e anidride carbonica) e di composti organici che si distribuiscono tra fase disciolta e sospesa. Il carbonio complessivo risultante dalla somma del carbonio inorganico (TIC) e di quello organico (TOC) presente nelle due fasi costituisce il carbonio totale (TC). Il carbonio organico disciolto (DOC) rappresenta la frazione organica di carbonio che passa attraverso una membrana filtrante da ~ 1 μm, mentre il carbonio organico sospeso o particolato (POC) rappresenta la frazione trattenuta dalla membrana. La somma di queste due frazioni dà il carbonio organico totale (TOC).

L'anidride carbonica prodotta dall'ossidazione radicalica viene estratta dal sistema e misurata mediante gascromatografia o per assorbimento in acqua ultrapura, di cui viene misurata la conducibilità.

Figura 10. Schema di analizzatore TOC che utilizza l'ossidazione del campione UV-attivata



PARTE SPERIMENTALE E RISULTATI

Il giorno precedente alle misure le sette acque in esame sono state fatte acclimatare tutte nella stessa stanza e per ognuna sono stati determinati il pH, la conducibilità elettrica e la componente organica.

- **pH**: sono state effettuate due misure per ogni acqua, con e senza l'aggiunta di KCl 0.01M;
- **conducibilità**: durante le misure la temperatura è stata mantenuta costante a 25°C per mezzo di un termostato;
- **componente organica**: non disponendo di un analizzatore TOC, si è utilizzata la spettroscopia di assorbimento nell'UV (190-400 nm), allungando il più possibile il cammino ottico con cuvette in quarzo da 100 mm per esaltare l'assorbimento, prevedibilmente molto debole, e calcolare poi, in mancanza di picchi evidenti, l'area nell'intera regione spettrale analizzata.

Le misure sono state eseguite in tre giorni diversi, ma la determinazione di ogni grandezza è avvenuta su tutte e sette le acque nella stessa giornata.

Strumentazione utilizzata

Per le misure di pH è stato usato un pHmetro Hanna Instruments 221, per quelle di conducibilità un conduttimetro DeltaOhm HD2156.2 con sonda SPT01G e per le misure spettroscopiche uno spettrofotometro a doppio raggio Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS. Le caratteristiche dei tre strumenti sono riportate nelle tabelle seguenti:

pHmetro Hanna Instruments 221	
elettrodo a vetro	Ag/AgCl
range di misura	-2.00/16.00 pH
	-20.0/120.0 °C
risoluzione	0.01 pH
	0.1 °C
accuratezza a 20°C	±0.01 pH
	±0.4°C

Conduttimetro DeltaOhm HD2156.2	
costante di cella	0.1 cm ⁻¹
range di misura	0.00/19.99 µS/cm
	-50/200 °C
risoluzione	0.01 µS/cm
	0.1 °C
accuratezza	±0.5% ±1digit
	±0.25 °C

Spettrofotometro a doppio raggio Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS	
sorgente luminosa	lampada alogena al tungsteno/deuterio
range spettrale	190/900 nm
velocità di scansione	7.5, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1440 nm/min
accuratezza	±0.3 nm
	±0.003 A a 1A misurata con filtri NBS 930
ripetibilità	±0.1 nm
	±0.001 A a 1A
risoluzione	passabanda selezionabili (slit): 0.25, 1, 2, 4 nm a 656.1 nm

Misure di pH

Prima di iniziare le misure, il pHmetro è stato tarato con soluzioni tampone certificate⁷ a pH 4, 7 e 10. Per ogni tipo di acqua sono stati preparati 40 mL di soluzione di KCl 0.01 M, pesando ogni volta circa 0.0300 g di sale con una bilancia analitica⁸. Si è poi proceduto alla doppia misura del pH, prima su 40 mL di acqua pura, poi su 40 mL di soluzione di KCl, previo 'avvinamento' dell'elettrodo con il tipo di acqua che di volta in volta veniva sottoposta a misura. Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti:

Calibrazione con buffer 7 e 10							
Acqua	T(°C)	pH	T(°C)	pH H ₂ O+KCl	ΔpH	ΔT	g KCl/40mL
A	22.5	8.80	22.4	8.66	0.14	0.1	0.0314
B	21.3	6.22	21.3	5.81	0.41	0	0.0307
C	21.9	6.66	22.1	6.36	0.30	-0.2	0.0319
Calibrazione con buffer 7 e 4							
D	21.7	5.48	22.0	5.13	0.35	-0.3	0.0308
E	22.1	5.73	21.8	5.76	-0.03	0.3	0.0323
F	22.3	6.60	22.1	6.09	0.51	0.2	0.0300
G	22.6	6.04	22.3	5.68	0.36	0.3	0.0307

Come visto prima, i valori di pH ottenuti in soluzione 0.01 M di KCl dovrebbero essere più corretti, diminuendo la differenza di concentrazione tra elettrodo e soluzione, e quindi evitando correnti parassite e diffusione del sale. Nel commentare tali dati bisogna però tener presente che le misure di pH delle varie soluzioni non sono omogenee, in quanto eseguite con calibrazioni diverse⁹.

I risultati ottenuti dimostrano che tutte le acque presentano un pH leggermente acido, tranne la A, il cui valore di 8.66, corrispondente a una soluzione debolmente basica, è decisamente anomalo. Infatti, considerando che le soluzioni sono state tenute all'aria per un lungo tempo, queste diventano acide per la dissoluzione della CO₂ atmosferica, in base all'equilibrio:



Poiché la CO₂ costituisce circa lo 0.0350% del volume di aria secca (350 ppm), attraverso la legge di Henry si calcola che a 25°C la concentrazione di CO₂ in un'acqua pura, in equilibrio con un'atmosfera non inquinata, è pari a 1.146·10⁻⁵M, portando a un pH di 5.65.

I valori ottenuti, tranne quello per l'acqua D, sono più o meno maggiori di tale valore teorico, che comunque dovrebbe essere corretto per l'effetto della temperatura, in quanto le misure sono

⁷ SIGMA B5020-500ML: Buffer, reference standard, pH 4.00±0.01 at 25°C standardized against N.I.S.T. standard reference materials batch#: 115K0101

SIGMA B4770-500ML: Buffer, reference standard, pH 7.00±0.01 at 25°C standardized against N.I.S.T. standard reference materials batch#: 066K0026

SIGMA B4895-500ML: Buffer, reference standard, pH 10.00±0.01 at 25°C standardized against N.I.S.T. standard reference materials batch#: 086K0004

⁸ Mettler Toledo, Swiss, modello XS205, dual range (210 g, 80 g).

⁹ Vedi primo paragrafo delle conclusioni.

state condotte a una temperatura inferiore, compresa tra 21 e 22 °C. Per fare ciò però bisognerebbe conoscere sia la solubilità della CO₂ che il valore della K_a a tali temperature.

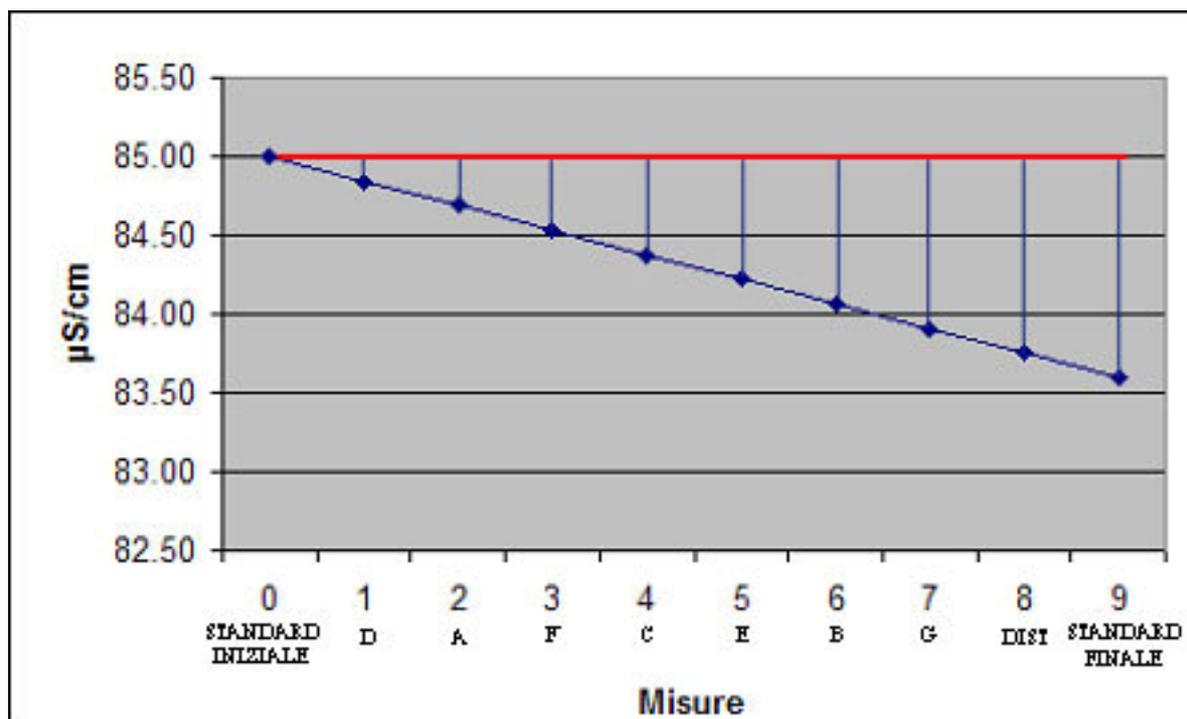
Si può notare infine che le acque B, E e G, prodotte con sistema di purificazione simile e nello stesso periodo di tempo, presentano valori di pH simili.

Misure di conducibilità

Prima di effettuare le misure di conducibilità, il conduttimetro è stato tarato con una soluzione di conducibilità HI 70033 di 84 µS/cm a 25°C. Con una particolare pipetta sono stati prelevati, in provette sterili, 30 mL di ogni tipo di acqua, con cui avvinare provette ed elettrodo, ed altri 30 mL su cui effettuare la misura, direttamente nella provetta. Tutte le misure sono state condotte alla temperatura di 25°C, mantenuta approssimativamente costante mediante un termostato. Al termine dell'analisi è stato rimisurato lo standard utilizzato per la taratura, al fine di individuare e correggere un'eventuale deriva temporale dello strumento. Di seguito, vengono presentati i risultati ottenuti:

Acqua	T(°C)	$\chi(\mu\text{S}/\text{cm})$	x	y*	Δy	$\chi_{\text{corr}}(\mu\text{S}/\text{cm})$
standard	25.5	85.00	0	85.00	0.00	85.00
D	25.4	1.03	1	84.84	0.16	1.19
A	25.3	16.65	2	84.69	0.31	16.96
F	25.5	1.11	3	84.53	0.47	1.58
C	25.5	1.13	4	84.38	0.62	1.75
E	25.5	0.95	5	84.22	0.78	1.73
B	25.3	1.04	6	84.07	0.93	1.97
G	25.5	1.04	7	83.91	1.09	2.13
distillata	25.5	1.93	8	83.76	1.24	3.17
standard	25.5	83.60	9	83.60	1.40	85.00
* $y = -0.1556x + 85$						

Figura 11. Errore associato ad ogni acqua, dovuto alla deriva temporale dello strumento



Il valore di conducibilità dell'acqua D, il più basso tra quelli misurati ($1.19 \mu\text{S}/\text{cm}$), è l'unico che rientra nelle specifiche dichiarate (vedi Tabella 1). Errori consistenti si hanno per le acque presunte ultrapure (E, C, G e B), che presentano valori di conducibilità molto maggiori del valore teorico di $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$, e soprattutto per la A, che presenta un valore di $16.96 \mu\text{S}/\text{cm}$, ben superiore a quello dell'acqua distillata.

Le differenze riscontrate potrebbero essere dovute a una contaminazione avvenuta nel prelievo e nella manipolazione delle acque, ma anche a una non corretta taratura del conduttimetro, avendo utilizzato una soluzione di conducibilità di un ordine di grandezza molto diverso rispetto ai valori attesi, e fuori dal range dei valori misurabili con lo strumento ($0.00\text{-}19.99 \mu\text{S}/\text{cm}$)¹⁰.

La conducibilità decisamente anomala misurata per l'acqua A, molto superiore rispetto a quella dichiarata e a quelle determinate per le altre acque (il che esclude per questa acqua la possibilità di contaminazione in fase d'analisi), potrebbe dipendere dalla non idoneità del materiale usato per lo stoccaggio: il vetro in cui tale acqua è commercializzata non è infatti esente da borosilicati come raccomandato nel manuale dell'Apat¹¹.

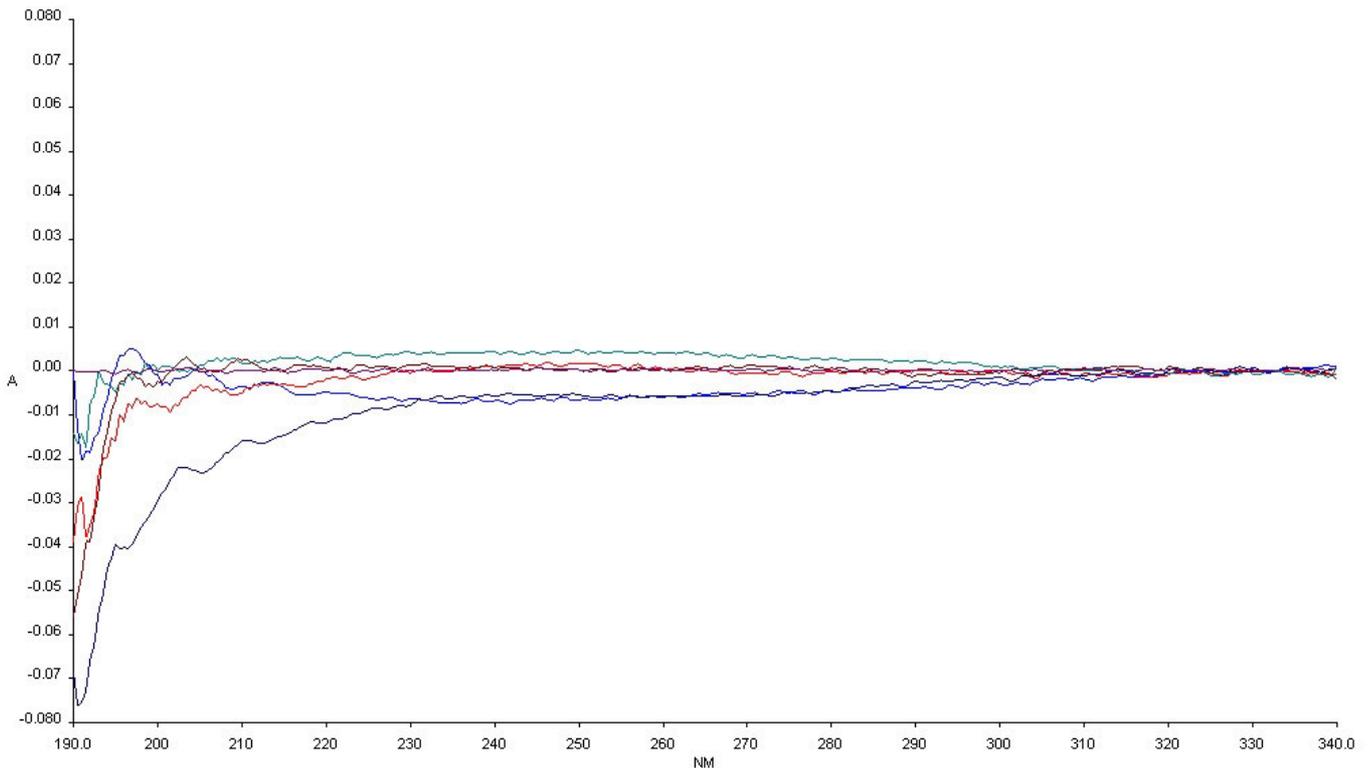
Misure spettrofotometriche

Gli spettri di assorbimento sono stati acquisiti nella regione dell'UV (340-190 nm) con una risoluzione di 0.5 nm mediante spettrofotometro a doppio raggio, confrontando ogni acqua con quella denominata G, usata come bianco. Prima dell'analisi ogni cuvetta è stata 'avvinata' con lo stesso tipo di acqua con cui doveva essere riempita. Il primo spettro è stato acquisito inserendo l'acqua presa come riferimento sia nella cuvetta del bianco che in quella del campione, al fine di valutare il rumore strumentale. Per ogni spettro, ottenuto impostando uno slit di 1 nm e una velocità di scansione di 120 nm/min, è stata calcolata l'area sottesa nella regione dell'UV. Di seguito si riportano i risultati ottenuti e gli spettri di cui sono state calcolate le aree.

¹⁰ Vedi primo paragrafo delle conclusioni.

¹¹ APAT - IRSA/CNR, Manuali e linee guida - 29/2003, *Metodi analitici per le acque*.

Acqua	Range λ	Area
D	190-332.8 nm	3.19
A	190-332.8 nm	6.02
F	190-332.8 nm	-1.28
E	190-332.8 nm	-0.28
C	190-332.8 nm	-0.59
B	190-332.8 nm	0.27
G	190-332.8 nm	0.026



Considerando unicamente il contenuto di sostanza organica, deducibile dai valori di assorbanza ottenuti nel range 190-332.8 nm, si può tentare di definire un'ipotetica scala di purezza rispetto all'acqua G:



Alla luce di questo risultato, tutto l'esperimento andrebbe ripetuto usando l'acqua F come bianco, ma sia i tempi sia i volumi disponibili lo hanno impedito.

In alternativa, si potrebbe cercare di stimare il contenuto di sostanza organica considerando i valori di assorbanza, A, a 254 e 210 nm, che vari produttori di acque (vedi Tabella 1) dichiarano come indice di qualità al posto del TOC. Di seguito si riportano tali valori, misurati per ogni acqua rispetto all'aria, il che permette di fare confronti assoluti tra le acque.

Acqua	λ	A
D	254	0.028
	210	0.105
A	254	0.079
	210	0.19
F	254	0.034
	210	0.085
E	254	0.028
	210	0.079
G	254	0.023
	210	0.075
C	254	0.028
	210	0.086
B	254	0.013
	210	0.066

Si può osservare che per tutte le acque l'assorbimento a 210 nm è maggiore di quello a 254 nm, ma entrambi i valori di assorbanza per le acque F e A sono molto minori rispetto ai limiti dichiarati.

Come prevedibile, il minore assorbimento alle lunghezze d'onda selezionate si ha per l'acqua B, prodotta di fresco con sistema Millipore Direct-Q3 dotato di lampade UV.

Le altre acque presentano tutte un assorbimento simile a entrambe le lunghezze d'onda, tranne la A, che risulta avere il contenuto di sostanze organiche più elevato.

Rapporto qualità/prezzo

Basandosi sui dati riassunti nella Tabella 1, tra le acque confezionate (Merck, Sigma Aldrich, Carlo Erba) la più conveniente sembrerebbe essere l'Acqua Plus della Carlo Erba, nonostante il valore di conducibilità dichiarato, misurato a 90°C, non sia direttamente confrontabile con quelli delle altre acque, misurati alla temperatura standard di 25°C.

Riguardo ai sistemi di purificazione, è difficile stimare il costo per litro di acqua ottenuta senza conoscere il consumo di acqua ultrapura da parte del dipartimento. Tuttavia, prendendo in considerazione il sistema Direct-Q3, che ha sostituito i modelli Milli-Q ormai fuori commercio e che rappresenta lo standard attuale verso cui tende la maggior parte dei sistemi di purificazione, ipotizzando un consumo di 10 litri al giorno, che corrisponderebbero a una produzione di 6600 litri nel tempo di vita di 3 anni dichiarato per lo strumento (10L x 220 giorni lavorativi= 2200L/anno), si ottiene un costo per litro d'acqua pari a circa 1 euro, dato dalla somma del costo dello strumento (3640 € /6600 L= 0.55 €/L) e di quelli della cartuccia di purificazione e del filtro (460 € /1000 L= 0.46 €/L). Si tratta comunque di una stima per eccesso, considerando che il tempo di vita dello strumento, per consumi così bassi rispetto a quelli permessi dalla portata massima (0.6 litri al minuto), potrebbe essere di gran lunga superiore a 3 anni.

Il costo per litro di acqua prodotta eguaglierebbe quello della più economica delle acque confezionate (l'Acqua Plus) per produzioni di circa 1000 litri in 3 anni, quindi l'acquisto di un sistema di purificazione diventerebbe conveniente per produzioni giornaliere minime di circa 1.5 litri di acqua ultrapura.

Per quanto riguarda il sistema Milli-Q, con un set di resine e filtri a carboni attivi si possono ottenere al massimo 7500 litri di acqua purificata, a un costo per litro di 0.20 euro.

CONCLUSIONI

Prima di trarre affrettate conclusioni sugli errori metodologici che hanno portato a risultati non soddisfacenti, va premesso che questa esperienza non era prevista dal programma del Corso ed è stata svolta da un gruppo di studenti volontari, al di fuori dell'orario delle lezioni. Di conseguenza non si è avuto il tempo necessario per ripetere le misure¹² e per studiare con la dovuta attenzione gli aspetti teorici riguardanti i metodi analitici delle acque ultrapure e le relative problematiche, indispensabili invece per poter trovare il giusto assetto della strumentazione in condizioni di lavoro ai limiti della rilevabilità¹³.

Oltre a ciò va considerato l'altissimo livello di pratica di laboratorio che misure così delicate richiedono, dalla manipolazione dei campioni, alla loro conservazione, dal tipo di strumenti utilizzati, al loro uso: un qualsiasi errore, seppur piccolo, in una di queste operazioni vanifica la ricerca dell'acqua più pura. Dai risultati ottenuti con le analisi di pH, conducibilità e assorbimento UV, non si è riusciti infatti a differenziare le acque presunte pure e molto pure (F, D, A) da quelle presunte ultrapure (E, G, B), che si sono uniformate più o meno allo stesso livello di purezza, inferiore a quello atteso per quanto riguarda il contenuto di specie ioniche: infatti, i risultati delle misure di pH e conducibilità, nonostante tali grandezze siano state misurate in giorni diversi e a temperature diverse¹⁴, sono concordi nell'individuare nell'acqua D la più pura.

Per quanto riguarda invece il contenuto di sostanze organiche, l'acqua più pura è risultata essere la B, prodotta con sistema Direct-Q3 dotato di lampade UV.

Dal momento però che sui risultati ottenuti hanno influito sia fattori casuali che fattori fissi sfuggiti al controllo, non è possibile valutare la significatività delle differenze osservate. Ciò dimostra l'importanza che riveste l'experimental design nel progettare un esperimento in modo tale da poterne trarre risultati corretti, come ben espresso in questa frase di Ronald Aylmer Fisher: "To consult a statistician after an experiment is finished, is often merely to ask him to conduct a post mortem examination. He can perhaps say what the experiment died of".

Ciò che però emerge chiaramente dai risultati ottenuti è un'anomalia nel comportamento dell'acqua A, confermata da tutti i metodi analitici impiegati, su cui sarebbe interessante indagare ulteriormente.

Nonostante tutto, si ritiene che questa esperienza di laboratorio possa essere utile per la pianificazione di una sua eventuale ripetizione, che tenga conto degli errori commessi. In tal caso sarebbe interessante poter aggiungere alle variabili da misurare come indici di purezza, la durata della colorazione del permanganato di potassio e la misura del TOC.

¹² Vedi pH, che si sarebbe dovuto determinare per ogni acqua con entrambe le tarature, e magari sotto corrente di azoto, o almeno mantenendo costante la temperatura a 25°C.

¹³ Vedi errata taratura del conduttimetro.

¹⁴ Essendo pH e conducibilità due grandezze correlate ed entrambe dipendenti dalla temperatura, sarebbe stato opportuno misurarle nello stesso giorno e alla stessa temperatura.

APPENDICE

Le acque analizzate, prodotte dai marchi Merck, Sigma Aldrich, Carlo Erba e Millipore, sono state indicate genericamente con lettere alfabetiche in ordine casuale, sia per evitare di insinuare dubbi sulla qualità dichiarata dai produttori, che per sottrarle a inevitabili quanto inutili confronti, visti gli errori metodologici commessi in fase d'analisi.

A questo proposito, riguardo alle misure di pH, in mancanza di un elettrodo a idrogeno, ormai in disuso, si è stati costretti ad utilizzare un elettrodo a vetro, pur riconoscendolo come non idoneo allo scopo. Il grado di purezza del sale KCl, che necessariamente si è dovuto aggiungere alle acque prima della misura con questo tipo di elettrodo, costituisce infatti un ulteriore elemento di potenziale contaminazione. Inoltre, la durata del mescolamento operato per far sciogliere il sale è un altro parametro sfuggito al controllo, che potrebbe aver comportato un inglobamento di diverse quantità di CO₂ nelle varie acque, falsandone di conseguenza il pH determinato. Anche la gradualità con cui la CO₂ atmosferica viene assorbita da parte dell'acqua è un elemento di disturbo nella misura, in quanto implica tempi di stabilizzazione lunghi, tanto che alcuni consigliano, per limitare il più possibile l'influenza della CO₂ sul pH, di prendere per buona la prima risposta dello strumento, senza aspettare che il pH letto raggiunga un valore costante.

Riguardo alla taratura del conduttimetro, non si disponeva purtroppo di una soluzione standard di conducibilità adeguata alla costante di cella impiegata, ma una lettura affrettata del manuale ha portato a ritenere idonea anche una soluzione da 84 $\mu\text{S}/\text{cm}$, che, sulla base dello schema generico in esso riportato (vedi Figura 6), sembrava perfettamente misurabile con una costante di cella di 0.1 cm^{-1} .

Insomma, gli errori commessi sono sì frutto di mancanza di tempo ed esperienza di laboratorio da parte degli studenti, ma anche della inadeguatezza dei materiali e degli strumenti a disposizione, la qual cosa ha reso l'esperienza molto più difficoltosa, e per certi versi impossibile, anche se purtroppo si rilevano problemi simili in analisi pubblicate.

BIBLIOGRAFIA

APAT - IRSA/CNR, Manuali e linee guida - 29/2003, *Metodi analitici per le acque*.

STANLEY, MANAHAN, *Chimica dell'Ambiente*- ed.italiana a cura di L.Zoccolillo (Piccin, 2000).

SIGMA-ALDRICH (brochure), *High-purity water for analytical applications: much more than just H₂O*.

MILLIPORE, rivista *Water Line* n°1, giugno 1998.

REGNAULT, KANO, DARBOURET, MABIC, *Ultrapure water for liquid chromatography-mass spectrometry studies*, *Journal of Chromatography A*, 1030 (2004).