MARGHERITA PLASSA*

Materiali di riferimento per l'analisi chimica: un secolo di storia**

Reference materials for chemical analysis: a century-long history

Summary – Reference materials, called with different names as «standard samples» or «analysed samples», were in use since the beginning of the twentieth century, mainly as an aid to the analysis of complex alloys. In industrially advanced countries, the National Metrology Institute, or another government institution, is usually charged with the task of preparing certified reference materials; private firms also act as suppliers and in Europe an institute of the European Union is active. The situation in some countries is briefly described, and the development of reference materials supplied by an important Metrology Institute (NIST, USA) and by the European Institute (IRMM, EU) is illustrated: after industrial materials also materials useful for instrumental analysis were supplied and, in the second half of the century, materials for clinical chemistry and environmental analysis. In most recent years, reference materials for DNA analysis and for genetically modified crops made their appearance.

Definizione, origine e classificazione dei materiali di riferimento

Il termine «Materiale di riferimento (MR)» si è stabilizzato nella seconda metà del secolo ventesimo, ed è stato normato dell'ISO (International Organization for Standardization) nella seguente definizione:[1] «Materiale o sostanza i cui valori di una o più proprietà sono sufficientemente omogenei e ben stabiliti da essere impiegati nella taratura di uno strumento, per la valutazione di un metodo di misurazione, o per l'assegnazione di valori a materiali», alla quale si accompagna quella di

* Istituto di Metrologia «G. Colonnetti» - CNR.

** Relazione presentata al X Convegno Nazionale di «Storia e Fondamenti della Chimica» (Pavia, 22-25 ottobre 2003).

[1] ISO, *Terms and definitions used in connection with reference materials*, Guide 30: 1992 (II edizione). La prima edizione risale al 1981.

«Materiale di riferimento certificato (MRC)»: «Materiale di riferimento, accompagnato da un certificato, i cui valori di una o più proprietà sono certificati da un procedimento che stabilisce la riferibilità ad una accurata realizzazione dell'unità nella quale i valori delle proprietà sono espressi e per cui ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza con un livello di fiducia stabilito».

L'uso di materiali di riferimento, che venivano chiamati in modo diverso da paese a paese, risale però almeno all'inizio del novecento, ed ebbe origine principalmente nel settore siderurgico allo scopo di verificare la correttezza delle analisi chimiche delle leghe metalliche, caratterizzate da composizione complessa e dalla presenza di elementi diversi ma difficili da distinguere chimicamente.

I materiali di riferimento si possono classificare in vari modi, a seconda del livello di certificazione (materiali di riferimento certificati, materiali di riferimento non certificati, materiali di riferimento interni), del tipo di proprietà di interesse (MR certificati per proprietà chimiche o per proprietà fisiche), della natura del materiale (sostanze pure, soluzioni campione, miscele gassose, materiali di riferimento con matrice), del campo di applicazione (materiali industriali, ambientali, clinici, alimentari, per controlli legali).[2]

Enti produttori di materiali di riferimento: differenti scelte nazionali

Inizialmente furono spesso associazioni professionali a preparare e distribuire fra i loro associati dei materiali di riferimento; successivamente si affiancò la fornitura di MR da parte del settore privato, in particolare in seguito allo sviluppo della chimica analitica strumentale, che rendeva necessaria la disponibilità di materiali per la taratura degli strumenti. Tuttavia nelle nazioni più avanzate si è imposto, seppure in tempi diversi, un modello secondo il quale è un ente pubblico – che può essere l'istituto metrologico nazionale oppure un altro ente – a sviluppare e fornire la maggior parte dei materiali di riferimento certificati, anche se continuano ad esistere sia l'attività delle associazioni professionali (specie per settori nuovi o per materiali molto deteriorabili) sia quella dei fornitori privati.

Nei diversi paesi esistono poi varianti diverse: l'istituto metrologico realizza MR con posizione dominante (es. USA, Russia, Corea), oppure esiste un istituto apposito per la preparazione di MR (es. Cina, Giappone fino a tempi recenti), od ancora l'istituto metrologico ricopre un settore limitato, mentre esiste un istituto di riferimento per materiali e chimica che realizza MR (es. Gran Bretagna, Germania). In altri casi ancora l'istituto metrologico od altri enti pubblici coprono un settore limitato, e si fa ampiamente ricorso a MR stranieri o privati (es. Francia, Italia). La situazione europea presenta poi una particolarità legata alla presenza di un istituto dell'Unione europea molto attivo nella realizzazione di MR. Di seguito viene bre-

[2] ADOLF ZSCHUNKE (ed.), *Reference materials in analytical chemistry*, Berlino, Springer, 2000.

vemente illustrata la situazione degli Stati Uniti e di alcuni paesi europei a questo riguardo.

Nel caso degli Stati Uniti il National Bureau of Standards (NBS), denominato oggi NIST, è l'istituto metrologico nazionale, e fu fondato dal Congresso degli USA con una legge del 1901.[3] Esso ebbe da subito non solo il compito di istituire dei campioni nazionali, ma di effettuare le opportune iniziative tecniche dirette al sostegno dell'industria, e quindi di essere attivo non solo entro i limiti della metrologia tradizionale, ma anche nei settori della chimica e delle proprietà dei materiali. Questo comportò un'attività di messa a punto da un lato di norme e procedure e dall'altro di materiali aventi proprietà fisiche o chimiche ben stabilite (*standard samples*). In questo senso il NBS sopravvanzò quindi il tedesco Physikalisch-Technische Reichanstalt (fondato nel 1887) ed il britannico National Physical Laboratory (1899).

La preparazione di *standard samples* cominciò nel 1905, su richiesta dell'American Foundrymen's Association. Essi con il tempo dettero poi origine ai moderni SRM (*standard reference materials*), affermati in tutto il mondo. L'istituto assunse il nome di National Institute for Science and Technology (NIST) dal 1988, con un'ulteriore accentuazione dell'impegno a sostegno dell'industria. Oggi il NIST realizza e commercializza più di 1300 tipi di MR certificati, e ne vende 34000 pezzi per anno a circa 7000 clienti diversi, di cui il 30% all'estero.

Per quanto riguarda l'Europa, verrà qui fatto un accenno alla situazione in due dei maggiori paesi (Germania e Gran Bretagna), ma soprattutto verrà presa in considerazione l'attività dell'Unione Europea nel settore degli MR.

In Germania l'istituto metrologico nazionale è il PTB, Physikalisch-Technische Bundesanstalt, erede del PTR, Physikalisch-Technische Reichsanstalt, fondato nel 1887; esso realizza MRC per proprietà fisiche e, solo da pochi anni, MRC in campo sanitario. L'organismo preposto alla realizzazione di MR è invece il BAM,[4] Bundesanstalt für Material-Forschung und- Prüfung, che a sua volta è l'erede sia del Preussische Königliche Mechanisch-Technische Versuchsanstalt, fondato nel 1870, sia del Chemisch-Technische Reichsanstalt, fondato nel 1920. Il BAM funge da istituto di riferimento per il settore chimico, ha stretto una convenzione con il PTB per le attività metrologiche nel campo chimico e ha un vasto catalogo di MRC in un ampio spettro di tipologie, come metalli, elastomeri, gas, materiali isotopici. Inoltre il BAM partecipa attivamente ai lavori internazionali ed in particolare al comitato ISO per i materiali di riferimento, ISO-REMCO, di cui gestisce la banca dati COMAR, che elenca i MRC di produttori che operano in accordo con le guide ISO.

Una situazione non troppo diversa si ritrova in Gran Bretagna, dove l'istituto metrologico nazionale è il NPL, National Physical Laboratory, fondato nel 1899;

[3] Rexmond G. Cochrane, *Measures for progress*, Washington, U.S. Dept. of Commerce, 1974.

[4] http://www.bam.de/

esso realizza MRC in alcuni settori, principalmente miscele gassose per riferimenti in campo ambientale. È invece il LGC,[5] Laboratory of Government Chemist, ad essere l'istituto di riferimento per il settore chimico: fondato verso il 1850 come laboratorio di riferimento del governo per problemi chimici, esso è stato privatizzato nel 1996. Ha un ampio catalogo di MRC in vari settori, come quello dei cibi, della chimica clinica e farmaceutica, della medicina legale.

A livello europeo, nel 1973 la Commissione dell'allora Comunità Europea fondò il BCR (Bureau Communautaire de Référence), che stimolò, coordinò e finanziò vari programmi di metrologia applicata di cui il più importante portò alla realizzazione, in base a bisogni previamente individuati in Europa, di materiali di riferimento, mediante apposite azioni che coinvolgevano svariati laboratori europei nella preparazione e nella certificazione. Oggi i MR sono realizzati e commercializzati dall'IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements),[6] un istituto che fa parte del Centro Comune di Ricerca dell'UE e che si è sviluppato a partire da un centro di ricerca in campo nucleare. In generale per gli MR si è mantenuta la sigla BCR, ma esistono anche MR dell'IRMM (in particolare quelli isotopici). Un recentissimo sviluppo è un accordo con LGC (GB) e BAM (DE) che porterà alla realizzazione di ERM (Materiali di Riferimento Europei) di alta qualità, certificati e riconosciuti internazionalmente.

Nel 1983, a 10 anni dall'istituzione, il BCR disponeva di un centinaio di tipi di MR e ne vendeva circa 1500 pezzi in un anno, dopo un altro decennio si era passati a più di 300 tipi ed una vendita di diecimila pezzi, oggi ne sono disponibili circa 500 tipi con un incasso annuale di circa un milione di euro.

Evoluzione dei materiali di riferimento, dall'interesse industriale all'interesse sociale

Un esame del catalogo dei materiali di riferimento dei maggiori produttori permette di seguirne l'evoluzione non solo dal punto di vista della storia della scienza ma anche dei legami con la società.

Particolarmente utile da questo punto di vista è il catalogo del NIST; in esso i MR sono indicati con un numero, che è un numero d'ordine correlato con la data in cui il materiale venne messo in lavorazione, e con una lettera, la quale indica quante volte è stato rifatto un nuovo lotto del MR. Il primo materiale dell'elenco, un calcare argilloso certificato per la concentrazione di Al_2O_3, CaO, Fe_2O_3, MgO, MnO, P_2O_5, K_2O, SiO_2, Na_2O, SrO, TiO_2, ha la sigla 1c, e questo ci dice sia che si tratta del primo MR preparato, risalente quindi al 1906, sia che il lotto attualmente disponibile è il quarto.

Sono molti i materiali di riferimento così longevi da essere ancora presenti in

[5] http://www.lgc.co.uk/
[6] http://www.irmm.jrc.be/

catalogo a distanza di quasi un secolo, infatti sono tuttora disponibili le ghise del primo gruppo preparato su richiesta dei fonditori americani nello stesso anno 1906, denominate 4L, 5m, 6g, 7g e certificate per C (totale e grafitico), Mn, P, S, Si, Cu, Ni, Cr, V, Mo, Ti, As, N. Seguono molti altri materiali il cui ordine di comparsa dà un'idea della storia della metallurgia; a partire dal 1909 si incontrano successivamente: acciai al carbonio (8j, 11h-20g), acciai poco legati (30f, …), acciai inossidabili (73c, …), lega di zinco per fusione sotto pressione (94c), acciai altolegati (126c, …); poi, a partire dal secondo dopoguerra: leghe di titanio (173b, …), leghe per alte temperature (348a, …), leghe di zirconio (360b, …), rame non legato (393).

Altri MR ci suggeriscono lo sviluppo della chimica analitica strumentale, come l'apparire nel catalogo di saccarosio certificato per la purezza stechiometrica (17e), utilizzato per la polarimetria, mentre il n. 185g, ftalato di potassio acido certificato per il valore del pH a 25°C, richiama la diffusione di strumenti come i pHmetri. Una serie di MR polimerici, certificati per il peso molecolare, inizia con il n. 1473a e riflette lo sviluppo dell'industria delle materie plastiche.

A partire dal 1970 in poi fanno la loro comparsa, accanto ai materiali di riferimento di importanza industriale, quelli di interesse per la salute umana e per il settore ambientale. Ecco quindi composizioni del tutto nuove, come una miscela di farmaci antiepilettici (900), sieri umani certificati per il tenore di Ca, Cl, Li, Mg, K, Na, colesterolo, creatinina, trigliceridi, urea, acido urico (909b), sostanze pure di interesse clinico, come colesterolo, urea, creatinina, bilirubina, cortisolo (911b, …), sostanze tossiche o droghe nell'urina e nei capelli.

Accanto a questi MR di ambito clinico compaiono quelli di interesse ambientale, particolarmente nell'ultimo decennio del secolo ventesimo. Essi spaziano da pesticidi clorurati e PCB in solventi ad una vasta serie di MR certificati per molti elementi in tracce; le diverse matrici includono foglie di melo, foglie di pesco, di spinacio, di pomodoro, aghi di pino, latte in polvere (1549), tessuto di ostrica, farina, fegato bovino (1577b), acqua (1643d), particolato urbano (1648), suoli, sedimenti, … Ci sono poi amianti (1866a-1876b) e miscele gassose, per la maggior parte contenenti inquinanti atmosferici.

Si arriva infine a materiali di riferimento nel campo genomico, relativi a profili DNA (2390/1) ed al DNA mitocondriale (2392).

Considerazioni simili si possono fare per i materiali di riferimento del BCR, la cui storia ricopre però, come si è detto, soltanto un quarto di secolo. Anche in questo caso il più vecchio MR in catalogo (010) è legato alla metallurgia, essendo un minerale di stagno concentrato certificato per il contenuto di Sn. Ad esso si aggiunsero altri minerali e poi soprattutto metalli puri, come rame, molibdeno, titanio, alluminio, piombo.

Successivamente furono preparate molte sostanze organiche certificate per la purezza (benzo(b)crisene, …), e presto (a partire dal numero 038) comparvero MR di interesse ambientale, tra i quali molti e svariati materiali certificati per gli elementi in tracce (ceneri di emissioni, foglie di olivo, 062, foglie di faggio, aghi di

abete, suoli e sedimenti, fanghi di fognatura, residui di inceneritore, vegetali, tessuti animali, acqua di mare, plancton, capelli umani, 397).

A questi si affiancarono successivamente MR con matrice biologica, certificati per il tenore di pesticidi (mangime animale, 115, latte in polvere, grasso di maiale, 430) o di ormoni (orina bovina) e per specie organo-metalliche tossiche (mercurio totale e metilmercurio nel tonno, 463/4, arsenico totale, arsenobetaina e acido dimetilarsinico nel tonno, 626/7).

Anche tra i MR del BCR hanno fatto la loro comparsa materiali utili per la chimica clinica, tipicamente aventi come matrice il siero, certificati per il tenore in ormoni (dal cortisolo, 192, all'estradiolo, 578), elettroliti, metaboliti, proteine, enzimi.

Tra i materiali più recenti si trova poi una famiglia che manca, non sorprendentemente, tra i MR americani, quella cioè degli organismi geneticamente modificati, rappresentati da soia e mais, certificati per la percentuale GM (IRMM 410 e 413). In questo come in altri casi (esempio il MR a base di foglie di olivo) si può notare come la produzione di MR europei non rispecchi quella americana, ma si affianchi ad essa fornendo materiali di specifico interesse per i paesi europei; diverso è invece il discorso per le produzioni di paesi per i quali considerazioni economiche o politiche abbiano spinto a realizzare un'indipendenza rispetto alla produzione americana.

Linee di tendenza

Da un lato si tende ad un aumento delle richieste di MR per la crescente necessità dei laboratori analitici di fornire una dimostrazione della qualità dei loro dati, attraverso un accreditamento od in altre forme. Questo avviene sia perché si opera in un'economia globalizzata, sia per l'emergere di problemi che mettono in gioco il futuro, come quelli ambientali, sia per una maggiore consapevolezza dell'utenza che comporta una richiesta di riferibilità a campioni riconosciuti in nuovi campi, come la chimica clinica (per la quale è operante un'apposita direttiva europea)[7] e la genomica.

Dall'altro lato risultano sempre più evidenti i limiti economici alla moltiplicazione dei MR, ed il dibattito in corso negli organismi internazionali tocca quindi diversi punti quali: l'uso migliore possibile dei materiali disponibili, da quelli certificati a quelli preparati per uso interno; la possibilità di limitare il bisogno di MR utilizzando per le analisi metodi primari; la garanzia di qualità e la riferibilità degli stessi materiali di riferimento.

[7] *Attuazione della direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.* Decreto Legislativo 8 settembre 2000, n. 332.

Riassunto – I materiali di riferimento sono stati utilizzati fin dall'inizio del XX secolo, sotto nomi diversi, principalmente per l'analisi di leghe complesse. Nei paesi industrializzati è in generale l'istituto metrologico nazionale, od un altro ente pubblico competente, ad essere preposto alla realizzazione di materiali di riferimento certificati; a questi enti si affiancano produttori privati e, nel caso dell'Unione Europea, un istituto del Centro Comune di Ricerca. Dopo un breve esame della situazione in alcuni paesi viene illustrata l'evoluzione dei materiali di riferimento prodotti da uno dei più importanti istituti metrologici (NIST, USA) e dall'istituto europeo (IRMM, UE): ai materiali di interesse industriale si affiancano successivamente materiali per l'analisi strumentale e, nella seconda metà del secolo, materiali utilizzati nella chimica clinica e nelle analisi ambientali, fino ad arrivare negli anni più recenti a materiali di riferimento per l'analisi del DNA e dei vegetali geneticamente modificati.