Schegge di Storia della Medicina

Anselme Payen: un precursore dell'analisi colorimetrica

G. Dall'Olio

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

Riassunto

L'analisi colorimetrica, che permette di risalire alla concentrazione di una soluzione colorata confrontandola con una soluzione a titolo noto della stessa sostanza, inizia a svilupparsi nella seconda metà dell'Ottocento. La comparazione del colore delle soluzioni è effettuata dall'occhio dell'analista con i *comparatori ottici* o *colorimetri*. Nel corso dell'Ottocento si assiste al progredire della colorimetria, più semplice e rapida rispetto all'analisi gravimetrica e volumetrica, ed alla conseguente evoluzione degli strumenti che consentivano questo tipo di indagine, dai vari tipi di *comparatori ottici* fino ai colorimetri fotoelettrici negli anni trenta del Novecento.

L'analisi colorimetrica sarà la tecnica analitica di elezione in Chimica Clinica dai primi decenni del XX secolo e ne determinerà il rapido evolvere poiché consente determinazioni veloci, semplici, precise, con ridotti volumi di reattivi e di campione biologico, caratteristiche indicate per la routine e l'automazione.

E' attribuito ad Anselme Payen, chimico francese, l'ideazione nel 1825 del primo strumento per analisi colorimetrica che egli denomina *decolorimetro*.

Summary

Anselme Payen: a precursor of colorimetric analysis

The development of the colorimetric analysis that allows to estimate the concentration of a colored solution comparing it with a solution of the same substance at known titer, begins in the second half of XIX century. The analyst visually carries out the comparison of the colour of the solutions using *optical comparators* or *colorimeters*. In XIX century colorimetry progresse since it is simpler and faster than the gravimetric and volumetric analysis inducing the evolution of the instuments devoted to these analyses (optical comparators and, in the Thirties of XX century, photoelectric colorimeters).

Colorimetric analysis has been the most used analytical technique in Clinical Chemistry in the first decades of XX century and allowed the rapid evolution of this discipline since allowed rapid, simple and precise analysis, requiring small reagent and sample volume, an attractive feature for routine and automation.

The first analyzer for colorimetry has been developed in 1825 by Anselme Payen, a French chemist, who called it *decolorimeter*.

Colorimetria e colorimetri nell'Ottocento

Le metodologie chimico analitiche, quali la gravimetria e la volumetria, utilizzate nel Settecento e nell'Ottocento nei laboratori chimici, vengono applicate anche alle prime analisi dei campioni biologici (non solo urina e calcoli ma anche il sangue), essendo all'epoca gli unici metodi a disposizione del chimico. Tuttavia il loro impiego in *chimica animale* è destinato ad essere, appena possibile, sostituito da altri metodi di analisi meno complicati e che necessitano di minori quantità di campione: la microanalisi volumetrica e soprattutto la colorimetria.

L'analisi colorimetrica che permette il calcolo della concentrazione di una soluzione di un composto colorato semplicemente confrontandone l'intensità di colore con quella di una soluzione a titolo noto della stes-

Ricevuto: 05-06-2007 Pubblicato on-line: 30-06-2007

Corrispondenza a: Dott. Giuliano Dall'Olio, Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Viale F. Rodolfi n. 37, 36100 Vicenza. E-mail: giuliano.dallolio@ulssvicenza.it

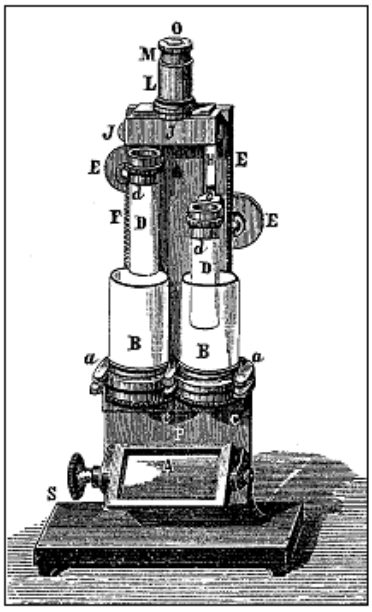


Figura 1. Colorimetro di Laurent.

sa sostanza, consente l'introduzione di metodiche infinitamente più semplici e rapide.

La comparazione delle soluzioni avviene visivamente, con strumenti denominati appunto *comparatori ottici* o *colorimetri*, dove la valutazione del colore è effettuata dall'occhio dell'analista e quindi legata alla sua esperienza, alle condizioni di luce del laboratorio ed alle caratteristiche dello strumento. *"Si immaginarono varie disposizioni per osservare comodamente e nel modo più esatto possibile le piccole differenze di colorazione, si ebbero così modelli svariatissimi di apparati detti colorimetri, i quali, semplici e non molto esatti dapprima, andarono poi progressivamente perfezionandosi"*[1].

L'uso dei colorimetri, studiati e realizzati nella prima metà dell'Ottocento per l'industria dello zucchero e *"per i bisogni dell'arte tintoria"* è limitato in un primo momento alle determinazioni quantitative di composti colorati. La progressiva conoscenza delle reazioni chimiche ne estende l'utilizzo alla misura di sostanze incolori trasformate in composti colorati solubili mediante opportuni reagenti.

Con i colorimetri i risultati quantitativi sono sempre relativi ad una soluzione a titolo noto di sostanza colorata e sono ottenuti portando la soluzione del campione in esame e la soluzione standard alla stessa intensità di colore. L'eguaglianza dei colori, rilevata attraverso un oculare, può essere raggiunta nei diversi apparecchi per diluizione di una delle due soluzioni oppure variando opportunamente le loro *"grossezze di strato"*. Noto il valore della soluzione standard e rilevato il volume di solvente aggiunto nel primo caso e lo spessore di strato nel secondo, si risale alla concentrazione della soluzione incognita.

"Si venne ad inaugurare, in tal modo, un metodo di analisi chimica, ***l'analisi colorimetrica****, prezioso mezzo di aiuto al chimico analista quando gli occorra determinare* ***sollecitamente*** *quantità così piccole di sostanza da render vani i tentativi per pesata o per via volumetrica"*[1].

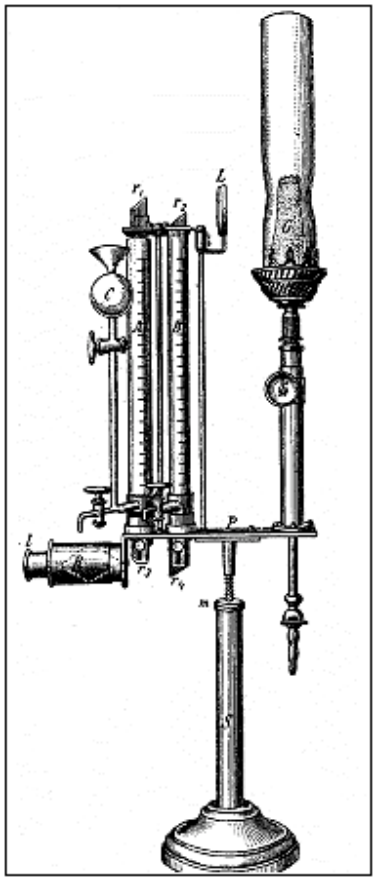


Figura 2. Colorimetro di Krüss.

Su queste basi si assiste nel corso dell'Ottocento alla continua ricerca di nuovi metodi colorimetrici e alla costruzione di una grande varietà di colorimetri.

Il botanico francese Jacques Julien Houtou de Labillardière (1755-1834) usa nel 1827 uno strumento di sua invenzione per studiare le soluzioni di indaco utilizzando per la prima volta il metodo di confrontare il colore della soluzione incognita con una *"soluzione tipo"*.

"Per eseguire gli assaggi col colorimetro è necessario che si abbiano campioni di nota bontà e fabbricazione per ciascuna materia colorante, che si terranno a tipo, ossia termine di paragone, pel confronto delle materie da sottoporre all'assaggio"[2].

Nel 1838, ancora un francese, il fabbricante di strumenti di precisione Charles-Felix Collardeau-Duheaume (1796-1869), probabilmente su indicazioni di Anselme Payen, costruisce un pratico colorimetro basato sulla variazione di spessore della soluzione in esame rispetto ad una soluzione standard a spessore fisso. *"L'apparecchio di Collardeau fu per molto tempo il colorimetro generalmente impiegato, sinchè non se ne modificò la disposizione nel senso di ridurlo più comodo nell'uso e più esatto nei risultati"*[1]. Il colorimetro di Labillardière e quello di Collardeau restano in uso per più di trent'anni nelle industrie tintorie e dello zucchero.

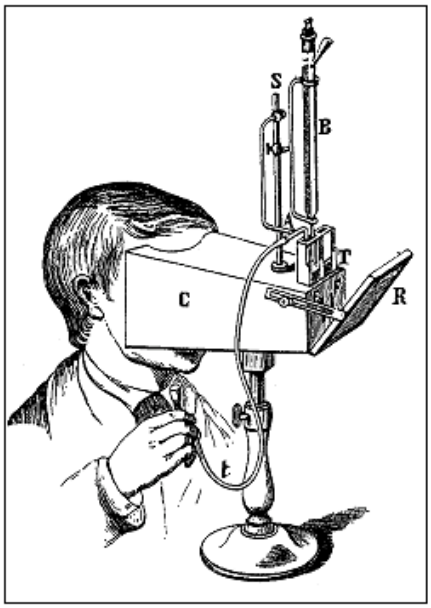


Figura 3. Colorimetro di Salleron.

Il 1854 è una data storica per la colorimetria: Jules Duboscq (1817-1886), ottico di Parigi, realizza il suo colorimetro che resterà in uso per un secolo e permette un salto di qualità a questa tecnica analitica. Lo strumento è costruito con materiali ottici di pregio ed è molto comodo nell'uso. Gli spessori delle due soluzioni, incognita e standard, si possono variare facilmente e contemporaneamente fino ad ottenere l'uguaglianza di colore rilevata attraverso un oculare. Il calcolo della concentrazione della soluzione in esame è reso facile, rapido e preciso[1-6]. Con questo strumento il biochimico americano Otto Folin (1867-1934) e la sua scuola studiano metodi colorimetrici adatti alla routine in Chimica Clinica, pubblicati nel fondamentale lavoro *"A system of blood analysis"* del 1919, che permettono la misura di numerosi analiti del sangue e delle urine su un volume di campione molto piccolo (10 mL) contribuendo in maniera determinante allo sviluppo della Chimica Clinica[7-9].

Dal 1864 al 1887 la letteratura è ricca di memorie relative a strumenti ed a metodi di analisi colorimetrica. Apparecchi basati sul principio della variazione degli spessori delle soluzioni vengono progettati e costruiti da Laurent (Fig. 1), da Hehner (1876), da Wolff (1879), da Krüss (Fig. 2) da Donnan (1896), mentre Salleron nel 1872 propone una modifica dell'apparecchio di Labillardière dove l'eguaglianza di colore è ottenuta per diluizione (Fig. 3). Grosse e Krüss apportano, rispettivamente nel 1887 e 1889, delle variazioni alla parte ottica dei colorimetri trasformandoli in strumenti polarizzanti capaci di percepire con esattezza le minime differenze di colore fra le due soluzioni da confrontare[1] (Fig. 4).

Molto pratici, anche se meno precisi, alcuni strumenti nei quali il materiale di confronto non è una soluzione

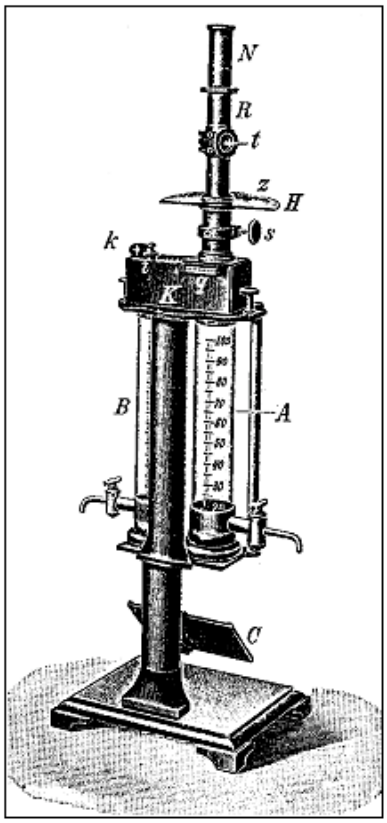


Figura 4. Colorimetro polarizzante di Krüss.

ma un vetro colorato o una scala cromatica dipinta su una tavoletta (vino-colorimetro di Salleron) (Fig. 5).

Interessanti le applicazioni della tecnica colorimetrica alla determinazione dell'emoglobina a scopo diagnostico: Rayensky (1876), Hayem (1877), Quinke (1878), Gowers (1879), Fleischl (1886), Sähli (1902) concepiscono particolari strumenti (*emometri*) adatti alla sua rapida misura per confronto di colori con *"soluzioni tipo"* il più possibile simili alla sostanza in esame.

Il *decolorimetro* di Payen

Anselme Payen sviluppa, agli inizi dell'Ottocento, nell'intento di perfezionare la lavorazione dello zucchero di barbabietola, una tecnica di raffinazione che prevede la decolorazione delle soluzioni zuccherine mediante carboni. Si trova quindi nella necessità, per ottimizzare il metodo, di stimare il potere decolorante dei diversi carboni ed in particolare del *nero animale* (*carbone animale, carbone d'ossa*). Si tratta, in ultima analisi, di paragonare il colore di una soluzione sottoposta al processo di decolorazione rispetto ad una non trattata.

Nel 1825, per rendere più agevole e attendibile il confronto del colore delle soluzioni, costruisce uno strumento, che egli denomina *decolorimetro*, considerato da Grassini[1] il primo comparatore ottico entrato in chimica analitica, mentre Rinsler[4] attribuisce la priorità all'apparecchio di Labillardière.

Lo strumento di Payen consiste in un tubo verticale

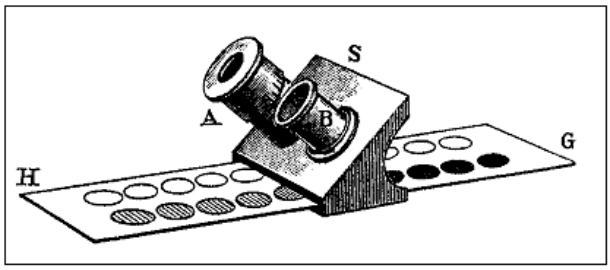


Figura 5. Vino-colorimetro Salleron.

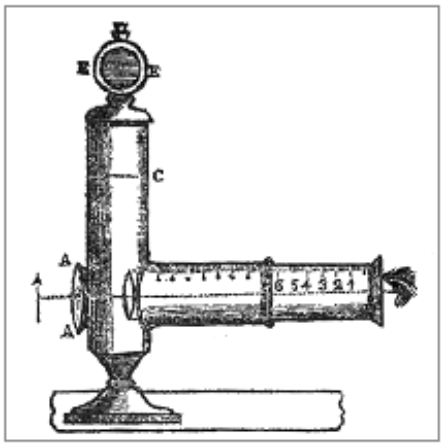
(diametro 3 cm, lunghezza 10 cm) collegato perpendicolarmente ad un altro cilindro all'incirca delle stesse dimensioni (Fig. 6 a,b). All'interno di quest'ultimo scorre, come un pistone, un ulteriore cilindro cavo con la base che entra chiusa da un disco di vetro. Questo tubo a tenuta può essere tirato verso l'esterno o spinto all'interno allontanandolo o avvicinandolo così ad un altro disco trasparente collocato alla fine del tubo orizzontale esterno. In tal modo viene a crearsi una cella a cammino ottico variabile.

Alla sommità del tubo verticale è fissato un piccolo cilindro con le basi di vetro ad 1 cm di distanza dove si pone il liquido di confronto. La soluzione trattata con il carbone in esame, immessa nel tubo vericale, si dispone nella cella a volume variabile.

Il potere decolorante dei vari carboni può essere misurato agevolmente, basta tirare il pistone facendo affluire nella cella la soluzione trattata fino a che il suo tono di colore è della stessa intensità del liquido nel piccolo cilindro di confronto. Rilevando sulla scala del pistone la distanza fra i due dischi trasparenti, si conosce lo spessore di liquido decolorato. *"Cosicchè, allorquando lo strato del liquido trattato col carbone è doppio di quello del liquore di prova, il carbone ha tolta la metà della materia colorante, quand'è tripla si può esser certi ch'egli ne ha assorbite le due terze parti. Questo modo di procedere semplice, di cui i fabbricatori possono facilmente usarne, perchè di facile maneggio a chichessia, ci mette in posizione di stimare con tutta facilità le differenti qualità di nero d'ossa che si commettono al commercio"*[10].

Françoise Anselme Payen (1795-1871)

Anselme Payen nasce nell'ambiente della chimica industriale. Il padre fin dal 1792 aveva iniziato, nei dintorni di Parigi, una piccola attività imprenditoriale per la produzione di cloruro d'ammonio che poi espande ad altre sostanze chimiche (acido cloridrico e solforico, borace, idrossido di sodio, gelatina)[11] e alla fabbricazione dello zucchero dalle barbabietole. Riceve quindi l'*imprinting* per la chimica dall'attività paterna. A 17 anni viene inviato a Parigi per frequentare un corso di chimica al Museo di Storia Naturale. Nei primi decenni dell'Ottocento la Francia è la culla della chimica ed infatti trova insegnanti di altissimo livello. Il corso è tenuto da Nicolas Vauquelin (1763-1829), che all'epoca occupa i posti più prestigiosi della chimica, assistito da



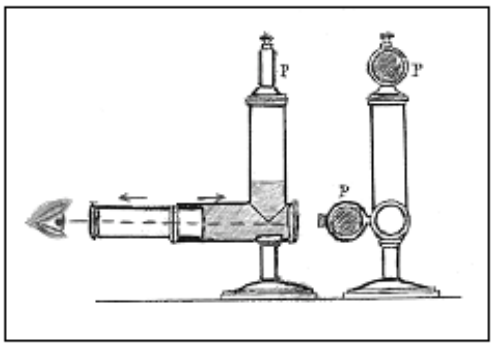


Figura 6 a,b. Decolorimetro Payen (a: rif. 10, b: rif. 11 mod.).

Michel Eugène Chevreul (1786-1889) che sarà noto per le sue ricerche sui grassi animali e sui colori. Payen frequenta anche il laboratorio privato di Vauquelin dove ha modo di conoscere e di collaborare con altri personaggi che avrebbero illuminato l'universo della chimica di quel secolo: Pierre Robiquet (1780-1840), Alphonse Chevallier (1793-1879), Louis Jacques Thénard (1777-1857).

A vent'anni si presenta l'eterno problema della chiamata alle armi. Avrebbe avuto l'onore di combattere sotto le insegne di Napoleone Bonaparte ma, come tanti giovani della sua e di future generazioni, preferisce lasciare ad altri la gloria sul campo di battaglia. Aggira l'ostacolo superando l'esame di ammissione all'Ecole Polytechnique, che però non frequenta, ma che lo esonera dal servizio militare. Così, appena ventenne, affianca il padre nella conduzione delle industrie di famiglia, per passare a dirigerle nel 1825 alla morte del genitore[11].

A quarant'anni Payen decide di cambiare indirizzo alla sua vita: lascia l'attività di imprenditore e si dedica alla ricerca e all'insegnamento (Fig. 7). Accetta un incarico all'*Ecole Centrale des Arts et Manufactures* (succedendo a Jean-Baptiste Dumas) e nel 1839 anche la cattedra di chimica applicata al *Conservatoire des Arts et Métiers*, insegnamenti che detiene fino alla morte.

Figura 7. Anselme Payen (rif. 11 mod.).

Rilevante il suo impegno scientifico. Oltre al miglioramento di molti processi industriali basterà ricordare, per avere la dimensione del personaggio, il lavoro in collaborazione con Jean-François Persoz (1805-1868): nel 1833 da un estratto di malto precipitano con alcool etilico una sostanza amorfa, bianca, capace di idrolizzare l'amido che denominano *diastasi*. Hanno isolato il primo enzima: l'*amilasi*[12]. A Payen è attribuita anche la scoperta di un'altra importante sostanza: la cellulosa[11]. Di rilievo le pubblicazioni: il *Traité élémentaire des réactifs* (1822), in collaborazione con Alphonse Chevallier, che ebbe tre edizioni e il *Précis de chimie industrielle* del 1849 con cinque edizioni.

Il lavoro di Payen per la messa a punto del *decolorimetro* va ricondotta alla incentivazione da parte di Napoleone della fabbricazione dello zucchero dalla barbabietola in seguito alle vicende di politica internazionale sfociate nel blocco navale francese nel 1806. Payen si trova pronto a questa attività industriale avendo, fin dal 1813, iniziato a fabbricare il *nero animale* o *nero d'ossa*, che sperimenta con successo come decolorante nella purificazione dello zucchero. Più tardi approfondisce anche la parte teorica del processo studiandone il meccanismo d'azione.

Conclusioni

Il progredire dei metodi colorimetrici e la costruzione di comparatori ottici tecnologicamente avanzati e adatti alle analisi di ruotine, iniziati nel 1825 da Payen e condotti durante tutto l'Ottocento da Labillardière, Collardeau, Duboscq, rendono possibile l'evolvere della chimica analitica strumentale e la nascita e l'espansione della Chimica Clinica. Quest'ultima disciplina in particolare subisce un impulso determinante grazie ai metodi colorimetrici messi a punto da Otto Folin adatti anche ai colorimetri fotoelettrici disponibili dagli anni '30 del Novecento.

Ralph Müller nel 1939 pur asserendo che l'apparecchio di Duboscq resta all'epoca lo strumento più versatile ed utile ammette che il futuro è rivolto alla colorimetria fotoelettrica[3]. Ciò risulta particolarmente vero quando nel 1957 inizia l'era della automazione a flusso continuo con il primo "Autoanalyzer" della ditta Technicon che evolverà nello SMA 12/60 capace di processare 60 campioni all'ora eseguendo su ciascun campione 12 determinazioni **tutte colorimetriche** e successivamente nello SMAC con 18 determinazioni colorimetriche. Senza gli analizzatori a flusso continuo, uno dei punti più alti della colorimetria, l'espansione dei laboratori ospedalieri negli anni '60 e '70 del Novecento non sarebbe stata possibile.

Bibliografia

1. Grassini R. Analisi colorimetrica. In: Guareschi I. Nuova Enciclopedia di Chimica. Vol 2. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese, 1913.
2. Selmi F. Enciclopedia di Chimica. Vol 4. Torino : Società Unione Tipografica Torinese, 1870.
3. Müller R H. Photoelectric methods in analytical chemistry. Industrial and Engineering Chemistry. Analytical edition 1939; 15:1-17.
4. Rinsler MG. Spectroscopy, colorimetry, and biological chemistry in nineteenth century. Journal Clinical Pathology 1981; 34:287-91.
5. Mellon MG. A Century of Colorimetry. Analytrical Chemistry 1952; 24:924-31.
6. Szabadvary F, Robinson A. The history of analytical chemistry. In: Wilson & Wilson's. Comprehensive analytical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 1980.
7. Dall'Olio G. Folin-Wu: A system of blood analysis. Progressi in Medicina di Laboratorio 1991;5:297-9.
8. Dall'Olio G. Jules Duboscq, un artefice della strumentazione analitica. Progressi in Medicina di Laboratorio 1992; 6:133-4.
9. Rosenfeld L. Four Centuries of Clinical Chemistry. New York: Taylor & Francis, 1999.
10. Recensione. Decolorimetro; del signor Payen. Biblioteca di Farmacia, Chimica, Fisica, Medicina, Chirurgia, Scienze naturali, ecc. 1840; 14:190-2.
11. Taddia M. Impatto tecnologico e pubblica utilità della chimica nell'opera di Anselme Payen (1795 -1871). Atti del XI Convegno Nazionale di Storia e Fondamenti della Chimica. Torino 21-24 settembre 2005.
12. Ranaldi F, Ottavini R, Vanni D, Guerin E, Giachetti E, Vanni P. Genesis and evolution of the biochemistry. The Italian Journal of Biochemistry 2004; 53:1-7.