

Sborník Československé společnosti histo- a cytochemické
při ČSAV

Communications of The Czechoslovak society for histochemistry
and cytochemistry

Vol. 2

1967

Chemie ftalochromového pigmentu

P. Vácha,^x R. Koďoušek^x

Chemistry of the "Phtalochrome" pigment. - The analysis is given concerning the physico-chemical properties of the "phtalochrome" pigment, produced by interaction between the copper-phtalocyanines and aminotriphenylmethane or thiazine dyes. A significant affinity of this complex to lipides of myelin type, mitochondria, neural synapses etc. was shown.

V mikroskopické technice lze barvit dvěma příp. více barviv simultánně nebo sukcesivně. Je dosud poměrně málo prací, zabývajících se mechanismem vzájemné interakce jednotlivých barviv v těchto případech. Lze to vysvětlit tím, že při výběru barviv a při hodnocení výsledků převládá hlavně aspekt morfolický, tj. snaha o nejvýraznější znázornění určité struktury, zatímco aspekt chemický je brán v úvahu až v druhé řadě. Ani současná teorie histologického barvení se těmito jevy nezabývá v tom rozsahu, jaký jim přísluší (SOUDEK a NEČAS 1965). Problémem vzájemné interakce barviv se zabývali již koncem minulého století EHRLICH 1879 a JENNER 1899, v moderní době pak zejména PEARSE 1960, McCONAILL a GURR 1960, GURR a McCONAILL 1961 a GURR 1963. Všechny práce uvedených autorů nasvědčují

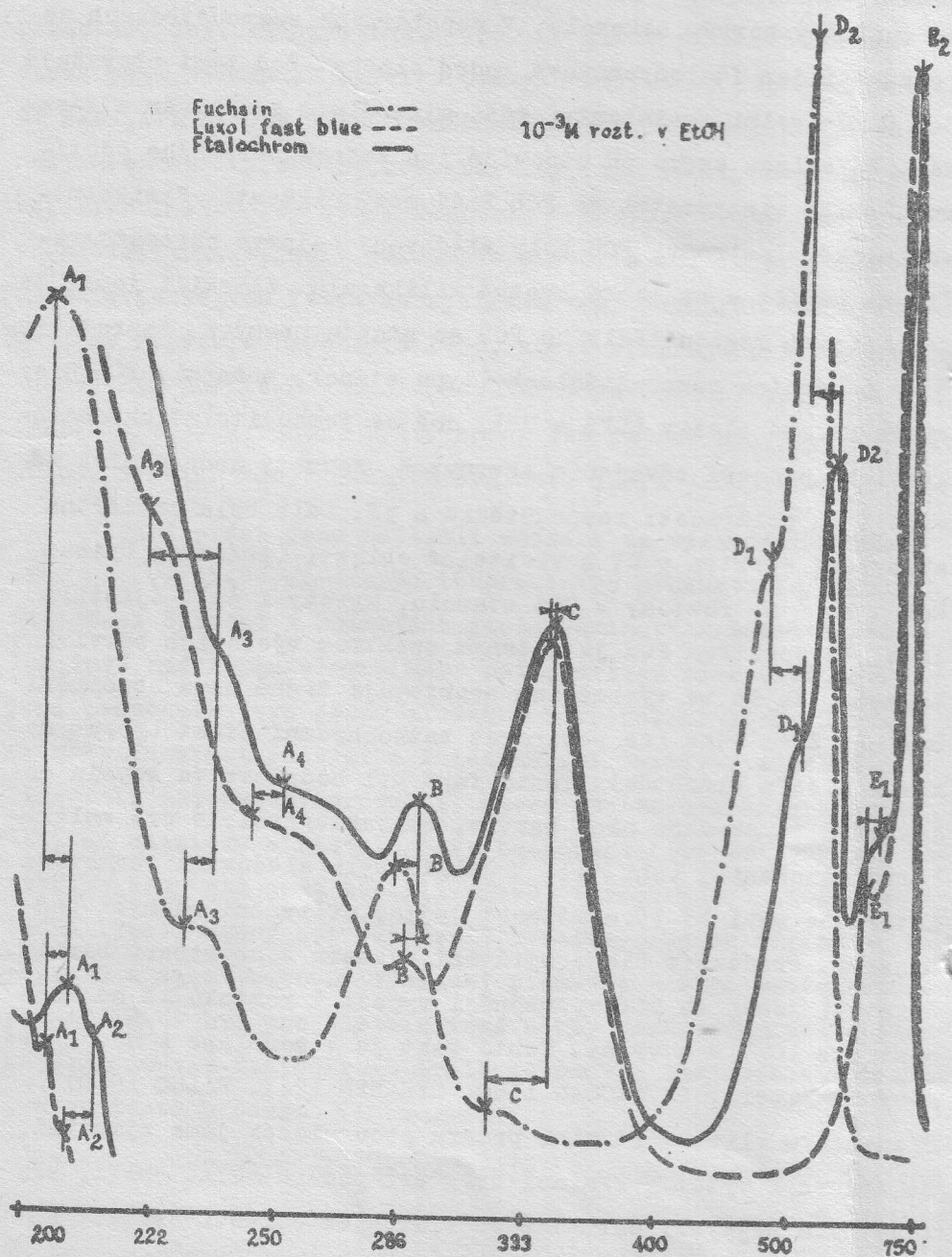
^x Ústav patologické anatomie lékařské fakulty Palackého university, Olomouc

skutečnosti, že ve směsích jistých barviv vznikají interakční produkty, jejichž vlastnosti jsou do jisté míry odlišné od vlastností původních barviv. Otázkou struktury těchto komplexů se zabývali hlavně GURR a McCONAILL 1961, kteří uvádějí možnost kondenzační reakce mezi barvivy, tj. vznik chemické vazby; PEARSE 1960 pak uvádí domněnku o iontové vazbě. Podobnou problematikou, zejména pokud jde o tvorbu molekulárních komplexů organických látek se systémem konjugovaných dvojných vazeb, se zabývala HAUSEROVÁ 1958, která spatřuje příčinu vzniku takovýchto komplexů v mezimolekulární rezonanci, tedy opět ve fyzikálním typu vazby. Tento názor lze patrně akceptovat i pro případ vyšších konjugovaných systémů, jakým jsou barviva.

V naší práci jsme navázali zejména na výzkumy PEARSEOVY 1960, který sledoval tvorbu interakčního produktu ze směsi neutrální červení a mědnatého ftalocyaninového barviva (FC) luxolové modři. Luxolovou nebo methazolovou modř (LFB, MFB) jsme ponechali jako jednu složku a kombinovali ji s různými aminotrifenylnmethanovými a thiazinovými barvivy, přičemž jsme získávali interakční produkty, které po izolaci byly kvantitativně chemicky a histologicky hodnoceny. Pro zmíněný typ barevných komplexů jsme zvolili název "ftalochromy" (KOĐOUSEK a VÁCHA 1966), který měl zdůraznit ftalocyaninovou základní komponentu a silně barevný výsledný pigment. Z izolovaných ftalochromů (FCH) byl pro histologické účely prakticky upotřebitelný jen fuchsin-ftalochrom. Proto se nadále zaměřujeme výhradně jen na tento produkt.

Ftalochrom byl získán smísením 10/00 etanoličských roztoků pararosanilinu (Lachema) a Luxol fast blue (Mochrome-E. Gurr). Po jednom týdnu byl roztok odsát na malé Wittově destičce a zadržený ftalochrom byl promyt alkoholem a vysušen. Výtěžek izolace byl 67 mg%. Izolovaný ftalochrom tvoří černé, za vlhka

mazlavé vločky, po vysušení amorfni hrušky. Je málo rozpustný ve vodě i v horkém alkoholu. V nepolárních rozpouštědlech se rozpouští jen ftalocyaninová modrá složka. Bod tání převyšuje 360°C . Je velmi resistantní vůči minerálním kyselinám a zásadám. Na silnou změnu pH odpovídá jen změnou barevného odstínu. Těmito vlastnostmi se FCH řadí mezi pigmenty. Fyzikálně-chemické vlastnosti FCH byly sledovány nejprve chromatografii na papíře a na tenké vrstvě silikagelu. Zjistili jsme, že nepolárními rozpouštědly se FCH se startu nesmývá. Naproti tomu v polárních rozpouštědlech (typu etanol, metanol) FCH disociuje na obě složky (LFB a BF), což se pochopitelně chromatograficky projeví zdvojením skvrny; R_F hodnoty obou složek závisejí na polárnosti rozpouštědla a pH. Dále byla proměřena absorpční spektra v UV a viditelné oblasti (přístroj Unicam, konc. 10^{-4} M, roztoky v 96% etanolu, květy 1 cm). Zjistili jsme, že spektrum FCH je směsným spektrem výchozích barviv: to znamená, že se ve výsledcích neobjevují žádná nová absorpční maxima. Zato však lze pozorovat bathochromní efekt (posun maxima k nižším vlnovým délkám). Tento fakt byl hodnocen ve smyslu molekulární interakce obou barviv, charakteristické pro molekulární sloučeniny (obr. 1). V dalším byla sledována rovnováha interakce mezi BF-FC a možnost jejího ovlivnění různými podmínkami. Především šlo o zjištění významu koncentrace barviv. Zjistili jsme, že FCH význačněji vypadá z roztoků až od koncentrace 10^{-4} M a vyšší. Tento fakt je v souladu s údaji uvedenými v literatuře (KOGAN 1960, TĚRENIN 1947, BAĽHO 1940). Sledováním vlivu molárního poměru obou složek jsme zjistili, že nejvyšší výtěžky izolací byly při poměru BF:FC = 1:1, kdy také byla nejvyšší extinkce ve viditelné oblasti světla. Detailněji byl dále sledován vliv pH. V tomto ohledu lze nálezy shrnout tak, že silně alkalické prostředí potlačuje absorpční pás náležející fuchsínu, zatímco silně kyselé prostředí potla-



Obr. 1. Spektrum ftalochromu

čuje spektrální pás náležející ftalocyaninu. To znamená, že v silně kyselém prostředí převládá u FCH komplexu barva červená, kdežto v alkalickém prostředí barva modrá. Menší změny v pH se projevují obdobně jako změna molárního poměru, což ostatně dokazuje jen možnost ovlivnění struktury FCH stupněm disociace kyselých (SO_3H) a zásaditých (NH_2) skupin. Typ rozpouštědla nijak význačně neovlivňoval složení FCH. Vliv teploty jsme detailněji nesledovali, protože jsme při běžné laboratorní teplotě 22°C dostávali konstantní výtěžky.

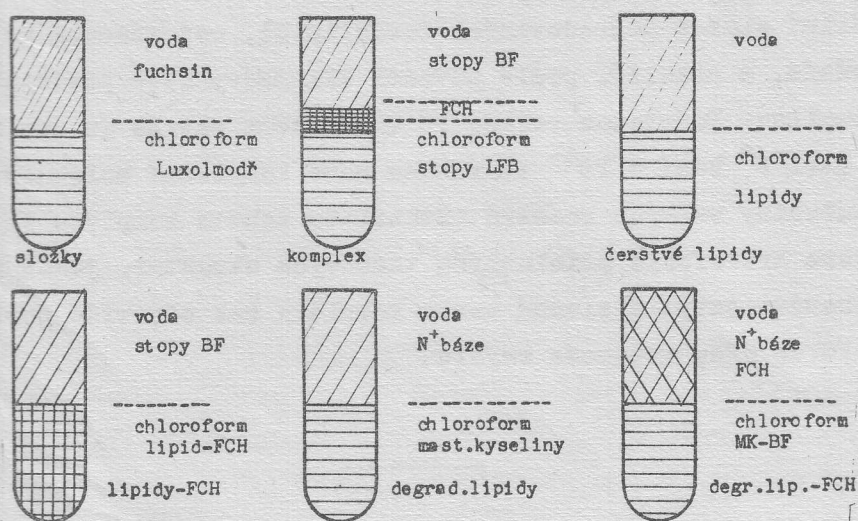
Na základě uvedených výsledků, které korespondují s údaji v literatuře (PEARSE 1960, GURR 1963, HAUSEROVÁ 1958, KOGAN 1960), lze konstatovat, že FCH je molekulární sloučenina rosanilinu (fuchsinu) a aminosoli sulfonovaného mědnatého ftalocyaninu (LFB) s vlastnostmi pigmentu. O jeho vzniku máme zatím tuto hypotézu: FCH vzniká v roztoku interakcí kyselého (LFB) a basického (BF) barviva. Podle MULIKENovy 1951 terminologie bylo by možno tento stav vyjádřit ve smyslu interakce donátoru a akceptoru elektronů (v našem případě BF a LFB), tedy na základě elektrostatických sil, působících mezi těmito opačně nabitými molekulami. Fuchsin (hydrochlorid rosanilinu) ve vodě dissociuje na jednomocný kation BF^+ a anion Cl^- . Snižováním pH dissociují postupně další aminoskupiny, až do celkového počtu tří. BF je tedy jednomocným až (maximálně) trojmocným kationtem (BF^+ až BF^{3+}). Luxolová modř (aminosůl sulfonovaného ftalocyaninu mědi) dissociuje na (aminoalkyl) $^+$ a anion PC^- . Výrobce udává, že molekula LFB obsahuje 1 až 4 sulfoskupiny, proto se v alkalickém pH může LFB stát až čtyřmocným aniontem: PC^- až PC^{4-} . Z těchto důvodů je třeba u obou barviv rozlišovat teoretický a aktuální náboj. Aktuální náboj je pak zcela závislý na stupni disociace NH_2 a SO_3H skupin, tj. na pH prostředí. Výše uvedenou domněnku o iontové povaze

vazby mezi BF a FC podporuje především pozorování bathochromního posunu absorpčních maxim (oproti hypsochromii, způsobené -podle TĚRENINA 1947 a BALHO 1940- pouhou agregací na podkladě Van der Waalsových sil). Dále pak svědčí ve prospěch uvedené hypotézy i korelace mezi složením FCH a stupněm dissociace skupin NH_2 a SO_3H . Nadto naše výsledky korespondují se závěry HAUSEROVÉ 1958. Ze sledování velikosti bathochromního efektu plyne, že největší posun se objevuje při molárním poměru $\text{BF}:\text{FC} = 1:1$, což znamená, že při tomto poměru má FCH komplex nejnižší volnou energii, a je proto nejméně dissociován. Podle MULIKENOVY 1951 teorie o vzniku molekulárních sloučenin se při tomto poměru minimálně vyskytuje polární mezomerní forma komplexu. Tím lze mj. vysvětlit nejvyšší výtěžky izolací právě při tomto poměru. Z předchozího plyne, že aktuální struktura FCH je extrémně závislá na reakčních podmínkách (koncentrace, molární poměry složek, pH). Největší stabilitu vykazuje komplex při poměru $\text{BF}:\text{FC} = 1:1$, kdy také má nejvyšší extinkci ve viditelné oblasti světla. Protože LFB je až 4-mocným aniontem, podrží si při tomto poměru i FCH komplex charakter aniontu (FCH^{3-}), v němž všechny záporné náboje nese molekula FC. Lze si tedy FCH představit jako molekulární iontovou sloučeninu, jednotnou v nepolárním prostředí a dissociovanou na složky v polárním prostředí. Přitom číselný poměr molekul BF a FC v komplexu (a tedy i jeho barva) závisí na poměru dissociace NH_2 a SO_3H skupin. Tato závěrečná představa o struktuře FCH je velmi užitečná pro pochopení dějů, způsobujících zbarvení tkání FCH.

Z histologického pozorování je zřejmé, že FCH barví struktury, vybarvující se též samotnou LFB. To souhlasí s naším předpokladem struktury FCH. Proto lze mluvit o FC-filní substanci ve tkáních, odpovědných i za zbarvení FCH. PEARSE

1960 se na základě pokusů in vitro domnívá, že FC barví specificky fosfolipidy s obsahem cholinu (lecithin, kefaliny, sfingomyelin). Z chemického hlediska pak uvažuje o substituci aminoalkylu LFB za cholin tkáňového fosfolipidu.

V naší laboratoři jsme provedli sérii pokusů in vitro za účelem identifikovat FC-filní substanci. Použili jsme modelově soustavy dvou nemísitelných fází (chloroform - voda) a sledovali distribuci FCH a jeho složek v této soustavě (obr. 2).



Obr. 2. Distribuce komplexu a složek v soustavě voda-chloroform

BF zůstal ve vodní fázi, FC částečně přešel do chloroformu, FCH komplex zůstal na rozhraní fází. Když jsme však v chloroformové fázi rozpustili fosfolipidy (izolované z lidského mozku chloroform-metanolovou extrakcí a přečištěné srážením v acetonu), pak FCH přešel do chloroformu a BF zůstal ve vodní fázi. Nyní jsme zmíněné fosfolipidy podrobili několikanásobně

degradaci na vzduchu a světle při 22°C. Takto degradované lipidy se v uvedené soustavě rozdělily na žlutě zbarvenou část (která zůstala v chloroformu) a na část bělavou (která přešla do vody). Paralelní hydrolyzou lipidů a jejich vytřepáním jsme prokázali, že v chloroformu jsou přítomny mastné kyseliny (reakcí hydroxamátovou), kdežto ve vodní fázi hlavně N-báse (cholin, stanolamin, serin), prokazatelné po srážení kyselinou fosfomolybdenovou. Po přidání FCH do soustavy s degradovanými lipidy zůstal tento ve vodní fázi, zatímco BF přešel do chloroformu. Tím jsme prokázali, že FCH jeví afinitu k hydrofilní složce degradovaných fosfolipidů, což znamená ke všem N-básím, a nikoliv, podle původní PEARSEovy 1960 představy, jen k cholinu. Podstatou reakce FC s N-básemi patrně je vznik vazby mezi N^+ báseí a FC^{4-} za vzniku nové komplexní molekulární sloučeniny velkých rozměrů. Stabilita tohoto komplexu je podpořena hydrofobíí příslušných tkáňových struktur, jakož i povrchovými jevy. Výsledná barva komplexu pak odpovídá poměru BF:FC ve výše uvedeném smyslu.

-
- Baňho E.: Koloidno-chimičeskije osnovy tékstilnoj technologii. - Gizlegprom, Moskva, 1940
- Ehrlich P.: Ztsch. Klin. Med. 1, 553, 1879
- Gurr E.: J. Soc. Dyers Colour. 79, 461, 1963
- Gurr E., McConaill M. A.: J. Roy. Micr. Soc. 79, 353, 1961
- Hauser A.: Physikalisch-chemische Untersuchungen zur zwischenmolekulären Bindung. - Dissertationsarbeit, Würzburg, 1958
- Jenner L.: Lancet I, 370, 1899
- Kodoušek R., Vácha P.: Comm. Czechosl. Soc. Histo-Cytochem. 1, 52, 1966

Kogan J.: Chemie barviv. - SNTL, Praha, 1960

McConaill M. A., Gurr E.: Irish J. Med. Sci. 412, 182, 1960

Mulliken R. S.: J. Chem. Phys. 19, 514, 1951

Pearse A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied. -
Churchil, London, 1960

Soudek D., Nečas O.: Obecná cytologie. - ČSAV, Praha, 1965

Těrentin A. N.: Fotochemie krasitelů. - AN SSSR, Moskva, 1947