ตอนที่ 4
สีย้อม การย้อมสี และการทำสไลด์ถาวร

บทที่ 8
สีย้อม

เค้าโครงเรื่อง

8.1 สีย้อมธรรมชาติ

8.1.1 โคชินีลและคาร์มีน

8.1.2 ฮีมาทอกซิลิน

8.1.3 สีย้อมธรรมชาติชนิดอื่น

8.2 สีย้อมสังเคราะห์

8.2.1 โครงสร้างและธรรมชาติของสีย้อม

(1) เบนซีน

(2) โครโมฟอร์

(3) ออกโซโครม

(4) หมู่ซัลโฟนิก

(5) แอซิด เบสิก และสีย้อมเป็นกลาง

(6) สารประกอบไม่มีสี

8.2.2 ธรรมชาติการทำงานของสีย้อม

8.3 การจำแนกชนิดสีย้อม

8.3.1 หมู่ไนโตร

8.3.2 หมู่ไนโตรโซ (ควิโนนออกซีม)

8.3.3 หมู่เอโซ

8.3.4 หมู่ไทอาโซล

8.3.5 หมู่แอนทราควิโนน

8.3.6 หมู่ควิโนน-อิมีน

8.3.7 หมู่เอริลมีเทน หรือเฟนิลมีเทน

8.3.8 หมู่แซนทีน

สาระสำคัญ

1. สีย้อมธรรมชาติที่ใช้กันแพร่หลายทั้งในอดีตและปัจจุบันคือ ฮีมาทอกซิลิน และคาร์มีนสีย้อมธรรมชาติชนิดอื่นใช้ในกรณีที่ต้องการสาธิตพิเศษ
2. สีย้อมสังเคราะห์ได้มีการพัฒนาเข้ามาใช้แทนสีย้อมธรรมชาติจนเป็นที่แพร่หลาย การสังเคราะห์ เน้นคุณสมบัติหมู่โครโมฟอร์ ซึ่งทำให้เกิดสีแล้วเพิ่มหมู่อื่นเข้าไปเพื่อให้สีย้อมทำงานได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น
3. การจำแนกชนิดสีย้อมยึดหลักการมีหมู่โครโมฟอร์เป็นสำคัญ การตั้งชื่อในปัจจุบันกำกับด้วยชื่อของผู้ผลิตและดัชนีสีด้วย เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดเมื่อมีการนำมาใช้

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกชื่อสีย้อมธรรมชาติและสีย้อมสังเคราะห์ที่ใช้เป็นประจำได้
2. นักศึกษาสามารถเขียนสูตรโครโมฟอร์ในสารสีย้อมที่ใช้เป็นประจำได้
3. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในหนึ่งสัปดาห์

แอนตัน แวน ลีเวนฮอก (Anton Van Leeuwenhoek) ได้ชื่อว่าเป็นคนแรกที่นำเอาแซฟฟรอน (saffron) มาทดลองย้อมกล้ามเนื้อในปี ค.ศ.1714 กอปเพิร์ท และ คอห์น (Goppert and Cohn) ได้ทดลองใช้คาร์มีน (carmine) ในปี ค.ศ.1849 แล้วทดลองนำฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) มาใช้ในปี ค.ศ.1863 จนกระทั่งในปี ค.ศ.1856 จึงมีการนำแอนิลีน ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์มาทดลองใช้เป็นสีย้อม

ในช่วงแรกของการย้อมสีตัวอย่างทางชีววิทยา ยังไม่มีผู้ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมโดยเฉพาะจึงต้องนำสีที่ใช้ย้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอมาใช้ ซึ่งได้ผลไม่ดีนัก จนกระทั่ง ดร.กรับเลอร์ (Dr. Grubler) ชาวเยอรมันได้นำสีย้อมมาดัดแปลงเพื่อใช้งานเพื่อการเป็นสีย้อมทางชีววิทยาแล้วผลิตออกขาย และได้มีการพัฒนาคุณภาพเรื่อยมาจนมีการตั้งคณะกรรมการสีย้อมทางชีววิทยา (Biological Stain Commision) ขึ้นในปี ค.ศ.1922 เพื่อควบคุมส่งเสริมคุณภาพสีย้อมให้ได้มาตรฐานเพื่อใช้ได้ทั่วไปทางด้านการค้า

8.1 สีย้อมธรรมชาติ

สีย้อมธรรมชาติ (natural dye) มีการใช้กันแพร่หลายในช่วงสิ้นของยุคแรก เมื่อรู้จักการย้อมสีทางชีววิทยา ปัจจุบันใช้น้อยเมื่อเทียบกับสีย้อมสังเคราะห์ (synthetic dye) สีย้อมธรรมชาติบางชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีการปรับปรุงคุณภาพและใช้งานได้ดี คือ

8.1.1 โคชินีลและคาร์มีน (cochineal and carmine) เป็นสีย้อมธรรมชาติที่ได้มาจากแมลงโคชินีล (*Coccus cacti*) เป็นแมลงขนาดเล็กอาศัยอยู่บนต้นแคกตัสที่ไม่มีหนาม สารสีม่วงอยู่ในต่อมพิเศษในแมลงเพศเมีย นำแมลงมาตากแห้ง บดให้ละเอียดได้โคชินีล ซึ่งมีคุณสมบัติของสีต่ำมาก เพราะไม่เกาะติดกับเนื้อเยื่อถ้าไม่มีไอออนของโลหะพวกเหล็ก อะลูมินัม หรือโลหะชนิดอื่นปนอยู่ด้วย จึงต้องใช้เกลือของโลหะดังกล่าวมาทำเป็นสารช่วยสีติด (mordant) กับเนื้อเยื่อก่อนการย้อมสีด้วยโคชินีล อะลัมโคชินีลเป็นสีย้อมที่มีสารช่วยสีติดอยู่ในตัวใช้ย้อมสีนิวเคลียสได้ดี คาร์มีนเป็นสีย้อมที่ได้มาจากโคชินีล ทำโดยต้มโคชินีลกับเกลืออะลัม ได้ตะกอน นำตะกอนมาใช้เป็นสีย้อมคาร์มีน ปกติจะไม่ละลายน้ำ เวลาใช้จึงต้องทำให้ละลายน้ำโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกรด เบส หรือละลายในแอลกอฮอล์

8.1.2 ฮีมาทอกซิลีน (hematoxylin) ถือว่าเป็นสีย้อมธรรมชาติชนิดแรกที่รู้จักนำมาใช้และค่อนข้างมีความสำคัญมาก เพราะยังสามารถใช้กันได้แพร่หลายอยู่ในปัจจุบัน ฮีมาทอกซิลินสกัดมาจากแก่นไม้ล้อกวู้ด (logwood) ซึ่งเป็นพืชขึ้นอยู่ทั่วไปในแถบอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และหมู่เกาะเวสท์อินดีส เป็นพืชตระกูลถั่วลักษณะคล้ายพวกกระถินและขี้เหล็กมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hematoxylon campechianum* ประเทศผู้ผลิตส่งออกในรูปของท่อนไม้ ชิ้นไม้ หรือสารสกัดแห้ง ซึ่งต้องนำมาสกัดเอาฮีมาทอกซิลีนออกด้วยอีเทอร์ ด้วยเครื่องมือและวิธีการค่อนข้างจะยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงเป็นสีย้อมราคาค่อนข้างแพง

สีฮีมาทอกซิลินบรรจุขวดยังไม่มีคุณสมบัติของสีย้อม เมื่อจะทำเป็นสีย้อมต้องนำมาออกซิไดส์ให้เป็นสีกรดฮีมาทีน[1] (hematein) ซึ่งทำได้สองวิธีคือ วิธีธรรมชาติโดยให้สัมผัสกับอากาศ 3-6 สัปดาห์ เช่นในกรณีของสีไฮเดนเฮน'ส ฮีมาทอกซิลิน (Heidenhain's hematoxylin) หรืออาจทำโดยการเติมสารมีคุณสมบัติเป็นออกซิไดซิงเอเจนท์เช่น เมอร์คิวริกคลอไรด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ได้เร็วขึ้นดังในการทำสีแฮริส' ฮีมาทอกซิลิน (Harris' hematoxylin) การใช้สีฮีมาทอกซิลินเพียงอย่างเดียว จะติดสีไม่ได้ดีเพราะ ฮีมาทีนมีคุณสมบัติติดสีได้ยาก ถึงแม้จะอยู่ในสภาพกรดก็ตาม จึงจำเป็นต้องใส่สารช่วยสีติด ซึ่งจะทำให้ฮีมาทีนเป็นเบสสามารถมีพันธะกับสารในนิวเคลียสที่เป็นกรดได้ดี

***1. ไม่เกี่ยวข้องกับฮีมาทิน (hematin) ซึ่งเป็นสารสีอยู่ในเม็ดเลือดแดง

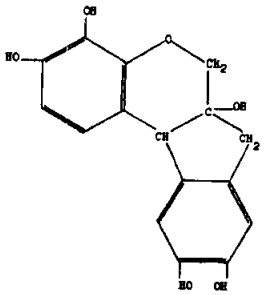
การเตรียมฮีมาทอกซิลินเพื่อใช้เป็นสีย้อมมีหลายวิธี (ดู 12.1) สีที่เตรียมได้มีช่วงสีตั้งแต่ม่วง น้ำเงิน ไปจนถึง น้ำเงิน-ดำ สารช่วยสีติดที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ และนำมาใช้กับฮีมาทอกซิลินมีประโยชน์มากสำหรับการสาธิตการแบ่งเซลล์ เพราะติดสีโครมาตินได้ดี เป็นสีน้ำเงิน-ดำ หรือสีดำ เนื่องมาจากการมีแทนนิน (tannin) อยู่ในฮีมาทอกซิลินด้วย และแทนนินพันธะกับเกลือของเหล็กเป็นสีดำถาวร

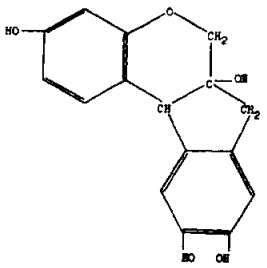
8.1.3 สีย้อมธรรมชาติอื่น ๆ (other natural dyes) นำมาใช้เป็นสีย้อมบ้างในกรณีที่ต้องการความเฉพาะสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อหรือส่วนประกอบบางชนิด ที่นำมาใช้กันมีดังนี้

(1) บราซิลิน (brazilin) ได้มาจากไม้เนื้อแดงของพืชตระกูลถั่วที่เป็นไม้ยืนต้นและไม้พุ่มในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ อยู่ในสกุล *Caesalpinia* สีชนิดนี้คล้ายกับฮีมาทอกซิลิน แต่มีหมู่ไฮดรอกซิลน้อยกว่า ต้องนำมาออกซิไดส์ก่อนจึงจะเป็นสีย้อม และเสียไฮโดรเจนไป 2 อะตอมเช่นเดียวกับฮีมาทอกซิลิน (รูป 11-1)

รูป 11-1 สูตรโครงสร้างของฮีมาทอกซิลินและบราซิลิน สังเกตุหมู่ไฮดรอกซิลของฮีมาทอกซิลินมีมากกว่า

ฮีมาทอกซิลิน ($C_{16}H_{14}O_6 \cdot 3HO$) บราซิลิน ($C_{16}H_{14}O_5$)





(2) ออร์ซีน (orcein) ได้มาจากพืชและไลเคนส์ที่มีกรด เลแคนอริก (lecanoric acid) นำพืชมาต้มจนกรดเลแคนอริกแตกตัวเป็นออร์ซินอล (orcinol) ซึ่งเป็นสารประกอบเรซอซินอล (resorcinol) ที่มีหมู่เมทิลเกาะติดอยู่ ออร์ซินอลรวมกับแอมโมเนียในบรรยากาศได้สารออร์ซีน ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ออร์ซีนขึ้นมาใช้แทนสีธรรมชาติ และมีคุณภาพดีกว่าด้วย ออร์ซีนเป็นสีย้อมที่นิยมใช้เฉพาะการสาธิตเส้นใยอีลาสติก

(3) ลิทมัส (litmus) สกัดได้มาจากไลเคนส์สกุล *Lecanora* และ *Rocella* ใช้เป็นอินดิเคเทอร์ให้สีแดงในสารละลายกรด และสีน้ำเงินในสารละลายเบส

(4) แซฟฟรอน (saffron) ได้มาจากเกสรเพศเมียของดอกแซฟฟรอน (*Crocus sativus*) นำมาตากแห้งและสกัดสารสีเหลืองสดเรียกว่า โครซิน (crocin) ออก

มา สารโครซินอาจสกัดได้จากผลของพืชพวกดอกนุดชนิดหนึ่ง *Gardinia florida*

(5) อินดิโก (indigo) ได้มาจากพืชสกุล *Indigofera*

(6) เบอร์เบรีน (berberine) ได้มาจากพืชพวกบาร์เบอร์รี (barberry)

กิจกรรม 8.1

ดูตัวอย่างสีย้อมธรรมชาติชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ นำดอกอัญชัญ ดอกพู่เรือหงส์ หรือผลมะเกลืออย่างใดอย่างหนึ่งเท่าที่จะหาได้มาบด ละลายน้ำ แล้วทำเป็นสีย้อมผ้าก็อช สังเกตสีย้อมติดผ้าก็อชว่า พืชแต่ละชนิดให้สีใดออกมา

8.2 สีย้อมสังเคราะห์

สีย้อมสังเคราะห์ก็เช่นเดียวกับสีย้อมธรรมชาติที่ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในอุตสาหกรรมสิ่งทอสีย้อมสังเคราะห์ได้เป็นครั้งแรกโดยบังเอิญเมื่อวิลเลียม เพอร์กิน (William Perkin) พยายามสังเคราะห์ควินิน (quinine) แต่กลับมาได้สีแอนิลีน (aniline or coal-tar dyes) ซึ่งได้มาจากภาษาอาหรับ al-nil หมายถึง สารสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสารพื้นฐานของน้ำมันถ่านหิน แอนิลีนให้สีน้ำเงินได้เมื่อฟอกด้วยผงฟอก นับจากนั้นมามีการผลิตแอนิลีน และสีชนิดอื่นขึ้นในเชิงอุตสาหกรรม

การใช้สีย้อมสังเคราะห์ก็เช่นเดียวกับสีย้อมธรรมชาติคือ ใช้แบบก้าวหน้าหรือถอยหลัง สีย้อมเบสิก ถูกล้างออกด้วยสารละลายกรด และสีย้อมกรดถูกล้างด้วยสารละลายเบส ในบางกรณีอาจใช้แอลกอฮอล์เป็นสารดิฟเฟเรนชิเอเทอร์ โดยเฉพาะเมื่อใช้กับสีย้อมเบสิก โดยทั่วไปสารดิฟเฟเรนชิเอเทอร์ที่ดีให้สีคมชัดควรเป็นสารละลายกรด

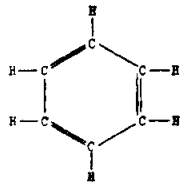
8.2.1 โครงสร้างและธรรมชาติของสีย้อม

ความสำคัญในการเป็นสีย้อมสังเคราะห์อยู่ที่การนำมาใช้ย้อมสีได้เป็นครั้งที่สองหรือครั้งที่สามบนเนื้อเยื่อเดียวกัน ถ้าเนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่งให้สีแตกต่างกันได้หลายสีการย้อมสีเช่นนี้ก็ได้ประโยชน์สำหรับการสาธิตมาก การเลือกสีย้อมที่เหมาะสมจะช่วยให้การย้อมสีมีความสมบูรณ์ทางมิญชวิทยา เพราะความเฉพาะของสีย้อมจะมีพันธะเฉพาะกับส่วนใดส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อเท่านั้น สีย้อมสังเคราะห์ซึ่งมีส่วนประกอบทางเคมีที่ทำขึ้นโดยเฉพาะจึงจะสามารถมีคุณสมบัติตามอุดมการณ์ทางมิญชวิทยาได้ เพื่อให้เกิดความเข้าใจในทางเคมีของสีย้อม จึงควรทราบโครงสร้างของสารประกอบหลักที่มีอยู่ในสีย้อมแต่ละชนิดดังนี้

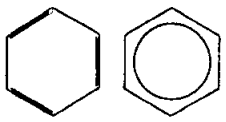
(1) เบนซีน (benzene) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีสูตร C_6H_6 อยู่ในรูปวงหกเหลี่ยมของคาร์บอนอะตอม โดยมีไฮโดรเจนพันธะอยู่ตรงตำแหน่งที่มีเวเลนซีอิสระ เรียกวงนี้ว่าวงเบนซีน (รูป 8-2)

รูป 8-2 โมเลกุลของเบนซีน

เขียนแบบแสดงอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน



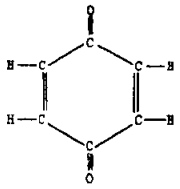
เขียนแบบย่อ



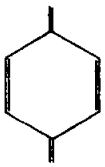
วงเบนซีนมีพันธะคู่ (double bond) ที่สามารถปรับเปลี่ยนตำแหน่งได้ จึงมีความสำคัญในอินทรีย์เคมีโดยมีพันธะกับหมู่หรือธาตุอื่นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นเช่น ถ้ามีออกซิเจน 2 อะตอม เข้ามาแทนที่ไฮโดรเจน 2 อะตอมที่ตำแหน่งตรงกันข้ามของวงเบนซีน จะทำให้เกิดการจัดตั้งใหม่ของวงเบนซีนได้เป็นสารควิโนน (quinone. $C_6H_4O_2$) ซึ่งเป็นสารพวก ควินอยด์ (quinoid) ที่พันธะคู่จะคงที่ ไม่ปรับจัดตัวอีก (รูป 8-3)

รูป 8-3 สูตรโครงสร้างของควิโนน ให้สังเกตตำแหน่งของพันธะคู่ที่ต่างไปจากวงเบนซีน (รูป 8-2)

โมเลกุลของควิโนนเขียนแบบแสดงอะตอมของธาตุ



เขียนแบบย่อ



(2) โครโมฟอร์ (chromophore) สีย้อมสังเคราะห์เป็นอนุพันธ์ของเบนซีน ซึ่งทั้งเบนซีนและอนุพันธ์ไม่มีสีเพราะดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นของอุลตราไวโอเลท แต่ควิโนนดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงปกติ (visible light) จึงมีสีให้เห็นได้

กลุ่มอะตอมของธาตุที่เกี่ยวข้องกับการให้เห็นสีคือ โครโมฟอร์ หมู่โครโมฟอร์โดยทั่วไปจะเป็นเส้น อาจจะอย่างง่าย มีแขนง หรือเป็นวงปิด (ควิโนน) ซึ่งชนิดหลังนี้เรียกว่า ระบบเรโซแนนซ์ (resonance system) สำหรับพวกที่เป็นเส้น ถ้าเส้นยาว จะดูดกลืนแสงช่วงคลื่นยาวได้มาก หมู่โครโมฟอร์ที่สำคัญมีดังนี้

C = C หมู่เอทิลีน (ethylene group)

C = O หมู่คาร์บอนิล (carbonyl group)

C = S หมู่ไทอาซอล (thiazol group)

C = N หมู่ไซยานิค (cyanic group)

N = N หมู่เอโซ (azo group)

N = O หมู่ไนโตรโซ (nitroso group)

NO_2 หมู่ไนโตร (nitro group)

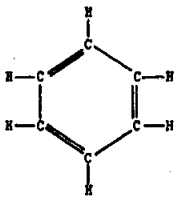
และหมู่ควินอยด์ (quinoid group)

วงควินอยด์เป็นหมู่ที่มีความสำคัญมากหมู่หนึ่งของโครโมฟอร์ สารประกอบที่มีวงควินอยด์เป็นองค์ประกอบจะให้สีเด่นชัด

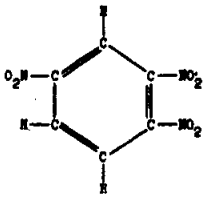
โครโมฟอร์เมื่อมีพันธะกับเบนซีนหรืออนุพันธ์ของเบนซีนได้สารประกอบให้สีได้ เรียกสารนี้ว่า โครโมเจน (chromogen) แต่โครโมเจนยังไม่เป็นสีย้อมเนื่องจากยังไม่มีพันธะกับเนื้อเยื่อ เพียงแต่เข้าไปเคลือบผิวนอกของเนื้อเยื่อไว้เท่านั้น และสามารถดึงออกโดยวิธีกลได้ง่าย

(3) ออกโซโครม (auxochrome) เนื่องจากโครโมเจนยังไม่เป็นสีย้อม จึงจำเป็นต้องทำการเปลี่ยนแปลงต่อไป โดยเติมหมู่ที่มีคุณสมบัติแยกตัวเป็นอิเล็กโทรไลท์ได้[1] (electrolytic dissociation) หรือหมู่ที่มีคุณสมบัติของการเกิดเกลือ แล้วจะเปลี่ยนสารประกอบโครโมเจนให้เป็นสารสีย้อม หมู่ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวนี้เรียกว่า ออกโซโครม ซึ่งมักจะทำหน้าที่กำหนดพร้อมกันไปด้วยว่าสารสีย้อมที่ได้นั้นจะเป็นสีย้อมแอซิดหรือสีย้อมเบสิก เช่น ถ้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอม 3 ตำแหน่งด้วยโครโมฟอร์หมู่ไนโตร 3 หมู่ จะได้สารประกอบไตรไนโตรเบนซีน (trinitrobenezene) ซึ่งเป็นโครโมเจนให้สีเหลือง (รูป 8-4)

รูป 8-4 การเปลี่ยนเบนซีนเป็นไตรไนโตรเบนซีน



เบนซีน



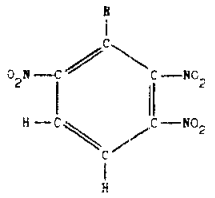
ไตรไนโตรเบนซีน

การทำให้ไฮโดรเจนอะตอมในวงเบนซีนถูกแทนที่ต่อไปอีกด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งทำหน้าที่เป็นออกโซโครม จะเปลี่ยนสารไนโตรเบนซีนมาเป็นกรดพิกริก[2] ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสีย้อม (รูป 8-5) กรดพิกริกรวมกับเบสได้ดีเกิดเกลือและจะติดอยู่ในเส้นใยหรือส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ ดึงออกได้ยาก

***1. แยกออกเป็นแคทไอออนและแอนไอออนในสารละลายที่นำมาใช้

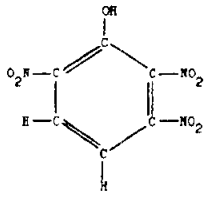
2. กรดพิกริกมีคุณสมบัติเป็นสารทำให้คงสภาพด้วย ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีสีเหลือง ดู 3.1

รูป 8-5 การเปลี่ยนไนโตรเบนซีนเป็นกรดพิกริก



ไตรไนโตรเบนซีน

$(C_6H_3N_3O_6)$



กรดพิกริก

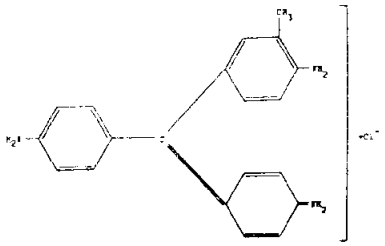
$(C_6H_3N_3O_7)$

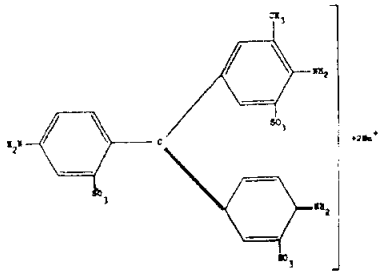
ออกโซโครมมีหลายหมู่ บางชนิดเป็นแอซิดิก เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) และหมู่คาร์บอกซิล ($COOH^-$) สำหรับหมู่เบสิก เช่นหมู่แอมิโน (NH^+_2) และหมู่โครโมฟอร์บางหมู่มีคุณสมบัติเป็นออกโซโครมเล็กน้อย แต่ไม่มีพลังพอที่จะให้คุณสมบัติของสีย้อมได้

(4) หมู่ซัลโฟนิก (sulfonic group) คือ SO_3H เป็นหมู่ที่มีความเป็นกรดและเกิดเกลือได้ดีแต่มีคุณสมบัติเป็นออกโซโครมอย่างอ่อน อย่างไรก็ตามหมู่ซัลโฟนิกมีความสำคัญในทางเคมีของสีย้อม เพราะช่วยให้สีย้อมที่ไม่ละลายน้ำสามารถละลายในน้ำได้ และยังช่วยเปลี่ยนสีย้อมเบสิกให้เป็นสีย้อมแอซิดได้ด้วย เช่นการเติมหมู่ซัลโฟนิกเข้าไปในเบสิกฟุกซิน (basic fuchsin or rosanilin) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นแอซิดฟุกซิน (acid fuchsin) (รูปที่ 8-6)

รูป 8-6 เปรียบเทียบสูตรโครงสร้างเบสิกฟุกซิน (โรซานิลิน) และแอซิดฟุกซิน

เบสิกฟุกซิน $C_{20}H_{20}N_3Cl$ แอซิดฟุกซิน $C_{20}H_{17}N_3O_9S_3Na_2$





สารประกอบที่ได้นั้นมีทั้งหมู่โครโมฟอร์ที่ให้สีและหมู่ซัลโฟนิก แต่ยังไม่เป็นสีย้อมจนกว่าจะมีหมู่ออกโซโครมที่แท้จริงอยู่ด้วย

(5) แอซิด เบสิก และสีย้อมเป็นกลาง (acid, basic and neutral dyes) ศัพท์เทคนิกที่ใช้เรียกแอซิด และเบสิกของสีย้อมไม่เกี่ยวข้องกับ pH (ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน) ของสีย้อมแต่อย่างใด แต่หมายถึงส่วนที่เป็นออกโซโครมของสีย้อมเป็นแอซิด หรือเป็นเบสิก ไม่เกี่ยวข้องกับ pH ของสารละลาย

สีย้อมแอซิด คือสีย้อมที่ส่วนหรือธาตุมูลที่มีสีถูกนำไปติดกับเนื้อเยื่อด้วยแอซิดออกโซโครม ธาตุมูลที่เป็นเบสิกทำหน้าที่เป็นเกลือ สีย้อมแอซิดที่มีขายในตลาดมักเป็นเกลือของโซเดียม เมื่อนำ

มาใช้จะให้ H^+ ทำหน้าที่เป็นแอนไอออน ซึ่งจะมีพันธะกับส่วนประกอบที่เป็นเบสิกของไซโทพลาซึมได้ดี

สีย้อมเบสิก คือสีย้อมที่ส่วนหรือธาตุมูลที่มีสีถูกนำไปติดกับเนื้อเยื่อด้วยเบสิกออกโซโครม สีย้อมเบสิกในตลาดมักอยู่ในรูปของเกลือคลอไรด์ เมื่อนำมาใช้จะได้ OH^- ทำหน้าที่เป็นแคทไอออน ซึ่งจะมีพันธะกับส่วนประกอบที่เป็นแอซิด เช่น กรดนิวคลีอิก จึงใช้ย้อมสีนิวเคลียสและส่วนประกอบของนิวเคลียสได้ดี

สีย้อมเป็นกลาง เตรียมจากการผสมสารละลายสีย้อมแอซิด และเบสิกเข้าด้วยกันเกิดตะกอน ซึ่งเป็นตะกอนของสีย้อมเป็นกลางที่มีส่วนให้สีทั้งแอซิดและเบสิกอยู่ด้วยกัน เช่น สีเจมซา(Giemsa's stain) ซึ่งใช้ย้อมโครงสร้างของกรด (acidophilic) และของเบส (basidophilic) ที่มีอยู่ในเซลล์และเนื้อเยื่อไปพร้อมกัน สีย้อมเป็นกลางให้สีต่างไปจากสีย้อมแอซิดและเบสิกที่ใช้ย้อมแต่ละครั้ง โดยทั่วไปสีย้อมเป็นกลางไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ นิยมใช้ย้อมสีเม็ดเลือดและแบคทีเรีย

(6) สารประกอบไม่มีสี (leuco-compound) สีย้อมบางชนิดอาจถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สารไม่มีสีที่ได้เรียกว่าสารประกอบไม่มีสี

หมู่โครโมฟอร์ถึงแม้จะมีความต่างกันแต่มีสิ่งที่เหมือนกันอยู่อย่างหนึ่งคือ ถูกรีดิวซ์ได้ง่าย กล่าวในทางเคมีคือ มีพันธะกับไฮโดรเจนได้ยาก

ในพวกวงควินอยด์ พันธะคู่อาจถูกทำลายแล้วปล่อยไฮโดรเจนอะตอมออกมา ซึ่งจะไปพันธะกับเวเลนซีอิสระ พันธะระหว่างไนโตรเจนอะตอมในหมู่เอซินอาจถูกทำลาย แล้วมีไฮโดรเจนสองอะตอมเข้าไปจับหรือในหมู่ไฮโดรเจนอาจถูกรีดิวซ์ได้เป็นหมู่เอมิโน เมื่อโครโมฟอร์ถูกทำลาย คุณสมบัติการให้สีก็ถูกทำลายด้วย จึงใช้คำว่าไม่มีสีนำหน้าสารประกอบที่โครโมฟอร์ถูกทำลายแล้ว

ในภาวะที่เหมาะสมเมื่อมีการออกซิไดส์ สารประกอบเหล่านี้จะถูกทำให้คืนสภาพเดิม การให้สีก็กลับคืนมาอีกครั้งหนึ่ง

สีย้อมเบสิกบางชนิดเปลี่ยนเป็นสารไม่มีสีเมื่อมีการเสียอนุมูลกรดจึงถูกเรียกว่า ลิวโคเบส (leuco-base) ในทำนองเดียวกัน สีย้อมแอซิดบางชนิดเปลี่ยนเป็นสารไม่มีสีเมื่อโครโมฟอร์ถูกสลายในระหว่างการจัดตัวของอะตอมช่วงที่มีการทำให้เป็นกลาง สารประกอบดังกล่าวมีประโยชน์มากในการทำเป็นอินดิเกเทอร์เพื่อวัด pH เพราะปฏิกิริยาสามารถย้อนกลับได้ง่าย

สีย้อมเบสิกที่ถูกสลายได้ลิวโค-เบส เกิดขึ้นในพวกที่มีหมู่เอริลมีเทน (arylmethane group) ของสารในพวกไตรเฟนิลมีเทน (triphenyl methane) เมื่อโมเลกุลจัดตัวใหม่ในระหว่างการทำให้เป็นกลาง ผลที่ได้จะไม่เป็นสีย้อมเบสิกที่แท้จริง แต่จะเป็นสารประกอบที่เรียกว่าคาร์บินอล (carbinol) ซึ่งไม่มีโครโมฟอร์หลงเหลืออยู่ สารคาร์บินอลมีความสำคัญในแง่เป็น

สารตัวกลาง สำหรับการเตรียมสีย้อม และมักจะเรียกกันว่า คาร์บินอลเบส หรือสีเบสของสีย้อมเฟนิลมีเทน

8.2.2 ธรรมชาติการทำงานของสีย้อม

นักชีววิทยาและนักชีวเคมีมีความเห็นไม่ตรงกันเกี่ยวกับธรรมชาติการทำงานของสีย้อม (nature of staining acting) ว่าจะเป็นแบบเคมี ฟิสิกส์ หรือทั้งสองแบบรวมกัน ถ้าเป็นแบบเคมีส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นกรดจะรวมตัวกับแคทไอออน และส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นเบสจะรวมกับแอนไอออน การดูดกลืนและการแพร่กระจายของสีย้อมจะเกิดขึ้นโดยการซึมผ่านเข้าไปในส่วนประกอบของเซลล์เพื่อการรวมตัวและมีพันธะอยู่ที่จุดนั้น การทำงานน่าจะมีส่วนร่วมในทางฟิสิกส์ด้วย โดยมีการดูดกลืนสีย้อม การดึงดูดระหว่างประจุบวกและลบ และการที่สีย้อมรวมกันอยู่บริเวณผิวของเซลล์ ถ้ามีอนุภาคเล็กและบางส่วนอาจถูกเลือกดูดกลืนเข้าไปรวมกับส่วนประกอบภายในของเซลล์และเนื้อเยื่อ สารประกอบพวกโปรตีน กรดนิวคลีอิก และส่วนประกอบอื่นของโพรโทพลาซึมทำงานตามกลไกทางเคมี โดยการแลกเปลี่ยนไอออนกัน ความสับสนอยู่ที่คำว่าการดูดกลืน อาจมีกลไกทางฟิสิกส์หรือเคมี เพราะสารดูดกลืนสามารถทำให้เกิดไอออนแล้วเข้าสู่กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนทางเคมีได้

อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติของการเป็นสีย้อมและการย้อมสีขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้

(1) ความแรงของสีย้อม (strength of dye)

(2) อัตราการแตกตัวของไอออนของโปรตีนในเนื้อเยื่อ และของสีย้อม

(3) ค่า pH ของสารละลายสีย้อมของโปรตีนในเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้การย้อมสียังได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมอื่น คือ

(1) สีย้อมอยู่ในสารละลายที่เป็นน้ำหรือแอลกอฮอล์

(2) อุณหภูมิขณะทำการย้อมสีต่ำหรือสูง

(3) สีย้อมที่ใช้เป็นชนิดเดียวอย่างง่ายหรือเป็นสีย้อมผสม

(4) สารละลายสีย้อมที่ใช้เข้มข้นหรือเจือจาง

กิจกรรม 8.2

ให้นักศึกษาอ่านตำราอินทรีย์เคมีเรื่องเกี่ยวข้องกับ กรด เบส การเป็นกลาง รวมทั้งศึกษาสูตรโครงสร้างของเบนซีน และอนุพันธ์ของเบนซีน เพื่อจะได้สามารถเขียนสูตรโครงสร้างของสีย้อมในข้อ 8.2.1 ได้

8.3 การจำแนกชนิดสีย้อม

ถึงแม้ว่าจะมีการจำแนกสีย้อมออกเป็นสีธรรมชาติและสีย้อมสังเคราะห์แล้วก็ตาม แต่ยังไม่เป็นการเพียงพอโดยเฉพาะสำหรับสีย้อมสังเคราะห์ จึงจำเป็นต้องจำแนกโดยยึดโครงสร้างทางเคมีเป็นหลัก โดยดูที่หมู่โครโมฟอร์ที่มีอยู่ในสีย้อมชนิดนั้น ซึ่งอาจมีหนึ่งหมู่หรือมากกว่า สีย้อมที่นักชีววิทยาใช้กันอยู่เป็นประจำ มีอยู่ 8 ชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบของโครโมฟอร์ต่อไปนี้อย่างน้อยหนึ่งหมู่ คือ (1) หมู่ไนโตร (nitro group) (2) วงควินอยด์เบนซีน (quinoid benzene ring) (3) หมู่เอโซ (azo group) (4) หมู่เอซิน (azin group) และ (5) หมู่อินเดมีน (indamine group)

8.3.1 หมู่ไนโตร (nitro group) สีย้อมในหมู่นี้เป็นกรดทั้งหมด เนื่องจากมีโครโมฟอร์ $-NO_2$ ซึ่งเป็นกรดแก่

8.3.2 หมู่ไนโตรโซ หรือ ควิโนนออกซีม (nitroso group or quinoneoxime) สีย้อมในกลุ่มนี้เตรียมมาจากการใส่กรดไนตรัสเข้าไปในสารประกอบฟีนอลได้เป็นไนโตรโซฟีนอล ซึ่งต่อกับวงเบนซีนโดยมีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับควิโนนออกซีม ต่างกันที่การจัดตัว จึงเชื่อว่ามีการทำงานเช่นเดียวกับควิโนนออกซีมซึ่งเป็นสีย้อม โดยมีวงควิโนนเบนซีนทำหน้าที่เป็นโครโมฟอร์

8.3.3 หมู่เอโซ (azo group) โครโมฟอร์คือ -N=N- ซึ่งไปต่อกับวงเบนซีนหรือแนฟทาลีน (naphthalene) เนื่องจากมีหมู่เอโซได้มากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุลของสีย้อม จึงมีหมู่ย่อยเรียกตามจำนวนหมู่เอโซเป็น สองเอโซ (disazo) สามเอโซ (triazo) และหลาย ๆ เอโซ (polyazo) เอโซโครโมฟอร์เป็นเบสแต่ไม่แข็งแรงพอจะทำให้เป็นสีย้อมเบสิก ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในสีย้อมด้วย สีย้อมหมู่เอโซถ้ามีหมู่แอมิโนอยู่ด้วยจะเป็นสีย้อมเบสิกอย่างแรง

8.3.4 หมู่ไทอาโซล (thiazole group) เป็นกลุ่มสีย้อมที่มีอยู่น้อยชนิด มีหมู่อินเดมีน -N= เป็นโครโมฟอร์

8.3.5 หมู่แอนทราควิโนน (anthraquinone group) สีย้อมในหมู่นี้รวมอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene) ซึ่งถูกออกซิไดส์ได้โครโมเจนแอนทราควิโนน แล้วทำให้เป็นสีย้อมโดยเติมหมู่ไฮดรอกซิลเข้าไป สีสองชนิดในกลุ่มนี้เป็นสีย้อมธรรมชาติซึ่งได้มาจากรากของพืชแมดเดอร์[1] (madder)

8.3.6 หมู่ควิโนน-อิมีน (quinone imine group) สีย้อมในกลุ่มนี้มีโครโมฟอร์สองชนิด คือ อินเดมีน -N= และวงควิโนนเบนซีน

***1. พืชชนิดหนึ่งที่รากมีสีแดงสามารถนำมาสกัดเอาสารสีแดงมาทำเป็นสีย้อมได้

8.3.7 หมู่เอริลมีเทน หรือเฟนิลมีเทน (arylmethane or phenylmethane group) โครโมฟอร์ในหมู่นี้คือ C=NH มีพันธะต่อกับวงเบนซีนได้เป็นโครโมเจนการเป็นสีย้อมต้องเติมหมู่แอลคิลแอมิโน (alkylamino group) เข้าไปที่ตำแหน่งพารา (para) กับมีเทนคาร์บอนวงเบนซีนทั้งสองวง สีย้อมในกลุ่มนี้อาจเป็นแอซิดหรือเบสิกก็ได้ขึ้นอยู่กับหมู่ออกโซโครมที่มีอยู่ในสารประกอบ

8.3.8 หมู่แซนทีน (zanthene group) สีย้อมในกลุ่มนี้ได้มาจากสารประกอบแซนทีน มีทั้งชนิดที่เป็นแอซิดและเบสิก

สีย้อมอาจให้เอกลักษณ์โดยการตั้งชื่อและดัชนีสี (C.I.) สมาคมผู้ผลิตสีย้อมและสารสีแห่งอังกฤษได้ร่วมมือกับสมาคมสิ่งทอและสีของอเมริกาได้ตั้งระบบดัชนีสีเป็นตัวเลข 5 ตำแหน่ง โดยมีช่องว่างแต่ละหมู่ไว้สำหรับใช้กับสีที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่

ปัญหาในการให้เอกลักษณ์ของสีย้อมเนื่องมาจากสีชนิดเดียวกันแต่มีชื่อเรียกหลายชื่อ เพราะในสมัยต้น ผู้ผลิตสนใจแต่ผลิตภัณฑ์ของตนเอง จึงตั้งชื่อตามใจชอบ โดยไม่สนใจว่าผู้ผลิตรายอื่นตั้งชื่อว่าอย่างไร จึงเกิดการสับสน ดังนั้น เมื่อใช้ชื่อสีย้อมควรบ่งด้วยว่าตั้งโดยผู้ใด (ถ้าทราบ) ตามด้วยดัชนีสี

กิจกรรม 8.3

ให้นักศึกษานำขวดสีย้อมในตู้เก็บในห้องปฏิบัติการดังต่อไปนี้ คาร์มีน เอโซคาร์มีน เบสิกฟุกซิน แอซิดฟุกซิน แฮริสฮีมาทอกซิลิน อีโอซีน มาลาไคท์กรีน (malachite green) มาศึกษาสูตรโครงสร้างแล้วหาหมู่โครโมฟอร์ของสีย้อมเหล่านี้ พร้อมทั้งเปรียบเทียบดัชนีสีย้อมด้วยว่าสีหมู่โครโมฟอร์ใดมีดัชนีเป็นอย่างไร

สรุป

สีย้อมที่ใช้ในทางมิญชวิทยา มีทั้งสีย้อมธรรมชาติและสีย้อมสังเคราะห์ การเลือกใช้ต้องศึกษาจากหมู่โครโมฟอร์ และโครงสร้างอื่นของสารสีย้อม เพื่อให้มีพันธะกับเซลล์และเนื้อเยื่อให้ดีที่สุด การใช้แต่ละครั้งต้องแน่ใจว่าใช้สีย้อมได้ถูกต้อง โดยดูดัชนีสีด้วย

แบบฝึกหัดที่ 8

1. จงบอกชื่อสีย้อมธรรมชาติที่ใช้อยู่จนถึงปัจจุบันว่ามีอะไรบ้าง แต่ละชนิดได้มาจากอะไร
   (ตอบ : ดู 8.1.1 และ 8.1.2)
2. สีย้อมสังเคราะห์มีธรรมชาติในการทำงานอย่างไร
   (ตอบ : ดู 8.2.2)
3. สีย้อมสังเคราะห์มีหมู่ ..... แตกต่างกัน เช่นหมู่เอทิลีน หมู่คาร์บอนิล เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การดูดกลืนช่วงคลื่นแสงช่วงยาวได้ดี หมู่เหล่านี้ต้อง .....ด้วย
   (ตอบ : ดู 8.2 (2))
4. ขั้นตอนการผลิตสีย้อมสังเคราะห์ที่สมบูรณ์นั้น สารสีย้อมต้องประกอบด้วย..... และ ..... ส่วนจะมีหมู่อื่นหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับว่าสีย้อมเหล่านั้นมีความเป็น..... หรือเบสิก แล้วหรือไม่
   (ตอบ : ดู 8.2 (2), 8.2 (3) และ 8.2(5))
5. สีย้อมเจมซา'ส เป็นสีย้อมชนิดใด
   1. สีย้อมแอซิด
   2. สีย้อมเบสิก
   3. สีย้อมเป็นกลาง
   4. สารประกอบไม่มีสี
6. สารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ทำให้คงสภาพและเป็นสีย้อมไปในตัวด้วยคือสารใด
   1. แอซิดฟุกซิน
   2. กรดพิกริก
   3. โรซานิลิน
   4. ควินอยด์เบนซีน
7. การจำแนกชนิดของสีย้อมยึดอะไรเป็นหลัก
   1. หมู่ควิโนนเบนซีน
   2. หมู่เอโซ
   3. หมู่แซนทีน
   4. หมู่โครโมฟอร์
8. สีย้อมที่เป็นแอซิดมีความเฉพาะในการย้อมสีส่วนประกอบใดของเซลล์และเนื้อเยื่อ
   1. นิวเคลียส
   2. ไซโทพลาซึม
   3. เซลล์ออร์แกเนลล์
   4. ไซโทพลาสมิกอินคลูชัน

   (ตอบ : ข้อ 5 ตอบ 3, ข้อ 6 ตอบ 2, ข้อ 7 ตอบ 4, ข้อ 8 ตอบ 2)