

Sborník Československé společnosti histo- a cytochemické
při ČSAV

Communications of The Czechoslovak society for histochemistry
and cytochemistry

Vol. 1

1966

Chemie dithioničitého leukofuchsinového činidla

P. Vácha,^x R. Koďousek^x

Nejznámější a nejpoužívanější reakcí k průkazu aldehydů je reakce se Schiffovým činidlem, tj. reakce mezi odbarveným fuchsinem (F) a aldehydickou skupinou, při níž vzniká zbarvení rozdílné od původní barvy F. K přípravě Schiffova činidla se dosud používalo jen různých forem siřičitanového iontu (SCHIFF 1865, 1866, 1867; GAYON 1887, CROCKER 1927, de TOMASSI viz PEARSE 1960, de LAMATER viz PEARSE 1960), zejména použitím plynného SO_2 , což je metoda relativně zdlouhavá. Proto byla v naší laboratoři vyzkoušena nová modifikace činidla (KOĐOUSEK 1965), v němž na rozdíl od výše uvedených postupů se při odbarvení fuchsinu dithionitem ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) uplatňuje ve dle iontu bisulfitového zejména ion sulfoxylový. Vzhledem k tomu dochází k odbarvení F již během několika málo vteřin, takže možnost použití našeho činidla je bezprostřední.

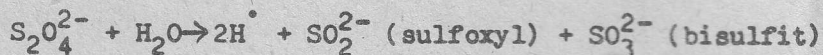
Při sledování chemické povahy našeho činidla se ovšem nevyhneme celému komplexu otázek. Přes velké praktické použití reakce aldehydů se Schiffovým činidlem není její detailní průběh totiž dosud uspokojivě objasněn. Původní schéma WIELANDA a SCHEUINGA 1921 bylo v některých bodech opraveno HÖRMANNEM 1951 a NAUMANNEM 1960, jiné detaily nejsou dosud známy vůbec. V naší práci chceme na příkladu vlastního dithioniči-

^x Histochemická laboratoř, Ústav patologické anatomie lékařské fakulty Palackého university, Olomouc

tého činidla Schiffova typu podat hrubý nárys současných vědomostí. Z tohoto hlediska lze celou tuto problematiku schématicky rozdělit na tyto dva celky:

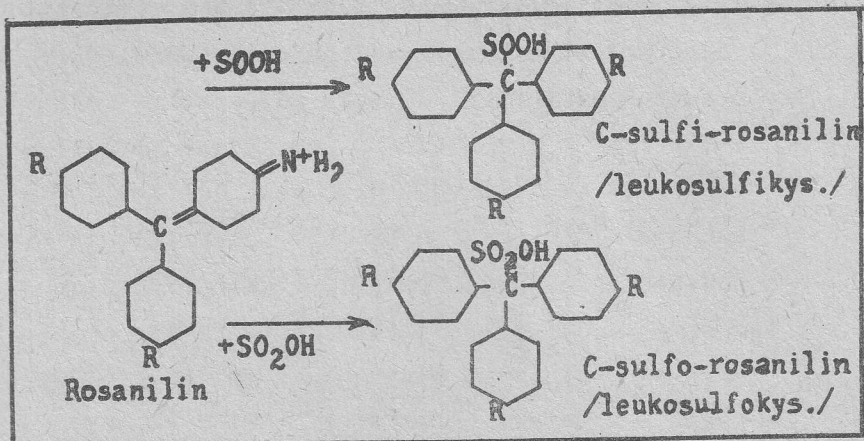
- a) odbarvení fuchsinu, tj. příprava Schiffova činidla;
- b) reakce Schiffova činidla s aldehydem.

Mechanismus odbarvení je poměrně jednoduchý. Fuchsin (směs rosanilinu a pararosanilinu) patří mezi aminotrifenylní metanová barviva (ATFMB). V této skupině syntetických barviv zastává úlohu chromoforu chinoidní struktura jednoho z fenylů, auxochromem jsou aminoskupiny (AMS) v počtu 1 až 3 (v případě F jsou 3). ATFMB přecházejí poměrně snadno ze stavu barevného do stavu bezbarevného vlivem fyzikálních i chemických faktorů. Ztráta barevnosti je vždy vázána na ztrátu chinoidní struktury, způsobenou obsazením všech čtyř valencí centrálního uhlíku (KOGAN 1960). Lze tedy F teoreticky odbarvit každým nukleofilním činidlem, tj. takovým činidlem, které je schopno addovat zmíněnou čtvrtou valenci. V praxi se používá zejména různých forem siřičitanového iontu. V naší nové modifikaci je situace složitější, protože dithionit ve vodě disociuje na ion bisulfitový (sulfitový) a sulfoxylový:



Oba ionty jsou silnými nukleofilními činidly (sulfoxyl je silnější), a proto rychle odbarvují F.

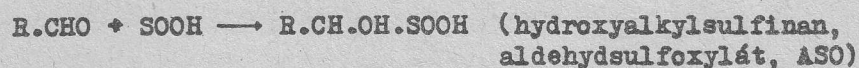
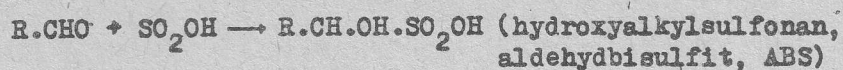
Adiční reakcí vznikají z F jeho C-sulfo (sulfi) deriváty (WIELAND a SCHEUING 1921), případně jejich směs:



Tyto podléhají na vzduchu oxydaci ve směru sulfoxyl $\rightarrow$ sulfit $\rightarrow$ sulfát (REMY 1958). Kromě toho vzniká v činidle stálým plynný SO_2 , který postupně vyprchá. Těmito degradačními pochody činidlo po určité době stárne.

Reakce Schiffova činidla s aldehydem je objasněna podstatně méně. Zdá se, že je nutno předpokládat průběh několika reakcí po sobě, přičemž výsledný produkt jedné reakce je výchozím produktem pro reakci následující.

1) Reakce sulfo(sulfi)akupiny s aldokupinou:



Produkty této reakce (ABS, ASO) jsou bezbarvé (LUKEŠ 1962).

2) V důsledku uvolnění valence C (uhlík karbonylu je méně nasycený než centrální uhlík barviva, proto i afinita nukleofilní skupiny k němu je vyšší) nastává substituce chinoidní struktury a tedy návrat k barevnosti.

3) Zároveň reaguje produkt reakce /1/ (ABS, ASO) s dusíkem AMS (WIELAND a SCHEUING 1921). Charakter vzniklé

vazby není zcela jasný. Může jít buď o vazbu iontovou (mezi kationtem barviva a aniontem ABS-ASO), nebo o vazbu kovalentní. Ta opět může vznikat mezi dusíkem AMS a kyslíkem ABS/ASO/ - pak vzniká amid kyseliny sulfonové (sulfinové), nebo mezi dusíkem AMS a uhlíkem ABS/ASO/ - pak je produktem derivát kyseliny aminooxysulfonové (sulfinové) (NAUMAN 1960). Ve všech případech je výsledkem alkylace-arylace AMS, což se projeví jako změna zbarvení ve smyslu prohloubení (bathmochromie): červená → červenofialová → modrofialová → modrá.

Významným problémem je specifická Schiffova činidla. V úvahu připadají tyto dvě otázky:

- 1) Co je v činidle specifickou složkou.
- 2) Zda činidlo reaguje i s jinými funkčními skupinami, s kterými a jak.

Na první otázku jsme v podstatě odpověděli (viz reakce 1). Vlastní specifickou reakcí je patrně reakce sulfo(sulfi) skupin s aldorskupinou, při níž vzniká bezbarvý ABS(ASO). Změna zbarvení F je sekundární (i když nám slouží jako indikátor reakce první) a odpovídá reakci ABS(ASO) s dusíkem AMS. V této souvislosti je zajímavá otázka zaměnitelnosti F jinými ATFMB. Oproti jiným autorům (FEIGL 1954) se na základě našich pokusů domníváme, že k reakci lze použít pouze ATFMB s volnými AMS (rosanilin, pararosanilin, Döbnerova violet). Ostatní ATFMB specifické zbarvení nedávají.

Pokud jde o specifickou Schiffova činidla k aldehydům, potvrzují údaje v literatuře (GOMORI 1950) i zkušenosti vlastní, že výsledná barva je různá jak u různých aldehydů, tak i u různých modifikací činidla. Vizualně i spektrofotometricky lze rozlišit nejméně tyto tři barevné typy:

Zbarvení
vínové
červenono
modrofial
Některé
kací Schiffo

Aldehyd
formaldehyd
acetaldehyd
benzaldehyd
salicylaldehyd

Z uvede
specifická
nespecifická
Schiffovo čin
kyselinami.
aldehydů. R
ostatních.
barvu (se s
statujeme,

a) na
jiných funk

b) na
aryl, délka

c) na
filie).

Celý
takto:

Zbarvení	Abs.max.(mμ)	Nukleofil.sk.	Specifičnost
vínově červ.	500	H ⁺ , HX	nespecif.
červonofial.	530	Na ₂ SO ₃	specif.
modrofialové	550	Na ₂ S ₂ O ₄	specif.

Některé výsledky reakcí jednotlivých aldehydů a modifikací Schiffova činidla jsou uvedeny v tomto přehledu:

Aldehyd	H ⁺ , HX	H ₂ S	Bisulfit	Dithionit	Rongalit
formaldehyd	vín. č.fial.	č.fial.	m.fial.	n.fial.	
acetaldehyd	vín.	0	č.fial.	m.fial.	modrá
benzaldehyd	vín.	0	zákal	m.fial.	modrá
salicylaldehyd	vín.	0	0	modrá	modrá

Z uvedeného přehledu je zřejmé, že existují nejméně dvě specifická (červonofialové a modrofialové) zbarvení a jedno nespecifické (vínově červené) zbarvení. Nespecificky reaguje Schiffovo činidlo s ketony, alkoholy, některými karbonovými kyselinami. Dále je patrný rozdíl mezi reakcemi ali- a arylaldehydů. Reakce formaldehydu se pak liší od všech reakcí ostatních. Konečně lze sledovat vliv nukleofilní skupiny na barvu (se stoupající nukleofilí se barva prohlubuje). Konstatujeme, že výsledné zbarvení závisí:

a) na přítomnosti aldehydické skupiny či na přítomnosti jiných funkčních skupin (OH, CO, COOH);

b) na vlastnostech molekulového zbytku aldehydu (ali, aryl, délka řetězu);

c) na vlastnostech použité nukleofilní skupiny (nukleofilie).

Celý průběh reakce lze schématicky znázornit takto:

Nukleofil.sk.	Produkt	Výsl.barva
	r.s fuchsinem	r.s aldehydem
$\begin{array}{c} \text{S}_2\text{O}_4^{2-} \\ \downarrow \\ \text{SOOH} \end{array}$	C-sulfider.F.	aldehydsulfoxylát
$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
$\begin{array}{c} + \\ \text{SO}_2\text{OH} \end{array}$	C-sulfoder.F.	aldehydbisulfit
$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
SO_3OH	trojsůl F.	?
		vín.červ.

Závěrem lze vyzvednout zejména tu okolnost, že Schiffovo činidlo skrývá vzhledem ke komplikovanosti jisté nebezpečí pro interpretaci výsledků. Pozitivitu či negativitu reakce lze spolehlivě hodnotit spektrofotometricky. Reakce není použitelná pro kvantitativní sledování aldehydů; kvalitativní průkaz je jenom skupinový - jednotlivé aldehydy nelze rozlišit. Konečně je třeba poukázat na velké množství používaných modifikací Schiffova činidla, což sotva zaručuje dobrou srovnatelnost výsledků.

Literatura

- Crocker J.: Z. anal. Chem. 71, 210, 1927
 Feigl F.: Spot tests. - Elsevier, Amsterdam 1954
 Gayon M. U.: Compt. rend. Acad. Sci. 105, 1182, 1887
 Gomori G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 50, 968, 1950
 Göhring L.: Z. anorg. allg. Chem. 253, 304, 1947
 Börmann F.: Ann. 616, 125, 1951
 Kastning E.: Über die Einwirkung von Bisulfit und Dithionit auf Nitro- und Nitrosoverbindungen. - Inaug. Dissert., Univ. Würzburg 1954
 Kočousek R.: Acta histochemica 21, 150, 1965
 Kogan J.: Chemie barviv. - SNTL, Praha 1960 (překlad z ruštiny)
 Lukeš R.: Organická chemie II. - ČSAV, Praha 1962.