

305. Richard Kuhn und Karl Schön: Pyocyaninium-perchlorat.

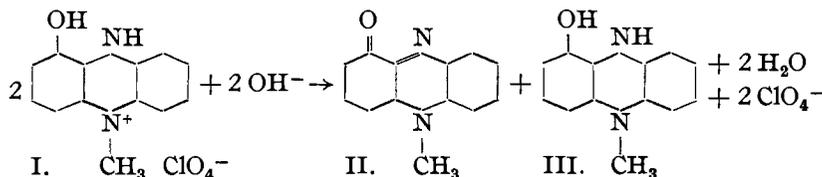
[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg,
Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 29. Juni 1935.)

Der blaue Farbstoff des *Bacillus pyocyaneus*, das Pyocyanin, ist von F. Wrede und E. Strack¹⁾ als Phenazin-Derivat erkannt und durch Synthese leicht zugänglich gemacht worden. E. Friedheim und L. Michaelis²⁾, sowie B. Elema³⁾ fanden, daß in saurer Lösung die roten Salze über eine grüne Zwischenstufe hinweg zur farblosen Leuko-Verbindung reduziert werden. Auf Grund potentiometrischer Titrations kamen sie übereinstimmend zu der Schlußfolgerung, daß die tiefarbige Zwischenstufe ein Radikal mit unpaarer Elektronen-Zahl ist. Dieses Radikal war bisher nur in Lösung bekannt. Wir konnten es in festem Zustand als Perchlorat isolieren, indem wir Leuko-pyocyanin mit Chlortetroxyd in ätherischer Lösung umsetzten. Die Bildung von Radikal-Salzen (Aminiumsalzen) aus tertiären Aminen und Chlortetroxyd (ClO_4) ist von E. Weitz⁴⁾ entdeckt worden. Das nach seinem Verfahren gewonnene Radikal-Salz des Pyocyanins soll daher als Pyocyaninium-perchlorat bezeichnet werden.

Das Pyocyaninium-perchlorat stellt, frisch gefällt, ein moosgrünes bis schwarzgrünes, mikro-krySTALLINES Pulver dar, das unter gekreuzten Nicols Auslöschung erkennen läßt. Es gelang nicht, das in fast allen organischen Lösungsmitteln äußerst schwer lösliche Salz ohne Zersetzung umzukrySTALLISIEREN. Die von uns isolierten Präparate waren auch im festen Zustande nicht sehr haltbar. In 50-proz. Schwefelsäure löst sich das Pyocyaninium-perchlorat mit grüner Farbe; hat es sich zersetzt, so ist die Lösung in 50-proz. Schwefelsäure rot wie diejenige von Pyocyanin in demselben Lösungsmittel.

Die vorliegenden Elementar-Analysen stimmen auf die Formel $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{ClO}_5$, vermögen aber natürlich nicht über die Radikal-Natur zu entscheiden. Durch Titration mit Natrium-stannit gelingt der Nachweis, daß das Pyocyaninium-perchlorat genau „halbchinoid“ zusammengesetzt ist. Durch verd. Alkali erfolgt unter reinem Stickstoff zunächst Disproportionierung: 2 Mole Radikal-Salz⁵⁾ (I) geben genau 1 Mol Pyocyanin (II) und 1 Mol Leuko-pyocyanin (III):



Läßt man Luft Zutreten, so geht auch die Leuko-Verbindung in Pyocyanin über: die Farbstärke und die zur Entfärbung nötige Stannit-Menge, die wieder

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **140**, 1 [1924], **142**, 103 [1925], **177**, 177 [1928], **181**, 58 [1928]; B. **62**, 2051 [1929].

²⁾ Journ. biol. Chem. **91**, 355 [1931]; L. Michaelis, Journ. biol. Chem. **92**, 211 [1931].

³⁾ Rec. Trav. chim. Pays-Bas **50**, 807 [1931].

⁴⁾ E. Weitz u. H. W. Schwachten, B. **59**, 2307 [1926].

⁵⁾ In Formel I ist der Sitz der positiven Ladung unbewiesen.

unter reinem Stickstoff bestimmt wird, verdoppeln sich. Beweisend für die Radikal-Natur ist der Paramagnetismus des von uns isolierten Salzes. Die magnetischen Messungen sind durch Hrn. H. Katz⁶⁾ ausgeführt und bereits mitgeteilt worden. Daß die gefundene Magnetonen-Zahl hinter derjenigen anderer Aminiums Salze, die zum Vergleich dienten, etwas zurückblieb, ist bei der Zersetzlichkeit des Pyocyaninium-perchlorats nicht unerwartet.

Die monomolekulare Formel II des Pyocyanins, die aus der Analyse der Titrations-Kurven abgeleitet wurde (L. Michaelis) stand nicht in Einklang mit direkten Molekulargewichts-Bestimmungen, nach denen der Farbstoff dimolekular zu sein schien¹⁾⁷⁾. Nach den im Versuchs-Teil mitgeteilten Messungen der Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser und in Benzol, die Hr. E. Valkó die große Freundlichkeit hatte, auszuführen, ist das Pyocyanin in den genannten Lösungsmitteln monomolekular. Diese und die magnetischen Messungen bestätigen somit beide Schlußfolgerungen, die aus der Analyse der Redox-Potentiale gezogen wurden: die Radikal-Natur der grünen Zwischenstufe und den monomolekularen Zustand des blauen Farbstoffes.

Beschreibung der Versuche.

Pyocyaninium-perchlorat.

Das als Ausgangsmaterial dienende Leuko-pyocyanin wurde dargestellt: 1) Durch katalytische Hydrierung von Pyocyanin in Äther mit Hilfe von Platin-Mohr, 2) Durch Reduktion von Pyocyanin in wäßriger, schwach soda-alkalischer Lösung mit Hilfe von Natriumhydrosulfit und Ausäthern. Die mit Natriumsulfat getrockneten Äther-Lösungen wurden mit einem geringen Überschuß von Chlortetroxyd in Äther versetzt, das ausfallende Radikal-Salz rasch abgesaugt, mit Äther gewaschen und über Chlorcalcium im Vakuum aufbewahrt.

3.558 mg Subst. (bei 15—20° im Hochvakuum getrockn.): 0.271 ccm N (752 mm, 22°). — 3.410 mg Subst.: 0.261 ccm N (755 mm, 23°). — 4.160 mg Subst.: 1.87 mg AgCl. — 4.50 mg Subst.: 2.025 mg AgCl.

$C_{13}H_{12}N_2ClO_5$ (311.6). Ber. N 8.99, Cl 11.38.

Gef. „ 8.72, 8.77, „ 11.12, 11.13.

Titration: Durch verd. n_{10} -Natronlauge wird das Pyocyaninium-perchlorat disproportioniert (Blaufärbung). Führt man den Versuch unter reinem Stickstoff aus, so findet man, daß genau die Hälfte des Radikal-Salzes in Pyocyanin, die andere Hälfte in Leuko-pyocyanin übergeht. — Bei der Titration mit Stannit-Lösung ist demgemäß nur 1 H-Atom zur Entfärbung erforderlich. Schüttelt man nach beendeter Titration mit Luft, so wird nicht nur der durch Stannit, sondern auch der durch Disproportionierung entstandene Leuko-körper zu Pyocyanin dehydriert, und bei Wiederholung der Titration unter Stickstoff sind nun 2 H-Atome zur Entfärbung nötig.

78.0 mg Subst.:	1)	5.00 ccm n_{20} -Stannit (direkt),
	2)	9.87 „ „ (nach Zutritt von Luft),
	3)	9.73 „ „ („ „ „ „),
81.2 mg Subst.:	1)	5.07 „ „ (direkt),
	2)	10.10 „ „ (nach Zutritt von Luft),
	3)	9.84 „ „ („ „ „ „).

⁶⁾ Ztschr. Physik 87, 238 [1933/34].

⁷⁾ Hagemeyer, Dissertat., Greifswald 1933; vergl. F. Mayer, Chemie d. organ. Farbstoffe II, S. 212 [Berlin, J. Springer, 1935].

Molekulargewichts-Bestimmung des Pyocyanins: Hrn. Dr. E. Valkó⁹⁾ verdanken wir die Messung der Diffusionsgeschwindigkeit von Pyocyanin nach der Methode der porösen Platten⁹⁾ mit Hilfe des Stufen-Photometers. Die spez. Leitfähigkeit des als Lösungsmittel verwendeten Wassers war 2×10^{-6} rez. Ohm, diejenige der 0.1-proz. Lösung 8×10^{-6} rez. Ohm; sie stieg im Laufe von Wochen auf 1.7×10^{-5} rez. Ohm. Wegen Ausscheidung geringer Mengen von Zersetzungsprodukten wurde vor jeder Bestimmung filtriert. Bei 25° fand Hr. E. Valkó:

Pyocyanin (Gew.-Proz.)	Salz-Zusatz (n)	D [cm ² /Tag]
0.05	—	0.560
0.02	—	0.568
0.08	0.05-n. NaCl	0.536
0.01	0.005-n. NaCl	0.553
0.01	0.0005-n. KCl	0.533

Der Mittelwert für die salz-haltigen Lösungen $D = 0.54$ [cm²/Tag] $\pm 4\%$ gibt nach Stokes-Einstein-Sutherland:

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta r}, \quad r = \frac{2.10 \times 10^{-8}}{D} \text{ [cm]} \quad (25^\circ, \text{Wasser})$$

(k = Boltzmannsche Konstante, T = absol. Temperatur, D = Diffusionskoeffizient, η = innere Reibung, r = Halbmesser des kugelförmigen Teilchens) für das Pyocyanin-Molekül den Teilchen-Radius $r = 3.92 \times 10^{-8}$ cm. Daraus berechnet sich unter Annahme eines spez. Gew. von 1.5 das Mol.-Gew. zu 230 ± 25 , während die stöchiometrische Formel $C_{13}H_{10}N_2O$ den Wert 210 verlangt.

Mit Benzol als Lösungsmittel ergab sich bei 25°

Substanz	Mol.-Gew. ber.	D [cm ² /Tag] gef.
Naphthalin ¹⁰⁾	128	1.40
Anthracen ¹⁰⁾	178	1.11
Pyocyanin	210	0.95
Pyocyanin	210	0.95

Danach steht auch in Benzol die Diffusionsgeschwindigkeit des Pyocyanins mit der einfachen Molekulargröße in Einklang.

⁹⁾ Hauptlaborat. d. I.-G. Farbenindustrie A.-G., Ludwigshafen/Rh.

⁹⁾ J. H. Northrop u. M. L. Anson, Journ. gener. Physiol. **12**, 543 [1929]; J. W. McBain u. T. S. Liu, Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 59 [1931]. E. Valkó, Transact. Faraday Soc. **31**, 230 [1935].

¹⁰⁾ vergl. R. O. Herzog, R. Illig u. H. Kudar, Ztschr. physikal. Chem. (A) **167**, 329 [1933].