

BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN

ÜBER DIE SULFONIERUNG DES ROHRZUCKERS.

Von Tokuro SODA.

Eingegangen am 2. Oktober, 1933. Ausgegeben am 28. Januar, 1934.

Die Untersuchungen über Rohrzucker-schwefelsäure sind bis jetzt nur gering. Vielleicht könnte meine frühere Veröffentlichung⁽¹⁾ über diese Verbindung die letzte sein. Ihre Darstellung wurde durch direkte Sulfonierung des Rohrzuckers in Pyridin mit Chlorsulfonsäure ausgeführt und ihr Ba-salz hatte der Analyse nach die Zusammensetzung von Rohrzucker-mono-schwefelsäure (RS_I) : $(C_{12}H_{21}O_{11}SO_3)_2Ba + 2C_2H_6O$. Das Salz war weisses amorphes Pulver; es wurde von Invertase zerlegt und durch Hefe vergoren; seine Einheitlichkeit ist doch noch nicht bewiesen. Da Hexose-schwefelsäure nicht durch Hefe in Gärung versetzt werden scheint, müsste der sulfonierte Hexose-Anteil der Rohrzucker-mono-schwefelsäure in der Gärung zurückbleiben und daraus als Glucose- oder Fructose-mono-schwefelsäure erfassen lassen.

In vorliegenden Versuche wurde die Sulfonierung wie üblich in demselben Sulfonierungsapparat wie in der früheren Mitteilung⁽²⁾ geschildert ausgeführt: 20 gr. gut getrockneter fein gepulverter Rohrzucker wird in 70 ccm Pyridin durch heftiges Turbinieren suspendiert. Vom Tropftrichter wird ein Gemisch von 4 ccm Chlorsulfonsäure und 12 ccm Chloroform langsam eingetroppft (das molekulare Verhältnis des Rohrzuckers zu Chlorsulfonsäure (R:S) wird etwas grösser als 1 gewählt). Das Gemisch lässt sich am Anfang auch unter Eiskühlung glatt umrühren, aber wenn etwa ein Drittel der Flüssigkeit zugesetzt ist, wird der ausgeschiedene Sirup plötzlich so zäh dass man die Temperatur bis auf 35-40°C. steigen lassen muss um weiter zu turbinieren.

So wird die weitere Sulfonierung in diesem Temperaturbereich durchgeführt. In der früheren Mitteilung wurde angegeben dass die Sulfonierung unter Kühlung ausgeführt war, jedoch meinte man damit nur im Anfang der Reaktion. Die Temperatur musste im Verlauf der Reaktion wesentlich erhöht werden um die Turbinierung weiter durchzuführen. Nach Beendigung des Eintropfens turbiniert man weiter einige Stunden bei Zimmertemperatur. Am nächsten Tag wird der zähe Sirup, der sich auf dem Boden abgesetzt hat, von oberen Pyridinschicht abgetrennt, in wasserfreiem Metanol aufgelöst und vom unlöslichen Rohrzucker (6-8 gr.) abfiltriert. Das Filtrat wird mit wenig Wasser ins Destilliergefäß eingetragen und nach dem Austreiben des Metanols unter Zusatz von PbO abdestilliert bis es pyridinfrei wird. Weiteres Verfahren ist fast dasselbe wie bei Glucose-schwefelsäure⁽²⁾ angegeben ist.

Versuch I. In die Lösung des Pb-salzes von RS (Rohrzucker-schwefelsäure) wurde H₂S durchgeleitet und in die freie Säure umgewandelt. Die

(1) *Biochem. Z.* **135** (1923), 621.

(2) (1) und dieses Bulletin, **8** (1933), 37.

Disaccharid-schwefelsäure wurde im sauren Medium von selbst in Hexose-schwefelsäure gespalten. Nach Aufbewahren einiger Monaten im kühlen Ort, neutralisierte man die Lösung mit KOH und versetzte sie in Gärung. Nach Beendigung der Gärung wurde die Lösung von Hefe befreit, im Vakuum eingeengt und das K-salz wurde aus Alkohol gefällt.

Die Analyse der vorgetrockneten Substanz* zeigte :

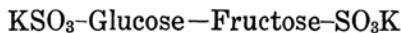
	S	K	$[\alpha]_D$
Gefunden	11.30%	13.25%	+26.5° (keine Mutarotation)
Ber. für $C_6H_{11}O_6SO_3K$	10.79	13.11	

Diese Analysenwerte stimmen ziemlich gut überein mit K-Hexose-mono-schwefelsäure, doch seiner optischen Drehung nach, ist es ganz verschieden von K-Glucose-6-mono-schwefelsäure ($[\alpha]_D = +37.3^\circ$). Alle Farbenreaktionen von Fructose (Proben von Seliwanoff, Ekkert, Dische⁽³⁾ und HCl) sind sehr deutlich. Könnte es also hier um K-Fructose-monoschwefelsäure handeln? Diese Vermutung scheint doch unzutreffend wenn man seine Reduktionsvermögen revidiert.

Reduktionsvermögen (als Glucose berechnet)

	Substanz in Frage	K-Glucose-mono-6-schwefelsäure
gemessen	36 mg in 125 mg Subst. (28.7%)	28.8 mg in 48.3 mg Subst. (43.0%)
nach Bertrand		
nach Willstätter-Schudel	8 mg in 37.7 mg Subst. (21.2%)	39 mg in 86.3 mg Subst. (45.2%)

Aus diesem Resultat sieht man ein dass in K-Glucose-schwefelsäure, gemessen nach beiden Methodik, der Glucosegehalt praktisch gleich ist, während man bei der aus Rohrzucker dargestellten Substanz deutlich verschiedene Werte erhält. Ausserdem steht der Glucose-Gehalt in K-Glucose-schwefelsäure ungefähr 2 Mal so hoch als in der Substanz in Frage wenn sie nach Willstätter-Schudel gemessen wird. Es scheint also als ob die Hälfte von der Substanz aus Glucose-6-mono-schwefelsäure bestehe. Aus obigen Versuche liegt die Annahme nahe dass das Sulfonierungsprodukt von Rohrzucker wesentlich die folgende chemische Substanz sei :



Nach dieser Auffassung könnte mein früheres Ba-salz von RS_1 ein zufälliges Gemisch oder eine lockere Assoziationsverbindung von $RS_2Ba + R$ gewesen sein. Tatsächlich, bei vielen Sulfonierungsexperimenten schwankte der

* Die Trocknung wird gewöhnlich bei $80^\circ C$. im Vakuum ausgeführt. Bei $100^\circ C$. nimmt das Gewicht weiter ab, aber schliesslich tritt gelbe Färbung ein. Die so lange erhitzte Substanz zeigte ein interessantes Verhalten zum Wasser: beim Lösen in Wasser entwickelte sie CO_2 ; die Lösung war fast neutral (pH: ca 6) und reduzierte Fehlingsche Lösung in der Kälte; Spaltung der organisch gebundenen SO_4 war nur gering.

Ba-Gehalt von Rohprodukten zwischen 10 und 16%. Man könnte dann vermuten dass sulfonierter Anteil sich nicht von Hefe vergären lässt: es ist also der assozierte R der durch Invertase zerlegt wird.

Versuch II. Rohes Ba-salz von Rohrzucker-schwefelsäure (RS-Ba I) dessen Ba-Gehalt 15.9% betrug, wurde durch Brucinsulfat versetzt. Das erhaltene Brucin-salz (RS-Brc I) welches sich nicht ohne weiteres kristallisierten liess, wurde aus Alkohol als amorphes Pulver gefällt. Es enthielt 5.06% S und zeigte $[\alpha]_D = -1.63^\circ$. S-% berechnet aus $C_{12}H_{20}O_{11}$ ($SO_3HC_{23}H_{26}O_4N_2$)₂ = 4.95%. Aus diesem Brucin-salz wurde das Ba-salz wieder hergestellt. Sein S- und Ba-Gehalt waren:

	S	Ba
Gefunden	10.80%	23.14%
Ber. für RS ₂ -Ba	10.03	21.54
Ber. für RS ₃ -Ba	11.52	24.62

Ferner wurde dieses Ba-salz wieder ins K-salz umgewandelt: sein S-Gehalt = 11.30%. (Ber. für RS₂-K = 11.09%); $[\alpha]_D = +47^\circ$.

Durch Invertase trat nur geringes Reduktionsvermögen auf, während durch Säure es stark zunahm. Am Ende der Säure-spaltung sank seine $[\alpha]_D$ auf $+27.1^\circ$ ab. Nach längerem Aufbewahren seiner wässrigen Lösung schieden sich eigenümliche spiral-förmige Kristalle aus. (Abb. 1).

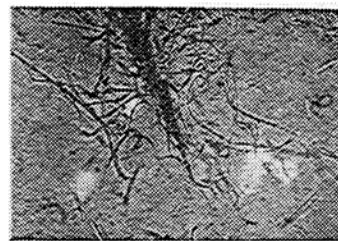


Abb. 1.

Versuch III. Solche spirale Kriställchen von Brucin-salz wurden auch aus dem Ba-salz (RS-Ba XVII) erhalten. Sein Ba-Gehalt war 18.6%. Daraus bereitetes Brucin-salz wurde in heissem Pyridin gelöst und allmählich Alkohol zugesetzt. Beim Erkalten setzte sich auf dem Boden ein Sirup ab, welcher von Mutterlauge getrennt, mit Alkohol zerrieben wurde. Das weisse Pulver wurde abgesaugt und mit Alkohol gut gewaschen und getrocknet. Sein S-Gehalt = 4.76%, 4.77%. Aus seiner wässrigen Lösung schied sich spirale Kristalle aus (ihr optischer Charakter: negativ) (Abb.

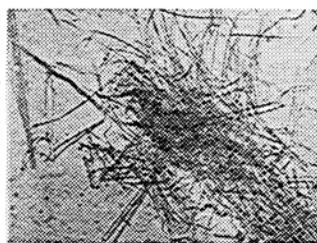


Abb. 2.



Abb. 3.

2 und 3). S-Gehalt = 5.71% (ber. für RS₄-BrC = 5.73%), $[\alpha]_D = -9.64^\circ$. Ausbeute 0.6 gr. aus 15 gr. Ba-salz.

Versuch IV. Die rohen Präparate von Ba-salze (RS-Ba XXIV, XXV, XXVII) deren Ba-Gehalt zwischen 10 und 13% liegen, wurden durch Hefe vergoren. Ausgegorene Flüssigkeit wurde von der Hefe abfiltriert, eingedrängt und aus Alkohol gefällt. Ihr Ba-Gehalt stieg auf: 18.34% für RS-Ba XXIV, 19.84% für RS-Ba XXV und 18.03% für RS-Ba XXVII. Beim Anfang der Gärung zeigte die Flüssigkeit sehr starke Reduktion, aber die durch Hefe gereinigten Ba-salze enthielten nur Spur von reduzierende Substanz, und erst nach der Behandlung durch Säure trat starke Reduktion heraus. Unten wird die Zunahme der Reduktion beim Erhitzen einer Lösung von RS-Ba XXV mit 0.02 N HCl auf 100°C gezeigt. Das Reduktionsvermögen wird nach Hagedorn-Jensen-Hanessche⁽⁴⁾ Methode gemessen und als % von Glucose des gelösten Ba-salzes dargestellt.

5 ccm der 1.673%-ige Lösung vom Ba-salz enthielten nach dem Reduktionsvermögen 2.64 mg Glucose; daher 52.8 mg Glucose in 1.673 gr. der Substanz oder 3.08% (die chemische Eigenschaft dieser kleinen Menge der reduzierenden Substanz ist noch nicht untersucht). Nun wurde zu anderen 5 ccm der Lösung 1 ccm HCl (0.53 N) zugefügt, auf 25 ccm verdünnt und im siedenden Wasserbad eingetaucht. Von Zeit zu Zeit pipettierte man daraus 2 ccm und neutralisierte es mit 0.4 ccm NaOH (0.112 N). Dieses wurde mit Wasser auf 5 ccm verdünnt und analysiert. Wenn es z.B. A mg Glucose ergibt, so berechnet man Glucose-Menge in 1.673 gr. der Substanz (B mg): $A \times 25/2 \times 100/5$. Glucose-% = $B/16.73$.

Min.	A	B	Glucose-%	Zunahme der Reduktion
0	—	52.8 mg	3.1	0
10	1.75	437	26.1	23.0
15	2.01	502	30.0	26.9
30	2.21	552	33.0	29.9
45	2.26	570	34.1	31.0
90	2.32	580	34.7	31.6
120	2.34	585	35.0	31.9

Nach 120 Min. wurde die Lösung ein wenig gelblich und eine schwache Trübung von BaSO₄ trat ein. Dieselbe Lösung, gemessen nach Willstätter-Schudel, zeigte ein Reduktionsvermögen 20.8% Glucose oder 22.9% umgerechnet für K-salz welcher Wert mit dem vorher angegebenen 21.2% (Versuch I) ziemlich gut übereinstimmt. $[\alpha]_D$ zeigte anfangs +37° und nach der Hydrolyse +26°. Daher ist die vorangehende Annahme festgestellt dass RS₂ nicht durch Hefe aufgespalten sondern erst durch Säure in Glucose- und Fructose-schwefelsäure hydrolysiert wird.

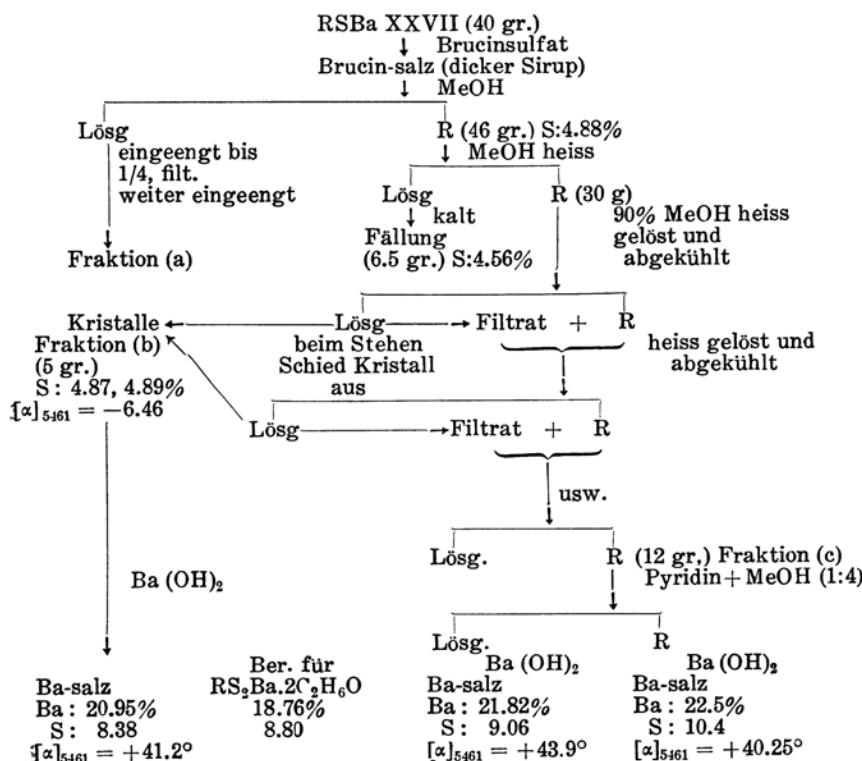
Versuch V. RS₂ muss dem Analysenwert nach das Hauptprodukt der Sulfonierung sein. Um RS₂ zu isolieren wurde Brucin-salz aus RS-Ba XXIV

(4) *Biochem. J.*, **23** (1929), 99.

dargestellt. Zum dick konzentrierten Sirup wurde Metanol zugefügt bis Fällung gerade eintrat und dieses im Eisschrank aufbewahrt. Zu erst schieden sich radial kugelförmige Kristalle aus und später erstarrte das Ganze in einem Kristall-brei. Das einzelne Kristall ist ein feines Nadelchen und positiv in optischen Charakter. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurde es analysiert: sein S-Gehalt war 5.19% oder 5.14%. Dieser Analysewert ist ein wenig grösser als der S-Gehalt von RS₂-Brc (4.95%) doch viel kleiner als RS₃-Brc (5.45%). Der Berechnung nach erhalten wir diesen Wert als solches Gemisch wie 2RS₂+RS₃ oder 5RS₂+RS₄.

Versuch VI. Das Brucin-salz aus RSBa XXV kristallisierte aus seiner sirupösen wässrigen Lösung in nadelförmigen Kristalle. Kristallisierte man es aus Metanol um, so schied sich haardünne Kristalle (opt. Charakter positiv) aus. Es wurde mit kaltem Wasser einige Mal gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute war sehr gering. Sein S-Gehalt war: 5.35% was sehr nahe dem S-Gehalt von RS₃-Brc. steht.

Versuch VII. Fast reines Brucin-salz von RS₂ wurde aus RSBa XXVII mit 90%-igem Metanol erhalten, zwar in folgendem Schema:



Fraktion (a) : eine braune zähe Masse, die schwer weiter zu reinigen ist. RS₁ könnte hier vorhanden sein wenn es überhaupt existiert. Fraktion (b) : Kristalle von RS₂-Bré—beim Abdampfen seiner wässrigen Lösung schieden sich ganz homogene schöne Kriställchen aus ; sein optischer Charakter ist sonderbar : eine optische Achse liegt nicht parallel mit der Entwicklungsrichtung des Kristalles. (Abb. 4 u.

5). Fraktion (c) : erstarrte in eine feste amorphe Masse wenn sie gut trocknen liess. Beim Aufbewahren um mehrere Monate in kühlem Ort schied sich feine Kriställchen aus, aber diese Kristalle sind in glasige amorphe Masse eingebettet; deshalb ist diese Fraktion unrein. Nach der Behandlung mit Pyridin + MeOH wurde es ins Ba-salz umgesetzt. Seinem Ba- und S-Gehalt nach ist es wohl ein Gemisch von RS₂ und RS₃ oder noch höheren Ester zu betrachten. In die Waschflüssigkeit ging die Hauptmenge von RS₂ über. Merkwürdig ist es dass alle Ba-salze, die über Brucin-salz dargestellt sind, mehr Ba enthalten als die entsprechende S verlangt. Es ist wohl denkbar dass Rohrzuckerschwefelsäure bei der Behandlung mit überschüssigem Baryt, mit diesem saccharatartig verbinden könne⁽⁵⁾.

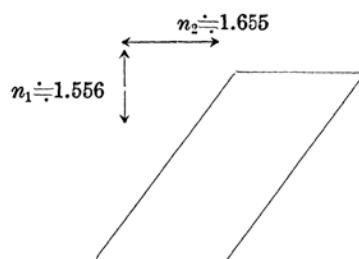


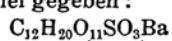
Abb. 4.



Abb. 5.

Versuch VIII. Nun wurde die Sulfonierungsbedingung so abgeändert dass das molekulare Verhältnis von Rohrzucker (20 gr.) zur Chlorsulfonsäure R:S = 1:2 wird. Nach dem Austreiben des Pyridins durch PbO, bildete ein Teil des sulfonierten R eine unlösliche Verbindung mit PbO (A) und der Restanteil ging als Pb-salz in das Filtrat über (B) (RS-Ba XXII). Aus (A)

(5) Eine dergleichen Deutung findet man in der Mitteilung von Neuberg und Pollak (*Ber.* **43** (1910), 2060). Sie haben zu ihrem Ba-salz der Rohrzuckerschwefelsäure folgende chemische Formel gegeben :



erhielt man 4 gr. Ba-salz (Ba : 22.18%) und aus (B), 22 gr. Ba-salz (Ba : 13.81%). Das letztere, nach der Vergärung durch Hefe, liess seinen Ba-Gehalt bis 18.03% steigen (nach dem Trocknen bei 80°C. im Vakuum 20.0%). Ausbeute : 6 gr. aus 10 gr.

Brucin-salz aus RS-Ba XXII (A) ist im Wasser wenig löslich und lässt sich aus heissem Wasser umkristallisieren. Das Kristall ist optisch negativ und etwas spiralförmig ; S-Gehalt = 5.62, 5.63%. Brucin-salz aus RS-Ba XXII (B) ist im Wasser leicht löslich. Aus dem Sirup schied sich nur eine kleine Menge von nadelförmige Kristalle (optisch positiv) aus ; sein S-Gehalt = 5.36%.

Versuch IX. Schliesslich wurde das molekulare Verhältnis R:S bei der Sulfonierung bis 1:3 erniedrigt. Alle organisch gebundene Schwefelsäure vereinigten mit unlöslichem PbO. Es wurde durch H_2S zersetzt und ins Ba-salz übergeführt. Das Ba-salz enthielt 25.7% Ba. Das daraus hergestellte Brucin-salz (S: 5.21%) enthielt reichliche Menge von spiralen Kristalle

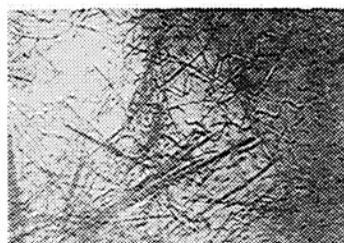


Abb. 6.

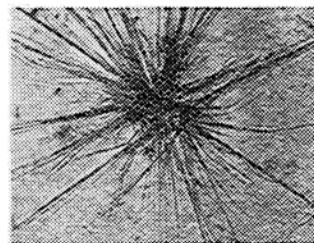


Abb. 7.

(Abb. 6 u. 7), und nach Umkristallisieren aus wässrigem Alkohol stieg sein S-Gehalt bis auf 5.86%. Aus der Mutterlauge ausgeschiedene Kristalle waren nach der Umkristallisation fein nadelförmig und sein S-Gehalt war 4.70%.

Schlussbemerkungen. Sulfonierung des Rohrzuckers verläuft also nicht so einfach wie bei Glucose. Wenn auch die Darstellung unter gleicher Sulfonierungsbedingung wie $R:S > 1$ durchgeführt wird, so ist das Reaktionsprodukt immer ein Gemisch von di-, tri- oder tetra-Ester, und zwar schwankt ihr Verhältnis von Ansatz zu Ansatz. Beim Sulfonieren unter starker Abkühlung wäre die Bildung des mono-Esters möglich, doch ist diese Bedingung praktisch kaum zu erfüllen.

Da Fructose, nach unseren Erfahrungen, auch unter schonender Bedingung leicht poly-Ester zu geben scheint (siehe dieses Bulletin 9, Nr. 2. "Glucosulfatase IX."), ist es anzunehmen dass der Fructose-Teil des Rohrzuckers auch geneigt sei poly-Ester zu bilden. Demnach ist mono-

Ester der Glucose in Rohrzuckerschwefelsäure zu erwarten, und zwar als Glucose-6-mono-schwefelsäure. Doch ist diese Gedankengang durch Experiment bis jetzt nicht völlig gestützt worden. Zuweilen habe ich sehr ähnliche Kristalle (auch der optische Charakter) wie Brucin-salz von



Photo. 8.

Glucose-6-mono-schwefelsäure in zerlegten Rohrzucker-schwefelsäure erkannt (Abb. 8), doch ist mir ihre Isolierung noch nicht gelungen. Das Verhalten gegen Gluco-sulfatase⁽⁶⁾ ist nennenswert: Die organisch gebundene SO₄ des durch Säure zerlegten RS₂-Ba wird vom Enzym hydrolysiert, zwar ungefähr die Hälfte wie bei Glucose-6-mono-schwefelsäure; auf der durch Säure nicht zerlegten Rohrzucker-schwefelsäure wirkt das Enzym nur schwach (demnächst veröffentlicht).⁽⁷⁾ Diese Tatsachen sprechen für die obige Vermutung, doch ist es schwer zu verstehen dass das K- oder Brucin-salz von zerlegten Rohrzucker-schwefelsäure keine Mutarotation zeigt.

Diese Arbeit wurde teilweise mit Mitteln von Kultusministerium zur Förderung der Wissenschaften ausgeführt, wofür ich zu grossem Dank verpflichtet bin.

*Chemisches Institut, Wissenschaftliches Fakultät,
Kaiserliche Universität zu Tokio.*

(6) dieses Bulletin, **6** (1931), 358 ; **8** (1933), 65 ; **8** (1933), 148.

(7) dieses Bulletin, **9**, Nr. 2. "Gluco-sulfatase IX."