



De auto-inactivering der auxinen

<https://hdl.handle.net/1874/322569>

DE AUTO-INACTIVEERING
DER AUXINEN

C. KONINGSBERGER

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

recht
6

*moving v
give all cases* *St. gen-192-1936*

DE AUTO-INACTIVEERING DER AUXINEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR
W. E. RINGER, HOOGLEERAAR IN DE FACUL-
TEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT
VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT TE
VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
OP MAANDAG 26 OCTOBER 1936, DES NAMID-
DAGS TE VIER UUR

DOOR

CAREL KONINGSBERGER

GEBOREN TE BUITENZORG

MOORMAN'S PERIODIEKE PERS N.V.

—

DEN HAAG 1936

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS

AAN MIJN AANSTAANDE VROUW

Het is mij een behoefte, dit voorwoord te beginnen met een eerbiedige hulde aan de nagedachtenis van *Professor Went*, ingegeven door gevoelens van dankbaarheid voor hetgeen hij voor mijn academische opleiding heeft beteekend.

Tot U, *Hooggeleerde Kögl*, *Hooggeachte Promotor*, gaat mijn erkentelijkheid in het bijzonder uit; in de eerste plaats wel voor al Uw belangstelling, getoond in mijn werk en in mijn persoon. Niet licht zal ik vergeten, wat ik verder aan U te danken heb voor de voltooiing van den arbeid, waarvan dit proefschrift de afsluiting is.

Hooggeleerde Cohen, *Hooggeleerde Kruyt*, niet genoeg kan ik het waardeeren, dat Gij beiden het zijt geweest, die mij hebt ingewijd in de theoretische en practische beoefening der physische en colloïd-chemie.

Zonder Uw zeer gewaardeerde voorlichting en daadwerkelijke medewerking, *Zeergeleerde Mejuffrouw Erxleben*, ware het onmogelijk geweest, het in deze dissertatie behandelde onderwerp in dezen vorm af te sluiten. Met genoegen zal ik steeds terugdenken aan de aangename sfeer, waarin onze gemeenschappelijke arbeid werd verricht.

An dieser Stelle möchte ich auch Ihnen, sehr verehrter *Herr Professor Windaus*, herzlich dafür danken, dass ich in Ihrem Institut die Technik der Ultraviolet-Absorptionsmessungen erlernen konnte.

Groote erkentelijkheid voel ik jegens de verdere leden van den wetenschappelijken staf van ons laboratorium voor den vriendschappelijken omgang; eveneens geldt dit diegenen onder de candidaten, welke mij door het vervaardigen van preparaten behulpzaam zijn geweest, terwijl tenslotte aan alle leden van het personeel lof gebracht wordt voor de hulpvaardigheid en toewijding, die ik steeds van hen heb mogen ondervinden.

INHOUD

	Blz.
INLEIDING	
HOOFDSTUK I	
De foto-electrische methode voor de quantitative bepaling van absorptiespectra in het ultraviolet volgens P o h l.	
HOOFDSTUK II	
De isoleering van auxine-a, auxine-a-lacton en auxine-b.	
HOOFDSTUK III	
De absorptiespectra van auxine-a, auxine-a-lacton en auxine- b in het ultraviolet (230—400 $m\mu$) in verband met de auto- inactivering dezer stoffen.	
HOOFDSTUK IV	
Over het verband tusschen de spectraal-analytische en chemische onderzoeken. Samenvatting.	

INLEIDING.

DOEL VAN HET ONDERZOEK.

Gedurende reeds een aantal jaren wordt in het organisch-chemisch laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht een reeks onderzoekingen verricht, welke tot doel hebben, de samenstelling en eigenschappen van een aantal *phytohormonen* te weten te komen. Onder deze categorie van voor het plantaardig organisme zeer belangrijke verbindingen nemen de „auxinen” een allereerste plaats in. Dit zijn immers de stoffen, welke bij zeer uiteenlopende groepen uit het plantenrijk de functie van regulator bij den lengtegroei uitoefenen. Hun invloed betreft in het bijzonder het proces der *celstrekking*. Onder de vele litteratuur, welke zich met de botanische zijde van dit vraagstuk bezig houdt, moge in het bijzonder verwezen worden naar de voortreffelijke beschouwingen door F. A. F. C. WENT aan dit onderwerp gewijd in het „Lehrbuch der Pflanzenphysiologie” ¹⁾.

Het is aan KÖGL, ERXLEBEN en HAAGEN SMIT, die zich met de chemie van de auxinen bezig hielden, vrij spoedig gelukt, deze in zuiveren toestand te isoleeren. Het duurde niet lang, of de samenstelling kon bepaald worden en na eenige jaren was men zoover gevorderd, dat een volledige kennis omtrent de structuur en de eigenschappen dezer verbindingen was verkregen. Een duidelijk en volledig overzicht betreffende de meeste en belangrijkste der daartoe verrichte onderzoekingen vindt men in een samenvattend artikel van MEJ. ERXLEBEN, verschenen in het tijdschrift: „Ergebnisse der Physiologie und experimentellen Pharmakologie” ²⁾.

Met uitzondering van het z.g. *hetero-auxine*, welk een op zichzelf staand karakter bezit, behooren de auxinen tot de alicyclische verbindingen. Zij zijn relatief eenvoudig gebouwd en vertoonen onderling zeer nauwe verwantschap, hetgeen blijkt uit de gemakkelijke

¹⁾ KOSTYTSCHEW-WENT: „Lehrbuch der Pflanzenphysiologie”, deel II, pag. 282 c.v.

²⁾ Erg. Physiol. expt. Pharm. 37, 186 (1935).

wijze, waarop zij in elkander omgezet kunnen worden. Op het oogenblik zijn er drie bekend: *auxine-a*, *auxine-a-lacton* en *auxine-b*.

De aanleiding tot het onderzoek, in de volgende bladzijden beschreven, is het kort na den aanvang van de werkzaamheden in dit laboratorium ontdekte, zéér onaangename feit, dat deze stoffen, zelfs in den meest zuiveren toestand, vrij spoedig, doch in elk geval na twee tot drie maanden, hun physiologische werkzaamheid volkomen verliezen.

Natuurlijk werden ook de inactieve producten op hun eigenschappen onderzocht, waarbij al spoedig aan het licht kwam, dat de chemische samenstelling niet verandert. Ook kwam vast te staan, dat zoowel de dubbele binding, als de vrije carboxylgroep in de onwerkzame verbinding aanwezig zijn. Maar toch bleek het inactieve materiaal zich in verschillende opzichten anders te gedragen. Zoo constateerde men een verandering in de optische draaiing; het smeltpunt, hoewel nagenoeg gelijk gebleven, wees op de aanwezigheid van twee stereo-isomeren, terwijl een gewichtige ontdekking gedaan werd met betrekking tot de z.g. mutarotatie. Bij *auxine-a* en het lacton was n.l. gevonden, dat zij in 96% alcoholische oplossing mutarotatie vertoonen. Daarbij kon vastgesteld worden, dat na verloop van enkele uren een eindwaarde der optische draaiing wordt bereikt, welke bij berekening blijkt overeen te stemmen met een constante verhouding van zich met elkaar in evenwicht bevindende hoeveelheden zuur en lacton. Het feit duidt er op, dat wij in dit geval met een δ -lacton te maken hebben.

Het was daarom een verrassende ontdekking, toen aan het licht kwam, dat *inactief auxine-a in oplossing niet mutaroteert!*

Het is ook gelukt, het onwerkzame materiaal door gefractioneerde kristallisatie in twee isomere componenten te scheiden; deze zijn toen „pseudo-*auxine-a*₁” en „pseudo-*auxine-a*₂” genoemd.

Met dat al was het toch niet goed mogelijk, zich een bevredigende voorstelling omtrent het chemisme der inactivering te vormen. Om hierin te slagen, heeft men toen de mogelijkheid in overweging genomen, of wellicht door de bestudeering der absorptiespectra in het ultraviolet tijdens het afnemen der physiologische werkzaamheid nieuwe aanknooppingspunten gevonden zouden worden. Aan schrijver dezes is toen gevraagd, zich met die taak te willen belasten. Gelijktijdig en in verband hiermede heeft Mej. E r x l e b e n toen haar

krachten gewijd aan het chemisch-analytisch onderzoek van de pseudo-auxinen. In nauwe samenwerking hebben wij wederzijds van elkanders resultaten gebruik gemaakt en op die wijze was het mogelijk, het gestelde probleem in relatief korten tijd tot oplossing te brengen, ondanks de moeilijke toegankelijkheid en het labiele karakter der betrokken verbindingen.

Voor de metingen der absorptie in het ultraviolet beschikt ons laboratorium sinds eenigen tijd over een instrument, waaraan de foto-electrische methode ten grondslag ligt. Deze door Pohl ontworpen apparatuur wordt in ons land nog betrekkelijk weinig gebruikt. Schrijver dezes had het voorrecht, in 1934 een kort bezoek te mogen brengen aan het laboratorium van den ontwerper te Göttingen, waar hem de toepassing getoond werd, terwijl hij in het chemisch instituut van Windaus, alwaar sinds vele jaren, voor soortgelijke doeleinden als de onze, genoemde werkwijze wordt toegepast, gelegenheid kreeg, zich de techniek der quantitative meting van absorptiespectra geheel eigen te maken.

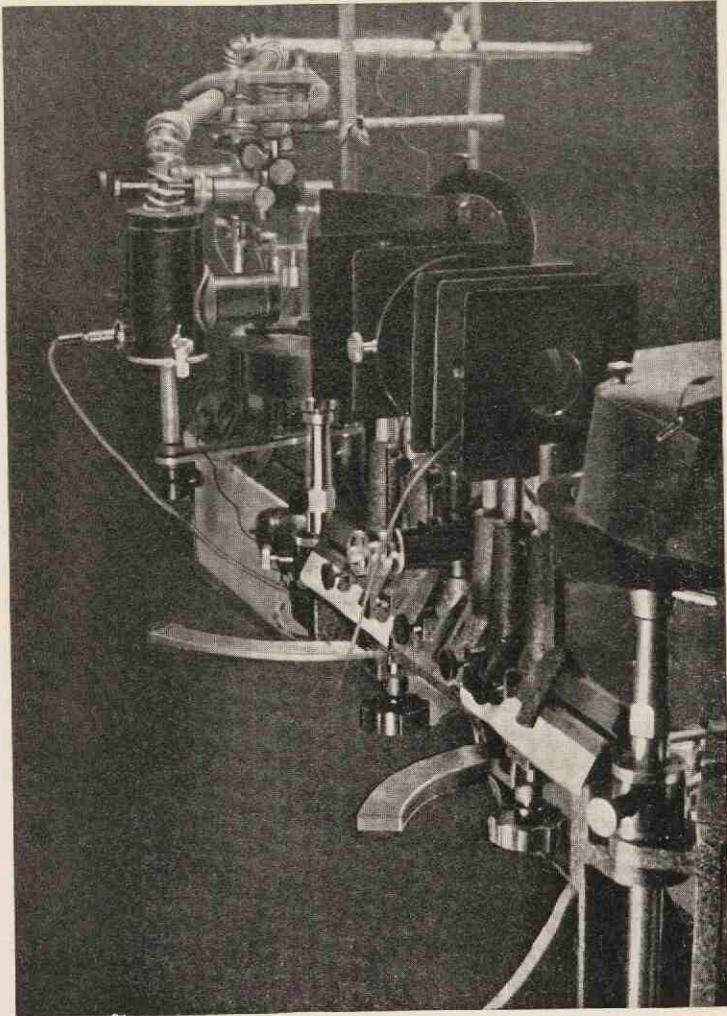
Hoofdstuk I zal in verband met het voorgaande een uitvoerige beschrijving van bouw en werking van het apparaat bevatten.

In hoofdstuk II zal vervolgens, in zeer beknopte vorm, de isoleering van auxine-a, auxine-a-lacton en auxine-b, zooals die in het Utrechtsche laboratorium ten uitvoer wordt gebracht, beschreven worden.

Hoofdstuk III geeft een uitgebreid overzicht van de resultaten der metingen van de ultraviolet-absorptiespectra dezer verbindingen.

Tenslotte zal hoofdstuk IV de chemische onderzoekingen samenvatten, in aansluiting op het voorgaande verricht teneinde het probleem der inactivering geheel tot klaarheid te brengen. Deze zijn grootendeels het werk van Mej. E r x l e b e n.

De verschillende onderwerpen loopen nogal sterk uiteen van karakter; wij hebben derhalve aan het eind van elk hoofdstuk de daarin behandelde litteratuur telkens afzonderlijk samengevat in een overzicht. De cijfers tusschen haakjes in den tekst hebben dus steeds betrekking op de betreffende lijst van publicaties.



Middelste rail met spleet en lenzen.

HOOFDSTUK I.

DE FOTO-ELECTRISCHE METHODE VOOR DE QUANTITATIEVE BEPALING VAN ABSORPTIESPECTRA IN HET ULTRAVIOLET VOLGENS P O H L.

Voor de meting van het absorbeerend vermogen van opgeloste stoffen voor ultraviolet licht (tusschen 400 en 230 $m\mu$) beschikt ons laboratorium over een apparaat, hetwelk door Prof. R. W. P o h l voor dit doel is ontworpen ¹⁾. Het hieraan ten grondslag liggende principe — *de licht-electrische fotometrie* — is afkomstig van E l s t e r en G e i t e l (1), die reeds in 1893 de experimenteele basis hiervoor gelegd hebben. Zij maakten daarbij gebruik van de eigenschap van verschillende metalen (zink, alkaliën), om bij bestraling met licht electronen uit te zenden. Wanneer n.l. deze metalen in een dunne laag aangebracht zijn binnen in een glazen bol en er zorg voor gedragen is, dat deze laag geleidend is verbonden met de negatieve pool van een batterij, terwijl zich daar tegenover in de geëvacueerde ruimte een metalen draad bevindt, welke met de positieve zijde van het element in verbinding staat, dan is de z.g. *fotostroom*, welke bij belichten van de metallische laag ontstaat, op verschillende manieren te meten. E l s t e r en G e i t e l gebruikten bij hun eerste proeven slechts een gevoeligen galvanometer, maar konden toch al met groote zekerheid aantoonen, dat de *sterkte van den fotostroom recht evenredig is met de intensiteit van de opvallende straling*. Hiermede hadden zij dus een nieuwe methode gevonden, om quantitatief lichtsterkten te meten.

In den loop der jaren is uit dit principe een geheel zelfstandige methodiek gegroeid, welke met goed gevolg toegepast wordt naast andere werkwijzen. Vooral in de handen van P o h l en medewerkers heeft zij gedurende de laatste twintig jaren groote verbeteringen ondergaan. Haar bruikbaarheid als hulpmiddel bij het chemisch onderzoek is een tiental jaren geleden zeer duidelijk aan den dag getreden, toen met dit toestel de ultraviolet-absorptiespectra van *het cholesterine en zijn bestralingsproducten* werden bestudeerd (2). Men

¹⁾ De levering geschiedde door de firma S p i n d l e r & H o y e r te Göttingen.

verkeerde tot op dat oogenblik in de overtuiging, dat de eerstgenoemde verbinding het z.g. *provitamine-D* zou zijn, hetwelk door krachtige belichting met ultraviolette stralen in het antirachitisch werkzame product omgezet zou worden. Teneinde nu bij de absorptiemetingen gevrijwaard te zijn tegen mogelijke photochemische reacties, moest een methode worden gekozen, waarbij de te gebruiken lichtintensiteiten van dien aard zijn, dat inderdaad deze storingen werden geëlimineerd. Bij het apparaat van Pohl is dit het geval gebleken, zoodat men bij het *vitamine-D-onderzoek* met succes hiervan gebruik heeft kunnen maken. In de eerste plaats wel kon uit het absorptiespectrum van het cholesterine, hetwelk op deze wijze tot circa 250 m μ werd bepaald, de gevolgtrekking gemaakt worden, dat niet deze stof zelve, doch een in minimale hoeveelheid aanwezige verontreiniging de rol van het *provitamine-D* vervult. Dit bracht Windaus en Hess (3) er toe, het probleem der sterinen en hun samenhang met het antirachitisch werkzame vitamine opnieuw van chemische zijde aan te pakken. Inderdaad kwam toen aan het licht, dat niet het cholesterine zelf, doch het er nauw mede verwante en dientengevolge er quantitatief moeilijk van te scheiden *ergosterine* het lang gezochte provitamine-D was. Met recht kan hieruit afgeleid worden, dat de foto-electrische absorptiemetingen het chemisch onderzoek den weg gewezen hebben.

In den loop der toen volgende jaren heeft een lange reeks nasporingen in het laboratorium van Windaus, waarbij het optisch onderzoek met behulp van het toestel van Pohl goede diensten bewees, het vraagstuk van het vitamine-D een heel eind nader tot de oplossing gebracht (4), (5), (6), (7), (8), (9). De bruikbaarheid van dit apparaat als hulpmiddel in het chemisch laboratorium is hierbij opnieuw bevestigd.

Ofschoon door den ontwerper zelf reeds verschillende uiteenzettingen zijn gegeven betreffende bouw en werking dezer apparatuur, (2), (4), (10), zullen wij in de volgende bladzijden ook eenigszins uitvoerig ons ermede bezig houden, omdat men hier te lande nog betrekkelijk weinig gebruik van dit toestel maakt.

Voor een goed overzicht is het noodzakelijk de twee belangrijke onderdeelen scherp van elkander te onderscheiden: den *monochromator* en de eigenlijke *foto-electrische meetinrichting*.

Wat eerstgenoemde betreft, kunnen wij verwijzen naar de publicaties van Lehmann (11) en Rudert (12), die voor het eerst de methode der *dubbele kleurschifting* met behulp van twee prisma's hebben toegepast, teneinde heel zuiver monochromatisch licht te krijgen. Dit laatste is in ons geval een absolute noodzaak, omdat wij te maken hebben met fotocellen, die als lichtgevoelig metaal kalium bevatten, hetwelk een groote selectieve gevoeligheid voor verschillende lichtsoorten bezit. In dit toestel is derhalve eveneens de *dubbel-monochromator* een der belangrijkste onderdeelen.

De bouw ervan is als volgt: een zware optische bank dient als onderstel; deze bestaat uit een rail van 50 cm, welke vast is bevestigd. Ter weerszijden hiervan zijn twee andere rails (resp. 75 en 100 cm lang) aangebracht en wel zóódanig, dat zij draaibaar zijn in het horizontale vlak (zie figuur I). Boven op de verticale assen bevindt zich ruimte voor de opstelling der prisma's. Het materiaal, waaruit deze bestaan, is steenzout, dat boven kwarts het voordeel bezit van een sterker dispergeerend vermogen, terwijl de doorlaatbaarheid voor licht met golflengten kleiner dan $250 \text{ m}\mu$ groter is. De brekende hoek is 60° ; een automatisch werkende inrichting zorgt voor het behoud van den stand der *minimum-deviatie*, wanneer deze voor een bepaalde golflengte eenmaal verkregen is. Het spreekt natuurlijk vanzelf, dat het materiaal, waaruit de prisma's geslepen zijn, aan strenge eischen, wat betreft optische eigenschappen, heeft te voldoen. In de eerste plaats wel moet het onberispelijk homogeen zijn; verder is het noodzakelijk, met het oog op de hygroscopische gevoeligheid van steenzout, dat bijzondere voorzorgsmaatregelen getroffen worden, teneinde het aantasten der brekende vlakken door sporen vocht tegen te gaan. Om dit euvel te vermijden, zijn electriche verwarmingsinrichtingen aangebracht vlak onder de plaats, waar deze instrumenten zijn opgesteld, waardoor zij voortdurend op eenige graden boven kamertemperatuur gehouden worden.

De optische inrichting bestaat voor het overige uit een aantal kwartslenzen en eenige spleten, die als volgt zijn aangebracht (zie figuur I).

Op den vasten arm, precies in het midden, bevindt zich de kromme spleet S_{p1} , waarvan de breedte regelbaar is; het onderstel daarvan bevat bovendien een slede, welke met een micrometerschroef heen en weer bewogen kan worden, zoodat het geheel verstelbaar is in een horizontale richting, loodrecht op de rail, over afstanden, welke tot op $0,01 \text{ mm}$ ingesteld kunnen worden. Ten opzichte van dit instrument zijn de verdere onderdeelen zoo symmetrisch mogelijk geplaatst. Allereerst bevinden zich ter weerszijden, er vlak tegen aan, twee kwartslenzen L_3 en L_4 ; vervolgens weer twee lenzen L_2 en L_5 op korten afstand van de prisma's. Een fotografische afsluiter A maakt het mogelijk, naar believen licht door te laten of den stralengang te onderbreken. Deze heele opstelling maakt de afbeelding van Pr_1 in Pr_2 mogelijk.

Op de rechter (beweegbare) rail bevindt zich, om te beginnen, weer een lens (L_1), niet ver van Pr_1 ; op 18 cm (d.i. de gemiddelde brandpuntsafstand van de lenzen L_1 tot en met L_6 voor de ultraviolette stralen in het gebied van $230\text{--}400 \text{ m}\mu$)

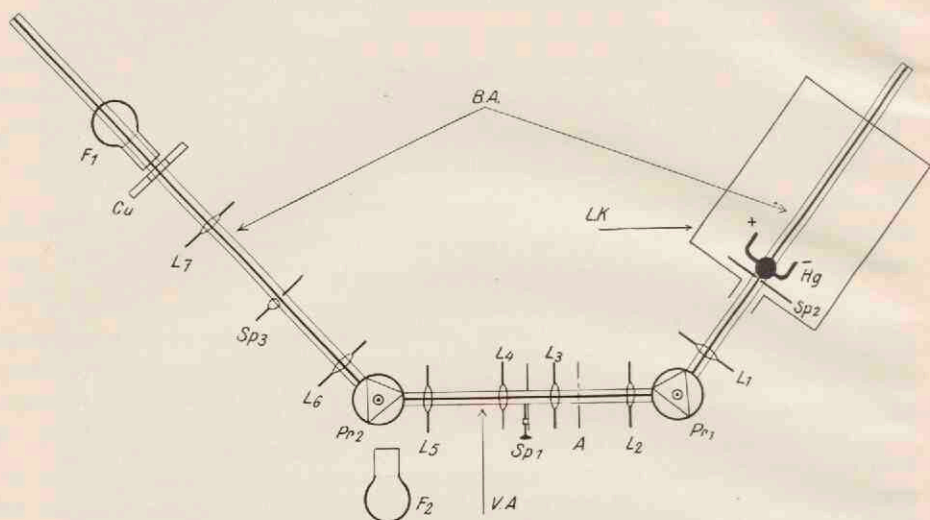


Fig. I. Verklaring: B.A.: draaibare armen; V.A.: vaste arm; L.K.: lichtdichte kast; Hg: kwiklamp; L: lenzen; Pr: prisma's; Sp: spleten; F: fotocellen; Cu: cuvetten; A: afsluiter. Voor verderen uitleg: zie tekst.

van L_1 staat een gewone spleet Sp_2 , waarachter direct, op slechts 1—2 mm afstand, de lichtbron, in ons geval een kwarts-kwiklamp, wordt geplaatst. Beide laatste genoemde voorwerpen worden tezamen in een lichtdichte kast opgesteld.

Richten wij nu onze aandacht op den linker arm, dan treffen wij eerst opnieuw een lens (L_6) aan, waarvan de positie in alle opzichten beantwoordt aan die van L_1 ; vervolgens merken wij een derde spleet Sp_3 op, die een nauwkeurig te regelen breedte heeft en welke, wat plaatsing betreft, een spiegelbeeld is van Sp_2 .

Bij nadere bestudeering van deze opstelling valt het volgende op te merken: Wanneer de lichtbron in werking is gesteld, zal de daarvan uitgezonden straling, mits door eenig probeeren een gunstigen stand van de rechter rail is gevonden, een beeld van Sp_2 in verschillende kleuren op het vlak van Sp_1 ontwerpen. De ultraviolette stralen kunnen zichtbaar gemaakt worden met behulp van een uraan-glaasje; dit vertoont geel of groen fluoresceerende strepen, welke corresponderen met het betrokken emissie-spectrum van kwikdamp. Voor ons doel is dit het belangrijkste deel van het uitgezonden licht.

Bij aandachtiger toezien zal blijken, dat het onmogelijk is, om alle lijnen *tegelijktijd scherp* op het vlak van Sp_1 afgebeeld te krijgen; men kan echter wel bereiken, dat zij, door L_2 heen en weer te bewegen in de richting van de lichtstralen, *achtereenvolgens* duidelijk geprojecteerd worden. Dit feit is het gevolg van het niet achromatisch zijn der kwartslenzen. Nu zijn echter scherp begrensde beelden voorwaarde, teneinde zuiver monochromatische lichtsoorten te verkrijgen, zoodat bovengenoemde eigenschap der lenzen gecorrigeerd moet worden. Dit geschiedt door L_2

naar behoefte voor elke lichtsoort te verplaatsen. Het is inmiddels mogelijk, aldus een overzicht te krijgen van het emissie-spectrum van kwikdamp, waarvan de voornaamste, ultraviolette, lijnen in figuur II zijn weergegeven.



Fig. II. Ultraviolette emissie-spectrum van de kwartskwiklamp (golf lengten in $m\mu$).

Om nu het apparaat in orde te brengen voor de absorptiemetingen, gaan wij als volgt te werk: De slede van Sp_1 wordt precies in den aangegeven o-stand gebracht; door draaien van de rechter rail en verschuiven van L_2 zorgen wij er voor, dat de lijn met de golflengte $280 m\mu$ (ongeveer het midden van het ultraviolette deel van het spectrum) scherp afgebeeld op de opening van Sp_1 valt. Is deze manipulatie gelukt, dan zetten wij den arm vast, noteren den stand van L_2 en brengen L_5 in een positie, welke symmetrisch daarmede ten opzichte van Sp_1 gelegen is. Een en ander wordt zeer vergemakkelijkt, door op de middelste rail aan beide uiteinden een reep millimeterpapier te plakken en daarop merkteekens aan te brengen.

Nu bevestigen wij op Sp_3 een uraanglaasje en bewegen den linker arm, totdat daarop de (ditmaal opnieuw geschifte) lichtstraal precies in de opening valt, waarvan de breedte symmetrisch te regelen is. Gewoonlijk kan men inderdaad waarnemen, dat nog sporen licht van andere golflengten, door Sp_1 mede doorgelaten tengevolge van onvermijdelijke verstrooiing in de lenzen en het eerste prisma, dank zij de herhaalde schifting thans links en rechts van den hoofdbundel afgebogen en dus onschadelijk gemaakt worden. De tweede rail wordt nu ook vastgezet en het toestel is gereed, wat de optische inrichting betreft. Teneinde andere lijnen uit het spectrum van de lichtbron op het midden van Sp_3 te doen vallen, behoeven wij slechts Sp_1 met den micrometerschroef zóódanig te verstellen, dat zij één voor één als het ware „uitgezeefd” worden uit de reeks, welke op het vlak van Sp_1 geprojecteerd wordt. Teneinde het verkrijgen van scherpe beelden tot stand te brengen, teekenen wij eens en voor altijd de verschillende posities van L_2 en L_5 , overeenkomende met de diverse golflengten, aan op de reeds genoemde strooken millimeterpapier. Tijdens de eigenlijke absorptiemeting behoeven wij dus voor het opzoeken van een nieuwe lichtsoort slechts de twee volgende manipulaties te verrichten:

- A) L_2 en L_5 in den juisten stand te plaatsen;
- B) de opening van Sp_1 met behulp van den micrometerschroef precies in den stralengang van de betreffende lichtsoort te brengen, hetgeen met een voor te schuiven uraanglaasje zonder moeite te controleren is. De breedte van de spleet mag vanzelfsprekend niet grooter zijn, dan noodig is voor het laten passeeren van den geheelen lichtbundel. Gewoonlijk hebben wij steeds zooveel mogelijk een constante breedte gebruikt.

Richten wij thans onze aandacht opnieuw op den linker arm, dan zien wij achter Sp_3 weer een lens L_7 , welke het thans zuiver monochromatische licht, dat

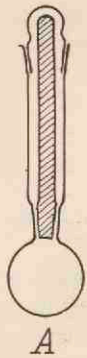


Fig. III. A. Smakula-cuvet met dubbele stop. B. Gewone kwarts-cuvet. Beide op de helft van de ware grootte.

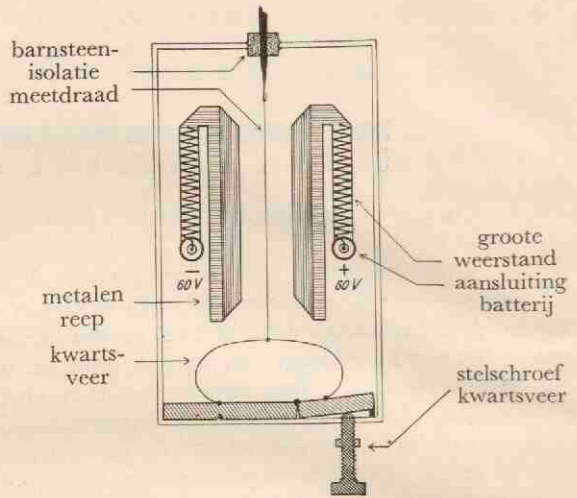


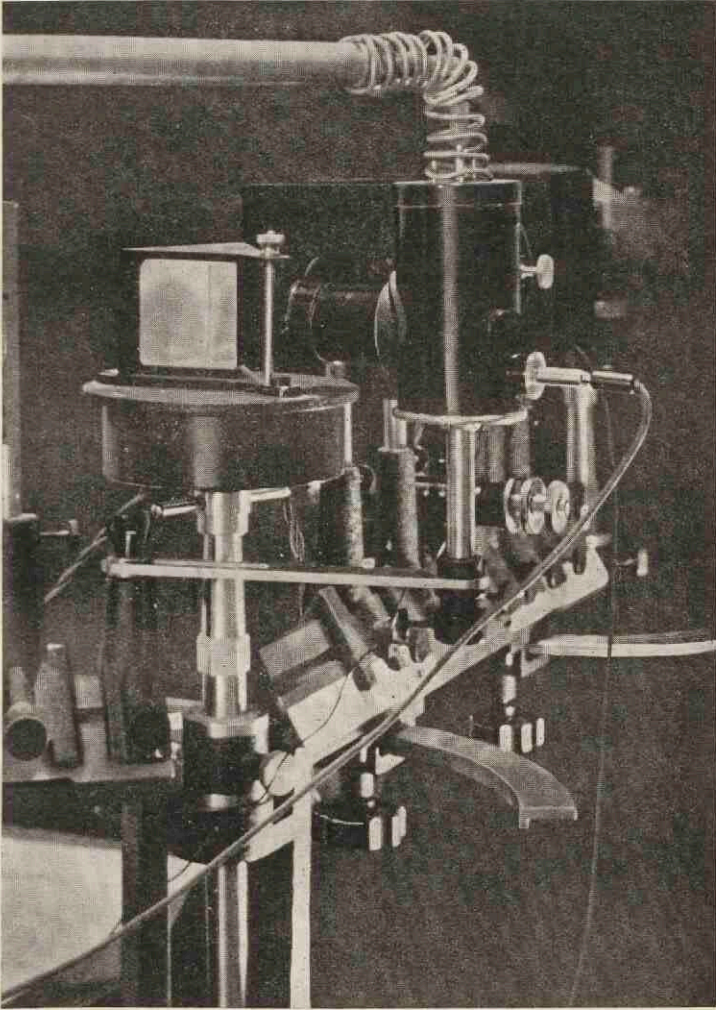
Fig. IV. Inwendige bouw van een electrometer.

Sp_3 verlaten heeft, tot een evenwijdigen bundel maakt. Deze passeert allereerst de cuvetten (Cu), welke op een houder vóór de fotocel F_1 zijn aangebracht, en valt tenslotte op het kwartsvenster van laatstgenoemd instrument. Er kunnen drie cuvetten naast elkander aangebracht worden; in het midden plaatst men gewoonlijk degene, welke gevuld is met het oplosmiddel, terwijl aan één of beide zijden daarvan naar behoefte andere, gevuld met oplossingen, opgesteld kunnen worden.

Door een daartoe geconstrueerde inrichting kunnen zij beurtelings snel in den stralengang geschoven worden, waardoor het werk zonder onderbreking voort kan gaan.

De cuvetten zijn geheel uit gesmolten kwarts vervaardigd¹⁾; voor het oplosmiddel wordt steeds een met enkelvoudigen stop gebruikt. De oplossingen daarentegen brengen wij altijd in z.g. *Smakula-cuvetten* (zie figuur III), welke een dubbele afsluiting bezitten (13). Hierin kan men stoffen, welke in aanraking met lucht niet bestendig zijn, vooral bij bestraling met ultraviolet licht, zonder bezwaar gedurende langeren tijd bewaren. Voor onze metingen gebruikten wij deze ter dikte van 1 mm; vooraf werden zij met behulp van een microscoop gecontroleerd op hun planparalleliteit. Nooit zijn door ons afwijkingen in dat opzicht gevonden. De bepaling van de werkelijke dikte, tot op 0,01 mm nauwkeurig, kon dan tegelijkertijd geschieden en de aldus gevonden waarde, brachten wij dan bij formule 1 in rekening.

¹⁾ Ze zijn betrokken van de Firma Hanff & Buest te Berlijn.



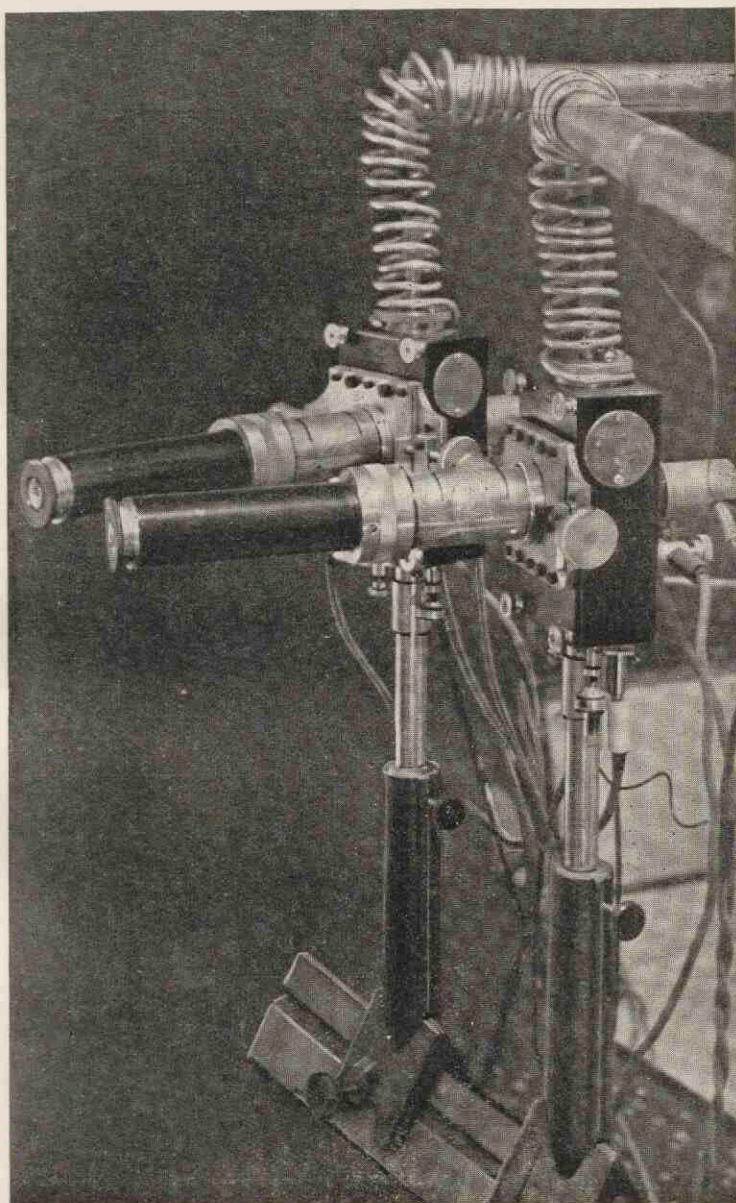
Prisma en fotocel.

De foto-electrische intensiteitsmeting berust, zooals in het begin reeds is opgemerkt, op de onderzoekingen van Elster en Geitel (l.c.), welke zich gedurende vele jaren bezig hebben gehouden met de bestudeering van de eigenschappen van fotocellen, gevuld met alkalimetalen. Daarbij hebben zij een reeks foutenbronnen, welke de rechte evenredigheid tusschen lichtintensiteit en fotostroom kunnen verstoren, opgespoord en middelen aangegeven, om deze te elimineeren (14). Later hebben ook Pohl en Pringsheim (15), (16) hun krachten aan dit vraagstuk gewijd. De door vele ervaringen beproefde methode, welke het resultaat van dezen arbeid uitmaakt, vindt men ook in ons apparaat toegepast. Deze bestaat in het meten van de oplading van een electrometer, welke wordt veroorzaakt door de in een zeker tijdsbestek in een fotocel vrijgemaakte electronen tengevolge van de werking der opvallende lichtquanten. Te dien einde wordt laatstgenoemd instrument opgenomen in een schakelschema, dat op het eerste gezicht veel overeenkomst vertoont met hetgeen Elster en Geitel bij hun eerste proeven gebruikten. Ook in ons geval verbindt men de negatieve pool van een batterij (100 volt) met de lichtgevoelige laag metaal; de draad, die de electronen moet opnemen, staat echter in verband met den reeds genoemden electrometer via een zeer goed geïsoleerden en afgeschermden geleider (zie figuur VI).

De bouw van den electrometer is als volgt: Twee evenwijdig gerichte reepen metaal van wigvormige doorsnede worden met behulp van een element op een constant potentiaalverschil gehouden. In de lengte is daartusschen een enkele microns dikke draad van kwarts uitgespannen, welke bestoven is met een zeer dunne laag platina of zilver, teneinde hem geleidend te maken (zie ook figuur IV). Eenerzijds staat deze in verbinding met de fotocel, aan den anderen kant is hij bevestigd aan een kwartsveertje, hetwelk met een schroef verstelbaar is. Deze inrichting maakt het mogelijk, de mechanische spanning in den draad binnen zeer wijde grenzen te regelen. Brengt men nu electriche ladingen er op aan, dan zal een uitwijking plaats vinden; de grootte van dezen uitslag zal bij gegeven lading van twee factoren afhangen:

- A) de zoojuist genoemde mechanische spanning;
- B) het potentiaalverschil tusschen de reepen.

De uitwijking wordt visueel geregistreerd met behulp van een microscoop, voorzien van een oculairmicrometer. Het geheele toestel is vanzelfsprekend, in verband met den teeren bouw van de essentiele onderdeelen en tevens ter afscherming van electrostatische invloeden van externen aard, in een geaard metalen kastje ingebouwd. Hetzelfde is ook het geval met de fotocel en den geleider. Verder



De electrometers.

is ook, met uitzondering natuurlijk van de oogenblikken, waarop een meting plaats vindt, laatstgenoemde voortdurend met een drukcontact op de aardleiding aangesloten. Dit geschiedt, om te voorkomen, dat tengevolge van een mogelijke oplading van den electrometer, veroorzaakt door het vallen van grootere of kleinere hoeveelheden licht in het venster van de fotocel, de draad zóóver uit gaat wijken, dat deze tegen een der metalen reepen aan slaat. Meestal beteekent dit een onaangename stagnatie, daar vaak pas na zeer veel moeite dit voorwerp weer los te krijgen is en de kans op breken heel groot is.

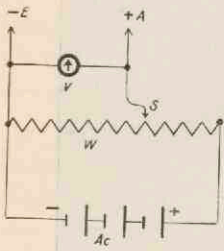


Fig. V. Verklaring: *Ac*: accu; *W*: weerstand; *S*: schuifcontact; *V*: voltmeter; *A*: aansluiting aardleiding; *E*: aansluiting electrometer.

De genoemde constructie van den electrometer is ook het resultaat van langdurige proefnemingen (17), (18), (19), (20). Men moet echter in het oog houden, dat het instrument zonder meer niet te gebruiken is. Bij de bepaling van lichtabsorpties komt het er op aan, de verhouding van twee lichtintensiteiten te leeren kennen. Het is derhalve noodzakelijk, het verband tusschen den uitslag, welke dit apparaatje aanwijst, en de op de fotocel gevallen hoeveelheid licht te kennen. Het is gemakkelijk in te zien, dat het aantal lichtquanten, dat op de lichtgevoelige laag valt, recht evenredig is met het aantal vrijgemaakte electronen; dit laatste op zijn beurt staat in lineair verband met de lading, die de electrometerdraad ontvangt. Mits derhalve

deze, benevens de geleider, steeds dezelfde capaciteit bezit; zal de electrostatische spanning ook recht evenredig zijn met de lading. Men kan daarom het verband tusschen lichtintensiteit en uitslag te weten komen, door de onderlinge afhankelijkheid van spanning en uitslag te bepalen. Dit laatste nu geschiedt op zeer eenvoudige wijze met behulp van een potentiometerschakeling, als in figuur V is weergegeven. Als contróle gebruiken wij een goede voltmeter, die een

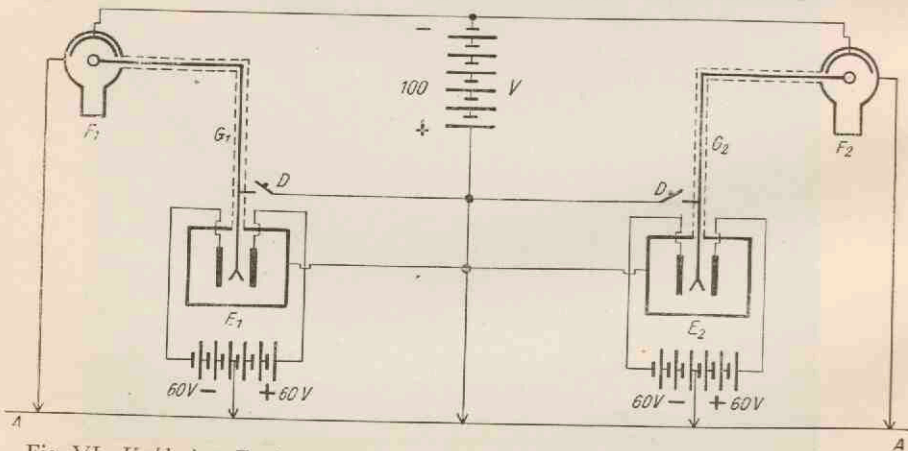


Fig. VI. Verklaring: *E*: electrometers; *F*: fotocellen; *G*: geleiders; *D*: drukcontacten; *A*: aarde. Voor verderen uitleg: zie tekst.

aflezing tot op 0,05 volt mogelijk maakt. Het komt hierbij, zooals duidelijk is, in de eerste plaats er op aan, dat de verhoudingen tusschen de uitslagen eenerzijds en de aangelegde spanningen anderzijds, met groote nauwkeurigheid vastgesteld worden. Het vergemakkelijkt daarom de bepalingen ten zeerste, wanneer er zorg voor gedragen wordt, dat ook de uitslagen in lineair verband staan tot de spanningen.

Dit is te bereiken, door de mechanische spanning in den draad met behulp van den stelschroef te varieeren; desnoods verandert men het potentiaalverschil der beide reepen. De beste resultaten van de absorptiemetingen worden verkregen, wanneer de gevoeligheid van den electrometer circa 20 schaaldeelen voor 1 volt bedraagt (0,05 volt/schaaldeel). Na eenig probeeren is dit gemakkelijk te bereiken; het spreekt vanzelf, dat telkenmale, voor men een nieuw preparaat gaat doormeten, de electrometer opnieuw geijkt moet worden.

Wil men nu bij een bepaalde golflengte de absorptie bepalen, dan gaat men gewoonlijk aldus te werk: Men stelt met een chronometer den tijd vast, benoodigd voor het verkrijgen van een uitslag van 20 schaaldeelen, terwijl de cuvet met oplosmiddel in den lichtbundel is opgesteld; vervolgens meet men de uitwijking, welke in denzelfden tijdsduur verkregen wordt, wanneer de cuvet met de oplossing voor de fotocel is aangebracht. Men kan ook omgekeerd de tijden meten, noodig voor het bereiken van dezelfde aanwijzingen van den electrometer bij oplosmiddel en oplossing; de verhouding der intensiteiten is dan *omgekeerd evenredig* aan die der bijbehorende tijden.

Deze twee methoden hebben het nadeel, dat tusschentijdsche veranderingen der primaire stralingsintensiteit kunnen optreden zonder dat men in staat is, hun invloed te elimineeren. Daarom is aan het toestel van Pohl de volgende compensatie-inrichting aangebracht, waarmede deze ongunstige factor uit te schakelen is. Tevens maakt deze het gebruik van een chronometer overbodig. Zij berust op de navolgende kunstgreep:

Een tweede fotocel F_2 vangt het licht op, dat door het voorste brekende vlak van het prisma Pr_2 wordt teruggekaatst. De intensiteit van dezen bundel wordt met behulp van een tweeden geleider en precies gelijk gebouwd en electrometer als in het bovenstaande beschreven is, gemeten. Indien men nu er zorg voor draagt, dat, zowel tijdens de bepaling van de sterkte van den lichtbundel, die door de oplossing is gevallen, als tijdens de meting van de intensiteit van het licht, dat door de cuvet met oplosmiddel is heengegaan, de z.g. *contrôle-electrometer* tot hetzelfde eindbedrag wordt opgeladen, dan

heeft men steeds de zekerheid, dat in beide gevallen totaliter dezelfde aantallen lichtquanten door de primaire straling op de cuvetten zijn geworpen, onverschillig, welke intensiteitsschommelingen deze mocht hebben ondergaan.

De opstelling in figuur I spreekt nu geheel voor zichzelf; in figuur VI kan men zien, hoe de schakeling der beide fotocellen met bijbehorende geleiders, electrometers en batterijen in elkaar zit. De hulpspanning op de twee reepen ter weerszijden van den meetdraad bedraagt gewoonlijk plus en minus 60 volt; het midden van de betreffende elementen is geaard, zooals ook het geval is met de positieve zijde van de batterij, welke de fotocellen voedt. Het is duidelijk, dat de contrôle-electrometer niet tusschentijds geijkt behoeft te worden, daar deze slechts telkens dezelfde *totale* lading behoort te registreren. Het verdient natuurlijk aanbeveling, de gevoeligheid ongeveer even groot te maken als het geval is met den meet-electrometer.

Er bestaan natuurlijk ook andere compensatie-methoden; hier mogen die van Koch (21), v. Halban en Geigel (22) en v. Halban en Siedentopf (23) gememoreerd worden.

Om tenslotte in het kort den gang van zaken bij een absorptiemeting nog eens duidelijk te illustreeren, gaan wij uit van de veronderstelling, dat de monochromator de lijn $\lambda = 313 \text{ m}\mu$ projecteert op de cuvet met oplosmiddel. Om te beginnen verzwakken wij met behulp van een aan L_1 bevestigd iris-diafragma de straling van de lichtbron een weinig, aangezien het licht van deze golflengte een vrij groote primaire intensiteit heeft. Vervolgens sluiten wij A , steken de lampjes aan, welke de electrometers van binnen verlichten en dooven de lichten in het vertrek. Verbreken wij de contacten, welke de aardverbinding van de geleiders tot stand brengen, dan mogen de electrometers, ook na langeren tijd, geen uitslag vertoonen. Blijkt dit het geval te zijn, dan is dit een bewijs, dat geen electrostatische storingen van buiten te vreezen zijn. Wordt A thans geopend, dan gaan de draden uit den 0-stand afwijken; in het algemeen zal dit in beide instrumenten niet met even groote snelheid geschieden, zoodat wij A weer sluiten. Door het loslaten der drukcontacten komen de draden vanzelf weer in de oorspronkelijke positie.

Door de breedte van Sp_3 te variëren en gebruik te maken van een voor het kwartsvenster van F_2 aangebracht iris-diafragma, zal het na

eenig probeeren gelukken, zóóver te komen, dat de beide electrometers gelijktijdig den stand „20” van de schaalverdeeling als uitwijking vertoonen. Hiermede is het eerste deel der meting beëindigd; het getal 20 wordt genoteerd voor de waarde van I_0 (zie formule 1).

Nu schuiven wij de cuvet met oplossing in den stralengang en herhalen de manipulaties, m.a.w. er wordt net zoolang licht doorgelaten, tot de contrôle-electrometer weer den stand „20” bereikt heeft; terstond sluiten wij A dan weer en lezen meteen af, wat het andere instrument aanwijst. Voor alle zekerheid herhalen wij dit laatste deel der proef één of meer malen; blijft de uitslag constant, dan noteeren wij de waarde ervan als I_D (zie formule 1). Het slot van de handeling bestaat in het opnieuw voorschuiwen van de cuvet met oplosmiddel en een tweede meting van I_0 ; vinden wij ook thans de waarde „20”, dan mag aangenomen worden, dat tijdens de meting geen enkele storing is opgetreden.

Op de zoo juist beschreven wijze gaat men te werk bij alle lijnen uit het Hg -spectrum, die voor ons doel van belang zijn, t.w.: 405, 365, 334, 313, 302, 297, 289, 280, 275, 270, 265, 254, 248, 240, 238 en 234 $m\mu$. Voor de berekening van de absorptie kan men gebruik maken van de volgende formules, welke alle gemakkelijk af te leiden zijn uit de wetten van Beer en Lambert:

$$1) \quad \kappa = \frac{2,3}{cd} \log \frac{I_0}{I_D}$$

Onder κ verstaat men de *moleculaire absorptiecoëfficiënt*, c stelt voor de concentratie der betreffende oplossing, uitgedrukt in mol/l, d is de dikte der vloeistoflaag (cuvet) in cm, terwijl de beteekenis van I_0 en I_D in het voorgaande reeds is uiteengezet: het zijn de relatieve lichtintensiteiten, behoorend bij de lichtbundels, welke het oplosmiddel, resp. de oplossing gepasseerd zijn. Het getal 2,3 is de omrekeningsfactor, die tevoorschijn komt bij het omzetten van natuurlijke in Briggiaansche logaritmen.

Het is niet altijd mogelijk of gewenscht, de moleculaire grootheid κ te bepalen; men maakt ook dikwijls gebruik van de volgende uitdrukking:

$$2) \quad h = \frac{2,3}{d} \log \frac{I_0}{I_D}$$

Hier stelt h de absorptiecoëfficiënt van de gegeven oplossing voor,

waarbij dan wel de concentratie in g of mg/l dient te worden genoemd. In dit geval geeft men d vaak in mm op; om verschillende redenen zullen wij deze gewoonte hier volgen. Wanneer men in het volgende zowel h als κ naast elkaar ziet opgegeven, dan bedenke men dat deze constanten onderling in de volgende betrekking staan:

$$3) \quad \kappa = \frac{h \times 10}{c}$$

Meermalen zal men de uitdrukking „extinctie” kunnen tegenkomen in de volgende bladzijden; hieronder verstaat men de volgende groothed:

$$E = \log \frac{I_0}{I_D}$$

Het feit, dat wij slechts de *verhouding* van I_0 en I_D behoeven te kennen, stelt ons in staat, met verwaarloozing van de eigen-absorptie van het oplosmiddel en reflectie op voor- en achterwand van de cuvetten, het absorberend vermogen van de opgeloste stof te bepalen. Het is duidelijk, dat vorm en afmetingen der cuvetten geheel dezelfde moeten zijn.

Het is inmiddels niet verantwoord, om oplosmiddelen met een belangrijke eigen-absorptie te gebruiken. In de eerste plaats zal door de geringere hoeveelheid doorgelaten licht de bepaling van $\frac{I_0}{I_D}$ niet zoo nauwkeurig kunnen geschieden als wel wenschelijk is. Maar in de tweede plaats zal men bij tamelijk geconcentreerde oplossingen den invloed ondervinden van het feit, dat de lichtstraal op zijn weg door de cuvet met oplossing *minder moleculen van het solvens* zal ontmoeten, dan op zijn weg door het zuivere oplosmiddel. Het is gemakkelijk in te zien, dat dan bij de bepaling van de absorptie zelfs zeer groote fouten gemaakt kunnen worden.

Men moet dus bij de keuze van geschikte solventia met bovengenoemden factor rekening houden. Nu zijn de meest gebruikelijke organische oplosmiddelen: aethylalcohol en aether in dat opzicht juist zeer geschikt. Ook chloroform kan als zoodanig goede diensten bewijzen, terwijl gedestilleerd water weliswaar ook weinig eigen-absorptie bezit, maar het bezwaar heeft van onvoldoende oplossend vermogen voor de meeste te onderzoeken verbindingen. Het spreekt

vanzelf, dat genoemde vloeistoffen voor het gebruik aan zeer hooge eischen, wat betreft chemische en optische zuiverheid, moeten voldoen.

Gewone 96% alcohol bevat vrij veel acetaldehyde; om dit te verwijderen gaat men volgens een voorschrift van Dunlap (24) aldus te werk: men laat fijnverdeeld zilveroxyde in een overmaat loog gedurende 24 uur op de vloeistof inwerken. Het acetaldehyde is dan tot azijnzuur geoxydeerd en wordt als zoodanig vastgelegd. Met een goeden fractioneer-opzet destilleert men den alcohol af; eventueel filtreert men dezen door gehard filtreerpapier, teneinde stofjes etc. te verwijderen.

De aether, welke men in den handel verkrijgen kan, behandelt men vóór door uitschudden met verdund zwavelzuur, verdunde loog en tenslotte met water. De vloeistof wordt dan eerst op chloorcalcium en dan op metallisch natrium gedroogd en vervolgens afgedestilleerd. Men bewaart den aether ook op natrium, teneinde eventuele vorming van peroxyden tegen te gaan.

Met chloroform gaat men, om te beginnen, evenzoo te werk als in het voorgaande is aangegeven. Men droogt deze goed op $CaCl_2$; tot slot wordt ook afgedestilleerd. Het bewaren moct op een droge en koele plaats in het donker geschieden.

Gedestilleerd water kan men eventueel direct gebruiken, wanneer tenminste filtreren door gehard filtreerpapier niet noodig is.

Bij de beoordeeling der uitkomsten van de absorptiemetingen is het gewenscht, zich rekenschap te geven van den invloed van mogelijke *afleesfouten*, die optreden bij de vaststelling van de waarde van I_D . Een fout ten bedrage van 0,1 deelstreep kan op de waarde van κ of h een verschillend effect hebben naar gelang van de grootte van I_D , zooals uit onderstaand lijstje blijkt. In procenten uitgedrukt, bedraagt dit effect bij

I_D gelijk 19.....	10 %
„ „ 15.....	2,5 %
„ „ 10.....	1,3 %
„ „ 5.....	1,5 %
„ „ 1.....	4,3 %

Hieruit volgt, dat bij een uitslag van 10 schaaldeelen de invloed van een mogelijke afleesfout het geringst is. Wil men derhalve de absorptie bij een bepaalde golflengte nauwkeurig kennen, dan kieze men de concentratie van de oplossing zóódanig, dat voor I_D een waarde in die buurt gevonden wordt. Men kan nu echter na eenige complete metingen met oplossingen van verschillende sterkten reeds met vrij groote nauwkeurigheid de absorptiekromme bepalen, daar de afleesfout in het gebied tusschen 5 en 15 schaaldeelen een gering effect uitoefent.

Heeft men te maken met een stof, welke niet aan de wet van Beer gehoorzaamt, m.a.w. is het absorbeerend vermogen van zijn oplossingen niet uitsluitend een functie van de concentratie, dan kan het gebruik van verschillende concentraties voor een nauwkeurige meting van κ over het heele golflengtegebied niet tot het gewenschte doel voeren. Men zou dan één bepaalde oplossing in cuvetten van verschillende dikten moeten doormeten. Wij hadden bij ons onderzoek niet

verwacht, dat zich een dergelijk geval zou voordoen; het bleek echter, dat auxine-b in dit opzicht een afwijkend gedrag vertoont. Hierover zal nader in hoofdstuk III D mededeeling gedaan worden.

Uit de cijfers van alle door ons uitgevoerde bepalingen zal men kunnen opmaken, dat dikwijls, ook bij verschillende metingen van één en dezelfde oplossing, vrij groote schommelingen in de uitkomsten waar te nemen zijn. Indien men bedenkt, hoe grooten invloed soms sporen verontreinigingen, die chemisch-analytisch niet meer aan te toonen, laat staan te verwijderen zijn, kunnen hebben op het absorbeerend vermogen voor ultraviolet licht, dan behoeft dit geen verwondering te wekken, ook al mogen bij de uitvoering der bepalingen alle denkbare voorzorgen in acht genomen zijn. Bij de vaak zoo moeilijk toegankelijke verbindingen, waarmede zich ons onderzoek bezig heeft gehouden, en welke bovendien een labiel karakter bezitten, zijn rigoureuze ten uitvoer gelegde zuiveringsmethoden, zooals vaak elders toegepast konden worden, niet mogelijk. Vooral het feit, dat telkens slechts zeer kleine hoeveelheden materiaal ter onzer beschikking stonden, heeft de arbeid onder de gegeven omstandigheden soms in ongunstigen zin beïnvloed.

Niet onvermeld diene daarom te blijven, dat in drie opeenvolgende spectraal-analytische bepalingen van het auxine-a-lacton-gehalte (voor nadere bijzonderheden zie hoofdstuk III C, waar de mutarotatieproeven beschreven zijn) van zekere oplossingen, uitkomsten werden verkregen, die binnen één procent met elkaar overeenstemmen. Hieruit blijkt ten duidelijkste, dat met inachtneming van de uiterste voorzorgen, een reproduceerbaarheid van de resultaten verkregen kan worden, welke die der chemische analyse nabij komt.

Om eventuele systematische fouten in de gevolgde methode te kunnen vaststellen en hiermede tegelijkertijd een algeheele toetsing van de betrouwbaarheid van het apparaat tot stand te brengen, hebben wij meermalen, tezamen met andere bepalingen, ook absorptiespectra opgenomen van bekende en vaak onderzochte preparaten. Zoo gebruikten wij ergosterine, opgelost in aether of alcohol, als contrôle. Ter illustratie van de wijze, waarop de metingen geregistreerd worden, geven wij hieronder een volledige tabel weer, opge maakt bij de bepaling van de absorptie van een ergosterine-oplossing in de concentratie van 200 mg/l. Naast de uitkomsten van dezen proef geven wij de waarden weer, die, in verband met de resultaten van vele metingen, zoowel door ons als door andere onderzoekers verricht (o.a. P o h l), tot de betrouwbaarste cijfers te rekenen zijn. In dit geval is de overeenstemming tusschen beide series zeer goed te noemen.

In figuur VII geven wij de absorptiekromme van ergosterine grafisch weer; aan de getrokken lijn liggen de in de laatste kolom

TABEL 1. *Bepaling van de absorptieconstante h van een 200 mg/l aethylalcoholische ergosterine-oplossing.*

Golflengte	I_0	I_D	$\log \frac{I_0}{I_D}$	h (gev.)	h (beste waarde)
405	20	20	—	—	—
365	20	20	—	—	—
334	20	19,8	0,004	0,01	—
313	20	19,9	0,002	—	—
302	20	18,1	0,043	0,09	0,07
297	20	11,3	0,248	0,53	0,51
289	20	10,1	0,297	0,63	0,62
280	20	5,7	0,545	1,16	1,17
275	20	7,0	0,456	0,97	0,94
270	20	6,3	0,501	1,07	1,07
265	20	8,0	0,397	0,85	0,84
254	20	11,5	0,240	0,51	0,48
248	20	13,8	0,161	0,34	0,34
240	20	15,4	0,113	0,24	0,21
238	20	15,5	0,111	0,23	0,19
234	20	16,0	0,097	0,21	0,19

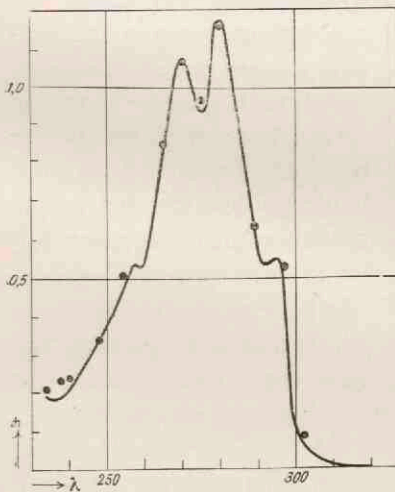


Fig. VII. Ergosterine in alcohol.

van bovenstaande tabel genoemde cijfers ten grondslag, terwijl de uitkomsten van de betreffende meting door stippen aangegeven zijn. In de grafiek komt duidelijk uit, dat in het algemeen de gedaante van de curve weinig wordt beïnvloed door de verschillen tusschen de waarden van h in de twee laatste kolommen van de tabel.

Naast ergosterine hebben wij ook van salicylzuur als contrôle gebruik gemaakt. Deze verbinding kan men n.l. gemakkelijk in zeer zuiveren toestand in den handel verkrijgen

TABEL 2. *Moleculaire absorptieconstante κ van salicylzuur in aethylalcohol.*

Golflengte	Eigen waarden	Volgens v. H. & E.
334	$0,9 \cdot 10^3$	(niet berekend)
313	$7,2 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$
302	$8,5 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^3$
297	$7,5 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^3$
289	$5,5 \cdot 10^3$	(niet berekend)
280	$3,3 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$
275	$2,0 \cdot 10^3$	(niet berekend)
270	$0,9 \cdot 10^3$	(„ „)
265	$0,8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$
254	$1,0 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
248	$3,2 \cdot 10^3$	(niet berekend)
240	$11,5 \cdot 10^3$	(„ „)
238	$11,4 \cdot 10^3$	(„ „)
234	$11,1 \cdot 10^3$	(„ „)

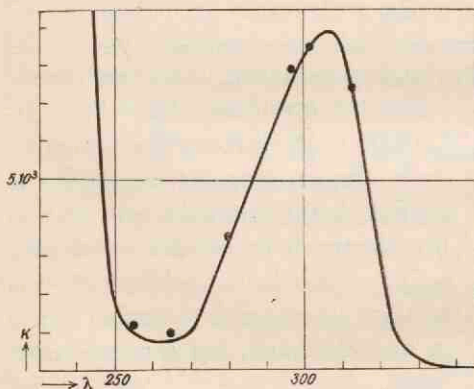


Fig. VIII. Salicylzuur in alcohol.

als ijkpreparaat voor thermochemisch onderzoek. De oplossingen bezitten het voordeel van een groote chemische stabiliteit bij langer bewaren, terwijl bovendien de absorptie-coëfficiënten bij verschillende golflengten met groote nauwgezetheid door verschillende onderzoekers is bepaald.

In bovenstaande tabel geven wij de resultaten weer van een serie eigen metingen in den

vorm van de gemiddelde waarden gevonden voor de moleculaire absorptieconstante κ ; de daarnaast afgedrukte getallen zijn afkomstig van onderzoekingen van v. Halban en Eisenbrand (25). Het was helaas niet mogelijk bij alle gebruikte golflengten vergelijkbare

getallen te vinden. Deze auteurs en met hen vele andere geven in hun publicaties absorptiekrommen weer, waarbij $\log \epsilon$ tegen de golflengte in een grafiek is uitgezet. Indien men bedenkt, dat onder ϵ verstaan wordt de moleculaire dekadische absorptie-coëfficiënt (Bunsen), die zich tot κ verhoudt als 1 : 2,3, dan is het duidelijk, dat een nauwkeurige vergelijking weliswaar niet onmogelijk, maar dan toch zeer moeilijk wordt gemaakt. Voor zoover de waarden van ϵ door genoemde onderzoekers direct wordt genoemd, moeten zij met den factor 2,3 vermenigvuldigd worden, teneinde een directe vergelijking met onze uitkomsten mogelijk te maken.

Zooals men ziet, stemmen onze waarden met die van v. Halban en Eisenbrand, voor zoover deze met de onze vergeleken konden worden, goed overeen. In figuur VIII is de kromme geteekend, ontleend aan eigen waarnemingen; de stippen geven de cijfers van de andere onderzoekers weer.

Hiermede zullen wij dit hoofdstuk betreffende de methode van Pohl voor de bepaling van de ultraviolet-absorptiespectra besluiten.

LITTERATUURVERZICHT

behoorend bij hoofdstuk I.

- (1) J. Elster en H. Geitel. Wied. Ann. 48, 625 (1893).
- (2) R. W. Pohl. Nachr. Gött. 142 (1926).
- (3) A. Windaus en A. Hess. Nachr. Gött. 175 (1926).
- (4) R. W. Pohl. Nachr. Gött. 185 (1926).
- (5) A. Windaus, A. Hess, O. Rosenheim, R. Pohl en T. Webster. Chem. Ztg. 12, 113 (1927).
- (6) A. Windaus en O. Rygh. Nachr. Gött. 202 (1928).
- (7) A. Windaus, K. Westphal, F. v. Werder, en O. Rygh. Nachr. Gött. 45 (1929).
- (8) A. Windaus. Nachr. Gött. 169 (1929).
- (9) A. Windaus. Nachr. Gött. 36 (1930).
- (10) R. W. Pohl. Naturw. 15, 433 (1927).
- (11) H. Lehmann. Ann. d. Physik. 5, 633 (1901).
- (12) G. Rudert. Ann. d. Physik. 31, 559 (1910).
- (13) A. Smakula. Ztschr. physik. Chem. (B) 25, 94 (1934).
- (14) J. Elster en H. Geitel. Physik. Ztschr. 14, 741 (1913).
- (15) R. Pohl en P. Pringsheim. Verh. d. dtsh. physik. Ges. 12, 215 (1910).

- (16) R. Pohl en P. Pringsheim. Verh. d. dtsh. physik. Ges. 15, 173 (1913).
- (17) C. W. Lutz. Physik. Ztschr. 9, 100 (1908).
- (18) J. Elster en H. Geitel. Physik. Ztschr. 10, 664 (1909).
- (19) C. W. Lutz. Physik. Ztschr. 13, 954 (1912).
- (20) Th. Wulf. Physik. Ztschr. 15, 250 (1914).
- (21) P. P. Koch. Ann. d. Physik. 39, 705 (1912).
- (22) H. v. Halban en H. Geigel. Ztschr. physik. Chem. 96, 229 (1920).
- (23) H. v. Halban en K. Siedentopf. Ztschr. physik. Chem. 100, 208 (1922).
- (24) F. Dunlap. J. Am. Chem. Soc. 28, 395 (1906).
- (25) H. v. Halban en J. Eisenbrand. Ztschr. physik. Chem. 122, 337 (1926).

HOOFDSTUK II.

DE ISOLEERING VAN AUXINE-A, AUXINE-A-LACTON EN AUXINE-B.

Ofschoon reeds verschillende malen in de litteratuur de bereidingswijzen van deze verbindingen uit natuurlijke grondstoffen zijn beschreven, zullen wij in dit hoofdstuk nogmaals in het kort mededeelen, hoe deze phytohormonen in zuiveren toestand kunnen worden verkregen.

A. In de eerste plaats moge een overzicht volgen van de isoleering van *auxine-a* en *auxine-a-lacton*. Oorspronkelijke beschrijvingen kan men vinden in de publicaties van K ö g l, E r x l e b e n en H a a g e n S m i t (1), (2), (3), (4). Als uitgangsmateriaal gebruikt men urine van gezonde personen, welke op het laboratorium zelf wordt verzameld en welke op een sinds verschillende jaren reeds gevolgde wijze aldus wordt opgewerkt:

Dagelijks wordt een hoeveelheid van 30 liter, na met circa 1000 cc sterk zoutzuur behandeld te zijn, onder vacuum ingedampt, tot het volume der vloeistof nog slechts $2\frac{1}{2}$ —3 l bedraagt. Terstond schudt men deze massa met een gelijke hoeveelheid peroxydvrijen (kort tevoren over stannochloride gedestilleerden) aether uit. Na afscheiden en drogen van de aetherische oplossing wordt deze zoo spoedig mogelijk op een waterbad ingedampt, eerst bij gewonen druk, vervolgens in vacuum. Het gemeenschappelijk residu van vijf op dergelijke wijze bewerkte porties wordt op de hieronder beschreven methode verder behandeld:

Residu aetherextract van 150 l urine.

Dit brengt men opnieuw in oplossing met circa 2 l aether. De massa wordt daarna met een verzadigde waterige bicarbonaat-oplossing meermalen doorgeschud, waarin de actieve bestanddeelen overgaan. Deze fractie behandelt men weer met sterk zoutzuur, totdat de vloeistof congopapier blauw kleurt, waarna deze opnieuw met een gelijk volume peroxydvrijen aether wordt uitgeschud. Door indampen van de aetherische oplossing krijgt men:

Residu, na behandeling met bicarbonaat-oplossing.

Men verwijderd thans door herhaalde malen uitkoken met petroleumaether en ligroïne vele onwerkzame bijmengsels (vooral ureum).

Residu, onoplosbaar in petroleumaether en ligroïne.

Dit wordt in 60% aethylalcohol opgelost; door vele malen uitschudden met benzol gaan de actieve bestanddeelen voor het grootste gedeelte daarin over. De benzolische oplossing behandelt men op dezelfde wijze eerst met water en daarna met 60% methylalcohol. De verkregen extracten, welke de actieve producten bevatten, worden gezamenlijk ingedampt, teneinde de methanol te verwijderen. Hierna zuurt men flink aan met ijsazijn en schudt wederom uit met aether; de verkregen oplossing wordt op de gebruikelijke wijze geconcentreerd.

Residu, na behandelen met benzol enz.

Met behulp van aethylalcohol lost men dit op; een geconcentreerde waterige oplossing van loodacetaat wordt toegevoegd, welke een volumineus neerslag doet ontstaan. Het filtraat, dat de te isoleren producten bevat, dampst men tot een klein volume in, zuurt dit aan met ijsazijn en extraheert opnieuw de actieve stoffen met aether, enz.

Residu, na verwijdering van in alcohol onoplosbare loodverbindingen.

Met enkele cc aethylalcohol wordt dit in oplossing gebracht; men voegt een groote overmaat water toe, waarna de troebele massa met een *Ca*-acetaat-oplossing wordt behandeld. Vervolgens giet men 1 n kaliloog bij, totdat geen neerslag meer ontstaat. Ook nu bevinden zich de actieve bestanddeelen in het filtraat; dit behandelt men met ijsazijn, enz.

Residu, bevrijd van in basisch milieu onoplosbare calciumverbindingen.

Dit wordt thans zoo goed mogelijk gedroogd; vervolgens kookt men het met een kleine hoeveelheid 1½% methylalcoholische *HCl*-oplossing. Na verwijdering van de vluchtige bestanddeelen neemt men het residu in aether op en verwijdert met behulp van een verzadigde bicarbonaat-oplossing eventueel nog aanwezige zure fracties. De aether wordt daarna op de gebruikelijke wijze verwijderd.

Neutraal reagerend residu, bevattend veresterde of gelactoniseerde producten.

Dit wordt aan een langzame destillatie in hoogvacuum (circa 0,01 mm druk) onderworpen. Daarbij worden drie fracties opgevangen en bewaard; respectievelijke overgangstemperaturen; 120—135°; 135—150°; 150—165°. Voorloop en residu kunnen verwijderd worden.

Actieve destillaten.

Na korter of langer staan, hetzij in een koelkast, hetzij in een mengsel van aceton en vast koolzuur, kunnen hieruit kristallen tevoorschijn komen. Deze worden door filteren zorgvuldig van de olieachtige bijproducten bevrijd.

Onzuivere kristallijne producten.

Door omkristalliseren uit alcohol-ligroïne of uit waterige aceton verkrijgt men tenslotte de zuivere phytohormonen:

Auxine-a of *auxine-a-lacton*, met een smeltpunt van 196° , resp. 173° en een werkzaamheid van gemiddeld 50 milliard AE/g.

In bovenstaand schema zijn de voornaamste tusschenproducten, tijdens de verschillende bewerkingen verkregen, cursief gedrukt. Het spreekt vanzelf, dat een voortdurende contrôle van de physiologische werkzaamheid daarvan noodzakelijk is, teneinde zekerheid te hebben omtrent het bij elke schrede der opwerking bereikte effect. Voor de uitvoering der biologische test moge verwezen worden naar de vele publicaties, welke zich met het groeistofprobleem bezig houden en wel in het bijzonder diegene, waarin de methode van F. W. W e n t beschreven wordt (5), (6). Deze werkwijze wordt, met enkele verbeteringen, toegepast voor alle *auxine*-metingen, welke ten behoeve van dit laboratorium geschieden. Gaarne willen wij hier den heer E. W. F. V i s s e r dank zeggen voor de zorgvuldige uitvoering der vele benodigde groeistofmetingen.

B. Voor het verkrijgen van *auxine-b*, waarover ook reeds vroeger een mededeeling is verschenen (3), werd als uitgangsmateriaal mout genomen. Hiervan is telkenmale een hoeveelheid van 25 kg verwerkt, hetgeen op de volgende wijze geschiedde:

In een tiental glazen bekens, elk met een inhoud van ongeveer 10 l, deden wij $2\frac{1}{2}$ kg fijngemalen mout. Twee daarvan werden geheel met water bijgevoerd, waarna de massa's flink dooreen geroerd werden. Zoodra zich een heldere laag had gevormd, schonken wij deze af en gaten de vloeistof over in twee volgende bekens. De overgebrachte hoeveelheden vervangen wij bij het eerste paar door versch water. Deze handelingen werden zoolang herhaald, totdat in totaal omstreeks 20 l gevoegd was bij elke serie bekens. De afgeschonken hoeveelheden vloeistof werden zoodoende steeds rijker aan opgelost materiaal. Van de laatste porties mout konden daardoor relatief geconcentreerde oplossingen worden afgegoten.

Op deze wijze verkregen wij in het geheel ongeveer 25—30 l waterig mout-extract; zonder vooraf aanzuren is dit steeds terstond met een gelijk volume peroxydrijen aether uitgeschud. Er ontstonden natuurlijk emulsies, welke wij zoo goed en kwaad als dat mogelijk was, in een waterige en een aetherische laag scheidden. Pas na centrifugeeren was het mogelijk, uit deze laatste een heldere oplossing, bevattend de actieve bestanddeelen, te verkrijgen.

Zoo spoedig mogelijk dampten wij den aether af en verkregen een residu, dat gewoonlijk al tamelijk rijk was aan werkzaam materiaal. Met het oog hierop konden wij bij de verdere zuivering, welke voor het overige geheel parallel loopt met die, welke in het bovenstaande voor *auxine-a* en *auxine-a-lacton* is weergegeven, de bewerking met benzol, enz., en met loodacetaat achterwege laten.

Tenslotte verkregen wij op deze wijze zuiver auxine-b met een smeltpunt van 183° (onder ontleding) en een gemiddelde werkzaamheid van 50 milliard AE/g, in handen.

Voor de welwillende wijze, waarop ons het gebruik van de 6-liter-centrifuge van het Hygiënisch Laboratorium voor de opwerking van het moutextract verschillende malen werd toegestaan, moge op deze plaats een woord van hartelijken dank jegens Prof. L. K. Wolff worden uitgesproken.

LITTERATUUROVERZICHT
behoorend bij hoofdstuk II.

- (1) F. Kögl. *Naturw.* 21, 17 (1933).
- (2) F. Kögl, H. Erxleben en A. J. Haagen Smit. *H.S.* 214, 241 (1933).
- (3) F. Kögl, H. Erxleben en A. J. Haagen Smit. *H.S.* 225, 215 (1934).
- (4) H. Erxleben. *Erg. Physiol. expt. Pharm.* 37, 186 (1935).
- (5) F. W. Went. *Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam.* 30, 1 (1926).
- (6) F. W. Went. *Rec. trav. bot. néerl.* 25, 1 (1928).

HOOFDSTUK III.

DE ABSORPTIESPECTRA VAN AUXINE-A, AUXINE-A-LACTON EN AUXINE-B IN HET ULTRAVIOLET (230—400 $m\mu$) IN VERBAND MET DE AUTO-INACTIEERING DEZER STOFFEN.

A. Zoals in de inleiding tot dit proefschrift werd uiteengezet, is het doel van het hier beschreven onderzoek, een beter inzicht te verkrijgen in het wezen der *auto-inactivering*, een verschijnsel, dat *alle zuivere auxinen*, met uitzondering van het *hetero-auxine*, vertoonen. Dit bestaat in het „vanzelf” verdwijnen van de physiologische werking op de plantencel na verloop van korter of langer tijd, doch ten hoogste na twee tot drie maanden.

Door Kögl, Erxleben en Haagen Smit is omtrent deze merkwaardige eigenschap in vroegere publicaties reeds mededeeling gedaan (1), (2), (3). Het uitvoerigst is daarin het gedrag van auxine-a besproken; in het kort weergegeven, luiden de resultaten van de oudere onderzoekingen als volgt:

De inactivering heeft geen verandering in de chemische samenstelling ten gevolge; de dubbele binding en de vrije carboxylgroep zijn in het omzettingsproduct nog aan te toonen. Uit een en ander volgt, dat wij vermoedelijk met een isomerisatie-proces te maken hebben, hetgeen ook aannemelijk gemaakt wordt door een verandering in de specifieke draaiing. Het smeltpunt wijst op de aanwezigheid van twee stereo-isomeren. Inderdaad kon door gefractioneerde kristallisatie een scheiding teweeggebracht worden, waarbij twee isomere pseudo-auxinen-a in zuiveren toestand werden verkregen.

Verder is komen vast te staan, dat zowel inactief auxine-a, als de beide zuivere pseudo-isomeren geen mutarotatie in (96%) alcoholische oplossing vertoonen, wat wel het geval is bij het werkzame product. Vermelding verdient ook het feit, dat bij spreidingsproeven, uitgevoerd met auxine-a, auxine-a-lacton en auxine-b, gebleken is, dat de onwerkzame producten bij een P_H groter dan 5, in tegen-

stond is daarna de eerste meting verricht met een resultaat overeenkomstig onze verwachtingen. Vervolgens herhaalden wij de bepalingen, met tusschenpoozen van een week (later meer) gedurende vijf maanden, terwijl de moederoplossing in de koelkast werd bewaard. Tegelijkertijd gingen wij zooveel mogelijk de verandering der activiteit na. In tabel 3 staan de resultaten vermeld; zooals men ziet, was het niet mogelijk, gedurende dien tijd eenig absorbeerend vermogen, althans van eenige betekenis, vast te stellen. Zoo er bij sommige metingen extincties vielen waar te nemen, was de waarde daarvan zóó klein, dat deze de foutengrens der methode niet overschreed en dus niet in aanmerking genomen kon worden.

TABEL 3. *Auxine-a* in *aethylalcohol*.
Preparaat 121; 200 mg/l.

Datum	Activiteit in milliarden AE/g	Absorptie
28/VI	55	geen
5/VII	35	„
12/VII	33	„
19/VII	10	„
27/VII	— ¹⁾	„
2/VIII	— ¹⁾	„
10/VIII	— ¹⁾	„
17/VIII	— ¹⁾	„
23/VIII	— ¹⁾	„
17/IX	0,3	„
27/IX	0,3	„
19/X	0,2	„
4/XI	0,2	„
28/XI	0,2	„

Gelijktijdig met bovenstaande serie waarnemingen zijn door ons metingen verricht van reeds inactief geworden auxine-a in dezelfde concentratie. Deze reeks strekt zich over twee maanden uit en geeft een overeenkomstig resultaat; de samenvatting volgt hierbij:

¹⁾ Tengevolge van de zomervacantie konden op genoemde dagen geen groeistofmetingen worden uitgevoerd.

TABEL 4. *Inactief auxine-a in alcohol.*
Preparaat 88; 200 mg/l.

Datum	Activiteit in milliarden AE/g	Absorptie
28/VI	0,0. . .	geen
5/VII	0,0. . .	„
12/VII	0,0. . .	„
19/VII	0,0. . .	„
27/VII	0,0. . .	„
2/VIII	0,0. . .	„
10/VIII	0,0. . .	„
17/VIII	0,0. . .	„
23/VIII	0,0. . .	„

Het was niet uitgesloten, dat de hier en daar gevonden, zéér zwakke, extincties toch afkomstig waren van de opgeloste stof. Teneinde over deze mogelijkheid te kunnen oordeelen, hebben wij meer geconcentreerde preparaten voor het optisch onderzoek samengesteld. Om te beginnen, losten wij 5 mg inactief auxine-a in alcohol op (500 mg/l); twee bepalingen waren voldoende, om aan te toonen, dat ook in dit geval nog geen sprake was van een goed waarneembare absorptie.

TABEL 5. *Inactief auxine-a in alcohol.*
Preparaat 123; 500 mg/l.

Datum	Activiteit in milliarden AE/g	Absorptie
17/IX	0,0. . .	geen
16/XII	0,0. . .	„

Bij de meting van de absorptie van een eenige weken oude oplossing van actief auxine-a (470 mg/l) bleken complicaties op te treden, die er op wezen, dat het eigenlijke proces der auto-inactivering niet meer op normale wijze plaats vond. Dit openbaarde zich ook in de verandering der activiteit; wij hebben derhalve in het vervolg steeds

zooveel mogelijk pas bereide oplossingen onderzocht, daar het ons belangrijker toescheen, eerst de gewone inactivering te bestudeeren.

In tabel 6 zijn de resultaten samengevat van een reeks metingen, uitgevoerd met oplossingen van auxine-a, hetwelk in vasten toestand reeds geheel of gedeeltelijk onwerkzaam was geworden.

TABEL 6. *Auxine-a in aethylalcohol.*
Verschillende concentraties.

Preparaten	Werkzaamheid in milliarden AE/g	Absorptie
203 A (500 mg/l)	3	geen
¹⁾ 203 B (200 mg/l)	0,0. . .	„
203 C (500 mg/l)	7	„
243 (500 mg/l)	0,0. . .	„
246 (500 mg/l)	0,0. . .	„
252 (500 mg/l)	0,0. . .	„
7394 E (155 mg/l)	60	„

Het is thans wel duidelijk geworden, dat het eigenlijke proces der auto-inactivering van auxine-a niet gepaard gaat met de vorming van tusschen- of eindproducten, welke gekenmerkt zijn door het bezit van een goed meetbaar of specifiek absorptiespectrum in het golflengte-gebied van 230—400 $m\mu$; zoo dit toch mocht geschieden, ontstaan zij in elk geval in zeer geringe hoeveelheden.

Voorloopig kunnen wij als resultaat van het optisch onderzoek van auxine-a-oplossingen samenvattend naar voren brengen, dat in elk geval, mede in verband met de resultaten van vroegere onderzoekingen, het waarschijnlijk is te achten, *dat de inactivering niet gepaard kan gaan met diep ingrijpende veranderingen in de structuur van het molecuul.*

Het leek ons gewenscht, ook de beide zuivere pseudo-auxinen-a aan een nadere bestudeering te onderwerpen. Men kan uit inactief materiaal deze producten door gefractioneerde kristallisatie van elkaar

¹⁾ Oplossing in gedestilleerd water.

TABEL 7. *Pseudo-auxine-a₂* in alcohol.
 Preparaat 7245 E; 500 mg/l.

Golflengte	Grootte van <i>h</i> bij verschillende metingen						Gem.	κ (1,52 m. mol/l)
405	—	—	—	—	—	—	—	—
365	—	—	0,05	—	—	—	—	—
334	—	0,04	—	—	—	—	—	—
313	—	0,04	0,01	0,05	0,01	0,02	0,02	0,1.10 ³
302	0,03	0,05	0,02	0,06	0,07	0,05	0,05	0,3.10 ³
297	0,04	0,05	0,05	0,07	0,02	0,05	0,05	0,3.10 ³
289	0,05	0,05	0,06	0,07	0,04	0,06	0,06	0,4.10 ³
280	0,05	0,05	0,07	0,11	0,09	0,08	0,08	0,5.10 ³
275	0,09	0,09	0,05	0,12	0,05	0,10	0,08	0,5.10 ³
270	0,09	0,09	0,07	0,14	0,11	0,10	0,10	0,7.10 ³
265	0,10	0,14	0,10	0,15	0,10	0,13	0,12	0,8.10 ³
254	0,13	0,14	0,13	0,21	0,16	0,17	0,16	1,0.10 ³
248	0,18	0,20	0,18	0,26	0,21	0,24	0,21	1,4.10 ³
240	0,37	0,36	0,37	0,49	0,34	0,42	0,39	2,6.10 ³
238	0,40	0,43	0,38	0,51	0,41	0,49	0,44	2,9.10 ³
234	0,45	0,41	0,39	0,55	0,44	0,55	0,47	3,1.10 ³

scheiden. Daarbij kristalliseert het eerst een stof uit, welke na algeheele zuivering een smeltpunt van 194° en een $[\alpha]_{20}^D = -6,03$ bezit. Dit product is het pseudo-auxine-a₁. Hiervan bereidden wij een oplossing met een concentratie van 500 mg/l. Het bleek, dat ook deze verbinding geen specifiek absorberend vermogen voor ultraviolet licht tusschen 230 en 400 m μ bezit.

Uit de moederloog van voornoemd kristallisaat kan men, echter in veel geringer opbrengst (hoogstens 10% van het totaal), een tweede stof isoleren, gekenmerkt door een smeltpunt van 196,5° en een $[\alpha]_{20}^D = +5,20$. Toen van dit pseudo-auxine-a₂ eveneens een oplossing van 500 mg/l was bereid en deze doorgemeten werd, kwam aan het licht, dat deze een weliswaar niet groote of bijzonder karakteristieke, maar toch goed meetbare absorptie vertoont. In figuur IX is deze weergegeven. Een reeks metingen, uitgevoerd met dezelfde

oplossing, had tot resultaat, dat wij mochtenaannemen, hier met een volkomen reëel verschijnsel te maken te hebben. De cijfers, waaruit de kromme is afgeleid, kloppen onderling behoorlijk, zooals uit tabel 7 blijkt.

Ofschoon dus uit de metingen kon worden opgemaakt, dat in deze oplossing een stof aanwezig moest zijn, welke de absorptie veroorzaakt, is later betwijfeld, of dit product het pseudo-auxine-a₂ zelve is, of een verontreiniging. In hoofdstuk IVA, waar wij op deze kwestie terugkomen in verband met het

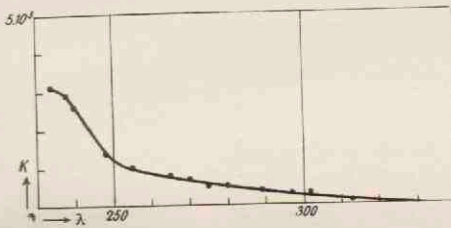


Fig. IX. Pseudo-auxine-a₂ in alcohol.

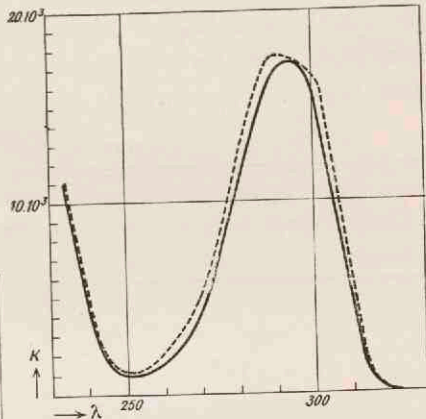
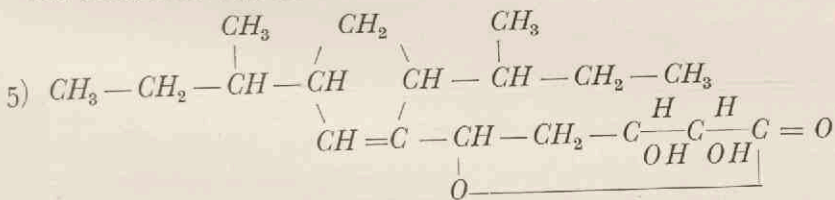


Fig. X. Getrokken: auxine-a-lacton in alcohol.
Gestippeld: dezelfde oplossing, na bestraling.

chemisch-analytisch onderzoek der pseudo-auxinen-a, zal een nader antwoord op deze vraag gegeven worden.

C. *Auxine-a-lacton en lumi-auxine-a-lacton.*

De constitutie van auxine-a-lacton is als volgt (2):



Er was voor ons derhalve geen aanleiding, te veronderstellen, dat het apparaat van Pohl ons omtrent de oplossingen dezer verbinding, welke zoo nauw verwant is aan het auxine-a zelve, veel nieuws zou leeren. Van een geheel werkzaam preparaat 7254 E

lostten wij 5 mg op in 10 cc alcohol (500 mg/l) en terstond daarna verrichtten wij de eerste absorptiemeting. *Merkwaardigerwijze echter bleek deze oplossing een karakteristieke absorptiekromme te bezitten.* Bij een reeks bepalingen met dit preparaat kwam deze steeds opnieuw tevoorschijn (zie figuur X); onderstaande tabel geeft de resultaten weer van een viertal metingen met vermelding der gelijktijdig bepaalde activiteiten.

TABEL 8. *Auxine-a-lacton in alcohol.*
Preparaat 7254 E; 500 mg/l.

Golf- lengte	Waarden van κ bij verschillende metingen met vermelding van gelijktijdig bepaalde activiteiten in milliarden AE/g				Gemiddelde waarde κ
	40	25	15	0	
313	$1,7 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
302	$13,1 \cdot 10^3$	$13,6 \cdot 10^3$	$13,9 \cdot 10^3$	$13,8 \cdot 10^3$	$13,6 \cdot 10^3$
297	$17,2 \cdot 10^3$	$17,0 \cdot 10^3$	$17,2 \cdot 10^3$	$17,1 \cdot 10^3$	$17,1 \cdot 10^3$
289	$16,6 \cdot 10^3$	$15,5 \cdot 10^3$	$17,7 \cdot 10^3$	$17,1 \cdot 10^3$	$16,7 \cdot 10^3$
280	$10,9 \cdot 10^3$	$10,8 \cdot 10^3$	$12,0 \cdot 10^3$	$11,2 \cdot 10^3$	$11,2 \cdot 10^3$
275	$7,1 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^3$	$7,6 \cdot 10^3$
270	$4,1 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$
265	$2,3 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
254	$0,8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
248	$0,9 \cdot 10^3$	$0,9 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
240	$4,3 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$
238	$6,7 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$
234	$10,7 \cdot 10^3$	$10,8 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$	$11,1 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$

De getrokken kromme in figuur X is afgeleid van de cijfers uit de laatste kolom van tabel 8; hieruit ziet men, dat de lacton-oplossing een uitgesproken absorptieband bezit tusschen de golflengten 250 en 325 $m\mu$. Een maximum bij circa 295 $m\mu$ is duidelijk op te merken; κ bereikt daar een waarde van ongeveer $17 \cdot 10^3$. Evenzoo is een minimum waar te nemen bij 250 $m\mu$, waar κ nog slechts $1 \cdot 10^3$ bedraagt, terwijl de waarde dezer constante bij nog korter golflengten wederom sterk toeneemt.

De physiologische werkzaamheid der oplossing blijkt geen invloed te hebben op het absorbeerend vermogen.

De verkregen resultaten waren zoo in strijd met de verwachtingen, dat wij alle reden hadden, te veronderstellen, dat het lacton in bepaalde opzichten zich geheel anders gedraagt dan het vrije zuur. Het is niet aan te nemen, dat het ontstaan van een lactonring zich op zoodanige wijze in het absorbeerend vermogen voor ultraviolet licht zal manifesteren, als hier is vastgesteld. Een plausibele verklaring was echter niet gemakkelijk te vinden.

Zoo werd besloten, de oplossing, welke zich tijdens de meting in de cuvet had bevonden en dus blootgesteld was geweest aan de straling van de kwarts-kwiklamp, nader op haar eigenschappen te onderzoeken. In de eerste plaats hebben wij de activiteit daarvan onderzocht, waaruit een nieuw merkwaardig feit aan den dag kwam:

De doorgemeten oplossing heeft steeds, ongeacht haar activiteit vóór de meting, voor minstens 80% haar werkzaamheid verloren.

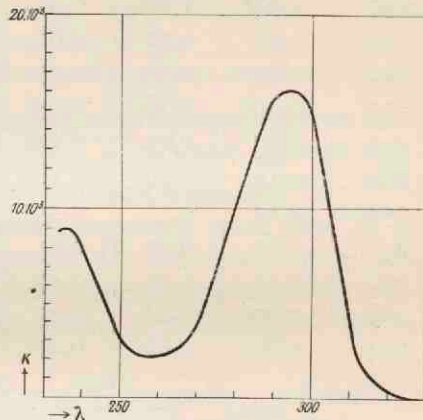


Fig. XI. Auxine-a-lacton in chloroform.

Om na te kunnen gaan, of wellicht het milieu een rol speelt bij dit onverwachte verschijnsel, bereidden wij een 200 mg/l-oplossing van auxine-a-lacton in chloroform. In tabel 9 zijn de resultaten van de hiermede uitgevoerde bepalingen samengevat, terwijl figuur XI ze grafisch weergeeft.

Uit het bovenstaande volgt, dat een groote overeenstemming der absorptiespectra bestaat in alcoholische en chloroform-oplossingen van auxine-a-lacton. De afwijkingen zijn gemakkelijk te verklaren uit den invloed van het oplosmiddel. Van groot belang is ook het feit, dat de oplossing, welke doorgemeten was, ook in deze gevallen steeds grootendeels of geheel onwerkzaam bleek te zijn geworden.

Wij hebben ons toen afgevraagd, of deze kunstmatige inactivering, blijkbaar veroorzaakt door de straling van de gebruikte lichtbron, beperkt is tot de oplossingen van auxine-a-lacton, of dat wellicht het

TABEL 9. *Auxine-a-lacton in chloroform.*
 Preparaat 7294 E; 200 mg/l.

Golf- lengte	Waarden van <i>h</i> bij verschillende metingen met vermelding van gelijktijdig bepaalde activiteiten in milliarden AE/g				Gem. waarde	Waarde κ
	50	50	37	19		
313	0,05	0,04	0,09	0,10	0,07	$1,9 \cdot 10^3$
302	0,79	0,85	0,83	0,93	0,85	$13,2 \cdot 10^3$
297	1,04	1,08	0,97	1,00	1,02	$15,8 \cdot 10^3$
289	0,98	1,11	0,88	0,96	0,98	$15,2 \cdot 10^3$
280	0,63	0,70	0,57	0,63	0,64	$9,8 \cdot 10^3$
275	0,49	0,46	0,35	0,34	0,41	$6,4 \cdot 10^3$
270	0,27	0,25	0,21	0,21	0,24	$3,7 \cdot 10^3$
265	0,15	0,18	0,18	0,17	0,17	$2,6 \cdot 10^3$
254	0,12	0,17	0,15	0,16	0,15	$2,3 \cdot 10^3$
248	0,20	0,27	0,25	0,26	0,25	$3,9 \cdot 10^3$
240	0,51	0,55	0,47	0,47	0,50	$7,7 \cdot 10^3$
238	0,60	0,64	0,49	0,50	0,56	$8,7 \cdot 10^3$
234	0,69	0,66	0,47	0,47	0,57	$8,8 \cdot 10^3$

vrije zuur dit gedrag ook vertoont. Wij hadden deze mogelijkheid bij auxine-a-oplossingen niet onder de oogen gezien, omdat er toen geen aanleiding bestond, haar in overweging te nemen. Nu was het echter van het grootste belang, een vergelijking te maken tuschen de gedragingen van het vrije zuur en het lacton onder soortgelijke omstandigheden. De resultaten van enkele daartoe uitgevoerde proeven, welke in de volgende tabel zijn opgenomen, toonen, dat inderdaad beide categorieën van stoffen op het punt van photochemische gevoeligheid zeer uiteenloopen.

Hiermede is komen vast te staan, dat de moleculen van het auxine-a-lacton, in tegenstelling tot die van het auxine-a, zéér gevoelig zijn voor zelfs geringe hoeveelheden licht. Enkele speciaal daartoe uitgevoerde proeven geven daarover een nog beter denkbeeld.

In de eerste plaats hebben wij getracht, vast te stellen, of de

TABEL 10. *Activiteiten auxine-a en auxine-a-lacton-oplossingen vóór en na de absorptiemeting.*

Preparaat	Vóór	Nà	Afneming activiteit
Auxine-a	{ 177 7 millrd AE/g	7 millrd AE/g	geen
	{ 203C 7 " "	9 " "	"
	{ 7394E 60 " "	54 " " ¹⁾	"
Auxine-a-lacton	{ 7254E 25 " "	0,0. . .	100%
	{ 7294E 50 " "	9 millrd AE/g	82%
	{ 7294E 19 " "	0,0. . .	100%

volgorde, waarin een absorptiemeting verricht werd, van invloed is op de resultaten daarvan. Zoo hebben wij, zoowel van oplossingen van preparaat 7254 E in alcohol, als van preparaat 7294 E in chloroform bepalingen uitgevoerd, waarbij begonnen werd met de golflengte 234 $m\mu$, inplaats van met 405 $m\mu$. De uitkomsten bleven geheel dezelfde, zoodat het blijkbaar geen verschil uitmaakt, met welke soort licht uit het ultraviolette *Hg*-spectrum de moleculen het eerst bestraald zijn.

Bij een oplossing van preparaat 7387 E (zie verderop) zijn wij aldus te werk gegaan: De monochromator werd terstond ingesteld op de lijn 297 $m\mu$; wij bepaalden toen de absorptie van de oplossing bij die golflengte en berekenden de waarde van κ , met het resultaat, dat deze bleek te bedragen 16,6.10³. Dit is geheel in overeenstemming met de uitkomsten van alle andere bepalingen, zoodat wij wel moeten aannemen, dat het auxine-a-lacton, zoodra het blootgesteld wordt aan de inwerking van ultraviolet licht, met practisch oneindig groote snelheid wordt omgezet in een verbinding, welke het karakteristieke absorptiespectrum vertoont, hetwelk wij steeds bij onze metingen registreeren.

Wij moeten derhalve vaststellen, dat *het niet mogelijk is op deze wijze het absorptiespectrum van auxine-a-lacton zelve te bepalen; er ontstaat tijdens*

¹⁾ Daar de nauwkeurigheid van de biologische test niet verder gaat dan tot op omstreeks 10—15%, mag in dit geval niet geconcludeerd worden tot een werkelijke vermindering der activiteit.

de meting een physiologisch onwerkzaam product, dat een karakteristieke absorptiekromme bezit.

Tenslotte hebben wij oplossingen van twee geheel actieve preparaten monochromatisch bestraald bij 405 en 365 $m\mu$; eerst gedurende 50 minuten, later gedurende 15 minuten. De intensiteiten van de gebruikte lichtbundels waren even groot, als bij de gewone metingen het geval placht te zijn. Wij controleerden dit, door de snelheid, waarmede een bepaalde uitslag van den electrometer werd bereikt, steeds met een chronometer te bepalen. In alle vier gevallen waren de oplossingen na afloop onwerkzaam geworden. Hoewel dus gebruik gemaakt was van lichtsoorten, welke blijkens absorptiemetingen ver buiten het gebied van de meetbare extincties waren gelegen, bleek de opgenomen hoeveelheid licht-energie, welke volgens de wet van Grotthus—Draper in ieder geval noodzakelijk is voor de photochemische omzetting, voldoende geweest te zijn, om de reactie te doen verlopen.

Deze laatste overweging bracht ons er toe, de gevonden resultaten met Prof. Dr. L. S. Ornstein te bespreken, die zoo vriendelijk was, ons zijn meening te kennen te geven, en daarbij te wijzen op het feit, dat er meer gevallen bestaan, waarin photochemische omzettingen plaats vinden bij bestraling met licht van golflengten, welke niet behooren tot het gebied der eigenlijk specifieke absorptie van een stof.

Wanneer wij dus in het kort resumeeren, hetgeen de tot dusverre verkregen resultaten ons hebben geleerd, dan luidt dit:

Het is niet mogelijk, van de physiologisch werkzame verbinding auxine-a-lacton een absorptiespectrum in het ultraviolet te bepalen, aangezien deze stof onder de inwerking van het voor dit onderzoek benodigde licht nagenoeg quantitatief en momentaan overgaat in een inactieve verbinding; deze laatste geeft de bij de metingen waargenomen absorptie.

Er doet zich nu de vraag voor, of dit op *kunstmatige wijze* verkregen inactieve product — waarvoor wij gemakshalve hier al den naam *lumi-auxine-a-lacton* willen gebruiken — identiek is met het op *natuurlijke wijze* bij de auto-inactivering gevormde.

Daarom leek het ons niet ondienstig, wat uitvoeriger na te gaan, of het absorptiespectrum van onwerkzaam geworden lacton overeen-

stemt met dat van de reeds onderzochte, nog geheel of gedeeltelijk actieve verbindingen. Om te beginnen geven wij daarom in de volgende tabel de resultaten weer van metingen, welke verricht zijn met de reeds eerder onderzochte oplossing van preparaat 7254 E, doch thans, nadat deze haar activiteit geheel verloren had. In fig. XII vindt men de absorptiekromme, samengesteld uit de cijfers van tabel II.

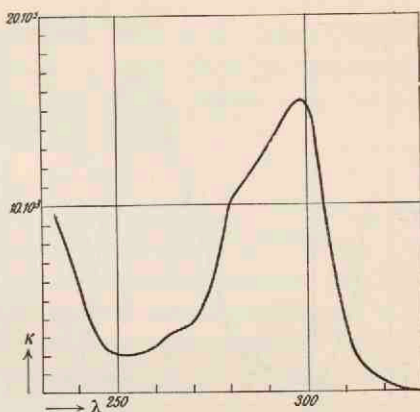


Fig. XII. Auxine-a-lacton, in alcoholische oplossing inactief geworden.

TABEL II. *Inactief auxine-a-lacton in alcohol.*
Preparaat 7254 E; 500 mg/l.

Golflengte	Gevonden waarden van κ		Gemiddelde waarde
313	$1,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
302	$13,9 \cdot 10^3$	$13,5 \cdot 10^3$	$13,7 \cdot 10^3$
297	$15,6 \cdot 10^3$	$14,9 \cdot 10^3$	$15,3 \cdot 10^3$
289	$12,5 \cdot 10^3$	$13,0 \cdot 10^3$	$12,8 \cdot 10^3$
280	$9,9 \cdot 10^3$	$10,5 \cdot 10^3$	$10,2 \cdot 10^3$
275	$6,2 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$
270	$3,6 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^3$
265	$3,3 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$
254	$1,9 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3$
248	$2,0 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$
240	$5,3 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$
238	$6,9 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$
234	$9,4 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$9,3 \cdot 10^3$

Zoals men ziet, kan men zeer zeker van een behoorlijke overeenstemming tusschen deze uitkomsten en die van de vorige bepalingen spreken. Toch zijn hier en daar afwijkingen op te merken, welke vermoedelijk hun ontstaan vinden in het gedurende langeren tijd bewaren

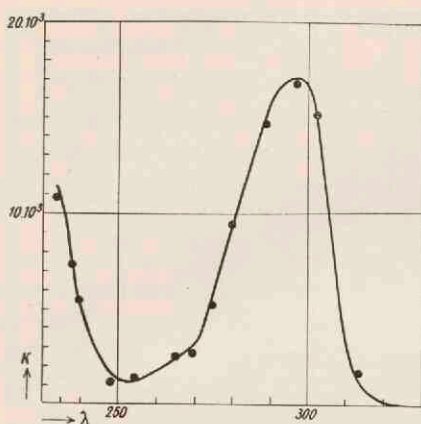


Fig. XIII. Getrokken lijn: oplossingen van inactief geworden lacton. Stippen: gemeten waarden van oplossingen van actief lacton.

van de oplossing. Wij hebben reeds eerder in het midden gebracht, dat het aanbeveling verdient, om bij voorkeur de absorptiespectra te bestudeeren van pas bereide oplossingen. Zoo zijn wij er dan ook toe overgegaan, een nieuwe reeks onderzoekingen ten uitvoer te leggen.

Allereerst hebben wij metingen verricht met oplossingen van auxine-a-lacton, hetwelk in vasten toestand zijn werkzaamheid had verloren. Daarbij werd gebruik gemaakt van producten, afkomstig

TABEL 12. „Natuurlijk” inactief auxine-a-lacton in alcohol. Preparaten 7294 E en 7347 E; verschillende concentraties.

Golf- lengten	Waarden van κ					Gemiddelde waarde κ
	no. 7294 E			no. 7347 E		
	201 mg/l 0,65 mmol/l	108 mg/l 0,35 mmol/l	92 mg/l 0,30 mmol/l	160 mg/l 0,52 mmol/l	100 mg/l 0,32 mmol/l	
313	$1,7 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
302	$14,6 \cdot 10^3$	$14,9 \cdot 10^3$	$15,2 \cdot 10^3$	$14,5 \cdot 10^3$	$17,0 \cdot 10^3$	$15,2 \cdot 10^3$
297	$16,4 \cdot 10^3$	$16,9 \cdot 10^3$	$17,2 \cdot 10^3$	$16,3 \cdot 10^3$	$18,6 \cdot 10^3$	$17,1 \cdot 10^3$
289	$13,5 \cdot 10^3$	$15,2 \cdot 10^3$	$15,2 \cdot 10^3$	$14,2 \cdot 10^3$	$16,4 \cdot 10^3$	$14,9 \cdot 10^3$
280	$7,8 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$10,2 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$
275	$5,9 \cdot 10^3$	$5,7 \cdot 10^3$	$5,7 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$
270	$2,3 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$
265	$2,2 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$
254	$0,8 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
248	$1,2 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
240	$4,8 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$
238	$6,4 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$
234	$9,9 \cdot 10^3$	$11,1 \cdot 10^3$	$11,8 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$	$13,0 \cdot 10^3$	$11,3 \cdot 10^3$

van twee verschillende urine-opwerkingen, terwijl de concentraties thans willekeurig gekozen zijn. In tabel 12 vindt men de resultaten samengevat, terwijl in figuur XIII de curve is geteekend, waaraan de gemiddelde waarden van κ ten grondslag liggen:

De groote overeenkomst tusschen de krommen uit de figuren X en XIII valt terstond in het oog. In laatstgenoemde teekening zijn bovendien de punten weergegeven, welke corresponderen met de gemiddelde waarden van κ , gevonden bij een tweetal metingen van oplossingen van geheel actief auxine-a-lacton (preparaten 7347 E en 7387 E), waarvan de resultaten uitvoeriger in de volgende tabel staan opgeteekend:

TABEL 13. *Actief auxine-a-lacton in alcohol.*
Preparaten 7347 E en 7387 E; verschillende concentraties.

Golf- lengten	Waarden van κ		Gemiddelde waarde κ
	no. 7347 E 120 mg/l (0,39 m.mol/l)	no. 7387 E 116 mg/l (0,37 m.mol/l)	
313	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
302	$15,5 \cdot 10^3$	$15,1 \cdot 10^3$	$15,3 \cdot 10^3$
297	$17,1 \cdot 10^3$	$16,6 \cdot 10^3$	$16,9 \cdot 10^3$
289	$15,2 \cdot 10^3$	$14,4 \cdot 10^3$	$14,8 \cdot 10^3$
280	$9,8 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$
275	$5,3 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$
270	$2,8 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^3$
265	$2,8 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
254	$1,6 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$
248	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$
240	$5,4 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$
238	$7,5 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$
234	$11,1 \cdot 10^3$	$10,7 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$

Wij kunnen nu derhalve vaststellen, dat oplossingen van actief auxine-a-lacton, waaruit tijdens de meting lumi-auxine-a-lacton ont-

staat, gelijke absorptiespectra vertoonen als oplossingen van door auto-inactivering ontstaan product.

Het zou evenwel een nog grooter steun voor de opvatting betreffende de identiteit van beide onwerkzame verbindingen zijn, indien het mogelijk was, lumi-auxine-a-lacton zelf in handen te krijgen en de eigenschappen van deze stof te vergelijken met het „natuurlijke” onwerkzame lacton. Te dien einde hebben wij getracht op grooter schaal eerstgenoemde verbinding te bereiden door bestraling van oplossingen van auxine-a-lacton.

Wij zijn begonnen met enkele cc van een nog gedeeltelijk actieve oplossing (van preparaat 7254 E) als volgt te behandelen: Nadat deze hoeveelheid in een kwarts-reageerbuisje was overgebracht, verdreven wij de lucht daaruit met behulp van stikstof en sloten de buis met een kurkje af. Nu werd gedurende 15 minuten de inhoud aan alle kanten bestraald met het volle licht van onze kwiklamp; vervolgens namen wij op de gewone wijze een absorptiespectrum op. Dit staat weergegeven in figuur X met behulp van de gestippelde curve. Hieruit volgt, dat een dergelijke bewerking de opgeloste stof blijkbaar niet verder omzet tot dan lumi-auxine-a-lacton, de verbinding derhalve, waar het ons om te doen was.

Hierna zijn wij er toe overgegaan, de proef te herhalen met oplossingen, bevattend 20—25 mg actief auxine-a-lacton in 2—3 cc alcohol. Wij zetten de bestraling voort, totdat alle activiteit geheel verdwenen was, hetgeen somtijds een herhaling van deze bewerking noodzakelijk maakte. Na verdamping van het oplosmiddel hielden wij een eenigzins grauw gekleurde kristal massa over, welke echter door omkristalliseeren uit aether-alcohol 1 : 1 gezuiverd kon worden en dan geheel kleurloos werd. Het smeltpunt bedraagt dan 172° , hetwelk overeenstemt met dat van het product der auto-inactivering, terwijl een mengsmeltpunt geen depressie te zien geeft. Deze feiten stemden ons al zeer hoopvol; wij hebben toen enkele milligrammen lumi-auxine-a-lacton in alcohol opgelost (176 mg/l) en een absorptiespectrum daarvan opgenomen. De resultaten ziet men vereenigd in tabel 14, waar ook de uitkomsten van tabel 12 zijn opgenomen ter vergelijking. In figuur XIV vindt men de absorptiekromme geteekend, welke behoort tot deze laatstgenoemde serie en daarbij zijn de cijfers van onze laatste meting door stippen aangegeven:

TABEL 14. *Lumi-auxine-a-lacton in alcohol.*

Preparaat 7378 E; conc. 176 mg/l.

Golflengte	Waarde κ (0,57 mmol/l)	Waarde κ uit tabel 12
313	$1,8 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
302	$15,0 \cdot 10^3$	$15,2 \cdot 10^3$
297	$16,7 \cdot 10^3$	$17,1 \cdot 10^3$
289	$13,9 \cdot 10^3$	$14,9 \cdot 10^3$
280	$9,1 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$
275	$5,6 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$
270	$2,6 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$
265	$1,9 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$
254	$0,9 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
248	$1,1 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
240	$4,6 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$
238	$5,6 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$
234	$11,0 \cdot 10^3$	$11,3 \cdot 10^3$

Het staat thans wel vast, dat lumi-auxine-a-lacton en het product dat bij de auto-inactivering ontstaat, identieke absorptie-spectra bezitten. In hoeverre zij ook in andere opzichten gelijk zullen blijken te zijn, zal nader in hoofdstuk IV B behandeld worden.

Wij zullen, alvorens deze paragraaf over auxine-a-lacton te besluiten, ons nog bezig hebben te houden met een probleem, dat niet het minst interessante is geweest, hetwelk wij bij onze bestudering der absorptie-spectra ontmoet hebben. Het betreft hier de reeds in een vroegere publicatie (2) beschreven mutarotatie, welke zich manifesteert

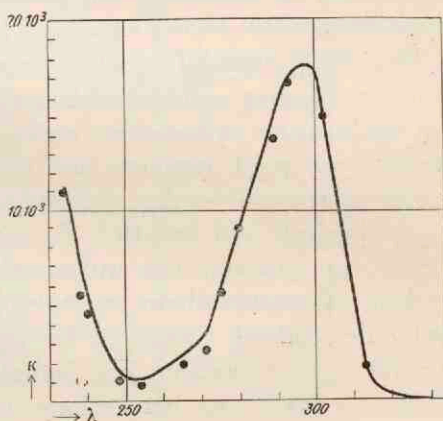


Fig. XIV. Getrokken lijn: oplossingen van inactief geworden lacton. Stippen: gemeten waarden van een lumi-auxine-a-lacton-oplossing.

in 96% alcoholische oplossingen van auxine-a en zijn lacton. Indertijd is al gevonden, dat de instelling van het lacton-zuur-evenwicht in een dergelijk milieu na eenige uren is voltooid. Op grond van dit feit concludeerden K ö g l, E r x l e b e n en H a a g e n S m i t, dat een hydroxylgreep op de δ -plaats in de zuurstofhoudende zijketen aanwezig moet zijn.

Het is daarom hoogst merkwaardig, dat bij de bestudeering van de absorptie-spectra van bovengenoemde verbindingen, welke eveneens geschiedde in 96% alcoholische oplossing, van dit verschijnsel nooit iets te bemerken is geweest. Men zal zich herinneren, dat wij in den beginne steeds de oplossingen gedurende langeren tijd bewaarden om na te gaan, of tijdens de inactivering der opgeloste stof producten zouden ontstaan, welke zich kenmerkten door hun specifieke absorptie. Evenzoo min als het ontstaan van zulke verbindingen waargenomen kon worden, was er sprake van, dat in oplossingen van auxine-a na verloop van een zekeren tijd de vorming van een bepaalde hoeveelheid lacton viel waar te nemen, of dat in auxine-a-lacton-oplossingen na verloop van enkele uren een afnemen der absorptie viel te bespeuren tengevolge van het ontstaan van het zuur, hetwelk geen ultraviolet licht absorbeert.

De verklaring kan niet gezocht worden in eventuele proeffouten; langs den weg van het polarimetrisch onderzoek was immers aangetoond, dat na instelling van het evenwicht ongeveer 60% van de opgeloste stof uit lacton en 40% uit zuur bestaat.

Het enige verschil tusschen de vroeger uitgevoerde mutarotatieproeven en onze optische onderzoekingen is gelegen in het feit, dat wij werkten met oplossingen, welke een concentratie hadden van ten hoogste 500 mg/l opgeloste stof, terwijl de proeven met den polarimeter uitgevoerd werden met oplossingen, welke ten minste 80.000 mg/l opgeloste stof bevatten. In verband hiermede hebben wij een viertal experimenten ten uitvoer gelegd met de bedoeling, te onderzoeken, of inderdaad de concentratie der oplossingen een factor is, welke de snelheid, waarmede het lacton-zuur-evenwicht in oplossing bereikt wordt, zoodanig kan beïnvloeden, dat bij de door ons verrichte metingen van het verloop der reactie in het geheel niets te merken was.

De uitvoering van de nu volgende proeven was aldus: Er werd zooveel auxine-a of auxine-a-lacton in alcohol (96%) opgelost, dat

ongeveer een tienprocents-oplossing verkregen werd. Nu ging men polarimetrisch het verloop der mutarotatie volgen, totdat vastgesteld kon worden, dat het evenwicht bereikt was. Daarna verdunden wij, totdat de concentratie zóódanig was geworden, dat een absorptiemeting met voldoende nauwkeurigheid kon worden uitgevoerd. De dan gevonden extincties zouden moeten uitmaken, of thans wél overeenstemming bestond tusschen de polarimetrische en spectraalanalytische bepalingen.

Het zal blijken, dat dit inderdaad het geval is:

Proef 1. 20,0 mg lacton werden opgelost in 0,244 cc alcohol. Na zes uren staan, bleek de optische draaiing niet meer te veranderen. Daarna verdunden wij, tot de concentratie, berekend op de oorspronkelijke ingewogen hoeveelheid lacton, 328 mg/l was geworden. De meting van het absorptiespectrum gaf het resultaat, zooals vermeld staat in de volgende tabel (kolom 2):

TABEL 15. *Auxine-a en auxine-a-lacton in alcohol.*
Na instelling van het mutarotatie-evenwicht.

Golflengten	Prep. 7393 E (lacton) Waarde h	Prep. 7398 E (zuur) Waarde h
313	0,10	0,10
302	0,79	0,74
297	0,96	0,86
289	0,80	0,73
280	0,54	0,49
275	0,30	0,28
270	0,16	0,13
265	0,13	0,12
254	0,06	0,07
248	0,08	0,09
240	0,29	0,27
238	0,41	0,37
234	0,48	0,54

Berekent men uit de cijfers van de tweede kolom de moleculaire absorptieconstante van auxine-a-lacton, dan krijgt men de waarden,

welke aan curve I van figuur XV ten grondslag liggen. Vergelijkt men deze met kromme II, voorstellende het verloop der absorptie

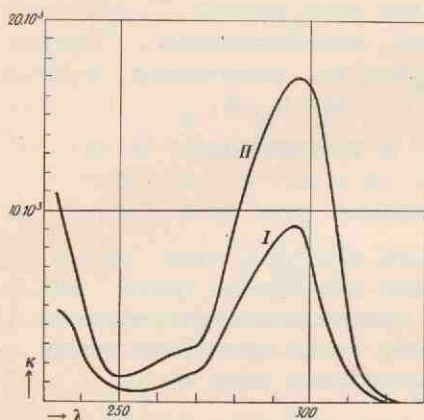


Fig. XV. I. Absorptiekromme, berekend uit de waarden gevonden bij een oplossing van auxine-a-lacton, na instelling van het mutarotatie-evenwicht. II. Absorptiekromme van auxine-a-lacton in zeer verdunde oplossing.

van een gewone verdunde oplossing van auxine-a-lacton, dan ziet men terstond, dat tengevolge van de mutarotatie in de geconcentreerde oplossing inderdaad een deel van de licht-absorbeerende stof is verdwenen en omgezet is in een product, dat de ultraviolette straling ongehinderd doorlaat. Dit laatste is natuurlijk niets anders dan het auxine-a.

Men kan omgekeerd uit de gevonden waarden van h , gebruik makende van de uit vele proeven thans bekende grootte van κ , de concentratie aan lacton berekenen. Wij doen dit bij de golflengte $297 \mu\mu$, waar de maximum-absorptie optreedt:

$$\kappa = \frac{h \times 10}{c} \quad (c = \text{mol/l})$$

$$c = \frac{h \times 10}{\kappa} =$$

$$= \frac{0,96 \times 10}{17,0 \times 10^3} = \frac{9,6}{17,0 \times 10^3} \text{ mol/l} = \frac{9,6 \times 310 \times 10^3}{17 \times 10^3} \text{ mg/l} = 175 \text{ mg/l}$$

Het resultaat van de berekening is, dat de oplossing nog 175 mg/l lacton bevat. De overige 153 mg/l is dus in het zuur omgezet, waarvan derhalve 162 mg/l gevormd moet zijn. De samenstelling van de opgeloste stof is dus, in procenten uitgedrukt: 53% lacton en 47% zuur.

De biologische test van de doorgemeten oplossing had tot resultaat, dat de werkzaamheid der opgeloste stof 25—26 milliardiard AE/g bleek te bedragen. Gezien het feit, dat het lacton grootendeels onwerkzaam geworden moet zijn door de absorptiemeting, klopt dit resultaat met bovenstaande cijfers. Ook de overeenstemming met de uitkomsten der polarimetrische analyse is bevredigend te noemen.

Proef 2. Ditmaal werden 21,8 mg auxine-a opgelost in 0,318 cc alcohol; nadat de instelling van het evenwicht tot stand was gekomen, verdunden wij wederom. De concentratie, berekend op de hoeveelheid ingewogen zuur, bedroeg nu 274 mg/l. Het resultaat van de absorptiemeting staat in de derde kolom van tabel 15 ver-

meld; opnieuw kan men de concentratie aan lacton berekenen: deze blijkt te zijn 157 mg/l. Hiertoe moet 166 mg/l zuur zijn omgezet; er is dus in oplossing nog aanwezig 108 mg/l. De verhouding lacton: zuur is in dit geval dus 59% : 41%, hetgeen een prachtige bevestiging van de resultaten van vroegere polarimetrische onderzoeken is. De test van de doorgemeten oplossing leverde als resultaat, dat de activiteit van de opgeloste stof in dit geval 26—27 milliard AE/g bedroeg. Dit is ook in goede overeenstemming met de door ons gevonden waarden van de absorptieconstante h .

In figuur XVI stelt kromme *I* wederom de moleculaire absorptie voor, berekend uit de cijfers van kolom 3 van tabel 15; kromme *II* dient ter vergelijking, zooals in de vorige tekening ook geschied is.

Proef 3. 19,8 mg lacton werden opgelost in 0,326 cc alcohol; nadat het evenwicht zich had ingesteld, werd verdund, totdat de concentratie, berekend op ingewogen lacton, 244 mg/l was geworden. De absorptiemeting, welke hier niet in haar geheel meer behoeft te worden weergegeven, leerde, dat h bij 297 $m\mu$ 0,82 bedroeg. Daaruit volgt, dat de lacton-concentratie 150 mg/l was geworden; de rest van deze stof, bedragende 94 mg/l, had zich omgezet in zuur, waarvan 99 mg/l was gevormd. De procentuele verhouding der componenten van de opgeloste stof was dus 60% lacton tegen 40% zuur. Opnieuw derhalve een resultaat, dat goed klopt met de vroeger gevonden waarden.

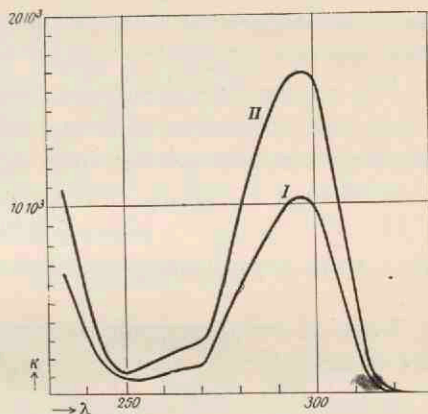


Fig. XVI. *I.* Absorptiekromme, berekend uit de waarden gevonden bij een oplossing van auxine-a, na instelling van het mutarotatie-evenwicht.
II. Absorptiekromme van auxine-a-lacton in zeer verdunde oplossing.

Proef 4. In 0,252 cc alcohol losten wij 22,2 mg auxine-a op; de instelling van het mutarotatie-evenwicht werd afgewacht en daarna verdunden wij, tot het gehalte der oplossing 352 mg/l (berekend op ingewogen zuur) was geworden. Voor h bij 297 $m\mu$ werd gevonden 1,12, hetwelk na berekening neer blijkt te komen op een concentratie van 204 mg/l lacton, welke hoeveelheid ontstaan moet zijn uit 216 mg/l zuur. Er is dus nog in oplossing 136 mg/l auxine-a. De in procenten uitgedrukte samenstelling van de opgeloste stof is derhalve 60% lacton en 40% zuur. Ook dit resultaat is in zeer goede overeenstemming met beide vorige en ook met de uitkomsten op grond van de polarimetrische analyse.

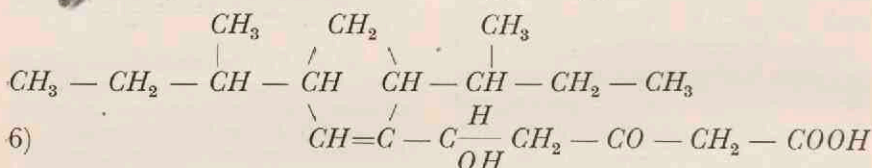
In verband met bovenstaande experimenten is het duidelijk geworden, dat inderdaad de snelheid, waarmede het evenwicht zuur-

lacton zich in oplossing instelt, afhankelijk is van de concentratie. Bij een bespreking over deze kwestie, was Dr. A. L. Th. M o e s v e l d zoo vriendelijk, ons er op te wijzen, dat zijns inziens deze snelheid afhankelijk zou kunnen zijn van de waterstof-ionenconcentratie. Aangezien het auxine-a zelf aan de oplossing *H*-ionen afstaat, wordt het verklaarbaar, waarom de concentratie van de opgeloste stof zelve een dergelijken uitgesproken invloed op de reactiesnelheid kan uitoefenen. Wij zouden dus in ons geval met een dergelijk feit te maken hebben, als reeds in 1892 door H e n r y en C o l l a n is gevonden bij γ -oxyboterzuur en γ -oxyvaleriaan-zuur (10), (11), waarbij auto-katalyse, tengevolge van de door de opgeloste stof zelf gevormde *H*-ionen een rol blijkt te spelen.

Wij zouden feitelijk nog eens moeten nagaan, of de snelheid, waarmede het evenwicht zich in verdunde oplossing instelt, door toevoeging van een weinig zuur ook niet een meetbare grootte kan verkrijgen.

C. . *Auxine-b* en *pseudo-auxine-b*.

Voor de eerstgenoemde verbinding hebben K ö g l en E r x l e b e n de volgende structuurformule afgeleid (4):



Hieruit ziet men, dat, inplaats van de oxy-groepen op de α - en β -plaats in den zuurstofhoudenden zijketen, een keto-groep op de β -plaats alléén aanwezig is. Men kan zich daarom *auxine-b* uit -a gevormd denken door afsplitsing van water tusschen de α - en β -oxy-groepen. Inderdaad is het mogelijk, door behandeling van het *auxine-a*-lacton met kaliumbisulfaat bij hoogere temperatuur, dit om te zetten in het *auxine-b*-lacton en dus ook in *auxine-b* zelf (12). Een aldus verkregen product noemen wij, ter onderscheid van uit natuurlijke grondstoffen geïsoleerde stof (zie hoofdstuk II), „künstmatig bereid” *auxine-b*.

Wij zijn begonnen, met oplossingen van natuurlijk en künstmatig

bereid product in 96% alcohol in een concentratie van 500 mg/l op haar absorptiespectrum in het ultraviolet te onderzoeken. Met geregelde tusschenpoozen zijn metingen verricht, zooals wij dat aanvankelijk met auxine-a en auxine-a-lacton ook gedaan hebben. Terwijl wij ook in die gevallen tenslotte er de voorkeur aan moesten geven, steeds versch bereide oplossingen voor ons werk te gebruiken, bleek het bij de bestudeering van auxine-b-preparaten terstond, dat wij de gevolgde methode vaarwel moesten zeggen. De veranderingen, welke zich na enkele dagen reeds manifesteerden in de gedaanten der krommen, maakten het duidelijk, dat wij op deze manier nooit een goed beeld van het verloop der auto-inactivering zouden kunnen verkrijgen, vooral toen bleek, dat ook na het verdwijnen der activiteit, deze verschijnselen nog steeds vielen waar te nemen.

Daarom geven wij van deze serie bepalingen alleen de uitkomsten weer, verkregen bij de eerste meting. Men kan ze vinden in de tweede en derde kolom van tabel 16; de preparaten 7306 E en 7311 E waren toen nog volkomen werkzaam. (Zie ook curve 1 van figuur XVII).

De bovengenoemde ervaringen leidden er toe, dat wij verder uit-

TABEL 16. *Auxine-b in aethylalcohol.*
Preparaten 7306 E, 7311 E, 7344 E, 7346 E, 7464 E.

Golf- lengte	Waarden van κ bij verschillende concentraties.							
	500 mg/l	500 mg/l	256 mg/l	202 mg/l	192 mg/l	186 mg/l	166 mg/l	106 mg/l
289	$0,2 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^3$	—
280	$0,9 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
275	$1,8 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
270	$4,5 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$
265	$5,5 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$	$6,3 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$
254	$18,6 \cdot 10^3$	$17,9 \cdot 10^3$	$29,2 \cdot 10^3$	$31,3 \cdot 10^3$	$30,7 \cdot 10^3$	$30,8 \cdot 10^3$	$31,6 \cdot 10^3$	$31,6 \cdot 10^3$
248	$13,4 \cdot 10^3$	$13,6 \cdot 10^3$	$25,9 \cdot 10^3$	$32,7 \cdot 10^3$	$33,1 \cdot 10^3$	$33,8 \cdot 10^3$	$33,8 \cdot 10^3$	$43,6 \cdot 10^3$
240	$11,6 \cdot 10^3$	$11,7 \cdot 10^3$	$23,0 \cdot 10^3$	$29,0 \cdot 10^3$	$29,0 \cdot 10^3$	$29,5 \cdot 10^3$	$31,6 \cdot 10^3$	$43,6 \cdot 10^3$
238	$10,8 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$	$21,4 \cdot 10^3$	$26,8 \cdot 10^3$	$27,9 \cdot 10^3$	$28,0 \cdot 10^3$	$27,6 \cdot 10^3$	$38,6 \cdot 10^3$
234	$9,1 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$18,7 \cdot 10^3$	$23,6 \cdot 10^3$	$23,1 \cdot 10^3$	$23,5 \cdot 10^3$	$22,2 \cdot 10^3$	$29,8 \cdot 10^3$

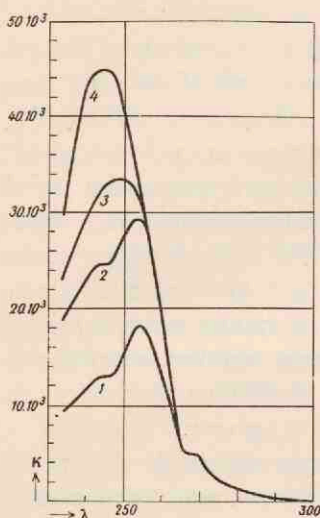


Fig. XVII. Auxine-b
in alcohol.

- 1: 500 mg/l; 2: 256 mg/l;
3: 186 mg/l; 4: 106 mg/l.

sluitend pas bereide oplossingen voor ons onderzoek gebruikten. Wij hebben de volgende preparaten, alle bestaande uit volkomen actief materiaal, op hun absorptiespectrum bestudeerd:

7344 E (uit mout); 7346 E (uit lacton);
7464 E (uit lacton).

De concentraties waren willekeurig gekozen; het bleek al spoedig, dat deze van grooten invloed zijn op het absorptiespectrum, zoodat wij een heele serie bepalingen uitgevoerd hebben, teneinde een duidelijk beeld van dezen samenhang te verkrijgen. De resultaten van een en ander vindt men in tabel 16 vereenigd.

Richten wij allereerst onze aandacht op de tweede en derde kolom daarvan, dan merken wij op, dat de ultraviolet-absorptiespectra van natuurlijk en kunstmatig bereid auxine-b practisch aan elkaar gelijk blijken te zijn. Dit wijst dus ook op de identiteit van beide producten en is een bevestiging van de conclusies, waartoe men op grond van het chemisch onderzoek reeds was gekomen. In curve I van figuur XVII ziet men, hoe het verloop van de absorptie in het ultraviolet is. Het is duidelijk, dat hier een geheel ander beeld verkregen wordt, dan bij auxine-a het geval is. Men onderscheidt drie banden: een zeer karakteristieke met een maximum bij circa 255 $m\mu$ en twee minder uitgesprokene met maxima bij ongeveer 270 en 245 $m\mu$.

Gezien de ervaringen, opgedaan bij het auxine-a-lacton, hebben wij terstond gecontroleerd, of ook in deze gevallen door het ultraviolette licht de activiteit der oplossingen beïnvloed was. *Dit bleek echter niet het geval te zijn.* Tabel 17 geeft daarvan het bewijs.

Wij mogen dus vaststellen, dat het gevonden absorptie-spectrum inderdaad bij het auxine-b behoort. Het was daarom zeer merkwaardig, toen aan den dag kwam, dat blijkbaar de concentratie der opgeloste stof van grooten invloed op het absorberend vermogen is.

TABEL 17. *Activiteit auxine-b-oplossingen.*
Vóór en nà de absorptiemetingen.

Preparaat	Werkzaamheid in milliarden AE/g	
	vóór	nà
7306 E	70	67
7311 E	58	63
7306 E	49	51

Bij nadere beschouwing van de cijfers in tabel 16 zal men zien, dat dit speciaal het geval is bij de golflengten 234—254 $m\mu$, voor zoover het dan betreft het gebied, dat wij bestudeerd hebben. Tusschen 289 en 265 $m\mu$ verandert de absorptie niet met de verdunning. Voor deze golflengten zou men dus met recht kunnen spreken van een moleculaire absorptie, in overeenstemming met de door B e e r opgestelde wet. Gemakshalve zullen wij daarom voor dit gebied de reeks gemiddelde waarden voor κ afleiden uit de bij de verschillende metingen gevonden getallen.

TABEL 18. *Waarden van κ bij verschillende concentraties van auxine-b in het gebied 289—265 $m\mu$.*

Golflengten	Gemiddelde waarde κ
289	0,3.10 ³
280	1,3.10 ³
275	2,1.10 ³
270	4,8.10 ³
265	5,8.10 ³

Deze waarden liggen ook ten grondslag aan het gemeenschappelijk stuk van de krommen 1 tot en met 4 in figuur XVII.

Beneden 265 $m\mu$ wordt het absorbeerend vermogen der auxine-b-

oplossingen zeer sterk beïnvloed door de concentratie. Dit uit zich in dien zin, dat de absorptie relatief toeneemt bij grotere verdunning. Men houde in het oog, dat in tabel 16 overal de grootte κ is berekend, hoewel feitelijk van een *moleculaire constante* geen sprake is. Dit is slechts geschied, teneinde het bovengenoemde effect der verdunning goed te laten uitkomen. Men moet dus bedenken, dat voor elke concentratie apart een curve geteekend behoort te worden, welke het verband tusschen κ en de golflengte aangeeft. Dit nu zou een onoverzichtelijke figuur hebben gegeven, zoodat wij volstaan met de krommen voor de navolgende verdunningen te reproduceeren:

Kromme 1: 500 mg/l (1,61 mmol/l)

Kromme 2: 256 mg/l (0,83 mmol/l)

Kromme 3: 186 mg/l (0,60 mmol/l)

Kromme 4: 106 mg/l (0,34 mmol/l)

Bij de beschouwing van figuur XVII valt het volgende op: De absorptie neemt toe bij kleiner worden van de concentratie met dien verstande, dat de ligging van het maximum tevens verschuift naar het gebied van de kortere golflengten. Bij een oplossing, bevattend 500 mg/l auxine-b ligt het maximum bij $255 \text{ m}\mu$, terwijl κ_{max} ongeveer $18 \cdot 10^3$ bedraagt; is het gehalte slechts 106 mg/l, dan is het maximum verplaatst naar een punt, gelegen bij omstreeks $245 \text{ m}\mu$ en de grootte van κ_{max} is dan geworden circa $45 \cdot 10^3$. Men krijgt den indruk, alsof de absorptieband, die bij kromme 1 slechts ternauwernood merkbaar is door een knik van de lijn bij $240\text{--}245 \text{ m}\mu$, in het laatste geval een alles beheerschende rol is gaan spelen, zóódanig, dat zelfs de top bij $255 \text{ m}\mu$ geheel onzichtbaar is geworden.

Wij zullen thans eerst de resultaten bespreken, welke het onderzoek van pseudo-auxine-b heeft opgeleverd. De volgende tabel geeft een reeks uitkomsten weer, welke zijn verkregen op dezelfde wijze, als bij de bestudeering van auxine-b is gevolgd.

Ook hier kan men duidelijk twee gebieden onderscheiden: van $289\text{--}265 \text{ m}\mu$ verandert de moleculaire absorptie niet met de concentratie, zoodat hier aan de wet van Beer voldaan wordt, terwijl van $234\text{--}254 \text{ m}\mu$ de waarden van κ weer sterk afhankelijk zijn van den verdunningsgraad. In figuur XVIII is wederom een serie absorptiekrommen geteekend, elk behoorend bij een bepaalde concentratie; voor het gebied $289\text{--}265 \text{ m}\mu$ bezitten zij een gemeenschappelijk

TABEL 19. *Pseudo-auxine-b* in aethylalcohol.

Preparaten 7344 E, 7346 E en 7464 E.

Golflengte	Waarden van κ bij verschillende concentraties				
	500 mg/l	180 mg/l	140 mg/l	128 mg/l	114 mg/l
289	$0,3 \cdot 10^3$	—	$0,4 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^3$	—
280	$1,0 \cdot 10^3$	$0,9 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3$
275	$2,4 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$
270	$4,8 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$
265	$6,0 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$
254	$18,2 \cdot 10^3$	$30,0 \cdot 10^3$	$32,8 \cdot 10^3$	$33,2 \cdot 10^3$	$31,3 \cdot 10^3$
248	$13,7 \cdot 10^3$	$33,2 \cdot 10^3$	$40,1 \cdot 10^3$	$43,4 \cdot 10^3$	$44,8 \cdot 10^3$
240	$11,3 \cdot 10^3$	$31,0 \cdot 10^3$	$38,5 \cdot 10^3$	$42,6 \cdot 10^3$	$46,2 \cdot 10^3$
238	$11,0 \cdot 10^3$	$28,9 \cdot 10^3$	$36,8 \cdot 10^3$	$38,5 \cdot 10^3$	$41,9 \cdot 10^3$
234	$9,2 \cdot 10^3$	$26,7 \cdot 10^3$	$31,7 \cdot 10^3$	$33,2 \cdot 10^3$	$38,9 \cdot 10^3$

stuk, hetwelk afgeleid is uit de gemiddelde waarden van κ , berekend uit de getallen van tabel 19:

Kromme 1: 500 mg/l (1,61 mmol/l)

Kromme 2: 180 mg/l (0,58 mmol/l)

Kromme 3: 140 mg/l (0,45 mmol/l)

Kromme 4: 114 mg/l (0,37 mmol/l)

De overeenstemming tusschen beide figuren toont aan, dat de auto-inactivering niet van invloed is op de absorptie in het ultra-violet; de afhankelijkheid van deze eigenschap van de concentratie is in beide gevallen zeer karakteristiek. Hoogstens zou men kunnen opmerken, dat de toename bij pseudo-auxine-b nog iets sterker is waar te nemen dan bij het auxine-b zelve (vgl. de curven 4 uit beide

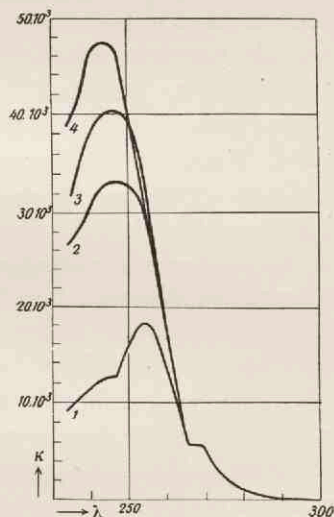


Fig. XVIII. *Pseudo-auxine-b* in alcohol.

1: 500 mg/l; 2: 180 mg/l;
3: 140 mg/l; 4: 114 mg/l.

teekeningen), maar aan den aard van het effect verandert dit niets.

Men krijgt den indruk, dat zoowel bij auxine-b als pseudo-auxine-b in alcoholische oplossing een evenwicht bestaat tusschen een uitgesproken licht-absorbeerenden vorm en een vorm, welke geen of slechts zwakke absorptie vertoont, terwijl de ligging van dat evenwicht in hooge mate afhankelijk zou moeten zijn van de concentratie. Vanzelf richt men dan zijn gedachten op de mogelijkheid van de keto-enol-tautomerie, welke bij een stof als auxine-b (een β -ketozuur) op zichzelf zeer goed bestaanbaar geacht moet worden. Maar terstond rijst dan het volgende bezwaar tegen deze verklaring: de oplossingen van auxine-b geven niet de voor enolen zoo karakteristieke reactie met ferrichloride, zooals vroeger reeds verschillende malen is opgemerkt (3), (13). Op grond van de resultaten van ons optisch onderzoek besloten wij echter, deze proef nog eens te herhalen. Daar toevallig op dat oogenblik geen werkzaam auxine-b aanwezig was, doch wel inactief product, herhaalden wij het experiment met een pseudo-auxine-b-oplossing. Merkwaardigerwijze bleek deze verbinding wèl te reageeren en zelfs in zeer groote verdunning nog behoorlijk zichtbare verkleuringen te geven. Maar dit nam niet weg, dat de juistheid van de proeven met actief auxine-b hierdoor allermint in twijfel mochten getrokken worden. Zoodra weer eenige milligrammen van deze verbinding waren verkregen, bleek dan ook, dat het actieve product inderdaad niet met $FeCl_3$ -oplossing reageert.

Bij de experimenten met pseudo-auxine-b was het ook niet mogelijk, vast te stellen, dat de intensiteit van de verkleuring relatief toeneemt bij grootere verdunning. Bij groote concentraties bleek het toegevoegde reagens ontledend te werken, aangezien na eenige oogenblikken onder gasontwikkeling de kleur verdween, om pas terug te komen, nadat nieuw pseudo-auxine-b was toegevoegd.

In elk geval is het duidelijk, dat de keto-enol-tautomerie zonder meer niet een verklaring kon geven van de resultaten van het optisch onderzoek. Het ligt echter voor de hand dat wij toen onze aandacht richtten op het klassieke voorbeeld, waarbij dit verschijnsel het best is bestudeerd: de acetylazijnester. De vraag was, of bij deze verbinding soortgelijke eigenschappen, als gevonden bij auxine-b en pseudo-auxine-b, ooit zijn vastgesteld.

Bij de bestudeering van de litteratuur, viel al spoedig onze aandacht op een artikel van K. H. Meyer en Kappelmeier (14), waarin de opmerking wordt gemaakt, dat volgens analytischen weg (broomtitratie) door deze onderzoekers kon worden vastgesteld, dat het enol-gehalte van oplossingen van acetylazijnester in verschillende media, doch in het bijzonder hexaan, *toeneemt bij stijgende verdunning*.

Hantzsch had toen reeds gevonden, dat de wet van Beer niet geldig zou zijn voor oplossingen van acetylazijnester in hexaan (15); in een latere publicatie (16) evenwel bespreekt hij met critischen geest zijn eigen resultaten en komt dan tot de conclusie, dat de gevonden afwijkingen uitsluitend het gevolg zijn van de aanwezigheid van sporen verontreinigingen in het oplosmiddel. Inderdaad is het een bekend feit, dat dergelijke factoren een groote rol kunnen spelen; volgens dezen onderzoeker moet hun invloed toenemen bij afnemende concentratie, hetgeen voor de hand ligt.

Het is derhalve opmerkelijk, dat in een veel later door Grossmann (17) verricht onderzoek betreffende het keto-enol-evenwicht in verschillende media en verschillende verdunningen, opnieuw met nadruk wordt vastgesteld, dat in hexaan-oplossingen deze grootheid afhankelijk is van de concentratie, waarbij de resultaten van het werk van Meyer, Kappelmeier en Hantzsch (l.c.) bevestigd worden. Ofschoon de schrijver deze kwestie niet aan een nadere bespreking onderwerpt, krijgt men den indruk, dat hij het betreffende verschijnsel wèl beschouwt als gevolg van een eigenschap van de opgeloste ester en niet voortkomend uit de aanwezigheid van eventueele verontreinigingen. Zijn bepalingen van het enol-gehalte berusten op de uitkomsten van de broomtitratie; in het daarop aansluitend spectraal-analytisch onderzoek, dat overigens met de grootste zorgvuldigheid ten uitvoer is gelegd, is helaas door hem niet nagegaan, of hij de vroegere resultaten van Hantzsch kon reproduceeren.

Zooals men ziet, levert de bestudeering van de litteratuur op dit punt weinig positieve gegevens op. Wij besloten derhalve, zelf te trachten aan de hand van absorptiemetingen van oplossingen van acetylazijnester tot een bevredigend antwoord te komen. Een zuiver handelspreparaat (Kahlbaum) werd voor ons doel door zorgvuldige destillatie in vacuo nogmaals gerectificeerd. Als oplosmiddel gebruikten wij denzelfden alcohol, welke dienst had gedaan bij de

metingen van auxine-b en pseudo-auxine-b, zoodat een eventueelen invloed van het solvens zich in denzelfden zin zou moeten manifesteren.

In de volgende tabel zijn de resultaten van een viertal metingen samengevat, uitgevoerd met oplossingen van verschillende concentratie:

TABEL 20. *Acetylazijnester in alcohol.*

Golf- lengte	Waarden van de constante κ bij verschil- lende verdunningen				Gem. waarde κ
	52 mg/l	104 mg/l	261 mg/l	514 mg/l	
302	—	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$
297	—	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$
289	—	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$
280	—	$0,2 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^3$
275	$0,2 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^3$	$0,4 \cdot 10^3$	$0,4 \cdot 10^3$	$0,4 \cdot 10^3$
270	$1,2 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$
265	$1,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
254	$3,7 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^3$
248	$4,7 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	—
240	$4,0 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^3$	—
238	$3,7 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	—
234	$3,7 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	—

Alvorens tot een nadere beschouwing van de krommen uit figuur XIX over te gaan, teneinde ze te vergelijken met de curven van de

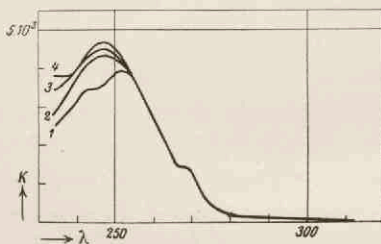


Fig. XIX. Acetylazijnester in alcohol.
1: 514 mg/l; 2: 261 mg/l;
3: 104 mg/l; 4: 52 mg/l.

figuren XVII en XVIII, willen wij aan de hand van gegevens uit de litteratuur trachten vast te stellen, of de door ons gevonden waarden overeenstemmen met die van andere onderzoekers en of wellicht uit den vorm der absorptiekrommen iets met betrekking tot het vraagstuk der keto-enol-tautomerie af te leiden valt.

Wat het eerste punt betreft, kun-

nen wij verwijzen naar de reeds genoemde publicatie van Hantzsch (15), die de eerste is, welke meer gedetailleerde gegevens verstrekt en wiens uitkomsten later door Bielecki en Henri (18), (19) bevestigd worden. Het blijkt, dat genoemde auteurs in overeenstemming met elkander konden vaststellen, dat acetylazijnester in alcoholische oplossing een absorptie-maximum bij $243 \text{ m}\mu$ bezit, waarbij ϵ de waarde 2000 bereikt. Bedenkt men, dat $\kappa = 2,3 \epsilon$ is, volgt uit hun metingen, dat κ bij die golflengte $4,6 \cdot 10^3$ bedraagt, hetgeen goed overeenstemt met onze resultaten (zie curven 3 en 4 uit figuur XIX).

In het ook reeds vermelde onderzoek van Grossmann (17) zijn de volgende quantitative gegevens te vinden: Deze auteur vond het maximum in alcoholisch milieu bij $246 \text{ m}\mu$, terwijl de waarde van ϵ volgens hem 1900 bedraagt. De concentratie der oplossing bedroeg $1,7 \text{ mmol/l}$; dit komt het meest overeen met de concentratie uit de vierde kolom van tabel 20 ($2,01 \text{ mmol/l}$). Wij vinden in dezelfde kolom het maximum bij $248 \text{ m}\mu$ en κ is bij ons 4300. De door Grossmann gevonden waarde komt overeen met $\kappa = 4370$. De overeenstemming tusschen zijn getallen en de onze is hier zelfs bijzonder goed. Verder vermeldt deze onderzoeker, dat hij een knik in de kromme vond bij $274 \text{ m}\mu$ en ter plaatse een waarde van ϵ gelijk aan 90 (κ gelijk 210). In ons geval ligt de knik tusschen 265 en $270 \text{ m}\mu$ en bij $275 \text{ m}\mu$ vinden wij κ gelijk 400. Deze tegenstrijdigheid valt te verklaren uit het feit, dat onze waarden tengevolge van de geringe absorptie in dat gebied waarschijnlijk niet erg betrouwbaar zijn.

Tenslotte willen wij hier het werk van Morton en Rosney vermelden (20), waarvan de resultaten het meest overeenkomen met die van Bielecki en Henri (l.c.).

Uit een en ander mogen wij afleiden, dat onze uitkomsten blijkbaar met voldoende nauwkeurigheid verkregen zijn — vooral in het gebied tusschen 240 en $255 \text{ m}\mu$ —, dat het maken van gevolgtrekkingen geoorloofd is.

In figuur XIX zijn de bijbehorende absorptiekrommen geteekend. Het valt terstond in het oog, dat acetylazijnester veel minder sterk absorbeert dan auxine-b of pseudo-auxine-b; evenwel valt toch waar te nemen, dat bij eerstgenoemde stof een analoog verschijnsel zich voordoet, wat betreft de afhankelijkheid van κ van de concentratie

bij golflengten beneden $254 \text{ m}\mu$. De afwijkingen van de wet van Beer zijn weliswaar lang niet zoo uitgesproken, als wij vonden bij auxine-b en pseudo-auxine-b, maar ook hier komt hun waarde ver buiten de foutengrens van de absorptiemetingen, zoodat wij niet aan hun realiteit behoeven te twifelen.

Gaan wij thans na, wat speciaal door de reeds genoemde onderzoekers in het midden is gebracht met betrekking tot de interpretatie van de absorptiekromme(n) van acetylazijnester, dan kunnen de volgende feiten vooropgesteld worden:

De breede band met zijn maximum bij $240\text{--}245 \text{ m}\mu$ staat in verband met den enolvorm van de ester. Wanneer n.l. acetylazijnester in verschillende media (water, alcohol, aether of hexaan) opgelost wordt, blijkt het enol-gehalte toe te nemen, naarmate men in de genoemde reeks vordert. In hexaan b.v. bedraagt het percentage 80% , in water niet meer dan $0,5\text{--}1\%$. Bij alcohol en aether is de concentratie tusschen deze extreme waarden gelegen. *Nu blijkt de grootte van de constante κ bij het maximum recht evenredig te zijn met het door broomtitratie vastgestelde enol-gehalte in de verschillende oplosmiddelen* (Grossmann, Morton & Rosney, l.c.).

Verder heeft men kunnen vaststellen, dat de reeds genoemde knik in de kromme bij $270\text{--}275 \text{ m}\mu$ de aanwijzing vormt voor het bestaan van een gedeeltelijk bedekte, zwakke absorptieband, behoorend bij de carbonylgroep. Dit is af te leiden door vergelijking met de absorptiespectra van zuivere ketonen. Daar het absorbeerend vermogen van de keto-groep betrekkelijk zwak is, kan men haar aanwezigheid bij stoffen als acetylazijnester niet gemakkelijk langs optischen weg aantoonen. Het is daarom nooit met zekerheid uit de bij die golflengten bepaalde waarden van κ of ϵ af te leiden, of een verandering in het keton-gehalte van een oplossing inderdaad parallel gaat aan een evenredige verandering in de waarden dezer absorptieconstanten. Daarom hebben wij ook bij de oplossingen van acetylazijnester tot aan de golflengten $254 \text{ m}\mu$ steeds ongeveer dezelfde waarden voor κ gevonden. Bovendien kan een eventueele toeneming van het enol-gehalte zich ook reeds bij golflengten boven $254 \text{ m}\mu$ in de absorptie doen gelden, zoodat het zeer goed mogelijk is te achten, dat een verschuiving van het keto-enol-evenwicht zich niet manifesteert tengevolge van de compenseerende werking der beide groepen

op de absorptie der stof in het gebied tusschen 254 en 289 $m\mu$.

Uit een en ander is dus op te maken, dat het maximum der absorptie bij 240—245 $m\mu$ veroorzaakt wordt door de enol-ester en dat de hoogte ervan een maat is voor het gehalte aan deze verbinding.

Beschouwt men nu in de figuren XVII en XVIII de curven 3 en 4, dan ziet men, dat de maxima bij overeenkomstige golflengten gelegen zijn. De hooge waarden der absorptieconstanten hangen natuurlijk samen met het feit, dat de constitutie van auxine-b en pseudo-auxine-b mede bepaald wordt door de aanwezigheid van een dubbele binding, terwijl deze stoffen ook een *vrije* carboxylgroep bezitten.

Het optreden van het uitgesproken maximum bij 255 $m\mu$ in oplossingen met grootere concentratie kan aldus verklaard worden: De aanwezigheid van een groote hoeveelheid ketovorm (vermoedelijk zelfs een overmaat van deze verbinding) zal een tamelijk sterke absorptie aldaar veroorzaken. Daarnaast zal een geringe hoeveelheid enolvorm (welke echter relatief sterk absorbeert) ook haar invloed doen gelden. Het resultaat is, dat bij de betreffende golflengten een maximum in de absorptie gevonden wordt doordat twee krommen, waarvan de eigen toppen ter weerszijden daarvan liggen, gedeeltelijk over elkaar heen vallen.

Bij dat al dient men goed in het oog te houden, dat de in de voorgaande regels gegeven verklaring van het gedrag van auxine-b en pseudo-auxine-b in alcoholische oplossing, in verband met den langs optischen weg vastgestelde eigenschappen, allermintst vrij van bedenkingen is. Het ernstigste bezwaar is nog steeds het uitblijven van de reactie met ferri-chloride bij oplossingen van auxine-b. Het is daarom te verwachten, dat toekomstige onderzoekingen wellicht belangrijke aanvullingen of zelfs veranderingen in de hier uitgesproken zienswijze met zich zullen brengen.

Voor een inzicht betreffende het mechanisme der auto-inactivering van dit phytohormoon is het feit van belang, dat de ultraviolet-absorptiespectra van auxine-b en pseudo-auxine-b, ondanks de optredende complicatie, met groote zekerheid als identiek beschouwd mogen worden. Hierdoor is voor deze verbinding waarschijnlijk gemaakt, dat, evenmin als dat bij auxine-a het geval schijnt te zijn, genoemd proces gepaard gaat met diep ingrijpende veranderingen in de structuur van de moleculen.

LITTERATUUROVERZICHT

behoorend bij hoofdstuk III.

- (1) F. Kögl. *Naturw.* 21, 17 (1933).
- (2) F. Kögl. H. Erxleben en A. J. Haagen Smit. *H.S.* 216, 31 (1933).
- (3) F. Kögl, H. Erxleben en A. J. Haagen Smit. *H.S.* 225, 215 (1934).
- (4) F. Kögl en H. Erxleben. *H.S.* 227, 51 (1934).
- (5) A. Smakula. *Ang. Chem.* 47, 657 (1934).
- (6) K. W. Hauser, R. Kuhn, A. Smakula en K. Kreuchen. *Ztschr. physik. Chem. (B)* 29, 363 (1935).
- (7) K. W. Hauser, R. Kuhn, A. Smakula en M. Hoffer. *Ibid.* 371.
- (8) K. W. Hauser, R. Kuhn, A. Smakula en A. Deutsch. *Ibid.* 378.
- (9) K. W. Hauser, R. Kuhn en A. Smakula. *Ibid.* 391.
- (10) P. Henry. *Ztschr. physik. Chem.* 10, 96 (1892).
- (11) U. Collan. *Ibid.* 130.
- (12) F. Kögl. *Ber.* 68B, 16 (1935).
- (13) H. Erxleben. *Erg. Physiol. expt. Pharm.* 37, 197 (1935).
- (14) K. H. Meyer en P. Kappelmeier. *Ber.* 44, 2722 (1911).
- (15) A. Hantzsch. *Ber.* 43, 3058 (1910).
- (16) A. Hantzsch. *Ann.* 398, 379 (1913).
- (17) P. Grossmann. *Ztschr. physik. Chem.* 109, 305 (1924).
- (18) J. Bielecki en V. Henri. *C.r.* 156, 1323 (1913).
- (19) J. Bielecki en V. Henri. *C.r.* 158, 866 (1914).
- (20) R. A. Morton en W. C. V. Rosney. *J. Chem. Soc.* 706 (1926).

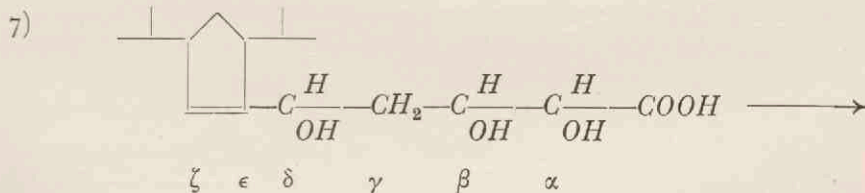
HOOFDSTUK IV.

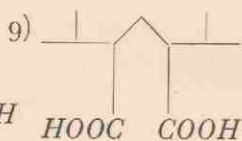
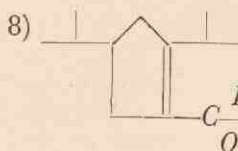
OVER HET VERBAND TUSSCHEN DE SPECTRAAL-ANALYTISCHE EN DE CHEMISCHE ONDERZOEKINGEN.

A. De constitutie van de pseudo-auxinen a en b.

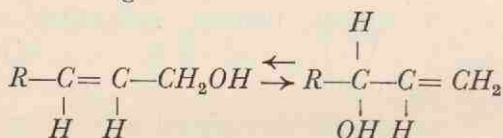
Zooals in de inleiding al vermeld is, werd naast de bestudeering der absorptiespectra ook getracht, langs chemisch-analytischen weg de problemen van de inactivering tot een oplossing te brengen. Het chemisch-analytisch onderzoek, dat door mejuffrouw *E r x l e b e n* in nauw verband met onzen eigen arbeid verricht werd, kon van dit laatste profijt trekken en omgekeerd. Voor het goede begrip van den stand van zaken is het noodzakelijk, hier in korte trekken de resultaten der nieuwe chemische onderzoekingen te bespreken, welke tot nu toe nog niet gepubliceerd zijn.

Zooals bekend, ontstaan bij de auto-inactivering van het auxine-a twee isomeren, de pseudo-auxinen a_1 en a_2 ; zij bevatten nog de carboxylgroep en de dubbele binding, verschillen echter in hun specifieke draaiing. Van het begin af trok het de aandacht, dat beide pseudo-auxinen, in tegenstelling met auxine-a, geen mutarotatie vertoonen. Het uitblijven van dit verschijnsel wijst er op, dat zich hier klaarblijkelijk geen lacton meer kan vormen en wij dus met een verandering in de substitutie van het δ -C-atoom rekening moeten houden, wat op zichzelf het mechanisme van de auto-inactivering natuurlijk nog niet duidelijker maakt. Er werd van het begin af gedacht, dat de eigenlijke oorzaak van de inactivering het verspringen van de dubbele binding is, b.v. een verplaatsing daarvan in den ring, zooals dat volgende formules toonen:

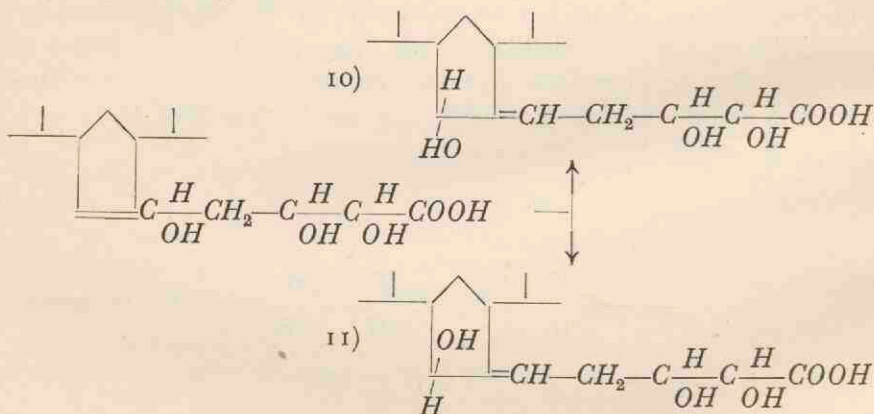




In dat geval was bij de permanganaat-oxydatie een keto-carbonzuur met 13 C-atomen te verwachten. In werkelijkheid ontstond echter het auxine-glutaarzuur 9), wat er op scheen te duiden, dat de dubbele binding nog op dezelfde plaats stond als in het auxine-a. Bovendien was daarmee ook bewezen, dat bij de auto-inactivering geen verandering in het gebied van de 11 koolstofatomen plaats heeft, welke behalve de twee carboxylgroepen in het auxine-glutaarzuur aanwezig zijn. Daar genoemd proces bij de auxinen a en b, wat de omstandigheden betreft, volkomen gelijk verloopt, is het zeer waarschijnlijk, dat ook het mechanisme daarvan in beide gevallen overeenstemt. Gezien het verschil in substitutie bij de koolstofatomen α en β blijft dan als gemeenschappelijk gebied van de omzetting alleen over het stuk tusschen het γ - en het ζ -C-atoom. De beperking tot dit gebied heeft nu er toe geleid, de auxinen a en b als gesubstitueerde allyl-alcoholen te beschouwen. Zooals bekend, hebben deze verbindingen de neiging, zich als volgt om te zetten:

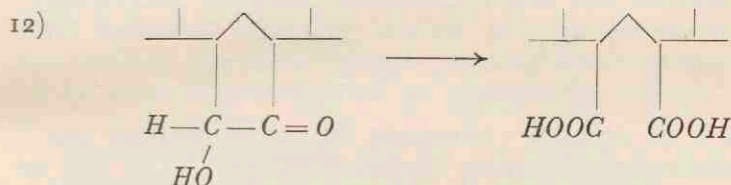


Toegepast op ons geval, zouden uit auxine-a twee stereo-isomeren kunnen ontstaan:



Deze hypothese is nu inderdaad in staat, de experimenteel geconstateerde feiten te verklaren:

- 1) Het ontstaan der pseudo-auxinen a_1 en a_2 .
- 2) Het uitblijven van de mutarotatie, omdat de pseudo-auxinen geen lacton kunnen vormen.
- 3) De vorming van auxine-glutaarzuur bij de afbraak met kaliumpermanganaat; het is n.l. duidelijk, dat dit zuur kan ontstaan door verdere oxydatie van een intermediair gevormd acyloïne:



F. K ö g l en H. E r x l e b e n hebben nu getracht, de semi-cyclische ligging van de dubbele binding aan te toonen door een voorzichtigen afbraak met ozon. Hierbij ontstond inderdaad het acyloïne 12), dat als gekristalliseerd p-nitrophenylhydrazon geïsoleerd kon worden en volgens de micro-analyse de juiste samenstelling bleek te bezitten.

In hoeverre stemmen nu de resultaten van het chemisch onderzoek overeen met de conclusies, welke wij uit de bestudeering der absorptiespectra kunnen trekken? Zooals in hoofdstuk IIIB vermeld is, toont het pseudo-auxine- a_1 evenals auxine-a zelve practisch geen absorptie tusschen 230 en 400 $m\mu$. Dit is in volkomen overeenstemming met het bovengenoemde mechanisme van de omzetting, want het zal voor de absorptie in dit gebied geen verschil uitmaken, of de dubbele binding tusschen de C-atomen $\epsilon-\zeta$ dan wel $\delta-\epsilon$ staat.

Een moeilijkheid doet zich alleen voor bij pseudo-auxine- a_2 , waar wij, in tegenstelling met zijn isomeer, een weliswaar zwakke en niet karakteristieke, maar toch goed meetbare absorptie hebben gevonden. Dit feit is echter geen reden om de overigens wel gefundeerde verklaring van de auto-inactivering te wijzigen. Het preparaat van pseudo-auxine- a_2 werd n.l. uit de moederloog van a_1 geïsoleerd en stond maar in zoo kleine hoeveelheid ter beschikking, dat het niet tot een constante draaiing kon worden omgekristalliseerd; ook voor een micro-analyse was er te weinig materiaal. Er werden alleen

moleculairgewichtsbepalingen uitgevoerd, welke het verwachte resultaat gaven. Bij dezen stand van zaken bestaat zeer wel de mogelijkheid, dat het preparaat met een sterk absorberende verbinding verontreinigd was; zoo zou b.v. tusschen het ζ -C-atoom en het nabijzijnde tertiaire C-atoom door waterafsplitsing een nieuwe dubbele binding kunnen ontstaan. Een dergelijk „dieen” zou als verontreiniging de gevonden absorptie goed kunnen verklaren.

Bij de bestudeering der ultraviolet-absorptiespectra van auxine-b en pseudo-auxine-b doet zich de complicatie voor, dat de oplossingen niet voldoen aan de wet van Beer. Zooals in hoofdstuk III D nader is toegelicht, hangt dit waarschijnlijk samen met de keto-enol-tautomerie van deze verbindingen, en wel met de toeneming van het enol-gehalte in de verdunde oplossingen. Bij een vergelijking van de twee reeksen absorptie-krommen (figuren XVII en XVIII) is te bedenken, dat de daaraan ten gronde liggende concentratie's alleen bij de curven 1 volkomen gelijk zijn. Globaal gezien krijgt men den indruk, dat ook hier de auto-inactivering zonder invloed is op den aard van de absorptiespectra. Niet opgehelderd is hier alleen het merkwaardige feit, dat auxine-b zelfs in de meest verdunde oplossing geen ijzerchloride-reactie geeft; het pseudo-auxine-b daarentegen wel, zelfs in de concentratie van oplossing I. Wij moeten het aan toekomstige onderzoekingen overlaten, de oorzaak van dit verschijnsel op te sporen.

B. De constitutie van het lumi-auxine-a-lacton.

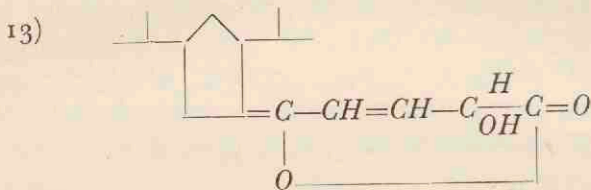
Van te voren was het niet te verwachten, dat zich bij de auto-inactivering van auxine-a-lacton bijzondere resultaten zouden voordoen; weliswaar kan hier niet onmiddellijk een allyl-omzetting plaats hebben, omdat het „ δ -hydroxyl” bij de lactonvorming betrokken is. Men moet echter bedenken, dat volgens het polarimetrisch onderzoek zich in oplossing in enkele uren een evenwicht tusschen lacton en zuur instelt. Het zuur zou zich dan op de bekende wijze kunnen inactiveren; tenslotte zouden ook hier quantitatief dezelfde omzettingen producten moeten ontstaan, daar het evenwicht lacton \rightleftharpoons zuur altijd weer tot nieuwe vorming van auxine-a aanleiding geeft. Het mag echter niet onvermeld blijven, dat zich auxine-a-lacton ook in gekristalliseerden toestand inactieveert en hierbij was het niet te voorspellen, op welke wijze dat gebeurt.

Uit het spectraalonderzoek bleek evenwel, dat de inactivering van auxine-a-lacton volkomen anders verloopt dan bij het vrije zuur het geval is. Allereerst was het buitengewoon verrassend, dat bij de bepaling van het ultraviolet-absorptiespectrum van het auxine-a-lacton een zeer karakteristieke absorptiekromme (figuur X) met een uitgesproken maximum bij $295 \text{ m}\mu$ gevonden werd. Het was niet te aanvaarden, dat het practisch niet absorbeerende zuur alleen door de lactoniseering een dergelijk absorbeërend vermogen krijgt; het viel eerder aan te nemen, dat door het ultraviolette licht een diepgaande verandering in het molecuul tot stand gebracht wordt. Deze overweging leidde er toe, de opgeloste stof na de meting biologisch te testen. Hierbij bleek, dat de activiteit voor het grootste gedeelte verdwenen was.

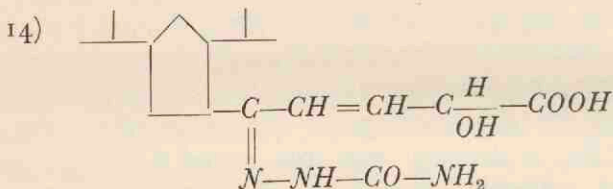
Weliswaar is het bekend, dat het ultraviolette licht menigvuldige omzettingen teweegbrengt, zoodat een photochemische inactivering op zichzelf geen ongewone reactie te noemen is. Zeer verrassend is echter, dat de omzetting al door de heel zwakke bestraling gedurende de meting plaats vindt. De volgende stap van het onderzoek bestond in de bepaling der absorptiekromme van het product, dat bij de auto-inactivering in den loop van drie maanden was ontstaan. Het spectrum bleek volkomen identiek te zijn met dat van het boven vermeld; wij kunnen derhalve concludeeren, dat het ultraviolette licht een omzetting „katalyseert”, welke in den loop van eenige maanden ook uit zichzelf plaats vindt.

Het micro-chemisch onderzoek heeft geleerd, dat de op de twee manieren verkregen inactiveringsproducten van auxine-a-lacton inderdaad met elkaar identiek zijn. De nieuwe verbinding wijkt in haar bouw sterk af van de pseudo-auxinen; om aan te duiden, dat zij onder invloed van het licht kan ontstaan, noemen wij haar *lumi-auxine-a-lacton*. De photochemische bereidingswijze stelde ons in staat, uit het auxine-a-lacton door bestraling onmiddellijk het lumi-auxine-a-lacton te verkrijgen, terwijl wij bij de bestudeering van de pseudo-auxinen telkens maanden moesten wachten, totdat de inactivering zich quantitatief voltrokken had. Ter vergelijking van de op twee manieren bereide preparaten van lumi-auxine-a-lacton hebben wij het absorptiespectrum, het mengsmeltpunt en de specifieke draaiing bepaald; bovendien hebben wij getracht een karakteristiek derivaat in handen te krijgen. Hierbij werd gevonden, dat een gekristalliseerd

semi-carbazon te bereiden is, dat in beide gevallen identiek is en de samenstelling $C_{19}H_{33}O_4N_3$ heeft. Terwijl nu echter het lumi-auxine-a-lacton een neutrale verbinding is, reageert het semi-carbazon zuur op lakmoes. Dit bracht ons er toe, voor het lumi-auxine-a-lacton de formule 13) in aanmerking te nemen, waarbij wij met een enol-lacton te doen zouden hebben; de vorming van het semi-carbazon 14) zou dan door opensplitsing tot een keto-carbonzuur te verklaren zijn:



lumi-auxine-a-lacton



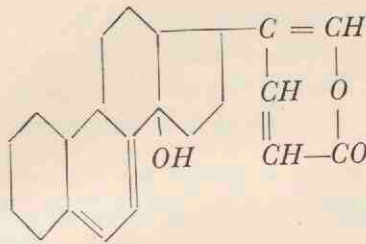
Zooals men ziet, verplaatsen wij hierbij de in auxine-a-lacton aanwezige dubbele binding in de semi-cyclische positie, zooals wij ze in de pseudo-auxinen hebben aangetroffen. Tot de aanwezigheid van een tweede aethyleenbinding moeten wij om verschillende redenen besluiten:

Ten eerste wijst de samenstelling van lumi-auxine-a-lacton op de afsplitsing van een molecuul water.

Ten tweede is de sterke absorptie van het lumi-auxine-a-lacton alleen door de aanwezigheid van een sterk chromophore groep te verklaren, zooals dat door de „enol-diëen-groeping” bevredigend tot uiting komt.

In verband met dit laatste verdient het ongetwijfeld de aandacht, dat Stoll, Hoffmann en Helfenstein bij hun onderzoek naar de constitutie van scyllaridine-a 15) voor deze stof een absorptiespectrum hebben gevonden, zooals in figuur XX staat weergegeven. Tevens vermelden wij, dat de vermoedelijke structuur van deze verbinding als volgt is (1), (2):

15)



Vergelijkt men het absorptiespectrum met dat van lumi-auxine-a-lacton, dan valt terstond op, dat zij in principe gelijk gebouwd zijn, n.l. een specifieke band met een maximum bij ca. 300 m μ ($\kappa = \pm$

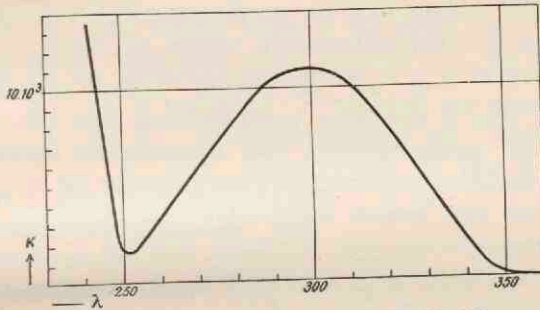
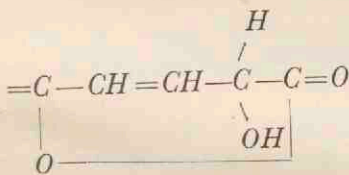
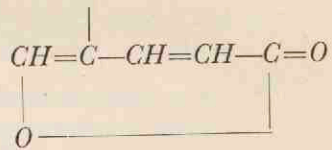


Fig. XX. Absorptiespectrum van scyllaridine-a.

10×10^3). Na een minimum bij 250 m μ doorloopen te hebben stijgt de kromme bij nog kortere golflengte weder sterk. Weliswaar verschilt de hoofdband in breedte en hoogte. Er dient echter op gewezen te worden, dat ook de bouw van de enol-lactonring eenigszins verschilt:



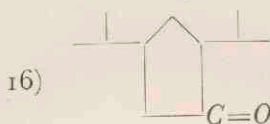
(bij lumi-auxine-a-lacton)



(bij scyllaridine-A)

De formule van lumi-auxine-a-lacton kon nog door verschillende proeven verder gesteund worden. Door katalytische hydreeing ontstaat uit lumi-auxine-a-lacton een neutraal tetra-hydro-product, dat eerst door koken met water tot het overeenkomstige zuur gehydroly-

seerd kon worden. Verder kon de semi-cyclische positie van een der dubbele bindingen bewezen worden door een oxydatieve afbraak met behulp van ozon. Hierbij ontstond het verwachte ringketon 16), dat als p-nitro-phenyl-hydraxon gekarakteriseerd werd en volgens



zijn eigenschappen identiek was met het product, dat vroeger door oxydatie van di-hydro-auxine-a met chroomtrioxyd verkregen was.

Tot de geconjugeerde ligging van de tweede dubbele binding kunnen wij voorloopig in chemisch opzicht alleen per exclusionem concluderen: zij kan zich niet in de vijftring of in de sec.-butylgroepen bevinden, omdat wij dan bij de ozoniseering niet het C_{13} -ringketon hadden verkregen. Zij kan ook niet tusschen de koolstofatomen α en β liggen, omdat de waterafsplitsing hier tot een enol- resp. een keto-groeppeering zou leiden, welke zich experimenteel niet hebben laten aantoonen. De hieruit volgende conjugatie van de tweede dubbele binding klopt dan ook goed met de conclusies uit het spectraal-analytisch onderzoek.

LITTERATUURVERZICHT behoorend bij hoofdstuk IV.

- (1) A. Stoll en A. Hoffmann. *Helv. 18*, 401 (1935).
 (2) A. Stoll, A. Hoffmann en A. Helfenstein. *Helv. 18*, 644 (1935).

SAMENVATTING.

- 1) De ultraviolet-absorptiespectra der auxinen a en b werden bepaald.
- 2) De ultraviolet-absorptiespectra der auxinen a en b ondergaan geen karakteristieke veranderingen bij de auto-inactivering dezer phytohormonen.
- 3) Auxine-a-lacton wordt al tijdens de spectraalmeting omgezet tot een inactieve verbinding, het lumi-auxine-a-lacton.
- 4) Het lumi-auxine-a-lacton is identiek met het product, dat na verloop van enkele maanden door auto-inactivering uit auxine-a-lacton ontstaat.

STELLINGEN.

I

De auto-inactivering der auxinen is het gevolg van het verspringen der dubbele binding uit den vijfkring in de meest nabij gelegen semicyclische positie.

Proefschrift: Hoofdstuk IV.

II

De constitutie van cerebronzuur is niet vast te stellen op grond van de uitkomsten, verkregen door oxydatieven afbraak dezer verbinding.

R. Ashton, R. Robinson en J. C. Smith.
J. Chem. Soc. 283 (1936).

III

Terecht nemen Kuhn en Bär aan, dat in de oplossingen van oxy-azo-verbindingen steeds een evenwicht tusschen de chinoïde en azoïde vormen bestaat. De opvatting van Burawoy, dat in sommige extreme gevallen uitsluitend het eerstgenoemde isomeer aanwezig is, moet als onjuist beschouwd worden.

A. Burawoy. Ann. 521, 298 (1936).
R. Kuhn en F. Bär. Ann. 516, 143 (1935).

IV

Bij de inwerking van alkaliën op monosen bij lage temperatuur speelt de aard van het kation een wezenlijke rol.

A. Kusin. Ber. 69B, 1041 (1936).

V

De door Eilers en Korff voorgestelde formule $A = c\xi^2/\kappa$, welke de beschermende werking der dubbellaag bij colloïde deeltjes moet uitdrukken, vindt geen steun in de resultaten van verschillende nieuwere stabiliteits- en electrophorese-metingen.

H. Eilers en J. Korff.
Chem. Weekbl. 33, 358 (1936).

VI

Phipps en Reedy zijn er niet in geslaagd, aan te toonen, dat het gebruik van den dompel-refractometer als instrument ter bepaling van overgangstemperaturen de voorkeur verdient boven andere methoden.

H. E. Phipps en J. H. Reedy.
J. physic. Chem. 40, 89 (1936).

VII

De onmeetbaar snel verloopende reactie in een oplossing, bevattend permanganaat- en mangano-ionen naast oxaalzuur, is het gevolg van de katalytische werking der oxalaat-ionen op de reductie van Mn door Mn

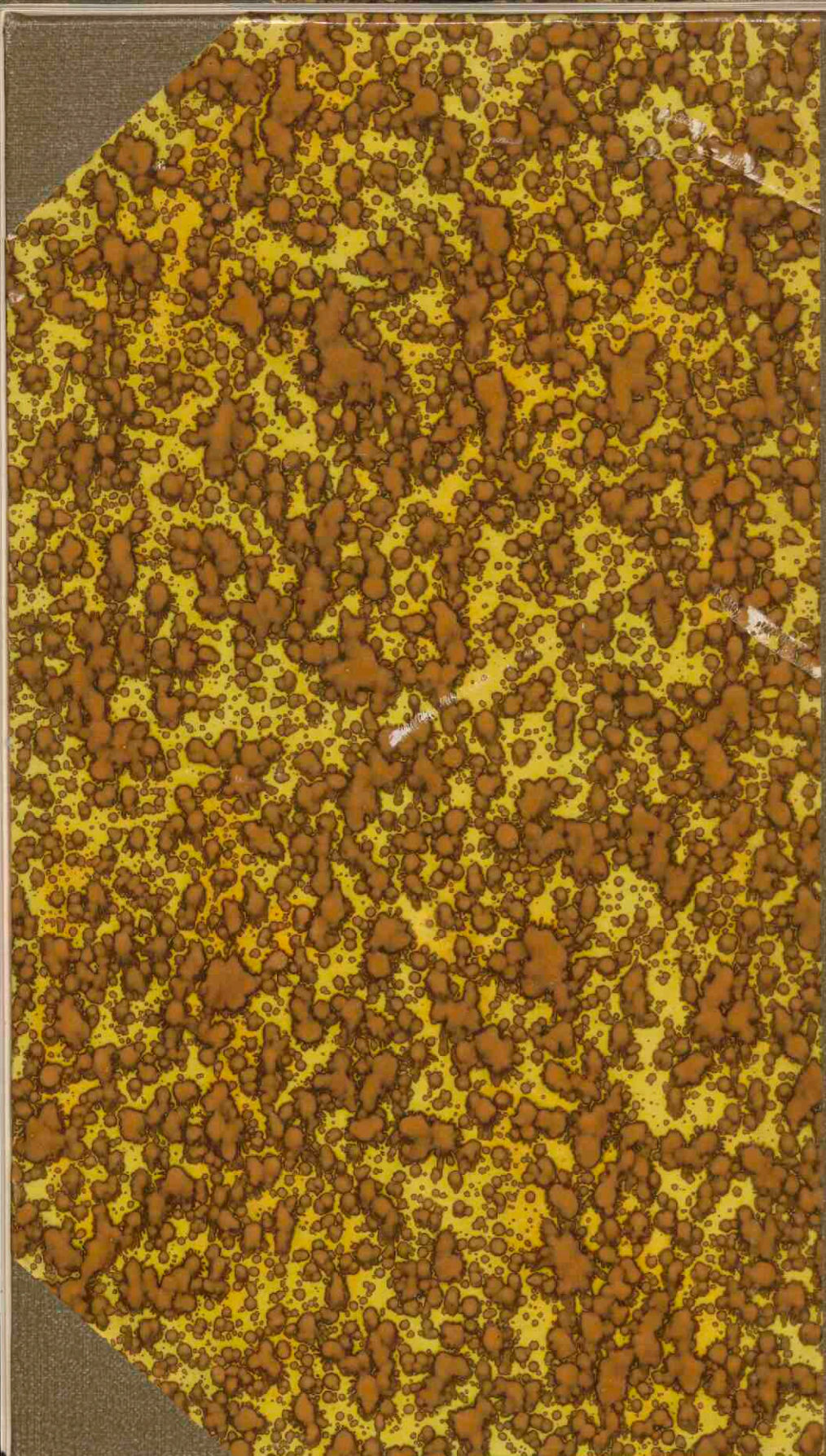
M. J. Polissar. J. Chem. Educ. 13, 40 (1936).

VIII

Aan de opvatting van Klebs, dat de vorming van bloemen bij de hogere planten afhankelijk is van een bepaalde verhouding tusschen koolhydraten en opgenomen stikstof, zijn ernstige bezwaren verbonden.

H. Knodel. Zeitschr. f. Botanik. 29, 449 (1936).

Rijkasyls voor Psychopaten
te Avereest.



diss.
1