



# Onderzoeken over biotine

<https://hdl.handle.net/1874/324322>

ONDERZOEKINGEN  
OVER BIOTINE

s.  
ht

8







ONDERZOEKINGEN OVER BIOTINE



*Diss Utrecht 1938*

# ONDERZOEKINGEN OVER BIOTINE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS  
Dr. J. BOEKE, HOOGLEERAAR IN DE FACUL-  
TEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BE-  
SLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT  
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACUL-  
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VER-  
DEDIGEN OP MAANDAG 11 APRIL 1938, DES  
NAMIDDAGS TE 2 UUR

DOOR

LEENDERT PONS,  
GEBOREN TE BANGKALAN.

KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT



# ONDERZOEKINGEN OVER BIOTINE

## INHOUD

De afzetting van het zand van  
de rivier de Rijn in de  
Nederlandsche Delta is een  
van de belangrijkste problemen  
van de waterbouw in Nederland.  
De afzetting van het zand  
wordt veroorzaakt door de  
afzetting van de zandkorrels  
die in de rivier worden  
aangevoerd. De afzetting  
van het zand wordt  
veroorzaakt door de  
afzetting van de zandkorrels  
die in de rivier worden  
aangevoerd.



Bij het voltooiën van dit proefschrift wil ik U, Oud-Hoog-  
leeraren, Hoogleeraren en Lectoren der Rijks-Universiteit hartelijk  
dank zeggen voor hetgeen Gij tot mijn wetenschappelijke vor-  
ming hebt bijgedragen.

U, Hooggeleerde K ö g l, Hooggeachte Promotor, zij een bij-  
zonder woord van dank gewijd. Niet alleen het voorrecht, gedu-  
rende eenige jaren Uw privé-assistent te hebben mogen zijn,  
stemt mij tot groote dankbaarheid, ook wat Gij buiten ons we-  
tenschappelijk werk om voor mij zijt geweest, zal ik niet licht  
vergeten. Het feit, dat het door U aan mij opgedragen onderzoek  
in zoo hooge mate Uw belangstelling had, was de oorzaak van  
het bijzondere contact, dat ik steeds met U gehad heb en dat mij  
in staat gesteld heeft, zeer veel van U te leeren. Ook hiervoor  
zal ik U steeds erkentelijk blijven.

Het voor het laatste deel van mijn onderzoek benoodigde bioti-  
ne kon ik in den beschikbaren tijd slechts bereiden, doordat  
de I. G. Farbenindustrie A.G., Werk Elberfeld, een groot  
gedeelte van de opwerking van 1000 KG. eigeel op zich had ge-  
nomen. Het is mij een behoefte, den Heeren Professor Dr. H.  
H ö r l e i n en Dr. F. S c h u l t z voor deze grootscheepsche hulp  
mijn oprechten dank te betuigen.

Verder dank ik al mijn collega's, op wier hulp ik steeds heb  
mogen rekenen, in het bijzonder den Heer d e M a n, die mij  
bij een deel der opwerking krachtig behulpzaam is geweest.

Tenslotte wil ik mijn dank betuigen aan het personeel van het  
Organisch-chemisch Laboratorium voor den ijver en de bereid-  
willigheid, betoond bij het overwinnen van de vele bezwaren, die  
aan het opwerken van zulke groote hoeveelheden materiaal in  
een Universiteitslaboratorium zijn verbonden.



## INHOUD.

	Blz.
HOOFDSTUK I . . . . .	1
Inleiding.	
HOOFDSTUK II . . . . .	10
De testmethode.	
HOOFDSTUK III . . . . .	17
Bereiding van biotine uit eigeel.	
HOOFDSTUK IV . . . . .	30
Over de chemie van het biotine.	
HOOFDSTUK V . . . . .	41
Over de physiologische beteekenis van het biotine.	

---



## HOOFDSTUK I.

### INLEIDING. \*)

In zijn in 1860 verschenen publicatie: „Mémoires sur la Fermentation Alcoolique” beschreef P a s t e u r<sup>1)</sup> proefnemingen, waarbij hij zeer kleine hoeveelheden biergist had geënt op een voedingsbodem, die slechts bestond uit een waterige oplossing van suiker, ammoniumtartraat en gistasch. Daar zijn gist zich hierin goed ontwikkelde, concludeerde hij daaruit, dat voor den groei der gist geen andere stoffen noodzakelijk waren, ofschoon hij wel constateerde, dat door toevoeging van druiven-, beetwortel- of gistsap de groei en de gistingsintensiteit sterk toenamen.

Elf jaar later verscheen een publicatie van L i e b i g<sup>2)</sup>, waarin deze de juistheid van de resultaten van P a s t e u r in twijfel trok. Het gelukte hem n.l. niet om zijn gist in een oplossing van suiker, ammoniumtartraat en gistasch tot ontwikkeling te brengen, wanneer hij volgens de aanwijzingen van P a s t e u r te werk ging.

Oogenblikkelijk toonde P a s t e u r<sup>3)</sup> zich bereid, in Parijs voor de oogen van L i e b i g zijn proeven te herhalen, desnoods met voedingsoplossingen, samengesteld uit stoffen, die deze zelf mee zou brengen. L i e b i g, die toen reeds tegen de zeventig was, accepteerde deze uitnodiging niet. Doordat hij een jaar later overleed en niemand zijn partij overnam, was de controverse van de baan.

Pas 30 jaar later ontdekte W i l d i e r s<sup>4)</sup> in Ide's laboratorium te Leuven, dat het inderdaad niet gelukte op de manier van P a s t e u r op synthetische voedingsbodems gist te kweken, als men de enthoeveelheid maar klein genoeg nam, tenzij men een weinig wort, gistextract, pepton of vleesextract toediende. Dat

\*) Voor het samenstellen van dit overzicht heb ik voornamelijk gebruik gemaakt van de volgende samenvattingen:

F. W. Tanner, Chem. Rev. 1, 397 (1925).

W. Lash Miller, J. Chem. Educ. 7, 257 (1930).

W. van Hasselt, Diss. Utrecht 1935.

F. Kögl en B. Tönnis, H. S. 242, 43 (1936).

1) L. Pasteur, Ann. Chim. Phys. 3 Serie 58, 323 (1860).

2) J. von Liebig, Ann. Chim. Phys. 4 Serie 23, 5 (1871).

3) L. Pasteur, Ann. Chim. Phys. 4 Serie 25, 145 (1872).

4) E. Wildiers, La Cellule 18, 313 (1901).

in het geval van een grootere enthoeveelheid de gist wel groeien wilde, schreef Wildiers toe aan de grootere hoeveelheid wort, die tegelijk met de entgist in den voedingsbodem werd gebracht.

Op grond van zijn proeven kwam hij tot de conclusie, dat in wort, gistextract, enz. een nog onbekende stof aanwezig moest zijn, welke de gist noodig had om tot normale ontwikkeling te kunnen komen. Dit onbekende iets noemde hij *bios*, en hij toonde aan, dat het een *organische* stof moest zijn, aangezien bios wel voorkwam in gist, maar niet in gistasch.

Deze opvattingen van Wildiers ontmoetten zeer veel tegenstand. A. Fernbach<sup>5)</sup> en W. Windisch<sup>6)</sup> namen aan, dat Wildiers' gist in een synthetisch milieu niet groeide, omdat zijn zouten kleine hoeveelheden van vergiftige stoffen zouden bevatten, welke door het eiwit uit de wort of uit het gistextract gebonden en zoo onwerkzaam gemaakt zouden worden.

H. Pringsheim<sup>7)</sup>, die zich schamper uitliet over Wildiers' „levenselixer”, gooide het over een anderen boeg en veronderstelde, dat de gist zich bij overenting op een synthetisch milieu eerst acclimatiseeren moest. Bij enting met een groote hoeveelheid gistsuspensie is er dan meer kans op de aanwezigheid van krachtige cellen, die in staat zijn, zich aan het vreemde milieu aan te passen dan bij enting met een kleine hoeveelheid. Deze „verklaring” mag misschien opgaan bij de latere proeven van Naumann<sup>8)</sup>, die vond, dat bij entingen met 5 gistcellen geen groei optrad en met 50 gistcellen wèl, maar voor de proeven van Wildiers is ze niet steekhoudend. Lash Miller berekende, dat Wildiers toch nog altijd minstens een miljoen cellen voor zijn entingen moet hebben gebruikt<sup>9)</sup>. Bovendien legde Wildiers heelemaal niet den nadruk op het aantal cellen, waarmee hij entte, maar op de hoeveelheid wort, die hij tegelijk met deze cellen toevoegde. Een kleine hoeveelheid gist groeide ook op synthetisch milieu, als men maar een weinig gistextract toevoegde.

Overigens erkende ook Pringsheim, dat gistextract een „buitengewoon goed cultuurmedium” is voor gist en hij ver-

5) A. Fernbach, Ann. Brasserie et Distillerie 1901, 510; geciteerd door Windisch.

6) W. Windisch, Wochenschr. f. Brauerei 19, 2 (1902).

7) H. Pringsheim, Centr. Bakt. 16 111 (1906).

8) H. Naumann, Zschr. Techn. Biol. 7, 1 (1919).

9) W. Lash Miller, J. Chem. Educ. 7, 257 (1930).

moedde, dat gistextract een voor gist bijzonder geschikte eiwitachtige stof bevatte.

Intusschen ging men in Leuven rustig voort op den ingeslagen weg. Het gelukte Amand<sup>10)</sup> de op hypothesen „gefundeerde” bezwaren van Fernbach en Windisch te weerleggen. Hij vond ook, dat het bios gedurende den groei van de gist uit de voedingsoplossing verdween, dus verbruikt werd.

Ide<sup>11)</sup> kon geen acclimatisatie bij de door hem gebruikte gist constateeren. Integendeel, wanneer zijn gistcellen gedurende eenigen tijd in een biosarme voedingsoplossing hadden moeten leven, bleken zij zoo zeer verzwakt, dat ze zelfs bij toevoeging van bios niet meer tot normale ontwikkeling waren te brengen.

R. Devloo<sup>12)</sup>, die op het werk van Wildiers voortbouwde, onderzocht verschillende natuurproducten en ontdekte, dat diegene, welke choline bevatten, ook biosactiviteit vertoonden.

Choline zelf bleek echter onwerkzaam te zijn. Lecithine-preparaten waren actief. Maar pogingen om het bios te isoleeren bleven vruchteloos.

A. Kossowicz<sup>13)</sup> ontdekte, dat gist wel kon groeien op een synthetischen voedingsbodem, wanneer deze door schimmels of bacteriën geïnfecteerd was.

Langzamerhand verminderde de kritiek, doch dit was niet alleen een gevolg van de onderzoekingen van het Leuvensche laboratorium, maar had gedeeltelijk een geheel andere oorzaak. Reeds in 1881 had Lunin<sup>14)</sup> in Bazel geconstateerd, dat muizen bij voeding met melkpoeder maanden lang in leven waren te houden, terwijl ze na korten tijd stierven op een diët, dat was samengesteld uit caseïne, botervet, rietsuiker en melkasch. Hij zocht ook reeds de verklaring in de goede richting, nl. in de aanwezigheid van een onbekende, in de melk voorkomende stof, welke voor het leven der dieren noodzakelijk was. Talrijke andere onderzoekers kregen soortgelijke resultaten, zoodat de oude theorie, volgens welke dieren slechts eiwitten, koolhydraten, vetten, be-

10) A. Amand, La Cellule 20, 225 (1902); 21, 329 (1904).

11) M. Ide, Centr. Bakt. II 18, 193 (1907).

12) R. Devloo, La Cellule 23, 361 (1906).

13) A. Kossowicz, Z. Landw. Versuchsw. Oesterr. 6, 27 (1903); 17, 688 (1906).

14) N. Lunin, H. S. 5, 31 (1881).



paalde zouten en water noodig hadden, steeds meer aanhangers verloor.

Een zeer belangrijken stap in de goede richting beteekende het onderzoek, dat Eijkman op het einde der vorige eeuw over de beri-beri begon. Uit statistieken, opgesteld over een groot aantal gevangenen op Java, bleek duidelijk, dat er een verband bestond tusschen het optreden van beri-beri en eenzijdige voeding met geslepen rijst. In 1896 kon Eijkman bij hoenders kunstmatig een op de menschelijke beri-beri gelijkende polyneuritis opwekken door de dieren uitsluitend met geslepen rijst te voeren<sup>15)</sup>.

Door toediening van de bij het polijsten der rijst verwijderde zilvervliesjes kon hij de dieren weer genezen. Hiermede was voor het eerst een experimenteele „avitaminose” en de genezing ervan verkregen.

Eijkman's medewerker Grijns sprak het vermoeden uit, dat in het zilvervliesje een bepaalde stof voorkwam, welke menschen tegen beri-beri en hoenders tegen polyneuritis beschermde. Deze onderzoekers toonden verder aan, dat de betreffende stof met alcohol of zuur uit rijstzemelen was te extraheeren en ook in tal van andere natuurproducten voorkwam, b.v. in gist.

Een groot aantal onderzoekers (Hopkins, Funk, McCollum en Davis, Osborne en Mendel en vele anderen) vielen hen bij en het werd steeds duidelijker, dat er bepaalde stoffen bestaan, welke voor het in stand houden van een gezond dierlijk organisme noodzakelijk zijn. Funk stelde in 1911 voor, deze stoffen vitaminen te noemen.

Door deze ervaringen in de dierphysiologie was het ook meer plausibel, dat gist voor den groei een bijzondere stof noodig heeft.

Aangezien het anti-beri-beri-vitamine, nu vitamine B<sub>1</sub> of aneurine genoemd, zelf in gist voorkwam en verschillende onderzoekers<sup>16)</sup> ontdekten, dat preparaten, die een sterke antineuritische werking vertoonden, ook steeds den groei van gist sterk bevorderden, nam men aanvankelijk aan, dat vitamine B<sub>1</sub> en bios iden-

15) C. Eijkman, *Geneesk. Tijdschr. Ned. Indië* 36, 214 (1896).

16) K. Kuroono, *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Japan* 5, 305 (1915).

R. J. Williams, *J. Biol. Chem.* 38, 465 (1919); 42, 259 (1920).

W. H. Eddy en H. C. Stevenson, *J. Biol. Chem.* 43, 295 (1920).

F. Swoboda, *J. Biol. Chem.* 44, 531 (1920).

C. Funk en H. E. Dubin, *J. Biol. Chem.* 44, 487 (1920).

tiek zouden zijn. Williams trachtte zelfs het vitamine B<sub>1</sub> met behulp van deze werking op gist quantitatief te bepalen<sup>17)</sup>. Het bleek echter vrij spoedig, dat de beide stoffen niet identiek konden zijn, omdat het mogelijk was, preparaten te bereiden, die wel den groei van gist bevorderden, maar geen antineurische werking vertoonden of omgekeerd<sup>18)</sup>. Funk stelde toen voor om bios vitamine D te noemen, maar dit vond geen bijval.

Toch waren er in dezen tijd ook nog wel onderzoekers, die geenszins van het bestaan van een groeifactor voor de gist overtuigd waren<sup>19)</sup>.

McDonald en McCollum<sup>20)</sup> constateerden, dat hun gist wel groeide, zij het ook niet zeer sterk, op een voedingsoplossing, welke slechts gewone rietsuiker en anorganische zouten bevatte. Echter toonden Funk en Freedman<sup>21)</sup> aan, dat in gewone rietsuiker een spoor van een verontreiniging aanwezig is, die den groei van gist bevordert en verwijderd kan worden door de suiker eenige malen uit alcohol om te kristalliseeren.

In 1923 vonden Fulmer, Nelson en White<sup>22)</sup>, dat een bepaalde giststam zelfs goed groeide in een oplossing, welke behalve anorganische zouten slechts een synthetische suiker (methose uit formaldehyde) bevatte. Hieruit bleek reeds, dat bios niet voor alle gistsoorten noodzakelijk is en dit werd ten volle bewezen door het belangrijke onderzoek van A. M. Copping<sup>23)</sup>.

Copping constateerde, dat wilde gisten zich in een synthetisch milieu zonder bios goed ontwikkelden, terwijl daarentegen sterk veredelde rassen onder zulke omstandigheden slechts een zeer geringen groei vertoonden.

- 
- 17) R. J. Williams, *J. Biol. Chem.* 42, 259 (1920).
  - 18) A. D. Emmett en M. Stockholm, *J. Biol. Chem.* 43, 287 (1920).  
G. de P. Souza en E. V. McCollum, *J. Biol. Chem.* 44, 113 (1920).  
W. D. Fleming, *J. Biol. Chem.* 49, 119 (1921).  
E. I. Fulmer, V. E. Nelson en F. F. Sherwood, *Am. Soc.* 43, 186, 191 (1921).  
C. Funk en H. E. Dubin, *J. Biol. Chem.* 48, 437 (1921).  
J. J. Willaman en A. S. Olsen, *J. Biol. Chem.* 55, 815 (1923).  
H. D. Kruse en E. V. McCollum, *Physiol. Rev.* 9, 126 (1929).
  - 19) P. Lindner, *Z. Techn. Biol.* 7, 79 (1919); 9, 100 (1921).  
H. Naumann, *Z. Techn. Biol.* 7, 1 (1919).
  - 20) M. B. MacDonald en E. V. McCollum, *J. Biol. Chem.* 45, 307 (1921); 46, 525 (1921).
  - 21) C. Funk en L. Freedman, *J. Biol. Chem.* 56, 851 (1923).
  - 22) E. I. Fulmer, V. E. Nelson en A. White, *J. Biol. Chem.* 57, 397 (1923).
  - 23) A. M. Copping, *Biochem. J.* 23, II, 1050 (1929).

Het is niet onwaarschijnlijk, dat de uiteenlopende resultaten van Pasteur en Liebig veroorzaakt zijn door het gebruik van verschillende gistsoorten.

Inmiddels vorderden de pogingen, die ten doel hadden het bios te isoleeren, slechts zeer langzaam. Weliswaar verschenen er enkele publicaties van Amerikaansche<sup>24)</sup> en Japansche<sup>25)</sup> onderzoekers, die beweerden een actieve stof in gekristalliseerden vorm in handen te hebben, maar deze onderzoekingen werden later niet bevestigd. Het probleem werd nog ingewikkelder, toen bleek, dat bios geen enkelvoudige stof was, maar uit verschillende factoren moest bestaan, die tezamen een sterkere werking vertoonden dan afzonderlijk<sup>26)</sup>.

Lash Miller's medewerker G. H. W. Lucas<sup>27)</sup> verkreeg bij biospreparaten van verschillenden oorsprong een scheiding met behulp van alcoholische barietoplossing of met basisch loodacetaat. Hij noemde den factor in het neerslag bios I, dien in het filtraat bios II. E. V. Eastcott slaagde er in, gebruik makend van deze scheidingsmethode, uit theestof het bios I te isoleeren en te bewijzen, dat het identiek was met meso-inosiet<sup>28)</sup>.

R. J. Williams, die met verschillende gistrassen werkte, constateerde in het jaar 1931, dat deze ook verschillende biosfactoren noodig hebben<sup>29)</sup>. Bij de behandeling van gistextract met vollers aarde bleek, dat hierdoor de activiteit van het extract tegenover Gebr. Mayer-gist en Wildiers' gist niet verminderte. Daarentegen was het extract door deze behandeling voor andere gistrassen, o.a. 578 van de American Type Culture collection, inactief geworden. De aan vollers aarde geadsorbeerde

- 
- 24) W. H. Eddy, R. W. Kerr en R. R. Williams, *Am. Soc.* 46, 2846 (1924).  
V. Lepeschkin, *Am. J. of. Bot.* 11, 164 (1924).
- 25) V. Suzuki en B. Suzuki, *J. Chem. Soc. Japan* 44, 228 (1923); *Chem. Abstr.* 17, 2907 (1923).  
Y. Kinugasa, *J. Pharm. Soc. Japan* 48, 539 (1928); *Chem. Abstr.* 22, 3915 (1928).  
B. Suzuki, *Proc. Imp. Acad. Tokyo* 3, 521 (1928); 4, 158 (1928).
- 26) E. I. Fulmer, W. W. Duecker en V. E. Nelson, *Am. Soc.* 46, 723 (1924).
- 27) G. H. W. Lucas, *J. Physic. Chem.* 28, 1180 (1924).
- 28) E. V. Eastcott, *J. Physic. Chem.* 32, 1094 (1928).
- 29) R. J. Williams en E. M. Bradway, *Am. Soc.* 53, 783 (1931).  
Zie ook: R. J. Williams, J. L. Wilson en F. H. von der Ahe, *Am. Soc.* 49, 227 (1927); R. J. Williams, M. E. Warner en R. R. Roehm, *Am. Soc.* 51, 2764 (1929); R. J. Williams en R. R. Roehm, *J. Biol. Chem.* 87, 581 (1930).

factor kon met alkali worden geëluëerd; hij was op zichzelf onwerkzaam, bij combineeren met het filtraat werd echter weer de oorspronkelijke activiteit verkregen.

De geadsorbeerde factor bleek vervangen te kunnen worden door gekristalliseerd vitamine B<sub>1</sub>.

Later voerde Williams een scheiding uit door middel van gefractioneerde electrolyse. Met behulp hiervan kon hij aantonen, dat ook het voor Wildiers' gist noodzakelijke bios in twee factoren was te splitsen, nl. een basischen en een zuren factor, die afzonderlijk nagenoeg inactief waren<sup>30)</sup>.

De voor de Gebr. Mayer-gist benodigde groeistof<sup>31)</sup> bleek slechts uit den enkelvoudigen zuren factor te bestaan, die uit de meest uiteenlopende dierlijke en plantaardige producten met 80 %-ige methylalkohol te extraheeren was. Hij noemde deze stof pantotheenzuur. Op grond van diffusieproeven berekende Williams het moleculairgewicht op 150—200. Bij verestering van zijn preparaten (met alcohol en zwavelzuur) verdween de activiteit en keerde na verzeeping voor een groot gedeelte weer terug.

In 1934 deelde Williams<sup>32)</sup> mede, dat hij uit geautolyseerde lever een zeer actief preparaat van dit zuur had bereid, dat echter nog niet chemisch zuiver was.

Hierbij dient te worden opgemerkt, dat Williams voor zijn gistculturen een voedingsoplossing gebruikte, die o.a. asparagine bevatte. Volgens een later verschenen publicatie<sup>33)</sup> is pantotheenzuur bij afwezigheid van asparagine inactief. In deze zelfde mededeeling vermeldt Williams, dat  $\beta$ -alanine, tezamen met inosiet of met asparaginezuur en inosiet, bij verschillende gistsoorten een sterke groeibevorderende werking vertoont.

Intusschen hadden ook Lash Miller<sup>34)</sup> en zijn medewerkers nieuwe resultaten gepubliceerd: zij konden bios II door behandeling met kool opnieuw in 2 factoren splitsen, nl. IIA, die in de oplossing bleef en IIB, die aan de kool geadsorbeerd werd en

30) R. J. Williams en J. H. Truesdail, Am. Soc. 53, 4171 (1931).

31) R. J. Williams, C. M. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdail en D. Holaday, Am. Soc. 54, 3462 (1932); 55, 2912 (1933).

32) R. J. Williams en D. H. Saunders, Biochem. J. 28, 1887 (1934).

33) R. J. Williams en E. Rohrman, Am. Soc. 58, 695 (1936).

34) W. Lash Miller, E. V. Eastcott en E. M. Sparling, Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 26, 165. (1932); Z. 1933, I, 3463.

W. Lash Miller, E. V. Eastcott en J. E. Maconachie, Am. Soc. 55, 1502 (1933).

met behulp van aceton-ammoniak hiervan te elueeren was. In 1934 werd in dit laboratorium factor IIA in den vorm van een gekristalliseerde Cu-verbinding uit tomatensap geïsoleerd<sup>35</sup>). Volgens een mededeeling<sup>36</sup>) uit het jaar 1936 blijkt bios IIA uit een mengsel van  $\beta$ -alanine en l-leucine te bestaan. Tomatensap bevat echter bovendien nog een factor<sup>37</sup>), die met behulp van tannine is neer te slaan. Dit „bios V”, een schijnbaar zeer labiele verbinding, kon nog niet in zuiveren toestand worden afgescheiden.

Van het jaar 1932 af werd in het laboratorium te Utrecht in verband met de onderzoeken over de auxinen ook het bios-probleem bestudeerd. Kögl en Tönnis kozen eigeel als uitgangsmateriaal voor de isolering van een biosfactor, welks werking met het zoogenaamde gistras M getest werd.

De toegepaste fractionering sloot zich in het begin aan bij de door Lash Miller gevolgde methode. Na verwijderen van het meso-inosiet met behulp van ammoniakaal loodacetaat, kon nl. de voornaamste factor eveneens aan kool geadsorbeerd en met aceton-ammoniak hiervan geëluëerd worden. Na een reeks zuiveringstrappen slaagden de auteurs er in den factor, na een 3.000.000-voudige concentreering, in den vorm van zeer actieve kristallen te isoleeren<sup>38</sup>). Bij de opwerking bleek, dat de actieve verbinding een amphotere stof was. Aangezien bij de zuivering een behandeling met methylalkoholisch zoutzuur was toegepast, konden de kristallen uit een methylester, een lacton of een lactaam van den oorspronkelijken factor bestaan.

Voor de nieuwe groeistof werd de naam biotine ingevoerd en wel met dien verstande, dat deze uitdrukking later zou gebruikt worden voor het actieve zuur. Biotine heeft ook zonder toevoeging van co-factoren bij gistras M een zeer groote activiteit. De groeibevorderende werking, welke zelfs nog in een verdunning van  $1:4 \times 10^{11}$  is aan te toonen, blijft echter in quantitatief opzicht beneden die van gistkooksap. Inderdaad kan de activi-

35) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 28, 185 (1934).

36) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 30, 99 (1936)  
Z. 1937, I, 3003.

37) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 29, 163 (1935)  
Z. 1936, I, 3359.

L. N. Farrell, Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 29, 167 (1935)  
Z. 1936, I, 3359.

38) F. Kögl en B. Tönnis, H. S. 242, 43 (1936).

teit van biotine door inosiet en aneurine verhoogd worden; het lijkt echter, dat in gistkooksap toch ook nog andere co-factoren aanwezig moeten zijn.

Ik had de gelegenheid, reeds bij het laatste gedeelte van de genoemde onderzoekingen mede te werken. In het vervolg was het mijn taak, de bereidingsmethode van het biotine te verbeteren en deze kostbare nieuwe groeistof zoo ver mogelijk te bestudeeren.

Uit den aard der zaak bestaat dus een nauw verband tusschen bovengenoemd onderzoek van Kögl en Tönnis en dit proefschrift. Het is daarom noodzakelijk, allereerst de testmethode te beschrijven welke ook voor mijn eigen onderzoek toegepast werd.

## HOOFDSTUK II.

### DE TESTMETHODE.

Bij het begin van het onderzoek in het Utrechtsche laboratorium stond vast, dat meerdere biosfactoren existeerden en dat de verschillende gistrassen niet alleen in quantitatief, maar ook in kwalitatief opzicht een verschillende behoefte hebben aan deze factoren. Het was dus duidelijk, dat al naar gelang van het voor de test gekozen gistras, bij het concentreeren van de actieve stoffen of de activiteit van de extracten door splitsing in de op zichzelf inactieve componenten verdwijnen zou, of een op zichzelf reeds actieve factor op den voorgrond zou treden.

Wildiers en de latere onderzoekers van het laboratorium te Leuven namen als maat voor de bioswerking de gisting, welke zij bepaalden door het gewichtsverlies van hun cultures na te gaan, dat optrad tengevolge van de koolzuurontwikkeling. Tot heden heeft men echter geen duidelijk beeld over den samenhang tusschen groei en gisting en het blijkt ook uit de ervaringen van de practijk, dat deze beide processen niet geheel parallel behoeven te gaan. Onder deze omstandigheden hebben de Amerikaanse en Canadeesche onderzoekers er den voorkeur aan gegeven, den groei van de gist op de een of andere manier rechtstreeks te bepalen. De meesten van hen maten de toeneming van het aantal cellen door deze te tellen in hangende druppels (Williams, Swoboda), resp. in een haemacytometer (McCullum, Fulmer, Fraser). Op den duur is deze methode echter buitengewoon tijdroovend en vermoeiend, maar zij is wel de eenige, waarbij de groei niet langs indirecten weg bepaald wordt. Op zichzelf zou natuurlijk de groei ook door bepaling van het drooggewicht der gist nauwkeurig kunnen worden nagegaan. In de practijk (Williams) was echter deze weg om voor de hand liggende redenen voor serieonderzoekingen niet geschikt.

Funk en ook Lash Miller centrifugeerden hun gistcultures in buisjes, die van een schaalverdeeling waren voorzien. De hoogte van de gistkolom was een maat voor het volume der gevormde gist. Een bezwaar van deze methode is het gevaar,

dat een verschil in dichtheid van pakking der afgecentrifugeerde gistcellen een belangrijke foutenbron kan opleveren.

R. J. Williams<sup>39)</sup> beschreef in 1929 een methode, waarbij de troebeling der gistcultures door middel van een nephelometer werd bepaald. Dit was een verbetering van de methode van Peskett<sup>40)</sup>, waarbij de troebeling door vergelijking met BaSO<sub>4</sub>-suspensies met het bloote oog werd geschat.

De nephelometrische methode scheen zeer betrouwbare resultaten te geven en had het groote voordeel, zeer snel te zijn. Om deze redenen heeft men ook in het Utrechtsche laboratorium hieraan den voorkeur gegeven. Ter contrôle werd echter af en toe de groei in een telkamer gemeten en hierbij bleek, dat inderdaad de toeneming van de troebeling vrijwel parallel ging met de toeneming van het aantal cellen.

a. De gisten de gebruikte voedingsoplossing:

Van niet minder belang was het vinden van een geschikt test-object. Nadat een aantal gistrassen onderzocht was, viel de keuze op „Rasse M”, een branderij-bovengist van het „Institut für Gärungsgewerbe” te Berlijn, welke in een synthetisch milieu slechts zeer geringen groei vertoonde, daarentegen op toediening van een kleine hoeveelheid gistextract met een sterken groei reageerde.

Ras M werd te Berlijn reeds vele jaren in het groot voor branderijen en gistfabrieken gekweekt en wel, zooals na informatie bleek, in de eerste trappen uitsluitend organisch, in de latere trappen daarentegen voornamelijk anorganisch. Slechts in dit laatste stadium is zij dermate arm aan bios, dat zij zonder toediening ervan slechts een zeer geringen groei vertoont.

Ras M bestaat uit vier onderrassen, n.l. Ras XII, Lft. 2, Lft. 73 en Spc. 152.

Wij hebben deze vier onderrassen afzonderlijk op hun gevoeligheid tegenover bios onderzocht, na ze eerst op mout en daarna in synthetisch milieu gekweekt te hebben. Hierbij bleek, dat de gevoeligheid van ras M hoofdzakelijk veroorzaakt wordt door Lft. 73 en, in mindere mate, door Spc. 152. Natuurlijk zou het meer correct geweest zijn om voor onze onderzoekingen slechts het onder-

39) R. J. Williams, E. D. Mc Alister en R. R. Roehm, J. Biol. Chem. 83, 315 (1929).

40) G. L. Peskett, Biochem. J. 21, 460 (1927).



ras Lft. 73 te gebruiken en wij hebben dan ook moeite gedaan, deze gist zelf te kweken. De ervaring leerde echter, dat het zeer tijdroovend is, op laboratoriumschaal toereikende hoeveelheden van dit gistras met een *constant* laag biosgehalte te bereiden. Het plan, het benodigde gistras in het „Institut für Gärungsgewerbe” op langen termijn onder constante condities te laten kweken, was in verband met de hoge kosten eveneens niet te realiseren. Aangezien wij van het feit, dat ras M uit vier onder-rassen bestaat, tot nu toe nooit bezwaren hebben ondervonden, hebben wij er dan ook van afgezien, het door Lft. 73 te vervangen.

Wij verkregen wekelijks een versch monster van ras M per vliegpost; de fijn verdeelde gist werd in de koelkast bewaard.

Er is bij het transport en het bewaren van de gistmonsters natuurlijk kans op infectie door andere micro-organismen. Wij hebben echter in dit opzicht geen moeilijkheden ondervonden, omdat in de korte door ons gekozen kweektijd (5 uren) infecteerende micro-organismen nauwelijks tot ontwikkeling komen.

Als voedingsbodem voor de test werd steeds gebruikt een door V. Reader<sup>41)</sup> aangegeven oplossing van de volgende samenstelling:

aqua dest.	1000	cm <sup>3</sup>
glucose	10	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	„
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7	„
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	„
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,16	„
NaCl	0,5	„
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,4	„

De gebruikte stoffen hadden de kwaliteit „pro analysi”.

De oplossing werd gelijk verdeeld over 20 fleschjes en gedurende 2 × 45 minuten bij 100° gesteriliseerd.

#### b. De nephelometer:

Gebruikt werd een nephelometer volgens W. J. H. Moll,<sup>42)</sup> bestaande uit twee zeer gevoelige thermozielen, symmetrisch opgesteld ten opzichte van een kleine lamp.

41) V. Reader, Biochem. J. 21, 904 (1927).

42) W. J. H. Moll, Versl. Akad. Wetensch. Amsterdam 28, 1001 (1919-'20); Cent. Bakt. I, 115, 228 (1930).

Tusschen deze lamp en iedere thermozuul bevindt zich een glazen cuvet van  $\pm 10 \text{ cm}^3$  inhoud. Cuvet A is gevuld met gedestilleerd water, in cuvet B wordt de te meten gistcultuur gebracht. Bij doorlichting van beide cuvetten worden de thermozuilen dus verschillend sterk belicht. De hierdoor onstane elektrische stroom veroorzaakt een galvanometeruitslag, die door inschakelen van een weerstand wordt gecompenseerd. Deze ingeschakelde weerstand is een maat voor de troebeling van de gemeten oplossing.

Alvorens een serie metingen te beginnen wordt cuvet B gevuld met een 0,1 %-ige m-chloor-p-kresol-oplossing in water en met behulp van een koolweerstand de galvanometer op nul ingesteld.

Tijdens het meten van een serie kolfjes bleek het niet noodig te zijn, dat de cuvet voor elke nieuwe gistsuspensie zorgvuldig van binnen schoongemaakt werd. Goed leeggieten en daarna één maal goed uitwasschen met de volgende te meten gistcultuur was voldoende.

Het toestel was geijkt door suspensies van bekend gistgehalte te meten en de gevonden extincties (uitgedrukt in ohms ingeschakelde weerstand) graphisch uit te zetten tegen de „concentraties”. Uit de zoo verkregen curven kon dan voor iedere willekeurige extinctie het gistgehalte, en dus de toeneming hiervan ten opzichte van een bepaalde beginwaarde, eenvoudig worden afgelezen.

#### c) Uitvoering van de test. \*)

8—12 mg gist\*\*) wordt in  $50 \text{ cm}^3$  voedingsoplossing door schudden fijn verdeeld. Deze suspensie blijft 45 à 60 min. bij kamertemperatuur staan alvorens voor de test gebruikt te worden.

Van iedere oplossing, die getest moet worden, wordt een bepaald volume in een Jena-erlenmeyertje van  $25 \text{ cm}^3$  inhoud gepipetteerd en dit volume met stofvrij gedestilleerd water tot  $1 \text{ cm}^3$  aangevuld. Bij dezen  $\text{cm}^3$  vloeistof wordt  $1 \text{ cm}^3$  van de gistsuspensie

---

\*) Bij de test zijn mij de dames Chr. Visser en M. Visser behulpzaam geweest. Voor de hierbij steeds betoonde ijver en accuratesse betuig ik beiden mijn hartelijken dank.

\*\*) De hoeveelheid ingewogen gist werd bij voorkeur zóó gekozen, dat de extinctie van de uitgangswaarde lag tusschen 2,5 en 3,5. Afhankelijk van de mate van vochtigheid van de gist moest hiervoor een eenigszins varieerende hoeveelheid worden ingewogen.

sie gepipetteerd (de gistsuspensie wordt direct vóór het pipetteeren van elken  $\text{cm}^3$  nog even omgeschud) en het kolfje vervolgens gesloten met een kurk, welke met een dun collodiumhuidje bedekt is.

De kolfjes worden hierna in een thermostaat (temp.  $30^\circ \pm 0,5^\circ$ ) gedurende 5 uren geschud, waarna de gist wordt gedood door aan elk kolfje  $20 \text{ cm}^3$  van een 0,1 %-ige m-chloor-p-kresol-oplossing toe te voegen. Vervolgens wordt de troebeling van den inhoud der kolfjes nephelometrisch bepaald.

Bij elke testserie wordt in 4 kolfjes in het geheel geen biotine toegevoegd, maar slechts  $1 \text{ cm}^3$  water en  $1 \text{ cm}^3$  gistsuspensie. Bij twee van deze kolfjes wordt de gist reeds dadelijk gedood met  $20 \text{ cm}^3$  chloorkresol-oplossing en de troebeling gemeten. Deze leveren dus de „uitgangswaarde” in duplo. De beide anderen worden met de overige kolfjes 5 uren in de thermostaat geschud en leveren na dooden en meten de „blancowaarde”.

Het verschil tusschen blancowaarde en uitgangswaarde geeft dus den normalen groei van de gist aan onder de omstandigheden van de test. Deze wisselde ongeveer tusschen 0 en 40 %.

Daar de gevoeligheid van de gist voor biospreparaten dagelijksche schommelingen vertoont, werd steeds een oplossing van constante biosconcentratie als standaard medegemeten. Als standaardoplossing \*) gebruikte ik, evenals T ö n n i s, een gistextract van zoodanige concentratie, dat  $0,1 \text{ cm}^3$  hiervan een groei van de gist veroorzaakte van 120 % (als gemiddelde van een zeer groot aantal metingen).

K ö g l en T ö n n i s hebben als eenheid (Saccharomyces-eenheid = SE) aangenomen: die hoeveelheid stof, welke onder de omstandigheden van de test een groei veroorzaakt van 100 %. Daar bij niet te groote biosconcentraties de groeitoeneming evenredig is met de hoeveelheid toegevoegde bios, werd de standaardoplossing gerekend een activiteit te bezitten van 12 S.E. per  $\text{cm}^3$ .

Van deze standaardoplossing werd steeds een volledige groei-curve bepaald, d.w.z. den groei, veroorzaakt door 0,1—0,3—0,5

\*) Deze standaardoplossing was als volgt bereid:  $\frac{1}{2}$  KG. gist werd 2 uren met de viervoudige hoeveelheid water gekookt. Na afkoelen werd het celmateriaal afgecentrifugeerd, de vloeistof door een Ultra-Cella-filter gefiltreerd en het volume van het filtraat met gedestilleerd water tot 2 L aangevuld. Om als standaardoplossing gebruikt te kunnen worden moest de zoo verkregen vloeistof dan nog tien maal worden verdund. De geconcentreerde oplossing werd steriel in toegesmolten buizen in de frigidaire bewaard. Iedere nieuwe standaardoplossing werd op de oude geijkt.

en 1,0 cm<sup>3</sup>. Van een oplossing van een preparaat met onbekend biosgehalte werd het groeieffect bepaald, veroorzaakt door 0,1 en 0,3 cm<sup>3</sup> en de oplossing vervolgens zoodanig verdund, dat 0,1 cm<sup>3</sup> een even sterken groei veroorzaakte als 0,1 cm<sup>3</sup> van de standaardoplossing. In dit geval bevatte de oplossing dan eveneens 12 SE per cm<sup>3</sup>, zoodat uit de verdunning de activiteit van het betreffende preparaat te berekenen was.

Het groeieffect, veroorzaakt door 0,1 cm<sup>3</sup> standaardoplossing werd steeds in duplo bepaald.

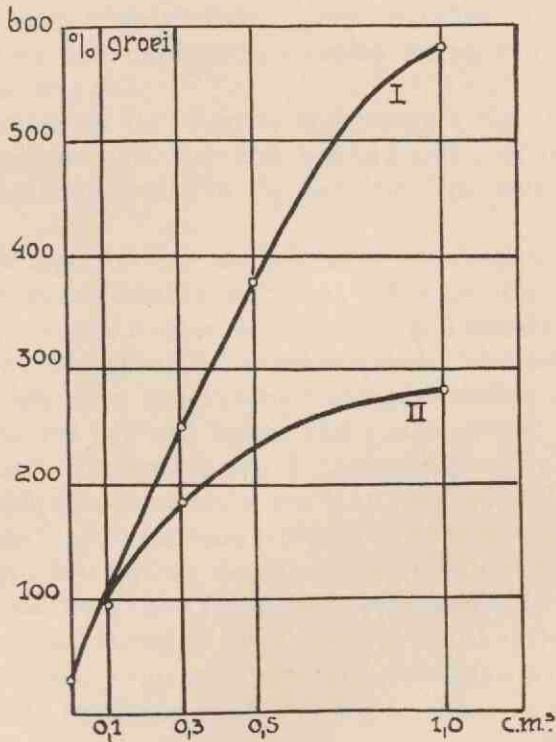
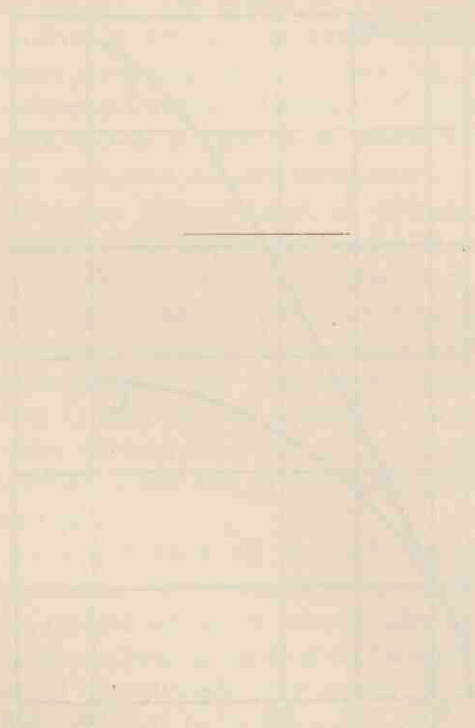


Fig I.

- i. Groeicurve van gistextract.
- ii. Groeicurve van biotine.

De groeicurve van zuiver biotine heeft een veel vlakker verloop dan de groeicurve van het als standaard gebruikte gistextract (Fig. 1). Ruwe eigeelpreparaten geven curven, die tusschen deze beiden inliggen, maar bij een zekere graad van zuiverheid (na de eerste kooladsorptie) geven zij een curve, die identiek is met die

van het zuivere biotine. Daarom hebben wij bij de verdere opwerking de meer gezuiverde preparaten steeds vergeleken met een tweeden standaard, die bestond uit een voldoende ver gereinigd eigeelpreparaat of uit een oplossing van zuiver biotine in een concentratie  $1 : 2 \times 10^9$ .



### HOOFDSTUK III.

#### BEREIDING VAN BIOTINE UIT EIGEEL.

In het geheel hebben K ö g l en T ö n n i s door opwerking van 250 KG. eendeneigeel 1,1 mg kristallen bereid, die een activiteit hadden van omstreeks 25 milliard SE. per gram. De genoemde auteurs ondervonden vooral bij den laatsten trap van de zuivering groote moeilijkheden, doordat de actieve kristallen van het hoogvacuumdestillaat zeer moeilijk te scheiden waren van de er aan hechtende inactieve olie.

In tegenstelling tot de vroegere onderzoekers ben ik van kipeneigeel uitgegaan, dat door zijn hoogere activiteit en door de gunstigere eigenschappen van de ballaststoffen beter geschikt was.

De eerste trappen van de opwerking konden nagenoeg zonder wijziging ook op het nieuwe materiaal toegepast worden, eenige van de latere trappen konden vervallen, terwijl andere gewijzigd of verbeterd werden. Ofschoon de opbrengst aan zeer actieve ruwe preparaten mede door het andere uitgangsmateriaal aanzienlijk beter was, was het ook mij langen tijd niet mogelijk, de actieve kristallen op eenvoudige wijze van de hardnekkig er aan hechtende olie te bevrijden en pas na bijna een jaar werk vond ik een weg, welke op steeds reproduceerbare wijze tot zuivere kristallen leidde.

In het begin trachtte ik de destillatie in microretortjes zóó uit te voeren, dat de actieve fractie zoo veel mogelijk in de minder viskeuze voorloop getrokken werd. Daarna werd onderzocht, of een andere uitvoering van de verestering voordeelen bood; te dien einde werden de HCl-concentratie, de temperatuur en de reactieduur gevarieerd. Dit had echter geen succes, evenmin het vervangen van methylalkohol door aethylalkohol. Hierna heb ik getracht, de „esterbase” door uitschudden met zuren van verschillende sterkte te fractioneeren, zooals dat bij de scheiding van vele andere natuurproducten (bijv. de porphyrinen) toepassing gevonden heeft. Helaas hebben al deze pogingen gefaald. Er bleef nu slechts de uitweg, de methodiek van de gefractioneerde destillatie te verbeteren. Hierbij was het vooral ook gewenscht,

eenigszins grootere hoeveelheden te kunnen destilleeren, omdat bij de tot nu toe gebruikte techniek de procentueele opbrengst aan zeer actief destillatieproduct verminderde, zoodra meer dan 10—12 mg ruw product gedestilleerd werden. Een mogelijkheid in die richting bood de zoogenaamde „moleculaire destillatie” \*), welke reeds door verscheidene onderzoekers met succes was toegepast. Belangrijk is hierbij de zeer korte afstand tusschen den koeler en het oppervlak van het te destilleeren product, alsmede een lage temperatuur van het koeloppervlak. Terwijl om dit laatste te bereiken gewoonlijk vloeibare lucht gebruikt wordt, bleek voor ons geval reeds de temperatuur van een mengsel van alcohol en vast koolzuur voldoende te zijn. Wij construeerden voor ons doel het hiernaast afgebeelde toestel.

Het destilatie-vat was gemaakt van een normaal slijpstuk (50/10) van Jena-glas. Het koelvlak bevond zich ongeveer 1,5 mm boven den bodem van het vat. De koeler, gemaakt van vernikkeld messing, werd in de door de pijpen aangegeven richting doorstroomd door alcohol, die met behulp van een mengsel van vast koolzuur en alcohol, tot ongeveer  $-50^{\circ}$  was afgekoeld. De koelvloeistof stroomde na het verlaten van den koeler door een klein vat, waarin een thermometer stak, waarmee de temperatuur van de koelvloeistof gecontroleerd kon worden. De alcohol werd door den koeler gepompt met behulp van een heeteluchtmotor. Daar de alcohol het pompje zeer snel passeert, bleek dit geen bezwaar op te leveren. Van het pompje stroomde de alcohol naar het koelvat terug, waar hij weer tot  $-50^{\circ}$  werd afgekoeld. Koelvat, koeler en pomp waren verbonden door gewone koelerslang, geïsoleerd met watten en asbest.

Wij hebben talrijke destillaties met dit toestel verricht en het geheel heeft ons uitstekend voldaan.

Het voordeel bestond ten eerste daarin, dat een hoeveelheid van 150—200 mg in eens gedestilleerd kon worden en ten tweede, dat de actieve stof reeds bij een badtemperatuur van  $150-155^{\circ}$  overging, terwijl bij de gewone hoogvacuumdestillatie een temp. van  $225-250^{\circ}$  noodig was. Deze aanzienlijke temperatuursverlaging had een veel betere kwaliteit van het destillatieproduct tengevolge; het met behulp van chloroform van den koeler afge-

---

\*) J. N. Bronsted en G. Hevesy, *Philos. Mag. J. Sci.* [6], 43, 31 (1922)  
J. W. Hills, *Science* 76, 218 (1932); *Z.* 1933, I, 3598.

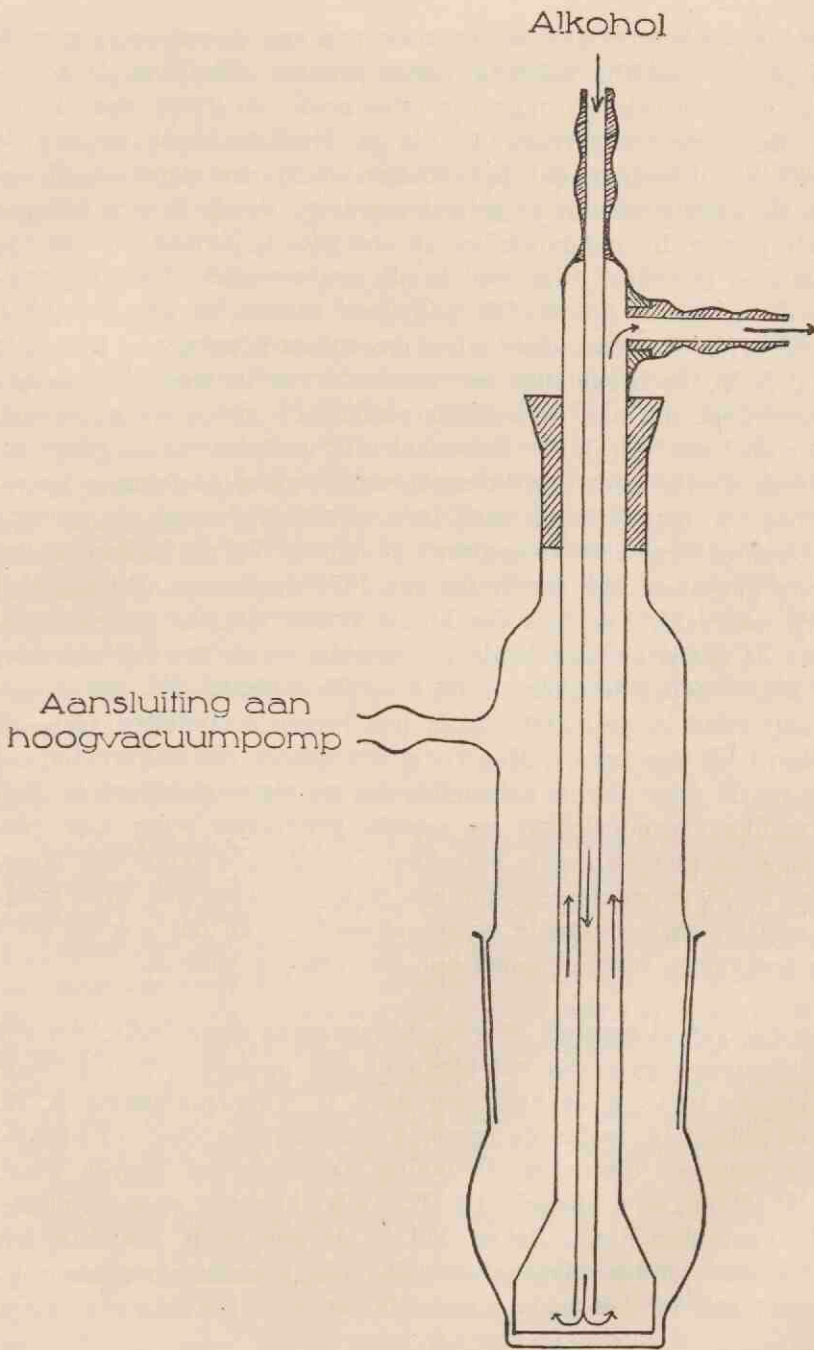


Fig. II.



spoelde condensaat gaf na het indampen van de oplossing onmiddellijk een prachtig gekristalliseerd product. Ofschoon de activiteit van deze fracties ongeveer twee maal zoo groot was als die van de vroeger verkregen destillaten, bleef toch ook nu nog de moeilijkheid bestaan, dat de kristallen slechts met groote verliezen van de aanwezige olie te scheiden waren. Reeds in een vroeger stadium van dit onderzoek heb ik veel moeite gedaan om een oplosmiddel te vinden, dat wel de olie, echter niet of slechts weinig de kristallen oplost. Dit had geen succes, hoewel tientallen vloeistoffen in vele combinaties geprobeerd werden. Gelukkig vond ik bij de hervatting van deze proeven in mesityloxyde een oplosmiddel, dat aan de gestelde eischen op ideale wijze voldeed. Voor analyses heb ik de twee maal uit mesityloxyde omgekristalliseerde biotine-ester nog uit een mengsel van chloroform en petroleumaether omgekristalliseerd. Als smeltpunt \*) van de zuivere verbinding werd  $158^{\circ}$  (ongecorr.) gevonden. T ö n n i s had bij het eerste preparaat een smeltpunt van  $148^{\circ}$  opgegeven. Dit verschil werd waarschijnlijk door een kleine verontreiniging veroorzaakt, want de activiteit van beide preparaten stemt vrijwel overeen: T ö n n i s bepaalde haar in 1934 op 25 milliard SE. per gram. Ik zelf vond in de laatste jaren iets lagere activiteiten (20—25 milliard SE per gram). Men krijgt den indruk, dat de gevoeligheid van ras M voor biotine geleidelijk een weinig verminderd is. Een dergelijke verandering is na zoovele generaties zeker niet verrassend en men kan zelfs omgekeerd uit de afwijking van hoogstens 20 % concludeeren, dat ras M in den loop van drie jaren op relatief zeer constante wijze gekweekt is en dat ook de door ons toegepaste testmethodiek aan alle eischen voldoet.

In het geheel werden 1650 kg kippeneigeel opgewerkt. Terwijl ik de eerste portie van het begin af zelf opwerkte, had ik voor de laatste 1000 kg de hulp van de I. G. Farbenindustrie A. G. Werk Elberfeld, welke de eerste 8 trappen van den zuiveringsgang voor mij uitvoerde. Ik betuig daarvoor den heeren Prof. Dr. H. H ö r l e i n alsmede Dr. F. S c h u l t z ook op deze plaats mijn oprechten dank. Zeker had ik de genoemde hoeveelheden niet in den ter beschikking staanden tijd kunnen afwerken zonder dat mij bij het laatste gedeelte de heer D e M a n terzijde

---

\*) Het smeltpunt werd bepaald met het smeltpuntmicroscop van Reichert.

gestaan had; ik ben hem voor de toewijding, waarmee hij een deel van de opwerkingen op zich nam, buitengewoon erkentelijk.

In de volgende beschrijving van het zuiveringsprocédé zijn bij de verschillende trappen de gemiddelde opbrengsten aan actief materiaal aangegeven voor een uitgangshoeveelheid van 100 KG eigeel.

Hierbij wil ik echter nog het volgende opmerken:

Bij versche preparaten verliep de opwerking steeds gunstiger, d.w.z. de hoeveelheid actieve stof, die in de juiste fractie terecht kwam, was, vergeleken met de hoeveelheid, die in de nevenfracties bleef, procentueel steeds grooter dan bij oude preparaten. Dit gold vooral voor de tweede kooladsorptie. Die nevenfracties waren echter nog niet verloren. De meer actieve werden opnieuw aan een kooladsorptie, verestering enz. onderworpen; de minder actieve afvalfracties werden in water opgelost en deze oplossing na aanzuren met zoutzuur met n-butylalkohol uitgeschud. Het biotine ging hierbij voor het grootste deel in den butylalkohol over en het na afdampen van den butylalkohol achterblijvende residu werd dan weer verder via kooladsorptie en verestering opgewerkt.

### 1. Extractie met koud water.

Het fijngemalen eigeel werd in wijdmondse flesschen met de vijfvoudige hoeveelheid koud water aangeroerd, waarbij een brei ontstond, die practisch niet te filtreeren was. Na 12 uur staan had het eigeel zich in twee lagen afgescheiden, waartusschen zich een laag nagenoeg heldere oplossing bevond, die zoo goed mogelijk met behulp van een hevel tusschen de beide eigeellagen werd weggezogen. Met dit koud extract werd tamelijk veel in water oplosbaar inactief materiaal verwijderd. Per 100 kg eigeel bevatte dit extract ongeveer 4000 g vaste stof met een totale activiteit van ca  $4 \times 10^8$  SE. Dit extract werd weggeworpen.

### 2. Extractie met kokend water.

De achtergebleven eigeelbrei werd onder mechanisch roeren in de vijfvoudige hoeveelheid kokend water gebracht en vervolgens 1 uur onder voortdurend roeren gekookt. Na afkoelen tot 50 à 60° werd in aardewerkfilters gefiltreerd (het best door

neteldoek) en het afgefilterde eigeel op dezelfde wijze nog 1 à 2 maal \*) met de vijfvoudige hoeveelheid water uitgekookt. Het verkregen extract werd in een vertind-ijzeren vacuümketel van 50 L. inhoud ingedampt (onder toevoeging van een weinig laurinealkohol tegen het schuimen). Badtemperatuur: 50—55°.

Het extract van 100 kg eigeel (1000 L) werd tot  $\pm 50$  L geconcentreerd; de gele emulsie bevatte ongeveer 3000 g vaste stof met een activiteit van  $ca 8,4 \times 10^5$  SE/g, dus in het geheel  $2,5 \times 10^9$  SE, overeenkomende met 100 mg biotine.

Bij het opwerken van de laatste kisten eigeel hebben wij bij het uitkoken kort vóór het filtreren op aanraden van Dr. Schultz een weinig azijnzuur (ongeveer 0,5 cc per L. vloeistof) toegevoegd. Hierdoor pakte het eigeel goed samen, zoodat het gemakkelijker gefiltreerd kon worden. Wel verdient het dan aanbeveling, het geconcentreerde extract te neutraliseeren.

### 3. Behandeling met aceton:

Bij het ingedampte extract werd onder mechanisch roeren (in gegalvaniseerd-ijzeren pannen) een gelijk volume aceton uit scheidtrechters bijgedruppeld (snelheid van bijdruppelen  $\pm 10$  L per uur). Er vormde zich een dik geelwit neerslag, dat na eenige uren staan zoover bezonken was, dat van de bovenstaande heldere lichtbruine oplossing een groot gedeelte door een (glazen) hevel kon worden weggezogen. De rest werd gecentrifugeerd en het neerslag na testen weggeworpen. De heldere oplossing werd in glazen kolven in vacuo ingedampt tot 10 L, welke 1900 g vaste stof bevatten met een activiteit van  $1,2 \times 10^6$  SE/g, tezamen dus  $2,3 \times 10^9$  SE.

Concentreering:  $\pm 50$ -voudig.

### 4. Behandeling met alcohol:

Bij het ingedampte acetonfiltraat werd op geheel analoge wijze het viervoudige volume absolute alcohol gedruppeld. Het neerslag, dat hierbij ontstond, was soms lichtbruin en vlokkig en kon dan gemakkelijk op een grooten Buchner-trechter worden afgezogen. Soms plakte het als een donkerbruine kleverige massa aan den bodem. De heldere bovenstaande oplossing kon er dan eenvoudig worden afgegoten. Het neerslag werd weggeworpen.

De oplossing werd ingedampt tot  $\pm 8$  L, waarin nog aanwe-

\*) De laatste extractie rendeert echter slechts bij een zeer groote activiteit van het eigeel.

zig was 1300 g vaste stof met een activiteit van  $1,7 \times 10^6$  SE/g, totaal dus  $2,2 \times 10^9$  SE.

Concentreering:  $\pm 70$ -voudig.

### 5. Behandeling met loodacetaat:

Het ingedampte alcoholisch filtraat werd gelijk verdeeld over 3 wijmondse flesschen van 15 L inhoud en hierin met water verdund, tot elke flesch 10 L vloeistof bevatte. Onder roeren met een houten spaan werd nu aan iedere flesch een oplossing van 400 g neutraal loodacetaat in 1 L water toegevoegd, waarbij een dik lichtgeel neerslag ontstond, dat door een Sharples-Supercentrifuge werd afgecentrifugeerd. Bij de heldere vloeistof werd vervolgens zooveel ammonia toegevoegd, dat de vloeistof alkalisch reageerde tegenover lakmoes. Hierbij ontstond opnieuw een dik oranje neerslag, dat eveneens werd afgecentrifugeerd. Uit de zoo verkregen heldere oplossing werd het nog aanwezige lood, na neutraliseeren met HCl, met  $H_2S$  neergeslagen. Het PbS werd afgefiltreerd en het filtraat in glazen kolven in vacuo ingedampt tot 10 L. De beide neerslagen werden weggeworpen.

Vaste stof in het filtraat:  $\pm 1100$  g.

Activiteit:  $1,8 \times 10^6$  SE/g, dus in het geheel  $2,0 \times 10^9$  SE.

Concentreering:  $\pm 70$ -voudig.

### 6. Eerste kooladsorptie:

Het filtraat van het loodneerslag (10 L) werd gedurende 15 min. met 100 g kool (Carbo medicinalis Merck) krachtig geroerd. Vervolgens werd de kool op een Buchner-trechter afgezogen en hierop met een weinig water nagewasschen. Het filtraat werd direct daarna opnieuw 15 min. met 100 g kool geroerd en deze portie kool na affiltreeren en uitwasschen met de eerste portie kool vereenigd. (Het filtraat werd getest en indien noodig nog voor een derde maal met 100 g kool behandeld, welke laatste portie kool later apart werd geëluëerd.)

De twee eerste porties kool werden gezamenlijk gedurende  $\frac{1}{2}$  uur met 2 L aceton-ammoniak (1200  $cm^3$  aceton + 50  $cm^3$  20 %-ige.  $NH_4OH$  + 750  $cm^3$  water) geroerd. Na affiltreeren werd deze bewerking nog twee maal herhaald. De drie acetoneeluatens werden vereenigd en drooggedampt.

Opbrengst: 110 g à  $18 \times 10^6$  SE/g, totaal  $2,0 \times 10^9$  SE.  
 Concentreering:  $\pm$  700-voudig.

Vroeger werd steeds 1000 g kool genomen en vóór de elutie met aceton-ammoniak een elueering met 50%-igen alkohol uitgevoerd ter verwijdering van geadsorbeerd inactief materiaal. Bij gebruik van 200 g kool kon deze elutie met alkohol vervallen. Door zeer kleine porties kool (25 g) te nemen en deze apart te elueeren, konden zelfs eluaten verkregen worden met een activiteit van  $80 \times 10^6$  SE/g. De verdere opwerking van deze zeer actieve preparaten verliep echter niet zóó gunstig, dat het meerdere werk er door beloond werd.

## 7. Behandeling met phosphorwolfraamzuur:

Het bij 6 verkregen kooleluat werd in  $110 \text{ cm}^3$  5 %-ig zwavelzuur opgelost en quantitatief in een bruinewijmondsche stopflesch overgebracht. Vervolgens werd hierbij gevoegd een oplossing van 200 g phosphorwolfraamzuur in  $200 \text{ cm}^3$  5 %-ig zwavelzuur en het reactiemengsel enkele minuten krachtig geschud. Het neerslag werd afgezogen, met weinig 5 %-ig zwavelzuur nagewasschen en goed op het filter afgeperst. Het neerslag werd ontleed door het in een mortier onder toevoeging van een weinig verzadigde barietoplossing met een overmaat vast bariet te wrijven. Na af-filtreeren werd deze bewerking zoo vaak herhaald, tot het filtraat nog maar zwak geel gekleurd was. Uit het heldere filtraat werd vervolgens de overmaat bariet verwijderd door titreeren met 5 %-ig zwavelzuur.

Het  $\text{BaSO}_4$  werd afgefiltreerd en het filtraat in vacuo droog-gedampt.

Opbrengst: 35 g à  $48 \times 10^6$  SE/g; in het geheel:  $1,7 \times 10^9$  SE.  
 Concentreering:  $\pm$  2000-voudig.

Bij deze wijze van ontleding van het phosphorwolfraamzuurneerslag, welke ik eveneens aan Dr. Schultz dank, traden weinig of geen verliezen op, in tegenstelling met de vroeger toegepaste methode (roeren van het neerslag in een 2%-ige barietoplossing), waarbij vermoedelijk steeds actief materiaal door het bariumphosphorwolframaat werd ingesloten. Ook de ontleding van het phosphorwolfraamzuurneerslag, door het in 75%-ige aceton op te lossen en bij deze oplossing 2%-ige barietoplossing te voegen, verliep niet naar wensch.

## 8. Extractie met absoluten alkohol:

Het bij den vorigen trap verkregen product werd met  $350 \text{ cm}^3$  absoluten alkohol en porseleinen kogeltjes geschud. Het onoplos-

bare deel werd afgefiltreerd en met absoluten alcohol nagewaschen. De alcoholische oplossing, die nagenoeg alle actieve stof bevatte, werd in vacuo drooggedampt.

Opbrengst: 19.5 g à  $8,4 \times 10^7$  SE/g; dus totaal  $1,6 \times 10^9$  SE.

Concentreering:  $\pm 3400$ -voudig.

De vroeger na den achtsten trap uitgevoerde scheiding met behulp van alcoholische sublimaats-oplossing heb ik niet toegepast, omdat de hoeveelheid van dit reagens, waarbij de actieve stof nog niet neergeslagen wordt, moeilijk is aan te geven.

## 9. Tweede kooladsorptie:

Ook bij deze kooladsorptie bleek door gebruik te maken van een kleinere hoeveelheid kool de elutie met verdunnen alcohol te kunnen vervallen.

Het product van den 8sten trap werd opgelost in de 15-voudige hoeveelheid water en deze oplossing gedurende 15 min. met de halve gewichtshoeveelheid kool geschud. Vervolgens werd de kool afgefiltreerd, op het filter met een kleine hoeveelheid water uitgewassen en daarna drie maal  $\frac{1}{2}$  uur met de 10-voudige hoeveelheid aceton-ammoniak geëluëerd. De beide eerste eluaten werden vereenigd en drooggedampt.

- a. koolfiltraat: 16,5 g à  $1,2 \times 10^7$  SE/g. Totaal  $2,0 \times 10^8$  SE.
- b. 1e + 2e eluaat: 4,7 g à  $30 \times 10^7$  SE/g. „  $1,4 \times 10^9$  SE.
- c. 3e eluaat: 0,2 g à  $2,4 \times 10^7$  SE/g. „  $4,8 \times 10^6$  SE.

De hierna door Tönnis toegepaste herhaling van de behandeling met phosphorwolframzuur werd eveneens van het begin af weggelaten, daar preparaat 9b reeds de vereischte activiteit bezat en bij de opwerking van het eerste phosphorwolframzuurneerslag op de wijze, zooals ik die vroeger uitvoerde (met 2%-ige bariet-oplossing), soms groote verliezen aan actieve stof optraden.

## 10. Eerste verestering:

Dezen trap heb ik ingevoerd in plaats van het broompikrolonzuur-neerslag tusschen de trappen 11 en 12, omdat hierbij soms vrij veel actief materiaal in het neerslag overging, welk verlies des te sterker optrad naarmate de preparaten actiever en dus beter waren. Weliswaar verliep deze eerste verestering ook niet altijd naar wensch, en bleef soms een groote hoeveelheid actieve stof in de waterlaag, maar deze behoefde dan slechts na droogdampen opnieuw veresterd te worden, waarbij nagenoeg geen verliezen optraden. Voor het ontleiden van een broompikrolonzuur-neerslag had ik geen bevredigende methode.

Praeparaat 9 b werd met  $100 \text{ cm}^3$  1,5 %-ig methylalcoholisch

zoutzuur gedurende eenige uren onder een terugvloeiakoeler gekookt. Vervolgens werd het reactiemengsel in vacuo drooggedampt en het residu opgenomen in  $\pm 15 \text{ cm}^3$  water en  $10 \text{ cm}^3$  chloroform. Na afscheiden van de chloroformlaag in een scheitrechtertje werd de waterlaag nog 9 maal met  $\pm 5 \text{ cm}^3$  chloroform uitgeschud. De chloroformextracten werden vereenigd en daarna 15 maal uitgeschud met ongeveer het halve volume 3 N zoutzuur.

Deze zoutzure extracten werden eveneens vereenigd en drooggedampt:

- a. waterlaag:  $3,2 \text{ g} \text{ à } 6 \times 10^7 \text{ SE/g}$ , totaal  $2,0 \times 10^8 \text{ SE}$ .
  - b. HCl-extract:  $0,86 \text{ g} \text{ à } 1,4 \times 10^9 \text{ SE/g}$ , totaal  $2,4 \times 10^8 \text{ SE}$ .
  - c.  $\text{CHCl}_3$ -laag:  $1,- \text{ g} \text{ à } 5 \times 10^7 \text{ SE/g}$ , totaal  $0,5 \times 10^8 \text{ SE}$ .
- Concentreering:  $\pm 58000$ -voudig.

#### 11. Tweede verestering:

Het bij den vorigen trap verkregen zeer actieve residu van het HCl-extract werd, na goed gedroogd te zijn, opnieuw met  $\pm 20 \text{ cm}^3$  1,5 %-ig methylalkoholisch zoutzuur gedurende 1 uur gekookt en vervolgens drooggedampt. Na oplossen van het achtergebleven product in een kleine hoeveelheid absoluten methylalkohol en opnieuw droogdampen (om het HCl zoo goed mogelijk te verwijderen) werd het residu opgenomen in  $\pm 10 \text{ cm}^3$  water en een gelijk volume chloroform. Na afscheiden van de chloroformlaag werd deze nog 2 maal met een gelijk volume water uitgeschud en werden deze waterige extracten vereenigd.

Vervolgens werd de chloroformlaag 10 maal uitgeschud met  $10 \text{ cm}^3$  N zoutzuur en werden ook deze extracten vereenigd en drooggedampt.

- a. waterlaag:  $0,420 \text{ g} \text{ à } 8 \times 10^8 \text{ SE/g}$ , totaal  $3,4 \times 10^8 \text{ SE}$ .
  - b. HCl-extract:  $0,320 \text{ g} \text{ à } 2,5 \times 10^9 \text{ SE/g}$ , totaal  $8,0 \times 10^8 \text{ SE}$ .
  - c.  $\text{CHCl}_3$ -laag:  $0,150 \text{ g} \text{ à } 7,2 \times 10^8 \text{ SE/g}$ , totaal  $1,1 \times 10^8 \text{ SE}$ .
- Concentreering: 100.000-voudig.

#### 12. Bereiding van de „esterbase”:

Fractie 11b werd opnieuw veresterd door 1 uur koken met 1,5 %-ig methylalkoholisch zoutzuur ( $\pm 10 \text{ cm}^3$ ). Na droogdampen werd het residu opgelost in ca  $5 \text{ cm}^3$  water en bij deze oplossing zooveel vast  $\text{NaHCO}_3$  gevoegd, dat zij alkalisch reageerde

tegenover lakmoes. Vervolgens werd deze alkalische oplossing 5 maal uitgeschud met een gelijk volume chloroform.

Deze chloroform-extracten werden vereenigd en drooggedampt:

Opbrengst: 0,300 g à  $2,5 \times 10^9$  SE/, totaal  $7,5 \times 10^8$  SE.

Concentreering: 100.000-voudig.

De waterlaag werd na aanzuren met zoutzuur eveneens drooggedampt. Deze fractie heb ik later met soortgelijke fracties vereenigd en na extractie met absoluten alkohol (ter verwijdering van NaCl) opnieuw opgewerkt.

Het met den naam „esterbase” aangeduide product bestond uit een bruine stroop, waarin na langeren tijd gewoonlijk een groot gedeelte van de er in aanwezige biotine-methylester uitkristalliseerde. Door dit product direct met mesityloxyde te behandelen heb ik ook eenige malen de actieve stof kunnen isoleeren (naar activiteit en mengsmeltpunt identiek met het na destillatie verkregen product). Echter moest bij deze manier van opwerken wegens de groote hoeveelheid nog aanwezige verontreinigingen steeds zoo veel mesityloxyde worden toegevoegd, dat de opbrengst aan zuivere kristallen betrekkelijk gering was.

### 13. Destillatie:

De verkregen esterbase werd in porties, die gewoonlijk varieerden van 150—200 mg, onder een druk van 0,005—0,010 mm kwik gefractioneerd in het toestel voor „moleculaire destillatie”, dat reeds in de inleiding van dit hoofdstuk besproken is.

De destillaties heb ik uitgevoerd als volgt: De esterbase werd in het destillatievat gebracht en na hierin goed gedroogd te zijn, de vacuumpomp in werking gesteld. Tegelijkertijd werd begonnen met het afkoelen van den alkohol in het koelvat.

Nadat de druk tot 0,01 mm was gedaald, werd het motortje aangezet, dat den alkohol door den koeler pompte; zoodra de temperatuur van den uit den koeler stroomenden alkohol tot  $-50^\circ$  was gedaald, werd het oliebad onder het destillatievat op de gewenschte hoogte aangebracht en langzaam opgewarmd tot  $125^\circ$ . Daarna werd het bad  $\frac{1}{2}$  uur op deze temperatuur gehouden, vervolgens verwijderd en nadat het destillatievat afgekoeld was, de vacuumpomp en het alkoholpompje afgezet. Door middel



van een driewegkraan werd gezorgd, dat het destillatievat onder vacuum bleef. Pas nadat de koeler op kamertemperatuur was gekomen (na  $\pm 2$  uur), werd lucht toegelaten en het onderste slijpstuk van het destillatietoestel afgenomen.

Door den koeler eenigszins schuin te plaatsen kon het destillaat er gemakkelijk met chloroform worden afgespoeld. Deze oplossing werd in vacuo drooggedampt. Dit product, dat bestond uit een lichtgele stroop, bevatte slechts zeer weinig biotine-ester.

Vervolgens werd op dezelfde manier de hoofdfractie overgedestilleerd door de temperatuur van het oliebad op te voeren tot  $150^\circ$  en 1 uur op  $150^\circ$ — $155^\circ$  te houden.

Dit destillaat zette zich gewoonlijk ook als een laag licht gekleurde stroop op den koeler af (slechts zeer zelden waren reeds op den koeler kristalnaaldjes te zien), maar na afspoelen met chloroform en voorzichtig droogdampen van deze chloroformoplossing in een vacuumexsiccator, bleef een product achter, dat nagenoeg geheel kristalliseerde.

Deze hoofdfractie bevatte 70 à 80 % van de in de oorspronkelijke esterbase aanwezige hoeveelheid biotine-ester, terwijl het gewicht ongeveer  $\frac{1}{5}$  van dat der esterbase bedroeg.

In het destillatievat bleef een bruinzwart residu achter. Dit bevatte in den regel nog voldoende biotine, om de moeite van het opwerken waard te zijn. Soms werd het nogmaals aan een distillatie onderworpen, waarbij de temperatuur tot  $170^\circ$  werd opgevoerd, maar meestal werden de residu's van meerdere distillaties verenigd en de chloroformoplossing hiervan met 3 N zoutzuur uitgeschud, waarbij het nog aanwezige biotine bijna geheel in het zoutzuur overging. Na verdampen van het zoutzuur werd het hierbij achterblijvende residu dan opnieuw in de esterbase omgezet en deze weer aan een destillatie onderworpen.

#### 14. Omkristalliseeren uit mesityloxyde:\*)

Het destillatieproduct werd met behulp van zoo weinig mogelijk chloroform in een micro-erlenmeyertje overgebracht en deze oplossing in een vacuumexsiccator bij kamertemperatuur goed drooggedampt. Aan het mengsel van kristallen en stroop werden

---

\*) Het bleek aanbeveling te verdienen om het mesityloxyde kort voor het gebruik te fractioneeren, althans voor het omkristalliseeren geen mesityloxyde te bezigen, dat langer dan een week gestaan had.

nu eenige druppels mesityloxyde toegevoegd. De stroop lost hierbij gemakkelijk op, terwijl de kristallen slechts zeer weinig oplossen. De oplossing werd met een fijne capillair tusschen de kristallen weggezogen.

De achterblijvende kristallen werden nu omgekristalliseerd door ze in zoo weinig mogelijk mesityloxyde op te lossen onder verwarmen tot ca 80°.

De bruine moederloog werd weer met een capillair tusschen de kristallen weggezogen. De kristallen, die nog licht geel gekleurd waren door het laatste restje bruine stroop, werden opgelost in chloroform, de oplossing gefiltreerd en drooggedampt. Daarna werd het residu opnieuw onder verwarming in mesityloxyde opgelost, na afkoelen de moederloog weer met een capillair weggezogen en de kristallen in het erlenmeyertje eerst met mesityloxyde en daarna met petroleumaether (kpt 40—60°) uitgewasschen. De na het verdampen van de petroleumaether achterblijvende droge kristallen konden nu gemakkelijk zonder verliezen met een spateltje in een trechttertje met een ingeslepen glazen „paddestoeltje” (zonder filtreerpapier) worden gebracht. Hierop werden ze opnieuw met versch mesityloxyde aangerood, drooggezogen, één maal nagewasschen met mesityloxyde en daarna 2 maal met petroleumaether.

De nu achterblijvende kristallen bestonden uit losse glanzende witte naaldjes. Smp. 158° (microscoop).

Opbrengst: ± 10 mg.

Activiteit:  $25 \times 10^9$  SE/g. Zie hiervoor ook blz. 20.

## HOOFDSTUK IV.

### OVER DE CHEMIE VAN HET BIOTINE.

In het geheel hebben wij 136,- mg biotine-methylester bereid. Zooals vanzelf spreekt moest ik mij bij de analyses en alle bewerkingen tot het allernoodzakelijkste beperken, terwijl verschillende op zichzelf zeer wenschelijke proeven tot later uitgesteld moesten worden. Onder deze omstandigheden kunnen sommige resultaten slechts met een zeker voorbehoud genoemd worden; zij zullen echter in elk geval als werkhypothesen van nut kunnen zijn.

**Oplosbaarheid van biotine-methylester.** De bij de opwerking van het eigeel verkregen biotine-methylester kristalliseert in den vorm van kleurlooze fijne naaldjes, die bij  $158^{\circ}$  smelten. Zooals dat ook het geval is bij de isoleering van andere zeer actieve stoffen, bleken de kristallen van biotine-methylester veel minder goed oplosbaar te zijn dan op grond van de ervaringen bij de opwerking vermoed was. De zuivere ester is in water en in de gebruikelijke organische oplosmiddelen matig oplosbaar, in aether en vooral in petroleumaether nagenoeg onoplosbaar. Naar schatting bedraagt de oplosbaarheid in methylalkohol bij kamertemperatuur ongeveer 1 gram per 100 gram oplosmiddel.

Bij de in hoofdstuk III vermelde pogingen, de kristallen van biotine-methylester te scheiden van de er aan hechtende olie, heb ik een vijftigtal oplosmiddelen onderzocht, waarbij bleek, dat de kristallen in paraffinekoolwaterstoffen nagenoeg onoplosbaar zijn, doch in onverzadigde koolwaterstoffen (cyclohexeen, benzol) aanmerkelijk beter oplossen. De oplosbaarheid in alcoholen is relatief groot, ook die in gehalogeneerde koolwaterstoffen. Aceton en methylaethylketon zijn eveneens goede oplosmiddelen voor biotine-methylester. Terloops zij nog vermeld, dat inplaats van mesityloxyde voor het omkristalliseeren ook phoron, methylheptenon of allylbenzol gebruikt zouden kunnen worden.

**Optische activiteit.** Voor de bepaling van de specifieke draaiing scheen absolute methylalkohol als oplosmiddel het meest

geschikt. De boven reeds vermelde oplosbaarheid in metylalkohol was echter geringer dan wij verwachtten. Daar biotine-methylester een vrij sterke draaiing toont, was deze ook in de verdunde oplossing goed waar te nemen; evenwel kan door de genoemde omstandigheden en door het feit, dat ons geen micro-meetbuis van grootere lengte dan 1 dM ter beschikking stond, de specifieke draaiing slechts met een nauwkeurigheid van eenige graden worden opgegeven.

Concentratie: 7,5 mg biotine-methylester in 1,280 g absoluten methylalkohol.

Temperatuur: 15°. Lengte der buis: 1 dM.

$$\alpha_D^{15} = + 0,38^\circ \pm 0,01^\circ$$

$$\alpha_D^{15} \times 100$$

$$[\alpha]_D^{15} = \frac{100 \times 0,0075}{1 \times 0,79 \times \frac{1,2875}{1,280}} = + 82^\circ \pm 3^\circ$$

Ultravioletabsorptie. De heer C. Koningsberger had de vriendelijkheid, bij verschillende van mijn preparaten na te gaan, of zij al dan niet in het ultraviolet een absorptie vertoonden. Inderdaad vond hij bij het eerste preparaat (in chloroform) een zeer geringe absorptie bij 240 m $\mu$ . Daar dit preparaat slechts twee keer uit mesityloxyde was omgekristalliseerd en dit  $\alpha\beta$ -onverzadigde keton in aethylalkohol het karakteristieke maximum bij 235 m $\mu$  toont<sup>43)</sup>, lag het voor de hand aan te nemen, dat de absorptie van ons preparaat door een verontreiniging met mesityloxyde veroorzaakt was; een gehalte van 1 % mesityloxyde zou de absorptie kunnen verklaren. Ik heb toen een dergelijk preparaat van biotine-methylester in chloroform opgelost en hieruit met petroleumaether neergeslagen. Inderdaad bleek na deze behandeling de absorptie geringer te zijn, en wel zou ze nu overeenkomen met de aanwezigheid van 0,4 % mesityloxyde. Een volgend preparaat van biotine-methylester heb ik twee keer uit mesityloxyde, één keer uit een mengsel van chloroform en petroleum-aether (1 : 1) en tenslotte nog één keer uit absoluten methylalkohol

43) G. Scheibe, F. Mayen H. Fischer, Ber. 57, 1330 (1924).  
A. E. Bradfield, B. H. Edge, B. Sanjiva Rao, J. L. Simonsen  
en A. E. Gillam, J. Chem. Soc. 1936, 667.  
J. Bielecki en V. Henri, Ber. 47, 1690 (1914).

omgekristalliseerd. Ook in dit geval was nog een, zij het ook zeer geringe absorptie bij  $240\text{ m}\mu$  te constateeren, die overeen zou komen met een verontreiniging door  $0,25\%$  mesityloxyde. Aangezien deze absorptie zoo gering was, dat zij met de gevoeligheid van de gebruikte apparatuur maar net kon worden waargenomen, hebben wij ervan afgezien, de met groote verliezen gepaard gaande zuivering van onze kristallisaten nog verder voort te zetten. Zooals bekend, is het ook bij stoffen, welke in onbeperkte hoeveelheid ter beschikking staan, niet altijd gemakkelijk ze optisch absoluut zuiver te verkrijgen. Misschien is het niet overbodig erop te wijzen, dat bij de elementairanalyse en ook bij de bepaling van de physiologische activiteit dergelijke sporen van verontreinigingen meestal niet aan te toonen zijn. Het is niet buitengesloten, dat de absorbeerende stof uit het eigeel zelf afkomstig is; helaas konden wij dit niet uitmaken door mesityloxyde als oplosmiddel te vermijden, daar deze of een soortgelijke verbinding voor de zuivering onmisbaar was.

De door den heer K o n i n g s b e r g e r gevonden waarden zijn weergegeven in onderstaande tabel, waarin  $h$  = de absorptiecoëfficiënt van de betreffende oplossingen.

Golflengte	Preparaat 956 conc. 740 mg/L h.	Preparaat 960 conc. 660 mg/L h.	Preparaat 1050 I conc. 740 mg/L h.
405—270 $\text{m}\mu$	0	0	0
265 $\text{m}\mu$	—	—	0,01
254 „	0,12	0,03	0,02
248 „	0,17	0,06	0,05
240 „	0,24	0,09	0,06
238 „	0,19	0,07	0,05
234 „	0,14	0,05	0,05

Prep. 956:  $2 \times$  omgekristalliseerd uit mesityloxyde; verontreiniging  $1\%$ . (gerekend als mesityloxyde).

Prep. 960:  $2 \times$  omgekrist. uit mesityloxyde, daarna  $1 \times$  uit  $\text{CHCl}_3$ -petrol.; verontreiniging:  $0,4\%$  (gerekend als mesityloxyde).

Prep. 1050 I:  $2 \times$  omgekrist. uit mesityloxyde,  $1 \times$  uit  $\text{CHCl}_3$ -petroleumaether en  $1 \times$  uit absoluten  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; verontreiniging:  $0,25\%$ , (gerekend als mesityloxyde.)

## Bepaling van de brutoformule.

Kögl en Tönnis hebben geconstateerd, dat de kristallen van biotine-methylester stikstof bevatten; de reactie op zwavel en fosfor werd toentertijd slechts met een zeer actief ruw product uitgevoerd en leverde een negatief resultaat, klaarblijkelijk werd toen voor deze proeven te weinig materiaal opgeofferd. Bij de herhaling met de gekristalliseerde biotine-methylester bleek nl., dat de verbinding inderdaad vrij is van fosfor, doch wel zwavel bevat. Het is zeer opmerkelijk, dat behalve aneurine ook nog een tweede bios-factor een stikstof- en zwavelhoudende verbinding blijkt te zijn.

Voor de in verschillende laboratoria uitgevoerde quantitative analyses werden preparaten gebruikt, welke twee keer uit mesityloxyde en daarna één keer uit een mengsel van chloroform en petroleumaether omgekristalliseerd en vervolgens bij 80° in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gedroogd waren.

## Analyses:

2,740 mg stof:	5,145 mg CO <sub>2</sub> en 1,740 mg H <sub>2</sub> O	(Schoeller)
3,099 mg stof:	5,815 mg CO <sub>2</sub> en 1,970 mg H <sub>2</sub> O	"
1,695 mg stof:	0,165 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> bij 26,°5 en 744 mm	"
2,635 mg stof:	0,246 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> bij 21° en 746 mm	(Roth, Heidelberg)
3,067 mg stof:	2,47 mg BaSO <sub>4</sub>	" "

Berekend voor: C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S:

C 51,12%; H 7,02%; N 10,84%; S 12,40%

Gevonden: C 51,21%; H 7,11%; N 10,86%; S 11,06%

C 51,17%; H 7,11%; N 10,64%

Zooals bij het onderzoek naar de ultravioletabsorptie vermeld werd, bevatten ook de voor de analyses gebruikte preparaten nog sporen van een bij 240m $\mu$  absorbeerende verontreiniging. In de veronderstelling, dat deze verontreiniging uit mesityloxyde zou bestaan, hebben wij ter contrôle uitgerekend, of in dit geval de analyses onbetrouwbaar worden; het bleek echter, dat dit niet het geval is.

Kögl en Tönnis hebben medegedeeld, dat het moleculair gewicht van biotine-methylester volgens de methode van Rast met kamfer als oplosmiddel niet was te bepalen. Zij hebben getracht, het moleculairgewicht door bepaling van den diffusie-coëfficiënt volgens de methode van Bruins-Went<sup>44)</sup> vast te stellen; de verkregen resultaten wezen op een waarde van  $\pm 200$ .

44) F. W. Went, Diss. Utrecht 1927; H. R. Bruins, Diss. Utrecht 1922; vgl. ook Stefan, Sitzgsber. Kgl. Akad. Wien 79, 161 (1879) en Kawalki, Wied. Ann. 52, 185 (1894).

Door de slechte oplosbaarheid van biotine-methylester in de voor de methode van R a s t in aanmerking komende oplosmiddelen was het helaas ook mij niet mogelijk, het moleculairgewicht nauwkeurig te bepalen. Uit de verhouding van de zwavel tot de overige atomen volgt voor biotine-methylester het moleculairgewicht 258 resp. een veelvoud hiervan. De fysisch-chemische eigenschappen van biotine-methylester pleiten niet voor een moleculairgewicht van 516 of hooger, zoodat wij de eenvoudigste formule als de juiste aannemen.

**Methoxylbepaling.** Aangezien bij een van de laatste zuiveringstrappen een behandeling met methylalkoholisch zoutzuur werd toegepast, kon het actieve kristallisaat een methylester, een lacton of een lactaam van den oorspronkelijken groeifactor zijn. Om dit uit te maken hebben wij allereerst een methoxylbepaling volgens Zeisel uitgevoerd. Daar micro-Zeiselbepalingen gewoonlijk met hoeveelheden van  $> 3$ , - mg stof worden uitgevoerd, heb ik eerst onderzocht, of deze methode ook met hoeveelheden van omstreeks 1 mg betrouwbare resultaten geeft. Zooals uit proeven met vanilline en  $\beta$ -indolylazijnester blijkt, is dit inderdaad het geval. Om het gevormde methyljodide te binden werd steeds 1 cm<sup>3</sup> alcoholische zilvernitraatoplossing gebruikt, waarvoor de door F r i e d r i c h <sup>45)</sup> aangegeven correctie van 0,06 mg werd aangebracht.

Berekend voor vanilline: CH<sub>3</sub>O: 20,40 %.  
 Gevonden : CH<sub>3</sub>O: 20,01 %; 20,97 %; 20,17 %.  
 Berekend voor  $\beta$ -indolylazijnzuren-methylester: CH<sub>3</sub>O: 16,40 %.  
 Gevonden: CH<sub>3</sub>O 16,37 %; 16,24 %.

Ook ons actief kristallisaat splitste bij de behandeling met HJ methyljodide af:

1,024 mg stof: 0,852 + 0,060 = 0,912 mg. AgJ.  
 Berekend voor 1 CH<sub>3</sub>O-groep in C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S: CH<sub>3</sub>O 12,02%.  
 Gevonden: CH<sub>3</sub>O 11,77%.

Het feit, dat de actieve verbinding één methoxygroep bevat, zou er op kunnen wijzen, dat wij inderdaad met een methylester te doen hebben. Het was echter nog mogelijk, dat de door het HJ afgesplitste methylgroep niet aan een COOCH<sub>3</sub>-groep toebe-

45) A. Friedrich, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse. 1933, blz. 141.

hoorde, ook met een thiomethylaether (zooals in methionine!) moest rekening worden gehouden.

**Titratie.** Terwijl zich het vrije biotine bij de opwerking kennelijk als een amphotere stof gedroeg, konden wij biotine-methylester uit een chloroform-oplossing bijv. met 3 N zoutzuur uitschudden. Ik heb daarom allereerst nagegaan, of biotine-methylester met zuur te titreeren is. Dit was echter niet het geval: 1,455 mg biotine-ester, opgelost in 1 cm<sup>3</sup> methylalkohol en 5 cm<sup>3</sup> water, bleek geen zoutzuur te verbruiken (methylrood als indicator). Een contrôleproefje met  $\beta$ -indolylazijnester gaf hetzelfde resultaat, terwijl l-tyrosinemethylester onder deze omstandigheden 1 equivalent HCl bleek te binden.

Toen heb ik onderzocht, of de actieve verbinding bij verwarmen met loog verzeept kon worden. Bij de voor het bovenstaande proefje gebruikte oplossing van 1,455 mg biotine-ester werd 1,32 cm<sup>3</sup> 0,0172 N carbonaatvrije NaOH oplossing (d.w.z. ongeveer 4 equivalenten) gevoegd en de oplossing 15 min. op 70° verwarmd. Na afkoeling werd de overmaat loog met 0,0209 N zoutzuur teruggetitreerd (phenolphtaleïne als indicator). Bij dit terugtitreeren werd 0,815 cm<sup>3</sup> zuur verbruikt.

Berekend: COOH 18,44 %.

Gevonden: COOH 18,64 %.

Na dit resultaat en de bovenvermelde methoxylbepaling werd het meer en meer waarschijnlijk, dat ons kristallisaat een methylester zijn moest. Daar aminozure esters dikwijls buitengewoon gemakkelijk verzeepen, moest onderzocht worden of de geringe basisiteit van onze ester niet in werkelijkheid veroorzaakt was door de snelle verzeeping tot biotine zelf.

Ik heb daarom een oplossing van biotine-methylester rechtstreeks met loog getitreerd:

1,170 mg biotine-ester werd opgelost in 1 cm<sup>3</sup> methylalkohol en 5 cm<sup>3</sup> water en bij deze oplossing een druppel phenolphtaleïneoplossing toegevoegd als indicator. Reeds de eerste druppel 0,0172 N NaOH veroorzaakte echter een rosekleuring, die eenige seconden bleef bestaan. Ook na korten tijd koken en zelfs na 24 uur staan werd geen NaOH verbruikt. In neutraal milieu trad dus geen merkbare hydrolyse van de ester op. Vervolgens werd 1 cm<sup>3</sup> van de NaOH-oplossing toegevoegd en het reactiemengsel 15 min. op 70° verwarmd. Een contrôlekolfje, waarin eveneens 1 cm<sup>3</sup> me-



thylalkohol, 5 cm<sup>3</sup> water en een druppel phenolphthaleïne-oplossing waren gebracht, werd analoog behandeld. Na afkoelen werd de loog in beide kolfjes met 0,0209 N zoutzuur teruggetitreerd. Het biontine-kolfje verbruikte 0,650 cm<sup>3</sup>, het contrôlekolfje 0,850 cm<sup>3</sup> zuur.

Opnieuw werd aan beide kolfjes 1 cm<sup>3</sup> 0,0172 N NaOH-oplossing toegevoegd en na een uur verwarmen op 70° de overmaat loog met zoutzuur teruggetitreerd. Het biotinekolfje verbruikte nu 0,820 cm<sup>3</sup>, het contrôlekolfje 0,840 cm<sup>3</sup> zuur.

Blijkbaar wordt dus biotine-methylester reeds door zeer verdunde loog bij 70° in 15 min. vrijwel quantitatief verzeept.

Gerekend naar het totale NaOH-verbruik werd gevonden: 18,68 % COOH, terwijl berekend was: 18,44 %.

**Bereiding van biotine door verzeeping van de methylester.** 20 mg biotine-ester werd opgelost in 10 cm<sup>3</sup> 0,1 N zoutzuur en hierin 30 min. op 70° verwarmd. Deze oplossing werd vervolgens in een vacuumexsiccator boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en natronkalk drooggedampt. Het residu, bestaande uit fijne naaldjes, werd weer in water opgelost, de oplossing gefiltreerd en daarna opnieuw in den exsiccator drooggedampt om nog eventueel aanwezig HCl te verwijderen. De nu achtergebleven kristallen werden onder verwarming in 5 cm<sup>3</sup> water opgelost. Bij afkoeling kristalliseerde het biotine in prachtige naaldjes uit. Deze werden afgefiltreerd en na uitwassen op het filter met weinig water, in den exsiccator boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gedroogd.

Gewicht: 14,1 mg. Het smeltpunt werd gevonden bij 216° (microscop). De activiteit was gelijk aan die van de ester:  $25 \times 10^9$  SE per gram. (Zie ook blz. 20).\*)

De kristallen waren onoplosbaar in chloroform, aether of petroleumaether, slecht oplosbaar in water. Zij bevatten geen HCl.

Bij een titratie van de carboxylgroep verbruikte 1,290 mg van de kristallen (opgelost in 5 cm<sup>3</sup> water) 0,290 cm<sup>3</sup> 0,0172 N NaOH (phenolphthaleïne).

Berekend: 18,44 % COOH.

Gevonden: 17,40 % COOH.

Om het kostbare materiaal te sparen moest er voorloopig van

---

\*) Het is mogelijk, dat biotine-methylester gedurende de test verzeept wordt, zoodat de hiervoor gevonden activiteit eigenlijk door het vrije biotine veroorzaakt is.

worden afgezien het biotine te analyseeren. Het feit, dat door de behandeling met zuur een product verkregen werd, dat rechtstreeks een aequivalent loog verbruikt, wijst er op, dat wij inderdaad hierbij een ester verzeept hebben. Het is buitengewoon onwaarschijnlijk, dat de vrijgekomen carboxylgroep door opensplitsing van een lacton- of lactaamring gevormd werd; door de behandeling met zuur zouden omgekeerd dergelijke ringen juist gesloten moeten worden. Verdere onderzoekingen zullen de langs indirecten weg voor biotine afgeleide formule  $C_{10}H_{16}O_3N_2S$  door micro-analyses moeten bevestigen.

Bestendigheid van biotine tegen alkali en zuur:

a. Alkalibestendigheid:

De oplossing van de eerste COOH-titratie (oorspronkelijk bevattende 1,455 mg biotine-ester) werd drooggedampt en het residu met 5 cm<sup>3</sup> 0,1 N NaOH onder N<sub>2</sub> op 80° verwarmd. Op bepaalde tijden werd van deze oplossing 0,01 cm<sup>3</sup> afgepipetteerd voor de test. Na 7 uur verwarmen bleek de activiteit nog niet afgenomen te zijn. Vervolgens werd de NaOH-concentratie met 12 N loog op 1 N gebracht en opnieuw op 80° verwarmd.

Na 10,5 uur was nog geen verlies aan activiteit opgetreden.

Vervolgens werd de NaOH-concentratie op 2 N gebracht en opnieuw verwarmd.

Na 2,5 uur op 100°: activiteit onveranderd.

Na 2 uur op 120°: Act. = 70 % van de oorspronkelijke.

Na 5 uur op 120°: Act. = 55 % „ „ „

Na 1 uur op 140°: Act. = 55 % „ „ „

Ongeveer 1/5 deel werd daarna nog 2 uur op 150° verwarmd, waarna de activiteit teruggelopen was tot 30%. Bij de proeven werd steeds met loodacetaat op S"-ionen gereageerd, er bleek echter geen zwavel afgesplitst te zijn.

De rest werd opgewerkt door na aanzuren met zoutzuur droog te dampen en het residu met absoluten methylalkohol te extraheren. Ik heb toen onderzocht, of uit het reactieproduct met behulp van pikrolonzuur of pikrinezuur een fractie was neer te slaan. Met pikrolonzuur ontstond een mikrokristallijn vlokkig neerslag; met pikrinezuur een neerslag, dat blijkbaar uit olie-druppeltjes bestond. De neerslagen geleken heel veel op de over-

eenkomstige neerslagen van het bij de behandeling met zuur verkregen product, maar de hoeveelheid was te gering voor een identificatie.

b. Zuurbestendigheid:

De van de tweede COOH-titratie afkomstige oplossing (oorspronkelijk bevattende 1,170 mg biotine-ester) werd drooggedampt en het residu met 5 cm<sup>3</sup> 5 %-ig zoutzuur verwarmd. Na 2 uur verhitten op 100° was de activiteit nog onveranderd. Vervolgens werd de oplossing in een Carius-buis overgebracht en het kolfje met 5 cm<sup>3</sup> 15 %-ig zoutzuur nagespoeld, zoodat de stof zich opgelost bevond in ± 10 cm<sup>3</sup> 10 %-ig zoutzuur. Na 1½ uur verhitten op 125° bleek de activiteit nog steeds niet afgenomen te zijn.

De oplossing werd hierop drooggedampt, het residu opgenomen in 2 cm<sup>3</sup> sterk zoutzuur (s.g. 1,191) en deze oplossing gedurende 1 uur op 200—210° verhit. Hierna bleek de activiteit vrijwel verdwenen te zijn.

Het zoutzuur werd in vacuo verwijderd en het residu in water opgelost.

Een verzadigde oplossing van pikrinezuur in water gaf met een proefje van deze oplossing een olieachtig geel neerslag, dat niet tot kristallisatie was te brengen.

Een verzadigde waterige oplossing van pikrolonzuur gaf daarentegen een dik geel microkristallijn neerslag.

Bij de rest van de oplossing werd nu eveneens pikrolonzuur gevoegd en het gevormde neerslag uit water omgekristalliseerd, afgecentrifugeerd, goed uitgewassen en daarna gedroogd. Het product bestond uit gele „Morgensterne”, die geen scherp smeltpunt vertoonden. Bij verhitting kleurden zij zich vanaf 150° geleidelijk bruin en vormden bij 240—250° een donkere smelt.

Bij latere proeven bleek, dat na verhitting van biotine-ester (1,2 mg) in sterk zoutzuur (0,6 cm<sup>3</sup>) gedurende 1 uur op 180° nog 1/6 à 1/7 deel ongesplitst was.

Zuursplitsing van biotine-methylester:

24,4 mg biotine-ester werden opgelost in 12,2 cm<sup>3</sup> geconcentreerd zoutzuur (s.g. 1,191) en deze oplossing gedurende 1 uur op 200—205° verhit. Hierbij trad een geringe verkoling op. Het reactieproduct werd in vacuo drooggedampt. Het residu, bestaande uit een bruine stroop en kristallen, werd in water opgelost en de oplossing gefiltreerd.

Bij het filtraat werd een overmaat verzadigde waterige oplossing van pikrolonzuur \*) gevoegd en het ontstane neerslag afgefiltreerd. Gew. 36,6 mg.

Het neerslag werd vervolgens twee keer uit water omgekristalliseerd en daarna in vacuo boven  $P_2O_5$  gedroogd.

Gew. 23,75 mg.

De analyses, die werden uitgevoerd door den heer Hubers (Amsterdam), leverden de volgende waarden:

*N-analyse:*

2,244 mg stof: 0,356 cc  $N_2$  bij  $23^\circ$  en 761 mm.

*CH-analyse:*

3,710 mg stof: 6,38 mg  $CO_2$  en 1,53 mg  $H^2O$ .

*S-analyse:*

4,411 mg stof: 1,47 mg  $BaSO_4$ .

Berekend voor  $C_9H_{18}O_2N_2S$ .  $2 C_{10}H_{18}O_5N_4$ :

C 46,62 %; H 4,59 %; N 18,77 %; S 4,30 %.

Gevonden: C 46,90 %; H 4,61 %; N 18,32 %; S 4,58 %.

De functie van de hetero-atomen. Uit de gegevens van de titratie en de methoxylbepaling mogen wij besluiten, dat biotine een carboxylgroep bevat. Aangezien biotine, resp. zijn ester, noch met semicarbazide, noch met p-nitrophenylhydrazine een neerslag geeft, blijkt het derde zuurstofatoom van het molecule niet in den vorm van een aldehyde- of ketongroep aanwezig te zijn. De wijze waarop het gebonden is werd door de zuursplitsing opgehelderd. Zooals zoojuist werd vermeld ontstond daarbij onder afsplitsing van een CO-rest een product  $C_9H_{18}O_2N_2S$ . In tegenstelling met de nagenoeg niet basische uitgangsstof kon zich dit afbraakzuur met twee mol. pikrolonzuur verbinden. Het derde zuurstofatoom blijkt dus in een groepeerings N-CO-N gebonden te zijn, en wel moet deze aan een ring toebehooren, daar anders het molecule in kleinere deelen gesplitst zou zijn. Inderdaad vindt men bij sommige pyrimidine-derivaten een soortgelijke bestendigheid tegenover loog en zuur. Reeds vroeger hebben K ö g l en T ö n n i s bij ruwe biotine-preparaten vastgesteld, dat de acyleering met azijnzuur-anhydride, resp. benzolchloride, tot

\*) Het bij de behandeling met zoutzuur ontstane product bleek ook met de volgende alkaloïdreagentia een neerslag te kunnen geven: broompikrolonzuur, flaviaan- en rufiaan- en styphninezuur, anthrachinon- $\beta$ -sulfonzuur, broomanilzuur, platinachloorwaterstofzuur, kaliumchloroplatiniet en goudchloride. Een aantal van deze neerslagen was echter olieachtig; sommige waren betrekkelijk goed oplosbaar. Slechts het rufiaanaat vertoonde evenals het pikrolonaat naast een geringe oplosbaarheid een betrekkelijk goed kristallisatievermogen. Daar rufiaan- en flaviaan- en styphninezuren zelf echter ook zwavel bevat, hetgeen met het oog op de analyses minder aangenaam was, werd aan het pikrolonzuur den voorkeur gegeven.

inactieve producten leidt; na verzeeping keerde de activiteit weer gedeeltelijk terug.

Zoo lang de functie van de zuurstofatomen niet bekend was, kon niet worden uitgemaakt of de acyleering aan de stikstofatomen of aan een eventueel aanwezige hydroxylgroep plaats heeft. Nu blijkt, dat het eerste het geval moet zijn.

Vervolgens hebben wij getracht, de functie van het zwavelatoom op te helderen. Daar biotine-methylester noch een cuproverbinding, noch een andere zwaarmetaalverbinding geeft, met loog geen zwavelwaterstof afsplitst en ook geen neiging tot de vorming van een dimoleculaire S-S-verbinding bestaat, mogen wij de aanwezigheid van een SH-groep als onwaarschijnlijk beschouwen. Aangezien voor een sulfon- of een  $\text{SO}_3\text{H}$ -groep niet de benodigde zuurstofatomen ter beschikking staan, moeten wij per exclusionem tot de aanwezigheid van een aetherachtig gebonden zwavelatoom besluiten.

Tenslotte doet zich nog de vraag voor, of biotine al dan niet een verzadigde verbinding is. De methylester geeft geen kleurreactie met tetranitromethaan en ontkleurt een oplossing van broom in chloroform niet. Met een door soda alkalisch gemaakte oplossing van permanganaat is geen spontane ontkleuring te zien. De na verloop van eenigen tijd optredende bruinsteenafscheiding is vermoedelijk aan de oxydatie tot een sulfon te wijten.

Bij de katalytische hydreeing van biotine-methylester met behulp van platina-oxyde<sup>46)</sup> in ijsazijn bleek de activiteit achteruit te gaan, terwijl ze bij een overeenkomstige proef in methanoloplossing (0,325 mg biotine-ester 1 uur bij  $20^\circ$  in 2 cm<sup>3</sup> absol.  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) onveranderd bleef. Het is mogelijk, dat de inactivering bij het hydreeen in ijsazijn door een acyleering aan de stikstofatomen tot stand komt. Toch kan de aanwezigheid van een (weliswaar niet zeer reactieve) dubbele binding voorloopig niet buitengesloten worden. Daar biotine-methylester geen karakteristieke absorptie in het gemakkelijk toegankelijke ultraviolet vertoont, zou de eventueel aanwezige dubbele binding niet in conjugatie tot de CO- of de  $\text{COOCH}_3$ -groep kunnen staan. Samenvattend kunnen wij concluderen, dat biotine op grond van zijn brutoformule, de functie van zijn hetero-atomen en het gedrag bij de zuursplitsing of één ring en een dubbele binding, of twee ringen zal bevatten; de twee ringen kunnen al of niet met elkaar gecondenseerd zijn.

46) Bereid volgens W. Bruce, Am. Soc. 58, 687 (1936).

## HOOFDSTUK V.

### OVER DE PHYSIOLOGISCHE BETEKENIS VAN BIOTINE.

Nadat het gelukt was, biotine in zuiveren toestand te bereiden, bestond de mogelijkheid om na te gaan, in hoeverre deze verbinding bij den groei van andere organismen dan het voor onze test gebezigde gistras, een rol zou spelen. Terwijl over aneurine (vitamine B<sub>1</sub>) in dit opzicht reeds talrijke onderzoekingen zijn verricht<sup>47)</sup>, die op de algemeene beteekenis van dezen bios-factor wijzen, was dit bij biotine tot voor kort nog niet mogelijk geweest. In de laatste jaren zijn echter in het Utrechtsche laboratorium ook met het biotine in die richting proeven genomen, waarvoor ik preparaten van de gekristalliseerde methylester ter beschikking heb gesteld.

Dat biotine bij den groei van *hoogere* planten een rol zal spelen was op zichzelf niet onwaarschijnlijk, gezien het relatief hoge bios-gehalte van een groot aantal onderzochte zaden (van Hasselt).<sup>48, 49)</sup>

F. Kögl en A. J. Haagen Smit<sup>49)</sup> konden een dergelijken invloed bij erwten duidelijk aantoonen. Zij kweekten erwtenembryo's, waarvan de cotylen waren verwijderd, op een sterielen, bios-vrijen voedingsbodem en constateerden, dat toevoeging van biotine een betrekkelijk sterken groei, speciaal van het spruitgedeelte, veroorzaakte. Zelfs in een verdunning  $1 : 1,25 \times 10^8$  bleek nog een duidelijk waarneembare groeiverhoging ten opzichte van de contrôleplantjes op te treden. Ook aneurine verhoogde den groei, maar werkte meer op de wortelvorming; de groeitoeneming van het spruitgedeelte was geringer dan bij een even groote biotine-concentratie. Daarentegen ontwikkelden zich bij toevoeging van aneurine vaak naast een lange hoofdwortel ook nog bijwortels, terwijl bij de biotine- en de contrôleplantjes steeds slechts een korte hoofdwortel optrad.

---

47) Literaturopgaven bij R. Grewe, *Ergebnisse d. Physiologie etc.* Bnd. 39. Verlag S. F. Bergmann, München 1937.

48) W. van Hasselt, *Diss.* Utrecht 1935.

49) F. Kögl en A. J. Haagen Smit, *H. S.* 243, 209 (1936)

Biotine en aneurine samen gaven, zooals te verwachten was een sterker effect dan de beide stoffen afzonderlijk.

F. Kögl en N. Fries<sup>50)</sup> vonden, dat biotine ook een groei-factor is voor verschillende schimmels. Bijzonder interessant zijn hun proeven met *Nematospora gossypii*. Deze op katoenplanten levende parasiet heeft volgens onderzoekingen van H. W. Buston<sup>51)</sup> en medewerkers twee groeifactoren noodig om zich in synthetisch milieu goed te kunnen ontwikkelen. De eene is meso-inosiet, zooals Buston bewees. Wat den tweeden factor betreft, konden Kögl en Fries aantonen, dat deze door zuiver biotine kon worden vervangen.

Aneurine had bij deze schimmel een zeer gering effect. Daarentegen was het bij enkele andere schimmels (*Polyporus adustus*, *Polyporus abietinus*) juist omgekeerd; deze reageerden sterk op aneurine, terwijl biotine en inosiet geen effect hadden.

De auteurs veronderstelden, dat bij den groei van al deze schimmels evenals bij gist de drie factoren (meso-inosiet, biotine en aneurine) een rol spelen, maar dat de schimmels niet in staat zijn, alle drie factoren zelf te synthetiseeren. De ontbrekende factoren (inosiet en biotine, resp. aneurine) moeten zij uit hun voedingsbodem kunnen opnemen.

Met behulp van de gisttest kon worden aangetoond, dat het mycelium van *P. adustus* na kweken in een synthetisch milieu een groote hoeveelheid biotine bevatte, ondanks het feit dat aan den voedingsbodem van buiten af geen biotine was toegevoegd.

In de veronderstelling, dat tijdens den groei de door de schimmels gesynthetiseerde factoren ook voor een deel in den voedingsbodem zouden overgaan, (wat Kögl en Fries voor *Phycomyces Blakesleeanus*, die zeer sterk biotine bleek te produceeren, ook inderdaad konden aantonen), entten zij nu *Nematospora gossypii* en *Polyporus adustus* beide op dezelfde voedingsoplossing zonder een der groeifactoren toe te voegen. En inderdaad bleek na ongeveer een week een krachtige groei van beide schimmels op te treden.

Een dergelijke „kunstmatige symbiose” verkregen deze onderzoekers ook met *Nematospora gossypii* en *Polyporus abietinus*.

50) F. Kögl en N. Fries, H.S. 249, 93 (1937).

51) H. W. Buston en B. N. Pramanik, Biochem. J. 25, 1656, 1671 (1931)  
H. W. Buston en S. Kasinathan, Biochem. J. 27, 1859 (1933).

F. Kögl en W. J. van Wagten donk<sup>52)</sup> constateerden, dat biotine ook een zeer sterken invloed heeft op den groei van *Staphylococcus pyogenes aureus*. Deze bacterie heeft volgens B. C. J. G. Knight<sup>53)</sup> twee groeifactoren noodig om zich in een zuiver synthetischen voedingsbodem te kunnen ontwikkelen, n.l. nicotinezuur (resp. nicotinezuuramide) en aneurine; afzonderlijk zijn beide factoren inactief.

Kögl en van Wagten donk konden dit bevestigen, maar constateerden bovendien, dat in tegenstelling met aneurine en nicotinezuur, zuivere biotine-methylester op zichzelf ook reeds een groei veroorzaakte en wel was nog in een verdunning van  $1 : 2 \times 10^{11}$  een duidelijke invloed waar te nemen.

Het door biotine veroorzaakte groeieffect werd vrij sterk verhoogt door toevoeging van nicotinezuur en (in mindere mate) door aneurine. De drie factoren tezamen gaven een bijzonder sterken groei. Ter toelichting diene de volgende tabel, waarin eenige van de door Kögl en van Wagten donk verkregen getallen zijn weergegeven.

Toegevoegde factor	Groei
Nicotinezuur 5 $\gamma/cm^3$	10 %
Aneurine 5 $\gamma/cm^3$	10 „
Biotine-ester 0,005 $\gamma/cm^3$	140 „
Nicotinezuur 5 $\gamma/cm^3$ + biotine-ester 0,005 $\gamma/cm^3$	320 „
Aneurine 5 $\gamma/cm^3$ + „ „ „ „	200 „
Nicotinezuur 0,05 $\gamma/cm^3$ + aneurine 0,05 $\gamma/cm^3$	150 „
„ „ „ „ + biotine-ester 0,005 $\gamma/cm^3$	665 „
Nicotinezuur 5 $\gamma/cm^3$ + aneurine 5 $\gamma/cm^3$	675 „
„ „ „ „ + biotine-ester 0,5 $\gamma/cm^3$	770 „

Uit bovenvermelde onderzoeken is duidelijk gebleken, dat biotine niet slechts voor ras M een belangrijke groeifactor is,

52) W. J. van Wagten donk, Diss. Utrecht 1737.

F. Kögl en W. J. van Wagten donk, Rec. Trav. Chin. Pays Bas 1938.

53) B. C. J. G. Knight, Nature 139, 628 (1937).

B. C. J. G. Knight, Biochem. J. 31, 731 (1937).



maar ook op den groei van andere, zeer uiteenlopende, plantaardige organismen een grooten invloed uitoefent. Hoewel het aantal proefnemingen in die richting uit den aard der zaak nog gering is, wettigen de tot nu toe verkregen resultaten echter wel het vermoeden, dat aan het biotine evenzeer als aan het aneurine een algemeene beteekenis als groeifactor toekomt. Zoo lang echter de structuur van deze interessante verbinding nog niet is opgehelderd en de bereiding nog met zulke groote kosten en moeite gepaard gaat, is men wel genoodzaakt, zeer spaarzaam te werk te gaan bij het opofferen van actieve kristallen aan physiologische proeven. Het is daarom te hopen, dat ook deze groeistof later beter toegankelijk wordt.

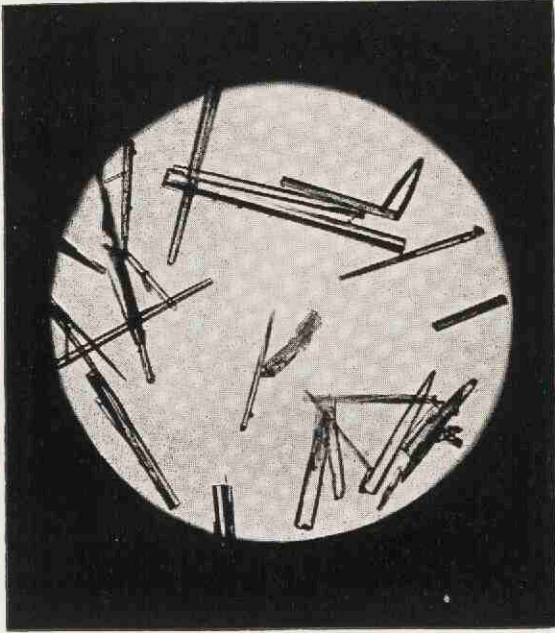


Fig. III.  
Biofine.









D  
Utr  
19