



Biotine en bios

<https://hdl.handle.net/1874/346457>

A. qu. 192, 1940

BIOTINE EN BIOS

TH. J. DE MAN

ht

BIOTINE EN BIOS

BIOTINE EN BIOS

Diss. Utrecht, 1940

BIOTINE EN BIOS

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR MAGNIFICUS DR. H. R. KRUYT, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VER-
DEDIGEN OP MAANDAG 7 OCTOBER 1940, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

THEODORUS JOHANNES DE MAN

GEBOREN TE UTRECHT



1940

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

Aan mijn Ouders.

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij gelegenheid, U, Oud-Hoogleraren, Hoogleraren en Lectoren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn hartelijke dank uit te spreken voor alles wat Gij tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen.

In het bijzonder gaat mijn dank natuurlijk uit tot U, Hooggeleerde Kōgl, Hooggeachte Promotor. Voor het feit, dat ik gedurende een aantal jaren Uw privé-assistent mocht zijn, zal ik U steeds erkentelijk blijven. Uw belangstelling in mijn werk en mijn persoon zal ik niet vergeten.

Zeergeleerde Van Romburgh, ook Uw belangstelling heb ik altijd zeer op prijs gesteld.

Ook ben ik jou, Pons, dank verschuldigd voor alles wat je mij leerde.

Ten slotte dank ik mijn collega's en het personeel van het Organisch-Chemisch Laboratorium voor de medewerking, die ik steeds van hen mocht ondervinden, in het bijzonder Mej. Visser voor de ijver en nauwkeurigheid, waarmede zij mij steeds terzijde stond.

INHOUD.

	Bladz.
Inleiding	3
HOOFDSTUK I.	
Overzicht van het biosvraagstuk	5
HOOFDSTUK II.	
De chemie van biotine	28
HOOFDSTUK III.	
Experimenteel gedeelte	42
Samenvatting	67

INDEX

Introduction 1

Chapter I 10

Chapter II 20

Chapter III 30

Chapter IV 40

Chapter V 50

Chapter VI 60

Chapter VII 70

Chapter VIII 80

Chapter IX 90

Chapter X 100

INLEIDING.

In 1936 gelukte het aan F. Kögl en B. Tönnis een gekristalliseerde stof uit eigeel te isoleren, welke de groei van gistras „M”, een branderij bovengist van het „Institut für Gärungsgewerbe” te Berlijn, in een synthetische voedingsoplossing zeer sterk bevorderde. Na een groot aantal zuiverings-trappen slaagden zij er in de factor, na een 3.000.000-voudige concentrering, in de vorm van kristallen af te zonderen.

De auteurs gaven als smeltpunt van de geïsoleerde methylester 146° — 147° C op en stelden voor het overeenkomstige vrije zuur *biotine* te noemen. Later bleek deze kristalfractie nog niet geheel zuiver te zijn, hetgeen niet was te verwonderen, daar slechts 155 γ werden geïsoleerd.

L. Pons (Diss. Utrecht 1938), die de opwerking wist te vereenvoudigen, verkreeg biotinmethylester als een zuivere, scherp bij 158° C smeltende stof en kon uit verschillende analyses de brutoformule $C_{11}H_{18}O_3N_2S$ afleiden. Ook was hij in de gelegenheid enkele afbraakreacties met de zuivere kristallen uit te voeren. Het was nu de taak van den schrijver van dit proefschrift, in de eerste plaats een nieuwe hoeveelheid biotinmethylester uit gedroogd eigeel te isoleren en hiermee verdere afbraakreacties te doen om aanwijzingen te verkrijgen over de structuur van deze zo actieve en kostbare stof.

Een zeer belangrijk gedeelte van de beschikbare tijd werd aan dit isoleren besteed. Daar echter deze zuivering reeds uitvoerig in bovengenoemde dissertatie was beschreven, zal hierop in dit proefschrift niet verder worden ingegaan.

De grootste moeilijkheid was natuurlijk gelegen in de slechte

toegankelijkheid van het materiaal, waardoor een sterke beperking was geboden, zowel in aantal afbraakreacties, dat verricht kon worden, als in het aantal milligrammen, dat voor iedere afbraak ter beschikking stond.

Aangezien juist in de laatste tijd zeer belangrijke publicaties over het biosvraagstuk waren verschenen, leek het wenselijk een tamelijk uitgebreide samenvatting hierover in dit proefschrift op te nemen. In deze recente artikelen werd onder anderen het bekend worden der structuur beschreven van een zeer belangrijke biosfactor, het *pantotheenzuur*, terwijl bovendien enkele aanwijzingen begonnen te komen over de verhouding, waarin sommige vitaminen tot de voornaamste biosfactoren staan.

Dat het bij biotine nog niet gelukt is een volledig structuurbewijs te leveren, vindt in de eerste plaats zijn oorzaak in de minimale hoeveelheid, waarover bij de afbraakreacties beschikt kon worden. Bovendien was de hardnekkigheid, waarmee de stof zich tegen enkele afbraken verzette, een grote handicap. Daar men zich, en niet alleen te Utrecht, zeer intensief met deze verbinding bezig houdt, is te verwachten, dat een volledig bekend worden van de structuur niet al te lang meer zal duren.

HOOFDSTUK I.

OVERZICHT VAN HET BIOSVRAAGSTUK.

De tot nu toe verschenen belangrijkste overzichten van de biosliteratuur mogen hier in het kort genoemd worden.

In 1925 werd een zeer uitgebreide samenvatting van F. W. Tanner¹⁾ gepubliceerd, waarin, voor zover ik heb kunnen nagaan, de tot dat tijdstip verschenen literatuur vrijwel volledig is beschreven. Wat betreft de oudere publicaties heb ik dan ook voornamelijk van dit overzicht gebruik kunnen maken.

In 1930 verscheen een kort, maar zeer duidelijk en interessant artikel van W. Lash Miller²⁾ over het vraagstuk, terwijl tenslotte W. van Hasselt³⁾ in zijn dissertatie in 1935 een tamelijk uitgebreid overzicht schreef.

Dat het nuttig lijkt ook in dit proefschrift een samenvatting van het biosprobleem op te nemen, vindt zijn oorzaak in de grote vooruitgang, die het vraagstuk juist in de laatste jaren heeft ondergaan. Om de allerbelangrijkste stappen te noemen, wil ik hier reeds wijzen op het isoleren van het pantotheenzuur, een zeer belangrijke biosfactor voor verschillende gist-rassen en op het vaststellen van de structuur van deze verbinding.

Bovendien is men in de laatste tijd, voornamelijk door

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

²⁾ W. Lash Miller. J. chem. Educ. 7, 257 (1930).

³⁾ W. van Hasselt. Diss. Utrecht 1935.

proeven, die men met het zuivere pantotheenzuur en biotine heeft kunnen doen, meer en meer tot de overtuiging gekomen, dat deze factoren niet alleen voor de groei van gist, maar voor lagere organismen in het algemeen van betekenis zijn. Ook heeft men aanwijzingen verkregen over de verhouding, waarin de beide verbindingen tot enige vitaminen staan.

Om een geheel te krijgen werd, terwijl de nieuwere publicaties uitvoerig werden gerefereerd, in deze samenvatting toch kort op de oudere biosliteratuur ingegaan, tenminste voor zover dit voor een goed begrip noodzakelijk bleek.

A. Pogingen om de biosfactoren te isoleren en te identificeren.

In 1901 werd door den Belg E. Wildiers⁴⁾ de naam „bios” voorgesteld voor een factor, die hem noodzakelijk bleek te zijn voor de groei van gist in een milieu, dat verder slechts bestond uit in water opgeloste minerale voedingszouten en suiker.

Dat het bestaan van zulk een factor maar niet voetstoots op Wildiers' gezag werd aangenomen, was in de eerste plaats te wijten aan de autoriteit van L. Pasteur⁵⁾, die reeds in 1860 een door hem uitgevoerde proef beschreef, waarin het hem was gelukt gist te doen groeien in een synthetisch milieu.

Wel bleek in 1871, dat J. von Liebig⁶⁾ deze proeven niet kon reproduceren en wel protesteerde hij dan ook tegen de opvatting van Pasteur, maar mede door het sportieve aanbod, dat de laatste deed⁷⁾ om de proeven onder toezicht van Liebig te herhalen met stoffen, door Liebig zelf meegebracht en ook door het uitblijven van enig antwoord van de kant van Liebig op dit voorstel, zegevierde in die tijd de opvatting van Pasteur.

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

⁵⁾ L. Pasteur. Ann. chim. Phys. 3. serie 58, 323 (1860).

⁶⁾ J. von Liebig. Ann. chim. Phys. 4. serie 23, 5 (1871).

⁷⁾ L. Pasteur. Ann. chim. Phys. 4. serie 25, 145 (1872).

Een andere oorzaak voor het feit, dat Wildiers in zijn idee over een zo actieve organische stof niet algemeen gevolgd werd, is gelegen in de omstandigheid, dat de tijd er als het ware nog niet rijp voor was. Men was nog niet door het vitaminebegrip vertrouwd geraakt met het bestaan van dergelijke verbindingen, die in buitengewoon grote verdunning zulk een belangrijke rol spelen.

Wanneer ik hier schreef, dat de Belgische onderzoeker niet algemeen gevolgd werd, drukte ik mij ongetwijfeld te zacht uit. Want wat algemeen was, was de kritiek, die naar aanleiding van zijn publicatie loskwam. En deze kritiek op het degelijk experimenteel werk van Wildiers was niet het gevolg van proeven, die zijn tegenstanders op hun beurt deden, maar uitsluitend het gevolg van het niet kunnen wennen aan het begrip, dat aan de naam „bios” was gekoppeld.

Een groot aantal publicaties is in die jaren verschenen, welke allen tegen de opvattingen van Wildiers ingingen, maar, daar zij het biosvraagstuk niet verder brachten en bovendien in de reeds eerder genoemde samenvattingen zeer uitvoerig werden beschreven, zal op deze kritiek in dit overzicht niet worden ingegaan.

Het laboratoriumwerk werd in die tijd vrijwel geheel overgelaten aan de school van prof. M. Ide, te Leuven, waartoe ook Wildiers behoorde.

Had deze laatste in zijn experimenten reeds pogingen gedaan om bios chemisch enigszins te identificeren, R. Devloo⁸⁾ zette deze voort. Een reeks van eigenschappen van de factor werd gegeven en een nog groter reeks van stoffen welke geen biosactiviteit bezaten.

Toen het vitaminebegrip algemener bekendheid verwierf, kon niet meer worden ontkend, dat minimaal kleine hoeveelheden van organische stoffen nodig waren voor het gezond zijn van levende wezens; waarom dan ook niet voor gist. Op deze wijze kon het biosbegrip meer en meer worden

⁸⁾ R. Devloo. La Cellule 23, 361 (1906).

geaccepteerd. Zoals haast te verwachten was, ging men te ver met vergelijken. Enkele jaren lang hield men bios voor identiek met het eerst ontdekte vitamine, het *aneurine*, tot dat omstreeks 1920 een aantal onderzoekers⁹⁾ concentraten maakten, die wél de gistgroei bevorderden, maar die niet in staat waren om polyneuritische duiven te genezen, of ratten te doen groeien en omgekeerd.

Wat kan men, nu het biosbegrip algemeen wordt aangenomen, als de reden opgeven van het meningsverschil tussen Liebig en Pasteur? Vermoedelijk vinden de tegengestelde proefuitkomsten hun oorzaak in het feit, dat men in die dagen slechts sprak van „biërgist”, zonder enige verdere onderscheiding.

Het feit bijvoorbeeld, dat Liebig bij zijn experimenten een Münchener ondergist gebruikte, leek geheel zonder belang. Zelfs Wildiers, die zijn proeven deed met verschillende handelsgisten en met twee zuivere rassen, dacht, dat hij de behoefte aan bios voor alle biërgisten had bewezen.

Fulmer en medewerkers¹⁰⁾ toonden echter in 1923 aan, dat er minstens één gistsoort was, die zich in een bios-vrij medium kon ontwikkelen. Een Fleischmann-gist werd door overenten in hun „medium-F”, bestaande uit een oplossing van anorganische zouten en zuivere suiker, langer dan een jaar in leven gehouden, hoewel de groei minder intensief bleek te zijn dan in wort. Was dit reeds een aanwijzing, later bleek uit verschillende proeven, dat het voor onderzoekingen over het biosvraagstuk niet onverschillig was met welk gistras deze proeven waren uitgevoerd.

A. M. Copping¹¹⁾, R. J. Williams en medewerkers¹²⁾,

⁹⁾ o.a. A. D. Emmett en M. Stockholm. *J. Biol. Chem.* **43**, 287 (1920).

¹⁰⁾ E. I. Fulmer, V. E. Nelson en A. White. *J. Biol. Chem.* **57**, 397 (1923).

¹¹⁾ A. M. Copping. *Biochem. J.* **23**, 1050 (1929).

¹²⁾ R. J. Williams, M. E. Warner en R. R. Roehm. *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 2764 (1929).

en H. Stantial¹³⁾ toonden allen aan, dat de behoefte aan bios niet voor alle gistsoorten bleek te bestaan.

De eerste onderzocht een twintigtal gistrassen en bewees, dat zwak ademende gisten de grootste behoefte aan bios hadden. Dit waren dan de veredelde soorten. De wilde rassen groeiden daarentegen ook zonder toevoeging van bios normaal.

In 1939 verscheen van de hand van den Engelsman C. Rainbow in J. Inst. of Brewing een verslag van een uitgebreid onderzoek, getiteld: „The bios requirements of various strains of *Saccharomyces Cerevisiae*”. Op zijn resultaten zal verder in dit overzicht nog worden ingegaan.

Gecomplieerder werd het vraagstuk toen langzamerhand bleek, dat bios geen enkelvoudige stof was. In 1922 namen E. I. Fulmer en V. E. Nelson¹⁴⁾ als eersten waar, dat bios minstens uit twee componenten bestond. Sedert die tijd is de samengesteldheid door verschillende onderzoekers bevestigd.

W. Lash Miller en medewerkers konden na uitgebreide onderzoekingen, die zich over een reeks van jaren uitstrekten, het volgende schema van fractionering opstellen:

¹³⁾ H. Stantial. Trans. Roy. Soc. Canada, Sect. III (3) 26, 163 (1932).

¹⁴⁾ E. I. Fulmer en V. E. Nelson. Proc. Iowa Acad. Sci. 29, 371 (1922).

Na een aantal voorbereidende pogingen gelukte het E. V. Eastcott¹⁶⁾ van dezelfde Canadese school in 1928 de fractie bios I in zuivere toestand te isoleren. Als uitgangsmateriaal werd theestof gekozen. Het bleek nu, dat de actieve verbinding identiek was met *meso-inosiet*, een verbinding, waarvan het zeer verspreid in de natuur voorkomen reeds lang bekend was.

Al spoedig bleek echter, dat deze splitsing in twee componenten de samengesteldheid van bios nog lang niet ten volle weergaf.

In 1932 verscheen van Lash Miller¹⁷⁾ de eerste voorlopige publicatie over de scheiding van bios II in twee fracties, die *bios IIA* en *bios IIB* genoemd werden.

Een jaar later verscheen een groot artikel over deze splitsing¹⁸⁾. Een ruw bios II preparaat, dat uit Fleischmann-gist was verkregen, werd met actieve kool behandeld. Op deze manier werden ook hier twee fracties geïsoleerd. Het gedeelte, dat niet aan de kool was geadsorbeerd, kreeg de naam bios IIA, terwijl het geadsorbeerde deel bios IIB werd genoemd. Deze laatste factor werd van de kool verwijderd door elueren met een aceton-ammonia mengsel.

In het jaar 1933 was dus gebleken, dat bios uit gist in drie fracties te splitsen was, bios I, IIA en IIB. In een overigens synthetisch milieu, bestaande uit een oplossing van voedingszouten en suiker, gaven elk der drie factoren afzonderlijk toegevoegd, slechts een geringe groei; een iets grotere groei werd veroorzaakt, wanneer twee van de drie factoren werden toegevoegd, terwijl een werkelijk goede groei pas plaats vond, wanneer alle drie aanwezig waren.

Buitengewoon interessant is in dit artikel de beschrijving van het feit, dat bovengenoemd schema van fractionering is

¹⁶⁾ E. V. Eastcott. J. Phys. Chem. **32**, 1094 (1928).

¹⁷⁾ W. Lash Miller, E. V. Eastcott en E. M. Sparling. Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) **26**, 165 (1932).

¹⁸⁾ W. Lash Miller, E. V. Eastcott en J. E. Maconachie. J. Am. Chem. Soc. **55**, 1502 (1933).

toe te passen op de meest uiteenlopende biosbronnen. Wat betreft de afscheiding van bios I werden in dit verband genoemd: moutkiemen, rijstvliesjes, thee, paddestoelen, melasse, sinaasappelen en tomaten. De splitsing van bios II in zijn componenten was uitgevoerd bij moutkiemen, tomaten en gist.

Physiologisch zijn alle overeenkomstige fracties gelijkwaardig, ongeacht de bron. Daar bovendien het chemisch proces, volgens hetwelk de splitsing in componenten werd uitgevoerd, in alle gevallen hetzelfde was, maken de auteurs uit deze feiten de gevolgtrekking, dat er geen enkele reden is om meer dan één bios I, IIA en IIB aan te nemen, totdat er een biosbron gevonden wordt, die anders dan de reeds genoemde met alcohol en bariet geen scheiding geeft in bios I en bios II en met kool geen verdere splitsing van deze laatste factor.

Na het bekend worden van bios I als meso-inosiet, heeft, zoals te verwachten was, de school van Lash Miller verschillende pogingen gedaan om ook de andere componenten te identificeren. In 1934 werd de isolering van een actief koperzout uit de bios IIA fractie beschreven¹⁹⁾. De elementairanalyse hiervan zou overeenkomen met de formule van een oxyaminoboterzuur, maar later bleek, dat synthetisch oxyaminoboterzuur de geïsoleerde verbinding niet kon vervangen²⁰⁾. Wel bleek dat β -alanine de werking van bios IIB sterk verhoogde²¹⁾.

De eigenschappen van de bios IIA fractie zijn dus, ten minste in ieder geval gedeeltelijk, te danken aan zijn gehalte aan β -alanine. Ook werd l-leucine in dit verband genoemd. Men krijgt dus sterk de indruk, dat het geïsoleerde en geanalyseerde koperzout uit de bios IIA fractie een mengsel is geweest.

In 1936 gaf Miller's medewerkster M. L. Elder²²⁾ het bestaan van een nieuwe factor in het koolfiltraat aan, die bios V

¹⁹⁾ W. Lash Miller. Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 28, 185 (1934).

²⁰⁾ W. Lash Miller. id. 29, 163 (1935).

²¹⁾ W. Lash Miller. id. 30, 99 (1936).

²²⁾ M. L. Elder. id. 30, 89 (1936).

genoemd werd. Deze labiele verbinding bleek later identiek met vitamine B₁ te zijn²³⁾. In dezelfde publicatie, waarin dit feit vermeld staat, wordt ook nog aangegeven, dat carnosine-nitrat na hydrolyse met zuur of bariet de groei-bevorderende eigenschappen van bios IIA geeft. Daar carnosine de structuur van β -aminopropionylhistidine heeft, lijkt mij dit verklaarbaar, daar deze verbinding bij een hydrolyse het β -alanine moet leveren.

Bovendien werd nog in dit artikel door Lash Miller als goede bron voor de bereiding van bios IIB, concentraten van de afvalkool van suikerraffinaderijen genoemd. Na verschillende bewerkingen kon een actief preparaat worden verkregen, ofschoon nog niets werd vermeld over een gekristalliseerde actieve verbinding in deze fractie.

Als het ware evenwijdig met de belangrijke onderzoeken, die in Toronto door Miller en medewerkers werden uitgevoerd, loopt het niet minder interessante werk van den Amerikaan R. J. Williams, dat zich over ongeveer dezelfde reeks van jaren uitstrekt. Na een reeks artikelen, waarop echter in deze samenvatting niet zal worden ingegaan, omdat zij in hoofdzaak slechts een voorlopig karakter hadden en niet noodzakelijk zijn voor een goed begrip van het volgende, werd door Williams²⁴⁾ en medewerkers in 1927 gepubliceerd over de eerste pogingen om een actief principe uit gistextract te concentreren.

Al spoedig was ook hier de samengesteldheid van bios gebleken. Met behulp van vollers-aarde werd een splitsing in twee fracties uitgevoerd, die ieder voor zich op de gist die voor het testen werd gekozen, slechts een geringe groei uitoefende. Pas een mengsel van beide fracties bleek een activiteit te bezitten, welke ongeveer overeenkwam met die van het oorspronkelijke gistextract.

²³⁾ W. Lash Miller. Trans. Roy. Soc. Canada Sect. III (3) 31, 159 (1937).

²⁴⁾ R. J. Williams, J. L. Wilson en F. H. von der Ahe. J. Am. Chem. Soc. 49, 227 (1927).

Men moet in dit verband grote nadruk leggen op de gist, die voor de experimenten werd gekozen; deze was in dit geval No. 578 van de „American Type Culture Collection”. Het bleek namelijk aan Williams²⁵⁾, bij een onderzoek, hetwelk zich over verschillende gistrassen uitstreckte, dat niet alle rassen zo gecompliceerd waren in hun behoefte aan bios. Bijvoorbeeld bleek, dat de gist van het type „Gebrüde Mayer” bijna even sterk groeide, wanneer extracten waren toegevoegd, die met vollers-aarde waren behandeld, als met onbehandelde extracten. Bij hun proeven in dit artikel beschreven, kregen de auteurs geen aanwijzing, dat de stof, die de groei van „Gebr. Mayer” gist stimuleert, meer dan één verbinding is.

Daar ook Wildiers zijn bios beschreef als een stof, die niet door een van de gewone middelen wordt neergeslagen en de eigenschappen veel overeenkomst vertonen met die van de stof, welke de groei van „Gebr. Mayer” gist bevordert, menen de auteurs, dat de groeistof, die zij onderzochten, identiek is met het oorspronkelijke bios van Wildiers.

Deze mening verkregen zij mede op grond van vergelijkingsproeven, die met de gist uit het laboratorium van Ide uit Leuven werden uitgevoerd.

Voor hun verdere isoleringspogingen hebben de auteurs dan ook als gist voor hun proeven de „Gebr. Mayer” soort gekozen²⁶⁾.

In 1931 werd door Williams²⁷⁾ voor het eerst de gefractioneerde electrolyse beschreven als een middel om Wildiers' bios verder te zuiveren. Bij een onderzoek met de oorspronkelijke stam, die Wildiers ook had gebruikt, bleek, dat zijn bios met behulp van deze methode te splitsen was in een zuur en een basisch bestanddeel. Voor de „Gebr. Mayer”

²⁵⁾ R. J. Williams, M. E. Warner en R. R. Roehm. *J. Am. Chem. Soc.* **51**, 2764 (1929).

²⁶⁾ R. J. Williams en E. M. Bradway. *J. Am. Chem. Soc.* **53**, 783 (1931).

²⁷⁾ R. J. Williams en J. H. Truesdail. *J. Am. Chem. Soc.* **53**, 4171 (1931).

gist werd gevonden, dat slechts één enkele zure stof voor de groei noodzakelijk was.

Nadat in 1932 in een voorlopige mededeling door Williams²⁸⁾ en medewerkers reeds aangegeven was, dat een actieve zure stof in het meest uiteenlopende materiaal voorkwam en zelfs al enige eigenschappen van deze stof werden genoemd, verscheen het jaar daarop de eerste grote publicatie over dit onderwerp getiteld: „Pantothenic Acid, a Growth Determinant of Universal Biological Importance”²⁹⁾.

Weefselextracten, uit verschillende bronnen bereid, werden onderzocht en het bleek, dat alle extracten een stimulerende werking uitoefenden op de groei van „Gebr. Mayer” gist. Nu werd op elk van deze extracten een gefractioneerde electrolyse uitgevoerd. Na de 48 uur, die deze behandeling duurde, werd van de inhoud van ieder der acht cellen van het toestel de P_H bepaald. Bovendien werd de inhoud van elke cel op de groeiwerking getest.

Het bleek nu, dat, onverschillig welke bron was gebruikt om het bioextract te maken, het gedrag van het actieve principe bij alle electrolyses eender was. De grootste hoeveelheid actieve stof was na de electrolyse steeds in de cel aanwezig, die een P_H van ongeveer 3,6 had.

Door middel van theoretische beschouwingen, waarvoor ik naar het origineel moet verwijzen, komen de auteurs tot de conclusie, dat de actieve verbinding vermoedelijk een polyoxyzuur is. Het merkwaardige is, dat de mededelingen in dit artikel niet gedaan zijn op grond van proeven met de zuivere stof, maar met nog zeer ruwe extracten.

Door diffusie-experimenten werd bijvoorbeeld vastgesteld, dat het moleculairgewicht ongeveer 150 moest zijn. De diffusie van de stof werd ook hier weer bepaald door met testproeven de doordringing van het actieve principe te volgen.

²⁸⁾ R. J. Williams, C. M. Lyman, G. H. Goodyear en J. H. Truesdail. *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 3462 (1932).

²⁹⁾ R. J. Williams, C. M. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdail en D. Holaday. *J. Am. Chem. Soc.* **55**, 2912 (1933).

Bovendien werd in dit onderzoek het gedrag der activiteit van de extracten nagegaan t.o.v. verschillende chemische inwerkingen: hydrering, verestering, enz. Steeds liepen de activiteitsveranderingen parallel, ongeacht de bron, waaruit het extract was gemaakt. Dit alles wees zeer sterk op het bestaan van één enkele stof, die steeds voor de activiteit aansprakelijk moest worden gesteld. Als naam voor deze zo algemeen voorkomende verbinding werd door Williams „pantotheenzuur” voorgesteld.

Op grond van hun gehele serie proeven werd, behalve het reeds genoemde, nog vastgesteld, dat pantotheenzuur geen dubbele binding bezat en makkelijk was te oxyderen. Ten slotte werd nog de afwezigheid van een aantal groepen aannemelijk gemaakt.

Met hoeveel moeilijkheden het zuiveren van pantotheenzuur gepaard ging, blijkt wel uit het feit, dat het vijf jaar duurde, voordat een tweede artikel over deze verbinding werd gepubliceerd.

In deze tussentijd verschenen wel is waar enkele artikelen over deze stof, maar hierin werden physiologische proeven beschreven, die met ruwe extracten waren uitgevoerd ⁸⁰⁾ ⁸¹⁾ ⁸²⁾.

In deze tweede publicatie werd het concentreren en de zuivering van pantotheenzuur uit lever beschreven ⁸³⁾. De moeilijkheid was natuurlijk in de eerste plaats gelegen in het feit, dat de concentratie van het zuur zo uiterst gering was. Zelfs het relatief bios-rijkste uitgangproduct, dat als uitgangsmateriaal genomen werd: de lever, bevatte slechts ongeveer 4 mg per kg. Ingewikkelder werd de isolering ook door de zeer grote oplosbaarheid in water, het kristallisatievermogen en de geringe stabiliteit van het pantotheenzuur.

⁸⁰⁾ R. J. Williams en D. H. Saunders. *Biochem. J.* 28, 1887 (1934).

⁸¹⁾ R. J. Williams, W. A. Mosher en E. Rohrman. *Biochem. J.* 30, 2036 (1936).

⁸²⁾ R. J. Williams en E. Rohrman. *Plant Physiol.* 10, 559 (1936).

⁸³⁾ R. J. Williams, J. H. Truesdail, H. H. Weinstock, E. Rohrman, C. M. Lijman en C. M. Mc Burney. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 2719 (1938).

Bij de isolering werden op een autolyse-extract van schapenlever een tiental zuiveringstrappen uitgevoerd. Als eindproduct verkregen Williams en medewerkers een amorf calciumzout, waarvan de aanwezigheid fysiologisch reeds kwantitatief was aan te tonen, wanneer 0,0005 γ per cm^3 voedingsoplossing aanwezig was. Dit preparaat had een activiteit van 11000, vergeleken met een standaardpreparaat uit rijstzemelen als eenheid.

Door verder te fractioneren gelukte het niet de activiteit te verhogen.

In een volgend artikel³⁴⁾ werden allereerst verschillende „oxydatie-aequivalent-analysen”³⁵⁾ beschreven van preparaten met een activiteit van 5000—11000 en elementairanalysen uitgevoerd met de actiefste preparaten.

Alle uitkomsten wezen op een formule $(\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N})_2 \text{Ca}$ voor het calciumzout, waaruit dan de formule $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}$ voor het vrije pantotheenzuur werd afgeleid. Bovendien werden met preparaten van zeer uiteenlopende activiteit reacties uitgevoerd op verschillende groepen, waarbij dan steeds het gedrag der activiteit werd nagegaan.

Nadat in 1936 Williams³⁶⁾ reeds gevonden had, dat β -alanine bij zijn gist als bios kon fungeren, werd in de volgende publicatie over pantotheenzuur beschreven, dat bij een splitsing van deze verbinding β -alanine ontstaat³⁷⁾. Uit diverse proeven was namelijk naar voren gekomen, dat de „Gebr. Mayer” gist het pantotheenzuur slechts dan kan synthetiseren, wanneer β -alanine aanwezig was. Dat de ontstane activiteit werkelijk van het gesynthetiseerde pantotheenzuur afkomstig was, en niet van het alanine, volgde uit electrolyseproeven.

Door deze fysiologische experimenten was men op het

³⁴⁾ R. J. Williams, H. H. Weinstock, E. Rohrman, J. H. Truesdail, H. K. Mitchell en C. E. Meyer. J. Am. Chem. Soc. **61**, 454 (1939).

³⁵⁾ R. J. Williams. J. Am. Chem. Soc. **59**, 288 (1937).

³⁶⁾ R. J. Williams en E. Rohrman. J. Am. Chem. Soc. **58**, 695 (1936).

³⁷⁾ H. H. Weinstock, H. K. Mitchell, E. E. Pratt en R. J. Williams. J. Am. Chem. Soc. **61**, 1421 (1939).

idee gekomen, dat β -alanine een *bestanddeel* van pantotheenzuur was. Deze verbinding werd in een 90⁰/₀-ige opbrengst als β -naphthalinesulfo- β -alanine geïsoleerd.

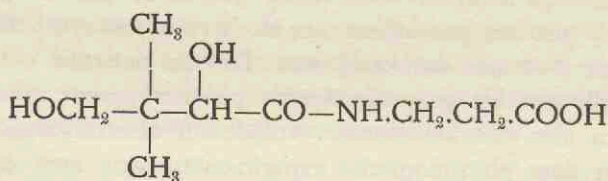
Hiermee waren de grootste moeilijkheden, die deze biosfactor opleverde, overwonnen.

Enkele maanden geleden, in hetzelfde nummer van Science, waarin D. W. Woolley⁸⁸⁾ het isoleren van een gekristalliseerd derivaat van pantotheenzuur beschreef, publiceerde R. J. Williams, in samenwerking met R. T. Major⁸⁹⁾ van het laboratorium van Merck, een voorlopige mededeling over de structuur van deze stof.

In de Amerikaanse laboratoria van Merck werden grote hoeveelheden leverextract opgewerkt en gezuiverd tot concentraten, die 3–40⁰/₀ bariumpantothenaat bevatten. Hieruit verkreeg men door splitsing een zuiver lacton, dat een smeltpunt van 91°–92° C bleek te bezitten. Uit analyses werd als brutoformule C₆H₁₀O₃ afgeleid en met behulp van afbraakreacties werd gevonden, dat de verbinding de structuur van α -oxy- $\beta\beta'$ -dimethyl- γ -butyrolacton moest bezitten.

Tenslotte werd het lacton ook gesynthetiseerd en aan β -alanine gekoppeld. Dit synthetisch pantotheenzuur bleek fysiologisch actief.

Het pantotheenzuur zelf moet men onderstaande structuur toekennen:



Deze structuuropheldering, die bij Merck werd verricht, werd uitgevoerd door de chemici: E. T. Stiller, J. C. Keresztesy

⁸⁸⁾ D. W. Woolley. Science 91, 245 (1940).

⁸⁹⁾ R. J. Williams en R. T. Major. Science 91, 246 (1940).

en J. Finkelstein. Een uitvoerige publicatie hierover werd in de voorlopige mededeling aangekondigd.

Nu dus de bouw van het pantotheenzuur bekend is geworden, is het interessant nog eens na te gaan, welke „voorspellingen” Williams reeds in 1932 deed op grond van de uitkomsten van zijn „testproefjes”, die hij met ruwe extracten uitvoerde. Achteraf blijkt dan, dat zijn conclusies van toen, door de latere afbraken op het zuivere materiaal gedaan, volkomen bevestigd werden. Een reden te meer om waardering te hebben voor dit buitengewoon mooie onderzoek.

De derde plaats waar gedurende een reeks van jaren over bios-factoren werd gewerkt, is het Organisch Chemisch Laboratorium der Rijks Universiteit te Utrecht. In 1932 namen F. Kögl en medewerkers dit onderzoek ter hand en vier jaren later konden zij mededeling doen over de isolering van een gekristalliseerde verbinding uit eigeel, die de groei van hun gist reeds in zeer grote verdunning bevorderde⁴⁰⁾.

Voor deze zo actieve stof werd de naam „biotine” voorgesteld. Bij de concentrering werd, ten minste in het begin, de fractioneringsmethode van Lash Miller gevolgd.

Het meso-inosiet werd verwijderd door middel van ammoniakaal loodacetaat. Hierna bleek de „biotine-factor” aan koolgeadsorbeerd te worden en hieruit kan men concluderen, dat biotine volgens het schema van Lash Miller zijn plaats in de fractie IIB zou moeten vinden.

Met behulp van de test door F. Kögl en B. Tönnis toegepast, waarvoor zij het gistras „M” van het Institut für Gärungsgewerbe te Berlijn gebruikten, kon worden vastgesteld, dat deze factor, ook zonder toevoeging van andere fracties, buitengewoon actief was. De groei-bevorderende werking was nog aan te tonen, wanneer het biotine zich slechts in een verdunning $1 : 4 \times 10^{11}$ bevond.

Het effect kon echter nog verhoogd worden door toevoeging van meso-inosiet en aneurine⁴¹⁾.

⁴⁰⁾ F. Kögl en B. Tönnis. Z. Physiol. Chem. 242, 43 (1936).

⁴¹⁾ W. v. Hasselt. Diss. Utrecht 1935.

Van het biotine, dat als methylester werd geïsoleerd, waaraan men op grond van elementair-analysen de brutoformule $C_{11}H_{18}O_3N_2S$ heeft moeten toekennen, lukte het tot nu toe niet de structuur volledig vast te stellen (zie voor bijzonderheden het tweede hoofdstuk van dit proefschrift).

Teneinde de voortgang van de isolering na de verschillende zuiveringstrappen goed te kunnen volgen en in een kwantitatieve maat uit te kunnen drukken, hebben Kögl en Tönnis als eenheid een *Saccharomyces eenheid* (S.E.) aangenomen, zijnde dié hoeveelheid stof, welke onder de omstandigheden van de test een groei veroorzaakte van 100 %.

De activiteit van biotinmethylester, in deze eenheid uitgedrukt, bleek 25 milliard S.E. per gram te bedragen.

Nu het actieve principe in zuivere toestand is verkregen, lijkt het mij gewenst deze eenheid los te maken van mogelijke veranderingen in de eigenschappen van ras „M”. De eenheid, zó gedefinieerd, zou dan zijn: $\frac{1}{25 \times 10^9}$ g biotinmethylester.

Behalve te Utrecht wordt momenteel nog in verschillende andere laboratoria aan biotine gewerkt. Om slechts de allerbangrijkste publicaties te noemen, wil ik hier wijzen op een onderzoek, dat in 1938 door G. Drumel en L. Hubert ⁴²⁾ in het laboratorium van M. Ide te Leuven werd uitgevoerd en op een artikel van R. Devloo ⁴³⁾ van hetzelfde instituut. De isolering van actieve stoffen was bij deze auteurs echter nog niet zover gevorderd, dat een gekristalliseerd product kon worden verkregen.

Bovendien blijkt uit een zeer recent artikel van R. J. Williams ⁴⁴⁾ en medewerkers, dat deze onderzoekers, aangemoedigd door hun succes met pantotheenzuur, ook de bestudering van biotine ter hand hebben genomen. Ook hier kon men

⁴²⁾ G. Drumel en L. Hubert. Arch. int. Physiol. 46, 141 (1938).

⁴³⁾ R. Devloo. Arch. int. Physiol. 46, 157 (1938).

⁴⁴⁾ E. E. Snell, R. E. Eakon en R. J. Williams. J. Am. Chem. Soc. 62, 175 (1940).

nog geen zuiver product beschrijven, hoewel aangenomen mag worden, dat dit niet lang meer op zich zal laten wachten.

Zijn gewoonte getrouw heeft Williams weer verschillende proefjes uitgevoerd, waarin de verandering werd nagegaan van de activiteit bij inwerking van diverse reagentia op de extracten. Op grond van de uitkomsten van deze experimenten kent Williams dan aan zijn nog te isoleren verbinding verschillende eigenschappen toe, die vrijwel overeenstemmen met die van ons gekristalliseerd biotine.

Ook wil ik hier nog wijzen op een tweetal, in 1939 verschenen publicaties ⁴⁵⁾ ⁴⁶⁾, die de stimulerende werking behandelen, die vitamine B₆ op de groei van enkele gistrassen blijkt uit te oefenen.

Overigens kan in dit verband worden opgemerkt, dat dit vitamine in onze test op ras „M” geen physiologische activiteit vertoonde.

Dit gedeelte van het overzicht, dat de isolering en het identificeren van de biosfactoren behandelt, wil ik niet eindigen zonder een drietal artikelen te noemen, die in 1939 van de hand van de Engelsen L. R. Bishop en C. Rainbow verschenen ⁴⁷⁾ ⁴⁸⁾ ⁴⁹⁾.

Na in het eerste artikel een test te hebben beschreven, gaan de auteurs in de tweede publicatie na, welke de invloed van verschillende bioscomponenten is op de groei van een zevental gistrassen. Op grond van hun proefuitkomsten wisten de Engelsen verschillende schijnbare tegenspraken uit de literatuur te verklaren; bovendien gaven zij diverse oorzaken op, die deze verschillen in de hand hebben gewerkt.

⁴⁵⁾ A. Schultz, L. Atkin en C. N. Frey. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1931 (1939).

⁴⁶⁾ R. E. Eakin en R. J. Williams. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1932 (1939).

⁴⁷⁾ L. R. Bishop en C. Rainbow. *J. of the Inst. of Brewing.* **45**, 33 (1939).

⁴⁸⁾ C. Rainbow. *J. of the Inst. of Brewing.* **45**, 533 (1939).

⁴⁹⁾ C. Rainbow en L. R. Bishop. *J. of the Inst. of Brewing* **45**, 593 (1939).

Het derde en laatste artikel, tot nu toe van deze auteurs verschenen, handelt in hoofdzaak over de concentrering van een tweetal biosfactoren. Een van deze factoren, die in eigenschappen op pantotheenzuur gelijkt, werd gevonden in de fractie IIA, volgens het schema van Lash Miller, dat door hen werd gevolgd. De andere uit de fractie IIB kwam in eigenschappen volkomen met het biotine overeen. Hoewel nog niet een geheel zuiver gekristalliseerd product werd gemaakt, konden toch reeds enkele eigenschappen worden opgegeven, welke doen vermoeden dat het hier werkelijk om biotine gaat.

Ook te Utrecht is gedurende de laatste jaren intensief met deze stof gewerkt en wel zijn hoofdzakelijk pogingen gedaan om meer over de structuur te weten te komen. Hierop zal echter in hoofdstuk II van dit proefschrift uitvoerig worden ingegaan.

B. Physiologische betekenis van pantotheenzuur en biotine voor verschillende lagere organismen.

Hoewel reeds uit de uitkomsten van proeven, genomen met ruwe extracten, met zekerheid was komen vast te staan, dat een zeer nauw verband bestond tussen de biosfactoren (in engere zin opgevat als stoffen, die de groei van gist bevorderen) en de groeistoffen die verschillende bacteriën nodig blijken te hebben, kon men eerst na het isoleren van zuiver pantotheenzuur en zuiver biotine goed reproduceerbare experimenten op dit gebied uitvoeren. In dit overzicht worden dan ook hoofdzakelijk die proeven beschreven, waarvoor de zuivere stoffen werden gebruikt.

Wat pantotheenzuur betreft, bleek al spoedig, dat deze factor voor een goede ontwikkeling van diverse bacteriën in een overigens synthetisch voedingsmilieu noodzakelijk was. Zo konden in 1938 J. H. Mueller en A. W. Klotz ⁵⁰⁾ de onmisbaarheid van deze verbinding voor de groei van diphte-

⁵⁰⁾ J. H. Mueller en A. W. Klotz. J. Am. Chem. Soc. 60, 3086 (1938).

ritis bacillen aantonen. De stimulerende werking die β -alanine op de ontwikkeling van deze organismen uitoefende, bleek het gevolg te zijn van het vermogen om uit deze stof het pantotheenzuur op te bouwen.

Pas dit door de bacillen zelf gesynthetiseerde pantotheenzuur werkte dan als groeistof.

Niet alle bacteriën waren in staat tot deze synthese, evenals niet alle giststrassen pantotheenzuur uit β -alanine konden maken. E. E. Snell, E. M. Strong en W. H. Peterson ⁵¹⁾ konden bijvoorbeeld de onmogelijkheid hiertoe bij melkzuurbacteriën aantonen.

Dat pantotheenzuur ook noodzakelijk is voor een goede ontwikkeling van verschillende stammen van haemolytische streptococcen, bleek b.v. uit publicaties van Y. Subbarow en L. Rane ⁵²⁾ en van B. L. Hutchings en D. W. Woolley ⁵³⁾, welke artikelen in het jaar 1939 verschenen.

Naast de wetenschap dat verscheidene micro-organismen in staat zijn om pantotheenzuur uit β -alanine op te bouwen, is het artikel van D. W. Woolley ⁵⁴⁾ interessant, waarin hij aantoonde, dat een bepaalde stam (H. 69 D. van Lancefield) van haemolytische streptococcen slechts reageert op het zure gedeelte van pantotheenzuur. Dus deze stam is in staat om uit $\alpha\gamma$ -dioxy- $\beta\beta'$ -dimethylboterzuur het pantotheenzuur te synthetiseren.

Ook de noodzakelijkheid van biotine voor een aantal lagere organismen is met zekerheid gebleken.

F. Kögl en N. Fries ⁵⁵⁾ vonden reeds in 1937, dat biotine ook als een groeifactor voor verschillende schimmels te beschouwen is. De parasiet *Nematospora gossypii* bleek voor een goede groei in een synthetisch milieu als groeifactoren

⁵¹⁾ E. E. Snell, F. M. Strong en W. H. Peterson. J. Am. Chem. Soc. **60**, 2825 (1939).

⁵²⁾ Y. Subbarow en L. Rane. J. Am. Chem. Soc. **60**, 1616 (1939).

⁵³⁾ B. L. Hutchings en D. W. Woolley. Science **90**, 41 (1939).

⁵⁴⁾ D. W. Woolley. J. Biol. Chem. **130**, 417 (1939).

⁵⁵⁾ F. Kögl en N. Fries. Z. Physiol. Chem. **249**, 93 (1937).

meso-inosiet en biotine nodig te hebben. Terwijl toevoeging van aneurine weinig effect had, waren de verhoudingen bij enkele andere schimmels (*Polyporus adustus*, *Polyporus abietinus*) juist omgekeerd. Deze laatste soorten hadden namelijk aneurine nodig, terwijl toevoeging van biotine geen invloed had.

Aangetoond kon worden, dat het mycelium van *P. adustus* na het groeien in een synthetisch milieu, biotine bevatte. Daar nu verondersteld werd, dat de door de schimmels gesynthetiseerde groeifactoren ook voor een deel in de voedingsbodem waren overgegaan, werden hierop *Nematospora gossypii* en *Polyporus adustus* tezamen op één voedingsbodem geënt. Door deze „kunstmatige symbiose” bleek het mogelijk de schimmels ook zonder toevoeging van biotine of (en) aneurine te doen groeien.

In dit verband is het de moeite waard te wijzen op een oud experiment van A. Kossowicz⁵⁶⁾ 57), waarbij hij omstreeks 1903 ontdekte, dat gist in een synthetische voedingsbodem wel groeide wanneer tevens ook bacteriën aanwezig waren. Hoewel Kossowicz zijn proeven niet als een symbiose wilde beschouwen, omdat ook dood mycelium de gistgroei bleek te versnellen, was het verschijnsel in principe niets anders dan de „kunstmatige symbiose” van Kögl en Fries.

De stimulerende werking van biotine op de groei van *Staphylococcus Pyogenes Aureus* werd in 1938 door F. Kögl en W. v. Wagtendonk⁵⁸⁾ geconstateerd, terwijl L. E. Hawker^{58a)} de groeiwerking op *Melanospora destruens* aantoonde.

In 1939 werd door E. F. Möller⁵⁹⁾, zowel voor pantotheenzuur als voor biotine, de werkzame invloed bij melkzuurbacteriën aangetoond, terwijl in hetzelfde jaar ook de

⁵⁶⁾ A. Kossowicz. Z. Landw. Versuchsw. Oesterr. 6, 27 (1903).

⁵⁷⁾ A. Kossowicz. Z. Landw. Versuchsw. Oesterr. 17, 688 (1906).

⁵⁸⁾ F. Kögl en W. v. Wagtendonk. Rec. trav. chim. 57, 747 (1938).

^{58a)} L. E. Hawker. Nature 142, 1038 (1938); Annals of Botany New Series Vol III, 657 (1939).

⁵⁹⁾ E. F. Möller Z.f. Physiol. Chem. 260, 246 (1939).

activiteit van de laatste verbinding bij de groei van *bact. radica-cicola* bleek ⁶⁰⁾.

Ten slotte valt nog te wijzen op een publicatie, waarin E. E. Snell en R. J. Williams ⁶¹⁾ aantoonde, dat biotine een groeifactor is voor de bacteriën, die de butanolgisting veroorzaken.

Op het feit dat, zoals F. Kögl en A. J. Haagen Smit ⁶²⁾ aantoonde, biotine ook een duidelijke invloed op de groei van *hogere* planten bleek te bezitten, kan in deze samenvatting niet nader worden ingegaan.

De vraag doet zich nu voor of we, nadat de stimulerende invloed van biosfactoren op verschillende lagere organismen bewezen is, nog steeds aan het bios-principe slechts de groei van gist moeten vastkoppelen, of dat we dit principe moeten uitbreiden tot de groei van deze organismen in het algemeen.

C. Vitamine-werking van pantotheenzuur en biotine.

Om van de vitamine-werking van de „biosfactoren” aneurine en adermine te spreken, klinkt enigszins eigenaardig. Wanneer wij de ontzaggelijke hoeveelheid literatuur beschouwen, die de werking van deze stoffen als vitaminen beschrijft; wanneer we dan verder bedenken, dat de ontdekking en isolering geheel op deze werking berustte, is het duidelijk, dat men beter kan spreken van vitaminen met een bioswerking.

Inmiddels tonen deze mogelijkheden wel het innig verband aan, dat tussen beide klassen bestaat.

Men kan zich nu afvragen, of de twee belangrijkste biosfactoren, het pantotheenzuur en het biotine, ook de een of andere vitamine-werking uitoefenen.

Voor pantotheenzuur is dit inderdaad bewezen. T. H. Jukes ⁶³⁾,

⁶⁰⁾ R. Nilsson en G. Bjälfve en D. Burström. *Naturw.* 27, 389 (1939).

⁶¹⁾ E. E. Snell en R. J. Williams. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 3594 (1939).

⁶²⁾ F. Kögl en A. J. Haagen Smit. *Z. f. Physiol. Chem.* 243, 209 (1936).

⁶³⁾ T. H. Jukes. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 975 (1939).

die van R. J. Williams een zeer actief pantotheenzuur-preparaat kreeg, stelde in 1939 vast, dat deze verbinding ook werkzaam was als „filtraatfactor” (kippen anti-dermatitis-factor).

In hetzelfde nummer van de *Journal of the Am. Chem. Soc.*, waarin Jukes zijn voorlopige mededeling hierover publiceerde, verscheen een artikel van D. W. Woolley, H. A. Waisman en C. A. Elvehem ⁶⁴), waaruit bleek, dat concentraten der kippen anti-dermatitisfactor, na behandeling met alkali, hun activiteit verloren. Hierna werd uit het reactiemengsel β -alanine geïsoleerd. Daar ook alle andere eigenschappen van de filtraatfactor met pantotheenzuur overeenstemmen, werd ook in dit artikel de gevolgtrekking gemaakt, dat beide identiek zijn.

Later werd door Jukes ⁶⁵) bewezen, dat een kip in 100 g voedsel ca. 1,4 mg pantotheenzuur nodig heeft.

Terwijl kippen als filtraatfactor beslist pantotheenzuur nodig hebben en dus onder de omstandigheden van de anti-dermatitis-test niet reageren op vrij β -alanine, bleek uit een onderzoek van M. Hofer en T. Reichstein ⁶⁶), dat bij ratten de filtraatfactor volledig door β -alanine vervangen kon worden. Voor deze dieren is dus β -alanine het essentiële deel van het pantotheenzuurmolecule, daar zij op dezelfde manier op pantotheenzuur als op β -alanine reageren.

Is dus bij pantotheenzuur de vitamine-werking volkomen bewezen te achten, bij biotine is men nog niet zo ver.

Wel werd dit ook bij deze verbinding zeer waarschijnlijk gemaakt door een artikel dat in 1940 verscheen van Paul György ⁶⁷) en medewerkers, getiteld: „The possible identity of vitamin H with biotin and coenzyme R”.

⁶⁴) D. W. Woolley, H. A. Waisman en C. A. Elvehem. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 977 (1939).

⁶⁵) T. H. Jukes. *J. Biol. Chem.* **129**, 225 (1939).

⁶⁶) M. Hofer en T. Reichstein. *Nature*. **144**, 72 (1939).

⁶⁷) P. György, D. B. Melville. D. Burk en V. du Vigneaud. *Science* **91**, 243 (1940).

De auteurs begonnen in deze publicatie erop te wijzen, dat zij bij hun studie over de chemie van vitamine H, getroffen werden door de overeenkomst in eigenschappen van dit vitamine met die van biotine en coenzyme R, een groei-factor voor *Rhizobium*.

Overigens was de gelijkheid in eigenschappen tussen biotine en coenzyme R reeds aangeduid door P. M. West en P. W. Wilson⁶⁸⁾, die hun conclusies trokken, nadat zij de groeieffecten van concentraten van beiden op *Saccharomyces cerevisiae* en op *Rhizobium trifolii* vergeleken hadden.

R. Nilsson, G. Bjälfve en D. Burström⁶⁹⁾ kwamen tot dezelfde conclusie door het effect te vergelijken, dat gezuiverd biotine en concentraten van coenzyme R hadden op *Rhizobium*.

De waarschijnlijkheid, dat de drie principes identiek zijn, wordt door György en medewerkers naar voren gebracht, door in de eerste plaats te wijzen op een onmiskenbare parallelliteit in het voorkomen in de natuur.

Bovendien wezen de auteurs op het feit, dat in alle drie de gevallen ongeveer dezelfde oplosbaarheid wordt waargenomen, terwijl ook het gedrag bij neerslaan en adsorberen op een identiteit wijst.

Ten slotte blijkt ook het gedrag tegenover verschillende reagentia een zeer sterk argument voor de gelijkheid te zijn.

Hoewel het natuurlijk voor een „identiteitsbewijs” noodzakelijk is, dat alle drie de stoffen in de vorm van zuivere kristallen verkregen zijn, hebben P. György en medewerkers de gelijkheid toch wel zeer waarschijnlijk gemaakt.

⁶⁸⁾ P. M. West en P. W. Wilson. *Science* 89, 607 (1939).

HOOFDSTUK II.

DE CHEMIE VAN BIOTINE.

In totaal werden in het Organisch Chemisch Laboratorium der Rijks Universiteit te Utrecht ongeveer 230 mg biotinmethylester in de vorm van zuivere kristallen uit eigeel geïsoleerd. Hiervan werden door L. Pons⁸⁹⁾ voor analyses en afbraakreacties 130 mg verbruikt. Van de door hem verkregen resultaten kan men de volgende korte samenvatting geven.

De brutoformule van biotinmethylester bleek $C_{11}H_{18}O_8N_2S$ te zijn.

Uit methoxylbepalingen en titraties werd besloten tot de aanwezigheid van één $COOCH_3$ -groep in het molecule. Door verzeeping van de methylester werd het vrije biotine verkregen, een zuur, dat in prachtige naalden kristalliseerde, die bij $216^\circ C$ smolten.

Ook bij het vrije biotine werd door titratie het carboxylgehalte bepaald. Deze laatste titratie stemde overeen met de aanwezigheid van 1 $COOH$ -groep en de brutoformule $C_{10}H_{16}O_8N_2S$. Om het materiaal te sparen werd tot nu toe afgezien van een directe elementairanalyse van het vrije biotine, zodat de laatstgenoemde brutoformule nog niet rechtstreeks is bewezen.

Door verhitting van biotinmethylester met geconcentreerd zoutzuur op $200^\circ C$ werd een C_9 -diaminozuur *) verkregen, dat als pikrolonaat werd geïsoleerd en geanalyseerd. De brutoformule hiervan bleek $C_9H_{18}O_2N_2S \cdot 2C_{10}H_8O_6N_4$ te zijn.

⁸⁹⁾ L. Pons. Diss. Utrecht 1938.

*) Dit splitsingsproduct zal verder C_9 -diaminozuur worden genoemd.

In tegenstelling tot het nagenoeg niet basische biotine, was dit zuur, dat onder afsplitsing van een CO-rest was ontstaan, in staat tot het binden van twee mol pikrolonzuur. Het derde zuurstofatoom van biotine-ester bleek dus in een groepering N-CO-N gebonden te zijn en deze atoomgroep moest deel uitmaken van een ring, daar anders het molecule bij afsplitsen van de CO-groep in kleinere delen uiteengevallen zou zijn.

Men vindt inderdaad bij sommige pyrimidine-derivaten dezelfde bestendigheid tegen zuur en loog als bij biotine. Zo wordt α -methyltrimethyleenureum gesplitst in 1,3 diaminobutaan door met geconcentreerd zoutzuur op 200° C te verhitten ⁷⁰).

Tenslotte bleek biotine geen dubbele bindingen te bevatten. Nadat dus door L. PONS de aanwezigheid van een COOCH₃-groep, en van een N-CO-N-groep in een ring was bewezen, was nu mijn taak allereerst uit te maken op welke manier de zwavel in het molecule was gebonden.

Daar de stabiliteit en andere eigenschappen niet in overeenstemming te brengen zouden zijn met de aanwezigheid van een thioaldehyde- of een thioketon-groep in het biotine-molecule en omdat voor plaatsing van een thiozuur-, sulfonzuur-, sulfoxyde-, of sulfon-groep niet genoeg zuurstofatomen in het molecule aanwezig zijn, komen voor binding van het zwavelatoom slechts de volgende mogelijkheden in aanmerking:

a. *Mercaptaan-groep.*

b. *Disulfide-groep.* Hiertegen pleit reeds het grote moleculairgewicht, dat biotine zó geformuleerd zou moeten hebben.

De brutoformule zou dan worden:

$2 \times C_{11}H_{18}O_8N_2S - 2H = C_{22}H_{34}O_6N_4S_2$. Het mol. gew. zou dan 514 zijn.

F. Kögl en B. Tönnis hadden echter reeds geprobeerd het moleculairgewicht vast te stellen door bepaling van de diffusie-coëfficiënt volgens de methode van Bruins-

⁷⁰) J. Tafel en A. Weinschenk. Ber. 33, 3380 (1900).

Went ⁷¹⁾ en hadden resultaten verkregen, die wezen op een mol. gew. van ongeveer 200.

c. *Sulfide-groep*.

A. **Oxydaties met kaliumpermanganaat.**

Om nu tussen deze drie mogelijkheden te beslissen, leek een oxydatie met kaliumpermanganaat de aangewezen weg. De drie typen zouden zich onder deze omstandigheden geheel verschillend moeten gedragen.

- a. Een *mercaptaan* zou tot een sulfonzuur geoxydeerd worden. Elk molecule zou dan 3 atomen zuurstof moeten verbruiken bij deze oxydatie;
- b. Een *disulfide*-molecule zou 5 atomen zuurstof moeten opnemen onder vorming van twee sulfonzuur-groepen. Dit betekent dus voor het één S-atoom bevattende halve molecule een opneming van $2\frac{1}{2}$ atomen zuurstof;
- c. Tenslotte zou een *thioaether* onder opneming van 2 zuurstofatomen in een sulfon moeten overgaan.

Allereerst was het natuurlijk noodzakelijk bij enige modelproeven na te gaan, of deze methode voldoende nauwkeurig was, om met enkele milligrammen stof uit te maken, op welke manier de zwavel was gebonden.

Om dit te bereiken werden cysteïne-hydrochloride, cystine en tetra-hydrothiopheen-*a*-carbonzuur *) geoxydeerd. Het bleek inderdaad, dat deze drie verbindingen zich op de te verwachten manier tegenover permanganaat verschillend gedroegen. Bovendien waren de titraties reeds met 2 mg stof uit te voeren.

Hierna werd overgegaan tot de permanganaat-oxydatie van

⁷¹⁾ H. R. Bruins. Diss. Utrecht 1922.

F. W. Went. id. 1927.

*) De tetra-hydrothiopheen-derivaten zullen verder in dit proefschrift *thiopaan-derivaten* genoemd worden (verg. voor nomenclatuur b.v. C. 1938 II 3239).

biotinemethylester zelf. Volgens de titratie nam 1 mol biotine-ester 1,98 atoom zuurstof op. Hieruit was dus de conclusie te trekken, dat de zwavel in het biotine in een C-S-C-groep aanwezig moet zijn. Bovendien werd het door deze oxydatie ontstane „biotinesulfon” *) uit het reactiemengsel geïsoleerd. Het bleek een verbinding te zijn, die — niet omgekristalliseerd — onder het smeltpuntsmicroscop bij 265° — 267° C smolt.

Om het materiaal te sparen moest ook hier voorlopig van een zuivering door omkristalliseren en van een elementair-analyse van het zuivere „biotinesulfon” worden afgezien.

B. Splitsingsproeven met joodwaterstof.

Toen eenmaal de functie van het zwavelatoom in het biotinemolecule was vastgesteld, lag het voor de hand pogingen te doen om de afbraakreacties zó te leiden, dat de koolstof-zwavel-binding werd aangegrepen.

Naar aanleiding van uit de literatuur bekende proeven, waarin S-methylverbindingen met joodwaterstof gesplitst werden, leek een behandeling met HJ van biotine veel belovend.

A. Lacourt⁷²⁾ splitste bij enkele S-methylverbindingen de methylgroep af door te verhitten met joodwaterstof (d. 1,7) op een temperatuur van 180° — 190° C.

D. Baernstein⁷³⁾ werkte een micromethode uit voor de bepaling der methylgroep in methionine met joodwaterstof.

Daar wij verwachten konden, dat bij biotine de koolstof-zwavelbindingen moeilijker gesplitst zouden worden, dan bij de toch altijd bijzondere methylgroep het geval was, werd eerst met enkele modelverbindingen geprobeerd om gunstige omstandigheden voor deze afbraak te vinden.

Hiervoor werden genomen cis-thiophaan $\alpha\alpha'$ -dicarbonsuur⁷⁴⁾

*) Aangezien deze verbinding door opneming van 2O-atomen is ontstaan, is de naam *biotinesulfon* niet correct afgeleid. Gemakshalve zullen wij echter deze aanduiding in het vervolg gebruiken.

⁷²⁾ A. Lacourt. Bull. Soc. chim. Belgique **44**, 665 (1935).

⁷³⁾ D. Baernstein. J. Biol. Chem. **97**, 663 (1932).

⁷⁴⁾ A. Freda. J. Prakt. Chem. (2) **150**, 124 (1938).

en δ -thiodivaleriaanzuur *). Wij hebben deze stoffen met HJ (d. 1,96) gedurende twee uur op 180° C verhit en verkregen onder ontwikkeling van zwavelwaterstof uit het thiophaan- $\alpha\alpha'$ -dicarbonzuur adipinezuur. Uit δ -thiodivaleriaanzuur werd δ -joodvaleriaanzuur verkregen, dat als p-phenylphenacylester werd geïsoleerd.

Ter contrôle hebben wij nog het gedrag van een ureum-groepering in een ring onder deze omstandigheden nagegaan. Te dien einde verhitte ik α -methyltrimethyleenureum met HJ en isoleerde een diamine in de vorm van een dipikraat. Dit dipikraat bleek identiek te zijn met dat, wat verkregen was na splitsing van het methyltrimethyleenureum met geconcentreerd zoutzuur.

Tenslotte ging ik over tot dezelfde afbraak van 4,8 mg biotinemethylester. Uit het reactiemengsel werd als pikrolonaat een basische stof geïsoleerd, welk pikrolonaat door omkristalliseren werd gezuiverd. Uit analyses berekend, bleek de brutoformule $C_9H_{18}O_2N_2S \cdot 2C_{10}H_8O_6N_4$ te bedragen. Ook wat betreft smeltpunt en ander gedrag was het pikrolonaat identiek met dat, wat vroeger reeds was geïsoleerd na de „zuursplitsing” van biotine. Hetzelfde C_9 -diaminozuur was dus ontstaan.

Het was dus niet gelukt onder deze omstandigheden de zwavel uit het biotinemolecule te splitsen. Daar was gebleken, dat het zwavelatoom vaster was gebonden dan wij hadden verwacht, werd hierna geprobeerd of niet door opvoeren van de reactietemperatuur het doel bereikt kon worden. Eerst werd 1,5 mg biotine-ester met joodwaterstof (d. 1,96) gedurende twee uur op 210° C verhit. Wij konden 2,4 mg pikrolonaat isoleren, dat zich geheel eender gedroeg als het pikrolonaat van het gewone C_9 -diaminozuur.

*) δ -thiodivaleriaanzuur werd door den heer J. Boerma (Org. Chem. Lab. Utrecht) bereid volgens de methode van J. M. Lovén [vgl. J. prakt. Chem. (2) 29, 367 (1884). Ber. 29, 1133 (1896).] uit δ -broomvaleriaanzuur. De verbinding smolt bij 94° – 95° C.

Ten slotte hebben wij zowel temperatuur als tijd nog opgevoerd door 2,4 mg biotinmethylester gedurende vijf uur met HJ (d. 1,96) op 250° C te verhitten. Nu bleek echter het molecule reductief volkomen gesplitst te zijn; de stikstof werd slechts als anorganisch ammoniumzout teruggevonden.

Als laatste proef met joodwaterstof werd biotinmethylester met HJ en rode phosphor verhit. Daar er gevallen bekend zijn, waarbij een dergelijke reactie ook tot reductie van de carboxylgroep leidt ⁷⁵⁾, heb ik bij de opwerking van dit reactieproduct er rekening mee gehouden, dat een amine was ontstaan. Helaas bleek noch de zwavel, noch de carboxylgroep door deze reductiemethode te zijn aangetast. Het gewone C₉-diaminozuur had zich gevormd.

Dat de zwavel zich in het biotine zoveel stabielere tegenover joodwaterstof gedroeg, dan de modelproeven deden verwachten, was natuurlijk zeer teleurstellend. De mogelijkheid bestond, dat de aminogroepen een ongunstige invloed in deze richting uitoefenden.

Inderdaad zijn in de literatuur gevallen bekend, waaruit blijkt dat aminogroepen een sterke invloed op het gedrag van zwavel in sulfide-vorm kunnen uitoefenen ⁷⁶⁾.

In dat geval zou het aanbeveling verdienen eerst deze aminogroepen uit het molecule te verwijderen en daarna pas een HJ-reductie uit te voeren.

Nu had L. Pons *) indertijd door een proef reeds een mogelijkheid tot dit verwijderen der aminogroepen gegeven. Hij toonde aan, dat het C₉-diaminozuur onder de gewone omstandigheden der Van Slijke-bepaling met natriumnitriet in azijnzuur milieu 2 mol stikstof geeft, dus dat de beide aminogroepen primair zijn.

Het leek ons nu de juiste weg, eerst met natriumnitriet de beide aminogroepen uit het C₉-diaminozuur te verwijderen en

⁷⁵⁾ F. Kraft, Ber. 15, 1687 (1882).

⁷⁶⁾ W. Schneider, Ann. 386, 332 (1912).

*) nog te publiceren.

dan op het dioxycarbonzuur, dat hierdoor zou moeten ontstaan, HJ te laten inwerken. Dit experiment is uitgevoerd, maar wij hebben geen vetzuur kunnen isoleren, hoewel uit het ontstaan van zwavelwaterstof gebleken was, dat de koolstof-zwavelbindingen door deze bewerking waren aangetast.

Natuurlijk is bij deze microproefjes altijd een bezwaar, dat het niet kunnen isoleren van een verwacht reactieproduct te wijten kan zijn aan het te geringe aantal milligrammen waarvan wordt uitgegaan. Materiaal om deze proef met een grotere hoeveelheid nog eens te herhalen was echter niet aanwezig.

C. Inwerking van KOH-oplossing op sulfonen.

Ook de tweede weg, die we gevolgd hebben in onze pogingen om de binding tussen de koolstof en de zwavel te verbreken, was gebaseerd op experimenten met modelstoffen.

Het was namelijk gebleken, dat, wanneer het sulfon, hetwelk ontstond door permanganaat-oxydatie van thiophaan- α -carbonzuur, verwarmd werd met een geconcentreerde oplossing van KOH op 200° C, de zwavel als zwaveldioxyde vrijwel kwantitatief uit het molecule werd gesplitst.

Dit laatste werd bewezen door het SO₂ met broomwater te oxyderen en het ontstane zwavelzuur als bariumsulfaat te bepalen. Over deze reactie hebben we niets in de literatuur kunnen vinden, maar het leek al bij voorbaat zeer waarschijnlijk, dat onder dergelijke omstandigheden een hydrolytische splitsing zou optreden.

Om enige aanwijzingen te krijgen over het gedrag der ureumgroepering in biotine, werd ook trimethyleenureum met loog verwarmd. Het bleek, dat in dit geval de KOH-splitsing geheel analoog liep met de gewone splitsing met zoutzuur, daar het ontstane vluchtige amine in een zeer goede opbrengst als dipikraat werd geïsoleerd.

Na deze voorbereidingen werd begonnen met de oxydatie van 10 mg biotinemethylester en de verhitting van het ontstane biotinesulfon met KOH-oplossing. Om deze laatste trap

uit te voeren, was het natuurlijk niet nodig het biotinesulfon te zuiveren door het te scheiden van de anorganische zouten; het gehele mengsel werd met de sterke loogoplossing verwarmd.

Ook bij deze proef ontstond zwaveldioxyde, maar wat minder gunstig was, was het feit, dat de stikstof van het biotinmolecule zich geheel anders gedroeg, dan we verwacht hadden op grond van het uitgevoerde modelproefje met trimethyleenureum. We toonden namelijk ammoniak in het reactiemengsel aan. Wel konden we een in aether oplosbare organische stof afzonderen, die enigszins de geur had van een oxyzuur en wel gelukte het ons hiervan een p-phenylphenacylester te maken, maar de afbraak had in ieder geval zijn overzichtelijkheid verloren, die hij ongetwijfeld gehad zou hebben, wanneer die complicatie met de aminogroepen niet was opgetreden.

De geïsoleerde p-phenylphenacylester bleek geen zwavel en geen stikstof te bevatten. Bovendien werd een CH-analyse op de ester uitgevoerd. De hiervoor beschikbare hoeveelheid was echter te gering om volkomen betrouwbare waarden te leveren, opdat uit de getallen een brutoformule zou kunnen worden afgeleid. Hiertoe zou deze proef met meer materiaal herhaald moeten worden, waarover ik echter niet de beschikking had.

D. Methylering en afbraak volgens A. W. Hofmann.

Na bovenstaande splitsing met geconcentreerde loog hebben wij geprobeerd het biotinmolecule eenvoudiger te maken door middel van een methylering en afbraak volgens A. W. Hofmann.

Daar verschillende gevallen bekend zijn, dat methyljodide aan sulfiden wordt geaddeerd onder vorming van een sulfoniumjodide,⁷⁷⁻⁸⁰ leek het wenselijk allereerst deze stof op

⁷⁷) A. van Oefele. *Ann.* **132**, 82 (1864).

⁷⁸) H. Klinger en A. Maassen. *Ann.* **243**, 193 (1888).

⁷⁹) D. Strömholm. *Ber.* **33**, 823 (1900).

⁸⁰) J. v. Braun, W. Teuffert en K. Weiszbach. *Ann.* **472**, 121 (1929).

biotinemethylester te laten inwerken. Inderdaad trad hierbij een gewichtsvermeerdering op, die overeenkwam met die, welke plaats zou moeten hebben bij additie van 1 mol CH_3J .

Na een poging om met zilveroxyde het overeenkomstige hydroxyde te maken en na verhitting van het ontstane reactieproduct in vacuo op 150°C , bleek de stof die door deze bewerking was ontstaan, in een testproefje dezelfde activiteit te hebben op de groei van onze gist als biotine, zodat de gevolgtrekking voor de hand lag, dat het sulfoniumhydroxyde bij verhitting methanol had afgesplitst.

Om zekerheid te hebben, dat werkelijk het jodide in het hydroxyde was omgezet, leek het ons gewenst deze reactie nog eens zodanig uit te voeren, dat eerst het jodide met behulp van zilverchloride in het sulfoniumchloride zou worden veranderd; hierna zou dan pas de inwerking van het zilveroxyde moeten volgen. Zo ver kwam het echter niet. Het bleek namelijk, dat de stof, die volgens dit schema het sulfoniumchloride zou moeten zijn, physiologisch dezelfde activiteit had als biotine en daar bovendien het gewicht van deze fractie klopte met dat van de oorspronkelijke hoeveelheid biotine, kon hieruit worden besloten, dat het chloride reeds bij kamertemperatuur CH_3Cl afgesplitst had om weer het oude sulfide te leveren.

Inderdaad zijn in de literatuur gevallen bekend, waaruit blijkt, dat sulfoniumchloriden minder stabiel zijn dan de overeenkomstige jodiden ⁸¹⁾.

Dat in ons geval van het sulfoniumhydroxyde methanol werd afgesplitst, is op zich zelf in het geheel niet verwonderlijk, want dat deze ongewenste reactie bij het verhitten plaats kan vinden, blijkt o.a. uit publicaties van J. v. Braun ⁸⁰⁾ en van C. K. Ingold ⁸²⁾ met hun medewerkers. Zij verhitten verschillende sulfoniumhydroxyden en vonden dat steeds een

⁸¹⁾ H. Blätter. Monatsh. 40, 417 (1919).

⁸²⁾ C. K. Ingold, J. A. Jessop, K. I. Kuriyan en A. M. M. Mandour
J. Chem. Soc. 533, (1933).

zeker gedeelte oorspronkelijk sulfide terug ontstond door afsplitsen van methanol. Een ander percentage ontleedde dan op de gewenste manier onder ontstaan van een olefine.

Deze beide mogelijkheden van splitsing treden natuurlijk ook op bij de overeenkomstige ammoniumhydroxyden⁸³⁾.

Welke de verdeling is tussen de beide mogelijkheden, hangt af van de structuur van het molecule. In zeer eenvoudige gevallen heeft men gemeend een zekere regelmaat te kunnen onderkennen, maar de grondslag is nog te wankel, om, bij de afbraak van een tamelijk ingewikkelde stof als biotine, van te voren reeds voorspellingen te doen.

Nadat we dan bij onze afbraakpogingen reeds twee maal het oorspronkelijke uitgangsmateriaal terug hadden gekregen, besloten we eerst een zoutzuursplitsing op het biotine uit te voeren en hierna het ontstane C₉-diaminozuur volledig te methyleren. Voor deze laatste bewerking leek ons in dit geval hoopgevend om de methode, die T. Purdie⁸⁴⁾ voor het methyleren van suikers had uitgewerkt, hier toe te passen.

Om de geschiktheid van deze manier van methyleren voor ons C₉-diaminozuur na te gaan, heb ik eerst ornithine gemethyleerd met zilveroxyde en methyljodide. Het aaraat dat ik uit het reactiemengsel kon isoleren, bleek identiek met het aaraat, dat ik na methyleren volgens R. v. Engeland⁸⁵⁾ verkreeg.

Na dit voorproefje werd dan overgegaan tot het methyleren van ons C₉-diaminozuur en, na omzetting van het hierbij ontstaan jodide in het hydroxyde via het chloride, heb ik na droogdampen van de oplossing het reactiemengsel gedurende 15 minuten op 150° C verhit in vacuum. Het gelukte hierna uit het verhittingsproduct een aaraat te isoleren, waarvan de analyses zeer goed klopten met de formule C₁₀H₂₆N₂SAu₂Cl₃.

Hieruit bleek dus, dat bij de verhitting de reactie, tenminste

⁸³⁾ J. v. Braun. Ann. 382, 1 (1911); 386, 273 (1912).

⁸⁴⁾ T. Purdie en J. C. Irvine. J. Chem. Soc. 83, 1021 (1903).

⁸⁵⁾ D. Ackermann. Z.f. Biologie 59, 433 (1913).

in hoofdzaak, het ongewenste verloop had genomen, daar zowel de zwavel als de beide stikstofatomen nog in het product aanwezig waren. Dat echter toch bij deze proef een tamelijk diep ingrijpende verandering had plaats gevonden, bleek wel uit het feit, dat de carboxylgroep uit het molecule was verdwenen.

Jammer genoeg is op het ogenblik onze kennis van de biotinestructuur nog onvoldoende om een goede verklaring van dit verdwijnen te kunnen geven.

E. Verhitting van biotinesulfon met zoutzuur.

Tenslotte hebben wij een poging gedaan om in biotinesulfon de bindingen tussen de koolstof en de zwavel te verbreken door middel van verwarming met zoutzuur. Hoewel uit een modelproefje, dat we eerst uitvoerden, was gebleken, dat het sulfon, hetwelk ontstond door oxydatie van δ -thio-divalerialaanzuur, tegen deze inwerking bestand was, bestond toch de mogelijkheid, dat de bindingen in het biotinemolecule zich minder hardnekkig zouden gedragen.

Als „voorproefje” werden hiertoe eerst 3,1 mg genomen van een door permanganaatoxydatie van biotinemethylester verkregen biotinesulfon. Na de verhitting van dit product met zoutzuur, werd uit het reactiemengsel een pikrolonaat geïsoleerd. Dit pikrolonaat, dat zwavel bleek te bevatten, gedroeg zich, zowel wat oplosbaarheid als wat smeltpunt betref, geheel anders dan het pikrolonaat van het C_9 -diaminozuur.

Daar niet was aan te nemen, dat alleen een vervanging van een sulfide- door een sulfon-groep een zo grote verandering in eigenschappen te weeg zou brengen, leek het er inderdaad op, dat een splitsing was opgetreden, waardoor een sulfonzuur zou moeten zijn ontstaan. De rest van het geïsoleerde pikrolonaat hebben wij gebruikt voor de uitvoering van een kwantitatieve N-analyse en het bleek, dat de waarde van het stikstofgehalte prachtig klopte met de formule: $C_9H_{20}O_5N_2S \cdot 2 C_{10}H_8O_6N_4$.

Er zou dan een diamino-sulfonzuur-carbonzuur zijn ontstaan, dat hetzelfde aantal C-atomen bevatte als het C₉-diaminozuur.

Uit het feit, dat het aantal C-atomen niet was verminderd, zou dan de conclusie kunnen worden getrokken, dat de zwavel in het biotine in sulfidevorm deel uitmaakt van een ring, want anders moest bij splitsing van een binding tussen de koolstof en de zwavel het molecule uiteen zijn gevallen in twee kleinere stukken.

Het spreekt vanzelf, dat zulk een vergaande gevolgtrekking niet geoorloofd is alleen op grond van een enkele stikstof-analyse. Daarom werd ter contrôle deze proef nog eens herhaald, zij het in een iets andere vorm. Door oxydatie van biotinemethylester werden 13,7 mg biotinesulfon verkregen en deze werden gesplitst door met geconcentreerd zoutzuur op 200° C te verhitten. Na droogdampen van het reactiemengsel verkreeg ik een mooi gekristalliseerde rest met een gewicht van 16,7 mg.

Hiervan heb ik 13,5 mg genomen voor het maken van een derivaat, waarbij werd afgezien van het oorspronkelijk plan om weer een pikrolonaat te maken, daar juist enkele maanden geleden een publicatie was verschenen over de geringe oplosbaarheid en het goede kristallisatievermogen van dilituraten⁸⁶). Dit zijn zouten, die organische basen met dilituurzuur (5-nitro-barbituurzuur) vormen.

Het bleek inderdaad mogelijk een mooi dilituraat te isoleren, dat door één maal omkristalliseren gezuiverd werd. Het gedrag bleek hierna niet veranderd. Tenslotte verkreeg ik 7,5 mg zuiver product, dat zwavel bevatte. Uit een CH-en een N-analyse kon als brutoformule afgeleid worden: C₉H₂₀O₅N₂S . 2 C₄H₈O₅N₈.

De uit deze formule berekende percentages klopten goed met de gevonden waarden, hoewel het haast vanzelf spreekt, dat aan micro-analysen met materiaal uitgevoerd, dat in zo kleine hoeveelheden moest worden gezuiverd, niet dezelfde

⁸⁶) C. E. Redemann en C. Niemann. J. Am. Chem. Soc. 62, 590 (1940).

eisen te stellen zijn, als wanneer een ongelimiteerde hoeveelheid materiaal ter beschikking staat.

Om te zien of de aanwezigheid van een sulfonzuurgroep zich ook zou uiten in een „zuurder” zijn van het molecule, vergeleken met het C₉-diaminozuur, hebben we nog enkele milligrammen opgeofferd aan een potentiometrische titratie met verdunde loog *).

Allereerst werd een titratie van ornithine-dihydrochloride uitgevoerd en daarna van het dihydrochloride van het gewone C₉-diaminozuur. Daar van beide verbindingen vast staat, dat het diaminomonomocarbonzuren zijn, was te verwachten, dat het verloop van de titratielijnen identiek zou zijn. Inderdaad bleek dit het geval.

Bij beide titraties had een sterke stijging van de P_H met de toegevoegde loog plaats, nadat reeds 1 equivalent was toegevoegd. Uit de titratie van het „zuursplitsingsproduct” van biotinesulfon bleek, dat de sterke stijging van de P_H met de toegevoegde loog eerst plaats had, nadat reeds 2 equivalenten loog waren toegevoegd.

Dus ook de titratie wees duidelijk op het aanwezig zijn van een zure groep méér in de verbinding, vergeleken met de eerst getitreerde stoffen. Hiervoor komt slechts de sulfonzuurgroep in aanmerking. Daar de titraties niet met analysezuivere producten waren uitgevoerd, kan men aan de kwantitatieve uitkomsten niet al te hoge eisen stellen, maar het verschil tussen beide „zuursplitsingsproducten” was zó duidelijk, dat men hieruit, gecombineerd met de analyses van het pikrolonaat en het diluturaat, de gevolgtrekking kan maken, dat het product, dat ontstond na de zuursplitsing van biotinesulfon, een diamino-sulfonzuur-carbonzuur was. Uit het feit dat hierin nog alle 9 C-atomen aanwezig waren, kon besloten worden tot een zwavelhoudende ring in biotine.

Hoe nuttig deze laatste wetenschap ook kan zijn voor de

*) Ook op deze plaats dank ik den Heer S. Troelstra hartelijk voor zijn steun bij het uitvoeren van deze titraties.

keuze van mogelijke volgende afbraken, het was ons natuurlijk toch liever geweest, wanneer de zwavel in het biotine-molecule als sulfide in een keten zijn plaats gevonden had. Bij het uitvoeren van bovenstaande splitsing waren we in dat geval enkele C-atomen kwijt geraakt en hadden we eenvoudiger producten kunnen isoleren, die mogelijk reeds bekende verbindingen zouden blijken te zijn, of die gesynthetiseerd zouden kunnen worden.

HOOFDSTUK III

EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

A. Oxydaties met kaliumpermanganaat.

De oxydaties werden uitgevoerd bij kamertemperatuur met een 0,02 molaire oplossing van kaliumpermanganaat, die 5,6 g soda per liter bevatte.

1. *Oxydatie van cysteine-hydrochloride.*

2,065 mg cysteinehydrochloride werden in 5 cm³ water opgelost en uit een microburet werd de 0,02 molaire permanganaatoplossing bijgedruppeld. Steeds, na toevoegen van een druppel, schudde ik om tot de paarse kleur verdwenen was. Dit was telkens in enkele seconden het geval, totdat in totaal 1,29 cm³ was toegevoegd.

Toen bleef de zwakke paarse tint langer dan 15 minuten. Deze oxydatie was dus als een zeer scherpe titratie uit te voeren.

1,29 cm³ van de oplossing komt overeen met het opnemen van 2,95 atomen zuurstof, terwijl theoretisch voor een oxydatie tot sulfonzuur 3 atomen zuurstof nodig zouden zijn.

2. *Oxydatie van cystine.*

2,039 mg werden onder verwarmen opgelost in ca 10 cm³ water. Na afkoelen werd de titratie met kaliumpermanganaat op dezelfde manier als boven uitgevoerd. Ook hier was weer scherp te titreren. De oplossing bleef een paarse tint behouden, nadat in totaal 1,61 cm³ van de 0,02 molaire permanganaatoplossing was toegevoegd.

Dit komt, berekend voor het gehele, twee zwavelatomen bevattende molecule, overeen met een opneming van 4,92 atomen zuurstof. Voor het halve cystine-molecule zou dit dus betekenen, dat 2,46 atomen zuurstof waren opgenomen. Wanneer 1 molecule cystine geoxydeerd zou zijn tot twee moleculen cysteïnezuur, zouden hiervoor theoretisch 5 atomen zuurstof nodig zijn.

3. *Oxydatie van thiophaan- α -carbonzuur.*

Een oplossing van 12,5 mg thiophaan- α -carbonzuur in water werd op dezelfde manier getitreerd. Nu moesten 6,40 cm³ worden toegevoegd om een blijvende paarse tint te verkrijgen. Dit komt overeen met een opneming van 2,04 atomen zuurstof per molecule thiophaan- α -carbonzuur, terwijl voor een oxydatie tot het overeenkomstige sulfon theoretisch 2 atomen nodig zouden zijn.

4. *Oxydatie van biotinmethylester.*

2,735 mg werden in waterige oplossing met de 0,02 molaire permanganaatoplossing getitreerd op dezelfde manier als reeds bij bovenstaande modelproefjes werd beschreven. Ook hier kon ik de titratie zeer scherp uitvoeren. Om een blijvende paarse kleur te krijgen moest in totaal 0,70 cm³ worden toegevoegd. Dit komt overeen met een opneming van 1,98 atomen zuurstof*) per molecule biotinmethylester, terwijl theoretisch voor een oxydatie van sulfide tot sulfon 2 atomen zuurstof nodig zouden zijn.

De opwerking van het reactiemengsel voerde ik als volgt uit.

De zeer zwak paars getinte oplossing werd met enkele druppels methanol enige minuten op een kokend waterbad gezet. Hierdoor verdween de kleur. Na afkoelen en een nacht staan bij kamertemperatuur filtreerde ik het bruinsteen, dat prachtig was uitgevlokt af en waste zorgvuldig met water uit.

*) Later heb ik, als onderdeel van reacties die verderop in dit experimenteel gedeelte beschreven worden, deze oxydatie nog enige malen uitgevoerd. Toen vond ik een opneming van 2,02; resp. 2,03 atomen zuurstof per molecule biotinmethylester.

Na het kleurloze, volkomen heldere filtraat met enkele druppels verdund zoutzuur zuur op kongo gemaakt te hebben, heb ik de oplossing in een vacuumexsiccator voorzichtig drooggedampt boven phosphorpentoxyde en KOH. De droogrest was prachtig wit gekleurd. Tussen de anorganische zoutkristallen waren reeds duidelijk witte naalden te zien.

Na toevoegen van 1 cm³ water en voorzichtig omschudden, losten de anorganische zouten op, terwijl slechts mooi loszwevende naalden onopgelost bleven. Met een zeer fijn pipetje heb ik hierna de oplossing tussen de naalden weggezogen. Op dezelfde manier werd twee maal met 0,5 cm³ water nagewassen.

Na drogen bleek de rest te bestaan uit mooie witte dunne naalden. Een smeltpuntsbepaling onder het smeltpuntsmicroscop had tot resultaat: 265°—267° C*). (Eerst boven 240° C begon de stof zich een weinig bruinachtig te kleuren; bij het smelten kon ik geen gasontwikkeling waarnemen.)

B. Splitsingsproeven met joodwaterstof.

1. Inwerking van HJ (d. 1,96) op δ -thiodivaleriaanzuur bij 175°—180° C.

67 mg δ -thiodivaleriaanzuur werden met 2 cm³ zuiver HJ (d. 1,96) gedurende twee uur in een schietkast verhit op 175°—180° C. Na afkoelen werd de buis geopend, waarbij geen overdruk te constateren viel. Ik kon een sterke geur van zwavelwaterstof waarnemen, terwijl een vochtig lood-acetaatpapiertje in de damp direct werd zwart gekleurd, waarbij ook duidelijk de metaalglans van loodsulfide was waar te nemen. Het reactiemengsel werd met behulp van ca. 15 cm³ water in een scheitrechttertje overgebracht en hierna vier maal met 15 cm³ aether uitgeschud. Na de aetherfractie twee keer met bicarbonaatoplossing geschud te hebben,

*) Later, bij het maken van een iets grotere hoeveelheid, vond ik als smeltpunt 268°—270° C.

werd de lichtbruin gekleurde bicarbonaatfractie met behulp van zoutzuur zuur op kongo gemaakt.

Hierna werd een gelijk volume aether toegevoegd en enkele druppels SO_2 -water, waardoor de bruine tint verdween en het mengsel volkomen kleurloos werd. Na nogmaals vier maal met aether te hebben uitgeschud, heb ik deze aetherfractie eerst gedroogd met natriumsulfaat, waarbij weer een lichte geelkleuring optrad. Na affiltreren van het natriumsulfaat heb ik de aetheroplossing tot bijna droog ingedampt. De rest werd geneutraliseerd op lakmoes met $2,5 \text{ cm}^3$ 0,1 N. NaOH-oplossing. Bij de ca. 4 cm^3 oplossing voegde ik 8 cm^3 alcohol en 60 mg p-phenylphenacylbromide. Op de gewone manier werd een p-phenylphenacylester gemaakt ⁸⁷⁾.

Opbrengst: 54 mg van een slechts zeer weinig lichtbruin gekleurd product. Smeltpunt $99^\circ\text{--}100^\circ \text{ C}$.

Mengsmeltpunt met de p-phenylphenacylester van δ -joodvaleriaanzuur $99^\circ\text{--}100^\circ \text{ C}$.

Om dit mengsmeltpunt te kunnen bepalen moest eerst de overeenkomstige ester van δ -joodvaleriaanzuur gemaakt worden.

2. p-phenylphenacylester van δ -joodvaleriaanzuur.

41 mg δ -joodvaleriaanzuur werden met $2,0 \text{ cm}^3$ 0,1 N. NaOH-oplossing geneutraliseerd op lakmoes. Hierna werden 4 cm^3 alcohol en 48 mg p-phenylphenacylbromide toegevoegd en veresterd.

Opbrengst (zonder opwerking van de moederloog) 45 mg met een smeltpunt $101^\circ\text{--}102^\circ \text{ C}$. Witte wollige naaldjes. De verbinding bevatte jodium.

Het bleek dus, dat een HJ-behandeling van δ -thiodivaleriaanzuur tot δ -joodvaleriaanzuur leidde. Ter contrôle heb ik ook

⁸⁷⁾ N. L. Drake en J. Bronitsky. J. Am. Chem. Soc. 52, 3715 (1930).
N. L. Drake en J. P. Sweeney. Id. 54, 2059 (1932).

nog het δ -joodvaleriaanzuur met HJ op dezelfde manier in de schietkast verhit. Het bleek mogelijk een groot gedeelte van de verbinding als *p*-phenylphenacylester uit het reactiemengsel terug te winnen.

3. *Inwerking van HJ op cis-thiophaan-dicarbonzuur bij 175°—180° C.*

113 mg *cis*-thiophaan- $\alpha\alpha'$ -dicarbonzuur (Sp 141°—143° C) werden met 2 cm³ HJ (d. 1,96) in een schietkast gedurende twee uur verwarmd op 175°—180° C. Na afkoelen werd de buis geopend, waarbij een sterke geur van zwavelwaterstof viel waar te nemen, terwijl een vochtig loodacetaatpapiertje in de damp oogenblikkelijk een zwarte metaalglans aannam.

Met behulp van wat water heb ik de gehele buisinhoud in een erlenmeyertje overgebracht en alles op een waterbad drooggedampt onder wegzuigen van de damp; hierna nog twee maal wat water toegevoegd en op dezelfde manier drooggedampt. Door deze bewerking was het gelukt om praktisch alle jodium te verwijderen. Dikke naalden bleven achter, die in ongeveer 5 cm³ water onder verwarmen werden opgelost. Na een weinig zeer donker gekleurd onopgelost materiaal afgefiltreerd te hebben, werd de vrijwel kleurloze heldere oplossing drooggedampt.

Op deze manier werden 74 mg witte kristallen verkregen. Smeltpunt: 150°—151° C.

Mengsmeltpunt met adipinezuur: 150°—152° C. Theoretisch zou uit 113 mg thiophaan-dicarbonzuur 83 mg adipinezuur moeten ontstaan. Geïsoleerd: 74 mg; dat is 90 % der theorie.

4. *Inwerking van HJ op α -methyltrimethyleenureum bij 175°—180° C.*

17 mg α -methyltrimethyleenureum werden met 1 cm³ zuiver HJ (d. 1,96) in een schietkast gedurende twee uur op 175°—180° C verhit. Na afkoelen werd de buis geopend en het reactiemengsel met wat water in een erlenmeyertje over-

gebracht. Na op een waterbad onder wegzuigen van de damp drooggedampt te hebben, voegde ik twee maal een weinig water toe en dampte op dezelfde manier droog om alle jodium te verwijderen. Het residu werd opgelost en, na van een spoortje onopgelost materiaal afgefiltreerd te hebben, voegde ik een waterige oplossing van pikrinezuur toe, waardoor een neerslag ontstond van een blijkbaar zeer weinig oplosbaar pikraat.

Ten slotte werden 37 mg geïsoleerd. Smeltpunt 246° — 248° C, onder opschuimen en zeer donker worden. Ik deed geen poging om nog een tweede hoeveelheid uit de moederloog te verkrijgen.

Ter contrôle of dit pikraat werkelijk het dipikraat was van 1,3-diaminobutaan, heb ik deze stof eerst als volgt bereid:

7 mg α -methyltrimethyleenureum werden met 1 cm³ geconcentreerd zoutzuur in een schietkast gedurende een half uur op 200° C verhit. Na afkoelen heb ik de buis geopend en de inhoud met behulp van een weinig water in een erlenmeyertje overgebracht; daarna de oplossing in een vacuum-exsiccator boven P_2O_5 en KOH goed drooggedampt. De rest werd opgelost in een weinig water, de oplossing van een spoortje onopgelost materiaal afgefiltreerd en hierna op de gewone manier een pikraat gemaakt.

Dit had een smeltpunt van 245° — 248° C onder opschuimen en zeer donker worden.

Bij het bepalen van een mengsmeltpunt van beide pikraten vond ik niet de geringste depressie. Ook het mengsel smolt bij 245° — 248° C onder opschuimen en zeer donker worden.

5. Inwerking van HJ op biotinmethylester bij 175° — 180° C.

4,8 mg biotinmethylester werden met 1 cm³ zuiver HJ (d. 1,96) in een toegesmolten buis in de schietkast gedurende twee uur op 175° — 180° C verhit. Na afkoelen werd de buis geopend en practisch geen overdruk geconstateerd. Een vochtig loodacetaatpapiertje in de damp kleurde zich slechts

zeer langzaam een weinig donker, waarbij geen metaalglans van loodsulfide viel waar te nemen.

Met behulp van wat water bracht ik de buisinhoud over in een erlenmeyertje en dampte droog door verwarmen op een kokend waterbad, terwijl de damp werd weggezogen. Bij de droogrest werd 1 cm^3 water gevoegd en nog eens op dezelfde manier drooggedampt om op deze manier de overmaat jodium te verwijderen. Ik hield na goed drogen in een vacuumexsiccator 8,5 mg over van een slechts iets lichtgeel gekleurde olie, die volledig in grote naalden kristalliseerde.

Deze rest werd in wat water opgelost en de oplossing gefiltreerd om een weinig onopgelost materiaal te verwijderen. Teneinde een mogelijk nog aanwezig spoortje jodium kwijt te raken, heb ik nog eens drooggedampt en goed gedroogd in een vacuumexsiccator boven P_2O_5 en KOH. Het gewicht van de gedroogde rest bedroeg nu 8,3 mg. Deze werden in ongeveer $0,5 \text{ cm}^3$ water opgelost en bij deze oplossing werd een verzadigde waterige pikrolonzuuroplossing gevoegd. Er ontstond een dik lichtgeel neerslag („Morgensterne”).

Na affiltreren, uitwassen en drogen bleek het gewicht 11 mg te zijn. Een smeltpuntsbepaling onder het microscoop gaf het volgende resultaat.

Vanaf 160° C begonnen witte vlekjes om de gele kristaldeeltjes op te treden, die bij ongeveer 170° C duidelijker werden. Smeltpunt: 187° — 189° C onder bruin worden. Toen waren de grootste deeltjes nog niet gesmolten; dit was eerst bij ca 200° C het geval.

Het pikrolonaat werd omgekristalliseerd uit pikrolonzuurhoudend water. Het bleek zeer moeilijk oplosbaar te zijn. Weer ontstonden „Morgensterne”. Het neerslag leek onder het microscoop volkomen homogeen. Na affiltreren, uitwassen en drogen bleek het gewicht 8,3 mg te bedragen. Een microsmeltpuntsbepaling had hetzelfde resultaat als vóór het omkristalliseren. Weér smolten de kleinste deeltjes bij 187° — 189° C . Bij ongeveer 200° C was weer alles gesmolten, of juistert: ontleed onder zeer donker worden.

De analyses leverden de volgende waarden: *)

CH-analyse:

3,115 mg stof: 5,32 mg CO_2 en 1,27 mg H_2O .

N-analyse:

2,202 mg stof: 0,352 cm^3 N_2 bij 22° C en 767 mm.

S-analyse:

1,893 mg stof: 0,60 mg BaSO_4 .

Berekend voor $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2\text{S} \cdot 2 \text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_5\text{N}_4$:

C 46,62 0/0; H 4,59 0/0; N 18,77 0/0; S 4,30 0/0.

Gevonden: C 46,58 0/0; H 4,56 0/0; N 18,67 0/0; S 4,35 0/0.

6. Inwerking van HJ op biotinmethylester bij 210° C.

1,5 mg biotinmethylester werd met 1 cm^3 zuiver HJ (d.1,96) in een schietkast gedurende twee uur op 208° — 210° C verwarmd. Na afkoelen werd de buis geopend, waarbij vrijwel geen overdruk geconstateerd werd. Een vochtig loodacetaat-papiertje in de damp gehouden, kleurde zich slechts zeer langzaam een weinig donker, waarbij geen metaalglans van loodsulfide te zien was.

Met water werd de buisinhoud in een erlenmeyertje overgebracht. Na het reactiemengsel op een kokend waterbad onder wegzuigen van de damp drooggedampt te hebben, loste ik de droogrest weer in water op en dampte op dezelfde manier nogmaals droog om de overmaat jodium te verwijderen. Hierna werd het residu weer in wat water opgelost en afgefiltreerd van een spoortje onopgelost materiaal. Tenslotte heb ik nog een keer drooggedampt om er zeker van te zijn, dat het laatste restje jodium verwijderd was.

Na goed drogen bleek het gewicht van deze droogrest 3,5 mg te zijn. Wéér maakte ik op de gewone manier een pikrolonaat; wéér bestond dit pikrolonaat uit „Morgensterne”, die ook

*) Voor de meer dan gewone zorg, waarmee de Heer Hubers te Amsterdam de analyses van al mijn kostbare afbraakproducten uitvoerde, betuig ik hem, ook op deze plaats mijn dank. Het is duidelijk dat deze analyses, daar vrijwel nooit voldoende materiaal voor herhaling aanwezig was, steeds een belangrijk slot van iedere afbraak vormden.

onder het smeltpuntsmicroscop hetzelfde gedrag vertoonden als het pikrolonaat van het C_9 -diaminozuur.

Opbrengst aan pikrolonaat: 2,4 mg.

7. *Inwerking van HJ op biotinmethylester bij 250° C.*

2,4 mg biotinmethylester werden met 1 cm³ zuiver HJ (d.1,96) 5 uur lang in een schietkast op 247°—255° C verhit. Na afkoelen werd de buis geopend; er bleek slechts weinig overdruk te zijn. Ik kon een duidelijke geur van zwavelwaterstof waarnemen, terwijl een vochtig loodacetaatpapiertje in de damp ogenblikkelijk bruinzwart werd, waarbij ook een metaalglans optrad.

Na de buisinhoud met behulp van wat water in een erlenmeyertje te hebben overgebracht, werd op een kokend waterbad drooggedampt onder gelijktijdig wegzuigen van de damp. Om de overmaat jodium te verwijderen, werd de droogrest nog eens in water opgelost en de oplossing nog eens op dezelfde manier drooggedampt.

Na zorgvuldig in een vacuumexsiccator te hebben gedroogd, bleek het gewicht der rest 4,9 mg te bedragen (vrijwel kleurloos en goed gekristalliseerd).

Door uitvoeren van een microproefje werd geconstateerd, dat met een druppel waterige pikrolonzuuroplossing geen neerslag ontstond, hetgeen zeker het geval zou moeten zijn, wanneer het gewone C_9 -diaminozuur het reactieproduct was geweest.

Hierna heb ik de gehele oplossing met overmaat zilverchloride geschud om alle jodium door chloor te vervangen. Na affiltreren van zilverhalogenide en droogdampen van het filtraat, ontstond een kleurloze gekristalliseerde rest van 2,2 mg. In dit product waren de waaivormen te onderscheiden, die voor ammoniumchloride zo kenmerkend zijn. Bovendien bleek uit een microproefje, dat met een oplossing van platinachloride in water een neerslag ontstond, welk bij beschouwen onder het microscop het uiterlijk bleek te hebben van ammoniumchloroplatinaat.

Ter contrôle heb ik nog de oplossing met behulp van bariet alkalisch gemaakt en tot een klein volume afgedestilleerd. Het destillaat, dat basisch bleek te reageren, werd met 0,110 N. HCl getitreerd tot een omslag van de indicator methylrood. Nodig waren 0,12 cm³. Dit komt overeen met 60 % van de theoretisch berekende hoeveelheid voor het geval dat alle stikstof, die oorspronkelijk in het biotinmolecule aanwezig was, tot ammoniak was gereduceerd. Bij de interpretatie van dit percentage moet er natuurlijk rekening mee worden gehouden, dat voor de uitvoering van bovengenoemde microreacties al reeds een gedeelte verbruikt was.

8. *Inwerking van HJ en rode phosphor op biotinmethylester bij 180° C.*

9,8 mg biotinmethylester werden met 65 mg rode phosphor en 1 cm³ HJ (d.1,96) twee uur lang in een Cariusbuis op 180° C verwarmd. Na afkoelen werd de buis geopend; de inhoud was van lichtbruin tot volkomen kleurloos geworden; een vochtig loodacetaatpapiertje kleurde zich in de damp slechts langzaam iets bruinachtig, waarbij niet de metaalglans van loodsulphide waargenomen werd.

Na het reactiemengsel met behulp van wat water in een erlenmeyertje overgebracht te hebben, werd op een waterbad, onder gelijktijdig wegzuigen van de damp drooggedampt. Hierbij trad aan het eind een lichte geelkleuring op. Er bleef een zeer lichtgeel gekleurde olie achter. Om het laatste restje jodium te verwijderen, werd nogmaals met een weinig water op dezelfde manier drooggedampt. Een vrijwel kleurloze rest bleef achter. Deze werd in 5 cm³ water opgelost, waarna een spoortje onopgelost materiaal werd afgefiltreerd.

Na door toevoegen van 0,4 g natriumhydroxyde sterk alkalisch gemaakt te hebben, heb ik de oplossing onder doorleiden van stikstof drooggedampt, door het kolfje in een oliebad te houden, dat aan het eind van de destillatie een temperatuur van 190° C had. Tenslotte werd de droogrest nog 15 minuten op deze temperatuur gehouden.

Het destillaat bleek na aanzuren met enkele druppels verdund zoutzuur en droogdampen vrijwel geen droogrest op te leveren. Het spoortje, dat achterbleef, gaf na oplossen in water geen neerslag met pikrolonzuur- of goudchloride-oplossing. Hierdoor was dus gebleken, dat een vluchtige base bij deze bewerking in het geheel niet, of slechts in minimale hoeveelheid was ontstaan.

De rest, die was verkregen na droogdampen van de alkalische oplossing, heb ik hierna met een overmaat zoutzuur enige tijd op een waterbad verwarmd. Een vlokke massa bleek onopgelost te blijven en werd afgefiltreerd en zorgvuldig met water uitgewassen. Bij nadere beschouwing bleek dit kiezelzuur te zijn, dat natuurlijk was ontstaan, doordat de sterke loog het glas van het destilleerkolfje had aangetast.

Na droogdampen van het filtraat, werd bij de droogrest 10 cm³ van een 1,5 0/0-ige oplossing van zoutzuur in absolute methanol gevoegd en gedurende 1 uur aan een opstijgende koeler gekookt. Na droogdampen en goed drogen in een vacuumexsiccator boven NaOH en P₂O₅, heb ik de rest in 10 cm³ water opgelost en met natriumbicarbonaat alkalisch gemaakt. De waterige oplossing werd hierna vijf maal met chloroform uitgeschud. Na drogen van deze fractie met behulp van uitgegloeid natriumsulfaat en affiltreren van dit droogmiddel, werd de chloroformoplossing drooggedampt.

Het gewicht van de gele olie, die overbleef, bleek na drogen in een exsiccator 4,6 mg te zijn. Na verzeping met HCl werd weer drooggedampt. Nu bleek de droogrest een gekristalliseerd product te zijn, terwijl het gewicht 4,7 mg bedroeg. Deze rest werd in water opgenomen en deze oplossing gaf met een waterige oplossing van pikrolonzuur een zeer moeilijk oplosbaar pikrolonaat. Na dit pikrolonaat geïsoleerd te hebben en één maal te hebben omgekristalliseerd, heb ik tenslotte 4,7 mg mooi lichtgeel product verkregen, dat onder het microscoop uit homogene „Morgensterne” bleek te bestaan. Het gedrag onder het smeltpuntmicroscoop was volkomen hetzelfde als van het pikrolonaat van het C₉-diaminozuur.

Ook hier een ontleding van de kleinste deeltjes onder zeer donker worden bij een temperatuur van ca 190° C, terwijl de grotere partikeltjes eerst bij een iets hoger gelegen temperatuur een ontleding ondergingen. Bij ongeveer 210° C bleek alles ontleed en zeer donker gekleurd te zijn.

Een kwalitatieve zwavelanalyse, met het pikrolonaat uitgevoerd, bleek een positief resultaat te hebben.

CH-analyse:

3,036 mg stof: 5,11 mg CO₂ en 1,18 mg H₂O (bovendien 0,046 mg as).

Berekend voor: C₉H₁₈O₃N₂S · 2 C₁₀H₈O₅N₄: C 46,62 0/0; H 4,59 0/0.

Gevonden: C 45,90 0/0; H 4,35 0/0.

Door rekening te houden met de 1,52 0/0 as, kunnen de gevonden waarden gecorrigeerd worden.

Deze worden dan: C 46,59 0/0; H 4,42 0/0.

9. *Splitsing van biotinmethylester met zoutzuur, gevolgd door behandeling met nitriet en reductie met HJ.*

9,3 mg biotinmethylester werden met 2 cm³ geconc. HCl een half uur in een schietkast op 200° C verhit. Na openen der buis en droogdampen van de oplossing bleef een rest van 10,1 mg. achter. Hierbij werd gevoegd 1 cm³ water en 0,3 cm³ ijsazijn; tenslotte een oplossing van 100 mg natriumnitriet in 1 cm³ water. Gasontwikkeling trad op.

Na 30 minuten staan bij kamertemperatuur, heb ik de oplossing bij een temperatuur van ca 40° C in een vacuumkolfje tot bijna droog ingedampt; hierna 0,5 cm³ gec. HCl toegevoegd en op dezelfde manier geheel drooggedampt. In een vacuumexsiccator werd boven P₂O₅ en KOH nog zorgvuldig gedroogd.

Door gebruik te maken van de oplosbaarheid in chloroform, werd een scheiding organisch-anorganisch bereikt. Na droogdampen van de chloroformoplossing, verkreeg ik tenslotte als organische fractie een rest van 8,3 mg lichtgele olie.

Deze olie werd met 1 cm³ zuiver HJ (d. 1,96) in een schietkast gedurende twee uur op 180° C verwarmd. Na afkoelen en openen der buis bleek een vochtig loodacetaat-

papiertje, in de damp gehouden, zich ogenblikkelijk donker te kleuren, terwijl ook de voor loodsulfide zo karakteristieke metaalglans waargenomen werd. Bovendien was zwavelwaterstof zeer duidelijk te ruiken.

Dat de zwavel er als zwavelwaterstof was afgesplitst, was dus met zekerheid aangetoond.

Het reactiemengsel, dat door jodiumafscheiding donker was getint, werd met water verdund en hierna met zwaveldioxyde-oplossing ontkleurd. De ontkleurde oplossing werd na filtreren 5 maal met hetzelfde volume chloroform uitgeschud. Na drogen van de chloroformfractie met behulp van natriumsulfaat, heb ik de chloroform bij lage temperatuur afgedampt en slechts een spoortje als rest verkregen (minder dan 0,1 mg).

C. Inwerking van KOH-oplossing op sulfonen.

1. Inwerking van KOH op het sulfon van thiophaan-*a*-carbonzuur.

Het sulfon werd op de gewone manier uit thiophaan-*a*-carbonzuur gemaakt door oxydatie met de permanganaat-oplossing. De gezuiverde verbinding bleek bij 126°—127° C te smelten.

85 mg van dit sulfon werden in een stalen micro-autoclaafje met een oplossing van 0,4 g KOH in 0,4 cm³ water gedurende 1 uur op 200° C. verhit. Na afkoelen en openen werd de inhoud met behulp van wat water in een erlenmeyertje overgebracht. Hierna maakte ik met zoutzuur zuur, waarna een SO₂-lucht was waar te nemen. Na een geringe overmaat broom te hebben toegevoegd, waardoor het zwaveldioxyde tot zwavelzuur werd geoxydeerd, werd dit laatste als bariumsulfaat bepaald.

Ongeveer 70 % van de theoretisch mogelijke hoeveelheid aan BaSO₄ werd geïsoleerd (80 mg). Wanneer men rekening houdt met een in gasvorm ontweken kleine hoeveelheid zwaveldioxyde, kan men uit deze proef de conclusie trekken, dat vrijwel alle zwavel uit het oorspronkelijke molecule is gesplitst.

2. *Inwerking van KOH op trimethyleenureum.*

100 mg trimethyleenureum werden op dezelfde manier als bij de vorige proef met een oplossing van 0,4 g KOH in 0,4 cm³ water gedurende 1 uur op 200° C verwarmd. Na opening was een sterke aminelucht waar te nemen. Met wat water werd het reactiemengsel in een destilleerkolfje overgebracht. Na afgedestilleerd en het destillaat in zoutzuur opgevangen te hebben, werd de zoutzuuroplossing drooggedampt. De droogrest werd in water opgenomen en het diamine als een dipikraat met een waterige pikrinezuuroplossing neergeslagen.

In totaal werd door mij, zonder opwerking van de moederloog, 300 mg pikraat geïsoleerd (60 % der theoretische hoeveelheid). Ontledingstraject: 230°—235° C. Een mengsmeltpunt, genomen met het dipikraat van 1,3 diaminopropaan, dat ik maakte door een splitsing van trimethyleenureum met zoutzuur, gaf geen depressie in ontledingstraject.

3. *Oxydatie van biotinmethylester en KOH-inwerking op het biotinesulfo.*

10,1 mg biotinmethylester werden bij kamertemperatuur op de gewone manier met de 0,02 molaire oplossing van kaliumpermanganaat geoxydeerd. Opgenomen werden 2,65 cm³; dat zijn 2,02 atomen zuurstof. Na affiltreren van het bruinsteen, werd het filtraat met zoutzuur tot zuur op kongo gemaakt en drooggedampt.

De droogrest wreef ik met een spateltje fijn en bracht hierna het poeder in een micro-autoclaafje. Na toevoeging van een oplossing van 35 mg KOH in 0,05 cm³ water en sluiten van het autoclaafje, werd 1 uur lang op 200° C verwarmd. Na afkoelen en openen werd de gele oplossing met behulp van wat water in een erlenmeyertje overgebracht. Een vochtig rood lakmoespapiertje werd in de damp ogenblikkelijk blauw gekleurd; bovendien meenden wij duidelijk ammoniak te ruiken.

Alvorens de gehele hoeveelheid op te werken, heb ik met

een druppeltje van de lichtgeel gekleurde oplossing het volgende microproefje uitgevoerd. Het druppeltje werd met een spoortje zoutzuur tot zuur op kongo gemaakt en hierna een weinig broomwater toegevoegd. In deze oplossing toonde ik nu zwavelzuur aan, door een druppel bariumchlorideoplossing toe te voegen, waardoor een neerslag van BaSO_4 in de vorm van een geringe troebeling optrad.

Na op deze manier het ontstaan van SO_2 aangetoond te hebben, werd met de opwerking van de rest van de oplossing verder gegaan. Ook hier werd met zoutzuur tot zuur op kongo gemaakt, waardoor een troebeling ontstond, die bij verwarmen van de oplossing bijna geheel weer oploste. Slechts zeer weinig donker uitzierend materiaal bleef onopgelost. Teneinde dit te verwijderen, heb ik de oplossing heet gefiltreerd en daarna drooggedampt.

Door gebruik te maken van de oplosbaarheid in aether heb ik tenslotte het organisch materiaal van de anorganische reactieproducten weten te scheiden. Ik verkreeg uiteindelijk 4,5 mg van een lichtgele olie, die de geur van een oxyzuur had. Teneinde deze olie nog nader te kunnen identificeren, werd op de volgende manier een p-phenylphenacylester gemaakt. De olie werd op lakmoes geneutraliseerd met 2,16 cm^3 0,012 N. NaOH-oplossing. Hierna voegde ik 5 cm^3 alcohol en 7 mg p-phenylphenacylbromide toe en kookte het reactiemengsel een uur aan een opstijgende koeler. Hierna werd, teneinde een weinig verontreiniging kwijt te raken, de oplossing heet gefiltreerd; vervolgens werd door nog iets in te dampen en hierna af te koelen, 4,5 mg neerslag geïsoleerd.

Smeltpuntsbepaling onder het microscoop: bij ca 80° C begon het product te verweken; smeltpunt 83°—85° C.

Na 1 maal omkristalliseren uit 70 0/0-ige alcohol werden tenslotte 2 mg van een vrijwel kleurloos materiaal verkregen. Onder het microscoop bleek de ester te bestaan uit kleurloze, zuilvormige kristallen.

Een smeltpuntsbepaling van dit omgekristalliseerde product, onder het microscoop gedaan, gaf hetzelfde resultaat als vóór

de zuivering. Opgemerkt moet echter worden, dat het smeltpunt op deze manier door de doorzichtigheid van de kristallen niet zeer duidelijk was waar te nemen.

Na met behulp van kwalitatieve microproefjes de afwezigheid van zwavel en van stikstof in de ester vastgesteld te hebben, werd de rest voor een CH-analyse gebruikt.

CH-analyse:

1,569 mg stof: 3,67 mg CO₂ en 0,72 mg H₂O.

Gevonden: C 63,79 0/0; H 5,13 0/0.

Het zal duidelijk zijn dat de hoeveelheid materiaal, voor deze analyse beschikbaar, te gering was om een betrouwbare uitkomst te garanderen, zodat er op deze plaats van wordt afgezien om een brutoformule af te leiden.

D. Methylering en afbraak volgens A. W. Hofmann.

1. *Inwerking van methyljodide op biotinmethylester en poging om met het reactieproduct een afbraak volgens Hofmann uit te voeren.*

Bij 10 mg biotinmethylester werd, na oplossen in 1,5 cm³ methanol en enkele druppels water *), 1,5 cm³ zuiver, kleurloos methyljodide gevoegd. Het reactiemengsel werd hierna gedurende 2¹/₂ uur aan een opstijgende koeler gekookt, waarbij een slechts lichte geelkleuring werd waargenomen. Na droogdampen van de oplossing en drogen van de rest in een exsiccator bleef 14,7 mg lichtgele olie achter (berekend voor het geval dat additie van 1 CH₃J-groep en verzeeping van de estergroep had plaats gevonden: 14,9 mg).

De oplossing van dit product in 3 cm³ water werd hierna 20 minuten lang geschud met een overmaat vers neergeslagen, vochtig zilveroxyde. Hierna heb ik afgefiltreerd en het neerslag goed met water nagewassen. Het heldere filtraat, waarin een microreactie op halogeenionen met negatief resultaat was gedaan, heb ik in een kolfje drooggedampt en tenslotte in

*) Water schijnt de additie te bevorderen. vgl. A. v. Oefele. Ann. 132, 82 (1864).

vacuo nog 15 minuten in een oliebad van 150° C gehouden.

De inhoud van het kolfje bleek na deze bewerking nog een gewicht van 10,2 mg te hebben. Deze inhoud werd opgelost in overmaat verdund zoutzuur, en na affiltreren van een spoortje onopgelost, donker gekleurd materiaal, werd het filtraat drooggedampt. De droogrest bestond uit 10,6 mg kleurloos product, dat praktisch volkomen in naalden gekristalliseerd bleek te zijn. Uit een test op de groeiwerking op gist, met 0,1 mg van deze fractie uitgevoerd, werd duidelijk, dat de volledige biotine-activiteit behouden was gebleven.

2. Hernieuwde behandeling met CH₃J en poging om het jodium door chloor te vervangen.

De 10,6 mg rest van het bovenstaande proefje werd, na oplossen in 3 cm³ methanol plus enkele druppels water, gedurende 2 uur gekookt met 2 cm³ zuiver CH₃J aan een opstijgende koeler, waarbij een zeer lichte geelkleuring op te merken was.

Na droogdampen van de oplossing en drogen van de rest in een exsiccator, bleek 15,1 mg licht gekleurde olie achter te blijven.

Nadat in 2 cm³ water opgelost was, werd 15 minuten lang met overmaat zilverchloride geschud. Hierna werd de geel geworden, vaste stof afgefiltreerd, goed met water uitgewassen, en het heldere filtraat in een vacuüm kolfje drooggedampt. Na drogen van het achtergeblevene in een exsiccator bedroeg het gewicht 10,6 mg.

Hiervan heb ik 0,1 mg genomen om de groeiwerking tegenover gist te testen, waarbij bleek dat de gehele biotine-activiteit behouden was gebleven.

3. Splitsing met zoutzuur en methylering van het C₉-diaminozuur.

De droogrest uit de vorige proef werd met 2 cm³ gec. HCl gedurende een half uur in een schietkast op 200° C verhit. Na openen van de afgekoelde buis, heb ik de inhoud

in een erlenmeyertje overgebracht met behulp van wat water en in een vacuumexsiccator drooggedampt boven KOH en P_2O_5 . Het gewicht van de geheel gekristalliseerde rest bleek 11,6 mg te bedragen. Met enkele γ 's hiervan heb ik onder het microscoop een pikrolonaat gemaakt, dat uit de „Morgensterne” bleek te bestaan, die zo karakteristiek zijn voor het pikrolonaat van het C_9 -diaminozuur.

Teneinde de methylering uit te voeren, werden deze 11,6 mg, na oplossen in 2 cm^3 methanol plus enkele druppels water, gedurende $1\frac{1}{2}$ uur aan een opstijgende koeler gekookt met 2 cm^3 zuiver methyljodide. Na droogdampen bleek de rest een gewicht van 19 mg te bezitten. Het was een lichtgele olie, die later kristalliseerde. Na oplossen in 1 cm^3 absolute methanol, werden 100 mg, vers bereid, droog zilveroxyde toegevoegd, waardoor een wit waas ontstond.

Na toevoegen van 1 cm^3 CH_3J , heb ik het reactiemengsel 4 uur lang aan een opstijgende koeler gekookt. Na deze 4 uur werden nog eens 100 mg Ag_2O en 1 cm^3 CH_3J toegevoegd en nog $1\frac{1}{2}$ uur gekookt. Deze laatste behandeling werd nog eens herhaald.

Hierna heb ik het reactiemengsel drooggedampt, overmaat verdund zoutzuur toegevoegd en een kwartier op een kokend waterbad verwarmd. Tenslotte werd heet gefiltreerd en de afgefiltreerde zilverhalogeniden zeer zorgvuldig met kokend water uitgewassen. Na droogdampen van de vrijwel kleurloze heldere oplossing, bleek de droogrest uit een kristalliserende lichtgele olie te bestaan en een gewicht van 24,7 mg te bezitten.

Teneinde het jodide in het overeenkomstige chloride om te zetten, heb ik na oplossen in 4 cm^3 water, geschud met een overmaat zilverchloride. De eerste toegevoegde porties werden duidelijk geel. Na affiltreren van de zilverzouten en goed uitwassen, bleek de rest, die ik overhield na droogdampen van het filtraat, een gewicht van 20,4 mg te hebben en te bestaan uit een doorgekristalliseerde, vrijwel kleurloze olie.

4. Afbraak volgens A. W. Hofmann.

De bovenstaande 20,4 mg werden opgelost in 4 cm³ water en hierna voegde ik een overmaat, vers neergeslagen, vochtig zilveroxyde toe, waarbij bleek, dat de eerste porties duidelijk wit werden. Na ongeveer 10 minuten geschud te hebben, werd afgefiltreerd en grondig met water uitgewassen.

Het heldere, alkalisch reagerende filtraat werd eerst in een kolfje drooggedampt en tenslotte werd het kolfje gedurende 15 minuten in vacuo in een oliebad van 150° C gehouden. De droge rest in de kolf, die een gewicht van 15,1 mg bleek te bezitten, was slechts weinig donker gekleurd. Na toevoegen van overmaat verdund zoutzuur, werd van zeer weinig onopgelost materiaal afgefiltreerd; hierna werd de oplossing drooggedampt. De rest bleek een practisch kleurloze kristalliserende olie te zijn, terwijl het gewicht 17,7 mg bedroeg.

Deze olie werd opgelost in 3 cm³ water en deze oplossing voor de zekerheid nog eens gefiltreerd. Nadat uit een microproefje was gebleken, dat met een 20 0/0-ige waterige HAuCl₄-oplossing een lichtgeel neerslag ontstond, heb ik bij de gehele oplossing een overmaat van dit reagens gevoegd. Na affiltreren, uitwassen en drogen, bleek 6,4 mg auraat te zijn ontstaan. De verbinding, die onder het microscoop een volkomen homogeen uiterlijk had, bleek onder ontleding bij 199°—200° C te smelten.

Nadat uit een kwalitatieve reactie op zwavel was gebleken, dat het auraat dit element bevatte, werd met de rest een CH-, Au- en een N-analyse uitgevoerd.

CH- en Au-analyse:

2,649 mg stof: 1,33 mg CO₂; 0,76 mg H₂O en 1,216 mg Au.

N-analyse:

2,158 mg stof: 0,062 cm³ N₂ bij 22° C en 764 mm.

Berekend voor C₁₀H₂₆N₂SAu₂Cl₈:

C 13,58 0/0; H 2,96 0/0; N 3,17 0/0; Au 44,62 0/0.

Gevonden: C 13,69 0/0; H 3,21 0/0; N 3,34 0/0; Au 45,90 0/0.

5. Methylering van ornithine volgens de methode van Purdie.

105 mg ornithinedihydrochloride werden met 2,5 cm³ absolute methanol en 2 cm³ zuiver methyljodide, na toevoegen van 1 g, vers gemaakt, droog zilveroxyde, gedurende 2 uur aan een opstijgende koeler gekookt. Hierna heb ik nog eens 2 cm³ CH₃J en 0,4 g Ag₂O toegevoegd en na nog eens 2 uur lang gekookt te hebben, drooggedampt.

Bij de droogrest werd nu een overmaat verdund zoutzuur gevoegd en hierna op een waterbad onder voortdurend omschudden verwarmd. De oplossing werd heet gefiltreerd en zeer grondig met verdund zoutzuur en heet water uitgewassen. Dit uitwassen bleek zeer belangrijk te zijn.

De rest, die na het droogdampen van het kleurloze, heldere filtraat overbleef, had een gewicht van 152 mg. Teneinde alle jodium door Cl te vervangen, heb ik deze rest opgelost en de oplossing goed met AgCl geschud, waarbij voor een overmaat werd gezorgd en waarbij ik kon waarnemen, dat de eerste porties zich geel kleurden.

Na affiltreren en uitwassen, heb ik tenslotte uit de oplossing, door toevoegen van een 20%-ige HAuCl₄ oplossing, een lichtgeel aaraat neergeslagen. Na affiltreren, uitwassen en drogen, bleek het gewicht 267 mg te bedragen. Het aaraat bleek bij 204°—205° C onder ontleding te smelten.

Een mengsmeltpunt, gedaan met het aaraat van gemethyleerd ornithine, dat ik maakte volgens de methode van R. Engeland, gaf geen depressie.

Bovendien heb ik enkele Au-analysen uitgevoerd, die het volgende resultaat hadden:

4,010 mg stof: 1,750 mg Au.	Au 43,86 %.
4,550 mg stof: 2,002 mg Au.	Au 44,00 %.
Berekend voor C ₁₁ H ₂₀ O ₂ N ₂ Au ₂ Cl ₈ :	Au 43,85 %.

E. Verhitting van biotinesulfon met zoutzuur.

1. *Inwerking van zoutzuur op het sulfon van δ-thiodivaleriaanzuur.*

Uit δ-thiodivaleriaanzuur werd eerst het overeenkomstige

sulfon gemaakt door oxydatie bij kamertemperatuur met de gewone 0,02 molaire permanganaatoplossing. De stof bleek een goed uit water om te kristalliseren verbinding te zijn, die na zuiveren smolt bij 178° C. Ook hier was het sulfide weer als het ware te titreren met de permanganaatoplossing; twee atomen zuurstof werden opgenomen.

37 mg van dit sulfon werden nu met 2 cm^3 geconc. HCl gedurende 2 uur verhit op 250° C in een Carius-buis. Na afkoelen werd de buis geopend en het reactiemengsel drooggedampt. De overmaat zoutzuur werd verwijderd in vacuo boven KOH en P_2O_5 . De rest bleek na drogen nog steeds een gewicht van 37 mg te hebben, terwijl het smeltpunt slechts 1 graad was verlaagd. Een mengsmeltpunt met het oorspronkelijke sulfon gaf geen depressie.

2. Zuursplitsing van biotinesulfon.

3,1 mg biotinesulfon, gemaakt door permanganaatoxydatie van biotinmethylester, werden met 1 cm^3 gec. HCl in een schietkast gedurende $\frac{1}{2}$ uur op 200° C verwarmd. Na droogdampen van het reactiemengsel en verwijderen van de overmaat zoutzuur door in vacuo te laten staan boven KOH en P_2O_5 , heb ik de droogrest in weinig water opgelost en, na filtreren van de oplossing, op de gewone manier een pikrolonaat gemaakt.

Na omkristalliseren uit weinig water, waaraan een druppeltje pikrolonzuuroplossing was toegevoegd, gelukte het mij om 2 mg van een zuivere, tamelijk oplosbare stof te isoleren.

Uit een bepaling onder het microscoop volgde, dat het smeltpunt 139° C was. Na eerst in deze stof kwalitatief de zwavel te hebben aangetoond, werd de rest gebruikt voor de uitvoering van een N-analyse.

N-analyse:

1,510 mg stof: $0,228 \text{ cm}^3 \text{ N}_2$ bij 24° C en 768 mm.

Berekend voor $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2\text{S} \cdot 2 \text{ C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5\text{N}_4$: 17,58 % N.

Gevonden: 17,54 % N.

3. *Oxydatie van biotinmethylester tot biotinesulfon, gevolgd door splitsing met zoutzuur.*

15,4 mg biotinmethylester werden bij kamertemperatuur geoxydeerd met de 0,02 molaire oplossing van kaliumpermanganaat, die wij steeds voor onze oxydatieproeven gebruikten. Nadat in totaal 4,04 cm³ was toegevoegd, verdween de paarse tint niet meer. Dit komt overeen met een opname van 2,03 atomen zuurstof. Na enkele druppels methanol te hebben toegevoegd, werd de oplossing 5 minuten op een waterbad verwarmd, om het bruinsteen goed te laten uitvlokken. Na een nacht staan bij kamertemperatuur, werd dit gefiltreerd en goed met water uitgewassen. Het heldere, kleurloze filtraat werd, na een overmaat zoutzuur te hebben toegevoegd, in een vacuumexsiccator boven P₂O₅ en KOH ingedampt.

Toen het volume nog ongeveer 2 cm³ bedroeg, heb ik met een zeer fijn pipetje de moederloog tussen de prachtig gevormde, kleurloze dunne naalden uitgezogen. Op dezelfde manier werd één maal met 1 cm³ en 3 maal met 0,5 cm³ water gewassen. Na drogen in een exsiccator bleek dat ik 13,7 mg biotinesulfon had geïsoleerd.

Een smeltpuntsbepaling onder het microsmeltpuntsmicroscop had tot resultaat: 268°—270° C. Eerst bij het smelten kleurde zich de kleurloze stof een weinig. Gedurende het smelten kon ik onder het microscoop geen gasontwikkeling constateren.

Teneinde de zuursplitsing uit te voeren, werden deze 13,7 mg met 3 cm³ gec. HCl een half uur in een schietkast op 200° C verhit. Na afkoelen werd de buis geopend. Er bleken zich geen harsachtige deeltjes gevormd te hebben; de oplossing was mooi kleurloos en helder gebleven.

Deze opl. werd hierna in een vacuumexsiccator boven P₂O₅ en KOH drooggedampt. Het gewicht van de droogrest bedroeg 16,8 mg (hygroscopisch). Het product was kleurloos en volledig gekristalliseerd: naalden.

Van de 16,8 mg heb ik 13,5 mg genomen om een verbinding met dilituurzuur te maken. Hiertoe werd het product in 3 cm³ water opgelost en deze oplossing voor de zekerheid

nog gefiltreerd, ofschoon hij op het oog geheel helder leek. Nadat uit een microproefje was gebleken, dat het dilituraat bestond uit los-zwevende, prachtig homogeen gekristalliseerde oliedruppeltjes „Morgensterne”, werd bij de gehele oplossing een verzadigde waterige opl. van dilituurzuur gedruppeld, waarbij ervoor werd gezorgd, dat uiteindelijk een overmaat van dit reagens aanwezig was.

Na enige tijd in de ijskast te hebben gestaan, werd het neerslag afgefiltreerd, goed met water uitgewassen en gedroogd. Aanwezig bleken te zijn 11,6 mg, die onder het microscoop een volkomen homogeen uiterlijk hadden. Bij een bepaling onder het smeltpuntsmicroscoop bleek de stof bij 232° — 238° C te ontleden, onder zeer donker worden van de smelt.

Na omgekristalliseerd te hebben uit ca 1,5 cm³ water, plus enkele druppels dilituurzuuroplossing, verkreeg ik tenslotte 7,5 mg gezuiverd product. Het ontledingstraject hiervan was 235° — 240° C. Onder het microscoop zag de verbinding er volkomen homogeen uit en bleef gedurende het opwarmen prachtig kleurloos. Eerst toen de stof begon te ontleden, werd de smelt zeer donker gekleurd.

Nadat in dit dilituraat de aanwezigheid van de zwavel was aangetoond, werd de rest gebruikt voor een CH- en een N-analyse.

CH-analyse:

3,120 mg stof: 3,76 mg CO₂ en 1,24 mg H₂O.

N-analyse:

1,901 mg stof: 0,297 cm³ N₂ bij 22° C en 749 mm.

Berekend voor C₉H₂₀O₅N₂S · 2C₄H₈O₅N₃: C 33,20 %;

H 4,27 %; N 18,22 %.

Gevonden: C 32,87 %;

H 4,45 %; N 17,82 %.

4. Potentiometrische titraties.

De volgende titraties werden uitgevoerd:

- a. Van 4,00 mg ornithinedihydrochloride.
- b. Van 2,15 mg dihydrochloride van het C₉-diaminozuur (ge-

maakt uit de overeenkomstige hoeveelheid biotinemethylester).

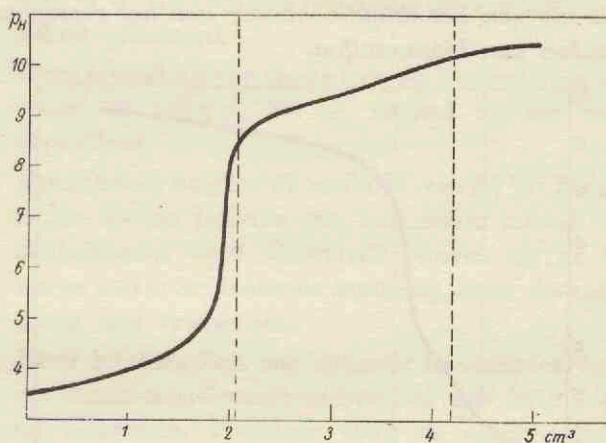
- c. Van 1,61 mg dihydrochloride van het „zuursplitsingsproduct” van biotinesulfon.

Ik titreerde steeds met een 0,00876 N. carbonaatvrije NaOH-opl. De producten werden in 15 cm³ water opgelost, 1 cm³ van een 2 0/0-ige KCl-opl. toegevoegd en hierna het spanningsverschil gemeten tussen een AgCl-electrode en een glaselectrode in de oplossing, onder doorleiden van een koolzuurvrije stikstofstroom. Steeds na een druppel loog toegevoegd te hebben, werd het spanningsverschil opnieuw gemeten.

In de bijbehorende grafieken heb ik de hoeveelheid toegevoegde loog uitgezet tegen de P_H van de oplossing.

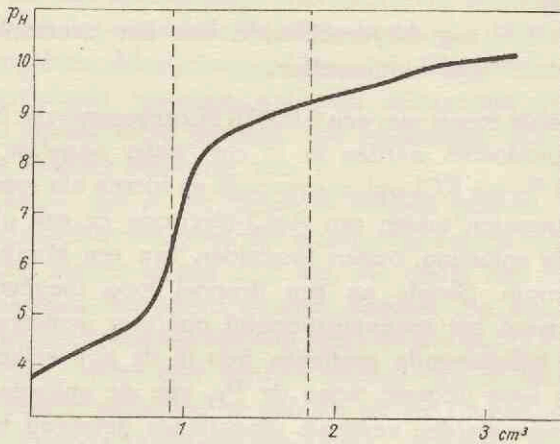
Bovendien werden verticale stippellijnen getekend bij 1 en bij 2 aequivalenten toegevoegde loog.

a. *Titratie van ornithine-dihydrochloride.*



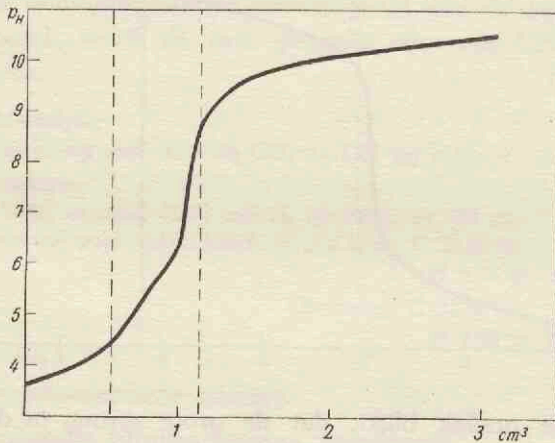
Uit de grafiek blijkt, dat de grote sprong in de curve optreedt, wanneer 1 aequivalent loog is toegevoegd.

b. *Titratie van het dihydrochloride van het C₉-diaminozuur.*



Uit de grafiek blijkt, dat de grote sprong in de curve optreedt, wanneer 1 equivalent loog is toegevoegd.

c. *Titratie van het dihydrochloride van het zuursplitsingsproduct van biotinesulfonyl.*



Uit de grafiek blijkt, dat de grote sprong in de curve optreedt, wanneer 2 equivalenten loog zijn toegevoegd.

SAMENVATTING.

- I. Een literatuuroverzicht van het bios-vraagstuk werd gegeven, waarin vooral de nieuwste publicaties werden gerefereerd.
 - II. Enkele reacties met biotinmethylester werden beschreven.
 - A. Biotinmethylester nam bij oxydatie twee zuurstofatomen op en ging over in „biotinesulfon”. Hiermee werd bewezen, dat de zwavel in sulfidevorm aanwezig was.
 - B. Door verhitting met joodwaterstof werden de C-S-bindingen niet aangetast. Een C₉-diamino-carbonzuur, waarin de zwavel nog aanwezig was, werd als pikrolonaat geïsoleerd.
 - C. Door inwerking van sterke loog op biotinesulfon werden zowel de stikstof, als de zwavel uit het molecule verwijderd.
 - D. Een afbraak volgens de methode van A. W. Hofmann leidde tot het isoleren van een zuiver aaraat, dat ook geanalyseerd werd. Zowel de zwavel, als de stikstof waren nog in het molecule aanwezig, maar de carboxyl-groep was verdwenen.
 - E. Door biotinesulfon met zoutzuur te verhitten, ontstond een diamino-sulfonzuur-carbonzuur met hetzelfde aantal C-atomen. Hierdoor werd de aanwezigheid van het zwavelatoom in een ring aangetoond.
-

SUMMARY.

1. A survey of the literature on the bios-problem is given, in which especial reference is made to the most recent publications.
 2. A few reactions with biotinmethylester are described.
 - A. On oxidation biotinmethylester took up two atoms of oxygen and was converted into „biotin sulphon”. From this it was established that the sulphur was present in the form of sulphide.
 - B. On heating with hydroiodic acid the C-S-bonds were not attacked. A C₉-diamino carboxylic acid, in which the sulphur was still present, was isolated as a picrolonate.
 - C. On treating biotin sulphon with a strong solution of KOH, the nitrogen as well as the sulphur were split off from the molecule.
 - D. A degradation according to the method of A. W. Hofmann led to the isolation of a pure aurate, which has also been analysed. Both the sulphur and the nitrogen were still present in the molecule, but the carboxyl group had disappeared.
 - E. On heating biotin sulphon with hydrochloric acid a diamino-sulphonic acid-carboxylic acid with the same number of C-atoms was formed. From this it was shown that the place of the sulphur atom is in a ring.
-

STELLINGEN.

I.

Het is wenselijk, dat de synthese van vitamine A volgens R. Kuhn herhaald wordt, echter uitgaande van zuiver β -jonylideen-acetaldehyde.

P. Karrer en A. Rügger. *Helv.* **23**, 284 (1940).

R. Kuhn en C. J. O. R. Morris. *Ber.* **70**, 853 (1937).

II.

De door Fieser voorgestelde structuurformule voor vitamine K₂ is onwaarschijnlijk.

P. Karrer en A. Epprecht. *Helv.* **23**, 272 (1940).

L. F. Fieser en medew. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2206 (1939).

III.

Het is zeer goed mogelijk, dat biotine en vitamine H identiek zullen blijken te zijn.

P. György, D. B. Melville, D. Burk en V. du Vigneaud. *Science* **91**, 243 (1940).

IV.

Voordat men een physiologisch actieve verbinding in zuivere toestand heeft geïsoleerd, kunnen reeds talrijke aanwijzingen over de structuur verkregen worden.

V.

Germer heeft niet aangetoond, dat de door hem onderzochte dunne metaallagen amorf zijn.

L. H. Germer. *Physic. Rev.* **56**, 58 (1939).

Vgl. J. A. Prins. *Nature.* **131**, 760 (1933).

VI.

De door Ham en Dean waargenomen stijging van de electro-kinetische ladingsdichtheid bij toevoeging van neutrale electrolyten, kan een physische betekenis hebben.

A. J. Ham en E. D. M. Dean. Trans. Farad. Soc. 36, 52 (1940).

VII.

De proeven van Ruysen bewijzen niet, dat bariumionen door een KCl-oplossing van een bariumsulfaatoppervlak verdronen worden.

R. G. Ruysen. J. of Physic. Chem. 44, 265 (1940).

19