

CHEMISCH WEEKBLAD

ORGAAN VAN DE NEDERLANDSCHE CHEMISCHE VEREENIGING EN VAN DE VEREENIGING VAN DE NEDERLANDSCHE CHEMISCHE INDUSTRIE

Hoofdredacteur: Dr. W. P. JORISSEN, Leiden, Zoeterwoudsche Singel 18
(part. adres gedurende Juli en Augustus: Zandvoort, telefoon 2817; postrekening 3569).

Redactie-Commissie: Dr. A. Bloemen (secretaris), Dr. C. A. Lobry de Bruyn, Dr. G. C. A. van Dorp,
Dr. C. Groeneveld en Dr. Ir. J. A. M. van Liempt.

N.V. D. B. CENTEN's Uitgevers-Maatschappij, Amsterdam-C., O.Z. Voorburgwal 115, telefoon 48695,
postrekening 39514.

INHOUD: Mededeelingen van het Secretariaat der Nederlandsche Chemische Vereeniging. — Aanbesteden betrekkingen. — Gevraagde betrekkingen. — Redactie-bureau. — Lezingen, gehouden in de Conferentie over voedingsmiddelscheikunde op 22 April 1938 in het Histologisch Instituut der Universiteit van Amsterdam: Prof. Dr. B. C. P. Jansen, Chemische methoden voor de bepaling der vitamines en hare praktische beteekenis (Openingstoespraak). — Prof. L. K. Wolff † (Utrecht), Methoden ter bepaling van vitamine A resp. carotine in voedingsmiddelen. — Prof. Dr. B. C. P. Jansen, Quantitatieve bepalingen van aneurine (vitamine B₁) — Ir. A. Emmerie, De chemische bepaling van lactoflavine (vitamine B₂) — Dr. M. van Eekelen, Het ascorbinezuur (vitamine C) en zijn chemische bepaling in voedingsmiddelen — Dr. E. H. Reerink, Bepaling van vitamine D. — Dr. L. W. van Esveld, De wettelijke controle van gevitamineerde voedingsmiddelen, vitaminehoudende pharmaceutische producten en levertraan in het buitenland en de wenschen hieromtrent in Nederland. — Boekaankondigingen. — Personalialia, enz. — Ter bespreking ontvangen boeken. — Correspondentie, enz. — Vraag en aanbod. — Economische berichten.

MEDEDEELINGEN VAN HET SECRETARIAAT DER
NEDERLANDSCHE CHEMISCHE VEREENIGING
(Willem Witsenplein 6, 's-Gravenhage, telefoon 774520,
postrekening 7680).

Nieuwe leden.

De in het Chemisch Weekblad van 28 Mei 1938 onder 141 t/m 143 genoemde candidaat-leden zijn thans aangenomen als gewone of buitengewone leden.

Veranderingen aan te brengen in de ledenlijst (incl. Supplement) 1937.

- Blz. 30: Bos (Ir. J. L. M. van der Horn van den), den Haag, Weissenbruchstraat 68.
.. 31: Breemen (drs. A. G. van), Helmond, Aarle-Rixtelsche-
weg 33.
.. 32: Bruins (Ir. A. W.), Schiedam, Rubenslaan 13.
.. 35: Cornelissen (Ir. A. M.), Assen, Groningerstraat 80.
.. 42: Geldof (drs. H.), Huizen (N.-H.).
.. 56: Klaver (Dr. G.), Overveen, Rio Grandelaan 29.
.. 59: Labryère (Dr. W.), den Haag, Valkenboschlaan 86.
.. 72: Polvliet (drs. A. C.), Bussum, Prinses Marielaan 3.
.. 74: Renier (drs. J.), Utrecht, Stadhouderslaan 8.
.. .. Riet (J. van), Helmond, Markt 56, apotheker.
.. 75: Roelfzema (drs. H.), Groningen, Verl. Grachtstraat 28.
.. 79: Schuyl (J. N.), chem. cand., Harderwijk, Wolluwevers-
straat 5 boven.
.. 90: Vries (Dr. C. L. de), Groningen, Jan Lutmastraat 4.
.. 91: Wael (Dr. J. de), Utrecht, A. Begerkade 1.
.. 92: Werker (W.), chem. cand., Wassenaar, Storm v.
's-Gravesandweg 84.
.. 96: Zuidweg (Ir. J.), Wageningen, Diedenweg 31, leeraar H.B.S.

Adresveranderingen, enz. van (candidaat-)leden, wier namen
nog niet in ledenlijst of supplement zijn opgenomen.

Blz. 72: Pons (Dr. L.), Batavia-C., Java (N. O.-I.), Tjimahiweg 1.

Het Secretariaat is gedurende de maand Augustus gesloten.

Men gelieve gedurende dezen tijd alleen *zeer dringende* correspondentie aan het gewone adres te richten, die dan — zij het met vertraging — zal worden beantwoord. Tegen storting of overschrijving op postrekening 7680 der Ned. Chem. Vereeniging te 's-Gravenhage van nog niet betaalde contributies gedurende de maand Augustus bestaat geen enkel bezwaar.

Dr. T. VAN DER LINDEN.

Aangeboden betrekkingen, werk, subsidies, enz.**

Aan een universitair biochemisch laboratorium zal binnenkort een assistentsplaats vacant komen. Gegadigden (m. of vr.) met een chemische opleiding aan Universiteit of Hoogeschool, gelieven zich *schriftelijk* aan te melden bij de Chemische Arbeidsbeurs.

* * *

Burgemeester en wethouders der gemeente Zeist roepen sollicitanten op naar de betrekking van directeur van het gasbedrijf. Bezoldiging f 5300.— tot f 5800.— met 5 één-jaarlijksche verhoogen van f 100.— en een toelage op het salaris van f 1200.—. Vrij vuur en licht tot door B. en W. bep. max. Dienstjaren in soortgelijke betrekking kunnen worden medegeteld. Aftrek voor pensioen 10% van f 3000.— en 4½% daarboven. Sollicitatiestukken met uitvoerige inlichtingen in te zenden aan B. en W. van Zeist vóór 15 Augustus 1938. Persoonlijke aanmelding uitsluitend na oproeping.

* * *

Industrieële onderneming vraagt voor haar researchafdeeling een voortvarenden jongen scheikundige voor organisch- en fysisch-chemisch onderzoek. Zie verder de adv. in No. 29.

Gevraagde betrekkingen ¹⁾.

No. 530. Dr. in de scheikunde, 30 jaar, 3 jaar kolloidchemische en biochemische research-ervaring, 4½ jaar assistent-bedrijfs-leider waschmiddelenfabriek, zoekt werkkring tegen 1 Sept. a.s., bij voorkeur biochemisch researchwerk.

No. 533. Scheik. ing., diploma Delft 1933, oud 31 jaar, physico-chemicus met research-ervaring, werkzaam zoowel op laboratorium als in fabriek, met kennis van colloidchemie, petr. ind., chem. bedrijf, verfindustrie, corrosie van ijzer, kunstzijde, zoekt werkkring.

Het redactie-bureau blijft gedurende de maand Augustus geopend.

Van 13 tot 31 Augustus is het adres *uitsluitend*: Zandvoort, Mauritsstraat 4, telef. 2817.

***) Men raadplege ook steeds de advertenties.

¹⁾ Plaatsing gratis voor leden.

Brieven te richten tot de Chem. Arbeidsbeurs, 's-Gravenhage, Willem Witsenplein 6 (met *ingesloten porto voor doorzending*). Men wordt verzocht dadelijk bericht te zenden, indien de plaatsing niet meer noodig is.

NEDERLANDSCHE CHEMISCHE
VEREENIGING.

NEDERLANDSCHE MAATSCHAPPIJ TER
BEVORDERING DER PHARMACIE.

LEZINGEN GEHOUDEN IN DE CONFERENTIE OVER VOEDINGSMIDDELSCHEIKUNDE,
OP 22 APRIL 1938 IN HET HISTOLOGISCH INSTITUUT
DER UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM.

Voorzitter: Prof. Dr. B. C. P. Jansen.

Algemeen onderwerp:

Chemische methoden voor de bepaling van vitamines en hare praktische beteekenis.

Sprekers: Prof. L. K. Wolff (†):	Vitamine A.
Prof. Dr. B. C. P. Jansen:	Vitamine B ₁ .
Ir. A. Emmerie:	Vitamine B ₂ .
Dr. M. van Eekelen:	Vitamine C.
Dr. E. H. Reerink:	Vitamine D.
Dr. L. W. van Esveld:	Wettelijke contrôle.

Bij het afdrucken van dit verslag ontvingen wij de ontstellende tijding van het overlijden van Prof. WOLFF. Welk een groot verlies de wetenschap van de voeding daardoor geleden heeft, is ook aan de lezers van dit tijdschrift bekend. Ook dit symposium legt wel een heel fraai getuigenis af van het werk van hem en zijn school.

Zijn aandenken zal bij alle onderzoekers op het gebied der vitamines in hooge eere blijven.

B. C. P. Jansen.

Prof. Dr. B. C. P. Jansen (Amsterdam), de voorzitter der Conferentie, opende deze met een toespraak over „*Chemische methoden voor de bepaling der vitamines en hare praktische beteekenis*”.

Onze kennis van de vitamines en hun werking is in de laatste jaren wel zeer snel toegenomen. Niet het minst belangrijk is de vooruitgang op chemisch gebied. Vele vitamines zijn in zuiveren toestand geïsoleerd en ettelijke worden reeds synthetisch fabriekmatig bereid. Tevens zijn er chemische methoden gevonden voor de quantitative bepaling van vele van deze stoffen. Dit is voor de bestudeering van de werking der vitamines van groot belang. Want in den beginne waren we voor quantitative bepaling uitsluitend aangewezen op de dierproef en daardoor duurde zo'n bepaling zeer lang, vaak verscheidene weken; ook waren de resultaten, door de groote individuele verschillen van de proefdieren, weinig nauwkeurig: een fout van 50 à 100 % kan niet vermeden worden, tenzij men een zeer groot aantal proefdieren gebruikt, wat op praktische bezwaren stuit. Tenslotte was voor elke dierproef een groote hoeveelheid van het op vitamine te onderzoeken praeparaat of voedingsmiddel noodig. Door dit alles was het vrijwel uitgesloten de vitamines te bepalen in de kleine hoeveelheden bloed, urine, enz., die ons bij stofwisselingsproeven ten dienste staan.

Een chemische bepaling daarentegen is als regel zeer snel uit te voeren: ze eischt gewoonlijk evenveel

uren, als de dierproef weken. Verder is de nauwkeurigheid veel grooter, het gehalte is meestal tot op enkele procenten na nauwkeurig te bepalen. En tenslotte vereischt ze maar zeer weinig materiaal. Door het invoeren van de chemische bepaling zijn er dus geheel nieuwe mogelijkheden ontstaan voor de bestudeering van de werking en de stofwisseling der vitamines. In enkele gevallen zijn hiermee reeds belangrijke resultaten bereikt, waarover ook in dit symposium nader bericht zal worden.

Ook is het daardoor meestal langs eenvoudigen weg mogelijk om na te gaan, of de opgave van fabrikanten van vitaminerijke praeparaten omtrent het gehalte van de op de markt gebrachte producten juist is. Toch moeten we, vooral ook op dit gebied voorzichtig zijn, en zal in vele gevallen contrôle met behulp van de dierproef noodig zijn, omdat de meeste chemische bepalingsmethoden niet geheel specifiek zijn. Maar ook in dit geval kan de chemische methode vaak aanwijzingen geven, waardoor de dierproef vergemakkelijkt wordt.

Prof. L. K. Wolff (†) (Utrecht) sprak over „*Methoden ter bepaling van vitamine A resp. carotine in voedingsmiddelen*”.

Voor ik U uiteen zet — zoo ving hij aan — op welke manier wij gewoon zijn vitamine A resp. carotine in voedings- en geneesmiddelen te bepalen, mogen enkele opmerkingen over de bepalingen van vitaminen in het algemeen voorafgaan.

Voor de mens is niet belangrijk hoeveel van een bepaalde stof (vitamine) in een preparaat aanwezig is, maar wel hoeveel hij van deze stof kan resorberen, wanneer hij het preparaat inneemt. Als een vitamine bv. niet geresorbeerd wordt, is het in die vorm voor de mens nutteloos, al zou de chemische bepaling uitmaken, dat het volop aanwezig is. M.a.w. gezegd: alleen bepaalde physiologische werkingen zijn van belang.

Men heeft daarom aan de biologische waardebepaling (rat, cavia) in het begin de voorkeur gegeven boven de chemische of fysische en wel daarom, omdat in de biologische bepaling natuurlijk de factor resorptie mede aanwezig is. Toch kunnen ook biologische bepalingen nog een verkeerd beeld geven, omdat het darmkanaal van rat of cavia zeer belangrijk kan verschillen van dat van de mens en dus de waarden niet klakkeloos kunnen worden overgenomen. Aan de andere kant hebben chemische bepalingen het enorme voordeel, dat ze sneller, nauwkeuriger en ook belangrijk goedkoper zijn dan biologische bepalingen. Ze zijn natuurlijk pas mogelijk, indien de chemische samenstelling van de vitaminen bekend is. Biologische bepalingen hebben bovendien nog een nadeel: de hoeveelheid van een vitamine, die voor een normaal leven nodig is, hangt van allerlei omstandigheden af. Dit nadeel is echter geheel te omzeilen door steeds vergelijkende proeven te doen met standaardpreparaten. Zonder standaardpreparaat zijn de biologische ijkingen waardeloos. Verder is gewenst, dat men zijn diermateriaal zo eenvormig mogelijk kiest (zuivere lijnen van dieren) en steeds opgeeft, hoe groot de strooiing is geweest. Bij de toebereiding der spijzen worden noch carotine, noch vitamine A in belangrijke mate veranderd, dit in tegenstelling met vitamine C. Wel kan koken de resorbeerbaarheid verhogen.

Bepaling van vitamine A. De diermethode is vrij onnauwkeurig, het is heel moeilijk zekere gegevens te verkrijgen. Bovendien is ze langdurig (10—12 weken). Ze zal hier verder niet behandeld worden. Alleen diene, dat als standaardpreparaat β -carotine in olie is genomen; 1 I.E. = 0.6γ β -carotine.

Voor de chemische en fysische bepaling staan ons 2 methoden ten dienste, de selectieve lichtabsorptie bij 328 $m\mu$ en de reactie van Carr en Price met antimoontrichloride.

Selectieve absorptie. Apparaten: Behalve de in de physica bekende apparaten voor het meten der absorptie in het ultraviolet, staat ons de vitameter van Hilger ter beschikking. Deze is voor visueel gebruik geschikt gemaakt, doordat het ultraviolet licht afkomstig van een koperboog in fluorescentie-licht wordt omgezet. Door middel van Wood's glas worden eerst de zichtbare lijnen uit het spectrum verwijderd. Men kan na enig oefenen vrij nauwkeurige waarnemingen doen. Nodig is, dat men de preparaten verzeepst en de reactie uitvoert met het onverzeepbare.

Enige recepten voor verzeeping volgen hier:

- a. *Verzeeping van traan of vet.* 2 cm^3 traan + 1 cm^3 10 n (60%) KOH in water + 5 cm^3 aethanol in een reageerbuis (10 min. bij $\pm 80^\circ C$). Quantitatief overbrengen in scheidtrechter van 200 cm^3 met 39 cm^3 water en 15 cm^3 aethanol. Twee keer wordt uitgeschud met 50 cm^3 peroxydrijve

aether. De aetherlaag wordt gewassen met 30 cm^3 water, daarna met 30 cm^3 3% KOH, daarna drie keer met 50 cm^3 water. De aetherlaag wordt nu gedroogd met watervrij Na_2SO_4 , hiervan afgefiltreerd (afwassen van de Na_2SO_4 met aether!) en nu in vacuo onder doorleiden van CO_2 afgedampt; het residu wordt opgenomen in $CHCl_3$ en is nu gereed (c.q. na verdunning) tot bepalen. Deze oplossing is *niet houdbaar*. Voor de reactie van Carr en Price verdunt men zover, dat men ± 32 I.E. per cm^3 heeft; voor de selectieve absorptie bij 328 $m\mu$ moet men tot ongeveer 10—12 I.E. per cm^3 verdunnen.

- b. *Organen b.v. lever.* Fijnmalen, dan 5 g + 10 cm^3 5% KOH-oplossing in kolfje in kokend waterbad gedurende $\frac{1}{2}$ uur. Daarna wordt 5 cm^3 aethanol toegevoegd en nu twee keer uitgeschud met 50 cm^3 peroxydrijve aether. Aetherlaag wordt 2 keer gewassen met 20 cm^3 water, daarna met 20 cm^3 3% KOH, daarna twee keer met 50 cm^3 water. Verder als bij traan.
- c. *Serum.* Men mengt 10 cm^3 serum + 1 cm^3 60% KOH-oplossing, houdt dit $\frac{1}{2}$ uur in kokend waterbad; daarna voegt men 5 cm^3 alcohol toe, en schudt twee keer uit met 50 en 25 cm^3 aether. Verder (zie 1).

Recept voor het maken van peroxydrijve aether. Handelsaether wordt krachtig geschud met een suspensie van vers bereid ferrohydroxyde (10 volumina aether en 1 vol. suspensie). Deze suspensie bereidt men door mengen van gelijke delen 10% $FeSO_4 \cdot 7 aq.$ en 5% KOH. Het $Fe(OH)_2$ laat men bezinken en onderzoekt de aether met een oplossing van ferro-ammoniumsulfaat en KCNS. De aether mag geen kleur aannemen, anders moet de behandeling herhaald worden. De aether wordt enige keren met water gewassen en is dan gereed voor het gebruik.

Verder is nodig, dat stoffen die ook een absorptie bij 328 $m\mu$ hebben, zoveel mogelijk worden verwijderd. Het is een gelukkige omstandigheid, dat de selectieve absorptie van het vitamine A een bijzonder hoge is; officieel is de extinctie bij 328 $m\mu$ 1600 voor een 1% oplossing in een cuvet van 1 cm. Verder heeft men aangenomen, dat $E_{1\text{ cm}}^{10\%} 328 = 1$ overeenkomt met 1600 I.E. 1 I.E. = 0.4γ (0.39γ). In het algemeen kloppen de resultaten met de dierproef vrij goed, maar toch worden wel af en toe, vooral bij sommige levertranen van bijzondere vissoorten, afwijkingen gevonden.

Engelse auteurs hebben gevonden, dat deze moeten verklaard worden door de aanwezigheid van een als vitamine A werkende stof, die echter een wat andere samenstelling heeft en ook een ander absorptie-maximum. Deze stof is A_2 genoemd, zie hierover later. In de gewone levertraan en ook in de heilbotolie schijnt dit afwijkende vitamine bijna niet voor te komen. Over de factor 1600 is nogal enige strijd geweest, daar in verschillende laboratoria deels met hetzelfde preparaat, maar vooral met andere preparaten bij vergelijking van de absorptie met de werking op ratten, getallen zijn gevonden, wisselend tussen 1000 en 2400. (Wij hebben één preparaat onderzocht, waar wij zelfs de factor 3000 vonden, maar dit is zeker een afwijkend preparaat). De Engelse onderzoekers, die de meeste van deze vergelijkingen hebben gedaan, zijn er tenslotte toe-

1) M. van Eekelen, A. Emmerie en L. K. Wolff, Z. Vitaminf. 6, 150 (1937).

gekomen, om de factor 1600 te behouden, omdat dit ongeveer het gemiddelde der bepalingen was. Om een voorbeeld te geven: wij vonden in de standaardlevertraan die door Amerika wordt uitgegeven, en bijzonder nauwkeurig op ratten is geijkt, een zeer goede overeenstemming, n.l. 2720 I.E. volgens de fysische methode en 3000 I.E. volgens de dierproef.

Men zou kunnen menen, dat de zaak van de absorptie-coëfficiënt gemakkelijk kon worden beslist, nu men er in geslaagd is in Amerika het zuivere vitamine A in kristallen te bereiden. Echter blijkt dit onmiddellijk na de oplossing in hexaan een hogere absorptie-coëfficiënt te hebben dan 1600, die echter binnen zeer korten tijd dit laatste getal benadert.

Bijzondere moeilijkheden biedt de methode, wanneer wij maar zeer weinig van het preparaat ter beschikking hebben en de concentratie van het vitamine hierin zeer laag is. Zo iets komt b.v. voor bij het onderzoek van boter, eidooier en bloedserum. Voor het laatste is door *Chevallier* een methode gegeven, die er op berust het serumextract met ultra-violet licht te bestralen; door meting van het verschil in absorptie bij 328 $m\mu$ vóór en na bestraling en vermenigvuldigen van dit getal met drie zou men de waarde voor het vitamine krijgen. Men moet zolang bestralen tot de absorptie bij 290 $m\mu$ en 375 $m\mu$ gaat veranderen. Juist daarvoor moet men ophouden. De bestraling geschiedt met een gewone kwartskwiklamp met een speciaal filter van *Wood's* glas (*Corning* violet-ultra). Wij hebben met deze methode goede resultaten gekregen bij enige vrij zuivere vitamine A-preparaten (een miljoen eenheden per gram) en bij het bepalen van het gehalte aan vitamine A in bloedserum van konijnen. Dit bevat geen carotinoiden. Zodra wij echter mensenserum gingen gebruiken, klopten de bepalingen niet meer met de straks te noemen bepaling met antimoontrichloride. *Chevallier* heeft zelf onlangs aangegeven, dat zijn methode ongeschikt is als er carotine aanwezig is. Hij beveelt nu aan, het extract te bestralen met een waterstoflamp met continu spectrum, totdat de u.v. absorptie niet meer verandert; het verschil tussen absorptie vóór en na de bestraling zou dan het gehalte aan vitamine A aangeven. Wij hebben met deze methode bij betrekkelijk zuivere vitamine A-preparaten geen goede resultaten gekregen. Wij staan hierover met den auteur in briefwisseling. Voor de laatstgenoemde gevallen maken wij totnogtoe uitsluitend gebruik van de straks te noemen methode van *Carr* en *Price*, die voor dergelijke kleine hoeveelheden totnutoe de enig bruikbare is. De methode van *Carr* en *Price* is echter alleen dan zonder meer toe te passen, wanneer er geen carotinoiden aanwezig zijn, die ook met het reagens een blauwe kleur geven. Hoe men bij de aanwezigheid van carotinoiden moet handelen, zal zo dadelijk beschreven worden. Ik wil tenslotte nog opmerken, dat in het officieele besluit van de Volkenbondcommissie eerst genoemd wordt de dierproef en in de tweede plaats de selectieve absorptie bij 328 $m\mu$, de reactie van *Carr* en *Price* is totnogtoe echter niet officieel.

Reactie van Carr en Price. Het reagens is een verzadigde oplossing van zuiver antimoontrichloride in chloroform. De gewone zuivere handelschloroform is hiervoor bruikbaar. De oplossing van het vitamine

moet in het algemeen in chloroform zijn. Zeer kleine hoeveelheden petroleumaether schaden echter niet. Wel schaden alcohol of aether. Met vitamine A ontstaat een blauwe kleur, die terstond moet worden gemeten. Bij oplossingen van zuiver vitamine A ligt de band bij 620 $m\mu$. In onverzeepte levertraan echter bij 610 $m\mu$, bij xanthophyl echter ook bij 620 $m\mu$ (carotine geeft een band bij 590 $m\mu$). Daarnaast komt nog een band voor bij 570—580 $m\mu$, die echter volgens onderzoekingen in ons laboratorium vermoedelijk afkomstig is van een oxydatie-product van het vitamine A, dat geen vitamine A-werkzaamheid heeft. De reactie wordt meestal gemeten in de Lovibond-colorimeter, die hiervoor uiterst geschikt is, omdat hij een snelle meting ook bij mengkleuren mogelijk maakt, terwijl dan toch alleen de hoeveelheid blauwe kleur kan worden afgelezen. De Lovibond-tintometer is in zekere zin ook speciaal voorgeschreven voor deze reactie. De reactie wordt uitgevoerd in cuvetten (of buisjes) van 1 cm diameter en wel door 0.2 cm^3 oplossing van de te onderzoeken stof in $CHCl_3$ samen te brengen met 2 cm^3 van het $SbCl_3$ -reagens. Men kan de reactie zeker ook uitvoeren in een gewone colorimeter, bv. de stufenphotometer van *Pulfrich*, terwijl men dan het filter S 61 moet gebruiken. Echter is deze methode minder geschikt dan die met de Lovibond, omdat het moeilijk is de bepaling zeer snel te verrichten. De kleur, die men verkrijgt met vitamine A is n.l. onbestendig. Ook de spectrografische methode is wel geprobeerd, maar hiervoor is een veel gecompliceerder apparaat nodig, dat slechts weinige laboratoria bezitten. $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ met $SbCl_3$ bij 620 $m\mu$ is 5000. 1 Lovibond E = 6.4 I.E.

Is het reactiemengsel een weinig troebel, dan kan men het dikwijls voor de meting geschikt (helder) maken door een druppel azijnzuuranhydride toe te voegen (*Bertram*). In het algemeen is de overeenkomst tussen de reactie van *Carr* and *Price* en de spectrofotografische bepaling van de absorptie bij 328 $m\mu$ een zeer goede, gelijk o.a. *Josephy* in ons laboratorium voor een aantal levertraan- en vitamine A-oplossingen heeft bewezen en ik U hier aan een vrij groot aantal bepalingen uit de laatste tijd kan laten zien.

Nodig is ook hier weer, dat de vetten, die het vitamine A bevatten, worden verzeept. In levertraan komt een onverzadigd zuur voor, door *Emmerie* ontdekt, dat in zeer geringe hoeveelheden in staat is de blauwe kleur van de reactie te onderdrukken. Bepalingen in levertraan als zodanig zijn geheel zonder waarde. Bij heilbot-oliën, die meestal zoveel meer vitamine A bevatten, is het verschil onverzeept-verzeept meestal niet zo groot, maar toch worden ook met deze preparaten slechts na verzeeping betrouwbare resultaten verkregen. Het verschil tussen absorptie bij 328 $m\mu$ en de reactie van *Carr* en *Price* scheelt niet veel meer dan 10 %. We hebben hier dus niet zulke grote variaties als met de dierproef. Bevat de oplossing van het vitamine A carotinoiden, dan moet men in aanmerking nemen, gelijk boven al is vermeld, dat deze ook een blauwe kleur geven met antimoontrichloride. Deze is echter per gewichtshoeveelheid wel 20 keer zwakker dan met vitamine A, terwijl de kleuren additief zijn, de blauwe kleuren van de meest voorkomende carotinoiden verschillen weinig van elkaar. Indien men eenmaal voor

één carotinoïd de curve van de reactie van Carr en Price heeft bepaald, kan men uit de bepaling der geelkleuring (iedere colorimeter is hiervoor bruikbaar; wij gebruiken hiervoor zowel de Lovibond als de Stufenphotometer) de blauwe kleur aflezen, die het carotinoïd met de reactie van Carr en Price kan geven. Wij gebruiken deze methode, indien wij naast elkaar carotinoïden en vitamine A aanwezig hebben. Dan bepalen wij eerst de geelkleuring (het vitamine A is kleurloos), berekenen hieruit de blauwkleuring, deze waarde wordt dan afgetrokken van de waarden, die het mengsel met het reagens van Carr en Price geeft; we houden dan over de waarde voor vitamine A. Totnutoe is dit de enige methode, die bruikbaar is voor het bepalen van kleine hoeveelheden vitamine A in bloedserum, eidooier en boter, welke alle drie in het algemeen naast vitamine A carotinoïden bevatten.

Tot nu toe hebben wij vit. A slechts gevonden bij gewervelde dieren; noch bij planten noch bij ongewervelde dieren konden wij vit. A aantonen. In den laatsten tijd is een enkele mededeling verschenen, waarin wordt beweerd, dat vit. A₂ wel bij ongewervelde dieren zou voorkomen. Deze kwestie, die zeer belangrijk is, moet nog nader onderzocht worden, vóór een zeker oordeel kan worden geveld.

Over het vitamine A₂, dat in hoofdzaak bij zoetwatervissen is gevonden, zal ik slechts kort zijn. Het geeft met de reactie van Carr en Price een absorptieband bij 693 m μ en een tweede onduidelijke bij 645—650 m μ . Deze laatste band strekt zich uit tot 620 m μ en kan daardoor de bepaling van A₁ een weinig storen. Door de verhouding tussen de absorptie bij 620 en 693 m μ te bepalen bij het blauwe product van de reactie van Carr en Price kan men een indruk krijgen over de verhouding tussen A₁ en A₂, die in het preparaat aanwezig is. Bij aanwezigheid van Vit. A₂ zonder A₁ is de kleur niet blauw, maar groenachtig. De levertraan van de zander, de baars en de meerval zouden 2—2½ keer meer vitamine A₂ dan A₁ bevatten, daarentegen hebben de forellen, de steur en de zalm meer vitamine A₁ dan A₂. Zeevissen als de wijting en de rog hebben maar 1/3 vitamine A₂ en 2/3 vitamine A₁. Ook bij andere dieren is maar weinig A₂ gevonden. De absorptie in het ultraviolet van A₂ heeft een maximum bij 346 m μ en 265 m μ .

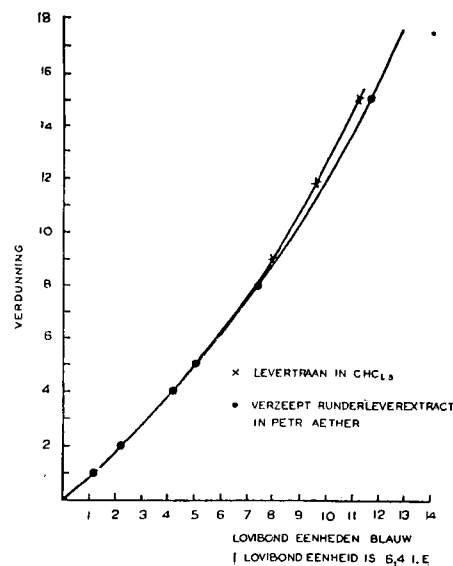
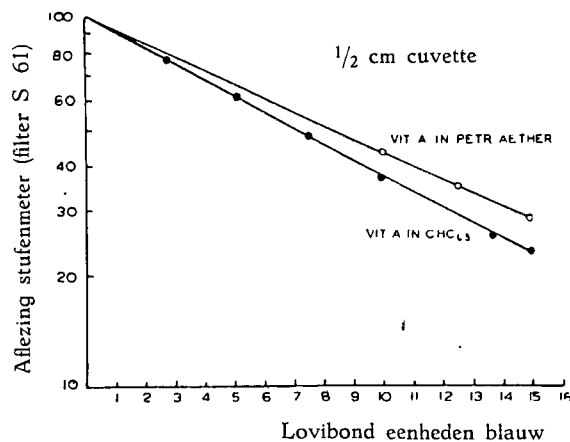
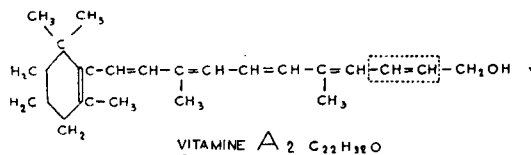
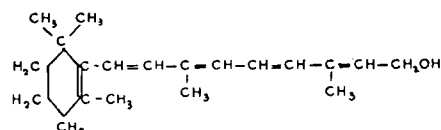
Het zuiverste preparaat heeft een E_{1 cm}^{1%} bij 346 m μ van 450 en bij 284 m μ van 265. De waarden van het reactieproduct met SbCl₃ waren voor E_{1 cm}^{1%} bij 697 m μ 1270, bij 620 m μ 550, voor zuiver Vit A₁ is dit bij 620 m μ 5000.

Gillam, Heilbron, Jones en Lederer hebben uitgemaakt, dat A₂ de formule heeft van C₂₂H₃₂O in plaats van C₂₀H₃₀O voor A₁. Het vitamine A₂ heeft dezelfde werking bij ratten als A₁. Het A₂ is waarschijnlijk dezelfde stof die twee jaar geleden door Wald is beschreven en welke voorkomt in de retina van zoetwatervissen.

Een quantitative bepaling van A₂ door meting van de absorptie van het reactieproduct met het reagens van Carr and Price bij 693 m μ stuit op bezwaren, omdat ook carotinoïden met het reagens bij 693 m μ absorptie geven (persoonlijke mededeling van Dr. Lederer). Men moet deze dus eerst scheiden van A₂. Wij zijn op dit oogenblik met proeven hierover bezig.

Literatuur van A₂:

1. Heilbron, Gillam en Morton, Biochem. J. 25, 1352 (1931).
2. Wald, Nature 139, 1017 (1937).
3. Lederer en Rosanova, Biochimia 2, 293 (1937).
4. Lederer, Rosanova, Gillam en Heilbron, Nature 140, 233 (1937).
5. Edisbury, Morton en Simpkins, Nature 140, 234 (1937).
6. Edisbury, Morton, Simpkins en Lovern, Biochem. J. 32, 118 (1938).
7. Gillam, Heilbron, Jones en Lederer, Biochem. J. 32, 405 (1938).
8. Lederer en Rathmann, Compt. rend. 206, 781 (1938).



Carotine.

Onder de carotinoiden, die in de natuur voorkomen, zijn alleen α carotine, β carotine, γ carotine en kryptoxanthine gebleken als provitamine A dienst te kunnen doen. Vandaar dat tot nog toe alleen de bepaling van deze carotinoiden hier zal worden besproken. Weet men niet wat de herkomst van een bepaalde oplossing is, dan zal men zich terdege moeten vergewissen, of men inderdaad met carotine (kryptoxanthine) te doen heeft. In de eerste plaats is het daarom van belang het preparaat te onderzoeken na verzeeping, omdat xantophyl en andere alcoholen in natuurproducten meestal als esters voorkomen en deze soms andere eigenschappen hebben dan de vrije carotinoiden. Voor het scheiden van carotine (kryptoxanthine) en de andere carotinoiden staan ons twee methoden ten dienste.

1e. In mengsels van petroleumaether en methanol 90 % of aethanol 85 % verdeelt het carotine (kryptoxanthine) zich ten gunste van de petroleumaether, terwijl de alcoholische carotinoiden in de alcohol overgaan. Lycopine blijft echter ook in de petroleumaether. In mengsels waar lycopine niet aanwezig is, is deze uitschuddingsmethode zeer bruikbaar. Voor onderzoek van plantaardig materiaal gaat men zo te werk, dat men het materiaal eerst bij lage temperatuur droogt, met petroleumaether extraheert, het extract met alcoholische loog verzeept en dit met aether of petroleumaether uitschudt. Heeft men aether gebruikt, dan moet men deze verdampen en het residu ook in petroleumaether oplossen. Heeft men petroleumaether gebruikt, dan kan men deze direct met aethanol of methanol uitschudden. In sommige gevallen is het niet nodig het materiaal te drogen, maar kan men dit direct met alcoholische loog samenbrengen (koken). Het is nodig het petroleumaetherextract, dat men op deze wijze heeft gekregen en dat natuurlijk met water gewassen en daarna gedroogd moet zijn, spectroscopisch na te zien, alvorens men het colorimetrisch kan bepalen. De oplossing moet dan duidelijk de banden van carotine vertonen. Scheiding tussen de verschillende carotines is op deze wijze niet mogelijk, hiérvóór komt alleen de tweede methode in aanmerking.

Chromatographische methode volgens Tswett. Hiertoe wordt de oplossing in petroleumaether gefiltreerd over een kolom van speciaal geprepareerd aluminiumoxyd (Brockmann). De carotinoiden verraden zich door alle in verschillende gekleurde banden in de aluminiumoxyd-kolom te verschijnen. Men kan nu het carotine elueren met een mengsel van petroleumaether en benzol (2:1). Daar het carotine in dit mengsel het eerst wordt geëluëerd, blijven de andere carotinoiden nog geadsorbeerd en krijgt men een zeer volledige scheiding zonder verlies van carotine. We hebben op deze wijze bv. hoeveelheden van 0.1 γ carotine met voldoende nauwkeurigheid kunnen bepalen. Dan kan men echter niet de gewone 1 cm-cuvetten van de stufenphotometer gebruiken, maar moet men de microcuvetten, die bij dit toestel behoren, gebruiken. De twee cm microcuvet heeft slechts een volume van 0.3 cm³. Voor dergelijke zeer kleine hoeveelheden is de bepaling in de stufenphotometer zelve te onnauwkeurig, en wij hebben hiérvóór met vrucht gebruik gemaakt van een zelf gebouwd toestel, waarbij wij het licht lieten vallen eerst door het kleur-

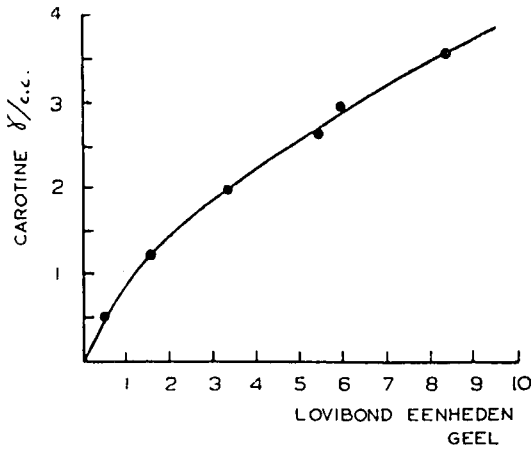
filter S 47 van de stufenphotometer, daarna door de cuvette en daarna op een kalium-photocel van Philips, die gekoppeld was aan een Lindeman-electrometer. Wij konden zorg dragen voor een snelle wisseling van de cuvet met carotine-oplossing en één met petroleumaether. Door de uitslag van de electrometer bij de controle-cuvet op 100 te stellen, kregen wij direct aflezing in percenten van de absorptie. Het kan van belang zijn om van de carotine-oplossing te weten, welke carotinen zij bevat en hoeveel van elk. Ook dit is alleen mogelijk door de chromatographische analyse. Heeft men de carotinoiden in petroleum-aether, dan kan men hen adsorbeeren aan fijngemalen gebluste kalk. Het eerst wordt kryptoxanthine geadsorbeerd, dan γ -carotine, daarna volgt een ring β -carotine en daarna een van α -carotine. Is er ook lycopine aanwezig, dan staat dat tussen kryptoxanthine en γ -carotine.

Ook kan men hen scheiden door op te lossen in benzol met benzine (kookpunt 70—80°) in de verhouding van 1:3 en te filtreren over een zuil van vezelig aluminiumoxyde (Fasertonerde). Zie verder het boekje van Zechmeister en Cholnoky: Die chromatographische Adsorptionsmethode, pg. 96 en volgende. De scheiding van α - en γ -carotine is niet belangrijk voor de praktijk, β -carotine zou echter een twee keer sterkere werkzaamheid als provitamine A hebben. Gelukkig echter is het grootste deel der in bloedserum, boter en eidooier voorkomende carotine het β -carotine. Bij sommige planten kan men echter wel een andere verhouding aantreffen. Bijna altijd echter overweegt het β -carotine. Wij hebben tot dusver bij onze analyses van plantaardig voedsel de scheiding niet uitgevoerd, omdat het werk niet opwoog tegen het nut dat de bepalingen zouden opleveren. Men moet bovendien er altijd mee rekenen, dat bij herhaalde adsorpties en eluties het carotine kan worden geoxydeerd of op andere wijze veranderd.

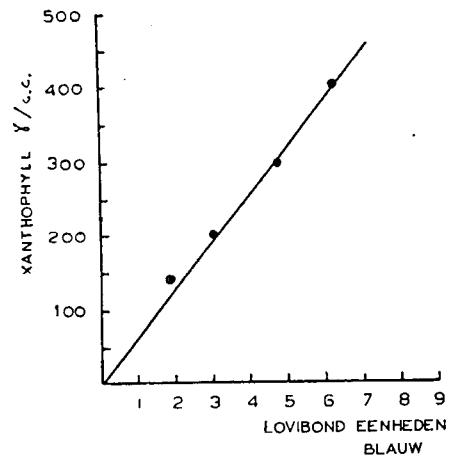
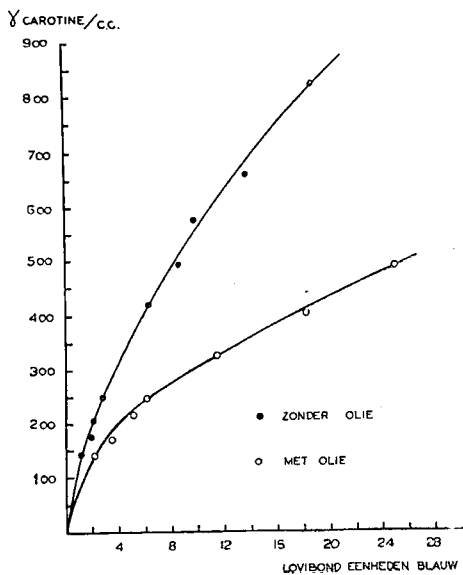
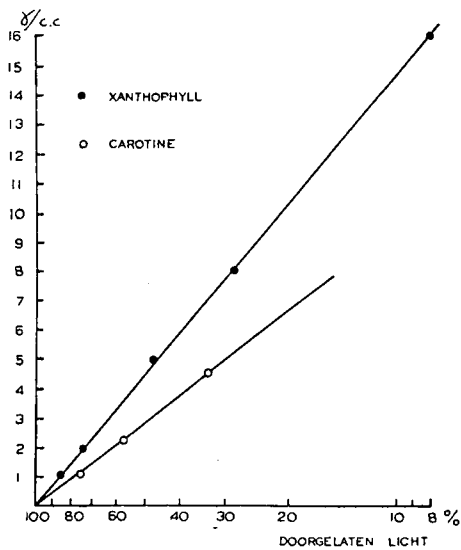
Waarde der carotinebepalingen in de praktijk. In het algemeen komen de carotinewaarden, die langs chemische weg voor de verschillende voedingsmiddelen zijn bepaald en gepubliceerd, maar matig overeen met de in de dierproef verkregen resultaten.

Gedeeltelijk kunnen de afwijkende resultaten verklaard worden, doordat bij hetzelfde voedingsmiddel, speciaal bij groenten en vruchten, grote variaties gevonden worden naar gelang van tijd van het jaar, ondersoort, groeiplaats, bemesting enz. Maar een veel grotere reden tot afwijking van de dierproef en chemische bepaling ligt in de slechte absorptie van een koolwaterstof als de carotine. Zo schijnt speciaal de carotine in worteltjes maar voor een zeer klein gedeelte te worden geresorbeerd, terwijl ook maar een klein deel van de carotine uit spinazie het lichaam ten nutte komt. Van Eckelen en Pannervis hebben deze kwestie onderzocht, door na te gaan hoeveel carotine weer met de faeces wordt uitgescheiden na het nuttigen van onze voedingsmiddelen. De carotine uit worteltjes werd voor 99 % teruggevonden in de faeces, die uit spinazie voor 94 %, die echter uit een olie-oplossing werd veel beter geresorbeerd tot 60 % (40 % in de faeces). Het is natuurlijk mogelijk, dat bij andere personen iets gunstiger resultaten worden gevonden. Maar tenslotte blijkt, dat ook bij de rat de carotine uit worteltjes betrekkelijk slecht wordt geresorbeerd. Wij zijn begonnen om na te gaan, hoeveel van de carotine uit enkele voedings-

middelen na kunstmatige vertering en toevoeging van gal in de vloeistof colloidaal of anderszins is opgelost. Verdere proeven zullen moeten aantonen, of deze methode voor de praktijk bruikbaar is. Tot zo lang moeten wij maar met de eenvoudige chemische bepaling genoegen nemen. Ook de dierproef is in deze niet geheel doorslaggevend voor wat er bij de mens



oplossing in petroleumaether, 1/2 cm cuvette, filter S 47



Vit. A. resp. Carotine in 100 g voedsel.

	Onze bepaling in γ carotine	Coward I. E.	Scheunert I. E.	Amerika Sherman Units
Aardappelen . . .	spoor	—	tot 50	40
Aardbeien . . .	60	—	—	—
Abrikozen . . .	470	—	—	5400
Ananas . . .	—	—	—	250
Andijvie . . .	1160	—	—	—
„ gezouten . . .	1160	—	—	—
Appelen . . .	—	—	—	80
Bananen . . .	250	80	—	275
Bieten (rode) . . .	200	50	—	75
Bonen, snij . . .	170	—	—	—
„ „ gezouten . . .	170	—	—	—
„ „ spercie . . .	220	600	—	—
„ „ gezouten . . .	180	—	—	—
„ „ bruine . . .	20	—	—	—
Boter (zomer) . . .	1650 (Vit. A. als car.)	20000	8000	3500
„ (winter) . . .	650	800	3500	1200
Brussels lof . . .	130	—	—	—
Ei . . .	500	3000	—	1000
Erwtten (groene) . . .	170	700	2500—4000	1250
„ (dop) . . .	430	—	—	1000
Kaas . . .	370—750	—	—	80—3500
Kersen . . .	300	—	—	20—800
Kool, bloem . . .	10	—	—	50
„ „ witte . . .	10	—	—	50
„ „ savoye . . .	30	—	—	—
„ „ boeren . . .	5500	900?	—	2000
„ „ rode . . .	10	—	—	—
Kropsalade . . .	1430	—	—	4000
Lever, rund . . .	tot 30000	—	250—7000	—
„ „ kalf . . .	—	—	—	7300
Mandarijn . . .	360	—	—	—
Melk (zomer) . . .	57 (Vit. A. als car.)	700	1000?	250
„ (winter) . . .	22	140	350?	80
Perzik (geel) . . .	—	—	—	1000
Peulen . . .	430	—	—	—
Pruimen gedr. . .	250	—	—	2500
Raapstelen . . .	2060	—	—	—
Selderieknollen . . .	10	—	—	—
Sinaasappelen . . .	360	300	50	67
Spinazie . . .	4390	13000	10000—30000	25000
Spruitjes . . .	650	—	—	300
Stoofsla . . .	2000	—	10000—30000	25000
Tarwekiemen . . .	—	650	500	—
Tomaten . . .	300	3000	2500	1500
Vlees (mager) . . .	—	—	25	75
Viskuit . . .	—	—	300—600	—
Wortelen (winter) . . .	6600	1900	2000—4000	5000
„ (zomer) . . .	9100	—	—	3000
mosselen . . .	—	—	300—600	—

1 Sherman Unit = ± 1.4 I.E. dus 1 I.E. = ± 0.7 Sh. U.

gebeurt. Zo geeft bv. Miss Coward in haar onlangs verschenen boekje op, dat rauwe spinazie 130 I.E. per gram bevat. Als spinazie alleen β -carotine bevat, zou dat overeenkomen met $130 \times 0.6 \gamma$ -carotine = 78 γ -carotine; per 100 gram wordt dit ongeveer 8 mg carotine en een resorptie van 100 %, terwijl wij vonden 4.4 mg en een resorptie bij den mens van 5 %. Voor wortelen vond Miss 1140 β -carotine. Wij vonden 9100—6600 γ . Hier van zou bij den mens maar 1 % geresorbeerd worden of 91—66 γ . Wij zijn bezig ook bij de rat resorptie-bepalingen te verrichten.

Enkele vergelijkingen tusschen vitamine A-bepalingen door middel van selectieve absorptie bij 328 $m\mu$, (a. gemeten met spectrograaf of monochromator, b. met vitameter) en de uitkomsten van de reactie van Carr en Price met verzepte preparaten.

Preparaat	Spectro- graaf I. E. cm^3	Vitameter I. E. cm^3	Verhouding Spectrograaf: Vitameter	Carr en Price I. E. cm^3	Verhouding reactie Carr/Price: Vitameter
A 10	39200	44800	0.875	32000	0.71
Ch 1—8	160000	156800	1.04	14080	0.90
Ch 137	—	180000	—	128000	0.71
Ch 237	—	34000	—	34400	1.01
A 13	—	15600	—	128000	0.82
A 11	48800	50000	0.98	33000	0.66
XVIII/118	52000	46000	1.13	48000	1.04
P	70240	69400	1.10	54000	0.78
Q	48480	43200	1.12	33600	0.77
A 8	176600	153600	1.12	128000	0.84
A 114	142400	168000	0.84	153600	0.91
AV 1	162000	160000	1.01	130000	0.81
A 17	—	1024000	—	1024000	1.00
A 15	—	38400	—	35200	0.94
A 8e	—	57600	—	49900	0.87
A 16	—	144000	—	134000	0.93
A 8	—	56000	—	52000	0.91
A 18	896000	928000	0.96	1126400	1.21
L 47	754	715	1.06	865	1.21
L 48	660	720	0.92	800	1.11
			gem. 1.01		gem. 0.91

Bepaling van vitamine D.

Gaarne zouden wij onze ervaringen willen meedelen met de bepaling van vit. D langs de chemische weg volgens Brockmann en Yun Hwang Chen. Deze bepaling berust op de kleurmeting van een mengsel van het vit. D in zuivere chloroform en zeer zuiver en droog antimontrichloride in zuivere $CHCl_3$. De chloroform voor deze proef moet vers gedestilleerd, alcohol- en watervrij zijn en geen reactie geven met KJ en stijfsel.

De $SbCl_3$ -oplossing moet 24 uur staan na de bereiding; ze is slechts ± 1 week houdbaar. (Voor de reactie van Carr en Price zijn al deze voorzorgen niet nodig). Men meet het best in de stufpometer met filter S_{50} ; men meet tot een maximumkleur is opgetreden, hetgeen meestal in 10'—15' na menging het geval is (men voegt bijeen 0.25 cm^3 opl. en 5 cm^3 reagens). De reactie wordt uitgevoerd met het onverzeepbare gedeelte; de te onderzoeken oplossing moet ten minste $\pm 20 \gamma$ calciferol (= 800 I.E.) per cm^3 bevatten.

Vit. D_2 en vit. D_3 geven dezelfde reactie (Brockmann). Sommige sterinen storen, echter alleen wanneer ze in grote overmaat aanwezig zijn, tachysterine gedraagt zich echter op dezelfde wijze als D_2 en D_3 ; vitamine A stoort eveneens de reactie.

Men kan de absorptie ook spectrophotografisch meten bij 500 $m\mu$; wij vonden voor $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ calciferol een waarde van 31.4; in de stufenmeter met filter S_{50} een factor 30.1.

Hieronder volgen enkele waarden, die wij hebben gekregen van preparaten, die ook met de dierproef werden onderzocht:

bestraald ergosterol	dierproef	Brockmann- proef	verhouding
D 34	66000	79000	1.18
D 37	60000	55700	0.93
D 38	37000	49000	1.32
D 39	42000	59000	1.41
D 40	52000	56000	1.07
D 41	72000	62000	0.86
D 44	45000	61000	1.35
D 45	45000	61800	1.35
D 46	60000	77400	1.29
			gem. 1.91

Steeds werd een controle meegedaan met zuiver calciferol. In de allerlaatste tijd heeft Emmerie beproefd in preparaten, die zowel vitamine A als D bevatten, de reactie uit te voeren na scheiding van A en D.

De scheiding van vitamine A en vitamine D_2 werd uitgevoerd met montana-aarde. Deze reageert met vitamine A onder blauwkleuring der aarde (bv. in petroleumaeether en benzoloplossing); bij voldoende toevoeging van de aarde geeft de resterende oplossing geen Carr en Price-reactie meer. Het bleek, dat zuiver calciferol in petroleumaeether ook geadsorbeerd wordt, evenwel niet of zeer weinig in benzol. De scheiding wordt aldus uitgevoerd, dat het preparaat, hetwelk vitamine A en D_2 bevat, wordt verzeept en de onverzeepbare fractie in zuivere benzol opgelost wordt en door een Tswett-kolom van Montana-aarde wordt gefiltreerd, nagewassen met benzol, in vacuo ingedampt en opgenomen in zuivere chloroform en bepaald volgens onze methode met de reactie van Brockmann.

Het is zeer belangrijk de aarde vooraf kwantitatief te testen met oplossingen van zuiver calciferol, omdat de absorptie afhangt van de vochtigheidsgraad der aarde; dezelfde Montana-aarde reageerde na 5 uur verhitten op 120° ook met vitamine D_2 met een oranje-gele kleur. Met preparaten, die ongeveer 1 mg D_2 (40000 I.E.) per cm^3 bevatten, werd dit na filtratie door een zuil van Montana-aarde vrijwel kwantitatief teruggevonden. Aangezien sterolen de reactie tusschen vitamine D_2 en antimontrichloride kunnen storen, wanneer ze in grote overmaat aanwezig zijn, is het in dit geval nodig hen te verwijderen met digitonine.

Literatuur:

- H. Brockmann en Yun Hwang Chen, Z. physiol. Chem. 241, 129 (1936).
A. Emmerie en M. van Eekelen, Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 6, 133 (1936).

Prof. Dr. B. C. P. Jansen sprak over „Quantitatieve bepalingen van aneurine (= vitamine B₁)“.

Hoewel de aneurine, het anti-beriberi-vitamine, het eerste vitamine is, dat in kristallijnen toestand is geïsoleerd geworden, heeft het lang geduurd vóór een goede chemische methode werd gevonden, waarmee deze stof, ook indien ze slechts in kleine hoeveelheden voorkomt, zoals in voedingsmiddelen of stofwisselingsproducten, quantitatief bepaald kon worden. In 1934 gaven Peters en Kinnerley een dergelijke methode met behulp van het diazo-reagens. Het nadeel ervan was echter, dat voor de toepassing ervan betrekkelijk vèrgezuiverde oplossingen noodig waren en juist bij deze processen van zuiveringen kunnen groote verliezen optreden. Later zag Peters blauw fluoresceerende oplossingen ontstaan door oxydatie van aneurine. Kuhn c.s. isoleerden uit gist een sterk blauw fluoresceerende stof, die zij thiochroom noemden en waarvan zij op grond van de empirische formule veronderstelden, dat het een dehydratie-product van aneurine zou zijn. Barger c.s. slaagden er in door oxydatie in alkalische omgeving met kalium-ferricyanide het aneurine over te voeren in thiochroom. Kuhn en Vetter verkregen hetzelfde resultaat door oxydatie met porphyrexide. Door dit proces onder zeer bepaalde omstandigheden uit te voeren, is het nu mogelijk de oxydatie van aneurine tot thiochroom quantitatief te laten verlopen. Het gevormde thiochroom kan dan bepaald worden door zijn fluorescentie. Deze fluorescentie kan visueel bepaald worden, zoals geschiedt door Karrer in het laboratorium van Hoffmann—La Roche; naar het ons voorkomt echter meer nauwkeurig door het fluorescentie-licht te laten vallen op een foto-electrische cel; door een geschikte combinatie van licht-filters moet dan gezorgd worden, dat alleen het fluorescentie-licht en niet het de fluorescentie opwekkende licht, de foto-electrische cel bereikt.

Bij het nagaan van de voorwaarden voor een quantitative omzetting van aneurine in thiochroom bleek, dat de oxydatie moet geschieden in sterk alkalisch milieu; verder, dat een groote overmaat van het oxydatie-middel, kalium-ferricyanide, schadelijk is; misschien, doordat het thiochroom verder geoxydeerd wordt. Bij zuiver aneurine zal men dus een stöchiometrische hoeveelheid moeten nemen; bij onzuivere oplossingen, zoals extracten van gist, rijstzemelen, e.d.g., zijn echter behalve het aneurine ook andere reduceerende stoffen aanwezig, zoodat men noodzakelijkerwijs een overmaat ferricyanide moet gebruiken. Heeft men te maken met geheel onbekende extracten, dan zal men bij verschillende proefjes ervan stijgende hoeveelheden ferricyanide moeten voegen om na te gaan, bij welke hoeveelheid de sterkste fluorescentie — dus de grootste uitslag van den met de fotocel verbonden galvanometer — verkregen wordt. Dit is dan de juiste hoeveelheid. Het bleek verder, dat in methylalcoholische oplossing een betrekkelijk groote overmaat ferricyanide onschadelijk is: de hoeveelheid ferricyanide kan dan dus binnen wijde grenzen veranderd worden, zonder dat de maximale galvanometer-uitslag beïnvloed wordt.

In den fluorometer, die door F. H. Cohen inder tijd in ons laboratorium is geconstrueerd geworden, wordt als lichtbron van het de fluorescentie opwek-

kende licht gebruikt een Philips-superhoogedruk-kwiklamp. Het licht hiervan is zeer constant en betrekkelijk weinig afhankelijk van de schommelingen in de spanning van het elektrische net. Om echter zooveel mogelijk onafhankelijk te zijn van de lichtbron enz., wordt bij elke serie van bepalingen tevens de fluorescentie gemeten van een kininesulfaat-oplossing van bekende sterkte. Het fluorescentie-licht wordt belemmerd door de overmaat ferricyanide. We kunnen dit gemakkelijk verhelpen door het thiochroom uit te schudden met isobutanol. Het aneurine kan in extracten, zoals van biergist of van rijstzemelen, die rijker zijn aan deze stof, direct bepaald worden. In minder vitaminerijke vloeistoffen moet het vitamine echter eerst geconcentreerd worden door adsorbtie aan vollersaarde.

Bij gedroogde biergist kunnen we bijv. als volgt te werk gaan: Bij 10 cm³ van een 25 % extract wordt bij p_H ± 3 gevoegd 20 cm³ methanol; na afcentrifugeeren van het gevormde neerslag worden verschillende proefjes van telkens 1.0 cm³ van het centrifugaat gemengd met resp. 0.1, 0.2 en 0.3 cm³ van 1 % ferricyanideoplossing. Daarna bij elk proefje 1.0 cm³ 30 % natronloog en dan 2.0 cm³ water; tenslotte wordt uitgeschud met 13.0 cm³ isobutanol en gecentrifugeerd. Van de isobutanollaag wordt 10.0 cm³ afgepipeteerd en hiervan de fluorescentie gemeten.

Willen we het aneurine eerst concentreren aan vollersaarde, dan kunnen we als volgt te werk gaan: In 10.0 cm³ van het bovenverkregen centrifugaat van 10.0 cm³ gistextract en 20 cm³ methanol brengen we 200 mg vollersaarde (bijv. frankoniet). Dit wordt eenigen tijd geroerd, dan afgecentrifugeerd, gewaschen met even aangezuurd water en gedroogd. Bij 20 mg van dit zoo geactiveerde frankoniet brengen we onder een stikstofstroom 2.0 cm³ methanol, vervolgens ferricyanide en daarna 1.0 cm³ 30 % natronloog en 2.0 cm³ water; tenslotte wordt weer uitgeschud met 13.0 cm³ isobutanol en in 10.0 cm³ hiervan de fluorescentie bepaald. Men vindt dan weer nagenoeg dezelfde waarden als in het eerste geval zonder vollersaarde.

Bij toepassing van deze methode op vitamine-rijke vloeistoffen zoals extracten van biergist of van rijstzemelen werden steeds goede resultaten verkregen. Dit blijkt daaruit, dat toegevoegd aneurine quantitatief wordt teruggevonden. Bij minder vitamine-rijke vloeistoffen zoals urine, bloed, melk, extracten uit andere voedingsmiddelen, moesten de omstandigheden, waaronder de bepaling plaats grijpt, van te voren nauwkeurig vastgesteld worden; en ook dan vindt men voor extra toegevoegd aneurine niet altijd denzelfden galvanometer-uitslag, dien men verkrijgt, wanneer men het zuivere aneurine alleen verwerkt. Het bleek echter bij een zeer groot aantal proeven, dat onder die omstandigheden toch wel voor een bepaalde hoeveelheid toegevoegd aneurine een constante galvanometer-uitslag werd gevonden, zoodat ook in dit geval de methode wel bruikbaar is, maar eerst opnieuw geijkt moet worden door toevoeging van bekende hoeveelheden zuiver aneurine.

Zoo vonden Westenbrink en Goudsmit, dat, om de methode, toe te passen op urine, het noodig is, deze vloeistof vóór het toevoegen van de frankoniet sterk te verdunnen: vier maal voor dag-

en tien maal voor nacht-urine. Bij bloed bleek het mogelijk in plasma of serum, dat geheel vrij is van bloedkleurstof, het aneurine zonder meer te adsorberen aan frankoniet. Dit kan dan op de gewone wijze verwerkt worden en levert dadelijk een goed resultaat, zooals blijkt uit toegevoegd aneurine. Reeds een kleine hoeveelheid bloedlichaampjes of een geringe haemolyse echter brengt de bepaling geheel in de war. Het bleek nu, dat na onteiwitting met trichloorazijnzuur het resultaat weer uitstekend wordt: van te voren aan het bloed toegevoegd aneurine werd in het trichloorazijnzuurfiltraat quantitatief teruggevonden.

De heer *Wiegand* is bezig de thiochroommethode uit te werken voor verschillende voedingsmiddelen. Bij melk was de bepaling eenvoudiger dan verwacht werd: door toevoeging van frankoniet aan verdunde melk werd het aneurine quantitatief geadsorbeerd. Het verder verwerken van dit geactiveerde frankoniet geschiedde op de gewone wijze en leverde geen moeilijkheden op; van te voren toegevoegd aneurine werd quantitatief teruggevonden. Verschillende monsters in den loop van een jaar onderzocht, leverden vrij constante waarden voor het aneurine-gehalte; de schommelingen waren betrekkelijk gering; meestal werd ongeveer $200 \text{ à } 300 \gamma = 0.2 \text{ à } 0.3 \text{ mg}$ aneurine per liter melk gevonden. Pasteuriseren of korten tijd opkoken geeft geen daling in aneurine-gehalte.

Bij toepassen op tarwe-meel, brood, gerst, mais en dergelijke voedingsmiddelen kreeg *Wiegand* grootere moeilijkheden en hier in 't bijzonder bleek van te voren toegevoegd aneurine een kleineren galvanometer-uitslag te geven, dan wanneer het aneurine zonder meel-extract enz. gemeten werd. Daar de afwijking echter volkomen constant is, zal het wel gelukken ook voor deze voedingsmiddelen de methode bruikbaar te maken.

Nu komt het aneurine niet alleen als zoodanig in de natuur voor, maar ook, zooals we weten door het werk van *Lohmann*, in den vorm van pyrophosphorzure ester: het co-ferment van de carboxylase. Het is nu gebleken, dat ook dit pyrophosphaat door alcalische oxydatie overgaat in een blauw fluoresceerende stof, naar we mogen aannemen, het pyrophosphaat van thiochroom. Dit thiochroompyrophosphaat wordt nu, zooals ook begrijpelijk is voor een zooveel sterker zure verbinding, in alcalische oplossing niet uitgeschud door isobutanol. We krijgen op deze wijze dus een scheiding van het aneurine en zijn pyrophosphaat: het thiochroom zelf gaat over in de isobutanol-laag, terwijl het pyrophosphaat achterblijft in de water-laag. De fluorescentie in deze water-laag kan echter niet zonder meer gemeten worden, omdat ze nadeelig beïnvloed wordt door de overmaat ferricyanide. Voorloopige proeven hebben het waarschijnlijk gemaakt, dat het mogelijk zal zijn, deze overmaat weg te nemen door toevoeging van waterstofperoxyde. De methode is nog niet zoo ver uitgewerkt, dat we reeds nu quantitatieve resultaten kunnen krijgen. Het laat zich echter aanzien, dat dit zeer binnenkort wel het geval zal zijn.

We mogen wel aannemen, dat deze thiochroommethode specifiek zal zijn: het is toch niet zeer waarschijnlijk, dat er in de natuur nog andere stoffen zullen voorkomen, die bij oxydatie in alcalisch milieu een blauwe fluorescentie geven. Wel komen

er in de natuur andere fluoresceerende stoffen voor, denk slechts aan het lactoflavine. Deze andere fluoresceerende stoffen hinderen echter de bepaling niet; gedeeltelijk kan men hen uitschakelen door geschikte lichtfilters of langs chemischen weg. Voor zoover dit niet gelukt, bepaalt men de fluorescentie vóór en na de oxydatie met ferricyanide. Het verschil is dan een maat voor de hoeveelheid aneurine.

Bij deze bepaling moet men er rekening mee houden, dat het thiochroom vrij sterk licht-gevoelig is. Het bewaren van de oplossing in isobutanol gedurende 1 uur in het daglicht, of ook het blootstellen van deze oplossing gedurende 5 à 10 minuten aan het licht van de fluorometer-lamp heeft reeds een duidelijk merkbare vermindering van de fluorescentie tengevolge

Ten slotte nog eenige woorden over de met deze methode bereikte resultaten. *Westenbrink* en *Goudsmit* hebben een uitvoerig onderzoek verricht over de stofwisseling van het aneurine. Het bleek bij een aantal gezonde, goed gevoede personen, dat de uitscheiding per 24 uur $100 \text{ à } 300 \gamma$ bedroeg. Reeds na 2 dagen van een nagenoeg aneurine-vrij dieet, liep de uitscheiding terug tot ongeveer 40γ per 24 uur. Werd bij een normaal dieet nog 3 mg aneurine extra per dag per os opgenomen, dan bleek na 24 uur de uitscheiding $\pm 600 \gamma$ te bedragen. Reeds den daaropvolgenden dag was van een vermeerderde uitscheiding niets meer te bespeuren. Bij het bepalen van de uitscheiding op verschillende tijdstippen van den dag, bleek deze na den hoofdmaaltijd duidelijk verhoogd te zijn. De uitscheiding per uur was des nachts iets groter dan overdag. Werd het aneurine intra-musculair geïnjecteerd, dan was de uitscheiding gedurende de eerste paar uren veel groter dan na opneming per os. Daarna echter verliep de uitscheiding evenzoo als die na opneming per os.

Bij onderzoek van een twintig-tal zwangeren van de Universiteits-polikliniek van verloskunde, bleek het, dat deze vrouwen op enkele uitzonderingen na, geen aantoonbare hoeveelheid aneurine uitscheidten. Ook indien aan deze vrouwen extra 5 mg aneurine per os werd verstrekt, was de uitscheiding nog maar zeer gering. De aneurine-bepalingen werden verricht door Dr. *Westenbrink* en geheel onafhankelijk daarvan — dus zonder kennis van de resultaten van deze bepalingen — werden de vrouwen door Dr. *Goudsmit* onderzocht op eventuele zwangerschapsbezwaren (paraesthesieën, vermoeidheid, oedeem, enz.). Het bleek nu, dat de vrouwen, die nog aneurine uitscheidten, behoorden tot de groep zonder klachten, terwijl de overigen bijna allen meer of minder bezwaren vertoonden. Bij het nagaan van de voeding van deze vrouwen bleek, dat zij, die geen klachten hadden en wel aneurine uitscheidten, bruinbrood-eetsters waren. Al is het aantal onderzochte personen nog te klein om nu reeds vergaande conclusies te trekken, dit onderzoek geeft toch den indruk, dat ook hier te lande de voorziening met aneurine niet altijd voldoende is.

Ir. A. *Emmerie* sprak over „*De chemische bepaling van lactoflavine (vitamine B₂)*”.

Inleiding en nomenclatuur. Ofschoon de geelgroene kleur van melkwei reeds zeer lang geleden

moet zijn opgemerkt, duurde het tot 1879, eer Blyth¹⁾ eenige onderzoekingen over deze kleurstof, welke door hem lactochroom werd genoemd, deed. Later (1932) isoleerden Banga en von Szent-Györgyi²⁾ het „cytoflav” en Warburg en Christian³⁾ het gele oxydatie- of ademhalingsferment, welke beide stoffen eveneens als lactoflavine-derivaten zijn herkend.

Het is op voorstel van Kuhn, Györgyi en Wagner-Jauregg⁴⁾ geweest, dat men aan de dierlijke en plantaardige in water oplosbare kleurstoffen, die zich onderscheiden door gele kleur en groene fluorescentie, den naam van „flavinen” heeft gegeven.

Ellinger en Koschara⁵⁾ gaven deze nieuwe klasse van kleurstoffen den naam van „lyochromen”, ter onderscheiding van de in vet oplosbare lipochromen (carotinoïden). Het lactoflavine werd het eerst door Kuhn, Györgyi en Wagner-Jauregg⁶⁾ in zuiveren, gekristalliseerden toestand uit melkwei bereid. Later is gebleken, dat het ovoflavine (uit eieren), hepaflavine (uit lever) en het uroflavine (uit urine) identiek waren met lactoflavine.

Eigenschappen van lactoflavine. Het lactoflavine is chemisch 6,7-dimethyl-9-[d,1'-ribityl]-isoalloxazine met formule $C_{17}H_{20}O_6N_4$. Het smeltpunt ligt bij 292—293° C en de oplosbaarheid in water bedraagt ongeveer 0.25 %₁₀₀ (20° C).

In aether, chloroform en petroleumaether is het onoplosbaar, in kouden aethanol zeer weinig, in koken iets beter oplosbaar. In verdund-alkalische oplossing is lactoflavine linksdraaiend, $[\alpha]_D^{20} = -115^\circ$, $c = 0.3$ %. Het lactoflavine is zeer bestendig tegen zuren en oxydatiemiddelen; door reductiemiddelen laat het zich omzetten in leuko-lactoflavine, dat door schudden met lucht weer overgaat in lactoflavine. Lactoflavine is niet bestendig tegen alkaliën en tegen licht. Deze lichtgevoeligheid maakt het noodzakelijk, om manipulaties met lactoflavine zooveel mogelijk uit te voeren bij zeer gedempt daglicht of bij rood licht. Bij bestraling met zonlicht of kunstlicht in alkalisch milieu gaat het lactoflavine over in lumiflavine^{3) 7)} (6,7,9-trimethylisoalloxazine), hetgeen oplosbaar is in chloroform; bij bestraling in neutraal en zwak zuur milieu ontstaat lumichroom⁸⁾ (6,7-dimethylalloxazine), eveneens uit te schudden met chloroform uit verdund-azijnzure waterige oplossing. Terwijl lumiflavine geheel dezelfde kleur en fluorescentie als lactoflavine vertoont, is lumichroom stroogeel gekleurd en fluoresceert blauw tot blauw-groen in neutraal milieu, in alkalische oplossing fluoresceert het geel.

Zoowel lumiflavine als lumichroom zijn biologisch

¹⁾ A. W. Blyth, J. Chem. Soc. 35, 530 (1879).

²⁾ J. Banga en A. v. Szent-Györgyi, Biochem. Z. 246, 203 (1932).

³⁾ O. Warburg en W. Christian, Naturwissenschaften 20, 688, 980 (1932); 22, 441 (1934); Biochem. Z. 254, 438 (1932); 257, 492; 258, 496; 263, 228; 266, 377 (1933).

⁴⁾ R. Kuhn, P. Györgyi en Th. Wagner-Jauregg, Ber. 66, 317 (1933).

⁵⁾ Ph. Ellinger en W. Koschara, Ber. 66, 315, 808, 1411 (1933).

⁶⁾ R. Kuhn, P. Györgyi en Th. Wagner-Jauregg, Ber. 66, 576, 1034 (1933).

⁷⁾ R. Kuhn, H. Rudy en Th. Wagner-Jauregg, Ber. 66, 1950 (1933).

⁸⁾ P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schlitter en H. Fritzsche, Helv. Chim. Acta 17, 1010 (1934).

inactief, zoodat de mogelijkheid bestaat, dat bij kunstmatige bestraling van lactoflavinehoudende producten (melk b.v.) deze hun biologische waarde als lactoflavinebron verliezen.

Kristallijn lactoflavine is oranje-geel gekleurd en vertoont in waterige oplossing een sterke groene fluorescentie (vooral in Wood's licht). Deze fluorescentie is afhankelijk van de p_H en verdwijnt bij p_H -waarden lager dan 3 en hoger dan 9⁹⁾.

Waterige oplossingen van lactoflavine zijn geel-groen gekleurd en hebben absorptiemaxima bij 445, 370, 270 en 225 m μ . Synthetisch is lactoflavine bereid door Kuhn c.s.¹⁰⁾ en door Karrer en Meerwein¹¹⁾.

Voorkomen van lactoflavine. Het lactoflavine komt in het planten- en dierenrijk zoowel in vrijen als in gebonden toestand voor. Het gele oxydatieferment van Warburg is een lactoflavine-phosphorzuur-eiwit-verbinding (Theorell¹²⁾). Deze verbinding is niet dialyseerbaar en wordt door koken met water, door verwarmen met methanol of door behandeling met verdunde minerale zuren gesplitst in lactoflavine-phosphorzuur en een eiwitcomponent. Het lactoflavinephosphorzuur wordt door koken met 15 % zoutzuur langzaam omgezet tot lactoflavine en phosphorzuur¹³⁾.

Extractiemethoden voor lactoflavine uit diverse producten. Alvorens tot een quantitative bepaling te kunnen overgaan, komt als eerste bewerking de extractie van het flavine aan de beurt. Nadat het te onderzoeken product in zoo fijn mogelijk verdeelden toestand is gebracht, hetgeen meestal in aanraking met het extractiemiddel geschiedt en hetgeen buitengewoon belangrijk is om een quantitative extractie te verkrijgen, kan de extractie plaats vinden. Een uniforme extractiemethode is in de literatuur niet aanwezig; van de verschillende aangegeven methoden zijn extracties met water, methanol, aethanol of met combinaties van deze stoffen het meest gebruikelijk, eventueel onder toevoeging van zuur. De extractie-temperaturen varieren van kamertemperatuur tot 100° C. We zien dus, dat vele combinaties mogelijk zijn. Daar bovendien in producten zooals lever en gist het flavine in gebonden toestand voorkomt (in tegenstelling met melk), moet bij de extractie de eiwitcomponent worden afgesplitst.

De school van Euler heeft meestal extracties toegepast met alcoholconcentraties van 60 %—96 % bij een extractietemperatuur van 37°. Murthy¹⁴⁾, die een overzicht geeft van de methoden en die een aantal Britsch-Indische voedingsmiddelen onderzocht, extraheert eveneens bij 37°, doch met 20 %-ige methanol, die 0.1 n zoutzuur bevat. Bij eigen onderzoekingen over het flavinegehalte van verschillende producten, welke plaats vonden vóór de publicatie van Murthy, gebruikte ik 70 %-ige methanol en als extractie-temperatuur 37° C. Murthy heeft geen vergelijkend onderzoek gedaan en men moet voorzichtig zijn met het trekken van conclusies bij de beoordeeling van de resultaten, verkregen met ver-

⁹⁾ R. Kuhn en G. Moruzzi, Ber. 67, 888 (1934).

¹⁰⁾ R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand en R. Ströbele, Ber. 68, 1765 (1935).

¹¹⁾ P. Karrer en H. F. Meerwein, Helv. Chim. Acta 19, 264 (1936).

¹²⁾ H. Theorell, Biochem. Z. 275, 37, 344 (1935).

¹³⁾ R. Kuhn en H. Rudy, Z. physiol. Chem. 239, 47 (1936).

¹⁴⁾ G. N. Murthy, Indian J. Med. Research 24, 1083 (1937).

schillende extractiemethoden voor hetzelfde product, omdat men hierbij andere bijproducten in het extract kan krijgen, welke de bepaling kunnen beïnvloeden. Ook is het lang niet altijd eenvoudig een quantitative extractie te verkrijgen; dikwijls is het noodig dit bv. te controleeren met de fluorescentie.

Zuivering van het extract. Deze zuivering is bijna zonder uitzondering altijd noodig. Hierbij komt in de eerste plaats in aanmerking de adsorptie ter verwijdering van vreemde pigmenten of fluoresceerende stoffen. De meest gebruikelijke adsorbentia zijn vollersaarde¹⁴⁾, Frankoniet, Floridinaarde en lood-sulfide¹⁵⁾. De keuze van adsorbens hangt ook af van het extract; in tegenstelling met de verschillende aarden is loodsulfide niet altijd bruikbaar, omdat het door de aanwezigheid van bepaalde stoffen in het extract soms min of meer kolloïdaal wordt. Daarentegen krijgen wij bij elutie meestal anorganische bestanddeelen van de aarden in het eluaat, die later uitvlokken en moeilijkheden veroorzaken. Loodsulfide is een sterker adsorbens voor lactoflavine dan de meeste aarden, vooral wanneer het in het extract zelf wordt gevormd door loodacetaat hieraan toe te voegen en daarna zwavelwaterstof in te leiden¹⁵⁾. Doch hoe sterker de adsorptie, hoe moeilijker de elutie. Om deze redenen ben ik er toe overgegaan het loodsulfide afzonderlijk te bereiden en uit te wasschen, om de overtollige zwavelwaterstof te verwijderen (door decanteeren) en het daarna aan het extract toe te voegen.

De adsorptie kan plaats hebben in neutraal en zuur milieu. In het algemeen verhoogt een grootere zuurgraad het adsorptievermogen. De meeste aarden worden ook in zuur milieu gebruikt. Voor loodsulfide is neutraal of zwak zuur milieu voldoende. Soms is het noodig meer dan één adsorptie uit te voeren bij aanwezigheid van veel storende stoffen. Als andere middelen tot zuivering van het extract (ter verwijdering van bv. vetten of in vet oplosbare kleurstoffen) komt in aanmerking uitschudden met aether, petroleumather of chloroform (niet ieder organisch oplosmiddel is hiervoor bruikbaar, zie Greene en Black³⁷⁾). Het is gewenscht het extract uit te schudden vóór de adsorptie, daar anders de vetten de adsorptie kunnen bemoeilijken.

Een zeer belangrijk hulpmiddel tot zuivering van flavine bevattende extracten is de oxydatie met kaliumpermanganaat en waterstofsperoxyde in azijnzuur-milieu¹⁶⁾, waarbij zeer vele storende stoffen kunnen worden verwijderd (pigmenten).

Elutie. Na de adsorptie vindt de elutie plaats. Hiervoor zijn het meest gebruikelijk mengsels van water, methanol, pyridine en azijnzuur in verschillende verhoudingen. Methanol is niet noodzakelijk, terwijl toevoeging van azijnzuur de elutie sneller doet verlopen (vooral bij loodsulfide). Steeds is het noodig te controleeren, of de elutie quantitatief verloopt. De aldus voorbehandelde extracten komen dan in aanmerking voor de chemische bepaling, welke op de volgende wijzen kan geschieden:

Bepaling.

1e. Meting der intensiteit van de gele kleur¹⁷⁾.

¹⁵⁾ Ph. Ellinger en W. Koschara, Ber. 66, 1411 (1933).

¹⁶⁾ W. Koschara, Ber. 67, 761 (1934).

¹⁷⁾ W. Koschara, Z. physiol. Chem. 232, 102 (1935).

2e. Bepaling der fluorescentie-intensiteit¹⁸⁾.

3e. Omzetting in lumiflavine en de bepaling hiervan¹⁹⁾ ²⁰⁾.

Bij deze methoden kan men het volgende opmerken:

Ad. 1. Indien men de concentratie van het flavine wil bepalen door de meting der gele kleur, is het noodzakelijk alle andere niet-flavine-pigmenten te verwijderen, hetgeen dikwijls zeer moeilijk te controleeren is.

Ad. 2. Ofschoon de fluorescentie een zeer karakteristieke eigenschap van het lactoflavine is, blijkt de quantitative bepaling van de fluorescentie-intensiteit van vele factoren afhankelijk te zijn. Niet alleen is de intensiteit afhankelijk van de p_H en van de zoutconcentratie doch vooral van de bijna altijd aanwezige niet-flavine-stoffen, die door eigen fluorescentie of kleur de bepaling ernstig kunnen storen. Men ziet hierbij dikwijls, dat de groene fluorescentie van het flavine geheel verdwijnt door andere (speciaal blauw) fluoresceerende stoffen¹⁷⁾ ²¹⁾ ²²⁾.

Ad. 3. De omzetting van flavine in lumiflavine, dat in chloroform oplosbaar is, is weliswaar specifiek voor het flavine, doch de mogelijkheid is niet geheel uitgesloten, dat ook onbekende stoffen een in chloroform oplosbaar product leveren. Het grootste bezwaar tegen de lumiflavine-methode is, dat de omzetting niet quantitatief is. Het rendement van de omzetting hangt af van de aanwezigheid van onzuiverheden en van de concentratie van het aanwezige flavine; hoe lager de concentratie, hoe slechter het rendement. Het rendement varieert hierbij van 42 %—87 %.

Deze drie bepalingsmethoden worden alle door de diverse onderzoekers toegepast en kunnen bij onderzoek van onbekende extracten door combinatie zeer nuttig zijn. Immers, heeft men een extract verkregen, dat men op flavinegehalte wil onderzoeken door bv. meting der gele kleur, dan kan men zich door omzetting in lumiflavine inderdaad overtuigen, met lactoflavine te doen te hebben. Ook kan een fluorescentiebepaling bij verschillende p_H 's dienen bewijzen.

Apparatuur voor de bepaling. Wat betreft de apparatuur voor de quantitative bepaling van lactoflavine, hiervoor is de Stufenphotometer van Pulfrich-Zeiss zeer geschikt. Bij meting der gele kleur van het lactoflavine of van het lumiflavine kan men de bij dit apparaat behorende filters S 47 of S 45 gebruiken. De extincties voor deze filters zijn in de volgende tabel gegeven²⁴⁾.

Filter S 47: 100 γ lactofl. per cm^3 e = 3.25
idem : 100 γ lumifl. " " e = 4.75
Filter S 45: 100 γ lactofl. " " e = 3.85
idem : 100 γ lumifl. " " e = 5.65.

Ook de fluorescentie kan men met den Stufenphotometer bepalen²⁵⁾. Bovendien zijn apparaturen

¹⁸⁾ H. v. Euler en E. Adler, Z. physiol. Chem. 223, 105 (1934).

¹⁹⁾ O. Warburg en W. Christian, Biochem. Z. 266, 377 (1933).

²⁰⁾ R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg en H. Kaltschmidt, Ber. 67, 1452 (1934).

²¹⁾ A. Gourévitch, Bull. soc. chim. biol. 19, 125 (1937).

²²⁾ Ph. Ellinger, Biochem. J. 32, 376 (1938).

²³⁾ M. v. Eekelen en A. Emmerie, Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 5, 77 (1935). Nederland. Tijdschr. Geneeskunde 79, 3796 (1935).

²⁴⁾ H. Vetter, Ergebnisse Physiol. 38, 855 (1936).

²⁵⁾ F. Vivanco, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. A 12, Nr. 3 (1935).

voor de fluorometrische bepaling beschreven door Josephy²⁶⁾, Cohen²⁷⁾ en Weisberg en Levin²⁸⁾, waarbij de fluorescentie van de flavine- of lumiflavine-oplossing wordt vergeleken met die van natriumfluoresceïne of van zuiver lactoflavine als standaard. In de volgende tabel zullen nu de lactoflavine-gehalten van een aantal voedingsmiddelen worden gegeven, welke langs biologischen en (of) langs chemischen weg zijn bepaald. De biologische waarden zijn herleid tot lactoflavine door 1 Sherman-Bourquin-eenheid = 2—2.5 γ -lactoflavine te stellen²⁹⁾. De met * gemerkte waarden zijn eigen bepalingen (ongepubl.).

Tabel (waarden in γ lactoflavine per 100 gram).

Voedsel	Biologische bepaling	Chemische bepaling
Aardappelen . . .	40—75 ³⁰⁾ ; 50—63 ³⁵⁾	43 ¹⁴⁾
Appelen	40—63 ³⁰⁾ ; 40—50 ³⁵⁾	—
Bananen	70—88 ³⁰⁾	7.5 ²⁰⁾
Boonen	50—63 ³³⁾	566 ¹⁴⁾ (Phaseol.)
Bieten	100—125 ³⁰⁾ ;	— (vulg.)
Bloemkool	100—125 ³⁰⁾ ; 120—150 ³⁵⁾	—
Brood	(rogge) 18—32 Krieger-Lassen E. ³²⁾	(bruin) 76*
"	(wit) 11—28 " "	(wit-water) 31—84*
"	" "	(wit-melk) 66*
Eieren	220—275 ³⁵⁾ ; 270—375 ³⁰⁾	—
Eigeel	340—425 ³⁵⁾ ; 460—575 ³⁰⁾	500—600 ³¹⁾
Eiwit	160—200 ³⁵⁾ ; 200—250 ³⁰⁾	400—500 ³¹⁾ 14)
Erwten (gedr.) . . .	200—313 ³⁰⁾ 35)	—
" (groen)	100—125 ³⁵⁾	280 ¹⁴⁾
Kaas	(Amer.) 800 ³³⁾ ; 400—500 ³⁵⁾ (Chedd.)	392—410* (mager)
"	(Zwits.) 600 ³³⁾	172* (volvet)
"	(room) 140 ³³⁾ ; 90—113 ³⁵⁾ (room)	—
Kalfslever	1700—2125 ³⁰⁾	—
Kalfsnier	1600—2000 ³⁰⁾	—
Kalfsvleesch	300—375 ³⁰⁾	—
Kool	50—150 ³⁵⁾ ; 100—250 ³⁰⁾	195 ¹⁴⁾
Melk (100 cm ³). . . .	60—225 ³⁵⁾ ; 100—188 ³⁰⁾ ; 176—255 ³⁴⁾	127 ¹⁴⁾ ; 148—180*;
"	"	200—260 ³⁴⁾
Peer	100—125 ³⁰⁾ ; 150—188 ³⁵⁾	—
Pruimen (gedr.) . . .	520—650 ³⁵⁾	—
Runderlever	1600—2500 ³⁰⁾	1000—2000 ¹⁸⁾
Rundernier	1600—2000 ³⁰⁾ ; 1800—2250 ³⁵⁾	1000—2000 ¹⁸⁾
Salade	100—125 ³⁵⁾ ; 100—188 ³⁰⁾	30—40 ³¹⁾
Sinaasappelsap (100 cm ³)	70—88 ³⁵⁾	7—9 ²⁰⁾
Spinazie	200—250 ³⁰⁾ ; 250—313 ³⁵⁾	40—60 ³¹⁾ 20)
Tomaten	24—30 ³⁵⁾ ; 32—40 ³⁰⁾	10—30 ³¹⁾ ;
"	"	195—236 ¹⁴⁾
Wortelen	100—125 ³⁵⁾	< 8 ¹⁴⁾ ; 20 ²⁰⁾

Wat betreft het voorkomen van gebonden en vrij flavine in producten, zijn de volgende gegevens bekend³¹⁾, welke zijn bepaald door dialysatie:

²⁶⁾ B. Josephy, Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 4, 46 (1934).
²⁷⁾ F. H. Cohen, Rec. trav. chim. 54, 133 (1935).
²⁸⁾ S. M. Weisberg en I. Levin, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 29, 523 (1937).
²⁹⁾ O. Bessey, J. Nutrition 15, 11 (1938).
³⁰⁾ H. C. Sherman, Chemistry of Food and Nutrition, 1933.
³¹⁾ H. v. Euler, E. Adler en A. Schlötzer, Z. physiol. Chem. 226, 88 (1934).
³²⁾ L. S. Fridericia en M. Schousboe, Compt. rend. 5e Congr. internat. tech. chim. indust. agric. Scheveningen, 1937.
³³⁾ P. L. Day en W. J. Darby, Food Res. 1, 349 (1936). J. Am. Chem. Soc. 59, 1153 (1937).
³⁴⁾ C. H. Whitnah, B. L. Kunerth en M. M. Kramer, J. Am. Chem. Soc. 59, 1153 (1937).
³⁵⁾ E. Peterson Daniel en H. E. Munsell, Vitamin content of foods, U. S. Dep. of Agric., Publication nr. 275 (1937).

Product	percentage gebonden flavine
Eigeel	90—100
Eiwit	90—100
Lever (rond)	70—80
Melk	20—25
Nier (rond).	70—80
Spinazie	75—90

Bij een beschouwing der verschillende waarden van deze tabel moeten we niet uit oog verliezen, dat we bij een vergelijking der waarden van éénzelfde product, volgens beide methoden bepaald, niet te maken hebben met duplo-bepalingen in den strikten zin des woords, doch met bepalingen van een product, dat onder zeer verschillende klimatologische omstandigheden gevormd kan zijn.

Wat betreft eigen bepalingmethoden, deze zijn toegepast op lever²³⁾, melk³⁶⁾, brood en kaas (ongepubliceerd). Als adsorbens werd loodsulfide gebruikt (bij lever en melk was dit niet noodig), terwijl het flavine werd bepaald door meting der gele kleur met den Stufenphotometer en de 2 of 3 cm-cuvette.

Lever: 10 gram lever wordt in een mortier onder toevoeging van een weinig zuiver kwartsand met 75 %-ige methanol zeer fijn gewreven. Na aanvulling tot 100 cm³ wordt het mengsel 24 uur bij 37° C bewaard (in het donker) onder af en toe omschudden. Filtreeren en aan 20 cm³ extract 1 cm³ ijszijn en 2 cm³ 4 %-ige kaliumpermanganaatoplossing toevoegen; na 1 minuut 2 cm³ 3 %-ige waterstofperoxydeoplossing toevoegen, goed omschudden, volume bepalen, filtreeren en meten.

Melk: 50 cm³ methanol worden onder roeren langzaam toegevoegd aan 50 cm³ ontroomde melk, waarna het mengsel 15 min op 60° C wordt gehouden. Na afkoeling tot kamertemperatuur wordt 0.1 cm³ ijszijn toegevoegd en het volume tot 100 cm³ aangevuld met methanol. Schudden en na 15 min staan filtreeren. 70 cm³ filtraat (het geheel wordt beschouwd 100 cm³ te zijn, het volume van het caseïne wordt verwaarloosd) in vacuo indampen tot ongeveer 20 cm³; 0.5 cm³ ijszijn en 1 cm³ 4 %-ige kaliumpermanganaatoplossing toevoegen en na 1 min 1 cm³ 3 %-ige waterstofsperoxydeoplossing. Aanvullen tot 25 cm³ en bepalen.

Brood: 100 gram brood in mortier zeer fijn verdeelen met behulp van 500 cm³ 70 %-ige methanol en het geheel 24 uur bij 37° bewaren (gesloten kolf). Scherp centrifugeeren en residu 2 maal achtereenvolgens met 250 cm³ 70 %-ige methanol gedurende een half uur bij 37° eenige malen omroeren en daarna centrifugeeren (dus totaal 3 maal centrifugeeren). Gecombineerd extract in vacuo indampen tot ongeveer 100 cm³, daarna met water verdunnen tot 200 cm³ en de loodsulfide-suspensie toevoegen (deze wordt bereid door zwavelwaterstof te leiden in 40 cm³ 5 %-ige loodacetaatoplossing (die 0.25 % azijnzuur bevat), waarna door eenige malen decanteeren met water de overmaat zwavelwaterstof wordt verwijderd). Het geheel 10 minuten zacht omzwenken (maatcilinder met stop) en laten bezinken. Daarna decanteeren door een gesinterd glasfilter (Schott 11 G 3), hetwelk een 5 mm laag fijn gepoederde glaswol bevat.

³⁶⁾ A. Emmerie, Compt. rend. 5e Congr. internat. tech. chim. indust. agric. Scheveningen, 1937.

Men voegt aan het in den maatcylinder achterblijvende loodsulfide (welke dus het lactoflavine bevat) 200 cm³ water toe, zwenkt eenige malen voorzichtig om en decanteert opnieuw door het filter. Daarna wordt met behulp van water het loodsulfide op het filter gebracht en daarna zóólang met water gewassen tot het filtraat kleurloos is. Het decanteeren en wasschen van het loodsulfide geschiedt onder zwak zuigen met de waterstraal-luchtpomp, men moet er echter zorg voor dragen, dat het loodsulfide niet drooggezogen wordt, daar dit later bezwaren oplevert bij het elueeren. Het beste is te zorgen, dat er steeds tenminste een laagje water (1 mm) boven het loodsulfide staat. Daarna heeft de elutie plaats en wel als volgt:

Giet 20 cm³ elutiemengsel (bereid uit 80 cm³ water + 20 cm³ pyridine + 2 cm³ ijszijn) op het loodsulfide en laat dit 5 min hierop staan (*niet* zuigen met waterstraal-luchtpomp), daarna langzaam doorzuigen. Herhaal dit met resp. 20, 20 en 10 cm³ elutiemengsel. De laatste twee malen kan men met een glasstaaf het loodsulfide suspendeeren in het elutiemengsel. Het totale eluaat wordt behandeld met 2 cm³ ijszijn en 2 cm³ kaliumpermanganaat 4 % en na 1 min 2 cm³ waterstofsperoxyde 3 %. Na bepaling van het volume snel filtreeren en meten. Wanneer het eluaat zeer weinig flavine bevat, is het gewenscht in vacuo te concentreeren (vóór de behandeling met kaliumpermanganaat etc.).

Kaas. De methode voor kaas lijkt zeer veel op die voor brood, zoodat het alleen noodig is eenige kleine wijzigingen aan te geven. Deze zijn de volgende:

- 1e. 25—50 gram kaas extraheeren met 100—200 cm³ methanol 70 % (24 uur bij 37°) en daarna 2 maal met 50—100 cm³ methanol 70 % (zie brood).
- 2e. Ter verwijdering van vet worden de gezamenlijke extracten 2 maal uitgeschud met 50 cm³ petroleumather, daarna ingedampt in vacuo tot 25—50 cm³ en aangevuld tot 100—200 cm³ met water.

Nogmaals wordt er op gewezen, dat het bij de bepalingen noodzakelijk is te werken bij zeer gedempt daglicht of rood licht.

Lactoflavine en lactoflavine-phosphorzuur. Beide stoffen vertoonen zeer groote overeenkomst in eigenschappen, wat b.v. kleur, absorptie, adsorptie, fluorescentie en vorming van fotoproducten betreft. Theorell¹²⁾ heeft gevonden, dat een scheiding mogelijk is door electrophorese bij p_H 7.2, waarbij het phosphorzuur-flavine zich anodisch beweegt. Voor routine-analyse is deze methode veel te gecompliceerd en te langdurig. Nadat Greene en Black³⁷⁾ hadden gevonden dat benzylalcohol en phenol 90 % zeer geschikt zijn voor het uitschudden van lactoflavine uit waterige oplossing, heb ik dit onderzocht voor flavine-phosphorzuur³⁸⁾. Het bleek, dat benzylalcohol zeer geschikt is om een scheiding tusschen beide componenten te verkrijgen. Deze scheiding is door mij toegepast bij een onderzoek over de uitscheiding van flavinen in urine, omdat de uitscheiding van in water oplosbare vitaminen in de urine een maatstaf kan zijn voor de bepaling van de hoe-

veelheden, die het lichaam noodig heeft (verzadigingstest met vitamine C b.v.).

Reeds vroeger was door mij gevonden³⁹⁾, dat na het innemen van extra hoeveelheden flavinen (vrij en gefosphoryleerd) steeds een sterk verhoogde uitscheiding in de urine optreedt. Tevens bleek, dat de uitscheiding van flavine zeer sterk afhangt van het voedsel. Hierbij werden variaties gevonden van 1250 γ —270 γ per dag, al naarmate het diëet rijk of arm aan flavine was. Met behulp van de scheiding door middel van benzylalcohol is nagegaan, hoe de uitscheiding plaats vindt na het innemen van synthetisch flavine en van een flavine-phosphorzuuroplossing (van beide werd 3 mg ingenomen).

Hierbij bleek het volgende⁴⁰⁾:

- 1e. In normale urine (2 proefpersonen) was de hoeveelheid flavinephosphorzuur 50 %—60 % van de totale hoeveelheid flavine.
- 2e. Na inneming van vrij flavine vond een sterk verhoogde uitscheiding plaats van vrij flavine, de phosphorzuur-flavine-uitscheiding veranderde zeer weinig of niet.
- 3e. Innemen van phosphorzuur-flavine heeft een verhoogde uitscheiding van beide componenten tot gevolg, evenwel is de stijging van de uitscheiding van vrij flavine grooter dan die van phosphorzuur-flavine.

De hoeveelheid flavine, die de mensch dagelijks noodig heeft, is nog niet nauwkeurig bekend. Vermoedelijk ligt deze hoeveelheid beneden de 3 mg voor een volwassen persoon, aangezien ik tot nu toe steeds bij toediening van deze hoeveelheid aan diverse individuen, waarbij sommigen een zeer flavine-arm diëet volgden, een verhoogde uitscheiding heb kunnen constateeren.

Dr. M. van Eekelen sprak over „*Het ascorbinezuur (vitamine C) en zijn chemische bepaling in voedingsmiddelen*”.

De bevolking van Nederland verkrijgt het ascorbinezuur voornamelijk door het eten van aardappels, groenten en vruchten. In brood is het vitamine niet, in vlees slechts in geringe hoeveelheid aanwezig. Met het invoeren van de aardappel als volksvoedsel in de loop der 18e eeuw, heeft men dan ook de scheurbuik als volksziekte zien verdwijnen.

Voor de zuigelingen en jonge kinderen is de melk van belang als bron van ascorbinezuur, maar daarnaast zijn het ook hier de groenten en vruchten, die al spoedig in de behoefte aan ascorbinezuur moeten voorzien.

Het zullen dus in de eerste plaats deze voedingsmiddelen zijn, die onze aandacht moeten hebben wat betreft hun gehalte aan ascorbinezuur en wat betreft de factoren, die invloed op dit gehalte uitoefenen.

De chemische bepaling van ascorbinezuur.

Nadat Tillmans c.s.¹⁾ hadden gevonden, dat

³⁹⁾ A. Emmerie, Nature 138, 164 (1936); Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 6, 108, 136 (1936); Nederland. Tijdschr. Geneeskunde 80, 3621 (1936); Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 7, 71 (1937).

⁴⁰⁾ A. Emmerie, Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 8 (1938); Nederland. Tijdschr. Geneeskunde 82, 2644 (1938).

¹⁾ Tillmans c.s., Z. Untersuch. Lebensm. 60, 34 (1930); 63, 1, 21, 24, 267, 276 (1932).

³⁷⁾ R. D. Greene en A. Black, J. Am. Chem. Soc. 59, 1820 (1937).

³⁸⁾ A. Emmerie, Nature 141, 416 (1938).

het reductievermogen van plantenextracten t.o.v. 2:6-dichloorphenolindophenol parallel loopt met de antiscorbutische werking, was de mogelijkheid gegeven het vitamine C met behulp van deze redoxindicator chemisch te bepalen. Door de spoedig daarna volgende ontdekking van Szent-Györgyi²⁾, dat het door hem reeds eerder kristallijn geïsoleerde sterk reducerende hexuronzuur identiek is met vitamine C (nadien ascorbinezuur genoemd), kwam de chemische bepaling op een goed, gefundeerde bodem te staan.

Wanneer men de methoden voor de chemische bepaling van ascorbinezuur, die de laatste jaren zijn beschreven en toegepast, aan een kritisch onderzoek onderwerpt, dan zijn het steeds weer de volgende eisen, die men ter beoordeling van hun waarde moet stellen:

1. De methode moet zo specifiek mogelijk zijn. Aangezien de meeste methoden berusten op het reducerend vermogen van ascorbinezuur, moet men in het oog houden, dat dit geen specifieke eigenschap is van deze stof. Andere reducerende stoffen kunnen dus bij de bepaling storen en moeten dan of worden verwijderd, of worden verhinderd te interfereren.

2. Ascorbinezuur kan in het te onderzoeken materiaal geheel of gedeeltelijk in reversibel geoxydeerde vorm (dehydroascorbinezuur) aanwezig zijn of tijdens de extractie in deze vorm overgaan. Daar het dehydroascorbinezuur eveneens antiscorbutisch werkzaam is, kan men slechts die methoden goed noemen, waarbij ook het dehydroascorbinezuur wordt bepaald.

3. Vooral wanneer het in de dehydrovorm aanwezig is, kan ascorbinezuur gemakkelijk verder irreversibel oxyderen, waarbij zowel de antiscorbutische als de reducerende eigenschappen voorgoed verloren gaan. Er moet dus voor worden gezorgd, dat deze oxydatie niet optreedt gedurende de bepaling.

Beschouwen wij thans de verschillende methoden nader, dan kan men deze in drie groepen verdelen: titrimetrische, colorimetrische en spectrografische methoden.

I. Titrimetrische methoden.

De meest gebruikte methode is de titratie met 2:6-dichloorphenolindophenol volgens Tillmans. In neutraal of zwak zuur milieu uitgevoerd, is zij echter zeer onspecifiek; ferrozouten, glutathion, cysteine, ergothioneine, thiosulfaat, glucoreducton, tanninen ontkleuren o.a. eveneens de indicator. Een verbetering was daarom de modificatie, die door Birch c.s.³⁾ werd aangebracht. Zij extraheren het te onderzoeken materiaal door het met kwartszand en trichloorazijnzuur 5% in een mortier grondig fijn te wrijven. Na filtratie wordt het ascorbinezuur in trichloorazijnzuurmilieu getitreerd. Bij $p_H < 2.5$ (Martius en von Euler⁴⁾) wordt de reductie van ferrozouten en glutathion uitgeschakeld. Op deze wijze wordt ook thans nog door vele onderzoekers het ascorbinezuurgehalte van voedingsmiddelen bepaald.

Aangezien ascorbinezuur in trichloorazijnzuur niet stabiel is, zijn andere zuren als extractiemiddel aanbevolen, bijv. metaphosphorzuur 5% (Fujita en Iwatake⁵⁾), sulfosalicylzuur 8% (Wachholder

en Podesta⁶⁾), warm azijnzuur 8% (Bessey en King⁷⁾), kokend zwavelzuur 2% (Mathiesen en Aschehoug⁸⁾), terwijl door Wachholder en Podesta het ascorbinezuur nog wordt gestabiliseerd door toevoeging van glutathion. In metaphosphorzuur is het vitamine inderdaad zeer stabiel, wat door verschillende onderzoekers kon worden bevestigd. Volgens Fujita en Ebihara⁹⁾ is de stabiliteit in sulfosalicylzuur, zelfs na toevoeging van glutathion niet volkomen. Het extraheren met zuren, vooral met sterke zuren als zwavelzuur, onder verwarming, is niet aan te bevelen, aangezien hierbij uit pectinen reductinezuur kan ontstaan, dat evenals ascorbinezuur de indicator ontkleurt (Reichstein, en Oppenauer¹⁰⁾; van Eekelen¹¹⁾).

In vele publicaties wordt geen rekening gehouden met de eventuele aanwezigheid van dehydroascorbinezuur. Reeds Tillmans¹²⁾ en Johnson¹³⁾ hebben erop gewezen, dat reductie met H_2S nodig is, om het dehydroascorbinezuur over te voeren in ascorbinezuur en zodoende voor de titratie toegankelijk te maken. Soms kan het dehydroascorbinezuur in het te onderzoeken materiaal van meet af aan aanwezig zijn, maar meestal ontstaat het wanneer verse groenten of vruchten voor de extractie worden fijngemaakt. In een groot aantal planten komen n.l. oxydases voor, die, zodra de cellen worden stukgemaakt, vrijkomen en het ascorbinezuur ogenblikkelijk tot dehydroascorbinezuur oxyderen (Szent-Györgyi¹⁴⁾, von Euler¹⁵⁾, Zilva¹⁶⁾, Tauber c.s.¹⁷⁾, van Eekelen¹⁸⁾, Mack¹⁹⁾, Neuweiler²⁰⁾, Spruyt en Donath²¹⁾ en vele anderen). Door koken worden de oxydases vernietigd, terwijl door trichloorazijnzuur 3% hun werking wordt geremd. Wanneer men dus zorgt, dat het fijnwrijven bij de extractie onder trichloorazijnzuur geschiedt, dan zal men de werking der oxydases aanmerkelijk kunnen beletten. Toch blijft ook dan nog de mogelijkheid bestaan, dat een gedeelte van het ascorbinezuur reversibel wordt geoxydeerd, zodat reductie met H_2S steeds wenselijk is. Dit wordt gedemonstreerd in tabel I en II, waarin de resultaten zijn samengevat van de ascorbinezuurbepalingen in stukjes van een en dezelfde aardappel na extractie met en zonder trichloorazijnzuur en door titratie vóór en na behandeling met H_2S (tabel I). Dezelfde bewerkingen geschieden met een gekookte

⁶⁾ Wachholder en Podesta, Z. physiol. Chem. 239, 149 (1936).

⁷⁾ Bessey en King, J. Biol. Chem. 103, 687 (1933).

⁸⁾ Mathiesen en Aschehoug, Arch. Math. Naturvidenskab 41, no. 8 (1937).

⁹⁾ Fujita en Ebihara, Biochem. Z. 290, 172 (1937).

¹⁰⁾ Reichstein en Oppenauer, Helv. Chim. Acta 16, 988 (1933).

¹¹⁾ van Eekelen, Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol. 4, 137 (1934).

¹²⁾ Tillmans c.s., Z. Untersuch. Lebensm. 63, 276 (1932); 65, 145 (1933).

¹³⁾ Johnson, Biochem. J. 27, 1287 (1933).

¹⁴⁾ Szent-Györgyi, Biochem. J. 22, 1387 (1928).

¹⁵⁾ von Euler en Klusmann, Z. physiol. Chem. 219, 215 (1933).

¹⁶⁾ Zilva, Biochem. J. 28, 663 (1934).

¹⁷⁾ Tauber, Kleiner en Mishkind, J. Biol. Chem. 110, 211 (1935).

¹⁸⁾ van Eekelen, Nature 136, 144 (1935).

¹⁹⁾ Mack, Nature 138, 505 (1936).

²⁰⁾ Neuweiler, Klin. Wochschr. 15, 856 (1936).

²¹⁾ Spruyt en Donath, Geneeskund. Tijdschr. Nederland, Indië 77, 2601 (1937).

²⁾ Svirebely en Szent-Györgyi, Biochem. J. 26, 865 (1932).

³⁾ Birch, Harris en Ray, Biochem. J. 27, 590 (1933).

⁴⁾ Martius en von Euler, Biochem. Z. 271, 9 (1934).

⁵⁾ Fujita en Iwatake, Biochem. Z. 277, 293 (1935).

aardappel (tabel II). Bovendien werd in een paar gevallen nog extra ascorbinezuur toegevoegd.

Tabel I.
mg ascorbinezuur per 10 g van eenzelfde aardappel
onder verschillende extractievoorwaarden.

1. Fijngewreven onder trichloorazijnzuur 3% . . .	3.05
2. Extract (1) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	3.11
3. Fijngewreven zonder trichloorazijnzuur . . .	0
4. Extract (3) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	3.11
5. Fijngewreven onder trichloorazijnzuur na toevoeging van 2.25 mg ascorbinezuur . . .	5.36
6. Extract (5) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	5.35
7. Fijngewreven zonder trichloorazijnzuur na toevoeging van 2.25 mg ascorbinezuur . . .	0.36
8. Extract (7) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	5.35

Tabel II.
mg ascorbinezuur per 10 g van eenzelfde aardappel
vóór en na koken.

1. Fijngewreven onder trichloorazijnzuur 3% vóór het koken . . .	3.18
2. Extract (1) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	3.21
3. 45 min. gekookt, vervolgens aangewreven met trichloorazijnzuur . . .	2.67
4. Extract (3) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	2.59
5. 45 min. gekookt, vervolgens aangewreven zonder trichloorazijnzuur . . .	2.59
6. Extract (5) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	2.48
7. Fijngewreven, daarna 45 min. gekookt . . .	0
8. Extract (7) na behandeling met mercuriacetaat en H ₂ S . . .	0.13

Eenige onderzoekers (Ahmad²²), Mc. Henry en Graham²³), Guha en Pal²⁴), Levy²⁵) hebben gevonden, dat in sommige groenten, nadat zij gekookt zijn, meer ascorbinezuur wordt aangetroffen dan in ongekookte. Zij verklaarden dit door te veronderstellen, dat een gedeelte van het vitamine in een gebonden, niet reducerende vorm, voorkomt. Door koken zou uit deze verbinding het ascorbinezuur worden vrijgemaakt. Ik heb gemeend dit verschijnsel te moeten toeschrijven aan fouten in de techniek der ascorbinezuurbepaling en wel aan het niet voldoende elimineren van de oxydasewerking tijdens de extractie der verse groenten (van Eekelen¹⁸). Aangezien in de gekookte groenten de oxydasen vernietigd zijn, zal men hierin dan schijnbaar meer vinden. In de door mij onderzochte groenten, waarbij steeds de extracten met H₂S werden behandeld, heb ik nooit een stijging van het ascorbinezuurgehalte kunnen constateren, echter meestal wel een daling. Dit wordt gedemonstreerd door de gegevens uit tabel I en II.

Door Mack¹⁹) en Harris²⁶) werd deze zienswijze gedeeld. In een onlangs verschenen publicatie voeren Reedman en Mc. Henry²⁷) echter nieuwe bewijzen aan voor de aanwezigheid van aan eiwit gebonden ascorbinezuur. Deze verbinding zou

niet oplosbaar zijn in trichloorazijnzuur, maar wel in water. Door behandeling met verdund zoutzuur kon het ascorbinezuur uit de verbinding worden afgesplitst; de antiscorbutische werking werd door proeven met caviae vastgesteld. Hoewel het natuurlijk a priori niet uitgesloten is dat het ascorbinezuur in gebonden vorm kan voorkomen, zal verder onderzoek moeten uitmaken in hoeverre genoemde onderzoekers gelijk hebben.

Door Tauber en Kleiner²⁸) is een bepalingmethode voor ascorbinezuur gepubliceerd, waarbij van de werking van een ascorbinezuur-oxydase wordt gebruik gemaakt. Wanneer men n.l. een mengsel heeft van ascorbinezuur en andere indophenol reducerende stoffen, zou men hierin het ascorbinezuur kunnen bepalen door eerst het mengsel te titreren, vervolgens eenzelfde mengsel aan de inwerking van de oxydase bloot te stellen (waardoor alleen het ascorbinezuur wordt geoxydeerd) en dan de overgebleven reducerende stoffen weer te titreren. Uit het verschil van beide titratiewaarden is dan de hoeveelheid ascorbinezuur te berekenen. Hierbij moet men echter zeker zijn, dat de oxydase specifiek is voor ascorbinezuur. Dat dit niet altijd het geval is, werd aangetoond door Silva²⁹), die vond, dat de ascorbinezuuroxydase uit appels ook werkt op het antiscorbutisch onwerkzame d-gluco-ascorbinezuur. De methode is nog slechts op een gering aantal voedingsmiddelen toegepast (Srinivasan³⁰), waarbij bleek, dat geen noemenswaardige verschillen werden gevonden met de directe titratie (1.5—3%).

Door Emmerie en van Eekelen³¹) is een modificatie van de methode-Tillmans—Birch c.s. gegeven, waardoor de specificiteit wordt verhoogd en tevens het dehydroascorbinezuur in de bepaling wordt betrokken. De methode werd oorspronkelijk vooral uitgewerkt voor de ascorbinezuurbepaling in dierlijke weefsels en lichaamsvloeistoffen, waarin over het algemeen meer andere, de bepaling storende, reducerende stoffen voorkomen dan in planten. De methode kan echter zeer goed bij plantaardig materiaal worden toegepast; zij heeft dan tevens het voordeel, dat er kleurstoffen, die de titratie belemmeren, mee worden verwijderd.

De bepaling geschiedt als volgt:

10—20 g van het te onderzoeken voedingsmiddel worden in een mortier met kwartszand en ongeveer 20 cm³ trichloorazijnzuur 3% zo vlug mogelijk grondig fijn gewreven. Daarna wordt de inhoud van het mortier met trichloorazijnzuur 3% in een maatcilinder van 100 cm³ overgespoeld, waarbij ervoor wordt gezorgd, dat het kwartszand achter blijft. Vervolgens wordt aangevuld tot 100 cm³, de inhoud goed gemengd en gefiltreerd of, indien het extract slecht filtreert, gecentrifugeerd. Aangezien ascorbinezuur in trichloorazijnzuur niet stabiel is, wordt nu 20 cm³ van het extract in een centrifugebuis geneutraliseerd met CaCO₃. Het extract reageert dan zuur t.o.v. lakmoes-, doch niet t.o.v. congopapier. Thans wordt zoveel van een mercuriacetaatoplossing 20% toegevoegd tot alle te precipiteren stoffen neergeslagen zijn. Hieronder bevinden zich cysteine, glutathion, ergothioneine,

²⁸) Tauber en Kleiner, J. Biol. Chem. 110, 559 (1935).

²⁹) Silva, Biochem. J. 30, 1215 (1936).

³⁰) Srinivasan, Biochem. J. 31, 1524 (1937).

³¹) Emmerie en van Eekelen, Biochem. J. 28, 1153 (1934); 30, 25 (1936).

²²) Ahmad, Nature 136, 797 (1935).

²³) Mc. Henry en Graham, Biochem. J. 29, 2013 (1935).

²⁴) Guha en Pal, Nature 137, 946 (1936).

²⁵) Levy, Nature 138, 933 (1937).

²⁶) Harris, Compt. rend. 5e Congr. internat. tech. chim. indust. agric. Scheveningen, 1, 112 (1937).

²⁷) Reedman en Mc. Henry, Biochem. J. 32, 85 (1938).

thiosulfaat en tanninen. Bij een te grote overmaat van kwikacetaat gaat een gedeelte van het precipitaat weer in oplossing; deze moet dus worden vermeden. Het ascorbinezuur blijft in oplossing, wordt echter door het mercuriacetaat reversibel geoxydeerd, zodat het, om verliezen door verdere oxydatie te vermijden, noodzakelijk is het precipitaat zo vlug mogelijk af te centrifugeren, de bovenstaande vloeistof te decanteren en met H_2S te doorstromen. Nadat het overtollige kwik als sulfide geprecipiteerd is, wordt dit afgefilterd. De thans heldere kleurloze vloeistof wordt in een wijde reageerbuis met H_2S verzadigd, de buis met een kurk goed afgesloten en in het donker tot de volgende dag bewaard. Dan wordt de H_2S door middel van een koolzuurstream, die gedurende ongeveer een uur door de vloeistof wordt geleid, verdreven, wat wordt gecontroleerd met een loodacetaatpapiertje. Vervolgens worden, afhankelijk van de hoeveelheid ascorbinezuur, die erin aanwezig is, 1—10 cm^3 van het extract in een wit porceleinen schaalje aangezuurd met trichloorazijnzuur tot een concentratie van ongeveer 2% trichloorazijnzuur en getitreerd met een oplossing van 2:6-dichloorphenolindophenol 0.02%.

Hoewel er door de precipitatie met kwikacetaat veel storende stoffen worden verwijderd, zo is dit toch niet met alle het geval. Glucoreducton, dat uit koolhydraten kan ontstaan, wanneer deze droog worden verhit en dat bijv. voorkomt in brood en koek, kan op deze wijze niet worden verwijderd. Verder kan de kwikacetaatmethode ook niet worden toegepast voor de bepaling van ascorbinezuur in bijniere. Er ontstaat hier n.l. door de inwerking van het kwikacetaat en H_2S een reducerend adrenalinederivaat, dat eveneens in zuur milieu de indicator ontkleurt (van Eekelen³²).

Voor de titratie van sterk gekleurde extracten kan men behalve van de kwikacetaatmethode ook gebruik maken van de titratietechniek, zoals deze door Tillmans, Hirsch en Jackisch³³, en door Mc. Henry en Graham²³ is beschreven. Zij is gebaseerd op het feit, dat de meeste plantenkleurstoffen niet oplosbaar zijn in nitrobenzol of chloroform, terwijl dichloorphenolindophenol door deze organische oplosmiddelen uit een waterige oplossing kan worden uitgeschud. Door het te titreren extract te schudden met nitrobenzol of chloroform, kan men het eindpunt der titratie bepalen; dit is bereikt wanneer de chloroform door de indicator rood gekleurd wordt.

Een geheel andere titrimetrische methode voor de bepaling van ascorbinezuur werd door Martini en Bonsignore³⁴ beschreven. Zij berust op het verschijnsel, dat ascorbinezuur in zuur milieu en onder sterke belichting methyleenblauw ontkleurt. Het voordeel van deze methode is, dat zij specifiek is dan de titratie met dichloorphenolindophenol; de daar genoemde organische zwavelverbindingen en thiosulfaat reduceren methyleenblauw niet. Deze stoffen kunnen echter voor de titratie met dichloorphenolindophenol

met mercuriacetaat worden verwijderd. Glucoreducton reduceert zowel dichloorphenolindophenol als methyleenblauw, zodat wat dit betreft de methode geen voordelen heeft. Daarentegen zijn er nog wel enige nadelen aan verbonden. De mate van reductie van het methyleenblauw is n.l. afhankelijk van de p_{H^+} , zodat steeds bij een constante p_{H^+} moet worden gewerkt of een correctie moet worden aangebracht voor verschillende p_{H^+} 's (Neuweiler³⁵). Volgens Fujita en Ebihara⁹), die de ontkleuring van het methyleenblauw met de stufenphotometer van Zeiss hebben gemeten, is de invloed van het milieu en van verschillende bijmengsels dermate gecompliceerd, dat zij aan deze bepalingmethode niet veel waarde toekennen.

II. Colorimetrische methoden.

Een aantal colorimetrische ascorbinezuurbepalingen zijn gepubliceerd geworden. Zij zijn echter over het algemeen minder specifiek dan de titratie met dichloorphenolindophenol. Dit geldt bijv. voor de reactie volgens Bezssonoff³⁶) met monomolybdophosphorwolframaamzuur (kritiek o.a. door Wachholder en Podesta⁶) en von Euler³⁷). De methode van Tauber en Kleiner³⁸), waarbij ascorbinezuur in zuur milieu ferricyanide tot ferrocyanide reduceert, waarna het ferrocyanide als Berlijnsblauw colorimetrisch wordt bepaald, is niet specifiek dan de titratie volgens Tillmans. De reactie volgens Fujita c.s.³⁹) met phosphorwolframaamzuur en NaOH is zeer onspecifiek en weinig stabiel (kritiek door Wachholder en Podesta⁶), van Eekelen⁴⁰), Fujita en Ebihara⁹). Hetzelfde geldt voor de reactie volgens Medes⁴¹) met phospho-18-wolframaamzuur bij p_{H^+} 5. Specifieker wordt deze reactie, indien zij uitgevoerd wordt bij p_{H^+} 2 (Wachholder en Podesta⁶)); de sterkte der kleurreactie is echter afhankelijk van de p_{H^+} en slechts proportioneel aan de ascorbinezuurconcentratie tot 1.5 mg%.

Meer specifiek schijnt de modificatie van deze methode volgens Fujita en Ebihara⁴²). Hierbij wordt gereageerd met Folin's reagens in een sterk gebufferde oplossing van p_{H^+} 3. Andere reagerende stoffen worden met monojoedazijnzuur in hun reactie geremd, terwijl bovendien de extracten eerst nog worden gezuiverd met kwikacetaat en loodacetaat. Aangezien er een zeer goede overeenkomst bestaat tussen de resultaten, die verkregen worden met deze methode en die met de dichloorphenolindophenol-titratie, verdient m.i. de laatstgenoemde methode door haar eenvoudigheid de voorkeur.

III. Spectrografische methode.

Tenslotte moet deze methode, die op een geheel ander principe berust, nog worden genoemd. Ascorbinezuur vertoont in neutraal milieu een absorptie-

³⁵) Neuweiler, *Klin. Wochschr.* **15**, 854 (1936).

³⁶) Bezssonoff, *Z. Vitamin f.* **5**, 193 (1936).

³⁷) von Euler en Burstroem, *Biochem. Z.* **283**, 153 (1936).

³⁸) Tauber en Kleiner, *J. Biol. Chem.* **108**, 563 (1935).

³⁹) Fujita, Iwatake en Miyata, *Biochem. Z.* **277**, 296 (1935).

⁴⁰) van Eekelen, *Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol.* **5**, 41 (1935).

⁴¹) Medes, *Biochem. J.* **29**, 2251 (1935).

⁴²) Fujita en Ebihara, *Biochem. Z.* **290**, 182, 192 (1937).

³²) van Eekelen, *Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol.* **7**, 68 (1937).

³³) Tillmans, Hirsch en Jackisch, *Z. Untersuch. Lebensm.* **63**, 241 (1932).

³⁴) Martini en Bonsignore, *Biochem. Z.* **273**, 170 (1934).

band bij 265 $m\mu$ (Bowden en Snow⁴³), Herbert c.s.⁴⁴). De ligging van deze band is echter afhankelijk van de ascorbinezuur-concentratie en van de p_{H} en van de aard van het oplosmiddel (Skarzynski⁴⁵). Hiermede en met de mogelijke aanwezigheid van stoffen, die in hetzelfde gebied absorptie vertonen, dient bij quantitative bepalingen rekening te worden gehouden (Plaut c.s.⁴⁶), De Loureiro⁴⁷), Chevallier en Choron⁴⁸), van Eekelen c.s.⁴⁹). Voor routine-onderzoek komt deze methode zeker niet in aanmerking.

Wanneer wij dus de chemische methoden voor de bepaling van ascorbinezuur kritisch bezien, dan komt men tot de conclusie, dat geen enkele methode specifiek is. Voor routine-onderzoek lijkt mij de titratie met 2:6-dichloorphenolindophenol in zuur milieu het meest geschikt. Deze titratie kan slechts in weinig gevallen worden uitgevoerd zonder voorafgaande behandeling der extracten met kwikacetaat en H_2S . Voor dierlijke weefsels en lichaamsvloeistoffen is deze behandeling vooral noodzakelijk ter verwijdering van storende reducerende stoffen en, wat plantaardig materiaal aangaat, met het oog op de reductie van dehydroascorbinezuur. De meest specifieke methode is misschien die volgens Tauber en Kleiner²⁸) met behulp van een ascorbinezuuroxydase, eventueel nog gecombineerd met een zuivering der extracten door precipitatie met kwikacetaat, zoals dit bijv. door Scarborough en Stewart⁵⁰) voor de bepaling van ascorbinezuur in urine is uitgewerkt. Indien het mocht blijken, dat ascorbinezuur gedeeltelijk in gebonden vorm aanwezig kan zijn, zoals dit door Reedman en McHenry²⁷) voorgesteld wordt, zal hiermee bij de bepaling rekening moeten worden gehouden. Een splitsing van deze verbinding zou dan aan de titratie vooraf moeten gaan.

Factoren welke een invloed hebben op het ascorbinezuurgehalte van de voedingsmiddelen.

Men zou de resultaten van de ascorbinezuurbepalingen in voedingsmiddelen graag willen samenvatten in een tabel, op dezelfde wijze als dit reeds voor het eiwit-, koolhydraten- en vetgehalte en de calorische waarde van de meeste voedingsmiddelen is geschied. Aan de hand van zo'n tabel zou men dan, de hoeveelheden voedingsmiddelen, die iemand dagelijks eet, kennende, kunnen berekenen hoeveel ascorbinezuur dagelijks wordt opgenomen. Zoals uit het volgende zal blijken, is dit echter voor ascorbinezuur vrijwel onmogelijk. Er zijn n.l. zovele en zo wisselende factoren, die een sterke invloed uitoefenen op het vitaminegehalte, dat dit voor een zelfde voedingsmiddel binnen wijde grenzen kan wisselen.

Genetische factoren. Om slechts enkele voorbeelden te geven van het variërend gehalte bij verschillende rassen, geef ik in de volgende tabellen (tabel

⁴³) Bowden en Snow, Nature, 129, 720 (1932).

⁴⁴) Herbert c.s., J. Chem. Soc. 143, 1280 (1933).

⁴⁵) Skarzynski, Bull. Akad. Polon. Sci. 462 (1937).

⁴⁶) Plant, Bülow en Pruckner, Z. physiol. Chem. 234, 131 (1935).

⁴⁷) de Loureiro, Bull. soc. chim. biol. 18, 757 (1936).

⁴⁸) Chevallier en Choron, Bull. soc. chim. biol. 19, 511 (1937).

⁴⁹) van Eekelen c.s., Klin. Wochschr. 13, 564 (1934).

⁵⁰) Scarborough en Stewart, Biochem. J. 31, 2232 (1937).

III en IV) enige bepalingen van aardappels (volgens Ydo⁵¹) en sinaasappels (volgens Olliver⁵⁷)), twee voedingsmiddelen, die voor de voorziening van onze bevolking met ascorbinezuur van het grootste belang zijn.

Tabel III.
Aardappels, mg ascorbinezuur per 100 g.

Ras	Groeiplaats	mg
Eigenheimer	Wageningen	13.5
Bintje	"	17.5
Bintje	Goes	15.3
Frühmölle	Wageningen	20.0
Iris	"	13.3
Iris	Goes	10
Alberta	Wageningen	14.3
Alberta	Goes	12.3
Limosa	Wageningen	13.0
Record	Dedemsvaart	8.4
Eersteling	"	14.0
Dunbar Yeoman	"	11.0

Tabel IV.
Sinaasappels, mg ascorbinezuur per 100 cm³ sap.

Sevilla	19—45
Jaffa	33—54
Brazilië	53—62
Spaans Burriana	52—66
Spaans Valencia	50
Californië	63—71
Zuid-Afrika	77

Bemesting. Zowel bemesting met stikstof als met kalium doet het ascorbinezuurgehalte toenemen (Ydo⁵³) onderzocht voor spinazie).

Oogsttijd. Het gehalte van vruchten neemt tijdens de rijping toe; anderzijds wordt bijv. in jonge erwten meer ascorbinezuur gevonden dan in oudere (Olliver⁵⁴)).

Verdeling in de plant. Verschillende delen van een plant kunnen een zeer verschillend gehalte hebben. In de bladeren is meer aanwezig dan in de stengels, bijv. in spinazie $2\frac{1}{2}$ keer meer (Ydo⁵³)). In de schil der meeste vruchten wordt belangrijk meer gevonden dan in het binnenste deel; bijv. per gewichtseenheid bij appels 5 maal, bij peren 2 maal, bij sinaasappels 3—6 maal meer (Bracewell⁵⁵), Bacharach⁵⁶), Olliver⁵⁷). Bij asperges zijn de verhoudingen van het gehalte in de top, het midden en het onderste deel van de stengel ongeveer als 6:3:1 (Olliver⁵⁷)).

Bereidingswijze van het voedsel. Door het koken gaat bijna steeds een gedeelte van het ascorbinezuur verloren. Hiervoor zijn twee oorzaken te noemen: 1° irreversibele oxydatie van het vitamine, 2° extractie van ascorbinezuur door het kookwater, dat vaak wordt weggeworpen. Het verschijnsel van de irreversibele oxydatie wordt gedemonstreerd door de gegevens uit tabel II, No. 2 en 4 (bij dit onderzoek werd het kookwater niet weggeworpen).

Een zeer groot verlies kan optreden, wanneer een

⁵¹) Ydo, Landbouwkund. Tijdschr. 49 (1937).

⁵²) Wachholder, Biochem. Z. 295, 237 (1938).

⁵³) Ydo, Biochem. J. 30, 2307 (1936).

⁵⁴) Olliver, Analyst 63, 2 (1938).

⁵⁵) Bracewell c.s., Biochem. J. 25, 138 (1931).

⁵⁶) Bacharach, Cook en Smith, Biochem. J. 28, 1038 (1934).

⁵⁷) Olliver, J. Soc. Chem. Ind. 55, 153 (1936).

oxydase bevattende groente voor het koken wordt fijn gemaakt. Het ascorbinezuur gaat dan voor een groot gedeelte in de dehydrovorm over, die tijdens het koken verder gemakkelijk irreversibel wordt geoxydeerd (zie ter illustratie tabel II, No. 7 en 8).

Het ascorbinezuurgehalte van melk wordt door huishoudelijk koken slechts weinig beïnvloed; daarentegen daalt het gehalte aanmerkelijk tijdens langdurig transport (oxydatie door schudden: Meulemans en de Haas⁵⁸) en bij technisch niet goed uitgevoerde pasteurisatie (van Wijngaarden⁵⁹). Het gehalte van melk, die gepasteuriseerd is volgens het Stassano-proces en dergel., is praktisch gelijk aan dat van rauwe melk (van Wijngaarden⁵⁹). Door belichting van de melk gaat het vitamine over in de dehydrovorm (Kon en Watson⁶⁰).

Verlenging van de kooktijd, bijv. door gebruik te maken van een kookkist, heeft een ongunstige invloed op het ascorbinezuurgehalte (zie tabel V volgens Wachholder⁵²).

Tabel V.
Aardappels, mg ascorbinezuur per 100 g.

Soort	Rauw	15 min. gekookt	5 min. gekookt daarna in kookkist	
			1 uur	3½-4 uur
Edelragis	16.3	16.3	9.8	6.1
Johannsen	15.5	12.7	9.4	6.7
Preuszen	13.2	12.6	4.8	1.9
Juliniere	13.9	8.4	6.2	4.3

Ook het fijnmaken van de warme gekookte groenten en aardappels en het mengen hiervan, zoals dit voor het maken van stampotten geschiedt, heeft verlies door oxydatie tot gevolg. Wanneer aardappels ongeschild worden gekookt, is het verlies geringer dan bij geschild; dit is zeer klein, indien de aardappelen ongeschild worden gestoomd (Scheunert⁶¹, Wachholder⁵²).

Conserveren. Evenals bij het huishoudelijk koken, gaat bij het conserveren van groenten en vruchten een gedeelte van het ascorbinezuur verloren. Bij de meeste onderzoekingen, die hierover zijn verricht, werd de conserve zonder meer vergeleken met de verse of met huishoudelijk gekookte groenten. Het resultaat was dan, dat er door het conserveren wel een gedeelte van het ascorbinezuur verloren gaat, echter niet meer doch eerder minder dan bij huishoudelijk koken. Deze vergelijking is echter niet juist. De geconserveerde groenten worden n.l. vóór het gebruik eerst verwarmd en juist dan kan weer een gedeelte van het ascorbinezuur verloren gaan. Het blijkt dan ook, dat men in de conserven, die op deze wijze zijn behandeld, minder ascorbinezuur vindt dan in huishoudelijk gekookte groenten (zie tabel VIII). Het toevoegen van kopersulfaat tijdens het blancheren der conserven (ter verkrijging van een mooie groene kleur) heeft, gezien de katalytische werking van koper bij de oxydatie van ascorbinezuur, een zeer

⁵⁸) Meulemans en de Haas, Geneesk. Tijdschr. Nederland, Indië 76, 2277 (1936).

⁵⁹) van Wijngaarden, Diss., Utrecht (1935).

⁶⁰) Kon en Watson, Biochem. J. 30, 2273 (1936).

⁶¹) Scheunert c.s., Biochem. Z. 290, 313 (1937).

⁶²) van Eekelen, Diss., Utrecht (1936).

funeste invloed op het ascorbinezuurgehalte (Mathiesen en Aschehoug⁸), e.a.).

Het bewaren van groenten heeft eveneens een zeer ongunstige invloed (zie tabel VI volgens Ydo⁵³) en tabel VII volgens Wachholder⁵²). Het bleek, dat de bestendigheid van het ascorbinezuur tijdens het bewaren voor verschillende aardappellrassen verschillend is (Wachholder⁵²).

Tabel VI.
Spinazie, mg ascorbinezuur per 100 g.

Aantal dagen bewaard	kamertemp.	ijskast
0	60	60
1	49	45
3	23	49
5	8	21

Tabel VII.
Variatiebreedte en gemiddelde van 15 aardappellrassen mg ascorbinezuur per 100 g.

	rauw		gekookt	
	van — tot	gemiddeld	van — tot	gemiddeld
October	21.5—32	24.2	13.1—23.4	17.9
November	15.6—26.2	20.2	10.6—18.6	15.3
Februari	7.4—19.2	13.9	6.7—16.6	11.7
April	6.4—13.8	10.0	5.2—12.8	8.2
Juni	6.8—12.8	8.9	5.5—9.3	7.7

Uit het bovenstaande blijkt dus wel, hoe moeilijk het is een enigszins nauwkeurige schatting te maken van de hoeveelheid ascorbinezuur, die door onze bevolking dagelijks in verschillende perioden van het jaar wordt genuttigd, ook al is er door voedings-enquêtes goed bekend hoeveel en welke voedingsmiddelen er worden gegeten. Om toch enig idee te krijgen van de hoeveelheid ascorbinezuur, die men in onze voedingsmiddelen kan aantreffen, zie men tabel VIII (van Eekelen⁶³). De bepalingen werden direct nadat de groenten waren gekookt verricht; de groenten uit blik en uit het zout werden vóór de bepaling verwarmd resp. gekookt. De gegevens voor vruchten hebben betrekking op het eetbare gedeelte, dus zonder schil of pit. In een aantal gevallen werd de titratie vóór en na behandeling met kwikacetaat en H₂S uitgevoerd. Meestal zijn de waarden na deze behandeling hoger, wat wijst op de aanwezigheid van dehydroascorbinezuur.

Wil men onderzoeken, of er in bepaalde jaargetijden een tekort aan ascorbinezuurgebruik bij onze bevolking of bij een deel ervan bestaat, dan zal men om bovengenoemde redenen door voedings-enquêtes slechts een zeer onnauwkeurig inzicht hierin krijgen. Men zal beter doen van andere methoden dan dieet-onderzoek gebruik te maken. Zo'n methode is bijv. het onderzoek naar het ascorbinezuurgehalte van het bloed van de betrokken personen. Volgens onze onderzoekingen (van Eekelen, Emmerie en Wolff⁶³) bestaat er een evenredigheid tussen het ascorbinezuurgehalte van het bloed en de hoeveelheid ascorbinezuur, die dagelijks wordt gebruikt. Bij een

⁶³) van Eekelen, Emmerie en Wolff, Z. Vitaminf. 6, 150 (1937).

optimale voorziening met het vitamine is het ascorbinezuurgehalte van het bloed groter dan 12 mg per l, een waarde van 8 mg per l wordt door ons nog als voldoende gerekend. Waarden, lager dan 4 mg per l, zijn slecht te noemen; dalen deze tot minder dan 2 mg, dan kunnen klinische verschijnselen van scheurbuik optreden. In de volgende grafiek zijn de resultaten weergegeven van een dergelijk onderzoek, dat uit-

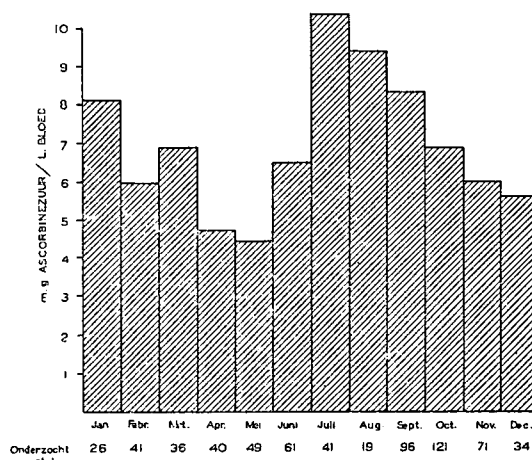
Tabel VIII.
Ascorbinezuur van voedingsmiddelen.

	mg per 100 g	
	Vóór behandel- ling met $Hg(CH_3COO)_2$ en H_2S	Na behandeling met $Hg(CH_3COO)_2$ en H_2S
<i>Gekookte groenten:</i>		
Aardappelen (oud, Juni)	—	8.4
Aardappelen (nieuw, Juni)	22.4	24.5
Aardappelen (October)	19.8	20.2
Andijvie	0.4	0.9
Appelmoes (van goudreinetten)	—	5.3
Bloemkool	—	22
Boerenkool (gesneden)	—	14.2
Boerenkool (gemalen)	—	10.3
Bruine bonen	—	1
Brussels lof	0.8	2
Capucijners	—	1.2
Chinese kool	—	6.8
Groene erwten	—	1.2
Komkommer (rauw)	5.9	6.5
Koolraap	12.6	14.6
Postelein	4.5	7.4
Prei	15.4	16.4
Prinsessebonen	5.7	11.2
Rhabarber	9.7	11.6
Rode biet	—	8
Rode kool	—	16.8
Savoye kool	5.4	7.5
Sla (rauw)	8	12.2
Snijbonen	5.9	8
Spinazie	1	1.3
Spruitjes	24.4	25.5
Tuinbonen	16	16.6
Uien	—	4.9
Witte bonen	—	1
Worteltjes	3	5.8
<i>Gekookte groenten uit blik:</i>		
Andijvie (extra)	1.4	2.7
Asperges (dik)	8.7	11.6
Stoofasperges (dun)	8.3	9.1
Soepasperges	6	7.6
Doperwtten (middel 2)	—	7.8
Doperwtten (fijn)	5.5	7.6
Riisdoperwtten (fijn)	—	8.3
Peulen	—	3.3
Snijbonen	1.3	3.9
Hollandse snijbonen	1.6	3.4
Pronksnijbonen	0.9	2
Sperciebonen (hele)	—	11
Sperciebonen (gebroken)	—	8.8
Dubbele sperciebonen	—	5.4
Spinazie	2.8	3.8
Tuinbonen (groot)	5.7	7.2
Tuinboontjes (klein)	9.4	13
Tuinboontjes (extra fijn)	4.1	5.1
Worteltjes (fijn)	—	3.2
Worteltjes (extra fijn)	—	2.2
Wortelen (gesneden)	—	2.4
<i>Gekookte groenten uit het zout</i>		
Andijvie	—	1.3
Snijbonen	—	1.5
Sperciebonen	—	7.8
Zuurkool (nieuw October)	2.8	5.8
Zuurkool (oud Mei)	2.3	4.1

Vervolg Tabel VIII.

	mg per 100 g	
	Vóór behandel- ling met $Hg(CH_3COO)_2$ en H_2S	Na behandeling met $Hg(CH_3COO)_2$ en H_2S
<i>Vruchten:</i>		
Aalbessen	—	8.1
Aardbeien	—	68
Ananas (uit blik)	6.7	8.1
Appel (Yellow transparant)	2.7	7
Appel (Goudreinet)	—	6.3
Bosbessen	—	9.8
Banaan	8.2	11.7
Bramen	—	14.9
Citroen (100 cm ³ sap)	43.4	42.3
Druif	0	3.2
Framboos	—	28.4
Kers	—	14.3
Meloen	23.4	30.3
Peer (Clapp's favoriet)	1.9	4.2
Perzik	9.3	12
Pruim (Reine Claude)	3.6	8.3
Radijs	—	23
<i>Sinaasappels:</i>		
Union of South Africa	—	61.6
Laranjas do Brasil	—	34.4
Sunkist	—	34.4
Suriname	—	50
Mandarijn	—	20.6
Tomaat	12.6	13
Zwarte bessen	—	135.2
<i>Melk, Vlees, Vis:</i>		
Melk (rauw)	—	2.1 ¹⁾
Melk (gepasteuriseerd)	—	0.6 ¹⁾
Melk (Stassano)	—	1.9 ¹⁾
Melk (gekookt)	—	1.5
Rundvlees (rauw)	—	1.8
Varkensvlees (rauw)	—	1.7
Vis (zeepaling, gekookt)	—	1.7
Eieren	—	0

gevoerd werd in het Hygiënisch Laboratorium te Utrecht. Het betrof hier de voedingstoestand van de minder goedge, werkende bevolgingsklasse.



Uit de figuur blijkt, dat het gemiddelde ascorbinezuurgehalte van het bloed bij deze groep alleen

¹⁾ Gemiddelde waarden, bepaald door Van Wijngaarden⁶¹⁾. Voor mijn bepalingen werd de precipitatie-methode toegepast: 25 cm³ melk worden met 15 cm³ 20% mercuriacetaat geprecipiteerd, vlug gecentrifugeerd en dan nog even gefiltreerd. Het filtraat wordt met H₂S doorstroomd en verder behandeld als op blz. 573 voor extracten beschreven is.

tijdens de maanden Juli, Augustus, September en Januari een waarde bereikt, die groter is dan 8 mg per l. In de zomer is deze goede voorziening met ascorbinezuur toe te schrijven aan het eten van nieuwe aardappels en verse groenten, terwijl ook vruchten als aardbeien een gunstige invloed hebben. De stijging van het gehalte in Januari, die zich ook nog in Februari en Maart doet gelden, moet men waarschijnlijk toeschrijven aan het gebruik van sinaas-appels. Tevens is te zien, dat in sommige maanden (vooral in December, April en Mei) de voorziening met ascorbinezuur te wensen overlaat.

Dr. E. H. Reerink sprak over „De bepaling van vitamine D.”.

Kleurreacties. Er zijn verschillende kleurreacties op vitamine-D voorgesteld; zoo noemen we van de laatste jaren die van Halden¹⁾, Brockmann²⁾ en Robinson³⁾. Geen van deze reacties is voldoende specifiek, om een bepaling van vitamine-D zonder meer mogelijk te maken. De reactie van Brockmann, berustend op het ontstaan van een gele kleur met $SbCl_3$ in chloroform, is waarschijnlijk degene, die het meest wordt toegepast. Zij heeft in elk geval in Brockmann's eigen onderzoekingen, die tot het afscheiden van een kristallijn vitamine-D-preparaat uit vischlevertraan geleid hebben, haar bruikbaarheid onder bepaalde omstandigheden bewezen.

De grens der gevoeligheid ligt bij 0.02 mg d.i. 800 I.E.; deze hoeveelheid moet in 0.2 cm³ chloroform worden opgelost, zoodat de onderste grens van de werkzaamheid van een preparaat, dat gemeten moet worden, bij 4000 I.E. per gram ligt. Sterinen storen bij een 50 à 80-voudige hoeveelheid, zoodat wel in de meeste gevallen waarin het om natuurlijke vitamine-D bevattende stoffen gaat, aan de bepaling op zijn minst een verzeeping en verwijdering der sterinen uit het onverzeepbare vooraf moet gaan.

Dan stoort echter nog het vitamine-A en wel, naar Brockmann's opgave berekend, een hoeveelheid van 150 I.E. vitamine-A op een hoeveelheid van 800 I.E. vitamine-D. Daarom zal in deze gevallen ook nog een verwijdering van het vitamine-A aan de bepaling vooraf moeten gaan. Met de z.g. chromatografische adsorptie-methode kan men dit bereiken, indien men over voldoende hoeveelheden beschikt, om de daarbij onvermijdelijke vitamine-D-verliezen relatief klein te kunnen houden. Het lijkt mij zeer de vraag, of dit bijv. bij routine-bepalingen van levertraan gemakkelijk te bereiken zal zijn.

Bij het onderzoek van preparaten van kunstmatig vitamine-D zal over het algemeen deze storing door vitamine-A niet optreden en zijn de condities dus gunstiger; echter heeft men daar rekening te houden met de moeilijkheid, dat een der nevenproducten, n.l. het tachysterine precies dezelfde reactie geeft. Een bepaling van het vitamine-D geeft dan dus steeds de som van vitamine plus tachysterine; en daar de verhouding dezer stoffen sterk afhangt van de bestralingsmethode, levert ook in deze gevallen de bepaling volgens Brockmann geen ondubbelzinnige resultaten.

Deze bezwaren, zelfs van de momenteel beste

colorimetrische methode verklaren dan ook het feit, dat voor de bepaling van vitamine-D nog steeds de biologische methode practisch de eenige is die algemeen wordt toegepast.

Biologische methode. Deze berust op het feit, dat vitamine-D in staat is in groeiend beenweefsel een afzetting van kalkzouten te bewerkstelligen. De grootte van deze kalkafzetting is binnen zekere grenzen afhankelijk van de hoeveelheid vitamine-D, zoodat een quantitative bepaling mogelijk is. De meest gangbare methode is die, waarbij een proefdier (meestal een rat) eerst rachitisch gemaakt wordt, d.w.z. gezorgd wordt, dat het groeiend beenweefsel onverkalkt blijft, waarna het te onderzoeken preparaat gedurende een bepaalden tijd wordt toegediend, en tenslotte wordt waargenomen in hoeverre de rachitische afwijkingen genezen zijn. Een andere methode is die, waarbij het proefdier niet eerst rachitisch gemaakt wordt, doch de hoeveelheid vitamine-D bepaald wordt, welke nog juist rachitis kan voorkomen. We bepalen ons tot een bespreking van de eerste, de z.g. curatieve methode. Deze bestaat uit drie gedeelten:

a. Het rachitisch maken der proefdieren. Dit geschiedt door aan jonge ratten een z.g. rachitogeen diët te voeren, waarvoor die aangegeven door Mc. Collum⁴⁾ en Steenbock⁵⁾ de meest gebruikte zijn, zij het ook, dat vele laboratoria kleine wijzigingen hebben ingevoerd. In den tijd dat de proefdieren dit diët krijgen, is er wel groei en ontwikkeling van het beenweefsel, maar geen verkalking in de groeizone. Er bestaan nog kleine verschillen in den duur van deze voorbereidingsperiode en in den leeftijd der proefdieren, waarop met deze periode begonnen wordt, maar die zijn waarschijnlijk van ondergeschikt belang.

b. De genezingsperiode, gedurende welke het vitamine-D wordt toegediend.

De grootte van de dagelijksche dosis — die meestal als een olie-oplossing direct met een injectie-naald in den bek wordt ingebracht — wordt gewoonlijk zóó gekozen, dat geen volkomen genezing bereikt wordt; de duur van deze periode wordt ook verschillend gekozen, van 5 tot 14 dagen, waarbij een compromis gezocht wordt tusschen den duur van de proef en de bereikbare nauwkeurigheid.

c. De waarneming. De in het rachitisch beenweefsel afgezette kalkzouten kunnen op twee wijzen zichtbaar gemaakt worden, n.l.:

1. Door de eigenschap van de kalkzouten (phosphaten) in het verkalkte weefsel om zich met een $AgNO_3$ -oplossing bruin te kleuren, de z.g. linetest. Hiervoor worden de dieren gedood, een beentje bijv. de tibia uitgerepareerd, overlans gespleten, met 95 % alcohol behandeld, en met $AgNO_3$ -oplossing gekleurd. In het slijtvlak ziet men in de metaphyse een meer of minder sterke afzetting, die zich in bepaalde gevallen als een continue lijn voordoet.

Dit beeld kan bijv. door fotografeeren worden vastgelegd (uitvoerige beschrijving bij bijv. Russell⁶⁾).

2. Door het maken van een röntgenfoto van het

¹⁾ W. Halden, Naturwissenschaften, 24, 296 (1936).

²⁾ H. Brockmann, Z. physiol. Chem. 241, 129 (1936).

³⁾ E. Robinson, Chem. Industrie 56, 191 (1937).

⁴⁾ E. V. Mc. Collum, J. Biol. Chem. 45, 507 (1921).

⁵⁾ H. Steenbock, J. Biol. Chem. 64, 263 (1925).

⁶⁾ M. W. Taylor, D. Klein and W. C. Russell, Ind. Eng. Chem. 10, 26 (1938).

been van het levende dier, bijv. het kniegewricht, waarbij de Ca-ionen het sterkst de röntgenstralen absorbeeren, en zoo op de fotografische plaat een zwarting ontstaat t.o.v. van het niet verkalkte weefsel.

In beide gevallen is men thans zoover, dat het effect van de vitamine-D-toediening kan worden waargenomen, en dat het resultaat van de waarneming voor het verkrijgen van quantitative gegevens over de sterkte van het vitamine-D-preparaat kan worden verder verwerkt.

Het is nooit met zekerheid uitgemaakt welke van de twee methoden de beste is. Elke onderzoeker zweert bij die, welke hij pleegt te gebruiken en het is wel zeker, dat iemand betere resultaten verkrijgt met een methode, waarmede hij door lange ervaring geheel vertrouwd is, dan met een, die hij terwille van de vergelijking slechts tijdelijk toepast. Een nadeel van de X-foto-methode is haar groote kostbaarheid, een voordeel het feit, dat de rachitis bij het beginstadium kan worden gecontroleerd en dat de dieren na het experiment niet gedood behoeven te worden en voor de fok gebruikt kunnen worden. Bij de line-test neemt men slechts de verkalking in één vlak waar, bij de X-foto meet men de verkalking in het geheele botgedeelte. Over wat beter is, loopen de meeningen uiteen. Zooals gezegd zijn er ook in andere punten wat betreft diët, duur der proef etc. kleine verschillen tusschen de werkwijzen van verschillende laboratoria; indien men echter met overleg te werk gaat, en de methode aangepast wordt aan de heerschende omstandigheden, zullen dergelijke verschillen geen belangrijk effect op de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de bepaling tengevolge behoeven te hebben. Waardoor de nauwkeurigheid principiëel het meest beïnvloed wordt, zullen we in het volgende bespreken. Wij zullen dat doen aan de hand van de röntgenmethode, zooals die is uitgewerkt door Van Niekerk en Everse⁷⁾ en sinds vele jaren in ons laboratorium is toegepast.

Dezelfde redeneering zou mutatis mutandis ook voor de line-test-methode kunnen worden toegepast; hiervoor beschikken wij echter niet over voldoende experimentele gegevens.

We hebben dus het effect van de vitamine-D toediening in een waarneming vastgelegd. De beelden vertoonen in de metaphyse een meer of minder sterke verkalking. Wanneer men een aantal van dergelijke beelden vergelijkt, ziet men een groot verschil in de mate van verkalking en het is mogelijk de beelden te rangschikken in een reeks van beeldgroepen, waarin iedere volgende een juist waarneembaar grootere mate van verkalking vertoont dan de vorige. Men kan nu het feit constateeren, dat de toediening van een grootere dosis vitamine-D gedurende de proefperiode gemiddeld een beeld met grootere mate van verkalking geeft.

Indien men nu een groot aantal beelden in groepen van toenemende mate van verkalking gerangschikt heeft, kan men voor iedere groep een typisch representatief beeld uitkiezen en deze reeks verder als standaardreeks gebruiken. Deze groepen kan men

⁷⁾ J. van Niekerk en J. W. R. Everse, *Biochem. Z.* 215, 85 (1929); *Strahlentherapie* 40, 733 (1931); *Nederland. Tijdschr. Geneeskunde* 75, 1101 (1931); J. W. R. Everse, *Dissertatie Leiden*, 1932.

dan verder een rangnummer geven en op deze wijze de mate van verkalking van een bepaald beeld door een cijfer uitdrukken. Bij ons is de praktijk zóó, dat de beelden tusschen volkomen rachitisch = 0, en volkomen verkalking = 7, in 13 verschillende groepen worden verdeeld, genummerd: $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2... tot $6\frac{1}{2}$. Deze cijfers noemen we qualificatie-eenheden (Q.E.) en we waardeeren dus een bepaalde mate van verkalking door toekenning van een zeker aantal qualificatie-eenheden, met een afleesnauwkeurigheid van $\frac{1}{2}$ Q.E. dus bijv. $3\frac{1}{2} \pm \frac{1}{4}$ Q.E.

Het is deze afleesnauwkeurigheid, die onder overigen ideale omstandigheden een grens stelt aan de bereikbare nauwkeurigheid van de bepaling; en een vergelijking tusschen de mérites van de verschillende methodes zou in laatste instantie moeten berusten op de grootte van de verschillen in verkalking, die zij waarneembaar kunnen maken; hoe kleiner verschil in mate van verkalking met zekerheid kan worden waargenomen, hoe nauwkeuriger de methode. De nauwkeurigheid van een praktische bepaling wordt echter verminderd door andere factoren.

In de eerste plaats reageeren twee proefdieren niet op precies dezelfde manier; eenzelfde hoeveelheid vitamine-D zal bij verschillende ratten een verschillende mate van verkalking teweeg brengen. De qualificaties voor een groep van ratten, die alle eenzelfde dosis vitamine-D gehad hebben, zullen dus een zekere strooiing om een gemiddelde vertoonen. Bij de verwerking van een willekeurig deel van ons experimenteel materiaal vonden wij, dat deze strooiing bij ca. 240 groepen van gemiddeld 16 ratten een grootte had van 1.1 ± 0.2 Q.E. berekend uit

$$\left(\sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n-1}} \right) \text{ onafhankelijk van de gemiddelde}$$

qualificatie der groep tusschen de eenheden $1\frac{1}{2}$ en $5\frac{1}{2}$. Dit beteekent dus, dat van een groep met een gemiddelde qualificatie van bijv. 4 Q.E. 66 % der dieren een qualificatie heeft tusschen van 3 t/m. 5 en 95 % tusschen van 2 t/m. 6.

Deze natuurlijke strooiing kan door vergroting van het aantal proefdieren in een groep niet verminderd worden; wel echter heeft dit aantal invloed op de gedefinieerdheid van de verdeelingscurve voor die groep, wanneer deze met een andere groep vergeleken moet worden. In een dergelijk geval mogen we rekenen met de gemiddelde groeps-qualificatie

$$\pm \frac{1.1}{\sqrt{n}} \text{ Q.E. dus voor onze groepen van gemiddeld}$$

$$16 \text{ dieren, } \pm \frac{1.1}{\sqrt{16}} \text{ Q.E.} = 0.275 \text{ Q.E. } ^8)$$

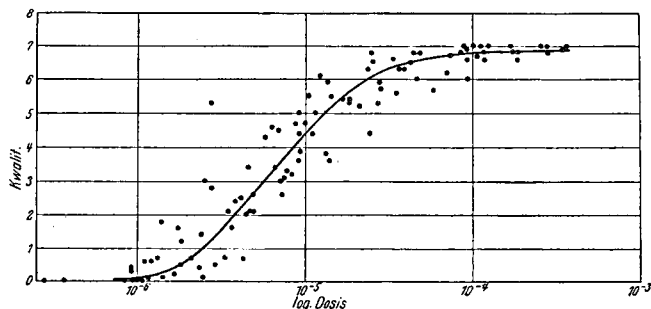
Een tweede foutenbron is gelegen in het feit, dat de proefdieren in verschillende tijden op eenzelfde dosis vitamine-D niet met dezelfde verkalking reageeren, d.w.z. dat, om bijv. een gemiddelde groeps-

⁸⁾ De meeste onderzoekers vergelijken slechts dieren uit eenzelfde nest, teneinde den invloed van de strooiing in de gevoeligheid zoo gering mogelijk te maken. Onze ervaring is echter, dat het verschil in den graad van rachitis van dieren uit eenzelfde nest bij het begin van de proef een veel grooteren invloed heeft, dan het verschil in gevoeligheid tusschen dieren van verschillende nesten. Daarom vergelijken wij slechts dieren met eenzelfde uitgangsrachitis, verdeelen de nesten over de te vergelijken groepen en vormen de gemiddelde groepsqualificatie van alle gebruikte dieren tezamen.

qualificatie van 3 Q.E. teweeg te brengen, in het eene jaargetijde een tweemaal zoo groote dosis vitamine-D noodig kan zijn dan in het andere. Men kan hierin een vrij bepaalden seizoeninvloed constateeren. De oorzaak kan in physiologische condities van het dier zelf als ook in bepaalde bestanddeelen van het rachitogeen diët gelegen zijn. Deze foutenbron kan men gedeeltelijk elimineeren, door steeds een groep proefdieren een standaardpreparaat te geven, waarvan de sterkte in vitamine-D-eenheden bij definitie vaststaat, en de werking van het te ijken preparaat te vergelijken met die van het standaardpreparaat.

Men kan hierdoor als het ware de gemiddelde gevoeligheid van een groep ratten op een bepaald tijdstip bepalen — echter, wegens de strooiing alleen al, met een voor een groep van 16 ratten op het standaardpreparaat boven berekende nauwkeurigheid van ca. 0.275 Q.E. Zelfs indien het gelukt om de doseering van het te ijken preparaat zóó te kiezen, dat de groep daarmee behandelde ratten precies dezelfde gemiddelde qualificaties verkrijgt, als de groep met het standaardpreparaat, is de middelbare fout van het resultaat der vergelijkende proef reeds ca. $\sqrt{(0.275)^2 + (0.275)^2}$ of ca 0.4 Q.E., wanneer we alleen de strooiing in aanmerking nemen. Hoewel men dit ideaal zooveel mogelijk zal trachten na te streven, zal het meestal niet gelukken een dergelijke overeenstemming te bereiken. Gewoonlijk zal er een zeker verschil bestaan tusschen de gemiddelde qualificaties van beide groepen. Om dan de sterkte van het te ijken preparaat te berekenen, zal men moeten weten, op welke wijze de qualificatie, dus de mate van verkalking, afhangt van de dosis vitamine-D, die men heeft toegediend.

Deze onafhankelijkheid, weergegeven door een concentratie-werkingscurve, kan worden bepaald door aan verschillende groepen ratten, toenemende doses, bijv. a, 2a, 4a, 8a te geven en de gemiddelde groepsqualificatie uit te zetten als functie van de log. dosis. Op deze wijze is onze c.w.curve verkregen. Deze kan nu gebruikt worden voor interpolatie en extrapolatie.



De vorm van de curve laat zien, dat het voor de nauwkeurigheid tenzeerste gewenscht is om bij gemiddelde genezingsgraden te werken, daar de curve daar vrijwel een rechte lijn is en de steilheid daar ter plaatse het grootst is. In ons geval vinden wij, dat in dat gebied een verdubbeling der dosis een qualificatie-verschil van 1.5 Q.E. geeft. Dit verschil is practisch constant tusschen Q is $1\frac{1}{2}$ en Q is 5, hetgeen wij konden afleiden uit de gevonden gegevens voor meer dan 100 preparaten, die tegelijkertijd in een dosis a en 2a waren onderzocht. Interessant is nog, dat de middelbare afwijking van het

gemiddelde qualificatieverschil tusschen 2 doses van een preparaat 0.4 Q.E. bleek te zijn, terwijl op grond van het bovengezegde verwacht moest worden $Q_1 \pm 0.275 - Q_2 \pm 0.275 = \Delta Q \pm \sqrt{2(0.275)^2} = \Delta Q \pm 0.4$ Q.E. De afwijking is dus precies zoo groot als de normale strooiing in de gevoeligheid van het diermateriaal doet verwachten, hetgeen er op wijst, dat er geen reden is om aan te nemen, dat nog andere oorzaken voor fouten in ΔQ een merkbaaren invloed uitoefenen. Dit beteekent weer, dat we rustig steeds met denzelfden vorm der c.w.curve mogen werken, en dat een niet al te groote extrapolatie op zich zelf geen foutenbron behoeft te zijn.

We hebben dus te maken met den invloed van twee foutenbronnen, de afleesfout en de strooiingsfout. Herhaalde beoordeeling van hetzelfde fotomateriaal bleek ons een middelbare afwijking in de resultaten te geven van ca. $\frac{1}{4}$ Q.E. De strooiingsinvloed op de fout bij een vergelijking van onbekend en standaardpreparaat bleek ca. 0.4 Q.E. te zijn.

De totaal te verwachten fout bij een bepaling in 1 dosis met 16 dieren per groep, is dus $\sqrt{(\frac{1}{4})^2 + (0.4)^2} = 0.47$ Q.E. Vertaald in fout in gevonden dosis, dus sterkte van de onbekende vitamine-D-preparaten, wordt dit, dat er 66 % kans is, dat de ware waarde ligt tusschen 80 en 125 % van de gevondene, en 95 % kans tusschen 65 % en 155 %. Bepaalt men de sterkte van het onbekende preparaat, door het in 2 doses met 2 doses standaard te vergelijken, dan wordt de middelbare fout natuurlijk $\sqrt{2}$ maal kleiner, en wel 0.34 Q.E., hetgeen beteekent ware waarde met 66 % kans tusschen 85 % en 117 % van de gevondene.

Daar wij een groot aantal preparaten op deze wijze hebben gemeten, geeft het experimenteel materiaal ons gegevens over de werkelijke experimenteële middelbare fout in onze metingen. Bij de bewerking van een groep van 60 preparaten, waarvan de sterkte op de bovenaangegeven wijze in dubbelbepalingen is verricht, vinden wij als middelbare fout van de dubbelbepaling — berekend uit het verschil tusschen de waarden van elke enkelbepaling — ca. 0.36 Q.E., hetgeen in zeer goede overeenstemming is met de boven berekende fout.

Verdeelen we deze 60 preparaten in 2 groepen van 30 naar het aantal dieren, dat voor elke bepaling is gebruikt, dan vinden we in de groep met minder dieren (gem. 51 per preparaat) een middelbare fout van ca. 0.395 Q.E.; voor de groep met meer dieren (gem. 77 per preparaat) een fout van ca. 0.32 Q.E. We zien dus, dat de fout met de stijging van het aantal dieren afneemt, en wel juist op de verwachte wijze:

$$\sqrt{\frac{77}{51}} = 1.23; \quad \frac{0.395}{0.32} = 1.23$$

We kunnen de 60 preparaten ook verdeelen in 2 groepen, een met een kleinere dan de gemiddelde strooiing van 1.1 Q.E. en een met een grootere dan 1.1 Q.E. We vinden dan voor de middelbare fout in de eerste groep 0.33 Q.E. in de tweede 0.38 Q.E. Weer zien we, dat de fouten grooter worden als de ratten minder gelijkmatig zijn. Dit geldt echter alleen maar gemiddeld voor grootere groepen van bepalingen; wat in een speciaal geval de werkelijke fout zal zijn, is natuurlijk onmogelijk te zeggen. Ook is niet met

zekerheid te zeggen, of een bepaalde uitkomst bijzonder betrouwbaar is, omdat de ratten toevallig erg gelijkmatig waren of hun aantal bijzonder groot was. Alles wat we kunnen zeggen is, dat bij de bepaling van de sterkte van een preparaat in 2 doses tegen 2 doses standaard, met gemiddeld 16 dieren per groep, de waarschijnlijkheid 66 % is, dat de werkelijke waarde ligt binnen 85 % en 117 % van de gevonden waarde en de waarschijnlijkheid 95 % is, dat ze ligt binnen 73 % en 137 %.

Om deze nauwkeurigheid op te voeren, zou het voor ons noodig zijn om óf meer dieren te gebruiken, bijv. bij 25 dieren per groep zou de foutengrens worden 88 %—114 %, óf om te trachten door zorgvuldige teeltkeus de strooïing in de gevoeligheid der individuele ratten geringer te maken. Een verhooging van de afleesnauwkeurigheid zou voor ons pas in de tweede plaats zin hebben. Het is daarentegen zeer goed mogelijk, dat iemand, die een zeer gelijkmatige rattenkolonie heeft, zijn bereikbare nauwkeurigheid verwaarloost door óf te weinig ratten per preparaat te gebruiken, óf een te onscherp criterium te gebruiken⁹⁾.

Met een enkel woord willen we nog vermelden, dat door het bestaan van verschillende soorten vitamine-D een ijking uitgevoerd alleen op ratten geen volledige waardebepaling van een preparaat geeft. Dit is van speciaal belang, wanneer preparaten geijkt moeten worden, die bestemd zijn voor gebruik door kippen en kuikens, daar zooals bekend is deze dieren zeer verschillend reageren op hoeveelheden vitamine-D van verschillende soort, die op ratten geijkt gelijke sterkte hebben. Zoo zal bijv. een goede levertraan bij ratten hetzelfde resultaat kunnen geven als een slechte levertraan die met bestraald ergosterine is versterkt, terwijl toch de laatste voor kuikens waardeloos zal zijn. Een controle-ijking op kuikens zal daarom in dergelijke gevallen steeds noodig zijn¹⁰⁾.

Dr. L. W. van Esveld sprak over „*De wettelijke contrôle van gevitamineerde voedingsmiddelen, vitaminehoudende pharmaceutische producten en levertraan in het buitenland en de wenschen hieromtrent in Nederland.*”

Wanneer men in verschillende landen gaat informeren naar de wettelijke maatregelen, die genomen zijn ter contrôle van gevitamineerde voedingsmiddelen, en men voegt daarbij de nauwverwante vraag, op welke wijze levertraan en vitamine-houdende pharmaceutische producten worden gecontroleerd, dan blijkt uit de antwoorden al spoedig, dat de vorderingen op dit gebied in de verschillende landen zeer sterk uiteenloopen. In sommige landen kent men nog geen enkelen contrôle-maatregel en is evenmin iets in voorbereiding. In andere daarentegen beschikt men reeds over bijzondere instituten, die gevitami-

neerde voedingsmiddelen of pharmaceutische producten of beide, met inbegrip van levertraan, controleeren, en hiertusschenin vindt men de landen, die óf reeds enkele contrôle-maatregelen hebben getroffen óf bezig zijn een min of meer uitgebreide contrôle voor te bereiden.

Men zal van mij niet verwachten, en het ligt ook niet in mijn bedoeling, dat ik hier een opsomming ga geven van de maatregelen, die, in verband met de genoemde contrôle, in een zeer groot aantal staten in en buiten Europa zijn genomen. Ik zou dit trouwens ook niet kunnen doen, omdat mij hiervoor geen voldoende gegevens ter beschikking staan. Het is ook niet noodig om zeer vele landen in deze enquête te betrekken. Uit hetgeen volgt zal men bemerken, dat de inlichtingen, die alleen in Europa, en wel in Engeland, België, Frankrijk, Zwitserland, Duitschland, Zweden en Hongarije zijn ingewonnen, een voldoende overzicht geven van hetgeen op het gebied eener vitamine-contrôle tot stand kan worden gebracht, om de vraag te gaan bespreken, op welke wijze men in Nederland — het paradijs voor een ieder, die een geneesmiddel, of iets wat hierop lijkt, in den handel wil brengen — in deze leemte zou kunnen voorzien.

Ik ben een aantal personen zeer dankbaar voor de moeite en den tijd, die zij aan het geven van inlichtingen hebben willen besteden. Hun namen zijn: Miss Coward, Nutrition Department van het Pharmacologisch Laboratorium van The College of the Pharmaceutical Society, London, Dr. de Myttenaere, Voorzitter der Belgische Pharmacopee-Commissie en Dr. Nelis van de Nationale Codex, beiden te Brussel, Prof. Lormand, Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, te Parijs, Prof. Fleisch, Institut de l'Etat pour le Contrôle Officiel des Vitamines, Lausanne, Regieringsrat Dr. Kärber, Reichsgesundheitsamt, Berlijn, Prof. Liljestränd, Pharmacologisch Laboratorium, Stockholm en tenslotte Dr. Tomscik en zijn medewerkers Mej. Staziak en Dr. Jendrassik, Hygiënisch Instituut te Budapest, welke laatsten ook mondeling aan Dr. Timmerman vele inlichtingen hebben verschaft.

Gaan wij thans de contrôle op gevitamineerde voedingsmiddelen, levertraan en vitamine-houdende pharmaceutische praeparaten nader beschouwen, dan zou ik willen beginnen met het product, dat een eenigszins bijzondere plaats inneemt, omdat het geen voedingsmiddel, maar ook geen pharmaceutisch praeparaat is, n.l. de levertraan. Ik kies de levertraan ook daarom het eerst uit, omdat men hier direct een voorbeeld heeft van een stof, die onder de middelen, welke in Nederland ter bestrijding van de rachitis worden gebruikt, de allervoornaamste plaats inneemt, en die toch, wat betreft haar gehalte aan het antirachitische vitamine D, aan geen enkelen officieelen eisch behoeft te voldoen. De Nederlandsche Pharmacopee Ed. V geeft identiteitsreacties, voorschriften over refractie, zuurgraad, joodadditie- en verzeepingsgetal en vorstvrijheid; in het Supplement vindt men een colorimetrische reactie op het vitamine A-gehalte, die, zooals wij nog zien zullen, zeker niet gehandhaafd kan worden, maar een eisch omtrent het belangrijkste vitamine, het vitamine D, ontbreekt.

De levertraan, die in Nederland in den handel is, kan men verdeelen in twee groepen: lè. de traan,

⁹⁾ De nauwkeurigheid van de biologische vitamine-D-bepaling is reeds verschillende malen bediscussieerd: bijv.: R. B. Bourdillon, H. M. Bruce, C. Fischmann and T. A. Webster, Quantitative estimation of vitamin-D by radiography (Medical Research Council, Special Report Series no. 158) London 1931; C. E. Bills, E. M. Honeywell, A. M. Wirick and M. Nussmeier, J. Biol. Chem. 90, 619(1931); K. H. Coward, Compt. rend. Vme Congrès international technique et chimique des Industries Agricoles, Vol. 1, pag. 39.

¹⁰⁾ Zie bijv. A. G. Boer, E. H. Reerink, A. van Wijk and J. van Niekerk, Proc. Akad. Wetenschappen Amsterdam 39, 622 (1936).

die een gegarandeerd minimum-gehalte aan de vitamines A en D bevat en 2e. de traan, die zonder eenige aanwijzing omtrent het gehalte aan deze vitamines wordt verkocht. De eerste groep wordt ten deele wel, ten deele niet door Nederlandsche laboratoria gecontroleerd. Tot haar behooren o.a. de tranen, die met een merkwoord worden aangeduid. De tweede groep omvat alle andere levertraan, welke verpakt in flesschen of per maatje te koop is.

Over het vitamine A- en D-gehalte van beide groepen staan een aantal gegevens uit eigen onderzoek ter beschikking.

1. Levertraan met gegarandeerd vitamine-gehalte.

De gegevens hieromtrent omvatten voor verreweg het grootste gedeelte tranen, die in de laatste jaren voor verschillende firma's hier te lande in het Rijks Instituut werden geijkt en onder controle van dit Instituut in den handel gebracht. Een aantal andere tranen met gegarandeerd vitamine-gehalte is echter ook onderzocht en eveneens in de volgende tabel opgenomen.

Mon-ster No.	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram	Mon-ster No.	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram
1	200	—	14	125	1005
2	175	945	15	125	870
3	175	875	16	125	850
4	175	—	17	120	1200
5	170	—	18	115	—
6	165	—	19*	110	945
7	160	—	20*	110	900
8	155	1660	21	105	—
9*	150	615	22	105	—
10	140	710	23	100	1060
11	140	—	24*	100	795
12	140	—	25*	100	725
13*	130	820	26	75	1150

Tabel I. Vitamine A- en D-gehalte (in intern. eenh.) van levertraan met gegarandeerd vitaminegehalte. Vitamine A in Lovibond-tintometer bepaald met reactie van Carr en Price in verzepte traan. De met * gemerkte monsters zijn van het seizoen 1937/38, de andere van vroegere jaren. De monsters waarvan in iedere derde kolom geen vitamine A-gehalte is opgegeven, zijn op niet vergelijkbare wijze onderzocht.

Men ziet uit deze tabel, dat met uitzondering van een enkel monster (No. 26, 75 I.E.) het vitamine D-gehalte ligt tusschen 100 en 200 I.E. per gram, met een gemiddelde van 130 eenheden. Het vitamine A-gehalte wisselt van 615—1600 I.E. met een gemiddelde van 945 eenheden. Slechts éénmaal (No. 9, 615 I.E.) is het A-gehalte minder dan 700 eenheden.

2. Levertraan zonder aangegeven vitamine-gehalte.

In tabel II vindt men het vitamine A- en D-gehalte weergegeven van tranen die, verpakt in flesschen of per maatje, gekocht werden bij apothekers, drogisten en een enkelen kruidenier, allen woonachtig in verschillende wijken van de stad Utrecht.

Uit deze tabel blijkt, dat het vitamine D-gehalte van deze tranen varieert van 20 tot 135 I.E. per gram met een gemiddelde van 80 eenheden. Het A-gehalte ligt tusschen 380 en 1215 I.E. en is gemiddeld 605 I.E. Een monster (No. 22, 20 I.E.D. en 0 I.E.A.), per maatje gekocht, kon den naam levertraan niet meer dragen. Het had een bordeaux-roode kleur, stonk en voldeed in 't geheel niet aan de eischen der Pharmacopee, wat bij alle andere traanmonsters wel het geval was.

Mon-ster No.	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram	Mon-ster No.	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram
1	135	1250	12	75	780
2	110	495	13	75	480
3	105	750	14	75	445
4	95	1215	15	75	380
5	95	560	16	70	770
6	90	900	17	70	—
7	90	590	18	60	625
8	90	575	19	60	595
9	90	485	20	55	—
10*	80	—	21*	50	—
11*	80	—	22*	20	0

Tabel II. Vitamine A- en D-gehalte (in intern. eenh.) van levertraan zonder aangegeven vitaminegehalte. Vitamine A in Lovibond-tintometer bepaald met reactie van Carr en Price in verzepte traan. Alleen de met * aangegeven monsters (vitamine A-gehalte niet op vergelijkbare wijze onderzocht) zijn van het seizoen 1937/38.

Vatten wij de uitkomsten van beide groepen van traanmonsters samen, dan blijkt, dat: 1e. het vitamine D-gehalte wisselt van 50—200 I.E. per gram, 2e. het vitamine A-gehalte ligt tusschen 380 en 1660 I.E. per gram en 3e. er wel geen paralleliteit bestaat tusschen het A- en D-gehalte, maar dat men toch wel kan zeggen, dat in het algemeen die tranen, welke een hoog D-gehalte hebben (zie tabel II) ook het meest rijk zijn aan vitamine A.

Vraagt men zich nu af welke minimum-eischen betreffende het vitamine A- en D-gehalte wij in ons land aan levertraan moeten gaan stellen, dan kan men, behalve de eigen waarnemingen, verschillende overwegingen laten gelden.

Men kan vragen, wat doet het buitenland? Het antwoord hierop is, dat bijvoorbeeld Amerika en Engeland een minimum van 85 I.E.D. en 600 I.E.A. eischen en dat deze grenzen in Hongarije op resp. 80 en 1000 zijn gesteld.

Men kan ook in Noorwegen gaan informeerden, wat het gemiddelde vitamine-gehalte der voor export bestemde traan voor menselijk gebruik is. Het „Fischereidirektorium” te Bergen was zoo vriendelijk om ons ruim een jaar geleden hierover in te lichten. Uit deze inlichtingen kwam vast te staan, dat het vitamine D-gehalte van de meeste monsters in de laatste jaren wisselt van 85—100 I.E.D. per gram, maar dat eveneens tranen met meer dan 100 eenheden vitamine D worden gevonden. Wat betreft het vitamine A-gehalte, hiervoor kan men gemakkelijk een garantie van 700 internationale eenheden verkrijgen.

Afgaande op deze inlichtingen en den eisch van verschillende Pharmacopeeën zou men het zich gemakkelijk kunnen maken en ook tenminste 85 eenheden D en 600 eenheden A gaan eischen.

Er zijn echter enkele redenen, die het m. i. wenschelijk maken het minimum voor vitamine D hooger te stellen, en wel op 100 eenheden per gram.

Vooreerst, omdat, bij wijze van spreken, ieder land de traan krijgt, die het toekomst. Jarenlang heeft Prof. Wolff voor de door zijn laboratorium gecontroleerde traan, en heeft ook het Rijks Instituut voor de traan, die met zijn controle-strook in den handel wordt gebracht, den eisch van tenminste 125 eenheden vitamine D gesteld en gelukte het den importeurs zonder al te veel moeite deze traan in handen te krijgen. Totdat twee jaren geleden van alle kanten bezwaren kwamen tegen den hoogen eisch voor vita-

mine D. Tranen met een gehalte van tenminste 125 eenheden waren zóó moeilijk te krijgen, dat wij gedwongen waren den eisch tot 100 te verlagen. Op de vermoedelijke reden van het schijnbare verdwijnen van tranen met een hoog D-gehalte kan ik hier niet uitvoerig ingaan. Alleen zij opgemerkt, dat het, zooals door exporteurs wel is beweed, niet zoo waarschijnlijk is, dat levertraan de laatste jaren plotseling minder vitamine D is gaan bevatten. Althans het „Fischereidirektorium” heeft hierover in haar bovenaangehaald schrijven niets medegedeeld. Niet ongegrond lijkt echter de veronderstelling, dat de ijking in het Noorsche Vitamine-Instituut, die tegenwoordig anders geschiedt dan vroeger het geval was, thans in het algemeen op een wat lager niveau wordt ingesteld, waardoor tranen met een hoog D-gehalte minder gemakkelijk worden opgemerkt dan enkele jaren geleden. Zulke tranen zouden dus niet in aantal zijn achteruitgegaan, maar zonder een bijzonder, op een hoog gehalte ingesteld onderzoek, zou men niet zeker weten welke het zijn.

Nu is het een feit, dat met onzen eisch ook het gemiddelde vitamine D-gehalte der ten onderzoek aangeboden traan naar beneden is gegaan. Dit blijkt direct, wanneer men op tabel I de D-gehalten der met * gemerkte traanmonsters van 1937/38, toen voor het eerst tenminste 100 in plaats van 125 eenheden D werden geëischt, vergelijkt met die van vóór genoemde jaren, waarbij men traan No. 9 (om haar bekend hoog D-gehalte nog uit 1936 gereserveerd) nog moet uitschakelen. Zou men zijn eisch wederom gaan verminderen, bijvoorbeeld tot 85, dan kan men er zeker van zijn, dat het vitamine D-gehalte der ingevoerde tranen eveneens wederom zal gaan dalen, om de eenvoudige reden, dat de importeur nu alleen garantie vraagt voor een gehalte van 85 eenheden en in het algemeen ook niet veel meer zal krijgen. Voor een goede rachitisprophylaxis is echter een zoo hoog mogelijk gehalte gewenscht.

Carstens¹⁾ en Soer²⁾ hebben aangetoond, dat in ons zonarme land eigenlijk alle kinderen, ook die uit meer welgestelde kringen, zeker in het eerste levensjaar, bescherming tegen rachitis noodig hebben, en dat toediening van vitamine D ook in het tweede jaar nog zeer gewenscht is.

Onder de prophylactische middelen neemt levertraan de allervoornaamste plaats in. De gebruikelijke dosering hiervan is 2 theelepels, soms wat meer. Met deze dosering bereikte Carstens, die traan van tenminste 125 I.E.D. per gram gebruikte, goede resultaten. Gerekend naar de D-waarde der door ons voor 1937/38 onderzochte traanmonsters, zou deze traan gemiddeld 140 I.E.D. per gram hebben bevat. De levertraanmonsters, die wij in het afgelopen seizoen standaardiseerden, hadden een gemiddeld D-gehalte van 117 I.E.D. per gram, d. i. ruim 16 % minder. Zou men een algemeen eisch van tenminste 85 I.E.D. per gram gaan stellen, dan zou zulke traan gemiddeld circa 90—95 I.E.D. bevatten, d. i. 36—32 % minder dan 140 I.E.D. Bij gelijk blijvende dosis (2 theelepels) zou dus de hoeveelheid toegediend vitamine D slechts $\frac{2}{3}$ bedragen van de hoeveelheid, die door

¹⁾ J. H. G. Carstens, Nederland. Tijdschr. Geneeskunde 1931, Dl. III, blz. 3550.

²⁾ J. J. Soer, Hoeveel vitamine D is noodig om rachitis te genezen en te voorkomen? Dissertatie, Leiden, 1931 en Nederland. Tijdschr. Geneeskunde 1932, Dl. III, blz. 4438.

Carstens met goed gevolg werd gebruikt. Dit lijkt zeker niet zonder bedenking.

Nu kan men zeggen, dat men toch gemakkelijk de dosis iets kan verhoogen en 3 in plaats van 2 theelepels geven. Maar dit is in het algemeen niet juist, omdat een grootere hoeveelheid door jonge kinderen niet altijd even goed wordt verdragen, en het ook voor de moeder het eenvoudigst is een zoo gering mogelijke hoeveelheid in te geven, en — hoe eenvoudiger een prophylactische maatregel is, des te beter.

Om deze verschillende redenen, maar vooral om de laatste, zou ik willen vasthouden aan een algemeen eisch van tenminste 100 internationale eenheden vitamine D per gram.

Het A-gehalte behoeft men m. i. niet hooger te stellen dan op ten minste 600 I.E. per gram. Het vitamine D is hoofdzaak, het vitamine A, hoewel zeer welkom, toch meer bijkomstig, en het moet niet behoeven voor te komen, dat een traan met een goed D-gehalte om een klein tekort aan vitamine A moet worden afgekeurd.

Voor de bepaling van het vitamine A-gehalte zal de reactie van het Supplement der Pharmacopee, die met de onverzepte traan plaats vindt, door een bepaling in de verzepte traan en de biologische ijking vervangen moet worden. Zooals de reactie thans beschreven staat, voldoen zeer vele tranen met een uitstekend A-gehalte niet aan den eisch. Dit komt hierdoor, dat in onverzepte traan, volgens de onderzoekingen van Emmerie³⁾, een stof voorkomt, die de reactie van Carr en Price remt. Door verzeeping wordt deze stof verwijderd en vindt men circa 2.5—3.5 maal meer vitamine A dan in de onverzepte traan kan worden aangetoond.

De eischen, die ik aan levertraan voor inwendig gebruik zou willen stellen, luiden dus: tenminste 100 internationale eenheden vitamine D en tenminste 600 internationale eenheden vitamine A per gram.

Zouden deze eischen in de Pharmacopee worden opgenomen, dan zou wel iets, maar niet genoeg gewonnen zijn. Apothekers, die staan onder contrôle van de Wet op de Artsenijbereidkunst, zouden dan bij vraag naar levertraan niet anders dan Pharmacopee-traan mogen afleveren. Hadden zij nog andere traan voorradig, dan zou deze het bijzonder opschrift moeten dragen, dat zij niet aan de eischen der Pharmacopee voldeed. Maar drogisten, en juist door deze wordt de meeste levertraan verkocht, zouden dan nog traan van ieder vitamine-gehalte mogen aanbieden. In verschillende landen bestaat ongeveer een dergelijke toestand: een gedeelte der in den handel zijnde levertraan wordt gecontroleerd, maar om de rest bekommert men zich niet. Zoo wordt bijvoorbeeld in Zwitserland een deel der tranen door het Vitamine-Instituut geijkt. Niet gecontroleerde levertraan mag wel als zoodanig verkocht worden, maar het etiket of de reclame mag dan niets omtrent vitamines vermelden. In Hongarije komt een gedeelte der in flesschen verpakte traan met een contrôle-strook van het Hygiënisch Instituut in den handel, maar de verkoop van alle andere tranen is vrij. In Engeland wordt een groot aantal tranen in het laboratorium der Pharmaceutical Society gestandaardiseerd. Op het etiket der

³⁾ A. Emmerie, Nature 131, 364 (1933).

flesschen mag dan de naam van het laboratorium worden vermeld en moet een chargennummer en een onderzoeksdatum worden aangebracht. Iedereen mag evenwel traan met elk vitaminegehalte in den handel brengen. Wie echter traan als voldoende aan de eischen der Engelsche Pharmacopee verkoopt, kan, door wien dan ook, gecontroleerd worden. Maar dit gebeurt niet. De Pharmaceutical Society althans heeft het nooit gedaan.

Dergelijke regelingen zijn half werk en daarom niet aan te bevelen. De eenig juiste maatregel, welke de beste waarborgen biedt, is, de eisch te stellen, dat voor inwendig gebruik bij den mensch geen andere levertraan in den handel mag worden gebracht dan diegene, welke het bovengenoemde gehalte aan vitamines bevat en op dezen eisch in Nederland is onderzocht. Dit onderzoek zou op kosten der importeurs moeten geschieden.

Onoverkomelijke bezwaren voor het doorvoeren van een dergelijken maatregel kunnen er niet zijn. De exportlanden zullen zeker de gevraagde tranen kunnen leveren. Van de traanimporteurs in Nederland, bij wien de controle zou moeten beginnen, laat thans reeds een gedeelte alle door hen ingevoerde levertraan vrijwillig tegen betaling in enkele laboratoria hier te lande onderzoeken. Alle door het Rijks Instituut gecontroleerde levertraan verlaat den importeur niet anders dan in vaten, blikken of flesschen, die voorzien zijn van een controle-merk, dat onder toezicht van personeel van het Instituut is aangebracht. Of een dergelijke controle in haar geheel in het groot uitvoerbaar is, valt te betwijfelen. Voor vaten en blikken wel, maar de moeilijkheid zit in de controle op de verpakking in flesschen, omdat deze niet alleen bij importeurs, maar ook bij talloze apothekers, drogisten en kruideniers geschiedt. Wanneer het evenwel verplicht was op het etiket van alle flesschen het controle-nummer van de betreffende partij aan te brengen, zou zeer veel zijn bereikt. De officieele instanties zouden dan altijd kunnen zien van wien de traan oorspronkelijk afkomstig is en met of zonder aanleiding steekproeven kunnen nemen en, dan natuurlijk zonder onkosten voor de betrokken firma, ijken.

Hoe dit zij, een goede regeling is zonder eenigen twijfel te maken. Of hiervoor bijvoorbeeld een afzonderlijk „Levertraanbesluit” noodig is, of dat men beter doet de controle van levertraan in een grooter geheel van vitamine-controle te laten opgaan, is een vraag, die hier buiten beschouwing kan blijven.

Een enkel belangrijk feit omtrent de controle op levertraan moet nog worden vermeld, en wel dit, dat de prijs van gestandaardiseerde traan nauwelijks hooger behoeft te zijn dan die van traan, welke zonder eenige garantie verkocht wordt. De importeur moet voor een traan met een hoog vitamine-gehalte natuurlijk iets meer betalen dan voor het gemiddelde product. Daarbij komen de onkosten der ijking. De praktijk wijst echter uit, dat levertraan met een gegarandeerd vitaminegehalte kan verkocht worden voor een prijs, die, zooals uit tabel III blijkt, ongeveer gelijk en soms zelfs minder is dan die van vele niet gecontroleerde tranen, en dat deze prijs niet meer dan circa 35 % meer bedraagt dan die van de goedkoopste, soms slechtste traan, die te krijgen is. Het in het algemeen grootere vitamine-gehalte der geijkte traan

is in dezen prijs nog niet eens verdisconteerd. De kosten der controle behoeven het nemen van maatregelen dus niet te remmen: gestandaardiseerde traan is geheel onder het bereik van het groote publiek.

Monster No.	Prijs per gelijke hoeveelheid	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram	Monster No.	Prijs per gelijke hoeveelheid	I. E. D. per gram	I. E. A. per gram
1	100	20	0	16	133	90	900
2	..	50	—	17	..	95	1215
3	..	55	—	18	..	105	750
4	..	75	380	19*	136	110	900
5	..	75	445	20*	..	125	850
6	..	75	480	21*	..	140	710
7	..	75	780	22*	..	150	615
8	..	80	—	23*	..	175	945
9	..	110	495	24	150	100	1060
10	103	65	750	25	..	75	445
11	117	60	625	26	..	70	770
12	..	90	575	27*	200	100	795
13	..	90	590	28*	..	120	1200
14	..	135	1250	29*	..	125	1005
15	133	60	595	30*	216	75	1150
				31*	233	155	1660

Table III. Vergelijking van de prijs per gelijk volume (prijs der goedkoopste traan = 100) van gestandaardiseerde en niet gestandaardiseerde levertraan met bijvermelding van het vitamine-gehalte. De gestandaardiseerde tranen zijn met *) gemerkt.

Gevitamineerde voedingsmiddelen en vitaminehoudende pharmaceutische producten.

De controle van gevitamineerde voedingsmiddelen en vitaminehoudende pharmaceutische producten is, zooals reeds werd opgemerkt, in het eene land zeer veel verder gevorderd dan in het andere.

Laat men de verschillende landen, waaruit inlichtingen werden verkregen, de revue passeeren, dan blijkt het volgende:

België. Evenmin als in Nederland bestaan in België maatregelen ter controle van de genoemde middelen. Ook daar is nog niets in voorbereiding.

Engeland. In Engeland is geen verplichte controle op gevitamineerde voedingsmiddelen of pharmaceutische producten, die vitamines bevatten. Vele firma's laten haar producten echter ijken door het Nutrition Department van het Pharmacologisch Laboratorium der Pharmaceutical Society. Van deze afdeling is Miss C o w a r d het hoofd. De naam van het laboratorium mag niet op de verpakking van of de advertenties betreffende de onderzochte producten worden genoemd. Een uitzondering hierop vormt, behalve de reeds genoemde levertraan, ook gevitamineerde margarine, omdat hiervan sinds jaren iedere maand op de open markt willekeurige monsters worden gekocht en op vitamine A en D onderzocht.

De handel in bestraalde producten is in Engeland geheel in handen van de *Claxo Company*, die over alle octrooien beschikt.

Duitschland. In Duitschland is men bezig bepalingen te treffen, die den handel in levensmiddelen, waaraan geneeskundige stoffen zijn toegevoegd, zullen regelen. Daaronder zullen ook de gevitamineerde levensmiddelen vallen. Deze bepalingen zullen passen in het kader van de bestaande levensmiddelenwet.

De handel in vitaminehoudende geneesmiddelen

zal geregeld worden door een in voorbereiding zijnde geneesmiddelenwet. Op het oogenblik zijn deze geneesmiddelen onderhevig aan de „Vorschriften über die Werbung des Heilwesens”. Iedere bedriegelijke reclame (onjuiste opgave van samenstelling, onjuiste beweringen omtrent de werking) wordt door deze voorschriften verboden.

Zweden. In Zweden heeft een commissie plannen gereed gemaakt voor een door den Staat uit te oefenen vitamine-contrôle. Deze plannen worden thans door verschillende instanties bestudeerd.

Zij bestaan in de oprichting van een afzonderlijke afdeling voor vitamine-onderzoekingen als onderdeel van een „Instituut voor de Volksgezondheid”. De oprichting van dit Instituut is in het begin van dit jaar door de regering voorgesteld en in Mei zou de Rijksdag hierover een beslissing nemen.

De ontworpen vitamine-afdeling zal zich met het onderzoek van levensmiddelen bezighouden en tevens de vitamine-houdende pharmaceutische praeparaten toegewezen krijgen.

Alle specialité's in Zweden moeten, voor zij in den handel mogen worden gebracht, ingeschreven worden in een geneesmiddelenregister. Alvorens dit geschiedt, wordt de juistheid der declaraties onderzocht. Dit geldt ook voor vitamine-houdende praeparaten. Tot nu toe kon het gehalte aan vitamines door gebrek aan een laboratorium niet gecontroleerd worden. Men ging daarom af op verklaringen der Vitamine-Instituten in Oslo en Kopenhagen. De oprichting van een eigen laboratorium zal hierin verandering brengen.

Frankrijk. Frankrijk beschikt te Parijs over twee Instituten: het „Laboratoire National de Contrôle des Médicaments” onder de directie van Prof. L o r m a n d en het „Laboratoire d'Hygiène Alimentaire”, onder leiding van Madame R a n d o i n.

Gevitamineerde voedingsmiddelen kunnen zonder voorafgaand onderzoek door het „Laboratoire d'Hygiène Alimentaire” in den handel worden gebracht. Zijn zij in den handel, dan kan de „Service de la Repression des Fraudes” monsters nemen. Deze worden dan door het genoemde laboratorium onderzocht. Blijken zij niet het aangegeven vitamine-gehalte te bevatten, dan kan de fabrikant gerechtelijk worden vervolgd.

Bij de vitamine-houdende pharmaceutische producten bestaat een dergelijke gang van zaken, echter met dit verschil, dat de meeste producten vóór zij op de markt verschijnen reeds in het „Laboratoire National” zijn onderzocht. Ook zijn er firma's, die hun praeparaten onder regelmatige contrôle van dit laboratorium stellen. Van deze contrôle mag op etiketten en reclame geen melding worden gemaakt. De reclame zelf staat niet onder toezicht van het laboratorium.

De vitamine-paeparaten worden geregistreerd en een zekere druk tot het laten controleren door het „Laboratoire National” wordt uitgeoefend, doordat alleen de onderzochte praeparaten het woord „vitamine” mogen gebruiken. De andere moeten tevreden zijn met aanduidingen als „bestraald ergosterine”, „carotine” of „ascorbinezuur”.

Hongarije. In Hongarije wordt de geheele geneesmiddelenvoorziening beheerscht door het in 1925 gestichte Hygiënisch Instituut te Budapest, dat staat onder leiding van Dr. T o m s c i k.

Een van de werkzaamheden van dit Instituut is de

contrôle op geneesmiddelen van chemisch eenvoudige samenstelling en die van specialité's. Deze contrôle is in 1935 door een verordening van den Minister van Binnenlandsche Zaken geregeld. In 1936 zijn verder de volgende middelen tot specialité's verklaard: hypophyse-achterkwab-paeparaten, adrenaline, schildklierpaeparaten, gonadotroop hormoon, menformon, digitalis en digitalisachtige stoffen, en ook paeparaten met vitamine A, C en D, benevens levertaan en levertraanemulsies, die verpakt in den handel komen en voor geneeskundige doeleinden worden gebruikt.

Alle specialité's, dus ook de genoemde vitamine-paeparaten, moeten in een geneesmiddelenregister worden ingeschreven. Wil een fabrikant een paeparaat in den handel gaan brengen, dan zendt hij dit paeparaat met de noodige toelichtingen bij het Instituut in en verzoekt om registratie. Het paeparaat wordt dan eerst tegen vergoeding onderzocht. Klopt de uitkomst van dit onderzoek niet met de opgaven, dan wordt registratie geweigerd. Komt de uitslag wel met de aangiften overeen, dan wordt het verzoek tot registratie met alle gegevens doorgezonden aan den Gezondheidsraad, die oordeelt over de prijsberekening, pharmacologische werking en therapeutische bruikbaarheid. Is dit oordeel gunstig, dan wordt het middel geregistreerd. Ieder jaar moet verder een bepaald bedrag voor registratie worden betaald.

Is een bepaald paeparaat eenmaal op de markt, dan heeft het Instituut het recht bij groothandelaren of apothekers (drogisten mogen in Hongarije zelfs geen aspirine verkoopen) monsters voor onderzoek te nemen. Deze regelmatige contrôle is echter nog niet zóó als zij zou moeten zijn. De specialité's worden nml. groepsgewijze gecontroleerd en het kan heel lang duren, voor een bepaalde groep weer aan de beurt is.

Verder staan de fabrieken en grondstoffen aan contrôle bloot. De reclame in couranten enz. is geheel vrij. Wel worden de opschriften op de verpakking en de gebruiksaanwijzingen met indicaties, die bij de verpakking gevoegd zijn, gecontroleerd.

Tot de instelling van een contrôle op gevitamineerde voedingsmiddelen is men tot nu toe niet kunnen komen. Deze contrôle wacht nog op een goed uitvoerbaar ontwerp.

Zwitserland. In Zwitserland is men juist in het laatst genoemde opzicht zeer ver gevorderd. De contrôle van gevitamineerde voedingsmiddelen geschiedt hier voor het fransch sprekende deel door het onder leiding van Prof. F l e i s c h staande „Institut de l'État pour le Contrôle Officiel des Vitamines” te Lausanne en voor het duitsch sprekende deel door Prof. E d e l b a c h e r te Bazel.

Vermelding van het vitamine-gehalte van voedingsmiddelen mag, op grond van de levensmiddelenwet, in Zwitserland, met nog te noemen uitzonderingen, slechts dan geschieden, wanneer deze voedingsmiddelen door toevoeging van vitamines of door een bijzondere behandeling vitamine-rijker zijn geworden. Deze gevitamineerde voedingsmiddelen mogen slechts met toestemming van het „Eidgenössische Gesundheitsamt” in den handel worden gebracht. Een dergelijke toestemming wordt alleen gegeven, indien de fabrikant of verkooper een op zijn kosten gemaakt rapport van een der genoemde Instituten kan overleggen, waaruit blijkt, dat het aangegeven vitamine-gehalte

werkelijk aanwezig is en de toevoegingen of behandelingen, die de levensmiddelen hebben ondergaan, onschadelijk zijn. Verder heeft het „Gesundheitsamt” het recht, om, wanneer een product eenmaal in den handel is, dit op kosten van den fabrikant periodiek op het vitamine-gehalte te laten onderzoeken.

Vervolgens moet alle reclame, van welken aard ook, aan de goedkeuring van het „Gesundheitsamt” worden onderworpen. Voor deze reclame is een leidraad opgesteld, „Leitsätze von Vitamin-Anpreisungen für Lebensmittel” genaamd, naar welke ieder zich heeft te richten. De „Leitsätze” bevatten aanwijzingen” omtrent hetgeen over aard en werking der vitamines in het algemeen mag worden gezegd en tevens aanduidingen van hetgeen over de werking van ieder vitamine afzonderlijk vermeld mag worden. Het afdrukken van aanbevelingen of attesten is geheel verboden.

Men deelt verder de gevitamineerde voedingsmiddelen naar hun rijkdom aan de verschillende vitamines in drie groepen in en houdt daarbij rekening met de dagelijksche dosis. Deze drie groepen worden aangeduid door: 1e. „rijk aan”, 2e. „een goede bron voor” en 3e. „bevat”. Een voedingsmiddel met bijvoorbeeld 2000 I.E.A. per dagdosis mag als „rijk aan” worden aangeduid”. Is deze dosis 1000—2000 I.E.A., dan is het product „een goede bron voor” en bedraagt de dagdosis 500—1000 I.E.A., dan mag alleen het woord „bevat” worden gebruikt.

De controle geschiedt per vitamine eenmaal per jaar. Dit lijkt niet veel, maar is blijkbaar hierom voldoende, omdat de fabrikant in het geheel niet weet wanneer en waar op de open markt zijn product zal worden gekocht en gecontroleerd en het niet riskeeren kan, dat dit product plotseling wordt verboden. Volgens Prof. Fleisch functionneert de controle uitstekend en komt in Zwitserland geen vitamine-zwandel meer voor. De voedingsmiddelen, die tegenwoordig met een aanduiding omtrent vitamine-gehalte worden verkocht, bevatten de aangeduide vitamines inderdaad.

Deze gevitamineerde voedingsmiddelen zijn: bestraalde melk, melkpoeder, kindermelk met levertraan, ovomaltine met natuurlijk vitamine, bestraald meel en brood, een groentenproduct, mout-paerparaten met gist, voedingsgist, leverpastei enz.

Enkele opmerkingen moeten hier nog worden gemaakt.

1. Wil men voor levensmiddelen, die, zoals versche melk, vruchten enz., van nature een erkend gehalte aan bepaalde vitamines hebben, vitamine-reclame maken, dan mag dit alleen met toestemming van het „Gesundheitsamt” en aan de hand van bovengenoemde leidraad geschieden. Een bijzonder onderzoek van deze producten is in den regel niet noodig.

2. Bestraalde levensmiddelen mogen ook dan niet zonder toestemming in omloop worden gebracht, indien niets omtrent het vitamine-gehalte vermeld wordt.

Op het gebied van de controle van gevitamineerde voedingsmiddelen staat Zwitserland dus vooraan. In het Kanton Waadt is men nog verder. Hier zijn de genoemde maatregelen sinds November 1937 ook van toepassing verklaard op pharmaceutische producten, die vitamines of hormonen bevatten en het ligt in de bedoeling een dergelijke controle in heel Zwitserland

te gaan doorvoeren. In het bijzonder mag hierbij nog worden genoemd, dat de teksten van alle reclame (verpakking, prospectus, circulaires, advertenties enz.), bij de aanvraag een bepaald product in den handel te mogen brengen, aan goedkeuring moeten worden onderworpen. Daartegenover mag de fabrikant op het goedgekeurde artikel vermelden: „Onder regelmatige controle van het Rijks Instituut”.

Wenschen voor controle van gevitamineerde voedingsmiddelen en vitamine-houdende pharmaceutische producten in Nederland.

Het behoeft na dit overzicht wel geen betoog meer, dat het ook in Nederland wenschelijk zou zijn maatregelen te treffen ter controle van gevitamineerde voedingsmiddelen en vitamine-houdende pharmaceutische producten. Deze maatregelen beoogen: het weren van middelen, die schadelijk zouden kunnen zijn en vooral, bescherming van het publiek tegen minderwaardige producten.

Nu behoeft men slechts aan de Eviunis-affaire te denken, om te weten, waartoe een ongecontroleerde aanprijzing en verkoop van een vitamineproduct kan leiden. Deze zaak ligt echter al weer eenige jaren achter ons. Niet lang geleden echter werd bij het Rijks Instituut nog een monster margarine ter onderzoek gezonden, dat volgens de reclame de vitamines A en D zou bevatten. Vitamine D was wel aanwezig, maar vitamine A ontbrak. Ook onderzochten wij nog onlangs gevitamineerde bonbons, waarvan de A-waarde slechts ongeveer 30 % en het gehalte aan vitamine C niet meer dan 10—15 % bedroeg van hetgeen op grond van de aangifte kon worden verwacht. In hetzelfde kader past ook het onderzoek van een op bijzondere wijze geconcentreerde traan, die 10 maal minder vitamine A bleek te bevatten dan was aangegeven. En dit zijn slechts een paar toevallige vondsten op een terrein, de controle van handelspraeparaten, waarop het Rijks Instituut zich verder niet beweegt. Zou men een systematisch onderzoek van vitamine-producten gaan instellen, dan zou, naar mijn overtuiging, heel wat kaf onder het koren worden gevonden.

Toezicht op de reclame zou eveneens gewenscht zijn.

Ik wil hier niet over uitwijden, maar alleen de algemeene opmerking maken, dat iedere reclame, op de verpakking, in circulaires, couranten, weekbladen enz., die het publiek een onjuiste of overdreven voorstelling geeft van de werking van het betreffende vitamineproduct, dient te worden geweerd.

Wij zijn in Nederland in de omstandigheid, dat practisch geen controle op het in den handel brengen van vitamine-producten bestaat. Men kan deze omstandigheid gelukkig noemen, omdat het daardoor mogelijk is van den grond af iets goeds op te bouwen. Daarbij kan men een dankbaar gebruik maken van hetgeen in andere landen op dit gebied reeds is tot stand gebracht en van de ervaringen, die daar zijn opgedaan. Zwitserland vooral kan ons het beste tot voorbeeld strekken.

Zouden wij de Zwitsersche controle, aangevuld met enkele maatregelen uit andere landen en aangepast aan Nederlandsche toestanden, hier kunnen invoeren, dan bleef eigenlijk niet veel te wenschen over.

Men zou zich een dergelijke controle aldus kunnen voorstellen.

Wil een fabrikant of importeur in Nederland een gevitamineerd voedingsmiddel of vitaminehoudend pharmaceutisch product in den handel brengen, dan zou dit niet geoorloofd moeten zijn, alvorens het betreffende product in een Register (in het midden gelaten of er één of twee Registers zouden moeten zijn) is ingeschreven.

Om deze inschrijving te verkrijgen zendt een fabrikant of importeur bij den Voorzitter van den Gezondheidsraad een verzoek in met bijvoeging van: 1. een monster, 2. een samenvatting van de bereiding, 3. een nauwkeurige opgave van de samenstelling, eventueel ook van de onderzoekingsmethoden en 4. een beschrijving van de doeleinden, waarvoor hij zijn product denkt aan te bevelen.

De Voorzitter stelt dit alles in handen van een Commissie, samengesteld uit vertegenwoordigers van de verschillende officieele instanties, die haar bevoegdheid hebben op het gebied van de Geneesmiddelenwet en de Warenwet, aangevuld met deskundigen.

Deze Commissie oordeelt eerst over het feit, of een product al of niet ter onderzoek zal worden doorgezonden naar een Rijks orgaan.

Niet in onderzoek zouden moeten worden genomen die producten, waarvan het evident is, of op goede gronden kan verwacht worden, dat zij schadelijk of volkomen nutteloos zijn. Besluit de Commissie in dezen zin, dan zendt zij hiervan bericht aan den Voorzitter van den Gezondheidsraad. Deze adviseert dan den betrokken Minister het product niet toe te laten. Dergelijke gevallen zullen weinig voorkomen, omdat alleen het bestaan van de genoemde regeling reeds zeer sterk preventief zal werken.

Wordt tot een onderzoek besloten, dan geeft de Commissie hiervan kennis aan den aanvrager, die zich vervolgens verplicht de onkosten van het onderzoek te betalen.

Het product wordt dan door de Commissie ter onderzoek gezonden aan het Rijksorgaan. Dit onderzoekt, of het middel aan alle aangiften voldoet en zendt van zijn bevindingen rapport aan de Commissie. Al naar de uitkomsten van het onderzoek en de overwegingen, die hiervan het gevolg zijn, adviseert de Commissie aan den Voorzitter van den Gezondheidsraad het product al of niet in het Register in te schrijven, waarop de Minister wederom beslist.

Door inschrijving in het Register verkrijgen de officieele instanties het recht monsters van het ingeschreven product tegen een door den fabrikant te betalen vast tarief per jaar periodiek te doen controleren. Deze periodieke controle zal met het oog op praktische uitvoerbaarheid en uit financiële overwegingen tot het strikt noodzakelijke moeten worden beperkt. Zij zal op onregelmatige tijden plaats moeten vinden en het aantal controle-onderzoekingen dient afhankelijk te worden gesteld van den aard van het product en het vertrouwen, dat men in de fabricage heeft. Daarom behooren de officieele instanties ook recht van toegang tot de fabricageruimten te hebben en grondstoffenmonsters te mogen nemen.

Het is m. i. niet aanbevelenswaardig den fabrikant of importeur het recht te geven zijn product te verkoopen met de vermelding „Onder voortdurende Rijkscontrole". Het publiek verbindt hieraan onwillekeurig de gedachte, dat het Rijk voor de gunstige werking van alle toegelaten producten instaat.

De geheele reclame (op verpakking, in circulaire, couranten, tijdschriften, enz. enz.) zou verder gecontroleerd moeten worden door een kleine Commissie, die regelmatig en frequent bijeen komt om alle reclamezaken zoo spoedig mogelijk te kunnen afdoen.

Reclame voor producten, die van nature vitamines bevatten, zal eveneens alleen mogen worden gemaakt na goedkeuring door laatstgenoemde Commissie.

Hoe al deze maatregelen in bestaande of komende wetten zouden kunnen worden ingelascht is een quaestie, die hier niet besproken behoeft te worden.

Voor de uitvoering der controle zullen noodig zijn: werkrachten, werkruimten en geld. Ervaren werkrachten zijn in Nederland voldoende te krijgen. Werkruimten zijn te maken. Wanneer de Regeering personeel en laboratoriumruimten in de controle zou willen inbrengen, zouden de verdere kosten vermoedelijk voor een groot gedeelte door de opbrengst uit de onderzoekingen kunnen worden gedekt. Dat de importeurs en fabrikanten deze lasten voor een zeker percentage zouden dragen is hierom te verdedigen, omdat zij ook het voordeel genieten, dat hun toegelaten producten worden beschermd. De controle in andere landen heeft bewezen, dat, zooals reeds gezegd, alleen het bestaan ervan reeds uitermate preventief werkt. Het aantal op de markt gebrachte producten vermindert, omdat men weet, dat minderwaardige middelen of middelen van twijfelachtige waarde geen of weinig kans hebben op registratie en daarom begint men er dikwijls niet eens aan om deze uit te brengen. De concurrentie voor de goede producten is dus geringer, hetgeen hun afzet verhoogt.

Dat het Rijk het zijne bijdraagt in de controle lijkt eveneens billijk, omdat het hier gaat om een algemeen belang, n.l. de voorziening van het Nederlandsche Volk met zoo goed mogelijke vitamineproducten.

Ziehier een reeks van wenschen. Wij kunnen niet anders dan hopen, dat de Regeering op een gegeven oogenblik bereid zal zijn haar aandacht aan deze wenschen te geven.

BOEKAANKONDIGINGEN.

De vitamines; een overzicht ten dienste van allen, die in onze voeding belangstellen, door Dr. J. J. Hoff, apotheker te Haarlem en C. G. Hoff-Vermeer, arts. Vierde vermeerderde druk. Gorinchem, J. Noorduyn en Zoon N.V., 1938, 96 pp., 19½ × 13½ cm, f 1.—, geb. f 1.25.

Dit is reeds de vierde druk sedert de eerste verschijning in Juni 1932: een bewijs voor de belangstelling van velen in het vraagstuk onzer voeding.

Van de schrijvers is de eene arts de andere chemicus-pharmaceut, vele jaren aan een fabriek van conserven verbonden; een combinatie, die voor eenzijdigheid behoedt. Het boekje, dat versierd is door goede portretten van Eykman en Grijns, is reeds meermalen in dit Weekblad besproken; het behoeft geen verdere aanbeveling. Slechts zij vermeld, dat deze nieuwe druk gegevens bevat over het gehalte aan eenige vitamines van een vrij groot aantal Indische voedingsmiddelen.

W. P. Jorissen.

* * *

Werkstoffkunde und Werkstoffbearbeitung. Eine kurze Uebersicht der im Metallgewerbe verwendeten Werkstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Kraftfahrzeugbaues von H. Koop, Ing. und Gewerbelehrer in Hamburg. VI. Teil der „Kraftfahrzeugkunde“. Richard Carl Schmidt & Co., Berlin W 62, 1937, 72 pp., 21 × 30 cm, RM. 2.—

Deze handleiding vormt het vierde gedeelte van de serie „Kraftfahrzeugkunde“ van denzelfden schrijver, welke bedoeld is te worden gebruikt bij het vakonderricht aan chauffeurscholen. Zij is hoogst eenvoudig gehouden en behandelt in het eerste gedeelte, „Die Werkstoffe“, uiterst kort een paar metalen, geeft in het tweede gedeelte, „Die Werkstoffprüfung“, iets aan van de mechanische keuring der metalen en bespreekt in het derde, grootste, gedeelte, „Die Werkstoff-Bearbeitung“, een paar punten van het gieten, walsen, lasschen, harden, soldeeren, draaien en meten van werkstukken. A. Slingervoet Ramondt.

* * *

E. Friedmann, Sterols and Related Compounds. W. Heffer and Sons Ltd., Cambridge, 1937, X + 100 pp., 18 × 25 cm, price 7/6.

Prof. Friedmann heeft in 1936 in het „Institute of Biochemistry“ te Cambridge een reeks van drie lezingen over steroïden gehouden; deze lezingen zijn nu, op enkele belangrijke punten bijgewerkt tot begin 1937, in boekvorm uitgegeven. De eerste lezing handelt over sterolen, galzuren, hartvergiften en saponinen; de tweede over vitamine D, en de derde over geslachtshormonen en carcinogene koolwaterstoffen. Het geheel geeft een voortreffelijk overzicht van de onderzoekingen op het gebied der steroïden, en van de resultaten, waartoe deze in de laatste jaren hebben geleid. Hierbij wordt niet alleen de structuurbevestiging besproken, maar wordt ook aangegeven, waarom deze klasse van verbindingen in physiologisch opzicht zoo belangrijk is. Als inleiding tot de studie der steroïden zal dit boekje, dat uitmunt door zijn helderen stijl, goede diensten kunnen bewijzen. Afgezien van enkele drukfouten (o.a. die in de formule van scymnol op p. 22), is de uitgave zeer goed verzorgd. J. W. Dienske.

* * *

O. Hahn, Die chemischen Elemente und natürlichen Atomarten nach dem Stande der Isotopen- und Kernforschung. Verlag Chemie, Berlin, 1938, 14 pp., 16 × 23 cm, RM. 0.90.

In deze overdruk uit de Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 71, 1 (1938) worden de resultaten weergegeven der massaspektrografische en chemische atoomgewichtsbepalingen gepubliceerd in 1937. Verder is een tabel opgenomen van alle elementen met vermelding van de stabiele isotopen met de relatieve hoeveelheden en gewichten; ook de massadefecten zijn, voor zover bekend, opgenomen. J. A. A. Ketelaar.

* * *

L. Bergmann, Schwingende Kristalle und ihre Anwendungen in der Hochfrequenz- und Ultraschall-technik. B. G. Teubner, Leipzig-Berlijn, 1937, 46 pp., 42 fig., 12 × 17 cm, RM. 0.90.

Na een inleiding over de piëzoelectrische verschijnselen worden de veelzijdige toepassingen besproken, welke de kristallen, die dit vertonen, in de eerste plaats kwarts, in de laatste tijd in de radiotechniek hebben gevonden. Ver-

volgens worden de opwekking van ultra-geluidsgolven door piëzoelectrisch in trilling gebrachte kristallen en de met deze golven verkregen verschijnselen behandeld.

In kort bestek zal de lezer, die eens iets over dit onderwerp wil lezen, een zeer goede samenvatting vinden, toegelicht met vele afbeeldingen. Uit de aard der zaak kan geen diepere behandeling van de problemen op dit gebied worden verwacht. Het doet vreemd aan, in een tekening van de structuur van kwarts, ook al is dit verder van geen belang voor het betoog, de silicium-ionen groter dan de zuurstof-ionen te zien aangegeven. J. A. A. Ketelaar.

* * *

G. Dupont, Cours de chimie industrielle, tome V; industries organiques (suite). Gauthiers—Villars, Paris, 1938, 16 × 25 cm, 279 pp., 18 fig., frs. 70.—

Het vijfde deel van dit werk, waarvan de deelen I, II en IV reeds door referent besproken werden, bevat de hoofdstukken: Matières colorantes et tannins. Les produits pharmaceutiques. Huiles essentielles et parfums. Résines, térébenthines, caoutchouc. Peintures et vernis. Les produits photographiques. De eigenlijke technologie en apparatuur zijn in dit deel, dat mij het minst geslaagd van alle lijkt, sterk op den achtergrond gedrongen. Het is wat onevenwichtig, al moet direct toegegeven worden, dat het een moeilijke taak is, bij het comprimeeren van een zoo uitgebreide stof in eenige honderden bladzijden druks, de juiste verhoudingen steeds te bewaren. Enkele opmerkingen slechts: De kleurstoffen zijn goed en vrij uitvoerig besproken in 90 blz. (men mist hier echter een behandeling der echtheden). De looistoffen worden kort besproken, de looierij echter in het geheel niet. In het hoofdstuk harsen, terpentijnen en caoutchouc vindt men aan de eerste twee 27 blz. gewijd, geheel van Fransch standpunt. Het doet eigenaardig aan, in hetzelfde hoofdstuk rubber in ruim 5 bladzijden afgedaan te zien. De literatuuropgaven zijn bijna uitsluitend Fransch. In andere opzichten is er echter toch veel te loven b.v. de overzichtelijke tabellen van de tusschenproducten der kleurstoffenindustrie en der aetherische oliën. Druk en uitvoering zijn gelijk die der vorige deelen goed, de prijs matig. F. W. Hisschemöller.

PERSONALIA, ENZ. *)

Prof. L. K. Wolff†. Wijlen Prof. Wolff aanvaardde in 1929 het ambt van hoogleeraar in de bacteriologie en hygiëne aan de Universiteit te Utrecht als opvolger van Prof. Eykman. Naast zijn onderzoekingen over de bactericidie en in de laatste jaren over de chemotherapie, waren het vooral de onderzoekingen over vitaminen, die zijn groote belangstelling hadden. Onder zijn bezielende leiding werden in het Hygiënisch Laboratorium talrijke onderzoekingen over de biologische en vooral over de chemische en physisch-chemische bepalingen der vitaminen verricht.

Van deze bepalingen zijn vooral die van het vitamine A- en C-gehalte in het bloed van groot belang geweest tot het vaststellen eener hypovitaminose bij den mensch. Het is aan Prof. Wolff te danken, dat de medische wetenschap zich steeds meer van deze bepalingmethoden bedient.

Dat ook sociaal werk zijn groote belangstelling had is gebleken uit het belangrijke aandeel, dat hij heeft gehad in de gemeentelijke commissie en de staatscommissie ter bestudeering van den gezondheids- en voedingstoestand der werklozen.

Zijn buitengewone eigenschappen van hart en geest zullen door degenen, die hem gekend hebben, maar vooral door zijn medewerkers, nooit vergeten worden.

* * *

Het Phytochemisch Laboratorium te Buitenzorg, een der oudste wetenschappelijke instellingen van Nederlandsch-Indië, zal op 18 Augustus zijn vijftigjarig bestaan in besloten kring vieren.

*) Berichten voor deze rubriek zijn steeds welkom.

TER BESPREKING ONTVANGEN BOEKEN

(aanvragen te richten tot de redactie).

- A. Einstein en L. Infeld, Drie eeuwen physica: van Gallilei tot relativiteitstheorie en quantumtheorie. Amsterdam. N.V. D. B. Centen's Uitgevers-Mij., 1938, 319 pp., geb. f 4.25.
- S. C. Bokhorst, Leerboek der scheikunde, deel 1 B, algemeene en theoretische scheikunde, 4e druk. J. B. Wolters, Groningen-Batavia, 1938, 15 × 24 cm, 204 pp., ing. f 1.40 en geb. f 1.60.
- P. Fleury, La peinture en bâtiment. Librairie Garnier frères, Paris, 1938, 12 × 18 cm, 229 pp., fr. 16.
- J. A. Lauwerys and J. Ellison, Chemistry (with some geology). University of London Press, Ltd., 10 & 11 Warwick Lane, London, E.C. 4, 1938, 13 × 19 cm, 356 pp., 146 fig., 4 s. 6 d.
- P. van Hoek, Beknopt leerboek der scheikunde, tweede deel, ten dienste van land- en tuinbouw-winterscholen. J. B. Wolters, Groningen-Batavia, 1938, 14 × 20 cm, 139 pp., 26 fig., f 1.90.
- F. A. Meerendonk, Hegerschool qualitative analysis. J. M. Dent and Sons Ltd., Bedford St., London W.C. 2, 1938, 13 × 19 cm, 40 pp., 1 s. 6 d.
- W. H. Westphal, Physikalisches Praktikum, Eine Sammlung von Übungsaufgaben für die physikalischen Übungen an Hochschulen und Universitäten aller Gattungen. Fr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1938, 15 × 23 cm, 101 fig., 335 pp., RM. 9.60.

CORRESPONDENTIE ENZ.

H. te R. In Ind. Eng. Chem. zijn reeds vele reproducties verschenen van schilderijen, waarop alchemisten in hun werkplaatsen zijn afgebeeld. Zie de opgaven in Ind. Eng. Chem. 1936, 129; 1937, 74; 1938, 70, 269, 427, 500, 630, 834.

* *

Men vraagt, in welke bibliotheken aanwezig zijn: Möller und Rievel, Fleisch- und Lebensmittelkontrolle. Aciers spéciaux, métaux, alliages (tijdschrift).

* *

Het particulier adres van den hoofdredacteur is gedurende Juli en Augustus: Zandvoort, „De Ridderskamp“, Mauritsstraat 4 (Zuiderboulevard), telefoon 2817.

VRAAG EN AANBOD.

Correspondentie wordt over deze rubriek niet gevoerd: de Redactie zendt alleen brieven door, waarvoor men porto insluit.

Ter overneming gevraagd:

- Analytische balans (nauwkeurigheid 0.1 mg.).
 Helvetica Chimica Acta, 1—19 (vooral deel 6, nummer 1, of deel 6 compleet).
 Dr. J. Tillmans, Lehrb. d. Lebensmittelchemie (1927 of nieuwere editie).

Ter overneming aangeboden:

- Kruly, Colloids (1930).
 Henley, Book of formulas, recipes and processes (1928).
 Nernst, Theoretische Chemie (1921).
 Die Umschau (geb. 1929—1937).
 Grimsehl, Lehrb. d. Physik (3 dln. 1929—34).
 Chem. Weekblad 21 (1924) t/m 26 (1929), geb.; 27 (1930) t/m 34 (1937) in afl. met losse banden.
 Lux 1896 t/m 1909, 1916 t/m 1926 geb.; Lux de Camera 1927, 1928, 1931, 1932, 1933 in afl.
 Fresenius, Qual. Anal. 1885; Quant. Anal. 1887, geb.
 Rec. trav. chim. 39, 40 en 41.
 Arch. wissensch. Photogr. 1 (1899), 11 (1901) geb.
 Van 't Hoff: Etudes de dynamique chimique; De verbeeldingskracht in de wetenschap; Ansichten über die org. Chemie, 2 dln. geb.; Zur Bildung der ozeanischen Salzablagerungen; Vorlesungen über Bildung und Spaltung von Doppelsalzen; La chimie dans l'espace; Vorles. über theor. u. physik. Chemie, 3 dln.
 Kosmos, Handweiser f. Naturfreunde. 1916 t/m 1923, in afl.
 Mikrokosmos, Z. angew. Mikrosk., Microbiol., Microchem., mikrosk. Techn. 10 (1916/17) t/m 16 (1922/23).
 Handb. der mikrosk. Technik. Das Mikrosk. u. s. Nebenapp.; Untersuch.verf. u. Hilfsmitt. z. Erf. d. Lebewelt d. Gewäss.; Rost- u. Brandpilze; Mikrophotograph. App. u. Handhabung.

Economische Berichten.

Nadere inlichtingen verstrekt het Bureau der Vereeniging van de Nederlandsche Chemische Industrie, Laan Copes van Cattenburch 16, Den Haag¹⁾.

Bulgarie.

Kwaliteitsvoorschriften. Ingevolge een verordening van den Minister voor Handel en Industrie zullen normen worden vastgesteld door producten, zoowel van binnenlandsche als buitenlandsche herkomst. Ingevoerde artikelen zullen door de douane-beambten onderzocht worden en producten, welke niet aan gestelde eischen voldoen, zullen niet ten invoer worden toegelaten. Bovengenoemde normen zullen worden vastgesteld voor de navolgende artikelen: technische vetten, consistentvetten, textielvetten, gesulfoneerde vetten, kunstmatige aetherische oliën, aromatische verbindingen en preparaten, cosmetische preparaten (parfums, eau de Cologne, crèmes, tandpasta, mondwater, schminken e.d.), geneesmiddelen, antiseptica, springstoffen, gassen (ook gecompriëerde), zuren, koper- en ijzersulfaat, chloor en chloorproducten, stikstofverbindingen, aangemaakte verven, lakken en vernissen, anorganische verfpigmenten, organische kleurstoffen, inkt, zegellak, kleurstoffen en crèmes voor schoenwerk, dextrine en stijfjel, poetsmiddelen en boenwas, kunstmeeststoffen, kaarsen, rubberartikelen, cellulose, celluloid, lino-leum, caseïne-kunsthorn, formaldehyde- en andere kunstharsen.

Nederland-Roemenië.

Regeling handels- en betalingsverkeer. Sedert eenige dagen zijn te 's-Gravenhage besprekingen ingeleid met gedelegeerden van de Roemeensche regeering over het handels- en betalingsverkeer tusschen Nederland en Roemenië.

Daar de Roemeensche gedelegeerden voor soortgelijke besprekingen naar elders moesten vertrekken, zijn de besprekingen niet voortgezet kunnen worden, maar zullen op een later tijdstip worden hervat.

In afwachting daarvan en met het oog op het feit, dat de thans nog van kracht zijnde regeling per 1 Augustus 1938 afloopt, is bepaald, dat in elk geval invoer van Roemeensche goederen in Nederland onder de bepalingen der bestaande regeling valt, mits de goederen vóór 1 Augustus verzonden zijn en derhalve onafhankelijk van den datum, waarop de werkelijke invoer resp. de storting bij het Nederlandsch Clearinginstituut van het terzake verschuldigde plaats vindt.

Tenzij vóór dien tijd een nieuwe regeling tot stand mocht zijn gekomen, volgt uit het voorgaande, dat uitvoer van goederen, die ná 1 Augustus verzonden zijn, onderworpen zal zijn aan de autonome bepalingen, in Nederland resp. Roemenië alsdan van kracht.

Paraguay.

Invoerrechten. Ingevolge een decreet van 25 Mei j.l. is voor de navolgende producten, welke tot nu toe vrij van rechten worden ingevoerd, een invoerrecht vastgesteld van 20% ad val. De nieuwe rechten, welke reeds sedert genoemden datum van kracht zijn, gelden tot 31 Dec. 1938. Het betreft hier o.a. de navolgende chemische producten: tabak, toebereid als insecticide, minerale teer, pek e.d., ruwe creosoot, lithografen-inkt, antimoon- en kaliumbitartraat.

Venezuela.

Geneesmiddelen. In aansluiting met het bericht, in Chem. Weekblad van 23 Juli j.l. (pag. 556) opgenomen, zij nog vermeld, dat de navolgende firma's eveneens de vergunning bezitten om geneesmiddelen te verkoopen: Antonio José Godoy in Sarare (district Palavicini in den staat Lara), Luis M. Gutiérrez in Baragua (district Urdaneta in den staat Lara), José Luis Henriquez in Biscucuy (district Sucre in den staat Portuguesa), Mario F. Bravo in Meng de Mauroa (district Buchivacoa in den staat Falcon).

Zuidslavië.

Ruwe naphtha. Het invoerrecht op ruwe naphtha is verlaagd van 3 tot 1.50 gouden dinar per 100 kg bruto.

¹⁾ De met * gemerkte berichten zijn ontleend aan gegevens, verstrekt door den Economischen Voorlichtingsdienst van het Departement van Economische Zaken.