Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Nephelometrische bloedvetbepalingen bij lijders aan suikerziekte

https://hdl.handle.net/1874/288495

Aqu. 192, 1927

NEPHELOMETRISCHE BLOEDVETBEPALINGEN BIJ LIJDERS AAN SUIKERZIEKTE

W. PORTHEINE

Diss.
Utrecht
1927

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

NEPHELOMETRISCHE BLOEDVETBEPALINGEN BIJ LIJDERS AAN SUIKERZIEKTE.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 3514

Diss. Utrecht 1927

NEPHELOMETRISCHE BLOEDVETBEPALINGEN BIJ LIJDERS AAN SUIKERZIEKTE

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. A. NOORDTZIJ, HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID VOLGENS HET BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE OP
DINSDAG 5 JULI 1927, DES
NAMIDDAGS 3 UUR, DOOR

WILLEM PORTHEINE
GEBOREN TE ZUTPHEN

DRUKKERIJ ZUIDAM — UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN VROUW

en

AAN MIJN OUDERS

Bij het voltooien van mijn proefschrift is het mij een genoegen U hoogleeraren en lectoren in de geneeskundige en philosopische faculteit der Universiteit te Utrecht hier mijn dank te kunnen betuigen voor het genoten onderwijs.

In 't bijzonder U Hooggeleerde Hijmans van den Bergh, Hooggeachte promotor, geldt mijn erkentelijkheid. Het onderdeel van de medische wetenschap, dat door U wordt onderwezen, heeft mij steeds het meest geboeid. Uw belangstelling en goede raadgevingen en de groote welwillendheid, waarmede ge mij tegemoet zijt gekomen, hebben mij zeer aan U verplicht.

Zonder Uw hulp en aansporingen Zeergeleerde van Wely ware dit proefschrift nimmer voltooid. Uw interesse voor dit onderwerp was de reden, dat ik dit ter hand nam. Uw groote liefde voor ons vak, die ge ook Uw medewerkers weet in te boezemen en Uw scherpe klinische blik maken U tot een onvergetelijk leermeester. De beide jaren, waarin ik onder Uw leiding heb gewerkt, reken ik onder de beste van mijn leven.

Voor veel goeden raad op scheikundig gebied en voor nauwkeurige zorgen aan de chemicaliën besteed, ben ik U Zeergeleerde Schirm ten zeerste dankbaar.

Waarde Berkhout, ge hebt in den tijd, waarin we samen assistent waren, steeds met warme belangstelling medegeleefd in dit werk. Onze dagelijksche omgang destijds is de grondslag geweest van een hechte en blijvende vriendschap.

Bij een onderwerp als dit, waarbij veel laboratoriumwerk te verrichten valt, was Uw hulp hooggeachte Mej. Fontane, onmisbaar. Uw ijver en toewijding zijn mij tot grooten steun geweest.

INLEIDING.

Als men zich een inzicht wenscht te vormen in de intermediaire stofwisseling van het vet en de daarmede verwante stoffen, dan is een onderzoek van het bloed naar het gehalte hieraan wel het meest aangewezen.

Vooral voor waarnemingen aan het ziekbed is dit tegenwoordig, nu het bloedonderzoek in de kliniek zoo'n groote plaats inneemt, zeer voor de hand liggend.

Het spreekt vanzelf, dat in de physiologische literatuur reeds jaren geleden waarnemingen in dit opzicht zijn vastgelegd; ook van pathologisch-anatomische zijde zijn reeds vroeger veel gegevens bijeengebracht.

Pas met de nieuwere methodes, die quantitatieve bepalingen in betrekkelijk geringe hoeveelheden bloed mogelijk maken, is men in staat zich een oordeel te vormen over de kleinere variaties in het gehalte van het bloed aan deze stoffen.

Het is algemeen bekend, dat bij lijders aan suikerziekte soms groote hoeveelheden vet in het bloed worden aangetroffen.

Nu het door inspuitingen met insuline mogelijk is bij deze lijders, ook bij hen die ernstig ziek zijn, de stofwisseling in hooge mate op normale wijze te doen verloopen, leek het ons

van belang bij deze behandeling, het vetgehalte van het bloed na te gaan. En met dit doel is dit onderzoek ook begonnen.

De indeeling van de stof is nu de volgende: in het eerste hoofdstuk wordt de literatuur behandeld over de „vetstoffen" in het bloed in 't algemeen en bij diabetes.

Het tweede hoofdstuk bevat een bespreking van de gevolgde methodiek, terwijl in het derde hoofdstuk een aantal eigen waarnemingen zijn beschreven.

HOOFDSTUK I.

DE LITERATUUR.

§ 1. **Chemische gegevens.**

De opvattingen, die in den loop der jaren over de „vetstoffen" in het bloed hebben geheerscht, hangen ten nauwste samen met de werkwijze, die door de verschillende onderzoekers werd toegepast.

Het was reeds lang bekend, dat door eenvoudig uitschudden met aether vele, in aether oplosbare, stoffen in het serum of het bloed achterblijven. Daarom worden steeds extractie-methodes toegepast; dikwijls de oude methode van Hoppe Seyler, welke hierin bestaat, dat serum met overmaat van alcohol wordt vermengd. Na 24 uur wordt afgefiltreerd en het residu daarna gedurende 24 uur met aether in het toestel van Soxhlet geextraheerd. Dikwijls extraheert men het gedroogde en gepulveriseerde bloed.

Er zijn nu in de literatuur een groot aantal onderzoekingen te vinden naar de chemische eigenschappen van de in aether oplosbare stoffen, die op dergelijke wijze uit bloed of serum zijn geïsoleerd.

Reeds in oudere publicaties is men zich volkomen bewust, dat dit allerminst uitsluitend vet is.[1]). Men had er choleste-

---

[1]) W. Cohnstein en H. Michaelis. Pflüger's Archiv, deel 65, 1897, bl. 473—491.

rine, cholesterine-esters, vetzuren en verder stikstof volgens Kjeldahl en na verassching phosphor in kunnen aantoonen.

Een artikel van W. Klein en L. Dinkin[1]) geeft een goed overzicht van de moeilijkheden, die men op dit gebied ontmoet.

Bespreken wij in het kort de verschillende stoffen:

1. **cholesterine.**

De juiste chemische samenstelling van deze stof is tot dusver nog niet geheel bekend; zij komt voor in galsteenen en in de gal, in de huid-talk en in het wolvet en verder in alle organen, vooral in het zenuwweefsel.

Cholesterine heeft de eigenschappen van een alcohol. De OH groep kan zich met de zuurgroep van vetzuren e.d. verbinden tot esters.

Op twee verschillende wijzen wordt nu cholesterine chemisch aangetoond:

1. door kleurreacties met sterk zwavelzuur; de meest gebruikelijke is wel de z.g. reactie van Liebermann-Burchard: aan een oplossing van de stof in chloroform wordt azijnzuur-anhydride en een weinig sterk H_2SO_4 toegevoegd. Er ontstaat dan een intensief groene kleur.

2. door de eigenschap van cholesterine om zich in alcoholisch milieu met digitonine, een saponine uit het vingerhoedskruid, tot een onoplosbaar complex te verbin-

---

1) W. Klein en L. Dinkin. Zeitschrift für physiologische Chemie, deel 92, 1914, bl. 302—330.

den.[1]). Op beide manieren nu is cholesterine in het aether-extract aantoonbaar.

2. **Cholesterine-ester.**

Lost men een hoeveelheid aether-extract in weinig warme alcohol op en laat men deze oplossing eenigen tijd bij kamertemperatuur staan, dan scheidt zich een kristallijn neerslag af, dat volgens K. Hürthle[2]) uit cholesterine-ester bestaat.

Cholesterine-esters geven wel de kleurreacties met H_2SO_4 van het vrije cholesterine, doch verbinden zich niet met digitonine. Deze verbinding toch geschiedt met de vrije hydroxyl-groep van het cholesterine en deze is bij de esters reeds door de vetzuurrest in beslag genomen.

Cholesterine-esters kunnen gesplitst worden in cholesterine en vetzuur door langdurig koken met alkali in alcoholisch milieu. Het vetzuur verbindt zich dan met de loog tot zeep. Dit verzeepen nu van de cholesterine-esters duurt veel langer en gaat veel moeilijker dan van neutraalvet.[3]).

Ook op de volgende wijze dus kan men de aanwezigheid van cholesterine-esters in het aether-extract aantoonen:

In een alcoholische oplossing van een bepaalde hoeveelheid aether-extract slaat men het vrije cholesterine met digitonine neer; in het filtraat is dan de cholesterine-ester overgegaan, welke men daarin kan aantoonen:

---

[1]) A. Windaus. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, deel 42, 1909, blz. 238.

[2]) K. Hürthle. Zeitschr. für physiologische Chemie, deel 21, 1895/6 bl. 331.

[3]) Th. E. H. Thaysen. Biochemische Zeitschr, deel 62, 1914, blz. 89—114.

1. met de kleurreacties;
2. door neer te slaan met digitonine na verzeepen.

3. **Vetzuren.**

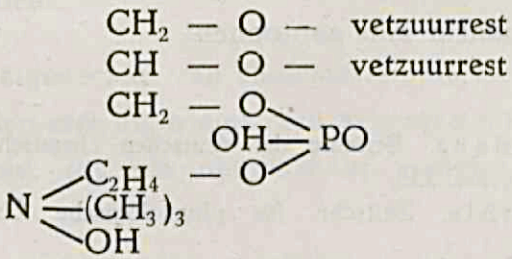
De aanwezigheid van vetzuren in het aether-extract is gemakkelijk aan te toonen. Verwarmt men een bepaalde hoeveelheid aether-extract met een waterige oplossing van Na OH, dan wordt zeep gevormd. Deze zeep is aan te toonen door uitzouten, of door het neerslag, dat ontstaat bij toevoeging van Ca of Ba zouten; of wel door de troebeling, die optreedt bij aanzuren. Deze troebeling wordt veroorzaakt door de vetzuren, die op deze wijze uit de zeep worden vrij gemaakt. Door uitschudden met aether wordt de oplossing dan weer helder.

Een vraag is nu in welke verbindingen deze vetzuren in het aether-extract voorkomen.

Zooals boven reeds opgemerkt, ten deele in verbinding met cholesterine als cholesterine-ester. Een groot gedeelte is echter ongetwijfeld in phosphor-houdende complexen z.g. lecithine in het extract aanwezig.

4. **Lecithine.**

De formule, die men voor deze stof in het leerboek van H a m m a r s t e n b.v. vindt opgegeven is de volgende:



een ingewikkelde verbinding dus van vetzuren, glycerine, phosphorzuur en choline.

Een wijze om deze stof uit het aether-extract te isoleeren bestaat hierin, dat men een geconcentreerde oplossing in aether met overmaat van aceton vermengt. Lecithine slaat dan neer.

In het reeds genoemde artikel van W. Klein en L. Dinkin vindt men nu, dat in dit neerslag veel minder P. wordt gevonden dan met de bovenstaande formule overeenkomt. Ook is de verhouding van stikstof tot phosphor geheel anders: er is naar rato te veel N. in het neerslag.

Dit kan nu ten deele berusten op het feit, dat andere N. houdende stoffen mede worden neergeslagen, of ook wel, doordat P. houdende stoffen in oplossing blijven. Vooral door M. Kumagava en K. Suto is hierop gewezen.[1]).

Doch men heeft evenzeer het recht te betwijfelen of het z.g. lecithine, dat in bloed en serum voorkomt, wel aan bovenstaande formule beantwoord. Ongetwijfeld ook heeft men hier te doen met een mengsel van verschillende stoffen.

In zijn artikelen heeft W. R. Bloor[2]) de gewoonte om de hoeveelheid lecithine in een extract te berekenen naar de hoeveelheid P., die kon worden aangetoond; daarbij uitgaande van de bovengenoemde formule, waarin dan als vetzuren, oliezuur en stearine-zuur worden aangenomen.

Om de bovengenoemde redenen nu prefereeren verschillende onderzoekers in hun publicaties uitsluitend het phosphor-gehalte van het aether-extract op te geven zonder verdere berekening, b.v. J. Feigl.[3]).

---

[1]) M. Kumagava en K. Suto. Biochemische Zeitschrift, deel 8, 1908, blz. 212.

[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 22, 1915.

[3]) J. Feigl. Biochemische Zeitschrift. deel 90, 1918, blz. 173.

Lecithine en andere dergelijke stoffen vormen in water gemakkelijk colloidale oplossingen.

Zij zijn zeer toegankelijk voor chemische veranderingen, splitsen zich reeds bij kortstondig koken met alkali. Het is daarom zeer de vraag of men deze stoffen kan extraheeren zonder dat er splitsingen optreden.

Het is nu moeilijk om uit te maken, op welke wijze de overige vetzuren in het bloed voorkomen. In z.g. lipaemisch bloed en ook in het troebele serum na resorptie van vet zeker gedeeltelijk als neutraalvet d.w.z. als verbindingen van 1 mol. glycerine met 3 mol. vetzuur.

De vraag is echter of er inderdaad neutraalvet voorkomt in het heldere plasma van hongerende individuen. E. Letsche[1]) b.v. betwijfelt dit sterk. In zijn vroegere artikelen neemt W. R. Bloor aan, dat de vetzuren, die hij bij zijn berekeningen niet kon verantwoorden als cholesterine-esters of lecithine, in den vorm van neutraalvet voorkwamen. In een latere publicatie[2]) echter, geeft hij als zijn meening aan, dat deze vetzuren in overigens nog onbekende verbindingen met eiwit voorkomen.

Een klein gedeelte schijnt verder in den vorm van vrij vetzuur of zeep aanwezig te zijn.

Zooals dus blijkt, heeft men allerminst het recht het aether-extract te bestempelen met den naam van vet, integendeel.

W. R. Bloor[3]) zegt dan ook, dat in het aether-extract

---

[1]) E. Letsche. Zeitschrift für physiologische Chemie, deel 53, 1907, blz. 31.

[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921, blz. 201.

[3]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 59, 1924, blz. 543.

voorkomt „probably also some fat, though the presence of it never has been actually demonstrated" en verder „Since no method has been found by which the fat can be separated out alone".

Als de vetzuren, die in dierlijk vet voorkomen, vindt men meestal opgegeven: stearinezuur, palmitinezuur en oliezuur.

Het zijn alle vetzuren van de aliphatische reeks. Stearinezuur en oliezuur hebben 18- palmitinezuur 16 koolstofatomen.

Oliezuur is een z.g. onverzadigd vetzuur; vertoont één dubbele binding.

De formules zijn:

Stearinezuur $CH_3 . (CH_2)_{16} COOH$.

Palmitinezuur $CH_3 . (CH_2)_{14} COOH$.

Oliezuur $CH_3 . (CH_2)_7 . CH = CH . (CH_2)_7 COOH$.

Voor deze stoffen bestaat wel de regel, dat het smeltpunt des te hooger is hoe grooter het aantal koolstofatomen is, terwijl de onverzadigde vetzuren een veel lager smeltpunt hebben.

Zoo vindt men als smeltpunten voor deze stoffen aangegeven:

voor stearinezuur	68.2°
voor palmitinezuur	61. °
voor oliezuur	14. °

De onverzadigde vetzuren zijn op de plaats van de dubbele binding gemakkelijker toegankelijk voor oxydatie, volgens den regel, dat de oxydatie daar aangrijpt, waar zij reeds is begonnen; bovendien vertoonen zij additievermogen voor J. en Br., zoodat de hoeveelheid J., die door een mengsel van vetzuren kan worden geabsorbeerd, een maat is voor het voorkomen van dubbele bindingen. (z.g. joodgetal).

W. R. Bloor[1]) nu heeft in het serum zuren kunnen aantoonen, deels met minder koolstof-atomen dan de bovengenoemde drie, deels met twee en meer dubbele bindingen. In zeer gespecialiseerde chemische onderzoekingen tracht hij na te gaan of deze stoffen als lecithine, dan wel als cholesterine-ester voorkomen.

P. A. Levene en H. S. Simms[2]) hebben in lecithine, uit de lever geïsoleerd, vetzuren met zelfs vier dubbele bindingen kunnen aantoonen.

De hypothese, die door de verschillende schrijvers op grond van dergelijke onderzoekingen wordt ondersteund is deze, dat de vetzuren in den vorm van lecithine in de lever desaturatie ondergaan, zoodat daarna verdere oxydatie zooveel te gemakkelijker plaats vindt.

In het algemeen is „lecithine" de vorm, waarin vetzuur voor omzettingen toegankelijk wordt ,terwijl neutraalvet meer als inactieve reservestof is te beschouwen.

Het gevolg is dus, dat de bloedvetzuren een zeer heterogeen mengsel voorstellen. Evenals de vetzuren uit de lever zijn zij veel gemakkelijker te oxydeeren dan vetzuren uit gewoon vetweefsel bereid.

Ook voor het cholesterine vindt men dergelijke verhoudingen, die pas beter bekend zijn geworden, toen men de verschillende quantitatieve methodes met elkaar ging vergelijken[3]). Verschillen in uitkomsten moesten wel worden

---

[1]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 59, 1924, blz. 543.

[2]) P. A. Levene en H. S. Simms. The journal of biological chemistry, deel 51, 1922, blz. 285.

[3]) J. H. Müller. The journal of biological chemistry, deel 25, 1916, blz. 549.

G. Luden, ibidem, deel 27, 1916, blz. 273.

geweten aan verschillende modificaties van het cholesterine in het bloed, daar de quantitatieve methodes voor zuiver handelscholesterine volkomen gelijkwaardig bleken.

J. Lifschütz[1]) heeft in verschillende mededeelingen geschreven over oxydatieproducten van cholesterine, terwijl hij de meening is toegedaan, dat er verband bestaat tusschen oliezuur, cholesterine en galzuren.

Het is inderdaad zeer begrijpelijk, dat in het bloed veel van deze stoffen op weg van oxydatie worden aangetroffen.

Men hoeft daartoe niet te veronderstellen, dat deze oxydatie in het bloed plaats heeft. Het is immers zeer goed mogelijk, dat stoffen, die elders, b.v. in de lever een begin van oxydatie hebben ondergaan, door het bloed worden vervoerd naar de plaats, waar de definitieve verbranding zal worden voltooid.

§ 2. **Physisch-chemische gegevens.**

Wanneer men 5 cc van een 0.1‰ oplossing van cholesterine in alcohol, uitgiet in b.v. 50 cc water en daarna wat zuur toevoegt, dan ontstaat een sterk troebele vloeistof. Het is nu wat vreemd, dat nuchter-serum met ongeveer een 200-voudig gehalte aan cholesterine volkomen helder is. Men kan zich dat alleen verklaren door aan te nemen ,dat het cholesterine in zeer fijn verdeelden colloidalen toestand voorkomt; sommigen nemen aan in losse verbinding met de eiwitten van het serum; latere opvattingen zijn, dat het serumeiwit als „Schützkolloid" optreedt.

Merkwaardige gegevens hierover zijn gepubliceerd door

---

[1]) J. Lifschütz. Zeitschrift für physiologische chemie, deel 58, 1908/9, blz. 175.

J. Lifschütz. Biochemische Zeitschrift, deel 62, 1914, blz. 219.

H. Handovsky.[1]). Hij vergeleek met elkaar de hoeveelheid cholesterine, die door eenvoudig uitschudden met aether uit serum kon worden geextraheerd, met de totale hoeveelheid. Het gedeelte „direkt ausschüttelbar" cholesterine was het grootste bij sera, waar een bepaalde eiwit-fractie, het euglobuline, betrekkelijk gering was. Ook de ionen-concentratie had invloed. Ivar Bang nu wil bij een door hem ontworpen micromethode[2]) een scheiding maken tusschen de verschillende bloed-lipoiden door behandeling met verschillende extractie-middelen. Ik meen, dat bij een dergelijke methodiek met de vermelde vondsten van H. Handovsky zeker rekening dient te worden gehouden.

Waarschijnlijk op analoge wijze zijn de overige componenten van het aether-extract in het serum opgelost. Het is echter een algemeen bekend feit, dat serum soms zeer troebel kan zijn, welke troebeling wordt veroorzaakt door een fractie van het aether-extract, daar het serum of plasma door uitschudden met aether helder wordt.

Van ouds wordt dit met den naam van lipaemie bestempeld. Daar men dit verschijnsel heeft waargenomen tijdens de digestie, onder pathologische omstandigheden en verder experimenteel bij konijnen, onderscheidt men:

een alimentaire lipaemie
een pathologische lipaemie
een experimenteele lipaemie

Beziet men een druppel van dergelijk troebel serum onder het microscoop bij immersie-vergrooting, dan blijkt het talrijke kleine partikeltjes, in levendige Brownsche beweging,

---

[1]) H. Handovsky. Münchener medizinische Wochenschrift, deel 71, 1924, blz. 708.

[2]) Ivar Bang. Biochemische Zeitschrift, deel 91, 1918, blz. 235.

te bevatten. Deze worden in helder serum nimmer gezien en verdwijnen ook na uitschudden met aether. Ze hebben vanouds den naam van haemoconiën.

Zooals bekend, ziet de chylus in den ductus thoracicus melkwit, tijdens de digestie van vet, tengevolge van zeer veel dergelijke kleine partikels. Men is nu algemeen overtuigd, dat de haemoconiën afkomstig zijn van den troebelen chylus, die zich in het bloed uitstort.

I. Munk heeft bewezen[1]), dat het aether-extract van chylus tijdens de resorptie van vet voor verreweg het grootste deel uit neutraalvet bestaat.

E. Neisser en H. Braüning[2]) hebben nu speciaal de haemoconiën bestudeerd. Het bleek hun, dat bij staan gedurende 24 à 48 uren in de ijskast zulk troebel serum helder werd, terwijl een klein laagje vet aan de oppervlakte kwam. Deze „Aufrahmung" trad langzamer of in 't geheel niet op, als vloeibaar vet was gevoed. De aard van het met aether uitgeschudde vet veranderde naar gelang meer vloeibaar of meer vast vet was toegediend. Tenslotte was het te kleuren met Soedan III en Osmiumzuur. Ook door voeding met boter, sterk gekleurd met Soedan III, werden de haemoconiën bepaald oranje.

Dit alles beschouwen de schrijvers wel als een bewijs, dat de haemoconiën uit neutraalvet bestaan in fijnverdeeld gesuspendeerden toestand.

Er is echter een kleine moeilijkheid: B. Fischer[3]) beschrijft naar aanleiding van een geval van diabetes met zeer

---

[1]) L. Munk. Virchow's Archiv, deel 80, 1880, blz. 10.

[2]) E. Neisser en H. Braüning. Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, deel 4, 1907, blz. 749.

[3]) B. Fischer. Virchow's Archiv, deel 172, 1903, blz. 30 en 218.

hoog vetgehalte van het bloed, hoe de inhoud van de levercapillairen zich niet met osmiumzuur zwart liet kleuren, doch wel Soedan III opnam.

Intusschen, het is wel zeer aannemelijk, dat de haemoconiën uit neutraalvet bestaan.

Volgens Neumann[1]) worden met het ultramicroscoop in het donkerveld nog vele kleinere deeltjes zichtbaar, doch ongetwijfeld worden op deze wijze ook colloidale eiwitdeeltjes waargenomen.

Een vraag is nu of de eenige vorm, waarin neutraalvet in het plasma kan voorkomen, die van het „bloedstof" is. W. R. Bloor schijnt in een latere publicatie[2]) wel deze meening toegedaan. Een scherp bewijs ervoor heb ik niet in de literatuur kunnen vinden.

Men dient zich echter wel bewust te zijn, dat de resorptie van vet kan plaats vinden, zonder dat haemoconiën optreden: bij konijnen lukt het niet een alimentaire lipaemie op te wekken. Bovendien is het duidelijk, dat een zeer geringe hoeveelheid vet al de troebeling kan veroorzaken.

Het troebel zijn van het serum is dus geenszins een bewijs voor een hoog gehalte aan aether-extract. Het zegt alleen, dat een bepaalde fractie — waarschijnlijk dus het neutraalvet — in den vorm van hamoconiën voorkomt.

Intusschen is het waar, dat serum met meer dan 1% aether-extract zelden helder is. Bij icterus en in gevallen van levercirrhose[3]) zijn echter soms veel hoogere waarden — b.v. 2.24% — gevonden in helder plasma. In de literatuur vindt

---

[1]) A. Neumann. Wiener klinische Wochenschrift, 1907, blz. 851.
[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921.
[3]) H. Beumer en M. Bürger. Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie, deel 13, 1913, blz. 343.

men in dit verband gesproken over „gemaskeerd aether-extract" en maskeerend vermogen van het bloedplasma".

§ 3. **De quantitatieve verhoudingen.**

In de literatuur vindt men nu buitengewoon uiteenloopende waarden opgegeven voor het totale aether-extract en ook voor de verschillende componenten. B. Fischer[1]) in 1903 citeert een aantal cijfers varieerend tusschen 0.1% en 1% als normale waarden.

Grootendeels ligt dit aan de verschillende wijze van extractie door de onderzoekers gebruikt; bovendien werd niet voldoende rekening gehouden met de veranderingen, die door staan, of postmortaal kunnen optreden.

In het artikel van M. Kumagava en K. Suto[2]) wordt nu een uitgebreide bespreking gewijd aan de genoemde bezwaren. Op grond van hun onderzoekingen is door Y. Shimidzu[3]) de volgende quantitatieve methode voor bloed uitgewerkt: het alcoholisch extract van het niet gedroogde bloed wordt verzeept, aangezuurd en de vetzuren + onverzeepbare stof met aether uitgeschud.

Voortbouwende op deze beginselen heeft W. R. Bloor de micro-methodes opgebouwd, die later worden besproken. Deze onderzoeker heeft een lijst van normale waarden, bij den mensch, gepubliceerd in 1926[4]).

In 't kort zijn deze cijfers op de volgende wijze verkregen:

---

[1]) B. Fischer. l.c.

[2]) M. Kumagava en K. Suto. l.c.

[3]) Y. Shimidzu. Biochemische Zeitschrift, deel 28, 1910, blz. 237.

[4]) W. R. Bloor. The journal of biological Chemistry, deel 25, 1916, blz. 577.

NORMAALWAARDEN. (W. R. BLOOR 1916) in %.

MANNEN.

	VETZUREN			LECITHINE			CHOLESTERINE			VET	
	bloed	plasma	cellen	bloed	plasma	cellen	bloed	plasma	cellen	plasma	cellen
Hoog	0.41	0.43	0.45	0.33	0.26	0.44	0.25	0.31	0.23	0.16	0.15
Midden	0.36	0.38	0.36	0.30	0.22	0.40	0.21	0.22	0.19	0.11	0.07
Laag	0.29	0.30	0.28	0 29	0.20	0.35	0.19	0.19	0.17	0.04	0.00

VROUWEN.

	VETZUREN			LECITHINE			CHOLESTERINE			VET	
	bloed	plasma	cellen	bloed	plasma	cellen	bloed	plasma	cellen	plasma	cellen
Hoog	0.42	0.47	0.34	0.31	0.22	0.48	0.24	0.26	0 24	0.20	0.03
Midden	0.36	0.40	0.29	0.29	0.19	0.44	0.23	0.24	0.21	0.16	0.01
Laag	0.32	0.35	0.27	0.28	0.17	0.39	0.21	0.21	0.19	0.12	0.00

Bepalingen werden uitgevoerd met een extract van het geheele bloed, en van het oxalaat-plasma alleen. De waarden voor de bloedlichaampjes zijn berekend.

In elk extract werd bepaald:

I. Vetzuren + cholesterine, samen — nephelometrisch.

II. Cholesterine — colorimetrisch. (zonder verzeepen).

III. Phosphor — nephelometrisch.

De rubriek „vetzuren" werd verkregen door II van I af te trekken. De rubriek „lecithine" is berekend naar de gevonden hoeveelheid phosphor. De rubriek „Vet" is berekend uit de hoeveelheid resteerend vetzuur, die niet als lecithine of cholesterine-ester kon worden verantwoord. Daarbij wordt aangenomen, dat 60% van het cholesterine in het plasma als ester gebonden voorkomt.

Volgens een latere wijziging van W. R. Bloor in 1922 worden vetzuren en cholesterine afzonderlijk bepaald, het laatste na verzeepen. Voor beide worden dan lagere waarden gevonden. Deze methode nu is door mij gebruikt. Als normale waarden voor cholesterine zijn dus in dit verband beter de opgaven in de literatuur na verzeepen. Normale vetzuur-waarden met deze methode verkregen, vindt men niet opgegeven. Men dient zich hierin dus met de oude cijfers tevreden te stellen.

Voor cholesterine dan vindt men in het geheele bloed opgegeven 1.4—1.6‰[1]) en in het serum 1.4—2.3‰, gemiddeld 1.77‰.[2]).

In het algemeen zijn de waarden voor cholesterine zoowel

---

[1])W. Autenrieth en A. Funk. Münchener medizinische Wochenschrift, 1913, blz. 1243 (No. 23.)

[2]) W. Klein en L. Dinkin l.c.

als voor vetzuren wat lager in de bloedlichaampjes dan in het plasma. De meeste variaties doen zich in het plasma voor, terwijl de cellen een zekere zelfstandigheid in hun chemische samenstelling tegenover het plasma toonen. Dit is trouwens ook voor andere stoffen een bekend feit.

De meeste schrijvers zijn het er over eens, dat cholesterine-esters niet of slechts bij uitzondering in de cellen voorkomen.[1]). Sinds K. Hürthle[2]) heerschte de meening, dat in het plasma slechts cholesterine-esters voorkwamen, doch dit is, sinds de methode van Windaus gebruikt werd, weerlegd. W. R. Bloor en A. Knudson[1]) geven op, dat ± 60% van het cholesterine in het plasma als ester voorkomt. H. Beumer en M. Bürger[3]) vinden veel meer wisselende verhoudingen.

§ 4. **Physiologische gegevens.**

Algemeen wordt tegenwoordig aangenomen, dat de vetten een splitsing in vetzuren en glycerine ondergaan vóór ze worden geresorbeerd.

Reeds I. Munk[4] heeft de mogelijkheid van deze wijze van resorptie overwogen, doch vooral E. F. W. Pflüger[5]) heeft in verschillende publicaties aangetoond, dat de mogelijkheid van een splitsing van alle opgenomen vet zeker bestaat; dat een emulsie al zoodanig geresorbeerd kan worden, is nimmer aangetoond, eer het tegendeel.

---

[1]) W. R. Bloor en A. Knudson. The journal of biological chemistry, deel 29, 1917, blz. 8.
Th. E. H. Thaysen. l.c.
[2]) K. Hürthle. l.c.
[3]) H. Beumer en M. Bürger. l.c.
[4]) I. Munk en A. Rosenstein. Virchow's Archiv, deel 123, 1891, blz. 230 en 484.
[5]) E. F. W. Pflüger. Pflüger's Archiv, deel 81, 88 enz. (1901).

Men neemt dan een resynthese van een deel van de geresorbeerde vetzuren tot neutraalvet[1]) aan.

De witte kleur van de chylus-vaten tijdens de digestie van vet wordt veroorzaakt door de zeer fijn verdeelde vet-emulsie, die aldus is ontstaan. Welk percentage van het geresorbeerde vet nu op deze wijze met den chylus-stroom wordt meegevoerd, is niet zeker bekend.

I. Munk en A. Rosenstein[2] hebben uit een chylusfistel bij een meisje 60% van het opgenomen vet teruggewonnen.

W. R. Bloor heeft er op gewezen[3]), dat de vetzuren van het chylus-vet, in vergelijking met die van het opgenomen vet, gewijzigd zijn in den zin van het soorteigen vet van het proefdier. Hij ziet hierin een analogie met de resorptie der eiwitten.

Over het cholesterine heerschte oorspronkelijk de opvatting van Naunyn, dat deze stof een afbraak product van eiwit is. Uit de school van Aschoff zijn nu een aantal onderzoekingen, die vrijwel bewijzen, dat het cholesterine grootendeels uit het voedsel afkomstig is.[4]).

Bij voeding van alleen cholesterine zou slechts het vrije cholesterine in het bloed toenemen, terwijl de cholesterineesters bij voeding van vet vermeerderd worden gevonden.[5])[6]).

---

[1]) I. Munk. Virchow's Archiv, deel 80, 1880, blz. 10.

[2]) Munk en A. Rosenstein. l.c.

[3]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 16, 1913/14, blz. 517.

[4]) b.v. Bacmeister. Biochemische Zeitschrift, deel 26, 1910, blz. 223.

[5]) J. H. Müller. The journal of biological chemistry, deel 22, 1915, blz. 1.

[6]) A. Knudson. The journal of biological chemistry, deel 32, 1917, blz. 337, deel 45, 1920/21 blz. 255.

Zeer waarschijnlijk wordt het lecithine uit het voedsel in den darm gesplitst. Er schijnt echter een resynthese plaats te vinden, daar F. Eichholtz[1]) tijdens de resorptie het lecithine in het bloed vond toegenomen.

Tijdens de digestie worden dus veranderingen in het bloed gevonden door den chylus, die zich er in uitstort.

Na ongeveer 12 uur is het vetgehalte echter bij normale individuën weer tot een niveau gedaald, dat vrijwel constant is. E. F. Terroine[2]) heeft vooral de variaties bij één individu en binnen de soort bestudeerd. Bij honden vond hij de individueele variaties ongeveer 10%, die, binnen de soort, ongeveer 33% boven en beneden het gemiddelde. Men kan dus van een nuchterniveau met deze variaties spreken. Alle waarden in de bovengenoemde tabel zijn dan ook nuchterwaarden.

Tijdens de digestie van vet wordt, zooals bekend is, het serum troebel; samen hiermede gaat een toename van het aether-extract.

Bij konijnen, waar deze alimentaire lipaemie niet kan worden teweeg gebracht, wordt ook chemisch geen toename gevonden.[3]).

Door A. Neumann[4]) en later door E. Neisser en H. Braüning[5]) is deze alimentaire troebeling bestudeerd. De eerste schatte daartoe de lichtende bolletjes in het donker-veld, de laatste onderzoekers namen als maat de hoogte van de kolom vet, die zich bij staan boven een be-

---

1) F. Eichholtz. Biochemische Zeitschrift, deel 144, 1924, blz. 66.
2) E. F. Terroine. Journal de physiologie et de pathologie générale, deel 16, 1914, blz. 212.
3) S. Sakai. Biochemische Zeitschrift, deel 62, 1914, blz. 387.
4) A. Neumann. l. c.
5) E. Neisser en H. Braüning l. c.

paalde hoeveelheid serum verzamelde. Zij vonden, dat in het tweede tot derde uur na het gebruik van vet de troebeling begon. Dat na 6 uur het aantal haemoconiën het grootste is, terwijl na 8 hoogstens na 10 uur het serum weer volkomen helder was. Hiermede gelijken tred houden de chemische veranderingen, die b.v. door E. F. Terroine[1]) en W. R. Bloor[2]) aan honden zijn bestudeerd.

Beide onderzoekers vinden een toename van vetzuren, het sterkst na 4 à 6 uur. Over cholesterine loopen hun conclusies uiteen.

Terwijl de laatste onderzoeker een verandering in het cholesterine-gehalte van het bloed ontkent, vond de eerste een min of meer parallel-gaan van deze stof met de vetzuren. In een latere bespreking van de alimentaire lipaemie is W. R. Bloor[3]) toch ook wel geneigd een toename van cholesterine aan te nemen. Samen met E. M. Gillette[4]) heeft hij trouwens eenige series getallen gepubliceerd, waaruit dit ook zeker wel kan worden geconcludeerd.

W. R. Bloor gaat nu hierin veel verder dan de eerste onderzoeker, doordat hij de sterkste toename van de vetzuren in de erythrocyten vindt en wel in den vorm van lecithine. Hierop baseert hij zijn hypothese, dat de haemoconiën door de erythrocyten worden opgenomen en in lecithine worden omgezet. Dit zou dan de eerste stap zijn in de assimilatie van het vet. Bovendien was dan het feit, dat de troebele chylus

---

[1]) E. F. Terroine l.c.

[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 24, 1916, blz. 447.

[3]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921. blz. 201.

[4]) W. R. Bloor en E. M. Gillette. Proceedings of the society for experimental biology and medicine, N.-York, deel 22, 1915, blz. 251.

terstond in de groote circulatie vloeit, min of meer begrijpelijk. Ik heb geen nadere bevestiging van deze waarneming kunnen vinden, die toch met tamelijk aanvechtbare methodes is bewerkt.

In dit verband nemen een geheel afzonderlijke plaats in de onderzoekingen van W. Arnoldi en I. A. Collazo[1]). Zij vonden bij opname van koolhydraat, eiwit of vet afzonderlijk, veranderingen, zoowel in bloedsuiker, als in bloedvet. Hun conclusie is, dat voedselopname, van welken aard dan ook, een aanleiding is tot een verplaatsing van weefselvocht en bloedbestanddeelen. Deze overwegingen maken een en ander wel zeer ingewikkeld. Het is bovendien de vraag, of dergelijke subtiele gevolgtrekkingen naar waarnemingen met de, steeds nog wat onzuivere, micro-methodes (in dezen die van Ivar Bang) wel gerechtvaardigd zijn.

Na het bovenstaande ligt de beteekenis van het lecithine in de vetstofwisseling wel voor de hand. Welke rol echter het cholesterine in dezen speelt, is niet duidelijk. W. Hueck en L. Wacker[2]) geven hiervoor een hypothese, die nog slechts door weinig waarneming gesteund wordt. Bij het ontstaan van lecithine uit neutraalvet zou cholesterine zich met het vrijkomende vetzuur verbinden. Zooals reeds gezegd, zijn sommige onderzoekers overtuigd, dat cholesterine uit vetzuren kan ontstaan. De beteekenis van deze stoffen als lipoid-membranen voor de permeabiliteit van de cellen is wel zeer bekend. Verder ziet men nog een physiologische waarde in de eigenschap van het vrije cholesterine om haemolytische giffen

---

[1]) W. Arnoldi en I. A. Collazo. Zeitschrift für die gesammte experimentelle Medizin, deel 40, 1924, blz. 323.

[2]) W. Hueck en L. Wacker, Biochemische Zeitschrift, deel 100, 1919, blz. 84.

te binden en onwerkzaam te maken.

T. B. Robertson[1]) heeft den invloed van cholesterine op den groei onderzocht.

Door verschillende onderzoekers zijn nu de veranderingen door vasten nagegaan.[2])[3])[4])[5]). Deze worden in 't algemeen verschillend gevonden al naar mate het proefdier tevoren vet of mager was.

Veel meer bestudeerd is de lipaemie, die door ruime aderlatingen bij konijnen na eenige dagen ontstaat.[6])[7]).

Bij deze dieren wordt dan een toename zoowel van vetzuren als van cholesterine gevonden. De verklaring, die de verschillende onderzoekers voor dit verschijnsel geven, is niet eensluidend. S. Saka i zoekt de oorzaak in een verminderd lipolytisch vermogen van het bloedplasma, terwijl W. R. Bloor[8]) meer de meening is toegedaan, dat vet in het bloed wordt uitgestort, misschien wel, doordat vetmerg vervangen wordt door bloedvormend weefsel. Ook de hypothese, dat de toename van cholesterine het primaire zou zijn, verdient overweging.

Want door voeding van cholesterine met olijfolie gedurende

---

[1]) T. B. Robertson. The journal of biological chemistry, deel 25, 1916, blz. 635.

[2]) Fr. N. Schultz. Pflüger's Archiv, deel 65, 1897, blz. 299.

[3]) L. Lattes. Archiv. für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, deel 66, 1911, blz. 132.

[4]) E. F. Terroine. l.c.

[5]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 19, 1914, blz. 1.

[6]) S. Sakai. l.c.

[7]) Y. Horiuchi. The journal of biological chemistry, deel 44, 1920, blz. 345.

[8]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921, blz. 201.

langeren tijd hebben W. Hueck en L. Wacker[1]) bij konijnen, een lipaemie weten op te wekken, waarbij ook het vet in het bloed was toegenomen. Of de haemoconiën, die in al deze gevallen de troebeling veroorzaken, nu steeds uit neutraalvet bestaan, is nimmer beslist.

Over het zooeven genoemde lipolytisch vermogen van het bloed bestaat een uitgebreide literatuur. In 1897 hebben W. Cohnstein en H. Michaelis[2]) gevonden, dat het vet in het bloed, eenvoudig door aether-extractie bepaald, afnam bij doorzuigen van zuurstof. Dit vonden zij ook bij een mengsel van chylus en bloed, doch niet bij serum, zoodat het verschijnsel aan de erythrocyten schijnt te zijn gebonden. In een volgend artikel[3]) geven zij argumenten aan, dat het vet in dialyseerbare stoffen zou worden gesplitst. Verwarmen tot 100° maakt het bloed onwerkzaam; door haemolyse lakkleurig bloed geeft echter wel resultaat.

Deze vondsten zijn door verschillende onderzoekers gecritiseerd. G. Klemperer en H. Umber[4]) b.v. konden geen lipolyse aantoonen en vermoeden, dat de vondsten van de bovengenoemde onderzoekers aan de inwerking van bacteriën moeten worden geweten. Interessante waarnemingen zijn neergelegd in een critiek van de hand van G. Mansfeld.[4]). Terwijl hij evenals W. Cohnstein en H. Michaelis vond, dat het met aether extraheerbare

---

[1]) W. Hueck en L. Wacker. l.c.
„ „ en Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, deel 74, 1913, blz. 416.

[2]) W. Cohnstein en H. Michaelis. Pflüger's Archiv, deel 65, 1897, blz. 473.

[3]) Pflüger's. Archiv, deel 69, 1898, blz. 76.

[4]) G. Klemperer en H. Umber. Zeitschrift für klinische Medizin, deel 61, 1907, blz. 145.

[5]) G. Mansfeld. Zentralblatt für Physiologie, deel 21, 1908, blz. 666.

vet verminderde, kon hij geen verlies constateeren bij onderzoek na verzeeping. Hij is van oordeel, dat de vetzuren worden gebonden op een wijze, die ze voor aether-extractie niet meer toegankelijk maakt. Hoe meer eiwit er in het mengsel aanwezig is, hoe sterker de verandering, zoodat hij vermoedt, dat de binding aan eiwit geschiedt.

Door eenige onderzoekers[1] [2], die later het vetsplitsend vermogen van verschillende organen onderzochten, is steeds gevonden, dat het bloed geen of nagenoeg geen lipolytische eigenschappen bezit, vandaar dat A. Magnus—Levy in het handboek van Kraus en Brugsch[3] de leer van de lipolyse in het bloed als weerlegd beschouwt.

Een geheel nieuw aspect heeft de zaak echter gekregen sinds P. Rona en L. Michaelis[4] een nieuwe onderzoekingsmethode hebben aangegeven. Deze berust op het feit, dat de oppervlakte spanning van een oplossing van monobutyrine of van tributyrine — verbindingen van glycerine met boterzuur — sterk verandert, als deze stoffen in hun componenten worden gesplitst.

Men gaat deze verandering na, door het aantal druppels van de oplossing te tellen, dat per minuut uit een capillair vloeit: z.g. stalagmometrisch. Op deze wijze heeft S. Sakai[5] veranderingen in het lipolytisch vermogen van het bloedserum bij anaemisch gemaakte konijnen gevonden. Het is vreemd, dat in de Amerikaansche literatuur nauwelijks

---

[1] L. Berczeller. Biochemische Zeitschrift, deel 44, 1912, blz. 185.
[2] Freudenberg. Biochemische Zeitschrift, deel 45, 1912, blz. 467.
[3] Deel I 1919, Diabetes mellitus, blz. 25.
[4] P. Rona en L. Michaelis. Biochemische Zeitschrift, deel 31, 1911, blz. 345.
P. Rona. Biochemische Zeitschrift, deel 33, 1911, blz. 413.
[5] S. Sakai. l.c.

over deze dingen wordt gesproken. W. R. Bloor[1]) bespreekt de uitkomsten van S. Sakai met deze methode. Het is ongetwijfeld waar, dat een splitsend vermogen voor monobutyrine of zelfs voor tributyrine nog geen analoge werking op neutraalvet bewijst. Hierop is o.a. ook gewezen door Beumer in 1921.[2]). Zoover ik heb kunnen nagaan, is het lipase-gehalte van het serum bij diabetici op deze wijze nimmer onderzocht.

Een zeer bijzondere beteekenis hebben in dit verband de onderzoekingen van H. Roger en L. Binet[3]). Zij konden een sterk lipolytisch vermogen van het arterieele bloed constateeren. Zij deden hun quantitatieve bepalingen volgens Kumagava en Suto. Het veneuze bloed, zelfs wanneer het met zuurstof werd verzadigd, vertoonde dit lipolytisch vermogen nagenoeg niet. Dit laatste is in overeenstemming met de boven-aangehaalde observaties.

Hierdoor wordt dus de beteekenis van de longen voor de vetstofwisseling op den voorgrond geschoven, zoodat het feit, dat het geresorbeerde vet grootendeels buiten de lever om, de longen bereikt, een ander aspect krijgt.

§ 5. Klinische waarnemingen in het algemeen.

In de klinische literatuur zijn slechts weinig onderzoekingen gepubliceerd naar de quantitatieve verhoudingen van de verschillende componenten van het aether-extract bij ziek-

---

[1]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921, blz. 201, „Lipaemie".

[2]) Beumer. Berliner klinische Wochenschrift. Jhrg. 58, 1921, No. 30, blz. 855.

[3]) H. Roger en L. Binet. Comptes rendus de la société de biologie, deel 86, 1922, blz. 79 en 203.

ten. H. Beumer en M. Bürger[1]) hebben in een reeks artikelen waarnemingen besproken bij polycythaemie, leukaemie, icterus enz. Van de hand van W. R. Bloor bestaat een, als het ware orienteerend, overzicht van de vondsten bij talrijke ziekelijke toestanden.[2]). Door Dr. J. C. Schippers[3]) is een laag vetgehalte in het bloed van kinderen met exsudatieve diathese gevonden. Dr. A. C. De Kock[4]) heeft zich in zijn dissertatie hierbij aangesloten. Ook bij morbus Basedow is een laag bloedvet beschreven.

Het cholesterine alleen is veel meer een voorwerp van studie geweest, sinds de colorimetrische methoden, oorspronkelijk door Grigaut ingevoerd. Dr. D. Klinkert[5]) heeft een goed overzicht gegeven van de schitterende en veelomvattende hypotheses, die op dit gebied door Chauffard en zijn school het eerst zijn opgebouwd.

De meeste quantitatieve onderzoekingen over cholesterine zijn echter gedaan zonder dat gelijktijdig de hoeveelheid vetzuren in het bloed werd bepaald. Bij de experimenteele lipaemie van anaemische konijnen en ook bij de diabetische lipaemie is een parallel-gaan van het cholesterine met de vetzuren waargenomen; iets dat voor W. R. Bloor een bewijs is, dat cholesterine een rol speelt bij de vetstofwisseling, ter-

---

[1]) H. Beumer en M. Bürger. l. c.

[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 25, 1916, blz. 577.

[3]) Dr. J. C. Schippers. Jahrbuch für Kinderheilkunde 3te Folge, deel 43, 1920, blz. 151.

[4]) A. C. de Kock. Over alimentaire lipaemie bij kinderen. Dissertatie Leiden 1924.

[5]) Dr. D. Klinkert. Berliner Klinische Wochenschrift. No. 18, 1913, blz. 820.

Dr. D. Klinkert. Aetiologie en pathogenese der Cholelithiasis. Dissertatie, Leiden 1909.

wijl S. Sakai de verbluffende opmerking geeft, dat het cholesterine misschien hierom is toegenomen, in deze gevallen, omdat het vetrijke bloed een beter oplosmiddel voor deze stof is. Vindt men dus bij een bepaalde ziekte een verhoogd cholesterine-gehalte van het bloed, dan dient eerst te worden uitgemaakt in hoeverre dit te beschouwen is als een begeleidend verschijnsel bij een toename van vetzuren. In dit opzicht is de hypercholesterinaemie bij zwangere vrouwen goed bestudeerd. De eerste waarnemingen hieromtrent stammen reeds van de Fransche onderzoekers. J. Neumann en E. Herrmann hebben in een aantal artikelen[1]) hun bevindingen neergelegd, die in hoofdzaak hierop neerkomen, dat cholesterine evenals neutraalvet in het bloed van zwangere vrouwen met den duur der graviditeit toeneemt en snel daalt na de partus als het kind wordt gezoogd. Het zog bevat dan aanvankelijk veel cholesterine, dat onder anderen langs dezen weg het bloed verlaat. Een tweede weg is met de gal, waar deze stof dan het ontstaan van galsteenen zou kunnen bevorderen.

Het is dus zeer wel mogelijk, dat de hypercholesterinaemie in dezen een symptoom is van de toename der vetzuren. En een verandering in de vetstofwisseling is bij gravidae toch wel zeer goed aan te nemen.

Door J. Feigl[2]) is bij acuut bloedverlies (bij patienten met tbc pulmonum, ulcus ventriculi e.d.) een toename van cholesterine en vetzuren in het bloed gevonden; dit wordt in verband gebracht met de experimenteele vondsten bij

---

[1]) J. Neumann en E. Herrmann. Wiener klinische Wochenschrift, 24 Jhrg. 1911, No. 12, blz. 411; 25 Jhrg. 1912, No. 43, blz. 1557. Biochemische Zeitschrift, deel 43, 1912, blz. 47.

[2]) J. Feigl. Biochemische Zeitschrift, deel 115, 1921, blz. 63.

anaemisch gemaakte konijnen. Bij pernicieuze anaemie wordt overigens meestal een verlaagd cholesterine-gehalte opgegeven. De vetzuren van het bloed bij deze ziekte genieten een bijzondere belangstelling, sinds E. S. Faust en T. W. Tallquist[1]) de oorzaak van de botriocephalus-anaemie zochten in de haemolytische eigenschappen van een onverzadigd vetzuur, dat uit dezen parasiet werd verkregen. Men zoekt vooral naar meervoudig onverzadigde vetzuren[2]), tot dusver zonder volkomen overtuigende resultaten.

Toename van cholesterine is verder beschreven bij arteriosklerose en nephritis. Verband wordt gezocht met de hierboven genoemde proeven van W. Hueck en L. Wacker bij voeding van konijnen met cholesterine. Zij vonden veranderingen van de intima der arteriën, die eenige overeenkomst vertoonden met de menschelijke arteriosklerose. Zooals bekend, wordt daarbij in de laesies ook veel cholesterine gevonden.

Een bijzondere plaats neemt de hypercholesterinaemie in, die bij icterus en ook soms bij cholelithiasis wordt waargenomen. Sommige onderzoekers willen deze toeschrijven aan een belemmerde afscheiding van de lever, anderen sluiten zich aan bij de hypothese van Chauffard, die in de hypercholesterinaemie als het ware een bepaalde constitutie zag, waarvan ook cholelithiasis een uitvloeisel was. Intusschen is toename van cholesterine bij deze afwijkingen lang niet constant. Ook met carcinoom wordt cholesterine in verband gebracht.

---

[1]) E. S. Faust en T. W. Tallquist. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, deel 57, 1907, blz. 367.

[2]) A. von Szent-Györgyi. Biochemische Zeitschrift, deel 146, 1922, blz. 239.

Voor de desbetreffende literatuur raadplege men b.v. de artikelen van W. R. Bloor, die speciaal over cholesterine handelen.[1]).

§ 6. **Waarnemingen bij diabetes mellitus.**

De oudere publicaties over het bloedvet bij deze ziekte handelen meest over lipaemie, waarbij dan bijzonder hooge waarden werden gevonden. Pas sinds W. R. Bloor zijn micromethodes had ingevoerd, is men aangevangen met de studie van het bloedvet bij lijders aan suikerziekte in het algemeen. Het eerste artikel van dezen onderzoeker over dit onderwerp betreft een 20-tal lijders, die onder behandeling waren van E. P. Joslin.[2]). Deze lieden gebruikten, zooals destijds E. P. Joslin sterk propageerde, een dieet van een zeer geringe caloriënwaarde (500 caloriën en lager) en dat zeer geringe hoeveelheden vet bevatte. Bij allen werd nuchter helder plasma gevonden, althans wanneer de lijders eenigen tijd onder behandeling waren. Bij chemisch onderzoek waren de gevonden waarden zoowel voor vetzuren als voor cholesterine, steeds aan den hoogen kant. De hoogere waarden, zooals die door vroegere onderzoekers werden gepubliceerd, en evenzoo een troebeling van het plasma nuchter, werden alleen gevonden bij onbehandelde patienten. In het algemeen werden bij de zwaardere gevallen wat hoogere waarden gevonden dan bij lichtere.

W. R. Bloor merkt bovendien op, dat het heldere plasma

---

1) W. R. Bloor en A. Knudson. The journal of biological chemistry, deel 29, 1917 blz. 8.

2) W. R. Bloor, E. P. Joslin en A. A. Hornor. The journal of biological chemistry, deel 26, 1916, blz. 417.

van diabetici bij staan soms troebel wordt, zonder dat dit aan bacterie-groei is toe te schrijven.

Van de verschillende componenten is de toename van lecithine het geringste. De veranderingen zijn hoofdzakelijk in het plasma; de erythrocyten vertoonen slechts weinig afwijkende waarden. Door dezelfde onderzoekers is deze serie bepalingen in 1916 en 1917[1]) nog met 131 uitgebreid.

Volgens H. Gray heeft het bloedvet een prognostische beteekenis: hoe langer het lijden heeft geduurd, hoe lager de gevonden waarden; de lijders met hooge vetwaarden sterven spoediger. In een latere publicatie heeft H. Gray[2]) aan de hand van ± 1000 bloedvet-bepalingen deze opinies nog scherper omschreven: het bloedvet is door dieet-behandeling minder te beinvloeden dan de bloedsuiker, zoodat ook bij behandelde lijders het bloedvet een betere maatstaf voor de prognose is dan bloedsuiker. Het spreekt vanzelf, dat sinds de toepassing van insuline deze beschouwingen een geheel andere beteekenis krijgen.

De veranderingen in het bloed na gebruik van 50 Gr. boter zijn bij menschen bestudeerd door U. Hartmann[3]) met de methode van Ivar Bang. Deze onderzoeker vond slechts weinig verschil tusschen lichte diabetes-lijders en normale personen in dit opzicht.

Veel instructiever zijn de waarnemingen die door W. R.

---

[1]) E. P. Joslin, W. R. Bloor en H. Gray. The journal of the American medical association. Vol. 69, 4 Aug. 1917 No. 5, blz. 375.

H. Gray. The Boston medical and surgical journal. Vol. 178, 1918, blz. 16-50-97-120-156.

[2]) H. Gray. The American journal of the medical sciences, deel 168, 1924, N.S., blz. 35.

[3]) U. Hartmann. Biochemische Zeitschrift, deel 146, 1924, blz. 307.

Bloor en E. M. Gillette[1]) zijn gedaan bij honden voor en nadat zij door partieele pancreas-extirpatie diabetisch waren gemaakt. Na voeding met 100 Gr. olijfolie vond hij bij de proefdieren na de operatie de alimentaire toename van neutraalvet in het bloed veel sterker en vooral veel langduriger dan tevoren; alsof het vet langzamer dan normaal uit het plasma verwijderd werd.

Door F. M. Allen waren voor den oorlog in samenwerking met M. B. Wishart veel experimenteele studies verricht over dit onderwerp, doch jammer genoeg gingen de tabellen met de gevonden waarden verloren, zoodat hij zich moest beperken tot een slechts weinig gedocumenteerd verslag.[2]). Hij geeft hierin een goede bespreking van alle vraagstukken, die op het gebied van de vetstofwisseling nog onbeantwoord zijn. Het artikel wordt besloten met een literatuuroverzicht met een korte inhoudsopgave van 377 publicaties. Zijn voornaamste conclusie is, dat ook ten opzichte van het bloedvet en de lipaemie de experimenteele pancreasdiabetes bij honden volkomen vergelijkbaar is met de menschelijke suikerziekte.

Een zeer hoog vetgehalte van het bloed is in de menschelijke pathologie eigenlijk alleen bekend bij lijders aan diabetes. In de oudere literatuur, die door B. Fischer[3]) wordt gerefereerd, vindt men lipaemie opgegeven bij verschillende andere ziekten. Een troebeling van het plasma kan echter, zooals boven reeds is uiteengezet, het gevolg zijn van veel andere oorzaken dan van een toename van het vet alleen, zoodat de vroegere waarnemingen feitelijk niet een verhoogd

---

[1]) W. R. Bloor en E. M. Gillette. l. c.
[2]) F. M. Allen. The journal of metabolic research. Vol. 2, 1922, blz. 219.
[3]) B. Fischer. l. c.

vetgehalte in die gevallen bewijzen. Bij de ernstige graden van lipaemie bij diabetes ziet het bloed bruinrood; het plasma of serum zijn sterk troebel, terwijl zich bij staan een dikke laag vet aan de oppervlakte verzamelt.

Het vet doet zich voor in den vorm van haemoconiën. Het schijnt echter, dat door eenvoudig uitschudden met aether het plasma niet helder wordt[1]) in tegenstelling met de troebeling bij alimentaire lipaemie.

Zeer hooge waarden voor het geheele aether-extract worden genoemd. Zoo bespreekt B. Fischer[2]) zeer uitvoerig een geval, waarin het geheele bloed 18%, het serum 23.366% aether-extract bevatte.

Misschien is de viscositeit van het bloed verhoogd door deze fijnverdeelde vetemulsie, doch een gevaar voor vetembolie, zooals door vroegere onderzoekers wel werd genoemd, is volkomen denkbeeldig, daar zelfs de grootste haemoconiën veel kleiner zijn dan de erythrocyten. De microscopische beelden van de organen, die men bij vetkleuring verkrijgt, doen echter wel aan vetembolie denken, doch dit is natuurlijk slechts schijn. Soms is de lipaemie bij het oogspiegelen te herkennen aan de bleeke kleur van de vaten en van den geheelen fundus oculi. Gezichtsstoornissen worden hierdoor soms veroorzaakt. Deze „lipaemia retinalis" is reeds waar te nemen bij 4½% bloedvet. Bij een gehalte van 8% is het verschijnsel zeer uitgesproken.[3]).

---

[1]) H. Beumer en M. Bürger. Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie, deel 13, 1913, blz. 362.

[2]) B. Fischer. l.c.

[3]) H. Gray en F. Root. The journal of the American medical association. Vol. 80 7 April 1923, No. 14, blz. 995, (hier literatuur over lipaemia retinalis).

Reeds B. Fischer heeft aangegeven, dat bij lipaemie ook het cholesterinegehalte van het bloed verhoogd wordt gevonden. Vooral G. Klemperer en H. Umber[1]) hebben er op gewezen, dat het aether-extract bij lipaemie soms zelfs voor de helft uit lipoiden — cholesterine en lecithine — bestaat. Zij zeggen: lipaemie is evenzeer lipoidaemie.

Ongetwijfeld ontstaat een lipaemie in sommige gevallen slechts zeer geleidelijk, in het verloop van weken. R. M. Wilder, W. M. Boothby en C. Beeler vonden bij een nauwkeurig bestudeerd geval[2]) in 4 dagen een stijging van 1% tot 11%. Dit had plaats tijdens een dieet, dat veel eiwit en veel vet bevatte. Er bestond een sterke acidosis, terwijl de verhouding van glucose tot stikstof in de urine 3,65 was, z.g. absolute diabetes, waarbij gevormde glucose volslagen ongebruikt het lichaam verlaat. Bij een wijziging van het dieet daalde het vetgehalte van het bloed in 6 dagen van 11% tot 2%. Waarschijnlijk echter zijn zoo snelle wisselingen alleen bij zeer zware gevallen te verwachten.

Volgens W. R Bloor[3]) heeft bij het ontstaan van lipaemie eerst een toename van het neutraalvet plaats, daarna volgt het lecithine, terwijl pas later het cholesterinegehalte van het bloed stijgt. Bij het verdwijnen van de lipaemie nam hij dezelfde volgorde waar, zoodat een verhoogd cholesterinegehalte van het bloed zelfs op een reeds herstelde lipaemie zou kunnen wijzen. Percentsgewijze blijft de toename van het lecithine het geringst.

---

[1]) G. Klemperer en H. Umber. l. c.

[2]) R. M. Wilder en W. M. Boothby en C. Beeler. The journal of biological chemistry, deel 51, 1922, blz. 311.

[3]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 49, 1921, blz. 201.

Lipaemie is wel een zeer bijzondere stofwisselingsstoornis. Bij ganzen, die met tamelijk vetrijk voedsel waren vetgemest, vonden Bleibtreu[1]) en later E. F. Terroine[2]) pas een toename van vet in het bloed, nadat alle organen, het laatste de lever, overvuld waren met vet. De eerste onderzoeker geeft bovendien aan, dat na enkele dagen vasten de lipaemie weer geheel verdwenen is. Het zelfde zeggen L. Wacker en W. Hueck over de lipaemie, die bij konijnen ontstaat bij voeding van cholesterine en vet tezamen. Het is dus wel zeer vreemd, dat bij sommige diabetici het vet zich in het bloed ophoopt, temeer daar het verschijnsel vooral bij magere lijders wordt aangetroffen.

Zoowel klinisch als experimenteel heeft men de condities trachten op te helderen, waaronder lipaemie ontstaat.

In de eerste plaats dan gaat lipaemie altijd samen met verschijnselen van actieven diabetes, d.w.z. glucosurie en acidosis. Worden beide symptomen overwonnen, door welke behandeling dan ook, dan verdwijnt de lipaemie. Dit is zelfs het geval, wanneer het zeer vetrijke dieet volgens Newburgh en Marsh[3]) wordt toegepast. Een parallelgaan van het vetgehalte van het bloed met de glucosurie of met de acidosis bestaat er niet; zelfs coma diabeticum wordt waargenomen zonder verhoogd bloedvet. Sinds de acidosis wordt toegeschreven aan een onvolledige oxydatie van het vet, heeft men ijverig naar een verband met de lipaemie gezocht; men

---

[1]) Bleibtreu. Pflüger's Archiv, deel 85, 1901, blz. 345.

[2]) E. F. Terroine. Journal de physiologie et de pathologie générale, deel 16, 1914, blz. 408.

[3]) P. L. Marsh en H. G. Waller. Archives of internal medicine, deel 31, 1923, blz. 63.

N. R. Blatherwick. The journal of biological chemistry, deel 49 1921, blz. 193.

kan echter niet meer zeggen, dan dat beide bij ernstigen diabetes voorkomen.

Verder moet het voedsel voldoende vet bevatten. W. R. Bloor gaat zelfs zoover, dat hij zegt: het bloedvet bij de lipaemie komt uit het voedsel.[1]). Voor deze opvatting bestaan zeer goede gronden. Deze onderzoeker zelf heeft, zooals boven medegedeeld werd, bij een aantal patienten die gedurende eenigen tijd nagenoeg hongerden, of althans zeer weinig vet gebruikten, nimmer lipaemie waargenomen. F. M. Allen geeft bovendien aan, dat bij honden, waar het geheele pancreas is geextirpeerd, geen lipaemie kan worden opgewekt, daar het vet nagenoeg niet wordt geresorbeerd. Vroeger (b.v. G. Klemperer en H. Umber) meende men, dat de lipaemie was toe te schrijven aan een sterke vettige degeneratie van de organen. Men was toen echter nog niet overtuigd van de rol, die de z.g. lipoiden in de vetstofwisseling spelen. Trouwens, ware deze opvatting juist, dan zou men bij hongerende lijders en bij volkomen pancreaslooze honden de sterkste lipaemie moeten verwachten.

F. M. Allen heeft bovendien een individueel zeer wisselende neiging tot lipaemie bij zijn proefdieren gevonden. Hij noemt een reeks van omstandigheden, die experimenteel zeker zonder eenigen invloed zijn.

Hoe men zich ook de herkomst van het bloedvet bij lipaemie mag voorstellen — hetzij uit het voedsel, hetzij uit de organen — één ding is zeker: het verlaat het bloed te langzaam. Dit is trouwens duidelijk bewezen door de proeven op honden van W. R. Bloor en E. M. Gillette. In 1903

---

[1]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 26, 1916, blz. 417.

heeft reeds B. Fischer betoogd, dat men dit feit moet verklaren, wil men het ontstaan van lipaemie ophelderen. Het is echter een moeilijk vraagstuk, daar zelfs nog niet bekend is, op welke wijze bij gezonde individuen het vet het bloed verlaat.

In de eerste plaats dan heeft men de oorzaak willen zien in een verminderde oxydatie van het vet. Er zou dan a.h.w. een opstuwing van het geresorbeerde vet in het bloed plaats hebben. Tegen deze hypothese pleit sterk[1]) het feit, dat lipaemie voorkomt bij lijders aan ernstigen diabetes, die voor hun stofwisseling vrijwel uitsluitend op vet zijn aangewezen, en er zeker meer van omzetten dan de meeste normale personen. Ik zou echter willen opmerken, dat hiermede de zaak niet is afgedaan. Vergelijkt men bijv. de lipaemie met de hyperglycaemie bij diabetes, dan zou ik op drie bijzonderheden willen opmerkzaam maken.

1. Op blz. 67 van zijn „Voordrachten over suikerziekte" wijst Prof. A. A. Hijmans van den Bergh er op, dat bij lijders aan diabetes een verhoogde toevoer van koolhydraat, ook boven de tolerantiegrens, een toename van de omgezette hoeveelheid teweeg brengt. Blijkbaar is, ook bij bestaande glucosurie, het verhoogde gehalte van het bloed aan glucose een oorzaak, dat er meer in de weefsels wordt omgezet.

2. Wanneer bij oudere diabetici de nieren z.g. suikerdicht worden, stijgt de tolerantie. Er wordt dan hyperglycaemie zonder glucosurie gevonden. Deze hyperglycaemie

---

[1]) A. Magnus—Levy in Kraus en Brugsch' handboek deel 1. Diabetes blz. 25.

is dan dus de oorzaak, dat er meer glucose in de weefsels wordt opgenomen en omgezet.

3. W. K a u s c h[1]) heeft bij eenden en ganzen de gevolgen van pancreas-extirpatie bestudeerd. Deze dieren vertoonen soms zelfs bij bloedsuikerwaarden van 7‰ nog geen glucosurie. Het eenige symptoom bij deze dieren is dus de hyperglycaemie. Koolhydraat wordt goed geresorbeerd, verschijnt niet in de urine, dus wordt verbrand. Er wordt dan ook nimmer acidosis waargenomen.

Ik kan er mij niet aan onttrekken in deze verschijnselen een analogie te zien met eenvoudige chemische reacties; door verhooging van de concentratie (in casu de hyperglycaemie) blijft de reactie-snelheid voldoende, niettegenstaande het ontbreken van den katalysator (n.l. het pancreashormon).

Het verschil tusschen lipaemie en hyperglycaemie is dan wel dit, dat er nimmer vet in de urine optreedt. De lipurie, die een enkele maal is beschreven, staat meer in verband met de chylurie, en is, zoover ik weet, bij lipaemie nooit waargenomen. Reeds B. F i s c h e r heeft er op gewezen, dat lipaemie eigenlijk alleen vergelijkbaar is met de hyperglycaemie bij pancreaslooze vogels. Wil men dus een toename van het bloedsuikergehalte toeschrijven aan een verminderde oxydatie van glucose, dan kan men met evenveel recht de oorzaak der lipaemie in een verminderde oxydatie van vet zoeken. Juister ware het dan echter, om van een b e m o e i l i j k t e oxydatie van glucose en vet te spreken.

---

1) W. K a u s c h. Archiv. für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, deel 37, 1896, blz. 274.

In de tweede plaats heeft men een vermindering van het lipolytisch vermogen van het plasma als oorzaak genoemd. Reeds B. Fischer voert argumenten hiertoe aan; zijn methodiek is echter later ontoereikend gebleken. S. Sakai vermoedt, dat met de methode van P. Rona en L. Michaelis in deze wel opheldering kon worden gebracht, doch, zooals gezegd, dit is, voor zoover ik heb kunnen nagaan, niet geschied.

De splitsingsproducten, glycerine en zeep, zijn in water oplosbaar en zouden dus gemakkelijk de capillairwanden kunnen passeeren.

Ten derde: zooals reeds medegedeeld, beschouwt W. R. Bloor een omzetting van het vet in lecithine door de erythrocyten als de eerste phase bij de assimilatie van deze voedingsstof. Deze reactie zou bij diabetes moeilijker gaan. Blijkbaar neemt hij aan, dat de vetzuren, als zij eenmaal in den vorm van lecithine zijn overgebracht, verder vlot worden omgezet.

Het is heel goed mogelijk, dat alle drie hypotheses recht van bestaan hebben.

Geheel in analogie met de veronderstelling, die Prof. A. A. Hijmans van den Bergh ten opzichte van glucose noemt, zou men kunnen aannemen, dat ook de vetzuren onder den invloed van het pancreashormon zoodanig worden veranderd, dat ze door de cellen kunnen worden opgenomen en verder omgezet. Daarbij wordt dan geheel in het midden gelaten, waarin deze verandering bestaat.

Tenslotte nog zou men kunnen veronderstellen, dat de toename van cholesterine het primaire is, in verband met de resultaten door L. Wacker en W. Hueck verkregen bij het voeden van konijnen met deze stof. Hiertegen pleit echter

wel, dat W. R. Bloor bij het ontstaan van een lipaemie eerst een toename van het vet en pas het laatst van cholesterine vond.

Na het bovenstaande is het a priori reeds duidelijk, dat insuline inspuitingen een verlagenden invloed op het bloedvet moeten hebben. Immers op deze wijze wordt een verbetering van de stofwisseling bereikt, die door geen dieetregeling wordt geevenaard. Een aantal waarnemingen hierover zijn in de literatuur te vinden. E. P. Joslin beschrijft[1]) een geval, waarbij in het verloop van drie weken het bloedvet daalde van 2.24% tot 0.94% en een tweede geval, waarbij in twee maanden een daling van 3.18% tot 0.67% intrad. H. Gray en H. F. Root[2]) beschrijven een geval van lipaemia retinalis, waarin het bloedvet in vier dagen van 6.30% tot 2.95% daalde; en na zes dagen tot 2.2% was gezonken. Een analoge waarneming publiceerde A. H. Rowe[3]). Bij een meisje van 15 jaar bevatte het bloed na een week behandeling met insuline 13.7% vetzuren en 1.48% cholesterine, na 5 weken 1.7% vetzuren en 0.25% cholesterine. Door Dr. A. C. De Kock worden in zijn dissertatie[4]) twee gevallen van diabetes medegedeeld, waarin het bloedvet enkele uren na inspuiting van insuline daalde. Ook Mej. Dr. E. M. Kobus noemt in haar dissertatie[5]) vier gevallen, waaraan zij dit kon waarnemen. De vondsten van

---

[1]) Treatment of diabetes mellitus, 3de uitgave 1923, blz. 75.

[2]) H. Gray en H. F. Root l.c.

[3]) A. H. Rowe. The journal of the American medical association. Vol. 82, 12 April 1924, No. 15. blz. 1168.

[4]) A. C. De Kock. l.c.

[5]) E. M. Kobus. Het bloedvet bij kinderen gemeten in monomoleculaire laag. Dissertatie Leiden 1926.

A. C. White[1]) wijzen in de zelfde richting.

Door verschillende schrijvers wordt nu de kwestie besproken of deze invloed van insuline indirect is, via een verbeterde koolhydraatstofwisseling, dan wel door een onmiddellijke werking op de derivaten van het vet. Ivar Bang[2]) is geneigd een aantal van zijn waarnemingen zoo uit te leggen: dat door gelijktijdige resorptie van glucose een verlaging van het bloedvet zou worden veroorzaakt, althans een remming van de alimentaire stijging.

Vooral door P. A. Shaffer[3]) is de antiketogene werking van glucose bestudeerd. Het is nu zeer goed denkbaar, dat de koolhydraat- en de vetstofwisseling ook in andere phasen in elkaar grijpen. U. Hartmann[4]) vond bij diabetici geen duidelijke verschillen in de alimentaire toename van het bloedvet, na inspuiting van insuline. Ook dit beschouwt hij als een argument voor de opvatting, dat de invloed van insuline op het bloedvet indirect is. Voordat echter is opgehelderd, op welke wijze het vet het bloed verlaat, lijken mij al deze beschouwingen nog wat ontijdig.

---

[1]) A. C. White. The quarterly journal of medicine, No. 74, Januari 1926.

[2]) Ivar Bang. Biochemische Zeitschrift, deel 91, 1918, blz. 104.

[3]) P. A. Shaffer en E. S. West. The journal of biological chemistry, deel 66, 1925, blz. 63.

[4]) U. Hartmann l.c.

HOOFDSTUK II.

DE METHODIEK.

§ 1. **De oudere methodes.** (Macromethode).

Zooals reeds vroeger gezegd, was ik voor mijn onderzoek eigenlijk uitsluitend aangewezen op de nieuwere methode's, daar deze voor de quantitatieve bepalingen kleinere hoeveelheden bloed vereischen en bovendien zich meer aansluiten bij de techniek en de apparatuur, zooals die in klinische laboratoria gebruikelijk zijn.

Niettemin lijkt mij een korte bespreking van de oudere macro-methode's, hier wel op zijn plaats.

En dan is wel het artikel, dat door M. Kumagava en K. Suto in 1908 in de Biochemische Zeitschrift deel VIII pag. 212 werd gepubliceerd, te beschouwen als het klassieke werk over de quantitatieve bepaling van vetzuren en onverzeepbare stoffen in organisch materiaal.

Het zeer helder en overzichtelijk geschreven stuk vangt aan met een grondige kritiek op de vroegere werkwijzen.

Een van de grondleggers van deze vroegere methodes, E. Bogdanow, moet zelfs later gezegd hebben, dat alle bepalingswijzen van vóór Kumagava en Suto nog slechts historisch interesse hebben na hen.

Ook voor Bloor in 1922 is deze methode de standaardmethode, waaraan hij zijn microbepaling toetst.

Ook voor mij bij het nawerken van de hier gebruikte methode was dit artikel van veel nut. De schrijvers geven o.a. waardevolle opmerkingen op welke wijze men de reagentia zuivert, filtreerpapier en watten bevrijdt van het daarin steeds aanwezige vet.

Verder komen zij tot een aantal principieele beschouwingen, die nog steeds algemeen worden geaccepteerd.

1. Het beste extractiemiddel is kokende aethylalcohol.
2. Een quantitatieve scheiding van neutraalvet, esters en lecithine alleen door het extractiemiddel is niet mogelijk.

   Quantitatief te bepalen zijn alleen vetzuren en onverzeepbaar materiaal.

   De bepaling geeft er geen uitsluitsel over of de vetzuren als neutraalvet, als z.g. lecithine, of als esters van chclesterine e.d. in het organisch materiaal aanwezig waren.
3. De van ouds gebruikelijke scheiding van lecithine van de overige vetstoffen door behandeling van het aetherextract met overmaat aceton is onvolledig.

De methode, die door hen werd uitgewerkt, komt in 't kort hierop neer, dat het organisch materiaal met sterke loog 2 uur wordt gekookt.

Het mengsel wordt daarna aangezuurd, uitgeschud met aether, de aether verdampt en het zoo verkregen aetherextract gereinigd met petroleum-aether. In deze petroleumaether worden dan natuurlijk zoowel vetzuren als onverzeepbaar materiaal opgenomen. De scheiding in deze twee componenten is mogelijk, doordat zeepen in petroleum-aether volkomen onoplosbaar zijn.

En dit is het vierde onbestreden resultaat van hun onderzoek:

de eenige scheiding die quantitatief mogelijk is, is die in verzeepbaar en onverzeepbaar door middel van petroleumaether.

Deze laatste stelling vindt men met dezelfde zekerheid weer terug door de geheele literatuur over quantitatieve vetbepalingen.

Met de methode, door W i n d a u s in 1909[1]) beschreven, is het mogelijk het vrije cholesterine te scheiden van cholesterine-esters en op die wijze de hoeveelheid vetzuur te berekenen, die als ester voorkomt in een gegeven extract. Het vrije cholesterine wordt bij deze methode met een alcoholische oplossing van digitonine neergeslagen als cholesterine-digitonide.

Het is gebruikelijk bovendien de hoeveelheid lecithine in een extract te berekenen naar het phosphorgehalte. Zooals begrijpelijk, is dit een zeer indirecte methode, die uigaat van de, van te voren reeds onwaarschijnlijke, stelling, dat het z.g. lecithine steeds hetzelfde gehalte aan phosphor heeft.

De hoeveelheid vetzuur, die op deze wijze berekend is als voorkomende in den vorm van ester en lecithine, wordt afgetrokken van de geheele hoeveelheid na verzeeping gevonden.

De rest wordt dan beschouwd als afkomstig van neutraalvet.

---

[1]) A. W i n d a u s. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, deel 42, 1909, blz. 238.

Door Y. Shimidzu, eveneens een Japanner en een medewerker van Kumagava in Tokio, is in 1910 in de Biochemische Zeitschrift, deel 28, blz. 237, een artikel gepubliceerd, waarin de bovengenoemde methode werd toegepast op bloed en plasma. Hierbij nu bleek, dat direkte verzeeping van het bloed als zoodanig, belangrijk lagere uitkomsten gaf dan de verzeeping van het alcohol-extract. Op verschillende wijzen heeft hij getracht een verklaring voor dit wonderlijke feit te vinden, zonder dat hem dit gelukt is.

L. Berczeller[1]) nu heeft gevonden, dat door schudden met aether uit het volumineuze praecipitaat, dat bij aanzuren na de verzeeping ontstaat, lang niet alle vetzuur wordt opgenomen.

Met eenvoudige aether-extractie in het Soxhlet-apparaat kon hij uit deze massa nog vrij veel vet winnen.

Ook bij bepalingen in het plasma vond hij hetzelfde, zoodat waarschijnlijk hierin de reden moet worden gezocht. Voor bloed is dus noodig extractie met kokende alcohol en daarna verzeeping van dit extract.

In de Biochemische Zeitschrift 1918, deel 91, komt Ivar Bang terug op de 2e stelling, zooals Kumagava en Suto die hebben vastgelegd.

Voor zijn micromethodiek voert hij, wat hij noemt, „fractioneeren door het extractiemiddel" wederom in. Tot dusver is een critiek op dit punt in zijn werkwijze mij niet onder de oogen gekomen.

Zooals ik echter later zal bespreken bestaan er andere zwaar wegende bezwaren tegen zijn methode.

---

[1]) L. Berczeller. Biochemische Zeitschrift, deel 44, 1912, blz. 192.

§ 2. De nieuwe micro-methodes.

Tot dusver zijn er vier micromethoden beschreven voor de bepaling van de vetstoffen in het bloed:

1. de methode van B l o o r uit 1914 gewijzigd in 1922.
2. de methode van I v a r B a n g uit 1918.
3. de methode van B i n g & H e c k s c h e r uit 1924.
4. de methode door Dr. E. M. K o b u s in haar proefschrift in 1926 beschreven.

De eerste en derde zijn nephelometrische methoden. De beide andere berusten op andere principes. Door mij werd, zooals reeds gezegd, de methode van B l o o r gebruikt. Bij het nawerken van zijn methode, zooals deze in 1914 werd beschreven, bleek mij al spoedig, dat er inderdaad te weinig rekening was gehouden met de bijzondere eigenaardigheden, die nephelometrische bepalingen aankleven. In 1918 werd op ditzelfde feit door F. A. C s o n k a gewezen. Vandaar dat de methodiek door B l o o r in 1922 werd gewijzigd.

Alvorens ik deze methoden nader bespreek wil ik het een en ander mededeelen over het apparaat, den nephelometer zelf, en over de werkwijze bij de suspensie's, die hier ter sprake komen.

§ 3. De geschiedenis v. d. Nephelometer.

Het principe om uit de troebeling van een vloeistof het gehalte aan gesuspendeerde stof te beoordeelen, is reeds zeer oud. In de desbetreffende literatuur vindt men steeds den naam van M u l d e r in 1859 genoemd. Door S t a s in 1894 werd de concentratie van een bepaalde troebele vloeistof beoordeeld naar de sterkte van het doorvallend licht.

Het beginsel om het zijdelings uitgestraalde licht, het Tyndall-licht, te gebruiken als maat, is in 1894 het eerst toegepast door Richards.[1]).

In een artikel over het atoom-gewicht van Strontium beschrijft hij een eenvoudig apparaatje, waarmee hij Ag Cl suspensies beoordeelt; dit was voor hem gewenscht als aanvulling van een quantitatieve bepaling door wegen. In 1904[2]) geeft hij een kleine verbetering aan; deze nephelometer heeft dan den volgenden bouw:

In een zwarthouten kastje worden twee reageerbuisjes — met de standaard - en de te onderzoeken vloeistof — iets schuin naar elkaar toe, opgesteld, zoodat de randen vlak naast elkaar liggen; zijdelings is de lichtbron. De lengte, waarover een buisje wordt verlicht, kan worden gevarieerd door een lichtdichte glazen huls er om heen op en neer te schuiven.

De sterkte van het nephelometrisch effect wordt dan beoordeeld in het eerste apparaat door eenvoudig van boven in de buisjes te kijken; in het tweede toestel, uit 1904, wordt het licht uit beide buisjes door twee prismata gebracht tot de beide helften van een rond veld, wat de vergelijking makkelijker maakt.

Men plaatst de huls om de standaard-vloeistof op een bepaald punt, verplaatst die om de vergelijkingsvloeistof tot er rechts en links evenveel licht wordt waargenomen en leest af.

De aflezingen zijn dan omgekeerd evenredig aan de

---

[1]) Richards. Proceedings o/the American Acad., deel 30, 1894, blz. 385.

Richards. Zeitschrift für anorganische Chemie, deel 8, 1895 blz. 269.

[2]) Richards en Wells. American Chemical journal, deel 31, 1904, blz. 235.

sterkte van de suspensie; hoe dunner suspensie, hoe grooter kolom er moet worden belicht voordat het vereischte licht wordt waargenomen.

Al deze onderzoekingen gaan uit van de veronderstelling, dat de sterkte van het waargenomen licht, ceteris paribus, evenredig is aan het gehalte aan gesuspendeerde stof.

In 1904 merkt Richards echter reeds op, dat men standaard en vergelijkingsvloeistof volkomen op de zelfde wijze moet behandelen, daar men bij een verschillende wijze van neerslaan onregelmatigheden vindt.

Zooals later zal blijken, ligt hierin de grootste moeilijkheid van alle nephelometrische bepalingswijzen.

In 1906 werden door Wells[1]) met hetzelfde apparaat waarnemingen gedaan met Ag Cl suspensies. Hij geeft reeds veel opmerkingen over de voorzorgen, die bij het werken met deze methode in acht moeten worden genomen. In het zelfde tijdschrift komt nog een klein artikel van Richards voor, waarin hij betoogt, dat nephelometrische bepalingen slechts als aanvullende bepalingen gebruikt mogen worden.

P. A. Kober[2]) in 1913 is de eerste, die nephelometrische bepalingen op zich zelf als quantitatieve bepaling van eiwitten invoert. Daartoe worden eenige verbeteringen aangebracht: een betere optiek, een scheidingswand tusschen de reageerbuizen om verlichting onderling te voorkomen, dompelaars om de stoornissen, die door den hollen meniscus ontstaan, te ondervangen.

Deze onderzoeker nu heeft in den loop der jaren een groot aantal verbeteringen aangebracht en geldt in de Ameri-

---

[1]) R. C. Wells. American chemical journal, deel 35, 1906, blz. 99.

[2]) P. A. Kober. The journal of biological chemistry, deel 13, 1912/'13, blz. 485.

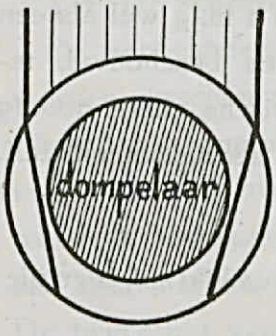
kaansche literatuur als de autoriteit op het gebied van de nephelometrie. Hij komt echter tot zeer ingewikkelde empirische formules, die het verband tusschen nephelometrisch effect en gehalte aan gesuspendeerde stof zouden aangeven.

Het is echter niet meer dan de waarheid, dat men slechts in Duitsche literatuur, tijdens en na den oorlog verschenen, de nauwkeurige physische waarnemingen kan vinden, die een inzicht kunnen geven in de bijzonderheden, die zich voordoen bij nephelometrische werkwijzen.

De door ons gebruikte nephelometer is die, welke op aanwijzing van H. Kleinmann door de firma Schmidt & Haensch werd geconstrueerd[1]). Het belangrijkste van dit instrument is wel, dat het dezen onderzoeker gelukt is hiermede aan te toonen, dat het nephelometrisch effekt, d.i. de sterkte van het zijdelings uitgestraalde licht evenredig is met het gehalte aan gesuspendeerde stof.

Het feit, dat P. A. Kober aanzienlijke afwijkingen van deze evenredigheid vindt, moet worden verklaard door fouten in zijn instrument.

De voornaamste is wel deze: het evenwijdige licht, dat op de nephelometerbuisjes valt wordt door de ronde wand gebroken tot een kegel.



De dompelaar nu moet zoo klein zijn, dat hij geheel binnen dezen lichtkegel blijft, een voorwaarde, die in Kober's apparaten niet vervuld schijnt.

De nephelometerbuisjes moeten dus een bepaalden afstand, enkele millimeters buiten den dompelaar reiken.

---

[1]) H. Kleinmann. Biochemische Zeitschrift, deel 99, 1919, blz. 19.

In zijn dissertatie, te Groningen bewerkt, geeft A. A. Weinberg[1]) een kritiek op den nephelometer van Kleinmann, die gedeeltelijk kleinigheden betreft, gedeeltelijk onjuist is en aantoont, zooals Kleinmann in de Biochemische Zeitschrift 137 1923 terecht met eenige verontwaardiging opmerkt, dat de criticus zijn instrument nooit heeft gezien.

Hoe het ook zij, ook Weinberg vindt met zijn zelf geconstrueerd apparaat de zuivere evenredigheid evenals Kleinmann, mits hij maar diens opmerking over de wijdte van de nephelometerbuisjes ter harte neemt.

Het belangrijkste punt in dit proefschrift is wel het feit, dat de schrijver in staat was bij 't gebruik van te nauwe nephelometerbuisjes inderdaad aanzienlijke afwijkingen van de evenredigheid te vinden. De afwijking is echter in anderen zin als die, welke Kober in de beschrijving van zijn instrument in The Journal of Biol. Chem., deel 29 in 1917, aangeeft, terwijl toch de door Weinberg geconstrueerde nephelometer het meest gelijkt op die, welke aldaar beschreven is.

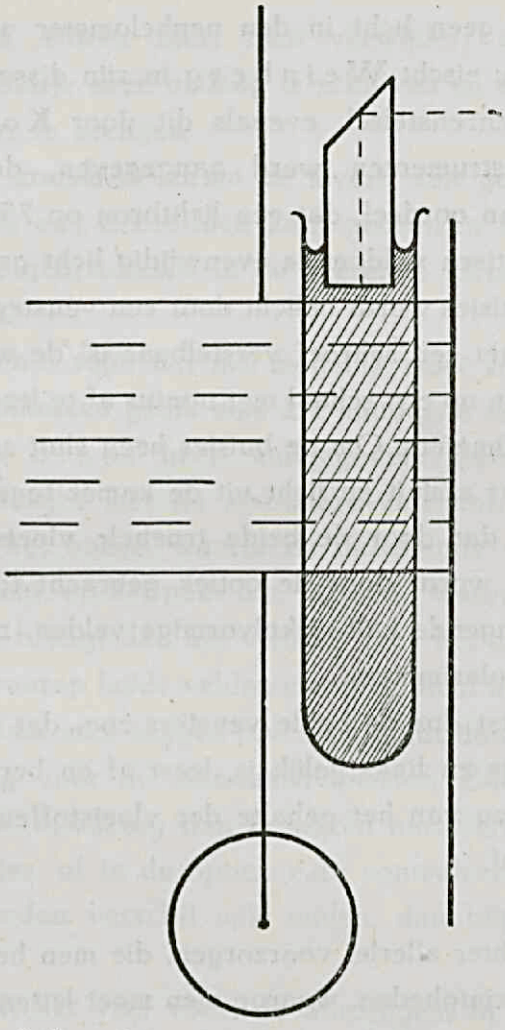
Het komt mij dus voor, dat de zaak nog niet geheel is opgehelderd en dat het de moeite zou loonen beide nephelometers naast elkaar te vergelijken.

De nephelometer volgens Kleinmann mag wel als een practisch betrouwbaar instrument worden beschouwd, temeer daar voor ons doel toch een empirische curve noodig bleek, zoodat eventueele afwijkingen door het instrument zelf daarin geheel verwerkt zijn.

Een korte beschrijving van dit instrument lijkt mij hier niet misplaatst.

---

1) A. A. Weinberg. Dissertatie, Groningen, 1921.



§ 4. **De nephelometer.**

De nephelometerbuisjes, die van prima glas moeten zijn, worden tusschen veerende klemmen op een slede geplaatst, tot onder de dompelaars geschoven en dan om de dompelaars heen omhoog getrokken tot de situatie zoo is, als in de schematische teekening hierboven aangegeven. De dompelaars zelf zijn vast aan het toestel bevestigd en van massief glas. De belichting van de buisjes dient met evenwijdig licht te geschieden; worden beide buisjes met helder water gevuld,

dan mag er geen licht in den nephelometer worden waargenomen. Nu eischt W e i n b e r g in zijn dissertatie een ingewikkeld lenzenstelsel, evenals dit door K o b e r bij zijn nieuwere instrumenten werd aangegeven, doch K l e i n m a n n is van oordeel, dat een lichtbron op 75 c.M. à 1 M. afstand practisch voldoende evenwijdig licht geeft.

Elk der buisjes wordt belicht door een venster, waarvan de onderrand met een schroef verstelbaar is; de wijdte van het venster is dan op een schaal met nonius af te lezen tot in tienden van millimeters. Om de buisjes heen sluit een kastje, dat ze van elkaar afsluit en licht uit de kamer tegen houdt. Het tyndalllicht, dat door de beide troebele vloeistoffen wordt uitgestraald, wordt door de optiek gebracht tot twee tegen elkaar aanliggende half-cirkelvormige velden, zooals dat bekend is bij polarimeters.

Men plaatst dus de beide vensters zoo, dat het licht in 't oculair rechts en links gelijk is, leest af en berekent daaruit de verhouding van het gehalte der vloeistoffen aan troebelmakende stof.

Er zijn echter allerlei voorzorgen, die men heeft in acht te nemen en kleinigheden, waarop men moet letten. De reageerbuisjes, die als nephelometerbuisjes dienst doen, moeten natuurlijk zeer goed schoon en helder zijn. Men moet bij voorkeur ze slechts aan den bovenrand aanpakken. Het beste bewaart men ze in water of alcohol en spoelt ze voor het gebruik met de te onderzoeken vloeistof om. De dompelaars moeten zorgvuldig worden schoon gehouden. Er mogen geen pluizen in de te onderzoeken vloeistoffen zweven; men ziet deze terstond als de buisjes belicht worden.

Belletjes, die zich vaak tegen de dompelaars zetten als het

wat warm is, storen zeer; men verwijdert ze door het nephelometerbuisje even omlaag te schuiven en dan weer om den dompelaar te brengen.

De buisjes, zooals de firma ze levert, zijn gemerkt. Men moet ze steeds aan denzelfden kant gebruiken en steeds op dezelfde wijze georienteerd in de veerende klemmen van de slede plaatsen.

K l e i n m a n n zegt, dat het mogelijk moet zijn buisjes te vinden, die volkomen gelijk zijn. De handigste methode blijft echter, zooals B l o o r heeft aangegeven: men vult beide nephelometerbuisjes met de standaard-vloeistof; plaatst het venster voor het buisje, waarin de onbekende vloeistof zal worden gebracht, op het punt b.v. 30 mM., waarmee men wil vergelijken en brengt dan het venster voor het andere buisje op het punt, waarop beide velden evenveel licht hebben. Deze laatste stand (laat men zeggen b.v. 30.7) geldt dan als 30 mM. vensteropening voor de standaardvloeistof. Zooals vanzelf spreekt is deze afwijking dan te wijten aan verschillen tusschen de buisjes, of in de optiek e.d.; controleert men zoo'n eenmaal gevonden verschil vele malen, dan blijkt het constant te zijn.

Verder heeft het veel voor, de aflezingen, in de donkere kamer te verrichten, na aangepast te zijn. Een zwart kastje, waarin de nephelometer, samen met de lichtbron is opgesteld, is van groot voordeel om licht van elders af te sluiten. Men moet nu eens met het eene oog, dan weer met het andere aflezen, nu eens wanneer het venster langzaam gesloten, dan weer wanneer het langzaam geopend wordt. Men neemt een gemiddelde van een aantal, 3 à 5, aflezingen.

Oefening is een groote factor!

In de verschillende publicaties zijn al deze punten ter sprake

gekomen. In de dissertatie van Weinberg vooral; ook in de artikelen van Kleinmann en van Kober.

Voor de quantitatieve bepaling van een aantal stoffen zijn nu nephelometrische werkwijzen ontwikkeld. De meest bevredigende schijnt die voor phosphorzuur te zijn, welke Kleinmann in zijn eerste artikel beschrijft.[1]). Later geeft hij een methode aan, voor de bepaling van Calcium.[2]). Vooral in dit artikel zijn veel goede raadgevingen over de wijze, waarop een nephelometrische methode dient te worden uitgewerkt.

Voor meerdere bijzonderheden zij de lezer naar deze publicaties en naar Weinberg's dissertatie verwezen.

§ 5. **Tyndall-licht.**

Bij de methodiek, zooals die tenslotte door mij werd gebruikt, worden in den nephelometer vergeleken vetzuursuspensie's in water na toevoeging van sterk zoutzuur.

Vóór ik er nu toe overga het gedrag van deze suspensie's bij onderzoek in den nephelometer te bespreken, zij het mij vergund in 't kort eenige publicatie's te refereeren, die in staat stellen om een inzicht te krijgen in het verband dat er is tusschen de sterkte en den aard van het Tyndall-licht eenerzijds en de verdeeling en de concentratie van een suspensie anderzijds.

In 1871 is door lord Rayleigh een theoretische formule opgesteld voor de sterkte van het Tyndall-licht op een bepaald punt in een troebele vloeistof.

Deze formule luidt:

$$I = \frac{n\, v^2\, K}{\lambda^4}$$

---

[1]) H. Kleinmann l.c.

[2]) H. Kleinmann en P. Rona. Biochemische Zeitschrift, deel 137, 1923, blz. 157.

I. is de intensiteit van het Tyndall-licht.
n. het aantal deeltjes gesuspendeerd materiaal in een volume-eenheid.
v. het volume van elk deeltje.
λ de golflengte van het licht.
K. een constante.

Men kan uit deze formule lezen

1. dat de intensiteit van het Tyndall-licht evenredig is met het aantal deeltjes per volume-eenheid, dus m.a.w. met de concentratie.
2. dat bij toenemende grootte der deeltjes en gelijkblijvende concentratie I evenredig is aan v want: de concentratie $=$ n v $\times$ het soortelijk gewicht, wat voor een bepaalde stof natuurlijk constant is.
3. dat de stralen met korte golflengte veel sterker worden gereflecteerd; dat het Tyndall-licht dat door een lichtkegel van wit licht zijdelings wordt uitgestraald, overwegend stralen van korte golflengte bevat, dus m.a.w. blauwachtig is; zooals de hemel blauw is.

Van ouderen datum is een formule van R. Clausius, die luidt:

$$I = \frac{n\ v^2\ K}{\lambda^2}$$

Het verschil in beide formules ligt dus hierin, dat volgens Clausius het blauwe licht wel sterker dan het roode wordt gedispergeerd, doch niet in zoo hooge mate als de formule van Lord Rayleigh aangeeft.

Een lichtkegel van wit licht, die door een suspensie wordt geworpen, die zou voldoen aan de formule van Clausius, zou dus minder blauwachtig Tyndall-licht geven.

W. Mecklenburg heeft in de Kolloïd-Zeitschrift, deel 14, blz. 172, in 1914, een door hemzelf geconstrueerden „Tyndallmeter" beschreven.

Een dunne straal evenwijdig licht wordt door de troebele vloeistof geworpen. Als troebele voeistof gebruikte hij een colloïdale oplossing van tinzuur. De vloeistof is in een bakje met geslepen glazen wanden en met een geslepen glasplaat toegedekt, zoodat er geen lucht boven is. Door de optische uitrusting van het instrument is hij in staat de sterkte van het Tyndall-licht, door een bepaald punt van den lichtbundel uitgestraald, te vergelijken met de sterkte van den lichtbron. Doordat het bakje met micrometerschroeven in alle richtingen kan worden verplaatst, kan de vloeistof op deze wijze op alle punten onderzocht worden.

Hij vindt dan het volgende:

Het Tyndall-effect van de lichtstraal neemt af in de lengte van zijn as.

Voorin is het licht meer blauw.

Hoe oppervlakkiger men de lichtstraal door de vloeistof laat gaan, hoe sterker Tyndall-licht. Immers dan is de bovenstaande laag, die het licht absorbeert, dunner. Door nu al zijn aflezingen in curven te brengen en te extrapoleeren, vindt hij voor een bepaalde oplossing een a.h.w. theoretische waarde.

Deze waarden zijn in hooge mate proportioneel aan de concentratie.

In een volgend artikel[1]) heeft hij met gekleurd glas den invloed van de golflengte van het licht nagegaan. En inderdaad heeft hij — bij deze colloïdale oplossing van tinzuur —

---

[1])W. Mecklenburg. Kolloid-Zeitschrift, deel 15, 1914, blz. 149.

uitkomsten gekregen, die geheel overeenstemmen met de formule van Lord Rayleigh.

Het derde punt, den invloed van de grootte van de deeltjes, heeft hij besproken in een derde artikel in de Kolloïd Zeitschrift, deel 16, blz. 97, in 1915.

Hij heeft hiertoe het Tyndall-licht bestudeerd van colloïdale zwavel-oplossingen van zeer verschillende dispersiteit. De grootte der deeltjes, die in elke oplossing afzonderlijk onderling ongeveer gelijk waren, varieerde in de verschillende oplossingen van 5$\mu\mu$ tot 800$\mu\mu$.

Hij vindt dan in de eerste plaats, dat de formule van Lord Rayleigh volkomen van toepassing is op de oplossingen van hooge dispersiteit, n.l. die, waarbij de grootte van de deeltjes zich bewoog tusschen 5 en 100$\mu\mu$.

Voor een oplossing van geringere dispersiteit, waarbij de grootte der deeltjes $\pm$ 250$\mu\mu$, bedroeg, gold de formule van Clausius, althans wat betreft den invloed van de golflengte van het licht, wat dus, zooals ik boven betoogde, hierop neerkomt, dat bij bestraling met wit licht het Tyndall-licht bij de oplossingen van hooge dispersiteit een meer blauwe tint heeft.

Zoowel volgens de formule van Lord Rayleigh als volgens die van R. Clausius, ware te verwachten, dat de intensiteit van het Tyndall-licht bij gelijkblijvende concentratie toenam evenredig aan het volume der deeltjes.

Dit is voor de oplossingen van hoogere dispersiteit inderdaad het geval. Bij die, waarbij de grootte der deeltjes varieert omstreeks 800$\mu\mu$ heeft toename van hun afmeting een veel geringeren invloed op de intensiteit van het

Tyndall-licht, dan volgens de formules ware te verwachten. Doch ook bij deze laatste oplossingen is het Tyndall-licht, zooals W. Mecklenburg het op een theoretische waarde herleidt, evenredig aan de concentratie.

A priori is het natuurlijk niet vanzelf-sprekend, dat deze proportionaliteit bij nephelometrische bepalingen terug zou worden gevonden. Immers hier meet men het Tyndall-licht van een groote vloeistof-kolom. Hoe de bovenstaande eigenschappen dan veranderen door weerkaatsing van de deeltjes onderling en door absorptie van de meer oppervlakkige lagen, is dan nog de vraag. Dit is Kleinmann zich dan ook wel bewust en, zooals hij zegt, slechts het experiment kan hierin beslissen. Het is zijn trots, dat met het door hem geconstrueerde apparaat inderdaad deze proportionaliteit wordt gevonden. Het schijnt intusschen, dat dit ook op theoretisch-physische gronden te verwachten ware.

H. Bechhold en F. Hebler nu hebben in Koll. Zeitschrift deel 31, blz. 70 in 1922 een artikel gepubliceerd, waarin uitvoerig de invloed van de grootte der deeltjes bij gelijkblijvende concentratie op het nephelometrisch effekt wordt besproken. De term „nephelometrisch effekt" is, naar ik meen, ook door hen ingevoerd. Zij verstaan hieronder het licht, dat in den nephelometer wordt waargenomen.

Zij bezigden hiertoe colloïdale oplosingen van $BaSO_4$ met een dispersiteit varieerende tusschen

$$4\mu\mu \text{ en } 1.66\mu.$$

Zij verkregen dergelijke uitkomsten als W. Mecklenburg met zijn Tyndall-meter.

Deze zijn de volgende:

Aanvankelijk neemt het nephelometrisch effekt toe met de

grootte der deeltjes volgens de formule van Rayleigh. Daarna wordt de toename geringer totdat er bij 800 $\mu\mu$ ongeveer, een keerpunt komt, **het nephelometrisch effekt neemt daarna af,** tot het bij grof-mechanische suspensies nihil wordt. Zoodoende waren zij in staat colloïdale oplossingen van gelijke concentratie, doch zeer verschillende dispersiteit te vinden, die toch een even sterk nephelometrisch effekt gaven.

Het verschil is dan echter, dat de oplossing van hooge dispersiteit meer **blauw,** die van geringe dispersiteit meer **geel** licht geeft. Ook dit laatste stemt weer wonderwel met de vondsten van W. Mecklenburg overeen.

Voor het goed begrip van het nephelometrisch gedrag van de ons hier interesseerende troebeling, zou ik de volgende punten uit het bovenstaande naar voren willen brengen:

Het nepehelometrisch effekt van troebele vloeistoffen, colloïdale oplossingen of suspensies van een bepaalde stof, vertoont de volgende eigenschappen:

A. **Het is proportioneel aan de concentratie** onverschillig de grootte der deeltjes, mits deze in de beide vergeleken vloeistoffen onderling, gelijk is.
B. **Hoe kleiner de deeltjes hoe meer blauwachtig het nephelometrisch licht.**
C. **Bij toenemende grootte der deeltjes bij gelijkblijvende concentratie neemt het nephelometrisch effekt eerst toe daarna af.**

§ 6. **De methode van Bloor uit 1914.**

Deze methode, de eerste nephelometrische methode op dit gebied, werd door W. R. Bloor gepubliceerd in The Journal of Biological Chemistry, deel 17, blz. 377 in 1914.

In 't kort komt zij hier op neer:

In een overmaat van een mengsel van drie deelen alcohol en een deel aether (ongeveer 40 cc) wordt een kleine hoeveelheid (ongeveer 2 cc) bloed gegoten. De juiste hoeveelheid wordt door weging vóór en na de toevoeging bepaald. Het mengsel wordt even opgekookt in het waterbad, afgekoeld en aangevuld tot 50 cc, daarna gefiltreerd.

Een bepaalde hoeveelheid er van, b.v. 10 cc wordt met Natriumaethylaat verzeept. Er zijn dan slechts zeepen en cholesterine.

Deze worden in 5 cc van hetzelfde mengsel opgenomen. Als vergelijkingsoplossing gebruikt hij 40 mgr. trioleïne opgelost in 100 cc van hetzelfde alcohol-aether mengsel. Later[1]) heeft hij eenige wijzigingen aangebracht. Als samenstelling van zijn vergelijkingsvloeistof geeft hij dan op 40 mgr oliezuur in 100 cc van het alcohol-aether mengsel.

De eigenlijke nephelometrische bepaling wordt dan als volgt uitgevoerd:

1. aan de 5 cc alcohol-aether mengsel, die de verzeepte bloedvetzuren + cholesterine bevatten, wordt 50 cc water toegevoegd.
2. als standaard wordt gebruikt 50 cc water, waarin onder omroeren 5 cc van de bovengenoemde oliezuur-oplossing is gegoten.
3. daarna wordt zoo spoedig mogelijk na elkaar aan beide vloeistoffen toegevoegd 10 cc van een mengsel van 3 deelen water met 1 deel sterk H Cl.
4. na vijf minuten wordt in den nephelometer afgelezen.

---

[1]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 23, 1915, blz. 317.

Het quantum vetzuren wordt dan berekend door de hoeveelheid cholesterine, die colorimetrisch met een ander deel van het extract is bepaald, van de nephelometrisch gevonden waarde af te trekken.

Bij het nawerken van deze methode heb ik mij in de eerste plaats bezig gehouden met de reagentia.

Behandelt men den gewonen handels-alcohol, ook die, welke z.g. zonder olie is, op de bovengenoemde wijze (verdunnen met water, aanzuren) dan treedt steeds een troebeling op. Hetzelfde is het geval met aether. Slechts bij zorgvuldig overdestilleeren is dit bezwaar te ondervangen. Men moet er nauwkeurig op letten, dat de vloeistoffen in het destilleerapparaat, voorbij de plaats waar condensatie optreedt, niet meer in aanraking komen met caoutchouc; dit geeft terstond sterke verontreiniging.

Ook op de reinheid van het glaswerk dient te worden gelet, Echter is het mij gebleken, dat verontreiniging niet hier in de eerste plaats moet worden gezocht. Immers, wanneer men in een gewoon reageerbuisje van het laboratorium, dat dagelijks gebruikt wordt, een weinig op zich zelf zuivere alcohol kookt, met wat water verdunt en aanzuurt, treedt er nimmer troebeling op, een bewijs, dat verontreiniging door het buisje zelf niet plaats vond.

Het bleek nagenoeg niet mogelijk een bevredigende oplossing van Natrium-aethylaat te verkrijgen. Deze wordt spoedig geel door de vorming van aldehyd-hars en geeft dan een sterke troebeling bij onderzoek op de bovengenoemde wijze. Bij de methode van B l o o r uit 1922 wordt deze stof niet meer gebruikt; een goed reagens is misschien alleen te verkrijgen door metallisch Na op alcohol te laten inwerken.

Alle filtreerpapier bevat vetzuren; zelfs de geprepareerde filters van Schleicher & Schull. Door Kumagava en Suto werd hierop gewezen. Dit feit blijkt het duidelijkst, wanneer men een weinig zuivere alcohol met wat loog warm of koud door zoo'n filter giet; het filtraat geeft dan bij aanzuren een sterke troebeling. Door 3 × gedurende 2 uur koken met 1% Na OH in een waterbad (Kumagava en Suto) of 3 × gedurende 1/2 uur met 1% alcoholische Na OH verkrijgt men filters, die bij bovenstaand proefje een onberispelijk filtraat geven.

Met oliezuur en cholesterine, opgelost in een mengsel van overgedestilleerden alcohol en aether heb ik het nephelometrisch gedrag van deze stoffen nagegaan. Daarbij bleek, dat de nephelometrische bepaling op zich zelf, zooals boven beschreven, **zeer aanvechtbaar** is.

§ 7. **Critiek op de methode.**

Uit de vorige paragraaf blijkt volkomen duidelijk, dat bij deze nephelometrische bepaling ongelijke stoffen worden vergeleken. Dit nu zou geen bezwaar zijn als het bleek, dat de zeer verschillende stoffen, die het „bloedvet" samenstellen, alle hetzelfde nephelometrische gedrag hadden. Veeleer het tegendeel wordt bij daarop gericht onderzoek gevonden.

Zooals Wells[1] bij het onderzoek van Ag Cl troebelingen reeds waarnam varieert het nephelometrisch effekt met den tijd. Hij vergeleek daartoe het nephelometrisch licht, dat van de suspensie afkomstig was, met het licht, dat door een schuingeplaatst matglaasje werd weerkaatst. Van deze eenvoudige methode maakte ik ook gebruik.

---

[1]) R. C. Wells. l. c.

Hij vond dan, dat het nephelometrisch effekt toenam tot een bepaald maximum, om daarna weer te dalen. Het bereiken van het maximum geschiedde soms in 5 minuten, soms in 1/2 uur, het dalen zeer langzaam.

In het licht van de bovenaangehaalde onderzoekingen over het Tyndall-phaenomeen laat zich deze waarneming ongedwongen verklaren als een gevolg **van het geleidelijk grooter worden en samenklonteren van de deeltjes.**

Ditzelfde ontmoet men weer bij de suspensie's, die hier ter sprake komen: oplossingen van vetzuur en cholesterine in alcohol en aether, uitgegoten in water en aangezuurd. Men kan de aflezingen naar den tijd in curve brengen.

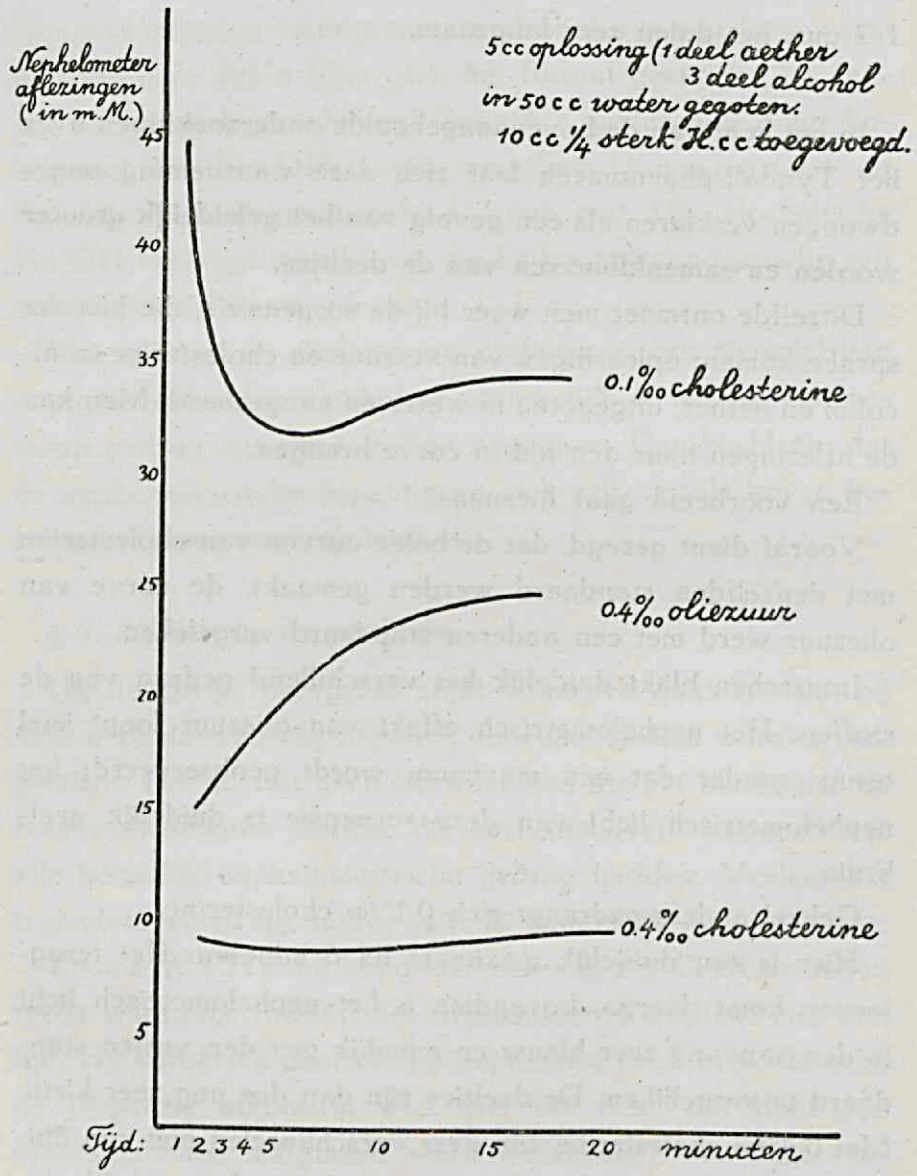
Een voorbeeld gaat hiernaast.

Vooraf dient gezegd, dat de beide curven van cholesterine met denzelfden standaard werden gemaakt, de curve van oliezuur werd met een anderen standaard vergeleken.

Intusschen blijkt duidelijk het verschillend gedrag van de stoffen. Het nephelometrisch effekt van oliezuur loopt snel terug, zonder dat een maximum wordt geobserveerd; het nephelometrisch licht van deze suspensie is duidelijk geelbruin.

Geheel anders gedraagt zich 0.1‰ cholesterine.

Hier is een duidelijk maximum na 6 minuten. Het terugloopen komt daarna, bovendien is het nephelometrisch licht in den aanvang zeer blauw en moeilijk met den vasten standaard te vergelijken. De deeltjes zijn dan dus nog zeer klein. Met 0.4‰ cholesterine zijn deze verschijnselen niet zoo duidelijk. Men moet deze waarnemingen dus wel zoo verklaren, dat de deeltjes oliezuur sneller samenklonteren dan de cholesterine deeltjes. Intusschen is het vreemd, dat de cholesterine


Nephelometer afleezingen (in m.M.)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
5cc oplossing (1 deel aether 3 deel alcohol in 50cc water gegoten: 10cc 1/4 sterk N. cc toegevoegd.
0.1‰ cholesterine
0.4‰ oliezuur
0.4‰ cholesterine
Tijd: 1 2 3 4 5 10 15 20 minuten

suspensie na korten tijd een sterke wirreling vertoont; dit ligt echter waarschijnlijk aan den kristallijnen vorm, waarin deze stof uitvlokt.

Beziet men de suspensie's onder 't microscoop, dan zijn er weldra kleine deeltjes met Brownsche beweging.

De partikeltjes zijn dus zoo groot, dat toename in grootte een afname van het nephelometrisch effekt moet veroorzaken. Vergelijkt men nu een suspensie van cholesterine (5 cc 0.4‰ oplossing in 50 cc water uitgegoten 10 cc ¼ sterk H Cl toegevoegd) met een suspensie op dezelfde wijze verkregen met 0.4‰ oliezuur, dan vindt men natuurlijk een steeds wisselende verhouding.

Na 5 minuten is het nephelometrisch effekt van de cholesterine-suspensie ± 4 × zoo sterk als dat van het oliezuur.

Dergelijke dingen vindt F. A. Csonka in zijn critiek op Bloor's methode.[1]). Hij wil dan door vergelijking met een vasten standaard het begrip „nephelometrische waarde van een stof" invoeren; natuurlijk moet hij dan na een willekeurig gekozen tijd al zijn aflezingen doen.

Blijkbaar koesterde hij de hoop, dat de verschillende stoffen in mengsels naar hun „nephelometrische waarde" aandeel in het nephelometrisch effekt zouden hebben.

Dit is echter allerminst het geval, wat het duidelijkst blijkt uit het volgende proefje:

Er worden twee oplossingen gemaakt in 1 deel aether en 3 deelen alcohol.

I. van 0.2‰ cholesterine (een 0,4‰ oplossing half verdund);

---

[1]) F. A. Csonka. The journal of biological chemistry, deel 34, 1918, blz. 577.

II. van 0.2‰ cholesterine + 0.2‰ oliezuur (door mengen van gelijke deelen 0.4‰ oliezuuroplossing en 0.4‰ cholesterine-oplossing);

5 cc van beide wordt in 50 cc water uitgegoten en 10 cc 1/4 sterk H Cl uit een pipet tegelijkertijd toegevoegd.

Beide suspensie's worden in den nephelometer vergeleken na 5 minuten.

I. op 20 m.M. is gelijk aan

II. op 21.5 m.M.

Het nephelometrisch licht van II is dus zwakker en bovendien meer bruin dan dat van I.

De waarheid is, dat het mengsel een eigen wijze van uitvlokken heeft, die niet door een eenvoudige berekening is af te leiden uit de wijze van uitvlokken van beide componenten. Immers in dat geval had het nephelometrisch effekt van II althans sterker moeten zijn, dan dat van I, hoe weinig dan ook.

Na deze verschillende waarnemingen was ik geheel overtuigd, dat reeds op zuiver theoretische gronden bepalingen met Bloor's methode uit 1914 wel van zeer twijfelachtige waarde waren.

Er zijn nu verschillende mededeelingen te vinden, die trachten bezwaren van de methode te ondervangen. Zoo haalt Kober[1]) de namen aan van Murlin en Riche, die de oplossingen uitgieten in 0.5‰ gelatine aangezuurd met azijnzuur. Ik kan iedereen afraden deze methodiek te gaan nawerken. Bij het gebruik van gelatine maakt het om-

---

1) P. A. Kober. The journal of industrial and engineering chemistry, deel 10, 1918, blz. 556.

schudden, de wijze en snelheid van toevoegen van de reagentia zoo'n verschil in nephelometrisch effekt, dat de eerste en voornaamste eisch van K l e i n m a n n voor nephelometrische bepalingen, de reproduceerbaarheid van de troebeling, geheel onvervuld blijft.

Het deed mij destijds veel genoegen in de Kolloid Zeitschrift deel 31, 1922, blz. 132 te lezen, dat B e c h h o l d en H e b l e r bij hun proeven ook op de onberekenbare werking van gelatine in dit opzicht waren gestuit.

Waarschijnlijk zijn er nog veel meer bezwaren dan de bovengenoemde tegen B l o o r's oude methode. Het bleek echter, dat in 1922 een modificatie door hem was beschreven, tot de bespreking waarvan ik nu overga.

§ 8. **Bloor's methode van 1922.**

Het artikel, waarin deze modificatie wordt beschreven[2]), maakt een veel meer gefundeerden indruk; bovendien is de aankondiging zeer voorzichtig gesteld; hij stelt deze methode voor, indien de nephelometrische bepalingswijze voor bloedvet bewaard moet blijven.

De wijzigingen bestaan hierin:

1. wenscht hij zijn extractie-methode (uitgieten in overmaat alcohol-aether mengsel) slechts te zien toegepast op plasma; deze wijziging vindt zijn grond daarin, dat de extractie van de bloedlichaampjes op deze wijze zeker onvolledig is.
2. verzeeping met sterk Na OH
3. scheiding van cholesterine en verzeept vetzuur. (deze

---

2) W. R. B l o o r, K. F. P e l k a n, D. M. A l l e n. The journal of biological chemistry, deel 52, 1922, blz. 191.

scheiding is, zooals boven beschreven, zeer wenschelijk).

4. de zeepen worden, nadat cholesterine is verwijderd, in 5 cc alcohol opgenomen en hiermede de nephelometrische bepaling uitgevoerd; nu door uitgieten in 100 cc gedestilleerd water.
5. als standaard oplossing wordt gebruikt een mengsel van oliezuur en palmitinezuur. (4 deelen palmitinezuur en 6 deelen oliezuur 0.4‰ in alcohol 96%.).

In de praktijk komt de methode dan hier op neer, dat 5 cc plasma (citraatplasma) in ± 70 cc alcohol-aethermengsel druppelsgewijze en onder omschudden wordt uitgegoten. Het mengsel wordt daarna in een waterbad even aan 't koken gebracht, afgekoeld en aangevuld tot het merkteeken op de kolf van 100 cc. Daarna wordt gefiltreerd; 10, 15 of 20 cc van het filtraat worden voor de bepaling gebruikt.

Deze worden met 0.1 cc zeer sterke Na OH verzeept. Deze loog verkrijgt B l o o r door water te laten condenseeren tegen zuiver Natrium in een vochtige ruimte.

Het verzeepen geschiedt ± een half uur lang in een kolf op den stoom van een waterbad. Men gaat voort tot er nagenoeg geen vloeistof meer is, althans totdat alle alcoholdamp is verdwenen en voegt dan 0.1 cc verdund $H_2 SO_4$ toe. (1 deel $H_2 SO_4$ conc. op 3 deelen water). Het mengsel moet daardoor niet zuur worden, waarvoor men gemakkelijk zorg kan dragen door vooraf de reactie te bepalen van een mengsel van gelijke deelen loog en zuur. Te zwakke loog moet niet worden gebruikt.

Is er niet genoeg vocht om een goede vermenging met het zwavelzuur te verzekeren, dan kan wat gedestilleerd water worden toegevoegd.

Om nu de zeepen van het onverzeepbare te scheiden, geeft hij de volgende methode aan:

Het mengsel van verzeept bloedvet, cholesterine, loog en natriumsulfaat, dat op de bovenbeschreven wijze is ontstaan, wordt op het waterbad tot een korst ingedroogd, die homogeen over den bodem van de kolf moet zijn verdeeld en vanzelf poreus is door het aanwezige zout.

Op deze korst laat men voorzichtig 10 cc chloroform vloeien; na 10 minuten wordt de chloroform door een filter afgegoten; deze zelfde bewerking wordt nog twee maal 5 minuten met 5 cc herhaald; alle cholesterine is dan in de chloroform, alle zeep in de korst of in kleine stukjes, die hebben losgelaten en op de filter zijn gekomen. De quantitatieve bepaling van cholesterine geschiedt dan colorimetrisch.

De verzamelde chloroform-filtraten worden ingedampt tot 5 cc (indampen tot ± 3 cc; het bekertje met kleine hoeveelheden chloroform uitwasschen en zoo de hoeveelheid in een maatcylinder tot 5 cc brengen). Daarna wordt 1 cc azijnzuur anhydride en 0.1 cc sterk H_2SO_4 toegevoegd; dezelfde bewerking geschiedt met 5 cc standaardoplossing. (0.1‰ of 0.2‰ cholesterine in chloroform). Beide oplossingen worden daarna 15 minuten bij 18°—22° in het licht gezet, waarbij wordt afgelezen. De colorimeter van Dubosc wordt gebruikt.

De nephelometrische bepaling van de vetzuren geschiedt op de volgende wijze:

10 cc alcohol wordt op de korst gegoten, 10 minuten wordt gekookt (bij voorbeeld op het waterbad) en daarna wordt deze zelfde bewerking nog eens met 5 cc alcohol gedurende 5 minuten herhaald. Beide portie's alcohol worden, nog heet, door het filter gegoten, verzameld en tot 5 cc ingedampt.

(evenals boven voor de chloroform beschreven is). Hierin is dan alle zeep. Deze 5 cc zeepoplossing wordt in 100 cc gedestilleerd water uitgegoten, 5 cc van de standaardoplossing in een andere kolf met 100 cc aqua dest. en zooveel mogelijk tegelijkertijd wordt zoutzuur toegevoegd: 10 cc van een oplossing van 1 deel sterk H Cl in 3 deelen water.

Voor het toevoegen van de zeepoplossing aan het water geeft B l o o r de volgende methode aan: door een trechter met uitgetrokken steel, waarvan het uiteinde onder water reikt, wordt de alcoholische zeepoplossing onder omschudden in het water gegoten; daarna wordt het maatglaasje eenmaal omgespoeld met het water uit de kolf en dit weer door den trechter gegoten. Ik heb niet de overtuiging, dat dit alles noodzakelijk is, doch ik heb mij wel steeds aan deze voorschriften gehouden. De troebele oplossingen worden in de nephelometerbuisjes gebracht en met elkaar vergeleken.

Ik wil nu de volgende punten nader bespreken:

1. het nephelometrisch gedrag van oliezuur- en palmitinezuur-suspensie's afzonderlijk en als mengsel en den invloed van verschillende factoren op deze suspensie's.
2. de wijze, waarop cholesterine en verzeepte vetzuren worden gescheiden.
3. de colorimetrische bepaling van cholesterine.

§ 9. **De vetzuursuspensie's.**

Het spreekt vanzelf, dat bij de nephelometrische bepalingswijze van de bloedvetzuren, suspensie's van ongelijksoortige stoffen worden vergeleken. De bloedvetzuren zijn immers een mengsel van zeer verschillende vetzuren, die ten deele zelfs nog onvolkomen bekend zijn. Bovendien is de samenstelling van dit mengsel bij verschillende individuen en bij hetzelfde

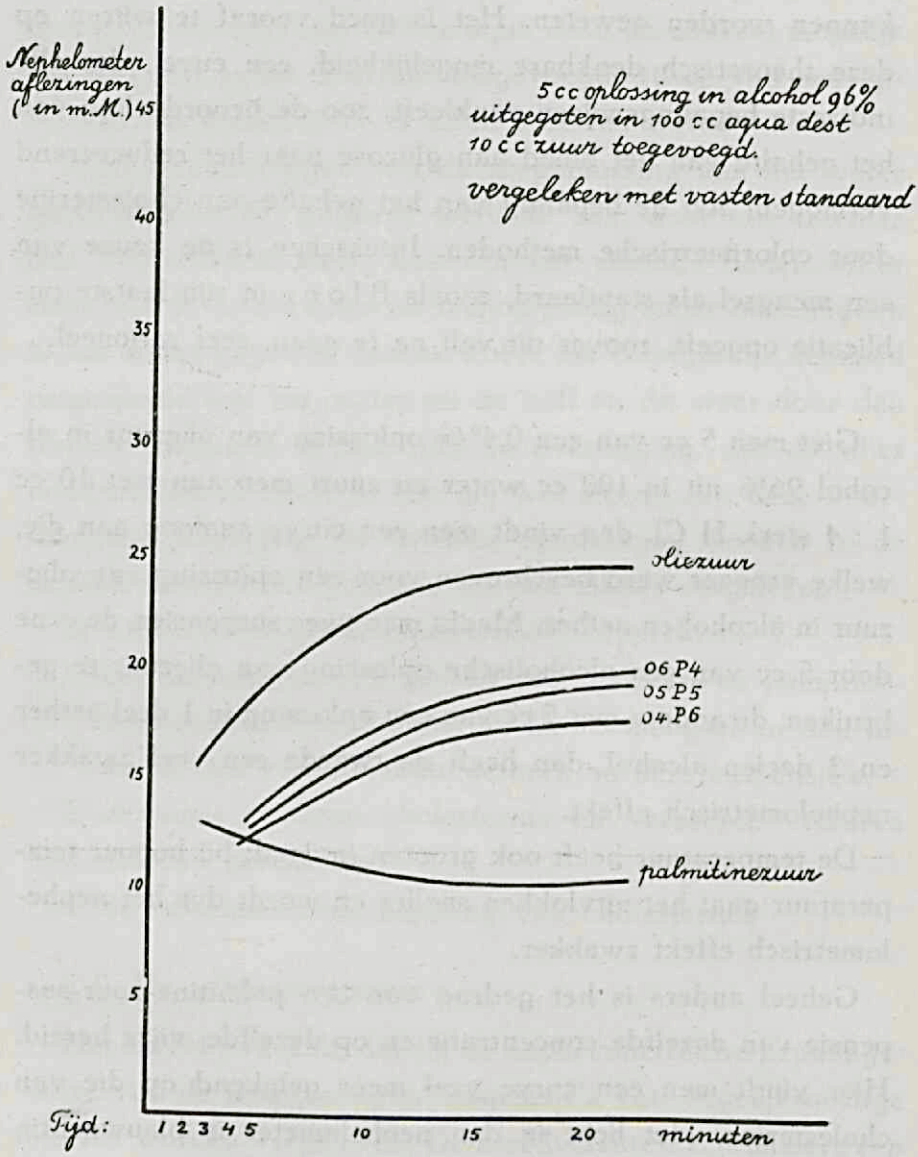
individu op verschillende tijden ongetwijfeld wisselend, zoodat verschillen in het nephelometrisch effekt altijd nog, althans gedeeltelijk, aan qualitatieve veranderingen zouden kunnen worden geweten. Het is goed vooraf te wijzen op deze theoretisch denkbare mogelijkheid, een euvel, dat alle indirecte bepalingswijzen aankleeft; zoo de beoordeeling van het gehalte van het bloed aan glucose naar het reduceerend vermogen; zoo de bepaling van het gehalte aan cholesterine door colorimetrische methoden. Intusschen is de keuze van een mengsel als standaard, zooals B l o o r in zijn laatste publicatie opgeeft, zoover dit valt na te gaan, zeer rationeel.

Giet men 5 cc van een 0.4‰ oplossing van oliezuur in alcohol 96% uit in 100 cc water en zuurt men aan met 10 cc 1 : 4 sterk H Cl. dan vindt men een curve analoog aan die, welke vroeger werd beschreven voor een oplossing van oliezuur in alcohol en aether. Maakt men twee suspensies, de eene door 5 cc van een alcoholische oplossing van oliezuur te gebruiken, de andere met 5 cc van een oplossing in 1 deel aether en 3 deelen alcohol, dan heeft de tweede een veel zwakker nephelometrisch effekt.

De temperatuur heeft ook grooten invloed; bij hooger temperatuur gaat het uitvlokken sneller en wordt dus het nephelometrisch effekt zwakker.

Geheel anders is het gedrag van een palmitine-zuur-suspensie van dezelfde concentratie en op dezelfde wijze bereid. Hier vindt men een curve veel meer gelijkend op die van cholesterine. Het licht in den nephelometer is blauwachtig en men moet dus aannemen, dat de deeltjes hier veel langzamer samenklonteren.

Men vindt nu, dat het gedrag van mengsels een geleidelijke


Nephelometer afleringen (in m.M.)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
5 cc oplossing in alcohol 96% uitgegoten in 100 cc aqua dest 10 cc zuur toegevoegd.
vergeleken met vasten standaard
oliezuur
06 P4
05 P5
04 P6
palmitinezuur
Tijd:
1 2 3 4 5
10
15
20
minuten

overgang vertoont van de eene curve naar de andere. In zijn bovengenoemd artikel (1922) geeft Bloor een reeks getallen op, die de nephelometrische aflezingen voorstellen van palmitinezuur en mengsels, vergeleken met oliezuur. Dit is een zeer vreemde lijst. Het kan hem onmogelijk ontgaan zijn, dat palmitinezuur op deze wijze niet is te vergelijken met oliezuur. Hij spreekt evenmin over een bepaalden willekeurig gekozen tijd, waarna hij de aflezingen uitvoerde. Het vreemdste is echter, dat hij een plotseling verschil vindt tusschen een mengsel van 6 deelen oliezuur en 4 deelen palmitinezuur en een van 5 deelen oliezuur 5 deelen palmitinezuur. Hiervan is mij niets gebleken, zooals duidelijk te zien is aan de hiernaast geteekende curven.

Wat de oorzaak mag zijn is mij niet duidelijk.

Vergelijkt men nu een suspensie van oliezuur met een van een mengsel van 6 deelen oliezuur en 4 deelen palmitinezuur (het standaard-mengsel) dan treft het, dat het licht van de tweede suspensie wat blauwer is en tegenover het oliezuur geleidelijk relatief sterker wordt, dus als uitdrukking daarvan, dat het mengsel minder snel uitvlokt.

Bloor wil dit verschillend gedrag in verband brengen met het smeltpunt en het smeltpunt van het als standaard gebruikte vetzuurmengsel is ongeveer hetzelfde als dat van bloedvetzuren $\pm$ 43°.

Het ligt natuurlijk buiten het bestek van deze studie om na te gaan of er een mathematisch verband valt te leggen tusschen de wijze van uitvlokken en het smeltpunt. Men zou daartoe bij constante temperatuur en met monochromatisch licht moeten werken.

Intusschen lijkt deze veronderstelling van Bloor zeer aannemelijk. Ook om andere redenen, die ik later zal noe-

men, is er geen aanleiding wijziging te brengen in dezen voorgestelden standaard.

Een bijzonderheid, die hier wel dient vermeld te worden, is deze, dat B l o o r ongeveer gelijk gedrag vond van oliezuur en palmitinezuur als hij werkte met water van 75°.

Het verschil in nephelometrisch gedrag moet dus wel in de wijze van uitvlokken worden gezocht, en is niet zoo te verklaren, dat even groote palmitinezuurdeeltjes meer licht zouden reflecteeren dan evengroote oliezuurdeeltjes.

Reeds nu zal het den lezer treffen, dat het gedrag van deze troebele vloeistoffen zoo weinig voldoet aan een van de eischen van K l e i n m a n n, n.l. het constant blijven gedurende zekeren tijd, dat zij eigenlijk als weinig geschikt voor nephelometrische methodiek moeten worden geacht.

Nog grooter worden de moeilijkheden, als men de standaard-suspensie vergelijkt met die van verdunningen. Een onderzoek in deze richting was noodzakelijk, daar B l o o r aanraadt een empirische curve te maken.

Zooals uit de bovenaangehaalde onderzoekingen van Duitsche zijde blijkt, zou men kunnen verwachten, dat het nephelometrisch effekt van verdunningen proportioneel was aan de concentratie. Het is echter a priori niet te verwachten, dat deze veranderlijke suspensie's bij onderlinge vergelijking op een bepaalden tijd na toevoeging van het praecipiteerend reagens — (in dezen het zoutzuur) even groote deeltjes zouden hebben.

Ik wil beginnen met de suspensie's van **Palimitinezuur** te bespreken.

Maakt men twee oplossingen van palmitinezuur in alcohol,

de eene 0.4‰ de ander 0.2‰ (0.4‰ half verdund), voegt men 5 cc van elk van beide oplossingen toe aan 100 cc aqua destill. en laat onder omschudden zooveel mogelijk tegelijkertijd 10 cc 1/4 sterk H Cl. toevloeien, dan krijgt men troebelingen, die in den nephelometer vergeleken, de volgende aflezingen geven:

	0.4‰ (standaard)	0.2‰
na 3½ minuut	20	42
„ 7 „	„	40.3
„ 10 „	„	41

(Theoretisch volkomen proportioneel zou zijn 20 — 40).

Bij vergelijking van	0.4‰ (standaard)	0.24‰
na 5 minuten	20	34.2
„ 8 „	„	33.8

(Theoretisch 20 — 33.3).

Bij vergelijking van	0.4‰ (standaard)	0.32‰
3 minuten	20	25

wat volkomen proportioneel beteekent.

In de verschillende verdunningen bestaat dus nagenoeg proportionaliteit van het nephelometrisch effekt, terwijl de zelfde verhouding gedurende geruimen tijd bewaard blijft. Dit is echter slechts het geval met het palminitinezuur, dat langzaam uitvlokt.

Doet men analoge-proeven met **oliezuur**-oplossingen, dan vindt men:

Bij vergelijking van 0.4‰ (standaard) met 0.2‰

na 3 minuten	30	43.6
„ 9 „	„	41.5

(Theoretisch ware 30 — 60).

Bij vergelijking van 0.4‰ (standaard) met 0.24‰

na 5 minuten	30	40.5
„ 8 „	„	39.8

(Theoretisch ware 30 — 50).

Bij vergelijking van 0.4‰ (standaard) met 0.32‰

na 6 minuten	30	33.1
„ 10 „	„	33.8

(Theoretisch ware 30 — 37.5).

Deze cijfers leeren het volgende:

1. er is een sterke afwijking van de proportionaliteit;
2. de onderlinge verhouding is veranderlijk met den tijd.

Dit gedrag van de suspensie's is mijns inziens alleen maar zoo te verklaren: dat het nephelometrisch effekt van de dunnere suspensie's relatief hooger is, dan dat van de dichtere, doordat de deeltjes in de dunnere suspensie's kleiner zijn; dientengevolge hoeft het venster van den nephelometer niet zoover te worden opengeschroefd om het vereischte licht te krijgen, zoodat de aflezingen relatief te laag worden.

Men kan den regel opstellen:

Dunnere suspensie's vlokken minder snel uit.

Dit is geheel in overeenstemming met andere ervaringen in de physische chemie.

Het feit bovendien, dat het nephelometrisch licht van de dunnere suspensie's meer blauwachtig is, pleit ook sterk voor deze opvatting.

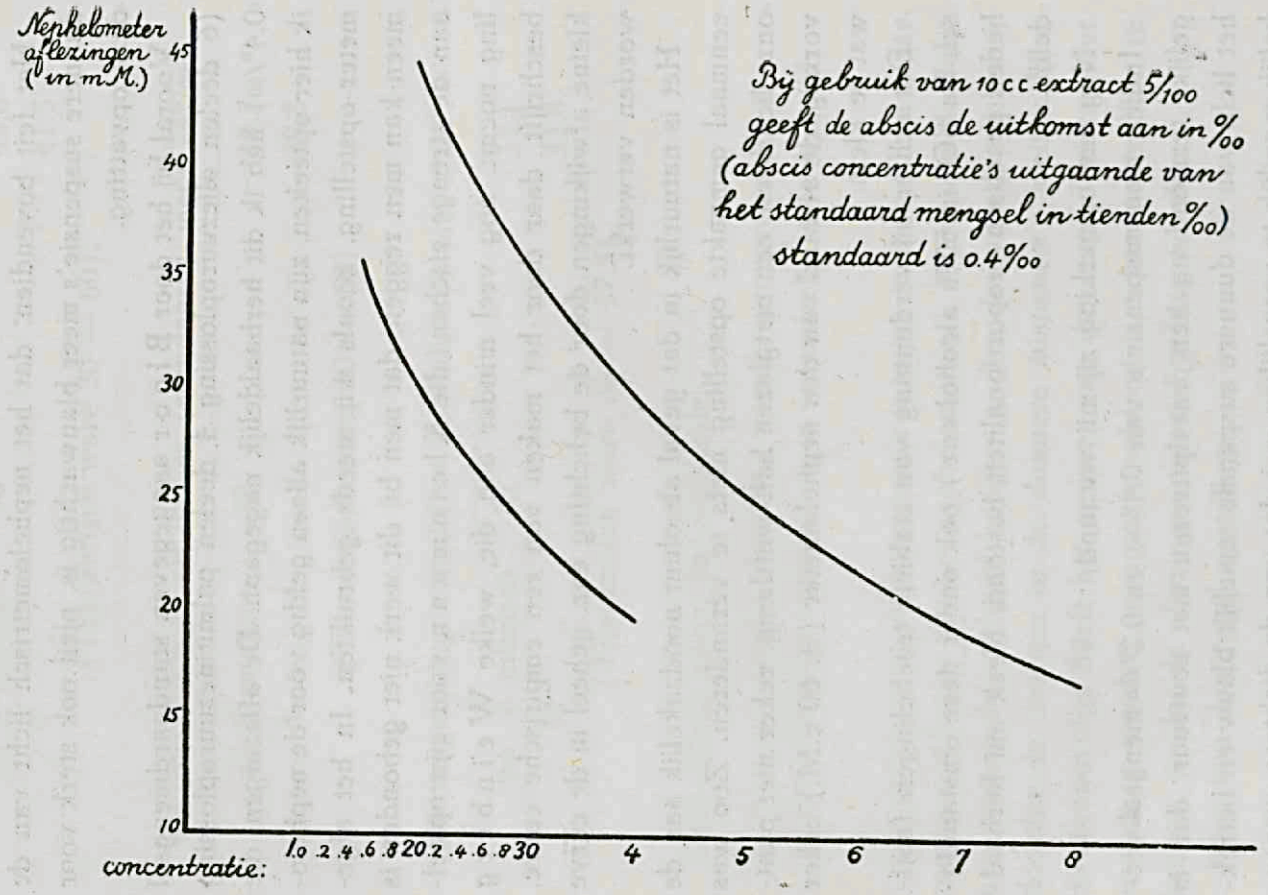
Vooral bij het door B l o o r aangegeven standaardmengsel (6 deelen oliezuuroplossing 4 deelen palmitinezuuroplossing 0.4°/oo) heb ik dit herhaaldelijk nagegaan. De aflezingen, die ik hier opteeken, zijn natuurlijk alleen geldig voor de nephelometer-opstelling, zooals wij steeds gebruikten. In het algemeen kan men zeggen, dat men bij dit werk niet gebonden is aan de strenge eischen, die K l e i n m a n n voor zijn opstelling noemt, nog veel minder aan die, welke W e i n b e r g beschrijft, daar door het maken van een empirische curve, kleine afwijkingen door de belichting enz. geheel in de curve worden verwerkt.

Het is natuurlijk in dat geval absoluut noodzakelijk aan de eenmaal gemaakte opstelling niets te veranderen. Zoo was onze lichtbron, een matglazen half-wattlamp, zeker niet puntvormig, de afstand van den nephelometer (± 60 c.M.) zeker wat te klein.

Dat echter bij verdunning van stabiele troebelingen (stijfsel, Ba SO_4 in 50% alcohol enz.) ook onder deze omstandigheden practisch proportionaliteit bestond, bleek mij herhaaldelijk.

Nog één opmerking zij mij vergund;

Indien men suspensie's van 0.4°/oo en 0.2°/oo mengsel vergelijkt terstond na het praecipiteeren met zoutzuur, dan is het licht van de dunnere suspensie tamelijk blauw en betrekkelijk moeilijk te vergelijken met dat van de dichtere suspensie, terwijl het verhoudingsgetal ook verandert.


Nephelometer
aflezingen
(in mM.)
45
40
35
30
25
20
15
10
concentratie:
1.0 .2 .4 .6 .8 2.0 .2 .4 .6 .8 3.0
4
5
6
7
8
Bij gebruik van 10 cc extract 5/100
geeft de abscis de uitkomst aan in ‰
(abscis concentratie's uitgaande van
het standaard mengsel in tienden ‰)
standaard is 0.4‰

b.v.	0.4‰ (standaard)		0.2‰
na 2 minuten	20		34.2
na 4 „	„		32.5
na 6 „	„		30.2

Daar pas na 6 à 8 minuten een verhouding werd gevonden, die eenigen tijd constant bleef, werd als tijd voor afle-zingen 6 à 8 minuten na het toevoegen van het zoutzuur gekozen.

T a b e l: alles vergeleken met 6 deelen oliezuur, 4 deelen palmitinezuur 0.4‰ als standaard.

0.2 ‰	(standaard op 20)	— 30.3
0.24‰	(standaard op 30)	— 40.6
0.32‰	„	— 34.3
0.48‰	„	— 26
0.64‰	„	— 20.7
0.8 ‰	„	— 17

Tot één opmerking geeft deze tabel nog aanleiding:

de nephelometrische verhouding van de suspensie's van 0.8‰ en 0.4‰ onderling neigt veel meer tot de proportionaliteit dan die tusschen de suspensie's van 0.4‰ en 0.2‰. De bovengenoemde regel kan dus nog op de volgende wijze worden aangevuld.

Dunnere suspensie's vlokken langzamer uit, en dit feit wordt des te meer uitgesproken hoe dunner de suspensie's zijn.

Indien dus de bloedvetzuren nephelometrisch vergelijkbaar zijn met dit als standaard gebruikte mengsel, dan moet worden voldaan aan de volgende eischen:

1. Het nephelometrisch effekt van een even sterke bloedvetzuur-suspensie loopt op gelijke wijze terug als dat van de standaard suspensie.
2. Bloedvetzuur-suspensie's gedragen zich in hun verdunningen als die van het standaard mengsel.

Op dit punt kom ik later nog terug.

B l o o r beschrijft in zijn publicatie hoe hij getracht heeft door praecipitatie met Ca-hydroxyde in alkalisch milieu troebelingen te krijgen, die voor alle vetzuren evengroot nephelometrisch effekt vertoonden en meer stabiel waren.

Het is zeer vreemd, dat deze werkwijze goed voldoet met mengsels van vetzuren, doch bij toepassing op het bloed veel te lage waarden geeft, vergeleken met macro-methoden.

Een verklaring geeft B l o o r hiervoor niet. Wel dat het afwijkend gedrag moet gezocht worden in de fractie onverzadigde vetzuren.

Hoe dit ook zij, door mij is dit punt niet nagewerkt.

Van de volgende factoren heb ik den invloed op de suspensie's van het standaardmengsel nagegaan:

a) de hoeveelheid toegevoegd zoutzuur
b) de hoeveelheid alcohol
c) de temperatuur
d) de verzeeping
e) verschillende zouten

A. **De hoeveelheid zoutzuur.**

Zelfs als men aan een van beide suspensie's in plaats van 1/4 sterk H Cl. 10 cc van 1/8 sterk H Cl. toevoegt, blijft het nephelometrisch effekt gelijk.

Maar het zoutzuur is bepaald noodig, daar anders zelfs na een half uur nog geen spoor van troebeling is ontstaan.

B. **De hoeveelheid alcohol.**

Ook als men bij gelijke hoeveelheid opgelost vetzuur de dubbele hoeveelheid alcohol gebruikt, geeft dit slechts nauw merkbaar verschil in nephelometrisch effekt.

C. **De temperatuur.**

Zooals te verwachten is, heeft de temperatuur een duidelijken invloed. Vergelijkt men twee suspensie's van gelijke sterkte, de een in warm water, de ander in koud, dan geeft de warme veel zwakker nephelometrisch effekt. Echter, bij gebruik van water van dezelfde temperatuur, hetzij koud of warm, voor beide vindt men geen verschil.

Voor ons was het natuurlijk van veel belang na te gaan, of de onderlinge nephelometrische verhouding van verdunningen verandert met de temperatuur. In dat geval zou steeds bij een zelfde temperatuur moeten worden gewerkt. Bij suspensie's van 0.2‰ vergeleken met die van 0.4‰ heb ik dit nagegaan bij temperaturen tusschen 15° en 25°, steeds bleef de verhouding, wanneer n.l. beide even warm waren, dezelfde, (20 — 30.2), zoodat hieruit de conclusie kan worden gemaakt, dat men, bij kamertemperatuur werkende, verder geen bijzondere voorzorgen behoeft te nemen.

D. **De verzeeping.**

F. A. Csonka vermeldt in zijn reeds meer aangehaalde beschouwing over Bloor's methodiek, dat de

verzeeping een uitgesproken invloed heeft op het nephelometrisch effekt. Dit punt is natuurlijk van zeer veel belang en het lijkt mij nuttig even hierbij stil te staan. Als men 5 cc van de alcoholische oliezuur-oplossing of 5 cc van het, als standaard gebruikte, mengsel indampt met 0.1 cc sterk Na OH (verkregen als boven beschreven), de zeepen opneemt in 5 cc alcohol en uitgiet in 100 cc aqua destillata, dan ontstaat een troebeling na eenige minuten staan.

Van dit feit wordt ook gewaagd in een artikel van Kleinmann en Rona over de nephelometrische bepaling van Calcium[1]). Zij wijten het aan de aanwezigheid van zeer geringe hoeveelheden Calcium.

Voegt men nu het zoutzuur toe, nadat deze troebeling eenigen tijd heeft bestaan, dan krijgt men een suspensie met sterker nephelometrisch effekt dan die, welke op de gewone wijze is gemaakt.

Ook zonder te verzeepen, doch alleen door een druppel loog vooraf aan het water toe te voegen, kan men hetzelfde waarnemen.

Voegt men echter het praecipiteerend zuur toe, voordat er eenig zichtbare troebeling is ontstaan, dan vindt men geheel hetzelfde nephelometrisch gedrag als van de standaard suspensie.

E. **Invloed van zouten.**

Na Cl en $Na_2 SO_4$ vooraf aan de vetzuuroplossing of aan het water toegevoegd, vertoonen geen invloed.

---

[1]) P. Rona en H. Kleinmann. Biochemische Zeitschrift, deel 137, 1923, blz. 157.

Ca Cl_2 en Ba Cl_2 geven, zooals te begrijpen is, een troebeling van Calcium- of Bariumzeepen, doch ook hier weer gaat de regel op: als men het praecipiteerende zuur maar toevoegt, voordat er eenige troebeling is ontstaan, dan is het nephelometrisch gedrag hetzelfde als dat van den standaard.

Daar het nu voor den standaard geen verschil maakt of men niet of wel een kwartier wacht met het toevoegen van het zuur, nadat de oplossing in het neutrale water is uitgegoten, heb ik mij dus bij de praktische uitvoering van mijn bepalingen gewend aan de volgende werkwijze:

5 cc standaardoplossing wordt onder omschudden toegevoegd aan 100 cc water;

5 cc oplossing verzeept bloedvetzuur wordt toegevoegd aan 100 cc water, door een trechter zooals B l o o r aangeeft.

Terstond wordt daarna 10 cc 1/4 sterk H Cl aan dit laatste mengsel toegevoegd en zoo spoedig mogelijk er na aan het standaard mengsel. Men neme een pipet met zeer wijde opening om snel te kunnen werken.

Na 6 à 8 minuten wordt in den nephelometer afgelezen.

Een duidelijken invloed van de wijze van omschudden of de snelheid van toevoegen van het zoutzuur kon ik niet vinden. Zooals reeds gezegd: gebruikt men gelatineoplossing in plaats van water, dan wegen deze punten juist zeer zwaar.

Het lijkt mij echter raadzaam het toevoegen van het zoutzuur snel te verrichten, door bijgieten uit een maatglaasje of een pipet met wijde opening. Het tijdsverschil

tusschen het ontstaan van beide suspensie's heeft dan geen invloed en bovendien voldoet men aan den regel, dien K l e i n m a n n in zijn eerste publicatie geeft, dat de verdeeling van de gesuspendeerde stof des te homogener is hoe sneller men het praecipiteerend agens toevoegt.

§ 10. **De scheiding van cholesterine en zeepen.**

Voordat ik de werkwijze, zooals B l o o r in 1922 heeft aangegeven, nader bespreek, wil ik eerst eenige opmerkingen maken over de techniek.

Het is moeilijk, na de verzeeping, het mengsel tot een gelijkmatig verdeelde korst op den bodem van een kolfje in te drogen. Men vindt er geen met een platten bodem; alle hebben een min of meer diepe gracht rondom, waarin het mengsel in dikke korsten samenbakt. Alleen bekerglaasjes met recht opstaanden wand hebben een vlakken bodem. Hier is echter het bezwaar, dat men bij het koken door spatten veel verliest en bovendien, dat veel materiaal op de wanden droogt. Dit alles ondervangt men echter door de bekerglaasjes (van 100 cc) met een horlogeglas, den hollen kant naar boven, toe te dekken. Door den condenseerenden alcohol, die langs de zijwanden terugvloeit, worden deze schoon gehouden; wat tegen het horlogeglas spat, valt met de daartegenaan condenseerende alcoholdruppels terug en de verzeeping duurt zeker den tijd, noodig om de cholesterine-esters te splitsen i. e. minstens een half uur. T h a y s e n geeft aan[1]), dat 2 uur verzeepen noodig is, doch voor de kleine hoeveelheden, die hier ter sprake komen, is 1/2 uur voldoende.

---

[1]) Th. E. H. T h a y s e n. Biochemische Zeitschrift, deel 62, 1914, blz. 89.

De korst laat nog al eens los bij het overgieten met chloroform, hoe voorzichtig men dit ook doet. Bij een wijziging, die ik later zal beschrijven, was ik verplicht H Cl te gebruiken voor het „gedeeltelijk neutraliseeren". Korsten op deze wijze verkregen zijn veel solider dan bij gebruik van $H_2 SO_4$, terwijl toch ook met het Na Cl, dat ontstaat, de korst poreus genoeg is voor een bevredigende extractie van de cholesterine door de chloroform. Ik kan dus warm aanbevelen 0.1 cc H Cl hiertoe te gebruiken.

Door kloppen tegen den buitenkant van het bekerglas en door enkele druppels aqua dest. toe te voegen vlak voor het drogen, lukt het, na eenige oefening, zeer gelijkmatig verdeelde korsten te krijgen.

B l o o r zegt: men moet niet te lang drogen, want dan wordt niet alle cholesterine door de chloroform uitgetrokken. Droogt men te kort, dan gaat ook zeep mede in de chloroform. Vooral mag nergens in de korst een zure reactie heerschen, daar het dan aanwezige vrije vetzuur in chloroform oplost. Ik meen dat ± 5 minuten drogen goed voldoet. Men leert dit trouwens op den duur.

De chloroform moet watervrij en alcoholvrij zijn, daar er anders zeep in oplost.

Op de volgende wijze heb ik er mij van overtuigd, dat met chloroform bij kamer-temperatuur inderdaad een scheiding van cholesterine en zeepen mogelijk is.

1. Ik heb nagegaan na hoeveel malen koken met chloroform geen cholesterine meer uit de verzeepingskorst kon worden geextraheerd. Kookt men eerst enkele minuten met 10 cc chloroform, daarna met 5 cc en daarna weer met 5 cc, dan is in de laatste hoeveelheid chloro-

form met azijnzuur-anhydride en sterk zwavelzuur geen groenkleuring meer op te wekken.

Tweemaal koken met chloroform geeft dus volledige extractie.

2. Kookt men de indampkorst, na de extractie met chloroform in de koude, gedurende enkele minuten met chloroform, dan wordt in deze laatste chloroform met azijnzuur-anhydride en zwavelzuur vaak een zeer geringe groenkleuring gevonden.

3. Vergelijkt men echter met de L i e b e r m a n n reactie colorimetrisch de hoeveelheid cholesterine, die uit een zelfde quantum plasma-extract met chloroform in de koude en na koken is gewonnen, dan vindt men geen merkbaar verschil.

Men kan dus zeggen: al moge het waar zijn, dat bij deze wijze van scheiding een spoor cholesterine in de verzeepingskorst achterblijft, in ieder geval is dit praktisch onmerkbaar weinig. Het bleek mij, dat het partieel neutraliseeren, zooals B l o o r het aanraadt met het oogmerk de verzeepingskorst poreus te maken, zeer goed voldoet.

Zonder deze bewerking is de extractie van de cholesterine door de koude chloroform ten eenenmale onvoldoende.

4. Maakt men een verzeepingskorst, zooals boven aangegeven, door 5 cc van het standaardmengsel met 0.1 cc sterke Na O H in te dampen, gedeeltelijk te neutralisee-

ren en daarna in te drogen en overgiet men deze korst met chloroform bij kamertemperatuur, dan bestaan er twee mogelijkheden om na te gaan of er zeep in de chloroform oplost.

In de eerste plaats door de chloroform, nadat deze met de korst eenigen tijd in aanraking is geweest, te onderzoeken op verontreiniging, zooals ik boven voor de andere reagentia noemde: verdampen van de chloroform, residu opnemen in zuivere alcohol en aanzuren.

Gebruikt men nu gezuiverde chloroform, die op zich zelf, op deze wijze onderzocht, geen troebeling geeft, dan overtuigt men zich gemakkelijk, dat op deze wijze steeds een spoor zeep in de chloroform oplost.

In de tweede plaats: lost men de zeep, die na de behandeling met chloroform in de korst achterbleef, op in 5 cc alcohol en vergelijkt men daarna in den nephelometer met het gewone standaardmengsel, dan vindt men geen merkbaar verschil.

Men kan dus verder zeggen: al moge het waar zijn, dat eenige zeep in de chloroform in oplossing gaat, dan is dit toch zóó weinig, dat het practisch geen merkbaar verlies beduidt.

Zooals ik reeds opmerkte bij de bespreking van de macromethode's, vindt men steeds genoemd een scheiding door middel van petroleum-aether.

In zijn reeds meer genoemde studie raadt Ivar Bang aan het extract te verzeepen met sterke Na OH, in te drogen, te overgieten met petroleum-aether en na 24 uur af te gieten.

Het bleek mij, dat evenals bij de extractie met chloroform ook bij extractie met petroleum-aether het gedeeltelijk neu-

traliseeren van veel voordeel is. Echter al neemt men, op raad van Bang, zelfs zeer vluchtige petroleum-aether (Kp 38° dus praktisch zuiver pentaan), dan nog vindt men na 24 uur door koken met chloroform een kleine rest cholesterine in de korst.

Op de volgende wijze lukte het mij de cholesterine volledig te verwijderen:

Met 0.1 cc Na OH wordt het extract ingedampt; ten slotte, zooals boven beschreven 0.1 cc sterk H Cl. toegevoegd en daarna 15 minuten op een flink kokend waterbad ingedroogd. Op deze nog heete korst wordt 20 cc van de bovengenoemde vluchtige petroleum-aether gegoten, die daarbij flink gaat koken; de korst laat echter niet los. Nu laat men het geheel gedurende 8 uren staan, giet de petroleum-aether er af, lost dan de korst met enkele druppels aqua dest. op, droogt weer gedurende 15 minuten en overgiet met 20 cc petroleum-aether. Dit herhaalt men dan nog eenmaal na 8 uur. De drie porties petroleum-aether worden verzameld, de vloeistof afgedampt en het residu in 5 cc chloroform opgenomen. De bepaling geschiedt dan verder als voor het gewone chloroform-extract.

Kookt men de korst, die overblijft, uit met chloroform, dan is er geen achtergebleven cholesterine meer te vinden. Vooral het omsmelten van de korst lijkt mij zeer dienstig: er komt dan, als het ware, telkens een andere kant boven.

Het drogen gedurende 15 minuten is een raad, gegeven door Kumagava en Suto, daar de zeepen bij aanwezigheid van zelfs de geringste sporen alcohol in petroleumaether oplossen.

Ook als men in drie periode's van elk één uur de boven

beschreven bewerking uitvoert, is er volledige extractie, doch korter kan men het niet doen. Ik heb mij nu bij een aantal parallelbepalingen kunnen overtuigen van de gelijkwaardigheid van beide methodes. Als voorbeeld volgt hier:

Mej. G., d.d. 8.5.'26.

Plasma-extract 5/100.

I.	Extractie met chloroform	cholesterine	2.7‰
		vetzuur	3.9‰
II.	„ „	petroleumaether cholesterine	2.6‰
		vetzuur	4.2‰
III.	„ „ „	cholesterine	2.6‰
na gekookt chloroform		„	nihil

Bij mijn klinisch werk heb ik als regel steeds de methode met chloroform gebruikt.

Ik achtte het echter noodzakelijk, dat ook op deze wijze de juistheid van B l o o r's methode kon worden aangetoond.

§ 11. **De quantitatieve bepaling van cholesterine.**

Verschillende methoden hiervoor worden in de literatuur beschreven. Het onderscheid berust dan meestal op de wijze van extractie.

De eigenlijke bepaling wordt op twee principieel verschillende wijzen uitgevoerd: hetzij door weging, hetzij colorimetrisch.

Reeds vroeger was gevonden, dat vrij cholesterine de eigenschap bezit haemolytische giffen onwerkzaam te maken[1]). Later bleek, dat de stof deze eigenschap ook bezat

---

[1]) R a n s o m. Deutsche medizinische Wochenschrift, deel 27, 1901, blz. 1914.

tegenover haemolytische bacterieele giffen[1]) en dat de cholesterine-esters in dit opzicht onwerkzaam waren. Aan deze eigenschap pleegt een biologische beteekenis te worden toegekend.

Door W i n d a u s[3]) is in 1909 het gedrag van cholesterine tegenover een bepaalde haemolytische stof, het digitonine, een saponine uit de digitalis plant onderzocht.

Het bleek, dat er een verbinding tusschen deze stoffen ontstond bij samenbrengen, zoodat bij overmaat van digitonine alle vrije cholesterine quantitatief uit een alcoholische oplossing wordt neergeslagen.

De cholesterine-esters blijven in oplossing, daar deze zich niet met digitonine verbinden.

Naar dit principe is later een weegbepaling door dezen onderzoeker uitgewerkt.

De colorimetrische bepaling berust op het feit, dat cholesterine, zoowel in substantie als in oplossing, bij toevoeging van sterk zwavelzuur kenmerkende kleurreacties vertoont.

Voor de colorimetrische bepaling wordt nu steeds de reactie van L i e b e r m a n n—B u r c h a r d gebruikt. Aan een oplossing van cholesterine in chloroform wordt azijnzuuranhydride en zwavelzuur toegevoegd; er ontstaat dan een groene verkleuring, waarvan de intensiteit en de tint afhankelijk is van de temperatuur, het licht, de hoeveelheid toegevoegd zwavelzuur en den tijd. Zijn deze factoren gelijk, dan vindt men bij dezelfde hoeveelheid cholesterine steeds dezelf-

---

[1]) E. A b d e r h a l d e n en E. R. L e C o u n t. Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie, deel II 1905/06, blz. 199.

[3]) A. W i n d a u s. l. c.

de kleursterkte en tint; m.a.w. de kleur is reproduceerbaar, wat wel de voornaamste eisch is.

Deze kleurreactie is voor quantitatieve bepalingen het eerst door Fransche onderzoekers gebruikt.[1]).

Door W. Autenrieth en A. Funk[2]) is in 1913 een methodiek uitgewerkt, die sindsdien de meest gebruikelijke is gebleven.

In 't kort komt hun methode hierop neer:

2 cc bloed wordt met 20 cc KOH 25% 2 uren in het waterbad verwarmd, het mengsel daarna 5 × met chloroform uitgeschud; de chloroform verzameld en aangevuld tot 100 cc.

De reactie geschiedt met 5 cc van dit extract. 2 cc azijnzuur-anhydride en 0.1 cc H_2SO_4 conc. worden toegevoegd; het mengsel in water van ± 35° 15 minuten in het donker gezet. Daarna wordt in den colorimeter afgelezen. Men gebruikt den z.g. Autenrieth-colorimeter.

Men vergelijkt met een wig, die een groene oplossing bevat. Deze wig wordt geijkt door oplossingen van cholesterine in chloroform van bekend gehalte te behandelen als boven beschreven voor het chloroform-extract en de aflezingen in curve te brengen.

Beziet men nu de curve, die door de schrijvers wordt gepubliceerd, dan ziet men, dat de aflezingen vrijwel evenredig aan de concentratie zijn (tenmiste als men de schaal-getallen van 100 aftrekt).

Dit nu is de veronderstelling, waarvan men uitgaat in de Amerikaansche literatuur. Door Amerikaansche onderzoekers,

---

[1]) Grigaut. Comptes rendus des séances de la société de biologie, deel 68, 1910, blz. 791, deel 71, 1911, blz. 441.

[2]) W. Autenrieth en A. Funk. Münchener medizinische Wochenschrift. Jhrg. 60, 1913, No. 23, blz. 1243.

ook door Bloor, wordt steeds in den colorimeter van Dubosc vergeleken met een standaard cholesterine-oplossing, die op dezelfde wijze wordt behandeld als het extract. Men neemt den standaard van ongeveer dezelfde concentratie, als men in de te onderzoeken vloeistof verwacht en voert de berekening uit volgens de bovengenoemde veronderstelling. Deze werkwijze heb ik steeds gevolgd. Een bezwaar was, dat in den Autenrieth-colorimeter de standaard steeds sterker moet zijn. In den Dubosc-colorimeter, die met dompelaars en verstelbare buisjes werkt, is dit niet noodig.

In verschillende artikelen in The Journal of Biol. Chemistry heeft W. R. Bloor nu wijzigingen en vereenvoudigingen van deze methode voorgesteld, die weer aanleiding zijn geweest tot critiek.

Zeer merkwaardige vondsten zijn daarbij ter sprake gekomen.

Het was zijn bedoeling de bepaling uit te voeren in een bepaalde hoeveelheid bloedextract, volgens zijn methode bereid. In 1916[1]) publiceert hij een artikel, waarin de bepaling zeer eenvoudig wordt uitgevoerd. Het bleek, dat voor het bereiken van de kleurreactie verzeeping niet noodzakelijk was. Een bepaalde hoeveelheid van het alcohol-aether-extract wordt dus ingedampt en het residu in chloroform opgenomen: hierin wordt dan de kleurreactie op de gewone wijze uitgevoerd, en wel bij kamertemperatuur.

Deze wijziging is de aanleiding geweest tot twee interessante critische besprekingen.

---

1) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 24, 1916, blz. 227.

De eerste van J. H. Müller[1]) gaat in hoofdzaak over het volgende:

In de eerste plaats heeft hij kunnen aantoonen voor de gewone handelscholesterine van Merck, uit wolvet of galsteenen bereid, dat de quantitatieve bepalingen, zoowel met digitonine als colorimetrisch, gelijkwaardig zijn en dat ook na lang koken met sterke loog, cholesterine niet wordt veranderd.

Daarom is het des te vreemder, dat bij onderzoek van bloed steeds verschillen worden gevonden.

De digitonine-methode geeft lagere waarden dan de methode volgens Autenrieth en Funk en deze weer lagere waarden dan die volgens Bloor zonder verzeeping.

In het filtraat van het digitonine-neerslag kon hij een stof vinden, die nog de kleurreactie geeft. Het is dan een kwestie van opvatting of men aanneemt, dat dit dan geen cholesterine is; of veronderstelt, dat niet alle cholesterine met digitonine wordt neergeslagen; de eerste veronderstelling lijkt wel het meest aannemelijk.

Verder het verschil zonder en met verzeepen. Men moet dan toch wel aannemen, dat een stof, die de reactie van Liebermann geeft, door verzeepen wordt gedestrueerd. Maar dit kan dan toch geen cholesterine zijn.

Over dit laatste punt nu is een tweede studie verschenen van G. Luden[2]). Uit galsteenen kon zij inderdaad een stof isoleeren, die wel de kleurreactie gaf, doch geen cholesterine was.

---

[1]) J. H. Müller. The journal of biological chemistry, deel 25, 1916, blz. 549.

[2]) Georgina Luden. The journal of biological chemistry, deel 27, 1916, blz. 273.

Eenmaal zelfs gelukte het haar uit het bloed-extract van een patient met icterus een dergelijke stof te bereiden.

Door J. Lifschütz[1]) zijn veel onderzoekingen gepubliceerd over oxydatie-producten van cholesterine, doch als zoodanig schijnen de bovengenoemde stoffen niet te kunnen worden beschouwd.

In een antwoord[2]) op deze critieken geeft W. R. Bloor nu weer veel bijzonderheden. Hij houdt vol, dat met zijn colorimetrische methode inderdaad cholesterine wordt bepaald, dat echter cholesterine uit bloed iets anders is dan handelscholesterine.

Hij vond bijvoorbeeld hoe afkoeling de kleurontwikkeling in de standaardoplossing sterk vertraagd, in veel hooger mate, dan bij een oplossing van bloedcholesterine, vandaar zijn raad bij 22° C. te werken.

Het blijkt dus wel, dat het er om gaat wat men nog cholesterine wil noemen.

Ik vind het zeer interessant, dat men ook hier weer voor dergelijke vragen komt te staan, als zich voordoen bij het bestudeeren van de bloedvetzuren en de glucose in het bloed.

De uitkomsten met Bloor's methode uit 1922 zijn dus vergelijkbaar met die, welke volgens Autenrieth en Funk worden gevonden, of in 't algemeen met colorimetrische bepalingen na verzeeping. In 1922 raadt Bloor aan de aflezingen te verrichten, nadat de oplossingen 15 minuten bij 18°—22° in het licht hebben gestaan. De groene kleur krijgt dan een gele tint, doch verandert niet tijdens het aflezen. Zijn vroegere voorschrift, de reactie gedurende 30

---

[1]) J. Lifschütz. Biochemische Zeitschrift, deel 62, 1914, blz. 219.

[2]) W. R. Bloor. The journal of biological chemistry, deel 27, 1916, blz. 107, deel 29, 1917, blz. 437.

minuten in het donker te laten plaats hebben, voldeed mij echter beter. Zooals boven werd uiteengezet, had ik steeds een sterkeren standaard noodig. Ik gebruikte een 0.2‰ of 0.4‰ oplossing van cholesterine in chloroform.

Vroeger luidde het voorschrift bij 5 cc cholesterine-oplossing 2 cc azijnzuur-anhydride te gebruiken. In 1922 geeft Bloor 1 cc aan; naar hij mededeelt, is dit een zuinigheidsmaatregel.

§ 12. **Nog enkele opmerkingen.**

De korst, die na de extractie met chloroform overblijft, wordt eenige malen met alcohol uitgekookt. Men zou dus verwachten, dat er geen zeep in achterblijft; er zou dan geen troebeling mogen optreden, wanneer men de korst in zoutzuur oplost. Dit nu is niet altijd het geval; men moet dus wel aannemen, dat de kokende alcohol een gedeelte van de zeep niet bereikt.

De moeilijkheid is licht te vermijden, door de korst, na de eerste maal koken met alcohol, op te lossen in enkele druppels aqua dest. Voegt men daarna weer alcohol toe, dan slaan alkali en zouten neer, terwijl de zeep opgelost blijft. Er ontstaat dan ook nimmer een troebeling, wanneer men het residu in zoutzuur oplost.

Bij het indampen van de verzamelde alcoholfiltraten treedt meestal een troebeling op door Na OH dat neerslaat.

Zooals ik boven reeds heb gezegd, was het mijn plan terug te komen op de vraag, of een suspensie van bloedvetzuren inderdaad nephelometrisch vergelijkbaar is met de standaardsuspensie.

Bloor geeft den raad, aflezingen, die al te zeer verschillen van den standaard, niet in rekening te brengen, doch de

bepaling te herhalen met overeenkomstig grootere of kleinere hoeveelheden extract. Op deze wijze lukt het dikwijls suspensie's van bloedvetzuren te verkrijgen, die vrijwel hetzelfde nephelometrisch effekt vertoonen als de standaard.

Het feit nu, dat bij zulke suspensie's de aflezing gedurende 20 minuten praktisch gelijk bleef, was voor mij het sterkste argument om te aanvaarden, dat een suspensie van bloedvetzuren vrijwel op dezelfde wijze uitvlokt als onze standaard.

Het spreekt vanzelf, dat men een analoge curve krijgt als vroeger voor de vetzuren beschreven is, wanneer men deze suspensie's met een vasten standaard vergelijkt.

Een oplossing van verzeepte bloedvetzuren in 5 cc alcohol, die een gelijk nephelometrisch gedrag vertoont als de standaard, moet dus 2 mgr. vetzuur bevatten.

Vergelijkt men nu deze suspensie met een uit een half verdunde oplossing (1 mgr. vetzuur) verkregen, dan vindt men, evenals dat bij de standaardoplossing het geval was, de verhouding 20 — 30.8 weder terug.

Ook dit lijkt mij een zwaar wegend argument ten gunste van deze methode. Het ware misschien nog juister een bepaalde hoeveelheid bloedvetzuur te isoleeren, in alcohol op te lossen tot een 0.4‰ oplossing als onze standaard en met die oplossing het nephelometrisch gedrag te vergelijken. Dit is door B l o o r wel gedaan. Intusschen, al vond men op deze wijze een goede overeenkomst, dan was dit daarmee toch niet bewezen voor bloedvetzuur van andere herkomst, daar het mengsel van bloedvetzuren bij de verschillende individuen en bij het zelfde individu op verschillende tijden, een verschillende samenstelling kan hebben.

De voorafgaande beschouwingen zijn trouwens niet bedoeld als een volledige critiek op de methode; het zijn slechts

overwegingen, waartoe ik kwam, toen ik mij wilde overtuigen van de bruikbaarheid van deze bepalingswijze voor klinisch werk.

Zoo ware er nog veel te zeggen over de extractie-methode. Dat deze op de bovenbeschreven wijze voor de bloedcellen onvoldoende is, geeft Bloor zelf ook stilzwijgend toe, door bij zijn laatste methode slechts een extract van plasma te gebruiken. Doch dan is de extractie wel volkomen, zooals trouwens ook door anderen wordt toegegeven[1])[2]). Intusschen vindt men in een artikel van Thaysen[3]), dat slechts na destructie met loog uit serum alles zou zijn te extraheeren. Hij heeft echter op deze wijze gedroogd serum behandeld, iets wat allerminst vergelijkbaar is met onze werkwijze.

Er zijn verder nog enkele punten, waarvan een nader onderzoek zeker loonend zou zijn; b.v. het verschil in nephelometrisch gedrag tusschen gewone vetzuurmengsels en bloedvetzuren bij praecipitatie met Ca $(OH)_2$ en vele andere, zuiver theoretische vraagstukken, waarop ik niet nader wil ingaan.

Zooals zal blijken bij het verslag van mijn eigen bepalingen, gelukte het mij vaak zeer goed overeenstemmende dubbelbepalingen te verkrijgen. Zonder dat ik daarvoor echter de reden kon vinden, kwamen echter herhaaldelijk afwijkingen van 10 en 15% voor. Op 't eerste gezicht lijkt dit veel, doch beziet men de cijfers, die Shimidzu in zijn artikel over macro-methodiek publiceert, dan blijkt het, dat in dezen de methode van Bloor niet achter staat bij de weegmethode.

---

[1]) J. H. Müller. l.c.
[2]) J. Feigl. Biochemische Zeitschrift, deel 88, 1918, blz. 53.
[3]) Th. E. H. Thaysen l.c.

Men zou zich kunnen afvragen of er geen andere stoffen dan vetzuren tot de nevelvorming zouden kunnen bijdragen op deze wijze. Na de waarnemingen dienaangaande beschreven in het reeds meer genoemde artikel van K u m a g a v a en S u t o, moet men wel aannemen, dat stoffen als kreatine en melkzuur in het extract oplossen. Deze stoffen zouden zich echter nimmer onder deze omstandigheden als nevel voordoen; ik zou trouwens niet weten welke stoffen, die hier mogelijk zijn, dan wel.

Een veel zwaarder wegend bezwaar tegen de laatste methode van B l o o r is, dat zij feitelijk geen micromethode mag heeten. Zelfs als men inplaats van 5 cc plasma in 100 cc alcohol-aether mengsel uit te gieten, 2½ cc in 50 cc neemt, dan is nog altijd een venapunctie van 5 cc bloed noodig. Dit is daarom zoo jammer, omdat de bepaling zelf met de hoeveelheid cholesterine en vetzuur uit ½ cc plasma (10 cc van een verdunning 1 : 20) geschiedt.

Het is duidelijk, dat voor een micro-bepaling gezocht moet worden naar een extractie-methode voor het geheele bloed, maar, zooals boven reeds gezegd, B l o o r zelf geeft toe, dat zijn wijze van extractie voor de bloedcellen onvolledig is.

Het is natuurlijk een bezwaar, dat waarden, gevonden voor het bloed als zoodanig, een andere beteekenis hebben als bepalingen in het plasma alleen.

Toch kan men wel zeggen, dat variatie's, vermeerdering en vermindering, het duidelijkst in plasma-extracten worden gevonden. Vindt men dus bij micro-bepalingen duidelijke veranderingen, dan mag men wel aannemen, dat de toename of afname in het plasma nog veel meer geprononceerd zal zijn. Ik wil nu overgaan tot het beschrijven van de extractie-

methode voor een ½ cc bloed, uit een vingerprik verkregen, zooals ik die heb toegepast.

§ 13. **De micro-extractie.**

De extractie-methode, die ik heb gevolgd, is beschreven door A. von Szent Györgyi en T. Tominaga in 1924[1]). In hun publicatie bespreken zij eerst de bezwaren tegen de tot dusver bekende extractie-methoden. Zooals gezegd, de methode van Bloor is voor het geheele bloed onvoldoende. Volgens deze onderzoekers blijft er wel 10 à 20% van hetgeen te extraheeren is bij deze werkwijze in het residu achter. In zijn reeds genoemde publicatie beveelt Ivar Bang aan, met alcohol bij kamer-temperatuur gedurende 24 uur te extraheeren. Ook deze methode geeft onvolledige extractie.

Een extractie met kokenden alcohol gedurende twee uren zou natuurlijk geheel volledig zijn, doch het bezwaar hiertegen is, dat men een donkerbruin extract krijgt, doordat er zooveel haematine in den alcohol oplost; en het is dan practisch onmogelijk deze stof geheel uit het extract te verwijderen.

De oplossing, die de bovengenoemde schrijvers nu geven, is het gebruik van Bariumchloride. Wordt de alcohol-extractie, hoe lang dan ook, bij aanwezigheid van Bariumchloride uitgevoerd, dan lost er slechts zeer weinig haematine in den alcohol op en het weinige wat er nog in oplost, slaat bij toevoeging van aether geheel neer.

Zij veronderstellen, dat het haemoglobine op een of andere wijze door dit zout wordt veranderd. Ook reeds door

---

[1]) A. von Szent Györgyi en T. Tominaga. Biochemische Zeitschrift, deel 146, 1924, blz. 226.

F. A. Csonka[1]) is toevoeging van Ba Cl_2 tijdens de extractie toegepast voor de bepaling van cholesterine, eveneens met het doel de verontreinigende kleurstof te vermijden, daar deze natuurlijk bij de colorimetrische bepaling van cholesterine zeer storend is.

Een tweede bijzonderheid van hun extractie-methode is deze, dat het bloed in aceton wordt uitgegoten en op deze wijze watervrij wordt gemaakt.

Inderdaad geschiedt deze bewerking met aceton veel beter dan met absoluten alcohol. Zooals zij ook reeds zeggen: met alcohol wordt het bloed tot een kleverige taaie massa, terwijl bij behandeling met aceton een fijn verdeeld kruimelig poeder ontstaat, dat veel meer voor extractie geschikt is.

De oplossing van Bariumchloride, die zij voorschrijven, is de volgende:

Ba Cl_2	10 Gr.
Ysazijn	10 cc.
Aqua destillata tot	100 .

De aceton moet natuurlijk worden overgedestilleerd en aan de eischen van zuiverheid voldoen, die ik boven noemde.

Evenals in aether en chloroform komen ook in overgedestilleerde aceton op den duur veranderingen, zoodat het wenschelijk is deze stoffen telkens versch gedestilleerd te gebruiken.

De extractie geschiedt als volgt:

In een bekerglaasje met 10 cc aceton en 2 druppels Ba Cl_2 oplossing wordt onder omroeren ½ cc bloed toegevoegd.

---

[1]) F. A. Csonka. The journal of biological chemistry, deel 24, 1916, blz. 431.

Het geheel laat men ½ uur staan, het bloed bezinkt dan tot een dun laagje kruimels.

De aceton wordt nu voorzichtig afgegoten in een tweede bekerglaasje; op het residu wordt 10 cc van het alcohol-aether-mengsel gegoten en dit daarna op den stoom van het waterbad aan 't koken gebracht; hieraan worden dan ook 2 druppels van de $BaCl_2$ oplossing toegevoegd. Tijdens dit koken wordt het bekerglaasje met een horlogeglas toegedekt; nu en dan omroeren is, vooral in 't begin, noodig, daar het mengsel anders soms oververhit raakt en ploft.

Het bekerglaasje, dat de aceton bevat, wordt ook op het waterbad geplaatst, totdat alle vloeistof verdampt is. Het droge residu, dat in hoofdzaak uit $BaCl_2$ bestaat, wordt met 5 cc alcohol-aether-mengsel overgoten; dit wordt even opgekookt en aan het tweede bekerglaasje toegevoegd. Dit herhaalt men nog eenmaal. Men overtuigt zich gemakkelijk, dat er dan in het residu in het aceton-glaasje geen vet meer is: lost men alles op met wat loog en zuurt men daarna aan, dan treedt geen troebeling op.

In het tweede bekerglaasje wordt het mengsel gedurende ± ¾ uur zacht gekookt. Er is dan nog slechts weinig alcohol. Men mag wel aannemen, dat uit deze kleine hoeveelheid bloed dan alles is geextraheerd.

Daarna voegt men 10 cc aether toe en laat geruimen tijd, 15 minuten ongeveer, afkoelen. Filtreert men daarna, dan is het filtraat water-helder.

Het residu wordt met 5 cc aether nog tweemaal opgekookt en deze aether ook door het filter gegoten.

Dit filtraat wordt nu op dezelfde wijze verzeept en verder behandeld als boven beschreven voor het plasma-extract.

Men dient echter vooraf op het waterbad de aether te verdampen en wat alcohol toe te voegen, daar anders de verzeeping niet lang genoeg duurt.

Voor het afnemen van het bloed uit een prik in den vinger, heb ik Mac-Lean pipetten van ½ cc gebruikt. Men kan deze grootere pipetten echter niet vol laten loopen door ze iets schuin naar beneden te houden, zooals dat mogelijk is met pipetten van 0.2 cc, die men gewoonlijk voor bloedsuikerbepalingen gebruikt; men moet dus opzuigen. Bovendien kan men het pipet niet met aceton omspoelen door op en neer te zuigen, daar de kruimels bloed storen.

Het beste is zoo'n pipet langzaam leeg te laten vloeien en dan het laatste druppeltje uit te blazen. Er blijft dan inderdaad nagenoeg geen bloed aan den wand hangen, wanneer de pipetten goed gereinigd zijn geweest.

Verschillende vragen, die zich naar aanleiding hiervan voordoen, wil ik nog in 't kort bespreken.

Men zou zich kunnen voorstellen, dat het Bariumchloride een wijzigenden invloed zou hebben op het nephelometrisch gedrag van de vetzuren, doch zooals ik boven reeds opmerkte, indien men het praecipiteerend agens, in casu het zoutzuur, terstond toevoegt, dan is er geen verschil merkbaar.

Inderdaad moet er wel mee rekening worden gehouden, dat $Ba\,Cl_2$ in het filtraat komt. Het zout lost in geringe mate in alcohol op. Ik heb mij hiervan kunnen overtuigen door $Ba\,Cl_2$ oplossing bij alcohol te voegen, te filtreeren en den alcohol te verdampen. Lost men het residu op in water, dan komt er bij toevoeging van $H_2\,SO_4$ een troebeling.

Het was daarom ook noodzakelijk het partieel neutralisee-

ren, voor de extractie met chloroform, met H Cl te doen, daar Bariumsulfaat in het water uitgegoten, een troebeling op zich zelf zou geven, want ook Ba SO_4 is oplosbaar in alcohol, ik meen colloidaal.

Zooals ik boven reeds besprak, is deze kleine wijziging van voordeel.

Verder zou men kunnen verwachten, dat bij de verzeeping bij aanwezigheid van Ba Cl_2 Bariumzeepen ontstaan, die practisch in alcohol haast onoplosbaar zijn[1]) evenals in water.

Dit zou natuurlijk een belangrijke storing geven. In de eerste plaats zouden dan vetzuren bij het filtreeren achterblijven en verder zou er een onberekenbare stoornis bij de nephelometrische bepaling optreden.

Het blijkt echter dat dit, vreemd genoeg, niet het geval is en wel uit het volgende proefje:

Met sterk Na OH en eenige druppels Ba Cl_2 oplossing worden 5 cc van het standaardmengsel tot droog ingedampt. Het residu wordt daarna in 5 cc alcohol opgenomen en in den nephelometer vergeleken met 5 cc van het standaardmengsel; **men krijgt dan volkomen vergelijkbare troebelingen.**

Ook in de korst na het uitkoken met alcohol, zijn geen zeepen, wat blijkt op de gewone wijze: opnemen in water en aanzuren.

Daarbij komt, dat het nog zeer de vraag is of er bij de extractie van bloed Ba Cl_2 in het filtraat komt. Het meeste zal toch wel met de rest van het bloed op het filter achterblijven.

Intusschen kan men veilig aannemen, dat er geen barium-

---

1) C. A. Jacobson en A. Holmes. The journal of biological chemistry, deel 25, 1916, blz. 29.

zeepen gevormd worden of althans zoo weinig, dat hiermee practisch geen rekening hoeft te worden gehouden.

Als proef op de som heb ik plasma geextraheerd op beide manieren: op de wijze, zooals B l o o r aangeeft en met de zoo juist beschreven extractie-methode. Het was natuurlijk noodig plasma te gebruiken door defibrineeren verkregen, daar bij citraat-plasma een storing bij aanwezigheid van Ba . te verwachten ware. Inderdaad lukte het mij volkomen overeenstemmende uitkomsten te verkrijgen.

v. d. G. diabetes.
d.d. 16.3.'26.

Plasma-extract 2½ / 50.

cholesterine	2.4‰
vetzuur	5.2‰

Micro-extractie 1/2 cc plasma.

cholesterine	2.4‰
vetzuur	5. ‰

M. nephritis.
d.d. 20.3.'26.

Plasma-extract 2½ / 50.

cholesterine	1.5‰
vetzuur	2.9‰

Microextractie 1/2 cc plasma (dubbelbepaling).

A.	cholesterine	1.6‰
	vetzuur	2.8‰
B.	cholesterine	1.6‰
	vetzuur	2.8‰

Ik heb nu met deze methode een aantal bepalingen gedaan, doch een groot bezwaar is, dat de bewerking zeer lang duurt en steeds toezicht vereischt.

Een eenvoudiger methode, waarmee een betrouwbare extractie ware te verkrijgen, is mij echter niet bekend.

Een tweede bezwaar is nog, dat vaak aflezingen in den nephelometer worden gevonden, die ver van den standaard afliggen. Zoo'n uitkomst zou dan volgens B l o o r moeten worden gecorrigeerd, door de bepaling te herhalen met een andere hoeveelheid bloed. Dit is dan natuurlijk niet meer mogelijk.

Eenige woorden dien ik nu nog te wijden aan de andere genoemde micro-methoden.

§ 14. **De methode van Ivar Bang.**

In de Biochemische Zeitschrift deel 91 (1918) komen een aantal vlot geschreven artikelen voor van dezen onderzoeker, waarin hij een titreermethode beschrijft voor de quantitatieve bepaling van vet en daarmee verwante stoffen in kleine hoeveelheden bloed.

Zooals bekend is, wordt vet door een mengsel van K. bichromaat en zwavelzuur geoxydeerd; de hoeveelheid overgebleven chromaat kan men bepalen door de hoeveelheid Jodium te titreeren, die uit een jodiumzout in vrijheid wordt gesteld.

De bepaling berust nu op dit principe. Men moet dan natuurlijk veronderstellen, dat de oxydatie van het vet altijd tot een bepaald punt gaat. En juist op dit principieele punt is een ernstige kritiek uitgeoefend door J o h a n n a M a a s[1]).

---

[1]) J o h a n n a M a a s. Biochemische Zeitschrift, deel 144, 1924, blz. 379.

Door ander vaatwerk te gebruiken en door allerlei andere verder niet te beheerschen omstandigheden wordt de graad, tot waar de oxydatie voortschrijdt, zoozeer beinvloed, dat er van een quantitatief verband tusschen de hoeveelheid verbruikt chromaat en de hoeveelheid geoxydeerd vet niet kan worden gesproken.

Ivar Bang geeft verder aan, dat het mogelijk is de verschillende vetstoffen te scheiden door het gebruik van bepaalde extractie-middelen, fractioneeren door de extractie, noemt hij het.

Dit punt zou zeker nog onderzocht dienen te worden. Zooals ik reeds vroeger zeide, is het wel in tegenspraak met de waarnemingen van Kumagava en Suto in dit opzicht Over eigen ervaringen met deze methode beschik ik niet. Na het lezen van de bovengenoemde kritiek, wordt het haast ondenkbaar, dat met deze werkwijze betrouwbare resultaten te verkrijgen zouden zijn.

Er zijn reeds vele onderzoekingen met deze methode gepubliceerd. Ten onzent zijn studies over het bloedvet bij kinderen hiermede verricht door Dr. J. C. Schippers[1]) en Dr. A. C. de Kock[2]).

§ 15. De methode van Bing en Heckscher.

Door deze onderzoekers is in 1924[3]) een methode beschreven, die wederom een nephelometrische is.

---

[1]) Dr. J. C. Schiippers. Jahrbuch für Kinderheilkunde, 3te Folge, deel 43, 1920, blz. 151.

[2]) Dr. A. C. de Kock. Over alimentaire lipaemie bij kinderen. Dissertatie Leiden 1924.

[3]) H. J. Bing en H. Heckscher. Biochemische Zeitschrift, deel 149, 1924, blz. 79.

De extractie geschiedt op een wijze als Ivar Bang gebruikt: bloed in filtreerpapier opgezogen wordt gedroogd en daarna met aether overgoten, gedurende 24 uur bij 37° gezet, de aether verdampt, het residu in alcohol opgenomen.

De nevelvorming wordt dan bereikt door toevoeging van een oplossing van 1% $BaCl_2$.

Volgens hun zeggen bepalen zij op deze wijze in hoofdzaak de hoeveelheid neutraalvet.

Men mist in deze publicatie noode een discussie over de voor de hand liggende bezwaren tegen deze werkwijze. Dat deze er zijn, behoeft na al het voorafgaande nauwelijks gezegd. Men zou met recht van de schrijvers mogen verwachten een bespreking van de volgende punten:

1. welken invloed heeft het drogen.
2. welke stoffen worden door aether geextraheerd.
3. is een praecipitatie van bloedvet door $BaCl_2$ vergelijkbaar met een van gewoon vet.

Deze methode lijkt mij een stap terug. Zonder dat men bij benadering kan zeggen, wat zij aanduiden, worden waarden gevonden en cijfers gepubliceerd. Over controle door macromethoden wordt niet gesproken.

Wel is waar is de methode snel; en al is het natuurlijk waar, dat variaties bij een individu zich wel in de gevonden getallen zullen weerspiegelen, toch is het volgens mijn oordeel niet juist conclusies te willen baseeren op een zoo gebrekkig gefundeerde bepalingswijze.

§ 16. De methode van Mej. Dr. E. M. Kobus[1]).

Tijdens de bewerking van dit proefschrift werd door Dr.

---

[1]) Dr. E. M. Kobus. Het bloedvet bij kinderen gemeten in monomoleculaire laag. Dissertatie Leiden 1926.

E. M. Kobus een methode beschreven om „vetstoffen" in zeer geringe hoeveelheid quantitatief te bepalen, die op een geheel ander principe berust.

Voor nadere bijzonderheden over deze interessante en veelbelovende werkwijze raadplege men haar desbetreffende dissertatie.

Naar verluidt, zal later een meer gedetailleerde publicatie omtrent den theoretischen grondslag volgen.

§ 17. **De methode.**

In 't kort wil ik nu nog recapituleeren de methode, zooals zij door mij werd uitgevoerd:

Plasma-extractie,

in kolf van 100 cc ± 75 cc alcohol-aether-mengsel brengen.

Onder omschudden druppelsgewijze 5 cc plasma toevoegen.

Kolf in het kokende waterbad verwarmen tot het mengsel juist kookt.

Afkoelen onder de kraan. Aanvullen tot 100 cc. Filtreeren.

Gewoonlijk wordt 10 cc van het filtraat gebruikt voor e e n bepaling. (dus ½ cc plasma).

Bekerglas met platten bodem gebruiken.

Micro-extractie,

in bekerglaasje van 100 cc

10 cc aceton.

2 druppels toevoegen van de volgende oplossing:

Ba Cl_2	10
IJsazijn	10
Aqua destillata ad	100.

onder omroeren ½ cc bloed toevoegen. ½ uur laten staan. Daarna:

Aceton afgieten in bekerglaasje II. Residu in bekerglas 1 overgieten met 10 cc alcohol-aether-mengsel. 2 druppels Ba Cl_2 oplossing toevoegen.

Onder omroeren op den stoom van het waterbad koken. Bekerglas toedekken met een horlogeglas. Aceton uit bekerglas II verdampen tot droog. Residu tweemaal koken met 5 cc alcohol-aether.

Deze alcohol-aether bij de rest in bekerglas 1 voegen. ¾ à 1 uur laten koken. 10 cc aether toevoegen. Daarna 10 minuten laten afkoelen - filtreeren.

Residu tweemaal met 5 cc aether even opkoken. Aether door het zelfde filter gieten.

Op het waterbad aether uit het filtraat verdrijven.

Wat alcohol toevoegen.

De bewerking is verder voor beide extracten dezelfde.

Verzeeping.

0.1 cc sterke Na OH toevoegen. Op den stoom van het waterbad indampen tot alle alcohol-reuk is verdwenen.

Steeds met horlogeglas toegedekt houden.

Het overblijvende met 0.1 cc sterk H Cl. gedeeltelijk neutraliseeren. Eventueel een paar druppels water.

Indrogen.

Korst koud laten worden.

Scheiding van cholesterine.

10 cc $CH Cl_3$ bij kamer-temperatuur op de korst gedurende 10 minuten;

daarna 2 × 5 cc gedurende 5 minuten.

chloroform door filter gieten,
chloroform indampen tot 5 cc,
(tot ± 3 cc en dan aanvullen).

Oplossing van de zeepen.

De korst wordt daarna met 10 cc alcohol gekookt gedurende ± 10 minuten. Beker bedekken met horlogeglas.

Alcohol nog heet door het filter gieten.
Korst oplossen met 2 druppels aqua dest.
5 cc alcohol toevoegen - koken - filtreeren:
Dit nog eenmaal.
Filtraat tot 5 cc indampen.

Bepaling van cholesterine.

10 cc standaard-oplossing (0.4‰ gewoonlijk) in een klein kolfje.
2 cc azijnzuur-anhydride bij standaard.
1 cc „ bij chloroform-extract.
0.2 cc sterk H_2SO_4 bij standaard.
0.1 cc „ „ bij chloroform-extract.
Omschudden.
20 à 30 minuten in het donker bij 20 à 22°.
Aflezen.

Stel de aflezing geeft $\frac{X}{100} \times$ standaard, dan is de concentratie in de 5 cc chloroform extract $\frac{X}{100} \times 0.4‰$.

Is deze 5 cc chloroform-extract afkomstig van ½ cc bloed of plasma, dan is de concentratie daarin dus 10 maal zoo sterk. i. e. $\frac{X}{100} \times 4‰$.

Bepaling van de vetzuren,

in twee kolven 100 cc aqua destillata;

aan kolf I 5 cc standaard-oplossing onder omschudden toevoegen;

aan kolf II door trechter met uitgetrokken steel de 5 cc zeep-oplossing toevoegen.

Maatglaasje eenmaal met het water uit de kolf vullen, door trechter weer leeggieten.

Terstond aan kolf II 10 cc ¼ sterk H Cl toevoegen en dadelijk daarna aan kolf I.

Na 6 à 8 minuten in den nephelometer aflezen.

Zoekt men nu in de curve, blz. 78, de concentratie van het standaardmengsel, die bij een bepaalde aflezing hoort, dan vindt men de concentratie aan vetzuren in tienden °/₀₀ in de 5 cc zeep-oplossing. Was deze 5 cc afkomstig van ½ cc plasma of bloed, dan is de concentratie hierin 10 × zoo groot. De getallen langs de abscis van de curve geven dan dus de concentratie terstond in °/₀₀.

De reagentia.

Alcohol wordt overgedestilleerd. Voorbij de plaats van condensatie mag geen caoutchouc zijn.

Aether wordt overgedestilleerd.

Chloroform eenige malen uitschudden met water, om alcohol te verwijderen.

Watervrij Na_2SO_4 toevoegen.

Destilleeren.

Aceton wordt overgedestilleerd.

Aether chloroform en **aceton** kunnen niet lang bewaard blijven. Steeds koel en in het donker houden.
Om de reagentie op hun zuiverheid te onderzoeken, verdampt men ze, neemt het eventueele residu in wat zuivere alcohol op en zuurt aan. Er mag geen troebeling ontstaan.

Filtreerpapier. 3 × ½ uur koken met 1% alcoholische Na OH. Zuivere alcohol met wat goede sterke loog mag, na het papier gepasseerd te zijn, bij aanzuren geen troebeling geven.

Na OH verkregen door in een vochtige ruimte water te laten condenseeren tegen Na OH en natrio in klontjes van M e r c k.
Evenals B l o o r hebben wij hiertoe een exsiccator gebruikt.

HOOFDSTUK III.

EIGEN WAARNEMINGEN.

Voor ik er nu toe overga eenige eigen waarnemingen mede te deelen, wil ik eerst de dieet-regeling bespreken, zooals die voor lijders aan suikerziekte in de afdeeling inwendige ziekten Slijkeinde 2 van het Haagsche gemeenteziekenhuis wordt getroffen.

Hierbij worden de beginselen toegepast, die door L. H. Newburgh en P. L. Marsh zijn gepropageerd.

Het schema dan, waarvan in vele gevallen naar omstandigheden wordt afgeweken, is het volgende:

Eerst wordt gedurende twee dagen bij een gemengd dieet en bedrust de lijder geobserveerd, klinisch onderzocht; het gehalte van de urine aan glucose, aceton-lichamen en ammoniak wordt bepaald. Het bloedsuikergehalte nuchter wordt onderzocht, zoodat men een oppervlakkigen indruk heeft over den aard en de intensiteit van de stofwisselingsstoornis. Daarna gebruikt de patient gedurende eenige dagen een dieet, dat bestaat uit 300 Gr. afgekookte groente, 100 Gr. boter en 30 Gr. gekookt vleesch. Dit dieet bevat dan slechts zeer weinig koolhydraat, ongeveer 95 Gr. vet en 25 Gr. eiwit en heeft een voedingswaarde van omtrent 1000 caloriën. Juist dit groote quantum vet tegenover het kleine rantsoen eiwit, is door de bovengenoemde onderzoekers aangeraden; zeer

terecht, te oordeelen naar de ervaringen met deze dieetregeling verkregen.

Vrijwel altijd wordt bij deze behandeling de urine suikervrij. Gewoonlijk neemt het ammoniakgehalte van de urine toe; ook de reacties op aceton en diaceetzuur worden sterker. Meestal is deze toename van de acidosis van voorbijgaanden aard.

Blijft echter de glucosurie bestaan, of neemt de acidosis verontrustend toe, dan is insuline noodig.

Het dieet wordt na eenige dagen uitgebreid tot een voedingswaarde van 1500 caloriën en wel voornamelijk door verhooging van het vetrantsoen.

Het dieet bevat dan 20 Gram koolhydraat, 40 Gr. eiwit, 140 Gr. vet.

De tolerantie van den lijder wordt nu bepaald door, uitgaande van dit dieet, van dag tot dag de hoeveelheid koolhydraat te vermeerderen tot glucosurie optreedt.

Telkens wordt het bloedsuikergehalte bepaald.

Immers, het is algemeen bekend hoe, vooral bij oudere diabetici, hyperglycaemie zonder glucosurie kan worden gevonden. En in deze gevallen is het wellicht juister bij de regeling van het dieet het bloedsuikergehalte als leiddraad te nemen.

Daarna wordt de lijder gesteld op een koolhydraatrantsoen, ongeveer de helft van zijn tolerantie; bij jonge personen nog lager in verband met den voortschrijdenden aard van het lijden op dezen leeftijd.

Eiwit wordt dan in den vorm van vleesch, visch, enz. toegevoegd, tot men verwachten kan, dat er stikstofevenwicht bestaat. Minstens $^2/_3$ Gram per K.G. lichaamsgewicht moet het eiwitrantsoen bedragen.

De bloedsuikerbepalingen, waarvan in het volgende gerept wordt, geschiedden volgens de methode van Mc. L e a n.

De sterkte van de gebruikte insuline was 20 klinische eenheden per cc.

De urine werd verzameld van 's ochtends 7 uur tot den volgenden ochtend op denzelfden tijd. Waarden, die aangegeven staan voor 's avonds, werden gevonden in bloed, afgenomen om ongeveer 7 uur n.m., nadat het geheele dieet was genuttigd, de laatste maaltijd om 6 uur.

Het gehalte aan koolhydraat, eiwit en vet van het voedsel werd berekend naar de bekende tabellen van Dr. C o h e n T e r v a e r t.

In de eerste plaats dan heb ik bij bovengenoemde dieetregeling op verschillende dagen de waarden voor cholesterine en vetzuur in het geheele bloed, met de boven beschreven micromethode nagegaan.

Patient G. T., oud 13 jaar, is een lange, magere jongen. Hij is al sinds enkele maanden dorstig. Sinds 6 weken merkte men op, dat hij frequent waterde.

Hij wordt 18 Maart 1926 opgenomen. Weegt 39.5 K.G. Bij gewoon dieet zonder suiker bevat de urine 7.5% glucose, geen aceton.

Den 30sten Maart(dus na geruimen tijd dieet) wordt de volgende glucoseproef gevonden.

9 uur.	50 Gr. glucose 9½	10	10½	11
Bloedsuiker 1‰	1.3‰	1.9‰	2.3‰	2.3‰
Urine: Glucose-	Gluc. -		35 cc Gl 1%	

19 Maart. 3 uur n.m. gemengd dieet — Bloedsuiker 3‰ (Mc. Lean)
Cholesterine 1.9‰
Vetzuur 2.6‰

22 Maart. nuchter

dieet: 10 KH 25 E 95 V Bloedsuiker 0.9‰
Cholesterine 2.1‰
Vetzuur 2.4‰
Urine reductie — aceton + diaceetzuur: spoor.
NH_3 0.59 Gr.

Na 23 Maart vermindert de hoeveelheid NH_3 in de urine en verdwijnt geleidelijk de aceton-reactie.

27 Maart. nuchter.

dieet KH 25 E 40 V 140 Bloedsuiker 0.6‰
Cholesterine 2 ‰
Vetzuur 2.6‰
Urine reductie — aceton + diaceetzuur —
NH_3 0.47 Gr.

11 April nuchter bloedsuiker 0.8‰
dieet KH 75. E 40. V 140 cholesterine 2.2‰
vetzuur 2.4‰
Urine reductie — aceton —.

16 April nuchter bloedsuiker 1.1‰
dieet KH 95. E 40. V 140 cholesterine 2.6‰
vetzuur 2.4‰
Urine reductie — aceton —.

Den 30sten April was het koolhydraatrantsoen opgevoerd tot 160 Gr. Toen trad reductie op. Er werd dus een definitief dieet opgesteld voor patient met betrekkelijk laag koolhydraatgehalte.

11 Mei nuchter	bloedsuiker	0.7‰
dieet KH 80. E 70. V 160	cholesterine	2.2‰
	vetzuur	2.3‰

Urine reductie — aceton —.

Overziet men nu deze serie bepalingen, bij dezen lijder aan ongecompliceerden diabetes, met, vooralsnog, lichte stofwisselingsstoornis, dan is zeker het vrijwel constant zijn van het gehalte van het bloed aan vetzuren, zeer frappant.

De hier gevonden waarden zijn geheel in overeenstemming met wat men, ook met andere methoden, als normaal heeft gevonden.

Men moet dus aannemen, dat in dezen het lichaam gedurende den nacht in staat was, de verhooging van het bloedvet, dat door de voeding van dit vetrijke dieet ontstaan was, te niet te doen.

Dat deze toename van het bloedvet optreedt, de z.g. alimentaire lipaemie, daarvan heb ik mij blijkens het onderstaande lijstje kunnen overtuigen.

11 April werd aan dezen lijder een proefontbijt toegediend zonder koolhydraat, doch met 50 Gr. boter, 50 Gr. room en verder afgekookte groente.

Er werden parallelbepalingen gedaan zoowel van het plasma (na defibrineeren) als van het geheele bloed

nuchter	bloedsuiker	0.7‰
geheele bloed	cholesterine	2.2‰
		2.2‰
	vetzuur	2.1‰
		2.5‰

plasma	cholesterine	2.4°/oo
(na centrifugeeren		2.3°/oo
55% van het geheele	vetzuur	2.7°/oo
volumen bloed)		2.9°/oo
is volkomen helder.		
na 4 uur	bloedsuiker	0.6°/oo
geheele bloed	cholesterine	2.4°/oo
		2.4°/oo
	vetzuur	2.8°/oo
		3.2°/oo
plasma	cholesterine	2.5°/oo
(55% van het geheele		2.4°/oo
volumen bloed)	vetzuur	4.2°/oo
is licht opalescent.		4. °/oo

Er is dus een onmiskenbare toename vooral in het plasma. Het moet echter worden toegegeven, dat de dubbelbepalingen soms vrij sterk uiteenloopen.

Nu kan men, zooals B l o o r steeds doet, de waarden voor de erythrocyten berekenen. Gebruikt men hiertoe de gemiddelde uitkomsten, dan vindt men:

nuchter	cholesterine	2. °/oo
	vetzuur	1.7°/oo
na 4 uur	cholesterine	2.3°/oo
	vetzuur	1.6°/oo

Door echter niet de gemiddelde uitkomsten, doch de meest uiteenloopende te nemen, berekent men:

nuchter	vetzuur	1.1°/oo
na 4 uur	vetzuur	2.2°/oo

Ik ben dus van oordeel, dat een dergelijke proef niets zegt omtrent een toename al of niet in de erythrocyten. Volgens mijn oordeel kan men daarin alleen beslissen door een extract van uitgewasschen erythrocyten te onderzoeken, iets wat met behulp van Bariumchloride wel mogelijk is.

Intusschen is ook dit uitwasschen niet geheel te verdedigen, daar volgens Brinkman en Van Dam (Biochemische Zeitschrift 103) door deze behandeling veranderingen in het lipoidgehalte van de cellen worden teweeggebracht.

De questie is wel interessant. Zooals ik reeds vroeger opmerkte, heeft Bloor uit zijn proeven op honden, met zijn oude methode en door berekening, gevonden, dat er een alimentaire toename vooral in de erythrocyten optrad; en hij beschouwt dit als de eerste phase van de vet-assimilatie, dit opnemen van de vetzuren uit het plasma in de erythrocyten.

Zou dit nu bij normale menschen ook het geval zijn? En bij lijders aan suikerziekte soms in mindere mate of soms langzamer?

Zooals ik reeds zeide: hierin zou alleen door extractie van de erythrocyten afzonderlijk kunnen worden beslist.

Patiente v. V. is een oude, tamelijk dikke vrouw van 78 jaren. Zij is niet geheele compos mentis. 4 jaren geleden had zij een apoplexia cerebri met halfzijdige parese links.

Er was een waarneming uit 1925, waarbij haar urine nog suikervrij was gevonden.

Zij werd 19 Februari 1926 opgenomen. De urine bevatte toen een spoor albumen, 5% glucose en geen aceton.

De bloedsdruk bedroeg systolisch 180 mM Hg., diastolisch 120 mM.

Zooals dit meer wordt gevonden bij dergelijke personen,

bestond hier een verhoogde drempelwaarde voor de uitscheiding van glucose.

19 Maart 1926, dus na geruimen tijd dieet, werd de volgende glucoseproef gevonden:

9 uur	50 gr. glucose 9½	10	10½	11
Bloedsuiker 1.8‰	1.9‰	2.7‰	2.5‰	2.5‰
Urine: reductie-		red. -	50 cc red 1.8%	

Bij haar nu werden wederom de veranderingen in het plasma en in het geheele bloed nagegaan na het gebruik van een proefontbijt, dat 50 gr. brood, 50 gr. boter en 50 gr. room bevatte. In de urine werd in dien tijd nimmer glucose of aceton gevonden.

25 Maart 1926

nuchter	bloedsuiker	1.6 ‰
	ureum serum	0.64‰
geheele bloed:	cholesterine	1.8 ‰
	vetzuur	1.6 ‰
plasma	cholesterine	2.5 ‰
(volkomen helder)		2.6 ‰
	vetzuur	2.5 ‰
		2.4 ‰
na 3½ uur	bloedsuiker	1.6 ‰
geheele bloed:	cholesterine	1.8 ‰
	vetzuur	1.9 ‰
plasma	cholesterine	2.3 ‰
(iets troebel)		2.2 ‰
	vetzuur	2.9 ‰
		3.1 ‰

Ook hier is dus weer een alimentaire toename van het bloedvet onmiskenbaar.

Het blijkt bovendien, dat de lichte troebeling van het plasma hoogstens op 0.5‰ vetzuur berust.

Zou men dus naar den graad van troebeling van het plasma de toename van het bloedvet beoordeelen, dan zou men ongetwijfeld een onjuist beeld van de quantitatieve verhoudingen krijgen.

18 Juni 1926.

nuchter	bloedsuiker	2. ‰
plasma	cholesterine	1.8‰
		1.9‰
	vetzuur	2. ‰
		1.8‰
's avonds	bloedsuiker	2.2‰
(na een dieet van:	cholesterine	1.6‰
90 K H . 80 E. 160 V.)		1.7‰
plasma	vetzuur	2.4‰
		2.3‰

Vergelijkt men deze waarde nu met de waarde ongeveer drie maanden tevoren gevonden, dan blijkt er slechts een onbeteekenend verschil te bestaan.

Ook deze laatste bepalingen doen weer duidelijk de alimentaire toename uitkomen.

Een voorbeeld van den invloed van insuline is het volgende geval:

Patiente G. is een tamelijk gezette, kleine vrouw van 44 jaar. Reeds sinds 5 jaren weet zij, dat zij aan suikerziekte

lijdt. Zij was van 4 Maart 1926 tot 9 April 1926 opgenomen geweest. In dien tijd had zij lichte maagklachten; haar tolerantie bleek toen ongeveer 120 Gr. K.H. Een en ander werd moeilijk gemaakt, doordat patiente snoepte. Hoe het ook zij, haar diabetes was van lichten aard. Bij ongeveer de genoemde hoeveelheid koolhydraat bevatte de urine noch glucose, noch aceton.

Van 9 April 1926 tot 5 Mei 1926 was zij thuis. Zij zou toen een dieet gebruikt hebben, dat naar schatting 100 Gr. koolhydraat, 60 Gr. eiwit en 170 Gr. vet bevatte.

Den 5en Mei 1926 werd zij weer opgenomen. Zij koortste toen tot 39°2. Dit bleek het gevolg van een dubbelzijdige salpingitis.

Aanvankelijk nu werd haar een gemengd dieet gegeven, dat 70 K H 70 E 160 V bevatte.

Den 7den Mei produceerde zij gedurende 24 uur 900 cc urine.

Deze bevatte 2.4% glucose, vertoonde sterke reacties op aceton en diaceetzuur, terwijl 1.9 Gr. aan zuur gebonden NH_3 in de geheele hoeveelheid werd bepaald.

Den 8sten Mei 1926 werd het dieet, in verband met genoemde complicatie, zoo gewijzigd, dat melk, pap en eieren werden gebruikt en verder zooveel insuline werd gegeven tot de urine niet meer reduceerde.

Juist vóór deze wijziging werd de volgende bepaling gedaan:

8 Mei 1926.

nuchter	Cholesterine	2.7‰
plasma		2.6‰
	Vetzuur	3.9‰
		4.2‰

Het daarna gevolgde dieet bevatte ongeveer

125 K. H. 85 E. 85 V.

Aanvankelijk werd 's ochtends en 's avonds 20 eenheden insuline ingespoten. Na 10 Mei 's ochtends 15, 's avonds 10 eenheden.

Van 12 Mei af was de urine steeds suikervrij en vrij van aceton. De temperatuur was eveneens gedaald en in alle opzichten was de gunstige invloed van de verbeterde stofwisseling op de compliceerende aandoening duidelijk.

19 Mei 1926.	bloedsuiker	0.9°/oo
nuchter	cholesterine	2.1°/oo
plasma		2.1°/oo
	vetzuur	2.2°/oo
		2.5°/oo
's avonds	bloedsuiker	1.5°/oo
plasma	cholesterine	2.2°/oo
	vetzuur	2.6°/oo
		2.8°/oo

Bij gelijkblijvend dieet werden later nog de volgende waarden gevonden:

10 Juni 1926.		
's avonds	bloedsuiker	2.2°/oo
plasma		2.3°/oo
	vetzuur	3.4°/oo
		3.6°/oo
11 Juni 1926.		
nuchter	bloedsuiker	1.1°/oo
plasma	cholesterine	2.4°/oo
	vetzuur	2.3°/oo
		2.5°/oo

Sinds de insuline-behandeling is er dus een duidelijke daling opgetreden van het vetzuurgehalte van het plasma. Ook de waarde voor cholesterine is wat lager.

Ik ben mij echter volkomen bewust, dat deze daling niet uitsluitend aan de insuline als zoodanig kan worden toegeschreven. Immers het rantsoen vet in het dieet werd sterk verminderd. De algemeene toestand verbeterde en de infectie werd overwonnen, alle tezamen argumenten, die bij de beoordeeling van de beteekenis van deze observatie dienen te worden overwogen.

Ook in het volgende geval is de invloed van insuline wel merkbaar.

Patiente H. is een tamelijk gezette vrouw van middelbaren leeftijd, zonder verdere klinische afwijkingen.

Bij gemengde kost bevatte de urine 7.3% glucose, aceton, doch geen diaceetzuur.

Haar dieetregeling werd geheel in loopende behandeling uitgevoerd. 10 Mei 1926 werd aangevangen. Na 3 dagen een dieet van 20 K H 40 E 140 V te hebben gebruikt, was de urine suikervrij.

De volgende bepalingen werden bij haar gedaan:

21 Mei 1926. nuchter bloedsuiker 2 °/₀₀
cholesterine ging verloren
vetzuur 2.2°/₀₀
(geheel bloed-micro-methode).

Dieet 37 K H 43 E 140 V .

Urine reductie — aceton + diaceetzuur + NH_3 0.8 Gr.

25 Mei 1926. nuchter

	bloedsuiker	1.63°/oo
geheele bloed	cholesterine	1.5 °/oo
	vetzuur	2.2 °/oo

Dieet 35 K H 45 E 140 V.

Op 28 Mei werd voor 't eerst 0.5 cc Insuline toegediend. Het koolhydraatrantsoen werd tevens verhoogd. Ook werd meer vleesch toegestaan.

28 Mei 1926. nuchter

	bloedsuiker	1.1°/oo
geheele bloed	cholesterine	1.9°/oo
	vetzuur	1.7°/oo

Dieet 66 K H 65 E 145 V + 10 eenh. Insuline.
Urine reductie — aceton sp. diaceetzuur — NH_3 0.65 Gr.

31 Mei werd de insuline dosis nogmaals verhoogd tot 1 cc per dag.

4 Juni 1926. nuchter

	bloedsuiker	1.37°/oo
geheele bloed	cholesterine	2 °/oo
	vetzuur	1.4 °/oo

Dieet 66 K H 65 E 145 V. + 20 eenh. Insuline.
Urine reductie — aceton spoor diaceetzuur —.

In dit geval is dus een daling in het bloedvetzuurgehalte merkbaar bij gelijkblijvend vetrantsoen.

De volgende observatie heeft veel meer het karakter van een experiment.

Patient v. d. G. oud 36 jaren.
Sinds Juni 1924 weet patient, dat hij suikerziekte heeft.
Voor 't eerst werd patient 18 Augustus 1924 opgenomen.

Hij vertrok echter na eenigen tijd weer, voordat een dieetregeling voor hem was getroffen.

Zijn tolerantie was toen hooger dan 30 Gr. K H.

21 December werd hij opgenomen in beginnend coma. Hij vertoonde de bekende zuchtende ademhaling, was eenigszins in de war.

De urine bevatte 3.8% glucose, aceton, diaceetzuur, albumen en veel korte, gekorrelde cylinders, de bekende comacylinders naar K ü l z genoemd. Het bloedsuikergehalte was 3.6‰; gedurende de eerste dagen bevatte de urine resp. 3.5 - 5.2 en 4.2 Gr. NH_3.

Met behulp van insuline waren deze verschijnselen spoedig verdwenen.

Na eenige weken werd patient ontslagen met een dieet, waarbij hij voortdurend insuline gebruikte.

Hij woog toen 58.5 K.G.

Deze behandeling had een buitengewoon goed resultaat. De man kon zijn werk weer goed verrichten, nam in gewicht toe, voelde zich gezond.

Geleidelijk werd de hoeveelheid insuline verminderd, het rantsoen koolhydraat uitgebreid. Eind Februari 1926, dus na ruim één jaar woog patient 66.2 K.G. Zijn dieet bestond uit

200 K H 115 E 175 V.

terwijl hij zich 's ochtends en 's avonds 5 eenheden insuline inspoot.

Het scheen toen aangewezen een poging te doen een dieet voor patient te vinden, waarbij hij zonder inspuitingen kon blijven.

23 Februari 1926 werd hij daartoe opgenomen; in het verloop van dezen tijd werden nu de volgende waarnemingen gedaan:

23 Februari 's avonds

plasma	cholesterine	1.5‰
	vetzuur	2.3‰

24 Februari 's ochtends nuchter.

plasma	cholesterine	1.3‰
		1.4‰
	vetzuur	2.-‰
		1.7‰

Het dieet op 23 Februari was:

200 K H 115 E 175 V + 2 × 5 eenh. insuline.

De urine vertoonde een spoor reductie en geen aceton.

Den 25 Februari werd het dieet gewijzigd, bestond toen uit

20 KH 40 E 140 V zonder insuline.

Gedurende de eerste dagen bleef nu de urine suikervrij, terwijl slechts geringe acidosis ontstond. Daar patient gewend was aan zijn ruim dieet en spoedig wilde worden ontslagen, werd het dieet geleidelijk uitgebreid.

3 Maart 1926 's avonds

plasma	cholesterine	1.5‰
	vetzuur	4.1‰
		3.8‰

4 Maart 1926, 's ochtends nuchter

plasma	cholesterine	1.5‰
	vetzuur	2.8‰

Het dieet op 3 Maart was:

40 KH 60 E 150 V. zonder insuline

Urine- reductie neg. aceton + een spoor diaceetzuur. 0.816 Gr. NH_3 in de daghoeveelheid.

De vetzuurwaarde 's avonds is dus wat hooger dan bij de vorige bepaling; ook de gevonden waarde 's ochtends is wat hooger dan op 24 Februari. Verder is het duidelijk, dat het verschil tusschen 's ochtends en 's avonds procentsgewijze veel grooter is dan tevoren.

Terwijl toch het rantsoen vet eerder lager is dan tijdens de insuline-behandeling.

Dit verschil is nog duidelijker bij de volgende bepalingen.

Intusschen was patient ontslagen en in loopende behandeling gebleven.

15 Maart 1926, 's avonds.

	bloedsuiker	2.-‰
plasma	cholesterine	2.7‰
(opalescent)	vetzuur	7.8‰

16 Maart 1926. 's ochtends nuchter

	bloedsuiker	2.4‰
plasma	cholesterine	2.4‰
(helder)		2.4‰
	vetzuur	5.1‰
		5.-‰

Het dieet op 15 Maart was:

K H 60 E 60 V 150 geen insuline.

Urine reductie + (16 Gr. per dag-hoeveelheid) aceton +. Op 16 Maart was ook de diaceetzuurreactie + terwijl de hoeveelheid van dien dag 1.02 Gr. NH_3 bevatte.

Zooals gezegd, bovengenoemde uitkomsten zijn zeer sprekend. Ook het cholesterine-gehalte van het plasma was nu gestegen, zooals ook in de literatuur wordt genoemd.

Men moet dus aannemen, dat het tijdsverloop gedurende den nacht, waarin geen voedsel werd gebruikt voor den patient niet voldoende was om het vetzuurgehalte van het plasma weer tot het vroegere peil terug te brengen.

Eenige dagen hierna, kwam de man 's ochtends vragen om weer een aanvang te maken met de inspuitingen. Hij had pijn overal, voelde zich slap. De urine, die hij toen in nuchteren toestand loosde, bevatte 2.5% glucose, aceton en diaceetzuur. Het bloedsuikergehalte was 3‰, zoodat op **22 Maart 1926** weer met injecties werd begonnen als vroeger.

Weldra voelde hij zich weer geheel de oude.

Hierna werden nu de volgende bepalingen bij hem nog verricht.

28 Maart 1926. nuchter.

plasma	bloedsuiker	1.1‰
	cholesterine	2.1‰
		2.1‰
	vetzuur	3.-‰
		3.1‰

Het dieet op 27 Maart was:

120 K H 70 E 155 V en 2 × 6 eenh. insuline.

Urine reductie - aceton -.

Eenige maanden later werden de volgende waarden gevonden:

5 Juli 1926. 's avonds

plasma	bloedsuiker	0.7‰
	cholesterine	1.1‰
	vetzuur	1.9‰

6 Juli 1926. 's ochtends nuchter.

	bloedsuiker:	verloren
plasma	cholesterine	1.4‰
	vetzuur	1.9‰

Het dieet op 5 Juli 1926 was:

185 K H 95 E 160 V + 2 × 8 eenheden Insuline.

Urine reductie - aceton -.

Op enkele bijzonderheden in de bovenstaande serie bepalingen wil ik nog even wijzen.

Pas na 20 dagen werd een waarde gevonden, die op een beginnende lipaemie zou kunnen wijzen; het plasma, nuchter, was toen nog helder. Zou het bij dezen lijder tot lipaemie zijn gekomen, dan zou dit toch zeer geleidelijk pas zijn ontstaan. De waarden voor cholesterine vertoonen een analoge verandering als die voor bloedvet.

Vergelijkt men de waarden 's avonds met die van 's ochtends, dan zou men met goede gronden kunnen aannemen, dat het ontstaan van hooge nuchterwaarden en a fortiori van lipaemie moet worden toegeschreven aan een sterkere stijging na gebruik van vet en onvoldoende verwijdering van de vetzuur-componenten, die zich in het plasma hebben opgehoopt.

Dat blijkbaar bij lieden, die onder den invloed van insuline staan, deze eliminatie veel vlotter gaat, zoo zelfs, dat van een alimentaire stijging niet veel te bespeuren valt.

In het volgende geval werd 's avonds zelfs een lagere waarde dan 's ochtends gevonden.

Patient S. is 35 jaar oud. In Maart 1925 was hij opgenomen voor een dieetregeling. Den 17den Maart werd een aanvang gemaakt met insuline-inspuitingen. Sinsdien bleef hij als loo-

pend patient onder controle, volgde, zooals trouwens de meeste diabetici in deze omstandigheden, zeer goed zijn dieet en kon weer volkomen als kostwinner voor zijn gezin fungeeren. Klinische afwijkingen zijn er bij hem verder niet.

12 Juli 1926. nuchter.

	bloedsuiker	1.7‰
plasma	cholesterine	2.9‰
	vetzuur	2.9‰
		2.7‰

's avonds

	bloedsuiker	0.5‰
plasma	cholesterine	2.-‰
	vetzuur	2.2‰
		2.5‰

Dieet op 12 Juli:

100 K H 70 E 150 V. en 28 eenheden Insuline, waarvan 14 eenheden 's ochtends en 14 's avonds.

Urine reductie negatief, aceton negatief.

Misschien was de dosis insuline in dit geval wat te hoog, waarop ook het lage bloedsuiker 's avonds zou kunnen wijzen.

Deze merkwaardige vondst, 's avonds lager gehalte aan vetzuur dan 's ochtends, staat te veel op zich zelf, dan dat ik mij in theoretische beschouwingen hierover zou willen begeven.

Patiente M. is reeds in September 1923 voor diabetes opgenomen geweest.

Zij is 58 jaar oud. Is in November 1923 voor catarrhact geopereerd.

Sinds Mei 1924 werd zij met insuline-inspuitingen behandeld. Steeds voelde zij zich hierbij wel. Een matige dosis was voldoende. In September 1926 woog zij 64.7 K.G.

26 September 1926. nuchter 's ochtends.

	bloedsuiker	2.75°/oo
plasma	cholesterine	3.6 °/oo
		3.4 °/oo
	vetzuur	2.95°/oo
		2.9 °/oo

Het dieet op 26 September was:

70 K H 80 E 85 V. en 's ochtends 26 eenheden insuline in eens.

De urine bevatte meestal geen suiker. De urine van 25 September 0.7%, geen aceton, geen diaceetzuur.

Blijkbaar bestond er tevens een verhoogde drempelwaarde.

Patient v. d. R. is een van de ernstigste lijders aan suikerziekte, die ik destijds kon observeeren. Hij is 34 jaar oud, vertoont geen klinische afwijkingen verder en voelt zich, bij geregeld gebruik van insuline krachtig en gezond.

Reeds in December 1923 werd hij voor een dreigend coma met insuline behandeld. Een tweede maal in Februari 1924 en sindsdien heeft hij zich steeds inspuitingen gegeven.

In Juni 1926 woog hij 65 K.G.

3 Juni 1926. nuchter 's ochtends.

	bloedsuiker	3.8°/oo
plasma	cholesterine	2.3°/oo
	vetzuur	2.9°/oo
		2.9°/oo

Het dieet op 3 Juni was:

105 K H 90 E 155 V, en in 't geheel 45 eenheden insuline: 's ochtends 25 eenheden en 's middags en 's avonds telkens 10.

De urine bevatte toen 4.5% glucose aceton, doch geen diaceetzuur en 1.5 Gr. NH_3.

Bij deze hooge doseering verliep dus de stofwisseling nog allerminst bevredigend. Als de man 's ochtends niet spoedig zijn spuitje kreeg was hij radeloos, voelde zich ellendig en meende, dat hij terstond zou sterven. Bij zoo'n gelegenheid werden zeer hooge bloedsuikerwaarden gevonden, 4.2‰ enz. Hij is overigens een zeer evenwichtig persoon.

Om deze redenen werd de insuline-doseering verhoogd van 4 Juni af.

14 Juni 1926. 's avonds

	bloedsuiker	1.5‰
plasma:	cholesterine	1.3‰
		1.4‰
	vetzuur	2.5‰
		2.6‰

15 Juni 1926. 's ochtends nuchter

	bloedsuiker	0.9‰
plasma	cholesterine	1.7‰
		1.8‰
	vetzuur	1.8‰
		2.-‰

Dieet op 14 Juni:

105 K H 90 E 155 V en 113 eenheden insuline, waarvan 's ochtends 45, 's middags 28 en 's avonds 40 eenheden.

De urine bevatte 18 Gr. glucose, aceton, geen diaceetzuur, 1.3 Gr. ammoniak per dag.

De bloedsuikerwaarde op 15 Juni nuchter is dus lager dan op 3 Juni; evenzoo de waarden voor vetzuur en cholesterine.

Of dit laatste nu op rekening van de vermeerderde hoeveelheid insuline kan worden geschreven, laat ik in het midden.

In ieder geval blijkt uit de laatste bepalingen wel weer duidelijk het geringe verschil tusschen de vetzuurwaarden 's avonds en 's ochtends bij gebruik van insuline.

Het volgende geval is er een voorbeeld van, hoe zelfs een vrij sterke acidosis kan samengaan met vrijwel normaal vetzuurgehalte van het plasma, althans wanneer insuline wordt ingespoten.

Patient V. is reeds sinds September 1924 geregeld behandeld met insuline. Hij is een 47-jarige lijder aan ernstigen diabetes. Reeds eenige malen werd hij voor een catarrhact geopereerd. Zijn algemeene toestand is vrij bevredigend; hij weegt 64 K.G.; is slechts door zijn gezichtsstoornis invalide.

17 Februari 1926 's ochtends nuchter

	bloedsuiker	1.8‰
plasma	cholesterine	1.8‰
		2.-‰
	vetzuur	2.9‰
		3.-‰

Het vetrijke dieet hem elders gegeven, bevatte:

72 K H 53 E 150 V en 30 eenheden insuline, waarvan 20 eenheden 's ochtends, 10 eenheden 's middags.

Urine: een spoor reductie aceton en diaceetzuur + 2.8 Gr. NH_3 per dag; dus een vrij sterke acidosis.

Bij het volgende geval van coma diabeticum bleek, zooals ook in de literatuur steeds wordt betoogd, dat deze stoornis allerminst behoeft samen te gaan met een verhoogd gehalte van het bloed aan vetzuren.

Patiente S. geb. H. is een 60-jarige lijderes aan suikerziekte, waarvoor zij, hoewel het haar bekend was, geen dieet hield.

Zij werd 25 Juli 1926 opgenomen in comateuzen toestand, vertoonde het bekende ademhalingstype volgens Kussmaul, had een slappe kleine pols en verlaagde lichaamstemperatuur. Zij zou pas sinds enkele dagen wat suf zijn.

De volgende waarden nu werden bij haar gevonden:

bloedsuiker	5.2/^{0}/$_{00}$
cholesterine	2.3^{0}/$_{00}$
	2.3^{0}/$_{00}$
vetzuur	4.1^{0}/$_{00}$
	4.2^{0}/$_{00}$

De urine bevatte 3.4% glucose en had sterk positieve aceton en diaceetzuurreacties.

Denzelfden nacht nog overleed patiente, niettegenstaande ijverige insuline-behandeling.

Zooals Magnus-Levy in het handboek van Kraus en Brugsch ook reeds opmerkt, kan men zich voorstellen, dat lipaemie meestal zeer geleidelijk ontstaat, terwijl een fatale acidosis, misschien door complicaties, die het klinisch onderzoek ontgaan, vrij snel kan optreden.

In dit verband zou ik willen noemen een patiente, die ik destijds kon observeeren. Zij was reeds geruimen tijd goed in evenwicht met geringe hoeveelheden insuline, toen gedurende enkele weken de toestand zoo verergerde, dat zij

meer dan de dubbele dosis noodig had. In dien tijd was nu de volgende merkwaardigheid: trachtte men met de eerste injectie 's ochtends te wachten tot 12 uur, dan begon patiente zich tegen 11 uur kort-ademig te voelen en vertoonde de dyspnoe typisch voor acidosis. Een half uur na een insulineinjectie was dit alles dan weer verdwenen.

Na enkele weken keerde de toestand van vóór deze periode terug, waarbij kleine hoeveelheden insuline voldoende waren.

Zelfs bij herhaald klinisch onderzoek was in dien tijd nimmer een complicatie te vinden, waardoor deze verergering kon zijn veroorzaakt.

De kans, dat men de wijziging in de waarden voor bloedvetzuren bij het langzamerhand ontstaan van een ongecompliceerd coma zal kunnen observeeren, is nu wel zeer gering geworden.

Immers niemand zal nalaten den natuurlijken loop der verschijnselen door insuline-inspuitingen te storen.

SLOTSOM.

Uit het voorgaande meen ik de volgende conclusies te mogen trekken:

Insuline verlaagt het vetzuurgehalte van het bloedplasma.

Dit geschiedt, doordat vetzuurcomponenten, die zich in het plasma hebben opgehoopt, sneller worden verwijderd, zoodat ook de stijging na gebruik van vet geringer blijft.

Mijn waarnemingen geven geen antwoord op de vraag naar de wijze, waarop insuline deze werking ontvouwt.

Voorloopig schijnen mij vooral de volgende punten in dit opzicht nader onderzoek waard:

1. de veranderingen in plasma en uitgewasschen erythrocyten afzonderlijk na gebruik van vet met- en zonder insuline;
2. de invloed van insuline op de lipolytische eigenschappen van het bloed, onderzocht met de methode van P. Rona en L. Michaelis, eventueel in het arterieele bloed in aansluiting aan de waarnemingen van H. Roger en L. Binet.

INHOUD.

Inleiding.

HOOFDSTUK I. **De literatuur.**

§ 1. chemische gegevens 3
§ 2. physisch-chemische gegevens 11
§ 3. de quantitatieve verhoudingen 15
§ 4. physiologische gegevens 18
§ 5. klinische waarnemingen in het algemeen . 26
§ 6. waarnemingen bij diabetes mellitus . . . 30

HOOFDSTUK II. **De methodiek.**

§ 1. de oudere methode's 42
§ 2. de nieuwere micromethode's 46
§ 3. de geschiedenis van den nephelometer . 46
§ 4. de nephelometer . . . . . .
§ 5. Tyndall-licht 54
§ 6. de methode van Bloor uit 1914 59
§ 7. critiek op de methode 62
§ 8. Bloor's methode van 1922 67
§ 9. de vetzuursuspensie's 70

§ 10. de scheiding van cholesterine en zeepen 84
§ 11. de quantitatieve bepaling van cholesterine 89
§ 12. nog enkele opmerkingen 95
§ 13. de micro-extractie 99
§ 14. de methode van Ivar Bang 105
§ 15. de methode van Bing en Heckscher . . . 106
§ 16. de methode van Mej. Dr E. M. Kobus . 107
§ 17. de methode 108

HOOFDSTUK III. Eigen waarnemingen.
Slotsom.

STELLINGEN.

I.

Tijdens de behandeling van hartlijders met sulfas chinidini dient het electrocardiogram herhaaldelijk te worden opgenomen.

II.

Miliair-tuberculose van de longen is geneeselijk.

III.

Bij de behandeling van lijders aan suikerziekte met synthaline wordt ook de vetstofwisseling gunstig beinvloed.

IV.

Bij post-operatieve z.g. adhaesie-bezwaren, verdienen paravertebrale novocaïne injectie's eventueel de doorsnijding van rami communicantes overweging.

V.

De behandeling van accidenteele wonden met tinctura jodii is geen voorbehoedmiddel tegen Tetanus.

VI.

Het overdragen zijn van de vrucht stelt geen aanwijzing tot het kunstmatig opwekken van de baring.

VII.

De behandeling van dementia praecox met metaalzouten verdient proefneming op grooten schaal.

VIII.

Het voorkomen van typhusbacillen in de urine van bacillendraagsters berust dikwijls op besmetting door de uitwendige genitalia.

IX.

Het ontstaan van meervoudige maagkanker op den bodem van polyposis ventriculi moet als zeldzaam worden beschouwd.