



# **Carotine, vitamine A en vitamine C in koemelk**

<https://hdl.handle.net/1874/321635>



A<sup>n</sup> 192

1935.

**CAROTINE, VITAMINE A  
EN VITAMINE C IN KOEMELK**

**J. C. H. VAN WIJNGAARDEN**

U.  
2





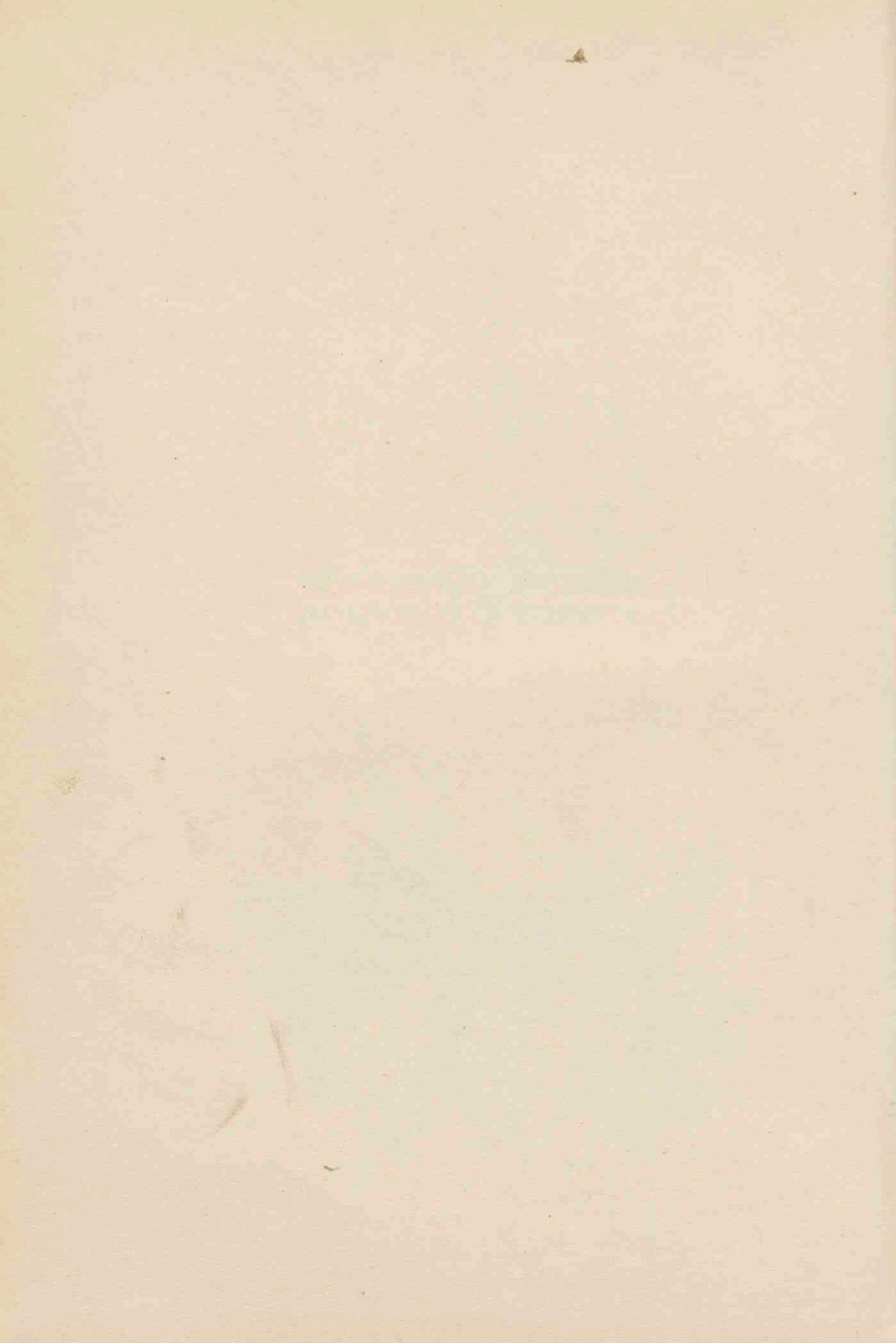






CAROTINE, VITAMINE A EN  
VITAMINE C IN KOEMELK





## STELLINGEN.

### I.

Tegen de methode van *Rosenthal* voor de bepaling van vitamine A zijn ernstige bezwaren in te brengen.

*Bioch. Z.* 271, 414 (1934).

*Klin. Wochenschr.* 14, 829 (1935).

### II.

De bepaling van flavinen volgens *Koschara* is te verkiezen boven die volgens *Warburg*.

*Z. physiol. Chem.* 232, 101 (1935).

*Bioch. Z.* 266, 377 (1933).

### III.

Het is tot nu toe niet mogelijk vitamine C chemisch te bepalen in suikerhoudend materiaal, dat droog verhit is geweest.

### IV.

De methode van *Bernal* en *Crowfoot* voor de bepaling van de dichtheid van kristallen verdient aanbeveling, wanneer men slechts over kleine hoeveelheden beschikt.

*Nature* 134, 809 (1934).



# STILLBORN

I

... ..  
... ..  
... ..  
... ..

II

... ..  
... ..  
... ..  
... ..

III

... ..  
... ..  
... ..  
... ..

IV

... ..  
... ..  
... ..  
... ..

V

... ..  
... ..  
... ..  
... ..

## V.

Het schema, dat H a u r o w i t z geeft van de verschijnselen, die optreden bij denaturering van eiwitten, is onjuist.  
Koll. Zeitsch. 71, 198 (1935).

## VI.

Het bestaan van chlorophyl C is niet bewezen.

F. P. Z s c h e i l e, Bot. Gaz. 95, 529 (1934).

A. W i n t e r s t e i n en K. S c h ö n, Z. physiol. Chem. 230, 145 (1934).

## VII.

Tussen filtreerbaar virus en bacteriën bestaat slechts een gradueel en geen principiëel verschil.

J. E. B a r n a r d, Brit. J. Exp. Path. 16, 129 (1935).



1871

1872

1873

1874

1875

1876

1877

# CAROTINE, VITAMINE A EN VITAMINE C IN KOEMELK

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD  
VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN  
DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG  
VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. H. BOLKESTEIN,  
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN  
EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN  
SENAAT DER UNIVERSITEIT IN HET OPENBAAR TE  
VERDEDIGEN OP MAANDAG 8 JULI 1935, DES VOR-  
MIDDAGS TE 10 UUR

DOOR

JOHANNA, CORNELIA, HUIBERDINA  
VAN WIJNGAARDEN

GEBOREN TE RHENEN



N.V. DRUKKERIJ P. DEN BOER — UTRECHT

# CAROTINE, VITAMINE B<sub>12</sub> VITAMINE C IN KORMILK

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat im Jahre 1954 die  
Vitaminwerte von Milch und Milchprodukten festgelegt. Diese  
Werte sind in der folgenden Tabelle angegeben. Die Werte sind  
in mg pro 100 g Milch angegeben. Die Werte sind in der  
Tabelle angegeben. Die Werte sind in der Tabelle angegeben.  
Die Werte sind in der Tabelle angegeben. Die Werte sind in der  
Tabelle angegeben. Die Werte sind in der Tabelle angegeben.

KARL L. BROWN, M.D.  
734 N. GARDEN

PHOTOGRAPH BY

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA



AAN MIJN OUDERS

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY

*Een goede traditie schenkt mij de gelegenheid op deze plaats allen, die hebben medegewerkt aan mijn wetenschappelijke vorming en aan het tot stand komen van deze dissertatie mijn dank te betuigen.*

*Hooggeleerde Cohen, voor Uw onderricht in de fysische chemie, waarbij Gij zoveel nadruk legt op de noodzakelijkheid van nauwkeurig werken, ben ik U zeer erkentelijk.*

*Hooggeleerde Kruyt, U ben ik zeer verplicht voor Uw belangrijke colleges over Phasenleer en Kolloidchemie, die een diepe indruk op mij hebben gemaakt.*

*Aan U, Hooggeleerde Kögl, ben ik veel dank verschuldigd voor het onderricht in de organische chemie.*

*Hooggeleerde Schoorl, U dank ik, dat ik onder Uw leiding heb mogen kennismaken van de analytische methodes voor het onderzoek van voedingsmiddelen.*

*Hooggeleerde de Graaff, voor het vele, dat ik op Uw colleges en practica heb mogen leren, betuig ik U mijn erkentelijkheid.*

*Hooggeleerde Wolff, Hooggeachte Promotor, voor de hulp mij bij de keuze en bewerking van het onderwerp van mijn dissertatie verleend, ben ik U grote dank verschuldigd; in het bijzonder waardeer ik de welwillendheid, waarmee Gij mij, ondanks Uw dikwijls zo druk bezette tijd, steeds met raad en daad terzijde hebt willen staan.*

*Zeergeleerde Emmerie, Uw grote kennis en ervaring op het gebied van het vitaminenonderzoek zijn voor mij van grote betekenis geweest. Wil hiervoor mijn oprechte dank aanvaarden.*

*Zeergeleerde van Eekelen, ook U ben ik zeer erkente-*



lijk voor Uw hulp tijdens het bewerken van dit proefschrift.

Zeergeleerde Brouwer, voor de vriendelijke medewerking bij het verkrijgen van de melkmonsters ben ik U veel dank verschuldigd.

Tevens wil ik hier mijn dank betuigen aan de directie van de U. M. I. te Utrecht voor de bereidwilligheid, mij steeds van melkmonsters te willen voorzien.

Tenslotte bedank ik allen, die aan het Hygiënisch laboratorium verbonden zijn, voor de hulp en bereidwilligheid tijdens het bewerken van dit proefschrift.

## INHOUD.

	Blz.
Inleiding . . . . .	1
HOOFDSTUK I.	
OVERZICHT VAN HET VITAMINE A EN HET CAROTINE.	
A. Historie . . . . .	3
B. Het verband tussen vitamine A en het carotine . . . . .	4
C. De chemie van carotine en vitamine A . . . . .	6
D. Verschijnselen, die optreden door vitamine A- gebrek bij mens en dier . . . . .	7
HOOFDSTUK II.	
DE BEPALING VAN HET VITAMINE A- EN CAROTINE-GEHALTE.	
A. Bepaling van het vitamine A-gehalte . . . . .	8
1. De dierproef . . . . .	8
2. De chemisch-colorimetrische methode . . . . .	10
3. De fysisch-chemische methode . . . . .	11
4. De vitamine A-eenheden . . . . .	12
B. De bepaling van het carotinegehalte . . . . .	13
C. De Lovibond Tintometer . . . . .	14
HOOFDSTUK III.	
BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER HET VITAMINE A- EN CAROTINE- GEHALTE VAN KOEMELK.	
A. Dierproeven . . . . .	17
B. Chemisch-colorimetrische methodes . . . . .	20
C. Spectroscopische bepalingen . . . . .	24

## HOOFDSTUK IV.

BEPALING VAN HET VITAMINE A- EN  
HET CAROTINE-GEHALTE VAN KOEMELK.

A. Bepaling van het vitamine A-gehalte . . . . .	29
B. Bepaling van het carotine-gehalte . . . . .	31
C. De scheiding van lycopine en carotine . . . . .	33
D. Kort overzicht van de gehele methode voor de bepaling van het carotine- en vitamine A-gehalte van melk . . . . .	39
E. De berekening van de hoeveelheid carotine uit de Lovibondwaarden . . . . .	40
F. De berekening van de hoeveelheid vitamine A uit de Lovibondwaarden . . . . .	41
G. Toevoeging van een bekende hoeveelheid caro- tine en vitamine A . . . . .	42

## HOOFDSTUK V.

RESULTATEN VAN HET VITAMINE A- EN  
CAROTINE-ONDERZOEK VAN KOEMELK.

A. Monsterneming . . . . .	44
B. Het carotine- en vitamine A-gehalte van rauwe marktmelk . . . . .	45
C. Het vitamine A- en carotine-gehalte van gepas- teuriseerde melk . . . . .	47
D. Invloed van het diët van de koe op het caro- tine- en vitamine A-gehalte van de melk . . .	49
1. De bepaling van het carotine-gehalte van de voedingsmiddelen . . . . .	50
2. Het vitamine A- en carotine-gehalte van de melk tijdens de verschillende diëten . . .	51

## HOOFDSTUK VI.

HET CAROTINE- EN VITAMINE A-  
GEHALTE VAN BOTER.

	Blz.
A. Bepaling van het carotine- en vitamine A-gehalte van boter . . . . .	57
HOOFDSTUK VII.	
DIERPROEVEN . . . . .	59
HOOFDSTUK VIII.	
OVERZICHT VAN HET VITAMINE C.	
A. Verschijnselen, die optreden bij vitamine C-gebrek . . . . .	64
B. Historie . . . . .	64
C. Constitutie van het Ascorbinezuur . . . . .	67
HOOFDSTUK IX.	
BEPALING VAN HET VITAMINE C-GEHALTE.	
A. De dierproef . . . . .	69
B. Chemische bepalingsmethodes . . . . .	70
C. Reductie met H <sub>2</sub> S . . . . .	71
D. De kwikacetaatbehandeling . . . . .	72
HOOFDSTUK X.	
BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER HET VITAMINE C-GEHALTE VAN KOEMELK.	
A. De dierproef . . . . .	74
B. De chemische bepalingsmethode . . . . .	75
HOOFDSTUK XI.	
HET BEPALEN VAN HET VITAMINE C-GEHALTE VAN KOEMELK.	
A. Uitvoering van de bepaling . . . . .	78
B. Berekening van het vitamine C-gehalte uit de titratiewaarden . . . . .	79
C. De bereiding en het stellen van de oplossing van 2-6-dichloorphenolindophenol . . . . .	80
D. Toevoeging van een bekende hoeveelheid vitamine C . . . . .	81



	Blz.
E. De kwikacetaatmethode . . . . .	81
HOOFDSTUK XII.	
RESULTATEN VAN HET VITAMINE C- ONDERZOEK VAN KOEMELK.	
A. Het vitamine C-gehalte van rauwe melk . . .	83
B. Het vitamine C-gehalte van gepasteuriseerde melk . . . . .	84
C. Invloed van het diët van de koe op het vita- mine C-gehalte van de melk . . . . .	84
HOOFDSTUK XIII.	
BESPREKING VAN DE RESULTATEN . . .	89
Samenvatting . . . . .	92

## INLEIDING.

Vitaminen zijn organische voedingsbestanddelen, wier aanwezigheid in het organisme het optreden van „deficiëntieziekten” voorkomt. Ze zijn naast eiwitten, vetten, koolhydraten en zouten noodzakelijk voor het organisme en verschillen van de eerste drie, doordat zij in dergelijk kleine hoeveelheden werkzaam zijn, dat hun gebruik voor verbranding of vorming van de cel uitgesloten is.

Wij dienen er dus voor te zorgen, dat ons voedsel genoeg vitamines bevat. Hiervoor is het nodig, dat wij het vitaminegehalte van onze voedingsmiddelen kennen. Aanvankelijk was dit alleen mogelijk door middel van de dierproef. Bij deze methode kunnen echter zeer grote fouten gemaakt worden en de resultaten hiervan zijn reeds bevredigend, wanneer afwijkingen van 50 % gevonden worden.

Het is dan ook geen wonder, dat men ijverig gezocht heeft naar een chemische methode om quantitatief vitamines te kunnen bepalen. Hierin is men reeds geslaagd voor vitamine A, vitamine C en in de allerlaatste tijd ook voor vitamine B<sub>2</sub>. Behalve de grotere nauwkeurigheid heeft de chemische methode ook nog het voordeel, dat men in een zeer veel kortere tijd een bepaling kan doen en bovendien, dat men van de te onderzoeken stof veel geringere hoeveelheden nodig heeft.

Daar koemelk het hoofdvoedsel, vaak zelfs het enige voedsel van kunstmatig gevoede zuigelingen is, is het dus

van groot belang de oorzaken na te gaan, waardoor het vitaminen-gehalte van de melk beïnvloed wordt. Daar het bekend is, dat de samenstelling van de melk wisselt met de samenstelling van het voedsel van de dieren, ligt het voor de hand de invloed hiervan op het vitaminen-gehalte van de melk te onderzoeken.

Bij mijn onderzoek heb ik mij beperkt tot die vitaminen, die, toen ik in 1933 begon, chemisch te bepalen waren, nl. vitamine A en vitamine C.

## HOOFDSTUK I.

### OVERZICHT VAN HET VITAMINE A EN HET CAROTINE.

#### A. Historie.

De eerste aanwijzingen voor het bestaan van vitamine A zijn te danken aan de proeven van Mc. Collum en Davis <sup>1)</sup> en Osborne en Mendel. <sup>2)</sup>

Zij gaven ratten een kunstmatig samengesteld voedsel, bestaande uit koolhydraten, vetten, eiwitstoffen en zouten. De dieren kregen dus volgens de toenmalige opvatting alles wat zij nodig hadden voor normale groei. Het bleek den schrijvers echter al spoedig, dat dit niet het geval was; de dieren groeiden slecht, gingen in gewicht achteruit en stierven tenslotte. Goede groei volgde echter na toevoeging van een kleine hoeveelheid melk of boter aan het dieet, terwijl eveneens het aetherextract van eigeel bij deze ratten groeibevorderend werkte.

Reeds vóór deze proeven was bekend, dat er oogstoornissen optraden bij kinderen, die voedsel van eenzijdige samenstelling kregen. Zo deed Mori <sup>3)</sup> in 1904 reeds de belangrijke ontdekking, dat deze oogziekte kon worden voorkomen door het gebruik van levertraan. Ook Bloch <sup>4)</sup> nam waar, dat deze ziekte, xerophthalmie, een gevolg was van een eenzijdig dieet en dat boter en levertraan genezend werkten. Er moest dus in levertraan en boter een stof voorkomen, die noodzakelijk is voor de voeding van het kind.



Veel overeenkomst met genoemde oogstoornissen bij kinderen vertoonden de afwijkingen bij de ratten, die bovenvermeld kunstmatig samengesteld voedsel kregen, zodat het voor de hand lag aan te nemen, dat beide verschijnselen een gevolg waren van een tekort aan een bepaalde nog onbekende stof. Deze stof, die in vet oplosbaar bleek te zijn, werd vitamine A genoemd.

Het al of niet optreden van genoemde oogziekte bij de ratten is daarna gebruikt om een voedingsmiddel op vitamine A te onderzoeken.

Pas in 1926 is het Carr en Price gelukt om vitamine A door middel van een chemische reactie te bepalen.

#### B. Het verband tussen vitamine A en het carotine.

Drummond <sup>6)</sup> is de eerste geweest, die het plantepigment carotine in het vitaminen-onderzoek heeft betrokken. Hij vond, dat een onzuiver carotine-paerparaat een geringe physiologische werking vertoonde, een gezuiverd praerparaat had volgens hem niet de minste werking.

Steenbock <sup>7)</sup> was een tegenovergestelde mening toegedaan. Hij wees erop, dat er in voedingsstoffen een evenredigheid bestaat tussen het gehalte aan gele pigmenten en vitamine A en sprak als zijn mening uit, dat het in vet oplosbare groeibevorderende vitamine een geel plantepigment of een nauw verwante stof was. Verder vond hij, dat meermalen omgekristalliseerd carotine vitamine A-werking bezat.

Daarentegen konden Stephenson, <sup>8)</sup> Drummond, Channon en Coward, <sup>9)</sup> Palmer en Kennedy <sup>10)</sup> deze waarnemingen niet bevestigen. De oorzaak van de negatieve resultaten, zowel van deze onderzoekingen als van latere proeven van Dulière, Morton en Drummond <sup>11)</sup> ligt hierin, dat de onderzoekers bij de dierproeven als oplosmiddel voor carotine aethyloleaat gebruikten, waarin

het carotine onbestendig is, hetgeen door Hume en Mc. Lean <sup>12)</sup> evenals door Drummond, Ahmad en Morton <sup>13)</sup> bewezen is.

Nieuwe inzichten omtrent het verband tussen carotine en vitamine A brachten Euler en Hellström. <sup>14)</sup> Met inachtneming van de nodige voorzorgen vonden zij bij hun dierproeven, dat gezuiverd carotine in dagdoses van 5—10 $\gamma$  groeibevorderend werkte. Zij wezen er verder op, dat carotine evenals vitamine A een blauwe kleur geeft met  $\text{SbCl}_3$ , doch bij spectroscopisch onderzoek bleken deze beide kleuren verschillende absorptiebanden te bezitten. Hierdoor kwamen zij ertoe aan te nemen, dat vitamine A een met carotine verwante stof is. De vitamine A-werking van carotine werd hierna door verschillende onderzoekers bevestigd. <sup>15)</sup> <sup>16)</sup> <sup>17)</sup> <sup>18)</sup> <sup>19)</sup> <sup>20)</sup>

Hoewel dus de physiologische werking van carotine vaststond, was dit nog geen bewijs, dat carotine en vitamine A identiek zijn.

Zeer zorgvuldige onderzoeken van Moore <sup>21)</sup> hebben aangetoond, dat het carotine in het dierlijk organisme in het eigenlijke vitamine wordt omgezet. Hij gaf zuiver carotine aan ratten, die op een vitamine A-vrij diët waren gezet en waarvan het leverextract geen blauwe kleur meer gaf met  $\text{SbCl}_3$ . Hij kreeg dan uit de lever van deze dieren een extract, dat een absorptieband bij 328  $m\mu$  vertoonde en bovendien een duidelijke blauwe kleur met  $\text{SbCl}_3$  gaf, welke eigenschappen karakteristiek zijn voor vitamine A. Deze proeven zijn van verschillende kanten bevestigd (Karrer c.s., <sup>22)</sup> Capper c.s., <sup>23)</sup> Wolff c.s. <sup>24)</sup>).

Carotine is dus als provitamine A te beschouwen.

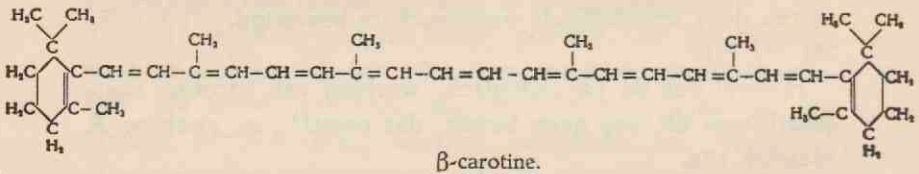
Wanneer we dus van een voedingsmiddel de vitamine A-werking willen bepalen, dan moet zowel het carotine- als het vitamine A-gehalte bepaald worden.

Toen de formules van carotine en vitamine A bekend waren is de samenhang tussen carotine en vitamine A ook structuurchemisch duidelijk geworden.

### C. De chemie van carotine en vitamine A.

Er zijn 3 isomere carotinen gevonden,  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -carotine met de formule  $C_{40}H_{56}$ . Deze isomeren kan men scheiden met behulp van de z.g.n. chromatografische methode volgens *Tswett*,<sup>25)</sup> waarbij gebruik gemaakt wordt van het verschil in adsorptiesnelheid aan adsorberende stoffen zoals  $CaCO_3$ ,  $Al_2O_3$  enz.

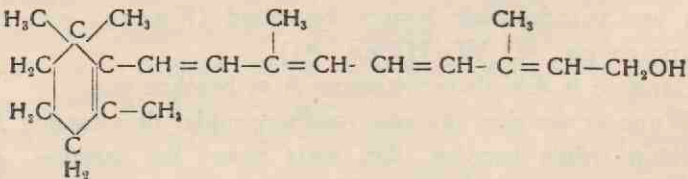
De formule van  $\beta$ -carotine is:



Hierin zijn dus 2  $\beta$ -jononringen en 4 isopreenresten aanwezig.

Het verschil met  $\alpha$ -carotine is, dat dit inplaats van 2  $\beta$ -jononringen 1  $\beta$ - en 1  $\alpha$ -jononring bevat, terwijl  $\gamma$ -carotine slechts 1 ringsysteem heeft, nl. de  $\beta$ -jononring.

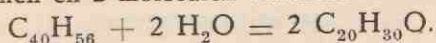
Hoewel het *Karrer*, *Morf* en *Schöpp*<sup>26)</sup> niet gelukt was het vitamine A geheel zuiver in handen te krijgen, waren zij in staat de formule van vitamine A op te stellen.





Naderhand konden zij uitgaande van  $\beta$ -jonon het perhydrovitamine A synthetisch maken, dat identiek bleek te zijn met het gehydrateerde natuurlijke vitamine. (Karrer c.s. <sup>27</sup>).

Volgens deze formule kan vitamine A ontstaan door splitsing van het  $\beta$ -carotine in 2 gelijke helften, waarbij  $H_2O$  wordt opgenomen en 2 moleculen vitamine A ontstaan



Dit is echter alleen maar mogelijk bij het symmetrische  $\beta$ -carotine en niet bij het  $\alpha$ - en  $\gamma$ -carotine. Hieruit ontstaat bij splitsing van 1 molecule slechts 1 molecule vitamine A. Hiermee is tevens de tweemaal zo sterke vitamine A-werking van het  $\beta$ -carotine verklaard.

#### D. Verschijnselen, die optreden door vitamine A-gebrek bij mens en dier.

Zoals reeds in het historisch overzicht besproken is, is de groeistoornis een van de verschijnselen, die bij vitamine A-gebrek optreden.

Een andere afwijking, die meer specifiek is dan de groeistoornis, is de xerophthalmie, een oogziekte. De verschijnselen hiervan bestaan in een verhoorning van het epitheel van de conjunctiva en de cornea. Een andere oogziekte, die ook aan vitamine A-gebrek wordt toegeschreven is de hemeralopie of nachtblindheid, welke dikwijls de xerophthalmie voorafgaat. Verdere afwijkingen zijn: nier- en blaasstenen, etterige darmontstekingen en andere etterprocessen. Een verhoogde infectiekans wordt ook vaak aan vitamine A-gebrek geweten. Tenslotte noem ik nog de verhoorning van andere epitheliën. Talrijk zijn nog de verschijnselen, die men meent in verband te moeten brengen met vitamine A-gebrek. Voor een uitvoerige beschrijving hiervan verwijs ik naar de dissertatie van Menken. <sup>28</sup>)

---

## HOOFDSTUK II.

### DE BEPALING VAN HET VITAMINE A- EN CAROTINE-GEHALTE.

#### A. Bepaling van het vitamine A-gehalte.

Het vitamine A kan bepaald worden:

1. door middel van de dierproef.
2. volgens de chemisch-colorimetrische methode.
3. volgens de fysisch-chemische methode.

##### 1. De dierproef.

Als proefdieren voor de vitamine A-bepaling gebruikt men meestal ratten, terwijl als criterium voor het al of niet aanwezig zijn van avitaminose verschillende methodes in gebruik zijn.

- 1<sup>o</sup>. De methode van Drummond en Sherman, waarbij het lichaamsgewicht als criterium wordt genomen. Deze methode kan curatief of prophylactisch gebruikt worden.
- 2<sup>o</sup>. De methode, waarbij de genezing van xerophthalmie als criterium wordt gebruikt.
- 3<sup>o</sup>. De kolpokeratosetest van Hohlweg en Dohrn, <sup>29)</sup> die gebruik maakt van het optreden van verhoorningen van de cellen in de vagina (Wolff en Overhoff, <sup>30)</sup> van Eekelen <sup>31)</sup>).



- 4<sup>o</sup>. De resistentietest van Boynton en Bradford <sup>32</sup>). Hierbij wordt gebruik gemaakt van de resistentievermindering van ratten ten opzichte van een infectie van *Bact. mucosus capsulatus*.

De bekendste methode is de curatieve groeitestmethode, waarvan nog verschillende modificaties in gebruik zijn. Deze methode heb ik bij mijn dierproeven toegepast, hij komt in het kort op het volgende neer:

De dieren worden op een vitamine A-vrij dieet gezet en het verloop van hun lichaamsgewicht wordt nauwkeurig nagegaan. Wanneer een duidelijke afneming van het gewicht optreedt, wordt begonnen met het toedienen van de stof, waarvan het vitamine A-gehalte bepaald moet worden. Men geeft aan verschillende groepen van dieren opklimmende hoeveelheden van de te onderzoeken stof. De toeneming van het gewicht wordt gebruikt als maat voor de hoeveelheid vitamine A.

Het is duidelijk, dat aan deze bepaling zeer veel bezwaren verbonden zijn. De grootste moeilijkheid bij de biologische ijking is wel gelegen in de individuele groeiverschillen der proefdieren. Om de invloed van deze factor op het resultaat van de proef zo gering mogelijk te maken, moet het aantal proefdieren bij de bepaling zo groot mogelijk zijn. Het behoeft echter geen betoog, dat de praktijk grenzen stelt aan het aantal voor één proef te gebruiken dieren.

Behalve individuele verschillen zijn er nog een groot aantal factoren, die invloed kunnen hebben op de resultaten van de biologische bepaling, bv. stalomstandigheden, ras, seizoen enz. Om de invloed van deze factoren zoveel mogelijk uit te schakelen is men ertoe overgegaan standaardpraeparaten te gebruiken, waarmee bij iedere proef de werking van het onbekende praeparaat wordt vergeleken. Voor het vitamine A-

onderzoek wordt hiervoor gebruik gemaakt van carotinepraeparaten.

Toch zijn bij de biologische bepalingmethode schommelingen van 50 %—100 % geen zeldzaamheid, zodat de resultaten, die men hiermee verkrijgt, dan ook altijd zeer critisch moeten worden beschouwd.

## 2. De chemisch-colorimetrische methode.

In 1922 vonden Drummond en Watson, <sup>33)</sup> dat geconcentreerd  $H_2SO_4$  toegevoegd aan levertraan een blauwgekleurd reactieproduct gaf. Zij meenden, dat er evenredigheid bestond tussen deze blauwe kleur en de vitamine A-waarde, die bepaald was met behulp van de dierproef. De kleur was echter weinig stabiel, maar kon toch gebruikt worden om verschillende tranen onderling te vergelijken.

Fearon <sup>34)</sup> gaf een kleurreactie met pyrogallol aan, maar deze reactie bleek niet specifiek te zijn voor vitamine A, wat door Moore <sup>35)</sup> en door Rosenheim en Webster <sup>36)</sup> werd aangetoond.

Het bleek Rosenheim en Drummond <sup>37)</sup> in 1925, dat  $AsCl_3$  met levertraan een blauwe kleur gaf. Volgens hen zou deze kleurreactie specifiek zijn voor vitamine A, terwijl de gevoeligheid veel groter was dan de kleurreactie met  $H_2SO_4$  en de kleur bovendien stabiel.

Carr en Price <sup>5)</sup> gebruikten  $SbCl_3$  inplaats van  $AsCl_3$  en wel een verzadigde oplossing van deze stof in  $CHCl_3$ . Ook de op vitamine A te onderzoeken stof werd in  $CHCl_3$  opgelost. Bij 0,2 cc van deze oplossing voegden zij 2 cc  $SbCl_3$ -oplossing en de intensiteit van de blauwe kleur, die ontstaat, werd bepaald met behulp van de Lovibond tintometer. Deze reactie wordt ook nu nog gebruikt voor de chemisch-colorimetrische bepaling van het vitamine A. De resultaten komen in 't algemeen overeen met die van de dierproef, hoewel deze

laatste, zoals reeds meegedeeld is, sterk uiteenlopende waarden geeft.

Verschillende onderzoekers hebben gevonden, dat men pas goede resultaten krijgt bij de chemisch-colorimetrische bepaling als men vooraf de op vitamine A te onderzoeken stof verzeept en de reactie uitvoert met het onverzeepbare gedeelte.

Er moet echter de nadruk op gelegd worden, dat tal van andere stoffen ook met het reagens van Carr en Price reageren; om in een onbekende stof naar het vitamine te zoeken is het nodig ook het absorptiespectrum van het reactiemengsel na te gaan.

Vitamine A geeft met het reagens twee banden; in verzepte praeparaten liggen deze bij 580 en 620  $m\mu$ . Carotinoïden reageren ook met het  $SbCl_3$ -reagens; behalve dat de absorptiebanden anders liggen (bij carotine bv. bij 590  $m\mu$ ), is ook de hoeveelheid, nodig om een duidelijke kleur te geven wel 20 maal groter dan die van vitamine A.

Op blz. 41 wordt besproken hoe het mogelijk is, vitamine A naast carotine te bepalen met behulp van de reactie van Carr en Price.

### 3. De fysisch-chemische methode.

Vitamine A heeft een electieve absorptieband bij 328  $m\mu$ . De intensiteit van deze band is evenredig met de hoeveelheid vitamine A, die in oplossing aanwezig is. Hierop berust de fysisch-chemische methode. Daar ik deze methode niet gebruikt heb, wil ik hierop niet nader ingaan, alleen nog mededelen, dat deze methode gebruikt is om de betrouwbaarheid van de reactie van Carr en Price te controleren.

Zoals we gezien hebben, is dit ook reeds gedaan door middel van de dierproef, maar door de onnauwkeurigheid van de dierijking zijn hieraan bezwaren verbonden.



Josephy <sup>38)</sup> vergeleek daarom de intensiteit van de absorptieband bij 328  $m\mu$  met de intensiteit van de blauwe kleur, die ontstaat bij de reactie van Carr en Price. Het bleek hem, dat de ultraviolette absorptie bij 328  $m\mu$  van verschillende soorten levertraan en vetten na verzeeping evenredig was met de kleurintensiteit van de Carr en Price-reactie, die gemeten werd in de Lovibond tintometer. Ook door Morton en Heilbron <sup>39)</sup> en door Drummond en Morton <sup>40)</sup> zijn analoge waarnemingen gedaan.

Om snel met behulp van absorptiemetingen bij 328  $m\mu$  vitamine A te bepalen, heeft de firma Hilger een nieuw toestel, de z.g.n. „vitameter”, in de handel gebracht.

Wolff en van Eekelen <sup>41)</sup> hebben de nauwkeurigheid van de vitamine A-bepaling met dit toestel onderzocht en gevonden, dat dit toestel voor de praktijk wel voldeed, hoewel de bepalingen minder nauwkeurig zijn dan wanneer de fotografische methode gebruikt wordt.

#### 4. De vitamine A-eenheden.

In de literatuur worden zeer veel verschillende eenheden gebruikt, om de hoeveelheid vitamine A aan te geven. Dit geeft vaak aanleiding tot verwarring.

Daarom geef ik in aansluiting op het overzicht van de bepalingsmethodes, een tabel van de meest gebruikelijke eenheden en hun onderling verband. Met behulp van deze tabel zijn we in staat bij de bespreking van de literatuur de waarden in één eenheid uit te drukken.

In 1931 werd op de 1<sup>e</sup> Internationale Vitaminenconferentie aangenomen, dat de werking van 1 $\gamma$  carotine uit wortelen gelijk was aan 1 internationale eenheid vitamine A.

Op de 2<sup>e</sup> internationale conferentie in 1934 werd inplaats van het onzuivere *Daucus*-carotine zuiver  $\beta$ -carotine als vitamine A-standaard ingevoerd.

De eenheid zelf werd niet veranderd, daar  $0,6\gamma$   $\beta$ -carotine als eenheid aangenomen werd en deze hoeveelheid dezelfde werking had als  $1\gamma$  van de oude standaard.

Van het zuiverste vitamine A-praeparaat, dat tot nu toe bereid is, heeft  $0,6\gamma$  dezelfde biologische werking als 1 int. eenheid.

Dit praeparaat had een extinctie-coëfficiënt  $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 1600$  (in alcohol of cyclohexaan).

Door van Eekelen, Emmerie en Wolff <sup>42)</sup> zijn de in de literatuur gebruikte eenheden omgerekend in deze internationale eenheid, waarvan hier de tabel volgt.

Tabel 1.

1. Intern. E. =  $0,6\gamma$   $\beta$ -carotine =  $1\gamma$  *Daucus carotina* =  
=  $0,6\gamma$  vitamine A. ( $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 1600$ ).
2. Blue Unit (Drummond en Hilditch)  
Blue Value (Brit. Pharmacopoeia)  
Antimony trichloride blue value } 1 E = 20,8 int. eenh.
3. 1 Blue Unit (Moore) = 0,39 int. eenh.
4. 1 C.L.O. Unit (Rosenheim en Webster) = 208 int. eenh.
5. 1 Lovibond eenheid (Wolff) = 4,2 int. eenh.
6. 1 Sherman, A.D.M.A. Unit (American Drug. Manuf. Ass.) = 1,4 int. eenh.
7. 1 U.S.P. Unit (United States Pharmac.) herzien in 1934 = 1 int. eenh.

#### B. De bepaling van het carotinegehalte.

De bepaling van het carotine-gehalte is veel eenvoudiger dan die van het vitamine A-gehalte.

De gele kleur van het carotine maakt het mogelijk colorimetrisch de concentratie van een carotine-oplossing te meten.



De kleur van de oplossing kan men vergelijken met een standaard, hiervoor gebruikte men vroeger een bichromaat-oplossing.

Nauwkeuriger en gemakkelijker kan men de kleur echter meten met de Lovibond tintometer of met de Stuphenphotometer van Zeiss. Wanneer men voor beide toestellen beschikt over een curve, die het verband aangeeft tussen de intensiteit van de gele kleur en de hoeveelheid carotine, kan men met behulp hiervan de onbekende hoeveelheid carotine berekenen.

Men moet natuurlijk zeker zijn, wanneer men de intensiteit bepaalt, dat de gele kleur afkomstig is van het carotine. Wanneer in de oplossing andere gekleurde stoffen aanwezig zijn, moeten deze vooraf verwijderd worden.

### C. De Lovibond Tintometer.

Bij mijn onderzoek maakte ik gebruik van de chemisch-colorimetrische methode om het vitamine A te bepalen, waarbij de blauwe kleur met de Lovibond tintometer gemeten werd. Ook voor het bepalen van het carotine-gehalte maakte ik van dit toestel gebruik. Het gebruik van de Lovibond tintometer bij het vitamine A-onderzoek is ingevoerd door Rosenheim en Schuster.<sup>43)</sup> Het is een toestel, waarmee het mogelijk is, door het verschuiven van glaasjes, die opklimmen in kleurintensiteit, snel de kleur van de te onderzoeken vloeistof te meten. De kleurstofoplossing bevindt zich in een cuvet of buisje van 10 mm doorsnede in een opening aan de achterkant van het toestel.

Achter de tintometer staat een lichtbron, waardoor het mogelijk is steeds onder constante belichting te vergelijken. Men kijkt door een kijker zonder lenzen en ziet dan 2 rechtehoekige gezichtsvelden, het bovenste heeft de kleur van de te onderzoeken stof, het onderste de kleur van een glaasje, dat men ervoor geschoven heeft.

Het is mogelijk de glaasjes snel te verschuiven, waardoor men spoedig het glaasje kan vinden, dat dezelfde kleurintensiteit heeft als de te onderzoeken vloeistof. In het toestel zijn 3 soorten glaasjes, rode, gele en blauwe. Van elk der kleuren heeft men één rij glaasjes, die 0,1 eenheid in kleurintensiteit verschillen, benevens één rij, die 1 eenheid in kleurintensiteit verschillen. Bovendien is nog van elk der kleuren een glaasje aanwezig van 10 eenheden en een glaasje van 20 eenheden. Door het voor elkander schuiven van verschillend gekleurde glaasjes kan men ook mengkleuren meten.

Bij het meten van de blauwe kleur, die ontstaat bij de reactie van Carr en Price, moet men erop bedacht zijn, dat men in veel gevallen niet alleen met de blauwe glaasjes van het toestel een zelfde kleur als het reactiemengsel kan verkrijgen. Om dit te bereiken moet men tevens gebruik maken van de gele of rode glaasjes. Wanneer men van deze steeds zo weinig mogelijk gebruikt, krijgt men reproduceerbare resultaten, zoals door van Eekelen, Emmerie, Julius en Wolff <sup>44</sup>) is aangetoond.

Zij vergeleken de waarden, die met de Lovibond werden afgelezen, met die welke zij verkregen bij metingen, waarbij het mogelijk was alleen de blauwe kleur te bepalen.

In de eerste plaats deden zij dit met de Stuphenphotometer van Zeiss. Met dit toestel is men in staat intensiteitsmetingen te doen in beperkte spectraalgebieden.

Het bleek hun, dat zij met deze methode resultaten kregen, die minder dan 5 % verschilden van die, welke met de Lovibond gevonden waren. Daar de metingen met de Lovibond tintometer, zowel als die met de stuphometer subjectief zijn, hebben zij de kleurintensiteit van de blauwe kleur, die bij de Carr en Price-reactie ontstaat, bovendien nog gemeten volgens 2 objectieve methodes.

Bij de ene methode maakten zij gebruik van een apparaat voor objectieve absorptiemetingen van Moll en Burger, gecombineerd met een spectrograaf. Hiermede werd de absorptie bij  $620\text{ m}\mu$  gemeten.

Bij de andere methode valt het licht van een lamp op een dubbele monochromator (van Cittert) door middel van een lens; het spectraallicht valt dan op een seleniumphotocel; de elektrische stroom van de photocel wordt gemeten met een microgalvanometer van Moll.

De schrijvers komen tot de conclusie, dat de extinctie in het gebied van  $620\text{ m}\mu$  evenredig is met de concentratie van het vitamine A in de oplossing. De 4 methodes, volgens welke zij de kleurintensiteit van de blauwe kleur gemeten hebben, gaven overeenkomstige resultaten, zodat ze hebben aangetoond, dat de Lovibond tintometer gebruikt kan worden door een geoefend onderzoeker om het vitamine A snel te bepalen.

### HOOFDSTUK III.

## BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER HET VITAMINE A- EN CAROTINE-GEHALTE VAN KOEMELK.

Melk was een der eerste voedingsmiddelen, waarvan ontdekt werd, dat daarin nog andere voedingsstoffen aanwezig waren dan eiwitten, vetten, koolhydraten en zouten.

Lunin <sup>45)</sup> wees hierop reeds in 1881, terwijl Hopkins <sup>46)</sup> eveneens dergelijke waarnemingen deed.

Osborne en Mendel <sup>2)</sup> deden hun eerste ontdekkingen over vitamine A met behulp van melk.

Funk <sup>47)</sup> uitte in 1913 reeds de veronderstelling, dat het gehalte van de melk aan vitaminen afhankelijk zou zijn van het voedsel. Wat betreft het vitamine A waren Mc Collum c.s. <sup>48)</sup>, Steenbock c.s. <sup>49)</sup> en Hess c.s. <sup>50)</sup> het met deze veronderstelling eens.

#### A. Dierproeven.

Verscheiden onderzoekers hebben daarna met behulp van dierproeven de groeibevorderende werking van melk onderzocht en de werking van weidemelk vergeleken met die van stalmelk.

Drummond, Coward en Watson <sup>51)</sup> toonden aan, dat 0,2 g boter van stalmelk afkomstig als dagelijkse hoeveelheid aan ratten gevoerd geen groeibevorderende



werking had, terwijl dit bij eenzelfde hoeveelheid boter van weidemelk gemaakt, wel het geval was. Ook latere proeven van Drummond c.s. <sup>52)</sup> bevestigden de gunstige werking van weideboter.

Volgens Kennedy en Dutcher <sup>53)</sup> was als enige vitamine A-bron in het voedsel van ratten de dagelijkse dosis van 15 cc melk, afkomstig van koeien, die niets anders kregen dan haverstroo en krachtvoer onvoldoende, terwijl 10 cc weidemelk als dagelijkse dosis voldoende was.

Steenbock, Sell en Buell <sup>54)</sup> vonden, dat boter aan het einde van de stalperiode minder vitamine A-werking had dan boter van dezelfde koeien tijdens de weideperiode.

Holmes <sup>55)</sup> bestudeerde de vitamine A-werking van botervet van verschillende rassen koeien, maar vond zijn proeven onvoldoende, om hieruit conclusies te trekken, terwijl Hume <sup>56)</sup> er niet in slaagde de groeibevorderende werking van stalmelk aan te tonen, hoewel de koeien overvloedig groenvoer kregen.

Reyer <sup>57)</sup> voedde kinderen met melk van koeien, die een dieet bestaande uit groenvoer kregen, daarna gaf hij de kinderen melk van koeien, die droogvoer aten; in 't laatste geval ging het gewicht van de kinderen niet vooruit.

Luce <sup>58)</sup> was de eerste, die bij haar proeven meer quantitatief te werk ging. Zij drukte het vitamine A-gehalte uit in eenheden. Als eenheid nam zij aan de kleinste hoeveelheid vitamine A, die per dag toegediend een rat 10 à 12 g per week doet groeien. Zij vond ong. 12 eenheden in 100 g stalmelk, terwijl als de koeien gras en klaver kregen er 26 tot 41 eenheden in de melk werden gevonden. Haar conclusies zijn in het kort de volgende:

De groeibevorderende factor van de melk wordt alleen door het dieet van de koe bepaald en is onafhankelijk van



het feit of de koe buiten in het zonlicht of in een donkere stal gehouden wordt.

De reeds genoemde onderzoekers hebben bij hun proeven nooit erop gelet of vitamine D-gebrek ook een rol speelde; dit vitamine werd nl. pas in deze periode ontdekt. Daarom zetten Chick en Roscoe <sup>59)</sup> de proeven van Luce voort en letten daarbij speciaal op de vitamine D-voorziening. Zij kwamen echter tot dezelfde resultaten als Luce en vonden, dat 100 g melk tijdens het winterrantsoen 8 à 12 eenh. bevatte en tijdens de weideperiode 50 à 100 eenh.

Golding, Soames en Zilva <sup>60)</sup> kwamen tot de conclusie, dat boerenkoolvoedsel in de winter de groeibevorderende werking van de melk deed stijgen. Ook het toedienen van levertraan veroorzaakte een stijging. Dit had echter volgens hen het nadeel, dat het vetpercentage van de melk erdoor achteruitgaat.

Volgens Scheunert <sup>61)</sup> bevatte weideboter ruim 2 maal zoveel vitamine A als boter van koeien, die hooi, voederbieten en krachtvoer kregen. Hij vond nl. bij zijn dierproeven, dat 0,25 g weideboter voor een rat als dagelijkse hoeveelheid voldoende was, terwijl 0,5 g stalboter onvoldoende was.

Ook Fraps en Treichler <sup>62)</sup> deden rattenproeven met boter en volgens hen zijn in normale weideboter 33 E aanwezig. Als eenheid nemen zij aan die hoeveelheid, die bij ratten een gemiddelde gewichtstoename van 3 g per week gedurende 8 weken veroorzaakt.

Mc.Leod, Brodie en Mc. Loon <sup>63)</sup> toonden aan, dat variaties in de vitamine A-waarden alleen een gevolg zijn van voedselverandering en niet van seizoenwisseling. Zij hielden een groep koeien gedurende het hele jaar op stal en vonden, dat bij een goede stalvoeding de vitamine A-waarde van de melk gedurende het hele jaar practisch con-

stant bleef. Het bleek hun, dat 0,5—0,75 cc melk als enige vitamine A-bron dagelijks aan ratten gevoerd bij deze dieren een gemiddelde gewichtstoename gaf van 3 g per week gedurende 8 weken. De melk zou dus 1,3 tot 2 ratten-eenheden vitamine A per gram bevatten, hetgeen dus wel zeer veel is.

Uit het hier gegeven overzicht van de dierproeven over het vitamine A-gehalte van melk en boter, blijkt wel, dat over het algemeen zeer verschillende waarden werden gevonden.

Dit is een gevolg van de fouten, die bij de uitvoering van de dierproef gemaakt kunnen worden. Vooral wanneer bij de proef niet een groot aantal dieren gebruikt worden en men conclusies trekt uit het gedrag van 1 of 2 ratten, zoals bv. Fraps en Treichler <sup>62)</sup> deden.

Bovendien vergeleek geen van de onderzoekers de werking van boter met die van carotine-standaardpraeparaten, zodat de resultaten beïnvloed zijn door verschillende factoren zoals stalomstandigheden, gronddiët enz., die op de laboratoria van de onderzoekers verschillend zijn.

Absolute waarden leverden deze proeven ons dus niet; we kunnen er echter wel uit concluderen, dat het vitamine A-gehalte van zomermelk in het algemeen hoger is dan dat van wintermelk.

## B. Chemisch-colorimetrische methodes.

Op zuiver chemische wijze hebben Palmer en Eckles <sup>64)</sup> reeds in 1914 een uitgebreid onderzoek ingesteld naar de pigmenten van het melkvet. Zij verzeepden boter met alcoholische kali en het onverzeepbare deel werd door extractie in aether opgenomen.

Door te onderzoeken:

1<sup>o</sup>. Het gedrag van de pigmenten t.o.z. van alcohol en petroleumaether (resp. C.S<sub>2</sub>),

2<sup>o</sup>. het gedrag bij de adsorptieanalyse met  $\text{CaCO}_3$  volgens Tswett,

3<sup>o</sup>. door spectroscopisch de absorptiebanden te meten, vonden zij, dat de pigmenten van het melkvet als hoofdbestanddeel carotine bevatten en dat daarnaast nog weinig xanthophyl aanwezig was. De intensiteit van de gele kleur, die zij verkregen na scheiding van de xanthophylfractie met alcohol werd gemeten in de Lovibond tintometer.

Zij constateerden een invloed van het voedsel op het carotine-gehalte van het melkvet.

Het vitamine A-gehalte, waaraan toen bij het chemisch onderzoek nog niet gedacht werd, lieten zij buiten beschouwing. Langs analytische weg werd dit voor het eerst in 1929 bepaald. Rösio<sup>65)</sup> gaf hiervoor een methode aan:

Omdat dit in vet oplosbare vitamine geheel in het melkvet aanwezig is, maakte hij van de melk eerst boter. De boter werd met  $\text{CHCl}_3$  geëxtraheerd. Het extract werd volgens Carr en Price op het vitamine A-gehalte onderzocht. De boter werd dus niet verzeept. Zoals nog blijken zal, geeft dit aanleiding tot te lage resultaten.

Door omrekening hoeveel melk voor een bepaalde hoeveelheid boter gebruikt is, verkreeg Rösio het vitamine A-gehalte van de melk.

Doordat toen nog niet de samenhang tussen carotine en vitamine A bekend was, bepaalde hij niet het provitamine A, carotine, zodat we ook uit zijn proeven niet de totale vitamine A-waarde van de melk weten. Hij vond in melk 23—163 Lovibond eenheden per KG. Daar zijn eenheden gelijk zijn aan  $\frac{1}{5,5}$  L. E. Wolff, waren er dus volgens hem in 1 KG melk 18—124 int. eenh. aanwezig. (Zie tabel 1).

Lundborg trachtte het carotine-gehalte van de melk



te bepalen. Hij kwam na verschillende proefnemingen tot het resultaat, dat dit op de beste en snelste manier geschiedde, wanneer hij het vet uit de melk afscheidde volgens een gewijzigde Röse Gottlieb-methode, dit vet verzepte en in het onverzeepbare gedeelte de Carr en Price-reactie uitvoerde. De blauwe kleur, die dan ontstond, schreef hij ten onrechte uitsluitend toe aan het carotine.

In een volgende publicatie <sup>67)</sup> bepaalde hij het carotine-gehalte van botervet colorimetrisch door dit na verzeeping uit te schudden met  $\text{CHCl}_3$  en de intensiteit van de gele kleur van de  $\text{CHCl}_3$ -oplossing te meten door deze te vergelijken met een  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -oplossing, die vooraf geijkt was met een zuivere carotine-oplossing. Hij kwam hierbij tot de ontdekking, dat hij op deze wijze lagere waarden vond, dan wanneer hij het carotine met behulp van de Carr en Price-reactie bepaalde. Een aan de melk toegevoegde hoeveelheid carotine vond hij echter quantitatief terug. Hieruit besloot hij, dat er naast carotine nog een stof aanwezig was, welke hij „carotinoïd X” noemde, die ook de Carr en Price-reactie gaf en welke waarschijnlijk vitamine A zou zijn.

Het is duidelijk, dat de intensiteit van de blauwe kleur, die Lundborg met behulp van de Carr en Price-reactie bepaalde, de som was van de intensiteiten van de blauwe kleur, die ontstaat tengevolge van het vitamine A en die van het carotine. Op blz. 41 is te zien, dat het gedeelte van de blauwe kleur, dat toegeschreven moet worden aan het aanwezige carotine zeer klein is en zelfs dikwijls verwaarloosd kan worden, zodat Lundborg dus met de Carr en Price-reactie niet het carotine bepaalde, maar practisch alleen het aanwezige vitamine A. Hij vond 9 Lovibond eenheden per g vet = 7,6 int. eenh.

Wolff, Overhoff en van Eekelen <sup>24)</sup> waren de

eersten, die zowel het vitamine A als het carotine in boter bepaalden.

Na verzeeping van boter werd de massa geëxtraheerd met petroleumaether. Hierin losten het carotine en het vitamine A op. Deze scheidde zij door de petroleumaether-oplossing met 90 % alcohol uit te schudden, waarbij het vitamine A in de alcoholphase overging. Het vitamine A werd dan met behulp van de Carr en Price-reactie bepaald, terwijl het carotine in de petroleumaetherphase colorimetrisch gemeten werd.

In 1 monster zomerboter vonden zij 10 mg carotine en 300 L.E.B. (Lovibond eenheden blauw) vitamine A per kg. De vitamine A-waarde was dus 1126 int. eenh. per 100 g boter.

Zoals nog blijken zal vonden zij een zeer laag vitamine A-gehalte. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit, dat het zeer moeilijk is, door uitschudden met 90 % alcohol het vitamine A quantitatief in de alcoholphase te doen overgaan.

In 1932 bepaalde Moore <sup>98)</sup> eveneens zowel het vitamine A- als het carotine-gehalte van boter.

Na verzeeping met alcoholische KOH-oplossing werden carotine en vitamine A geëxtraheerd met aether. Dit aether-extract werd met water gewassen om de zepen te verwijderen, daarna werd de aether afgedampt en de rest in  $\text{CHCl}_3$  opgelost. In deze  $\text{CHCl}_3$ -oplossing werd het carotine colorimetrisch bepaald met de Lovibond tintometer; het vitamine A werd met behulp van de Carr en Price-reactie eveneens in de Lovibond tintometer gemeten.

Hij vond in winterboter 3 Y.U. (= Yellow units) carotine en 10 B.U. (= Blue units) vitamine A per gram vet, dit is  $2\gamma$  carotine en  $2,3\gamma$  vit. A en dus in totaal gelijk aan 5,8 int. eenh. per gram vet. In zomerboter vond hij 25 Y.U. en 11 Y.U. carotine en 20 B.U. en 25 B.U. vitamine A per g vet, dit is 16 en  $7,5\gamma$  carotine en 4,6 en  $5,7\gamma$  vit. A en in



totaal gelijk aan 24 en 17 int. eenh. per gram vet.

In samenwerking met Booth, Kon en Dann <sup>69)</sup> publiceerde hij later nog een onderzoek over het carotine- en vitamine A-gehalte van zomer- en winterboter, waarbij dezelfde bepalingmethode gebruikt werd. In winterboter werd 2,6 Y.U. en 3,5 B.U. of 1,7 $\gamma$  carotine en 8 $\gamma$  vitamine A = 15 intern. eenh. per gram vet gevonden en in zomerboter 1,7 Y.U. en 6,5 B.U. of 10 $\gamma$  carotine en 15 $\gamma$  vitamine A = 35 int. eenh. per gram vet.

Bovendien merken deze onderzoekers op, dat een 5 tot 10 maal lager vitamine A-gehalte gevonden werd, wanneer dit niet bepaald werd in het onverzeepbare gedeelte van de boter, dus wanneer de boter niet werd verzeept. Volgens hen zou dit toe te schrijven zijn aan de storende werking van stoffen, waarvan bekend is, dat zij de Carr en Price-reactie onderdrukken. (Norris en Church <sup>70)</sup> en Emmerie <sup>71)</sup>) In zomerboter vonden zij een grotere toeneming van het vitamine A-gehalte na verzeeping dan in winterboter, zodat volgens hen tussen deze beide soorten een verschil in gehalte aan storende substanties bestaat.

### C. Spectroscopische bepalingen.

Spectroscopische bepalingen van het carotine- en vitamine A-gehalte van boter werden gedaan door Baumann en Steenbock. <sup>72)</sup>

Voor carotinebepalingen werden de absorptiewaarden in het gebied van de maximum absorptie bij 460 en 485  $m\mu$  gemeten. Door de waarden, die hierbij voor boter werden gevonden te vergelijken met die van een standaardoplossing van carotine in katoenzaadolie, berekenden zij de hoeveelheid carotine, die in boter aanwezig was.

Het vitamine A werd bepaald door het absorptiespectrum van het onverzeepbare deel van de boter opgelost in  $CH_3OH$

te fotograferen en de extinctie in het gebied van de maximum absorptie bij  $328 \text{ m}\mu$  te bepalen. De hoeveelheid vitamine A werd hieruit berekend door gebruik te maken van de waarde, die Heilbron voor de extinctiecoëfficiënt had gevonden.

Deze was  $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 1300$ . Zij vonden op deze wijze in 100 g zomerboter  $600\gamma$  carotine en  $1700\gamma$  vitamine A, dus totaal 3433 int. eenh.; in winterboter  $200\gamma$  carotine en  $1000\gamma$  vitamine A, totaal 1866 int. eenh. per 100 g.

Later echter hebben Carr en Jewell voor een zuiverder vitamine A-praeparaat gevonden dat  $E \frac{1\%}{1 \text{ c.m.}} = 1600$ , zodat wanneer deze waarde gebruikt wordt bij de berekening van de resultaten van Baumann c.s. het gevonden vitamine A-gehalte lager wordt.

In een tweede publicatie <sup>73)</sup> gebruikten zij dan ook de waarde van Carr en Jewell en vonden toen een overeenkomstig lager vitamine A-gehalte.

Dergelijke spectroscopische carotine- en vitamine A-bepalingen deden ook Gillam, Heilbron, Morton, Bishop en Drummond. <sup>74)</sup> Zij vonden in winterboter gem.  $110\gamma$  carotine en  $320\gamma$  vitamine A of 643 int. eenh. per 100 g; in zomerboter gem.  $550\gamma$  carotine en  $660\gamma$  vitamine A = 1750 int. eenh. per 100 g. Tevens bleek hun, dat voeding van kunstmatig gedroogd gras het carotine- en vitamine A-gehalte van de winterboter deed stijgen, het voeren van kuilgras daarentegen deed dit gehalte weinig stijgen.

In de loop van 1934 publiceerden dezelfde schrijvers in samenwerking met Watson een nieuw onderzoek <sup>75)</sup> over de invloed van het rantsoen op het carotine- en vitamine A-gehalte van de boter, waarbij zij van dezelfde methode gebruik maakten om dit te bepalen. Zij vonden in normale winterboter gem.  $150\gamma$  carotine en  $280\gamma$  vitamine A, de vitamine A-

waarde is dus 616 int. eenh. per 100 g botervet; in zomerboter vonden zij gem. 600 $\gamma$  carotine en 700 $\gamma$  vitamine A of 1766 int. eenh. per 100 g botervet, terwijl zij bij voeding van kuilgras geconserveerd volgens Virtanen <sup>76)</sup> in de winter een hoger carotine- en vitamine A-gehalte van de boter kregen, nl. 350 $\gamma$  carotine en 550 $\gamma$  vitamine A, dus 1267 int. eenh. per 100 g vet.

Verschillende onderzoekers hebben de invloed van het ras nagegaan op het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk.

Crawford, Perry en Silva <sup>77)</sup> onderzochten dit met behulp van dierproeven en vonden geen verschil van betekenis in monsters boter van koeien van verschillend ras, waarbij de koeien natuurlijk eenzelfde diët kregen.

Tot dezelfde conclusie kwamen Wilbur, Hilton en Hauge <sup>78)</sup>, die eveneens de groeibevorderende werking bepaalden met behulp van de dierproef. Wel vonden zij verschil in het carotine-gehalte, dat colorimetrisch bepaald werd. Zij namen daarom aan, dat in gevallen waarbij het carotine-gehalte van de boter hoog is, het vitamine A-gehalte laag is.

Kon en Booth <sup>79)</sup> evenals Baumann en Steenbock <sup>73)</sup> bewezen, dat deze veronderstelling juist was.

Kon en Booth onderzochten de boter van Shorthorn- en Guernsey-koeien, die hetzelfde diët kregen.

Zij bepaalden het carotine colorimetrisch en vonden een groot verschil in gehalte tussen de boter van beide rassen. Daarentegen bleek de groeibevorderende werking van beide soorten boter bij rattenproeven gelijk te zijn. Daarom bepaalden zij eveneens het vitamine A-gehalte in het onverzeepte gedeelte van de boter met behulp van de  $SbCl_3$ -reactie en vonden tussen de beide soorten weer een groot verschil, maar nu in tegengestelde richting.

Baumann en Steenbock vonden met behulp van hun spectroscopische methode soortgelijke variaties, zoals uit onderstaande tabel blijkt.



Tabel 2.

## Wintermelk.

ras	car. in $\gamma$ per 100 gr. vet	vit. A in $\gamma$ per 100 gr. vet	int. eenh. per 100 gr. vet
Asyrhire. . . . .	480	840	1880
Guernsey . . . . .	1000	680	2133
Holstein . . . . .	520	1000	2180
Yersey . . . . .	710	710	1893
Brown Swiss . . . . .	600	780	1900

## Zomeremelk.

ras	car. in $\gamma$ per 100 gr. vet	vit. A in $\gamma$ per 100 gr. vet	int. eenh. per 100 gr. vet
Ayrshire. . . . .	550	1220	2853
Guernsey . . . . .	1700	850	3116
Holstein . . . . .	660	1510	3176
Yersey . . . . .	1070	1150	2986
Brown Swiss . . . . .	980	1380	3280

In de laatste kolom staan de waarden, die ik verkregen heb, door hun gegevens voor carotine en vitamine A om te rekenen in int. eenh. en deze beide op te tellen. Hieruit is duidelijk te zien, dat de totale vitamine A-waarden van de verschillende rassen practisch constant zijn.

Na deze publicaties is het dus wel zeer waarschijnlijk, dat het ras niet veel invloed op de totale vitamine A-waarde van de boter heeft.

Anders is het met de invloed van het voedsel. Uit het



literatuuroverzicht is wel gebleken, dat er een invloed van het voedsel van de koeien op de vitamine A-waarde van de melk is waar te nemen en wel, dat voedsel, dat veel carotine bevat een gunstige invloed heeft. De resultaten van de verschillende onderzoekers lopen echter zeer uiteen. Het leek daarom van belang, de vitamine A-waarde van de Nederlandse melk in verband met de in Nederland gebruikelijke voeding en onder de hier heersende omstandigheden na te gaan.

## HOOFDSTUK IV.

### BEPALING VAN HET VITAMINE A- EN HET CAROTINE-GEHALTE VAN KOEMELK.

In het vorig hoofdstuk hebben we gezien, dat voor de bepaling van het vitamine A- en het carotinegehalte van melk, deze nooit direct werd gebruikt. De onderzoekers maakten van de melk steeds eerst boter en bepaalden hierin de hoeveelheid carotine en vitamine A.

Deze werkwijze is echter zeer tijdrovend. Daarom ben ik bij de carotine- en vitamine A-bepaling steeds direct van de melk zelf uitgegaan. Dit was als volgt mogelijk.

#### A. Bepaling van het vitamine A-gehalte.

Naar analogie van de vitamine A-bepaling in boter, heb ik de melk verzeept met alcoholische KOH-oplossing. Hiervoor bleek 1 uur verzeppen voldoende te zijn.

De verzepte massa wordt geëxtraheerd met petroleum-aether of peroxydvrije aether. Hierin lossen de aanwezige carotinoïden en vitamine A op.

Door de aanwezige zepen treedt gemakkelijk emulsievorming op, speciaal bij het uitschudden met petroleum-aether. Het bleek echter, dat deze moeilijkheid te omzeilen was, indien ervoor gezorgd werd, dat de alcoholconcentratie in de waterige laag 50% was.

Om na te gaan hoeveel extracties nodig waren om alle

carotinoïden en vitamine A uit de verzepte melk te schudden, deed ik 4 extracties met 100 cc petroleumaether en bepaalde in elke extractie afzonderlijk het vitamine A- en carotine-gehalte. Het carotine bleek in het tweede extract practisch reeds geheel te ontbreken, terwijl voor het vitamine A 3 maal uitschudden voldoende was.

In de petroleumaether lost bij het uitschudden ook een gedeelte van de ontstane zepen op, die verwijderd moeten worden. Hiertoe worden de verzamelde extracten enkele malen met water gewassen en dan met watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  behandeld om het aanwezige water op te nemen, daar de oplossing anders bij het indampen troebel wordt.

Na affiltreren van het  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  hebben wij nu een petroleumaetheroplossing, waarin alle carotinoïden en vitamine A aanwezig zijn. Deze oplossing is echter veel te verdund en wordt dus ingedampt. Voor het indampen werd gebruik gemaakt van Soxhletapparaten, die het voordeel hebben, dat de opstelling weinig ruimte inneemt, zodat verschillende bepalingen naast elkaar op het waterbad gedaan konden worden. Het indampen werd voortgezet tot de concentratie van het vitamine A zodanig was, dat bij de Carr en Price-reactie een duidelijke blauwe kleur optrad.

Van deze oplossing brengt men 0,2 cc in het Lovibond-buisje, voegt daarbij 2 cc  $\text{SbCl}_3$ -oplossing in chloroform en 1 druppel azijnzuuranhydride. De intensiteit van de blauwe kleur, die ontstaat, wordt snel in het Lovibond-toestel gemeten.

Het azijnzuuranhydride wordt toegevoegd om nog sporen aanwezig water op te nemen. De aanwezigheid van water veroorzaakt dadelijk een troebeling tengevolge van de  $\text{SbCl}_3$ , waardoor het meten onmogelijk wordt. (Bertram<sup>80</sup>).

De nauwkeurigste aflezing van de intensiteit van de blauwe kleur in de Lovibond tintometer is mogelijk in de buurt van

5 Lovibond eenheden blauw (L. E. B.), zodat de verdunning van de petroleumaetheroplossing zo gekozen wordt, dat ongeveer deze Lovibondwaarde afgelezen wordt. Na enige oefening is men in staat de meting zo uit te voeren, dat de maximale fout ten hoogste 0,2 L. E. B. is, hetgeen dus neerkomt op een fout van ten hoogste 5 %.

### B. Bepaling van het carotine-gehalte.

Voor de bepaling van het carotine-gehalte van de melk gebruikte ik dezelfde methode als voor de vitamine A-bepaling. De melk wordt verzeept, met petroleumaether geëxtraheerd, de extracten worden gewassen, gedroogd en ingedampt tot een volume, waarbij de intensiteit van de gele kleur colorimetrisch goed te bepalen is in de Lovibond tintometer.

Om uit de intensiteit van de gele kleur de hoeveelheid carotine te kunnen berekenen moeten we er zeker van zijn, dat de gele kleur uitsluitend afkomstig is van carotine en niet van andere gele pigmenten, zoals xanthophyl en lycopine, die beide in het voedsel van de koe kunnen voorkomen.

Eerst werd nagegaan of xanthophyl ook in meetbare hoeveelheid aanwezig was. Hiervoor maakte ik gebruik van de volgende scheidingsmethode voor xanthophyl en carotine.

Schudt men een petroleumaetheroplossing, die carotine en xanthophyl bevat met 85 % alcohol, dan gaat het xanthophyl over in de 85 % alcohol, terwijl de carotine in de petroleum-aetherlaag achterblijft. <sup>81)</sup> <sup>82)</sup> <sup>83)</sup> Ik verzeefte hiervoor 100 cc melk, extraheerde met petroleumaether, waste met water, droogde met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en concentreerde de oplossing door indampen tot 10 cc. Hierna werd de intensiteit van de gele kleur bepaald met de Lovibond tintometer.

De oplossing werd daarna met 85 % alcohol uitgeschud. De petroleum-aetherlaag werd afgescheiden, met water gewassen, met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogd en het volume weer nauw-



keurig op 10 cc gebracht, waarna de intensiteit van de gele kleur opnieuw bepaald werd. Geen merkbaar verschil met de eerstbepaalde kleurintensiteit werd gevonden.

Bovendien werd de alcoholhaag na verdunning met water uitgeschud met petroleumaether. Deze petroleumaetheroplossing werd ingedampt tot 1 cc. Het bleek toen, dat deze oplossing slechts zeer weinig geel gekleurd was (minder dan 1 L. E. G.). De hoeveelheid xanthophyl was zo gering, dat bij de carotinebepaling, waar voor het meten van de intensiteit van de gele kleur een volume van 5 tot 10 cc gebruikt wordt, de concentratie van het xanthophyl zodanig is, dat invloed hiervan op de intensiteit van de gele kleur binnen de proeffout ligt, hetgeen dus in overeenstemming is met de bovenstaande bepaling, waarbij geen andere waarde werd gevonden na verwijdering van het xanthophyl.

Dit is ook in overeenstemming met de resultaten van Gillam en Heilbron, <sup>74)</sup> die bij hun spectroscopische bepalingen ook slechts zeer weinig xanthophyl vonden.

Daar de mogelijkheid bestond, dat xanthophyl in grotere hoeveelheid in de melk zou voorkomen, wanneer de koeien een ander diëet kregen, werd bovenstaande proef iedere keer herhaald, wanneer het voedsel van de koeien veranderd werd. Steeds echter was de hoeveelheid xanthophyl zo gering, dat deze binnen de proeffout lag.

Bij de bepaling van het carotine hoeft dus geen correctie aangebracht te worden voor de aanwezigheid van xanthophyl.

In de tweede plaats moeten we rekening houden met de eventuele aanwezigheid van lycopine.

Om dit na te gaan, heb ik gebruik gemaakt van de scheidingsmethode van Kuhn en Brockmann <sup>83)</sup> voor carotine en lycopine.

Om zeker te zijn, dat ik volgens deze methode een goede scheiding tussen carotine en lycopine verkreeg, heb ik eerst gewerkt met een mengsel van beide stoffen.

Het benodigde lycopine werd bereid uit tomatenpurée volgens een voorschrift van Wilstätter en Escher.<sup>84)</sup>

Bereiding van lycopine:

11 kg tomatenpurée werden met 6 L 96 % alcohol geroerd. Dit mengsel liet ik 24 uur staan, waarbij zo nu en dan de massa omgeschud werd. Het bezinksel werd door een doek gefiltreerd. De aldus verkregen brei werd opnieuw met 3 L alcohol geschud en weer gefiltreerd. Daarna werd de alcohol, die nog aanwezig was, verwijderd met behulp van een filterpers. De kruimelige massa, die overbleef, werd bij 40° gedroogd en dan gemalen.

Het tomatenmeel werd met CS<sub>2</sub> geëxtraheerd in Soxhlet-apparaten, en de verkregen oplossing ingedampt in CO<sub>2</sub> atmosfeer onder verminderde druk.

De bruinrode rest werd met het drievoudige volume absolute alcohol verdund en gefiltreerd, waarna met petroleum-aether nagewassen werd. Het ruwe product werd gereinigd door het uit een CS<sub>2</sub>-oplossing met absolute alcohol neer te slaan. Nadat dit vijf maal herhaald was, werd 0,9 g van het eindproduct verkregen. Dit werd gedroogd in een vacuum-exsiccator boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. De exsiccator werd voor het evacueren met CO<sub>2</sub> gevuld, daar het lycopine zeer oxydabel is. Om deze reden werd het lycopine ook in een toegesmolten buisje, gevuld met CO<sub>2</sub>, bewaard.

Het smeltpunt van dit praeparaat was 170°.

### C. De scheiding van lycopine en carotine.

Bij de methode van Kuhn en Brockmann wordt gebruik gemaakt van het principe van de chromatografische adsorptiemethode van Tswett, die berust op het verschil in adsorbeerbaarheid van de te scheiden componenten. Kuhn en Brockmann nemen voor de scheiding van lycopine en

carotine een mengsel van 10 delen „Fasertonerde” (M e r c k) en 40 delen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (grofkorrelig).

Het adsorbens bevindt zich in een buis van ong. 30 cm lengte en 8 mm doorsnede. Deze buis heeft aan de onderkant een vernauwing, welke voorzien is van een wattenprop, en is op een zuigerlenmeyer gemonteerd.

Voor het vullen van de buis suspendeerde ik het adsorbens in petroleumaether en bracht de suspensie onder afzuigen in de buis tot een laagdikte van 12 cm.

Nadat het adsorptiemengsel met petroleumaether gewassen was, werd een oplossing, die carotine en lycopine bevatte door de adsorberende laag gezogen.

Omdat lycopine sterker door het gebruikte adsorbens ge-adsorbeerd wordt dan carotine, kan het carotine quantitatief uitgewassen worden met petroleumaether, terwijl het lycopine een rode ring vormt in de adsorberende laag, die bij het wassen met petroleumaether slechts langzaam verschuift. De lycopine kan daarna met petroleumaether, die 1 % aethylalcohol bevat, geëluëerd worden.

Om na deze werkwijze te kunnen controleren of het carotine en lycopine gescheiden zijn, moeten we de concentratie van de beide stoffen in petroleumaether bepalen. Voor carotine geschiedde dit met behulp van de Lovibond colorimeter. Deze bleek echter niet geschikt voor de bepaling van het lycopine, omdat dan met 2 kleuren gemeten moest worden (geel en rood).

Daarom maakte ik hiervoor gebruik van de Stuphenphotometer van Zeiss, <sup>85)</sup> waarmee we in staat zijn de lichtabsorptie in een bepaald golflengtegebied te meten.

Door het meten van de absorptie van lycopine-oplossingen met bekende concentratie werd het verband bepaald tussen de absorptie en de concentratie in het golflengtegebied, dat



bestreken wordt door het filter S 47, dat bij het toestel behoort.

Onderstaande tabel geeft de waarden aan van de absorptie in % van het invallend licht, wanneer een cuvet van 10 mm dikte gebruikt werd.

Tabel 3.

Hoeveelheid lycopine in $\gamma$ per cc.	Stuphometerwaarden.
1	81
2	68
4	47
5	38
6	33
8	22
10	16

In fig. I is de grafische voorstelling te zien van bovenstaande waarden, waarbij de  $x$ -as de lycopineconcentratie aangeeft en de  $y$ -as, die logaritmisch verdeeld is, de stuphometerwaarden. Met behulp van deze kromme kunnen we de concentratie van een lycopine-oplossing bepalen.

Van een lycopinepraeparaat en van een standaardpraeparaat van carotine werden oplossingen gemaakt van bekende concentratie. Van deze oplossingen maakte ik een mengsel, waarvan dus het lycopine- en carotine-gehalte bekend was. Dit mengsel werd volgens de beschreven methode gescheiden.

Nadat de oplossingen na de scheiding door indampen geconcentreerd waren, werd het gehalte aan lycopine en carotine bepaald. Het bleek hierbij, dat de beide stoffen niet kwantitatief teruggevonden werden, zoals uit Tabel 4 te zien is.



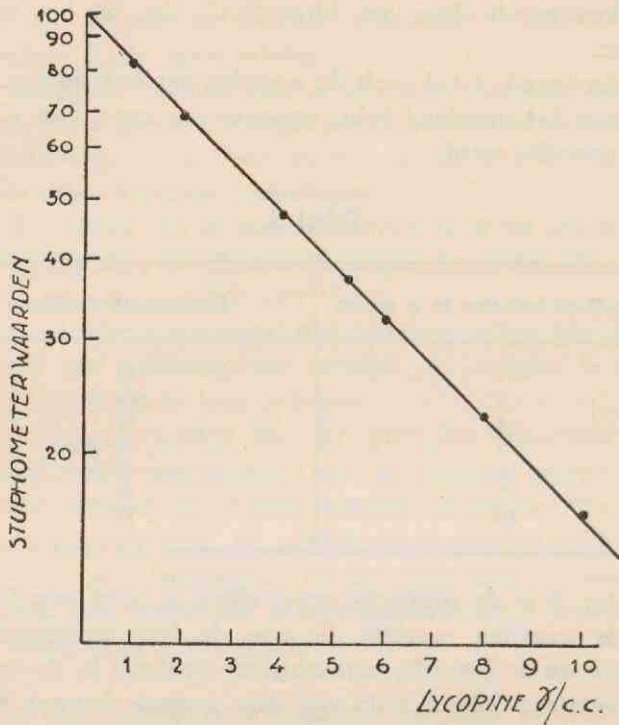


Fig. I.

Tabel 4.

Oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid in 't mengsel.		Teruggevonden hoeveelheid	
lycopine in $\gamma$	carotine in $\gamma$	lycopine in $\gamma$	carotine in $\gamma$
12,4	12	5	6,6
12,4	14,5	3	17

Volgens het voorschrift van Kuhn en Brockmann moest bij de adsorptie-analyse grofkorrelig  $\text{Al}_2\text{O}_3$  van Merck gebruikt worden, dit was bij deze firma echter niet te verkrijgen, zodat de proef met fijnkorrelig  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gedaan werd, hetgeen waarschijnlijk de oorzaak was van het mislukken van de scheiding. Daarom werd bij prof. Kuhn geïnformeerd, waar dit adsorbens te verkrijgen was.

Prof. Kuhn was zo welwillend ons een monster „adsorptiemengsel volgens Brockmann” te sturen, waarmee zonder meer een adsorptie-analyse uitgevoerd kon worden.

Bovendien deelde prof. Kuhn mee, dat gebleken was, dat bij de carotine-lycopine scheiding het gebruik van een mengsel van petroleumaether en benzol (1:1) als wasvloeistof beter voldeed.

De adsorptie-analyse werd nu opnieuw uitgevoerd met dit nieuwe adsorptiemateriaal en met de aangegeven wasvloeistof, waarbij nu goede resultaten verkregen werden. (Tabel 5).

Tabel 5.

Oorsponkelijk aanwezige hoeveelheid in 't mengsel.		Teruggevonden hoeveelheden.	
lycopine in $\gamma$ .	carotine in $\gamma$ .	lycopine in $\gamma$ .	carotine in $\gamma$ .
18,6	9,9	18,3	9,6
6,4	15,5	6,2	15,5
13,2	14,5	13.	14.

Het was mij hierna dus mogelijk carotine en lycopine quantitatief te scheiden.

Daar in de koolraap relatief veel lycopine voorkomt, (3 mg/kg) heb ik melk onderzocht van een koe, die veel koolraap als voedsel kreeg.

400 cc van deze melk werden op de bekende manier verzept en het petroleumaether-concentraat met behulp van de adsorptie-analyse op de aanwezigheid van lycopine onderzocht. Ik kon echter geen lycopine aantonen.

In gevallen, waarin de koe minder lycopine in het voedsel kreeg, leek het mij overbodig om volgens deze methode te onderzoeken of de melk ook lycopine bevatte, vooral omdat de kleurstofoplossing altijd spectroscopisch onderzocht werd, wanneer het voedsel der koeien veranderde. Behalve de bovengenoemde adsorptieanalyse kan het absorptiespectrum n.l. ook nog aanwijzingen geven omtrent de aanwezigheid van lycopine.

Een carotine-oplossing in petroleumaether vertoont banden, waarvan de extinctiemaxima liggen bij 484 en 451  $m\mu$ .

Een lycopine-oplossing heeft banden bij 506, 474 en 446  $m\mu$ . De hoogste band bij carotine ligt dus beneden 500  $m\mu$ , terwijl die van lycopine boven 500  $m\mu$  ligt.

Nemen we nu een carotine-oplossing en voegen hierbij wat lycopine-oplossing, dan wordt de band zeer duidelijk naar de langere golflengten verschoven.

Natuurlijk zijn kleine hoeveelheden lycopine volgens deze methode niet aan te tonen, daar de banden in het spectrum dan te weinig verschuiven. Dit was echter een gemakkelijke controlemethode, die ik altijd toepaste, wanneer het diëet van de koeien veranderde. Hierbij heb in geen enkel geval een band boven 500  $m\mu$  aangetroffen, ook niet bij de melk van de koe, die voornamelijk koolraap, dus lycopinehoudend voedsel kreeg.

Opgemerkt moet nog worden, dat dit in overeenstemming is met de resultaten van Gillam en Heilbron.<sup>86)</sup> Nadat ik mijn onderzoek reeds afgesloten had, publiceerden zij een verhandeling, waarbij zij door middel van de chromatografische- en spectroscopische methode de carotinoiden van de boter onderzochten.

Zij vonden, dat deze practisch geheel uit  $\alpha$ - en  $\beta$ -carotine bestonden, terwijl de verhouding van de hoeveelheid  $\alpha$ - en  $\beta$ -carotine wisselde.

In enige botermonsters, die veel pigment bevatten, konden zij een spoor kryptoxanthine aantonen, terwijl zij alleen in 1 monster Deense boter een spoor lycopine konden aantonen.

Daar xanthophyl en lycopine bij de bepalingen dus niet in storende hoeveelheden aanwezig zijn, heb ik bij de berekening van de hoeveelheid carotine uit de intensiteit van de gele kleur hiermee geen rekening gehouden.

#### D. Kort overzicht van de gehele methode voor de bepaling van het carotine- en vitamine A-gehalte van melk.

Hier volgt een beschrijving van de wijze, waarop in een bepaald geval de methode toegepast werd.

100 cc melk werden gedurende een uur op een waterbad met 100 cc vers bereide 20 % alcoholische KOH-oplossing, verzeeft.

De verzeefte massa werd met petroleumaether in een scheidtrechter uitgeschud, resp. met 100, 100 en 50 cc. De petroleumaetherextracten werden verzameld en in een scheidtrechter met water gewassen. De oplossing werd gedroogd met watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Nadat door filtreren het  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  verwijderd was, werd de oplossing ingedampt tot 5 cc en de intensiteit van de gele kleur werd in de Lovibondtintometer bepaald. Het volume werd door indampen op 1 cc gebracht.

Voor de Carr en Price-reactie werd hiervan 0,2 cc in het Lovibondbuisje gebracht; hierbij werd 2 cc  $\text{SbCl}_3$ -oplossing en 1 druppel azijnzuuranhydride gevoegd.

De intensiteit van de blauwe kleur werd dan snel in het Lovibondtoestel gemeten.



### E. De berekening van de hoeveelheid carotine uit de Lovibondwaarden.

Om uit de gevonden kleurintensiteit de hoeveelheid carotine te berekenen, werd gebruik gemaakt van Fig. II, waarvan de kromme het verband aangeeft tussen de carotineconcentratie en de afgelezen Lovibond eenheden geel (L. E. G.) (van Eekelen, Emmerie, Julius en Wolff <sup>44</sup>).

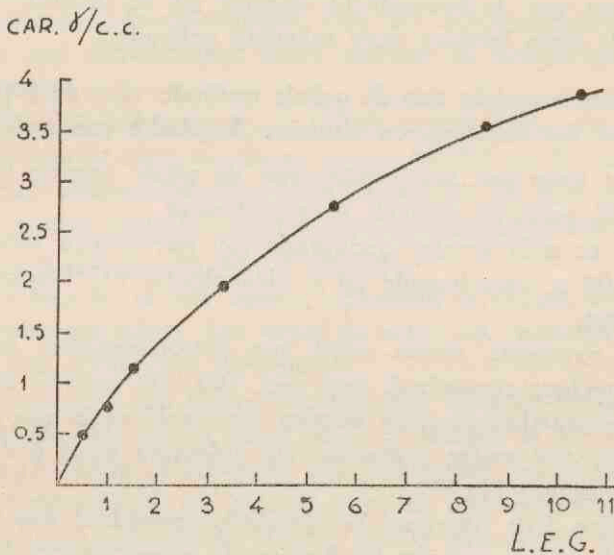


Fig. II.

Bij hoeveelheden van meer dan  $2,5\gamma$  carotine per cc ( $>5$  L. E. G.) wordt het aflezen in het Lovibond toestel onnauwkeurig.

Het volume van de ingedampde petroleumaether-oplossing werd daarom zo gekozen, dat het aantal  $\gamma$  carotine per cc

niet hoger was dan deze waarde. Het is dan mogelijk het carotine te bepalen met een fout van ten hoogste 5%.

#### F. De berekening van de hoeveelheid vitamine A uit de afgelezen Lovibondwaarden.

Om uit de gevonden kleurintensiteit de hoeveelheid vitamine A te kunnen bepalen, moeten we er rekening mee houden, dat carotine ook een blauwe kleur geeft met  $\text{SbCl}_3$  oplossing.

Wij lezen dus met de Lovibondtintometer een blauwe kleur af, die de som is van die, veroorzaakt door vitamine A en die, veroorzaakt door carotine. We moeten dus de hoeveelheid Lovibond eenheden blauw (L. E. B.), veroorzaakt door het carotine aftrekken van het aantal L. E. B., dat afgelezen werd.

Daar de hoeveelheid carotine reeds bepaald is, kan het aantal L. E. B. berekend worden, die deze hoeveelheid carotine geeft. Hiervoor werd gebruik gemaakt van Fig. III, waarvan de curve aangeeft hoeveel L. E. B. 0,2 cc van een bekende hoeveelheid carotine met 2 cc  $\text{SbCl}_3$ -oplossing geeft.

In de meeste gevallen was in de oplossing, die voor de Carr en Price-reactie gebruikt werd, de carotine concentratie beneden 20  $\gamma$ /cc. Voor deze concentratie wordt volgens deze kromme een Lovibondwaarde van 0,2 L. E. B. afgelezen. Daar deze waarde binnen de proeffout valt, heb ik in deze gevallen bij de vitamine A-bepaling geen rekening gehouden met de blauwe kleur, die veroorzaakt wordt door het aanwezige carotine. In een paar gevallen echter werd bij de berekening van de vitamine A-waarde een correctie voor de Carr en Price-reactie van carotine aangebracht.

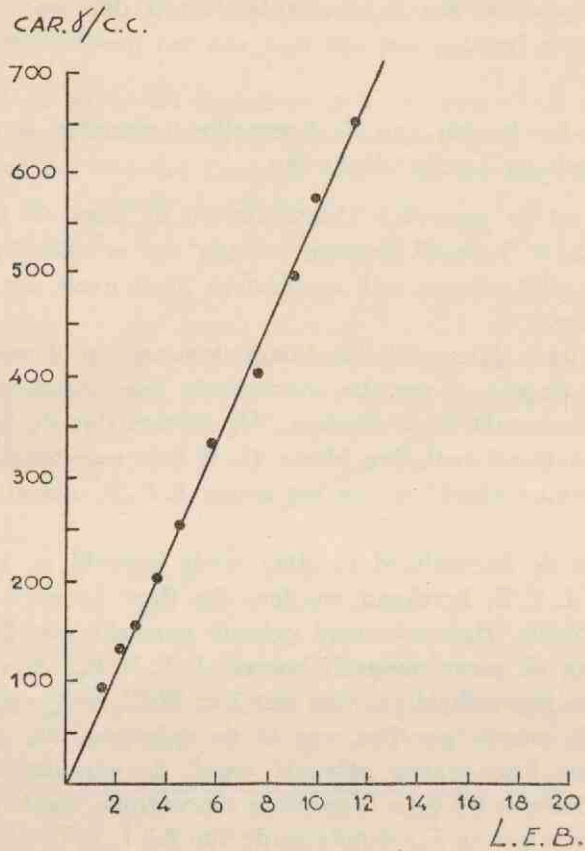


Fig. III.

### G. Toevoeging van een bekende hoeveelheid carotine en vitamine A.

Om te controleren of bij de bewerkingen voor de bepaling van carotine en vitamine A geen verliezen optreden, werd aan melk, waarvan ik eerst het carotinegehalte bepaald had, een bekende hoeveelheid carotine toegevoegd.

Door hierna opnieuw het carotinegehalte te bepalen, was

na te gaan, of de toegevoegde hoeveelheid carotine quantitief werd teruggevonden.

Ditzelfde deed ik ook met een bekende hoeveelheid vitamine A.

De carotine werd toegevoegd opgelost in petroleumaether. Hiervan werd een verdunde oplossing gemaakt, waarvan het gehalte eerst colorimetrisch bepaald werd.

Voor de toevoeging van vitamine A gebruikte ik een traan, waarvan de hoeveelheid vitamine A bekend was en waarvan een oplossing gemaakt werd in petroleumaether, die geschikt was voor het doel, dus ongeveer van dezelfde concentratie als die in melk.

Tabel 6.

Carotinegehalte in $\gamma$ per 100 cc. melk in duplobepalingen.		Toegevoegde hoeveelheid carotine in $\gamma$ .	Teruggevonden carotinewaarden in $\gamma$ , duplo's.	
I.	19,5	13	31	32
II.	17,5	14	30	32
III.	19	11	30	29

Tabel 7.

Vitamine A gehalte in L.E.B. p. 100 cc melk in duplobepalingen.			Toegevoegde hoeveelheid vit. A in L.E.B.	Teruggevonden hoeveelheid vit. A, in L.E.B., duplo's.	
I.	6	5,5	4	10	10
II.	4	4	2	6	6
III.	8	8	6	15	14,5

Uit de tabellen 6 en 7 blijkt, dat de toegevoegde hoeveelheden carotine en vitamine A met een fout van minder dan 10 % werden teruggevonden.



## HOOFDSTUK V.

### RESULTATEN VAN HET VITAMINE A- EN CAROTINE-ONDERZOEK VAN KOEMELK.

In het vorig hoofdstuk is de methode beschreven, volgens welke het carotine- en vitamine A-gehalte van een groot aantal monsters werd bepaald.

#### A. Monsterneming.

Door bemiddeling van de U. M. I. ontving ik elke week van bepaalde boeren monsters rauwe melk.

Tevens kreeg ik elke week gepasteuriseerde melk en zgn. „Stassanomelk”. Dit is melk, die gepasteuriseerd is, door deze gedurende zeer korte tijd (ong. 15 sec.) in uiterst dunne laag bloot te stellen aan verhitting op 75°. Dit geschiedt in een gesloten, dubbelwandig buizensysteem, waarvan de wanden op 1 mm afstand van elkaar geplaatst zijn.

De bedoeling van het onderzoek van deze monsters was het vitaminengehalte van de marktmelk na te gaan, gedurende de loop van het jaar.

Bovendien zond het Rijksproefstation te Hoorn wekelijks monsters van 7 koeien. De melk van deze koeien werd onderzocht om de invloed van diëetsverandering op het vitaminengehalte van de melk na te gaan.

## B. Het carotine- en vitamine A-gehalte van rauwe markt-melk.

De marktmelk werd onderzocht van eind September tot eind Mei, zodat dus de stalperiode en de weideperiode in het onderzoek betrokken waren.

Van de melkmonsters van 5 verschillende stallen werden elke week het carotine- en vitamine A-gehalte bepaald.

Uit de tabellen 8—12 en nog beter uit de krommen van fig. IV zien we, dat tijdens de weideperiode het vitamine A-gehalte zowel als het carotinegehalte het hoogst is.

Het gemiddelde vitamine A-gehalte van de weidemelk bedraagt 7,7 L.E.B. per 100 cc, terwijl dit voor stalmelk 3,3 L.E.B. is.

Het gemiddelde carotinegehalte is 24,9 $\gamma$  carotine per 100 cc weidemelk, voor stalmelk is dit 8 $\gamma$  per 100 cc.

Zoals in fig. IV te zien is, was het vitamine A- en het carotinegehalte, toen ik mijn bepalingen begon, lager dan in de verdere weideperiode, dit is waarschijnlijk een gevolg van het feit, dat alle koeien toen mond- en klauwzeer hadden.

Onmiddellijk nadat de koeien op stal zijn gekomen zien we een daling in het carotine- en vitamine A-gehalte optreden. Het vitamine A-gehalte daalde onmiddellijk tot het niveau, waarop het gedurende de winter bleef, de hoeveelheid carotine daarentegen nam minder snel af.

In de loop van de winter bleven de waarden vrij constant.

Omdat er zo weinig verandering optrad in het carotine- en vitamine A-gehalte, heb ik na 20 Maart met de bepalingen gewacht tot de koeien weer in de weide kwamen. Dadelijk nadat de koeien weer vers gras kregen, werden hogere waarden gevonden.

Van de melkmonsters werd ook het vetgehalte volgens de methode van Gerber bepaald. Hierdoor is het mogelijk het vitamine A- en carotinegehalte per gram vet op te geven.

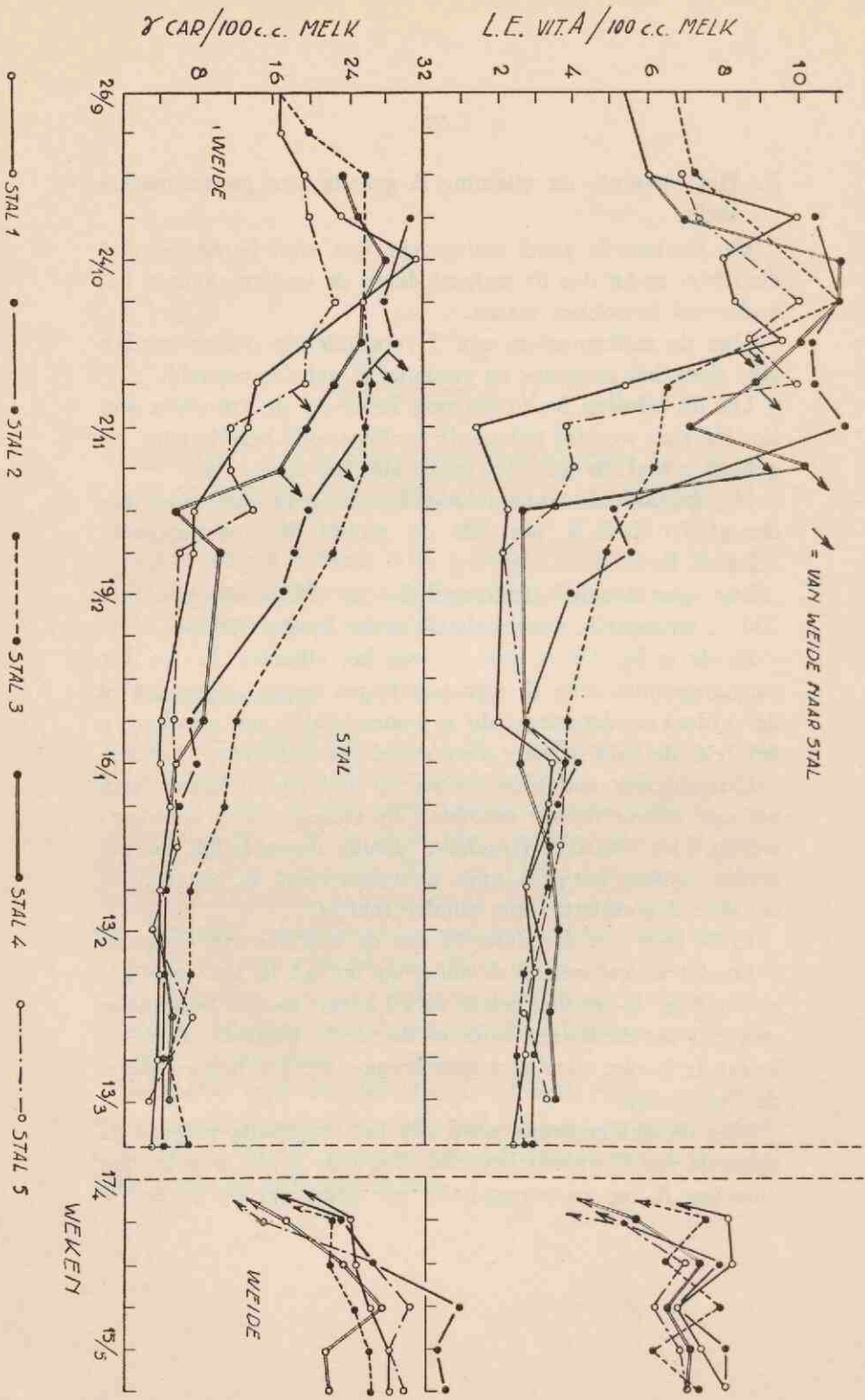


Fig. IV.

Daar het vetgehalte echter betrekkelijk weinig veranderingen ondergaat, geven de waarden voor het carotine- en vitamine A-gehalte per gram vet hetzelfde beeld te zien als die per 100 cc melk.

Tabel 13.

Stal- nummer.	Winter.			Zomer.		
	Car. in γ.	Vit. A in L.E.B.	int. eenh.	Car. in γ.	Vit. A in L.E.B.	int. eenh.
1	4,6	2,6	15	25	7,5	56
2	9,3	3,4	23	28	9,2	66
3	13,0	4,3	31	25	7,3	56
4	6,0	3,0	18	25	9,5	55
5	7,2	3,3	21	23	6,7	51

Uit tabel 13 zien we, dat de vitamine A-waarden van de melk van de verschillende stallen tijdens de weideperiode niet veel uiteenlopen. De verschillen zijn groter, wanneer de koeien op stal zijn. Zoals hierna nog zal blijken, moeten we dit toeschrijven aan een verschil in voeding van het vee.

### C. Het vitamine A- en carotine-gehalte van gepasteuriseerde melk.

Hoewel er geen reden is te veronderstellen, dat gepasteuriseerde melk een ander vitamine A- en carotinegehalte had dan rauwe melk, werd van deze melk toch het vitamine A- en carotinegehalte bepaald, daar we hierdoor een goed beeld krijgen van het vitamine A- en carotinegehalte van mengmelk.

Omdat ik deze monsters kreeg voor het bepalen van het vitamine C-gehalte, was het makkelijk deze hiervoor te gebruiken.



Tabel 14.

Gepasteuriseerde melk.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
15—11	3,3	22	7,6	6,8	2,3	0,83
22—11	3,3	20	6,2	6,1	1,9	0,51
29—11	3,4	17	8,0	5,0	2,3	1,07
13—12	3,2	11	2,7	3,2	0,8	0,83
10—1	3,3	7,7	2,7	2,3	0,8	0,70
17—1	3,15	5,7	3,7	1,8	1,2	0,26
24—1	3,1	4,7	3,3	1,5	1,1	0,26
7—2	3,1	4,8	3,1	1,5	1,0	0,57
14—2	3,1	4,2	2,7	1,3	0,9	0,57

Tabel 15.  
Stassanomelk.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
13—10	3,4	25	7,2	7,5	2,1	1,73
20—10	3,4	25	10,8	7,5	3,2	1,92
27—10	3,4	25	10,0	7,5	3,0	1,79
3—11	3,5	26	10,0	7,4	2,9	1,86
9—11	3,4	23	12,0	7,0	3,5	1,54
17—11	3,5	21	8,4	6,1	2,4	1,92
24—11	3,5	16	5,6	4,7	1,6	2,08
1—12	3,5	15	4,4	4,3	1,3	1,86
8—12	—	—	—	—	—	2,05
15—12	3,6	11	2,7	3,1	0,8	1,89
12—1	3,2	7,8	3,4	2,4	1,1	2,24
19—1	2,9	8,0	3,5	2,8	1,2	2,08
26—1	3,2	7,5	3,3	2,3	1,0	1,79
9—2	3,15	5,5	3,9	1,7	1,2	1,79
23—2	3,1	6,5	2,7	2,0	0,9	2,24
9—3	3,2	5,2	3,1	1,6	1,0	1,82
23—3	3,1	4,2	2,1	1,3	0,7	1,92
27—4	3,2	15	5,6	4,7	1,7	1,92
4—5	3,45	25	6,4	7,2	1,9	2,24
18—5	3,4	28	7,3	8,2	2,1	2,08
25—5	3,3	28	8,6	8,5	2,6	1,97

Uit de tabellen 14 en 15 is duidelijk te zien, dat de waarden practisch overeenkomen met die van rauwe melk.

#### D. Invloed van het diët van de koe op het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk.

Nadat vastgesteld was, dat marktmelk in de winter weinig carotine en vitamine A bevat, werd in samenwerking met het

Rijks-Landbouwproefstation te Hoorn geprobeerd om door diëetsverandering wintermelk te krijgen met een hoger carotine- en vitamine A-gehalte.

Hiervoor werd de melk van 7 koeien onderzocht, die in de loop van de winter op verschillende diëten gezet werden, waarbij tevens het carotinegehalte van de voedingsmiddelen werd bepaald.

#### 1. De bepaling van het carotine-gehalte van de voedingsmiddelen.

Voor het bepalen van het carotinegehalte in de voedingsmiddelen gebruikte ik de methode, die door Vermast<sup>87)</sup> aangegeven wordt.

Voor het onderzoek wordt het plantenmateriaal in kleine stukjes gesneden, daarna met zand en watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  samengewreven om de plantendelen te verbrijzelen en tevens te drogen.

De droge massa wordt in een Soxhlet apparaat met petroleumaether geëxtraheerd gedurende 5 uur. Hierna wordt deze oplossing met alcoholische KOH-oplossing verzeept. De verzepte massa wordt met water verdund, tot de alcoholconcentratie 50 % is en in een scheidrecther gebracht, waarna de petroleumaetherlaag wordt afgetapt. Dan wordt nog enige malen met petroleumaether uitgeschud tot de petroleumaetherlaag niet meer geel gekleurd is. De verzamelde petroleumaetherextracten worden met water gewassen en dan geconcentreerd door indampen. Deze oplossing bevat nu carotine en xanthophyl.

Het xanthophyl wordt verwijderd door uit te schudden met 85% alcohol, waarbij de carotine dus in de petroleumaetherlaag achterblijft (zie blz. 31) en de xanthophyl in de 85% alcohol oplost.

Door de petroleumaetheroplossing uit te wassen met water wordt de alcohol, die hierin achtergebleven is, verwijderd.

Daarna wordt de oplossing ingedampt tot een dergelijk volume, dat de intensiteit van de gele kleur in de Lovibond tintometer bepaald kan worden.

Nadat ik op deze wijze het carotine uit de voedingsmiddelen afgescheiden en bepaald had, werd ter controle tevens het absorptie spectrum van de verkregen petroleumaetheroplossingen onderzocht. In alle gevallen gaf dit een carotinespectrum te zien.

Bij het onderzoek van het spectrum der oplossing, die verkregen werd voor de bepaling van carotine in hooi was dit niet goed te zien door de aanwezigheid van sterinen. Deze konden echter door uitvriezen voor een groot gedeelte verwijderd worden; daarna was het spectrum duidelijk.

Voor het berekenen van de hoeveelheid carotine uit de gemeten kleurintensiteit maakte ik gebruik van Fig. II.

Tabel 16 geeft de hoeveelheden carotine aan, die in de voedingsmiddelen gevonden werden.

Tabel 16.

Voedingsmiddel.	Car. in $\gamma$ per 100 gram. Verschillende monsters.
hooi	78 — 92 — 120 — 220
krachtvoer	5 — 8,5 — 8,5 — 25
voederbiet	15
haverstroo	100
soyakoek	7,5
Zoutzuur silage	3500 — 4000
Hollands silage.	1880 — 2800 — 3000.

2. Het vitamine A- en carotine-gehalte van de melk tijdens de verschillende diëten.

Gedurende de eerste periode van 19 December—25 Januari en ook reeds enige tijd daarvoor kregen de koeien een normale wintervoeding.



Hieronder volgt het dagelijks rantsoen van de koeien met de daarin aanwezige hoeveelheid carotine.

## PERIODE I.

Dagelijks rantsoen.	Hoeveelheid carotine in mg hierin aanwezig.
12 kg hooi	15
5 kg krachtvoer. *)	0.6
	15.6

Uit de tabellen 16—22 (blz. 99—105) is te zien, dat na een diëtsverandering het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk de eerste weken niet constant is, omdat dan nog de invloed van het vorige diët te merken is. Daarom geven de cijfers van de laatste weken van een periode een duidelijker beeld van de samenhang tussen het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk en het diët in de verschillende perioden.

Om de gemiddelde waarden van het carotine- en vitamine A-gehalte tengevolge van een bepaald diët te berekenen, heb ik daarom alleen de cijfers van de 3 laatste weken van een voedingsperiode gebruikt.

Het gemiddelde carotinegehalte gedurende de laatste 3 weken van de 1e periode was 6,5 $\gamma$  carotine en het gemiddelde vitamine A-gehalte 3,4 L.E.B. per 100 cc melk. De totale vitamine A-waarde was dus 21 int. eenh.

Gedurende periode II van 29 Januari—2 Maart kregen de koeien het volgende rantsoen.

\*) Het krachtvoer bestond uit 1 dl. suikerpulp, 1 dl. cocosmeel, 1 dl. maïsmeel, 1 dl. gerstemeel, 1 dl. lijnmeel en  $\frac{3}{4}$  dl. grondnotenmeel. Hieraan was nog  $\frac{1}{4}$  % keukenzout toegevoegd.

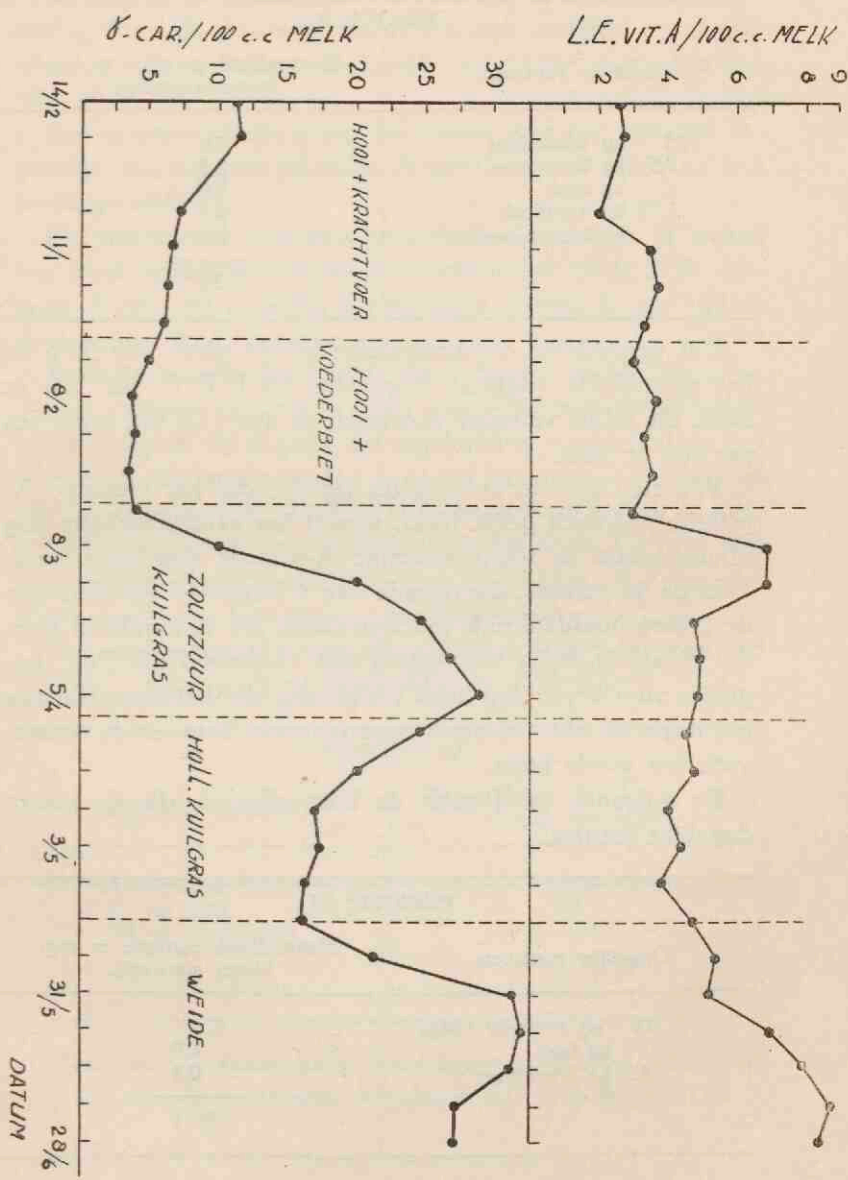


Fig. V. Melk uit Hoorn. Vitamine A en Carotine.

PERIODE II.	
Dagelijks rantsoen.	Hoeveelheid carotine in mg, hierin aanwezig.
35 kg voederbiet	5,3
2,5 kg haverstroo	2,5
4 kg hooi	5,0
1,75 kg soyakoek	0,1
1 kg krachtvoer	0,1
	13,0

Het gemiddelde carotinegehalte bij dit diët was 3,7 $\gamma$  en het gemiddelde vitamine A-gehalte 3,3 L.E.B. per 100 cc melk. De totale vitamine A-waarde is dus 17,6 int. eenheden per 100 cc melk.

We zien hieruit, evenals uit fig. V, dat het vitamine A-gehalte practisch gelijk bleef, terwijl het carotinegehalte nog afnam, zodat de totale vitamine A-waarde dus lager werd.

In de 3e periode, die duurde van 4 Maart—7 April kregen de koeien hoofdzakelijk zoutzuursilage. Dit is ingekuild gras, dat bereid is onder toevoeging van verdund HCl. Een dergelijke zuurtoevoeging heeft tot gevolg, dat het materiaal van het begin af aan vrij sterk zuur reageert, hetgeen de conservatie ten goede komt.

De volgende tabel geeft de hoeveelheden, die de koeien dagelijks kregen.

PERIODE III.	
Dagelijks rantsoen.	Hoeveelheid carotine in mg, hierin aanwezig.
18 kg zoutzuur silage	675
7 kg hooi	8,9
3,2 kg krachtvoer	0,4
	684,3

De opgenomen hoeveelheid carotine is in deze periode dus veel groter. Bij dit diët werd dan ook dadelijk een hoger carotine- en vitamine A-gehalte gevonden (zie tabellen 16—22 en fig. V).

Het carotinegehalte steeg langzamer dan het vitamine A-gehalte, het hoogste vitamine A-gehalte werd reeds na een week gevonden.

De gemiddelde waarden gedurende de laatste 3 weken van deze periode bedroegen 26 $\gamma$  carotine en 4,9 L. E. B. vitamine A per 100 cc melk. De vitamine A-waarde per 100 cc melk is dus 46,6 int.eenh.

In de 4e periode, die duurde van 7 April—16 Mei werd het zoutzuur silage vervangen door eenzelfde hoeveelheid Hollands kuilgras, dit is gras, dat ingekuuld is zonder toevoeging van HCl. De hoeveelheden hooi en krachtvoer bleven dezelfde als in periode III. Het kuilgras, dat de koeien in deze periode kregen, was van minder goede kwaliteit. De geur was zeer onaangenaam, hetgeen ermee samenhang, dat een gedeelte reeds een jaar tevoren ingekuuld was.

Het carotinegehalte van dit rantsoen was lager dan dat van het vorige, zoals uit onderstaande tabel blijkt.

PERIODE IV.	
Dagelijks rantsoen.	Hoeveelheid carotine in mg, hierin aanwezig.
18 kg Holl. kuilgras	460,8
8 kg hooi	10
3,2 kg krachtvoer	0,4
	471,2

Voor het carotinegehalte werd tijdens dit diët gemiddeld 17 $\gamma$  en voor het vitamine A-gehalte 4,1 L. E. B. per 100 cc



melk gevonden, de totale vitamine A-waarde is dus 34,2 int. eenh. per 100 cc. Hieruit blijkt, dat zowel het carotine- als het vitamine A-gehalte lager waren dan die van de vorige periode. Toch waren deze cijfers nog aanzienlijk hoger dan die van de eerste 2 perioden.

Bij de berekening van de gemidd. waarden van het carotine- en vitamine A-gehalte van de koeien op 26 April zijn de koeien 27 en 29 buiten beschouwing gelaten, omdat deze koeien toen ziek waren en tengevolge daarvan abnormaal veel carotine en vitamine A in hun melk hadden, zodat deze cijfers geen beeld gaven van de normale toestand.

Gedurende periode V van 22 Mei—27 Juni vertoefden de dieren, zoals in bijna alle delen van ons land gebruikelijk is, dag en nacht in de weide, waarbij geen extra bijvoeder werd toegediend.

Het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk werd toen hoger en bereikte de waarden van 39 $\gamma$  carotine en 8,1 L. E. B. vitamine A per 100 cc melk, wat dus 73 int. eenh. vitamine A per 100 cc melk is.

Vergelijken we de gemiddelde waarden van het vitamine A- en carotine-gehalte van de melk van de koeien onderling tijdens de verschillende perioden, zoals deze aangegeven zijn in de tabellen 16—22, dan zien we, dat er niet veel variatie optreedt. Nog minder verschil treedt op, wanneer we het carotine- en vitamine A-gehalte per gram vet vergelijken. Dit is zeer opmerkelijk, daar de gemiddelde dagelijkse melk-opbrengst van de afzonderlijke koeien vrij sterk uiteenloopt, zodat er van eenig verband tussen de vitamine A-waarde van de melk en de melkproductie geen sprake is.

---

## HOOFDSTUK VI.

### HET CAROTINE- EN VITAMINE A-GEHALTE VAN BOTER.

Om de chemische bepaling te vergelijken met de biologische, werden zoals in het volgende hoofdstuk besproken zal worden, dierproeven gedaan met ratten, die als enige vitamine A-bron boter kregen.

Het carotine- en vitamine A-gehalte van deze boter werden bepaald volgens een methode, die in hoofdzaak parallel loopt met de bepaling van carotine en vitamine A in melk.

#### A. Bepaling van het carotine- en vitamine A-gehalte van boter.

5 g boter werden verzeept met 2,5 cc verzadigde KOH-oplossing in water en 10 cc alcohol gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op een waterbad. <sup>69)</sup>

De oplossing werd na de verzeeping verdund met 40 cc water, bovendien werden 40 cc alcohol toegevoegd om de alcoholconcentratie op 50 % te brengen.

De oplossing werd met petroleumaether geëxtraheerd. Hierbij bleek, dat 3 maal extraheren met resp. 100, 100 en 50 cc petroleumaether niet voldoende was om alle vitamine A te kunnen uitschudden, 5—7 maal extraheren met 70 cc petroleumaether was echter voldoende.

De petroleumaether-extracten werden dan gewassen, met watervrij  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogd en ingedampt om in de Lovibond colorimeter de intensiteit van de gele kleur te kunnen bepalen. Uit de kleurintensiteit kunnen we het carotine-gehalte met behulp van Fig. II berekenen.

Voor de vitamine A-bepaling moest het extract geconcentreerd worden tot een volume van 1 à 2 cc.

De intensiteit van de blauwe kleur, die met de  $\text{SbCl}_3$ -oplossing verkregen wordt, werd eveneens op de bekende wijze in de Lovibond colorimeter bepaald. (Zie blz. 30).

Voor de berekening van het vitamine A-gehalte verwijs ik ook naar de bepaling in melk.

In Tabel 23 zijn de waarden aangegeven, die in de verschillende monsters boter gevonden werden. De gebruikte boter was gewone marktboter, die ik van de U. M. I. ontving.

Tabel 23.

Data.	Carotine in $\gamma$ per gr botervet.	Vit. A in L.E.B. per gr botervet.	Samen herleid tot int. eenh.
18—10	6,0	2,4	16,1
25—10	5,3	2,8	17,0
15—11	5,3	2,7	16,6
22—11	5,7	2,6	16,6
6—12	5,7	1,7	12,8
10—1	2,4	1,3	7,9
24—1	1,8	1,3	7,4
14—3	1,3	1,2	6,2

In de winter wordt de handelsboter gekleurd met bixine. Dit is een mono-ester van een dicarbonzuur. Wanneer de boter dus verzeept wordt en het carotine bepaald door de intensiteit van de gele kleur te meten in het onverzeepbare deel, stoort de aanwezigheid van bixine in de boter bij de bepaling niet, omdat het bixine dan ook verzeept is.

## HOOFDSTUK VII.

### DIERPROEVEN.

De dierproeven werden uitgevoerd om de chemische bepaling van de vitamine A-waarde van botervet te vergelijken met de biologische bepaling.

Zoals reeds meegedeeld is, gebruikte ik bij de dierproeven de curatieve groeitestmethode, waarbij ik de werking van het botervet vergeleek met die van een standaardpraeparaat van carotine.

Als proefdieren gebruikte ik ratten, waarvan het gewicht bij het begin van de proef 60—80 gram bedroeg. Deze ratten werden op het volgende vitamine A-vrije diët gezet:

caseïne (vetvrij)	100
amylum oryzae	273
zoutmengsel (Mc Collum 185)	25
arachisolie	50
gedroogde gist	50
vitamine D	500 eenheden per kg

Het zoutmengsel bestond uit:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,41
$\text{NaCl}$	5,19
$\text{MgSO}_4$	7,98
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	28,62
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,20
calciumlactaat	39,0
ijzercitraat	3,54
jodium	spoor.



De dieren werden tweemaal per week gewogen.

Eenige tijd nadat de dieren alleen een vitamine A-vrij diët krijgen, treedt een gewichtsstilstand op, tenslotte vallen de dieren af. Dat is het ogenblik, waarop met het toedienen van de carotine en het botervet begonnen wordt.

Tijdens deze periode sterven echter reeds veel dieren. Door sectie-onderzoek wordt nagegaan of dit een gevolg is van vitamine A-gebrek, waarbij speciaal gelet wordt op de toestand van de ogen, etterige darmontstekingen, het optreden van nier- en blaasstenen enz.

#### **De gevoerde carotine-oplossing.**

Het carotine, waarvan ik uitging was een internationaal standaardpraeparaat van  $\alpha$ - en  $\beta$ -carotine, waarvan  $1\gamma$  overeenkwam met de internationale eenheid.

10 mg van dit praeparaat werden opgelost in benzol en gemengd met 50 cc gezuiverde arachisolie. De benzol werd daarna in vacuum afgedampt. De olie-oplossing werd zodanig verdund, dat 1 druppel uit het gebruikte druppelflesje  $1\gamma$  carotine bevatte.

Van de aldus verkregen oplossing werden aan 2 groepen ratten dagelijkse hoeveelheden gevoerd, die 2 en  $3\gamma$  ( $\alpha + \beta$ ) carotine bevatten, daar over 't algemeen gevonden werd, dat de werkzame dosis carotine tussen deze grenzen ligt.

De verschillende doses carotine-oplossing werden in de bek van de rat gedruppeld.

Opgemerkt moet worden, dat gecontroleerd werd, of het carotinegehalte van de olie-oplossing tijdens de proef constant bleef.

#### **Het gevoerde botervet.**

Het botervet werd in gesmolten toestand gevoerd. Met een verdeelde 1 cc pipet werd het botervet afgemeten en in de

bek van de rat gepipetteerd, zodat ik er zeker van was, dat alles opgenomen werd.

Door van te voren verschillende met de pipet afgemeten volumina te wegen, wist ik het gewicht van de toegediende hoeveelheden botervet.

Van het botervet werden dergelijke hoeveelheden gegeven, dat de ratten volgens de chemische bepaling tussen de 2 en 3 int. eenheden vitamine A kregen, waardoor het mogelijk was de werking van het botervet met die van de carotine te vergelijken.

Hieronder volgt een overzicht van deze proeven:

Carotine ( $\alpha + \beta$ ) per dag in $\gamma$ .	int. eenh. per dagportie.	Gewichtstoename in 5 weken in grammen.
3	3	37
3	3	18
3	3	47
3	3	50
1 rat gestorven.		gemiddeld 38.
2	2	30
2	2	25
6 ratten gestorven.		gemiddeld 27,5.

Uit deze zeker niet geheel voldoende proefreeks is af te leiden, dat bij de omstandigheden, waaronder de ratten leefden, de dagdosis ( $\alpha + \beta$ ) carotine ruim 2 internationale eenheden is.

Het toedienen van 2 int. eenh. was niet genoeg, daar hier van de 8 ratten 6 gestorven zijn; 3 int. eenheden was zeker een te grote dosis, omdat de gemiddelde gewichtstoename in

5 weken 38 g was, terwijl over het algemeen aangenomen wordt, dat ratten juist genoeg vitamine A krijgen, wanneer de gemiddelde gewichtstoename in 5 weken 15 g bedraagt.

Hieronder volgen de gegevens van de ratten, die botervet kregen.

Botervet per dag in grammen.	Carotine in int. eenh. per gram vet.	Vitamine A in int. eenh. per gram vet.	Int. eenh. per gram vet.	Int. eenh. per dagportie.	gewichtstoename in 5 weken in grammen.
0,3	1,9	5,5	7,4	2,2	27
0,3	1,9	5,5	7,4	2,2	6
0,3	1,9	5,5	7,4	2,2	20
0,3	1,9	5,5	7,4	2,2	35
0,3	1,9	5,5	7,4	2,2	17
2 ratten gestorven.					gemiddeld 21
0,35	1,3	4,9	6,2	2,2	11
0,35	1,3	4,9	6,2	2,2	9
4 ratten gestorven.					gemiddeld 10
0,19	5,4	7,4	12,8	2,4	33
0,19	5,4	7,4	12,8	2,4	30
					gemiddeld 31
0,2	5,3	11,3	16,6	3,3	41
0,2	5,3	11,3	16,6	3,3	54
0,2	5,3	11,3	16,6	3,3	55
0,2	5,3	11,3	16,6	3,3	62
0,2	5,3	11,3	16,6	3,3	68
					gemiddeld 56

Uit dit overzicht is te zien, dat ratten, die zoveel botervet kregen, dat zij volgens mijn bepalingen 3,3 int. eenh. vitamine A ontvingen, zeer snel in gewicht toenamen, zodat dit zeker een te grote dosis was.

Bij ratten, die 2,2 int. eenh. kregen, was deze hoeveelheid ongeveer voldoende, hetgeen hieruit blijkt, dat dit in het ene geval iets te veel, in het andere geval te weinig was, terwijl bij 2 ratten 2,4 int. eenheden vitamine A ook ruim voldoende was.

Bij het botervet werd dus eveneens gevonden, dat de dagdosis voor de rat tussen de 2 en 3 int. eenh. lag. Dit komt dus geheel overeen met de controleproeven, zodat we kunnen concluderen, dat de resultaten van de chemisch-colorimetrische bepaling van het botervet en dus ook van melk een beeld geven van de vitamine A-waarde.



## HOOFDSTUK VIII.

### OVERZICHT VAN HET VITAMINE C.

#### A. Verschijnselen, die optreden bij vitamine C-gebrek.

De avitaminose C draagt de naam van scheurbuik of scorbuut, een ziekte, die vroeger veel voorkwam, vooral op schepen.

Scorbuut kenmerkt zich door de volgende verschijnselen: tandvlesbloedingen, subcutane bloedingen, pijnlijke en gezwollen gewrichten en anaemie. Bovendien is één van de typische verschijnselen, het zwaktegevoel, waardoor de mensen alle energie missen om te werken.

#### B. Historie.

Dat de ziekte met een onvoldoend diëet te maken had, was sinds lang bekend en reeds in het midden van de 18e eeuw wees een Brits marinedokter James Lind <sup>88)</sup> erop, dat het gebruik van verse groenten en vruchten een geneesmiddel was tegen scheurbuik.

De eerste belangrijke stap in de goede richting bij het wetenschappelijk onderzoek is in de jaren 1907—1912 gedaan door twee Denen Holst en Fröhlich. <sup>89)</sup> Het is aan hen voor het eerst gelukt de toen alleen nog maar bij mensen bekende ziekte kunstmatig op te wekken bij caviae, door deze te voeren met zemelen, haver en aan de lucht verhit melk-

poeder, botervet, wat zout en water. De dieren vertoonden na 1 maand op dit diët geleefd te hebben ziekteverschijnselen, die precies overeenkwamen met de scheurbuik bij de mens. Holst en Fröhlich konden daarbij de genezende werking van verse vruchten en groenten vaststellen.

Na dien tijd zijn er zeer veel onderzoeken gedaan over de anti-scorbutische stof, die vitamine C genoemd werd. Men heeft getracht het vitamine uit de plantensappen te isoleren, maar stuitte daarbij op de moeilijkheid, dat het vitamine zeer onbestendig bleek.

In 1927 werd door Tillmans<sup>90)</sup> gevonden, dat uitgeperst citroensap en de antiscorbutische fracties daarvan phenolindophenol reduceren. Deze eigenschap gaat in alkalisch milieu bij aanwezigheid van lucht verloren, evenals de antiscorbutische werkzaamheid.

Zilva,<sup>91)</sup> die zich ook veel met het vitamine C-probleem heeft beziggehouden, vond, dat er geen correlatie bestond tussen het reductievermogen en de antiscorbutische werking van citroensap. Hij vermoedde daarom, dat de reducerende stof een begeleider was van het antiscorbutische agens.

Eind 1931 publiceerde Rygh<sup>92)</sup> zijn opzienbarende ontdekking betreffende de chemische samenstelling van vitamine C. Hij bereidde uit het aetherextract van zwak alkalisch gemaakt sinaasappelsap een praeparaat, dat volgens hem zeer actief was. Dit bestond uit kristallen van het alkaloid narcotine en een olie, welke laatste de drager van het vitamine C zou zijn. Narcotine beschouwde hij als provitamine C.

Door bestraling van narcotine met ultraviolet licht bereidde hij verschillende derivaten, waarvan het methylnarcotine reeds bij een dagelijkse dosis van 0,02 mg caviae voor scheurbuik kon behoeden. Volgens hem was methylnarcotine identiek met vitamine C.

Natuurlijk werd het door Rygh gevondene spoedig ge-

controleerd. Tillmans en Hirsch <sup>93)</sup>, Dalmer en Moll, <sup>94)</sup> Ott en Packendorf, <sup>95)</sup> Brüggemans <sup>96)</sup> Grant, Smith en Zilva <sup>97)</sup> kwamen daarbij tot conclusies, die als volgt samen te vatten zijn:

1. Methylnornarcotine of andere narcotineproducten hebben geen antiscorbutische werking.
  2. Rygh's narcotine-praeparaten vertonen ten opzichte van de indicator van Tillmans niet het voor vitamine C karakteristieke reductievermogen.
  3. Narcotine kan niet uit sinaasappelen geïsoleerd worden.
- Het behoeft dus geen betoog, dat deze schrijvers eenparig van mening waren, dat methylnornarcotine en vitamine C niet identiek waren.

Rygh <sup>98)</sup> bleef bij zijn oorspronkelijke mening. Hij vond echter bovendien, dat bij scorbutische dieren de glucuronzuurafscheiding in de urine ophield. Toedienen van glucuronzuur beïnvloedde de scorbut niet, wel methylnornarcotine + glucuronzuur. Daarom beschouwde hij nu het complex glucuronzuur + methylnornarcotine als de antiscorbutische factor.

Weer werden Rygh's waarnemingen gecontroleerd, maar weer kon niemand ze bevestigen. <sup>99)</sup> <sup>100)</sup> <sup>101)</sup> <sup>102)</sup>

Toch hebben Rygh's publicaties wel enige verdienste gehad. Hierdoor werd n.l. het vitamine C-probleem door verschillende onderzoekers aangepakt.

Intussen hadden Tillmans <sup>103)</sup> en medewerkers in tegenstelling met Zilva gevonden, dat er wel correlatie bestaat tussen het vitamine C-gehalte en het reductievermogen ten opzichte van de indicator 2-6-dichloorphenolindophenol.

Deze onderzoeken brachten Szent Györgyi <sup>104)</sup> ertoe terug te komen op zijn proeven van 1928. Hij had toen bij een onderzoek van peroxydase-systemen in plantensap (koolbladen en sinaasappels) en in de bijniere van het rund een sterk reducerende stof ontdekt. Het gelukte hem deze stof

te isoleren en het moleculairgewicht te bepalen. Uit de elementairanalyse en het moleculairgewicht volgde, dat de samenstelling  $C_6H_8O_6$  was. De stof gaf alle typische koolhydraatreacties, zodat Szent Györgyi kon besluiten, dat het een isomeer was van glucuronzuur, hij noemde het hexuronzuur. Dit hexuronzuur ging hij na de publicatie van Tillmans onderzoeken op de antiscorbutische werkzaamheid. Hij <sup>105)</sup> nam proeven met caviae en vond, dat ongeveer 1 mg per dag deze dieren voor scheurbuik kon behoeden.

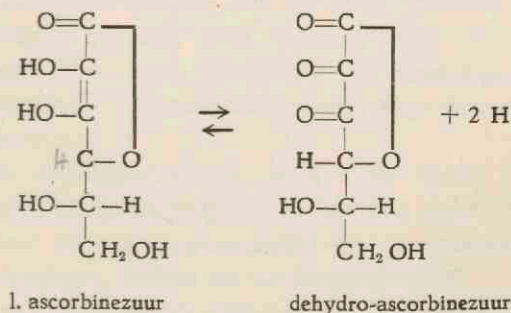
King en Waugh, <sup>106)</sup> Tillmans, <sup>93)</sup> Harris en Ray <sup>107)</sup> en Brüggemann <sup>108)</sup> kregen hierna overeenkomstige resultaten. Zij zijn overtuigd, dat het hexuronzuur van Szent Györgyi, later ascorbinezuur <sup>109)</sup> genoemd, identiek is met vitamine C.

### C. Constitutie van het Ascorbinezuur.

Nadat men wist, dat het vitamine C identiek is met ascorbinezuur, werd snel gewerkt om de constitutie op te helderen.

Hieraan hebben vooral Szent Györgyi c.s., <sup>110)</sup> Karrer c.s., <sup>111)</sup> Hirst c.s. <sup>112)</sup> en Micheel en Kraft <sup>113)</sup> deelgenomen.

Als resultaat van deze onderzoekingen werd de volgende formule aangenomen.





De juistheid van deze structuurformule werd tenslotte be-  
wezen, door de synthetische bereiding van l. ascorbinezuur.

De synthese is het eerst gelukt aan Reichstein<sup>114)</sup> en  
ongeveer gelijktijdig aan Haworth.<sup>115)</sup>

Het synthetische l. ascorbinezuur bleek zowel bij de dier-  
proef en ook als geneesmiddel voor lijders aan scheurbuik  
dezelfde werkzaamheid te bezitten als het uit planten gewon-  
nen materiaal.

Volgens bovenstaande formule is zowel het zure karakter  
als het reducerend vermogen te danken aan de endiolgroep;  
het dehydro-ascorbinezuur en het dimethyl-ascorbinezuur  
hebben deze eigenschappen verloren.

Over de specifieke werking van het vitamine in het orga-  
nisme is weinig bekend. Uit het feit, dat d. ascorbinezuur bij  
de dierproef onwerkzaam is, blijkt wel, dat dit niet eenvoudig  
te verklaren is door te wijzen op het feit, dat l. ascorbinezuur  
als oxydatie-reductiesysteem kan optreden.

---

## HOOFDSTUK IX.

### BEPALING VAN HET VITAMINE C-GEHALTE.

#### A. De dierproef.

De bepaling van het vitamine C-gehalte geschiedde oorspronkelijk alleen met behulp van de dierproef en als proefdier werd meestal de cavia gebruikt. Een enkele maal werkte men wel eens met apen, maar dit is om praktische redenen tot weinige gevallen beperkt gebleven.

Ook bij de dierproef voor de vitamine C-bepaling zijn curatieve en prophylactische testmethodes in gebruik.

Bij de prophylactische methode bepaalt men de kleinste hoeveelheid van de op vitamine C te onderzoeken stof, die juist de proefdieren scorbuutvrij kan houden. Hiervoor worden de dieren op een vitamine C-vrij gronddieet gezet en opklimmende hoeveelheden van de stof, waarvan het vitamine C-gehalte bepaald moet worden, bijgevoerd. In den beginne gebruikte men citroensap of sinaasappelsap als controlemateriaal. Tegenwoordig neemt men hiervoor zuiver ascorbinezuur.

Voor de scorbuutdiagnose worden de dieren geseceerd, terwijl tevens de gewichtscurve in het oog gehouden wordt. Bij de sectie let men voornamelijk op de toestand van de tanden, beenderen, ribben en op h morrhagi n.

Een andere prophylactische methode is de methode van

Höjer, waarbij gebruik gemaakt wordt van het feit, dat reeds lang voor het optreden van duidelijke scorbuutsymptomen veranderingen aan de wortels van de snijtanden gevonden worden bij een histologisch onderzoek van deze tanden.

De curatieve methode berust op het verschijnsel, dat dieren, die op een vitamine C-vrij gronddieet leven, na enige tijd niet meer groeien en in gewicht afnemen, waarna ze door het voeren van de vitamine C-houdende stof weer zwaarder worden. De toeneming van het gewicht is binnen zekere grenzen een maat voor de hoeveelheid vitamine C, die de dieren krijgen.

Evenals bij de vitamine A-bepaling reeds opgemerkt is, is de biologische proef langdurig en bewerkelijk, terwijl bovendien de variatie in de gevoeligheid van de proefdieren een factor is, die tot het maken van grote fouten aanleiding kan geven.

Er is dan ook naar een chemische reactie gezocht, om het vitamine C quantitatief te kunnen bepalen.

## B. Chemische bepalingsmethodes.

Reeds in 1921 heeft Bezzonoff <sup>116)</sup> een reagens voor vitamine C aangegeven. Dit reagens, een complex phosphor-molybdeenwolframzuur geeft met vitamine C-houdende oplossingen in zuur milieu een blauw violette kleur.

Glassmann en Posdeew <sup>117)</sup> toonden aan, dat dit reagens niet voor een quantitative bepaling van vitamine C in aanmerking kon komen, omdat koolhydraten dezelfde kleurreactie geven.

Daarna hebben Tillmans c.s. <sup>103)</sup> het 2-6-dichloorphenolindophenol als reagens aanbevolen. Dit wordt ook nu nog gebruikt voor de bepaling van vitamine C. De hoeveel-

heid wordt door titratie met het 2-6-dichloorphenolindophenol als indicator vastgesteld. De in neutraal milieu blauwe, in zuur milieu rode kleurstof wordt door het vitamine gereduceerd tot zijn leukovorm. Het eindpunt van de titratie is dus het zichtbaar blijven van een blauwe, resp. rode kleur.

Tillmans <sup>103)</sup> titreerde in praktisch neutraal milieu. Door de resultaten van een groot aantal titraties te vergelijken met die van de dierproef concludeerde hij, dat de vitamine C-werking toe te schrijven is aan de getitreeerde reducerende stof.

Harris en Ray <sup>119)</sup> kregen betere resultaten, wanneer zij de titratie van vitamine C met 2-6-dichloorphenolindophenol uitvoerden in zuur milieu. De oorzaak hiervan is, dat het vermogen om 2-6-dichloorphenolindophenol te reduceren, een eigenschap is, die niet specifiek is voor vitamine C, maar die alle redox-systemen bezitten, die eenzelfde of lagere oxydatie-reductiepotentiaal dan ascorbinezuur hebben bij een bepaalde  $p_H$ . Zij vonden, dat glutathion in zuur milieu niet de indicator reduceerde, wél echter onder de omstandigheden, waarbij Tillmans titreerde. Daar in biologisch materiaal vaak glutathion voorkomt, raden zij aan, de titratie in zuur milieu uit te voeren.

Ook Wolff c.s. <sup>120)</sup> geven de voorkeur aan titratie in zuur milieu.

Uit het voorgaande blijkt dus, dat we de op vitamine C te onderzoeken stof in zuur milieu moeten brengen of met een zure oplossing moeten extraheren. Hiervoor wordt meestal 3% trichloorazijnzuur gebruikt. In dit milieu kunnen we de titratie uitvoeren.

### C. Reductie met $H_2S$ .

Daar zowel de reversibel geoxydeerde- als de gereduceerde vorm van het ascorbinezuur antiscorbutische werkzaamheid



bezitten, is het noodzakelijk bij de titratie van de vitamine C-waarde beide vormen te bepalen.

Met de indicator 2-6-dichloorphenolindophenol bepalen we alleen de gereduceerde vorm van het ascorbinezuur. Wanneer we de totale vitamine C-waarde met dit reagens willen bepalen, dan dienen wij ervoor te zorgen, dat alle aanwezige vitamine C in de gereduceerde vorm aanwezig is.

Dit is mogelijk met behulp van  $H_2S$ , zoals Tillmans<sup>103)</sup> dit het eerst aangegeven heeft. De reductie geschiedt gedurende 6 uur in zwak zuur milieu, omdat in alkalisch milieu reducerende zwavelverbindingen ontstaan.

Wanneer geëxtraheerd wordt met trichloorazijnzuuroplossing moet men deze voor de  $H_2S$ -behandeling eerst neutraliseren, daar het vitamine C-gehalte bij een dergelijke zuurgraad op den duur achteruitgaat. (Emmerie c.s.<sup>121)</sup>.

Na afloop van de reductie moet het  $H_2S$  weer geheel verwijderd worden, daar dit zelf ook de indicator kan reduceren. Om het  $H_2S$  te verdrijven wordt een  $N_2$ -stroom doorgeleid. Daarna wordt vóór de titratie de oplossing weer aangezuurd.

Door het titreren in zuur milieu na voorafgaande behandeling met  $H_2S$  zijn we in staat in veel gevallen het vitamine C-gehalte nauwkeurig te bepalen.

#### D. De kwikacetaatbehandeling.

We kunnen echter bij deze methode in sommige gevallen foutieve uitkomsten krijgen, doordat cysteïne, ergothioneïne en thiosulfaten<sup>122)</sup> in zuur milieu ook de indicator reduceren.

Volgens Emmerie<sup>123)</sup> kan men cysteïne, ergothioneïne e.a. reducerende zwavelverbindingen verwijderen met behulp van mercuri-acetaat-oplossing.

Voegt men bij een oplossing, die vitamine C naast bovengenoemde verbindingen bevat, mercuriacetaatoplossing, dan worden cysteïne enz. geprecipiteerd, terwijl vitamine C in

oplossing blijft. Het vitamine C wordt bij deze behandeling reversibel geoxydeerd, zodat reductie met  $H_2S$  nodig is om het te kunnen titreren. Deze praecipitatie met kwikacetaat-oplossing heeft tevens het voordeel, dat de rode kleurstoffen, die in sommige vruchten voorkomen en dan de titratie onmogelijk maken tegelijkertijd worden verwijderd.

Na deze verbetering van de methode kunnen we deze toch nog niet in alle gevallen toepassen, zoals blijkt uit de publicaties van Euler en Martius <sup>124)</sup> en van Eekelen en Ruysen. <sup>125)</sup>

Euler en Martius verkregen door verwarming van glucose in alkalisch milieu stoffen, die zij reductonen noemden. Deze reductonen reduceren de indicator 2-6-dichloorphenolindophenol in zuur milieu, bezitten echter geen antiscorbutische werking. (Svirbely en Szent Györgyi <sup>126)</sup>.)

Van Eekelen en Ruysen wezen erop, dat bij processen, waarbij suikers verhit worden, zoals o.a. branden van koffiebonen, bakken van brood, dergelijke reductonen ontstaan, die niet neergeslagen worden met kwikacetaatoplossing en in zure oplossing de indicator reduceren.

We komen dus tot de slotsom, dat niettegenstaande dit bezwaar de titratie met de indicator 2-6-dichloorphenolindophenol in zuur milieu, na praecipitatie met kwikacetaat, momenteel de meest betrouwbare manier is om vitamine C chemisch te bepalen. In bepaalde gevallen zal de dierproef echter te hulp moeten worden geroepen.

## HOOFDSTUK X.

### BESPREKING VAN DE LITERATUUR OVER HET VITAMINE C-GEHALTE VAN KOEMELK.

In het vorig hoofdstuk hebben we gezien, dat het vroeger alleen mogelijk was het vitamine C-gehalte met behulp van de dierproef te bepalen. Door verschillende onderzoekers is deze methode ook toegepast voor de vitamine C-bepaling van melk.

#### A. De Dierproef.

Chick c.s. <sup>127)</sup> vonden in 1918, dat caviae op een vitamine C-vrij diëet geheel tegen scorbuut beschermd werden, wanneer zij gemiddeld 85 cc verse melk per dag kregen.

Hart c.s. <sup>128)</sup> onderzochten de melk van koeien, die een verschillend diëet kregen. Zij kwamen tot het resultaat, dat dagelijks 50 cc zomermelk, d.w.z. melk van koeien, die vers gras kregen, voldoende was om een cavia scorbuutvrij te houden, terwijl van wintermelk 75 cc dagelijks nodig was. Volgens hen bevatte zomermelk dus meer vitamine C dan wintermelk.

Tot dezelfde conclusie kwamen Dutcher en medewerkers. <sup>129)</sup> Zij gebruikten voor hun onderzoek winter- en zomermelk van dezelfde koeien om individuele invloeden uit te schakelen.

Dergelijke proeven namen ook Hess c.s. <sup>130)</sup> Zij vonden

eveneens dat weidemelk meer vitamine C bevat dan stalmelk. Doordat zij de melk volgens het walsenproces droogden en enige tijd bewaarden (hetgeen zeer zeker het vitamine C-gehalte beïnvloedt), voordat zij deze aan de caviae voerden, hebben hun proeven echter weinig waarde.

Reyer beweerde <sup>131)</sup>, dat koeien, die op een vitamine C-arm diëet geleefd hebben, ongeveer 2 à 3 maanden met vitamine C-rijk voedsel gevoerd moesten worden, voordat zij vitamine C-rijke melk leverden. Dit laatste is niet in overeenstemming met de waarnemingen van Dutcher c.s., <sup>129)</sup> die 2 weken na een diëetsverandering al een duidelijk verschil in vitamine C-gehalte van de melk vonden.

Kieferle en Zeiler <sup>132)</sup> vergeleken melk van koeien, die met silage gevoerd werden met wintermelk. Zij vonden, dat resp. 45 cc en 60 cc melk voldoende waren om caviae scorbuutvrij te houden.

Na een dergelijk vergelijkend onderzoek kwam Mc. Leod <sup>133)</sup> tot de slotsom, dat men door middel van silagevoer de seizoenvariaties in het vitamine C-gehalte kan voorkomen.

Een zelfde onderzoek hadden Olson en Copeland <sup>134)</sup> reeds in 1924 gedaan, waarbij zij eveneens vonden, dat silagemelk meer vitamine C bevatte.

Tegenover Hart c.s., Dutcher c.s., Hess c.s. en Reyer staan andere onderzoekers, die van diëetsverandering geen invloed waarnemen, n.l. Hughes <sup>35)</sup> en medewerkers, terwijl ook de Ruyter de Wildt en Brouwer <sup>136)</sup> bij een 2-jarig onderzoek van weidemelk en stalmelk geen opvallend verschil in vitamine C-gehalte konden aantonen.

## B. De Chemische bepalingsmethode.

Schlemmer <sup>137)</sup> en medewerkers zijn de eersten, die



een uitgebreid onderzoek naar het vitamine C-gehalte van de melk instelden door middel van de titratiemethode met de indicator 2-6-dichloorphenol-indophenol.

Hun methode is als volgt: De melk werd met neutraal loodacetaat onteiwit, de overmaat Pb. verwijderd met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en afgefiltreerd. Het verkregen serum werd getitreerd volgens Tillmans. Zij reduceerden niet met  $\text{H}_2\text{S}$ , waardoor de reversibel geoxydeerde vorm van vitamine C dus niet getitreerd werd.

Het is dus geen wonder, dat zij grote schommelingen in hun titratiewaarden kregen. Zij vonden voor melk van dezelfde koe op hetzelfde diët meermalen waarden, die 90 tot 95% verschillen voor 2 opeenvolgende bepalingen. Zij verklaarden deze verschillen door invloeden van temperatuur, weersverandering en stalomstandigheden. Het is echter duidelijk, dat deze verschillen aan hun methode te wijten zijn.

Zelf merkten zij reeds op, dat het een nadeel van hun methode is, dat de reduceerende factor in de onteiwitte melk sterk achteruitgaat, nl. binnen een uur 60%.

De storingen, die hiervan het gevolg zijn, trachtten zij op te heffen door te werken onder steeds reproduceerbare omstandigheden, wat hun blijkbaar niet gelukt is. Daar zij de  $\text{H}_2\text{S}$  reductie niet toepasten, moet deze snelle achteruitgang toegeschreven worden aan de reversibele oxydatie, die in het neutrale milieu, waarin zij werkten nog sneller verloopt dan in zwak zuur milieu. Tenslotte moet nog opgemerkt worden, dat ascorbinezuur in neutraal milieu door loodacetaat gedeeltelijk gepraecipiteerd wordt, zodat dit ook hun resultaten beïnvloed heeft.

Zij vonden per 100 cc melk hoeveelheden vitamine C, die varieerden van 0,14 tot 3,40 mg. Zij konden geen invloed van het diët op het vitamine C-gehalte van de melk waarnemen.

Na het voorafgaande is het echter duidelijk, dat we aan hun resultaten en conclusies niet veel waarde kunnen hechten.

Kon,<sup>138)</sup> die ook de invloed van het voedsel op het vitamine C-gehalte van de melk onderzocht, is de tweede, die hiervoor de titratiemethode toepaste. Hij titreerde volgens Harris en Ray, dus in zuur milieu. De melk werd met trichloorazijnzuuroplossing onteiwit. Hierna bepaalde hij het aantal cc trichloorazijnzuurfiltraat, dat nodig is om 0,05 cc van een 0,1% oplossing van de indicator te ontkleuren.

Een nadeel van deze methode lijkt mij het vullen van de microburet met het melkserum inplaats van met de indicator. Voor elke bepaling moet de microburet opnieuw schoongemaakt en gevuld worden. Doordat Kon evenals Schlemmer c.s. het reversibel geoxydeerde vitamine C vóór de titratie niet met  $H_2S$  reduceerde, bepaalde hij ook niet het totale vitamine C-gehalte, maar alleen de gereduceerde vorm hiervan. Hij vond dan ook, dat het vitamine C-gehalte van de melk zeer snel achteruit ging. Het is duidelijk, dat dit voornamelijk aan de reversibele oxydatie te wijten is.

Uit het geringe aantal bepalingen, die hij tijdens de winter- en zomervoeding gedaan heeft, kon hij geen conclusies trekken over de invloed van het voedsel op het vitamine C-gehalte, daar hij evenals Schlemmer te grote fluctuaties vond in het gehalte van de melk van koeien, die hij bij gelijke voedingsomstandigheden dagelijks onderzocht.

Kon publiceerde de titratiewaarden van de onteiwitte melk. Hieruit kunnen we het vitamine C-gehalte van de melk echter niet berekenen, daar hij niet opgaf, hoeveel trichloorazijnzuuroplossing hij gebruikte om de melk te onteiwitten.

---

## HOOFDSTUK XI.

### HET BEPALEN VAN HET VITAMINE C-GEHALTE VAN KOEMELK.

Voor de bepaling van het vitamine C-gehalte van melk moet deze eerst onteiwit worden, daar dan een helder kleurloze vloeistof verkregen wordt, die makkelijk te titreren is.

De melk werd onteiwit met metaphosphorzuur- of trichloorazijnzuur-oplossing.

Om te bepalen hoeveel  $\text{HPO}_3$  resp.  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  hiervoor nodig is, werd een reeks buizen gevuld met 10 cc melk en hieraan opklimmende hoeveelheden 10 %  $\text{HPO}_3$  (resp. 20 %  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) toegevoegd.

Het gecoaguleerde eiwit werd afgefiltreerd en de filtraten werden opnieuw met  $\text{HPO}_3$  resp.  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  behandeld.

Gevonden werd, dat voor 10 cc melk 6 cc 10 %  $\text{HPO}_3$ -oplossing of 6 cc 20 %  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ -oplossing nodig zijn om de melk te onteiwitten.

#### A. Uitvoering van de bepaling.

25 cc melk worden onteiwit met 15 cc 10 % metaphosphorzuur- of met 15 cc 20 % trichloorazijnzuur-oplossing.

5 cc van het filtraat worden dadelijk getitreerd met een gestelde 2-6-dichloor-phenolindophenoloplossing, die zich in een microburet bevindt (titratie vóór reductie). Omdat het vitamine C onbestendig is in een dergelijk zuur milieu brengt



men bij de rest van het filtraat vast  $\text{CaCO}_3$ , waardoor de  $p_H$  ongeveer 5 wordt. Om het reversibel geoxydeerde vitamine C om te zetten in de gereduceerde vorm wordt in deze oplossing 10 minuten  $\text{H}_2\text{S}$  geleid; de reageerbuis, waarin de vloeistof aanwezig is, wordt met een kurk afgesloten, waarna men deze ongeveer 6 uur laat staan. Na de reductie wordt 10 cc van de aldus verkregen oplossing aangezuurd met 1 cc  $\text{HPO}_3$ - of  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ -oplossing en de  $\text{H}_2\text{S}$  wordt met een  $\text{N}_2$  stroom verdreven. Door een loodacetaat-papiertje boven de oplossing te houden, terwijl  $\text{N}_2$  doorgeleid wordt, wordt gecontroleerd of alle  $\text{H}_2\text{S}$  verdreven is. Hierna wordt 5 cc getitreerd met de indicator (titratie na reductie). Men titreert tot de invallende druppel van de blauwe indicator-oplossing, die in het zure milieu naar rood omslaat, de oplossing rood kleurt. De kleuromslag is het beste waar te nemen, wanneer men titreert in een wit porceleinen schaalpje.

Na enige oefening is het mogelijk de bepaling met een nauwkeurigheid van 5 % uit te voeren.

#### B. Berekening van het vitamine C-gehalte uit de titratiewaarden.

Titratie vóór reductie.

Stel gebruikte aantal cc indicator = x en a cc indicator  $\simeq$  1 mg ascorbinezuur.

Dan bevat 100 cc melk  $\frac{100}{25} \times \frac{40}{5} \times \frac{x}{a}$  mg ascorbinezuur.

Titratie na reductie.

Stel gebruikte aantal cc indicator = y.

Dan bevat 100 cc melk  $\frac{100}{40} \times \frac{40}{5} \times \frac{11}{10} \times \frac{y}{a}$  mg. ascorbinezuur.



### C. De bereiding en het stellen van de oplossing van 2-6-dichloorphenolindophenol.

300 mg van het natriumzout van 2-6 dichloorphenolindophenol worden opgelost in heet, uitgekookt water. Daarna wordt de oplossing afgefiltreerd om onoplosbare oxydatieproducten te verwijderen. Hierna wordt aangevuld tot 1 L.

Handelspraeparaten zijn meestal onzuiver, zodat afwegen alleen nooit voldoende is om een oplossing van bepaalde sterkte te krijgen. De indicatoroplossing wordt daarom gesteld op ascorbinezuuroplossing, waarvan het gehalte bepaald is door titratie met een jodiumoplossing.

De ascorbinezuuroplossing verkregen we als volgt: 25 mg ascorbinezuur worden opgelost tot een volume van 25 cc met uitgekookt, gedestilleerd water, terwijl  $\text{CO}_2$  ingeleid wordt om de oxydatie tegen te gaan. Bij 5 cc van deze ascorbinezuur-oplossingen voegen we 1 cc 3 % trichloorazijnzuur, 1 cc 20 % KJ-oplossing en 5 cc jodiumoplossing (0,02 N.), die gesteld is op 0,02 N. natriumthiosulfaatoplossing. De overmaat jodium wordt met thiosulfaat teruggetitreerd, waarbij zetmeel als indicator gebruikt wordt.

Bij deze titratie in zuur milieu reageert alleen de gereduceerde vorm van ascorbinezuur met jodium en wel 1 gram-molecule ascorbinezuur met 2 gramatomen jodium.

De indicatoroplossing wordt in een microburet gebracht. De gestelde ascorbinezuuroplossing wordt tien maal verdund met uitgekookt water, waarin  $\text{CO}_2$  geleid wordt. Van deze verdunde oplossing brengen we 1 cc in een wit porceleinen schaalte en voegen daarbij 3 cc water en 1 cc 3 % trichloorazijnzuur-oplossing. Hierna kan op de beschreven wijze getitreerd worden.

De indicator-oplossing wordt in het donker bewaard en wordt iedere week opnieuw gesteld.

#### D. Toevoeging van een bekende hoeveelheid vitamine C.

Om te controleren of bij deze methode om vitamine C te bepalen geen verliezen optreden, werd aan melk, waarvan eerst het vitamine C-gehalte bepaald was een bekende hoeveelheid ascorbinezuur toegevoegd. Nadat opnieuw het vitamine C-gehalte van deze melk bepaald was, kon berekend worden of de toegevoegde hoeveelheid ascorbinezuur met deze methode quantitatief teruggevonden werd.

Tabel 24.

Aanwezige hoeveelheid vit. C. titratiewaarden.	Toegevoegde hoeveelheid ascorb. zuur titratiewaarden.	Teruggevonden hoeveelheid titratiewaarden.
0,52	0,49	0,98
0,58	0,49	1,06
0,65	0,49	1,11

Uit tabel 24 blijkt, dat de toegevoegde hoeveelheid ascorbinezuur binnen de proeffout werd teruggevonden.

#### E. De kwikacetaatmethode.

Zoals op blz. 72 reeds opgemerkt is, kunnen met behulp van kwikacetaatoplossing de bij de titratie in zuur milieu storende stoffen, cysteïne, ergothioneïne e.a. reducerende zwavelverbindingen verwijderd worden. Daarom heb ik de melk met kwikacetaat onteiwit.

Hiervoor werd bij 25 cc melk 15 cc 20 % kwikacetaatoplossing gevoegd. De gecoaguleerde eiwitten werden afgefiltreerd, het filtraat met  $H_2S$  behandeld en het  $HgS$ , dat ontstaat, afgefiltreerd. Hierna werd nog enige minuten  $H_2S$  ingeleid en de reageerbuis, waarin de oplossing zich bevond

met een kurk afgesloten. Na 6 uur werd de overmaat  $H_2S$  op de reeds beschreven wijze verdreven. Na aanzuren met 3 % trichloorazijnzuur-oplossing werd het reducerend vermogen met de indicator-oplossing bepaald.

Uit onderstaande tabel blijkt, dat met deze methode dezelfde waarden gevonden werden als bij het onteiwitten met  $HPO_3$ .

Tabel 25.

	HPO <sub>3</sub> -methode titratiewaarden per 5 cc filtraat.	Kwikacetaatmethode titratiewaarden per 5 cc filtraat.
I.	0,75 0,75	0,78 0,77
II.	0,77 0,79	0,80 0,79
III.	0,64 0,64	0,64 0,64
IV.	0,70 0,68	0,69 0,69

We kunnen hieruit concluderen, dat er in de onteiwitte melk geen reducerende stoffen aanwezig zijn, die door kwikacetaat verwijderd kunnen worden.

## HOOFDSTUK XII.

### RESULTATEN VAN HET VITAMINE C- ONDERZOEK VAN KOEMELK.

Volgens de methode, die in het vorig hoofdstuk beschreven is, werden de melkmonsters, die ik voor de carotine- en vitamine A-bepaling gebruikte ook op hun vitamine C-gehalte onderzocht.

Zoals reeds bij het vitamine A-onderzoek is medegedeeld, werd de melk van de koeien uit Hoorn onderzocht om de invloed van diëetsverandering op het vitaminen-gehalte na te gaan.

Het is duidelijk, dat we hiervoor de werkelijk geproduceerde hoeveelheid vitamine moeten bepalen. Het transport mag dus geen invloed op de resultaten van de bepalingen hebben. In tegenstelling met het carotine- en vitamine A-gehalte gaat het vitamine C-gehalte tijdens het vervoer achteruit. Daarom werd de melk in Hoorn direct na het melken volgens de op blz. 78 beschreven methode onteiwit, geneutraliseerd en met  $H_2S$  verzadigd verstuurd.

Onder deze omstandigheden blijft het vitamine C-gehalte constant en was het dus mogelijk het oorspronkelijke vitamine C-gehalte te bepalen.

#### A. Het vitamine C-gehalte van rauwe melk.

Zoals uit de tabellen 8—12 (blz. 94) blijkt, werd een ge-



middeld vitamine C-gehalte gevonden van 2,1 mg/100 cc melk, terwijl de waarden variëren tussen 1,6 mg en 2,65 mg/100 cc melk. Het gemiddelde gehalte van de melk van alle stallen tijdens de weideperiode was 2,08 mg/100 cc, terwijl dit in de stalperiode 2,17 mg/100 cc was.

Er is dus wat het vitamine C-gehalte betreft, praktisch geen verschil waar te nemen tussen stal- en weidemelk, zoals ook in fig. VI te zien is.

Het gemiddelde vitamine C-gehalte van de melk

van stal 1	was	2,00 mg/100 cc.
„ „ 2	„	2,09 mg/100 cc.
„ „ 3	„	2,17 mg/100 cc.
„ „ 4	„	2,24 mg/100 cc.
„ „ 5	„	2,15 mg/100 cc.

Hieruit blijkt, dat het vitamine C-gehalte van monsters van verschillende herkomst praktisch geen verschillen vertonen.

#### B. Het vitamine C-gehalte van gepasteuriseerde melk.

Zoals te verwachten was, heeft gewone gepasteuriseerde melk een lager vitamine C-gehalte dan rauwe melk. (tabel 14 en fig. VII). De waarden variëren van 0,26—1,07 mg/100 cc melk. Het gemiddelde gehalte was 0,6 mg/100 cc.

Daarentegen is het gehalte van „Stassanomelk” praktisch gelijk aan dat van rauwe melk. (zie tabel 15 en fig. VII). Het gemiddelde ligt hier bij 1,90 mg per 100 cc, terwijl de grenzen 1,54 en 2,24 mg per 100 cc melk zijn.

#### C. Invloed van het diëet van de koe op het vitamine C-gehalte van de melk.

In de tabellen 16—22 (blz. 99) is het vitamine C-gehalte aangegeven van de melk van de koeien, die verschillende

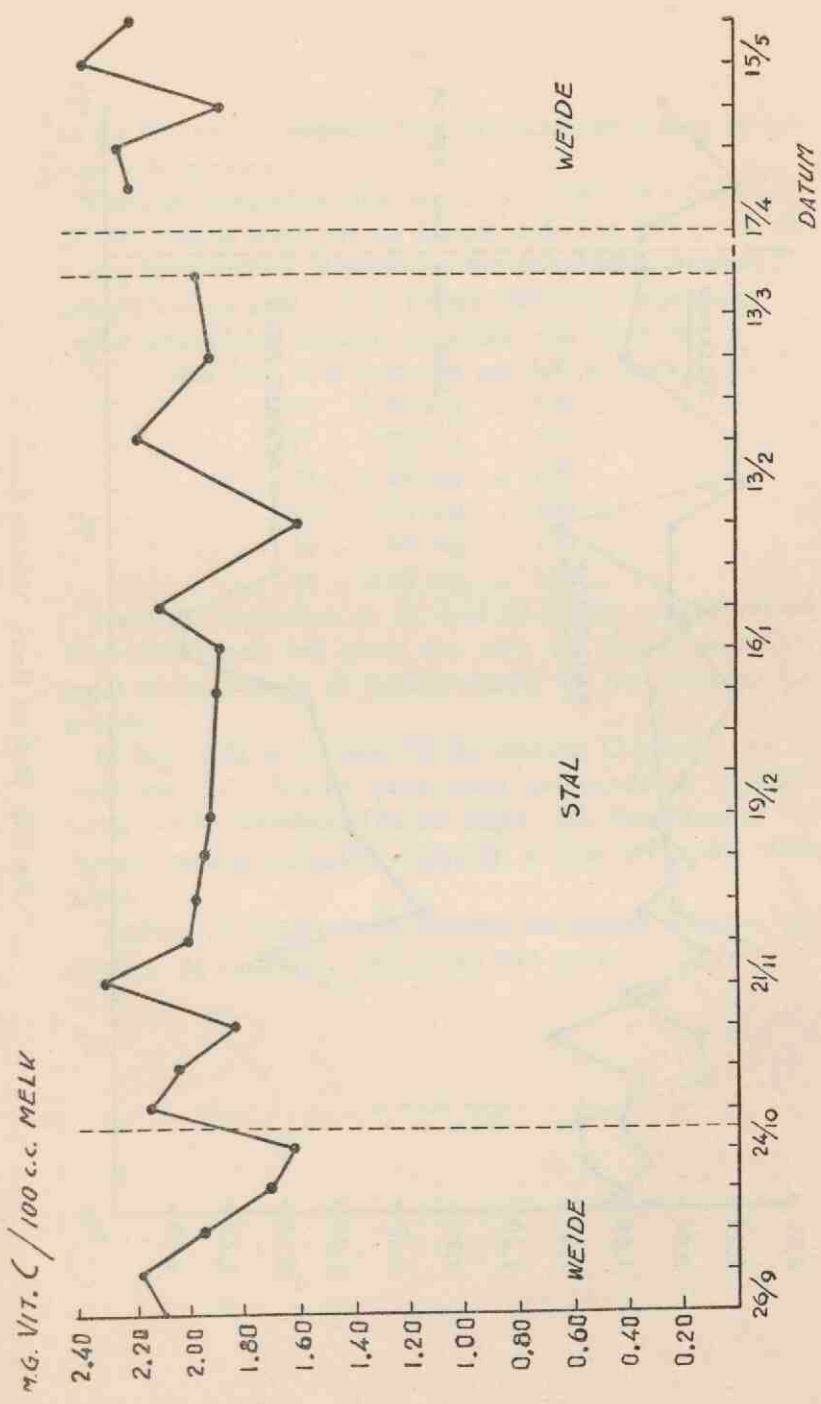


Fig. VI. Melk uit Utrecht. Vitamine C.

M.G. VIT. C / 100 c.c. MELK

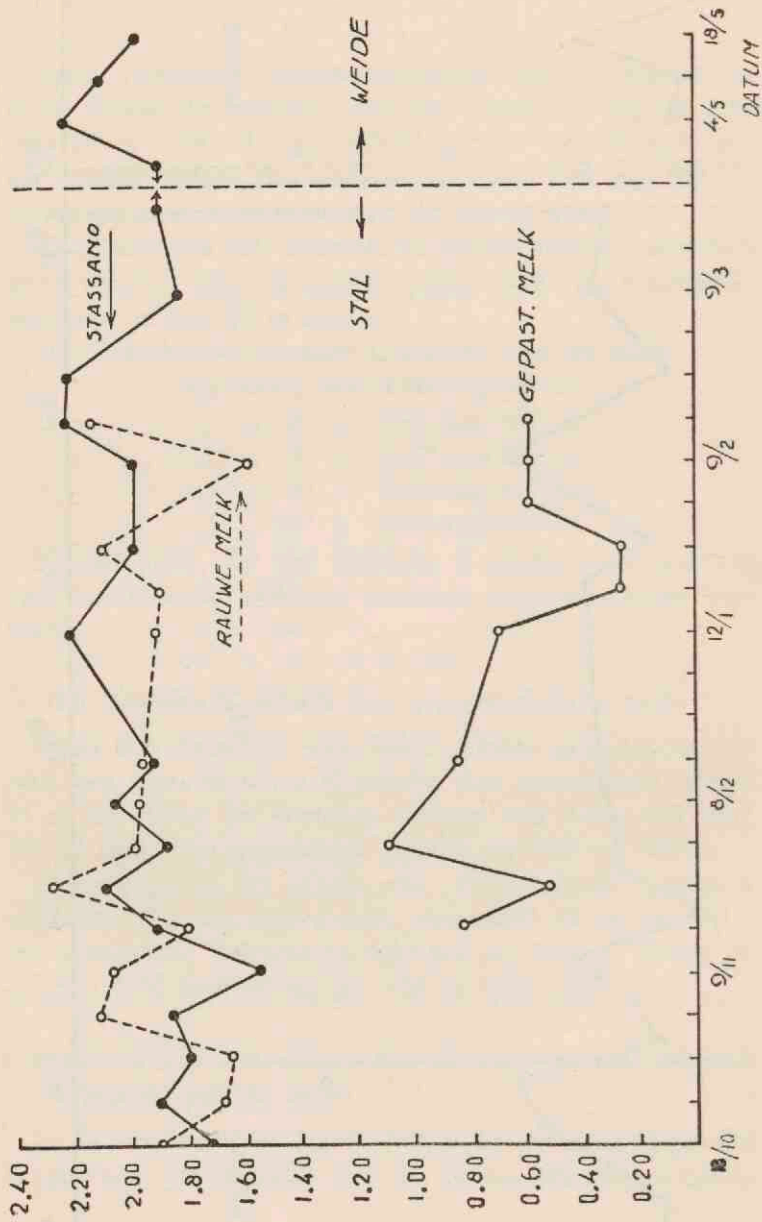


Fig. VII. Melk uit Hoorn. Vitamine C.

diëten kregen. De samenstelling van deze diëten is in hoofdstuk V besproken.

Zoals uit de tabellen blijkt zijn de verschillen in vitamine C-gehalte van de melk van de koeien onderling niet groot, dit is nog beter te zien, wanneer we het gemiddelde vitamine C-gehalte van de melk van de koeien onderling vergelijken.

Het gemiddelde vitamine C-gehalte van de melk

van koe	4	is	2,15	mg	per	100	cc	melk,
"	"	21	"	1,84	mg	"	100	" " "
"	"	27	"	2,06	mg	"	100	" " "
"	"	29	"	1,89	mg	"	100	" " "
"	"	42	"	2,03	mg	"	100	" " "
"	"	46	"	1,68	mg	"	100	" " "
"	"	68	"	2,00	mg	"	100	" " "

Daar de verschillen in de door de koeien geproduceerde hoeveelheid melk vrij groot zijn, zien we, dat er geen verband bestaat tussen de melkproductie en het vitamine C-gehalte.

In Fig. VIII is het gemiddelde vitamine C-gehalte van de melk van de 7 koeien aangegeven gedurende de verschillende voederperioden. Hieruit blijkt, dat het vitamine C-gehalte weinig verandert, wanneer de koe een ander diët krijgt.

Tijdens de weideperiode werden de laagste waarden gevonden, de verschillen zijn echter niet groot.



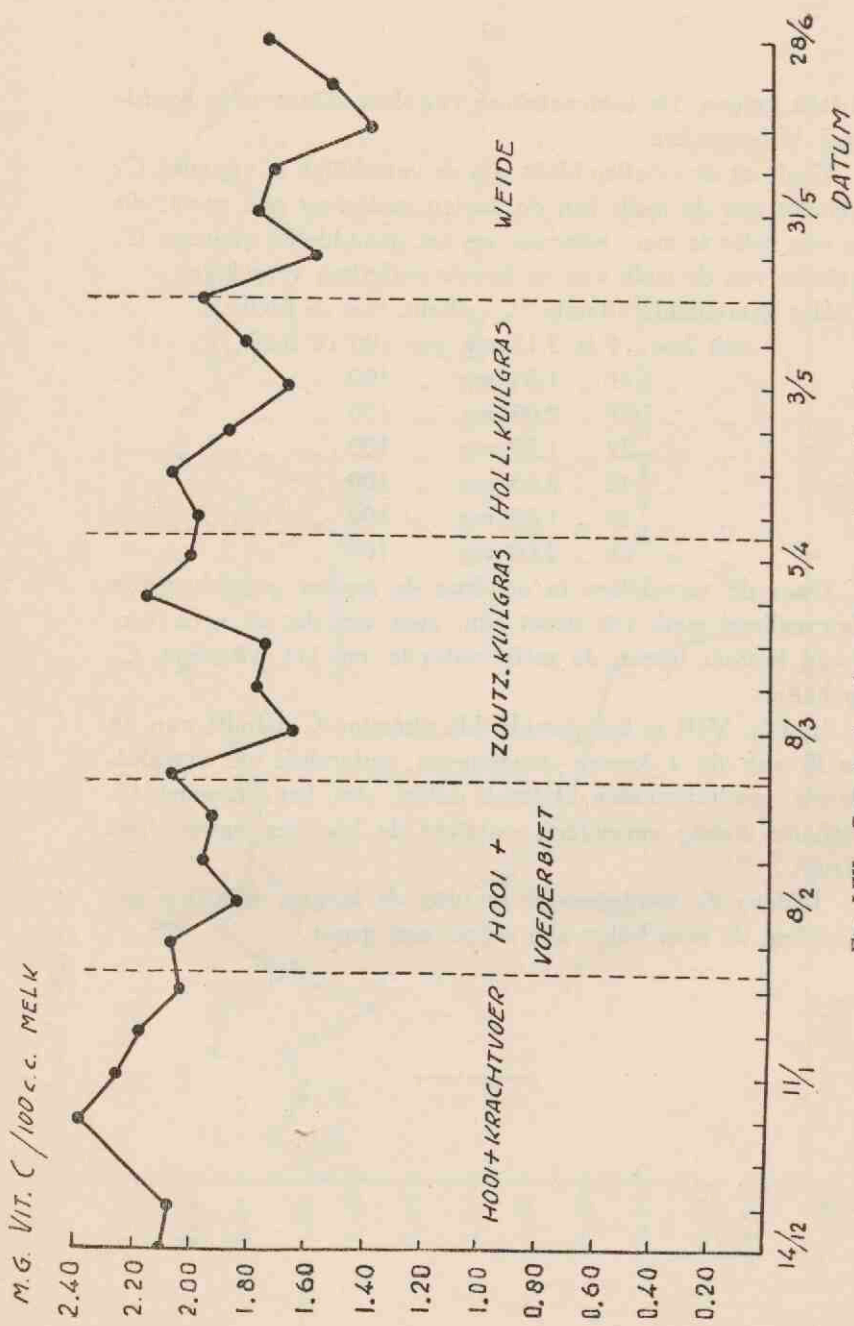


Fig. VIII. Gepasteuriseerde en rauwe melk uit Utrecht.

## HOOFDSTUK XIII.

### BESPREKING VAN DE RESULTATEN.

Zoals we uit het literatuuroverzicht gezien hebben, werd door de onderzoekers het carotine- en vitamine A-gehalte van botervet bepaald, zodat we hun resultaten moeten vergelijken met de waarden, die ik per gram vet gevonden heb.

Hieronder volgen de waarden van het carotine- en vitamine A-gehalte uit de literatuur.

Tabel 26.

Schrijver.	Jaar.	Soort boter.	Carotine γ per 100 g vet.  in	Vitamine A γ per 100 g vet.  in	Int. Eenh. per 100 g vet.
Moore <sup>68)</sup> . . . . .	1932	winterboter	200	230	583
		„ „	225	140	458
		zomerboter	1600	460	2366
Booth—Moore <sup>69)</sup> . . . .	1933	„ „	750	575	1710
		winterboter	170	800	1503
Baumann, Steenbock <sup>72)</sup> .	1933	zomerboter	1000	1500	3500
		winterboter	200	1000 *) (800)	1533
Baumann, Steenbock <sup>73)</sup> .	1934	zomerboter	600	1700 *) (1400)	2933
		winterboter	660	800	1993
Gillam, Heilbron <sup>74)</sup> . . .	1933	zomerboter	990	1220	3023
		winterboter	110	320	643
Gillam, Heilbron <sup>75)</sup> . . .	1934	zomerboter	550	660	1750
		winterboter	150	280	616
Eigen onderzoek . . . . .		zomerboter	600	700	1766
		winterboter	190	275	650
		zomerboter	600	630	1650

\*) Steenbock neemt aan  $E \frac{10^{10}}{1 \text{ cc}} = 1300$ , tegenwoordig wordt hiervoor 1600 aangenomen, de cijfers tussen haakjes geven de waarden aan, omgerekend op dit bedrag.

De gegevens van zomer- en winterboter, die de Engelsen hebben gepubliceerd, komen overeen met die, welke ik gevonden heb, de Amerikanen geven echter hogere waarden aan. In Amerika worden echter ook vaak afwijkende waarden voor het vetgehalte gevonden.

De snelle achteruitgang in het carotine- en vitamine A-gehalte, wanneer de koe vanaf de weide een z.g. winterdiët krijgt, is zeer merkwaardig, vooral wanneer we in aanmerking nemen, dat de geproduceerde hoeveelheden carotine en vitamine A in de melk slechts een zeer gering deel zijn van de opgenomen hoeveelheid carotine. Dit blijkt wel, wanneer we de cijfers nemen van periode I, waarin de koeien een normaal Hollands winterdiët kregen. De koeien kregen met hun voedsel 15600 intern. eenh. per dag, terwijl bij een gemiddelde dagelijkse melkopbrengst van 15,4 L en een gemiddelde vitamine A-waarde van 21 intern. eenh. de geproduceerde hoeveelheid 323 intern. eenh. bedraagt. Hieruit zien we, dat de afgescheiden hoeveelheid slechts 2% is van de opgenomen hoeveelheid.

Hoewel gebleken is, dat het carotinegehalte van het voedsel een grote invloed heeft op het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk resp. de boter, en het laatste op en neergaat met het eerste, bestaat er toch geen evenredigheid, zoals uit onderstaande tabel blijkt.

Periode.	Verhouding Carotine in het voer.	Verhouding Vitamine A-waarde in de melk.
I.	1,2	1,2
II.	1	1
III.	52	2,6
IV.	43	2

In tegenstelling met de resultaten van het grootste deel der

onderzoekers, die het vitamine C met behulp van de dierproef bepaalden, bleek mij, dat er van een invloed van het diëet op het vitamine C-gehalte van de melk geen sprake is. Alleen Brouwer, de Ruyter de Wildt <sup>136)</sup> en Hughes <sup>135)</sup> zijn bij hun dierproeven tot hetzelfde resultaat gekomen.

Het is echter in overeenstemming met het feit, dat avitaminose C bij runderen eigenlijk niet bekend is. Wel heeft men enkele malen een ziekte beschreven, die iets op scorbuut leek, maar een bewijs, dat hier werkelijk scheurbuik aanwezig was, werd niet gegeven.

Thurnston, Palmer en Eckles, <sup>139)</sup> die een onderzoek instelden naar de avitaminose C bij runderen konden geen scheurbuik aantonen. Kalveren, die op een vitamine C-vrij diëet gezet werden, groeiden op dit rantsoen even snel als de controledieren, die bovendien als extra vitamine C-bron nog tomatensap kregen.

Bovendien vonden zij in de lever van de kalveren, die een vitamine C-vrij dieet kregen wel vitamine C, hetgeen dus een bewijs is, dat het rund het vermogen bezit vitamine C zelf te synthetiseren.

Brouwer en De Ruyter de Wildt <sup>140)</sup> konden deze proeven bij geiten bevestigen.

Na een publicatie van de waarden, die ik gevonden had, delen Harris en Ray <sup>141)</sup> mede, dat zij volkomen overeenstemmende waarden gevonden hebben voor het vitamine C-gehalte van koemelk in Engeland en dat zij dus ook geen invloed gevonden hebben van het diëet of het seizoen op het vitamine C-gehalte van de melk.

---



## SAMENVATTING.

Voor de bepaling van het carotine- en vitamine A-gehalte van melk werd een chemisch-colorimetrische bepalingsmethode gegeven.

Hierbij wordt de melk na verzeeping geëxtraheerd met petroleumæther. Het carotine wordt colorimetrisch bepaald door meting van de intensiteit van de gele kleur van het petroleumæther extract in de Lovibondtintometer, terwijl voor de bepaling van het vitamine A de intensiteit van de blauwe kleur, die met  $\text{SbCl}_3$  ontstaat eveneens in de Lovibondtintometer gemeten wordt.

Xanthophyl en lycopine werden niet in dergelijke hoeveelheden gevonden, dat ze storend werkten bij de bepaling van carotine.

De invloed van het voedsel van de koe op het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk werd nagegaan. Het carotine- en vitamine A-gehalte van de melk bleek op en neer te gaan met de hoeveelheid carotine in het voedsel, er bestond echter geen evenredigheid. Door kuilgrasvoeding krijgt men in de winter melk met een hoger vitamine A- en carotine-gehalte dan bij normale wintervoeding.

De verschillen in carotine- en vitamine A-gehalte van de melk van de koeien onderling op hetzelfde dieet waren klein, zelfs wanneer de dagelijkse melkproductie zeer uiteenliep, zodat de dagelijkse carotine- en vitamine A-productie min of meer evenredig is met de dagelijkse melkproductie.

De resultaten van de chemisch-colorimetrische methode werden vergeleken met die van de biologische, waarbij een overeenkomst werd gevonden.

Bovendien werd het vitamine C-gehalte van melk bepaald.

Hiervoor werd de melk onteiwit, met  $H_2S$  behandeld en in zuur milieu getitreerd met de indicator 2-6-dichloorphenolindophenol.

Er bleek geen invloed van het voedsel van de koe op het vitamine C-gehalte van de melk te bestaan.

Gepasteuriseerde melk (Dauerpasteurisatie) heeft een veel lager vitamine C-gehalte dan rauwe melk, terwijl bij pasteurisatie volgens de nieuwere methodes (o.a. Stassano) het vitamine C-gehalte practisch gelijk is aan dat van rauwe melk.

---

Tabel 8.

Stal 1.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk vóór reductie.	Vit. C in mg per 100 cc melk na reductie.
26—9	3,3	17	5,6	5,2	1,7	1,28	2,11
3—10	3,2	17	4,6	5,4	1,4	1,77	2,18
10—10	3,35	19	6,0	5,8	1,8	1,52	1,92
17—10	3,2	22	10,0	7,0	3,1	1,28	1,68
24—10	3,1	32	8,0	10,0	2,6	1,43	1,64
31—10	3,3	26	8,4	7,9	2,5	1,77	2,13
7—11	3,3	19	9,4	5,9	2,8	1,74	2,05
14—11	3,5	14	5,6	4,0	1,6	1,80	1,82
21—11	3,4	13	1,5	3,8	0,5	1,66	2,27
28—11	3,85	—	—	—	—	1,69	1,98
5—12	3,55	7,5	2,3	2,1	0,7	1,40	1,95
12—12	3,45	7,8	2,2	2,3	0,6	1,74	1,92
19—12	3,3	—	—	—	—	1,60	1,82
8—1	3,4	4,3	1,9	1,2	0,6	1,74	1,89
16—1	3,35	4,2	3,5	1,3	1,0	1,74	1,89
23—1	3,4	4,5	3,3	1,3	1,0	1,45	2,11
6—2	3,35	4,0	2,7	1,2	0,8	1,28	1,59
20—2	3,5	4,2	2,9	1,2	0,8	1,63	2,18
6—3	3,5	4,2	2,7	1,2	0,8	0,73	1,92
20—3	3,7	3,8	2,3	1,0	0,6	1,11	1,98
24—4	3,45	28	8,0	8,1	2,3	1,40	2,18
1—5	3,3	29	8,1	8,8	2,5	1,08	2,24
8—5	3,2	30	6,6	9,4	2,1	0,82	1,86
15—5	3,08	32	7,3	10,4	2,4	1,59	2,36
22—5	3,2	32	8,0	10,6	2,5	1,40	2,18

Tabel 9.

Stal 2.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
17—10	3,5	31	10,2	9,0	2,9	2,00
24—10	3,4	—	—	—	—	1,86
31—10	3,5	28	11,4	8,0	3,3	2,14
7—11	3,5	29	10,4	8,3	3,0	1,98
14—11	4,15	26	10,6	6,3	2,6	1,73
21—11	3,9	26	11,0	6,7	3,0	2,08
28—11	4,4	—	—	—	—	2,18
5—12	3,3	19	5,0	6,0	1,5	2,24
12—12	3,15	18	5,3	5,9	1,7	1,92
19—12	3,3	17	3,9	5,2	1,2	1,92
9—1	2,4	6,8	2,6	2,8	1,1	1,79
16—1	3,15	7,5	3,9	2,4	1,2	2,24
23—1	3,25	5,8	3,7	1,8	1,1	2,30
6—2	3,05	4,3	2,7	1,4	0,9	1,86
20—2	3,0	4,8	3,1	1,6	1,0	2,11
6—3	2,7	4,2	2,7	1,6	1,0	2,24
20—3	2,8	4,3	2,7	1,5	1,0	2,08
24—4	3,0	23	5,4	7,7	1,8	2,69
1—5	3,0	26	8,0	8,8	2,7	2,05
8—5	3,0	36	6,6	12,0	2,2	1,58
15—5	3,2	33	8,0	10,3	2,5	2,60
22—5	3,0	34	8,0	11,3	2,7	2,05



Tabel 10.

Stal 3.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg. per 100 cc melk.
29—9	3,25	16	6,8	4,9	1,8	1,89
6—10	3,2	19	—	6,1	—	1,89
13—10	3,2	25	7,2	8,0	2,3	1,68
3—11	3,3	26	11,0	8,0	3,4	1,98
17—11	2,95	26	6,4	9,0	2,2	2,18
24—11	3,75	26	10,0	7,0	2,7	2,18
1—12	2,8	26	6,0	9,3	2,1	2,11
15—12	3,3	22	4,8	6,8	1,5	2,11
12—1	3,35	12	3,8	3,6	1,1	2,18
19—1	3,55	7,5	3,8	2,1	1,1	2,05
26—1	3,35	12	3,3	3,5	1,0	1,86
9—2	3,2	6,5	3,3	2,0	1,0	2,11
23—2	3,55	6,7	2,7	1,9	0,8	2,50
9—3	3,5	4,8	2,8	1,4	0,8	2,56
23—3	3,6	6,2	2,5	1,7	0,7	2,21
27—4	2,8	26	7,3	9,4	2,6	2,30
4—5	2,3	26	6,2	11,3	2,7	2,50
18—5	2,82	29	7,7	10,0	2,8	2,31
25—5	3,0	30	6,0	10,0	2,0	2,53
3—6	3,0	30	7,2	10,0	3,3	2,40

Tabel 11.

Stal 4.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
9—10	3,4	22	6,2	6,6	1,8	2,21
16—10	3,5	25	7,0	7,3	2,0	1,76
23—10	3,3	28	11,0	8,6	3,3	1,86
30—10	3,1	26	11,0	8,4	4,0	2,53
6—11	3,5	26	10,0	7,4	3,0	2,46
13—11	3,7	23	8,6	6,3	2,3	2,49
20—11	3,65	20	6,8	5,6	1,9	1,98
27—11	3,95	16	10,0	4,2	2,5	2,24
4—12	3,1	6,0	2,5	1,9	0,8	2,18
11—12	3,7	10	3,0	2,8	0,8	2,11
8—1	3,35	8,0	2,7	2,4	0,8	2,11
15—1	3,3	5,5	2,5	1,7	1,1	2,43
29—1	3,1	4,8	3,3	1,6	1,1	2,24
12—2	3,1	4,0	3,4	1,3	1,1	2,78
26—2	3,0	4,8	3,0	1,6	1,0	2,75
12—3	3,25	4,2	3,3	1,3	1,0	1,98
23—4	3,26	18	5,5	5,4	1,7	2,75
30—4	3,15	23	7,3	7,5	2,3	2,30
7—5	2,8	27	6,4	9,6	2,3	1,86
14—5	3,3	22	7,0	7,0	2,1	1,86
22—5	3,1	23	7,0	7,4	2,4	1,96

Tabel 12.

Stal 5.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
9—10	3,3	15	7,0	4,5	2,3	1,63
16—10	3,2	19	7,2	6,0	2,3	1,79
23—10	2,9	—	—	—	—	2,08
30—10	3,1	22	10,0	7,2	3,2	2,30
6—11	3,2	20	8,8	6,3	2,8	1,98
13—11	3,2	20	10,0	6,4	3,1	1,86
20—11	2,95	11,0	3,8	3,7	1,3	2,24
27—11	3,0	11,3	4,0	3,8	1,3	2,21
4—12	3,5	14	3,6	4,0	1,0	2,40
11—12	3,0	6,0	2,2	3,0	0,7	2,18
9—1	3,0	5,0	2,6	1,7	0,9	1,86
15—1	3,1	4,7	3,8	1,5	1,2	2,27
29—1	2,95	5,0	3,5	1,7	1,2	2,05
12—2	2,8	3,8	3,0	1,4	1,1	2,37
26—2	2,9	7,2	2,9	2,5	1,0	2,30
12—3	3,0	3,3	3,1	1,1	1,0	1,98
23—4	3,0	10	5,4	5,2	1,8	2,62
30—4	3,2	26	7,0	8,1	2,2	2,18
7—5	2,8	30	6,2	10,4	2,2	2,11
14—5	3,0	28	6,8	9,3	2,3	2,45
21—5	3,0	29	7,0	9,7	2,3	2,30

Tabel 16.

Koe 4.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,88 kg.						
14—12	3,4	9,7	2,2	2,9	0,7	2,46
21—12	3,1	10,5	2,8	3,4	0,9	2,11
4—1	3,75	7,7	2,4	2,1	0,6	2,62
11—1	3,55	7,0	4,4	1,9	1,2	2,50
18—1	3,65	7,0	3,9	1,9	1,1	1,92
25—1	3,9	7,0	3,3	1,8	0,8	2,21
gemiddeld	7,0	3,7	1,9	1,1	2,30	
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,24 kg.						
1—2	3,7	6,5	3,2	1,8	0,9	2,50
8—2	3,75	3,9	3,9	1,0	1,0	1,92
15—2	3,6	3,7	3,9	1,0	1,1	2,11
22—2	3,5	3,9	3,9	1,1	1,1	2,11
1—3	3,5	5,1	3,9	1,5	1,1	2,11
gemiddeld	4,2	3,9	1,2	1,1	2,15	
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,06 kg.						
8—3	4,15	13	8,0	3,1	1,9	1,79
15—3	3,68	26	8,4	7,2	2,3	2,30
22—3	3,6	32	4,4	8,9	1,2	2,05
29—3	3,68	31	4,2	8,7	1,1	2,53
5—4	3,65	31	4,6	8,9	1,3	2,05
gemiddeld	31	4,4	8,9	1,2	2,44	
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,18 kg.						
12—4	3,56	29	5,0	8,1	1,4	2,11
19—4	3,78	23	5,0	6,0	1,3	2,30
26—4	3,6	22	4,7	6,3	1,3	1,98
3—5	3,9	19	5,1	4,9	1,3	2,30
10—5	3,76	22	5,1	6,0	1,4	2,20
gemiddeld	21	5	5,7	1,4	2,18	
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,57 kg.						
17—5	3,6	20	5,1	5,5	1,4	2,48
24—5	3,85	26	5,6	6,8	1,4	1,30
31—5	3,39	45	5,5	13,3	1,6	1,80
7—6	3,7	39	6,8	10,5	1,9	1,58
14—6	3,65	39	9,4	11	2,6	1,30
21—6	4,0	37	9,4	9,3	2,2	1,63
28—6	3,48	39	8,0	11	2,3	1,66
gemiddeld	39	8,6	10,4	2,4	1,61	



Tabel 17.

Koe 21.

Data.	Vet in %.	Car. in γ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in γ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 15,26 kg.						
14—12	3,45	12,2	2,7	3,6	0,8	2,34
21—12	3,2	12,7	2,8	4,0	0,9	2,18
4—1	3,4	9,0	1,7	2,6	0,5	2,05
11—1	3,4	7,0	3,9	2,1	1,1	2,21
18—1	3,3	7,5	3,4	2,3	1,0	1,92
25—1	3,4	7,3	3,2	2,1	0,9	1,86
gemiddeld		7,2	3,5	2,2	1,0	2,09
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,44 kg.						
1—2	3,15	5,0	2,7	1,6	0,9	1,98
8—2	3,0	5,0	3,6	1,7	1,2	1,64
15—2	3,29	4,5	3,6	1,4	1,1	1,79
22—2	3,38	4,5	3,5	1,3	1,0	1,92
1—3	3,19	5,1	3,3	1,6	1,0	1,89
gemiddeld		4,7	3,5	1,4	1,0	1,84
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,44 kg.						
8—3	3,59	9,5	5,3	2,7	1,9	1,51
15—3	3,50	20	7,3	5,7	2,1	1,79
22—3	3,49	23	4,8	6,6	1,4	1,61
29—3	3,50	29	4,4	8,3	1,2	2,43
5—4	3,45	28	4,8	8,1	1,4	1,79
gemiddeld		27,0	4,7	7,7	1,3	1,82
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,52 kg.						
12—4	3,6	28	5,0	7,8	1,4	2,05
19—4	3,5	19	5,0	5,6	1,4	2,08
26—4	3,5	18	4,6	5,1	1,3	1,92
3—5	3,4	14	4,2	4,3	1,2	1,73
10—5	3,6	14	4,0	4,0	1,1	1,63
gemiddeld		16,0	4,3	4,5	1,2	1,88
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 16,15 kg.						
17—5	3,59	16	5,2	5,2	1,5	1,86
24—5	3,99	23	5,0	6,0	1,2	1,60
31—5	3,49	31	4,4	9,0	1,3	1,80
7—6	3,9	31	4,2	8,0	1,1	1,46
14—6	3,6	33	8,0	9,2	2,2	1,18
21—6	3,8	22	8,4	6,0	2,2	1,52
28—6	3,6	22	8,0	6,1	2,2	1,71
gemiddeld		26,0	8,1	7,1	2,2	1,59

Tabel 18.

Koe 27.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 15,60 kg.						
14—12	3,45	12,2	3,0	3,6	0,8	2,27
21—12	3,4	14,2	3,1	3,9	0,9	2,49
4—1	3,3	8,5	1,7	2,6	0,5	2,75
11—1	3,25	7,2	2,7	2,2	0,8	2,75
18—1	3,3	7,0	3,9	2,1	1,2	2,43
25—1	3,85	7,2	3,3	1,9	0,9	2,18
gemiddeld		7,2	3,3	2,1	1,0	2,48
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,18 kg.						
1—2	2,65	4,2	3,0	1,6	1,1	2,18
8—2	3,1	3,6	3,7	1,2	1,2	2,11
15—2	3,10	4,5	4,3	1,5	1,4	2,05
22—2	3,3	3,7	3,6	1,1	1,1	2,14
1—3	3,19	3,2	3,1	1,0	1,0	2,24
gemiddeld		3,8	3,7	1,2	1,2	2,14
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 13,12 kg.						
8—3	3,9	13,0	8,6	3,3	2,2	1,86
15—3	3,49	23	8,0	6,4	2,3	1,79
22—3	3,68	35	4,6	9,5	1,3	2,05
29—3	3,8	31	5,0	8,2	1,3	2,43
5—4	4,0	34	5,6	8,5	1,4	2,3
gemiddeld		33,3	5,1	8,7	1,3	2,09
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,05 kg.						
12—4	3,88	30	5,6	7,7	1,4	2,08
19—4	3,76	25	5,3	5,2	1,4	2,05
26—4	7,7	54	10,9	7,0	1,4	3,97
3—5	3,93	23	5,4	5,9	1,4	1,48
10—5	4,18	21	4,1	5,0	1,0	1,70
gemiddeld		22	4,8	5,4	1,2	1,83
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,90 kg.						
17—5	4,1	23	6,4	5,7	1,6	2,37
24—5	4,2	29	—	6,9	—	1,70
31—5	3,9	45	4,4	11,5	1,2	1,97
7—6	4,6	48	7,8	10,4	1,7	1,75
14—6	3,69	39	8,4	10,6	2,2	1,30
21—6	4,0	40	10,0	10,0	2,5	1,58
28—6	3,78	39	10,0	10,3	2,3	1,76
gemiddeld		39	9,5	10,3	2,3	1,77

Tabel 19.

Koe 29.

Data.	Vet in %.	Car. in γ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in γ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 24,12 kg.						
14—12	2,9	10,0	2,2	3,4	0,8	1,76
21—12	2,85	11,5	2,2	4,0	0,8	2,02
4—1	3,0	7,0	1,7	2,3	0,6	2,18
11—1	2,85	6,2	2,1	2,2	0,8	2,11
18—1	3,2	7,0	3,4	2,2	1,1	2,10
25—1	3,4	6,3	3,2	1,8	0,9	2,14
gemiddeld		6,5	2,9	2,1	0,9	2,05
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 22,32 kg.						
1—2	3,1	5,7	2,9	1,8	0,9	—
8—2	3,25	3,6	3,5	1,1	1,1	1,64
15—2	3,29	3,7	3,0	1,1	0,9	1,59
22—2	3,03	3,0	2,6	1,0	0,9	1,73
1—3	3,0	3,1	2,7	1,0	0,9	2,11
gemiddeld		3,3	2,8	1,0	0,9	1,77
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 22,68 kg.						
8—3	3,34	11,2	5,1	3,3	1,5	1,64
15—3	3,19	19	5,6	6,0	1,8	1,76
22—3	3,35	26	5,2	7,6	1,6	1,79
29—3	3,38	28	5,0	8,3	1,5	2,11
5—4	3,4	28	5,0	8,2	1,5	2,05
gemiddeld		27	5,1	8,—	1,5	1,87
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 19,80 kg.						
12—4	3,39	29	4,4	8,5	1,3	1,86
19—4	3,5	19	4,8	5,6	1,3	2,05
26—4	4,65	24	4,5	5,3	1,0	2,30
3—5	3,45	19	4,6	5,7	1,3	2,18
10—5	3,74	19	4,0	5,0	1,1	1,86
gemiddeld		21	4,4	5,3	1,1	2,05
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 18,68 kg.						
17—5	3,25	16	4,8	5,1	1,5	1,60
24—5	3,89	23	5,0	6,0	1,3	1,41
31—5	3,3	28	4,8	8,5	1,5	1,91
7—6	3,7	30	5,0	8,1	1,4	2,03
14—6	3,55	32	6,8	9,0	2,0	1,41
21—6	3,65	23	8,0	6,3	2,2	1,75
28—6	3,52	25	8,2	7,1	2,3	2,01
gemiddeld		26	7,6	7,5	2,2	1,73

Tabel 20.

Koe 42.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in $\gamma$ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,62 kg.						
14—12	3,5	12	2,7	3,6	0,8	1,98
21—12	3,75	11,3	2,7	3,0	0,7	1,79
4—1	3,6	7,5	1,8	2,1	0,5	2,53
11—1	3,1	6,0	4,4	2,0	1,5	2,24
18—1	2,85	5,5	2,7	1,9	0,9	2,81
25—1	4,2	6,0	3,4	1,4	0,8	2,18
gemiddeld		5,8	3,5	1,8	1,0	2,25
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 11,34 kg.						
1—2	3,26	4,8	2,6	1,4	0,8	2,18
8—2	2,7	2,9	3,6	1,1	1,3	2,11
15—2	3,12	3,0	3,0	1,0	1,0	2,50
22—2	3,7	3,0	4,3	0,8	1,2	1,89
1—3	2,3	5,1	2,2	1,0	0,8	2,50
gemiddeld		4,4	3,2	0,9	1,0	2,23
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,26 kg.						
8—3	3,45	8,0	6,8	2,4	2,0	1,86
15—3	3,79	18	5,8	5,0	1,6	1,73
22—3	3,3	18	4,8	5,6	1,5	1,73
29—3	3,09	22	5,6	7,3	1,9	2,05
5—4	3,7	28	6,0	7,5	1,7	2,50
gemiddeld		23	5,5	6,8	1,7	1,97
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 9,40 kg.						
12—4	3,39	19	4,2	5,7	1,2	2,11
19—4	3,6	22	3,7	5,4	1,0	2,18
26—4	3,28	15,0	3,9	4,6	1,2	1,86
3—5	3,05	—	—	—	—	1,79
10—5	2,9	12	3,0	4,3	1,0	1,91
gemiddeld		14	3,5	4,4	1,1	1,97
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 10,62 kg.						
17—5	2,8	12	3,9	4,3	1,4	2,14
24—5	3,65	15	—	4,1	—	1,35
31—5	3,6	28	5,4	8,0	1,5	1,86
7—6	3,35	30	9,8	9,0	2,9	1,75
14—6	3,55	31	8,4	8,7	2,4	1,70
21—6	3,8	27	8,6	7,1	2,2	1,63
28—6	3,52	25	8,0	7,1	2,3	1,56
gemiddeld		28	8,3	7,6	2,3	1,71



Tabel 21.

Koe 46.

Data.	Vet in %.	Car. in $\gamma$ per 100 cc melk.	per 100 cc melk. Car. in $\gamma$	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 16,62 kg.						
14—12	3,05	13	3,3	4,2	1,1	1,79
21—12	2,9	10,3	1,7	3,5	0,6	1,86
4—1	2,95	7,8	2,4	2,6	0,8	2,05
11—1	2,8	6,3	3,8	2,2	1,3	1,86
18—1	2,7	5,7	3,4	2,1	1,2	1,98
25—1	3,2	6,0	3,3	1,9	1,0	1,64
gemiddeld		6,0	3,5	2,1	1,1	1,86
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 15,64 kg.						
1—2	2,8	—	—	—	—	1,79
8—2	2,7	3,1	3,9	1,1	1,4	1,98
15—2	2,45	3,0	2,6	1,2	1,1	1,79
22—2	3,1	2,9	3,6	0,9	1,2	1,79
1—3	2,7	2,8	2,2	1,0	0,8	1,86
gemiddeld		2,9	2,8	1,1	1,1	1,84
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,44 kg.						
8—3	2,89	8,0	5,4	2,8	1,9	1,59
15—3	2,85	17	4,9	6,0	1,7	1,49
22—3	2,87	21	5,0	7,2	1,5	1,34
29—3	2,85	22	5,6	8,0	1,9	1,54
5—4	2,8	25	4,4	8,9	1,6	1,59
gemiddeld		23	5,0	8,0	1,7	1,51
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,40 kg.						
12—4	2,82	18	3,4	6,4	1,2	1,73
19—4	2,85	17	4,5	6,0	1,6	1,64
26—4	2,7	14	3,3	5,2	1,2	1,60
3—5	2,88	15	3,3	5,2	1,1	1,54
10—5	2,99	16	4,0	5,4	1,4	1,46
gemiddeld		15	3,5	5,3	1,2	1,59
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 15,12 kg.						
17—5	2,9	11	4,0	4,0	1,4	1,63
24—5	3,05	16	5,6	5,4	1,8	2,07
31—5	2,9	21	5,4	7,2	1,8	1,58
7—6	2,7	24	7,8	8,8	2,9	1,70
14—6	2,98	23	8,2	7,7	2,8	1,35
21—6	3,3	22	10,0	6,6	3,0	1,18
28—6	2,85	20	8,0	7,0	2,8	1,51
gemiddeld		22	8,7	7,1	2,9	1,57

Tabel 22.

Koe 68.

Data.	Vet in %.	Car. in γ per 100 cc melk.	Vit. A in L.E.B. per 100 cc melk.	Car. in γ per g vet.	Vit. A in L.E.B. per g vet.	Vit. C in mg per 100 cc melk.
<b>PERIODE I.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,44 kg.						
14—12	3,05	8,5	2,3	2,8	0,8	2,11
21—12	3,5	11,5	3,3	3,3	0,9	2,05
4—1	3,15	7,0	2,2	2,2	0,7	2,69
11—1	3,35	7,0	2,6	2,0	0,7	2,30
18—1	3,25	5,5	3,9	1,7	1,2	—
25—1	3,1	4,5	3,3	1,5	1,1	2,11
gemiddeld	5,7	3,3	1,7	1,0	2,25	
<b>PERIODE II.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,24 kg.						
1—2	3,2	3,0	3,3	0,9	1,0	1,92
8—2	3,05	2,5	3,9	0,8	1,3	1,79
15—2	3,26	3,0	3,6	0,9	1,1	1,92
22—2	3,1	2,6	3,1	0,8	1,0	1,92
1—3	3,1	3,3	2,8	1,1	0,9	2,18
gemiddeld	3,0	3,2	0,9	1,0	1,95	
<b>PERIODE III.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 12,24 kg.						
8—3	3,69	7,5	7,9	2,0	2,1	1,59
15—3	3,40	17	6,5	5,0	1,9	1,73
22—3	3,4	17	5,0	5,0	1,5	1,73
29—3	3,35	23	4,4	7,0	1,3	2,24
5—4	3,4	23	4,1	6,9	1,3	2,05
gemiddeld	21	4,8	6,3	1,4	1,87	
<b>PERIODE IV.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 11,92 kg.						
12—4	3,49	19	4,4	5,6	1,3	2,21
19—4	3,5	14	4,8	4,1	1,4	2,30
26—4	3,25	15	3,4	4,6	1,2	2,24
3—5	3,5	13	3,9	3,6	1,1	2,11
10—5	3,4	11,3	3,2	3,3	0,9	2,14
gemiddeld	13	3,5	3,8	1,1	2,2	
<b>PERIODE V.</b>						
Gemidd. dagel. melkopbrengst 14,72 kg.						
17—5	3,37	14	3,9	4,3	1,2	1,91
24—5	3,6	15	5,3	4,2	1,5	1,84
31—5	3,35	22	5,4	6,7	1,6	1,70
7—6	3,0	20	7,8	6,7	2,6	1,80
14—6	3,02	19	7,8	6,3	2,3	1,46
21—6	3,6	18	8,2	5,0	2,3	1,46
28—6	2,98	19	8,2	6,4	2,8	2,01
gemiddeld	19	8,1	5,9	2,5	1,74	

## LITERATUUR.

1. Mc. Collum en Davis.  
J. Biol. Chem. 15, 167 (1913).
2. Osborne en Mendel.  
J. Biol. Chem. 15, 311 (1913).  
16, 423 (1913).
3. Mori.  
Jahrb. Kinderhkl. 59, 175 (1904).
4. Bloch.  
J. of Hyg. 19, 283 (1921).
5. Carr en Price.  
Bioch. J. 20, 497 (1926).
6. Drummond.  
Bioch. J. 13, 81 (1919).
7. Steenbock.  
Sc. 50, 352 (1929).
8. Stephenson.  
Bioch. J. 14, 715 (1920).
9. Drummond, Channon en Coward.  
Bioch. J. 19, 1047 (1925).
10. Palmer en Kennedy.  
J. Biol. Chem. 46, 559 (1921).
11. Dulière, Morton en Drummond.  
J. Soc. Chem. Ind. 48, 316 T. (1929).
12. Hume en Mc. Lean.  
Lancet 1, (1930).

13. Drummond, Ahmad en Morton.  
J. Soc. Chem. Ind. 49, 219 T. (1930).
14. Euler en Hellström.  
Bioch. Z. 203, 370 (1928).
15. Moore.  
Bioch. J. 18, 803 (1929).
16. Green en Mellanby.  
Bioch. J. 22, 102 (1928).  
Brit. J. Exp. Path. 11, 81 (1930).
17. Capper.  
Nature 126, 685 (1930).
18. van Eekelen.  
Arch. Neerl. de physiol. 16, 281 (1931).
19. Glanzmann.  
Jahrb. d. Kinderhik. 133, 129 (1931).
20. Polak en Stokvis.  
Arch. neerl. de physiol. 16, 542 (1931).
21. Moore.  
Lancet II, 380 (1929).  
Bioch. J. 24, 692 (1931).
22. Karrer c.s.  
Svensk. Vet. Akad. Ark. Kemi, Mineralogi, Geologi  
10 B, 12 (1931).
23. Capper c.s.  
Bioch. J. 25, 265 (1931).
24. Wolff, Overhoff en van Eekelen.  
Deutsche Med. Wochenschr. 34, 1428 (1930).
25. Tswett.  
Ber. dtsch. bot. Ges. 24, 316 en 384 (1906).
26. Karrer, Morf en Schöpp.  
Helv. 14, 1036 en 1431 (1931).
27. Karrer c.s.  
Helv. 15, 878 (1932).  
16, 557 en 625 (1933).



28. Menken.  
Dissertatie, Utrecht (1934).
29. Hohlweg en Dohrn.  
Z. exper. Med. 71, 762 (1930).
30. Wolff en Overhoff.  
Ned. Tijdschr. Geneesk. 75, 1662 (1931).
31. van Eekelen.  
Arch. neerl. Physiol. 16, 281 (1931).
32. Boynton en Bradford.  
J. of Nutr. 4, 323 (1931).
33. Drummond en Watson.  
Analyst. 47, 341 (1922).
34. Fearon.  
Bioch. J. 19, 888 (1925).
35. Moore.  
Lancet 2, 219 (1929).
36. Rosenheim en Webster.  
Lancet 2, 806 (1926).  
Bioch. J. 20, 1342 (1926).
37. Rosenheim en Drummond.  
Bioch. J. 19, 753 (1925).
38. Josephy.  
Acta Brevia Neerl. 3, 133 (1933).
39. Morton en Heilbron.  
Bioch. J. 22, 987 (1928).
40. Drummond en Morton.  
Bioch. J. 23, 785 (1929).
41. Wolff en van Eekelen.  
Acta Brevia Neerland. 4, 48 (1934).
42. van Eekelen, Emmerie en Wolff.  
Acta Brevia Neerland. 4, 172 (1935).
43. Rosenheim en Schuster.  
Bioch. J. 21, 1329 (1927).

44. van Eekelen, Emmerie, Julius en Wolff.  
Proc. Acad. Sc. Amsterdam 35, 1347 (1932).
45. Lunin.  
Zeitschr. physiol. Chem. 5, 31 (1881).
46. Hopkins.  
J. Physiol. 49, 425 (1912).
47. Funk.  
Bioch. J. 7, 211 (1913).
48. Mc. Collum c.s.  
J. Biol. Chem. 27, 33 (1916).
49. Steenbock c.s.  
J. Biol. Chem. 35, 517 (1918).
50. Hess c.s.  
J. Am. Med. Ass. 74, 425 (1912).
51. Drummond, Coward en Watson.  
Bioch. J. 14, 668 (1920).  
15, 540 (1921).
52. Drummond.  
J. Agr. Sc. 13, 144 (1923).
53. Kennedy en Dutcher.  
J. Biol. Chem. 50, 339 (1922).
54. Steenbock, Sell en Buell.  
J. Biol. Chem. 47, 89 (1921).
55. Holmes.  
Ind. Eng. Chem. 17, 75 (1925).
56. Hume.  
Med. Res. Council 77 (1923).
57. Reyer.  
Klin. Wochensch. 3, 117 (1926).
58. Luce.  
Bioch. J. 18, 716 (1924).
59. Chick en Roscoe.  
Bioch. J. 20, 632 (1926).

60. Golding, Soames en Zilva.  
Bioch. J. 20, 1306 (1926).  
22, 173 (1928).
61. Scheunert.  
Milchwsch. Forsch. 3, 117 (1926).
62. Fraps en Treichler.  
Ind. Eng. Chem. 1079 (1932).
63. Mc. Leod, Brodie en Mc. Loon.  
J. Dairy. Sc. 15, 14 (1932).
64. Palmer en Eckles.  
J. Biol. Chem. 17, 191 (1914).
65. Rösio.  
Zeitschr. f. physiol. Chem. 182, 289 (1929).
66. Lundborg.  
Bioch. Z. 231, 274 (1931).
67. Lundborg.  
Bioch. Z. 235, 1 (1931).
68. Moore.  
Bioch. J. 26, 1 (1932).
69. Booth, Kon, Dann en Moore.  
Bioch. J. 27, 1189 (1933).
70. Norris en Church.  
J. Biol. Chem. 89, 589 (1930).
71. Emmerie.  
Nature 128, 495 (1931).  
131, 364 (1933).
72. Baumann en Steenbock.  
J. Biol. Chem. 101, 547 (1933).
73. Baumann en Steenbock.  
J. Biol. Chem. 105, 167 (1934).
74. Gillam, Heilbron, Morton, Bishop en Drummond.  
Bioch. J. 27, 878 (1933).
75. Watson, Bishop, Drummond, Gillam, Heilbron.  
Bioch. J. 28, 1076 (1934).

76. Virtanen.  
Emp. J. Exp. Agr. 1, 143 (1933).
77. Crawford, Perry en Zilva.  
Med. Research Council 175 (1932).
78. Wilbur, Hilton en Hauge.  
J. Dairy Sc. 153 (1933).
79. Kon en Booth.  
J. Soc. Chem. Ind. 52, 844 (1933).
80. Bertram.  
Proc. Acad. Sc. Amsterdam 32, 664 (1929).
81. Willstätter en Stoll.  
I p. 154, 231.
82. Vermast.  
Proefschrift 1931, Utrecht, p. 128.
83. Kuhn en Brockmann.  
Z. physiol. Chem. 206, 41 (1932).
84. Willstätter en Escher.  
Z. physiol. Chem. 64, 47 (1910).
85. Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeits-  
methoden, Abt. II, Teil 2, Heft 9, p. 2337.
86. Gillam en Heilbron.  
Bioch. J. 29, 834 (1935).
87. Vermast.  
Proefschrift 1931, Utrecht, p. 105.
88. James Lind.  
A Treatise on the Scurvy London p. 1757.
89. Holst en Fröhlich.  
Z. f. Hyg. und Inf. 72, 1 (1912).
90. Tillmans.  
Z. Unters. Lebensm. 54, 33 (1927).
91. Zilva.  
Bioch. J. 26, 1624 (1932).
92. Rygh.  
Z. physiol. Chem. 204, 105—112—114 (1932).



93. Tillmans en Hirsch.  
Bioch. Z. 250, 312 (1932).
94. Dalmer en Moll.  
Z. physiol. Chem. 209, 211 (1932).
95. Ott en Packendorf.  
Z. physiol. Chem. 210, 94 (1932).
96. Brüggemann.  
Z. physiol. Chem. 211, 231 (1932).
97. Grant, Smith en Zilva.  
Bioch. J. 26, 1628 (1932).
98. Rygh.  
Z. physiol. Chem. 211, 275 (1932).
99. Reschke.  
Z. physiol. Chem. 215, 164 (1933).
100. Widmark en Glimsted.  
Z. physiol. Chem. 215, 147 (1933).
101. Demole.  
Z. physiol. Chem. 217, 83 (1933).
102. Dann.  
Nature 131, 24 (1933).
103. Tillmans.  
Zeitsch. Unt. Nahr. 63, 1—21—241—276 (1932).
104. Szent Györgyi.  
Bioch. J. 22, 1387 (1928).
105. Szent Györgyi.  
Bioch. J. 26, 865 (1932).
106. King en Waugh.  
J. Biol. Chem. 97, 325 (1932).
107. Harris en Ray.  
Bioch. J. 26, 2067 (1932).
108. Brüggemann.  
Z. physiol. Chem. 216, 139 (1933).
109. Szent Györgyi en Haworth.  
Nature 131, 24 (1933).

110. Szent Györgyi c.s.  
Bioch. J. 22, 1387 (1928).
111. Karrer.  
Helv. Chim. Acta 16, 181—302—1161 (1933).
112. Hirst.  
Nature 130, 577—888 (1932).
113. Micheel en Kraft.  
Z. physiol. Chem. 215, 216 (1933).  
216, 233 (1933).  
218, 280 (1933).
114. Reichstein.  
Helv. Chim. Acta 16, 1019 (1933).  
17, 311 (1934).
115. Haworth.  
J. Chem. Soc. London 1270 (1933).
116. Bezzonoff.  
Compt. Rend. 173, 466 (1921).
117. Glassmann en Posdeew.  
Zeitsch. Unt. Lebensm. 57, 191 (1929).
118. Tillmans.  
Zeitsch. Unters. Nahrm. 54, 33 (1927).  
56, 272 (1928).
119. Harris en Ray.  
Bioch. J. 27, 303 (1933).
120. Wolff, van Eekelen en Emmerie.  
Acta Brevia 3, 44 (1933).
121. Emmerie en van Eekelen.  
Bioch. J. 28, 1153 (1934).
122. van Eekelen.  
Acta Brevia 4, 137 (1934).  
Nature 135, 37 (1935).
123. Emmerie.  
Bioch. J. 28, 268 (1934).

124. Euler en Martius.  
Ann. 505, 73 (1933).
125. van Eekelen en Ruyszen.  
Pharm. Tijdschr. 8, 149 (1934).
126. Svirebely en Szt Györgyi.  
Bioch. J. 27, 9 (1933).
127. Chick c.s.  
Lancet I, 1 (1918).
128. Hart c.s.  
J. Biol. Chem. 42, 383 (1920).
129. Dutcher c.s.  
J. Biol. Chem. 45, 119 (1920).
130. Hess c.s.  
J. Biol. Chem. 45, 229 (1920).
131. Reyer.  
Z. Fleisch u. Milchhyg. 36, 291 (1926).
132. Kieferle en Zeiler.  
Fortschr. Landw. 1, 83 (1926).
133. Mc Leod.  
J. Am. Med. Ass. 88, 1947 (1927).
134. Olson en Copeland.  
J. Dairy Sc. 7, 370 (1924).
135. Hughes.  
J. Biol. Chem. 71, 309 (1926).
136. De Ruyter de Wildt en Brouwer.  
Versl. Landb. Onderz. Rijksl. Proefst. 36, 15 (1930).
137. Schlemmer c.s.  
Bioch. Z. 254, 187 (1932).
138. Kon.  
Nature 132, 64 (1933).
139. Thurnston, Palmer en Eckles.  
J. Dairy Sc. 9, 37 (1926).  
.. 12, 394 (1929).

140. Brouwer en De Ruyter de Wildt.  
Versl. Landb. Onderz. 35, 88 (1930).
141. Harris en Ray.  
Lancet 228, 77 (1935).
-













