Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Biologische onderzoekingen over vitamine E

https://hdl.handle.net/1874/357574

A. qu. 192, 1941

BIOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN OVER VITAMINE E

CHR. ENGEL

BIOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN OVER VITAMINE E

Diss. Utrecht 1941

BIOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN OVER VITAMINE E

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. H. R. KRUYT, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 26 MEI 1941, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

CHRISTIAAN GERARDUS JOHANNES MARIA ENGEL

GEBOREN TE EIBERGEN

1941

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Ter nagedachtenis aan mijn Dochtertje Josientje.
Aan mijn Ouders.
Aan mijn Vrouw.

Bij het beëindigen van mijn universitaire studie, grijp ik gaarne de gelegenheid aan, mij door dit proefschrift geboden, om met een enkel woord dank te brengen aan allen die tot mijn academische vorming hebben bijgedragen.

Op de eerste plaats gaat mijn erkentelijkheid uit naar wijlen den Hooggeleerden Wolff, zijn aansporingen hebben mij in aanraking gebracht met vitamine E problemen.

Den Hooggeleerden Jordan dank ik dat hij mij in de gelegenheid gesteld heeft als assistent werkzaam te zijn.

Hooggeleerde Julius, Hooggeachte Promotor, het was een groot voorrecht voor mij om het reeds onder Uw voorganger begonnen onderzoek over vitamine E onder Uw leiding te mogen voortzetten.

Voorts geldt deze dank alle Hoogleeraren en overige Docenten van wie ik colleges en practica heb gevolgd.

Ook U, mijn ouders breng ik hier dank, dat U mij in staat gesteld hebt mijn opleiding te voltooien.

Zeer geleerde Vonk, Emmerie en van Eekelen het is steeds een groot genoegen voor mij geweest om met U te mogen samenwerken.

INHOUD.

INLEIDING.

In de laatste jaren hebben verscheidene clinici het vitamine E, in de vorm van tarwekiemolie of een concentraat hieruit, aangewend bij den mensch in gevallen van verschillende vruchtbaarheidsstoornissen.

In tal van publicaties, die in het 7e hoofdstuk, pag. 83 besproken worden, werden de al of niet gunstige resultaten vastgelegd.

Naast deze clinische proeven met vitamine E als therapeuticum bij den mensch, waren geen clinische of physiologische gegevens bekend. Het al of niet bestaan van een vitamine E-avitaminose bij menschen, werd dan ook door anderen betwijfeld, daar dit alleen berusttê op resultaten in de kliniek bereikt, die elkaar bovendien gedeeltelijk tegenspraken.

Onlangs verscheen een Nederlandsche publicatie over het vitamine E in verband met veterinaire toepassingen [Herschel (1938)]. Dit was voor ons een rede om die vraagstukken buiten beschouwing te laten.

De eerste vraag, die we ons stelden, is dus, bestaat er een E-avitaminose bij den mensch, in welke vorm uit deze zich en is deze experimenteel vast te stellen.

De chemische bepaling van vitamines in bloedserum of bloed, respectievelijk van vitamine A en C, had in deze gevallen nuttige diensten bewezen om langs eenvoudige weg een avitaminose vast te stellen. Om een indruk te krijgen of er al of niet een E-avitaminose bij den mensch voorkwam, was dit ons inziens de meest geschikte weg.

Alvorens we hiertoe konden overgaan, moesten verschillende moeilijkheden worden opgelost.

In het begin van 1938, toen we ons onderzoek over vitamine E begonnen, was er zelfs geen quantitatieve bepalingsmethode van vitamine E bekend, terwijl toch een eenvoudige chemische of

physische methode ter bepaling van het vitamine E ons alleen tot het gewenschte doel zou kunnen voeren.

Een tweede vraag, die niet definitief was opgelost, was de volgende: wordt de E-avitaminose bij de mannelijke rat door gebrek aan dezelfde stof veroorzaakt, als bij de vrouwelijke rat. Deze vraag was ook van belang voor den mensch.

Het doel van deze dissertatie was een eventueele E-avitaminose bij den mensch te bestudeeren.

De resultaten door anderen bereikt, vooral wat betreft de chemie van het vitamine E (tocopherol) in 1938 en 1939, was voor ons een welkome steun.

De ontwikkeling van een chemische en biologische bepaling van vitamine E en vergelijking van deze beide, was de eerste stap in de richting van ons doel. Dit wordt in het 3e hoofdstuk uitvoerig besproken en is verwezenlijkt.

De identiteit van het vitamine E voor mannelijke en vrouwelijke ratten is in het daarop volgende hoofdstuk behandeld.

We stelden ons voor de gevonden vitamine E-bepaling in bloedserum te gebruiken om het verband vast te leggen tusschen het gehalte in het bloed en de E-avitaminose. Dit kan bij de rat zeer eenvoudig geschieden en bij de experimenteele avitaminose van de rat kon dit verband dan ook vastgelegd worden. Bij den mensch zou het voorkomen van de E-avitaminose pas kunnen blijken uit een zeer groot aantal bepalingen van gezonden en zieken. Door de mobilisatie zijn we echter niet verder kunnen komen dan een gering aantal bepalingen bij den mensch, die door hun kleine aantal nog geen beslissende uitslag hebben gegeven over het verband tusschen een eventueele E-avitaminose bij den mensch en de waarden, die in het bloed werden gevonden.

HOOFDSTUK I.

DE BIOLOGIE VAN HET VITAMINE E.

De historische feiten, die de grondslag zijn geweest voor het vitamine E onderzoek, mogen hier voorafgaan.

Mattill en Conklin (1920) bewezen als eersten, dat een dieet, dat voldoende was voor een rat tot instandhouding van een goede groei en goede gezondheid, niet toereikend was voor de voortplanting.

Evans (1922) vond bij een onderzoek over het effect van de voeding op de oestrus-cyclus, dat ratten op een bepaald dieet, waaraan de tot dan toe bekende vitamines waren toegevoegd, in de eerste generatie gedeeltelijk, in de tweede geheel steriel waren. Deze steriliteit kon worden opgeheven door zekere natuurlijke voedingsmiddelen.

Evans en Bishop (1922) toonden aan, dat een in vet oplosbare factor, die niet overeenkwam met de toenmaals bekende vitamines, noodig was voor de voortplanting.

Sure (1923, 1923a) vond hetzelfde, onafhankelijk van bovengenoemde auteurs en noemde deze factor: *vitamine E*.

In de volgende jaren werd het biologische onderzoek van verschillende zijden begonnen.

Het spreekt vanzelf, dat er ook onderzoekers waren, die het bestaan van vitamine E ontkenden [Anderegg en Nelson (1926), Nelson, Heller en Fulmer (1924) en Hogan en Harshaw (1924)].

Zij schreven de steriliteit toe aan de groote hoeveelheid reuzel gebruikt in vitamine E-vrije diëeten. Dat echter vetrijke diëeten op zichzelf geen steriliteit veroorzaken, werd door Mattill, Carman en Clayton bewezen (1924). Evans en Burr

(1927a, 1927b) toonden aan, dat reuzel antagonistisch werkt ten opzichte van vitamine E en later bleek, dat de diëeten van Nelson c.s. niet voldoende vitamine E-vrij waren geweest. Hierna moesten ook degenen, die het bestaan van vitamine E ontkenden hun standpunt wel opgeven.

In 1936 slaagden Evans, Emerson en Emerson (1936) erin de stof, die verantwoordelijk is voor de antisteriliteitswerking van tarwekiemolie, te isoleeren. Zij noemden deze *α-tocopherol*. Verschillende in de natuur voorkomende stoffen bleken vitamine E-werking te bezitten; zij zijn in chemisch opzicht nauw verwant; physiologisch is tot nu toe alleen een quantitatief verschil gevonden.

Het chemisch onderzoek, dat besloten werd met de synthese van tocopherol, kan men thans reeds als een afgerond geheel beschouwen en wordt in het tweede hoofdstuk besproken. Het biologisch onderzoek is nog in vollen gang en wordt in de volgende paragrafen besproken. Daar ons doel is de E-avitaminose bij den mensch te bestudeeren en wij daarvoor de proeven bij de rat als grondslag aanvaarden, kunnen we de literatuur, die hierop geen betrekking heeft, zooals de verhandelingen over E-avitaminose bij huisdieren en vogels, buiten beschouwing laten.

a. *Verschijnselen van vitamine E gebrek bij de vrouwelijke rat.*

De symptomen zijn bij de vrouwelijke rat het eerst en het meest uitgebreid onderzocht, hetgeen wel zijn oorzaak zal hebben in de zeer opvallende resorptie-steriliteit.

Aan de oorspronkelijke histologische bewerkingen van Evans (1927) is door latere onderzoekers dan ook weinig toegevoegd.

De avitaminose, die zich tenslotte openbaart in een resorptie-steriliteit, geeft ook in mindere graad aanleiding tot verschijnselen. We zien bij niet voldoende opname van vitamine E als eerste symptoom, dat de moederdieren hun jongen niet voeden [Verzár (1932), Juhasz-Schäffer (1931)]. Of hierbij een onvoldoende melksecretie of andere factoren de oorzaak zijn, is niet met zekerheid bekend.

Een volgend stadium van de E-avitaminose heeft men als de jonge moederdieren met een nog net voldoende hoeveelheid vitamine E gevoerd worden of als ze op een vitamine E-vrij dieet gezet,

de in hun lichaam aanwezige hoeveelheid nog niet hebben verbruikt. Een deel der jongen wordt dan dood geboren. In dit stadium is er eenig verband tusschen het aantal geworpen levende jongen en de hoeveelheid vitamine E, in het dieet of afzonderlijk oraal toegediend; zie fig. 1 [Bomskov (1938)].

Bomskov vermeldt ook nog een zg. „Treppenwachstum". Terwijl in het algemeen de jongen van een normale rat even zwaar wegen en even groot zijn, zijn de pasgeboren ratjes in dit stadium van vitamine E-gebrek, in grootte en gewicht van elkaar verschillend.

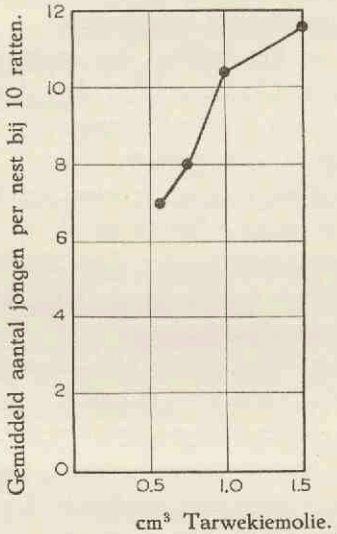


Fig. 1.

Verband tusschen aantal jongen en dosis vitamine E.
Bomskov (1938).

Volgens Juhasz-Schäffer (1933) is het grootste deel der levend geborenen wijfjes en zou de mannelijke foetus gevoeliger zijn voor vitamine E-gebrek.

Bij nog verdere E-avitaminose worden geen levende jongen meer geboren of worden niet geheel ontwikkelde jongen te vroeg geboren. Hierop volgt het volledige symptoom, een typische resorptiesteriliteit. Deze toestand kan op een geeigend dieet zeer lang blijven bestaan zonder dat andere verschijnselen zich voordoen.

Op een goed vitamine E-vrij dieet kan men vrouwelijke ratten in 2 à 3 maanden zoo krijgen. In het geval, dat ze na het zoogen direct op E-vrij dieet komen, zijn ze van het begin der geslachtsrijpheid af onvruchtbaar. De oestrus cyclus blijft voortgaan. De functie der ovariën blijft normaal en ovulatie treedt regelmatig op. Na copulatie met gezonde mannetjes worden de wijfjes gewoon bevrucht. De bevruchting en ovulatie zijn niet te onderscheiden van gewone ratten. De foetus ontwikkelt zich de eerste dagen normaal. Het gewicht van het moederdier stijgt overeenkomstig deze ontwikkeling. Na de 10e dag treedt er echter een gewichtsdaling in, gepaard gaande met bloedingen.

De beschrijving van het verloop der resorptie is door Evans reeds gegeven (1927): Op de achtste dag der zwangerschap ziet hij de eerste afwijkingen. De embryonen zijn minder ontwikkeld. Op de tiende dag zijn afwijkingen te zien aan de kop en de allantois. Weinig bloedcellen zijn in de bloedvaten aanwezig. Op de dertiende dag zijn de meeste foeten dood. Reeds op de vijftiende dag is de geheele foetus geautolyseerd en zijn de organen niet meer te herkennen. Nog weer eenige dagen later is van de embryonen door resorptie niets meer te vinden.

Bij de ontwikkeling van de placenta ziet men een dergelijk verschijnsel. Het geheele proces van stilstand der ontwikkeling, autolyse en resorptie is echter eenige dagen verder verschoven.

Het moederdier is spoedig weer hersteld, kan opnieuw bevrucht worden en weer een resorptie-steriliteit door maken. Normale oestrus treedt steeds daarna weer op. De dood der embryonen wordt blijkbaar veroorzaakt door een abnormaliteit in de stofwisseling. Hoe echter vitamine E past in deze stofwisseling is onbekend.

Door Evans werd niet opgemerkt de bruine pigmentatie van de uterus van E-deficiente ratten, die Moore, Martin en Rajagopal (1939) het eerst beschreven. De aard van deze pigmentatie is geheel onbekend. Ze verdwijnt niet meer door toediening van vitamine E, wel echter door een zwangerschap.

De vele publicaties, waarin gewezen wordt op de invloed van vitamine E-gebrek op de endocrine organen, op de groei en op de zg. spierdystrophie worden apart besproken, daar deze voor man-

netje en vrouwtje ongeveer dezelfde zijn (zie dit hoofdstuk c, d, e en f).

b. *Verschijnselen van vitamine E-gebrek bij de mannelijke rat.*

Vitamine E is noodig voor de spermatogenese. Ook dit is reeds door Evans bij vitamine E-gebrek waargenomen.

Het vertoont zich eerder op een E-vrij dieet dan de resorptiesteriliteit. Blijkbaar verbruiken mannetjes hun voorraad vitamine E sneller dan vrouwtjes.

Mason en Bryan (1938) nemen zelfs, na 50—60 dagen E-vrij dieet, reeds de eerste veranderingen waar, terwijl Evans en Burr (1927) 90—150 dagen opgeven.

De veranderingen in de spermatogenese betreffen in de eerste plaats de spermiën zelf. Ze verliezen hun beweeglijkheid en zijn daardoor niet meer in staat een bevruchting tot stand te brengen. Later ontbreken de geesels geheel en zijn de kernen vergroot en anders van vorm.

Parallel hiermee gaan ook degeneratieve veranderingen in de testes. Er worden reus-cellen gevormd door het samenklonteren der spermatidenkernen. Het germinatieve epitheel verdwijnt geheel.

De zaadkanaaltjes met spermatogoniën en spermatocyten atrophieeren. Het interstitieele weefsel blijft echter intact. Ook macroscopisch is deze testis-degeneratie tenslotte te zien in een verschrompeling en aanzienlijk gewichtsverlies [Grijns (1938)]. Terwijl wijfjes door vitamine E toe te dienen ten allen tijde te genezen zijn, kunnen al deze verschijnselen bij mannetjes niet meer genezen worden. Slechts in het begin, als de degeneratie de geheele testis nog niet heeft aangetast en de spermatogenese in sommige deelen nog normaal is, kan de fertiliteit behouden blijven.

Zelfs zeer langdurige vitamine E-therapie is niet in staat eenmaal voortgeschreden degeneratie te genezen [Mason (1926), Ringsted (1936), Zagami en Sindoni (1933)]. Ringsted stelt de veranderingen der testis voor als criterium voor een biologische bepalingsmethode van het vitamine E. De resultaten met een dergelijke methode verkregen, zijn nog niet vergeleken met die verkregen bij wijfjes, waarvan het principe en uitvoering in het vierde hoofdstuk beschreven zijn.

c. *Vitamine E en de groei van ratten.*

Naast deze vitamine E-deficientie verschijnselen, in verband met de voortbrenging, zijn later nog vele andere verschillen t.o.z. van normaal gevoede dieren opgemerkt.

De normale groei, die zooals bekend van bijna alle vitamines afhankelijk is, is ook in verband gebracht met vitamine E. Ter verduidelijking moge figuur 2 dienen.

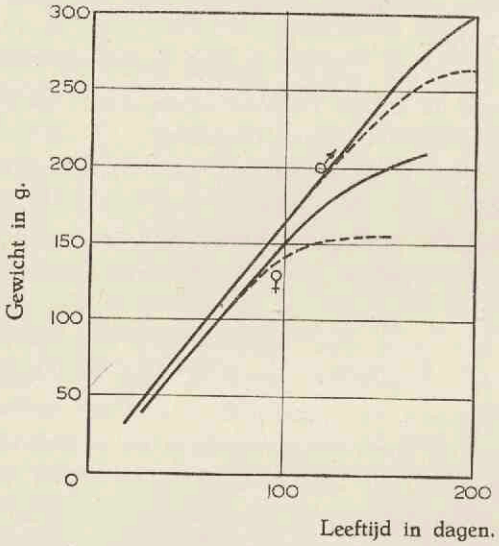


Fig. 2.

Schema van groeicurven van de rat.
——— op normaal voer.
— — — op vitamine E vrij voer.
De teekens ♀ en ♂ geven aan wanneer de dieren geslachtsrijp zijn.

In deze figuur beschouwen we het eerste deel der curven tot de teekens ♀ en ♂ als „jeugdgroei" het verdere deel der curven als „latere groei". Zooals bekend mag worden verondersteld, is de eerste groeiperiode vooral afhankelijk van vitamine A. Bij de eerste proeven van Evans (1928/29) over de invloed van vitamine E op de groei bleek reeds, dat deze jeugdgroei geheel onafhankelijk was van vitamine E, maar dat de latere groei van geslachtsrijpe dieren, zoowel mannelijke als vrouwelijke, onvolledig is door

vitamine E-gebrek. Dit effect wordt niet veroorzaakt door geringere activiteit der gonade. Het is een eigenschap van het vitamine E zelf, want na castratie van vitamine E-vrije mannetjes kan toch weer een verbeterde groei verkregen worden na toediening van vitamine E. Het vitamine E was hier toegediend in de vorm van een concentraat, vrij van sterinen. Ook deze proeven van Evans zijn door anderen bestreden: Mason (1929) en Blumberg (1935), die de feiten van Evans in groote trekken wel erkennen, maar ook de jeugdgroei geremd zien door vitamine E-gebrek. Mason experimenteert met mannetjes, Blumberg met beide geslachten. Interessant is nog, dat de laatste vaststelt, dat het xanthophyl als groeifactor onwerkzaam is. v. Euler (1932) meende nl. aan het xanthophyl een zekere rol te moeten toeschrijven in verband met het vitamine E, daar het in de natuur steeds hiervan vergezeld voorkomt.

De eerste proeven van Evans zijn door Emerson en Evans (1937), Olcott en Mattill (1934) en Randoin en Netter (1934) bevestigd en uitgebreid. Bij verschillende E-vrije diëeten heeft men ongeveer hetzelfde effect. Vetrijke of vetarme diëeten blijken van weinig invloed te zijn. Zoolang geen zuiver vitamine E verkregen was, bleef nog onopgelost de vraag, of de groeifactor vitamine E of een andere factor was, daar bij al deze proeven natuurlijke vitamine E-rijke producten gebruikt zijn. Martin (1937) doet pogingen om deze factoren te scheiden. Zijn resultaat, dat de antisteriliteits-factor niet, maar de groeifactor wel vernietigd wordt door tarwekiemolie in een autoclaaf te verhitten, moet als een qualitatief verschil gekarakteriseerd worden. Het omgekeerde, groeifactor behouden en antisteriliteits-werking vernietigd, kon niet bereikt worden.

Na het verkrijgen van zuiver tocopherol zijn door Evans, Emerson en Emerson (1938, 1939) de proeven herhaald met hetzelfde resultaat. Hieruit blijkt duidelijk, dat tocopherol de latere groei beïnvloedt en dat gebrek hieraan de groei remt, zooals de stippellijnen in fig. 2 aangeven.

Afgezien van deze groei bij ratten, zijn er nog vele publicaties over de invloed van vitamine E op de celgroei van tumoren en de groei van weefselculturen.

Juhasz-Schäffer (1931a) vindt in weefselculturen een

vermeerderde celgroei van embryonaal en carcinoomweefsel. Ook op het ontstaan van tumoren zou vitamine E van invloed zijn.

Evans (1928) nam reeds deciduaal-tumoren waar bij vitamine E-deficiente ratten. Andere onderzoekers zien echter juist het ontstaan van tumoren door extra vitamine E toe te voegen in de vorm van tarwekiemolie [Rowntree, Lansbury en Steinberg (1937) en Dorrance en Ciccone (1937)]. Vele anderen hebben dit experiment niet kunnen bevestigen [Carruthers (1938), Zagami (1933a), Marchesi (1933), Dingemanse en v. Eck (1939)]. Na het werk van Demole (1938/39) weten we, dat α-tocopherol geen enkele invloed heeft op de tumorvorming. In de ruwe tarwekiemolie van Rowntree c.s. moet iets anders de oorzaak voor het optreden van tumoren geweest zijn.

d. *Spierdystrophie.*

Het verschijnsel van de spierdystrophie bij ratten op een vitamine E-vrij dieet, is de laatste jaren in het middelpunt der belangstelling gekomen door gelijkenis met spierdystrophie bij den mensch. Alle vitamine E onderzoekers hebben op hun beurt het symptoom opgemerkt en vermeld. We onderscheiden bij de rat twee leeftijdsperioden, waarin deze dystrophiën optreden, die verschillend zijn al naar de leeftijd van de rat.

1. **Dystrophie bij de jonge rat.**

Evans en Burr (1928) beschreven in 1928 het verschijnsel bij het jonge dier.

Jongen van vitamine E-arme ratten krijgen parese na 18—20 dagen Evans en Burr (1928), 17—20 dagen Barrie (1937) en 16—20 dagen Demole en Pfaltz (1939, 1940). Het percentage ziekte is door de auteurs opgegeven van 90 % (Demole en Pfaltz) tot 75 % (Evans en Burr). Een groot percentage sterft, een ander gedeelte 10—20 % herstelt en een gedeelte leeft nog eenigen tijd zonder te genezen. Bij de jonge rat heeft de ziekte een zeer snel verloop. Ze begint bij de achterpooten, breidt zich in enkele dagen uit tot de kop, waarna het dier meestal sterft. De ziekte is te voorkomen met tarwekiemolie of tocopherol

als het voor de 15e dag gegeven wordt [Morelle (931), Barrie (1937), Demole en Pfaltz (1939, 1940) en Evans (1928)].

Het is duidelijk dat het ontbreken van vitamine E de oorzaak is van deze ziekte. Curatieve behandeling met vitamine E heeft geen succes. De pathologische, anatomische en histologische afwijkingen van spieren en zenuwen zijn door Demole en Pfaltz (1939, 1940) beschreven.

De geheele spierstructuur is veranderd: De spier is niet meer prikkelbaar; de cellen zijn hyalien, de dwarsstreping verdwijnt. Sterke proliferatie der sarcolemmacellen treedt op. Ook het zenuwstelsel is aangetast, vooral het periphere. Lipschitz (1936) meent ook een afwijking in het labyrinth-systeem te hebben gevonden.

2. Dystrophie bij de volwassen rat.

Deze werd het eerst opgemerkt door Evans (1932) en door vele anderen later bevestigd.

Einarson en Ringsted (1938) hebben er een speciale studie aan gewijd. De bewegingsstoornissen verschijnen langzaam en zijn van neuro-musculaire aard. De ontwikkeling begint bij de achterpooten en gaat langzaam naar voren. Dit duurt van 4 tot 12 maanden (Demole en Pfaltz) of volgens Einarson en Ringsted (1938) van 6 tot 15 maanden.

Het eerste optreden der ziekte vertoont zich na ongeveer twee jaar (Einarson en Ringsted), 22 maanden Burr, Brown en Moseley (1937), 15—22 maanden Evans, Emerson en Telford (1938) en na 14—17 maanden volgens Demole en Pfaltz. De zieke dieren kunnen nog zeer lang in leven blijven. De uitwendig zichtbare gebreken beschrijven Einarson en Ringsted. Het begint met krampachtig loopen, parese der achterpooten en zijdelings spreiden der pooten tot een breeder steunvlak, vervolgens kramptoestanden en volkomen onbeweegbaarheid. De dwarsstreping der spieren verdwijnt.

De spierspanning is, gemeten bij contractie van een uitgenomen gastrocnemicus, verminderd [Knowlton en Hines (1938)] t.o.z. van de normale bij directe electrische prikkeling van de spier of via de zenuw.

In tegenstelling met de overeenkomstige ziekte bij de jonge rat, heeft hier curatieve toediening van tarwekiemolie (Einarson en Ringsted), concentraten van tarwekiemolie [Burr, Brown en Moseley (1937)], *dl*-α-tocopherol [Knowlton, Hines en Brinkhous (1939)] en tocopheryl-acetaat (Demole en Pfaltz) gedeeltelijk succes. Het voortschrijden der ziekte kan daarmee gestuit worden, volledige genezing kan er niet mee verkregen worden.

Bij al deze waarnemingen werd vitamine E als eenige factor genoemd, die de musculaire dystrophie kan voorkomen.

Morgulis en Spencer (1936) en Morgulis, Wilder en Eppstein (1938) hebben een spierdystrophie ook opgewekt bij konijnen. Hier zijn, volgens deze onderzoekers, verschillende factoren in het spel en zou ook nog een wateroplosbare factor uit tarwekiemen noodzakelijk zijn voor de genezing. Dit is intusschen weer tegengesproken door Mackenzie, Levine en McCollum (1940). Zoowel bij de rat als het konijn is dus de spierdystrophie te voorkomen door zuiver tocopherol zonder andere factoren.

e. *Vitamine E en de endocrine organen.*

De typische verschillen bij de mannelijke en de vrouwelijke E-avitaminose, en de vroeger voor waarschijnlijk gehouden sterolnatuur, Dingemanse (1929), van het vitamine E is voor velen een aanleiding geweest, om de werking van vitamine E te zoeken in een invloed op de endocrine organen, in de eerste plaats op die, welke in verband staan met de geslachtsfuncties en later ook op de thyreoidea. Zeer vele afwijkingen zijn gevonden en sommige zijn als uitgangspunt gekozen voor het opstellen van een hypothese over de werking van vitamine E.

Naar het schijnt zijn echter al deze verschijnselen als secundair te beschouwen. Met een korte opsomming van de voornaamste publicaties op dit gebied kan dan ook volstaan worden.

Aan tarwekiemolie na orale toediening of injectie wordt toegeschreven oestrogenewerking door Szarka (1929), Verzár (1929) en Adler en Böltink (1929), vroegtijdige opening der vagina-membraan en uterine hypertrophie [Verzár (1931,

1932)] bij normale, maar niet bij gecastreerde, infantiele ratten en muizen.

Vitamine E-deficiente ratten zouden een verminderde grondstofwisseling vertoonen en een zijdeachtige pels gelijkend op die van hypophyselooze ratten, die kunnen herstellen na toediening van vitamine E [Verzár c.s. (1931), Gierhake (1933, 1935)]. Verzár ziet in deze feiten, dat vitamine E zeer nauw verbonden is met de gonadotrope hormonen van de hypophyse of misschien noodig is voor de synthese van deze in het lichaam. Deze veronderstellingen zijn echter herhaalde malen en nadrukkelijk tegengesproken [v. Euler, Zondek en Klussmann (1933), Juhasz-Schäffer (1933), Diakov en Krizenecky (1933, 1933a, 1935), Olcott en Mattill (1934), Kudrjaschov (1935) en Saphir (1936)].

Het histologische beeld van de hypophyse-voorkwab van E-deficiente mannelijke ratten laat een verandering zien van de basophiele cellen, zeer sterk gelijkend op veranderingen, veroorzaakt door cryptorchisme en castratie [van Wagenen (1925), Nelson (1933), Geller (1934) en Gierhake (1933, 1935)].

Nelson meent, dat de structureele veranderingen in de hypophyse secundair zijn en veroorzaakt worden door degeneratie der kiemcellen van de testis en niet herstelbaar zijn evenmin als deze. Bij vrouwelijke ratten kan geen enkele verandering in de hypophyse waargenomen worden [Nelson (1933), Stein (1935) en Müller en Müller (1937)] wat eveneens pleit voor het secundaire der verschijnselen bij het mannetje. Functioneele veranderingen zijn waargenomen maar weer tegengesproken door Mason (1939).

Een andere weg om aan te toonen, dat vitamine E direct verband houdt met hormonen, is door verschillende auteurs gevolgd nl. door vitamine E-deficiente ratten te behandelen met hormonen, orgaanextracten etc.

Follikel hormoon [Bisceglie (1929)], hypophyse extract, zwangeren-urine [Agnoli (1930)] en placentaal extracten [Marchesi (1935)] zouden in staat zijn de resorptie-steriliteit bij vrouwelijke ratten te voorkomen of te genezen. Hier tegenover staan weer andere publicaties van Csik (1932), Nelson

(1931) en Mason (1933), waarin gezegd wordt, dat al deze hormonen en extracten onwerkzaam zijn.

Al deze gegevens en het feit, dat de geslachtsfuncties bij het vrouwtje normaal zijn en de secundaire geslachtsklieren bij het mannetje niet aangegrepen worden door vitamine E-gebrek, doen vermoeden, dat de deficientie in de hypophyse bij het mannetje meer een gevolg dan de oorzaak van de steriliteit is. Men kan dus tot nu toe zeggen, dat vitamine E-deficientie zich uit bij het mannetje in een directe werking op de gonade en bij het wijfje op de foetus.

f. *Werkingsmechanisme van vitamine E.*

We kunnen wel zeggen, dat er nog geen verklaring is voor de vele verschijnselen, veroorzaakt door vitamine E gebrek. Het heeft niet aan hypothesen ter verklaring van de werking ontbroken.

De proeven van Verzár, welke een verband van vitamine E en hypophyse-voorkwab trachten te leggen, bespraken we in de voorgaande paragraaf. Volgens Verzár en Kokas (1931) kan het hypophyse-voorkwabhormoon gedeeltelijk het vitamine E vervangen.

Het vitamine E zou nu noodig zijn voor de vorming van hypophyse-voorkwabhormoon. Het is echter waarschijnlijk, dat de testisveranderingen verantwoordelijk zijn voor de aantasting der hypophyse en niet omgekeerd.

Deze hypophyse-theorie, zooals ik die kortheidshalve wil noemen, kan bovendien zeer veel andere symptomen niet verklaren.

Een andere hypothese, die de moeilijkheden echter verschuift naar het volkomen onbekende gebied der groei en celdeeling, is van Evans en Juhasz-Schäffer. De laatste toonde de invloed aan van vitamine E op celvermeerdering in weefselculturen. Deze hypothese is veel meer omvattend en er zijn tot nu toe geen positieve feiten, welke kunnen aantoonen, dat ze foutief is.

Nog een derde hypothese moeten we noemen n.l. van de onderzoekers Waddell en Steenbock (1928) en Kudryashof (1933), die de werking van vitamine E trachten te verklaren door te wijzen op de analoge verschijnselen van het Waddell en Steenbock effect en die van resorptie-steriliteit.

Dit is het volgende verschijnsel:

Aether extracten, van met ferrichloride behandelde voedermengsels, veroorzaken aan ratten toegediend resorptie steriliteit.

Kudryashof verkreeg hetzelfde resultaat met ketonachtige oxydatie producten van vetten. Vitamine E zou nu in de stofwisseling het optreden van dergelijke stoffen voorkomen. Dit echter is niet bewezen, waardoor deze simpele verklaring ook nog tot de hypothesen behoort.

HOOFDSTUK II.

DE CHEMIE VAN HET VITAMINE E.

Het ligt buiten het terrein van dit proefschrift, om een volledig overzicht te geven van alle chemische onderzoekingen over vitamine E. We laten het dan ook bij een oppervlakkige beschouwing van de voornaamste resultaten.

a. *Eigenschappen en isolatie van vitamine E.*

De meeste eigenschappen waren reeds gevonden, terwijl het vitamine E nog niet in zuivere vorm verkregen was.

Ter bestudeering kwamen vooral in aanmerking concentraten, bereid uit tarwekiemolie, katoenzaadolie en dergelijke plantaardige oliën, waarvan bekend was uit biologische proeven, dat ze rijk waren aan vitamine E.

Bij de vervaardiging der concentraten werden deze oliën verzeept, waarbij het vitamine E in het onverzeepbare deel achterbleef. Dit deel is goed oplosbaar in de gebruikelijke lipoid-oplosmiddelen. Na het afscheiden der sterinen uit de onverzeepbare rest, zijn er verschillende wegen om nog sterker werkzame preparaten te verkrijgen.

Hoog-vacuum destillatie werd toegepast door Olcott en Mattill (1934), waarbij het vitamine bij 0.1—0.05 mm Hg druk tusschen 200—250° C overdestilleert.

Door Evans c.s. (1935) zijn de concentraten verdeeld tusschen petroleum-aether en methylalcohol (92 %) en uitgeschud met absolute methylalcohol.

Drummond (1935, 1935a) past een chromatografische reini-

ging toe. Al deze methoden gaven producten, welke in doses van 5—20 mg werkzaam waren bij de vrouwelijke E deficiente rat.

Kristallijne stoffen konden op deze manier niet verkregen worden. Eerst later toen men reeds meer wist van de eigenschappen van het vitamine E is door Evans, Emerson en Emerson het vitamine E in de vorm van zijn ester met allophaanzuur als eerste kristallijne product afgescheiden. Door verzeeping werd hieruit weer het zuivere vitamine E verkregen wat zij α-tocopherol noemden (formule $C_{29}H_{50}O_2$). Het is een lichtgele olie, met een zeer zwakke optische draaiing [Moss (1938)].

De stof bleek bestendig tegen zuur maar niet tegen loog. Het absorptiespectrum in ultraviolet licht is karakteristiek en de bepaling hiervan had reeds zijn diensten bewezen bij de reiniging der concentraten [Drummond (1935, 1935a)].

Het tocopherol is zeer gevoelig voor oxydatiemiddelen. Ferrichloride, goudchloride en zilvernitraat vernietigen het alle. Zelfs voor de zuurstof uit de lucht is de zuivere stof gevoelig in tegenstelling met de concentraten, waarin het eenigszins beschermd voorkomt door de daarin voorkomende antioxydantia, die in de natuurlijke producten het vitamine E steeds vergezellen.

De reduceerende eigenschappen van tocopherol ten opzichte van ferrichloride en goudchloride zijn door Karrer en Keller (1938g) en door Emmerie en Engel (1938, 1938a) gebruikt, om quantitatieve chemische bepalingsmethoden te ontwikkelen.

Karrer en Keller oxydeeren met goudchloride en voeren een potentiometrische titratie uit. De methode van Emmerie en Engel is een colorimetrische, waarbij het door de oxydatie met ferrichloride gevormde ferro-ijzer met $\alpha : \alpha'$-dipyridyl bepaald wordt.

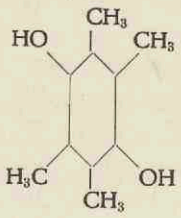
De tocopherolen geven bij behandeling met geconcentreerd salpeterzuur roode kleurstoffen [John (1939a)], deze eigenschap is later door Furter en Meyer (1939) nog benut, om een bepalingsmethode uit te werken.

Na de isolatie van dit eerste α-tocopheryl-allophanaat met een smeltpunt van 158° C zijn er nog het β- en het γ-tocopherol bij gekomen. Het laatste werd uit katoenzaadolie geïsoleerd. De smeltpunten zijn respectievelijk 143—144° C en 135° C (formule $C_{28}H_{48}O_2$) [Emerson (1937a)].

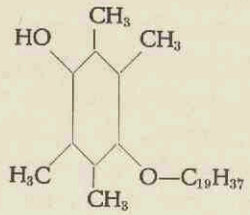
b. *Structuur en synthese der tocopherolen.*

De eerste grondslagen voor het vaststellen van de structuur zijn door Fernholz (1937) gelegd.

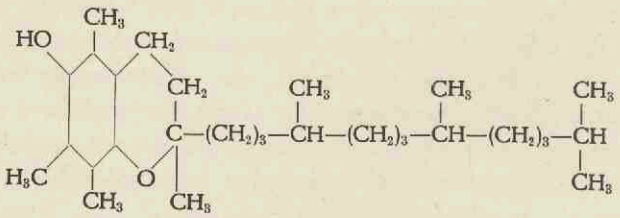
Door thermische ontleding verkreeg hij een product (I), dat hem leidde tot de veronderstelling, dat tocopherol een mono-aether was van het duro-hydrochinon (II). John, Dietzel en Günther (1938), Fernholz (1938) zelf en ook Bergel, Todd en Work (1938) kwamen echter reeds spoedig tot andere conclusies en Fernholz (1938) slaagde erin, om een structuurformule (III) op te stellen, die beter met de eigenschappen van het tocopherol overeenkwam.



I.
Durohydrochinon.



II.
Mono-aether van durohydrochinon.



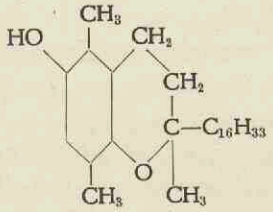
III.
dl-α-tocopherol.

Ook voor de isomere β- en γ-tocopherolen, die een methylgroep minder hebben als het α-tocopherol, kon een overeenkomstige formule gevonden worden, waarbij de plaats van de methylgroepen aan de benzolkern nog niet vastgesteld kon worden.

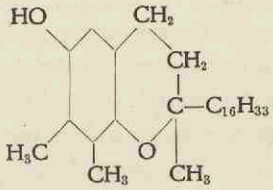
De synthese van α-tocopherol werd het eerst door Karrer, Fritzsche, Ringier en Salomon (1938, 1938d) uitge-

voerd. Trimethylhydrochinon werd met phytylbromide gecondenseerd onder inwerking van watervrij zinkchloride. Men krijgt zoo het *dl*-α-tocopherol in ongeveer quantitatieve opbrengst.

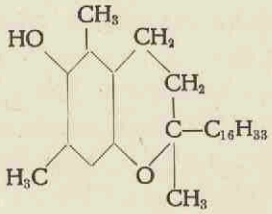
Bergel, Todd en medewerkers (1938, 1938a) en Smith en medewerkers (1938) hebben op ongeveer gelijke wijze kort na Karrer hetzelfde bereikt. Bij de synthese wordt een optisch inactieve stof verkregen, die Karrer *dl*-α-tocopherol noemde. Door middel van de broom-camphersulfonzure ester heeft hij een component kunnen afscheiden, die identiek was met die van het natuurlijke tocopherol. De synthese van de 3 mogelijke β-isomeren, is door Karrer c.s. (1938, 1939, 1939a) eenerzijds en door Bergel, Todd c.s. anderzijds uitgevoerd. Hierbij bleek, dat IV overeenkwam met het natuurlijke β-tocopherol, V met het γ-tocopherol en VI nog niet in de natuur gevonden was.



IV.
β-tocopherol.



V.
γ-tocopherol.



VI.

c. *Biologische activiteit van de tocopherolen en van andere synthetische stoffen.*

De biologische activiteit van *dl*-α-tocopherol wordt gewoonlijk gelijkgesteld met die van het natuurlijke tocopherol.

In het algemeen wordt aangenomen dat 3 mg van deze stoffen

voldoende zijn, om de vruchtbaarheid te herstellen, β- en γ-tocopherol zijn minder actief. Ongeveer 10 mg zijn noodig in een rattentest. Het derde synthetische β-tocopherol (VI) schijnt de activiteit van α-tocopherol te evenaren [Jacob, Sutcliffe en Todd (1940)]. De wijze waarop de verschillende auteurs tot deze waarden komen, zijn niet steeds geheel vergelijkbaar, hetgeen men bij deze getallen steeds in acht moet nemen.

Zeer vele stoffen, die in de loop van de chemische onderzoekingen zijn gesynthetiseerd, zijn op hun biologische activiteit onderzocht. Hierbij waren er, die in chemisch opzicht ver van het tocopherol afstonden en toch eenige activiteit vertoonden, andere, die slechts betrekkelijk weinig hiervan verschilden en die geheel inactief bleken.

Een systematisch onderzoek naar het verband van structuur der tocopherolen en de biologische activiteit is door Karrer (1938e) begonnen.

Veranderingen aan de benzolkern verminderen de activiteit, evenals veranderingen in de zijketen. In dit opzicht is α-tocopherol wel zeer specifiek de meest actieve vorm.

Door verestering van tocopherol krijgt men gedeeltelijk actieve producten b.v. tocopheryl-acetaat, tocopheryl-benzoaat en tocopheryl-phosphaat maar ook inactieve, zooals tocopheryl-allophanaat en het tocopheryl-urethaan.

Over de activiteit van de oxydatie producten van tocopherol, hebben we een eigen onderzoek uitgevoerd (pag. 51), waarbij ook de literatuur besproken is.

HOOFDSTUK III.

DE BIOLOGISCHE BEPALING VAN VITAMINE E.

a. *Literatuur.*

Toen we in 1938 ons onderzoek over vitamine E begonnen, was ons eerste werk een quantitatieve biologische bepalingsmethode op te bouwen. De chemische terzelfder tijd door Emmerie en schrijver (1938) gevonden, kon hiermee vergeleken worden. Elk verder onderzoek zou zonder deze chemische methode onvergelijkelijk veel moeilijker zijn, door de lange duur en vele andere moeilijkheden bij de biologische bepalingen.

Voor een goed begrip van onze moeilijkheden in het begin van onze onderzoekingen moet nog vermeld worden, dat ten tijde, dat deze biologische methode noodzakelijk geacht werd om de chemische uitkomsten te controleeren, het tocopherol nog niet gesynthetiseerd was en nog niet verkrijgbaar. De chemische structuur was door het werk van Fernholz (1937) en John (1937) reeds ten deele bekend. Quantitatieve biologische bepalingsmethoden bestonden niet. Door verschillende auteurs waren reeds pogingen gedaan, om de oude testmethode van Evans (1927) te verbeteren. We noemen vooral Palmer (1937), Bacharach (1937, 1938, 1938a), Bomskov (1938) en Mason (1939). Deze gaan voort op de methode van Evans. Hierbij worden vrouwelijke ratten gebruikt. De E-avitaminose is bij de rat niet door uitwendige symptomen gekenmerkt, die eventueel in aanmerking kunnen komen als testreactie. Slechts twee criteria komen als zoodanig in aanmerking. De resorptie-steriliteit bij vrouwelijke ratten en de testisdegeneratie bij mannelijke ratten. Een ijking kan dan berusten op het genezen (curatieve ijking) of het voorkomen (prophylactische ijking) van deze deficientie-verschijnselen. Daar

de testisdegeneratie niet herstelbaar is, spreekt het vanzelf dat we hier slechts een prophylactische ijkingsmethode zouden kunnen toepassen.

De andere symptomen, veranderingen der hypophyse, verlammingsverschijnselen en groeiremming komen niet in aanmerking. De methoden van bovengenoemde auteurs berusten allen op de resorptiesteriliteit, terwijl Ringsted (1936) nog een methode voorstelt met mannelijke ratten dus berustend op de testisdegeneratie. Ik bespreek verder alleen de methode, die we later zelf gebruikt hebben, n.l. de curatieve ijkingsmethode met vrouwelijke ratten.

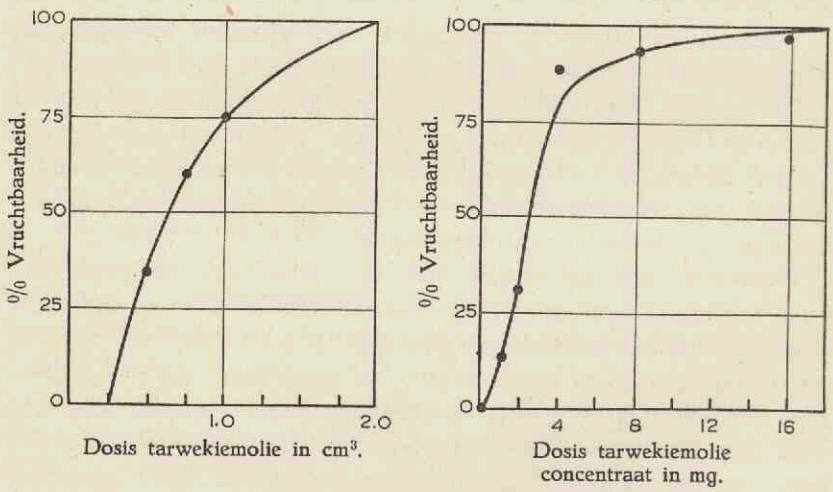


Fig. 3.
Werkingskrommen van tarwekiemolie (Bomskov) en tarwekiemolieconcentraat (Bacharach).

Door Bacharach en Bomskov is het eerst ingezien, dat, wilde men een quantitatieve ijking verkrijgen, men het verband moest kennen tusschen de dosis vitamine en de uitwerking daarvan. Het vaststellen hiervan ging reeds met vele moeilijkheden gepaard; het resultaat is in fig. 3 vermeld.

De werking van het vitamine E wordt hier uitgedrukt in vruchtbaarheids percentage. Dit is het percentage ratten, dat jongen werpt betrokken op het aantal, dat zwanger is geworden. Als we

de werkingskrommen nader bezien, blijkt, dat er slechts een gering gradueel verschil is. De uitslag van de ijking heeft min of meer het karakter van een „alles of niets" werking. Een geheel andere manier om de werking uit te drukken is later nog door Mason (1939) gepubliceerd, welke dit bezwaar tracht te ondervangen. Hij kon op de volgende wijze numerieke waarden verkrijgen, die hij „uterine index" noemt. Bij een proef doodt hij zijn proefdieren op den 16den dag der zwangerschap. Dit bleek voordeelen te hebben en nieuwe gezichtspunten op te leveren. De uterus wordt er uitgehaald en gewogen zoowel voor als na verwijdering van de levende foetus, doode foetus en resorptie resten. Hij verkreeg met behulp van de volgende vergelijking getallen, die volgens hem een meer gradueel verschil aangeven van de E-avitaminose:

$$\frac{\text{Gewicht van uterus inhoud in g.} + \text{aantal levende foetus (als twee of meer aanwezig zijn)}}{5}$$

Waarden kleiner dan 1 noemt hij negatief. Positieve uitkomsten tusschen 1 en 4 blijken evenredig te zijn met de dosis vitamine E. IJkingen met deze en met de methode van Bacharach gaven gelijke uitkomsten. Mij komt de methode wat kunstmatig voor en de practische bruikbaarheid moet nog bevestigd worden.

Uit de werkings-krommen kan men afleiden, dat men het best kan ijken met doses, die de steriliteit voor ongeveer 50 % opheffen.

De dosis, die bij 50 % der ratten de resorptie-steriliteit opheft noemt Bomskov de R(atten) E(enheid). Bacharach berekent een M(ean) F(ertility) D(ose) en vindt het volkomen overbodig om een eenheid in te voeren, daar deze dosis uitgedrukt kan worden in een zekere hoeveelheid tocopherol.

De genoemde auteurs gingen van de veronderstelling uit, dat hun dosis-werkingskromme iets absoluuts was, zoodat ze een onbekend preparaat in één dosis gegeven, hiermee direct konden ijken.

Daar we veronderstelden, dat een curve van een biologisch symptoom als de resorptie-steriliteit niet steeds hetzelfde behoefde te zijn, hebben we, evenals bij de vitamine A ijkingen gebruikelijk is, steeds naast de onbekende preparaten een standaard gebruikt.

Oorspronkelijk namen we hiervoor een tarwekiemolie, later *dl*-α-tocopherol en daar deze stof niet stabiel is t.o.z. van de zuurstof van de lucht lijkt het ons beter tocopheryl-acetaat te gebruiken. De activiteit is dan ook door ons t.o.z. van tocopherol bepaald. Bij de ijking van onbekende preparaten stellen we dus steeds naast elkaar de werkingskrommen van de standaard en van de onbekende stof. Als vergelijkingspunt namen we de dosis waarbij in beide krommen 50 % der dieren de zwangerschap tot een goed einde bracht. De sterkte van het onbekende preparaat is dan gemakkelijk te berekenen en uit te drukken in een gehalte aan tocopherol.

b. *Uitvoering der ijkingen.*

Bij het samenstellen van de werkings-krommen gaan we als volgt te werk. Aan een aantal groepen van volkomen gelijk behandelde dieren, die zoolang een vitamine E-vrij dieet hebben gehad, dat ze

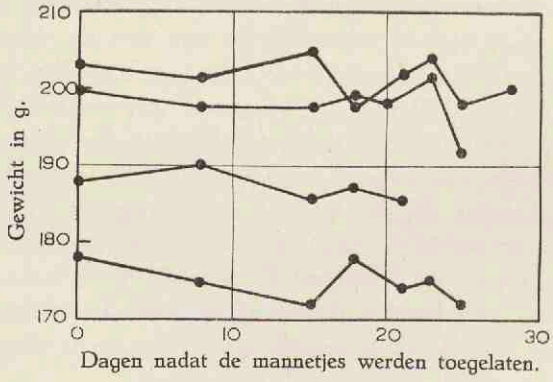


Fig. 4.
Gewichtscurven, waaruit blijkt dat de dieren niet zwanger werden.

allen resorptie-steriliteit vertoonden (± 3 maanden), worden verschillende doses van een preparaat, opgelost in een inactieve olie gegeven.

De totale dosis wordt verdeeld over vijf dagen, *per os* gegeven, te beginnen met de dag waarop de mannetjes bij de wijfjes worden

gelaten (drie mannetjes bij ongeveer tien wijfjes bleek steeds voldoende om alle wijfjes te bevruchten).

De bevruchting kan men op verschillende manieren vaststellen, door na te gaan of er spermiën in de vagina gevonden worden of een vaginaal prop of ook een toeneming van het gewicht. De laatste methode pasten we toe. De wijfjes worden voor dit doel tweemaal per week gewogen. Uit de gewichtscurven kan men afleiden of de ratten zwanger zijn geworden en of er een resorptie optreedt (fig. 4, 5 en 6).

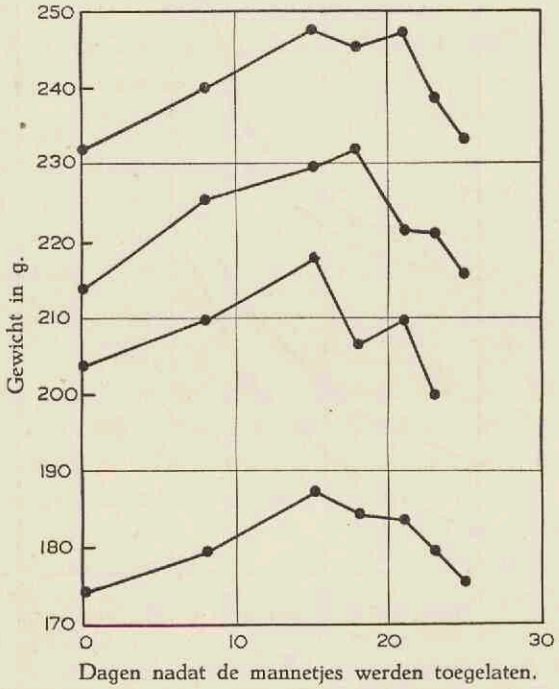


Fig. 5.

Gewichtscurven waaruit blijkt dat de dieren zwanger waren maar de foetus geresorbeerd hebben.

Als de zwangerschap normaal verloopt, wordt na ongeveer 21 dagen een nest jongen geworpen. We noemen de zwangerschap normaal als er één levend ratje geboren wordt. Bacharach beveelt het gebruik van virgineele ratten aan. Bomskov gebruikt

zijn ratten meerdere malen. Bij onze methode, waar steeds standaard curven ter contrôle gemaakt worden, kan men deze laatste methode toepassen. Het spreekt echter van zelf, dat men de ijkingen

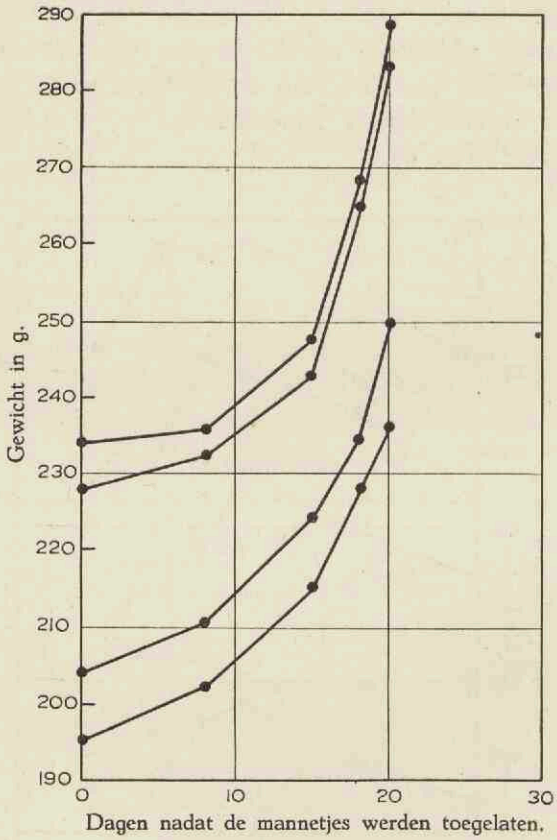


Fig. 6.

Gewichtscurven waaruit een zwangerschap blijkt, die normaal verloopt.

van standaard en onbekende preparaten met een groep geheel gelijk behandelde dieren moet uitvoeren. Bij deze bepalingen was een uniforme behandeling van het dier materiaal en de samenstelling van het dieet van groot belang. Deze waren als volgt:

1. **Dieren.**

Jonge vrouwelijke albinoratten met een gewicht van 60—80 g,

4—5 weken oud, van moeders, gevoed met ons normale fokvoer, werden op een vitamine E-vrij dieet gezet, dat hen *ad libitum* gegeven werd. De dieren werden met 8 à 10 te samen in kooien met een inhoud van 45 × 45 × 40 cm gehouden, terwijl drinkwater steeds tot hun beschikking was. Ze vertoonden na drie maanden resorptiesteriliteit. Het is dus niet noodig om speciale voorzorgen te nemen, zooals Mason voorstelt, om te verhinderen, dat de jongen terwijl ze nog gezoogd worden een vitamine E-voorraad opdoen door van het voer van de moederdieren te eten.

2. **Het dieet.**

Ons fokvoer voor de moederdieren en voor de normale mannetjes bestond uit het volgende:

Gemalen mais	200
Magere melkpoeder	150
Biergist	75
Oleum arachidis	25
Reuzel	50
	500

De dieren waren op dit dieet volkomen normaal. Een vitamine E-vrij dieet kan men op verschillende manieren bereiken. Men kan van grondstoffen uit gaan die absoluut vitamine E-vrij zijn.

Dit zijn in het algemeen vetvrije diëeten [Blumberg (1935)]. Een andere methode is die van Waddel en Steenbock (1931); hierbij worden de voermengsels behandeld met een ferrichloride oplossing in aether. Het vitamine E wordt dan geoxydeerd. Een derde methode vindt men in de vetrijke diëeten. Hierin worden de eventueele hoeveelheden vitamine E geoxydeerd door de bij het rans worden ontstane peroxyden. Als vet komt vooral in aanmerking reuzel daar dit gemakkelijk rans wordt. Bij de twee laatste methoden zou men volgens Waddel en Steenbock complicaties kunnen verkrijgen daar de door het rans worden ontstane producten alleen reeds voldoende zouden zijn om een resorptiesteriliteit te veroorzaken. Dit is in nog sterkere mate het geval met de oxydatie producten, die ontstaan bij de behandeling met ferrichloride. De eerste methode lijkt dus het beste. De groei is dan

echter meestal slecht. Wij hebben daarom een tusschenweg gekozen, het dieet bestond uit:

Caseine (technische)	900
Amylum oryzae	3450
Biergist	300
Reuzel	195
Zoutmengsel (Steenbock no. 40)	220
	5065

20 g levertraan per kg voer.

De ratten vertoonden op dit dieet na drie maanden zonder uitzondering resorptie-steriliteit.

3. **Waardeering der resultaten.**

De werkingskrommen van standaard en onbekende preparaten werden opgesteld door de vruchtbaarheidsgraad na te gaan na toediening van verschillende doses aan groepen van vitamine E-vrije ratten. Bij de berekening nemen we als vergelijkingspunt de dosis, waarbij 50 % der ratten, waarbij een implantatie vastgesteld was, een zwangerschap tot een goed einde brachten.

Het resultaat van de ijkingen, waarbij *dl*-α-tocopherol, dat de firma Hoffmann-La Roche ons ter beschikking stelde, als standaard preparaat gebruikt werd, wordt in de volgende bladzijden besproken.

c. *Zwangerschaps-resorptie en implantatie.*

Voorgaand schreven we reeds, dat Bacharach bij voorkeur virgineele ratten gebruikt, terwijl Bomskov de ratten meerdere malen voor achtereenvolgende ijkingen bezigt. De reden van Bacharach (1937, 1938) hiervoor is het volgende feit, dat anderen en ook wij bij onze proeven hebben opgemerkt. Maakt een groep ratten een zwangerschaps-resorptie door, dan wordt bij een volgende dekking een zeker percentage niet zwanger. Dit percentage wordt na nog meer resorpties hoe langer hoe grooter. Daar deze dieren waardeloos zijn voor de proef, brengt het groote nadeelen mee; men moet dan, om een vereischt behoorlijk aantal te

krijgen, van een veel grooter aantal uitgaan. Ook Karrer en Demole (1938) vermeldden deze daling van het percentage met normale implantatie, nadat de ratten een of meer zwangerschapsresorpties hadden doorgemaakt. Door Bacharach (1938) werd bewezen, dat het een gevolg is van de zwangerschapsresorptie zelf en niet van het langer verblijven op een vitamine E-vrij dieet. Ook wij konden deze achteruitgang vaststellen, zooals blijkt uit de volgende tabel, waarin ook de cijfers van bovengenoemde auteurs vermeld zijn.

Tabel 1.

Steriliteit en zwangerschaps-resorptie.

V = virgineele ratten, Z = ratten na 1 zwangerschapsresorptie, ZZ = ratten na 2 zwangerschaps-resorpties, ZZZ = ratten na 3 zwangerschaps-resorpties.

Aantal ratten	Aantal ratten vruchtbaar	Aantal ratten vruchtbaar in %	Auteur
V 542	469	87	Bacharach (1938a)
Z 59	32	54	„
V 25	21	84	„ (1938a)
Z 25	10	40	„
V 300	291	97	Karrer en Demole (1938)
Z 200	144	72	„ „
ZZ 100	53	53	„ „
ZZZ 20	4	20	„ „
V 110	106	96	
Z 94	73	78	
ZZ 87	46	53	

Het is niet bekend of deze steriliteit tengevolge van zwangerschaps-resorpties herstelbaar is.

d. *IJking van oliën en concentraten.*

Het doel van deze ijkingen was om bij een aantal preparaten na te gaan of de uitkomsten met de chemische bepaling overeenkwamen met die van de biologische. Het was immers zeer goed mogelijk, dat we evenals bij vitamine A zeer groote verschillen

zouden vinden in beide methoden. De chemische methode wordt daardoor niet geheel waardeloos, maar verliest, vooral bij een physiologisch onderzoek, veel van zijn voordeelen.

De volgende ijkingen zijn met eenzelfde groep ratten uitgevoerd. Als standaard preparaat werd *dl*-α-tocopherol gebruikt. Van de onbekende preparaten werd een dosis-werkingskromme geconstrueerd. Met behulp van krommen werd grafisch de dosis gevonden waarbij 50 % der dieren een normale zwangerschap vertoonden. Uit deze dosis is dan, door middel van de dosis gevonden met het *dl*-α-tocopherol, direct het tocopherol-gehalte der onbekende preparaten te berekenen.

Tabel 2.
Verband tusschen de dosis en de werking van *dl*-α-tocopherol.

Preparaat	Doses in mg	Aantal ratten	Aantal nesten	% Fertiliteit
dl-α-tocopherol	0.7	5	0	0
	1	5	2	40
	1.8	7	6	86
	2.3	6	6	100
	2.7	6	6	100
Contrôle	—	15	0	0

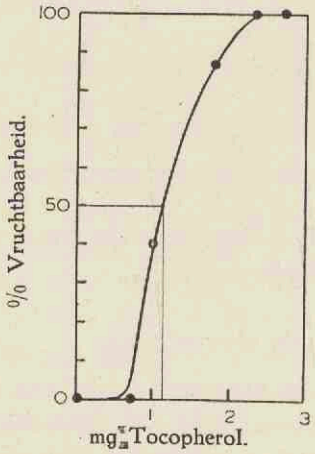


Fig. 7.
Dosis-werkingskromme van *dl*-α-tocopherol.

1. *dl-α*-**tocopherol.**

Het preparaat opgelost in olijfolie. De verschillende doses verdeeld over de eerste vijf dagen der proef *per os* aan de ratten toegediend (zie tabel 2 en fig. 7).

De zwangerschap verloopt bij 50 % der dieren normaal bij een dosis van **1.2 mg.**

2. **Tarwekiemolie.**

„Koud geperste" tarwekiemolie uit de handel.

Als zoodanig onverdund aan de dieren *per os* gegeven.

Tabel 3.

Verband tusschen de dosis en de werking van tarwekiemolie.

Preparaat	Doses in g	Aantal ratten	Aantal nesten	% Fertiliteit
Tarwekiemolie	0.23	4	0	0
	0.46	4	3	75
	0.6	10	10	100
	0.9	5	5	100

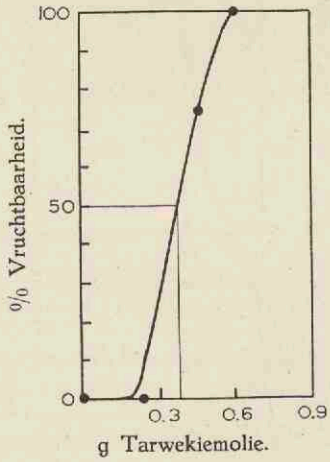


Fig. 8.

Dosis-werkingskromme van tarwekiemolie.

De zwangerschap verloopt bij 50 % der dieren normaal bij een dosis van 0.39 g. Het gehalte aan tocopherol is dus **0.33 %.**

3. **Concentraat uit tarwekiemolie bereid.**

Door verzeeping en uitvriezen der sterinen uit voorgaande tarwekiemolie verkregen (concentraat 1). Concentraat verdund met olijfolie.

Tabel 4.

Verband tusschen de dosis en de werking van concentraat 1.

Preparaat	Doses in mg	Aantal ratten	Aantal nesten	% Fertiliteit
Concentraat 1	5.3 6.3 10.6	5 19 6	3 12 6	60 63 100

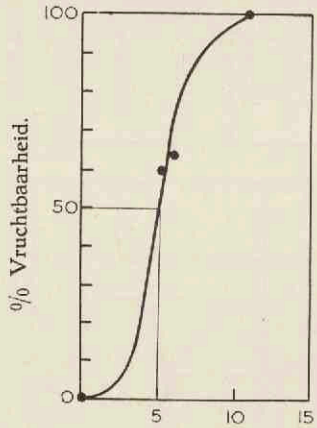


Fig. 9

Dosis-werkingskromme van concentraat 1.

De zwangerschap verloopt bij 50 % der dieren normaal bij een dosis van 5 mg. Het gehalte aan tocopherol is dus **24 %**.

4. **Katoenzaadolie.**

Niet geraffineerde katoenzaadolie uit de handel. Als zoodanig onverdund aan de ratten *per os* gegeven.

Tabel 5.
Verband tusschen de dosis en de werking van katoenzaadolie.

Preparaat	Doses in g	Aantal ratten	Aantal nesten	% Fertiliteit
Katoenzaadolie	0.4	5	1	20
	0.8	4	3	75
	1.2	5	5	100

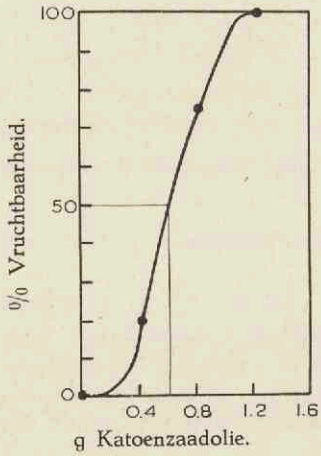


Fig. 10.
Dosis-werkingskromme van katoenzaadolie.

De zwangerschap verloopt bij 50 % der ratten normaal bij een dosis van 0.6 g. Het gehalte aan tocopherol is dus **0.2 %**.

5. **Concentraat uit katoenzaadolie.**

Door verzeeping en uitvriezen der sterinen uit voorgaande olie verkregen (concentraat 2). Het concentraat verdund met olijfolie.

Tabel 6.
Verband tusschen de dosis en de werking van concentraat 2.

Preparaat	Doses in mg	Aantal ratten	Aantal nesten	% Fertiliteit
Concentraat 2	3.25	5	0	0
	6.5	6	1	16
	8.5	6	3	50
	9.5	7	6	86

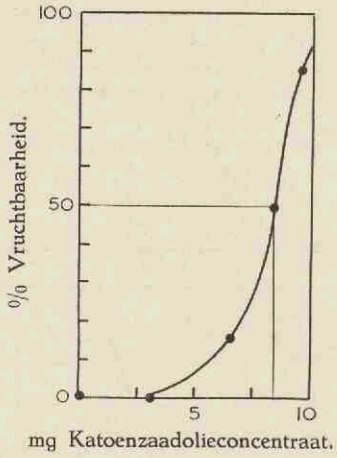


Fig. 11.
Dosis-werkingskromme van concentraat 2.

De zwangerschap verloopt bij 50 % der ratten normaal bij een dosis van 8.5 mg. Het tocopherol gehalte is dus **14** %.

e. *Vergelijking van de biologische en de chemische bepaling van vitamine E.*

De biologische ijkingen van deze preparaten geven ons eenige cijfers ter vergelijking met waarden gevonden met de chemische bepalingsmethoden voor het vitamine E. Naast de methode van Emmerie en Engel (1938a), hebben we ook nog eenige bepalingen uitgevoerd op een wijze als door Karrer en Keller (1938g) beschreven is. Beide methoden berusten op de reduceerende eigenschappen van het vitamine E. Zij verschillen slechts in oxydatie middel. Bij de methode van Emmerie en Engel wordt met ferrichloride het tocopherol geoxydeerd en het gevormde ferro-ijzer met behulp van $\alpha : \alpha'$-dipyridyl colorimetrisch bepaald, bij de methode van Karrer en Keller is goudchloride het oxydans en wordt het verbruikte goudchloride potentiometrisch getitreerd. Bij beide methoden kunnen de in de oliën aanwezige carotinoiden storen. Men kan hiervoor een correctie aanbrengen [Karrer en Keller (1938g)] of ze quantitatief verwijderen [Emmerie en Engel (1939)].

Chemische bepalingen.

De bepalingen werden uitgevoerd met het onverzeepbare deel der oliën. De concentraten waren reeds verzeept, zoodat het hierin rechtstreeks bepaald kon worden.

1. **Tarwekiemolie.**

5 g afgewogen en met 10 cm^3 2 *n* methyl-alcoholische KOH gedurende 10 min. bij kooktemperatuur onder een stikstof atmospheer verzeept. Het mengsel verdund met 15 cm^3 methanol en 40 cm^3 water en daarna driemaal met 50 cm^3 aether geextraheerd. De vereenigde aether extracten met water, verdunde loog en weer met water tot alkali-vrij gewasschen. De aether oplossing over calciumchloride gedroogd en *in vacuo* verdampt. De rest in 50 cm^3 aethanol opgenomen (oplossing 1).

Deze oplossing gebruikt voor de bepaling van carotine en tocopherol:

1 cm^3 bevat *6 γ carotine.*

1 cm^3 van oplossing 1 met 1 cm^3 0.2 % ferrichloride in aethanol en 1 cm^3 0.5 % $\alpha : \alpha'$-dipyridyl eveneens in aethanol verdund tot 25 cm^3. Stuphometer aflezing met 1 cm cuvet 43.5 d.i. 246 γ tocopherol.

Carotine correctie: Deze waarde moet nog gecorrigeerd worden voor het aanwezige carotine. Bij deze geringe carotine hoeveelheden komt 1 γ carotine overeen met 1 γ tocopherol. Per cm^3 is dus 240 γ *tocopherol* aanwezig d.i. **0.24** % berekend op de oorspronkelijke olie.

20 cm^3 van oplossing 1 met een oplossing van goudchloride volgens Karrer en Keller potentiometrisch getitreerd. 1.30 cm^3 van deze goudchloride oplossing komt overeen met 1 mg tocopherol.

Het gemiddelde der potentiaal sprong werd grafisch uit de figuur afgeleid. Het is in dit geval bij 7.3 cm^3 $AuCl_3$ oplossing.

Carotine correctie.

20 cm^3 van oplossing 1 bevatten 130 γ carotine. 1 mg carotine komt overeen met 4.01 cm^3 goudchloride oplossing. 130 γ is dus 0.52 cm^3. Voor tocopherol blijft dus over 6.78 cm^3 d.i. 5.21 mg tocopherol of **0.26** % der oorspronkelijke olie (Biol. waarde 0.33 %).

Tabel 7.

Potentiometrische titratie van het onverzeepbare deel van tarwekiemolie.

cm^3 $AuCl_3$ toegevoegd	E in millivolt
2	193
4	229
6	277
7	330
8	508
10	570
12	627

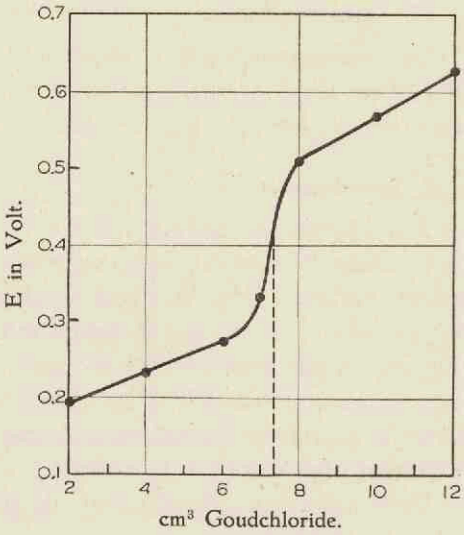


Fig. 12.

Potentiaalverloop bij de titratie van het onverzeepbare deel van tarwekiemolie met goudchloride.

2. **Concentraat 1.**

100 mg afgewogen en opgelost in 50 cm^3 aethanol.

Carotine: 10 cm^3 bevatten **72** γ carotine.

Tocopherol: 0.5 cm^3 met ferrichloride-dipyridyl behandeld. Stuphometer aflezing: 44.5 d.i. 240 γ dus na carotine correctie 232 γ of **23.6** % tocopherol berekend op het concentraat.

10 cm^3 der oplossing gebruikt voor potentiometriche titratie met goudchloride.

Het gemiddelde van de potentiaal-sprong is bij 6.3 cm^3.

Carotine correctie: 72 γ komt overeen met 0.30 cm^3 goudchloride oplossing. Voor tocopherol blijft dus over 6.00 cm^3 d.i. 4.62 mg of **23.1** % tocopherol berekend op het concentraat (biol. waarde 24 %).

Tabel 8.

Potentiometrische titratie van concentraat 1 met $AuCl_3$

cm^3 $AuCl_3$ toegevoegd	E in millivolt
1	153
3	170
5	190
7	482
9	527
11	590

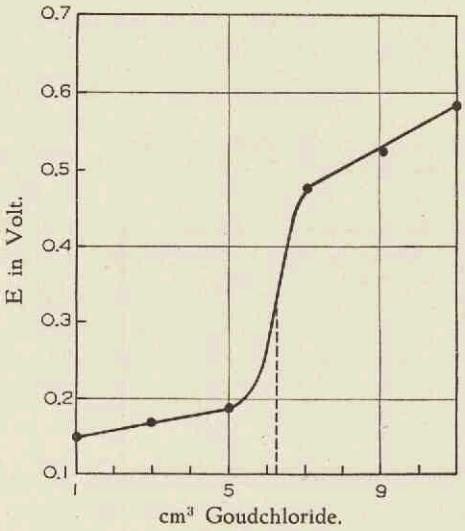


Fig. 13.

Potentiaalverloop bij de titratie van een tarwekiemolie concentraat met goudchloride.

3. **Katoenzaadolie.**

Bewerkt als tarwekiemolie. Het onverzeepbare van 5 g olie opgelost in 50 cm^3 aethanol.

Carotine: 2 cm^3 van deze oplossing bevatten 1.7 γ carotine.

Tocopherol: 2 cm^3 met ferrichloride-dipyridyl reagens behandeld geven een stuphometer aflezing van 36 d.i. 304 γ gecorrigeerd voor carotine dus 302.3 γ of **0.15** % tocopherol berekend op de oorspronkelijke katoenzaadolie.

20 cm^3 met goudchloride getitreerd.

Het gemiddelde van de potentiaal-sprong ligt bij 3.4 cm^3.

Na carotine correctie blijft 3.30 cm^3 over voor tocopherol of 2.54 mg. het gehalte aan tocopherol der katoenzaadolie is dus **0.13** % (biol. waarde 0.20 %).

Tabel 9.

Potentiometrische titratie van het onverzeepbare deel van katoenzaadolie.

cm^3 $AuCl_3$ toegevoegd	E in millivolt
2	207
3	261
4	578
5	616
5.5	634

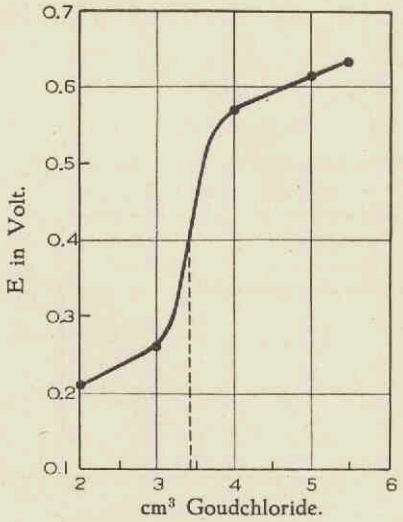


Fig. 14.
Potentiaalverloop bij de titratie van het onverzeepbare deel van katoenzaadolie met goudchloride.

4. **Concentraat 2.**

100 mg afgewogen en opgelost in 50 cm^3 aethanol.

10 cm^3 van deze oplossing bevatten 12 γ carotine.

2 cm^3 met ferrichloride-dipyridyl reagens behandeld geven een aflezing van 29 d.i. 368 γ tocopherol dus na carotine correctie 367 γ of **18.3** % berekend op het concentraat (biol. waarde 14 %).

In onderstaande tabel hebben we de uitkomsten der chemische en der biologische bepalingen samengevat.

Tabel 10.

Vergelijking van de biologische en de chemische bepaling van vitamine E.

Preparaat	Gehalte aan tocopherol in %		
	Biologisch	Chemisch	
		methode K & K	methode E & E
Tarwekiemolie	0.33	0.26	0.24
Concentraat 1	24.—	23.1	23.6
Katoenzaadolie	0.20	0.13	0.15
Concentraat 2	14.—	—	18.3

Zooals uit de tabel blijkt, komen de beide chemische methoden in uitkomsten vrijwel overeen. Ook de biologische ijkingen wijken niet veel af als men in aanmerking neemt de groote fouten, die men bij deze ijkingen niet kan vermijden.

Lester Smith en Bailey (1939) onderzochten later een grooter aantal oliën en concentraten en vonden de beide chemische methoden van Karrer en Keller en van Emmerie en Engel in overeenstemming met elkaar. In vergelijking met de biologische vinden zij, dat bij de chemische methoden in het algemeen de waarden te hoog gevonden worden bij concentraten en te laag bij oliën. Biologische uitkomsten zijn echter niet vermeld. Zij gebruiken de methode van Bacharach.

f. *Vergelijking der biologische activiteit van het synthetische dl-α-tocopherol en het natuurlijke d-α-tocopherol.*

Ten tijde, dat wij reeds het synthetisch *dl-α*-tocopherol als standaard gebruikten voor onze ijkingen, was het nog niet bekend of de biologische activiteit identiek was met die van het natuurlijke tocopherol. Een scheiding in de componenten kon door Karrer (1938c) slechts ten deele verwezenlijkt worden. Later bleek, dat de verhoudingen gecompliceerder waren dan oorspronkelijk vermoed was [Karrer (1939)].

Een biologische ijking van beide preparaten naast elkaar was nog door niemand uitgevoerd. In de literatuur kwamen wel verschillende getallen voor over de werking der beide preparaten, maar geheel vergelijkbaar zijn deze niet door verschil in methode.

In onderstaande tabel zijn de gegevens uit de literatuur samen gevat. Hieruit blijkt ook heel duidelijk, dat men steeds weer een standaard moet gebruiken om een bepaald preparaat te ijken en dat men niet kan volstaan met een voor altijd samengestelde dosiswerkings kromme [Bacharach (1938a)].

Tabel 11.
Biologische activiteit van *dl*-α-tocopherol en van *d*-α-tocopherol.

Preparaat	Dosis in mg	Aantal ratten	Fertiliteit in %	Auteur
d-α-tocopherol	3		66	Evans, Emerson en Emerson (1936)
	1		20	
	3		100	
	2.5		100	
	1		0	
	3		100	
dl-α-tocopherol	1.64	18	94	Bacharach (1939)
	1.09	25	92	
	0.55	25	8	
d-α-tocopherol	3.74	5	100	Bacharach (1939)
	1.97	6	50	
	0.98	5	40	
d-α-tocopherol	1.5	21	81	Bacharach (1939)
dl-α-tocopherol	2	10	90	Demole, Isler, Ringier, Salomon en Karrer (1939a)
d-α-tocopherol	2	5	80	
d-α-tocopherol	10	6	100	Karrer en Demole (1938)
	5	2	100	
	3	4	100	
	2	2	50	
	1	2	0	
dl-α-tocopherol	5	5	100	Karrer en Demole (1938)
	3	5	80	
dl-α-tocopherol	1	4	0	Werder, Moll en Jung (1939)
	2	5	0	
	3	28	79	
	7.5	3	100	
	15	7	100	
d-α-tocopherol	1	5	40	Evans, Emerson en Emerson (1938)
	3	4	100	

Eigen ijking.

Voor de ijking van *d*-α-tocopherol gebruikten wij een zuiver tocopheryl-allophanaat, dat dr. John (Göttingen) ons ter beschikking stelde. Het werd voor het toedienen op de gebruikelijke manier met methyl-alcoholische KOH verzeept. Door een chemische bepaling werd het gehalte na verzeeping bepaald en een geschikte verdunning gemaakt in arachisolie.

Het *dl*-α-tocopherol (Hoffmann-La Roche) werd eveneens in arachisolie verdund.

Tabel 12.

Biologische activiteit van *d*- en *dl*-α-tocopherol.

Preparaat	Dosis in mg	Aantal ratten	Fertiliteit in %
d-α-tocopherol	0.8 1.6	12 13	67 77
dl-α-tocopherol	0.8 1.6	10 17	70 82

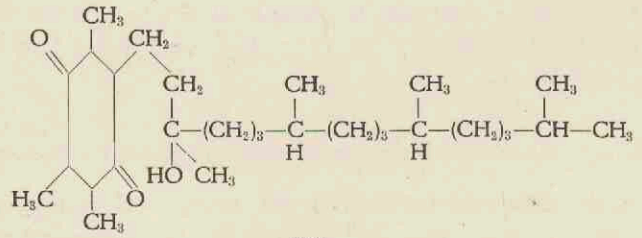
De activiteit van beide preparaten is dus ongeveer **gelijk.** In vergelijking met de voorgaande ijkingen is het tocopherol hier sterker werkzaam (zie tabel 2 blz. 40). Een verklaring kan hiervoor niet gegeven worden.

g. *Biologische activiteit van de oxydatie producten van tocopherol.*

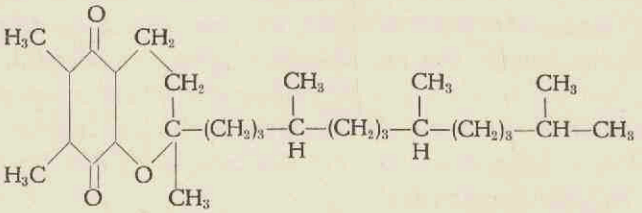
Indien de oxydatie producten van tocopherol eenige vitamine E-activiteit hadden, was de chemische bepalingsmethode van Emmerie en Engel waardeloos. Geoxydeerde producten worden immers met deze methode, die juist berust op de reduceerende eigenschappen van het tocopherol, niet mee bepaald. In aansluiting aan de ijkingen van de natuurlijke oliën en concentraten onderzochten wij terstond de oxydatie producten van het synthetische *dl*-α-tocopherol en van het *d*-α-tocopherol met ferrichloride op hun biologische activiteit.

In een vroegere publicatie, Emmerie en Engel (1939),

deelden wij het resultaat reeds mee, waarbij wij opmerkten, dat hoewel deze oxydatie producten onwerkzaam waren, zij nog wel een reactie vertoonden met de alcoholisch salpeterzuur bepalingsmethode van Furter en Meyer (1939). Het lijkt eenigszins overbodig deze proef te doen, daar immers Waddell en Steenbock (1931) hun dieet voor het verkrijgen van vitamine E-vrije ratten met ferrichloride in aether behandelden, waarbij het eventueel aanwezige vitamine E onwerkzaam wordt. Daartegenover stond, dat Olcott en Mattill (1934) en Evans, Emerson en ,Emerson (1936) slechts een verminderde activiteit vonden na oxydatie met zilvernitraat. Na het afsluiten van onze eigen proeven verschenen er verscheidene publicaties over dit onderwerp. Karrer (1938a, 1938f), John (1939a), v. Werder (1939) en Wright (1940) vonden de oxydatie producten inactief. Hierbij dient vermeld te worden, dat door de oxydatie middelen zooals gewoonlijk gebruikt (ferrichloride, goudchloride en zilvernitraat) niet identieke producten ontstaan. Met ferrichloride en goudchloride ontstaat in hoofdzaak een product VII, dat Karrer tocopherolchinon, John tocopherylchinon en Emerson toco-chinon noemt. Met zilvernitraat ontstaat naast VII nog het rood gekleurde para-chinon VIII het „tocopherol-rot", dat eveneens ontstaat bij de oxydatie met alcoholisch salpeterzuur.



VII.

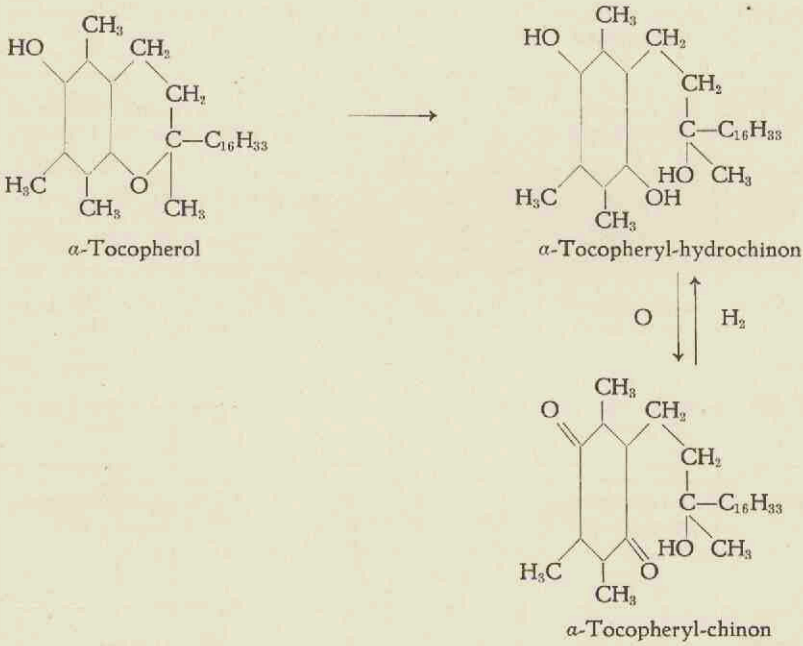


VIII. John.

Des te merkwaardiger is daarom het resultaat van Emerson, Emerson en Evans (1939), die een quantitatief even groote activiteit vinden van toco-chinon en tocopherol.

Karrer en Geiger (1940) komen met een uitgebreid onderzoek nogmaals terug op deze vraag en bevestigen nogeens hun reeds vroeger vermeld resultaat.

De vraag of tocopheryl-chinon biologisch werkzaam is of onwerkzaam, is niet alleen van belang voor de chemische bepaling maar heeft ook een andere beteekenis. Emerson (1939) en Wright (1940) veronderstelden n.l., dat beide producten in de cel in elkaar konden overgaan, een redox-systeem zouden vormen en men stelde zich voor, dat het tocopherol ook op deze wijze in de cel zou werken.



IX. Oxydo-reductie systeem verondersteld door Wright en Drummond.

Wright (1940) en Karrer (1940) ontkennen dit, terwijl Emerson (1939) dit bewezen meent te hebben. Karrer heeft intusschen wel aangetoond, dat de methode van oxydatie van Emerson zeer onvolledig was en geeft daarbij dezelfde getallen,

die wij ook vonden voor het niet geoxydeerde gedeelte. In het experimenteele gedeelte komen wij daarop nader terug (blz. 55). Hieronder volgt een samenvatting van de biologische ijkingen van de diverse auteurs.

Tabel 13.

Biologische activiteit van de oxydatie producten van tocopherol.

Oxydatie methode	Preparaat	Aantal ratten	Dosis mg	Aantal resorpties	Aantal nesten	Auteurs
$AgNO_3$	Concentraat geoxydeerd	verminderde activiteit				Olcott en Mattill (1934)
$AgNO_3$	*d*-α-Tocopherol geoxydeerd	?	4	50 %	50 %	Evans, Emerson en Emerson (1936)
$AgNO_3$	*d*-α-Tocopherol geoxydeerd	?	20	geen activiteit		Karrer, Salomon en Fritzsche (1938 f)
$AuCl_3$	*dl*-α-Tocopherol geoxydeerd	4	20	4	0	Karrer, Escher, Fritzsche, Ringier en Salomon (1938a)
$FeCl_3$	α-Tocopherol geoxydeerd	5	20	5	0	v. Werder, Moll en en Jung (1939)
$FeCl_3$	α-Tocopherol geoxydeerd	6	20	6	0	John, Dietzel en Emte (1939a)
$FeCl_3$	*d*-α-Tocopherol geoxydeerd	5 3 4 4	4 3 8 17	2 0 0 0	3 3 4 4	Emerson, Emerson en Evans (1939)
$AgNO_3$	α-Tocopherol geoxydeerd	3 5	5 10	3 5	0 0	Wright en Drummond (1940)
$AuCl_3$ $FeCl_3$	*dl*-α-Tocopherol geoxydeerd *dl*-α-Tocopherol geoxydeerd	4 5 5 4	25 20 25 10	4 5 5 4	0 0 0 0	Karrer en Geiger (1940)

Experimenteel gedeelte.

dl-α-Tocopheryl-chinon.

275 mg *dl*-α-Tocopherol afgewogen en in 30 cm^3 methanol opgelost. Hieraan 1 g $FeCl_3$. 6 aq toegevoegd en zeven uur bij kamertemperatuur laten staan. Met ongeveer 70 cm^3 water verdund en driemaal met peroxyd-vrije aether geextraheerd. De vereenigde aether oplossingen met verdund zoutzuur en water gewasschen en over natriumsulfaat gedroogd. Na filtratie de aether oplossing gemengd met 18.4 cm^3 olijfolie en de aether *in vacuo* verdampt.

Oplossing I. 1 cm^3 van deze oplossing bevat dus 15 mg geoxydeerd tocopherol. Na deze oxydatie bleek nog 7 % van de oorspronkelijke hoeveelheid reduceerende stof berekend als tocopherol aanwezig.

d-α-Tocopheryl-chinon.

Daar wij niet de beschikking hadden over zuiver *d*-α-tocopherol werd deze proef met een concentraat uit tarwekiemolie uitgevoerd. Dit bevatte 24 % tocopherol. 700 mg concentraat d.i. 168 mg tocopherol afgewogen en met 500 mg $FeCl_3$. 6 aq. in 30 cm^3 methanol zeven uur bij kamertemperatuur laten staan. Verder verwerkt als bij *dl*-α-tocopherol. Opgelost met olijfolie tot 11.2 cm^3. Oplossing II.

Tabel 14.

Biologische activiteit van de oxydatie producten van *dl*-α-tocopherol en van *d*-α-tocopherol met ferrichloride.

Preparaat	Doses mg	Aantal ratten	Aantal nesten
Oplossing I . .	6 12	7 6	0 0
Oplossing II. .	6 12	5 7	0 0
dl-α-tocopherol	1,8 3,6	7 6	4 5

Oplossingen I en II in doses van 400 en 800 mm^3, dit is 6 en 12 mg oorspronkelijk tocopherol, aan vitamine E-vrije ratten gegeven en de werking vergeleken met die van zuiver tocopherol. Deze doses waren over de eerste vijf dagen van de proef verdeeld.

De oxydatie producten zijn dus in de gegeven doses **onwerkzaam.**

h. Vergelijking van de biologische activiteit van dl-α-tocopherol en van dl-α-tocopheryl-acetaat.

Het voordeel van een constante, tegen oxydatie bestendige, standaard is duidelijk. Een tocopherol-derivaat, dat als zoodanig de voorkeur verdient boven tocopherol, zou moeten voldoen aan de eisch:

1e. dat het biologisch actief is en
2. dat het bestendig is tegen oxydatie door de luchtzuurstof.

De allophaanzure-ester van tocopherol is wel bestendig, is echter biologisch inactief. Door Olcott (1935) werd aangetoond, dat acetyleering van tocopherol, een biologisch actief product gaf, in tegenstelling met het resultaat van Evans en Burr (1927) in een ouder onderzoek vermeld. Isler (1938) vond, dat het tocopheryl-acetaat bestendig was tegen luchtzuurstof. Dit was voor ons aanleiding om deze ester als standaard in te voeren in plaats van tocopherol. Een nadeel bij het gebruik van het tocopheryl-acetaat is, dat men niet zoo gemakkelijk de hoeveelheid chemisch kan bepalen als van het vrije tocopherol, daar men steeds eerst een verzeeping moet uitvoeren.

Demole en Karrer c.s. (1939a) onderzochten dit product (en nog enkele andere esters) op de biologische activiteit en vonden het zelfs sterker werkzaam dan het vrije tocopherol. Deze conclusie leek ons aan de hand van hun gepubliceerd cijfer materiaal eenigszins voorbarig. Voor een juiste vergelijking der activiteit kan men niet met slechts één dosis van het tocopherol volstaan. Daar we bij eventueel latere ijkingen van preparaten, waarbij we tocopheryl-acetaat als standaard zouden gaan gebruiken, het gehalte aan tocopherol wilden uitdrukken in mg van het laatste, leek het ons gewenscht een juiste vergelijking der activiteit der beide preparaten uit te voeren. De resultaten van een ijking volgens onze eigen methode met dit doel uitgevoerd volgen hieronder.

dl-α-Tocopherol en *dl*-α-tocopheryl-acetaat in sesamolie opgelost. De totale doses verdeeld over de eerste vijf dagen der proef en *per os* toegediend.

Tabel 15.

Biologische activiteit van *dl*-α-tocopherol en van *dl*-α-tocopheryl-acetaat.

Preparaat	Dosis in mg	Aantal ratten	Aantal nesten	Fertiliteit in %
dl-α-tocopherol	0.8 1.6	13 14	8 10	62 71
dl-α-tocopheryl acetaat	0.8 1.6	13 12	8 10	62 83
Contrôle als vorige tabel				

De sterkte der beide preparaten is *ongeveer gelijk;* 0.7 mg is voldoende om bij 50 % der ratten de steriliteit op te heffen.

Over de biologische activiteit van het tocopheryl-acetaat zijn later meerdere gegevens bekend geworden.

Wright en Drummond (1940) vinden bij 5 mg 30 % en bij 10 mg 50 % fertiliteit. Demole heeft in een latere publicatie (1939b) ook gelijke sterkte in biologische activiteit gevonden van tocopherol en tocopheryl-acetaat. De volgende getallen worden door hem nog gegeven (doses *per os* toegediend):

0.5 mg . . . . . 0—20 % fertiliteit
1 mg . . . . . 40—60 % „
2 mg . . . . . 80—100 % „

HOOFDSTUK IV.

DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN *dl*-α-TOCOPHEROL BIJ MANNELIJKE RATTEN.

Het werk van Grijns (1938) en medewerkers (1933) is aanleiding geweest tot dit onderzoek. Grijns, die, voorzoover we konden nagaan, de eerste Nederlandsche auteur was over antisteriliteitsproblemen, heeft sinds 1921 vele proeven genomen met ratten. Hij meende daarbij gevonden te hebben, dat de antisteriliteitsfactoren voor vrouwelijke en mannelijke ratten verschillend waren en er bovendien nog een lactatiefactor in de voeding noodig was. Een lactatiefactor is ook door anderen gevonden [Nakahara (1934/35 en Zagami (1933a)]. De door hen genoemde factor is wateroplosbaar en komt in lever en gist voor. Het ziet er naar uit alsof men hier met een factor uit de B-groep te doen heeft en of het beter is deze factor maar niet onder het vitamine E te rekenen. Grijns en Dingemanse hebben getracht de mannelijke en vrouwelijke E-vitamines van elkaar te scheiden. De conclusies waartoe Grijns (1938) tenslotte gekomen is kunnen wij kort samenvatten:

1. Er is een antisteriliteitsfactor, die de vrouwelijke resorptiesteriliteit opheft. Dit is hetzelfde als het vitamine E (tocopherol) van de Amerikaansche onderzoekers (Evans, Sure en Mattill).

2. Er is een factor, die de steriliteit van mannelijke ratten voorkomt en deze is niet gelijk aan bovengenoemde factor.

3. Er is behalve deze twee antisteriliteitsvitamines nog een factor, die noodzakelijk is voor de lactatie.

Hij meent de punten 1 en 2 bewezen te hebben, door een scheiding van de beide factoren. Wij kunnen ervan afzien de proeven

van G r ij n s over dit onderwerp uitvoerig te beschrijven. Ze zijn bovendien in zijn publicaties zeer kort samengevat, hoewel ze niet op alle punten even duidelijk zijn.

Ons doel was om na te gaan, of het zuivere tocopherol werkzaam was bij mannelijke ratten. Dit kon thans geschieden doordat wij de beschikking hadden over zuiver tocopherol.

Eigen proeven.

1. Curatieve proeven.

Eenige oriënteerende proeven werden uitgevoerd, waaruit bleek, dat de mannelijke ratten op ons vitamine E-vrij voer steriel werden.

22 ongeveer 5 maanden oude ratten, werden op vitamine E-vrij dieet gezet. De vruchtbaarheid werd nagegaan, door iedere twee weken elk mannetje samen te brengen met twee normale wijfjes. Werd een of allebei zwanger, dan was het mannetje nog fertiel. Fig. 15 geeft het verband tusschen fertiliteit en de tijd doorgebracht op vitamine E vrij dieet.

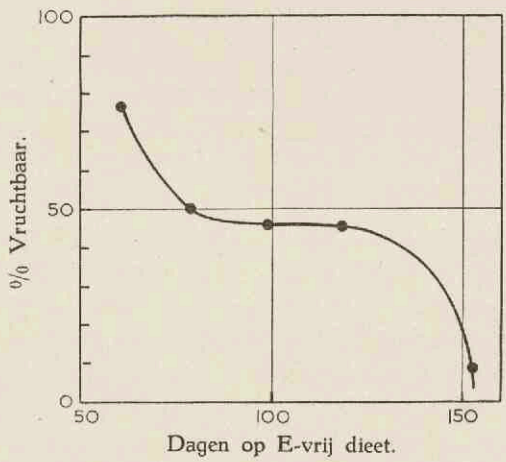


Fig. 15.

Verband tusschen de steriliteit van mannetjes ratten en de tijd behandeld met een vitamine E-vrij dieet.

Ofschoon uit de literatuur reeds bekend was, dat curatieve toediening van tarwekiemolie geen of slechts weinig effect had, beslo-

ten we bij eenige ratten, die volgens onze test vier weken steriel waren, te behandelen met een dosis van 2 mg *dl*-α-tocopherol; hierna waren zij nog steriel. Behandeling met tweemaal een dosis van 6 mg met tusschenpoozen van 14 dagen had evenmin een gunstig resultaat. Het histologisch onderzoek van de testes van deze ratten en van onbehandelde, die even lang op het vitamine E-vrij dieet hadden geleefd, gaf een verrassende uitkomst. De dieren waren toen ± 2 à 3 maanden onvruchtbaar, maar het histologisch beeld van de behandelde dieren was nog nagenoeg normaal, terwijl dat van de niet behandelde dieren het typische degeneratie beeld vertoonde zooals dat door anderen reeds beschreven was. [1])

Hieruit kon men dus reeds concludeeren, dat de tocopherolbehandeling het voortschrijden van de degeneratie belet en dus werkzaam is. Niet tevreden echter met dit resultaat heb ik nog eenige prophylactische proeven uitgevoerd met het synthetische *dl*-α-tocopherol bij mannelijke ratten en heb tevens getracht de ontstane steriliteit bij de curatieve proef op te heffen, door te behandelen met hormoonpreparaten, waarvan sommige onderzoekers een gunstig effect hadden waargenomen. Ik had hiertoe de beschikking over pregnyl en gestyl. [2])

Geen der preparaten gecombineerd met *dl*-α-tocopherol of tarwekiemolie gaf eenig resultaat. De eenheden gestyl en pregnyl hierbij toegediend varieerden van 2 tot 80 R.E. per week.

2. **Prophylactische proeven.**

Een prophylactische proef werd als volgt uitgevoerd: 6 groepen van elk 8 ratten werden op een leeftijd van ongeveer 10 weken op vitamine E-vrij dieet gezet; *dl*-α-tocopherol en tarwekiemolie werden per os toegediend. De mannetjes werden na drie maanden getest door ze samen te brengen met normale vrouwtjes. Het resultaat is in tabel 16 vermeld.

Ofschoon bij deze doses tocopherol niet alle ratten fertiel

---

[1]) Het histologisch onderzoek werd door dr. Freud te Amsterdam uitgevoerd, waarvoor ik hem op deze plaats nogmaals dank zeg.

[2]) Pregnyl = gonadotroop hormoon uit de hypophysevoorkwab.
Gestyl = gonadotroop hormoon uit het serum van zwangere merries.
(Beide preparaten afkomstig van de Fa. Organon te Oss).

bleven, blijkt ook hier heel duidelijk de werking van tocopherol. Na het afsluiten van onze proeven over dit onderwerp zijn ook Evans, Emerson en Emerson tot hetzelfde resultaat gekomen (1939).

Tabel 16.

Biologische activiteit van synthetisch *dl*-α-tocopherol en tarwekiemolie bij mannelijke ratten.

Preparaat	mg tocopherol per week	Percentage vruchtbaar
dl-α-tocopherol	0.25	12
	1.0	12
	2.0	25
tarwekiemolie	0.25	12
	2.0	25

HOOFDSTUK V.

VITAMINE E BEPALING IN BLOEDSERUM.

In de inleiding op pg. 11 schreven we reeds, dat een vitamine bepaling in het bloed ons inziens de meest waardevolle weg was om een avitaminose te bestudeeren. In 1939 deelden Emmerie en schrijver (1939) een chemische methode mede voor de bepaling van tocopherol in bloedserum. Dat we bij deze methode werkelijk het vitamine E bepaalden, wordt wel zeer waarschijnlijk gemaakt door het feit, dat bij vitamine E vrije ratten geen en na toediening van tarwekiemolie wel tocopherol in het bloedserum kon worden aangetoond. Op verschillende manieren, die hieronder besproken worden, hebben wij overwogen nog meer bewijzen hiervoor aan te voeren.

1°. Afscheiding van het tocopherol uit het bloedserum en identificatie. Dit ideale bewijs kon niet gebracht worden. Rattenserum bevat $\pm$ 20 γ per 10 cm^3 serum en zeer veel andere stoffen, die niet door verzeeping te verwijderen zijn. De verhouding van vreemde stoffen en tocopherol was te ongunstig. De afscheiding van tocopherol uit het onverzeepbare gedeelte van oliën geschiedt in de vorm van zijn allophanaat. Gezien de moeilijkheden, die vele onderzoekers en ook wij reeds gehad hadden, om het tocopherol af te scheiden uit een verzeepingsrest van tarwekiemolie, was de kans, dat dit bij een verzeepingsrest van bloedserum zou gelukken al zeer gering, afgezien nog van de groote hoeveelheden bloed, die voor een dergelijke proef noodig zouden zijn. We hebben dan ook geen poging gedaan om dit te bereiken.

2°. De biologische proef om te bewijzen, dat de bepaalde stof werkelijk tocopherol was. Men zou hierbij ongeveer 10 liter serum noodig hebben om 10 à 20 mg tocopherol in een of ander concen-

traat te verkrijgen, wat wel voldoende zou zijn voor een test met eenige ratten. Een dergelijke hoeveelheid serum kon niet door ons verwerkt worden.

3°. Karrer (1939b) wees er reeds op, dat bij de bepaling van tocopherol in organen na de toegepaste extractie en verzeeping geen andere bekende stoffen meer aanwezig waren, die $AuCl_3$ of $FeCl_3$ reduceeren, behalve vitamine A en carotinoiden. Ook deze worden bij onze methode verwijderd. Ofschoon dit geen direct bewijs is, dat het bepaalde tocopherol is, maakt het dit toch wel zeer waarschijnlijk.

4°. De roode kleurstof, die als reactie op tocopherol door John (1939) werd beschreven, geeft een indruk over het al of niet aanwezig zijn van tocopherol of derivaten ervan:

Door John (1939) werd een reactie beschreven van tocopherol met salpeterzuur, waarbij een roode kleurstof ontstaat, het parachinon, welk product we reeds noemden in verband met de biologische activiteit van oxydatie producten van tocopherol (blz. 52).

Furter en Meyer (1939) hebben deze reactie uitgewerkt tot een quantitatieve bepalingsmethode. Ofschoon wij deze methode ongeschikt achten om vitamine E te bepalen, daar eenerzijds ook tocopheryl-chinon (biologisch onwerkzaam) dezelfde reactie vertoont en zij anderzijds veel te ongevoelig is voor de hoeveelheden, die bij een bepaling in serum in aanmerking komen, geeft deze reactie tòch wel een indruk over het al of niet aanwezig zijn van tocopherol of derivaten ervan. De reactie berust op andere grondslagen dan die met $AuCl_3$ of $FeCl_3$, waarbij alleen de reductieeigenschappen van het tocopherol bepaald worden. De kleinste hoeveelheid, die met de methode van Furter en Meyer bepaald kan worden is 150 γ. Dit is in 75 cm^3 serum van rattenbloed aanwezig. Eenige bepalingen werden op deze wijze uitgevoerd en vergeleken met de uitkomsten verkregen met onze eigen methode (zie blz. 66).

5°. Langs spectrografische weg aantoonen van tocopherol. Door Moore (1940) werd tocopherol in het peritoneale vet van ratten aangetoond. Daar deze physische methode als bevestiging van de chemische de eenvoudigste was, hebben we deze ook toegepast op bloedserum (blz. 66).

De onder 4° en 5° genoemde mogelijkheden om nog een bewijs

te brengen, dat het bepaalde werkelijk vitamine E was, hebben we in de volgende bladzijden beschreven. We vergeleken daartoe eerst de beide chemische methoden, die op een verschillend principe berusten. De methode van Karrer (1938g), de titratie met $AuCl_3$ laten we buiten beschouwing, daar deze op dezelfde reduceerende eigenschappen berust, waarvan bij onze eigen methode gebruik gemaakt is. Naast deze chemische bepalingen beschrijven we ook nog eenige spectrografische bepalingen en vergelijken de uitkomsten hiervan met de chemische.

a. *Vergelijking van de chemische bepalingen van tocopherol in bloedserum volgens de methode van Furter en Meyer en van Emmerie en Engel.*

We hebben in enkele gevallen in bloedserum van ratten en menschen het tocopherol gehalte bepaald. Hierbij was het de bedoeling om van dezelfde oplossingen, waarmee de chemische bepalingen uitgevoerd werden, de spectrograaf opnamen te maken, die hieronder beschreven worden. Het spreekt vanzelf, dat we voor het laatste zooveel mogelijk stoffen verwijderen, om een zoo gering mogelijke algemeene absorptie te hebben in het ultraviolette gedeelte van het spectrum. Daarom werden eenige bewerkingen meer uitgevoerd dan voor een chemische bepaling volgens Furter en Meyer of volgens Emmerie en Engel noodig waren. De reactie van Furter en Meyer wordt uitgevoerd door de te onderzoeken stof in absolute aethanol op te lossen en met geconcentreerd salpeterzuur eenigen tijd te koken. De daarbij uit tocopherol gevormde roode kleurstof wordt colorimetrisch gemeten. De minimum hoeveelheid tocopherol, welke hierbij bepaald kan worden is $\pm$ 150 γ.

Voor een bepaling volgens Emmerie en Engel kan men met 10 γ tocopherol volstaan. Deze hoeveelheden waren aanwezig in ongeveer 75 cm^3 bloedserum van ratten of in 20 cm^3 serum van menschen. Door de spectrograaf opnamen eerst te maken was hiervoor geen grootere hoeveelheid serum vereischt. Een voorbeeld van de bewerkingen, die noodig waren om een oplossing te verkrijgen, waarmee de twee chemische bepalingen en de spectrograaf opname gemaakt konden worden, volgt hieronder:

Dertig normale vrouwelijke ratten gedood en het bloed verzameld. Hiervan werd 70 cm^3 serum verkregen.

1. Extractie. Het serum met een half volume 0.2*n* KOH verdund en daarna 100 cm^3 formaldehyd oplossing 37 % (neutraal op phenolphthaleine) en 100 cm^3 aethanol toegevoegd. Driemaal met 500 cm^3 aether geextraheerd. De verzamelde aetheroplossingen gewasschen met 2 % KOH en 1 % H_2SO_4 en daarna met water tot zuurvrij. Aether oplossing gedroogd over Na_2SO_4.

2. Verzeeping. De voorgaande aether oplossing gefiltreerd en *in vacuo* drooggedampt. Het residue met 10 cm^3 0.2 *n* KOH in methanol gedurende 10 min. bij 65° verzeept. De oplossing met 40 cm^3 water en 10 cm^3 methanol verdund en wederom driemaal met 50 cm^3 aether uitgeschud. De verzamelde aether extracten verder als onder 1 verwerkt.

3. Scheiding van vitamine A en carotinoiden. Na verdampen der aether oplossing in vacuo, de rest opgenomen in ongeveer 10 cm^3 benzol. De benzol oplossing gefiltreerd over een kolom van Floridin XS aarde. Het vitamine A en de carotinoiden blijven aan de aarde geadsorbeerd.

4. Verwijdering der sterinen. Het filtraat in benzol drooggedampt en het residue in 10 cm^3 heete methanol opgelost. De heete methanol oplossing langzaam afgekoeld tot —5° C, waarbij de grootste massa der sterinen uitkristalliseerden. De sterinen door filtratie verwijderd. (0.2 g dezer sterinen gaven geen reactie met ferrichloride-dipyridyl, het tocopherol is dus in oplossing gebleven). De methanol oplossing drooggedampt en de rest in aethanol opgelost. (Oplossing I).

Met deze en dergelijke oplossingen, verkregen van andere groepen ratten en van menschen, werden eenige vergelijkende chemische bepalingen volgens de bestaande methoden uitgevoerd en werden tevens van dezelfde oplossingen spectrograaf-opnamen gemaakt. In onderstaande tabel zijn de chemische uitkomsten vermeld. In de laatste kolom zijn de overeenkomstige no's der spectrograaf opnamen opgenomen, die hierna beschreven worden.

Tabel 17.

Vergelijking van de chemische bepalingsmethoden van Furter en Meyer en van Emmerie en Engel bij de bepaling van het tocopherol gehalte in bloedserum.

γ Tocopherol per 10 cm³ serum, volgens		Herkomst van het serum	No. der spectrograaf-opname
F. en M.	E. en E.		
82	70	30 normale ♀♀ ratten	2
113	95	30 vit. E deficiente ♀♀ ratten 15 uur na toediening van 5 mg tocopheryl-acetaat p. rat	3
90	73	id. ♂♂ ratten.	4
98	80	mensch ♂.	5

Met deze serum extracten wordt ook de roode kleurstof verkregen, waaruit de aanwezigheid van tocopherolen blijkt.

De uitkomsten met de methode van Furter en Meyer zijn steeds hooger dan met de methode van Emmerie en Engel. Dit quantitatieve verschil wordt vermoedelijk veroorzaakt door biologisch inactieve oxydatie producten van het tocopherol. Deze oxydatie producten reageeren n.l. wel bij de methode van Furter en Meyer en niet bij die van Emmerie en Engel.

b. *Spectrophotometrisch aantoonen van vitamine E in bloedserum.*

Evans en Burr (1927) waren niet in staat om in absorptiespectra van vitamine E houdende oliën aanwijzingen te vinden voor bepaalde banden, die in verband konden staan met de biologisch actieve stof.

Eerst Bowden en Moore (1933, 1934) konden verschillende banden in tarwekiemolie concentraten naar voren brengen. Een zekere correlatie werd door hen waarschijnlijk gemaakt van een absorptieband tusschen 320—285 mμ en het vitamine E. Terzelfder tijd kwamen ook Morton en Edisbury (1933) met dergelijke resultaten.

In 1934 vonden Martin en medewerkers (1934) een goed gedefinieerde absorptie bij 294 mμ.

Ook Olcott (1935a, 1935) vindt dezelfde band in het onverzeepbare gedeelte van katoenzaadolie, maar is van meening, dat deze band niet eigen is aan het vitamine E.

Drummond (1935, 1935a) en medewerkers hebben, ofschoon zij het probleem, of de band bij 294 mμ al of niet behoorde bij het vitamine, niet hebben opgelost, zeer veel met de spectrorafische methode onderzocht en met behulp daarvan het vitamine E een eindweegs kunnen zuiveren. Zij stelden ook voor om het absorptie maximum en het absorptie minimum bij 267 mμ met elkaar in verband te brengen. De verhouding van de absorptie intensiteiten bij het maximum en minimum zou dan een aanwijzing geven over de zuiverheid en het verschil van het minimum en het maximum zou een maat zijn voor de hoeveelheid.

Dat de band bij 294 mμ werkelijk karakteristiek is voor het vitamine E, bewezen Evans, Emerson en Emerson (1936) na bereiding van zuiver tocopherol uit natuurlijke oliën en Karrer (1938c) na de synthese van *dl*-α-tocopherol.

Het opsporen van kleine hoeveelheden tocopherol in extracten van weefsels of, zooals in ons geval, in bloedserum, is evenwel niet eenvoudig. Met zuiver sterk geconcentreerde vitamine E preparaten uit oliën is het soms nog moeilijk de gevonden absorptie spectra te interpreteeren, tengevolge van de algemeene absorptie, die de typische vitamine E-band bij 294 mμ overvleugelt. In dierlijk materiaal kan men bovendien nog de storing ondervinden van aanwezig vitamine A met een uitgesproken absorptieband bij 328 mμ.

In extracten van dierlijke organen werd het vitamine E spectrografisch het eerst door Moore, Martin en Rajagopal aangetoond (1939). Zij konden het tocopherol alleen vinden in de vetdepôts van ratten, die gedurende langen tijd een dieet gehad hadden met 60 % tarwekiemen. In andere weefsels konden zij het niet vinden. De door hen gebruikte methode van extraheeren der weefsels moet echter verworpen worden. Zij koken nl. het weefsel gedurende 2 uur met 1 *n* KOH. Wij konden aantoonen, dat bij een dergelijke verhitting in basisch milieu het tocopherol vernietigd wordt [Emmerie en Engel (1939a)]. Ook enkele pogingen om het op deze manier uit levers te extraheeren mislukten, zooals onderstaande proeven laten zien.

4 g lever (rat) met 10 cm^3 1 *n* KOH en 1 cm^3 tocopherol in alcohol (302 γ) gedurende 30 min. op een waterbad gekookt. Eenzelfde proef ingezet zonder toevoeging van tocopherol.

Na extractie met aether enz. werd in het eerste geval 260 γ, in het tweede 203 γ tocopherol gevonden. Verschil 57 γ slechts 19 % van het toegevoegde dus teruggevonden.

Cuthbertson, Ridgeway en Drummond (1940) gaven na het afsluiten van ons onderzoek nog een andere methode van spectroscopisch onderzoek. Ze oxydeeren het aanwezige tocopherol, waardoor een meer uitgesproken maximum ontstaat bij $\pm$ 270 mμ van tocopheryl-chinon en de gevoeligheid der bepaling aanmerkelijk wordt verhoogd. Ook in bloedserum hebben zij sporen kunnen aantoonen naast grootere hoeveelheden in de vetdepôts. In andere organen, ook in de lever, was het niet aan te toonen. Hun extractie methode der weefsels was minder ingrijpend dan die van Moore en geeft een grootere kans, dat het aanwezige tocopherol niet verdwenen is bij de extractie.

Onze eigen methode om in bloedserum spectrophotometrisch tocopherol aan te toonen is in principe dezelfde als die van Moore. De methode van extraheeren echter geheel anders. Hierbij pasten we dezelfde methode toe, zooals we bij de chemische bepaling beschreven blz. 65.

We krijgen dan tenslotte de serum-lipoiden, die het vitamine E bevatten, zonder verwarming of hydrolyse der proteinen in een voor ons doel geschikte oplossing. Voor het maken van een spectrograaf opname is het echter noodig, om zooveel mogelijk stoffen te verwijderen. We verzeepten daarom de lipoiden op een zoodanige wijze, dat het tocopherol niet vernietigd werd. Ook na deze verzeeping was het nog mogelijk om verschillende onverzeepbare stoffen af te scheiden. Door filtratie over Floridin XS aarde werden de carotinoiden en het vitamine A verwijderd en door uitvriezen in methanol ook de hoofdfractie der sterinen. Zelfs na deze bewerkingen, die bij de chemische bepaling reeds beschreven werden, was het moeilijk de verkregen absorptie spectra te interpreteeren.

De apparatuur, die tot onze beschikking stond, werd reeds uitvoerig door Julius (1932) beschreven.

Een opname van tocopherol opgelost in aethanol werd ter vergelijking opgenomen.

Opname 1. Het resultaat is in tabel 18 en fig. 16 vermeld.

Tabel 18.

Log $\frac{I_0}{I}$ bij verschillende golflengten van een *dl-α*-tocopherol oplossing in aethanol. 75 γ per cm³. 1 cm cuvet.

Golflengte in mμ	Log $\frac{I_0}{I}$
320	0.04
310	0.10
300	0.39
295	0.54
290	0.56
285	0.50
280	0.39
275	0.30
270	0.23
260	0.17
250	0.17
240	0.21
230	0.26

$E^{1\,\%}_{1\,cm} = 73$ bij 294 mμ.

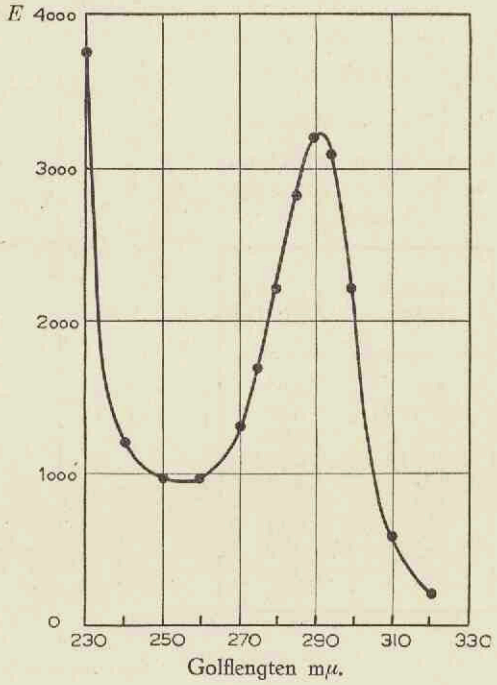


Fig. 16.

Moleculaire absorptie van *dl-α*-tocopherol.

Opname 2. Serum-extract van normale ratten.

De alcoholische oplossing bevatte 7 γ tocopherol per cm³ (chemisch bepaald) zie tabel 19 en fig. 17.

Tabel 19.

Log $\frac{I_0}{I}$ bij verschillende golflengten van een serumextract van normale vrouwelijke ratten.

Golflengte in mμ	Log $\frac{I_0}{I}$
310	0.03
305	0.04
300	0.05
297.5	0.04
295	0.06
292.5	0.10
290	0.11
285	0.12
280	0.14

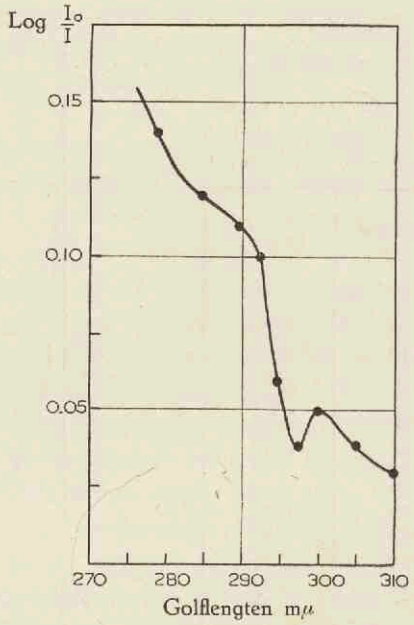


Fig. 17.

Spectrografische opname van een serum-extract van normale vrouwelijke ratten. 7 γ tocopherol per cm³.

Opname 3. Serum van vitamine E-deficiente vrouwelijke ratten, die 15 uur van te voren 5 mg tocopheryl-acetaat *per os* gekregen hadden. 1 cm³ der oplossing bevatte 26 γ tocopherol (chemisch bepaald). Zie tabel 20 en fig. 18.

Tabel 20.

Log $\frac{I_0}{I}$ bij verschillende golflengten van een serum-extract van vitamine E-deficiente vrouwelijke ratten na toediening van 5 mg tocopheryl-acetaat.

Golflengte in mμ	Log $\frac{I_0}{I}$
310	0.04
300	0.13
297.5	0.14
295	0.18
292.5	0.19
290	0.20
285	0.22
280	0.21
275	0.20
270	0.33

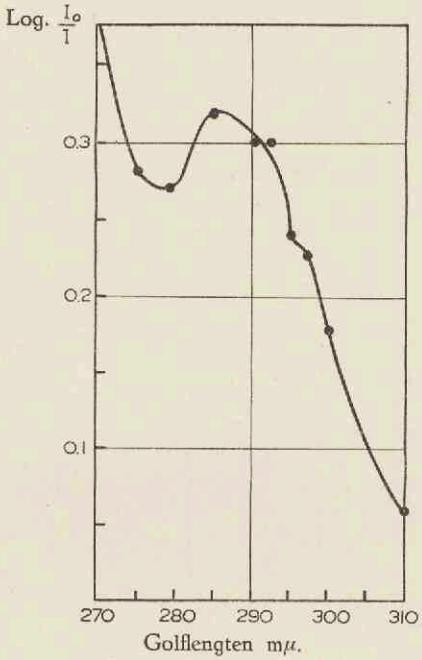


Fig. 18.

Spectrografische opname van een serum-extract van vitamine E-deficiente vrouwelijke ratten na toediening van 5 mg tocopheryl-acetaat. 26 γ tocopherol per cm³.

Opname 4. Serum van vitamine E-deficiente mannelijke ratten, die 15 uur van te voren 5 mg tocopheryl-acetaat *per os* gekregen hadden. 1 cm³ der oplossing bevatte 28 γ tocopherol (chemisch bepaald). Zie tabel 21 en fig. 19.

Tabel 21.

Log $\frac{I_0}{I}$ bij verschillende golflengten van een serum-extract van vitamine E-deficiente mannelijke ratten na toediening van 5 mg tocopheryl-acetaat.

Golflengte in mμ	Log $\frac{I_0}{I}$
310	0.06
300	0.18
297.5	0.23
295	0.24
292.5	0.30
290	0.30
285	0.32
280	0.27
275	0.28
270	0.41

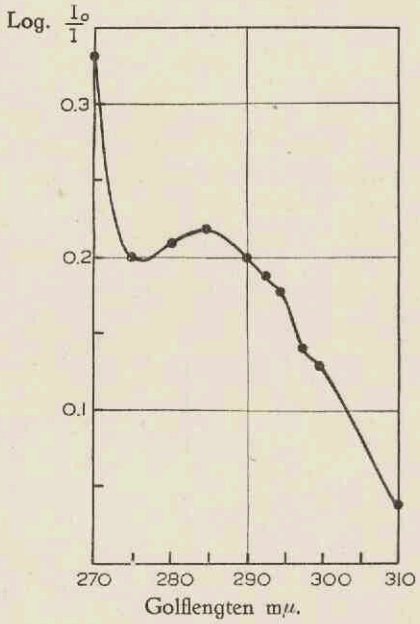


Fig. 19.

Spectrografische opname van een serum-extract van vitamine E-deficiente mannelijke ratten na toediening van 5 mg tocopheryl-acetaat. 28 γ tocopherol per cm³.

Opname 5. Serum-extract van menschenbloed (♂).

1 cm³ der oplossing bevatte 6 γ tocopherol (chemisch bepaald). Zie tabel 22 en fig. 20.

Tabel 22.

Log $\frac{I_0}{I}$ bij verschillende golflengten van een serum-extract van menschenbloed (♂).

Golflengte in mμ	Log $\frac{I_0}{I}$
310	0.09
307.5	0.09
305	0.13
302.5	0.14
300	0.18
297.5	0.16
295	0.15
292.5	0.18
290	0.19
287.5	0.18
285	0.18
280	0.23
275	0.27
270	0.34

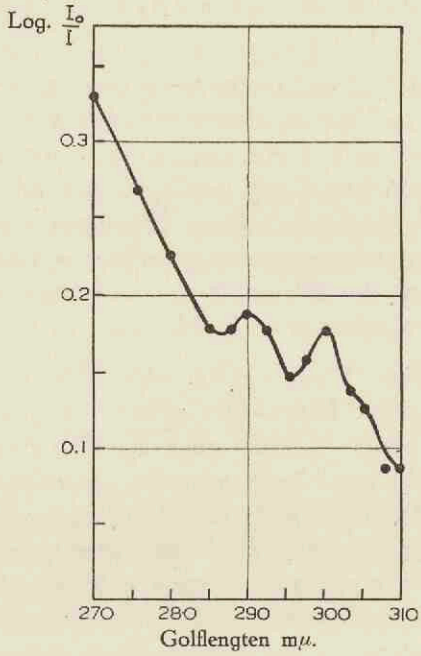


Fig. 20.

Spectrografische opname van serum-extract van den mensch (♂). 6 γ tocopherol per cm³.

De resultaten van deze opnamen zijn niet erg overtuigend te noemen. Men kan door de algemeene absorptie van de extracten slechts van zeer verdunde oplossingen opnamen maken, waardoor het absorptie-maximum van tocopherol bij 295 mμ nauwelijks is waar te nemen.

Al zijn de uitkomsten op zich niet bewijzend, zij pleiten toch zeker niet voor het tegendeel.

c. *Tocopherol in het bloedserum van ratten.*

Uit het voorgaande (blz. 62 tot 72) waren we dus overtuigd, dat hetgeen we chemisch bepaalden in het bloedserum met de

ferrichloride-dipyridyl reactie, werkelijk vitamine E was. Met behulp van deze betrekkelijk eenvoudige methode was het ons nu mogelijk verschillende vragen te beantwoorden.

1. De vorm van voorkomen van vitamine E in het bloed.

Zooals bekend reageert het veresterde tocopherol niet met ons reagens en wordt alleen het vrije tocopherol door ferrichloride-dipyridyl geoxydeerd. Indien het vitamine E dus veresterd in het serum voorkwam, zou men het niet zonder verzeeping kunnen aantoonen. Als beide vormen naast elkaar voorkwamen zou na verzeeping meer tocopherol gevonden worden. Dit is niet het geval. Het komt dus alleen als vrij tocopherol in het serum voor, zooals uit de volgende proef blijkt.

Aan 5 vrouwelijke ratten, welke reeds 2 maanden op ons vitamine E vrij dieet geleefd hadden, werd *per os* 5 mg *dl-α*-tocopheryl-acetaat gegeven. Aan 2 andere ratten van dezelfde groep werd niets gegeven: contrôle dieren.

10 uren, nadat de dosis gegeven was, werden de dieren gedood en het bloed van elke categorie afzonderlijk verzameld. In het serum der contrôle dieren werd (zonder verzeeping) 2 γ tocopherol per 10 cm^3 serum gevonden. Het bloed van de 5 dieren, welke tocopheryl-acetaat gehad hadden, gaf 10 m^3 serum. Dit werd in twee gedeelten van elk 5 cm^3 verwerkt. 1°. Directe tocopherolbepaling na de bewerkingen als door Emmerie en Engel (1939a) beschreven, dus zonder verzeeping. 2°. Na de extractie der lipoiden de aether der oplossing verdampt en de overblijvende rest met 5 cm^3 0.2 *n* KOH in methanol gedurende 10 min. bij 65° verzeept. Als beschreven op pg. 65 verder verwerkt en de scheiding van vitamine A en carotinoiden uitgevoerd.

Gevonden werd 1°. onverzeept 98 γ tocopherol per 10 cm^3 serum.
2°. verzeept 90 γ tocopherol per 10 cm^3 serum.

Hieruit blijkt, dat het tocopherol als zoodanig aanwezig is, ook als het in veresterde vorm gegeven is. Het kleine verschil in de

gevonden waarden moet toegeschreven worden aan verliezen bij de verzeeping, zie ook Emmerie (1940).

2. Opname van *dl*-α-tocopherol en *dl*-α-tocopheryl-acetaat.

Isler (1938) wees het eerst op het gebruik van veresterde tocopherolen, die bestendiger zijn tegen oxydatie dan het vrije tocopherol en vond het acetaat van tocopherol ongeveer even werkzaam als het tocopherol zelf. In een publicatie van Emmerie en schrijver (1939b) gaven we een tabel van het gehalte aan tocopherol na toediening van dagelijksche doses tarwekiemolie, tocopherol en tocopheryl-acetaat. We hadden toentertijd geen acht geslagen op de tijdsduur tusschen toediening der doses en de bepaling in het bloedserum. In onderstaande proef wordt het gehalte aan tocopherol in het bloedserum bepaald en vergeleken na opname van *dl*-α-tocopherol en *dl*-α-tocopheryl-acetaat, waarbij speciaal rekening werd gehouden met de tijdsduur tusschen toediening en bepaling.

Aan twee groepen van elk 12 vrouwelijke vitamine E-deficiente ratten werd respectievelijk 5 mg *dl*-α-tocopherol en *dl*-α-tocopheryl-acetaat per rat gegeven.

Op verschillende tijden na toediening van deze dosis werden van elke groep drie ratten gedood. In het serum van het verzamelde bloed werd het tocopherol gehalte bepaald. In tabel 23 en fig. 21 is het resultaat vermeld.

Tabel 23.

Gehalte van tocopherol in het bloedserum van vrouwelijke vitamine E deficiente ratten na toediening *per os* van 5 mg tocopherol of tocopheryl-acetaat.

γ Tocopherol p. 10 cm³ serum Toegediend 5 mg		Aantal uren na toediening der dosis
dl-α-tocopherol	*dl*-α-tocopheryl-acetaat	
168	98	12
92	51	36
62	—	60
—	33	84
37	—	108

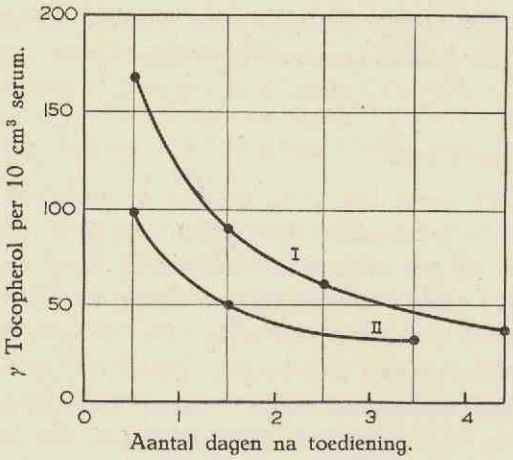


Fig. 21.

Gehalte van tocopherol in het bloedserum van vitamine E deficiente vrouwelijke ratten na toediening van 5 mg tocopherol I of 5 mg tocopheryl-acetaat II.

Het tocopherol-gehalte is na de dosis van tocopheryl-acetaat geringer. Daar er bij de vorige proef geen veresterd tocopherol werd gevonden, is de oorzaak vermoedelijk, dat de ester niet zoo snel wordt geresorbeerd als het vrije tocopherol. Het uiteindelijk gehalte aan tocopherol is bij beide preparaten ongeveer gelijk, zooals de volgende proef ook laat zien na toediening van dagelijksche doses van tarwekiemolie, *dl*-α-tocopherol en *dl*-α-tocopheryl-acetaat.

Aan drie groepen van vrouwelijke vitamine E deficiente ratten werden respectievelijk de volgende doses gegeven:

0.4 cm³ tarwekiemolie = 0.97 mg *d*-α-tocopherol.

1 mg *dl*-α-tocopherol in 0.4 cm³ sesamolie.

1 mg *dl*-α-tocopheryl-acetaat in 0.4 cm³ sesamolie.

Twee dagen na toediening der laatste dosis werd het gehalte van tocopherol in het bloedserum bepaald.

In onderstaande tabel zijn de waarden vermeld na verschillende proefduur.

Tabel 24.

Tocopherol gehalte van het bloedserum van vrouwelijke ratten op een vitamine E vrij dieet na toediening *per os* van verschillende vitamine E preparaten in dagelijksche doses. Bepaling 48 uur na de laatste dosis.

Preparaat	Dag. dosis	Aantal dagen toegediend	Totale dosis tocopherol (mg)	γ Tocopherol per 10 cm^3 serum
Tarwekiemolie	0.4 cm^3 0.4 „	6 12	5.8 11.6	26 40
dl-α-tocopherol	1 mg 1 „ 1 „	6 13 20	6 13 20	31 50 55
dl-α-tocopheryl-acetaat	1 mg 1 „	13 20	13 20	45 59

Het tocopherol gehalte in het bloedserum is dus bij inname van tocopherol of tocopheryl-acetaat gelijk.

3. Tocopherol gehalte van het bloedserum van mannelijke en vrouwelijke ratten op vitamine E vrij dieet.

In het 4e hoofdstuk bleek, dat de doses, die voor vrouwelijke ratten voldoende zouden zijn om de resorptie-steriliteit te genezen, niet voldoende waren om de steriliteit bij mannetjes te voorkomen.

Bij de bepaling van het tocopherol in het bloedserum van mannetjes en vrouwtjes kwam echter op geen enkele wijze een verschil tot uitdrukking, zooals uit onderstaande proef blijkt.

Aan een groep mannelijke en vrouwelijke ratten, die vier maanden op vitamine E vrij dieet geleefd hadden en waarbij in het serum geen tocopherol meer was aan te toonen, werden verschillende doses *dl*-α-tocopherol per os gegeven en na zekere tijden het tocopherol gehalte in het bloedserum bepaald. Aan mannetjes werden doses van 2, 5 en 10 mg en aan vrouwtjes doses van 2 en 10 mg ineens gegeven.

In onderstaande tabel en fig. 22 en 23 is het resultaat verwerkt.

Tabel 25.

Gehalte van tocopherol in het bloedserum van vitamine E-deficiente ratten na toediening van verschillende doses *dl*-α-tocopherol.

Geslacht	Dosis *dl*-α-tocopherol in mg	γ-tocopherol per 10 cm³ serum	Aantal uren (dagen) na toediening der dosis
♂	2	61	14 uren
♂	2	7	40 „
♂	2	6	112 „
♂	5	72	14 uren
♂	5	24	40 „
♂	5	4	112 „
♂	5	2	184 „
♂	5	1	232 „
♂	10	143	14 uren
♂	10	42	40 „
♂	10	10	112 „
♂	10	9	232 „
♂	10	8	16½ dagen
♂	10	0	24½ „
♀	2	63	15 uren
♀	2	18	39 „
♀	2	2	110 „
♀	2	0	7½ dagen
♀	10	185	15 uren
♀	10	50	39 „
♀	10	24	110 „
♀	10	11	9½ dagen
♀	10	7	16½ „
♀	10	4	24½ „

Uit de figuren 22 en 23 blijkt:

1°. Geen verschil tusschen mannelijke en vrouwelijke rat.

2°. Bij toediening van kleine dosis tocopherol (2 mg) aan vitamine E-deficiente vrouwelijke ratten is het tocopherol reeds na 4 dagen uit het bloedserum verdwenen.

Bij grootere dosis blijft het tocopherol langer in het serum aantoonbaar.

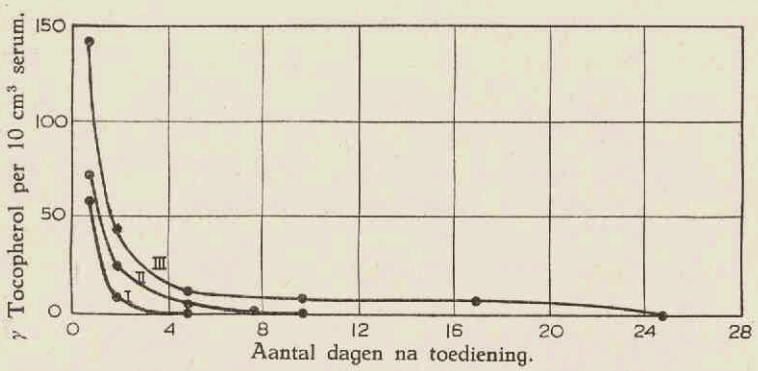


Fig. 22.

Gehalte van tocopherol in het bloedserum van vitamine E deficiente mannelijke ratten na toediening van 2, 5 en 10 mg *dl*-α-tocopherol. Respectievelijk curve I, II en III.

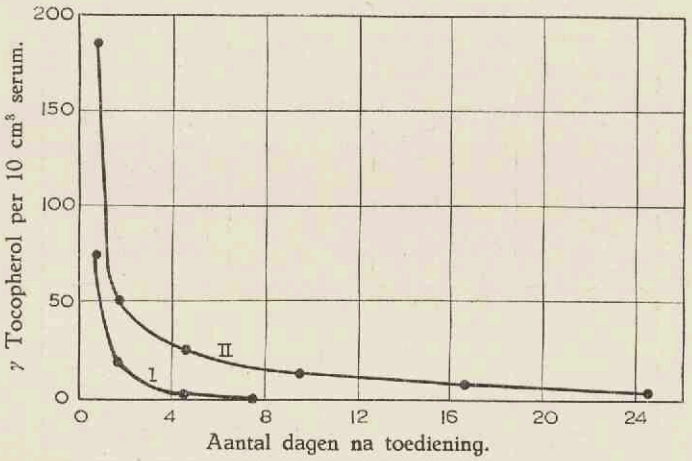


Fig. 23.

Gehalte van tocopherol in het bloedserum van vitamine E deficiente vrouwelijke ratten na toediening van 2 en 10 mg *dl*-α-tocopherol. Respectievelijk curve I en II.

4. Tocopherol gehalte in het bloedserum en deficientie verschijnselen tengevolge van vitamine E gebrek.

Uit het voorgaande zagen we reeds, dat er verschillen zijn in het tocopherol gehalte in het bloedserum van vitamine E deficiente ratten al naar de dosis toegediend. In de volgende proef werd het

verband vastgelegd tusschen het gehalte tocopherol in het bloedserum en het optreden der E-avitaminose: resorptie-steriliteit bij vrouwtjes resp. steriliteit bij mannetjes.

Een groep normale mannelijke en vrouwelijke ratten werd op vitamine E vrij dieet gezet. Na verschillende perioden werd telkens een groep van drie mannetjes gepaard met normale vrouwtjes, waarna ze gedood werden en in het bloedserum het tocopherol gehalte bepaald werd. De vrouwtjes werden met normale mannetjes gepaard, waarna eerst het verloop van de zwangerschap werd afgewacht voor ze gedood werden. In onderstaande tabel is het resultaat vermeld.

Tabel 26.

Verband tusschen het tocopherol gehalte in het bloedserum en vitamine E-avitaminose.

γ tocopherol per 10 cm³ serum	Aantal dagen op vit. E vrij dieet	Geslacht	Aantal vruchtbaar
17	0	♂	alle drie
12	35	♂	„ „
11	56	♂	„ „
5	92	♂	een vruchtbaar
15	0	♀	alle drie
15	28	♀	„ „
15	42	♀	„ „
7	68	♀	2 resorbeeren, 1 werpt levende jongen

Tusschen 10 en 5 γ tocopherol per 10 cm³ ligt dus het niveau waar de deficientie verschijnselen beginnen op te treden.

HOOFDSTUK VI.

TOCOPHEROL IN HET BLOEDSERUM VAN DEN MENSCH.

Het was de opzet om aan de hand van een groot aantal bepalingen bij normale menschen en patiënten het vitamine E gehalte van het bloedserum na te gaan om hieruit eventueel conclusies te trekken.

Bij de E avitaminose van de rat zagen we reeds, dat er een zeer duidelijk verband bestaat tusschen het optreden van de E-avitaminose en het gehalte van het vitamine E in het bloed.

Om de stabiliteit van tocopherol in bloedserum van den mensch na te gaan werd nog het vitamine E gehalte na verschillende tijden bepaald, terwijl het serum bij kamertemperatuur maar niet in direct zonlicht bewaard werd.

Uitkomst na	0 uur	104 γ	tocopherol	10 cm^3	serum
	24 uren	100 γ	„	„	
	48 uren	104 γ	„	„	

zodat bleek, dat het na een of twee dagen nog bepaald kon worden.

In tabel 27 zijn de resultaten vermeld van tot nu toe bewerkte sera.

Het zou voorbarig zijn uit deze tabel conclusies te trekken, tenzij negatieve. Bv. kan men wel zeggen, dat er bij diabetes patiënten geen gestoord vitamine E niveau in het bloed is.

Er zijn er onder deze patiënten slechts twee waarbij het vitamine E gehalte laag is (11 en 16). Hierbij werd een vitamine E therapie toegepast. Achteraf kregen wij dit preparaat tot onze beschikking, om het tocopherol daarin te bepalen. Het bleek een olie met een betrekkelijk laag tocopherolgehalte te zijn, zoodat slechts in totaal 14 mg gegeven zijn. Dit is natuurlijk onvoldoende om het vitamine E gehalte op te voeren (patient 11, 55 γ 2e bepaling). Later werd nu gewone tarwekiemolie gegeven (3e bepaling).

Bij de tweede patiënt (16) is nog geen resultaat bekend.

Tabel 27.

Tocopherolgehalte van bloedsera van patiënten.

Patient	γ tocopherol per 10 cm³ serum	Bijzonderheden
1	115	In '39 abortus gehad. In '40 partus immaturus.
2	115	13e maal zwanger. 5 abortus en 2 dood geboren kinderen.
3	98	normaal 3 mnd. zwanger.
4	161	Diabetes en graviditeit.
5	170	" " "
6	74	" " "
7	81	" " "
8	142	" " "
9	124	" " "
10	129	8 maal voortijdig afgebroken graviditeit.
11	61 55 64 82	6e en 7e kind kort na de geboorte gestorven. Laatste 8e bevalling ± 3 weken te vroeg. Behandeld met vit. E preparaat (14 dagen). Nogmaals 1 mnd. met tarwekiemolie behandeld.
12	190	2 maal een dood kind. 3e kind door kunstmatige vroeggeboorte levend geboren; bleef in leven. Nu Thans ± 7 mnd. zwanger.
13	115	2 maal gemacereerd kind geboren.
14	85 118	2 kinderen normaal. Daarna stierven de volgende 3 kinderen kort na de geboorte aan icterus gravis. Thans ± 37 weken graviditeit.
15	132	Twee kinderen partus immaturus (dood). Nu 3e maal graviditeit 2 mnd.
16	44	4 maal abortus.
17	103	2 kinderen normaal. 3e onlangs gemacereerd.
18	78	♂ Musculaire dystrophie.
19	68	♂ Musculaire dystrophie.

HOOFDSTUK VII.

VITAMINE E THERAPIE BIJ DEN MENSCH.

Er is een respectabele hoeveelheid literatuur ontstaan over de werking van vitamine E bij den mensch.

Er zijn onderzoekers, die groote successen aan het vitamine E toeschrijven; anderen, die het nut ervan zeer twijfelachtig zooal niet geheel negatief vinden.

Bij den mensch is het vitamine E toegepast bij vele stoornissen, die eenige gelijkenis vertoonden met de deficientie verschijnselen bij de rat. Bij de rat kan men de resorptie-steriliteit opheffen, bij den mensch heeft men getracht de habitueele abortus, dreigende abortus en dergelijke stoornissen te genezen of te voorkomen. Ook mannelijke steriliteit heeft men met vitamine E behandeld. Andere ziekten buiten de voortbrengings functie's om worden de laatste tijd ook met vitamine E bestreden. Bij de rat zagen we de paralysen bij het jonge en oude dier.

Overeenkomstige ziekten bij den mensch, amyotrophische lateraalsclerose en musculaire atrophieën, zijn met wisselend succes met vitamine E behandeld.

Hieronder worden de resultaten, bekend uit de literatuur, besproken.

a. *Vitamine E en de voortplantingsstoornissen.*

De eerste, die vitamine E in de vorm van tarwekiemolie toepastte bij den mensch, was Vogt-Möller (1931). Bij habitueele abortus verkreeg hij een gunstig resultaat (1933, 1936). In 70—80 % van de gevallen trad genezing op.

Het is niet de bedoeling om hier in discussie te treden over de al of niet gunstige werking van vitamine E. De habitueele abortus

kan door vele oorzaken optreden [van Vonno (1938)] en hieronder is er een, die wellicht vitamine E deficientie genoemd kan worden. Andere methoden hebben dan ook bij habitueele abortus dergelijke successen behaald en de gunstige werking van vitamine E wordt door vele onderzoekers dan ook betwijfeld. De moeilijkheid bij dit soort onderzoek is, dat men geen contrôle personen heeft gehad en dat het niet bekend is, hoe dikwijls spontaan na een of meer malen abortus de geboorte normaal verloopt.

De voorstanders van de vitamine E therapie meenen, dat het percentage van 70—80 % zeker meer is dan bij onbehandelde patiënten. Om op deze wijze tot een oplossing te komen zou men statistisch het heele probleem moeten bewerken. Hiervoor is het cijfermateriaal nog lang niet voldoende. Ook bij dreigende abortus heeft Shute successen vermeld; deze vindt echter bij habitueele abortus geen gunstige invloed.

De voorstanders van een vitamine E therapie komen dus ook onderling niet tot overeenstemmende resultaten. Met een opsomming van de in de literatuur vermelde gevallen kan hier worden volstaan.

Tabel 28.

Vitamine E therapie bij den mensch.

Aantal patienten	Ziektebeeld	Opmerkingen	Gunstig resultaat	Auteur
20	Hab.ab.	Behandeld met tarwekiemolie.	17	Vogt—Möller (1933)
52	„	„ „ „	38	Vogt—Möller (1936)
1	„	4 maal abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	1	Vogt—Möller (1931)
1	„	5 maal abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	1	
1	„	Groenten dieet.	1	Tanberg (1936)
4	„	Behandeld met tarwekiemolie p. os	4	
1	„	„ „ „ subcutaan	1	
1	„	„ „ promonta	1	Gierhake (1936)
37	„	Allen 2 of meermalen abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	33	Currie (1937)

Aantal patienten	Ziektebeeld	Opmerkingen	Gunstig resultaat	Auteur
11	Hab. ab.	Behandeld met tarwekiemolie.	11	Brown (1939)
7	„	Niet behandeld.	7	
81	„	Behandeld met tarwekiemolie.	64	Currie (1939)
8	„	„ „ „	8	
18	„	2 of meermalen abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	17	Mac Donald (1939)
1	„	2 maal abortus gehad.	1	Bickenbach (1939)
1	„	3 maal abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	1	
11	„	3 tot 15 maal abortus gehad.	9	Watson (1936)
17	„	2 maal abortus gehad.	12	
9	„	1 maal abortus gehad. Behandeld met tarwekiemolie.	8	
5	„	„ „ „	5	Juhasz—Schäffer (1933)
18	„	„ „ „	13	Watson en Tew (1935)
4	„	„ „ „	4	Cromer (1937)
15	„	„ „ „ *dl-α*-tocopherylacetaat.	12	Plate (1940)
5	prim. Ster.	Behandeld met tarwekiemolie.	0	Vogt—Möller (1939)
13	„	„ „ „	0	Watson (1936)
15	Dreig.. ab.	„ „ „	14	Currie (1939)
3	„	„ „ „	3	Cromer (1937)
23	„	„ „ „	19	Shute (1939)
15	„	„ „ „	11	Watson (1936)
40	„	„ „ „	36	Currie (1939)
20	„	„ „ „	9	Mac Donald (1939)

De resultaten van sommige onderzoekers zijn zeer overtuigend. Toch moeten deze even goed als de meer negatieve zeer critisch beschouwd worden.

Uit eigen ervaring bleek mij nl. dat vele van de zg. zeer actieve vitamine E preparaten slechts een zwakke vitamine E activiteit hadden en dat er zelfs een was, waar geen vitamine E in aan te toonen was, terwijl een van de bovengenoemde onderzoekers daar goede resultaten mee verkregen had bij habitueele abortus. Ook de gewone tarwekiemoliën loopen sterk in activiteit uiteen en de meeste clinici hebben niet de gelegenheid om de activiteit vast te stellen.

b. *Toepassing van vitamine E buiten het gebied der voortplanting.*

1. Afwijkingen in het spier-zenuwstelsel.

Einarson en Ringsted (1938) wezen reeds op de overeenkomst van de degeneratie van het zenuwstelsel, die ontstaat bij vitamine E gebrek van het proefdier en bij amyotrophische lateraalsclerose.

Wechsler (1940) heeft twee patiënten, die volgens hem leden aan deze afwijking, behandeld met vitamine E (tocopherylacetaat) en heeft er goede uitkomsten mede verkregen. Vitamine B_1 was niet van invloed.

Een behandeling van een uitgebreider aantal patiënten met meer uiteenlopende ziektebeelden is nog door Bicknell (1940) beschreven. Hij behandelt naar aanleiding van een publicatie van Goettsch en Ritzmann (1939) met versche tarwekiemen, waarin zoowel water- als lipoid factoren voorkomen, met een gunstige werking tegen spierdystrophie bij konijnen. (Zie ook blz. 22).

In 13 gevallen van musculaire dystrophie ziet hij in 12 verbetering. Bij amyotrophische lateraal-sclerose ziet hij in 2 van de vier gevallen verbetering. Bij tabes dorsalis en peroneale musculaire atrophie blijft de werking uit.

2. Vitamine E en groei.

Widenbauer (1938) zag bij 17 praemature kinderen een snelle gewichtstoename na voorafgaande groeistilstand. Gaedtke en Bennholdt-Thomsen (1938) ontkennen eenigen invloed.

SAMENVATTING.

Een biologische bepalingsmethode voor het vitamine E werd ontwikkeld, waarbij de gebreken van de methoden van Bacharach en Bomskov werden geëlimineerd. De biologische uitkomsten werden vergeleken met de chemische volgens de methoden van Karrer en Keller en volgens Emmerie en Engel. In oliën en concentraten werden overeenkomende waarden gevonden.

De biologische activiteit van *dl*-α-tocopherol en *d*-α-tocopherol bleek ongeveer gelijk. Ook bij *dl*-α-tocopheryl-acetaat was de werking gelijk aan die van *dl*-α-tocopherol.

Het oxydatieproduct van tocopherol met ferrichloride bleek biologisch inactief. Bij mannelijke ratten bleek synthetisch *dl*-α-tocopherol werkzaam.

De chemische bepaling van tocopherol in bloedserum werd vergeleken met de chemische methode van Furter en Meyer en met spectrophotometrische opnamen.

Eenige physiologische proeven bij ratten zijn vermeld. De opname van tocopherol en tocopheryl-acetaat zijn nagegaan aan de hand van het gehalte aan vitamine E in het bloedserum. Het verband van vitamine E gebrek en het tocopherolgehalte in het bloed werd bij ratten vastgelegd. Bij 5 à 10 γ tocopherol per 10 cm^3 serum beginnen de deficientieverschijnselen op te treden, terwijl het normale gehalte bij ratten tusschen 20 en 50 γ ligt.

Het gehalte aan tocopherol van menschensera bleek te varieeren van 44 tot 190 γ per 10 cm^3 serum.

Dit waren waarden verkregen bij patiënten. Bij een aantal normale personen ligt het gehalte bij ongeveer 100 γ per 10 cm^3. In het laatste hoofdstuk wordt de literatuur over vitamine E in de therapie bij den mensch besproken.

SUMMARY.

A quantitative biological estimation of vitamin E by resorption-sterility has been given.

By this method we have compared the biological activities of a number of natural oils and concentrates with the tocopherol contents as estimated by the chemical methods of Karrer and Keller and of Emmerie and Engel. Both biological and chemical methods gave essentially the same results.

The biological activity of synthetic *dl*-α-tocopherol and of natural *d*-α-tocopherol is the same and equal to the activity of tocopheryl-acetate.

The oxidation product of α-tocopherol with ferric-chloride, tocoquinone, is biologically inactive.

Synthetic *dl*-α-tocopherol prevents sterility in male rats on a vitamin E deficient diet.

The chemical estimation of tocopherol after Furter and Meyer and after Emmerie and Engel has been applied to bloodserum and compared.

Besides the spectroscopic method has been used to detect vitamin E in bloodserum.

Some physiological experiments on administration of tocopherol in relation to content of the bloodserum of male and female rats have been described.

The normal tocopherol content of bloodserum of rats varies from 20 γ to 50 γ p. 10 cm^3.

The symptoms of vitamin E deficiency appear when the tocopherol content of the blood is less than 10 γ p. 10 cm^3.

The tocopherol content of normal human bloodserum is about 100 γ p. 10 cm^3 whereas for patients values from 44 to 190 γ p. 10 cm_1 were found.

The therapeutic employment of vitamin E in medical practice has been discussed.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wird eine quantitative Auswertungsmethode für Vitamin E auf Grund der Heilung der Resorptionssterilität ausgearbeitet.

Die Ergebnisse der biologischen Auswertung von Ölen und Konzentraten und jene der chemischen Bestimmungen nach Karrer und Keller bzw. Emmerie und Engel stimmen gut überein.

Die biologischen Aktivitäten des *dl*-α-Tocopherols und des *d*-α-Tocopherols waren gleich grosz, ebenso die des Tocopheryl-acetats.

Das durch Einwirkung von Ferrichlorid entstehende Oxydationsprodukt des Tocopherols, Tocopheryl-chinon, war biologisch inaktiv (Dosis 12 mg).

Das synthetische *dl*-α-Tocopherol verhindert die durch Vitamin E-Mangel verursachte Sterilität bei Männchen.

Die beiden chemischen Bestimmungsmethoden des Tocopherols von Furter und Meyer bzw. von Emmerie und Engel wurden bei Blutserum verglichen, wobei zum Nachweis des Tocopherols in Serum auch spektrophotometrische Aufnahmen herangezogen wurden.

Bei einigen physiologischen Versuchen mit Ratten wurde die Aufnahme des Tocopherols und des Tocopheryl-acetats verfolgt, und die Beziehung zwischen Vitamin E-Mangel und Tocopherolgehalt im Blut von Ratten kontrolliert.

Der normale Tocopherolgehalt des Blutserums von Ratten ist 20 bis 50 γ p. 10 cm^3.

Die Symptome Vitamin E-Mangels beginnen bei einem Gehalt von weniger als 10 γ p. 10 cm^3 Serum.

Bei Menschen wurde immer ein höherer Gehalt gefunden und zwar etwa 100 γ p. 10 cm^3 bei normalen Personen und 44 bis 190 γ p. 10 cm^3 bei Patienten.

Die Literatur über die Vitamin E-Therapie bei Menschen ist im letzten Abschnitt zusammengefasst.

LITERATUUR.

Adler, K. en Böltink, E. 1929. Monatsh. Geburts. u. Gynaek. **82**, 19.

Agnoli, R. 1930. Boll. soc. ital. biol. sper. **5**, 937.

Anderegg, L. T. en Nelson, V. E. 1926. Industr. Engineer. Chem. **18**, 620.

Bacharach, A. L. 1938. Biochem. J. **32**, 2017.

——— 1939. Vitamin E symposium. Soc. chem. Industry. Londen.

Bacharach, A. L. en Alchorne, E. 1938a. Biochem. J. **32**, 1298.

Bacharach, A. L. en Alchorne, E. en Glynn, H. E. 1937. Biochem. J. **31**, 2287.

Barrie, M. M. O. 1937. Nature **140**, 426.

Bergel, F., Copping, A. U., Jacob, A., Todd, A. R. en Work, T. S. 1938a. J. Chem. Soc. 1382.

Bergel, F., Todd, A. R. en Work, T. S. 1938. J. Chem. Soc. 1375.

Bickenbach, 1939. Med. Klin. **35**, 501.

Bicknell, F. 1940. Lancet, 10.

Bisceglie, V. 1929. Riv. pat. sper. **4**, 119.

Blumberg, H. J. 1935. J. biol. Chem. **108**, 227.

Bomskov, C. 1938. Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **190**, 627.

Bowden, F. P. en Moore, T. 1933. Nature **131**, 512.

——— 1934. Nature **132**, 204.

Brown, F. J. 1939. Vitamin E symposium. Soc. chem. Industry. Londen.

Burr, G. O., Brown, W. R. en Moseley, R. L. 1937. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 780.

Carruthers, C. 1938. J. biol. Chem. **123** xix.

Cromer, J. R. 1937. Med. Ann. Dist. Columbia **7**, 145.

Csik, L. 1932. Arb. Ungar. biol. Forsch. Inst. Tihany **5**, 181.

Currie, D. 1937. Brit. med. J. 1218 II.

——— 1939. Vitamin E Symposium Soc. chem. Industry. Londen.

Cuthbertson, W. F. J., Ridgeway, R. R. en Drummond, J. C. 1940. Biochem. J. **34**, 34.

Demole, V. 1938/39. Z. Vitaminf. **8**, 341.

——— 1939b. C.r.Soc. physiol. Suisses.

Demole, V., Isler, O., Ringier, B. H., Salomon, H. en Karrer, P. 1939a. Helv. chem. Acta **22**, 65.

Demole, V. en Pfaltz, H. 1939. Schweiz. Med. Ws. **69**, 123.

——— 1940. Rev. Med. Suisse rom. **60**, 464.

Diakov, F. A. en Krizenecky, J. 1933. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **31**, 58.
——— 1935. Biol. generalis **11**, 149.
——— 1933a. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **31**, 59.
Dingemanse, E. 1929. Arch. néerl. Physiol. **14**, 268.
Dingemanse, E. en van Eck, W. F. 1939. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **41**, 622.
Dorrance, G. M. en Ciccone, E. F. 1937. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 426.
Drummond, J. C. en Singer, E. en MacWalter, R. J. 1935. Biochem. J. **29**, 456.
——— 1935a. Biochem. J. **29**, 2511.
Einarson, L. en Ringsted, A. 1938. Kopenhagen. Levin en Munksgaard.
Emerson, O. H., Emerson, G. A. en Evans, H. M. 1939. J. biol. Chem. **131**, 409.
Emerson, O. H., Emerson, G. A., Evans, H. M. en Mohamad, A. 1937a. J. biol. Chem. **122**, 99.
Emerson, G. A. en Evans, H. M. 1937. J. Nutrit. **14**, 169.
Emmerie, A. 1940. Rec. trav. Chem. **59**, 246.
Emmerie, A. en Engel, Chr. 1938 Nature **142**, 873.
——— 1938a. Rec. trav. chim. **57**, 1351.
——— 1939. Rec. trav. chim. **58**, 283.
——— 1939a. Rec. trav. chim. **58**, 895.
——— 1939b. Vitamin E symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Von Euler, H. en Klussmann, E. 1932. Biochem. Z. **256**, 11.
Von Euler, H., Zondek, B. en Klussmann, E. 1933. Ark. f. Kemi. Min. Geol. **11** B, 1.
Evans, H. M. 1922. Science **56**, 650.
——— 1928. Amer. J. Physiol. **85**, 149.
——— 1928/29. J. Nutrit. **1**, 23.
——— 1932. J.A.M.A. **99**, 469.
Evans, H. M. en Bishop, R. S. 1922. J. metabol. res. **1**, 319 en 335.
Evans, H. M. en Burr, G. O. 1927. The antisterility vitamin fat soluble E. Mem. University of California.
——— 1927a. J.A.M.A. **88**, 1462.
——— 1927b. J.A.M.A. **89**, 1587.
——— 1928. J. biol. Chem. **76**, 273.
Evans, H. M., Emerson, G. A. en Emerson, O. H. 1936. J. biol. Chem. **113**, 319.
——— 1938. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 197.
——— 1939. Anat. rec. **74**, 257.
Evans, H. M., Emerson, G. A. en Telford, I. R. 1938. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 665.
Evans, H. M., Murphy, E. A., Archibald, R. C. en Cornish, R. E. 1935. J. biol. Chem. **108**, 515.
Fernholz, E. 1937. J. am. chem. Soc. **59**, 1154.

——— 1938. J. am. chem. Soc. **60**, 700.
Furter, M. en Meyer, R. E. 1939. Helv. chim. Acta **22**, 240.
Gaedke, G. en Bennholdt-Thomsen, C. 1938. Z. Kinderheilk. **60**, 52.
Geller, F. C. 1934. Arch. f. Gynäk. **156**, 345.
Gierhake, E. 1933. Arch. f. Gynaek. **156**, 348.
——— 1935. Deutsch. med. Ws. **61**, 1674.
——— 1936. Münch. med. Ws. **83**, 1720.
Goettsch, M. en Ritzmann, J. 1939. J. Nutrit. **17**, 371.
Grijns, G. 1938. Z. Vitaminf. **8**, 197.
Grijns, G. en Dingemanse, E. 1933. Proc. royal Acad. Amsterdam **36**, 242.
Herschel, A. 1938. Onderzoekingen over E-avitaminose, Utrecht, dissertatie, Kemink en Zn.
Hogan, A. G. en Harshaw, H. M. 1924. J. metabol. Res. **5**, 111.
Isler, O. 1938. Helv. chim. Acta **21**, 1756.
Jacob, A., Sutcliffe, F. K. en Todd, A. R. 1940. J. chem. Soc. 327.
John, W. 1937. Z. physiol. Chem. **250**, 11.
John, W., Dietzel, E. en Emte, W. 1939a. Z. physiol. Chem. **257**, 173.
John, W., Dietzel, E. en Günther, Ph. 1938. Z. physiol. Chem. **252**, 208.
John, W. en Emte, W. 1939. Z. physiol. Chem. **261**, 24.
Julius, H. W. 1932. Verslagen en Mededeelingen betr. de Volksgezondheid. 84.
Juhász-Schäffer, A. 1931. Virchows Arch. **281**, 3.
——— 1931a. Virchows Arch. **281**, 35.
——— 1933. Erg. inn. Med. **45**, 129.
Karrer, P. en Demole, V. 1938. Schweiz. med. Ws. **68**, 954.
Karrer, P., Escher, R., Fritzsche, H., Keller, H., Ringier, B. H. en Salomon, H. 1938a. Helv. chim. Acta **21**, 939.
Karrer, P. en Fritzsche, H. 1938b. Helv. chim. Acta **21**, 1234.
——— 1939. Helv. chim. Acta **22**, 260.
Karrer P. en Keller, H., 1939b. Helv. chim. Acta **22**, 253.
Karrer, P., Fritzsche, H., Ringier, B. H. en Salomon, H. 1938c. Helv. chim. Acta **21**, 520.
——— 1938d. Helv. chim. Acta **21**, 820.
Karrer, P. en Geiger, A. 1940. Helv. chim. Acta **23**, 455.
Karrer, P. en Jensen, H. 1938e. Helv. chim. Acta **21**, 1622.
Karrer, P. en Keller, 1938g. Helv. chim. Acta **21**, 1161.
Karrer, P., Koenig, H., Ringier, B. H. en Salomon, H. 1939a. Helv. chim. Acta **22**, 1139.
Karrer, P., Salomon, H. en Fritzsche, H. 1938f. Helv. chim. Acta **21**, 309.
Knowlton, G. C. en Hines, H. M. 1938. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 665.
Knowlton, G. C. Hines, H. M. en Brinkhous, K. M. 1939. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **42**, 804.
Kudrjaschov, B. A. 1933. Arch. f. exp. Path. und Pharm. **169**, 275.
——— 1935. Trans. Dynam. Development **10**, 40.

Lester-Smith, E. en Bailey, R. 1939. Vitamin E Symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Lipschitz, M. D. 1936. Rev. neurol. **65**, 221.
MacDonald, C. R. 1939. Vitamin E symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Mackenzie, C. G., Levine, M. D. en MacCollum, E. V. 1940. J. Nutrit. **20**. 399.
Marchesi, F. 1933. Riv. Pat. sper. **11**, 396.
——— 1935. Sperimentale **89**, 622.
Martin, G. J. 1937. J. Nutrit. **13**, 679.
Martin, A. J. P., Moore, T., Schmidt, M. en Bowden, F. P. 1934. Nature **134**, 214.
Mason, K. E. 1926. J. exp. Zool. **45**, 159.
——— 1929. J. Nutrit. **1**, 311.
——— 1933. Am. J. Anat. **52**, 153.
——— 1939. Sex. and internal Secretions 1149.
——— 1939. Vitamin E Symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Mason, K. E. en Bryan, W. L. 1938. Biochem. J. **32**. 1785.
Mattill, H. A., Carman, J. en Clayton, M. 1924. J. biol. Chem. **61**, 729.
Mattill, H. A. en Conklin, R. E. 1920. J. biol. Chem. **46**, 137.
Moore, T. en Rajagopal, K. R. 1940. Biochem. J. **34**, 335.
Moore, T., Martin, A. J. P. en Rajagopal, K. R. 1939. Vitamin E Symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Morelle, J. 1931. C.r.soc. Biol. **108**, 804.
Morgulis, S. en Spencer, H. C. 1936. J. Nutrit. **11**, 573.
Morgulis, S., Wilder, V. M. en Eppstein, S. H. 1938. J. Nutrit. **16**, 219.
Morton, R. A. en Edisbury. 1933. Nature **131**, 618.
Moss, A. R., Cuthbertson, W. F. J., Danielli, J. F. en Drummond, J. C. 1938. J. Soc. Chem. Ind. **57**, 135.
Müller, J. H. en Müller, C. 1937. Endokrinologie **18**, 369.
Nakahara, W. en Inukai, F. 1934/35. Nutr. Abstr. **4**, 133.
Nelson, W. E. 1931. Anat. Rec. **51**, 37.
——— 1933. Anat. Rec. **56**, 241.
Nelson, W. E., Heller, G., Parks, T. B. en Fulmer, E. J. 1924. J. biol. Chem. **61**, 729.
Olcott, H. S. 1935a. J. biol. Chem. **109**, lxxii.
——— 1935. J. biol. Chem. **110**, 695.
Olcott, H. S. en Mattill, H. A. 1934. J. biol. Chem. **104**, 423.
——— 1937. J. Nutrit. **14**, 305.
Palmer, L. S. 1937. J. biol. Chem. **119**, lxxv.
Plate, W. P. 1940. Nederl. Tijds. Geneesk. **84**, 4134.
Randoin, L. en Netter, P. 1934. Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 581.
Ringsted, A. 1936. Diss. Kopenhagen. Nyt Nordisk Forlag.

Rowntree, I. G., Lansbury, J. en Steinberg, A. 1937. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 424.
Saphir, W. 1936. Endocrinology **20**, 107.
Shute, E. 1939. Vitamin E Symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
Smith, L. J., Irwin, W. B. en Ungnade, H. E. 1939. J. am. chem. Soc. **61**, 2424.
Smith, L. J., Ungnade, H. E. en Prichard, W. W. 1938. Science, **88**, 37.
Stein, S. I. 1935. J. Nutrit. **9**, 611.
Sure, B. 1923. J. biol. Chem. **58**, 681.
——— 1923a. J. biol. Chem. **58**, 693.
Szarka, A. 1929. Arch. f. d. ges. Physiol. **223**, 657.
Tanberg, A. 1936. Nord. med. Tids. **12**, 1785.
Verzár, F. 1929. Proc. Staff meet. Mayo Clinic, **4**, 351.
——— 1931. Arch. f. d. ges. Physiol. **227**, 499.
——— 1932. Z. vitaminf. **1**, 116.
Verzár, F., v. Arvay, A. en v. Kokas, E. 1931. Biochem. Z. **240**, 19.
Verzár, F. en v. Kokas, E. 1931. Arch. f. d. ges. Physiol. **227**, 511.
Vogt-Møller, P. 1931. Lancet **221**, 182.
——— 1933. Hospit. Tidende **76**, 621.
——— 1936. Klin. Ws. **15**, 1883.
——— 1939. Vitamin E Symposium. Soc. chem. Industry. Londen.
v. Vonno, N. C. 1938. Geneesk. Gids **16**, 686.
Waddell, J. en Steenbock, H. 1928. J. biol. Chem. **80**, 431.
——— 1931. J. Nutrit. **4**, 79.
van Wagenen, G. 1925. Anat. Rec. **29**, 398.
Watson, E. M. 1936. Canad. med. Assoc. J. **34**, 134.
Watson, E. M. en Tew, W. P. 1935. Amer. J. Ostet. Gynaecol. **31**, 252.
Wechsler, I. S. 1940. J.A.M.A. **114**, 948.
v. Werder, F., Moll, Th. en Jung, F. 1939. Z. physiol. Chem. **257**, 129.
Widenbauer, F. 1938. Z. Kinderheilk. **60**, 216.
Wright, M. D. en Drummond, J. C. 1940. Biochem. J. **34**, 32.
Zagami, V. en Sindoni, M. 1933. Riv. Pat. Sper. **10**, 25.
Zagami, V. 1933a. Riv. Pat. Sper. **11**, 381.

L8193.

STELLINGEN.

I.

De conclusie van Moyer, dat kwartsdeeltjes zich in serum met albumine bedekken, collodiumdeeltjes daarentegen met globuline, is onjuist en vindt in zijn experimenten geen enkele steun.

Moyer, L. S. Transactions of the Faraday Society XXXVI, 248 (1940).

II.

Het is niet bewezen, dat er een groep proteinasen bestaat, die hun substraat speciaal bij het I.E.P. aantasten.

Nord, F. F. en Weidenhagen, R. Handbuch d. Enzymologie (1940) 611.

III.

De synthese van proteinen in hydrolysaten van eiwitten door proteinasen is door Maver en Voegtlin niet bewezen.

Maver, M. E. en Voegtlin, C. Enzymologia VI, 219 (1939).

IV.

Aan het begrip „Corpus luteum" is de secretie van een geslachtshormoon inherent. Het is daarom foutief de geovuleerde, degenereerende follikels van anamnia slechts uit vergelijkend-anatomisch standpunt „Corpora lutea" te noemen.

Hett, I. Handbuch der Vergl. Anat. d. Wirbeltieren VI, 253 (1933).

V.

Voor het vitamineeren van levensmiddelen met vitamine D is het toevoegen van zuiver vitamine te verkiezen boven het bestralen van de levensmiddelen met ultraviolet licht.

CHR. ENGEL.

VI.

Emerson, Emerson en Evans hebben niet bewezen, dat het oxydatieproduct van tocopherol met ferrichloride biologisch actief is.

Emerson, O. H., Emerson, G. A. en Evans, H. M., J. biol. Chem. **131**, 409 (1939).

VII.

De opvattingen van Myrbäck en Örtenblad over de activitie der gebonden amylase in gerst zijn te verkiezen boven die van Chrzaszcz en Janicki.

Myrbäck, K. en Örtenblad, B. Enzymologia IX, 43 (1940).

VIII.

De theorie van Grégoire over de morphologische waarde van de vruchtbladen van de angiospermen vindt geen steun in het werk van Sprotte.

Sprotte, K. Bot. Arch. **40**, 463 (1940).
