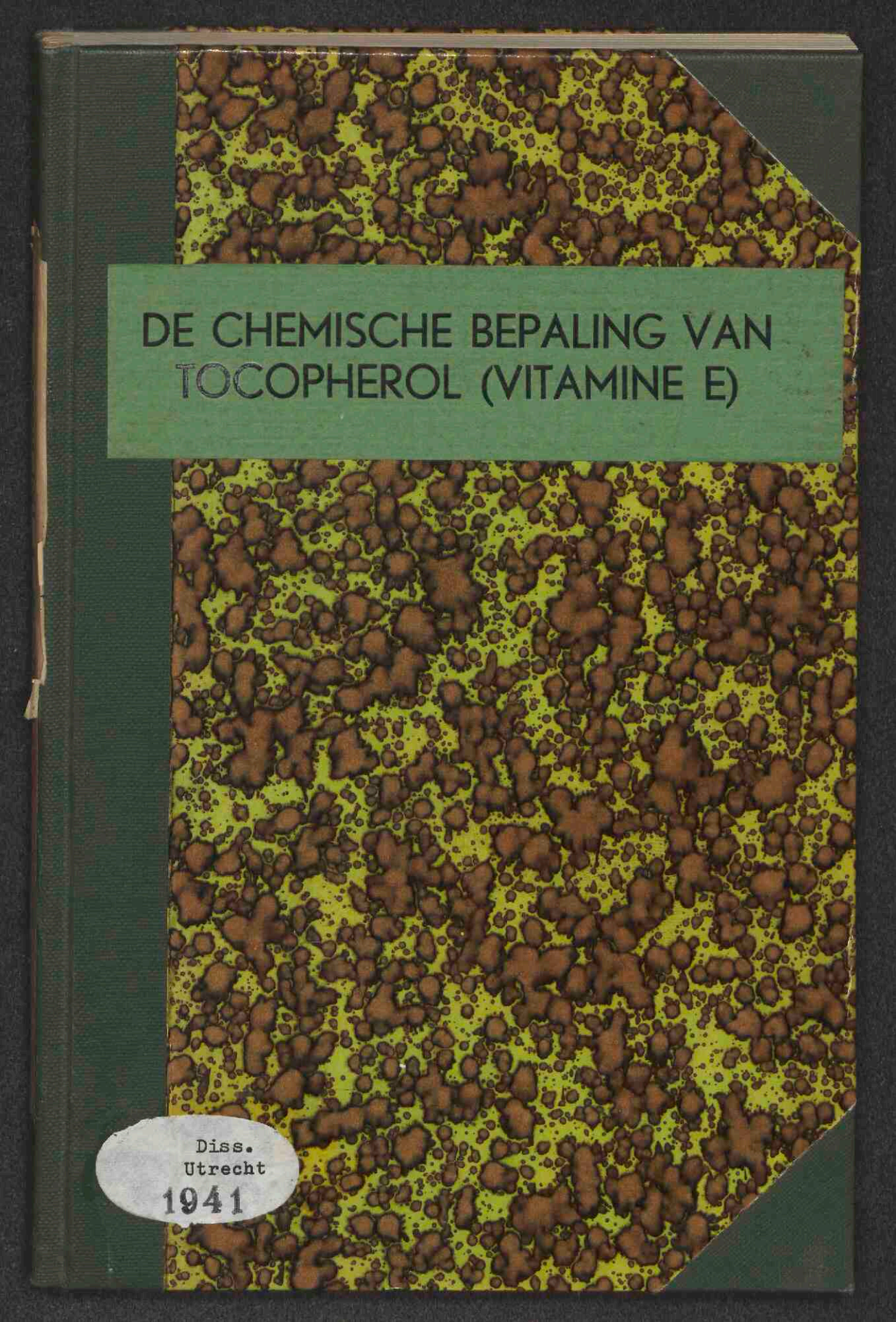




De chemische bepaling van tocopherol (vitamine E)

<https://hdl.handle.net/1874/357893>



DE CHEMISCHE BEPALING VAN
TOCOPHEROL (VITAMINE E)

Diss.
Utrecht
1941

DE CHEMISCHE BEPALING VAN TOCOPHEROL
(VITAMINE E)

A. zw 192 1941

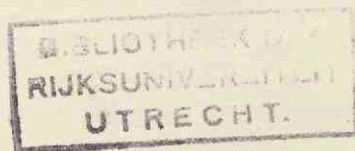
DE CHEMISCHE BEPALING VAN TOCOPHEROL (VITAMINE E)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR MAGNIFICUS DR. H. R. KRUYT, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER
UNIVERSITEIT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
OP MAANDAG 19 MEI 1941, DES NAMIDDAGS TE
3 UUR, DOOR

ADRIANUS EMMERIE

GEBOREN TE ROTTERDAM



1941

DRIJKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

DE CHEMISCHE BEPALING VAN
TOEGEFERD. VITAMINE B

Van de redactie van de
Tijdschrift voor Geneeskunde
en Natuurwetenschappen
in Utrecht, 1925, No. 1, p. 10.



Aan de nagedachtenis van mijn Vader.
Aan mijn Moeder.
Aan mijn Vrouw.

*Bij het afsluiten van dit proefschrift rust op mij de aangename taak U, Hoog-
leeraren in de Afdeling der Scheikundige Technologie der Technische Hoogeschool,
mijn dank te betuigen voor hetgeen Gij hebt bijgedragen tot mijn wetenschappelijke
ontwikkeling.*

*In het bijzonder, Hooggeleerde BÖESEKEN, geldt U deze dankbetuiging.
Hooggeleerde SJOLLEMA, U dank ik voor het vele, dat ik in Uw laboratorium
heb mogen leeren.*

*Met eerbied gedenk ik wijlen Professor L. K. WOLFF. Aan zijn wetenschap-
pelijk enthousiasme en stuwende kracht heb ik veel te danken.*

*Hooggeleerde JULIUS, Hooggeachte Promotor. Het is mij een bijzonder voorrecht,
dat Gij als mijn Promotor wilt optreden. Voor Uw belangstelling en voor de
vrijheid, die Gij mij gelaten hebt bij mijn onderzoekingen, ben ik U zeer dank-
baar. De steun, dien Gij mij bij het bewerken van dit proefschrift hebt verleend,
is voor mij van groote waarde geweest.*

*Hooggeleerde KÖGL, U dank ik voor de critische beschouwing van het manuscript.
Zeergeleerde VAN EEKELLEN, de meest aangename herinneringen bewaar ik
aan onze samenwerking, die tot een blijvende vriendschap heeft geleid.*

*Waarde ENGEL, Uw medewerking op biologisch gebied aan het vitamine E-
probleem is voor mij van groote waarde geweest, ik stel deze medewerking op
hoogen prijs.*

*Tenslotte een woord van dank aan alle medewerkers aan het Hygiënisch Labo-
ratorium, die mij steeds hun welwillendheid hebben betoond.*

INHOUD

	Bladz.
Inleiding	11
HOOFDSTUK I.	
Ontdekking en geschiedenis van het vitamine E	12
HOOFDSTUK II.	
Chemie van het vitamine E	14
HOOFDSTUK III.	
Biologie van het vitamine E	35
HOOFDSTUK IV.	
Chemische en physische bepaling der tocopherolen	40
HOOFDSTUK V.	
Eigen bepalingsmethode	45
HOOFDSTUK VI.	
Bepaling van het tocopherolgehalte in oliën	56
HOOFDSTUK VII.	
Bepaling van tocopherol in serum	65
HOOFDSTUK VIII.	
Onderlinge vergelijking der chemische bepalingsmethoden	71
Samenvatting	74
Summary	75
Zusammenfassung	75
Literatuur	76

INLEIDING.

Een verrassend snelle oplossing van het vitamine E-probleem in chemisch opzicht heeft gedurende de laatste 4 jaren plaats gevonden, waarbij het gelukt is het vitamine E te isoleeren, te identificeren en te synthetiseeren. Deze feiten zullen niet alleen den chemicus voldoening verschaffen, doch eveneens van groot belang zijn voor den clinicus (medicus en veterinaire). Ofschoon het vitamine E reeds verscheidene jaren bij mensch en dier wordt toegepast, zijn de tot heden verkregen resultaten niet eensluidend gebleken en heerscht er lang geen overeenstemming over de resultaten van de vitamine E-therapie bij den mensch. Hierop is zeker van invloed geweest het feit, dat men steeds genoodzaakt was het vitamine E toe te dienen in den vorm van onzuivere en niet constante vitamine E-preparaten (tarwekiemolie of concentraten hiervan), waarbij bovendien nog komt, dat men in onzekerheid verkeert of de hierin naast het vitamine E aanwezige stoffen biologische beteekenis hebben. Door het beschikbaar komen van zuiver synthetisch vitamine E zal men in staat zijn een beter inzicht te krijgen in de beteekenis van het vitamine E bij den mensch. Immers de groote vlucht, die het onderzoek naar de vitaminevoorziening bij mensch en dier in het algemeen heeft genomen, is voor een groot deel te danken aan het vinden van chemische of physische methoden om vitamines in het bloed of in andere lichaamsvloeistoffen te bepalen.

Het doel van dit proefschrift is geweest een chemische bepalingsmethode voor vitamine E in allerlei materiaal uit te werken en deze methode geschikt te maken om dit vitamine in bloed te bepalen. Met behulp van deze methode zal men dan in staat zijn nadere gegevens over de biologie van het vitamine E te verzamelen.

HOOFDSTUK I.

ONTDEKKING EN GESCHIEDENIS VAN HET VITAMINE E.

Tot vóór 1920 wist men niet beter dan dat een diëet, waarop de rat of muis voldoende groeide en in goede conditie verkeerde, eveneens volwaardig was ten opzichte van de voortplanting.

Mattill en Conklin (1) vonden in 1920 echter, dat vrouwelijke ratten, die op een volle-melk diëet leefden, niettegenstaande ze goeden groei vertoonden en in goede gezondheid verkeerden, meestal steriel waren.

In 1922 vonden Evans en Scott (2), dat vrouwelijke ratten, die op een diëet waren gezet dat voldoende eiwit, koolhydraten en de toenmaals bekende vitamines bevatte, in de eerste generatie gedeeltelijk en in de tweede generatie geheel steriel waren. Deze steriliteit kon worden opgeheven door een onbekenden voedingsfactor, dien zij X noemden en die in sommige natuurlijke voedingsstoffen aanwezig was, zooals in versche sla, tarwekiemen en alfalfa. Evans en Bishop (3, 4, 5) vonden, dat de door Evans en Scott genoemde stof X oplosbaar in vetten, doch niet identiek met één der bekende vitamines was.

Ook Sure (6, 7) kwam onafhankelijk van de voornoemde onderzoeken tot de conclusie, dat een bepaalde stof noodig was voor de instandhouding van de vruchtbaarheid bij de rat en stelde voor den nieuwen factor vitamine E te noemen. Dat deze factor eveneens noodig was voor de mannelijke rat en muis, werd aangetoond door Beard (8, 9), Mason (10, 11) en door Evans en Burr (12).

Toch werd gedurende eenige jaren na deze ontdekkingen het bestaan van het vitamine E in twijfel getrokken. Zooals later werd

gevonden, was de oorzaak hiervan gelegen in de verschillende diëten der onderzoekers. Een belangrijke rol heeft reuzel als bestanddeel der diëten gespeeld bij dit meeningsverschil, terwijl ook gebleken is, dat enkele diëten niet voldoende vitamine E-vrij waren. Nelson en medewerkers (13) veronderstelden, dat de steriliteit ontstond door de aanwezigheid van het vrij hoge percentage reuzel, dat door Evans in zijn diëten werd gebruikt. In latere publicaties van Evans (14) en van Evans en Burr (12) werd geconstateerd, dat de aanwezigheid van reuzel inderdaad bevorderlijk was voor de eigenschappen van een bepaald diëet om steriliteit bij de rat te veroorzaken. Dat niet het percentage vet de steriliteit-veroorzakende factor was, werd bewezen doordat een even hoog percentage boter in het diëet geen steriliteit veroorzaakte. Verder bleek uit onderzoekingen van Evans en Burr (15, 16), dat reuzel de werking van vitamine E neutraliseerde wanneer het met het vitamine E werd gemengd, terwijl dit niet het geval was, wanneer het vitamine E afzonderlijk werd toegediend.

Een monumentaal werk over vitamine E-onderzoekingen gedurende het hier boven beschreven tijdperk is verschenen van de hand van Evans en Burr, getiteld „The antisterility fat soluble vitamin E” en werd gepubliceerd in *Memoirs of the University of California* 8 (1927).

Tot 1936 volgden een aantal onderzoekingen over het vitamine E, die zich zoowel op biologisch als op chemisch gebied bewogen en waarbij men een aantal chemische eigenschappen van het vitamine E kon vaststellen.

In 1936 gelukte het aan de beide Emersons (17) twee kristallijne esters uit tarwekiemolie te bereiden, die na verzeeping producten met sterke vitamine E-activiteit leverden, welke stoffen α - en β -tocopherol werden genoemd.

Opheldering van de chemische constitutie dezer stoffen was grootendeels te danken aan Fernholz (18), die in 1938 vaststelde, dat α -tocopherol een chromaanderivaat was. In hetzelfde jaar gelukte het Karren en medewerkers (19) het α -tocopherol synthetisch te bereiden, terwijl uit 1938 en 1939 de chemische bepalingmethoden der tocopherolen dateeren (20, 21, 22).

HOOFDSTUK II.

CHEMIE VAN HET VITAMINE E.

A. *Verspreiding en voorkomen in de natuur.*

Het vitamine E komt veel verspreid in de natuur voor, zij het dan in het algemeen in kleine hoeveelheden en in geringe concentraties. Ofschoon tot nu toe een eenigszins volledige opgave over de aanwezigheid van het vitamine E in de natuur ontbreekt, kan men toch zeggen, dat het in het plantenrijk veelvuldig voorkomt.

Goede bronnen voor het vitamine E zijn de zaden en kiemen van granen, waarbij in de eerste plaats de tarwekiemen moeten worden genoemd, terwijl ook de zaden van de katoenplant als bron voor vitamine E kunnen dienen. Van de groene planten is sla te noemen als vitamine E-bron. Tarwekiemen en vooral de daaruit verkregen olie, de tarwekiemolie, hebben een zeer belangrijke rol gespeeld bij het vitamine E-onderzoek. Niet alleen hebben tarwekiemolie en concentraten hiervan een groot aandeel gehad in het biologisch onderzoek, doch eveneens zijn de zuivere vitamine E-factoren, de tocopherolen, het eerst uit concentraten van tarwekiemolie geïsoleerd. De olie wordt door persen of door extractie met een organisch oplosmiddel (aether of petroleumaether) uit de kiemen verkregen. *G r a n d e l* (23), die een onderzoek heeft verricht over tarwekiemolie en het vitamine E-gehalte ervan, komt tot de volgende conclusies:

Het vitamine E-gehalte neemt af wanneer het zuurgetal der olie stijgt. Oliën, die door koude persing der kiemen worden gewonnen, hebben lagere zuurgetallen dan oliën, die door extractie uit de kiemen worden verkregen. In het eerste geval krijgt men oliën met een hoogere concentratie aan vitamine E, terwijl men in het laatste geval meer olie uit de kiemen verkrijgt. Tevens blijkt, dat het

vitamine E-gehalte van goede tarwekiemolie bij bewaren bij lage temperatuur en bij afwezigheid van zuurstof zeer stabiel is.

In de volgende tabel zijn enkele waarden opgegeven betreffende het tocopherolgehalte van tarwekiemoliën en andere oliën, waarbij de waarden langs chemischen weg zijn bepaald.

Tabel 1.
Tocopherolgehalte van eenige oliën.*

Product	mg tocopherol per g olie	Auteurs
Tarwekiemolie	5.2	Karrer en Keller (20)
idem	5.5—1.4	Grandel (23)
idem	2.6—0.9	Lester Smith en Bailey (24)
idem	3.6	Furter en Meyer (22)
idem	2.8—0.2	eigen onderzoekingen
Katoenzaadolie	1.5	idem
Soyaolie	1.2	idem
Lijnolie	0.23	Karrer en Keller (20)
Olijfolie	0.08	idem
idem	0.03	eigen onderzoekingen
Cocosolie	0.03	Karrer en Keller (20)
Sesamolie	0.05	idem

Deze waarden zijn natuurlijk slechts oriënteerend, aangezien hierbij factoren als herkomst, ouderdom en raffinage van grooten invloed zijn.

Over het vitamine E-gehalte van organen of weefsels is tot nu toe weinig met zekerheid bekend; in het algemeen schijnt hierin weinig vitamine E aanwezig te zijn.

B. Bereiding van vitamine E-concentraten.

Daar tarwekiemolie de rijkste natuurlijke bron voor het vitamine E was, werd bij de bereiding van concentraten steeds hiervan uitgegaan.

Evans en Burr (12) hadden reeds gevonden, dat na verzeeping der olie het vitamine E overging in de onverzeepbare fractie; zodoende kon een aanzienlijke concentratie van het vitamine worden verkregen.

* De door ons onderzochte oliën zijn welwillend ter beschikking gesteld door de N.V. Organon.

Het bleek echter, dat het vitamine tegenover alkali niet geheel stabiel was, zoodat het noodig was bij de verzeeping voorzorgsmaatregelen te nemen. *Evans* en zijn medewerkers (25) kwamen tot de conclusie, dat de verzeeping van tarwekiemolie het best kon worden uitgevoerd met een oplossing van kaliumhydroxide in absoluten methylalcohol onder koken. De verzeeping vond plaats in een stikstof- of waterstofatmosfeer, terwijl de extractie van het onverzeepbare deel met aether geschiedde. Volgens hun onderzoekingen gaf deze methode betere resultaten dan verzeepen met kaliumhydroxide in aethylalcohol of verzeeping bij kamertemperatuur. Eigen onderzoekingen hierover zullen later worden beschreven (zie hoofdstuk VI). Het onverzeepbare deel der olie bevat naast het vitamine E nog talrijke andere stoffen, hoofdzakelijk sterinen (o.a. sitosterine), terwijl eveneens carotinoïden (xanthophyl en kryptoxanthine) aanwezig zijn (26). Door behandeling van het onverzeepbare met bepaalde oplosmiddelen (pentaan of methylalcohol) bij lagere temperatuur lieten de sterinen zich grootendeels verwijderen, terwijl een deel der overblijvende sterinen door precipitatie met digitonine werd verwijderd (12). Verdere zuivering der aldus verkregen concentraten werd door *Evans* en *Burr* bereikt door het concentraat op te lossen in petroleumaether en uit te schudden met 92 % methylalcohol, waarbij het vitamine E in de petroleumaetherlaag bleef en inactieve stoffen gedeeltelijk in den methylalcohol overgingen. Bij de verdeeling van het concentraat tusschen petroleumaether en absoluten methylalcohol, verdeelde het vitamine E zich ten gunste van den methylalcohol (27). Verdere methoden tot zuivering bestonden in het sterk afkoelen van oplossingen van het concentraat in alcohol of in aceton, waarbij een gedeelte der inactieve stoffen precipiteerde.

Bij gebruik maken van hoogvacuumdestillatie vonden *Evans* en *Burr* (12), dat de actieve fractie overging bij 200—233° C (0.5 mm Hg druk) en dat bij herhaald fractioneeren het destillaat tusschen 225—230° C (0.01 mm Hg druk) actief was.

Olcott en *Mattill* (28) vonden voor de actieve fractie een kookpunt van 190—220° C (0.1 mm Hg druk).

Drummond en medewerkers (26, 29) maakten gebruik van het principe der chromatographische analyse volgens *Tsett* (30). Bij dit principe wordt de stof in een oplosmiddel (meestal petroleum-

aether of benzol) door een laag adsorbens gefiltreerd. Deze laag adsorbens bevindt zich in een verticaal geplaatste glazen cylinder, die aan het onderinde een vernauwing heeft en daar afgesloten wordt door een watteprop of een geperforeerde plaat met filter. De oplossing wordt voorzichtig op het adsorbens gegoten en na passage door de kolom wordt nagewasschen met het zuivere oplosmiddel. In tegenstelling met een gewone adsorptie, verkregen door schudden van de oplossing met het adsorbens, waarbij men tenslotte slechts een scheiding krijgt tusschen niet-geadsorbeerde stof en wel-geadsorbeerde stof, is het bij de analyse volgens T s w e t t mogelijk veel beter te differentieeren. Hierbij n.l. kan men een scheiding maken tusschen stoffen die sterker en minder sterk worden geadsorbeerd; immers de stoffen, die het sterkst worden geadsorbeerd bevinden zich boven in de kolom en de minder sterk geadsorbeerde stoffen bevinden zich in het onderste deel. Door de kolom adsorbens voorzichtig uit de glazen buis te drukken, waarbij de kolom intact moet blijven, kan men deze in stukken verdeelen en zodoende een scheiding verkrijgen. De geadsorbeerde stoffen kan men door behandeling van het adsorbens met alcohol, aether e.d. stoffen elueeren. Een andere methode om een scheiding te krijgen tusschen de geadsorbeerde stoffen bestaat hierin, dat men de kolom intact laat en doorspoelt met bepaalde elutievloeistoffen, waarbij men de gewenschte component in het filtraat kan verzamelen.

Deze methode, die bij het onderzoek van natuurstoffen zijn bruikbaarheid heeft bewezen, werd door D r u m m o n d op tarwekiemolieconcentraten toegepast. Als adsorbens werd aluminiumoxyde gebruikt en als oplosmiddel voor het concentraat petroleumaether of benzol.

Ook op onverzepte tarwekiemolie pasten M o s s en D r u m m o n d (31) het principe der chromatographische analyse toe, met het doel concentraten te verkrijgen onder vermijding van het verzeepingsproces.

Al deze onderzoeken waren zeer tijdroovend, omdat steeds als contrôle der verkregen fracties een biologische ijking noodig was. D r u m m o n d en medewerkers hebben bij hun onderzoeken ook gebruik gemaakt van de spectrographische methode om het vitamine E te bepalen, waarover later uitvoeriger (zie hoofdstuk II en IV).

C. *Chemische eigenschappen van het vitamine E.* *)

Ofschoon het vitamine E pas in 1936 in zuiveren toestand werd verkregen, waren er vóór dit tijdstip reeds verscheidene onderzoeken gedaan over de eigenschappen van vitamine E met behulp van concentraten. Een groot gedeelte dezer chemische eigenschappen hebben Evans en Burr reeds beschreven in hun standaardwerk over vitamine E en op een enkele uitzondering na bleken deze eigenschappen later, toen de zuivere tocopherolen waren geïsoleerd, daarmee in overeenstemming te zijn. Men moet echter niet uit het oog verliezen, dat de resultaten van deze onderzoeken verkregen werden met behulp van de dierproef en dus onderhevig waren aan de strooingen, die hierbij optreden, zoodat een nauwkeurigheid, zooals bij de latere chemische bepalingen aanwezig is, ontbreekt.

1. *Oplosbaarheid.*

Zoowel het natuurlijke vitamine E als de later te noemen tocopherolen zijn goed oplosbaar in organische oplosmiddelen en in vetten, onoplosbaar in water en in verdunde alkaliën of zuren.

2. *Bestendigheid tegenover alkaliën en zuren.*

Zooals reeds eerder werd vermeld is het vitamine E min of meer labiel tegenover alkali, een eigenschap, waarover in de hoofdstukken VI en VII uitvoeriger zal worden bericht. Tegenover zuren is de stabiliteit veel grooter. Het vitamine is stabiel tegenover 20 % zoutzuur bij kamertemperatuur evenals tegenover alcoholisch zoutzuur (12). Zie eveneens hoofdstuk VII.

3. *Hydreering.*

Tegen katalytische hydreering met waterstof en platina bleek het vitamine E zeer goed bestand, evenals tegenover hydreering bij hoogen druk (Bowden en Moore (32), Olcott en Mattill (28), Olcott (33, 37), Drummond en medewerkers (26, 29)).

*) Wanneer gesproken wordt over vitamine E, dan wordt bedoeld deze stof in natuurlijke producten of hun concentraten; wordt gesproken over de zuivere stoffen met vitamine E-werking, dan worden deze aangeduid als tocopherolen.

4. Oxydatie.

Het vitamine E is tegenover oxydatiemiddelen niet stabiel. Oxydantia, zooals ferrichloride en zilvernitraat, maken het vitamine / geheel of gedeeltelijk inactief. Het ferrichloride heeft dienst gedaan om vitamine E-vrije diëten te bereiden, waarbij oplossingen van ferrichloride in aether over het voer werden gegoten; na menging liet men den aether verdampen (Waddell en Steenbock (34)).

Andere oxydatiemiddelen als ozon, kaliumpermanganaat en perbenzoëzuur maken het vitamine E eveneens biologisch onwerkzaam (Olcott en Mattill (28), Olcott (35)).

Bij proeven met zuiver *dl*- α -tocopherol toonde Isler (36) aan, dat dit door zuurstof wordt geoxydeerd, doch dat de esters stabiel zijn tegenover zuurstof.

5. Halogenen.

Bromeeren of chloreeren vernietigt de activiteit van het vitamine, doch door koken van het hierbij verkregen reactieproduct met zink en methylalcoholisch zoutzuur kan de activiteit hersteld worden (Olcott (35)).

6. De hydroxylgroep in het molecule.

Door de onderzoekingen van Olcott (37) werd bewezen, dat het vitamine E een hydroxylgroep bevat. Olcott vond, dat na behandeling met methyljodide en zilveroxyde een inactief product ontstond. Het door behandeling met phenylisocynaat ontstane reactieproduct was inactief, doch door hydrolyse kon de biologische activiteit hersteld worden.

Na acetyleeren van het vitamine E werd een product verkregen, dat zijn biologische werkzaamheid had behouden, dus in tegenstelling met het veresteren met phenylisocynaat.

Dat bij het acetyleeren inderdaad een verestering had plaats gevonden, werd aangetoond door het na acetyleeren verkregen product met phenylisocynaat te behandelen. Het product bleef hierbij werkzaam, in tegenstelling dus met het feit, dat na directe behandeling van het vitamine E met phenylisocynaat een biologisch onwerkzaam product ontstond.

Drummond en medewerkers (26) vonden eveneens, dat bij

acetyleren een mono-acetyl derivaat ontstond, dat biologisch werkzaam is en na verzeeping deze werkzaamheid behoudt.

D. Vitamine E en anti-oxydantia.

Reeds eerder werd melding gemaakt van het aandeel, dat reuzel heeft gehad in de door Evans en Burr gebruikte diëten. Hierbij bleek, dat reuzel in staat was om stoffen zooals boter, die bij aanwezigheid in het dieet steriliteit kunnen voorkomen, onwerkzaam te maken.

Uit onderzoekingen van Mattill (38) was komen vast te staan, dat ransige vetten het vitamine E vernietigen. Vooral de vetten, die sterk onderhevig zijn aan ransig worden (reuzel en levertraan), vernietigen het vitamine E het snelst (Cumings en Mattill (39)).

De auto-oxydatie van vetten kan geremd worden door z.g. anti-oxydantia, waartoe o.a. meerwaardige phenolen behooren (Mattill (40), Olcott (45)), terwijl carotinoïden deze oxydatie bevorderen (45).

Dergelijke anti-oxydantia komen eveneens in de natuur voor.

Uit onderzoekingen van Mattill en Crawford (41), Olcott en Mattill (42), Olcovich en Mattill (43) en van Bradway en Mattill (44) is komen vast te staan, dat het onverzeepbare deel van plantaardige producten (gele wortelen, sla, tomaten, katoenzaadolie en tarwekiemolie) anti-oxydantia bevat (dit werd onderzocht tegenover reuzel).

Tusschen de anti-oxydantia uit de diverse producten bleken onderling verschillen te bestaan. Bij een verdeeling tusschen petroleumaether en 92 % methylalcohol vond in sommige gevallen (wortelen, tomaten, sla) een verdeeling ten gunste der methylalcohol plaats, terwijl weer in andere gevallen (katoenzaadolie en tarwekiemolie) het anti-oxydant zich ten gunste der petroleumaether verdeelde (46, 44).

In deze laatste gevallen vertoonde het anti-oxydant dus hetzelfde gedrag als het aanwezige vitamine E, waarvan het chemisch niet gescheiden kon worden. De mogelijkheid was dus niet uitgesloten, dat het vitamine E zelf ook als anti-oxydant werkzaam is. Dat dit inderdaad het geval is, werd aangetoond door Olcott

en Emerson (47), die vonden dat de zuivere natuurlijke tocopherolen als anti-oxydantia tegenover reuzel werkzaam waren.

We zien hieruit, dat de stabiliteit van het vitamine E in oliën afhangt van het ransig worden der olie en dat men dus door toevoeging van anti-oxydantia in staat is de stabiliteit van het vitamine E te verhoogen.

E. *Isoleering der zuivere vitamine E-componenten (tocopherolen).*

Tot 1936 was men er niet in geslaagd het vitamine E in kristallijne toestand te bereiden of kristallijne derivaten er van te isoleren. Alle pogingen daartoe waren vruchteloos gebleven, totdat het in 1936 aan de beiden Emersons (17), medewerkers van Evans, gedurende hun verblijf in het laboratorium van Windaus in Göttingen gelukte om kristallijne esters (allophanaten) van twee vitamine E-factoren te bereiden.

Als eerste derivaat werd een allophanaat met smeltpunt 159—160° C geïsoleerd, waaruit door verzeeping een lichtgele olie werd verkregen. Deze olie bezat vitamine E-werking in een dosis van 3 mg en werd door de ontdekkers α -tocopherol genoemd (tocos = geboorte; phero = dragen; -ol wijst op hydroxylgroep). Uit de moederloog van het eerste kristallisatieproduct werd nog een tweede allophanaat verkregen met smeltpunt 138° C, dat na verzeeping de tweede vitamine E-factor, het β -tocopherol leverde, eveneens een olie, die echter minder biologisch actief was dan α -tocopherol.

Dit resultaat was een stap verder in de geschiedenis van het vitamine E-onderzoek. Aan de hand van de analyses door verestering tot het allophanaat en het p-nitrophenylurethaan werd voor het α -tocopherol de formule $C_{29}H_{50}O_2$ opgesteld. Het α -tocopherylallophanaat werd later door Emerson en medewerkers (48) ook uit katoenzaadolie geïsoleerd. Verschillende onderzoekers zijn er na de ontdekking der Emersons in geslaagd de beide tocopherolen uit tarwekiemolie af te zonderen.

Het α -tocopherylallophanaat werd geïsoleerd door Moss en Drummond (31) met smeltpunt 158.5—159.5° C en door Karrer en Salomon (49) met smeltpunt 159—160° C. Het β -tocopherylallophanaat werd geïsoleerd door Todd en medewerkers (50) met smeltpunt 143.5—144.5° C, Moss en mede-

werkers (51) met smeltpunt 145—146° C, John (52) met smeltpunt 146—147° C, Karrer en Salomon (49) met smeltpunt 143—144° C en door Moss en Drummond (31) met een smeltpunt 144.5—145.5° C.

Uit deze waarden zien we, dat het smeltpunt van het β -tocopherylallophanaat van de Emersons lager was dan dat der andere onderzoekers. In een latere publicatie van Emerson en medewerkers (53) werd dan ook een hoogere waarde opgegeven, namelijk 144—146° C.

Moss en Drummond (31) trachtten beide allophanaten uit een tarwekiemolieconcentraat te isoleren, dat volgens de chromatographische methode uit de olie was bereid (dus zonder verzeeping). Hierbij konden geen kristallijne allophanaten worden verkregen, hetgeen mogelijk te wijten was aan de aanwezigheid van vetten in het concentraat. Uit spectroscopische onderzoekingen van Moss en Drummond bleek, dat er wel allophanaten waren gevormd. Na verzeeping van het concentraat konden hieruit kristallijne allophanaten bereid worden. Hierbij werd gevonden, dat het α -tocopherylallophanaat zwak optisch actief was, $[\alpha]_D^{25} = +4.8^\circ$, terwijl het door de Emersons verkregen allophanaat geen draaiing vertoonde. Moss en Drummond veronderstelden, dat het in de olie aanwezige optisch actieve α -tocopherol door behandeling met loog racemisatie ondergaat en dat dit laatste bij de verzeeping van hun concentraat in mindere mate het geval was dan bij directe verzeeping der olie (Emersons). Het door Karrer en medewerkers (54) genoemde neo-tocopherol (uit tarwekiemolie verkregen) en het door John (52) genoemde cumo-tocopherol (eveneens uit tarwekiemolie) zijn identiek gebleken (55) met het door de Emersons genoemde β -tocopherol. Het α - en het β -tocopherol vertoonden groote overeenkomst in chemische eigenschappen en later is dan ook gebleken, dat het homologen waren (zie pag. 29). Wat betreft hun chemische eigenschappen bleken deze bijna zonder uitzondering overeen te komen met die, welke reeds eerder zijn beschreven bij het vitamine E in concentraten. De hoeveelheden α - en β -tocopherylallophanaat, die men uit tarwekiemolie heeft geïsoleerd, zijn variabel en bedragen hoogstens 1 g per kg olie. Meermalen is gevonden, dat de onderlinge verhouding der beide allophanaten zeer wisselend is, een feit, dat mogelijk aan de herkomst

der olie te wijten is (75). Uit de vorming van allophanaten in het concentraat volgens Moss en Drummond bereid (zonder verzeeping) blijkt, dat de tocopherolen geheel of gedeeltelijk in vrijen toestand (onveresterd) in de olie voorkomen. Dit feit is later eveneens geconstateerd bij de chemische bepaling der tocopherolen (zie hoofdstuk VI).

Een derde biologisch werkzame vitamine E-factor, het γ -tocopherol (smpt. van het allophanaat 138—140° C), is uit katoenzaadolie bereid (Emerson en medewerkers (48, 53), Olcott en Emerson (47), zie verder onder G).

F. Constitutie bepaling der tocopherolen.

Door de juist genoemde onderzoekingen was gebleken, dat het α -tocopherol de formule $C_{29}H_{50}O_2$ had, terwijl er in het molecule een hydroxylgroep aanwezig was. Het tweede zuurstofatoom in het molecuul bleek indifferent.

Bij vergelijking met andere natuurproducten heeft men gedacht aan een verwantschap met sitosterine ($C_{29}H_{50}O$), doch bij het onderzoek van de absorptiespectra van α -tocopherol en sitosterine bleek een belangrijk verschil tusschen beide spectra te bestaan. Het spectrum van α -tocopherol heeft een maximum bij 294 $m\mu$, dat van sitosterine bij 190 $m\mu$. Bovendien zijn de spectra van sterinen en hun esters (b.v. acetaten) vrijwel hetzelfde, in tegenstelling met die van α -tocopherol en α -tocopherylacetaat.

Naar aanleiding van het maximum bij 294 $m\mu$ nam Windaus (56), in analogie met bekende verbindingen, de aanwezigheid van 3 geconjugeerde dubbele bindingen in het molecule aan. Aangezien de formule in vergelijking met een aliphatischen alcohol 10 waterstof atomen minder bevat, moet het molecule bij aanwezigheid van 3 dubbele bindingen 2 ringsystemen bevatten.

We zullen zien, dat ook bij de verdere onderzoekingen naar de constitutie van het α -tocopherol het absorptiespectrum zeer belangrijke aanwijzingen heeft gegeven. John (52) vond bij vergelijking der absorptiespectra van α -tocopherol en phenolen een zekere overeenstemming, waarbij bleek, dat tusschen esters van α -tocopherol en van phenolen deze overeenstemming eveneens bestond. Vóór phenolstructuur pleitte ook het feit, dat esters van phenolen

en van α -tocopherol minder aantastbaar zijn voor oxydatiemiddelen dan de niet-veresterde verbindingen. Tegen het aannemen van phenolstructuur pleitte echter het feit, dat de tocopherolen noch de gebruikelijke kleurreacties geven, noch zure eigenschappen bezitten.

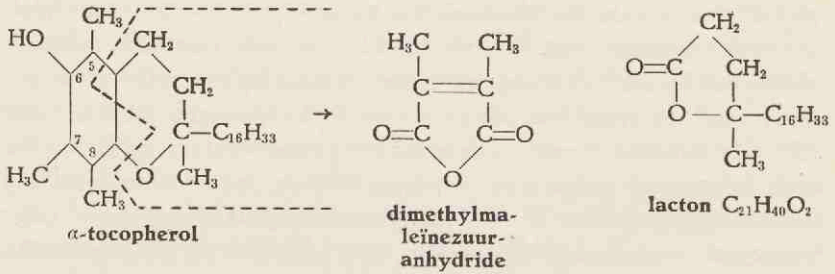
Een belangrijke stap verder in het inzicht der constitutie van de tocopherolen werd door *Fernholz* (57) gedaan. Hij vond, dat bij thermische ontleding van α -tocopherol bij 350° C een sublimatieproduct ontstond, dat tetramethylhydrochinon bleek te zijn. Ongeveer terzelfder tijd (onafhankelijk van *Fernholz*) verkregen *McArthur* en *Watson* (58) uit α -tocopherol door dehydroëering met selenium bij 300 — 330° C een kristallijn product dat als tetramethylchinon werd geïdentificeerd. Bij de thermische ontleding van β -tocopherol ontstond trimethylhydrochinon (*John* (52), *Bergel* en medewerkers (59)).

Naar aanleiding van deze vondsten meenden *Fernholz*, *John* en anderen, dat α - en β -tocopherol mono-alkylaethers waren van tetra- en trimethylhydrochinon, onder meer gebaseerd op het feit, dat dergelijke aethers bij thermische ontleding ook tetra- en trimethylhydrochinon gaven. In verschillende laboratoria werd een aantal van dergelijke aethers synthetisch bereid en hun eigenschappen met die der tocopherolen vergeleken. Naast de genoemde overeenstemming bij thermische ontleding was b.v. de onoplosbaarheid in alkali ook een eigenschap, die de aethers en de tocopherolen gemeen hadden. Doch spoedig bleken bezwaren tegen een aetherstructuur der tocopherolen te bestaan. Door vergelijking der absorptiespectra bleek n.l., dat er een duidelijk verschil tusschen de tocopherolen en de synthetische aethers bestond. Terwijl α -tocopherol een maximum van absorptie bij 294 $m\mu$ vertoonde, was dit voor een aether, met ongeveer hetzelfde moleculairgewicht, bij 280 — 285 $m\mu$ gelegen, terwijl bovendien de extinctie van het maximum bij den aether veel kleiner was (*Fernholz* (18), *John* (60)). Meerdere bezwaren tegen een aetherstructuur der tocopherolen kwamen aan het licht toen gevonden werd, dat α -tocopherol door zilvernitraat veel sneller geoxydeerd werd dan de aethers, terwijl de ontstane oxydatieproducten een groot onderscheid vertoonden. Bij deze oxydatie van α -tocopherol ontstond een chinon met hetzelfde aantal koolstofatomen als het α -toco-

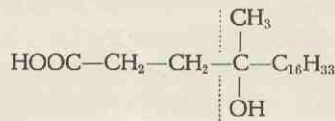
pherol, terwijl de aethers bij deze oxydatie gesplitst werden in tri- of tetramethylchinon en den alcohol van de alkylgroep van den aether (John (61), K a r r e r en medewerkers (55)). Bovendien vond K a r r e r, dat uit α -tocopherylallophanaat bij verhitting met een joodwaterstofzuur-ijsazijn mengsel bij 150° C een koolwaterstof ontstond met formule $C_{29}H_{50}$, waarbij dus geen splitsing van het molecule had plaats gevonden, zooals bij een aetherstructuur te verwachten was. Van de zijde van M o s s en zijn medewerkers (51, 62) kwamen eveneens bezwaren tegen aetherstructuur, waarbij deze auteurs op grond van metingen van de oppervlakte-spreiding veronderstelden, dat in het tocopherolmolecule 3 of meer ring-systemen voorkwamen (zie echter ook (31)). B e r g e l en medewerkers (63) vonden verschillen tusschen de absorptiespectra der aethers en α -tocopherol en veronderstelden voor α -tocopherol een oxychromaan- of oxycumaraanstructuur, waarbij dus het tweede zuurstofatoom van het α -tocopherolmolecule in een ringsysteem aanwezig was. Een door hen bereid oxycumaraanderivaat vertoonde in reductievermogen, spectrum en gedrag bij thermische ontleding veel overeenkomst met α -tocopherol.

Opnieuw was het aan de onderzoekingen van F e r n h o l z (18) te danken, dat verdere opheldering van de structuur der tocopherolen werd verkregen. Door inwerking van chroomzuur op α -tocopherol gelukte het F e r n h o l z als afbraakproducten dimethylmaleïnezuuranhydride en een optisch actief lacton $C_{21}H_{40}O_2$ te isoleeren. Het dimethylmaleïnezuuranhydride was afkomstig van de aromatische ring van het α -tocopherolmolecule, het lacton van het aliphatische deel van het molecule. Dit lacton was afkomstig van een oxyzuur $C_{21}H_{42}O_3$, waarvan een kristallijn derivaat kon worden verkregen. Aangezien dit oxyzuur gemakkelijk overging in het lacton, was het dus een γ - of een δ -oxyzuur. Een δ -oxyzuur is minder waarschijnlijk, omdat dan een koolstof-zuurstofring met 7 atomen aanwezig zou moeten zijn. De hydroxylgroep van het oxyzuur moest tertiair zijn aangezien deze zich niet of moeilijk liet oxydeeren en moeilijk te veresteren bleek. De vorming van een γ -oxyzuur sluit dan tevens de mogelijkheid eener cumaraanstructuur uit, want in dat geval zou een β -oxyzuur ontstaan zijn, terwijl een chromaanstructuur een γ -oxyzuur levert.

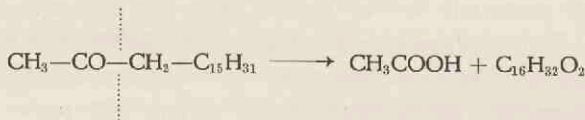
Schematisch kon deze oxydatie van het α -tocopherol als volgt worden voorgesteld, waarbij F e r n h o l z chromaanstructuur aannam:



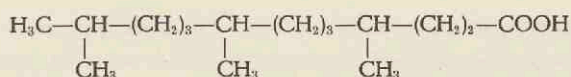
Bij oxydatie van α -tocopherylacetaat met een chroomzuur-azijnzuurmengsel onder koken en afdestilleeren der vluchtige producten, werden de volgende producten geïsoleerd: aceton, diacetyl, dimethylmaleïnezuuranhydride, een keton met formule $C_{18}H_{36}O$ en een verzadigd mono-carbonzuur met formule $C_{16}H_{32}O_2$. Het keton was ontstaan door verdere oxydatie van het reeds vermelde oxyzuur $C_{21}H_{42}O_3$:



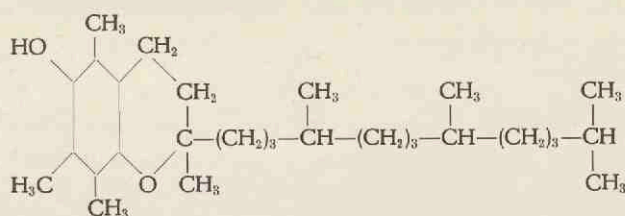
terwijl het zuur $C_{16}H_{32}O_2$ weer als afbraakproduct van het keton $C_{18}H_{36}O$ kon worden beschouwd:



Het gevormde zuur $C_{16}H_{32}O_2$ was geen palmitinezuur en aan de hand van de bepaling van het aantal C—CH₃-groepen meende F e r n h o l z de volgende structuur aan dit zuur te moeten toekennen:



Aan de hand van al deze gegevens stelde F e r n h o l z de volgende formule voor α -tocopherol op, waarbij hij voor de aliphatische zijketen isopreenstructuur aannam, een veronderstelling, gebaseerd op het voorkomen van analoge structuur bij natuurstoffen:



α -tocopherol ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$)

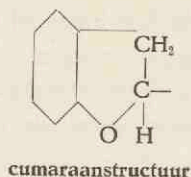
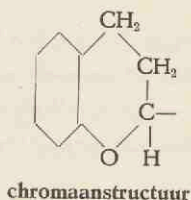
G. Synthese der tocopherolen.

Zeer kort na F e r n h o l z's onderzoekingen werd door K a r r e r en zijn medewerkers (19) het α -tocopherol synthetisch bereid door condensatie van trimethylhydrochinon met phytylbromide bij aanwezigheid van watervrij zinkchloride. Deze vlot verloopende reactie leverde nagenoeg in quantitatief rendement het *dl*- α -tocopherol. Het allophanaat hiervan smolt bij 172°C , tegenover dat van natuurlijk α -tocopherol bij 160°C . Het verschil in smeltpunt bleek te verklaren uit het feit, dat het synthetische *dl*- α -tocopherol bij splitsing in zijn optisch actieve componenten een *d*-vorm leverde, waarvan de ester met 3-broom-*d*-kamfersulfochloride identiek was met die van natuurlijk α -tocopherol (64) (deze zaak is echter gebleken gecompliceerder te zijn, zie hiervoor K a r r e r en medewerkers (65)).

De synthese van α -tocopherol is ook uitgevoerd door B e r g e l en medewerkers (66, 67) (condensatie van trimethylhydrochinon met phytol) en door S m i t h en medewerkers (68) (uit trimethylhydrochinon en phytadiëen).

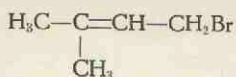
Zooals we gezien hebben nam F e r n h o l z voor α -tocopherol een chromaanstructuur aan. Hiertegen werd door K a r r e r (19,

55, 64) stelling genomen, volgens hem was cumaraanstructuur minstens even waarschijnlijk.



Karrer (19) achtte het o.a. niet uitgesloten, dat het γ -oxyzuur van Fernholz ontstaan was door omlegging uit een β -oxyzuur (dit laatste was dan afkomstig van een cumaraanstructuur). Deze omlegging zou dan hebben plaats gevonden onder invloed van het azijn-zuur, dat werd gebruikt bij de oxydatie volgens Fernholz. Emerson (69) bewees echter, dat hetzelfde γ -oxyzuur uit α -tocopherol ontstond door oxydatie met kaliumpermanganaat. Verdere argumenten van Karrer ten gunste van een cumaraanstructuur bestonden in het feit, dat allylbromide $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2\text{Br}$ bij condensatie met trimethylhydrochinon een cumaraanderivaat leverde (64, 70). Uit crotylbromide $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2\text{Br}$ en trimethylhydrochinon ontstonden zoowel een chromaan- als een cumaraanderivaat (71).

Het bleek echter, dat γ : γ -dimethylallylbromide



(68, 71) bij condensatie met trimethylhydrochinon een chromaanderivaat gaf (men kan phytylbromide beschouwen als een digesubstitueerd γ : γ -allylbromide). Tevens bleek, dat het oxydatieproduct van α -tocopherol, het α -tocopherylchinon, een tertiaire hydroxylgroep bevatte (70) (geen ketonvorming met aluminiumisobutylaat). Deze feiten deden Karrer besluiten eveneens chromaanstructuur voor α -tocopherol aan te nemen.

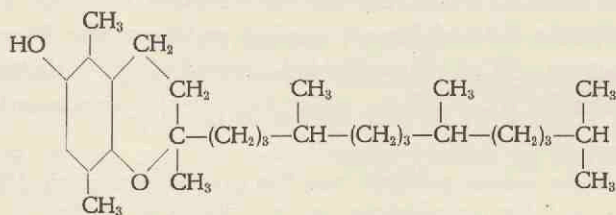
Verdere bewijzen voor de chromaanstructuur van α -tocopherol werden geleverd door John en medewerkers (60, 61, 72, 73), die eveneens vonden, dat het α -tocopherylchinon een tertiaire hydroxylgroep bevatte, terwijl de studie der absorptiespectra van de allo-

phanaten van synthetische chromaan- en cumaraanderivaten ten gunste eener chromaanstructuur van α -tocopherol uitviel.

De synthese van het β -tocopherol is door K a r r e r en F r i t z s c h e (74) uitgevoerd. De feiten, dat β -tocopherol zeer nauw verwant in chemische eigenschappen met α -tocopherol is; dat β -tocopherol bij thermische ontleding trimethylhydrochinon geeft, terwijl β -tocopherol bij chroomzuur-oxydatie hetzelfde C_{21} -lacton leverde als α -tocopherol (E m e r s o n (75)), waren het bewijs, dat α - en β -tocopherol homologen zijn. De synthese van het β -tocopherol werd uitgevoerd door condensatie van dimethylhydrochinon met phytylbromide. Daar er echter drie isomere dimethylhydrochinonen bestaan, was het noodzakelijk elk dezer isomeren te condenseren met phytylbromide. Het bleek evenwel bij deze condensaties, dat de reactie hier gecompliceerder verliep dan bij de synthese van α -tocopherol. Kregen wij bij de synthese van α -tocopherol dit laatste met vrijwel quantitief rendement, zoo kreeg men bij de condensatie der dimethylhydrochinonen naast het gewenschte reactieproduct ook producten, die ontstonden uit 1 molecule dimethylhydrochinon met 2 moleculen phytylbromide, welke min of meer bezwaarlijk van de mono-substitutieproducten te scheiden waren.

Om dit bezwaar te vermijden bleek het beter de synthese uit te voeren met phytol in plaats van phytylbromide en mierenzuur als condensatiemiddel te gebruiken. J a c o b en medewerkers (76) vermeden het gemelde bezwaar door de synthese uit te voeren met de mono-benzoaten der dimethylhydrochinonen en het condensatieproduct later te verzeepen.

Door vergelijking van de mengsmeltpunten van de allophanaten en p-nitrophenylurethanen der 3 verkregen condensatieproducten met die van natuurlijk β -tocopherol kon K a r r e r (77) de volgende formule voor β -tocopherol opstellen:



β -tocopherol ($C_{28}H_{48}O_2$)

Wat betreft het γ -tocopherol, dat beschouwd werd als een isomeer van β -tocopherol (E m e r s o n (75) vond bij γ -tocopherol door oxydatie met chroomzuur eveneens het reeds eerder besproken C_{21} -lacton en bij thermische ontleding van γ -tocopherol het trimethylhydrochinon), werd door K a r r e r en zijn medewerkers (78) het vermoeden geuit, dat γ -tocopherol onzuiver β -tocopherol was. Bij bepaling der mengsmeltpunten van een door K a r r e r geïsoleerd γ -tocopherylallophanaat en van een aan hem door E v a n s beschikbaar gesteld preparaat met de allophanaten van ieder der drie isomere β -tocopherolen, bleek alleen het mengsmeltpunt met het β -tocopherylallophanaat zelf geen depressie te geven. Hieruit besloot K a r r e r, dat het γ -tocopherol een iets onzuiver β -tocopherol was. *

H. *Ultraviolet absorptiespectrum van de tocopherolen.*

Reeds eenige malen is bij de bespreking der onderzoekingen over het vitamine E gewag gemaakt van het absorptiespectrum der tocopherolen en andere verbindingen, waarbij gewezen werd op de belangrijke rol, die deze spectra gespeeld hebben bij de opheldering der constitutie. Hier volgt de geschiedenis van het onderzoek van het spectrum van vitamine E in chronologische volgorde:

De eerste onderzoekingen over het spectrum zijn afkomstig van E v a n s en B u r r (12), die vonden, dat vitamine E-concentraten sterke algemeene absorptie in het ultraviolet vertoonden zonder specifieke banden. B o w d e n en M o o r e (79, 32) vonden in tarwekiemolieconcentraten een sterke toeneming der absorptie vanaf 302 $m\mu$ met een maximum bij 255 $m\mu$, terwijl verder in het ultraviolet algemeene absorptie optrad vanaf 244 $m\mu$.

Door vergelijking tusschen de intensiteit der absorptie en de biologische werkzaamheid van de concentraten, die aan verschillende chemische behandelingen werden onderworpen, kwamen zij tot de conclusie, dat er evenredigheid bestond tusschen de intensiteit der absorptie bij 285—320 $m\mu$ en de biologische werkzaamheid.

* Volgens een recente publicatie van E m e r s o n en S m i t h (128) heeft γ -tocopherol de beide methylgroepen in de aromatische ring op de plaatsen 7 en 8.

Martin en medewerkers (80) vonden bij een fractie, die door hoogvacuumdestillatie van een vitamine E-concentraat was verkregen en welke fractie werkzaam was in een dosis van 16 mg, een factor $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 27$ (bij 294 m μ).

Olcott (33, 81) vond een absorptieband met maximum bij 294 m μ in concentraten van tarwekiemolie en katoenzaadolie, doch deze band was eveneens aanwezig in een biologisch onwerkzaam palmolieconcentraat. Olcott besloot hieruit, dat deze absorptieband niets te maken had met vitamine E, een meening, die later gebleken is foutief te zijn. In een latere publicatie handhaafde Olcott (37) niettemin deze meening, mede in verband met het feit, dat hij bij gefractioneerde destillatie van tarwekiemolieconcentraten producten verkreeg, die bij gelijke absorptie-intensiteit ongelijke biologische werkzaamheid hadden (hierbij is mogelijkterwijs een ongelijke verhouding van α - en β -tocopherol in de producten de oorzaak).

Drummond en medewerkers (26, 29) vonden bij een onderzoek van concentraten in de biologisch meest werkzame fracties een maximum bij 294 m μ en een minimum bij 267 m μ . Bij een verzuiverd preparaat vonden zij $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 59$ (294 m μ). Wel vond Drummond, dat werkzame preparaten steeds een maximum bij 294 m μ vertoonden, doch tevens, dat sommige fracties minder werkzaam waren dan men volgens de intensiteit der absorptie zou verwachten. De eerste onderzoeken, waarbij gebruik gemaakt werd van de zuivere tocopherolen, geschieden door Evans en medewerkers (17).

Bij de bepaling van het absorptiespectrum der zuivere tocopherolen vonden zij bij α -tocopherol een dubbel maximum (in hexaan) bij 292 en 298 m μ ; $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 90 \pm 10$ (298 m μ).

Later (53) werd deze waarde voor α -tocopherol gecorrigeerd en vonden zij $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 73$ bij 298 m μ (octaan).

Moss en Drummond (31) vonden voor α -tocopherol eveneens een dubbel maximum in hexaan met de waarde $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 80 \pm 2$ (292 en 298 m μ). In aethylalcohol vonden zij één maximum $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 70 \pm 2$ (292 m μ).

Voor β -tocopherol in aethylalcohol werd een maximum bij 295 $m\mu$ gevonden met $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 82 \pm 2$.

Verdere bepalingen waren afkomstig van Todd en medewerkers (50), die voor β -tocopherol in aethylalcohol de waarde $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 87$ (295 $m\mu$) en van Moss en medewerkers (51), die voor β -tocopherol $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 80$ (294—295 $m\mu$) in aethylalcohol vonden.

Voor synthetisch *dl*- α -tocopherol vonden Werder en medewerkers (82) $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 69$ (290 $m\mu$), terwijl Karrer en medewerkers (19) $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 76$ (294 $m\mu$) vonden.

Volgens Moore en Rajagopal (83) is voor α -tocopherol $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 77$ (294 $m\mu$).

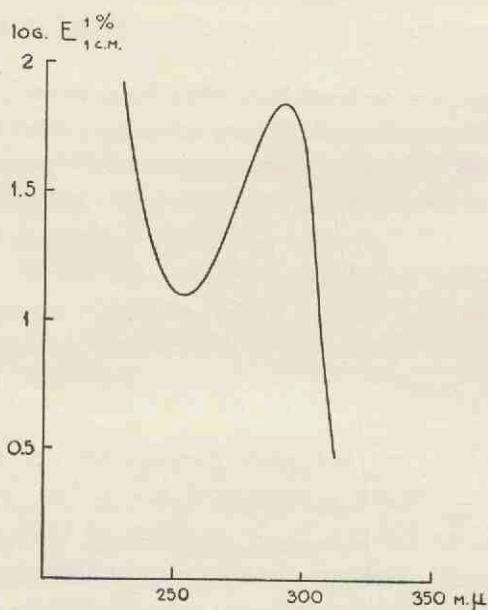


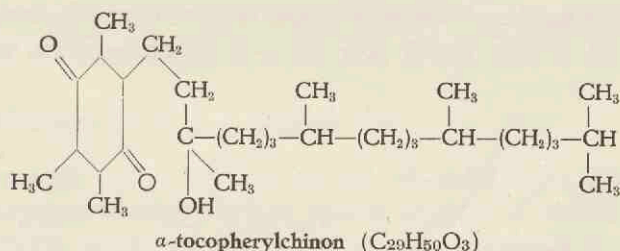
Fig. 1. Absorptiespectrum van *dl*- α -tocopherol.

In aansluiting hierbij is gebleken, dat bij inwerking van ultraviolet licht op vitamine E, hetzij in concentraten, hetzij als de zuivere tocopherolen, het vitamine E vernietigd wordt (Drummond en

medewerkers (26), Karrer en Keller (84), Furter en Meyer (22)).

I. Oxydatieproducten der tocopherolen.

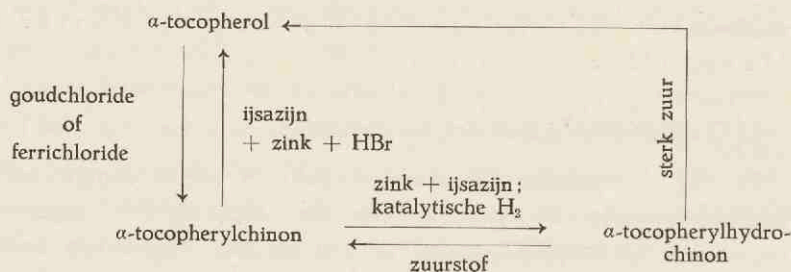
In het voorgaande literatuuroverzicht is reeds eenige malen gesproken over de gevoeligheid der tocopherolen tegenover oxydantia. De oxydatieproducten zijn nu niet alleen van belang geweest voor de structuurbepaling der tocopherolen, maar ook voor de later te bespreken chemische bepalingsmethoden, die allen op de oxydeerbaarheid van het tocopherolmolecule berusten. Door oxydatie van α -tocopherol met ferrichloride, zilvernitraat of goudchloride ontstaat het α -tocopherylchinon, $C_{29}H_{50}O_3$ (Karrer en medewerkers (70), Moss en medewerkers (51, 62), John (61), John en medewerkers (73)).



Zoals reeds eerder werd beschreven bevat het α -tocopherylchinon een tertiaire hydroxylgroep daar het zich niet laat omzetten met aluminiumisobutylaat tot een keton, wat dan ook één der redenen was, dat Karrer zich bij de chromaanstructuur van α -tocopherol heeft aangesloten.

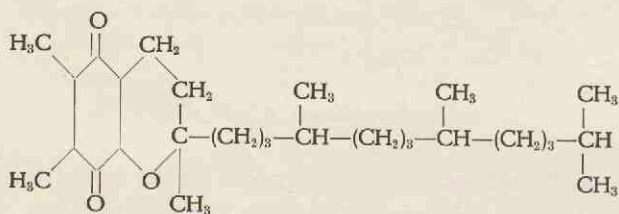
Het α -tocopherylchinon laat zich door reductie met waterstof en palladium of met zink en ijszijn omzetten in het α -tocopherylhydrochinon, een stof, die buitengewoon oxydabel is en door luchtzuurstof snel overgaat in het chinon (73). We zien dus, dat tusschen chinon en hydrochinon een oxydatie-reductiesysteem bestaat.

Het α -tocopherylchinon kan door verhitting met zink en ijszijnbroomwaterstofzuur weer overgaan in het α -tocopherol, terwijl het hydrochinon door verwarming met sterke zuren weer kan overgaan in het α -tocopherol. Deze omzettingen kunnen als volgt schematisch worden weergegeven:



Het β -tocopherol gedraagt zich bij oxydatie analoog aan het α -tocopherol. Zilvernitraat is minder geschikt voor de omzetting van α -tocopherol in α -tocopherylchinon, omdat bij de inwerking van alcoholisch zilvernitraat de oxydatie gemakkelijk verder gaat, waarbij een rood gekleurde verbinding, het α -tocopherolrood, ontstaat (John en Emte (85)), hetgeen eveneens ontstaat door verhitting van α -tocopherol met alcoholisch salpeterzuur (John (52)).

John en Emte gaven voor het α -tocopherolrood de volgende formule:



α -tocopherolrood.

Voor onderzoeken over dergelijke oxydatieproducten van eenvoudige chromaanverbindingen zie Karrer en medewerkers (71, 78), John en medewerkers (73) en Smith en medewerkers (127).

HOOFDSTUK III.

BIOLOGIE VAN HET VITAMINE E.

De bespreking van de biologie van het vitamine E zal zeer beknopt geschieden. We zullen ons hierbij beperken tot de rat, die, vanaf de ontdekking van het vitamine E tot heden toe, het gebruikelijke proefdier voor de biologische onderzoeken over het vitamine E is geweest en waarbij het verschijnsel der vitamine E-deficiëntie het best bestudeerd is.

A. *Vitamine E en de vrouwelijke rat.*

Vrouwelijke ratten worden op een vitamine E-vrij diët steriel. De ovaria zijn niet beschadigd, terwijl ovulatie en oestrus normaal zijn, evenals paring en implantatie van het bevruchte ei. In plaats van een normaal zwangerschapsbeloop sterft de foetus echter vroegtijdig af en wordt geresorbeerd. Dit is het beeld eener volledige E-avitaminose.

Indien de vrouwelijke rat nog niet voldoende lang op een vitamine E-vrij diët is geweest verloopt de zwangerschap normaal; de jonge dieren komen normaal ter wereld, doch een groot percentage er van sterft spoedig. Soms ook zien we, dat bij de jongen verlamingsverschijnselen optreden, die bij tijdig toedienen van vitamine E kunnen voorkomen worden (86), doch in latere stadia moeilijk te genezen zijn (87, 88).

B. *Mannelijke ratten.*

Vitamine E-gebrek bij mannelijke ratten vertoont zich het eerst bij de spermatogenese. De spermïen verliezen eerst hun beweeglijkheid en als gevolg hiervan de geschiktheid tot bevruchten. In latere

stadia vertoonen de spermiën degeneratieverschijnselen en na 8—10 maanden worden ze niet meer gevormd. Dan is degeneratie van de testis opgetreden. In tegenstelling met de vrouwelijke rat zijn bij de mannelijke rat slechts de aanvangsstadia van de gevolgen eener E-avitaminose te herstellen door vitamine E-toediening; in latere stadia is dit niet meer mogelijk.

C. *Veterinaire toepassing van het vitamine E.*

Behalve bij de rat heeft men ook bij andere dieren den invloed van het vitamine E (in den vorm van tarwekiemolie) bij steriliteit onderzocht, waarbij de onderzoekingen zich grootendeels op veterinair gebied bewegen (huisdieren). *Vogt-Möller* (89) was de eerste, die het vitamine E bij steriliteit van runderen toepaste en zijn tot op heden verkregen resultaten zijn over het algemeen succesvol te noemen, evenals die van andere onderzoekers op dit gebied (runderen, paarden en varkens).

Een andere belangrijke toepassing van de vitamine E-toediening bij huisdieren is die bij infectie met *Bacillus abortus* Bang. De resultaten, die hierbij met vrij groot materiaal (runderen) zijn verkregen, zijn zeer hoopvol. Volgens *Lange* (90) verhoogt het toedienen van vitamine E de weerstand der dieren tegen deze infectie, zonder echter de virulentie van de infectie te beïnvloeden.

Ook bij hoenderen heeft het vitamine E toepassing gevonden; bij kippen is gebleken, dat de aanwezigheid van het vitamine in het voeder van belang is voor de broeduitkomsten (*Ender* (91)). Wanneer voldoende vitamine E in het voeder aanwezig is, heeft extra toediening er van echter geen invloed op de broeduitkomsten (*Dols* (92)). Voor literatuur op dit gebied zie *Vogt-Möller* (89), *Karrer* (93), *Grandel* (23) en *Herschel* (129).

D. *Biologische ijking van het vitamine E.*

Het al of niet werpen van levende jongen door zwangere ratten is de grondslag voor het bepalen van het vitamine E langs biologischen weg, een methode, die reeds door de grondleggers van het vitamine E-onderzoek, *Evans* en *Burr*, werd toegepast. Aangezien er geen internationaal erkende methode voor de biologische ijking bestaat, is het dikwijls lastig de resultaten van verschillende

onderzoekers te vergelijken, omdat deze veelal verschillende criteria aanleggen. De te onderzoeken stof moet daarom steeds vergeleken worden met een standaardpreparaat, waarvoor geen internationale eenheid bestaat. Vroeger nam men als standaardpreparaat tarwekiemolie, dat echter geen constant vitamine E-gehalte bezit. Sedert de synthese van *dl*- α -tocopherol kan men dit of nog beter het *dl*- α -tocopherylacetaat *) nemen, dat stabiel is. Sommige onderzoekers (B a c h a r a c h (94)) nemen als vergelijkingspunt bij de biologische bepaling de dosis, die bij 50 % der dieren de steriliteit opheft, anderen (K a r r e r e n D e m o l e (95)) bepalen de minimum dosis, die bij 80—100 % der dieren de steriliteit opheft.

Voor synthetisch *dl*- α -tocopherol zijn de hoeveelheden, volgens beide methoden bepaald, resp. 1.2 en 3 mg, voor β -tocopherol resp. 1.9 en 6—10 mg.

E. Chemische structuur en biologische werkzaamheid.

1. Homologen van α -tocopherol.

Zoals we reeds zagen, is het β -tocopherol, dat 2 methylgroepen in de aromatische ring van het tocopherolmolecule heeft, minder werkzaam dan het α -tocopherol (dat 3 methylgroepen in de aromatische ring bezit).

In verband hiermede verdient een publicatie van J a c o b e n medewerkers (96) de aandacht. Dezen vonden, dat één der isomeren van het β -tocopherol in een dosis van 3 mg de steriliteit ophief bij 100 % der dieren (K a r r e r e n medewerkers (65) hadden voor dit isomeer een waarde van 10 mg gevonden). Dit verschil is des te merkwaardiger, omdat J a c o b e n medewerkers voor β -tocopherol en het andere isomeer vrijwel dezelfde waarden vonden als K a r r e r. We zien dus, dat de quantitative werkzaamheid der α - en β -tocopherolen nog niet geheel vast staat. Een synthetisch tocopherol met 1 methylgroep in de aromatische ring was in een dosis van 40 mg onwerkzaam (77). Bij vervanging van 1 of 2 methylgroepen door aethylgroepen werden producten verkregen, die in doses van resp. 16 en 10 mg werkzaam waren (97,

*) Onder den naam „Ephynal” door de firma Hoffmann-La Roche in den handel gebracht.

98). Een dehydro- α -tocopherol was volgens K a r r e r en medewerkers (99) werkzaam in een dosis van 6 mg.

2. Esters van α -tocopherol.

Van een aantal esters van het α -tocopherol (acetaat, propionaat, butyraat e.a.) werd gevonden, dat de biologische werkzaamheid hiervan niet ten achter staat bij het α -tocopherol zelf (100). Een phosphorzure-ester van α -tocopherol was ook ongeveer even werkzaam als het α -tocopherol (101).

3. *dl*- α -tocopherylchinon.

Terwijl een aantal onderzoekers (73, 82, 102) vonden, dat deze stof tot een dosis van 20 mg onwerkzaam was, vonden E m e r s o n en medewerkers (103), dat het chinon vrijwel even werkzaam was als het α -tocopherol zelf.

K a r r e r en G e i g e r (102) hebben echter aangetoond, dat bij de bereidingswijze van het chinon volgens E m e r s o n (uit *dl*- α -tocopherol met ferrichloride) slechts gedeeltelijke oxydatie van het *dl*- α -tocopherol plaats vond (E m e r s o n beweerde echter dat zijn chinon géén tocopherol bevatte).

Evenals bij vorige onderzoeken vond K a r r e r bij zorgvuldige bereiding van het chinon, dat dit onwerkzaam was in een dosis van 25 mg. Dit werd bevestigd door W r i g h t en D r u m m o n d (104) (in een dosis van 10 mg).

Niettegenstaande de uitkomsten van E m e r s o n is het dus vrij zeker, dat het chinon onwerkzaam is (zie ook E n g e l (105) en G o l u m b i c (106)).

4. Verbindingen waarvan structuur verwant is aan die der tocopherolen.

Men heeft een groot aantal verbindingen gesynthetiseerd, zoowel chromaan- en cumaraanderivaten als aethers afgeleid van trimethylhydrochinon en andere hydrochinonen. Vergeleken met α - en β -tocopherol bezitten deze stoffen weinig of geen biologische E-werkzaamheid (W e r d e r en M o l l (107), W e r d e r en medewerkers (82), E v a n s en medewerkers (108, 109)).

Men kan in het algemeen zeggen, dat, met als uitgangspunt het α -tocopherol (dat het meest werkzaam is), vermindering van het aantal methylgroepen of vervanging hiervan door andere groepen

in de aromatische ring achteruitgang van de biologische werkzaamheid beteekent.

Eveneens van groot belang is de phytolrest in het molecule; bij vervanging door een andere groep gaat de werkzaamheid zeer sterk achteruit of verdwijnt. Dit is eveneens het geval bij verdwijning der chromaanstructuur (cumaraan- of aetherstructuur).

Over de werking van het α - of β -tocopherol in het organisme is nog niets bekend. De mogelijkheid zou kunnen bestaan, dat het oxydatie-reductiesysteem chinon-hydrochinon een rol speelt, ofschoon dit niet zeer waarschijnlijk is op grond van de feiten, dat 1° het chinon biologisch onwerkzaam is en dat 2° C u t h b e r t s o n en medewerkers (110) gevonden hadden, dat na toediening van groote doses *dl*- α -tocopherol aan ratten geen chinon in de organen werd gevonden.

HOOFDSTUK IV.

CHEMISCHE EN PHYSISCHE BEPALING DER TOCOPHEROLEN.

Inleiding.

Niettegenstaande de langdurige en kostbare biologische bepalingmethoden heeft het vitamineonderzoek een snelle ontwikkeling ondergaan. Niet zoodra was een vitamine als voedingsfactor ontdekt, of verscheidene onderzoekers zetten zich aan het werk om dit vitamine te isoleeren, te identificeeren en te synthetiseeren. Bij een dergelijk onderzoek waren steeds langdurige biologische bepalingmethoden noodig om vast te stellen, in hoeverre men door toepassing van chemische kunstgrepen erin geslaagd was het vitamine van het uitgangsmateriaal te concentreeren. Het is zeker niet overdreven om te zeggen, dat bij deze chemische onderzoekingen de meeste tijd werd besteed aan biologische bepalingen, terwijl men pas aan de hand van het resultaat hiervan verder kon komen.

Op een enkele uitzondering na (b.v. de reactie volgens *Carr* en *Price* (111) op vitamine A), zijn de chemische of fysische bepalingmethoden pas tot ontwikkeling gekomen, nadat men erin geslaagd was de vitamines in zuiveren toestand te verkrijgen. Dit is in zooverre niet te verwonderen, omdat men slechts dan pas een goede chemische bepalingmethode kan opstellen, wanneer men er zeker van is, dat alléén het vitamine zelf en geen andere stoffen, die b.v. in chemisch opzicht verwant zijn aan het vitamine en hiervan moeilijk te scheiden zijn, zooals in concentraten het geval kan zijn, de reactie geven of op gelijke wijze als het vitamine reageeren.

Het doel van een chemische bepalingmethode is de langdurige en kostbare biologische methodiek te omgaan. Chemische methoden zijn sneller, goedkooper en nauwkeuriger dan de biologische. Deze

voordeelen zijn duidelijk aan den dag getreden bij het bepalen van het vitaminegehalte van commercieele producten in den vorm van vitaminepreparaten.

Een ander belangrijk voordeel van de chemische methoden is hun veel grootere gevoeligheid. Hierdoor is men in staat geweest uitgebreide onderzoekingen te doen op physiologisch gebied, onderzoekingen, die met behulp van de biologische methode niet mogelijk zouden geweest zijn, omdat de aanwezige hoeveelheid vitamine hiervoor ontoereikend is.

De groote vlucht, die het onderzoek naar een avitaminose bij den mensch heeft genomen, is te danken aan de chemische bepalingsmethoden. Hiermede zijn wij b.v. in staat om in een hoeveelheid bloed, die men zonder bezwaar aan een patiënt kan onttrekken, een bepaling van het vitaminegehalte te doen.

Op één punt echter staan de chemische methoden ten achter bij de biologische:

De biologische werkzaamheid van een vitamine is ten nauwste verbonden met de chemische structuur er van. Kleine wijzigingen in deze structuur kunnen, zonder de chemische of physische eigenschappen van het molecule merkbaar te veranderen, ingrijpende wijzigingen in de biologische werkzaamheid ten gevolge hebben (zie b.v. hoofdstuk III).

Aangezien de chemische bepalingsmethoden berusten op bepaalde chemische en physische eigenschappen van het vitamine, zooals kleur, fluorescentie, reductievermogen of absorptie in het ultraviolet, is het in verband met het bovenstaande duidelijk, dat de chemische methode minder specifiek is dan de biologische.

Ter toetsing heeft men van vele producten het vitaminegehalte volgens beide methoden bepaald. De resultaten, die men hierbij heeft verkregen, kunnen in het algemeen bevredigend worden genoemd. Wel is echter gebleken, dat slechts die chemische methoden zich hebben kunnen handhaven, die de grootste specificiteit bezitten. Eveneens is het dikwijls noodzakelijk, om de extracten waarin men een chemische bepaling wil uitvoeren, door kunstgrepen b.v. verzeeping of adsorptie, te zuiveren van stoffen, die de reactie storen. De moeilijkheid blijft echter bestaan, dat men in vele gevallen deze storende stoffen en dus ook hun eigenschappen niet kent.

Bij het bepalen van het vitaminegehalte van fysiologisch materiaal langs chemischen weg is het echter dikwijls niet mogelijk, wegens het geringe gehalte, een biologische bepaling als contrôle uit te voeren. Het onderzoek heeft uitgewezen, dat ook in deze gevallen de chemische methoden meestal voldoende betrouwbaar zijn om een indruk te geven van het vitaminegehalte. Het is b.v. gebleken, dat onderzoekingen naar de vitamine-voorziening bij den mensch met behulp der chemische methoden een waardevolle mogelijkheid bieden om een inzicht hierin te krijgen (zie o.a. Wolff (112)).

Overzicht der physische en chemische bepalingsmethoden der tocopherolen.

In de literatuur zijn de volgende methoden bekend:

1. Physische methode, berustende op de bepaling der intensiteit van de absorptie in het ultraviolet.
2. Titratie met goudchloride volgens de potentiometrische methode.
3. Colorimetrische bepaling door oxydatie met alcoholisch salpeterzuur.

Physische methode.

Reeds eerder werd melding gemaakt van het absorptiespectrum van de tocopherolen en de verschillende onderzoekingen, die ten doel hadden een betrekking te vinden tusschen de intensiteit der absorptie en de biologische activiteit. Zooals reeds werd beschreven (zie hoofdstuk II), kon men na de isoleering en synthese der tocopherolen het absorptiespectrum definitief vastleggen.

Onder de onderzoekers, die veelvuldig gebruik van deze methode hebben gemaakt, dienen Drummond en medewerkers te worden genoemd. Recente onderzoekingen met behulp van de spectrophotometrische methode zijn uitgevoerd door Moore en Rajagopal (83) en door Cuthbertson en medewerkers (110). Deze laatsten maakten tevens gebruik van de methode om het tocopherol door oxydatie om te zetten in tocopherylchinon en hiervan de absorptie (bij 265 $m\mu$) te bepalen.

Afgezien van de vrij kostbare en tijdroovende methodiek is de

onzekerheid van de quantitative tocoferolbepaling langs spectrophotometrischen weg hierin gelegen, dat de aanwezigheid van stoffen, die eveneens in het ultraviolet absorbeeren, dikwijls aanleiding kan zijn tot storing of zelfs de bepaling onmogelijk kan maken. Wanneer wij bijvoorbeeld extracten hebben, waarin vitamine A naast tocoferol voorkomt, kan de veel sterkere absorptie van het vitamine A ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1600$ bij $328\text{ m}\mu$) veel hinder veroorzaken, daar α -tocopherol een veel lagere absorptie-intensiteit bezit ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 77$ bij $294\text{ m}\mu$).

Potentiometrische titratie met goudchloride.

Reeds vroeger deelden wij mede, dat α -tocopherol door oxydatie met zilver- of ijzerzouten (ferri) overgaat in het α -tocopherylchinon.

Karrer en medewerkers (70) vonden, dat α -tocopherol door een alcoholische ferrichlorideoplossing onvolledig geoxydeerd wordt, doch dat goudchloride zeer geschikt was om het α -tocopherol snel en quantitatief tot chinon te oxydeeren. Deze bepalingmethode, die door Karrer en Keller (20) werd uitgewerkt, geschiedt langs potentiometrischen weg. Men lost een hoeveelheid van 5—10 mg α -tocopherol op in ongeveer 250 cm^3 80 % aethylalcohol. Dit mengsel wordt op $\pm 50^\circ\text{ C}$ gehouden en hieraan wordt in kleine hoeveelheden uit een microburet een oplossing van 0.01 *n* goudchloride in aethylalcohol toegevoegd. Na iedere toevoeging van goudchloride wordt gewacht tot zich een evenwicht heeft ingesteld, waarna opnieuw goudchloride wordt toegevoegd, totdat tenslotte een overmaat aanwezig is. De geheele titratie wordt potentiometrisch uitgevoerd. Daar de potentialen zich langzaam instellen duurt een titratie ongeveer 3 uren.

Later hebben Karrer en Keller (113) bij de bepaling van het tocoferolgehalte in oliën het oplosmiddel gewijzigd, daar oliën in 80 % aethylalcohol zeer weinig oplosbaar zijn. Bij het bepalen in oliën werd als oplosmiddel 96 % aethylalcohol met benzol (5 : 1) gebruikt, waaraan wat lithiumchloride werd toegevoegd om de geleidbaarheid te verhoogen.

Voor verdere oplosmiddelen bij deze titratiemethode zie Grandel en Neumann (114).

Colorimetrische bepalingsmethode met alcoholisch salpeterzuur.

Deze methode, die afkomstig is van *Furter* en *Meyer* (22), berust op het reeds eerder door *John* gevonden feit, dat tocopherolen door koken met alcoholisch salpeterzuur een roode kleurstof vormen, door hem tocopherolrood genoemd. Deze reactie is door *Furter* en *Meyer* uitgewerkt tot een quantitative bepaling en wordt als volgt uitgevoerd:

Men gaat uit van 1—5 mg stof, die minstens 0.3 mg tocopherol moet bevatten en die opgelost is in 5 cm³ absoluten aethylalcohol. De oplossing bevindt zich in een kolfje van 25 cm³, voorzien van een terugvloeiakoeler. Onder omroeren wordt 1 cm³ 65 % salpeterzuur toegevoegd en wordt het reactiemengsel precies 3 minuten op een waterbad gekookt. Na afkoelen wordt de intensiteit der roode kleur bepaald met den *Zeiss-Pulfrich* photometer, waarbij gebruik wordt gemaakt van filter S 47 en de 1 cm cuvette.

Bij de bepaling van tocopherol in oliën volgens deze reactie ontstaan 2 lagen, die ieder afzonderlijk moeten worden bepaald met den photometer en waarvan de kleurintensiteiten opgeteld worden.

Voor een critische bespreking van de chemische bepalingsmethoden zie hoofdstuk VIII.

HOOFDSTUK V.

EIGEN BEPALINGSMETHODE.

A. *Principe der methode.*

De methode berust op de oxydatie van tocopherol door ferri-chloride en de colorimetrische bepaling van het hierbij gevormde ferro-zout met behulp van α : α' -dipyridyl als rood gekleurde complexe verbinding (21, 115). Deze door Bla u (116) ontdekte reactie op ferro-zouten (zie ook Fe i g l e n H a m b u r g (117)) is een der meest gevoelige reacties hierop en wordt niet gestoord door ferri-zouten.

B. *Bijzonderheden bij het uitvoeren der methode.*

1. *Reactiemilieu en reagentia.*

Daar het niet mogelijk was de reactie uit te voeren in water, zooals gebruikelijk bij micro-ijzerbepalingen, kozen we 96 % aethylalcohol als oplosmiddel. Zoowel tocopherol als ferrichloride en dipyridyl lossen hierin voldoende op, terwijl de reactie zelf ook vlot in dit milieu verloopt. Evenwel bleek later bij toepassing der reactie op oliën, dat het hierbij wenschelijk was het milieu iets te wijzigen, reden waarom wij er toe zijn overgegaan een mengsel van 96 % aethylalcohol en benzol te nemen (5 cm³ benzol op 25 cm³ mengsel). De toevoeging van benzol was niet alleen gunstig voor de oplosbaarheid der te onderzoeken preparaten, doch was eveneens een voordeel bij onze adsorptieproeven voor de scheiding van tocopherol van andere stoffen (zie pag. 53). Het bleek, dat zoowel de uitvoering der reactie in 96 % aethylalcohol als in het alcohol-benzol-mengsel dezelfde colorimeter-aflezingen gaf voor een bepaalde hoeveelheid α -tocopherol.

De aethylalcohol (handelsproduct) en de benzol (Pharm. Ed. V) werden beide vóór het gebruik uit een geheel glazen apparaat gedestilleerd, waarbij $\pm 5\%$ als voorloop en evenveel als laatste fractie der destillatie niet werden gebruikt. Beide oplosmiddelen worden in het donker bewaard. De ferrichlorideoplossing bestaat uit 0.2% FeCl_3 6 aq. (Merck's ferrum sesquichloratum cryst. p.a.) in aethylalcohol, de oplossing van $\alpha : \alpha'$ -dipyridyl (Merck) heeft een concentratie van 0.5% in aethylalcohol. Beide oplossingen worden dagelijks versch bereid en moeten eveneens in het donker worden bewaard.

2. Invloed van het licht op de reactie.

Reeds dadelijk bleek, dat zonlicht en sterk daglicht grooten invloed op de reactie hebben. Een blanco oplossing der reagentia, die zwak geel gekleurd is, wordt bij blootstellen aan zon- of daglicht meer of minder snel rood. We zien dus, dat onder invloed van het licht een reactie plaats heeft, waarbij het ferrichloride in alcoholisch milieu wordt gereduceerd tot ferrochloride, dat met het dipyridyl reageert.

Na een aantal proeven met lichtfilters bleek, dat een filter, hetwelk licht doorlaat van golflengte $650\text{--}700\text{ m}\mu$ (rood licht), het gunstigst was voor de stabiliteit der blanco, terwijl de sterkste verandering der blanco plaats vond met een filter, dat licht doorlaat van golflengte $450\text{--}500\text{ m}\mu$. Het is evenwel niet noodig de geheele reactie in een donkere kamer uit te voeren. Bij de bepaling kunnen de reagentia bij sterk gedempt daglicht of zwak kunstlicht worden toegevoegd, terwijl daarna het reactiemengsel in het donker wordt bewaard tot de meting plaats vindt. Daar bij de meting het reactiemengsel aan het licht van de photometerlamp is blootgesteld, was het noodig den invloed van deze lichtbron op de reactie na te gaan.

Bij de colorimetrische bepaling werd gebruik gemaakt van den Zeiss-Pulfrich photometer, ook wel Stufenphotometer genoemd. Als lichtfilter werd het filter S 50 gekozen, dat na onderzoek het gunstigst bleek.

Om den invloed van de photometerlamp op de reactie na te gaan, werd één der cuvettes (van 1 cm) met het blanco reagentiamengsel en de andere cuvette met water gevuld. Onder voortdurende belichting werd telkens na bepaalden tijd een aflezing gedaan. In

de hieronder volgende tabel zijn de resultaten vermeld, waarbij de waarden van de aflezingen op den trommel van den photometer de hoeveelheden doorgelaten licht in percenten voorstellen. Aangezien de oplossing met de blanco-reagentia zwak geel gekleurd is door het ferrichloride, wordt door deze blanco, die vergeleken wordt met water, reeds in den aanvang minder dan 100 % licht doorgelaten.

Tabel II.

Invloed van het licht van de photometerlamp op het blanco-reagentiamengsel.

Tijd van aflezing	Photometeraflezing
0.5 min.	88
5 "	88
10 "	87
15 "	86
30 "	81
60 "	70

We zien hieruit, dat de blanco slechts langzaam verandert en dat het raadzaam is deze niet langer dan 10 minuten bij seriebepalingen te gebruiken. Men kan dan eenvoudig een nieuwe blanco nemen van de 25 cm³ blanco-oplossing, die men in het donker heeft bewaard. We zien bovendien, dat aan het uitvoeren der reactie zelf bij matig kunstlicht geen enkel bezwaar is verbonden, mits, zooals reeds werd gezegd, de reactie-mengsels in het donker worden bewaard. Na eenige uren in het donker bewaard te zijn, geeft de blanco dezelfde aflezing als direct na de bereiding.

3. Snelheid en stabiliteit der reactie van ferrichloride en dipyridyl met *dl*- α -tocopherol. *)

De snelheid en stabiliteit dezer reactie werden bepaald door meting der intensiteit van de roode kleur. Hierbij werd gevonden, dat de reactie na 1—2 minuten is afgelopen, terwijl de kleurintensiteit minstens enkele uren stabiel is.

*) Het synthetisch bereide *dl*- α -tocopherol is welwillend ter beschikking gesteld door de firma Hoffmann-La Roche.

4. Invloed van het dipyridyl op de reactie tusschen *dl*- α -tocopherol en ferrichloride.

Bij onze onderzoekingen over het verloop van de reactie van *dl*- α -tocopherol met het ferrichloride-dipyridyl-reagens bleek, dat het dipyridyl niet alleen diende om de rood gekleurde verbinding te geven, doch tevens, dat eerst het dipyridyl de oxydatie volledig maakte.

Zonder dipyridyl toevoeging vonden we een onvolledige omzetting van tocopherol in tocopherylchinon (zie ook hoofdstuk III). Dat inderdaad bij afwezigheid van dipyridyl onvolledige oxydatie plaats vindt, werd bewezen door gelijke hoeveelheden *dl*- α -tocopherol (0.4 mg) te oxydeeren met ferrichloride bij aanwezigheid en afwezigheid van dipyridyl (op 25 cm³ reactiemengsel werden toegevoegd 1 cm³ ferrichloride- en al of niet 1 cm³ dipyridyloplissing). Na 10 minuten werden beide oplossingen onder toevoeging van water met zuiveren aether geëxtraheerd. Na verdamping van den aether werd met beide residu's opnieuw de ferrichloride-dipyridyl-reactie uitgevoerd. Bij afwezigheid van dipyridyl bleek slechts 66 % van het *dl*- α -tocopherol te zijn geoxydeerd, bij aanwezigheid van dipyridyl was 100 % geoxydeerd.

Ook bij de oxydatie van carotine door ferrichloride is dit verschijnsel gevonden (zie pag. 52).

5. Het opstellen van een graphiek voor de reactie van *dl*- α -tocopherol met ferrichloride-dipyridyl.

Een bepaalde hoeveelheid *dl*- α -tocopherol werd na afwegen opgelost in 96 % aethylalcohol en verschillende volumina hiervan in maatkolfjes van 25 cm³ gebracht. Achtereenvolgens werden 1 cm³ ferrichlorideoplossing (0,2 % in aethylalcohol) en 1 cm³ dipyridyloplissing (0,5 % in aethylalcohol) toegevoegd en met aethylalcohol het volume op 25 cm³ gebracht.

Zoals reeds eerder werd gezegd, wordt de reactie in sterk gedempt daglicht of in zwak kunstlicht uitgevoerd en de kolfjes met de reactiemengsels in het donker bewaard tot de meting aanvangt. In de volgende tabel (III) zijn de resultaten weergegeven.

We zien uit de tabel, dat de waarden der extincties evenredig zijn met de hoeveelheid *dl*- α -tocopherol, wat blijkt uit het feit, dat de E (100 γ) constant is. Het reactiemengsel volgt dus de wet van Beer.

Tabel III.

Reactie tusschen *dl*- α -tocopherol en het ferrichloride-dipyridyl-reagens.
Aflizingen 10 minuten na toevoeging der reagentia.

<i>dl</i> - α -tocopherol (γ)	Photometer aflizing	Extinctie *)	E (100 γ)
29	91	0,041	0,141
72,5	78	0,108	0,149
145	61,5	0,211	0,146
217,5	48	0,319	0,147
290	38	0,420	0,145
435	23	0,638	0,147
			gemiddeld 0,146

Op dezelfde wijze werd een graphiek gemaakt voor ferro-ammoniumsulfaat. Het doel hiervan was uit deze graphiek te berekenen, hoeveel ferro-zout uit de reactie tusschen *dl*- α -tocopherol en ferrichloride ontstaat.

Bij het maken van deze graphiek werd van verdunningen van ferro-ammoniumsulfaat in water uitgegaan. Hiervan werd steeds 1 cm³ genomen, 1 cm³ dipyridyloplanning toegevoegd en met aethyl-alcohol tot 25 cm³ aangevuld, terwijl na 10 minuten de kleur-intensiteit werd bepaald.

Tabel IV.

Graphiek voor de reactie tusschen ferro-ammoniumsulfaat en dipyridyl.

Ferro-ijzer (γ)	Photometer-aflizing	Extinctie	E (100 γ)
20	77	0.114	0.568
40	60	0.222	0.555
60	47	0.328	0.547
80	36	0.444	0.555
			gemiddeld 0.556

Ook hier is dus, evenals bij *dl*- α -tocopherol, de E (100 γ) constant.

*) De extinctie is afgeleid uit $E = \log \frac{J_0}{J}$, waarbij J_0 het invallend licht en J het doorgelaten licht voorstelt. Aangezien de aflizing van den photometer het percentage doorgelaten licht aangeeft, is $E = \log \frac{100}{\text{aflizing}}$.

Het is nu mogelijk te berekenen hoeveel ferro-zout door *dl*- α -tocopherol uit ferrichloride wordt gevormd. Hiertoe moet men de hoeveelheid ferro-ijzer bepalen, die aequivalent is met 1 grammol. *dl*- α -tocopherol bij gelijke extincties volgens tabellen 3 en 4. Aangezien de extincties van ferro-ijzer en *dl*- α -tocopherol zich verhouden als 556 : 146, correspondeert 1 grammol. *dl*- α -tocopherol (430 g) met $430 \times \frac{146}{556} = 113$ g ferro-ijzer, hetgeen 2 gramat. ferro-ijzer is (theoretisch 111,6 g).

Hieruit volgt dus, dat 1 grammol. *dl*- α -tocopherol 2 grammol. ferrichloride reduceert.

Aan de hand van de gevonden extinctie voor *dl*- α -tocopherol zijn we nu in staat in diverse stoffen het tocopherolgehalte te bepalen en wel het totaal tocopherolgehalte, hetgeen dus wil zeggen de som van α -, β - en γ -tocopherol. De fout, die wij maken bij aanwezigheid van β - of γ -tocopherol is gering, aangezien het moleculairgewicht dezer stoffen (416) weinig van α -tocopherol (430) verschilt en β - en γ -tocopherol dus per gewichtseenheid iets grotere kleurintensiteit ($\pm 3\%$) bij de reactie zullen geven dan α -tocopherol. De biologische waarde van dergelijke mengsels van de tocopherolen kan echter veel sterker variëren, omdat β - en γ -tocopherol minder werkzaam zijn dan α -tocopherol (zie hoofdstuk III). Deze overwegingen gelden eveneens bij de bepaling volgens K a r r e r en K e l l e r of volgens F u r t e r en M e y e r.

De hoeveelheden tocopherol, die wij met onze methode bepalen, variëren in het algemeen van 100 tot 400 γ . In verband met de nauwkeurigheid bij het aflezen van den photometer ligt de laagste waarde bij ongeveer 30 γ , bij welke waarde we echter op een bepalingsfout van de orde van 10% moeten rekenen. Met onze micromethode (zie later) kunnen we nog 5 maal geringere hoeveelheden tocopherol bepalen.

Dat bij een bepaling van 500 γ α -tocopherol nog een ruime overmaat der reagentia aanwezig is, leert de volgende berekening: 1 grammol. α -tocopherol (430 g) heeft theoretisch nodig 2 grammol. $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{aq} = 540$ g. Hierbij worden 2 gramat. ferro-ijzer gevormd, waarvoor nodig zijn 6 grammol. dipyridyl = 936 g.

Uitgaande van 0,5 mg α -tocopherol bedragen de benodigde

hoeveelheden ferrichloride en dipyridyl resp. 0,6 en 1,1 mg. We voegen toe resp. 2 en 5 mg; er is dus een ruime overmaat der reagentia aanwezig.

6. Reactie van carotinoïden en vitamine A met het ferrichloride-dipyridyl reagens.

Daar het in de bedoeling lag onze bepalingsmethode toe te passen op natuurproducten en biologisch materiaal, werd eerst het gedrag van β -carotine en vitamine A ten opzichte van het reagens onderzocht. Immers de carotinoïden komen zeer verspreid in het plantenrijk voor en het vitamine A is dikwijls in biologisch materiaal aanwezig. Beide zijn evenals het tocopherol onverzeepbaar en oplosbaar in organische oplosmiddelen, zoodat een extractiemethode voor het tocopherol ook de carotinoïden en vitamine A omvat. Het bleek, zooals te verwachten was, dat beide het ferrichloride-dipyridyl-reagens reduceerden, zoodat een scheiding van deze stoffen van het tocopherol noodig was. Allereerst werd het gedrag van zuiver β -carotine quantitatief nagegaan. De reactie werd uitgevoerd zooals aangegeven bij *dl*- α -tocopherol

Tabel V.

Reactie van β -carotine met het ferrichloride-dipyridyl-reagens.
Bepaling na 10 minuten.

β -carotine (γ)	Photometer-aflezing	Extinctie	E (100 γ)
18.6	91	0,041	0,220
37.2	81	0,092	0,246
93	54	0,268	0,288
186	28	0,553	0,297

Uit deze getallen blijkt, dat de E (100 γ) stijgt bij toeneming van de hoeveelheid β -carotine, die aan de reactie deelneemt.

Zooals reeds werd medegedeeld is de kleur bij de reactie met *dl*- α -tocopherol zeer stabiel. Bij β -carotine vonden we echter, dat de kleurintensiteit langzaam toeneemt met den reactietijd (tabel VI).

Ook bij β -carotine bleek weer, eveneens bij *dl*- α -tocopherol, dat de aanwezigheid van dipyridyl op de oxydatie door het ferrichloride grooten invloed had. Dit werd bewezen door na 10 minuten reactie

het reactiemengsel zonder dipyridyl te verdunnen met water en uit te schudden met petroleumaether, waarbij de gele kleur der petroleumaetheroplossing als carotine werd bepaald (tabel VII).

Tabel VI.

Verband tusschen de intensiteit der kleur van β -carotine met het reagens en den reactietijd.

Tijdsduur	Photometeraflezing
3 min.	54
6 ..	52
10 ..	51
20 ..	50
30 ..	49
60 ..	47

Tabel VII.

Oxydatie van β -carotine en $(\alpha + \beta)$ -carotine (handels-carotine) met ferrichloride gedurende 10 minuten bij afwezigheid van dipyridyl.

Product	Hoeveelheid	Geoxydeerde hoeveelheid
β -carotine	160 γ	84 $\%$
$(\alpha + \beta)$ -carotine	195 γ	73 $\%$
$(\alpha + \beta)$ -carotine	240 γ	67 $\%$

Wanneer deze zelfde hoeveelheden werden geoxydeerd bij aanwezigheid van dipyridyl, waren de petroleumaetherextracten vrijwel kleurloos.

Karrer en Jaeger (118) onderzochten, naast β -carotine, nog een aantal andere carotinoïden op hun gedrag tegenover goudchloride. Hierbij werd gevonden, dat α - en β -carotine, xanthophyl, zeaxanthine en lycopine per 3 grammol. 7,5—8 grammol. goudchloride gebruikten. Astacine en rhodoxanthine gebruikten per 3 grammol. ongeveer 2 grammol. goudchloride, terwijl bixine en violaxanthine geen goudchloride reduceerden.

Daar het vitamine A zeer oxydabel is, stond het vrijwel vast, dat dit eveneens zou worden geoxydeerd door ons reagens. De moeilijkheid bij het onderzoek hiervan bestond in het feit, dat we

niet over zuiver vitamine A beschikten. Daarom werd gebruik gemaakt van het onverzeepbare deel van heilbotleverolie (die $\pm 1\%$ vitamine A bevatte), waarvan door uitvriezen een gedeelte der sterinen was verwijderd. Hierbij werd gevonden:

1. Het was mogelijk het preparaat door chromatographische analyse in fracties te verdeelen, die, bij gelijk vitamine A-gehalte (bepaald volgens de reactie van Carr en Price), geheel verschillende kleurintensiteiten gaven met ferrichloride-dipyridyl. Er waren dus nog andere stoffen aanwezig die reageerden.

2. Vitamine A werd langzaam geoxydeerd door het reagens. Uitgaande van een hoeveelheid van 100 Lovibond-eenheden vitamine A van een der gezuiverde fracties, bleek na 10 minuten 4%, na 60 minuten 8% van het vitamine A te zijn geoxydeerd.

3. De reactie nam vrij sterk in kleurintensiteit toe met den tijdsduur. Zoo was b.v. de kleurintensiteit van de onder 2 genoemde fractie na 60 minuten 3 maal grooter dan na 10 minuten. Dit alles maakte het onmogelijk, om quantitatief de reactie-intensiteit voor vitamine A te bepalen, doch zeker is het, dat het vitamine A wordt geoxydeerd. Dit werd bovendien bewezen, doordat bij langere inwerking (22 uur) en grootere overmaat van ferrichloride-dipyridyl 81% van het aanwezige vitamine A was verdwenen.

Karrer en Keller (84), uitgaande van een preparaat dat $\pm 50\%$ vitamine A bevatte, vonden eveneens oxydatie door goudchloride, doch konden het niet langs potentiometrischen weg quantitatief bepalen.

Uit deze proeven bleek dus, dat zowel carotine als vitamine A de reactie gaven en dus verwijderd moesten worden bij de bepaling van tocopherol. Bij plantaardig materiaal (waarin geen vitamine A aanwezig is) zou het nog mogelijk zijn, wanneer alleen carotine voorkwam, hiervoor een correctie aan te brengen met behulp der carotinegraphiek. Doch vrijwel steeds zijn ook andere carotinoïden aanwezig, zoodat deze correctie practisch onmogelijk wordt. Om deze redenen zijn we er dan ook toe overgegaan een scheiding met behulp van adsorbentia te zoeken.

7. Scheiding van tocopherol van carotinoïden en vitamine A (119).

Het doel hierbij was een adsorbens te vinden, dat carotinoïden

en vitamine A adsorbeerde en deze zodoende van tocopherol, dat dan niet mocht worden geadsorbeerd, te scheiden. Na onderzoek van een aantal adsorbentia (o.a. aluminiumoxyde, frankoniet, montana-aarde), die niet geschikt bleken, omdat ook *dl*- α -tocopherol gedeeltelijk geadsorbeerd werd, bleek Floridin XS-aarde*) in principe geschikt te zijn. Bij filtratie van een benzolische oplossing van *dl*- α -tocopherol door een laag van het adsorbens (zooals bij de chromatographische analyse) en bij nawasschen met benzol werd het *dl*- α -tocopherol echter niet geheel quantitatief in het filtraat teruggevonden, terwijl niet te groote hoeveelheden β -carotine en vitamine A quantitatief werden geadsorbeerd.

Na een aantal proeven met de Floridin XS-aarde bleek het evenwel mogelijk deze zoodanig te behandelen, dat het tocopherol quantitatief in het filtraat werd teruggevonden. Deze behandeling geschiedde als volgt: 50 g aarde werden met 200 cm³ 37 % HCl in een bekglas gedurende 1 uur in een kokend waterbad geplaatst. Na decanteeren van het geelbruine HCl werd opnieuw 200 cm³ 37 % HCl toegevoegd en het geheel onder af en toe omroeren bij kamertemperatuur gedurende eenige uren bewaard. Hierna werd gedecanteerd en werd de aarde met leidingwater gewasschen tot het water zuur-vrij reageerde, waarna nog 2 maal met 200 cm³ gedestilleerd water werd gewasschen. Na scherp afzuigen op een Büchnertrechter werd de aarde 24 uur bij 37° C gedroogd. Deze droogtemperatuur is van belang, omdat bij hogere temperatuur de aarde neiging toont om tocopherol te adsorbeeren. Zoo werd gevonden, dat de bij 37° C gedroogde aarde na 1 uur drogen bij 60° C 5 % tocopherol adsorbeerde; na 1 uur drogen bij 120° C werd 50 % tocopherol geadsorbeerd. Aan den anderen kant geeft echter drogen bij lagere temperatuur (kamertemperatuur) een aarde, die weliswaar geen tocopherol adsorbeert, doch in dit geval zijn de hoeveelheden β -carotine en vitamine A, die geadsorbeerd kunnen worden, minder dan wanneer bij 37° C wordt gedroogd. De adsorptie werd als volgt uitgevoerd:

Een verticale glazen buis (120 × 12 mm) met een vernauwing van onderen, werd afgesloten met een wattenprop en hierop een

*) Deze aarde is door Koschara (120) en door van Eekelen en Emmérie (121) gebruikt bij de adsorptie van vitamine B₂.

laag adsorbens (20 mm) gebracht. Na doorspoelen met benzol werden 5 cm³ benzolische *dl*- α -tocopheroloplossing voorzichtig op de aarde gegoten en een destilleerkolfje onder de buis geplaatst om het filtraat op te vangen. Nadat de 5 cm³ tocopheroloplossing de zuil met aarde was gepasseerd, werd telkens met porties van 5 cm³ benzol, in totaal 25 cm³, nagewassen. Het verzamelde filtraat werd daarna in vacuo onder CO₂ ingedampt en hiermede de tocopherolbepaling uitgevoerd. Voor de resultaten zie tabel VIII.

Tabel VIII.

Resultaat van de behandeling van *dl*- α -tocopherol in benzol met Floridin XS-aarde volgens T s w e t t.

Hoeveelheid <i>dl</i> - α -tocopherol (γ)	Tocopherol in filtraat (γ)
53	52
106	106
465	453
775	765

De hoeveelheden β -carotine en vitamine A, die door een laag adsorbens van 20 mm hoogte (12 mm diameter) kunnen worden geadsorbeerd, bedroegen 110—120 γ voor β -carotine en voor vitamine A 80—90 Lovibond-eenheden (512—576 I.E.).

HOOFDSTUK VI.

BEPALING VAN HET TOCOPHEROLGEHALTE IN OLIËN.

A. Onverzepte oliën.

De methode voor de chemische bepaling van tocopherol in oliën werd het eerst toegepast op tarwekiemolie. Reeds eerder werd beschreven, dat deze olie een der rijkste natuurlijke bronnen voor tocopherol is. Oplossingen van tarwekiemolie gaven met het reagens een roode kleur, wat niet alleen wees op het aanwezig zijn van tocopherol (behoudens de mogelijkheid van aanwezigheid van andere reduceerende stoffen), doch tevens aanduidde, dat het tocopherol in vrijen vorm voorkwam. Immers de reactie gaat alleen op, wanneer de hydroxylgroep van het tocopherol vrij is; esters geven de reactie slechts na verzeeping. Zooals reeds gezegd, lossen oliën in aethylalcohol weinig op en werd daarom bij oliën de reactie uitgevoerd door op 25 cm³ reactievloeistof 5 cm³ benzol te nemen (er bleek met *dl*- α -tocopherol geen verschil in kleurintensiteit te zijn bij uitvoering der reactie in dit mengsel of in aethylalcohol alleen). Een onzekere factor bij de bepaling in tarwekiemolie bleek de gele kleur der olie te zijn, die grootendeels door een mengsel van carotinoïden wordt veroorzaakt. Het bleek niet mogelijk deze carotinoïden door adsorptie met Floridin XS geheel te verwijderen bij de onverzepte olie, aangezien klaarblijkelijk de aanwezigheid der olie de adsorptie min of meer belemmerde. Na verzeeping der olie is dit bezwaar echter verdwenen.

Wanneer we de aanwezige carotinoïden als β -carotine bepaalden en hiervoor een correctie aanbrachten op de gevonden tocopherolwaarden, bleek deze correctie bij goede soorten tarwekiemolie (die ongeveer 0,25 % tocopherol bevatten) ongeveer 5 % te bedragen van de gevonden totale reductiewaarde. Dit is echter slechts bij benadering juist.

Bij het onderzoek van het tocopherolgehalte van tarwekiemolie en andere oliën bleek, dat deze oliën in staat waren de reactie tusschen tocopherol en het reagens te onderdrukken; dat wil zeggen, dat door de aanwezigheid der oliën bij de bepaling minder tocopherol werd gevonden, dan er inderdaad aanwezig was.

Bij deze onderzoeken vonden wij het volgende:

1. Bij de bepaling van het tocopherolgehalte van tarwekiemolie werd bij uitvoering der reactie met toenemende hoeveelheden der olie een afneming van het percentage tocopherol gevonden. Bij soyaolie, dat eveneens vrij veel tocopherol bevatte, werd dit niet gevonden.
2. Wanneer aan olijfolie of cocosvet *dl- α -tocopherol* werd toegevoegd, kwam het sub 1 genoemde verschijnsel sterk te voorschijn.
3. Uitgaande van de mogelijkheid, dat het bij de reactie gevormde ferrochloride door stoffen in de olie werd geoxydeerd gedurende het tijdsverloop tusschen toevoeging van ferrichloride en van dipyridyl, werd de reactie zoodanig gewijzigd, dat eerst dipyridyloplissing werd toegevoegd. Hierbij bleek het sub 2 genoemde verschijnsel veel minder te zijn.
4. Bij toevoeging van *dl- α -tocopherol* aan tributyrine werd geen onderdrukking van de reactie geconstateerd.
5. Het verschijnsel der onderdrukking van de reactie staat in verband met de aanwezigheid van peroxyden in de oliën.

In de volgende tabellen zijn de resultaten dezer onderzoeken weergegeven.

Tabel IX (sub 1).

Tocopherolgehalte van tarwekiemolie en soyaolie bij uitvoering der bepaling met verschillende hoeveelheden der oliën.

Olie	Hoeveelheid olie gebruikt voor bep. (mg)	Gevonden tocopherol (γ)	Percentage tocopherol
Tarwekiemolie	30	85	0.28
"	60	167	0.28
"	90	147	0.16
Soyaolie	50	66	0.13
"	100	137	0.14
"	200	274	0.14

Tabel X (sub 2).

Bepaling van tocopherol in olijfolie en cocosvet, waaraan bepaalde hoeveelheden *dl-α*-tocopherol zijn toegevoegd.

Product	Toegevoegde hoeveelheid <i>dl-α</i> -tocopherol (γ)	Hoeveelheid olie bij reactie (mg)	Gevonden en berekend als tocopherol (γ)	Percentage teruggevonden tocopherol
Olijfolie	—	50	8	—
"	—	100	16	—
"	—	200	28	—
"	—	300	40	—
"	258	50	251	94
"	258	100	237	86
"	258	200	218	74
"	258	300	206	64
Cocosvet	—	50—300	0	—
"	258	50	178	69
"	258	100	128	50
"	258	200	36	14
"	258	300	31	12

Tabel XI (sub 3).

Bepaling van tocopherol in olijfolie en cocosvet, waaraan *dl-α*-tocopherol is toegevoegd; tevens bepaling in tarwekiemolie. Reactie is zoodanig uitgevoerd, dat dipyridyl is toegevoegd vóór het ferrichloride.

Product	Toegevoegde hoeveelheid <i>dl-α</i> -tocopherol (γ)	Hoeveelheid olie bij reactie (mg)	Gevonden tocopherol (γ)	Percentage teruggevonden tocopherol
Olijfolie	—	50	8	—
"	—	100	16	—
"	—	200	34	—
"	—	300	48	—
"	254	50	265	101
"	254	100	265	98
"	254	200	288	100
"	254	300	296	98
Cocosvet	—	50—300	0	—
"	258	50	244	95
"	258	100	230	90
"	258	200	206	80
"	258	300	188	73
Tarwekiemolie	—	30	85	0,28
"	—	60	167	0,28
"	—	90	224	0,25

Wat betreft het sub 4 genoemde verschijnsel bleek, dat bij toevoeging van *dl-a*-tocopherol aan tributyrine (50—300 mg), het tocopherol onder alle experimenteele omstandigheden quantitatief werd teruggevonden. Aangezien vermoed werd, dat peroxyden in de oliën of in het cocosvet de oorzaak waren van het onderdrukken der reactie, werden de actieve-zuurstof-getallen bepaald, zooals aangegeven is door Sabalitschka (122).

De volgende waarden werden hierbij gevonden (tabel XII).

Tabel XII.
Actieve-zuurstof-getallen van eenige oliën en cocosvet.

Product	Getal
Cocosvet	27
Tarwekiemolie	6.2
Olijfolie	5
Soyaolie	0.3
Tributyrine	0

We zien uit deze waarden en uit de voorafgaande tabellen, dat er een verband is tusschen het onderdrukken der reactie van tocopherol met het reagens door de olie en het actieve-zuurstof-getal er van. Hoe hoger dit laatste, des te sterker is de onderdrukking (cocosvet). Stoffen, waarvan dit getal 0 of zeer gering is (tributyrine of soyaolie), onderdrukken de reactie niet.

Een mogelijke verklaring van deze feiten kan als volgt worden gegeven: Bij het reageeren van het tocopherol met ferrichloride ontstaat ferrochloride, dat gedeeltelijk door de in de olie aanwezige peroxyden wordt geoxydeerd. Na toevoeging van dipyridyl ontstaat dus een geringere kleurintensiteit, dan met de hoeveelheid tocopherol correspondeert.

Het feit, dat de onderdrukking der reactie minder is wanneer we eerst dipyridyl toevoegen, kan dan verklaard worden, doordat in dit geval het ontstane ferrochloride direct met het reeds aanwezige dipyridyl kan reageeren, terwijl bij eerst toevoegen van ferrichloride vóór dipyridyltoevoeging het ferrochloride door de peroxyden gedeeltelijk wordt geoxydeerd en dan niet meer geheel voor het dipyridyl beschikbaar blijft. Dit alles maakt de bepaling van toco-

pherol in onverzepte oliën of vetten bezwaarlijk, ofschoon het in principe mogelijk is een bepaling te doen, indien deze stoffen geen of weinig peroxyden bevatten.

B. *Bepaling van het tocopherolgehalte van oliën met verzeeping* (123, 124).

Nog meer redenen noodzaakten ons, tot verzeepen over te gaan. Het bleek, dat b.v. katoenzaadolie reduceerende stoffen bevat, die na verzeepen verdwijnen; bovendien moesten we eveneens rekening houden met de mogelijkheid van het vóórkomen van veresterd tocopherol. Daarom werd overgegaan tot het uitwerken eener ver-

Tabel XIII.

Stabiliteit van *dl*- α -tocopherol en *dl*- α -tocopherylacetaat tegenover KOH in absoluten methylalcohol. Reactievolume 5 cm³, temperatuur 72–74° C, reactieduur 10 minuten.

<i>dl</i> - α -tocopherol (γ)	Concentratie KOH	Teruggewonden tocopherol %
65	0.08 <i>n</i>	97
288	0.04 <i>n</i>	97
288	0.08 <i>n</i>	96
288	0.2 <i>n</i>	92
288	0.4 <i>n</i>	80
288	0.8 <i>n</i>	78
288	1.2 <i>n</i>	58
288	1.6 <i>n</i>	53
<i>dl</i> - α -tocopherylacetaat (γ)		
65	0.08 <i>n</i>	96
327	0.04 <i>n</i>	90
327	0.08 <i>n</i>	94
327	0.4 <i>n</i>	82
327	1.6 <i>n</i>	65
idem (mg)		
45.1	0.08 <i>n</i>	98
45.1	0.2 <i>n</i>	96
45.1	1.2 <i>n</i>	87

zeepingsmethode, die voor alle gevallen zou voldoen. De moeilijkheid, die zich hierbij voordeed, was gelegen in de instabiliteit van tocopherol tegenover alkali. In verband met de reeds besproken onderzoekingen van Evans en medewerkers (zie hoofdstuk II) over de verzeeping van tarwekiemolie, werd besloten dit spoor te volgen. Allereerst werd de stabiliteit van *dl*- α -tocopherol en *dl*- α -tocopherylacetaat tegenover KOH in absoluten methylalcohol onderzocht.

Uit tabel XIII blijkt, dat de stabiliteit van *dl*- α -tocopherol en het acetaat (dat verzeept wordt) afneemt bij toeneming der KOH-concentratie.

De opwerking van de reactiemengsels geschiedde als volgt:

Na toevoeging van 15 cm³ water werd 3 maal geëxtraheerd met 50 cm³ peroxyde-vrijen aether. De gecombineerde aetherextracten werden met gedestilleerd water alkali-vrij gewasschen, gedroogd op watervrij Na₂SO₄ en in vacuo ingedampt (onder CO₂), waarna met het residu de tocopherolbepaling werd uitgevoerd.

De peroxyde-vrije aether werd bereid door 1 L aether (Pharm. Ed. V) 2 maal uit te schudden met 100 cm³ 10 % ferrosulfaatoplossing, daarna 2 maal te wasschen met 100 cm³ gedestilleerd water, vervolgens 2 maal uitschudden met 100 cm³ 10 % KOH-oplossing en alkali-vrij te wasschen met gedestilleerd water.

De zoo behandelde aether wordt in de ijskast bewaard en is minstens 1 week houdbaar. Na deze onderzoekingen werd overgegaan tot het bepalen van de meest geschikte verzeepingsmethode voor oliën, waarbij een compromis moest worden gevonden tusschen de factoren, die de stabiliteit van het tocopherol beheerschen en die, welke de verzeeping bepalen. Deze factoren zijn b.v.:

1. Concentratie der KOH-oplossing.
2. Overmaat KOH.
3. Verzeepingstemperatuur.
4. Verzeepingsduur.

De hoeveelheid KOH, die voor de verzeeping nodig is, wordt bepaald door het verzeepingsgetal der olie, waarbij een kleine overmaat KOH nodig is om volledige verzeeping te verkrijgen. Wanneer we bovenstaande factoren beschouwen blijkt het, dat er zeer vele variaties in het verzeepingsproces mogelijk zijn. Daar het on-

mogelijk was al deze variaties te onderzoeken, werden, mede in verband met de resultaten van een aantal oriënterende proeven, 2 factoren als vast aangenomen, namelijk de verzeepingstemperatuur, die op 72—74° C werd gesteld, en de verzeepingsduur, die op 10 of 15 minuten werd bepaald. Met tarwekiemolie werden een aantal verzeepingen uitgevoerd, terwijl eveneens na iedere verzeeping het tocopherolgehalte werd bepaald.

Tabel XIV.

Verzeeping van 1 g tarwekiemolie (verzeepingsgetal 178) met KOH in absoluten methylalcohol. Verzeepingstemperatuur 72—74° C.

Proef	Volume en concentratie der KOH-oplossing	Verzeepingsduur in minuten	Percentage verzepte olie	Percentage tocopherol
1	6 cm ³ 1 n	15	97	0.23
2	5 „ 1.2 n	10	95	0.23
3	3 „ 1.33 n	15	96	0.24
4	2 „ 2 n	10	100	0.24
5	3 „ 2 n	10	100	0.21
6	2 „ 3 n	10	100	0.21

Uit deze tabel zien we, dat bij alle proeven de verzeeping quantitief of bijna quantitief was; het meest gunstige resultaat werd verkregen in proef 4, omdat hier zoowel quantitatieve verzeeping als het hoogste tocopherolgehalte werden gevonden. In proef 3 was het resultaat wat tocopherolgehalte betreft, even gunstig, ofschoon hier de verzeeping nog niet geheel quantitief was. Bij de proeven 3 en 4 waren de gebruikte hoeveelheden KOH geringer dan bij de andere proeven. Men mag nu echter zonder meer niet besluiten, dat de verzeepingsvoorwaarden in proef 4 een quantitatieve bepaling van het tocopherol in de tarwekiemolie waarborgen. Het is immers mogelijk, dat, niettegenstaande in dit geval het hoogste tocopherolgehalte werd gevonden, toch nog een gedeelte van het tocopherol gedurende de verzeeping vernietigd was. Het bewijs, dat inderdaad een quantitatieve bepaling van het tocopherolgehalte heeft plaats gevonden, kan slechts dan worden geleverd, indien na toevoeging van een bepaalde hoeveelheid *dl-a*-tocopherol aan de

olie, deze hoeveelheid na de verzeeping quantitatief wordt teruggevonden. Het resultaat van dit experiment is in de volgende tabel weergegeven.

Tabel XV.

Verzeeping van 1 g tarwekiemolie met en zonder toevoeging van *dl*- α -tocopherol. Hierbij werd verzeept met 2 cm³ 2 n KOH in absoluten methylalcohol gedurende 10 minuten bij 72–74° C.

Tarwekiemolie	Toegevoegd <i>dl</i> - α -tocopherol (%)	Gevonden hoeveelheid tocopherol (%)	Percentage teruggevonden tocopherol
1g	—	2840	—
1g	1350	4160	98

Inderdaad blijkt dus, dat onder deze verzeepingsvoorwaarden het tocopherolgehalte quantitatief wordt teruggevonden. Bij deze bepaling was aan de tarwekiemolie een vrij groote hoeveelheid tocopherol toegevoegd, omdat anders de verhouding ten opzichte van de hoeveelheid tocopherol in de olie te ongunstig zou worden. Om te bewijzen, dat kleinere hoeveelheden tocopherol eveneens quantitatief worden teruggevonden, werd uitgegaan van een olie, die weinig tocopherol bevat (olijfolie).

Tabel XVI.

Verzeeping van 1 g olijfolie (verzeepingsgetal 190) met en zonder toevoeging van *dl*- α -tocopherol, onder dezelfde omstandigheden als in tabel XV.

Olijfolie	Toegevoegd <i>dl</i> - α -tocopherol (%)	Gevonden hoeveelheid tocopherol (%)	Percentage teruggevonden tocopherol
1g	—	30	—
1g	271	296	98

Men ziet hieruit, dat ook van kleinere hoeveelheden tocopherol niets verloren gaat.

Na de verzeeping werden 8 cm³ methylalcohol en 10 cm³ gedistilleerd water toegevoegd, waarna 3 maal met 50 cm³ peroxyde-

vrijen aether werd geëxtraheerd. De gezamenlijke aetherextracten werden achtereenvolgens gewasschen met 25 cm³ 0,2 n KOH en met gedestilleerd water tot alkali-vrij. Hierna werd gedroogd met Na₂SO₄ en in vacuo onder CO₂ tot droog ingedampt. Het residu werd in een passende hoeveelheid aethylalcohol of benzol opgenomen, in het laatstgenoemde, wanneer een adsorptie met Floridin XS-aarde noodig was om de carotinoïden te verwijderen (tarwekiemolie). Het bleek hierbij, dat deze carotinoïden, die hoofdzakelijk uit xanthophyl bestaan, vlot geadsorbeerd werden.

De verzeepingen werden uitgevoerd in reageerbuizen (15 × 150 mm), voorzien van een kleine terugvloeiakoeler.

Het bovengenoemde bezwaar, dat bestond bij de bepaling van tocopherol in onverzepte oliën en dat, zooals beschreven, lag in het onderdrukken der reactie bij de bepaling, was dus na de verzeeping verdwenen. Bij het bepalen van tocopherol na verzeeping in een aantal tarwekiemoliën of andere oliën, waaraan tocopherol was toegevoegd, bleek ook, dat de hoeveelheid van het onverzeepbare deel, waarmede de reactie werd uitgevoerd, geen invloed had op de bepaling van het tocopherolgehalte, terwijl eveneens dezelfde waarden werden gevonden, wanneer men de volgorde van het toevoegen van ferrichloride en dipyridyl wijzigde.

HOOFDSTUK VII.

BEPALING VAN TOCOPHEROL IN SERUM (123).

Reeds bij de inleiding van hoofdstuk IV werd gewezen op het belang van chemische bepalingsmethoden voor het onderzoek van het vitaminegehalte in bloed of serum bij den mensch. Om deze redenen werd er dan ook toe overgegaan om te onderzoeken of de ferrichloride-dipyridyl-methode geschikt was om het tocopherol in serum te bepalen. Hierbij kwam het er dus op aan een methode te vinden om het tocopherol uit serum te extraheeren. Evenmin als bij het vitamine A bleek het mogelijk, door behandeling van het serum met aether, het tocopherol er direct uit te verkrijgen.

In analogie met de methode voor vitamine A-bepaling in serum (125), werd aan de mogelijkheid gedacht om op een dergelijke manier tocopherol te extraheeren. Eerst werd echter de stabiliteit van *dl-α*-tocopherol tegenover waterige- en verdund-alcoholische loog bepaald. Zooals reeds werd vermoed, naar aanleiding van hetgeen werd gevonden bij het onderzoek van de stabiliteit van *dl-α*-tocopherol in methylalcoholische loog, bleek deze stabiliteit niet groot te zijn.

Tabel XVII.

Bestendigheid van *dl-α*-tocopherol tegenover alkali in water en verdunden alcohol
Reactievolume 11 cm³.

<i>dl-α</i> -tocopherol (γ)	Temp.	Reactie-duur (min.)	Alcohol-concentr.	Alkali-concentr.	Terugge-vonden
322	20° C	5	8 0/0	0,3 n	81 0/0
630	20° C	5	16 0/0	2 n	22 0/0
322	20° C	120	36 0/0	1 n	33 0/0
322	100° C	15	—	1 n	6 0/0

Hier bleek dus weer, dat de bestendigheid afneemt met toenemende loogconcentratie. Ofschoon het nog mogelijk was, dat in tegenwoordigheid van serum deze bestendigheid grooter zou zijn, bleek, dat bij toepassing der methode zooals dit voor vitamine A geschiedt, van toegevoegd *dl- α -tocopherol* aan serum zeer weinig werd teruggevonden.

Hierna werd de mogelijkheid overwogen om het tocopherol te extraheeren na hydrolyse van de serum-eiwitten met pepsine-zoutzuur. Dus was het noodig de bestendigheid van *dl- α -tocopherol* tegenover zoutzuur te bepalen.

Tabel XVIII.

Bestendigheid van *dl- α -tocopherol* tegenover zoutzuur in verdund-alcoholisch milieu. Reactievolume 11 cm³.

<i>dl-α-tocopherol</i> (γ)	Temp.	Reactieduur (min)	Alcohol-concentr.	HCl-concentr.	Teruggevonden
322	20° C	5	8 0/0	1.2 n	99 0/0
322	37° C	35	8 0/0	1.2 n	99 0/0
322	37° C	165	8 0/0	1.2 n	93 0/0
322	37° C	1200	8 0/0	1.2 n	83 0/0

We zien hieruit, dat het tocopherol tegenover zoutzuur behoorlijk stabiel is. Bij een aantal proeven met runderserum onder toevoeging van *dl- α -tocopherol* en behandeling met pepsine-zoutzuur werd echter het tocopherol niet quantitatief teruggevonden.

Na deze experimenten werden een aantal proeven genomen met het doel te onderzoeken in hoeverre een extractie van het tocopherol (met aether) uit serum mogelijk was na denatureeren van de eiwitten op andere wijze en wel door toevoeging van aethylalcohol, verdunde alkali en formaldehyde-oplossing (33—34 %), indien deze stoffen hetzij afzonderlijk of in combinatie werden toegevoegd.

Tabel XIX.

Extractie van tocoferol uit runderserum na toevoeging van *dl*- α -tocopherol, onder wisselende voorwaarden.

Proef	Toegevoegd tocoferol (γ)	Formaldehyde-oplossing (cm^3)	Aethylalcohol (cm^3)	1 <i>n</i> KOH (cm^3)	H ₂ O (cm^3)	Gevonden tocoferol (γ)
1	322	—	—	1	—	5
2	322	—	5	1	—	137
3	322	—	10	1	10	206
4	—	10	10	1	—	44
5	94	10	10	1	—	132
6	194	10	10	1	—	231
7	322	10	10	1	—	326
8	322	10	—	1	—	31
9	322	10	15	1	—	340
10	322	10	10	1,5	—	340

Uit de tabel volgt, dat extractie in zwak alkalisch milieu met aether alleen (1) een zeer slecht resultaat geeft, terwijl toevoeging van aethylalcohol een behoorlijke verbetering geeft (2 en 3). Een combinatie van aethylalcohol, formaldehyde-oplossing en verdunde alkali is weer veel beter, ofschoon het tocoferol hierbij nog niet geheel quantitatief wordt teruggevonden.

Uit al deze gegevens bleek, dat we op den goeden weg waren en na een aantal nieuwe proeven, werd tenslotte de volgende methode gevonden, die quantitatieve resultaten gaf.

Uitvoering der bepaling.

In een scheidrecter van 250 cm^3 worden bij 10 cm^3 serum achtereenvolgens onder menging toegevoegd:

5 cm^3 KOH 0,2 *n*, 15 cm^3 neutrale formaldehyde-oplossing 33—34 % (Pharm. Ed. V) en 15 cm^3 aethylalcohol. Daarna wordt 3 maal geëxtraheerd met 50 cm^3 peroxyde-vrijen aether. Vóór de 2e en 3e aetherextractie voegt men 10 cm^3 aethylalcohol aan de serumoplossing toe. De gecombineerde aetherextracten worden gewasschen met 25 cm^3 0,2 *n* KOH, 25 cm^3 0,2 *n* H₂SO₄ en daarna eenige malen voorzichtig (om emulsie te vermijden) met 50 cm^3 gedestilleerd water tot zuur-vrij.

Het aetherextract wordt op watervrij Na₂SO₄ gedroogd en in

vacuo onder CO_2 ingedampt. Daarna voegt men aan het residu 10 cm^3 benzol toe en dampt opnieuw in (om resten aetherdamp te verwijderen). Het residu wordt in 5 cm^3 benzol opgenomen en door een kolom ($30 \times 12 \text{ mm}$) Floridin XS-aarde gefiltreerd. De aarde wordt nagewasschen met porties van 5 cm^3 benzol (totaal 25 cm^3) en het filtraat in vacuo ingedampt (in destilleerkolfje van 100 cm^3).

Hierna wordt van een blanco-reagentia-oplossing (1 cm^3 ferri-chlorideoplossing, 1 cm^3 dipyridylopplossing, 5 cm^3 benzol en met aethylalcohol tot 25 cm^3 aangevuld) 5 cm^3 toegevoegd aan het zeer geringe residu in het destilleerkolfje. Dit wordt afgesloten en onder af en toe zwenken (terwijl het kolfje in donker wordt bewaard) wordt na 10 minuten de colorimetrische bepaling uitgevoerd. Deze wijziging in de methodiek was noodig, omdat wij steeds de reactie uitvoerden met 25 cm^3 , daar het vroeger onderzochte materiaal (tarwekiemolie b.v.) meestal voldoende tocopherol bevatte. Bij onze onderzoekingen met rattenserum bleek dit zoo weinig tocopherol te bevatten, dat een reactievolume van 25 cm^3 te groot was. Aangezien de cuvette van den photometer een inhoud heeft van $4,5 \text{ cm}^3$, kan men volstaan met het reactievolume bij de bepalingen te reduceeren tot 5 cm^3 , waardoor het mogelijk is, 5 maal kleinere hoeveelheden tocopherol te bepalen dan met de macro-methode. Met oplossingen van *dl*- α -tocopherol hebben we er ons ten overvloede van overtuigd, dat de waarden verkregen bij bepaling volgens de macro- of micro-methode volkomen identiek waren. Het is hierbij duidelijk, dat de extincties verkregen bij de micromethode door 5 moeten worden gedeeld om vergeleken te kunnen worden met de extincties bij de macromethode.

In de volgende tabel zijn een aantal waarden gegeven, waaruit blijkt, dat de door deze methode bepaalde hoeveelheid tocopherol in serum quantitatieve resultaten oplevert. *

* Wanneer we vitamine A in serum bepaalden na extractie volgens deze methode werden dezelfde waarden gevonden, als bij opwerken volgens de gebruikelijke methode (125).

Tabel XX.

Bepaling van tocopherol in runderserum (10 cm³) onder toevoeging van *dl-α*-tocopherol.

Toegevoegd <i>dl-α</i> -tocopherol (γ)	Gevonden hoeveelheid tocopherol (γ)	Terugggevonden tocopherol (0/0)
—	25	—
25	49	96
50	74	98
100	123	98
136	160	99
272	296	100

We hebben hierna het tocopherolgehalte bepaald in het serum van vrouwelijke ratten, die op een vitamine E-vrij diët waren gezet en waaraan later tocopherolpreparaten werden toegediend.

Tabel XXI.

Bepaling van tocopherol in serum van vrouwelijke ratten, die na geruimen tijd op een vitamine E-vrij diët te zijn geweest, tocopherolpreparaten kregen toegediend.

Preparaat	Dagelijksche dosis	Toediening van preparaat (dagen)	Totale dosis tocopherol (mg)	Tocopherol (γ) in 10 cm ³ serum
—	—	—	—	2
Tarwekiemolie . . .	0,4 cm ³	6	5,8	26
<i>dl-α</i> -tocopherol . . .	1 mg	6	6	31
<i>dl-α</i> -tocopherylacetaat	1 „	13	13	45

Het tocopherol werd bepaald 48 uur na laatste toediening van het preparaat. Niet alleen blijkt, dat door tocopherol toedienen het gehalte in het serum stijgt, doch bovendien, dat na het verstrekken van *dl-α*-tocopheryl-acetaat een toeneming van *dl-α*-tocopherol in het serum plaats vindt.

Tabel XXII.

Tocopherolgehalte in het serum van een aantal normale vrouwelijke en mannelijke personen.

Individu	Tocopherolgehalte (%) per 10 cm ³ serum
1 (v)	103
2 (v)	95
3 (v)	90
4 (v)	74
5 (m)	98
6 (m)	83
7 (m)	66
8 (m)	58

Deze onderzoeken dienden om een voorloopigen indruk te krijgen over het tocopherolgehalte van normaal mensenserum. Het doel der chemische bepalingsmethode voor tocopherol in serum is gelegen in de toepassing bij het probleem der abortus of steriliteit, voor zoover deze problemen bij den mensch in verband zouden kunnen staan met een vitamine E-gebrek.

HOOFDSTUK VIII.

ONDERLINGE VERGELIJKING DER CHEMISCHE BEPALINGSMETHODEN.

A. *Methodiek.*

Bij een onderlinge vergelijking der methodiek van de bepalingen volgens K a r r e r en K e l l e r, F u r t e r en M e y e r en van E m m e r i e en E n g e l kan geconstateerd worden, dat de potentiometrische methode van K a r r e r en K e l l e r verreweg het meest tijdroovend en het minst geschikt is voor seriebepalingen. De methode van F u r t e r en M e y e r en de eigen methoden zijn vrijwel even snel en zijn beiden geschikt voor seriebepalingen. Bij beide methoden wordt gebruik gemaakt van den Z e i s s - P u l f r i c h photometer.

B. *Gevoeligheid der methoden.*

De hoeveelheden tocopherol, die K a r r e r en K e l l e r gebruikten bij hun bepalingen, varieerden van 2,8 tot 12,9 mg.

Bij de methode van F u r t e r en M e y e r is volgens deze auteurs een hoeveelheid van minstens 300 γ tocopherol noodig voor een bepaling. Aangezien F u r t e r en M e y e r en ook wij denzelfden photometer gebruiken (alleen de gebruikte filters verschillen), kunnen we uit de verhouding der extincties der beide reacties hun gevoeligheid bepalen.

Bij F u r t e r en M e y e r (zie hun tabel 6) correspondeert een $E = 1$ met 480 γ *dl*- α -tocopherol per cm^3 reactievolume. Bij onze bepaling vonden we voor 100 γ *dl*- α -tocopherol in 25 cm^3 reactievolume (4 γ per cm^3) een $E = 0,147$, voor 480 γ per cm^3 is dus onze $E = 120 \times 0,147 = 17,6$.

Hieruit volgt, dat de gevoeligheid van onze reactie 17 à 18 maal

grooter is dan van die volgens *Furter* en *Meyer*. Uit de bovenstaande waarden volgt, dat alleen onze methode in aanmerking komt voor het bepalen van tocopherol in serum bij klinische onderzoeken.

C. Specificiteit der methoden.

Karrer en *Keller* vonden bij hun methode (die in principe met onze methode parallel loopt), dat carotinoïden en vitamine A eveneens goudchloride reduceerden. Ook in water oplosbare biologische stoffen, zoals cysteïne en ascorbinezuur reduceeren, doch zijn na extractie met organische oplosmiddelen niet meer aanwezig. Bij aanwezigheid van carotinoïden werd door *Karrer* en *Keller* in afzonderlijke proeven het reductievermogen bepaald, vóór en na acetyleren van het product. Het verschil tusschen beide uitkomsten is dan het reductievermogen van het tocopherol. Wanneer vitamine A aanwezig was, werd het te onderzoeken product met het reagens van *Carr* en *Price* behandeld en na regeneratie het tocopherol bepaald. Het spreekt vanzelf, dat deze manipulaties tijdrovend zijn en aanleiding kunnen geven tot verliezen. Bij onze methode worden carotinoïden en vitamine A door adsorptie verwijderd.

Volgens *Furter* en *Meyer* is hun methode specifiekier dan die van *Karrer* en *Keller* of van ons. Inderdaad geven stoffen als carotine en vitamine A geen of weinig kleur met het alcohol-salpeterzuur-reagens, doch daartegenover staat, zoals wij vonden, dat de reactie in andere opzichten ernstige bezwaren heeft. Het bleek, dat het oxydatieproduct van *dl-α-tocopherol*, het *dl-α-tocopherylchinon*, hetwelk vrijwel zeker geen biologische werkzaamheid bezit, bijna even sterke kleurintensiteit (94 %) geeft als het tocopherol zelf. Dit is niet te verwonderen, omdat de reactie van *Furter* en *Meyer* niets anders dan een oxydatie van het tocopherol is. Bovendien vonden we, dat stoffen als ergosterine en calciferol (vitamine D₂) eveneens reageerden, zij het dan, dat de kleur van het *Furter* en *Meyer* reagens met ergosterine oranje-geel, die met calciferol geel was; met tocopherol is de kleur rood. Doch deze kleuren storen bij de bepaling met het S 47 filter. Bij onderzoek van ergosterine en calciferol met de reactie volgens *Furter* en *Meyer* werd gevonden, dat deze

stoffen 42,5 resp. 19,2 % van de kleurintensiteit van *dl*- α -tocopherol gaven, terwijl deze stoffen (bepaald in hoeveelheden van 5 mg) bij onze reactie niet stoorden. Bij toepassing van onze reactie op ergosterine (32 mg) vonden de v. E u l e r s (126), dat hierbij een kleur ontstond, waarvan de intensiteit met den tijdsduur toenam (na 120 minuten kwam de kleur overeen met die van 480 γ *dl*- α -tocopherol). Bij het herhalen van deze proef vond ik echter, dat na 150 minuten reactie met zeer zuiver ergosterine (32 mg) geen verschil met een blanco te zien was.

Bij de reactie van F u r t e r en M e y e r zien we eveneens, dat sommige oliën een storende gele kleur geven. Bij de bepaling in onbekend materiaal met onze eigen methode kan die van F u r t e r en M e y e r ter vergelijking goede diensten bewijzen, omdat deze in een aantal gevallen specifiek is.

De specificiteit van onze eigen methode hangt nauw samen met die volgens K a r r e r en K e l l e r.

Evenmin als bij hen komen in onze extracten in water oplosbare reduceerende stoffen voor, terwijl wij evenals K a r r e r en K e l l e r door behandeling met alkali stoffen met phenolisch of zuur karakter verwijderen. Tevens is het bij onze methode om carotinoïden en vitamine A te verwijderen door adsorptie niet uitgesloten, dat hierbij nog andere storende stoffen geëlimineerd worden.

Bij onze onderzoeken met rattenserum kwam aan het licht, dat het tocopherolgehalte in het serum bij vitamine E-deficiëntie vrijwel tot nul daalde, wat er voor pleit, dat bij serum als uitgangsmateriaal geen andere stoffen dan tocopherol de reactie te voorschijn roepen.

Met de 3 methoden bepalen we steeds het totale tocopherolgehalte, dus zoowel α -, als β - en γ -tocopherol, waarbij de getallenwaarden worden uitgedrukt in α -tocopherol. Zooals reeds eerder werd besproken, is de chemische bepalingsfout hierbij gering, doch de biologische fout kan veel grooter zijn, aangezien de verschillende tocopherolen niet even sterk biologisch werkzaam zijn.

SAMENVATTING.

Voor de bepaling van tocopherol (vitamine E) werd een chemische methode gevonden en uitgewerkt. Deze methode berust op de oxydatie van tocopherol door ferrichloride, waarbij het ontstane ferrochloride colorimetrisch wordt bepaald door toevoeging van α : α' -dipyridyl.

Carotinoïden en vitamine A, die de reactie storen, werden verwijderd door adsorptie met Floridin XS-aarde. De methode werd uitgewerkt voor de bepaling van tocopherol in onverzepte en verzepte oliën. Het bleek, dat een bepaling in onverzepte oliën in sommige gevallen niet mogelijk is.

Tevens werd een methode voor het bepalen van tocopherol in serum uitgewerkt. In een proef op ratten bleek, dat het gehalte in het serum der proefdieren, die van tevoren op een vitamine E-vrij dieet waren geplaatst, evenredig met het toedienen steeg. Het is mogelijk, dat deze methode diensten kan bewijzen bij het onderzoek naar een E-avitaminose bij den mensch.

SUMMARY.

A colorimetric method of determination of tocopherol (vitamin E) based on the reducing properties of tocopherol towards ferric-chloride is described. The ferrous salt which is formed in the reduction is determined colorimetrically with $\alpha:\alpha'$ -dipyridyl. To investigate the tocopherol content of biological material it is necessary to remove carotenoids and vitamin A. The separation of carotenoids and vitamin A from tocopherol is carried out by adsorption with Floridin XS earth. The method of determination has been applied to saponified and unsaponified oils. In the latter case the determination is not always possible.

A method for the estimation of tocopherol in blood-serum has been devised. Administration of tocopherol preparations to rats gives an increase of the tocopherol content of the blood.

It is possible that the method can be used for obtaining information as to the existence of a human E-avitaminosis.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde eine colorimetrische Bestimmungsmethode für Tocopherol (Vitamin E) ausgearbeitet, welche auf der Reduktion von Eisen (3)-chlorid durch Tocopherol und der Bestimmung des entstehenden Eisen (2)-chlorids mit Hilfe von $\alpha:\alpha'$ -Dipyridyl beruht. Die bei dieser Methode störenden Carotinoide und das Vitamin A werden durch Adsorption mit Floridin XS-Erde entfernt. Bei Anwendung der Methode zur Bestimmung des Tocopherolgehalts von verseiften und unverseiften Ölen wurde gefunden, dass eine Bestimmung in unverseiften Ölen infolge störender Stoffe nicht immer möglich ist.

Auch die Bestimmung von Tocopherol in Blutserum wurde mit Hilfe dieser Methode durchgeführt. Verabreichung von Tocopherol-Präparaten an Ratten ruft eine Erhöhung des Tocopherolgehalts im Serum hervor. Die neue Methode könnte auch bei Untersuchungen über einer E-Avitaminose beim Menschen angewandt werden.

LITERATUUR.

1. H. A. Mattill en R. E. Conklin, *J. Biol. Chem.* **44**, 137 (1920).
2. H. M. Evans en K. J. Scott, *Science* **56**, 650 (1922).
3. H. M. Evans en K. S. Bishop, *J. Am. Med. Ass.* **81**, 889 (1923).
4. H. M. Evans en K. S. Bishop, *J. Metab. Res.* **3**, 202 (1923).
5. H. M. Evans en K. S. Bishop, *Am. J. Physiol.* **63**, 396 (1923).
6. B. Sure, *J. Biol. Chem.* **58**, 681 (1923).
7. B. Sure, *J. Biol. Chem.* **58**, 693 (1923).
8. H. H. Beard, *Am. J. Physiol.* **75**, 668 (1925-'26).
9. H. H. Beard, *Am. J. Physiol.* **75**, 682 (1925-'26).
10. K. E. Mason, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **11**, 377 (1925).
11. K. E. Mason, *J. Exp. Zool.* **45**, 159 (1926).
12. H. M. Evans en G. O. Burr, *Memoirs Univ. California*, **8** (1927).
13. V. E. Nelson, V. G. Heller en E. I. Fulmer, *J. Biol. Chem.* **57**, 415 (1923).
14. H. M. Evans, *Science* **60**, 20 (1924).
15. H. M. Evans en G. O. Burr, *J. Am. Med. Ass.* **88**, 1462 (1927).
16. H. M. Evans en G. O. Burr, *J. Am. Med. Ass.* **89**, 1587 (1927).
17. H. M. Evans, O. H. Emerson en G. A. Emerson, *J. Biol. Chem.* **113**, 319 (1936).
18. E. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 700 (1938).
19. P. Karrer, H. Fritzsche, B. H. Ringier en H. Salomon, *Helv. Chim. Acta* **21**, 520 (1938).
- ★ 20. P. Karrer en H. Keller, *Helv. Chim. Acta* **21**, 1161 (1938).
- ★ 21. A. Emmerie en Chr. Engel, *Nature* **142**, 873 (1938).
- ★ 22. M. Furter en R. E. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **22**, 240 (1939).
23. F. Grandel, *Angew. Chem.* **52**, 420 (1939).
24. E. Lester Smith en R. Bailey, *Vitamin E Symposium*, London, **18** (1939).
25. H. M. Evans, E. A. Murphy, R. C. Archibald en R. E. Cornish, *J. Biol. Chem.* **108**, 515 (1934).
26. J. C. Drummond, E. Singer en R. J. MacWalter, *Biochem. J.* **29**, 456 (1935).
27. R. E. Cornish, R. G. Archibald, E. A. Murphy en H. M. Evans, *Ind. Eng. Chem.* **26**, 397 (1934).
28. H. S. Olcott en H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.* **104**, 423 (1934).

29. J. C. Drummond, E. Singer en R. J. MacWalter, *Biochem. J.* **29**, 2510 (1935).
30. M. Tswett, *Ber. dtsch. bot. Ges.* **24**, 384 (1906).
31. A. R. Moss en J. C. Drummond, *Biochem. J.* **32**, 1953 (1938).
32. P. Bowden en T. Moore, *Nature* **132**, 204 (1933).
33. H. S. Olcott, *J. Biol. Chem.* **105**, LXV (1934).
34. J. Waddell en H. Steenbock, *J. Biol. Chem.* **80**, 431 (1928); *J. Nutrit.* **4**, 79 (1931).
35. H. S. Olcott, *J. Biol. Chem.* **107**, 471 (1934).
36. O. Isler, *Helv. Chim. Acta* **21**, 1756 (1938).
37. H. S. Olcott, *J. Biol. Chem.* **110**, 695 (1935).
38. H. A. Mattill, *J. Am. Med. Ass.* **89**, 1505 (1927).
39. M. J. Cummings en H. A. Mattill, *J. Nutrit.* **3**, 421 (1931).
40. H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.* **90**, 141 (1931).
41. H. A. Mattill en B. Crawford, *Ind. Eng. Chem.* **22**, 341 (1930).
42. H. S. Olcott en H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.* **93**, 59, 65 (1931).
43. H. S. Olcovitch en H. A. Mattill, *J. Biol. Chem.* **92**, XXXI (1931).
44. E. M. Bradway en H. A. Mattill, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 2405 (1934).
45. H. S. Olcott, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 2492 (1934).
46. H. S. Olcott en H. A. Mattill, *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1627 (1936).
47. H. S. Olcott en O. H. Emerson, *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1008 (1937).
48. O. H. Emerson, G. A. Emerson en H. M. Evans, *Science* **83**, 421 (1936).
49. P. Karrer en H. Salomon, *Helv. Chim. Acta* **21**, 514 (1938).
50. A. R. Todd, F. Bergel en T. S. Work, *Biochem. J.* **31**, 2257 (1937).
51. A. R. Moss, W. F. J. Cuthbertson, J. F. Danielli en J. C. Drummond, *J. Soc. Chem. Ind.* **57**, 133 (1938).
52. W. John, *Z. physiol. Chem.* **250**, 11 (1937).
53. O. H. Emerson, G. A. Emerson, A. Mohammad en H. M. Evans, *J. Biol. Chem.* **122**, 99 (1937).
54. P. Karrer, H. Salomon en H. Fritzsche, *Helv. Chim. Acta* **20**, 1422 (1937).
55. P. Karrer, H. Salomon en H. Fritzsche, *Helv. Chim. Acta* **21**, 309 (1938).
56. A. Windaus, *Bull. soc. chim. biol.* **20**, 1306 (1938).
57. E. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1154 (1937).
58. C. S. MacArthur en E. M. Watson, *Science* **86**, 35 (1937).
59. F. Bergel, A. R. Todd en T. S. Work, *Chem. and Ind.* 1054 (1937).
60. W. John, *Naturwiss.* **26**, 449 (1938).
61. W. John, *Z. physiol. Chem.* **252**, 222 (1938).
62. A. R. Moss, W. F. J. Cuthbertson, J. F. Danielli en J. C. Drummond, *Chem. and Ind.* 275 (1938).
63. F. Bergel, A. R. Todd en T. S. Work, *J. Chem. Soc.* 253 (1938).
64. P. Karrer, H. Fritzsche, B. H. Ringier en H. Salomon, *Helv. Chim. Acta* **21**, 820 (1938).

65. P. Karrer, H. Koenig, B. H. Ringier en H. Salomon, *Helv. Chim. Acta* **22**, 1139 (1939).
66. F. Bergel, A. Jacob, A. R. Todd en T. S. Work, *Nature* **142**, 36 (1938).
67. F. Bergel, A. Jacob, A. R. Todd en T. S. Work, *J. Chem. Soc.* 1382 (1938).
68. L. I. Smith, H. E. Ungnade en W. W. Prichard, *Science* **88**, 37 (1938).
69. O. H. Emerson, *Science* **88**, 40 (1938).
70. P. Karrer, R. Escher, H. Fritzsche, H. Keller, B. H. Ringier en H. Salomon, *Helv. Chim. Acta* **21**, 939 (1938).
71. P. Karrer, R. Escher en H. Rentschler, *Helv. Chim. Acta* **22**, 1287 (1939).
72. W. John, E. Dietzel, Ph. Günter en W. Emte, *Naturwiss.* **26**, 366 (1938).
73. W. John, E. Dietzel en W. Emte, *Z. physiol. Chem.* **257**, 173 (1939).
74. P. Karrer en H. Fritzsche, *Helv. Chim. Acta* **21**, 1234 (1938).
75. O. H. Emerson, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1741 (1938).
76. A. Jacob, M. Steiger, A. R. Todd en T. S. Work, *J. Chem. Soc.* 542 (1939).
77. P. Karrer en H. Fritzsche, *Helv. Chim. Acta* **22**, 260 (1939).
78. P. Karrer, H. Fritzsche en R. Escher, *Helv. Chim. Acta* **22**, 661 (1939).
79. P. Bowden en T. Moore, *Nature* **131**, 512 (1933).
80. A. J. P. Martin, T. Moore, M. Schmidt en F. P. Bowden, *Nature* **134**, 214 (1934).
81. H. S. Olcott, *J. Biol. Chem.* **109**, LXXII (1935).
82. F. von Werder, Th. Moll en F. Jung, *Z. physiol. Chem.* **257**, 129 (1939).
83. T. Moore en K. R. Rajagopal, *Biochem. J.* **34**, 335 (1940).
84. P. Karrer en H. Keller, *Helv. Chim. Acta* **22**, 253 (1939).
85. W. John en W. Emte, *Z. physiol. Chem.* **261**, 24 (1939).
86. G. C. Knowlton, H. M. Hines en K. M. Brinkhouse, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **41**, 453 (1939).
87. H. M. Wuest, *ref. Angew. Chem.* **52**, 429 (1939).
88. F. Verzár, *Schweiz. med. Wschr.* **69**, 738 (1939).
89. P. Vogt-Möller, *Vitamin E Symposium, London*, 57 (1939).
90. A. E. Lange, *Tierärztl. Runds.* **239** (1938).
91. F. Ender, *Z. Vitaminforsch.* **4**, 106 (1935).
92. M. J. L. Dols, *Arch. néerl. Physiol.* **22**, 372 (1937).
93. P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **22**, 334 (1939).
94. A. L. Bacharach, *Nature* **142**, 35 (1938).
95. P. Karrer en V. Demole, *Schweiz. med. Wschr.* **68**, 954 (1938).
96. A. Jacob, F. K. Sutcliffe en A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* 327 (1940).

97. P. Karrer en O. Hoffmann, *Helv. Chim. Acta* **23**, 654 (1940).
98. P. Karrer en O. Hoffmann, *Helv. Chim. Acta* **23**, 1126 (1940).
99. P. Karrer, R. G. Legler en G. Schwab, *Helv. Chim. Acta* **23**, 1132 (1940).
100. V. Demole, O. Isler, B. H. Ringier, H. Salomon en P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* **22**, 65 (1939).
101. P. Karrer en G. Bussmann, *Helv. Chim. Acta* **23**, 1137 (1940).
102. P. Karrer en A. Geiger, *Helv. Chim. Acta* **23**, 455 (1940).
103. O. H. Emerson, G. A. Emerson en H. M. Evans, *J. Biol. Chem.* **131**, 409 (1939).
104. M. D. Wright en J. C. Drummond, *Biochem. J.* **34**, 32 (1940).
105. Chr. Engel, Dissertatie, Utrecht 1941.
106. C. Golumbic, *J. Biol. Chem.* **133**, XXXVI (1940).
107. F. von Werder en Th. Moll, *Z. physiol. Chem.* **254**, 39 (1938).
108. H. M. Evans, G. A. Emerson en O. H. Emerson, *Science* **88**, 38 (1938).
109. H. M. Evans, O. H. Emerson, G. A. Emerson, L. I. Smith, H. E. Ungnade, W. W. Prichard, F. L. Austin, H. H. Hoehn, I. W. Opie en S. Wawzonek, *J. Org. Chem.* **4**, 376 (1939).
110. W. F. J. Cuthbertson, R. R. Ridgeway en J. C. Drummond, *Biochem. J.* **34**, 34 (1940).
111. F. H. Carr en E. A. Price, *Biochem. J.* **20**, 497 (1926).
112. L. K. Wolff, *Schweiz. med. Wschr.* **66**, 979 (1936).
113. P. Karrer en H. Keller, *Helv. Chim. Acta* **22**, 617 (1938).
114. F. Grandel en H. Neumann, *Z. Unters. Lebensm.* **79**, 57 (1940).
115. A. Emmerie en Chr. Engel, *Rec. trav. chim.* **57**, 1351 (1938).
116. F. Blau, *Monatsh.* **19**, 647 (1898).
117. F. Feigl en H. Hamburg, *Z. anal. Chem.* **86**, 7 (1931).
118. P. Karrer en W. Jaeger, *Helv. Chim. Acta* **22**, 314 (1939).
119. A. Emmerie en Chr. Engel, *Rec. trav. chim.* **58**, 283 (1939).
120. W. Koschara, *Z. physiol. Chem.* **232**, 101 (1935).
121. M. van Eckelen en A. Emmerie, *Acta Brevia Neerl. Physiol. Pharmacol. Microbiol.* **5**, 77 (1935).
122. Th. Sabalitschka, *Z. Unters. Lebensm.* **79**, 143 (1940).
123. A. Emmerie en Chr. Engel, *Rec. trav. chim.* **58**, 895 (1939).
124. A. Emmerie, *Rec. trav. chim.* **59**, 246 (1940).
125. M. van Eckelen en A. Emmerie, *Acta Brevia Neerl. Physiol. Pharmacol. Microbiol.* **4**, 171 (1935).
126. B. von Euler en H. von Euler, *Z. physiol. Chem.* **265**, 147 (1940).
127. L. I. Smith, W. B. Irwin en H. E. Ungnade, *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2424 (1939).
128. O. H. Emerson en L. I. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 1869 (1940); *ref. Biol. Abstr.* **15**, 205 (1941).
129. A. Herschel, Dissertatie, Utrecht 1938.

STELLINGEN.

I.

De door John en Emte voorgestelde structuurformule voor α -tocopherolrood is waarschijnlijk onjuist.

W. John en W. Emte. Z. physiol. Chem. 261, 24 (1939).

II.

De chromatographische adsorptie ter zuivering van organische stoffen dient kritisch te worden toegepast.

III.

Men diene een scherp onderscheid te maken tusschen vitaminegehalte en vitaminewaarde van een voedingsmiddel.

IV.

De critiek van Balarew op de analysemethode van Winkler, volgens welke talrijke neerslagen na droging en zonder gloeien tot weging worden gebracht, is misplaatst.

D. Balarew. Z. anal. Chem. 115, 104 (1938—1939).

L. W. Winkler. Die chemische Analyse, Band 29 (1931).

V.

Alvorens een conserveeringsmiddel in de levensmiddelen-industrie mag worden toegepast, dient dit door een officieele instantie aan een *uitgebreid* physiologisch en pharmacologisch onderzoek te worden onderworpen.

VI.

De aanwezigheid van phthiocol in *Mycobacterium tuberculosis* is niet met zekerheid vastgesteld.

R. J. Anderson en M. S. Newman. J. Biol. Chem. 101, 773 (1933).

ibid. 103, 197 (1933).

VII.

De bepaling van lactoflavine, zooals deze o.a. door Schormüller wordt uitgevoerd, is niet te verkiezen boven die, waarbij de meting van de kleurintensiteit van het lactoflavine plaats vindt.

J. Schormüller. Z. Unters. Lebensm. 77, 1 (1939).

VIII.

Pezold en Dittmar hebben niet bewezen, dat hun methode voor het bepalen van aneurine in urine de werkelijke waarde oplevert.

F. Pezold en E. Dittmar. Klin. Wschr. 19, 1234 (1940).

IX.

De veronderstelling van Gabbe en Fischer, dat bij het ont-eiwitten van bloed het ascorbinezuur aan het oxyhaemoglobine wordt geadsorbeerd, is onjuist.

E. Gabbe. Klin. Wschr. 16, 483 (1937).

M. Fischer. Biochem. Z. 292, 16 (1937).

X.

De bepaling van tocopherol in *onverzeefte* oliën volgens de ferrichloride-dipyridyl methode kan foutieve uitkomsten geven.

