DE ANTIRACHITISCHE WERKING VAN NEDERLANDSE RUWVOEDERS IN VERBAND MET HET ANTAGONISME TUSSEN CAROTEEN EN VITAMINE D

THE ANTIRACHITIC ACTIVITY OF DUTCH ROUGHAGES IN RELATION TO THE ANTAGONISM BETWEEN CAROTENE AND VITAMIN D

WITH A SUMMARY IN ENGLISH

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. J. H. BECKING,
HOOGLERAAR IN DE HOUTMEETKUNDE, DE BOSBEDRIJFSECONOMIE,
DE BOSBEDRIJFSREGELING EN DE HOUTTEELT
EN BOSBESCHERMING IN DE TROPEN,
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT
DER LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP DONDERDAG 19 JANUARI 1956 TE 16 UUR

DOOR

JAKOB WEITS

H. VEENMAN & ZONEN – WAGENINGEN – 1956

STELLINGEN

I

Wanneer bij de bepaling van het vitamine D-gehalte van voedings- en voedermiddelen een rechtstreekse extractie wordt toegepast, zonder dat bovendien een verder gaande zuivering van het aldus verkregen extract wordt uitgevoerd, leidt dit tot te lage uitkomsten.

W. WODSAK, Fette und Seifen **55** (1953) 118–122.
L. FRIEDMAN c.s., J.A.O.A.C. **38** (1955) 165–171.
J. WEITS, Neth. J. Agr. Sci. **2** (1954) 32–36.

II

Doordat de aanbevolen norm voor de vitamine D-behoefte van kalveren gebaseerd is op de proeven van BECHDEL c.s., is deze norm hoger dan nodig is, omdat hun proefrantsoen te weinig fosfor bevatte.

S. I. BECHDEL c.s., Penn. Agr. Expt. Sta. Bull. **364** (1938).
J. W. THOMAS, J. Dairy Sci. **35** (1952) 1107–1116.
Nat. Res. Counc. Rep. No. 3 (1950).

III

Het denkbeeld, dat gejodeerd caseïne naast thyroxine een tweede hormoon bevat, dat de melkproduktie verhoogt zonder de stofwisseling verder te beïnvloeden, wordt door de proeven van POULSEN met lacterende geiten en koeien niet aannemelijk gemaakt.

E. POULSEN, **240**. Beretning fra Forsøgslaboratoriet (1949).
C. R. HARINGTON, Biochem. J. **20** (1926) 293–299.
J. WEITS, Neth. J. Agr. Sci. **1** (1953) 39–43.

IV

Naar aanleiding van het feit, dat op grond van proeven van HOUET wordt beweerd, dat het vitamine D_3 voor zuigelingen tweemaal zo werkzaam is als het vitamine D_2, dient bezwaar gemaakt te worden tegen zijn methodiek en de interpretatie van zijn uitkomsten.

R. HOUET, Ann. Paediatrici 167 (1946) 225–234.
R. HOUET, Ann. Paediatrici 172 (1949) 28–38.
K. LANG en R. SCHOEN, die Ernährung (1952).

V

Om een inzicht te krijgen in de kwaliteit van gepasteuriseerde melk, dient de bepaling van het kiemgetal, zoals deze in het Melkbesluit wordt geëist, vervangen te worden door een duurzaamheidsproef.

TH. E. GALESLOOT, Neth. Milk and Dairy J. **5** (1951) 75–93; 94–103.
TH. E. GALESLOOT, Neth. Milk and Dairy J. **6** (1952) 283–301.
TH. E. GALESLOOT, Neth. Milk and Dairy J. **7** (1953) 1–14; 15–40.

VI

De omstandigheid dat het gebied der selectiemesterijen provinciaal afgebakend is, bemoeilijkt het onderling vergelijken van de verkregen gegevens.

VII

MOHR heeft niet voldoende bewijzen aangevoerd voor zijn opvatting, dat de continue vetfase van boter geen intacte vetbolletjes bevat.

W. MOHR c.s., Milchwissenschaft **10** (1955) 117–119.
H. MULDER, Zuivelonderzoek, Deel II (1947).

VIII

Het verdient aanbeveling dat de jeugd wordt voorbereid tot de gezinstaak door middel van een daartoe strekkend onderwijs.

IX

Het verstrekken van schoolmelk dient niet alleen bepleit te worden op grond van het te geringe melkgebruik van de schoolkinderen in de steden, maar evenzeer op grond van dezelfde tekortkoming in de voeding van de schooljeugd op het platteland.

X

Dat de oud-Nederlandse tinglazuur-tegel in de woning als wandtegel is gebruikt en niet als vloertegel, kan niet alleen verklaard worden uit een Spaans-Portugese invloed.

E. NEURDENBURG, Heemschutserie, Deel 35 (1947).

XI

JEREMIA 14:6 kan gezien worden als een beschrijving van de symptomen, voortvloeiend uit een vitamine A-deficiëntie.

VOORWOORD

Zoals het bereiken van een mijlpaal in het leven veelal de aanleiding vormt tot een terugblik, zo biedt ook het voltooien van dit proefschrift mij daartoe de gelegenheid.

Mijn gedachten gaan dan terug naar de stad Groningen, waar ik op de O. Q. van Swinderenschool en het Willem Lodewijk Gymnasium de basis voor mijn opleiding aan de Landbouwhogeschool gelegd mocht zien.

Hooggeleerde BROUWER, hooggeachte promotor, dat ik onder Uw leiding met dit proefschrift mijn studie heb mogen afronden, stemt mij tot grote voldoening. Uw grote toewijding voor de fysiologie der landbouwhuisdieren en de daaraan verwante gebieden heeft bij mij, evenals bij zovele van Uw leerlingen, een wezenlijke belangstelling voor deze tak van wetenschap opgewekt.

Hooggeleerde VAN DER BURG, Hooggeleerde SMIT, Weledelgestrenge LEIGNES BAKHOVEN, dat U, ieder op de U eigen manier, mede de laatste hand hebt gelegd aan mijn opleiding tot landbouwkundige, beschouw ik als een groot voorrecht.

Voorts dank ik U, oud-Hoogleraren, Hoogleraren, Lectoren en Docenten van de Landbouwhogeschool voor het onderwijs, dat ik van U ontving.

I am greatly indebted to Dr. KATHLEEN M. HENRY, who corrected the English text and who made several valuable suggestions.

Mijn collegae te Wageningen ben ik zeer erkentelijk voor onze prettige verstandhouding, die de basis schiep voor een voor mij zo vruchtbare uitwisseling van denkbeelden.

Ook mijn oud-collegae te Weesp, die mij steeds bij mijn onderzoek met hun adviezen terzijde hebben gestaan, breng ik mijn hartelijke dank.

Het personeel van het Laboratorium voor Fysiologie der Dieren komt eveneens een woord van dank toe. In het bijzonder geldt dit Mejuffrouw ZANDERS, die gedurende enige tijd op bekwame wijze de haar toebedeelde taak in dit onderzoek heeft verricht, de Heer VAN KLEEF, die steeds op nauwgezette wijze onze proefdieren heeft verzorgd en de Heer VAN EDEN, die de tekeningen voor dit proefschrift heeft vervaardigd.

Met erkentelijkheid vermeld ik de steun, die de Firma PHILIPS-ROXANE N.V. te Weesp mij in verschillende opzichten heeft verleend.

Je remercie aussi la Maison HOFFMANN-LA ROCHE à Bâle de la vitamine A et du carotène synthétique qu'elle a mis gracieusement à notre disposition pour nos essais.

Voorts betuig ik allen, die op enigerlei wijze hebben bijgedragen tot de voltooiing van dit proefschrift, mijn welgemeende dank.

INHOUD

HOOFDSTUK I. Inleiding en motivering van het onderzoek 2

HOOFDSTUK II. Literatuuroverzicht betreffende het vitamine D-gehalte van enige ruwvoedermiddelen . . . . . .
1. Inleiding 4
2. Periode van de kwalitatieve vitamine D-bepalingen (1925–1934) 4
3. Periode van de kwantitatieve vitamine D-bepalingen (1934–heden) 6
4. Samenvatting van de aangehaalde literatuur 14

HOOFDSTUK III. De bepaling van het vitamine D in ruwvoedermiddelen . . . . . .
1. Inleiding 15
2. De mengmethode 16
3. De extractiemethode 18
4. Experimenteel gedeelte 19
5. Uiteindelijk voorschrift voor de bepaling van het vitamine D in ruwvoeders . . 26
6. De biologische bepaling van het vitamine D 27

HOOFDSTUK IV. De vitamine D-werking van een aantal Nederlandse ruwvoeders . . . .
1. De vitamine D-werking 28
2. De vitamine D-voorziening van herkauwers in Nederland 33

HOOFDSTUK V. Literatuuroverzicht over de factoren, die het vitamine D tegenwerken. . .
1. Inleiding 37
2. Factoren die de werking van het vitamine D tegengaan 37
3. Het vitamine A als „antagonist" van het vitamine D 41

HOOFDSTUK VI. Experimenteel gedeelte over de identiteit van de antivitamine D-factor .
1. Inleiding 44
2. Experimenteel gedeelte 45

HOOFDSTUK VII. Onderzoek naar de wisselwerking tussen vitamine D en caroteen (vitamine A) . . . . . .
1. Experimenteel gedeelte 51
2. Bespreking der uitkomsten 56
3. Theoretische beschouwingen over het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A) 60

Samenvatting 67
Summary 68
Literatuur 70

HOOFDSTUK I

INLEIDING EN MOTIVERING VAN HET ONDERZOEK

Het vitamine D neemt onder de vitamines een bijzondere plaats in doordat het onder invloed van de ultraviolette stralen wordt gevormd. Dit heeft verschillende gevolgen. In de eerste plaats brengt dit mee, dat een vitamine D-tekort met de gevolgen daarvan in eerste instantie in de winter verwacht mogen worden, aangezien de zon dan niet zo hoog boven de horizon komt, dat de ultraviolette stralen het aardoppervlak bereiken. Bovendien verblijven de landbouwhuisdieren dan in de stal zonder van het zonlicht te kunnen profiteren.

Een tweede gevolg is, dat de geologische ligging en het klimaattype een belangrijke invloed op de vitamine D-vorming uitoefenen. Reeds in het eind der negentiende eeuw werd vastgesteld, dat rachitis in Europa en Amerika het meest voorkwam in de gematigde luchtstreken (PALM, 1890). Derhalve mogen uitkomsten en conclusies betreffende de vitamine D-vorming en -voorziening niet overal zonder meer overgenomen worden, zodat de behoefte aan gegevens, die op het eigen land betrekking hebben, zeer groot is.

In dit verband ging onze belangstelling om verschillende redenen uit naar de voeding van het rundvee. Bij deze landbouwhuisdieren kunnen zich, evenals bij de mens, rachitis en osteomalacie-achtige verschijnselen voordoen, die ook in Nederland zijn vastgesteld (WESTER, 1929, 1931).

Uitvoerige onderzoekingen (BECHDEL c.s., 1933; RUPEL c.s., 1933; GULLICKSON c.s., 1935; BECHTEL c.s., 1936a; BECHDEL c.s., 1938) hebben doen zien dat de symptomen, veroorzaakt door vitamine D-tekort meestal betrekking hebben op een storing in de Ca- en P-stofwisseling, zoals afwijkende beenstanden, dikke gewrichten, naar boven gekromde rug, langzame stijve gang, het moeilijk gaan staan en gaan liggen en krampen. Vrijwel steeds worden gelijktijdig lage Ca- en P- en hoge fosfatasegehaltes in het bloedserum waargenomen terwijl het beenasgehalte duidelijk te laag blijkt te zijn. COLOVOS c.s. (1951) hebben waargenomen, dat de eiwit- en energiestofwisseling bij kalveren door gebrek aan vitamine D ongunstig beïnvloed zou worden.

De deficiëntieverschijnselen, die bij melkvee kunnen optreden tengevolge van vitamine D-tekort, hebben eveneens betrekking op een abnormale Ca- en P-stofwisseling (WALLIS, 1938a, 1946). Bovendien is waargenomen, dat de bronst achterwege blijft of dat de kalveren van deze dieren een geringe vitaliteit vertonen en dat de melkgift daalt. Omgekeerd mag uit het waarnemen van een of meer van deze symptomen in de praktijk niet zonder meer tot een vitamine D-tekort worden besloten, aangezien de meeste niet specifiek zijn. Bovendien zijn ze in de experimenten, beschreven in de aangehaalde literatuur kunstmatig op-

gewekt op rantsoenen zonder vitamine D. Dergelijke ongecompliceerde gevallen zullen in de praktijk niet gauw aangetroffen worden, zodat de deficiëntieverschijnselen zich minder duidelijk zullen voordoen (WALLIS, 1952). Pogingen om dus een niet optimale vruchtbaarheid of melkproduktie (ABRAMS, 1952) of op tetanie gelijkende ziektesymptomen (NEHLER, 1954) in verband te brengen met een mogelijk vitamine D-tekort, dienen dan ook met enige reserve bezien te worden.

Om zich nu een indruk te vormen van de vitamine D-voorziening van rundvee en tevens van de antirachitische werking van de ruwvoeders, kunnen voederproeven met deze dieren zelf uitgevoerd worden. Het beste kunnen hiervoor nog niet volwassen dieren genomen worden, die tijdens deze proeven regelmatig onderzocht moeten worden om na te gaan, of er symptomen optreden, welke op een vitamine D-tekort wijzen.

Aan de andere kant kan ook overgegaan worden tot het bepalen van vitamine D-gehaltes van ruwvoeders. Om langs deze weg echter iets te kunnen zeggen omtrent de vitamine D-voorziening van rundvee, zal men op de hoogte moeten zijn van de behoefte. Voor kalveren is deze tamelijk goed bekend (HUFFMAN c.s., 1935a; LONG c.s., 1936; BECHDEL c.s., 1938), voor melkkoeien nog maar bij benadering (WALLIS, 1946), zodat verder onderzoek op dit punt gewenst is (Nat. Res. Counc. Rep. Nr 3, 1950; GUILBERT c.s., 1951).

Er bestond voor ons een bijzondere overweging om deze laatste werkwijze te kiezen. BROUWER c.s. hadden reeds in 1931 vastgesteld, dat goed gewonnen Nederlands hooi en stro een niet onaanzienlijke hoeveelheid vitamine D bevatten. Er zijn echter sindsdien in Nederland methodes toegepast bij het verduurzamen van gras, die belangrijke gevolgen moeten hebben ten aanzien van het vitamine D-gehalte der voedermiddelen en het vitamine D-aanbod van rundvee. Deze nieuwe methodes brengen namelijk mee, dat de invloed van het zonlicht tijdens het conserveringsproces geringer wordt of zelfs geheel wordt uitgesloten. Voorheen toch was de hooibereiding vrijwel de enige methode, die voor het conserveren van gras gebruikt werd. Het gras werd daarbij uitgespreid op het land in de zon gedroogd, zodat er gunstiger voorwaarden bestonden voor de vorming van het vitamine D. Geleidelijk is men ertoe overgegaan een deel van het gras te ensileren en kunstmatig te drogen. Ook de hooibereiding heeft veranderingen ondergaan. Een zeer belangrijk percentage van het gras wordt thans op ruiters gedroogd en hier en daar gaat men reeds over tot het winnen van schuurhooi.

Een onderzoek van deze produkten leek dan ook zeker gewenst om het vermoeden, dat hierin lagere vitamine D-gehaltes voor zouden kunnen komen, te toetsen. De uitkomsten hiervan zijn in zeer korte vorm reeds gepubliceerd om de Voorlichtingsdienst niet nodeloos lang op gegevens te laten wachten (WEITS, 1952a, 1953).

Hiermee had, zoals aanvankelijk ook de bedoeling was, dit onderzoek afgesloten kunnen worden. Tijdens het onderzoek van de monsters, die uit verschillende delen van het land verzameld waren bleek echter, dat de door ALLEMANN (1942) voor het bepalen van vitamine D-gehaltes in ruwvoeders uitgewerkte methode veranderd diende te worden, zodat hiervoor een verbeterde werkwijze ontwikkeld moest worden.

Tenslotte leverde het onderzoek nog een andere, niet vermoede complicatie op die tot de slotsom leidde, dat er in bepaalde ruwvoeders naast vitamine D eveneens een stof voor moet komen, die het vitamine D tegenwerkt. Aangezien deze

waarneming voor de voeding alsook voor de standaardisatie der vitamine D-bepalingen voldoende belangrijk werd geacht voor verder onderzoek, is ook hieraan de nodige aandacht geschonken.

HOOFDSTUK II

LITERATUUROVERZICHT BETREFFENDE HET VITAMINE D-GEHALTE VAN ENIGE RUWVOEDERMIDDELEN

1. INLEIDING

Het in dit hoofdstuk te geven overzicht over het vitamine D-gehalte van ruwvoedermiddelen zal beperkt blijven tot hetgeen bekend is van gras, lucerne en hieruit door conservering gewonnen produkten, zoals: opper-, ruiter- en schuurhooi, kunstmatig gedroogd gras en al of niet voorgedroogd kuilvoer. Deze voedermiddelen kunnen hoeveelheden vitamine D bevatten, die voor de voeding der dieren van belang zijn, in tegenstelling met de meeste andere ruwvoedermiddelen, die vrijwel zonder uitzondering in dit opzicht niet van betekenis zijn. Een uitzondering hierop vormen de verschillende strosoorten. De zoëven met name genoemde voedermiddelen vormen tijdens de stalperiode het overwegend voedsel van verschillende soorten landbouwhuisdieren.

Onze kennis aangaande het vitamine D vertoont nog belangrijke hiaten. In dit verband kan gewezen worden op het gebrek aan kennis omtrent de wijze, waarop het vitamine D zijn werking in het lichaam uitoefent en omtrent de antirachitische invloed van zonlicht, wanneer men deze kwantitatief zou willen bezien; hetzelfde geldt voor de grootte van de vitamine D-reserve die gedurende de zomer door de dieren wordt aangelegd en voor de vitamine D-gehaltes der ruwvoeders. Dit laatste is voornamelijk een gevolg van het feit dat voor vitamine D-bepalingen nog steeds omslachtige biologische methodes onmisbaar zijn, zodat er van seriebepalingen vrijwel geen sprake is.

De tijd, waarin de onderzoekingen over het vitamine D-gehalte van ruwvoedermiddelen vallen, kan in twee periodes gesplitst worden, namelijk een periode, waarin alleen nog maar kwalitatief werd gewerkt en voorts een periode, waarin dit kwantitatief gebeurde.

2. PERIODE VAN DE KWALITATIEVE VITAMINE D-BEPALINGEN (1925–1934)

In dit tijdvak heeft men hoofdzakelijk de anti-rachitische werking van verschillende en verschillend gewonnen ruwvoedermiddelen onderling met elkaar vergeleken zonder tot een absoluut vitamine D-gehalte te komen. Wel heeft men hiervoor enige tijd grootheden zoals de STEENBOCK- en OSLO-eenheid gebezigd; maar deze eenheden hebben geen stand kunnen houden.

Reeds vóór 1922, het jaar waarin het vitamine D als afzonderlijk nutriënt werd onderkend, hadden HART en STEENBOCK het vermoeden uitgesproken, dat er in lucernehooi een vitamine zou voorkomen, dat een gunstige invloed zou uitoefenen op de negatieve kalkbalansen van koeien tijdens de eerste helft van de lactatieperiode. Dit criterium was echter allerminst geschikt om te komen tot de ontdekking van het vitamine D en het vaststellen van de antirachitische werking

van ruwvoeders. Dit werd anders, zodra men zijn toevlucht nam tot een gevoeliger criterium, namelijk de veranderingen die zich bij het verstrekken van vitamine D afspelen in de tibiae en femora van rachitische jonge ratten.

Zo konden STEENBOCK c.s. (1925) als eersten aantonen, dat de antirachitische werking van hooi sterker is naarmate het langer in de zon heeft gelegen. Ongunstige weersomstandigheden verminderden deze werking merkbaar, zonder ze evenwel geheel te doen verdwijnen. In vers gras vonden zij, na drogen buiten toetreden van het zonlicht, geen vitamine D.

Later onderzochten HART c.s. (1929) monsters hooi, afkomstig uit Amerikaanse Staten, die sterk uiteenlopen in hoogteligging en klimaat. Ofschoon de antirachitische werking van goed gewonnen hooi uit deze Staten niet veel verschilde, namen zij wederom waar, dat langere bestraling door het zonlicht een sterkere antirachitische werking aan het hooi verleende.

In Nederland onderzochten BROUWER c.s. (1931) onder andere het vitamine D-gehalte van goed gewonnen hooi en stro en zij gingen tevens na, welke de invloed was van matige hooibroei. Zij kwamen tot de conclusie, dat goed gewonnen Nederlands hooi een niet onaanzienlijke hoeveelheid vitamine D bevat en dat een matige broei het gehalte aan vitamine D niet belangrijk doet afnemen. Verrassend waren de uitkomsten verkregen met stro. Het onderzoek van enkele strosoorten, waaronder haver-, gerste-, tarwe- en groene erwtenstro, wees uit dat ook goed gewonnen Nederlands stro een niet onaanzienlijke hoeveelheid vitamine D bevat. Dat de genezing, die zij bij rachitische ratten waarnamen, inderdaad aan het vitamine D moest worden toegeschreven, toonden zij aan door aan het rachitogene rattenvoer het etherextract van stro toe te voegen. Ook nu trad genezing op.

SCHEUNERT c.s. (1931) onderzochten vers gras en gingen in het bijzonder na of verschillende grassoorten in vitamine D-gehalte verschilden, alsook wat de invloed was van bemesting en grondsoort. Negen monsters vers gras, waaronder timothee, Engels en Frans raaigras, bleken alle een antirachitische werking te vertonen; het duidelijkst bleek dit bij kropaar en beemdgras. Andere monsters van beide laatstgenoemde grassen bleken echter volkomen zonder enige werking te zijn. Daarom meenden zij, dat men van te voren niets kan zeggen over het eventuele vitamine D-gehalte van vers gras. Bemesting met kunstmest had geen invloed, de grondsoort misschien wel, ofschoon de aanwijzing hiervoor zeer zwak was.

In verband met de belangstelling, die ontstond voor het kunstmatig drogen van lucerne, ging RUSSELL (1930) na wat de invloed hiervan was op het caroteen- en vitamine D-gehalte. Zijn waarneming, dat kunstmatig gedroogde lucerne zeven maal zo rijk aan caroteen was als hooi, heeft in Amerika de stoot gegeven tot het in bedrijf stellen van verschillende drogerijen. Het kunstmatig gedroogde produkt bleek een geringe antirachitische werking te vertonen, welke overeenkwam met die van vers gras, in diffuus daglicht binnenshuis gedroogd. Werd de lucerne in de zon gedroogd, doch bij slecht weer en 's nachts tijdelijk binnengehaald, dan nam de antirachitische werking toe.

Een onderzoek van SMITH c.s. (1933) leverde geen nieuwe gezichtspunten op. Verse, in een donkere ruimte gedroogde lucerne bleek geen spoor vitamine D te bevatten. Een monster dat twee dagen buiten had gelegen, vertoonde een matige, een monster dat een week buiten had gelegen, een aanzienlijke antirachitische werking.

Hiervan afwijkende uitkomsten echter verkregen HODGSON c.s. (1934) met

vers gras, kunstmatig gedroogd gras en hooi. Merkwaardigerwijs constateerden zij in alle drie monsters een even sterke antirachitische werking.

Bij een terugblik over deze periode blijkt, dat de invloed van zonlicht zeer gunstig is voor het uiteindelijk vitamine D-gehalte. De opmerking van STEENBOCK c.s. (1925), dat men hooi moet winnen als de zon schijnt, is alleen in zo verre juist gebleken, dat een hoeveelheid zonlicht voor het droogproces inderdaad node kan worden gemist en gunstig is voor de vitamine D-vorming. Men moet er evenwel nooit naar streven hooi te winnen met een zo hoog mogelijk vitamine D-gehalte, omdat hier ernstige caroteenverliezen tegenover staan.

Verder blijken vers gras en verse lucerne niet steeds een aantoonbare hoeveelheid vitamine D te bevatten, terwijl dit in de regel enige dagen na het maaien wel het geval is.

3. PERIODE VAN DE KWANTITATIEVE VITAMINE D-BEPALINGEN (1934–HEDEN)

Dat men na 1931 van kwalitatieve vitamine D-bepalingen kon overgaan op kwantitatieve, werd door verschillende omstandigheden mogelijk gemaakt. In de eerste plaats werd in 1931 door een commissie van de Volkenbond aanbevolen om een oplossing van bestraald ergosterol, uitgegeven door het „National Institute of Medical Research", als internationaal standaardpreparaat te gebruiken. De werking van 1 mg van deze oplossing in olijfolie werd beschouwd als overeen te komen met één internationale eenheid. Verder waren er geschikte rachitogene rantsoenen voor ratten en gevoelige criteria voor het vaststellen van de graad van rachitis bij deze dieren gevonden en met deze criteria kon het verband tussen dosis en graad van genezing vastgesteld worden.

Fundamenteel werk is in de jaren na 1931 vooral verricht over de vitamine D-bepalingen in tranen en oliën en de hierbij uitgewerkte methodiek is later dienstbaar gemaakt aan het onderzoek van lucerne en andere voedermiddelen. Lang niet altijd evenwel heeft men er zich voldoende van overtuigd of deze methodiek zonder meer geschikt is voor het onderzoek van calcium- en fosforbevattende voedermiddelen. Er bestaat immers een nauwe wisselwerking tussen de genoemde mineralen en vitamine D bij het voorkomen en genezen van rachitis, zodat de vraag rijst of men bij het verstrekken van hooi aan ratten niet eerder een „bruto genezing" tengevolge van calcium, fosfor en vitamine D samen dan wel de genezing tengevolge van enkel het vitamine D waarneemt. Het vraagstuk van de methodiek van vitamine D-bepalingen in ruwvoedermiddelen zal daarom in hoofdstuk III nog nader worden bezien.

SCHEUNERT c.s. (1934) konden in verse lucerne geen vitamine D aantonen en in een monster kunstmatig gedroogde lucerne vonden zij slechts een zeer geringe hoeveelheid. Op ruiters en in de zon gedroogd bleek deze lucerne 300 i.e. per kg droge stof te bevatten. SCHEUNERT c.s. menen daarom dat verse lucerne geen vitamine D bevat, dat van enig verlies tijdens kunstmatig drogen dan ook geen sprake kan zijn en dat het vitamine D na het maaien onder invloed van het zonlicht ontstaat. Ruiteren of gewoon hooien zou voor het uiteindelijk vitamine D-gehalte geen verschil maken.

Gedeeltelijk hiermee in strijd is een mededeling van RYGH (1934a), die na een buitengewoon zonnige zomer in Noorwegen onderzocht hoe hoog het vitamine D-gehalte was van hooi, ruiterhooi en kunstmatig gedroogd gras. Zowel gewoon

hooi als ruiterhooi bleken 1000 i.e. vitamine D per kg te bevatten, terwijl dit van kunstmatig gedroogd gras 6000 i.e. per kg bleek te zijn. Het kunstmatig drogen zou volgens hem dus gunstig zijn voor het vitamine D-gehalte. Uit een andere mededeling van RYGH (1934b) blijkt echter, dat eenzelfde monster kunstmatig gedroogd gras maar 150 i.e. vitamine D per kg bevatte, hetgeen beter overeenkomt met onze denkbeelden omtrent de wijze waarop vitamine D ontstaat.

WALLIS (1938) stelde zich de vraag hoe het staat met het vitamine D-gehalte van blad en stengel van lucerne, omdat bij de hooiwinning tamelijk veel blad verloren gaat. Lucerneblad nu bleek na drogen in de zon zes maal zo veel vitamine D te bevatten als de stengel, terwijl het monster als geheel ongeveer 6000 i.e. per kg bevatte.

In het verslag van een voederproef, waarbij WALLIS (1939) onderzocht welk percentage van het verstrekte vitamine D in de melk overgaat, gaf hij op, dat het hierbij gebruikte lucernehooi 1100 i.e. per kg en het prairiehooi 550 i.e. per kg bevatte. Van het vitamine D ging 1–2 procent in de melk over, een percentage, dat vrijwel overeenkomt met hetgeen door andere onderzoekers is gevonden.

Een omvangrijk onderzoek over het vitamine D-gehalte van klaver is verricht door ALLEMANN (1942) in Zwitserland. De praktische waarde ervan wordt echter iets verminderd doordat hij uitsluitend werkte met het blad. Zijn werk is niettemin van belang, omdat iets meer licht wordt geworpen op de factoren, die van invloed zijn op het vitamine D-gehalte. De samenvattende tabel 1, ontleend aan zijn werk, geeft hiervan een denkbeeld.

Verse klaver bleek een matige hoeveelheid vitamine D te bevatten, die door

TABEL 1. Vitamine D-gehalte van klaverblad, op verschillende manieren geconserveerd (i.e. / kg ds) (ALLEMANN, 1942).
Vitamin D content of clover leaves cured in different ways (i.u./kg D.M.).

	Vitamine D-gehalte *Vitamin D content*	% vermeerdering resp. vermindering *% gain or loss*
1. Verse klaver . . . . . *Fresh*	265	–
2. Verse klaver in schaduw gedroogd . . . . *Fresh, dried in the shade*	103	– 61,13
3. Als 2) en daarna 30 min. bestraald door kwiklamp . . . . . *As 2), then irradiated for 30 min by mercury lamp*	1495	+464,15
4. Op ruiters gedroogd . . . . . *Frame-dried*	126	– 52,45
5. Kunstmatig gedroogd . . . . . *Artificially dried*	260	–
6. In Alpen gedroogd op 564 meter hoogte . *Cured in Alps, altitude 564 metres*	950	+259,49
7. Als 6) op 2064 meter hoogte . . . . . *As 6), altitude 2064 metres*	1390	+424,52
8. Als 6), in hooiberg gebroeid . . . . . *As 6), overheated in haystack*	855	+222,64
9. Ingekuild met A.I.V.-zuur . . . . . *Ensiled, AIV method*	30	– 88,67
10. Ingekuild met rietsuiker . . . . . *Ensiled with cane sugar*	76	– 71,32

drogen in de schaduw aanzienlijk afnam. De oorzaak hiervan is niet bekend. Hetzelfde proces was er waarschijnlijk aansprakelijk voor te stellen, dat op ruiters gedroogde klaver aanzienlijk minder vitamine D bevatte dan het verse uitgangsmateriaal. De zeer grote invloed van zonlicht bleek uit de sterke verhoging van het vitamine D-gehalte door drogen in de Alpenzon. Dat de bestraling door zonlicht, vooral in laag gelegen landen als het onze, met een minder sterke vitamine D-vorming gepaard gaat, lijkt waarschijnlijk op grond van de toeneming van het vitamine D-gehalte door bestraling met een kwiklamp gedurende een half uur. Dit gaf nog iets hogere gehaltes dan 16 uur zonlicht op een hoogte van ruim 2000 meter. Dat vitamine D betrekkelijk stabiel is, werd bewezen door het vitamine D-gehalte van het monster, dat in een hooiberg matig had gebroeid. Dit gehalte was namelijk niet sterk verminderd. Dat inkuilen met A.I.V.-zuur of met toevoegingen, waaruit organische zuren ontstaan, uiterst schadelijk is voor het vitamine D, bleek uit de lage gehaltecijfers der ingekuilde monsters in vergelijking met dat van het verse uitgangsmateriaal. Overigens wordt deze invloed door de uitkomsten van andere onderzoekers allerminst bevestigd.

De waarneming van ALLEMANN dat gras een hoger vitamine D-gehalte vertoonde, naarmate het afkomstig was van een hoger gelegen Alpenweide, kon door BIANCA (1952) niet bevestigd worden. In gras van Alpenweiden vond hij namelijk een geringere hoeveelheid vitamine D dan in gras afkomstig uit dalen.

BECKER (1943) verrichtte een uitgebreid onderzoek in Hongarije over het vitamine D- en caroteen-gehalte van gras en vlinderbloemigen. Zijn werk heeft een meer praktische opzet, omdat hij uit alle delen van het land praktijkmonsters verzamelde, die werden onderzocht in de tijd, dat het betreffende hooi in hoofdzaak werd gevoederd. Uit het grote aantal monsters dat werd onderzocht bleek duidelijk (tabel 2), dat het vitamine D-gehalte zeer sterk kan variëren. Tevens bleek, dat vlinderbloemigen gemiddeld betere vitamine D-bronnen waren dan grassen. BECKER zelf is van mening, dat de waargenomen gehaltes maar matig zijn.

TABEL 2. Vitamine D-gehalte van enige hooisoorten (i.e./kg met 16 % vocht) (BECKER, 1943).
Vitamin D content of partly dried (16 % moisture) hay (i.u./kg).

Hooisoort *Type of hay*	Aantal monsters *Number of samples*	Vitamine D-gehalte *Vitamin D content*
Grashooi (*Grass*)	9	77 (0–400)
Lucernehooi (*Lucerne*)	61	227 (0–1400)
Rode klaverhooi (*Red clover*)	28	221 (0–1200)
Esparcettehooi (*Sainfoin*)	5	120 (0–400)

Interessant is een publikatie van WALLIS (1944) uit Amerika, die een aantal suggesties bevat omtrent de vraag hoe lucerne geoogst moet worden om een zo hoog mogelijk gehalte aan caroteen en vitamine D te krijgen. Daartoe dient men de lucerne eerst enige uren in het zwad te laten liggen en daarna in niet al te grote wallen te harken. Het caroteenverlies is dan gering, terwijl het vitamine D-gehalte aanzienlijk stijgt. Het zou mogelijk zijn òf meer caroteen te behouden òf meer vitamine D te verkrijgen; maar dit gaat dan ten koste van het andere vitamine. Uit de grafieken van WALLIS (fig. 1) blijkt, dat het vitamine D-gehalte ge-

durende de eerste drie dagen slechts langzaam toenam en vrijwel in het geheel niet steeg, wanneer de lucerne dadelijk in oppers werd gezet. Het keren van de lucerne gaf uiteindelijk een extra winst van ongeveer 200 i.e. per kilogram. WALLIS is van mening, dat zonlicht niet de enige factor kan zijn, die voor het uiteindelijk vitamine D-gehalte van belang is, aangezien partijen hooi, gewonnen onder overeenkomstige omstandigheden, sterk kunnen variëren in vitamine D-gehalte. Volgens zijn gegevens schommelt het gehalte van lucernehooi tussen 660–2200 i.e. per kilogram met een gemiddelde van 1100–1200 i.e. per kilogram. Lucernehooi wordt door hem als één van de beste natuurlijke vitamine D-bronnen beschouwd.

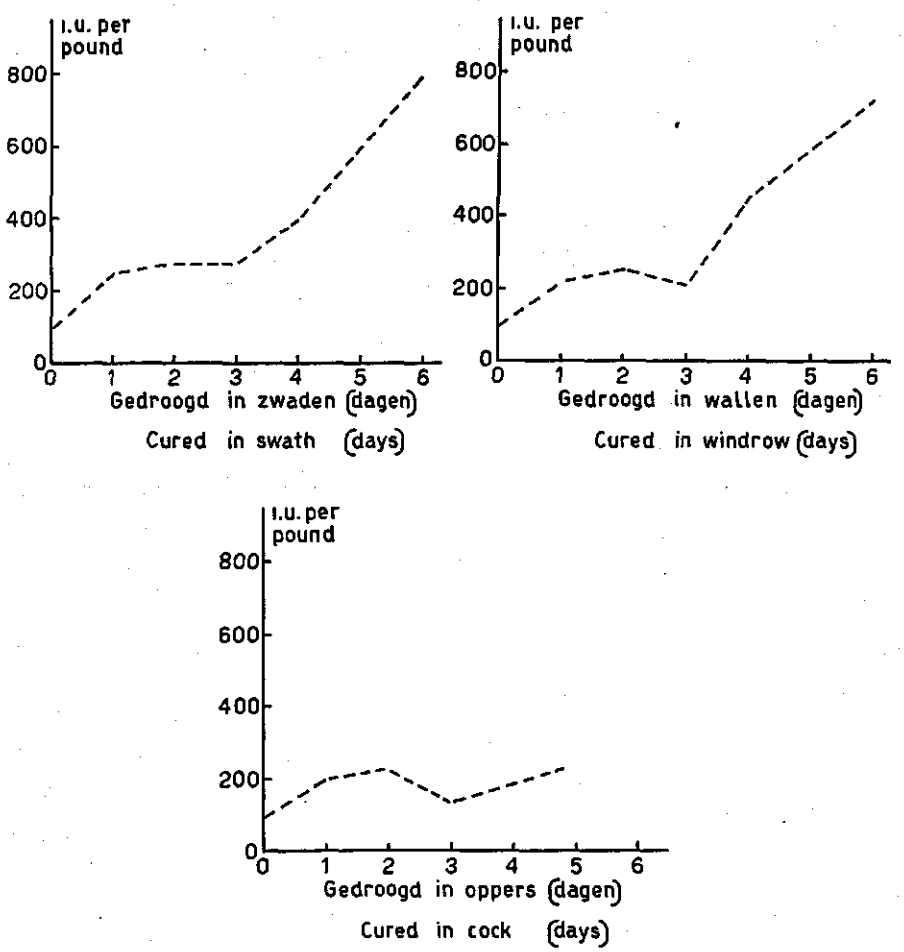


FIG. 1. Vitamine D in lucernehooi (WALLIS, 1944).
Vitamin D in alfalfa hay.

Een en ander brengt WALLIS (1946) nogmaals naar voren in een publikatie, waarin hij tevens op grond van eigen waarnemingen tot een schatting komt van de vitamine D-behoefte van melkvee.

Het verloop van het vitamine D-gehalte met de tijd, gerekend van het maaien af, is eveneens nagegaan door NEWLANDER c.s. (1952). Aangezien zij niet vermelden hoe het gewas na het maaien is behandeld, is het onmogelijk een vergelijking te maken met de reeds genoemde gegevens van WALLIS (1944). In ieder geval doen de uitkomsten duidelijk zien (tabel 3), dat na het maaien een sterke stijging van het vitamine D-gehalte intreedt.

TABEL 3. Ontstaan van vitamine D na het maaien (NEWLANDER, 1952).
Rate of vitamin D formation in hay.

Perceel *Lot No.*	Gewas *Type of crop*	Maaidatum *Cut*	Monsterneming *Sample collected*	i.e./kg *U.S.P./kg*
1	Bromusgras met lucerne *Brome and alfalfa*	28-6-'50, 7 uur	28-6-'50, 7 uur	110
			28-6-'50, 19 uur	200
			29-6-'50, 12 uur	<1000
			30-6-'50, 10 uur	1600
2	Lucerne 2e snee *Alfalfa, 2nd cutting*	15-8-'50, 7 uur	15-8-'50, 7 uur	70
			16-8-'50, 11 uur	280
			17-8-'50, 16 uur	<2000
3	Bromus gras *Brome*	21-6-'51, 13,30 uur	21-6-'51, 13,30 uur	100
			22-6-'51, 13,30 uur	870
			24-6-'51, 12 uur	520
4	Lucerne *Alfalfa*	21-6-'51, 13,30 uur	21-6-'51, 13,30 uur	250
			22-6-'51, 13,30 uur	820
			24-6-'51, 12 uur	360
5	Bromusgras *Brome*	11-7-'51, 11 uur	11-7-'51, 17 uur	420
			13-7-'51, 13 uur	1190
			13-7-'51, 17 uur	2780

Niet geheel duidelijk zijn de vroegere resultaten van NEWLANDER (1948). De uitkomsten van zijn onderzoek over 1946–1948 stemmen namelijk niet goed overeen. De vitamine D-gehaltes van hooi, bestaande uit een mengsel van gras en vlinderbloemigen, dat gedroogd werd in de zon dan wel tot schuurhooi werd verwerkt of kunstmatig werd gedroogd, zijn in tabel 4 overgenomen.

TABEL 4. Vitamine D-gehalte van hooi in i.e./kg (90 % ds) (NEWLANDER, 1948).
Vitamin D in sun-cured, barn-cured and artificially dried hays (i.u./kg with 90 % D.M.).

Gras-lucerne mengsel *Grass-alfalfa mixture*	1946 1e monster *1st sample*	1946 2e monster *2nd sample*	1947 1e monster *1st sample*	1947 2e monster *2nd sample*	1948 1e monster *1st sample*
Hooi (in zon gedroogd) . . *Sun-cured hay*	610	340	2000	1800	1740
Schuurhooi . . . . . *Barn-cured hay*	510	330	2330	2000	1500
Kunstmatig gedroogd . . *Artificially dried*	1270	420	590	750	460

Het hooi had steeds twee dagen buiten gelegen, waarna het voldoende droog was om binnengehaald te worden. Het schuurhooi had slechts één dag op het veld gelegen, terwijl het kunstmatig gedroogde gras onmiddellijk na het maaien

was gedroogd. Tussen het onderzoek van het eerste en het tweede monster was steeds circa een half jaar verlopen, zodat enig vitamine D-verlies tijdens het bewaren van hooi wel waarschijnlijk lijkt. Overigens doen de uitkomsten, evenals enkele uit tabel 3, verschillende vragen rijzen. Zo valt het grote verschil in gehalte op van het hooi, dat in verschillende jaren op overeenkomstige wijze was gewonnen. Dit zou misschien aan weersinvloeden toegeschreven kunnen worden. Zeer vreemd echter is het meer dan twee maal zo hoge gehalte in het kunstmatig gedroogde produkt vergeleken met de beide hooisoorten in 1946. Ook is het vitamine D-gehalte van het in de zon gedroogde hooi, over de drie jaren vergeleken met dat van het schuurhooi niet zo sterk verschillend als men wellicht zou verwachten. Het verschil ten gunste van het hooi dat in de zon was gedroogd, is namelijk òf uitermate gering òf niet aanwezig. Dit zou een gevolg kunnen zijn van het feit, dat het drogen in de zon nooit meer dan twee dagen heeft geduurd.

MOORE c.s. (1948) gingen in Amerika na of ingekuilde lucerne, schuurhooi en gewoon hooi, eveneens uit lucerne bereid, kalveren, die binnen gehouden werden, tegen rachitis konden beschermen. Volgens hen was dit inderdaad mogelijk, al valt het op, dat vrij veel dieren de aantekening „stijf" kregen, behalve die in de lucernehooi-groep. Bij de biologische bepaling van het vitamine D-gehalte van hun ruwvoeders onderzochten zij of er een verband bestond met de hoeveelheid zonlicht, uitgedrukt in gcal/cm² (tabel 5). Dit verband leek ver te zoeken, wat eigenlijk geen verwondering hoeft te wekken. Het aantal gcal/cm² wordt bepaald door de totale zonne-energie, waarvan het ultraviolet, dat uitsluitend het vitamine D vormt, slechts een geringe bijdrage levert van de orde van grootte van één procent. De vermelde uitkomsten zouden gevoeglijk daaraan toegeschreven kunnen worden, dat in het zonlicht sterk wisselende hoeveelheden ultraviolette stralen voorkomen, afhankelijk van de samenstelling van de dampkring. MOORE, c.s. zijn van mening, dat vers, groen gras geen vitamine D bevat, maar dat het erin voor zou kunnen komen doordat er, door beschadiging of anderszins, afgestorven delen tussen zitten. In deze afgestorven, bruin gekleurde plantendelen zou het ergosterol dan door het zonlicht omgezet kunnen worden in vitamine D.

TABEL 5. Bestraling door zonlicht (in gcal/cm²) van lucerne en het vitamine D-gehalte ervan in i.e./kg (MOORE c.s., 1948).
Exposure of forage to solar radiation (in gcal/cm²) and its vitamin D content in i.u./kg.

Lucerne *Alfalfa*	1945		1946	
	Zonne-energie *Radiation exposure*	Vitamine D -gehalte *Vitamin D content*	Zonne-energie *Radiation exposure*	Vitamine D -gehalte *Vitamin D content*
Kuilvoer . . . *Wilted silage*	221	560	243	870
Schuurhooi . . *Barn-dried hay*	522	470	541	580
Hooi . . . . . *Field-cured hay*	1350	970	1473	880

THOMAS c.s. (1951) hebben inderdaad kunnen bevestigen dat afgestorven lucerneblad aanzienlijk meer vitamine D bevat dan groen blad. In afgestorven

verdorde bladeren en stengels, in afstervende gele en in volkomen groene bladeren vonden zij achtereenvolgens 5450, 650 en minder dan 73 i.e. vitamine D per kilogram. Daar het percentage verdord blad toenam naarmate het groeistadium vorderde, menen zij, dat het mede hieraan toegeschreven moet worden, dat de gewassen hogere vitamine D-gehaltes vertoonden, naarmate ze in een later groeistadium waren gemaaid. Dit werd door de volgende proeven nader bevestigd. Veldjes van het perceel lucerne, waaruit ook de bruine en gele bladeren waren verzameld, maaiden zij voor, tijdens en na de bloei. Monsters van het onmiddellijk gedroogde gewas bleken achtereenvolgens 210, 320 en 640 i.e. vitamine D per kilogram te bevatten. Hun waarneming betreffende het hoge vitamine D-gehalte van afgestorven blad is in overeenstemming met die van BECHTEL c.s. (1936b), die waarnamen, dat de onderste bladeren van maisplanten, die op het moment van inkuilen reeds verdord zijn, 5390 i.e. per kilogram droge stof bevatten, de bovenste, nog groene bladeren daarentegen een niet aantoonbare hoeveelheid.

TSCHERNIAK c.s. (1950) onderzochten in Zwitserland het vitamine D-gehalte van een gras-klaver bestand met 15 procent weidekruiden. Een deel van het gewas werd onmiddellijk bij 50 °C gedroogd en als vers produkt beschouwd. De rest van hetzelfde perceel werd òf kunstmatig gedroogd gedurende 30 minuten bij 200–600 °C òf ingekuild, in een eerste proefserie met A.I.V.-zuur, in de tweede met „Amasil". In de eerste proefserie werd het gewas gemaaid vóór de bloei, in de tweede tijdens de bloei (tabel 6).

TABEL 6. Het vitamine D-gehalte van een gras-klavermengsel in i.e./kg ds (TSCHERNIAK c.s., 1950).
The vitamin D content of a grass clover mixture (i.u./kg D.M.).

Eerste serie *First series*	Vitamine D-gehalte *Vitamin D content*	Tweede serie *Second series*	Vitamine D-gehalte *Vitamin D content*
Vers . . . . . *Fresh*	460		340
Kunstmatig gedroogd . *Artificially dried*	460		360
Ingekuild . . . . . *Ensiled*	700		720

Het kunstmatig drogen bleek, vergeleken met het drogen bij 50 °C, geen vitamine D-verlies mee te brengen. Opvallend is het sterk gestegen vitamine D-gehalte in het ingekuilde produkt. Dit was niet enkel verklaarbaar door het verlies aan droge stof tijdens het inkuilproces. THOMAS c.s. (1951), die iets dergelijks waarnamen, schreven het hieraan toe, dat bij het hooiwinnen verdord blad met een hoog vitamine D-gehalte verloren gaat, hetgeen bij het inkuilen niet het geval is.

KEENER (1954), die in Amerika de invloed van verschillende factoren op het vitamine D-gehalte van ruwvoeders onderzocht, constateerde eveneens een hoger gehalte in geënsileerd materiaal, vergeleken met dat van het verse produkt. Als mogelijke verklaring voert hij hier voor aan, dat tijdens het bewaren in de silo een antivitamine D-factor afgebroken zou worden. In tabel 7 is een aantal van zijn uitkomsten vermeld.

TABEL 7. Invloed van enige factoren op het vitamine D-gehalte in i.e./kg ds (KEENER, 1954).
Vitamin D content of different species of forage as affected by curing time and by method and length of storage (dry basis).

Wijze van conserveren. Tijdstip monsterneming. *Method and stage of storage*		Zw. bast.kl. 1e snee *Alsike clover 1st cutting*	Ladino-klaver 1e snee *Ladino-clover 1st cutting*	Ladino-klaver 2e snee *Ladino-clover 2nd cutting*	Rode klaver 1e snee *Red clover 1st cutting*	Timo-thee 1e snee *Timothy 1st cutting*
vers *green forage*	op maaidatum, 7 juli *when cut*	51	51	449	59	51
voorgedroogde kuil *wilted silage*	bij inkuilen, 8 juli *when stored*	370	200		79	79
	bij opvoeren, 12 jan. *when fed*	330	460		398	169
schuurhooi *mow-cured hay*	na voordrogen, 9 juli *when stored*	429		414	154	161
	na drogen, 10 aug. *when dry*	418		515	279	249
	bij opvoeren, 12 jan. *when fed*	499		499	249	161
hooi *field-cured hay*	bij binnenhalen, 10 juli *when stored*	429		728	165	229
	bij opvoeren, 12 jan. *when fed*	319		849	249	180

Een zeer uitgebreid onderzoek over de vitamine D-gehaltes van ruwvoedermiddelen is door WALLIS (1949a, c) verricht in samenwerking met het Amerikaanse Ministerie van Landbouw en een tiental landbouwproefstations, verspreid over het gehele land. Uit de betreffende Staten onderzocht hij monsters die representatief waren voor de aldaar voorkomende gewassen en in zwang zijnde conserveringsmethodes. De volledige lijst (WALLIS c.s., 1949) bevat de uitkomsten van 65 monsters, waarvan een aantal van de belangrijkste zijn vermeld in tabel 8.

Een aantal conclusies, door WALLIS c.s. op grond van deze gehaltes getrokken, typeren de verwarde toestand op het gebied van onze huidige kennis der vitamine D-gehaltes van ruwvoedermiddelen:

1. Er bestaat een zeer sterke variatie in de vitamine D-gehaltes van ruwvoedermiddelen, die in de zon gedroogd zijn.
2. Veel zonlicht tijdens de hooiwinning betekent niet steeds een hoog vitamine D-gehalte in het hooi.
3. In het algemeen bestaat er geen duidelijk verband tussen kwaliteit en vitamine D-gehalte.
4. Er bestaat geen verband tussen het vitamine D-gehalte en de gewassoort.
5. Ruwvoedermiddelen, afkomstig uit het zuiden blijken geen hogere vitamine D-gehaltes te bezitten dan die uit het noorden.
6. Kunstmatig gedroogd gras en kunstmatig gedroogde lucerne bevatten een geringe, maar toch duidelijk aantoonbare hoeveelheid vitamine D.
7. Het vitamine D-gehalte van verse silage bedraagt ongeveer de helft van dat van kunstmatig gedroogde gewassen.

TABEL 8. Het vitamine D-gehalte van een aantal ruwvoedermiddelen (WALLIS c.s., 1949).
The vitamin D content of miscellaneous roughages.

Soort *Type of crop*	Aantal *Number of samples*	Vitamine D-gehalte (i.e./kg) *Vitamin D content (i.u./kg)*
Alle ruwvoedermiddelen tesamen *All roughages*	65	119–3095
Lucernehooi . . . . . . *Alfalfa hay*	12	141–2297
Prairiehooi . . . . . . *Prairie hay*	4	1098–1498
Timotheehooi . . . . . . *Timothy hay*	4	1826–2662
Timothee-lucerne . . . . . . *Timothy-alfalfa mixture*	4	968–1826
Klaverhooi . . . . . . *Clover hay*	3	1496–2222
Timothee-klaver . . . . . . *Timothy-clover mixture*	3	1826–2222
Lucernemeel . . . . . . *Alfalfa meal*	4	180–590
Soyastro . . . . . . *Soybean hay*	5	359–1498
Kuilvoer (vers) . . . . . . *Silage (wet basis)*	4	134–231

4. SAMENVATTING VAN DE AANGEHAALDE LITERATUUR

Het blijkt, dat de vitamine D-gehaltes van ruwvoedermiddelen sterk kunnen variëren zonder dat de oorzaken daarvan steeds aangewezen kunnen worden. De uitkomsten, vermeld in tabel 5, zijn in dit opzicht wel typerend. Men krijgt de indruk dat de factoren, die bij de vitamine D-vorming een rol spelen, niet volledig bekend zijn. Wij zullen ze, voorzover wèl bekend, daarom nogmaals beschouwen.

In de eerste plaats moet de invloed van het zonlicht vermeld worden. Uit de verzamelde gegevens wordt het wel duidelijk, dat de invloed hiervan over het geheel genomen gunstig is. De lage graad van correlatie, gevonden tussen het vitamine D-gehalte en het aantal uren zonlicht of de zonne-energie uitgedrukt in gcal per cm^2, behoeft niet gezien te worden als een bewijs van het tegendeel, evenmin als het zwakke verband tussen vitamine D-gehalte en geografische ligging. Met de invloed van het zonlicht hangt samen de invloed van de wijze van conserveren. Brengt deze mee dat het zonlicht korter inwerkt of minder diep kan doordringen, dan komt dit meestal tot uiting in een lager vitamine D-gehalte.

De invloed van het zonlicht wordt doorkruist door een aantal andere factoren, zoals het groeistadium, de verhouding stengel-blad en het percentage verdord

blad. Het vitamine D-gehalte wordt hoger naarmate het gewas in een later groeistadium wordt gemaaid. Dit hangt vermoedelijk samen met het toenemende percentage aan bruin, afgestorven blad, dat bij bestraling sterk antirachitisch wordt. De verhouding stengel-blad oefent echter juist een tegenovergesteld effect uit omdat de stengel minder vitamine D bevat dan het blad. Naarmate een grasbestand ouder wordt, neemt het percentage blad af en dit moet het vitamine D-gehalte weer nadelig beïnvloeden.

Een ander, nog niet geheel opgehelderd vraagstuk vormt het vitamine D-gehalte van gras voordat het gemaaid is. Uit de onderzoekingen hieromtrent blijkt, dat vers gras aanzienlijk minder vitamine D bevat dan verwacht zou mogen worden, ja dat het er soms zelfs niet in aangetoond kan worden. Dat het in hooi voorkomende vitamine D voor een aanzienlijk deel eerst na het tijdstip van het maaien ontstaat, is wel zeker, al kan er nog verschil van mening bestaan over de vraag of dit direct gebeurt dan wel pas na enkele dagen.

Ondanks het feit dat er een aantal factoren bekend is, dat op het vitamine D-gehalte een zekere invloed uitoefent, blijft de situatie verward. Dit heeft tot gevolg, dat bij het werken met gemiddelde gehaltes steeds de nodige reserve in acht genomen moet worden.

HOOFDSTUK III

DE BEPALING VAN HET VITAMINE D IN RUWVOEDERMIDDELEN

1. Inleiding

Ofschoon er op het gebied van de chemische bepaling van het vitamine D de laatste jaren goede vorderingen zijn gemaakt (Diemair c.s., 1953; Wodsak, 1953), kan deze werkwijze toch nog niet toegepast worden bij het onderzoek van elk vitamine D-bevattend uitgangsmateriaal. Ook bij het onderzoek van hooi en dergelijke dient voorlopig de biologische bepaling nog gebruikt te worden.

Na deze beperking blijft er nog een keus over, namelijk in welke vorm het materiaal aan de proefdieren moet worden verstrekt. Dit vloeit voort uit de omstandigheid, dat de kwantitatieve biologische bepaling van het vitamine D vooral in de jaren 1931–1933 uitgewerkt is ten behoeve van de sterktebepaling van levertraan en synthetische vitamine D-preparaten, zodat het vitamine D der te onderzoeken stoffen, evenals de vitamine D-standaard vrijwel steeds als olieoplossingen aan de proefdieren konden worden verstrekt (Bills c.s., 1931; Bourdillon c.s., 1931; Dyer, 1931; Everse, 1931). Dit heeft ertoe geleid, dat de biologische bepalingsmethode zelf wel volkomen is gestandaardiseerd en men de richtlijnen hiervan in de verschillende handboeken kan vinden (Coward, 1947; György, 1950–51), maar dat er geen dwingende voorschriften bestaan aangaande de wijze waarop voedings- en voedermiddelen, waarvan men het vitamine D-gehalte wenst te bepalen, aan de proefdieren verstrekt moeten worden. Toen derhalve naderhand de behoefte gevoeld werd ook kwantitatieve vitamine D-bepalingen in deze materialen uit te voeren, sloot men aan bij een tweetal methoden, die voorheen voor het kwalitatieve onderzoek op vitamine D waren gebruikt, namelijk :

a. het mengen van een bepaald percentage van het te onderzoeken voedsel door het rachitogene grondrantsoen der ratten (mengmethode) en

b. het vervaardigen van een extract met behulp van een oplosmiddel voor vet en het opnemen hiervan in olie (extractiemethode).

Beide methoden, maar vooral de mengmethode, zijn gebruikt voor de bepaling van vitamine D-gehaltes in hooi. Om evenwel een keus mogelijk te maken, dienen de voor- en nadelen van beide nader bezien te worden.

2. DE MENGMETHODE

De promotor van de mengmethode is WALLIS (1935, 1938 a, b). De aantrekkelijkheid van deze methode ligt in de eenvoud ervan. Een bepaald percentage gemalen hooi wordt gemengd met een bekende hoeveelheid grondvoer waarvan verwacht mag worden, dat het gedurende de proefperiode dagelijks geheel door de proefdieren wordt opgegeten. Wel moeten er voorzorgen getroffen worden, dat met het voer niet gemorst kan worden.

Een groot bezwaar van deze methode is echter, dat er behalve vitamine D tevens grotere of kleinere hoeveelheden organisch en anorganisch materiaal aan het grondvoer, in dit geval het rachitogene STEENBOCK-voer nr 2965, worden toegevoegd. Mogelijk kan hier geen ernstig bezwaar tegen ingebracht worden, zolang het om geringe percentages gaat. In extreme gevallen, wanneer het vitamine D-gehalte van het te onderzoeken materiaal minder dan 100 i.e. per kilogram droge stof bedraagt, moet dit percentage echter wel tot ongeveer 25 procent worden opgevoerd (SMITH c.s., 1933). De vraag rijst of in dergelijke gevallen werkelijk het gehalte aan vitamine D wordt bepaald dan wel een bruto vitamine D-werking.

Wat de betekenis van de organische stoffen in dit opzicht betreft heeft men vastgesteld, dat de rachitogene werking van de rantsoenen wordt verzwakt door het toevoegen van lactose (OUTHOUSE c.s., 1933; SUNDERLIN, 1933) en van vet (JONES, 1940; BOOTH c.s., 1942; BUNKFELDT c.s., 1943). In de ruwvoeders komen deze verbindingen echter niet of slechts in geringe concentratie voor, zodat hieruit nauwelijks een argument tegen de mengmethode is te putten. Mogelijk geldt hetzelfde voor de ruwe celstof van het hooi; maar gezien de invloed van deze stof op de resorptie van calcium en fosfor (MAYNARD, 1947) zou aan dit punt bij de mengmethode enige aandacht geschonken moeten worden.

Dit laatste geldt zeer zeker voor de minerale bestanddelen, vooral calcium en fosfor, die met het ruwvoeder door het rachitogene voer worden gemengd. Het rachitogene karakter van het STEENBOCK-voer nr 2965 wordt, behalve door de afwezigheid van vitamine D, in hoofdzaak bepaald door de erin voorkomende Ca/P-verhouding, die bijna 5 : 1 bedraagt. Verder is het fosforgehalte weliswaar bevredigend, namelijk ca 0,25 procent, maar dit element komt voor een aanzienlijk deel als fytaat voor, waardoor het minder goed resorbeerbaar is (BRUCE c.s., 1934b; KRIEGER c.s., 1940).

In tabel 9 is aangegeven welke veranderingen deze waarden ondergaan door het toevoegen aan het STEENBOCK-voer nr 2965 van 25 procent droge stof van weidegras (BRANDSMA, 1954), kunstmatig gedroogd gras ('t HART, 1944–1945), weidehooi (KOENRAADT, 1931–1933 uit BROUWER c.s., 1953) en klaverhooi (LEIGNES BAKHOVEN, 1951), alles van gemiddelde samenstelling.

Om te kunnen beoordelen in hoeverre deze veranderingen van belang zijn voor de graad van rachitis, welke bij proefratten op deze rantsoenen ontstaat en voor de mate van genezing tengevolge van het verstrekken van vitamine D, werd

TABEL 9. Invloed van het toevoegen van hooi e.d. op Ca, P en Ca/P-verhouding.
Effect of the addition of hay etc. on the Ca and P content of the Steenbock 2965 diet.

Toevoegsel (25 %) (*Addition*)	Ca (%)	P (%)	Ca/P
Geen . . . . . *None*	1,20	0,25	4,8
Weidegras . . . . . *Grass*	1,07	0,29	3,7
Kunstmatig gedroogd gras . . . . *Artificially dried grass*	1,06	0,29	3,7
Weidehooi . . . . . *Grass hay*	1,04	0,26	4,0
Klaverhooi . . . . . *Clover hay*	1,33	0,26	5,1

de literatuur op dit punt nageslagen. Hierbij werd alleen maar aandacht geschonken aan die onderzoekingen, waarbij de genoemde waarden niet al te ver van die in het STEENBOCK-voer afweken. Dit hield bij voorbeeld in, dat de uitkomsten van GROENEVELD (1932), die ook duidelijk de interactie tussen calcium, fosfor en vitamine D te zien gaven, in het huidige geval niet gebruikt mochten worden, om er een conclusie op te baseren. Hij paste namelijk in overeenstemming met het eigenlijke doel van zijn onderzoek, niet de extreme waarden toe, welke tabel 9 te zien geeft.

Voor het beoordelen van het thans aan de orde gestelde vraagstuk kunnen wel de uitkomsten van MC COLLUM c.s. (1921) dienen. Zij vonden, dat een Ca/P-verhouding gelijk aan 4, ernstige rachitis deed ontstaan, terwijl zich bij een Ca/P-verhouding gelijk aan 3 slechts een matige rachitis ontwikkelde, telkens op een rantsoen met 0,3 procent P. Dit komt overeen met de uitkomsten van BROWN c.s. (1932), die eveneens met behulp van ratten drie rantsoenen onderzochten, alle met 0,25 procent P, maar met Ca/P-verhoudingen gelijk aan 3–4 en 6. Deze verhoudingen waren duidelijk van invloed op de beenasgehaltes, die achtereenvolgens 45,3–44 en 42 procent bleken te bedragen. Deze tendens kon röntgenologisch worden bevestigd.

SOHL c.s. (1932) verminderden de Ca/P-verhouding van hun proefrantsoenen voor ratten van 4 tot 3,5. Beoordeeld aan de hand van het röntgenbeeld bleek dit een duidelijke vermindering van de rachitisverwekkende eigenschap van de voeders te betekenen, wat ook tot uiting kwam in de beenasgehaltes.

De uitkomsten van BETHKE c.s. (1932) zijn vollediger in die zin, dat hieruit bleek, dat niet alleen de graad van rachitis invloed van de Ca/P-verhouding onderging, maar ook de respons wanneer vitamine D werd verstrekt. Bij een P-gehalte van 0,36 procent verminderden zij de Ca/P-verhouding van 5 via 4 tot 3. Zonder vitamine D-toediening bedroegen de beenasgehaltes achtereenvolgens 22,6–23,6 en 32,2 procent; werd wèl vitamine D verstrekt, dan bedroegen ze 50,8–51,3 en 54,4 procent.

QUERIDO (1935) koos een enigszins andere proefopzet. Hij hield de Ca/P-verhouding van zijn proefvoeders voor ratten constant op 4 maar variëerde de absolute hoeveelheden Ca en P, zodat de hoeveelheden P in vier rantsoenen

achtereenvolgens 0,24–0,28–0,35 en 0,40 procent bedroegen. Hierbij bleek dat ook de absolute hoeveelheden calcium en fosfor van belang zijn, want met het voer met 0,40 procent P ontstond geen rachitis, met de andere voeders wel. In deze laatste gevallen was de genezende werking van het vitamine D bovendien beter naarmate de hoeveelheden calcium en fosfor in de rantsoenen groter waren. Tot analoge uitkomsten waren SHERMAN c.s. (1921) reeds eerder gekomen, hetgeen door LILLY c.s. (1935) nog weer werd bevestigd.

Ook de uitkomsten van proeven van BRUCE c.s. (1934a), O'BRIEN c.s. (1939) en COWARD c.s. (1940) wijzen duidelijk op een interactie tussen de mineralen Ca en P en het vitamine D. Deze wisselwerking maakt, dat de bepaling van het vitamine D-gehalte in sommige voedings- en voedermiddelen veel te hoge uitkomsten kan geven (MORGAREIDGE c.s., 1938).

Alvorens de hier weergegeven uitkomsten in verband te brengen met de waarden van tabel 9 dient nog aan een laatste punt herinnerd te worden. Er werd reeds opmerkzaam op gemaakt, dat het fosfor in het STEENBOCK-rantsoen voor het grootste deel voorkomt als fytinezuur en daardoor minder goed door de rat wordt geresorbeerd, zelfs wanneer vitamine D wordt verstrekt (BRUCE c.s., 1934b; BOUTWELL c.s., 1946; SPITZER c.s., 1948). In gras- en klaverhooi komt echter praktisch geen fytinezuur voor (BECKER, 1950), zodat het niet onwaarschijnlijk is, dat door het toevoegen van hooi aan het STEENBOCK-rantsoen de hoeveelheid resorbeerbaar fosfor toeneemt, hetgeen voor een kwantitatieve bepaling van het vitamine D storend zou kunnen werken.

Uit de gegevens van tabel 9 blijkt nu, dat door het toevoegen van gras of hooi de Ca/P-verhouding in het algemeen wordt verminderd. De veranderingen die optreden zijn zodanig, dat ze, gezien in het licht van de geciteerde literatuur, zeker niet zonder invloed op de bepaling van het vitamine D geacht mogen worden. Hieruit moeten dus ernstige bedenkingen tegen de mengmethode geput worden. Het valt daarom op, dat deze methode nog nooit kritisch onderzocht is. Men heeft er zonder meer mee volstaan het te onderzoeken materiaal, zoals hooi (WALLIS, 1938b), lever en bloedserum (HIBBS c.s., 1946; EATON c.s., 1947 a, b) door het rachitogene voer te mengen, terwijl de in olie opgeloste vitamine D-standaard afzonderlijk aan de dieren der standaardgroepen werd verstrekt. Daardoor is het niet altijd zeker, dat de gevonden vitamine D-werking inderdaad alleen maar aan vitamine D moet worden toegeschreven dan wel aan een combinatie van vitamine D, calcium en fosfor. In de loop der jaren is hierop dan ook wel gewezen (MC COLLUM c.s., 1922; BETHKE, c.s., 1932). Het is derhalve niet vreemd, dat herhaaldelijk aanbevolen is in deze gevallen niet het materiaal als zodanig te gebruiken maar het met behulp van een vet-oplossend middel verkregen extract (BILLS, 1947; COWARD, 1947; GYÖRGY, 1950).

3. DE EXTRACTIEMETHODE

Het aantrekkelijke van de extractiemethode is, dat het te onderzoeken materiaal uiteindelijk aan de proefratten wordt verstrekt in een vorm, die overeenkomt met de wijze, waarop dit ook met de vitamine D-standaard gebeurt. Hierdoor worden de bezwaren van de mengmethode weliswaar ondervangen maar in plaats daarvan rijzen er weer andere problemen. Zo dient men zich er van te overtuigen of bij de thans noodzakelijke bewerking van het materiaal, zoals drogen en extraheren, geen vitamine D wordt afgebroken en of de extractie wel

volledig is. De samenstelling van het ruwvet van groenvoeders en hooi is nu eenmaal zeer ingewikkeld en voor de extractie ervan bestaat eigenlijk geen geheel bevredigende methode (CAMPEN c.s., 1954). Men heeft hieraan bij het toepassen van de extractiemethode niet steeds voldoende aandacht geschonken.

Zo extraheerden ZUCKER c.s. (1923) eenzelfde monster plantaardig materiaal achtereenvolgens met verschillende oplosmiddelen voor vet, daarbij de verwachting uitsprekend, dat deze werkwijze een volledige extractie gaf. Voorts bepaalden TSCHERNIAK c.s. (1951) en EWER (1951) vitamine D-gehaltes door van het etherextract uit te gaan, van welke werkwijze RYGH (1950) zich eveneens een enthousiast voorstander toonde. Tenslotte meent ook NOBILE (1954) dat het vitamine D-gehalte van voedermiddelen bepaald kan worden, door van een extract uit te gaan.

ALLEMANN (1942) echter heeft de extractiemethode uitvoerig bestudeerd. Op grond van zijn proeven kwam hij tot de slotsom, dat het voordrogen van plantaardig materiaal bij 50°C aan de lucht geen vitamine D-verlies geeft en dat dit evenmin het geval is bij de extractie met ether. Bovendien bleek de extractie volledig te zijn, wanneer hiervoor ether werd gebruikt. Hiermee scheen dus de basis gelegd te zijn voor het toepassen van de extractiemethode ter bepaling van het vitamine D-gehalte van ruwvoeders. Het valt echter op, dat ALLEMANN's uitkomsten verkregen zijn met een betrekkelijk gering aantal proefratten en dat zij o.i. soms ietwat vluchtig zijn geïnterpreteerd.

Op grond van deze discussie over de meng- en de extractiemethode werd in beginsel besloten van de laatste werkwijze gebruik te maken. Toch leek het gewenst het definitieve besluit nog van enkele eigen experimenten te laten afhangen. Hiertoe bestond zeer zeker aanleiding omdat tegenover de uitkomsten van ALLEMANN (1942) de mededeling van BROUWER (1932) staat, dat het in tapioca aanwezige vitamine D door een intensieve extractie met ether nagenoeg niet werd verwijderd. Eenzelfde mening is WALLIS (1949b) toegedaan ten aanzien van hooi.

4. EXPERIMENTEEL GEDEELTE

Het werd van belang geacht een drietal vragen te bezien:

1. Kan de mengmethode te hoge uitkomsten geven?
2. Gaat er bij de extractiemethode tengevolge van de bewerking van het monster vitamine D verloren?
3. Wordt het vitamine D bij de extractiemethode volledig geëxtraheerd?

Om op vraag no 1 een antwoord te kunnen geven, is enige malen een hoeveelheid verast hooi aan het STEENBOCK-voer toegevoegd en aan enige groepen ratten verstrekt. De as correspondeerde ongeveer met de hoeveelheid hooi, die voor vitamine D-bepalingen gebruikt moet worden. Doordat in de hooimonsters Ca- en P-bepalingen waren uitgevoerd, kon uitgerekend worden hoeveel van beide mineralen per 100 gram voer werd toegevoegd. Naast dit voer werd aan de ratten een bekende hoeveelheid vitamine D verstrekt, zodat uit een vergelijking met standaard groepen, die naast het ongewijzigde STEENBOCK-voer dezelfde hoeveelheid vitamine D ontvingen, nagegaan kon worden hoeveel vitamine D werd teruggevonden. Eenmaal zijn in plaats van hooias grotere hoeveelheden Ca en P als anorganische zouten aan het STEENBOCK-voer toegevoegd. De uitkomsten zijn samengevat in tabel 10.

TABEL 10. De interactie tussen Ca, P en vitamine D.
The interaction between Ca, P and vitamin D.

Proef nr *Exp. no.*	Ca en P toegevoegd per 100 g STEENBOCK-voer *Ca and P added/100 g diet*	van vit. D teruggevonden (%) *vitamin D recovery (%)*
1	69 mg Ca en 39 mg P als hooias *69 „ „and 39 „ „ as hay ash*	131
2	71 mg Ca en 38 mg P als hooias *71 „ „and 38 „ „ as hay ash*	100
3	146 mg Ca en 26 mg P als hooias *146 „ „and 26 „ „ as hay ash*	115
4	260 mg Ca en 240 mg P als anorg. zouten *260 „ „and 240 „ „ as inorg. salts*	190

Uit deze gegevens blijkt, dat men er ernstig rekening mee moet houden, dat met de mengmethode te hoge gehaltes gevonden kunnen worden. De uitkomsten onderstrepen de bezwaren, die op grond van de literatuur, geciteerd in hoofstuk III. 2, tegen de mengmethode zijn ingebracht.

De vraag of er bij de extractiemethode vitamine D verloren kan gaan ten gevolge van de bewerking betreft in eerste instantie mogelijke verliezen tijdens de extractie zelf en het daarop volgend afdestilleren van de ether om het ruwvet aldus in handen te krijgen. Aan de voorafgaande bewerking, die slechts het malen en drogen van de monsters inhield om dit in een geschikte toestand te brengen voor de extractie, is geen verdere aandacht geschonken. Het drogen geschiedde namelijk in een vacuumexsiccator boven silicagel, zodat enig vitamine D-verlies tijdens dit onderdeel van de bewerking niet aannemelijk is. Om echter de invloed van de vrijwel steeds vier dagen durende extractie na te gaan is een vitamine D-olie van bekende sterkte vier dagen in het donker met peroxyd-vrije ether aan een opstijgende koeler verwarmd. De aldus behandelde olie werd in vergelijking met de bij -20°C bewaarde oorspronkelijke olieoplossing met behulp van rachitische ratten in drie doseringen onderzocht, waarbij de genezing van de dieren werd beoordeeld aan de hand van de door EVERSE (1931) ontworpen schaal. De uitkomsten zijn vermeld in tabel 11.

TABEL 11. De invloed van koken op het vitamine D.
The influence of boiling on vitamin D.

Dosis (*Daily dose*)	Gemiddelde genezing (*Average healing*)	
	Onbehandelde D-olie *Untreated oil*	Verwarmde D-olie *Heated oil*
0,15	0,91	1,40
0,30	2,36	2,45
0,60	4,50	4,65

Uit tabel 11 blijkt dat door de toegepaste behandeling geen vitamine D verloren is gegaan. Wij hebben nu aangenomen, al is dit strikt genomen niet geoorloofd, dat ook bij de extractie van plantaardig materiaal geen vitamine D gedestrueerd zal worden.

Om na te gaan of de extractie met ether volledig is en om nogmaals de rol van de mineralen calcium en fosfor te kunnen vaststellen, zijn twee monsters hooi op verschillende manieren onderzocht. Daarvoor werd aan een groep ratten dagelijks een geringe hoeveelheid hooi verstrekt, gemengd door het rachitogene voer. Een tweede groep kreeg per os het etherextract van eenzelfde hoeveelheid hooi, opgenomen in arachisolie. Een derde groep kreeg ditzelfde extract met daarenboven de as van het geëxtraheerde hooi door het voer. Van de controlegroepen kreeg groep vier geëxtraheerd hooi door het voer, groep vijf de hooias, terwijl groep zes slechts het rachitogene voer kreeg. De uitkomsten van deze proeven komen voor in tabel 12.

TABEL 12. Vergelijking van de meng- met de extractiemethode.
Comparison of different methods for the determination of vitamin D.

Methode (*Method*)	Genezing (*healing*)	
	monster 1 (*sample 1*)	monster 2 (*sample 2*)
1. Hooi *Hay*	2,2	3,4
2. Hooivet *Hay fat*	1,1	2,1
3. Hooivet+hooias *Hay fat+hay ash*	2,1	3,1
4. Geëxtraheerd hooi *Ether-extracted hay*	0,4	1,0
5. Hooias *hay ash*	0,4	0,1
6. Enkel STEENBOCK-voer *Only Steenbock diet*	0	0

Uit de vergelijking van groep 1 met groep 3 en van groep 4 met groep 5 kan opgemaakt worden of de extractie volledig is geweest en zonder vitamine D-verlies gepaard is gegaan. Op grond van het onderzoek van monster één schijnen deze vragen in positieve zin beantwoord te mogen worden; maar ze worden niet bevredigend bevestigd door de uitkomsten van monster twee. Hier kan echter aan toegevoegd worden, dat het verschil tussen de groepen 1 en 3 in dit geval niet significant was.

De rol van de mineralen komt tot uiting bij het vergelijken van groep 2 met groep 3. Ook hieruit blijkt weer dat de combinatie van vitamine D en mineralen tot een te hoge uitkomst leidt, terwijl de invloed van de mineralen alleen blijkt uit het vergelijken van groep 5 met groep 6.

De uitkomsten van de oriënterende proeven thans overziend, leek het wel duidelijk, dat de mengmethode niet toegepast kon worden voor de bepaling van het vitamine D-gehalte van ruwvoeders. Deze conclusie werd nog ondersteund door de vroeger aangehaalde literatuur. Derhalve werd besloten de extractiemethode toe te passen voor het onderzoek van de hooimonsters, die uit de praktijk verzameld waren. Daarbij werden aanvankelijk echter in iedere proef twee controlegroepen ingeschakeld, waaraan achtereenvolgens het geëxtraheerde hooi en hooias door het STEENBOCK-voer werden verstrekt. Deze maatregel bleek niet overbodig, want bij het toenemen van het aantal gegevens bleek, dat van de ratten waaraan geëxtraheerd hooi werd verstrekt, procentsgewijs méér

dieren enige genezing te zien gaven dan van de ratten die hooias kregen. Dit vormde wederom een aanwijzing, dat de extractie met ether niet afdoende is om het vitamine D volledig te extraheren en dat dit vraagstuk opnieuw bezien moest worden. Tijdens het reeds uitgevoerde onderzoek van een aantal praktijkmonsters was er nog een tweede aanleiding gevonden om de methode nader te onderzoeken; bij dit onderzoek was namelijk onverwacht een nieuw probleem gerezen (WEITS, 1952b), waarop in dit hoofdstuk nog teruggekomen zal worden.

De extractie is opnieuw bezien door reeds eerder geëxtraheerd hooi nogmaals gedurende vier dagen met ether te extraheren. Enigszins tegen de verwachting in bleek dit tweede extract geen antirachitische werking meer te bezitten. In overeenstemming hiermee was de vitamine D-werking van het tweemaal geëxtraheerde hooi onveranderd gebleven. Een deel van het vitamine D scheen dus niet zonder meer extraheerbaar te zijn. Misschien hebben wij hier te doen met een chemische binding.

Om dit te kunnen constateren werd tweemaal geëxtraheerd hooi behandeld met alcoholische loog, zoals dit ook in zwang is bij enkele modificaties van caroteenbepalingen (GYÖRGY, 1950–51). Het bleek bij herhaling, dat op deze wijze na verzepen, nog een antirachitisch werkzaam extract met behulp van petroleumether verkregen kon worden. De uitkomsten van een monster, dat op deze wijze is onderzocht, zijn samengevat in tabel 13.

TABEL 13. Antirachitische werking van verschillende hooiextracten.
Antirachitic activity of hay extracts and residues at different stages of the extraction procedure.

Behandeling (*Treatment of sample*)	Antirachitische werking (i.e./kg hooi) *Antirachitic activity (i.u./kg hay)*
1. Eenmaal geëxtraheerd hooi gemengd door STEENBOCK-voer . . . . . *H.R. after 1st ether extraction (a) mixed with D*	235
2. Tweede etherextract van zelfde monster . . . *2nd ether extract of (a)*	0
3. Als 1. na tweede ether extractie . . . . . *H.R. after 2nd ether extraction mixed with D*	215
4. Petroleumether extract van 1, na loogbehandeling . . . . . *Pet. ether extract of (a) after alkali-treatment*	195
5. Zelfde als 4, herhaling met een ander monster *As (4), replication with another sample*	135
6. Het residu van 4 en 5 gemengd door STEENBOCK-voer . . . . . *Residues from (4) and (5) mixed with D*	0

H.R. = hay residue; D = Steenbock diet.

Deze uitkomsten doen duidelijk zien, dat een intensieve extractie met ether niet voldoende is om het vitamine D geheel uit hooi te verwijderen. In dit verband is de opmerking van WODSAK (1953) van belang dat vitamine D gebonden aan eiwit of lecithine voor zou kunnen komen. Hij was namelijk in staat het vitamine D geheel vrij te maken door plantaardig materiaal met pancreatine te behandelen.

Tenslotte is het vitamine D-gehalte nog in vijf monsters opper- en ruiterhooi uit Zuid-Holland en in een monster kunstmatig gedroogd gras op de twee verschillende manieren bepaald. Enerzijds werd het materiaal dus als zodanig met

ether geëxtraheerd, anderzijds werd het één uur met 10% alcoholische loog aan een opstijgende koeler gekookt en daarna met petroleumether geëxtraheerd. Volledigheidshalve moet worden vermeld, dat de langs beide wegen verkregen extracten gechromatografeerd zijn, waarbij het vitamine D uit de monsters verder gezuiverd werd. De uitkomsten zijn vermeld in tabel 14.

TABEL 14. Vitamine D-gehalte van hooi, bepaald op twee manieren (i.e./kg ds).
Vitamin D content of hay determined in two ways (i.u./kg dry matter).

Provincie *Province*	Etherextract *Ether extract*		Petroleumetherextract na loogbehandeling *Petroleum ether extract after alkali-treatment*	
	Gehalte *i. u. vit. D*	Betrouwbaarheidsgrenzen in% (P = 0,05) *Fiducial limits*	Gehalte *i. u. vit. D*	Betrouwbaarheidsgrenzen in% (P = 0,05) *Fiducial limits*
Gelderland	583	69–134	857	74–130
Z. Holland	1497	79–131	1800	74–153
„	775	71–137	1100	73–136
„	790	69–150	825	68–154
„	241	60–122	445	63–138
„	495	76–127	689	73–132

Ook uit de gegevens van tabel 14 blijkt, dat de reeds min of meer gangbare extractiemethode met ether niet meer gebruikt kan worden, omdat ze tot waarden leidt, die gemiddeld ruim 20 procent te laag zijn.

Het tweede probleem, waarvan hierboven sprake was, betrof het volgende. Aangezien de hooimonsters vrijwel steeds in twee verschillende doseringen en dus niet, zoals gebruikelijk is, in één enkele dosering werden onderzocht, was het mogelijk behalve de regressielijn van de vitamine D-standaard, ook die van het onderzochte hooi te construeren. Het bleek nu, dat de regressielijnen van de hooimonsters regelmatig een helling vertoonden, die geringer was dan die van de gelijktijdig bepaalde regressielijnen van de vitamine D-standaard. Ofschoon dit verschil in helling, berekend voor de afzonderlijke proeven statistisch niet significant was, bleek toch wel uit de regelmaat waarmee dit verschijnsel zich herhaalde, dat de richtingscoëfficiënten van de regressielijnen van de vitamine D-standaard tot een andere populatie behoorden dan die van de hooi-regressielijnen (tabel 15).

TABEL 15. Helling van de regressielijnen voor vitamine D-standaard en hooivet.
Slope of vitamin D standard and hay fat regression lines.

Helling (*Slope*)		Verschil (*Difference*)
Standaard (*Standard*)	Hooivet (*Hay fat*)	
3,87	1,46	–2,41
6,12	1,99	–4,13
5,31	2,99	–2,32
5,31	2,99	–2,32
6,10	4,32	–1,78
4,07	3,16	–0,91
6,56	3,46	–3,10
6,56	7,65	+1,09
5,27	2,09	–3,18
5,21	3,62	–1,59

Vooral bij de microbiologische bepaling van B-vitamines heeft men met dit verschijnsel veelvuldig te maken gehad en in de desbetreffende literatuur wordt het aangeduid met „drift" (GYÖRGY, 1950–51). Analytisch gezien brengt dit verschil in helling tussen beide regressielijnen met zich mee, dat niet gesproken kan worden van *het* vitaminegehalte van het onderzochte materiaal, aangezien de uitkomst afhankelijk blijkt te zijn van de dosering. Dit wordt toegelicht door fig. 2, die de uitslag weergeeft van het onderzoek van een monster kunstmatig gedroogd gras, welk onderzoek uitgevoerd werd in drie doseringen. Het grasvet was bovendien verzeept en de onverzeepbare fractie behandeld met digitonine.

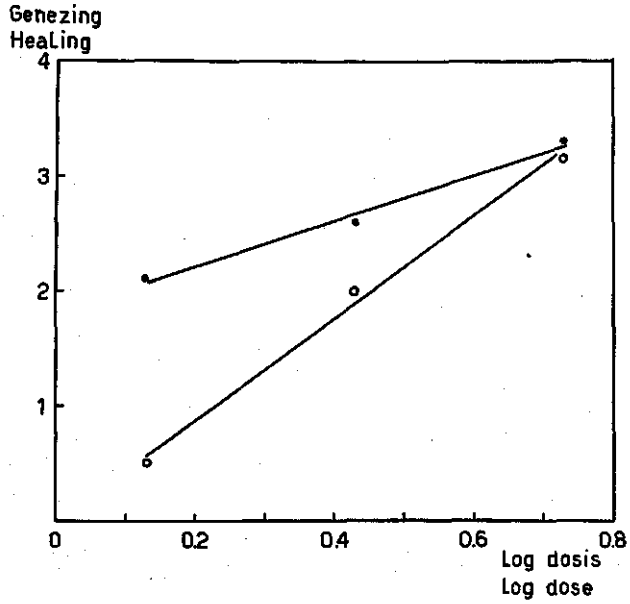


FIG. 2. Verschil in helling tussen de regressielijnen van vitamine D-standaard en grasvet.
Difference in slope between vitamin D and grass fat regression lines.
Vitamine D-gehalte op grond van laagste, middelste en hoogste dosis: 675, 440 en 315 i.e./kg ds.
Vitamin D content based on lower, middle and higher grass fat dose: 675, 440 and 315 i.u./kg dry matter.

Het hier weergegeven verschijnsel heeft verschillende aspecten. Aangezien thans de methode aan de orde is, zal slechts de analytische kant worden bezien. Het fysiologische probleem, dat er ook achter schuilt, komt in de hoofdstukken V en VI aan de orde. Analytisch gezien werd uit het verschil in helling besloten, dat het ruwvet van de onderzochte monsters een storende stof moest bevatten, die derhalve verwijderd diende te worden. De werking van deze stof zou tengevolge hebben, dat het bepaalde vitamine D-gehalte lager was dan het werkelijke gehalte. De verwijdering van deze stof zou moeten meebrengen:

1. het verschil in helling zou opgeheven moeten worden.
2. de gevonden vitamine D-gehaltes zouden hoger moeten zijn.

Aangezien de eerstgenoemde voorwaarde een moeilijk hanteerbaar criterium is, doordat regressiecoëfficiënten bij biologische bepalingen met een relatief grote middelbare fout behept zijn, is vooral de tweede voorwaarde als criterium gebruikt.

Het verschil in helling deed zich niet alleen voor, wanneer het ruwvet aan de proefratten werd verstrekt, maar eveneens wanneer de onverzeepbare fractie hiervoor werd gebruikt. Verzepen van het ruwvet gedurende een uur met 10% alcoholische loog bleek niet gepaard te gaan met enig vitamine D-verlies. De onverzeepbare fractie was dus geschikt als uitgangsmateriaal voor een verder gaande zuivering van het vitamine D. Om dit te bereiken werd deze onverzeepbare fractie gechromatografeerd. Hierbij kon met vrucht gebruik gemaakt worden van de ervaring waarover men omtrent het chromatograferen van vitamine D op het Analytisch Laboratorium van Philips-Roxane N.V. te Weesp beschikte. Aan dit laboratorium betuigen wij onze grote erkentelijkheid voor de verleende hulp.

Voor de chromatografie werd een zuil gebruikt van 2,5 × 14,5 cm met een inhoud van ca 60 gram Al_2O_3. De juiste activiteit van het Al_2O_3 werd verkregen door het drie uur te verhitten bij 500°C, waarna het werd afgekoeld in een exsiccator boven chloorcalcium. Aan een afgewogen hoeveelheid van dit geactiveerde Al_2O_3 werd 5 procent water toegevoegd en hiermee werd geschud tot er geen kluitjes meer in voorkwamen. Uit een zuil van deze activiteit kan vitamine D geëlueerd worden met petroleumether, die 0,5 procent absolute ethanol bevat, zoals met calciferol is gecontroleerd. Bij het zoeken van de geschikte combinatie van de activiteit van het adsorbens en de samenstelling van de elutievloeistof is gebruik gemaakt van de zgn. „schudproef", die uitgewerkt is op bovengenoemd laboratorium en waarover binnenkort een publikatie verschijnt (VAN DIJK c.s.).

Uit oriënterende proeven bleek, dat de carotenen reeds geëlueerd worden met petroleumether alleen en dat, om een aantal carotenoïden te elueren, petroleumether met een hoger percentage dan 0,5 procent absolute ethanol nodig is. Op deze wijze biedt een zuil van de opgegeven afmetingen en activiteit de mogelijkheid het vitamine D van een aantal andere verbindingen af te zonderen.

Vervolgens is van een aantal monsters hooi en kunstmatig gedroogd gras het vitamine D-gehalte met en zonder chromatografie bepaald (tabel 16).

De hooimonsters 2, 3 en 4 waren afkomstig van hetzelfde perceel en de datum van maaien was voor alle drie dezelfde. Monster 2 was opperhooi,

TABEL 16. De invloed van chromatografie op het vitamine D-gehalte (i.e./kg ds).
Influence of chromatography on vitamin D content (i.u./kg dry matter).

Hooi (*hay*)	Vitamine D-gehalte (*Vitamin D content*)	
	zonder chromatografie *before chromatography*	met chromatografie *after chromatography*
1	1375	1420
2	1090	1025
3	1090	1070
4	1005	955
Kunstm. gedr. gras *Artificially dried grass*		
1	270	595
	375	630
	345	450
	–	600
2	555	760
3	1150	1790
4	175	315
5	145	230

monster 3 driepootruiterhooi en monster 4 dakruiterhooi. Enige invloed van de chromatografie komt praktisch niet tot uiting in de uitkomsten van de hooimonsters, daarentegen wèl in die van het kunstmatig gedroogde gras.

De invloed van de chromatografie op de richtingscoëfficiënten zou beoordeeld kunnen worden op grond van de gegevens van tabel 16, als de monsters hiervan in twee doseringen onderzocht waren. Dit is echter niet het geval geweest. De monsters van tabel 14 kunnen hiervoor tot op zekere hoogte wèl dienen. Zoals gezegd werden van deze monsters twee extracten bereid. Het ene was een etherextract uit het materiaal als zodanig, welk extract naderhand was verzeept, het andere was een petroleumetherextract, verkregen uit het materiaal na behandelen met loog. Beide extracten van deze monsters zijn gechromatografeerd en in twee doseringen onderzocht, zodat de richtingscoëfficiënten van de beide hooi-regressielijnen vergeleken kunnen worden met die van de bijbehorende vitamine D-standaardlijnen (tabel 17).

TABEL 17. De invloed van chromatografie op de richtingscoëfficiënt.
The influence of chromatography on the slope of regression lines.

b standaard	b etherextract	b petroleumetherextract
3,32	3,16	4,32
3,32	3,16	3,33
4,38	4,75	3,79
4,49	4,55	6,02
4,49	3,92	5,59
3,69	5,52	5,35

Wanneer het beeld van deze tabel vergeleken wordt met dat van tabel 15, dan is het wel duidelijk, dat de chromatografie inderdaad de verwachte invloed op de richtingscoëfficiënt van de hooi-regressielijnen uitoefent. In tabel 17 overheerst namelijk zeker niet de tendens zoals in tabel 15 het geval is, dat deze groep regressielijnen minder steil verloopt dan die van de vitamine D-standaard. Op grond van de uitkomsten van de tabellen 16 en 17 mag de gevolgtrekking dan ook wel gemaakt worden, dat de chromatografie de storende stof verwijdert en dus in het voorschrift van de vitamine D-bepalingen opgenomen dient te worden.

5. UITEINDELIJK VOORSCHRIFT VOOR DE BEPALING VAN HET VITAMINE D IN RUWVOEDERS

Een monster hooi wordt, tezamen met 500 ml 10 procentige alcoholische loog per 100 gram hooi in een erlenmeyer gebracht en op een waterbad gedurende een uur gekookt aan een opstijgende koeler. De verzeepte massa wordt afgekoeld en gefiltreerd op een büchnertrechter. Het filtraat wordt overgebracht in een scheitrechter en het residu dat op het filter achterblijft wordt gewassen met petroleumether. Hiermee wordt doorgegaan tot de wasvloeistof een bleekgele kleur aanneemt, die bij verder wassen niet meer afneemt. De alcoholische loog in de scheitrechter wordt eveneens tot hetzelfde eindpunt uitgeschud. Voor beide bewerkingen gezamenlijk is ruim 1 liter petroleumether per 100 gram materiaal nodig.

Deze oplossing, die de onverzeepbare fractie van het hooivet bevat, wordt met water gewassen totdat dit niet meer alkalisch reageert en vervolgens gedroogd

met Na_2SO_4. Na filtreren en naspoelen wordt de petroleumether onder doorleiden van N_2 afgedestilleerd.

De aldus verkregen onverzeepbare fractie wordt gechromatografeerd over een zuil van 2,5 × 14,5 cm, inhoudende ca 60 gram Al_2O_3, waarvan de activiteit op de, in hoofdstuk III. 4 aangegeven wijze is ingesteld. De kolom kan gevuld worden door „insneeuwen" of aanstampen. De onverzeepbare fractie wordt met behulp van een weinig petroleumether op de kolom gebracht die van te voren met deze vloeistof bevochtigd moet zijn.

De caroteenfractie wordt geëlueerd met petroleumether, waarvoor ca 150 ml nodig is. Met N_2-overdruk wordt de doorloopsnelheid ingesteld op ongeveer één druppel per seconde. Vervolgens wordt de carotenoïd fractie, die het vitamine D bevat en die uit twee banden bestaat, geëlueerd met petroleumether waaraan 0,5 procent absolute ethanol is toegevoegd. Hiervoor is ongeveer 300 ml nodig. Deze fractie wordt afzonderlijk opgevangen.

Deze carotenoïd-vitamine D-fractie wordt weer ingedampt onder doorleiden van N_2 en opgelost in olie, waarbij iets verwarmd moet worden. In deze vorm kan het vitamine D uit het te onderzoeken materiaal aan de proefratten verstrekt worden.

6. DE BIOLOGISCHE BEPALING VAN HET VITAMINE D

Tot nu toe is het vraagstuk behandeld, hoe het monster chemisch bewerkt moet worden om het geschikt te maken voor het daarop volgende biologische onderzoek. Er kan van afgezien worden dit deel van de bepaling te bespreken, aangezien het een reeds jaren bestaande gestandaardiseerde werkwijze is, waarvoor alle details in de bestaande handboeken te vinden zijn (COWARD, 1947; GYÖRGY, 1950–51). In het huidige onderzoek is de curatieve röntgenmethode toegepast, zoals die in Nederland door EVERSE (1931) is uitgewerkt en die geheel aansluit bij de internationaal gebruikelijke werkwijze.

Er is steeds gebruik gemaakt van het rachitogene STEENBOCK-voer nr 2965. De voorbereidingsperiode, gedurende welke de rachitis zich ontwikkelde, bedroeg drie weken, de daaropvolgende proefperiode twee weken. Als regel bestonden de groepen uit 10–11 ratten. De graad van rachitis aan het eind van de voorbereidingsperiode, evenals de genezing aan het eind van de proefperiode werd vastgesteld door het vervaardigen van röntgenfoto's van de rechter tibiae. Dieren, die gedurende de proefperiode in gewicht afnamen, werden niet meegerekend.

Voor de berekening van de vitamine D-gehaltes en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen zij naar de zojuist aangehaalde handboeken verwezen of naar de uitvoerige verhandeling hieromtrent, voorkomend in de beschrijving van de Britse Standaard Methode (B.S.I. Spec. No. 911, 1940).

HOOFDSTUK IV

DE VITAMINE D-WERKING VAN EEN AANTAL NEDERLANDSE RUWVOEDERS

1. DE VITAMINE D-WERKING

In de jaren 1950–1954 is van 43 monsters Nederlandse ruwvoeders de vitamine D-werking bepaald. Hieronder bevonden zich:

7	monsters	kunstmatig gedroogd gras
5	„	ingekuild voorjaarsgras
4	„	ingekuild najaarsgras
2	„	ingekuilde stoppelknollen met loof
2	„	ingekuild najaarsgras na voordrogen
1	„	schuurhooi
8	„	ruiterhooi
9	„	opperhooi

Aangezien de gehaltes met de ongewijzigde extractiemethode verkregen zijn, waarbij dus het etherextract zonder toepassen van een behandeling met loog op zijn antirachitische werking werd onderzocht, zijn ze te laag. Er dient een correctie op toegepast te worden om ze voor praktisch gebruik hanteerbaar te maken. Deze correctie is mogelijk op grond van de gegevens van tabel 14, waar de niet gewijzigde methode vergeleken is met de verbeterde. De waarden, voorkomend in de tabellen 18–21 zijn dus gecorrigeerd door vermenigvuldiging met de factor 1,3, dit in tegenstelling met de reeds gepubliceerde uitkomsten (WEITS, 1952a, 1953). Deze correctie omvat dus niet de verhoging, welke de uitkomst door chromatografie nog weer te zien geeft (tabel 16). Zuiver analytisch gezien zou dit wel nodig zijn om het totale vitamine D-gehalte te kennen. Stelt men zich echter op een voedingsfysiologisch standpunt, dan heeft waarschijnlijk niet dit totale vitamine D-gehalte, maar juist de vitamine D-werking, welke nog wordt uitgeoefend bij aanwezigheid van de „antivitamine D-factor", de meeste betekenis. De waarden, voorkomend in de tabellen 18–21 moeten dus in dit licht gezien worden en er zal daarom niet de aanduiding vitamine D-gehalte maar vitamine D-*werking* aan gegeven worden. De vitamine D-werking van het kunstmatig gedroogde gras is vermeld in tabel 18, die van de verschillende kuilvoeders in tabel 19, die van het ruiter- en schuurhooi in tabel 20 en die van het opperhooi in tabel 21. Bij het berekenen van de gemiddelde waarden is monster 6a bij het opperhooi weggelaten, omdat dit een in de ijskast bewaard duplicaat was van het in de hooiberg bewaarde monster 6. De monsters 16 en 17 van het ruiterhooi zijn gemiddeld en als één enkel monster gerekend, omdat zij uit hetzelfde uitgangsmateriaal waren bereid. Aangezien de gemiddelde waarde van het ruiterhooi verder sterk werd verhoogd door de bijzonder sterke werking van monster 12, is het gemiddelde van het ruiterhooi ook nog zonder gebruikmaking van dit monster berekend. Het verdient aanbeveling in de praktijk te rekenen met dit laatste, lagere gemiddelde. Bij het kunstmatig gedroogde gras is ditzelfde gedaan ten aanzien van monster 23 en zijn de monsters 21, 21a en 21b gemiddeld en als één enkel monster gerekend.

TABEL 18. Vitamine D-werking van kunstmatig gedroogd gras (i.e./kg ds).
Vitamin D activity of artificially dried grass (i.u./kg D. M.).

Monster *Sample no.*	Provincie *Province*	Maand *Month*	Vit. D-werking *Vit. D activity*
19	Gelderland	aug. 1951	69
20	,,	,, 1951	398
21	,,	sept. 1951	487
21a [1])	,,	,, 1952	348
21b [1])	,,	,, 1952	448
22	,,	juni 1953	721
23	,,	sept. 1953	1495
24	Friesland	,, 1953	227
25	,,	,, 1953	188
		Gemiddeld (*Average*)	504 (338)[2]

[1]) Zelfde monsters als 21 (*Same samples as 21*)
[2]) Zonder monster 23 (*Without sample 23*)

TABEL 19. Vitamine D-werking van ingekuild gras (i.e./kg).
Vitamin D activity of different types of grass silage (i.u./kg).

Ingekuild voorjaarsgras (1951) (*Grass, made in the spring 1951*)

Monster *Sample No.*	Provincie *Province*	Maand *Month*	Vit. D-werking *Vit. D activity* in ds (*D.M.*)	in vers (*wet basis*)	Methode *Method*	pH
26	Gelderland	mei	395	97	melasse-Hardeland	3,9
27	N.Holland	,,	geen (*nil*)	–	melasse	4,15
28	,,	,,	200	47	melasse-Hardeland	4,25
29	,,	,,	407	73	koud-warm	4,9
30	N.Brabant	,,	534	135	melasse-Hardeland	3,9
Gemiddeld (*Average*)			307	70		
Ingekuild najaarsgras (1951) (*Grass, made in the autumn 1951*)						
31	Friesland	juli-aug.	166	52	A.I.V.-zuur	4,9
32	,,	sept.	272	58	bieten-Hardeland	4,0
33	N.Holland	,,	435		warm	5,0
34	Friesland	aug.-sept.	317	73	warm	5,8
Gemiddeld (*Average*)			297			
Ingekuild voorgedroogd najaarsgras (1951) (*Wilted, made in the autumn 1951*)						
35	Friesland	sept.	364	162	voorgedroogd	5,6
36	N.Holland	,,	282		,,	5,9
Gemiddeld (*Average*)			323			
Ingekuilde stoppelknollen (1951) (*Turnip silage, made in the autumn 1951*)						
37	N.Brabant	oktober	geen (*nil*)		lupine-stoppelkn.	4,1
38	,,	,,	geen (*nil*)		stoppelknollen	4,0
Gemiddeld (*Average*)						

TABEL 20. Vitamine D-werking van ruiter- en schuurhooi (i.e./kg ds).
Vitamin D activity of frame-dried and barn-cured hay (i.u./kg D.M.),

Monster *Sample No.*	Provincie *Province*	Maand *Month*	Vit. D-werking *Vit. D activity*	Betrouwbaarheidsgrenzen in % *Fiducial limits* (P = 0,05)
10	Gelderland	juni 1950	693	79–131
11	Limburg	„ 1950	324	65–135
12	„	„ 1950	2159	69–179
13	Gelderland	„ 1951	351	50–151
14	Friesland	mei-jan. 1951	435	72–129
15	Gelderland	juni 1951	295	73–127
16 [1])	„	„ 1953	1417	
17 [1])	„	„ 1953	1306	
Gemiddeld (*Average*)			803 (576) [2])	
Schuurhooi (*Barn-cured hay*)				
18	Groningen	mei-sept. 1952	253	

[1]) Identieke monsters (*Identical samples*).
[2]) Zonder monster 12 (*Without sample 12*).

TABEL 21. Vitamine D-werking van opperhooi (i.e./kg ds).
Vitamin D activity of hay cured in windrows and cocks (i.u./kg D.M.).

Monster *Sample No.*	Provincie *Province*	Maand *Month*	Vit.D-werking *Vit. D activity*	Betrouwbaarheidsgrenzen in % (P = 0,05) *Fiducial limits*
1	Gelderland	juni 1950	1451	74–154
2	Friesland	„ 1950	425	64–136
3	„	mei–jun. 1950	564	67–136
4	Limburg	juni 1950	459	64–137
5	Friesland	„ 1950	348	64–137
6	Gelderland	„ 1950	1357	72–153
6a			1810	74–165
7	„	„ 1951	1072	75–133
8	„	„ 1951	1787	
9	„	„ 1953	1417	
	Gemiddeld (*Average*)		987 [1])	

[1]) zonder monster 6a (*without sample 6a*)

Alvorens de gemiddelde waarden onderling te vergelijken, moet enige aandacht aan deze gemiddelden zelf worden geschonken. Vooral uit de gegevens van het kunstmatig gedroogde gras, het ruiter- en het opperhooi blijkt, dat de werking der afzonderlijke monsters sterk kan variëren. Aangezien het hier praktijkmonsters betreft, waarvan de gegevens omtrent de omstandigheden tijdens de hooiwinning driekwart jaar later werden opgevraagd, was het niet mogelijk de werking met het aantal uren zonlicht en dgl. in verband te brengen. Een afdoende verklaring voor de waargenomen variatie kan dan ook niet gegeven worden. Aan de andere kant moet bedacht worden, dat volgens de betrouwbaar-

heidsberekening een afwijking van ongeveer 30 procent in beide richtingen zeer goed mogelijk is. In een enkel geval zou dit een verklaring kunnen geven voor een bijzonder hoge, respectievelijk lage vitamine D-werking, al ontbreekt hiervoor uiteraard ieder bewijs. Een enkele maal lijkt het mogelijk een lage vitamine D-werking in hooi in verband te brengen met het feit, dat er tijdens de winning weinig in het hooi is gewerkt dan wel met intensieve hooibroei.

Wanneer thans de verschillende *groepen* monsters worden bezien, dan willen wij dit doen aan de hand van de hoeveelheid zonlicht, waarvan de gewassen hebben kunnen profiteren. In de monsters van de stoppelknollenkuilen, bestaande uit knollen met blad, komt geen aantoonbare hoeveelheid vitamine D voor (tabel 19). Gezien het feit, dat deze kuilen voor een groot deel bestaan uit ondergrondse plantendelen, waarin geen vitamine D verwacht mag worden en verder overwegende dat deze knollen groeien in de nazomer, wanneer de antirachitische werking van het zonlicht sterk is verminderd, behoeft de afwezigheid van een vitamine D-werking in deze monsters geen verwondering te wekken.

De voor- en najaarskuilen verschillen onderling niet in vitamine D-werking, zelfs niet als het voorgedroogde kuilen betreft (tabel 19). Aangezien het bij de beide voorgedroogde kuilen ging om gras dat bij het voordrogen ongeveer vier dagen bij droog, zonnig weer op het land had gelegen, zou dit uitgelegd kunnen worden als een aanwijzing, dat de antirachitische werking van het zonlicht gedurende eind augustus en september niet hoog meer aangeslagen mag worden.

De uitkomsten van de verschillende kuilen liggen, onafhankelijk van de werkwijze, vrijwel steeds tussen 200–400 i.e. per kg droge stof. Aangezien er geen duidelijk verband blijkt te bestaan met de pH, doet dit vermoeden dat ook het al of niet geslaagd zijn van de kuil geen ingrijpende invloed op het vitamine D-gehalte uitoefent. De invloed van het inkuilproces op het vitamine D-gehalte van het uitgangsmateriaal kan uit de huidige gegevens niet worden afgeleid. Op grond van een vergelijking van de vitamine D-werking van kuilgras met die van kunstmatig gedroogd gras, waartussen een onbetekenend verschil bestaat, zou men geneigd zijn te besluiten, dat door het inkuilen weinig of geen vitamine D verloren gaat. In hoofdstuk II is reeds meegedeeld dat ALLEMANN (1942) vond, dat inkuilen uiterst schadelijk voor het vitamine D zou zijn, terwijl TSCHERNIAK c.s. (1950), THOMAS c.s. (1951) en KEENER (1954) juist een stijging van het vitamine D-gehalte ten opzichte van dat van het uitgangsmateriaal waarnamen.

De vitamine D-werking van de monsters kunstmatig gedroogd gras vertonen een beeld, dat veel overeenkomst vertoont met dat van de kuilmonsters. Ook hier lijkt een minimum-gehalte van 200-400 i.e. per kilogram droge stof veelal wel verzekerd. Een enkele maal blijkt een duidelijk hoger gehalte voor te komen, zonder dat hier een oorzaak voor opgegeven kan worden. Monster 23 b.v. is afkomstig van een partij kunstmatig gedroogd gras, die eind september gemaaid en op dezelfde dag gedroogd werd.

Het is lang een open vraag geweest of vers weidegras vitamine D bevat. Naast positieve uitkomsten zijn er in de literatuur verschillende gegevens te vinden, die het twijfelachtig maken. Bij een nadere bestudering van deze uitkomsten viel het ons op, dat vers gras, waarin vitamine D aangetoond kon worden, veelal onmiddellijk kunstmatig gedroogd was, terwijl het in de overige gevallen binnenshuis zonder verhitten in de loop van enige dagen was gedroogd. Het zou dus kunnen zijn, dat aanvankelijk wel enig vitamine D aanwezig is geweest, maar dat dit tijdens het langzame droogproces is afgebroken; ook uit de uitkomsten van ALLEMANN (1942) kan dit worden afgeleid. Om deze mogelijkheid te bezien is

van een hoeveelheid vers gras de helft onmiddellijk in een droogstoof bij 60 °C gedroogd en de andere helft in een donkere ruimte uitgespreid. De eerstgenoemde helft werd hier na drogen eveneens neergelegd. Bovendien werd gelijktijdig met het groene grasblad een hoeveelheid afgestorven, bruin blad van hetzelfde perceel verzameld. De vitamine D-werking is vermeld in tabel 22.

TABEL 22. Vitamine D-werking van groen en bruin grasblad (i.e./kg ds).
Vitamin D activity of green and brown grass leaves (i.u./kg D.M.).

Groen blad, direct gedroogd (*Green leaves, dried immediately*)	390
Groen blad, verwelkt (*Green leaves, dried in a dark room*)	406
Bruin blad (*Dead brown leaves*)	1651

Het denkbeeld, dat door het langzaam drogen binnenshuis vitamine D afgebroken zou worden, wordt door deze uitkomst niet ondersteund. De tegenstrijdigheid in de literatuur is hiermee dus niet opgelost. De aanzienlijke vitamine D-werking van het bruine blad kan echter geheel of gedeeltelijk verantwoordelijk zijn voor de vitamine D-werking van „vers" gras en de herhaaldelijk waargenomen verschillen in gehalte. De waarneming dat bruin blad aanzienlijk meer vitamine D bevat dan groen blad, is ook reeds gepubliceerd (BECHTEL c.s., 1936; NEWLANDER, 1948; THOMAS c.s., 1951; GRANT, 1951).

De vitamine D-werking, aangetroffen in de hooimonsters, doet duidelijk de invloed van het zonlicht zien. Wanneer de uitkomsten van ingekuild en van kunstmatig gedroogd gras als één groep worden gezien en bovendien als representatief voor die van vers gras worden beschouwd, dan zou deze invloed van het zonlicht neerkomen op een stijging van de vitamine D-werking met 100–200 procent.

Belangwekkend is de vraag naar het mogelijke verschil in vitamine D-werking tussen ruiterhooi en opperhooi. Verwacht werd, dat de werking van ruiterhooi aanzienlijk geringer zou zijn dan die van opperhooi. ALLEMANN (1942) nam b.v. waar, dat ruiterhooi niet alleen minder vitamine D bevat dan opperhooi, maar zelfs nog 50 procent minder dan het verse gras waaruit het bereid was. In het huidige onderzoek bleek dit mee te vallen. Bij het ruiteren wordt ongetwijfeld vitamine D gevormd. Het ruiterhooi bevatte nl. gemiddeld aanzienlijk meer vitamine D dan kunstmatig gedroogd gras. Dooreengenomen was de werking echter geringer dan die van het opperhooi.

Er is reeds gewezen op de aanzienlijke spreiding in de uitkomsten der hooimonsters, zodat de vergelijking van de gemiddelde waarden weinig betrouwbaar is. Ofschoon er wel een aantal onderzoekingen uitgevoerd is, waarin werd nagegaan in welke mate de vitamine D-werking in het gemaaide gewas na het maaien toeneemt (WALLIS, 1944; NEWLANDER c.s., 1952) en welke factoren er op van invloed zijn (ALLEMANN, 1942; THOMAS, 1951; KEENER, 1954), is het nog niet mogelijk de vitamine D-werking van hooi te voorspellen of te correleren met een eenvoudig te bepalen grootheid.

Wanneer de vitamine D-werking van de Nederlandse hooimonsters vergeleken wordt met de buitenlandse cijfers, voorkomend in hoofdstuk II. 3, dan valt de uitslag niet tegen. Weliswaar vermelden WALLIS c.s. (1949) hogere gehaltes in grashooi, maar overigens zijn de Nederlandse gehaltes vergelijkbaar met de

door NEWLANDER (1948) en MOORE c.s. (1948) vastgestelde waarden, terwijl ze die van BECKER (1943) en van KEENER (1954) overtreffen. Hierbij moet dan nog bedacht worden, dat de zojuist geciteerde buitenlandse cijfers waarschijnlijk te hoog zijn, aangezien deze laatste vrijwel zeker met behulp van de mengmethode zijn bepaald.

Behalve gras en grasprodukten zijn ook enige monsters stro onderzocht. Daar achteraf bleek, dat de doseringen ervan in de verschillende proeven minder gunstig gekozen waren, kunnen geen uitkomsten vermeld worden. Wel bleek, dat de antirachitische werking van de stromonsters niet onderdeed voor die van hooi. Dit is in overeenstemming met wat door BROUWER c.s. (1931) hieromtrent reeds was waargenomen. Het lijkt derhalve wel zeer waarschijnlijk, dat ook stro voor de vitamine D-voorziening gedurende de winter een waardevol voedermiddel kan zijn.

Wanneer de vitamine D-werking van de verschillende groepen ruwvoedermiddelen uit de tabellen 18–21 met elkaar wordt vergeleken, dan wordt het vermoeden bevestigd, dat opperhooi de gunstigste vitamine D-bron vormt en dat de andere voedermiddelen, zoals ruiter- en schuurhooi, alsook kunstmatig gedroogd en ingekuild gras hierbij gemiddeld achterblijven. Naarmate het aandeel van opperhooi in het stalrantsoen afneemt en dat van de andere produkten toeneemt, ontstaat dus een ongunstige tendens in de vitamine D-voorziening. In dit verband is het teleurstellend, dat de gehaltes van de beide voordroogkuilen zich niet gunstig onderscheiden van de overige kuilmonsters. Het ging hier echter slechts om twee monsters.

2. DE VITAMINE D-VOORZIENING VAN HERKAUWERS IN NEDERLAND

Na het voorgaande is een belangrijke vraag hoe het in Nederland staat met de vitamine D-voorziening van kalveren en koeien. In de inleiding werd reeds gezegd, dat duidelijke rachitische verschijnselen bij kalveren wel voorkomen, maar dit is niet dikwijls het geval. Hieruit volgt dus niet dat de vitamine D-voorziening van het rund steeds voldoende verzekerd is. Daarom willen wij thans aanbod en behoefte tegenover elkaar stellen en daarbij tevens de lichaamsreserve in onze beschouwingen betrekken.

Uit het onderzoek van een aantal levers van kalveren beneden één jaar (EATON c.s., 1947a, b; NEWLANDER c.s., 1950) is gebleken, dat deze reserve 0,1–0,2 i.e. per gram verse lever bedraagt. Aangezien de lever van een kalf ongeveer 900 gram weegt, komt dit overeen met 90–180 i.e. vitamine D. Dit duidt er wel op, dat de totale lichaamsreserve niet groot kan zijn, omdat deze reserve zich hoofdzakelijk in de lever bevindt. Wij dienen er derhalve van uit te gaan dat het voeder volledig in de vitamine D-behoefte van het kalf moet voorzien. Cijfers hieromtrent zijn weergegeven in tabel 23, waarvan fig. 3 de grafische weergave vormt.

Het gewicht van de dieren en van het hooi zijn ontleend aan LENKEIT (1953), de hoeveelheid volle melk aan het vlugschrift voor de Landbouw Nr 36 (IWEMA, 1953) „Het opfokken van kalveren". Bij toepassen van het in dit Vlugschrift opgenomen schema A wordt 290 kg volle melk per kalf verstrekt. Als vetgehalte is 3,60 procent aangehouden. Voor de opfok van kalveren is dit rijkelijk hoog; het is echter tegenwoordig als een aannemelijk gemiddelde te beschouwen vanNederlandse melk. Als vitamine D-gehalte van het melkvet in wintermelk is gerekend

TABEL 23. Vitamine D-opname van kalveren in hooi en volle melk.
Daily vitamin D intake by calves from hay and whole milk compared with the recommended allowance.

Leeftijd (weken) *Age (wks)*	Gewicht (kg) *Wt. (kg)*	Voederopname Volle melk (kg) *Milk (l)*	Hooi (g) *Hay (g)*	Vitamine D (i. e.) Melk *Milk*	Hooi *Hay*	Totaal *Total*	Vitamine D-norm *Vitamin D allowance* N.R.C. (1950)	THOMAS (1952)
		Daily intake		*Vitamin D (i. u.)*				
2	42	4	50	13	42	55	374	140
3	49	5	50	16	42	58	436	163
4	53	6	100	19	84	103	471	177
5	59	5	100	16	84	100	524	197
6	65	5	150	16	126	142	578	217
7	70	4	200	13	168	181	622	233
8	76	4	300	13	252	265	675	254
9	82	2	300	6	252	258	729	274
10	88	2	350	6	294	300	782	294
11	94	1	400	3	336	339	835	314
12	100	1	500	3	419	422	889	334
13	106	–	600	–	503	503	942	354
14	112	–	700	–	587	587	995	374
15	118	–	800	–	671	671	1050	394
16	125	–	900	–	755	755	1110	416

0,09 i.e. per gram vet (GRIJNS c.s. 1934). Deze waarde komt goed overeen met een eigen waarneming, van 0,12 i.e. in februari-melk. Als vitamine D-werking van hooi is het gemiddelde van de monsters in tabel 21 aangehouden, nl. 839 i.e. per kg hooi met 85 procent droge stof.

De vitamine D-norm is ontleend aan „National Research Council Report 3, Recommended Nutrient Allowances for Dairy Cattle" (1950). Deze norm, berustend op proeven van BECHDEL c.s. (1938), bedraagt 400 i.e. per 45 kg levend gewicht. Deze hoeveelheid is formeel gezien te hoog, aangezien het rantsoen van BECHDEL te weinig fosfor bevatte. Hierdoor namen de dieren ongeveer 2,5 gram fosfor op per 45 kg levend gewicht bij een Ca/P-verhouding van ongeveer 3 : 1. Derhalve is in tabel 23 en fig. 3 eveneens als norm opgenomen de hoeveelheid van 150 i.e. per 45 kg levend gewicht. Deze is ontleend aan proeven van THOMAS (1952). Voor de praktische veevoeding ligt deze hoeveelheid mogelijk aan de krappe kant, omdat een goede calcium- en fosforvoorziening vereist was om moeilijkheden te voorkomen. Men krijgt de indruk, dat deze hoeveelheid om als norm aanbevolen te mogen worden, een toeslag als veiligheidsmarge behoeft. Voor praktische doeleinden kan bij de huidige stand onzer kennis derhalve aangenomen worden, dat de vitamine D-behoefte van kalveren tussen 150 en 400 i.e. per 45 kg levend gewicht ligt.

Uit fig. 3 wordt het nu duidelijk, dat de hoeveelheid vitamine D die met volle melk en hooi wordt verstrekt, de eerste maanden onvoldoende is, omdat de volle melk slechts een geringe bijdrage levert. Eerst wanneer voldoende hooi wordt opgenomen wordt het tekort geringer.

Voor volwassen rundvee is het vraagstuk van de vitamine D-voorziening moeilijker te beoordelen. In de eerste plaats schijnen volwassen dieren lange tijd weerstand te bieden aan een vitamine D-deficiëntie. Bij de proeven van WALLIS (1946) duurde het nl. niet minder dan 6–10 maanden alvorens melkkoeien, op

stal gehouden op een praktisch vitamine D-loos rantsoen, duidelijke symptomen van vitamine D-tekort te zien gaven. Naarmate de melkproduktie hoger was, traden de symptomen eerder op. Hieruit vloeit dus voort, dat uit de afwezigheid van klinisch waarneembare vitamine D-deficiëntieverschijnselen, zoals die door

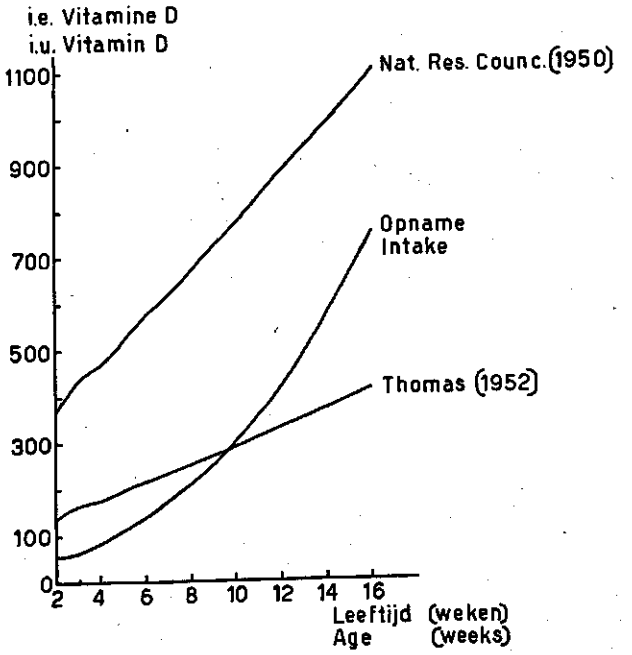


FIG. 3. De vitamine D-voorziening van kalveren vergeleken met de norm.
Vitamin D intake of calves in comparison with the recommended allowance.

WALLIS (1946) zijn beschreven, niet mag worden besloten tot een voldoende voorziening.

In de tweede plaats moet rekening gehouden worden met de mogelijkheid, dat de volwassen dieren gedurende de weidetijd een ruime lichaamsreserve opbouwen (MORRISON, 1948), waaruit gedurende de daaropvolgende stalperiode geput kan worden. Dit houdt in dat het nog geenszins ernstig behoeft te zijn, wanneer de vitamine D-voorziening iets beneden de aanbevolen hoeveelheid ligt.

In de derde plaats bestaat er geen officiële norm voor de vitamine D-behoefte van volwassen koeien. De weinige beschikbare gegevens wijzen op een minimum behoefte van ongeveer 1000 i.e. per 100 kg levend gewicht. Welke de invloed van de produktie is, staat in het geheel niet vast. WALLIS (1946) suggereert dat 12000–15000 i.e. vitamine D per dag het praktisch minimum zou moeten zijn voor een melkkoe.

Om evenwel verder te komen met het vraagstuk van de vitamine D-voorziening van het melkvee was het gewenst de beschikking te krijgen over gegevens omtrent de lichaamsreserve. Daartoe is van zes koeien, waarvan drie in het voorjaar en drie in het najaar werden geslacht, het vitamine D-gehalte van de lever bepaald. De uitkomsten komen voor in tabel 24.

TABEL 24. Het vitamine D-gehalte van enkele koeienlevers (i.e./g verse lever).
Vitamin D content of livers of cows (i.u./g fresh liver).

voorjaar (*spring*)	Lever 1	ten hoogste	0,03
	„ 2	„ „	0,03
	„ 3	„ „	0,03
najaar (*autumn*)	„ 1	„ „	0,07
	„ 2	„ „	0,07
	„ 3	„ „	0,11

Aangezien het gewicht van een runderlever vers ongeveer acht kg bedraagt, lijkt het op grond van dit geringe aantal gegevens onwaarschijnlijk, dat volwassen dieren over een aanzienlijke lichaamsreserve beschikken. Hierop wijst ook het relatief geringe vitamine D-gehalte van wintermelk vergeleken met dat van zomermelk (GRIJNS c.s., 1934), al dient toegegeven te worden, dat dit geen overtuigend argument is.

In ieder geval lijkt het gewenst bij de vitamine D-voorziening van melkvee gedurende de staltijd niet te veel op de reserves te rekenen. Voor een beoordelen van de situatie zou voor de behoefte aangehouden kunnen worden 5000–7000 i.e. per dag (WALLIS, 1946), voor de vitamine D-werking van hooi 839 i.e. per kg (tabel 21), terwijl stro hieraan gelijk gesteld kan worden. Voor de vitamine D-werking van kuilgras, zoals het wordt gevoerd, kan aangehouden worden 70 i.e. per kg (tabel 19) en voor het kunstmatig gedroogde gras 350 i.e. per kg (tabel 18). Aan de hand van aanbevolen voorbeeldrantsoenen (VERHOEVEN c.s., 1955) blijkt, dat op de weidebedrijven met 8–10 kg hooi gemiddeld meer dan 6000 i.e. vitamine D verstrekt zou worden. Hierbij komt dan nog de bijdrage van het ingekuilde gras, het kunstmatig gedroogde gras en het stro, zódat de totale voorziening boven 7000 i.e. vitamine D uit zou komen. Bij het verstrekken van de voorbeeldrantsoenen is de gemiddelde voorziening op deze bedrijven dus wel bevredigend, maar ook niet meer.

Op de gemengde bedrijven in de zandstreken lijkt de toestand minder gunstig, aangezien hier minder hooi wordt verstrekt. Andere produkten, zoals voederbieten en hun afvallen, stoppelknollen, nemen een ruimere plaats in de rantsoenen in. Voor de gemengde bedrijven op de klei kan nog het suikerbietenkop en -blad genoemd worden. Over het geheel genomen zijn deze produkten arm aan vitamine D, zodat ze in dit opzicht het hooi niet kunnen vervangen. Deze vermindering kan alleen opgevangen worden door het verstrekken van stro, en waarschijnlijk ook wel van kaf. Slaagt men er echter in de hoeveelheden hooi met stro en eventueel kaf op een niveau van 8–10 kg te houden, dan ligt de situatie niet ongunstiger dan op de weidebedrijven, aangezien de vitamine D-opname ook dan gemiddeld op ruim 6000 i.e. vitamine D per dag geschat mag worden.

Uit deze becijferingen blijkt dat hooi, verstrekt in hoeveelheden welke in ons land gebruikelijk zijn, toch zeker 800 i.e. vitamine D per kilogram luchtdroge stof moet bevatten om aan een waarschijnlijk niet ruim gestelde norm te kunnen voldoen. Gezien de onbekende invloed van de melkproduktie op de behoefte zou het misschien gewenst zijn, dat deze waarde iets hoger lag, b.v. in de buurt van 1000 i.e. per kilogram. Uit de grote variatie, die in de uitkomsten voorkomt volgt, dat men hieraan op vele bedrijven niet toekomt, waar dan nog aan toegevoegd kan worden, dat voor de beoordeling van de situatie gebruik gemaakt is van de vitamine D-werking van opperhooi en niet van ruiterhooi.

Om nu het gemiddeld aanbod te verhogen, zou het een te verdedigen maatregel zijn, de dieren in de staltijd extra vitamine D te verschaffen, ook al is het de vraag of hier direct waarneembare gunstige gevolgen uit voortvloeien. ABRAMS (1952) is van mening dat dit laatste in Engeland op het punt van de melkproduktie en vruchtbaarheid wel het geval zou zijn. Aan de andere kant hebben proeven met melkkoeien dit echter niet te zien gegeven (HORN, 1934a, b; KRAUSS c.s., 1939; ARCHIBALD c.s., 1943).

HOOFDSTUK V

LITERATUUROVERZICHT OVER DE FACTOREN, DIE HET VITAMINE D TEGENWERKEN

1. INLEIDING

In hoofdstuk III. 4 is reeds gewezen op het niet evenwijdig zijn van de regressielijnen van vitamine D-standaard en hooivet en eveneens op de gevolgen daarvan in analytisch opzicht. Dit verschijnsel heeft echter eveneens een fysiologische zijde. Er werd namelijk als meest voor de hand liggend vermoeden uit afgeleid dat de genezing van de rachitische ratten door de hoogste hooidosering lager was dan op grond van de genezing van de laagste dosering verwacht mocht worden. Aangezien bij de bepalingen steeds uitgegaan werd van het ruwvet van het hooi, werd hierin de aanwezigheid vermoed van een factor, die het vitamine D tegenwerkt. Zonder dat hier nog verdere associaties aan vastgeknoopt werden, is deze factor voorlopig „antivitamine D-factor" genoemd. Dit vermoeden is ook nog langs een andere weg aan een onderzoek onderworpen, zoals in hoofdstuk VI nader uiteengezet zal worden. Aangezien ook proeven zijn gewijd aan het ophelderen van de identiteit van deze antivitamine D-factor (hoofdstuk VI), is de literatuur hiervoor eveneens bestudeerd.

2. FACTOREN DIE DE WERKING VAN HET VITAMINE D TEGENGAAN

Het feit, dat de antivitamine D-factor in ether oplosbaar moet zijn, schakelde reeds direct een aantal bekende mogelijkheden uit. HARRIS (1948) heeft er een vijftal opgesomd, waaronder fytaat, de zuur/base- en de Ca/P-verhouding, waarvan de invloed op de antirachitische werking van het vitamine D vaststaat, maar die in het huidige geval om de bovengenoemde reden geen rol gespeeld kunnen hebben. Hetzelfde geldt voor oxaalzuur en een aantal elementen, zoals Sr en Be, waarvan de rachitisverwekkende werking eveneens vaststaat. Naast de genoemde factoren komen er in de literatuur nog enkele, min of meer geïsoleerd staande mededelingen voor over verbindingen, die afbreuk zouden doen aan de werking van het vitamine D.

COPPENS c.s. (1933) en METZ c.s. (1934) meenden met behulp van in vitro proeven in longweefsel een enzym aangetoond te hebben, dat het vitamine D vernietigt dan wel inactiveert. Ook het bloed zou dit vermogen bezitten; in lever en andere organen zou dit enzym daarentegen niet aantoonbaar zijn. Aangezien zowel tegen de vitamine D-bepalingen, alsook tegen de ingrepen, die de onderzoekers op het geïsoleerde weefsel toepasten, ernstige bezwaren aangevoerd kunnen worden, dient men bevestiging van hun uitkomsten af te wachten.

CHARPY c.s. (1947) hebben waargenomen, dat cysteïne de toxische werking tegengaat van grote doses vitamine D, toegepast ter bestrijding van bepaalde vormen van tuberculose. Dit wordt aan de hand van de ziektegeschiedenissen van drie patiënten gedemonstreerd. De vraag is echter gewettigd of hier in plaats van een vitamine D-antagonisme niet een vitamine D-afbraak in het spel geweest kan zijn door de zeer reactieve SH-groep van het cysteïne, temeer omdat ook de werking van het vitamine D op het tuberculeuze proces teloor scheen te gaan.

Gezien de tendens chronische arthritis met hoge vitamine D-doses te gaan behandelen en het vermoeden dat deze kwaal iets te maken zou kunnen hebben met de geslachtshormonen, bestudeerden NORMAN c.s. (1948) het verband tussen de werking van het vitamine D enerzijds en van het testosteron en oestradiol anderzijds op de calcium-fosforstofwisseling. Oestradiol, naast vitamine D verstrekt, bleek het beenasgehalte van rachitische ratten nog te verhogen, terwijl testosteron het verlaagde en het nauwer worden van de rachitische metafyse onder invloed van vitamine D vertraagde. Zij kenden dit mannelijke geslachtshormoon dan ook een rachitogene werking toe. Het belangwekkende van deze waarneming, die min of meer overeenkomt met de uitkomsten van GARDNER (1943) is daarin gelegen, dat hier aan een structuuranalogie gedacht kan worden.

Dit vermoeden is uitgesproken door ANDERSON c.s. (1954), die redenen vonden om aan te nemen, dat er een antagonisme zou bestaan tussen vitamine D en cortison. Zij baseerden dit op hun waarnemingen dat cortison het calciumgehalte van het bloed verlaagt bij patiënten die hypercalcemie vertoonden tengevolge van sarcoïden. FREEDMAN (1954) heeft echter ernstige kritiek uitgeoefend op hun veronderstelling van een algemeen antagonisme of van een rachitogene werking van cortison. Wel wil hij de mogelijkheid openhouden voor een lokaal antagonisme, b.v. bij de terugresorptie van aminozuren in de niertubuli.

MOURIQUAND (1923) nam waar dat de levensduur van cavia's op een onevenwichtig rantsoen van enkel gerst en citroensap nog aanmerkelijk werd bekort, wanneer zij bovendien nog 2,5 ml levertraan per dag en per dier ontvingen. Een kenmerkend gevolg van deze levertraantoediening was een verminderde weerstand van de pijpbeenderen tegen breuk. Werd het voer evenwichtig gemaakt door het toevoegen van hooi, dan bleef deze beenafwijking uit. Na in 1948 kennis gekregen te hebben van het bestaan van antivitamines, sprak MOURIQUAND (1949) het vermoeden uit, dat er in levertraan een antivitamine D voor zou kunnen komen. Aangezien levertraan tamelijk veel vitamine A bevat, zou echter de vraag moeten rijzen of er niet eerder aan een hypervitaminose A gedacht moet worden.

Ook BRION c.s. (1951) kwamen tot de opvatting dat in levertraan een stof moet voorkomen, die de werking van het vitamine D tegengaat. Deze uitspraak is gebaseerd op de uitkomsten, verkregen bij de opfok van een aantal biggen uit één worp. De vier door hen gevormde groepen waren derhalve klein (2–3 biggen per groep) en het aanvangsgewicht der groepen verschilde teveel (8,4 tot 13,2 kg). Het verschil in groeisnelheid, waarop BRION c.s. hun opinie baseerden evenals hun uitspraak, dat het vitamine D_3 beter werkzaam zou zijn dan het vitamine D_2, zouden door dit grote verschil in aanvangsgewicht zeer goed verklaard kunnen worden.

CHEVALLIER c.s. (1950, 1952) hebben melding gemaakt van een in vet oplosbare factor, die de toxische werking van een zeer hoge vitamine D-dosis bij cavia's tegenging. Deze factor bleek voor te komen in de vetzuurfractie van het door hen gebruikte voer. De factor bleek niet identiek te kunnen zijn met vitamine A of E.

MØLLGAARD (1943) nam toevallig waar, dat het dagelijks verstrekken van een geringe hoeveelheid Na_2S aan varkens ernstige rachitis ten gevolge had, doordat de resorptie van calcium, fosfor en magnesium er sterk door verminderd werd. Vitamine D verhinderde de rachitogene invloed van het sulfide-ion geheel.

Naast deze, min of meer geïsoleerd staande mededelingen betreffende factoren, die het vitamine D tegenwerken, maakt de literatuur nog melding van een drietal factoren, waaraan dezelfde werking toegekend zou moeten worden en die bij herhaling het onderwerp van ernstig onderzoek zijn geweest. Aansluitend bij de mededelingen van MOURIQUAND (1949) en BRION c.s. (1951), dat levertraan een stof bevat, die het vitamine D tegenwerkt, delen GOUNELLE c.s. (1951a) en zijn medewerkers (TEULON c.s., 1951a) mede, dat vitamine A-rijke levertraan de toxische werking van een hoge vitamine D-dosis bij ratten tegenging. De ratten bleven langer in leven, namen minder in gewicht af en vertoonden een lager calciumgehalte van het nierweefsel wanneer behalve een toxische dosis vitamine D tevens levertraan werd verstrekt. Dit effect deed zich zowel voor wanneer de levertraan per os als wanneer zij parenteraal werd toegediend.

Anderzijds vonden zij (TEULON c.s., 1951b), dat de vitamine D-intoxicatie niet van invloed was op de mate waarin het verstrekte vitamine A in de levers van de proefdieren werd opgeslagen. De beschermende werking, die levertraan tegen de vitamine D-vergiftiging uitoefende, bleek niet parallel te lopen met de hoeveelheid vitamine A in de lever (GOUNELLE c.s., 1951b). Min of meer hiermee in overeenstemming vonden zij (GOUNELLE c.s., 1952) op grond van proeven met synthetisch vitamine A, dat de beschermende werking van levertraan niet aan het daarin voorkomende vitamine A toegeschreven mocht worden. Ook olijfolie bleek geen beschermende werking uit te oefenen. De vitamine D-intoxicatie had ook geen invloed op de reservevorming van het verstrekte synthetisch vitamine A in de lever, zoals dit ook reeds met levertraan was vastgesteld (TEULON c.s., 1952).

Uit het geheel van deze uitkomsten trekken GOUNELLE c.s. de conclusie, dat levertraan een werking bezit, die de gevolgen van een toxische vitamine D-dosis tegengaat. Tegen deze interpretatie kan echter bezwaar gemaakt worden. Herhaaldelijk komen in hun proefverslagen uitkomsten voor, die volkomen afwijkend zijn of die in onvoldoende mate door controleproeven gesteund worden. Aangezien aan deze afwijkende uitkomsten weinig aandacht is geschonken, dient bovengenoemde slotsom over de werking van levertraan met enige reserve te worden bezien.

Interessant is de waarneming van BRAUDE c.s. (1943) in Engeland, dat acht procent biergist, als eiwitbron opgenomen in varkensvoeder, rachitis veroorzaakte. Ofschoon men in Duitsland reeds over een uitgebreide ervaring beschikte over voedergist (*Torula utilis*) als eiwitbron voor varkens (BÜNGER, 1939), is daar voorzover ons bekend nooit melding van rachitische verschijnselen gemaakt, niettegenstaande er eveneens hoge doseringen zijn toegepast.

Het ontstaan van rachitis als gevolg van het verstrekken van een vrij grote hoeveelheid biergist kon geremd worden door het kalkgehalte van het voer te verhogen en deze ziekte kon geheel voorkomen of zelfs genezen worden door het geven van levertraan. Aanvankelijk werd het voor mogelijk gehouden dat de rachitogene werking van de biergist veroorzaakt zou worden door de sterke verandering die het teweegbrengt in de verhouding tussen de gehaltes aan calcium en resorbeerbaar fosfor in het voer. Proefnemingen met anorganisch fosfaat

(BRAUDE c.s., 1944) toonden echter aan, dat de oorzaak hierin niet gelegen was.

De waarneming van HOFF-JØRGENSEN (1947) dat biergist in vitro de werking van fytase verminderde, zodat toegevoegd fytaat in geringere mate werd gesplitst, is aanleiding geweest om deze mogelijkheid aan de hand van proeven met varkens te toetsen. BRAUDE c.s. (1948) waren echter niet in staat deze waarneming bij varkens te bevestigen, evenmin als bij proeven in vitro. Dit laatste is nog bevestigd door proeven in vitro van DE MAN (1948) en van HOFF-JØRGENSEN zelf (1948).

In een beknopt overzicht betreffende de rachitogene werking van biergist komen BRAUDE c.s. (1949) tot de slotsom, dat er nog geen afdoende verklaring voor gegeven kan worden. Dat biergist niettemin met goed gevolg als eiwitbron gebruikt kan worden, mits van de aanvang af levertraan wordt verstrekt, was reeds uit proeven van WORDEN (1943) gebleken. Inmiddels worden de proeven in Engeland nog steeds voortgezet.

Eveneens belangwekkend is het werk, dat in Nieuw-Zeeland werd verricht aangaande de oorzaak van de aldaar geconstateerde rachitogene werking van groenvoeders. Men was er aldaar mee vertrouwd geraakt, dat gedurende de wintermaanden bij schapen af en toe slechte groei, een stijve gang en soms zelfs verlammingen voorkwamen, in het bijzonder wanneer de dieren graasden op groene haver. FITCH (1943) kwam op grond van gedegen onderzoek tot de opvatting, dat het hier echte rachitis betrof. Aangezien de kalk- en fosforzuurgehaltes van de groenvoeders als voldoende beschouwd konden worden en de genoemde afwijkingen vooral in de wintermaanden voorkwamen, neigt FITCH (1943) er aarzelend toe vitamine D-tekort als de oorzaak te beschouwen.

Nadat deze diagnose gesteld was, werd in de volgende jaren getracht rachitis bij schapen op te wekken door ze gedurende de winter op groene haver te laten grazen, hetgeen na enige mislukkingen pas na drie jaren het gewenste gevolg had (FITCH c.s., 1944). Het verstrekken van levertraan bleek weliswaar voldoende te zijn om de groeistoornis op te heffen, maar niettemin werd bij pathologisch-anatomisch onderzoek lichte rachitis geconstateerd. Het verstrekken van beendermeel had vrijwel geen invloed. FITCH c.s. (1944) menen de rachitis dan ook niet uitsluitend aan vitamine D-tekort te mogen toeschrijven, maar zij houden rekening met de mogelijkheid, dat er in groenvoeders een factor voorkomt, die de fosforstofwisseling ongunstig beïnvloedt.

Dit vermoeden wordt versterkt door de uitkomsten van naderhand uitgevoerde vergelijkende proeven met schapen (EWER c.s., 1948) omtrent de rachitogene werking van verschillende gewassen, waarbij bovendien de invloed van een vitamine D-stoot werd onderzocht. Bij herhaling bleek nu, dat groene haver en gerst en in geringere mate ook Italiaans raaigras een duidelijk rachitogene werking uitoefenden. De andere gewassen zoals knollenblad en mergkool veroorzaakten nauwelijks enige stoornis. De kalk- en fosforzuurgehaltes der gewassen konden hiervoor geenszins verantwoordelijk gesteld worden. Bij het grazen op groene haver en gerst kon men de rachitis voorkomen en zelfs genezen en de groei verbeteren door het verstrekken van 25 mg, dus 1.000.000 i.e., vitamine D. Het verstrekken van krijt had geen enkel effect. Voorts bleek er een duidelijke positieve correlatie te bestaan tussen gunstige weersomstandigheden die een rijkelijke groei van de gewassen ten gevolge hadden en het ontstaan van rachitis. Eveneens bestond er een positieve correlatie tussen de hypofosfatemie en de graad van de rachitis.

EWER (1949) is op grond van deze ervaringen van mening, dat de belangrijkste

factor voor het ontstaan van de rachitis een onbekende stof moet zijn, die vooral voorkomt in groene graangewassen en een ongunstige invloed heeft op de fosforstofwisseling.

Bij zijn voortgezette proeven bleek aan EWER (1950), dat ook de in Engeland groeiende haver rachitogene eigenschappen bezit, zowel voor schapen als voor cavia's. In overeenstemming met de Nieuwzeelandse uitkomsten bleek ook het Engelse produkt, nu in kunstmatig gedroogde vorm verstrekt, het fosforgehalte van het bloedserum te doen afnemen zonder het calciumgehalte merkbaar te beinvloeden. Later sprak hij het vermoeden uit (EWER, 1953) dat hier een antivitamine D in het spel zou kunnen zijn.

Het vraagstuk van de rachitogene factor in groene haver is verder bestudeerd en ogenschijnlijk tot een verrassende oplossing gebracht door GRANT (1951, 1953). Het bleek hem dat het beenasgehalte van rachitische jonge ratten, waaraan vitamine D werd verstrekt, minder snel toenam wanneer gelijktijdig een chloroformextract van groene haver werd gegeven. Dit was eveneens het geval, wanneer het vitamine D subcutaan werd verstrekt en het haverextract per os. Ook chloroformextracten van gras vertraagden de stijging van het beenasgehalte. In een volgende publikatie deelt hij mede (GRANT, 1953) een vorm van chromatografie uitgewerkt te hebben, waardoor hij erin geslaagd was de rachitogene factor verder te zuiveren en de identiteit ervan op te helderen, hierbij ook weer geleid door de uitkomsten van proeven met ratten. Het verrassende van deze mededeling is, dat de gezochte rachitogene factor geen onbekende stof zou zijn, maar het provitamine A, derhalve caroteen. Uit rattenproeven bleek verder, dat ook vitamine A eenzelfde beenas-verlagende werking uitoefende. Hij wijst er tenslotte op, dat de zeer grote hoeveelheden caroteen, die door schapen en koeien met groenvoeders worden opgenomen, een verklaring zouden kunnen vormen voor de rachitogene werking ervan gedurende de winter, wanneer de zonbestraling te wensen overlaat en de lichaamsreserve gering is.

Aangezien de werkwijze van GRANT (1951, 1953) bijna geheel met de onze overeenstemde en zijn mededeling betreffende de rachitogene werking van caroteen wellicht ook onze uitkomsten zou kunnen verklaren, hebben wij ook de literatuur omtrent het vitamine A als „antagonist" van het vitamine D bestudeerd.

3. HET VITAMINE A ALS „ANTAGONIST" VAN HET VITAMINE D

Zoals gezegd herleidde GRANT (1953) het vraagstuk van de rachitogene factor in groenvoeders tot een wisselwerking tussen de vitamines A en D. Het blijkt nu, dat er zeer tegenstrijdige uitspraken omtrent deze wisselwerking bestaan. Zo deelt LEHNARTZ (1943) mede, dat door avitaminose A deficiëntieverschijnselen ontstaan, die veel overeenkomst vertonen met die van hypervitaminose D en dat omgekeerd hypervitaminose A vitamine D-deficiëntieverschijnselen veroorzaakt. Diametraal hiertegenover staat de uitspraak van MIES (1948) dat de vitamines A en D elkaars werking versterken. SCHEUNERT (1940) nam reeds eerder nog weer een ander standpunt in door te verklaren, dat hij op grond van eigen werk ieder synergisme of antagonisme op het gebied van de vitamines, inclusief de vitamines A en D, moest afwijzen.

Dergelijke tegenstrijdigheden omtrent de wisselwerking tussen de vitamines A en D vindt men echter niet in ieder opzicht. Zo is b.v. herhaaldelijk gevonden, dat vitamine A de gevolgen van een toxische dosis vitamine D, onder andere be-

staande in gewichtsvermindering, kalkafzetting in de zachte weefsels en sterfte, kon voorkomen (THOENES, 1931, 1935; JUSATZ, 1933; GROS-SELBECK, 1935). Dit is eveneens vastgesteld door MORGAN c.s. (1937, 1941), HENDRIKS c.s. (1947) en door MATZKO c.s. (1951). Afgezien van het feit, dat niet al deze onderzoekingen overtuigend zijn, moet niet uit het oog verloren worden, dat vrijwel nooit gewerkt is met zuiver vitamine A maar met vitamine A-rijke traansoorten. Het is dan ook niet gerechtvaardigd het waargenomen effect zonder meer aan vitamine A toe te schrijven. Het onomstotelijk bewijs, dat een niet al te grote hoeveelheid vitamine A de toxische werking van vitamine D kan verminderen, is o.i. dan ook nog niet geleverd.

BOMSKOV c.s. (1933) benaderden het vraagstuk van de wisselwerking tussen de beide vitamines langs een andere weg, door de invloed van een toxische hoeveelheid vitamine A op de werking van het vitamine D te bestuderen. Ook zij komen tot de opvatting, dat het vitamine A een werking heeft, die antagonistisch is ten opzichte van die van het vitamine D. Aanwijzingen voor een antagonisme in tegenovergestelde richting, nl. voor het tegengaan van de toxische werking van het vitamine A door vitamine D zijn toentertijd niet gepubliceerd. De uitkomsten van proeven van VEDDER c.s. (1938) kunnen moeilijk als zodanig worden geïnterpreteerd.

Het vraagstuk van een mogelijke wisselwerking tussen de vitamines A en D is eveneens bestudeerd onder toepassing van meer fysiologische doseringen. Ten dele werden deze proeven opgezet met een praktisch doel, nl. om na te gaan of de uitkomst van biologische vitamine D-bepalingen in levertraan en dergelijke afhankelijk is van de hoeveelheid vitamine A. Door het vitamine A zou de groei van de proefdieren wellicht versneld worden, waarvan een geringere uitwerking van het vitamine D het gevolg zou kunnen zijn.

Dit vraagstuk is bestudeerd door BACHARACH c.s. (1931). Aan ratten, gehouden op het STEENBOCK-rantsoen nr 2965, verstrekten zij per dier en per dag één gram verse rode wortel. Dit bleek geen invloed op de groei nòch op het beenasgehalte der ratten uit te oefenen, vergeleken met de overeenkomstige criteria van controledieren.

COWARD c.s. (1932, 1947) hebben getracht het vitamine D op grond van de groeibevorderende werking te bepalen. De uitkomst bleek door vitamine A beïnvloed te kunnen worden. Zij stelden zich nu de vraag of dit verklaarbaar was op grond van een correlatie tussen beide vitamines. Hun uitgangspunt moet echter onjuist genoemd worden, omdat de groeicijfers, welke met elkaar vergeleken werden, niet van dezelfde, maar van verschillende proeven stamden; bovendien bestond bij deze verschillende proeven niet steeds de zekerheid, dat voldoende provitamine A was verstrekt om de groeibevorderende werking van het vitamine D mogelijk te maken.

Voorts hebben TABOR c.s. (1936) uitvoerig bestudeerd of het toevoegen van 22 resp. 90 i.e. caroteen per gram STEENBOCK-voer nr 2965, van invloed was op het rachitogeen karakter van dit voer en op de genezing van de rachitis, wanneer vitamine D werd verstrekt. De hoogste caroteendosis leidde tot een ernstiger mate van rachitis en tot een geringere genezing. De uitkomsten, bereikt met de lagere dosering, waren echter minder duidelijk.

De uitkomsten van EMERIQUE (1937) kunnen in zoverre geacht worden in overeenstemming te zijn met die van TABOR c.s. (1936), dat zij van mening is, dat de door haar bij cavia's veroorzaakte rachitis toegeschreven zou moeten worden

aan de spinazie die zij aan het rachitogene voer van de dieren toevoegde om een overmaat caroteen te verstrekken.

LECOQ (1940) vond een bevestiging van deze uitkomst wanneer hij verse spinazie met het rachitogene voer verstrekte en niet wanneer hij gebruik maakte van gedroogde spinazie, die overigens wel een goede caroteenbron bleek te zijn. Hij bestrijdt dan ook de gevolgtrekking van EMERIQUE (1937), dat de rachitis der cavia's aan het caroteen toegeschreven zou moeten worden.

Voortbouwend op eigen werk toonden JAVILLIER en EMERIQUE (1941) echter aan, dat 60–300 gamma caroteen per rat per dag, verstrekt naast een minder rachitogene modificatie van het STEENBOCK-rantsoen nr 2965, het ontstaan van rachitis in de hand werkte.

BRUCE c.s. (1938) daarentegen konden geen invloed van een overmaat caroteen op de uitkomsten van biologische vitamine D-bepalingen met ratten vaststellen en evenmin van een vitamine D-overmaat op die van biologische vitamine A-bepalingen. Zij komen dan ook tot de slotsom, dat bij biologische vitamine A- en D-bepalingen geen rekening met dit vraagstuk gehouden behoeft te worden en dat men er slechts voor dient te zorgen, dat het grondrantsoen er voldoende van bevat, natuurlijk met uitzondering van het te bepalen vitamine.

Ook SCHEUNERT (1940) kon, profylactisch werkend, geen invloed van 10–100 gamma caroteen per dag vaststellen op de dosis vitamine D, die juist voldoende was om ratten tegen rachitis te beschermen.

GRANT (1953) tenslotte kwam weer tot uitkomsten, analoog aan die van TABOR c.s. (1936) en JAVILLIER (1941). Op grond van proeven met ratten kwam hij namelijk eveneens tot de slotsom, dat matige hoeveelheden caroteen en vitamine A het vitamine D tegenwerken, zodat hij meent het caroteen te moeten identificeren met de door EWER (1944) in groene haver waargenomen rachitogene factor.

De conclusie, waartoe COWARD (1947) in haar handboek over de biologische bepaling van vitamines komt, namelijk dat geen aandacht geschonken behoeft te worden aan een overmaat van de vitamines in het grondvoer, maar dat men er slechts voor dient te zorgen dat er tenminste voldoende hoeveelheden in voorkomen, lijkt thans op grond van de zojuist besproken tegenstrijdige uitkomsten niet geheel verantwoord.

Ook het beeld van de hypervitaminose A geeft geen beslissing ten aanzien van de zojuist beschreven controverse. Wij zien er van af de literatuur hierover aan te halen, omdat kortgeleden enkele uitvoerige en rijk gedocumenteerde overzichten over hypervitaminose A bij mens en dier zijn verschenen (KLEIN OBBINK c.s., 1953; NIEMAN c.s., 1954; WOLBACH, 1954). Hieruit blijkt weliswaar duidelijk, dat vitamine A van invloed is op de processen der beenvorming, maar tevens, dat de gevolgen van een toxische dosis vitamine A in dit opzicht allerminst met rachitis betiteld mogen worden. Wanneer men de processen in de epifysairschijven van rachitische ratten (DODDS c.s., 1934) vergelijkt met die bij hypervitaminose A (WOLBACH, 1947), dan is het niet toelaatbaar de vitamines A en D als antagonisten in de ware zin van het woord te beschouwen. Bij vitamine D-tekort toch ziet men een vertraging van het verbeningsproces. De volgroeide kraakbeencellen in de epifysairschijven worden niet meer of onvoldoende en onregelmatig verwijderd, zodat een brede, onregelmatige kraakbeenzone ontstaat. Niettemin wordt een zekere hoeveelheid beenweefsel gevormd, echter minder dan normaal en bovendien neemt het niet of onvoldoende kalkzouten op. Zo ontstaat een zone van osteoïdweefsel, die met de kraakbeenzone bijdraagt

tot de grote breedte der epifysairschijven in het röntgenbeeld. Bij hypervitaminose A daarentegen is het verbeningsproces juist versneld, zodat de epifysairschijven dunner worden en zich vroegtijdig sluiten.

Ook in de overige delen der botten veroorzaakt een grote hoeveelheid vitamine A een duidelijke versnelling van de beenvormingsprocessen. Resorptie en appositie verlopen sneller, waardoor diafyse en cortex dunner worden, terwijl de structuur van het nieuw gevormde beenweefsel niet normaal is. Dit leidt echter niet tot een verlaging van het beenasgehalte (MOORE c.s., 1945; RODAHL, 1950), zodat ook in dit opzicht niet van een antagonisme tussen de vitamines A en D gesproken kan worden.

Uit het bovenstaande zijn naar onze mening drie aanwijzingen te putten voor het verder onderzoek naar de antivitamine D-factor in Nederlands hooi.

Gezien de door NORMAN c.s. (1948) geconstateerde rachitogene werking van testosteron en het door ANDERSON c.s. (1954) veronderstelde antagonisme tussen vitamine D en cortison, zou men kunnen zoeken naar de aanwezigheid van deze of van verwante stoffen in het hooi, temeer omdat enkele verwante stoffen inderdaad in planten voorkomen, bijvoorbeeld oestrogenen in jong gras en stoffen met corticosteroïd werking in saponinen. Verder kan verband gezocht worden met de rachitogene factor, door BRAUDE c.s. (1943) vastgesteld in biergist. Nog meer voor de hand liggend was het echter, verband te zoeken met de door FITCH c.s. (1944) in groene haver waargenomen rachitogene factor, welke volgens GRANT (1953) identiek zou zijn met caroteen. Aangezien onze eigen onderzoekingen, welke in hoofdstuk VI zijn beschreven, ons op hetzelfde spoor hadden gebracht, leek het in de eerste plaats aangewezen de slotsom van GRANT te toetsen.

HOOFDSTUK VI

EXPERIMENTEEL GEDEELTE OVER DE IDENTITEIT VAN DE ANTIVITAMINE D-FACTOR

1. INLEIDING

In hoofdstuk III. 4 werd er reeds op gewezen, dat de regressielijnen van de vitamine D-standaard en van het hooivet niet parallel bleken te zijn (fig. 2). Voorts is in het genoemde hoofdstuk de ontwikkeling van een methode beschreven om het analytische probleem, dat hieruit voortvloeide, op te lossen. Op de fysiologische kant van dit verschijnsel is nader ingegaan in hoofdstuk V. 1.

Het niet evenwijdig lopen van beide regressielijnen is echter een lastig criterium en bovendien een wankele basis voor de opvatting dat hier een antivitamine D-factor in het spel zou zijn. Er kan nl. een technische oorzaak schuilen achter het niet evenwijdig zijn van twee regressielijnen. In een ander verband is hierop ook reeds gewezen door VAN ALBADA c.s. (1951). Het S-vormig verloop van de volledig bepaalde regressielijn, die het verband tussen log dosis vitamine D en de genezing aangeeft, is hiervan de oorzaak. Om het probleem van het niet evenwijdig zijn zo zuiver mogelijk te stellen, zijn dan ook in tabel 15 slechts die richtingscoëfficiënten opgenomen, waarvan het duidelijk was dat het onderling verschil niet aan een technische oorzaak toegeschreven kon worden. De gege-

vens van monsters waarvan het evident was, dat ze in een te lage of te hoge dosering waren onderzocht, werden derhalve niet opgenomen.

Niettemin werd het gewenst geacht om ook nog langs een andere weg aan te tonen, dat het verschil in helling aan een storende factor toegeschreven moet worden alvorens over te gaan tot een verder onderzoek aangaande de identiteit hiervan.

2. EXPERIMENTEEL GEDEELTE

Aan hooivet, waarvan het vitamine D-gehalte met behulp van een groep ratten bepaald werd, is voor een andere groep een bekende hoeveelheid vitamine D toegevoegd. Uit het verschil in genezing tussen beide groepen kon nagegaan worden, of deze vitamine D-hoeveelheid teruggevonden werd. Dit bleek geen enkele maal het geval te zijn, ook niet wanneer het hooivet 's morgens vóór het voeren werd verstrekt en de vitamine D-toeslag acht uur later. De hoofduitkomsten van deze proeven zijn samengevat in tabel 25.

TABEL 25. De invloed van het verstrekken van hooivet met en zonder extra vitamine D.
Recovery of vitamin D given with an ether extract of hay to rachitic rats.

Dosering per dag *Daily dose*	Extra verstrekt (i.e.) *Vitamin D given (i.u.)*	Teruggevonden (%) *Recovered (%)*
1. Extract van 0,6 g hooi . . . . . . *Extract of 0.6 g hay*	4,2	79
2. Als 1 met 0,30 i.e. vitamine D . . . . . *As 1 with 0.30 i.u. vitamin D*		
3. Extract van 0,6 g hooi . . . . . . *Extract of 0.6 g hay*	4,2	73
4. Als 3 met 0,30 i.e. vitamine D . . . . . *As 3 with 0.30 i.u. vitamin D*		
5. Extract van 0,4 g hooi . . . . . . *Extract of 0.4 g hay*	5,6	65
6. Als 5 met 0,40 i.e. vitamine D . . . . . *As 5 with 0.40 i.u. vitamin D*	5,6	47
7. Als 5 met 0,40 i.e. vitamine D 8 uur later *As 5 with 0.40 i.u. vitamin D 8 hours later*		

Ook langs deze weg wordt het bestaan van de vermoede factor dus wel aannemelijk gemaakt. Uit de laatste uitkomst van tabel 25 blijkt, dat het antagonistische effect niet verklaard kan worden door een verminderde resorptie of door destructie van het vitamine D in het spijsverteringskanaal. Een en ander is reeds neergelegd in een korte publikatie (WEITS, 1952b), omdat gebleken was, dat het vraagstuk van de rachitogene factor in groenvoeders (FITCH c.s., 1944) op laboratoriumschaal door GRANT (1951) op vrijwel analoge wijze was aangepakt.

Nadat aldus op twee manieren aangetoond was, dat het denkbeeld van een antivitamine D-factor in hooi gerechtvaardigd was, is verder gewerkt aan de zuivering van deze factor. Deze bleek niet alleen in ether, maar ook in petroleumether (kp 40–60 °C) oplosbaar te zijn en voor te komen in de onverzeepbare fractie van het hooi. Wanneer het hooi of kunstmatig gedroogde gras nl. geextraheerd werd met petroleumether in plaats van met ether, het ruwvet daarna met alcoholische loog werd verzeept en deze onverzeepbare fractie voor de proeven

werd gebruikt, dan bleef het verschil in helling der regressielijnen bestaan. Een proef met kunstmatig gedroogd gras, waarvan de uitkomst is weer gegeven in fig. 2, is hier een voorbeeld van.

In dit stadium van het onderzoek werd gedacht aan de mogelijkheid, dat de factor een sterol zou kunnen zijn naar aanleiding van de structuuranalogie, die bij verschillende B-vitamines tot antagonismen leidt (WILLIAMS c.s., 1950). Ook voor enkele der in vet oplosbare vitamines bestaan aanwijzingen omtrent antivitamine-werking door overeenkomst in structuur (MEUNIER, 1952). Voorts is, wat het vitamine D betreft, in hoofdstuk V reeds gewezen op de mededeling van NORMAN c.s. (1948) dat het testosteron een antagonistische werking zou hebben ten opzichte van het vitamine D en van een analoge mededeling van ANDERSON c.s. (1954) ten aanzien van het corticosteron. Nu komen er in het plantenrijk verschillende sterolen voor, de zogenaamde fytosterolen, en verder ontstaat er uit ergosterol onder invloed van ultraviolette stralen naast vitamine D een reeks andere verwante verbindingen. Van enkele hiervan is het reeds bekend, dat zij farmacologisch niet onwerkzaam zijn (ROSENBERG, 1945).

Om de invloed van fytosterolen na te gaan zijn ze verwijderd door de onverzeepbare fractie van hooivet te behandelen met digitonine.

Daartoe werd de onverzeepbare fractie van 150 gram droge stof van hooi opgelost in 12,5 ml absolute alcohol. Aannemende dat het fytosterolgehalte in de droge stof van het hooi 0,04 procent bedroeg (ALLEMANN, 1942), werd uitgerekend hoeveel digitonine ongeveer gebruikt moest worden. Digitonine geeft met niet omgezette sterolen een additieprodukt, waarin de sterol-digitonineverhouding 1 : 3 bedraagt. Om zeker te zijn dat alle fytosterol zou worden gebonden, is een vijfvoudige hoeveelheid digitonine gebruikt. Een oplossing van 300 mg digitonine in 10 ml absolute alcohol en 3 ml water werd tot koken gebracht. Hetzelfde werd gedaan met de oplossing van de onverzeepbare fractie. Beide oplossingen werden warm bijeen gebracht en direct afgekoeld, waarna het mengsel een uur bleef staan. Daarna werd het in een scheitrechter gebracht onder toevoegen van 50 ml half verzadigde keukenzoutoplossing. Het mengsel werd met ongeveer 40 ml ether uitgeschud en dit werd herhaald tot de ether kleurloos was. De etherische oplossing werd nog weer gewassen met water, boven Na_2SO_4 gedroogd en gefiltreerd. De ether werd onder doorleiden van N_2 afgedestilleerd en het residu, opgenomen in arachisolie, aan de proefratten verstrekt.

Het onderzoek van de aldus behandelde onverzeepbare fractie van het ruwvet van kunstmatig gedroogd gras toonde aan, dat de antivitamine D-factor geen digitoniseerbaar fytosterol kon zijn. Het verschil in helling tussen de regressielijn van standaard en grasvet bleef namelijk bestaan (fig. 2).

Om na te gaan of de gezochte factor wellicht voorkwam in de reeks sterolen, die naast het vitamine D bij bestraling uit ergosterol ontstaan, zijn enige malen oplossingen van vitamine D_2 met daarnaast een overmaat van deze nevenprodukten met ratten onderzocht. Uit het verloop der regressielijnen viel af te leiden, dat de antivitamine D-factor niet identiek kan zijn met een der nevenprodukten die uit ergosterol ontstaan.

Ofschoon het gebied der sterolen door deze proeven allerminst geheel was onderzocht, werd het toch duidelijk, dat systematisch verder gewerkt moest worden met het vet zelf. Allereerst werd het echter wenselijk geacht om te zien naar een ander uitgangsmateriaal voor dit onderzoek. Om verschillende redenen viel de keus op melkvet. Om na te kunnen gaan of melkvet een aanmerkelijke

hoeveelheid antivitamine D-factor bevat, zijn in drie proeven zes monsters melkvet biologisch onderzocht zonder en met een bekende vitamine D-toeslag. De uitkomsten zijn vermeld in tabel 26.

TABEL 26. Onderzoek van melkvet als bron van de antivitamine D-factor.
Test of milk fat for antivitamin D factor activity.

Proef nr *Exp. no.*	Dosis per dag *Daily dose of milk fat*	Van vitamine D teruggevonden (%) *Recovery of vitamin D (%)*
1	melkvet 1 0,2 ml	
	„ 1 0,2 „ + 0,30 i.e. vitamine D	77–103
	„ 2 0,2 „	
	„ 2 0,2 „ + 0,30 i.e. vitamine D	60–86
	„ 3 0,2 „	
	„ 3 0,2 „ + 0,30 i.e. vitamine D	78–103
	„ 4 0,2 „	
	„ 4 0,2 „ + 0,30 i.e. vitamine D	54–80
2	„ 5 0,8 g	
	„ 5 0,8 „ + 0,30 i.e. vitamine D	121–154
3	„ 6 0,57 „	
	„ 6 0,57 „ + 0,30 i.e. vitamine D	71–92

Aangezien de monsters melkvet vrijwel steeds in een te kleine hoeveelheid onderzocht bleken te zijn, kon het vitamine D-gehalte daarvan slechts door extrapolatie berekend worden. Daarom zijn telkens twee percentages van het teruggevonden vitamine D berekend. Voor het ene percentage werd als basis uitgegaan van het door extrapolatie gevonden gehalte in het vet als zodanig. Voor de berekening van het tweede percentage werd aangenomen, dat het vet als zodanig geen vitamine D bevat, daarbij uitgaand van de overweging, dat dit gehalte in elk geval zeer gering is. Aangezien het eigen vitamine D-gehalte van het vet vrijwel zeker tussen beide gehaltes in ligt, is het percentage teruggevonden vitamine D in het eerste geval te laag en in het tweede geval te hoog. De paren getallen in de laatste kolom van tabel 26 stellen dus geen betrouwbaarheidsgrenzen voor al mag wel gezegd worden, dat het werkelijk teruggevonden percentage tussen de beide waarden in moet liggen.

Uit de gegevens van tabel 26 blijkt niet, dat melkvet een gunstig uitgangsmateriaal voor de antivitamine D-factor geacht kan worden. Op grond van de uitkomsten moet het zelfs nog een vraag geacht worden of de gezochte factor er wel in voorkomt. Inmiddels was echter bij overeenkomstige proeven een partij kunstmatig gedroogd gras gevonden, die een zeer geschikt uitgangsmateriaal voor verder onderzoek bleek te zijn en hiermee is dan ook in hoofdzaak verder gewerkt.

Uit het onderzoek van het melkvet was wel duidelijk geworden dat het voor verder onderzoek gewenst was om onafhankelijk te worden van het vitamine D-gehalte van het uitgangsmateriaal. Dit hield in dat een mogelijkheid gevonden moest worden om het vitamine D en de antivitamine D-factor van elkaar te scheiden. In dat geval zou de verkregen stof, waarin deze factor voor zou moeten komen, biologisch onderzocht kunnen worden tezamen met een bekende hoeveelheid vitamine D. Dit scheen een betere wijze van werken dan de tot nu toe gevolgde, waarbij de hellingen van regressielijnen of het toevoegen van een

vitamine D-toeslag aan het nog vitamine D-bevattend uitgangsmateriaal bestudeerd werden.

Derhalve is getracht de onverzeepbare fractie van grasvet met behulp van chromatografie in een aantal andere fracties te splitsen om de antivitamine D-factor zo zuiver mogelijk en zonder enig vitamine D ernaast in handen te krijgen. De doelstelling is hier dus ruimer dan in hoofdstuk III. 4, waar het er slechts om ging het vitamine D zelf verder te zuiveren. Aangezien het niet bekend was, hoe deze onbekende factor zich op de kolom zou gedragen, was deze verder gaande indeling in fracties eigenlijk geheel willekeurig. Derhalve werd bij de scheiding afgegaan op een aantal oranje-gele banden, die achtereenvolgens door de verschillende elueervloeistoffen van de zuil werden verwijderd. Het antwoord op de vraag of de gekozen indeling gelukkig was geweest, moest gegeven worden door de uitkomsten van rattenproeven, waarin iedere fractie tezamen met een bekende hoeveelheid vitamine D werd verstrekt. Het enige houvast was, dat verwacht mocht worden, dat het vitamine D van de kolom, zoals die in hoofdstuk III. 4 reeds beschreven is geëlueerd zou worden door petroleumether met 0,5 procent absolute ethanol. Op grond van een oriënterende chromatografie-proef met de onverzeepbare fractie van grasvet werden als elueervloeistoffen gebruikt:

1. petroleumether (kp 40–60 °C), waarmee één band werd geëlueerd (fractie 1),
2. petroleumether met 0,5 procent absolute ethanol, waarmee twee banden kort na elkaar werden geëlueerd (fracties 2 en 3),
3. petroleumether met 2 procent absolute ethanol, waarmee één band werd geëlueerd (fractie 4),
4. absolute ethanol, waarmee het overgebleven gele pigment werd geëlueerd (fractie 5).

Iedere fractie werd ten behoeve van het biologisch onderzoek tot droog ingedampt onder doorleiden van N_2, gewogen en vervolgens opgenomen in arachisolie. Aan de dieren der proefgroepen werd daarenboven een hoeveelheid vitamine D verstrekt, gelijk aan de middelste dosering van een serie van drie standaarddoses, die eveneens in iedere proef werd opgenomen. De uitkomsten van het biologisch onderzoek van een aantal gechromatografeerde monsters zijn samengevat in tabel 27.

De uitkomsten van proef nr 1 gaven geen duidelijke aanwijzingen. De indruk werd gewekt, dat de fracties 2 en 4 indifferent waren, dat ze dus nòch het vitamine D nòch de antivitamine D-factor bevatten. Aangezien verwacht mocht worden, dat het vitamine D voor zou komen in fractie 2 of 3, beide geëlueerd door petroleumether met 0,5 procent absolute ethanol, zou aan de geringe overmaat vitamine D, teruggevonden naast fractie 3, enige betekenis toegekend kunnen worden. Dit hield tegelijkertijd in, dat de gezochte factor mogelijk in fractie 1 of 5 voor zou kunnen komen.

Om een duidelijker beeld te krijgen is het onderzoek herhaald met een grotere hoeveelheid van het reeds enige malen genoemde kunstmatig gedroogde gras. Aangezien fractie 4 in het eerste onderzoek indifferent leek, zijn de fracties 4 en 5 nu samen opgevangen en onderzocht.

Uit de gegevens van proef nr 2 bleek tamelijk duidelijk, dat het vitamine D niet in één enkele fractie voorkwam, maar verdeeld was over de fracties 2 en 3, omdat naast beide aanmerkelijk méér vitamine D werd teruggevonden dan de extra gift van 0,30 i.e. vitamine D per dag. Omdat dit ook bleek uit de uitkom-

TABEL 27. De invloed van grasvet-fracties op extra verstrekt vitamine D (0,30 i.e. per dag).
Recovery of 0.30 i.u. vitamin D given daily with different fractions of grass fat.

Proef nr 1 *Exp. no. 1*	Gewicht (% van onverzeepbare fractie) *Wt. of fraction (% of uns. fr.)*	Dosis per dag in g gras (ds) *Daily fraction dose in g grass (D.M.)*	Van vitamine D teruggevonden (%) *Vitamin D recovered (%)*
	Materiaal 0,8984 g onverzeepbare fractie van 168 g snijhaver. *Unsaponifiable fraction of the fat of green oats.*		
Fractie 1	10,8	1	95,5
„ 2	42,6	1	98,0
„ 3	14,9	1	109,0
„ 4	8,8	1	100,5
„ 5	5,1	1	91,5
Proef nr 2 *Exp. no. 2*	Materiaal 3,5858 g onverzeepbare fractie van 272 g kunstmatig gedroogd gras. *Unsaponifiable fraction of the fat of artificially dried grass.*		
Fractie 1	7,1	2	102
„ 2	23,1	2	150
„ 3	22,4	2	296
„ 4+5	14,9	2	76
Proef nr 3 *Exp. no. 3*	Materiaal 6,2120 g onverzeepbare fractie van 547 g kunstmatig gedroogd gras. *Unsaponifiable fraction of the fat of artificially dried grass.*		
Fractie 1	6,6	3,5	59
„ 2	22,5	3,5	217
„ 3	29,0	1,0	310
„ 4+5	24,4	3,5	97
Proef nr 4 *Exp. no. 4*	Materiaal 9,0229 g onverzeepbare fractie van 825 g kunstmatig gedroogd gras. *Unsaponifiable fraction of the fat of artificially dried grass.*		
Fractie 1	5,9	5	64 (49)
„ 2+3	60,4	1	255
„ 4+5	25,4	5	113
Proef nr 5 *Exp. no. 5*	Materiaal 6,1237 g onverzeepbare fractie van 549 g kunstmatig gedroogd gras. *Unsaponifiable fraction of the fat of artificially dried grass.*		
Fractie 1		3,5	54
„ 2+3		–	–
„ 4+5		3,5	78

sten van de volgende proef nr 3, zijn de fracties 2 en 3 daarna niet meer gescheiden opgevangen. Een volmaakte scheiding was ook niet eenvoudig, omdat beide fracties vlak na elkaar worden geëlueerd. Verder leek het op grond van de uitkomst van fractie 4 + 5 van proef nr 2 aannemelijk, dat de gezochte factor in deze laatste gecombineerde fractie zou voorkomen.

Omdat deze aanwijzing niet voldoende betrouwbaar werd geacht, is het onderzoek met een nog grotere hoeveelheid materiaal herhaald in proef nr 3. De uitkomst hiervan was verrassend, aangezien hierin geen bevestiging gevonden werd voor het zojuist uitgesproken vermoeden. Thans leek het er veel op, dat de antivitamine D-factor voorkwam in fractie 1, waarnaast slechts 59 procent van

het gelijktijdig verstrekte vitamine D teruggevonden werd, terwijl de gecombineerde fractie 4 + 5 indifferent leek.

Dit maakte het noodzakelijk het onderzoek nogmaals te herhalen in proef nr 4. De uitkomsten hiervan waren geheel in overeenstemming met die van proef nr 3. Fractie 4 + 5 bleek ook nu indifferent, fractie 1 daarentegen scheen de gezochte factor weer te bevatten. Indien alle ratten van de groep, waaraan deze fractie werd verstrekt, in de beoordeling van de uitkomst werden opgenomen, werd 64 procent van het extra verstrekte vitamine D teruggevonden. Een der ratten was echter door enkele andere van deze groep opgevreten, waardoor verwacht mocht worden, dat deze dieren beter genezen waren dan anders het geval zou zijn geweest. Werden deze dieren niet meegerekend, dan werd slechts 49 procent van het verstrekte vitamine D teruggevonden.

Tegenover de uitkomsten van de proeven drie en vier, die erop duidden dat de antivitamine D-factor in fractie 1 voor moest komen, stond de uitkomst van proef nr 2, waaruit geconcludeerd zou moeten worden, dat het niet deze fractie 1 maar 4 + 5 was waarin de factor gezocht diende te worden. Nu stond ons nog een drietal fracties, namelijk 1, 2 + 3 en 4 + 5 ter beschikking, die gelijktijdig met die van de afwijkende proef nr 2 waren vervaardigd. Deze zijn nog onderzocht in proef nr 5. Omdat het in eerste instantie ging om de uitkomsten van de fracties 1 en van 4 + 5, is alleen naast deze fracties een bekende hoeveelheid vitamine D verstrekt.

De uitkomsten van proef nr 5 waren in zoverre niet ideaal, dat het extra ver-

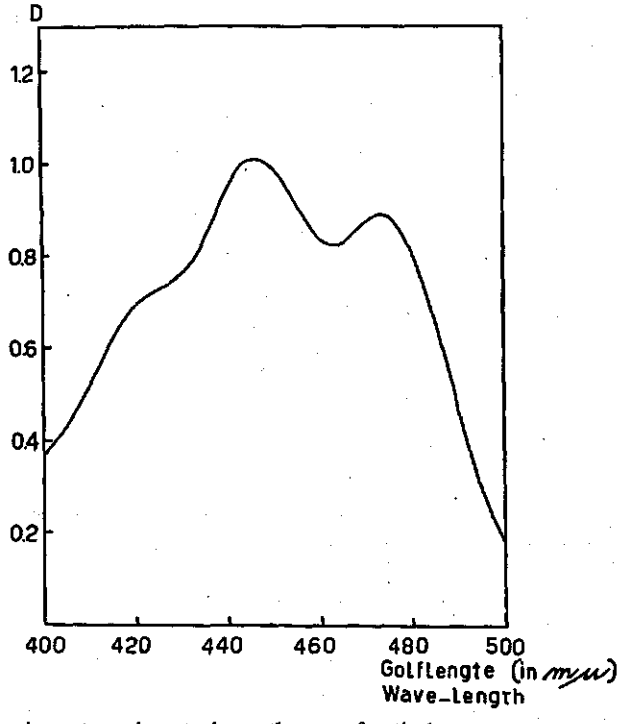


FIG. 4. Absorptiespectrum in petroleumether van fractie 1 van grasvet.
Absorption spectrum in petroleum ether of fraction 1 isolated from grass fat by chromatography.

strekte vitamine D naast geen der twee fracties geheel werd teruggevonden. Het tekort, geconstateerd naast fractie 1, was echter veruit het grootst. In ieder geval week de uitkomst, thans met deze fractie verkregen, sterk af van die van proef nr 2 en zij sloot geheel aan bij die van de proeven nr 3 en nr 4. Alles samengenomen was het wel duidelijk, dat door de chromatografie een scheiding tot stand gebracht was. In hoofdstuk III. 4, tabellen 16 en 17, was dit langs een andere weg trouwens ook al gebleken. Voorts leek het vrijwel zeker, dat de antivitamine D-factor voorkwam in fractie 1. Nu was het op grond van de eigenschappen van de kolom en van de gebruikte elueervloeistof petroleumether waarschijnlijk, dat fractie 1 de carotenen van het grasvet bevatte, hetgeen spectrofotometrisch werd bevestigd (fig. 4). Met digitonine precipiteerbare verbindingen kwamen er niet in voor, wat wèl het geval was in de fracties 2 + 3 en in 4 + 5.

In deze fase van het eigen onderzoek verscheen de mededeling van GRANT (1953), dat de rachitogene factor in groenvoeders, die bij schapen in Nieuw-Zeeland rachitis veroorzaakt, identiek zou zijn met caroteen zelf. Dit zou weliswaar goed in overeenstemming zijn met de uitkomsten van tabel 27, maar mocht op grond hiervan toch niet met zekerheid geconcludeerd worden, omdat in fractie 1 ook nog wel andere verbindingen zouden kunnen voorkomen. In ieder geval was er voldoende aanleiding om de invloed van caroteen en vitamine A op de werking van het vitamine D na te gaan.

HOOFDSTUK VII

ONDERZOEK NAAR DE WISSELWERKING TUSSEN VITAMINE D EN CAROTEEN (VITAMINE A)

1. EXPERIMENTEEL GEDEELTE

Bij het onderzoek naar de wisselwerking tussen de vitamines D en caroteen (vitamine A) leek het gewenst de invloed van caroteen op de groei van ratten, gehouden op het rachitogene rantsoen van STEENBOCK nr 2965, te onderzoeken. Aangezien dit rantsoen voor 76 procent uit geel maismeel bestaat, lijkt het niet voor de hand liggend dat de slechte groei, die bij het gebruiken van dit voer wordt waargenomen, aan vitamine A-tekort toegeschreven moet worden. Indien de proefdieren door het verstrekken van caroteen of vitamine A echter sneller zouden groeien, dan zou men kunnen veronderstellen, dat door deze snellere groei de antirachitische werking van een vitamine D-dosis geringer zou worden dan wanneer geen caroteen of vitamine A verstrekt zou worden en dat er derhalve in wezen geen sprake is van een antagonisme, maar van een vitamine A-tekort.

Daarom is aan enkele groepen van 12 ratten, gehouden op het rachitogene voer, gedurende 20 dagen 3–5 gamma synthetisch beta-caroteen per dag en per dier verstrekt en werd de groei vergeleken met die van controlegroepen. Om de beweerde rachitogene invloed van een grotere hoeveelheid caroteen na te kunnen gaan, werd aan andere groepen 75 gamma beta-caroteen per dag en per dier verstrekt. Om de invloed daarvan vast te kunnen stellen werd van de dieren van alle groepen het asgehalte van het rechter femur bepaald en werden röntgenfoto's van het proximale einde van de rechter tibia vervaardigd. De uitkomsten van deze proeven, die in het vervolg met „eerste proefreeks" aangeduid zullen worden, zijn samengevat in tabel 28.

TABEL 28. De invloed van caroteen op de groei en het geraamte
The influence of carotene on growth and skeleton of rats.

Proef nr *Exp. no.*	Groep *Group*	Dosis (γ) *Daily dose* (γ)	Gewicht (g) *Weight* (g)	Beenas (%) *Bone ash* (%)	Röntgenbeeld *X-ray picture*
1	1	0	53,9	31,5	
	2	3	55,6	30,6	geen verschil met 1
	3	75	53,6	30,0	*no difference with 1*
2A	1	0	53,1	28,4	
	2	5	52,9	27,4	geen verschil met 1
	3	75	50,7	28,5	*no difference with 1*
2B	1	0	57,5	31,5	
	2	75	54,5	31,5	geen verschil met 1 *no difference with 1*

De gewichtsverschillen, gevonden in proef 1, waren gering en niet significant. Hetzelfde geldt voor de beenasgehaltes. Ook de breedte van de metafyse op de röntgenfoto was niet verschillend. Deze proef is herhaald, waarbij aan de groep 2 vijf in plaats van drie gamma caroteen per dag werd verstrekt ter voorziening in de dagelijkse behoefte. Verder is deze tweede proef in twee delen gesplitst. Het zou namelijk denkbaar zijn, dat het rachitogene STEENBOCK-rantsoen zelf een dusdanig sterke rachitisverwekkende werking heeft, dat een extra bijdrage van een grote hoeveelheid caroteen niet tot uiting kan komen. Daarom is in proef 2 B een minder sterk rachitogene modificatie van het STEENBOCK-voer gebruikt. Het percentage geslibd krijt was hierin nl. verminderd tot 2,5 procent. Om de kwaliteit van het eiwit iets te verbeteren werd er bovendien 5 procent bloedfibrine in opgenomen ten koste van een even grote hoeveelheid tarwegluten.

Ook in de proef 2 A bleek een geringe hoeveelheid caroteen de groei niet te versnellen, terwijl van een rachitogene werking van een aanzienlijke hoeveelheid caroteen evenmin iets bleek. Dat het rantsoen van proef 2 B inderdaad minder sterk rachitogeen was, kwam tot uiting in de enigszins hogere beenasgehaltes en de smallere metafyses. Uit de uitkomsten van deze proeven moet wel besloten worden, dat onder de gegeven omstandigheden caroteen geen invloed heeft op de groei en geen rachitogene werking ontvouwt.

De wisselwerking tussen het vitamine D en caroteen (vitamine A) is verder bestudeerd aan de hand van een tweede reeks proeven met ratten, waarbij een proefopzet werd gekozen die in grote lijnen overeenstemde met die van curatief uitgevoerde vitamine D-bepalingen. Aan drie groepen van 10 rachitische ratten werden drie verschillende vitamine D-doses verstrekt, opklimmend in de verhouding 1 : 2 : 4. Aan een andere serie groepen werden deze zelfde hoeveelheden vitamine D verstrekt met daarnaast een gelijk blijvende hoeveelheid synthetisch beta-caroteen of synthetisch vitamine A-palmitaat. Een derde serie ratten kreeg naast de drie vitamine D-standaarddoseringen een dubbele hoeveelheid caroteen of vitamine A. Deze opzet wordt ook in de farmacologie bij het bestuderen van antagonismen aanbevolen (ARIËNS, 1954). Op deze wijze zijn drie proeven uitgevoerd met caroteen en drie met vitamine A. De uitkomsten ervan zijn samengevat in tabel 29.

TABEL 29. Het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A).
The antagonism between vitamin D and carotene (vitamin A).

Caroteen (γ per dag) *Daily dose of carotene in γ*	Genezing door vitamine D *Healing caused by vitamin D (i. u. per diem)*			Van vitamine D teruggevonden (%) *Vitamin D recovered (%)*	Betrouwbaarheidsgrenzen in % (P = 0,05) *Fiducial limits*
	0,15 i.e.	0,30 i.e.	0,60 i.e.		
0	1,00	2,65	4,10		
10	1,70	2,65	3,85	Naast 10 gamma 108,3	85,7–137,5
20	1,30	2,70	3,85	Naast 20 gamma 101,8	80,5–128,9
	0,10 i.e.	0,20 i.e.	0,40 i.e.		
0	2,00	2,83	4,22		
43,5	1,50	2,44	3,83	Naast 43,5 gamma 76,1	57,9–98,3
87	1,39	2,44	3,33	Naast 87 gamma 66,8	50,3–86,3
	0,10 i.e.	0,20 i.e.	0,40 i.e.		
0	1,90	3,30	4,60		
65,25	1,75	2,40	3,75	Naast 65,25 gamma 67,7	51,1–87,2
130,5	1,45	2,60	3,50	Naast 130,5 gamma 63,0	47,3–81,3
Vitamine A (i. e. per dag) *Daily dose of vitamin A (in i. u.)*	Genezing door vitamine D *Healing caused by vitamin D (i. u. per diem)*				
	0,15 i.e.	0,30 i.e.	0,60 i.e.		
0	2,75	3,89	5,10		
200	2,06	3,20	5,05	Naast 200 i.e. 79,5	59,3–104,8
400	1,85	3,06	5,20	Naast 400 i.e. 77,4	57,6–102,0
	0,15 i.e.	0,30 i.e.	0,60 i.e.		
0	2,80	4,45	6,22		
400	2,30	3,95	5,20	Naast 400 i.e. 75,2	54,1–101,8
800	1,95	3,65	5,40	Naast 800 i.e. 70,5	50,4– 95,5
	0,075 i.e.	0,15 i.e.	0,30 i.e.	0,60 i.e.	P = 0,01
0	1,10	2,40	4,20	6,15	
800	0,05	1,70	3,15	5,45	Naast 800 i.e. 69,9	54,5–89,6

Zonder uitzondering bleek, dat de regressielijnen van de vitamine D-standaardgroepen en van standaardgroepen met de verschillende hoeveelheden caroteen of vitamine A als rechtlijnig en parallel beschouwd mochten worden. De beide lijnen, betrekking hebbende op de laatste proef van tabel 29 en uitgevoerd met vier doseringen, komen voor in fig. 5.

Het was dus mogelijk op de normale wijze de vitamine D-activiteit te berekenen van de verschillende vitamine D-caroteen- en vitamine D-vitamine A-mengsels, zodat berekend kon worden hoeveel vitamine D van de verstrekte hoeveelheid werd teruggevonden zoals in tabel 29 is vermeld. Uit deze uitkomsten blijkt nu dat bij niet te kleine hoeveelheden caroteen en vitamine A minder vitamine D teruggevonden wordt dan verstrekt is en dat dit verschil toeneemt met stijgende hoeveelheden caroteen en vitamine A. Dit effect kon niet verklaard worden uit een verschil in groeisnelheid. In eerste instantie schijnen de uitkomsten

van deze tweede proefreeks dus een bevestiging te vormen voor de bewering van GRANT (1953) dat caroteen een rachitogene werking heeft. Bij het bespreken der uitkomsten zal echter blijken, dat de wisselwerking waarschijnlijk gecompliceerder is.

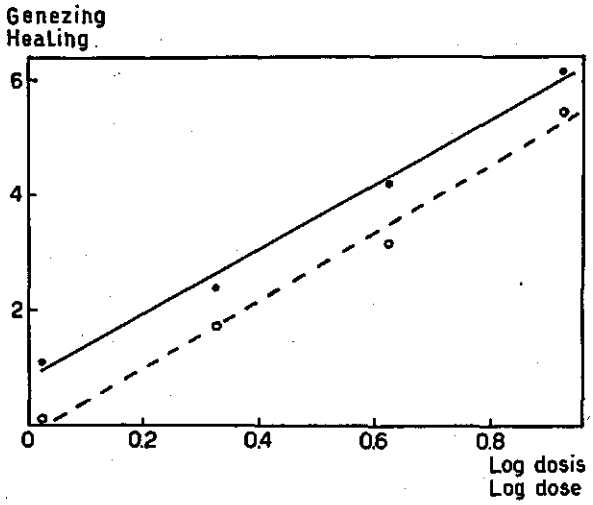


FIG. 5. Regressielijn van vitamine D-standaard (●——●) en van vitamine D-standaard met 800 i.e. vitamine A per dag (o·····o).

Regression line of vitamin D standard (●——●) and of vitamin D standard with a daily dose of 800 i.u. vitamin A (o·····o).

In de derde plaats is het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A) bestudeerd met drie paren lammeren, die op het moment dat ze in de proef werden betrokken, twee weken oud waren. Aan één lam van ieder paar werd gedurende zeven weken extra vitamine A verstrekt. Aangezien de geboortedata van het eerste paar en de beide andere sterk uiteen liepen, is de proef met het eerste paar beëindigd op 22 maart, vóór dat de grasgroei op gang kwam. Deze dieren zijn dan ook slechts af en toe overdag buiten geweest, wanneer er geen sneeuw lag. Aan het betreffende lam van dit eerste paar werd het vitamine A in olie toegediend.

De beide andere paren waren later geboren, zodat de proef met deze dieren tot 3 mei 1955 duurde. Deze dieren zijn veel meer buiten geweest, ook 's nachts en hebben dus van de grasgroei kunnen profiteren. Aan de betreffende lammeren van dit tweede en derde paar werd het vitamine A in een met water mengbare vorm toegediend.

Moest de hele koppel vanwege ongunstig weer, in het bijzonder vóór de geboorte van de beide laatste paren lammeren toen de proef met het eerste paar al begonnen was, binnen gehouden worden, dan werden eiwitrijke rundveebrokken en hooi tot verzadiging verstrekt. Deze brokken bevatten toegevoegd vitamine D en werden ook door de lammeren van het eerste paar opgenomen.

De hoeveelheid vitamine A die aan één lam van ieder paar werd verstrekt kwam overeen met honderd maal de behoefte. Als basis hiervoor werd aangehouden de minimum-behoefte van 25 i.e. per kilogram lichaamsgewicht, vermenigvuldigd met de factor vijf (HART, 1940). Per dag werden dus gegeven

12.500 i.e. vitamine A per kilogram. De factor honderd was gebaseerd op de overweging, dat koeien met voorjaarsgras dagelijks ongeveer honderd maal meer caroteen opnemen dan de voorgeschreven hoeveelheid bedraagt. Bij een grasopname van 15 kilogram droge stof met een caroteengehalte van 500 mg per kilogram droge stof zou 7,5 gram caroteen opgenomen worden, terwijl de behoefte ongeveer 75 mg per dag bedraagt. Daarenboven ontvingen alle dieren nog een zekere hoeveelheid caroteen uit weidegras.

Eens per week werden de lammeren gewogen en werd de vitamine A-dosis op grond van het gewicht voor de volgende week vastgesteld. Regelmatig werden röntgenfoto's gemaakt van het proximale einde van radius en ulna, waarbij de poot zo werd gehouden, dat beide beenderen naast elkaar op het beeld kwamen (THOMAS c.s., 1954). Aan het eind van de proef is in het bloedserum het gehalte aan Ca en anorganisch P in duplo bepaald.

De vitamine A-gift had geen waarneembare invloed op de groei. Bij het beoordelen van de röntgenfoto's werd gelet op de breedte van de calciumvrije zone tussen epi- en diafyse van de ulna en op de mate waarin deze smaller werd bij het ouder worden der dieren. Er kon op dit punt geen verschil gevonden worden tussen de lammeren die wel en die geen vitamine A kregen. Ook het totaalbeeld van de röntgenfoto's leverde geen duidelijke aanwijzingen op dat de ontwikkeling van het geraamte door het vitamine A merkbaar nadeel ondervond. Dit viel evenmin af te leiden uit het uiterlijk en gedrag van de dieren.

De uitkomsten van het bloedonderzoek komen voor in tabel 30. De lammeren van de paren 1, 2 en 3, waaraan vitamine A verstrekt is, zijn met A aangegeven.

TABEL 30. Het Ca- en P-gehalte van bloedserum bij vitamine A-toediening.
The influence of large doses of vitamin A on Ca and P content of the blood serum of lambs.

Nr *No.*	Ras en geslacht *Breed and sex*		Gehalte (*content*) (mg %)	
			Calcium	Fosfor
1	Fries	ooi	13,0	9,0
1A	„	„	11,9	8,9
2	Texelaar	„	12,5	10,4
2A	„	ram	12,6 [1])	8,5
3	„	„	11,8	12,7
3A	„	ooi	11,5	9,1

[1]) In simplo.

In de eerste plaats valt het op, dat alle gehaltes, in het bijzonder die van het fosfor, aan de hoge kant zijn. Als normaal traject voor het calciumgehalte in bloedserum wordt beschouwd 9–12 mg procent, voor fosfor 3–9 mg procent (DUKES, 1947). Mogelijk kunnen de hoge gehaltes verklaard worden uit het feit, dat het hier jonge, nog maar twee maanden oude dieren betrof. Een invloed van het vitamine A op het calciumgehalte van het bloedserum blijkt niet duidelijk. De verschillen zijn maar gering. Ditzelfde kan niet gezegd worden van de fosforgehaltes. Deze zijn bij de vitamine A-lammeren steeds lager dan bij de controledieren, al is het verschil bij het eerste paar minimaal. Bij de paren 2 en 3 daarentegen is het verschil zeer duidelijk.

Gezien het beperkte aantal waarnemingen en de reeds genoemde verschillen tussen paar 1 en de beide andere, kunnen de uitkomsten slechts als een vingerwijzing gezien worden, zodat geen vaststaande conclusies getrokken kunnen

worden. Niettemin doen zij vermoeden, dat een grote hoeveelheid vitamine A geen invloed uitoefent op de groei en het calciumgehalte van het bloedserum, maar wel op het fosforgehalte hiervan. Dit is in overeenstemming met de Nieuwzeelandse ervaringen van EWER (1950). Dat men in Nieuw-Zeeland in de praktijk moeilijkheden van rachitische aard ondervindt, die in Nederland ondanks de eveneens aanzienlijke caroteenopneming uitblijven, valt mogelijk te verklaren uit het niveau van de fosforgehaltes in het bloed. Uit gegevens van EWER c.s. (1948) en EWER (1950) blijkt dat deze gehaltes meestal 4–6 mg procent bedragen, zodat een vermindering hiervan ten gevolge van het opnemen van veel caroteen aldaar eerder kan leiden tot hypofosfatemie met de gevolgen daarvan. De door ons waargenomen gehaltes liggen zoals gezegd hoger, zodat ze ook bij een vermindering met 2–3 mg procent, nog voldoende hoog zijn om rachitische verschijnselen te voorkomen.

2. BESPREKING DER UITKOMSTEN

Wat de uitkomsten betreft staan de eerste proefreeks (tabel 28) en de tweede (tabel 29), beide uitgevoerd met ratten, scherp tegenover elkaar. In de eerste reeks kon geen rachitogene werking van caroteen vastgesteld worden, in de tweede werd aan de antirachitische werking van het vitamine D duidelijk afbreuk gedaan, zowel door caroteen als vitamine A. Het is niet duidelijk, hoe deze tegenstrijdigheid verklaard moet worden, ondanks het feit dat belangrijke verschillen in de opzet van beide proefreeksen bestaan. Indien caroteen de werking van het vitamine D bij de genezing van rachitische ratten vermindert, zoals uit de uitkomsten van de tweede proefreeks duidelijk is gebleken, dan zou verwacht mogen worden, dat het bij een gezonde rat, waaraan een rachitogeen voer wordt verstrekt, de zich ontwikkelende rachitis verergert. Dit klemt des temeer, omdat in proef 2 B (tabel 28) van een voer gebruik gemaakt is, waarvan de rachitogene werking verzwakt was. Niettegenstaande deze niet maximale rachitogene werking van het voer zelf, bleef een toeneming van de graad van rachitis door het verstrekken van 75 gamma caroteen geheel uit.

Tussen de beide proefreeksen bestaat verder nog dit verschil, dat in de eerste reeks geen vitamine D is gebruikt, terwijl het verstrekken van vitamine D in de tweede proefreeks een wezenlijk onderdeel van de proefopzet vormde. Om een verklaring voor de genoemde tegenstrijdigheid te kunnen vinden, zou het aanbeveling verdienen bij een herhaling van proeven volgens de opzet van de eerste proefreeks, de rachitogene werking van het voer niet alleen te verminderen door het gebruiken van een minder rachitogene modificatie ervan, maar ook door het verstrekken van vitamine D, zodat de proeven het karakter zouden krijgen van een vitamine D-bepaling volgens het preventieve principe. Het is niet uitgesloten dat aldus een betere basis voor de bestudering van de wisselwerking tussen vitamine D en caroteen zou zijn verkregen.

Voorts dient er op gewezen te worden, dat de hoeveelheid caroteen, die bij de eerste proefreeks ca 7,5 mg per kg droge stof van het voeder bedroeg, aanzienlijk minder is dan door koeien en schapen met voorjaarsgras wordt opgenomen. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit, dat in deze proefreeks geen invloed van het verstrekken van 75 gamma caroteen per dag waargenomen werd. De tegenstrijdigheid tussen de eerste en de tweede proefreeks kan hieruit echter niet verklaard worden.

Uit de gegevens van de tweede proefreeks blijkt, dat onder de omstandigheden

van deze proeven zowel caroteen als vitamine A het vitamine D tegenwerken. Hieruit zou dus besloten kunnen worden, dat het vraagstuk van de rachitogene werking van bepaalde groenvoeders is opgelost. Er is echter in hoofdstuk V. 3 reeds op gewezen, dat het op grond van de verschijnselen, optredend bij hypervitaminose A, moeilijk aan te nemen valt, dat caroteen en vitamine A een rachitogene werking uitoefenen, tenzij men aanneemt, dat er geen gradueel, maar een principiëel verschil bestaat tussen de werking van een onfysiologisch grote en een toxische hoeveelheid vitamine D, hetgeen niet waarschijnlijk klinkt. WOLBACH c.s. (1949) delen zelfs mee, dat een grote hoeveelheid vitamine A, toegediend aan rachitische ratten, een snel herstel van de rachitische afwijkingen in de metafyse inleidt, zodat de vormverandering welke de kraakbeencellen in de epifysairschijven ondergaan, alsmede de afzetting van kalkzouten, weer min of meer normaal gaan verlopen.

Verder is het bevreemdend, dat een eventuele rachitogene werking van caroteen alleen in Nieuw-Zeeland onder praktijkomstandigheden tot duidelijk waarneembare rachitis leidt en dit elders, bijvoorbeeld in Nederland, nog nooit is waargenomen. Nederland ligt verder van de evenaar verwijderd dan Nieuw-Zeeland, de vitamine D-voorziening langs natuurlijke weg zal hier dus zeker niet gunstiger zijn, zodat een rachitogene werking van caroteen zich hier zou kunnen openbaren, want ook in Nederland nemen de dieren gedurende enige tijd en wel in het bijzonder gedurende het voorjaar aanzienlijk meer caroteen op dan de behoefte bedraagt. Aan de andere kant verschillen de omstandigheden in Nieuw-Zeeland en Nederland zo veel, dat moeilijkheden die aldaar ontstaan, hier nog niet voor behoeven te komen.

Tenslotte is het denkbeeld, om caroteen als de rachitogene factor van groenvoeders te beschouwen niet goed in overeenstemming te brengen met de gegevens, die tijdens het onderzoek van de hooimonsters werden verkregen (hoofdstuk III. 4). Dit onderzoek leverde de eerste aanwijzing voor het bestaan van deze factor op en de invloed ervan kon toen reeds begroot worden op een verlies aan vitamine D-werking van 20–50 % (WEITS, 1952). De ratten kregen echter bij dit onderzoek per dag het etherextract van ca 0,5 g droge stof van hooi, dat ten hoogste 10 gamma caroteen bevat kan hebben (BROUWER c.s., 1941). In dit licht gezien valt de uitwerking van de aanzienlijk grotere hoeveelheden caroteen en vitamine A, zoals die in tabel 29 en fig. 6 is weergegeven, tegen. Het is dan ook bijna niet denkbaar, dat het bij hooi waargenomen effect door caroteen alleen veroorzaakt kan zijn.

Op de abscis zijn de hoeveelheden vitamine A dan wel caroteen, die in de proeven van de tweede proefreeks naast het vitamine D zijn verstrekt, thans beide in internationale eenheden uitgezet. Op de ordinaat is het percentage vitamine D uitgezet, dat werd teruggevonden. In fig. 6 komen twee dingen naar voren. In de eerste plaats schijnt er een grens te bestaan voor de antagonistische invloed van vitamine A en caroteen, zodat de werking van het vitamine D slechts tot ruim 50 procent verminderd kan worden. Dit houdt dus in, dat de antirachitische werking van een mengsel van vitamine D en caroteen (vitamine A) niet om zou kunnen slaan in een rachitogene werking. Wel zou het denkbaar zijn dat bij een nauwelijks voldoende vitamine D-gift de werking van deze geringe hoeveelheid door de antagonistische werking van caroteen of vitamine A zover verminderd zou kunnen worden, dat dit een milde graad van rachitis ten gevolge heeft. Dit karakter draagt de rachitogene werking van groenvoeders, zoals deze door de

Nieuwzeelandse onderzoekers wordt beschreven, echter beslist niet. Deze werking is zó uitgesproken, dat die van een grote hoeveelheid vitamine D er door wordt doorbroken. Zo delen FITCH c.s. (1944) mee, dat rachitis bij schapen, grazend op groene haver, niet geheel voorkomen kon worden, wanneer in de

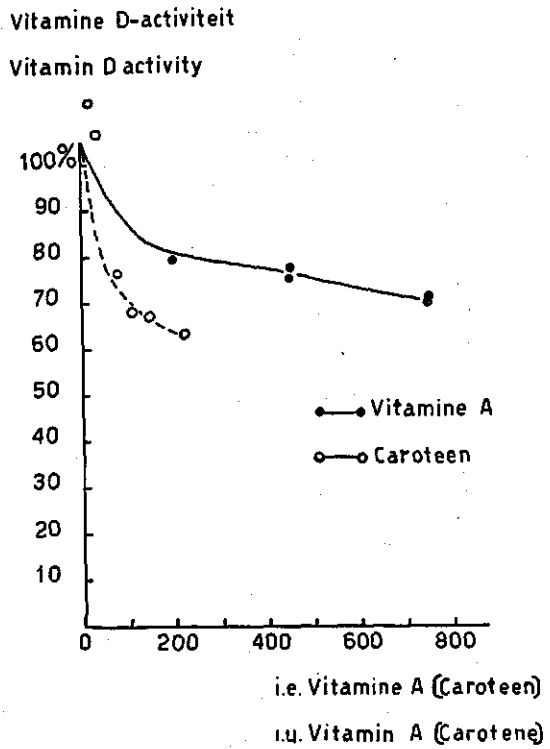


FIG. 6. Percentage vitamine D teruggevonden naast toenemende hoeveelheden caroteen en vitamine A.
Percentage vitamin D recovery with increasing intakes of carotene and vitamine A.

vorm van levertraan ongeveer 300 i.e. vitamine D per dag werden verstrekt, wat voor deze dieren ongeveer twee maal de behoefte betekende. Een stootdosis van één miljoen eenheden vitamine D, in het begin van de winter verstrekt, was wel voldoende om rachitis bij lammeren te voorkomen (EWER, 1948); maar dit was niet het geval wanneer 500.000 i.e. werden verstrekt (EWER, 1950). Werd geen vitamine D extra gegeven, dan ontwikkelde zich duidelijke rachitis, ofschoon de lammeren met de snijhaver een hoeveelheid vitamine D opnamen, die de bebehoefte vijf maal overtrof. Hieruit moet wel besloten worden, dat de rachitogene werking van groenvoeders een geheel ander karakter draagt dan de antagonistische werking van caroteen (vitamine A), zoals deze in fig. 6 tot uiting komt. Er moet echter ook in dit verband op gewezen worden, dat aan de ratten naar verhouding niet die hoeveelheid caroteen (vitamine A) werd toegediend, welke schapen en koeien met voorjaarsgras opnemen. De vraag kan dus gesteld worden, hoe de curves in fig. 6 doorlopen wanneer hogere doses caroteen of vitamine A worden gegeven.

Een andere merkwaardigheid die opvalt bij het bestuderen van fig. 6 is, dat caroteen, uitgedrukt in internationale eenheden, een sterkere antagonistische werking schijnt uit te oefenen dan vitamine A. Uiteraard dient de vraag gesteld te worden of dit verschil significant is. Indien dit wel het geval zou blijken te zijn, dan is deze sterkere werking moeilijk in overeenstemming te brengen met de gedachtengang, dat het caroteen pas na omzetting in vitamine A antagonistisch werkzaam is.

Al deze bedenkingen maken het moeilijk caroteen of vitamine A zelf als de rachitogene factor van groenvoeders te beschouwen, al kan niet ontkend worden, dat grote hoeveelheden, verstrekt aan rachitische ratten, de werking van het vitamine D tegen gaan (tweede proefreeks).

Tenslotte kan de vraag nog gesteld worden, hoe het antagonisme tot stand komt. Niettegenstaande het feit, dat zojuist nog enige twijfel uitgesproken is betreffende de identiteit van de rachitogene factor, bestaan er enkele aanwijzingen, die doen vermoeden, dat het antagonisme via de fosforstofwisseling tot stand komt. Hierop is reeds gewezen door FITCH c.s. (1944) bij hun proeven over de rachitogene werking van groenvoer en het is herhaald door EWER (1950). Het bleek hun nl. dat een van de opvallende gevolgen van het voederen van rachitogene snijhaver aan schapen bestond in het optreden van hypofosfatemie, terwijl het calciumgehalte van het bloedserum weinig of niet veranderde. Dezelfde tendens kwam in onze proef met de drie paren lammeren tot uiting, waarvan de uitkomsten reeds in tabel 30 zijn vermeld.

Voorts vonden ROSS c.s. (1948) een lager gehalte aan anorganisch P in het bloedserum van een groep vaarzen, waaraan dagelijks ruim 100.000 i.e. vitamine A werden verstrekt, vergeleken met dat van een controlegroep. Zij wensten aan dit significante verschil geen gevolgtrekkingen vast te knopen, omdat ook aan het begin van de proef reeds een gering verschil ten nadele van de proefgroep bestond.

ROSS c.s. (1949) stelden vast dat ook omgekeerd het verstrekken van extra fosfaat aan koeien, vaarzen en kalveren in een fosforarme streek leidde tot lagere caroteengehaltes in het bloedserum vergeleken met de gehaltes bij dieren, waaraan geen fosfaat werd bijgevoerd. Dit zelfde werd bij het caroteengehalte van het bloed van koeien waargenomen door THOMAS c.s. (1953), zonder dat veranderingen geconstateerd konden worden in het vitamine A-gehalte van het bloedserum.

Ook bij stieren namen zij waar (GALLUP c.s., 1953), dat er een negatieve correlatie bestond tussen het anorganisch fosfaat- en caroteengehalte van het bloedserum, zonder dat ook hier van een invloed op het vitamine A-gehalte van het bloedserum gesproken kon worden. Dit laatste konden zij echter niet bevestigen in proeven met lammeren. Het verstrekken van extra fosfaat leidde hier inderdaad tot lagere vitamine A-gehaltes in het bloedserum. Het caroteengehalte werd niet bepaald, zodat een vergelijking op dit punt niet mogelijk is.

Hun uitkomsten met lammeren kunnen in overeenstemming zijn met die van KLOSTERMAN c.s. (1952), die bij ratten en schapen eveneens het verband tussen anorganisch fosfaat en vitamine A onderzochten. Een laag fosforgehalte in het voer leidde in hun proeven steeds tot een hoger vitamine A-gehalte in de lever van ratten. Bij schapen bestond er een significante negatieve correlatie tussen het fosfor- en vitamine A-gehalte van het bloedserum.

Ofschoon de uitkomsten van deze proeven niet in alle opzichten met elkaar

overeenstemmen, waartoe mogelijk bijdraagt het feit, dat ze met verschillende diersoorten uitgevoerd zijn, krijgt men niettemin de indruk, dat het fosfaat, althans bij rundvee van invloed is op de caroteenstofwisseling in die zin, dat de omzetting ervan tot vitamine A bij fosforarmoede wordt belemmerd. Dit zou namelijk afgeleid kunnen worden uit het hogere caroteengehalte in het bloedserum bij fosforgebrek. Voor deze veronderstelling is echter geen steun te vinden waar het lammeren en ratten betreft, gezien de lagere vitamine A-gehaltes in lever en bloedserum bij het verstrekken van meer fosfaat. Behalve deze tegenstrijdigheid, die het al moeilijk maakt deze uitkomsten op enigerlei wijze in verband te brengen met het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A), komt nog de omstandigheid dat de wisselwerking tussen caroteen en vitamine A enerzijds en fosfor anderzijds in de zojuist aangehaalde onderzoekingen in eerste instantie bestudeerd is met fosfor als onafhankelijk veranderlijke. Hierbij werden derhalve de gevolgen van veranderingen der fosforvoorziening op de caroteen- en vitamine A-stofwisseling bestudeerd. Ook al zou men dus gerechtigd zijn aan te nemen, dat een laag fosforgehalte in het bloedserum leidt tot een hoog caroteengehalte, dan mag hieruit nog niet worden afgeleid, dat een hoog caroteengehalte in het bloedserum een laag fosforgehalte meebrengt om daaruit het antagonisme tussen caroteen (vitamine A) en vitamine D te verklaren. Het is dus belangwekkend om te weten welke gevolgen een hoge dosis caroteen of vitamine A meebrengt voor het fosformetabolisme. Hierover bestaat een beknopte mededeling van MADDOCK c.s. (1950), welke behelst dat het verstrekken van een toxische dosis vitamine A aan rachitische ratten de fosforuitscheiding via de urine sterk deed toenemen. Gelijktijdig werd de N-balans echter ook negatief, evenals de calciumbalans. In dit verband is het misschien van belang op te merken, dat de bevordering van de terugresorptie van het fosfaat door de niertubuli door sommigen als één van de functies van het vitamine D wordt beschouwd (HARRISON c.s., 1941).

Ofschoon deze gezamenlijke gegevens het denkbaar maken, dat het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A) tot stand komt via de fosforstofwisseling, leveren ze hiervoor nog geenszins voldoende bewijs. Daartoe zou het nodig zijn de invloed van het vitamine A en zijn moederstoffen op het fosformetabolisme veel uitvoeriger te bestuderen.

3. THEORETISCHE BESCHOUWINGEN OVER HET ANTAGONISME TUSSEN VITAMINE D EN CAROTEEN (VITAMINE A)

De opzet van de proeven der tweede proefreeks was zodanig gekozen, dat verwacht werd iets te kunnen zeggen omtrent het wezen van het antagonisme tussen vitamine D en caroteen (vitamine A). Hoewel hieromtrent in het onderstaande inderdaad iets gezegd zal worden, dient niettemin ten aanzien van de hierna volgende beschouwingen enig voorbehoud gemaakt te worden. Bij deze beschouwingen is gebruik gemaakt van theorieën (WORK c.s., 1948; WILLIAMS c.s., 1950; WOOLLEY, 1952), die voor sommige metabolieten en hun antimetabolieten, zoals bij voorbeeld de B-vitamines en hun antagonisten, wel vaststaan, of althans met de uitkomsten van proeven overeen blijken te stemmen, maar die voor het onderhavige geval nog als hypothesen beschouwd moeten worden. Dit wordt veroorzaakt door de leemte, die er bestaat aangaande de fysiologische chemie van de vitamines A en D.

De antagonismen, zoals hierboven bedoeld, worden onderscheiden in twee hoofdgroepen, namelijk:

1. Competatieve antagonismen.

Hierbij kunnen zowel metaboliet M als zijn antimetaboliet A reversibel gebonden worden aan één zelfde plaats van een receptormolecule R, bij voorbeeld een enzym, dat de omzetting van M bewerkstelligt. In dit geval wordt de mate waarin M en A gebonden aan R voorkomen bepaald door de onderlinge concentratieverhouding M/A. De antagonistische werking van A wordt derhalve door deze verhouding bepaald. Overeenkomst in structuur speelt bij deze antagonismen een bijzonder grote rol.

2. Niet-competatieve antagonismen.

Hierbij wordt verondersteld dat antimetaboliet A reversibel gebonden kan worden aan het metaboliet-receptorcomplex MR, waardoor dit complex onwerkzaam wordt gemaakt. De mate waarin A zich bindt aan het complex MR, wordt bepaald door de concentratie van A, zodat het antagonistisch effect alleen van deze concentratie afhankelijk is.

Deze eenvoudige indeling is zeker niet volledig, aangezien er variaties mogelijk zijn, terwijl ARIËNS c.s. (1955) erop gewezen hebben, dat de denkbeelden omtrent beide types antagonismen met enkele fundamentele begrippen uitgebreid moeten worden om bepaalde afwijkingen, die met bovenstaande opvattingen niet in overeenstemming waren te brengen, toch te kunnen verklaren.

Bij een competatief antagonisme moet er blijkens het voorgaande van uitgegaan worden, dat de volgende reacties tussen metaboliet M en antimetaboliet A enerzijds met receptor R anderzijds mogelijk zijn (WILLIAMS c.s., 1950):

$$M + R \rightleftharpoons MR$$

$$A + R \rightleftharpoons AR$$

De totale hoeveelheid receptoren $[R_T]$ kan dus voorgesteld worden door

$$[R_T] = [R] + [MR] + [AR].$$

Bij het toepassen van de wet der massawerking kan $[R]$ vervangen worden door $K_M\,[MR]/[M]$, waarbij K_M de evenwichtsconstante van het metaboliet-receptorcomplex voorstelt, en $[AR]$ door $K_M\,[A]\,[MR]/K_A\,[M]$, waarbij K_A de evenwichtsconstante van het receptor-antimetaboliet-complex is. Hierbij moet dan verondersteld worden, dat de concentraties van vrij $[M]$ en $[A]$ hoog zijn t.o.v. $[MR]$ en $[MA]$, zodat ze vrijwel gelijk gesteld mogen worden aan de totale toegevoegde hoeveelheden $[M]$ en $[A]$. De uitdrukking voor de totale hoeveelheid receptoren wordt dus nu

$$[R_T] = [MR]\left(\frac{K_M}{[M]} + 1 + \frac{K_M\,[A]}{K_A\,[M]}\right).$$

Dit kan herleid worden tot

$$[MR] = \frac{R_T}{\dfrac{K_M}{[M]} + 1 + \dfrac{K_M\,[A]}{K_A\,[M]}}.$$

Nu is het effect E van de reactie, waarvan M het substraat vormt, evenredig met de hoeveelheid receptor-metabolietcomplex $[MR]$ (MICHAELIS c.s., 1913).

Voorts is het maximale effect evenredig met $[R_T]$ aangezien $[MR]$ bij een hoge metabolietconcentratie hiertoe nadert. Dit geeft

$E = c\,[MR]$ en $E_{max} = c\,[R_T]$ en

$$\frac{E_{max}}{E} = \frac{[R_T]}{[MR]} = \frac{K_M}{[M]} + 1 + \frac{K_M\,[A]}{K_A\,[M]}. \qquad (1)$$

Voor een niet-competatief antagonisme is het uitgangspunt iets anders, aangezien hier de volgende reacties mogelijk zijn:

$$M + R \rightleftharpoons MR$$

$$A + MR \rightleftharpoons AMR.$$

De totale hoeveelheid receptoren is in dit geval dus

$$[R_T] = [R] + [MR] + [AMR].$$

Op analoge wijze als dit voor het competatieve antagonisme is gedaan, kan hieruit afgeleid worden dat

$$[MR] = \frac{[R_T]}{\frac{K_M}{[M]} + 1 + \frac{[A]}{K_{AMR}}},$$

waarbij K_{AMR} de evenwichtsconstante van het antimetaboliet-metaboliet-receptorcomplex voorstelt.

Hieruit volgt dat

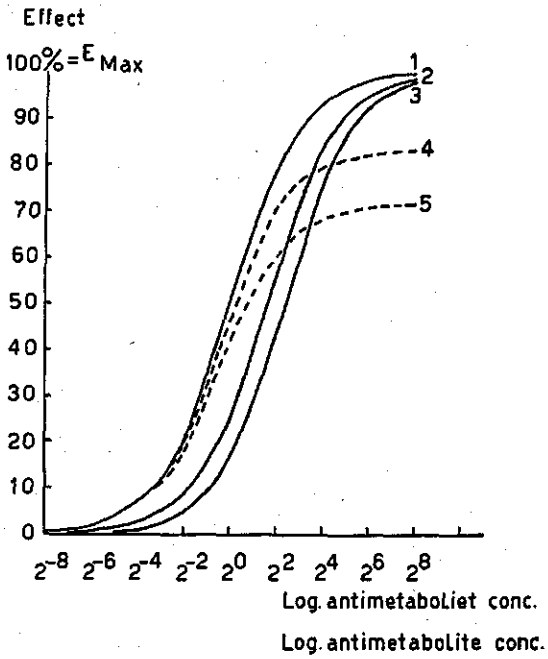
$$\frac{E_{max}}{E} = \frac{[R_T]}{[MR]} = \frac{K_M}{[M]} + 1 + \frac{[A]}{K_{AMR}}. \qquad (2)$$

De formules (1) en (2) maken het mogelijk het verband te bestuderen tussen het effect E en de hoeveelheid metaboliet $[M]$. Het is eveneens mogelijk ditzelfde na te gaan wanneer naast toenemende hoeveelheden metaboliet een constante hoeveelheid antimetaboliet aanwezig is. Dit is zowel voor een competatief als voor een niet-competatief antagonisme weergegeven in fig. 7. In deze figuur is telkens het honderdvoudige van de reciproke waarde van $\frac{E_{max}}{E}$ uitgezet, dus $\frac{100E}{E_{max}}$.

Omdat het hier slechts gaat om de weergave van het beginsel, zijn bij de berekening willekeurige waarden voor de dissociatieconstanten in de formules 1 en 2 gesubstitueerd. Voor de hoeveelheid metaboliet $[M]$, welke op de abscis logarithmisch is uitgezet, zijn de in fig. 7 aangegeven hoeveelheden gebruikt. Aangezien bij afwezigheid van antimetaboliet de term met $[A]$ in de formules 1 en 2 wegvalt, bestaat er in dit geval geen verschil tussen het effect E en $[M]$ bij de twee types antagonismen. Men zou de aldus verkregen kromme 1 de standaardlijn kunnen noemen. Voor beide types antagonismen is het verband tussen het effect en $[M]$ verder nog uitgerekend bij aanwezigheid van een constante hoeveelheid antimetaboliet en het dubbele ervan. Voor een competatief antagonisme geeft dit resp. de krommen 2 en 3, voor een niet-competatief antagonisme de lijnen 4 en 5 (ARIËNS c.s., 1955).

De opzet van de krommen in fig. 7 en de wijze waarop ze zijn afgebeeld, zijn

geheel in overeenstemming met de uitvoering van de rattenproeven van de tweede proefreeks (hoofdstuk VII. 1), waarvan fig. 5 een voorbeeld geeft. In fig. 5 is op de abscis de log dosis vitamine D uitgezet en in fig. 7 de log dosis metaboliet, terwijl op de ordinaat van fig. 5 de genezing is uitgezet en in fig. 7 het relatief



IG. 7. Competatief en niet-competatief antagonisme zonder antimetaboliet (kromme 1).
Competitive and non competitive antagonism without antimetabolite (curve 1).
Competatief antagonisme met twee verschillende hoeveelheden antimetaboliet (krommen 2 en 3).
Competitive antagonism with two different amounts of antimetabolite (curves 2 and 3).
Niet-competatief antagonisme met twee verschillende hoeveelheden antimetaboliet (krommen 4 en 5).
Non competitive antagonism with two different amounts of antimetabolite (curves 4 and 5).

effect van de metabolietdosis. Het verschil tussen beide figuren bestaat hierin, dat in fig. 5 de invloed van slechts één constante hoeveelheid antimetaboliet (vitamine A) is weergegeven en in fig. 7 de invloed van twee hoeveelheden (krommen 2 en 3). Verder zijn in fig. 7 de berekende krommen doorgetrokken tot buiten het bij benadering rechte centrale deel. In fig. 5 kon dit niet gedaan worden, omdat bij biologische bepalingen alleen maar op het rechte traject wordt gewerkt.

Uit het evenwijdig verloop van de beide lijnen in deze laatstgenoemde figuur moet, op grond van een vergelijking met de beide in fig. 7 grafisch weergegeven mogelijkheden, de conclusie getrokken worden, dat het bij de wisselwerking tussen het vitamine D en caroteen (vitamine A) gaat om een competatief antagonisme.

Dat deze typering van het genoemde antagonisme echter misschien niet geheel juist is, kan blijken uit de volgende overwegingen. In fig. 7 zijn voor een competatief antagonisme slechts drie gevallen weergegeven, namelijk het verband zonder metaboliet (standaardkromme), die met een bepaalde hoeveelheid anti-

metaboliet (kromme 2) en die met het dubbele ervan (kromme 3). Het spreekt vanzelf, dat dit aantal gevallen verder uitgebreid had kunnen worden door steeds grotere hoeveelheden antimetaboliet $[A]$ in formule 1 te substitueren. Daardoor zou een grotere serie, steeds meer naar rechts verschuivende krommen verkregen zijn. Bij hogere concentraties vertonen de lijnen bij iedere volgende verdubbeling van $[A]$, horizontaal gemeten, een constant interval. Nu kan van iedere kromme, voorstellend het effect van een reeks metaboliethoeveelheden met een constante hoeveelheid antimetaboliet een bepaalde metabolietwerking afgeleid worden, zoals ook bij de biologische vitamine D-bepalingen in hooi uit de positie van de regressielijnen ten opzichte van de regressielijn van de vitamine D-standaard tot een zekere vitamine D-werking kan worden besloten. De maatstaf hiervoor vormt de antilogarithme van de horizontale afstand tussen de regressielijnen (COWARD, 1947; B.S.I. Spec. No. 911, 1949).

Wanneer een dergelijke berekening wordt uitgevoerd voor een competatief antagonisme, dan zou dit bij voorbeeld gedaan kunnen worden op dat punt van de ordinaat waarvoor het effect E 50 procent van E_{max} bedraagt, zodat formule 1 wordt

$$\frac{K_M}{[M]} + 1 + \frac{K_M\,[A]}{K_A\,[M]} = 2. \qquad (3)$$

Dat het inderdaad geoorloofd is dit willekeurig niveau $\frac{E_{max}}{E} = 2$ te kiezen voor het bepalen van de horizontale afstanden, dus van metabolietwerkingen, vloeit voort uit het feit dat de krommen 1, 2 en 3 door verschuiving in horizontale richting in elkaar overgaan. Tussen de metabolietdosis $[M_1]$ namelijk, die bij aanwezigheid van een hoeveelheid antimetaboliet $[1A]$ eenzelfde effect geeft als de metabolietdosis $[M_2]$ bij aanwezigheid van een hoeveelheid antimetaboliet $[2A]$, bestaat de betrekking

$$\frac{K_M}{[M_1]} + 1 + \frac{K_M\,[1A]}{K_A\,[M_1]} = \frac{K_M}{[M_2]} + 1 + \frac{K_M\,[2A]}{K_A\,[M_2]}\,.$$

Hieruit volgt dat

$$\frac{[M_1]}{[M_2]} = \frac{K_A + [1A]}{K_A + [2A]},$$

zodat de horizontale afstand tussen $\log\,[M_2] - \log\,[M_1]$ gelijk is aan

$$\log\,(1 + \frac{[1A]}{K_A + [1A]}).$$

Hieruit blijkt, dat deze horizontale afstand bij gelijkblijvende $[A]$ onafhankelijk is van $[M]$ en derhalve blijkens (1) ook van $\frac{E_{max}}{E}$. De krommen gaan dus bij horizontale verschuiving in elkaar over.

Substitueert men nu in formule 3 bepaalde, met de factor twee toenemende waarden voor $[A]$, dan worden de bijbehorende waarden van $[M]$ gevonden, die een halfmaximaal effect geven. Wanneer zonder metaboliet wordt gewerkt, kan op overeenkomstige wijze $[M]$ van kromme 1 ($M_{standaard}$) gevonden worden, waarvoor eveneens geldt dat $\frac{E_{max}}{E} = 2$. Nu geeft het verschil $\log M_{1A} - \log$

$M_{standaard}$ de horizontale afstand aan tussen de standaardkromme en de lijn die verkregen wordt, wanneer naast iedere standaarddosering een hoeveelheid [1A] antimetaboliet voorkomt en eveneens log M_{2A} – log $M_{standaard}$ de afstand tussen beide krommen, wanneer van een hoeveelheid [2A] antimetaboliet uitgegaan is. Derhalve kan uit

$$\frac{M_{1A}}{M_{standaard}} \text{ en } \frac{M_{2A}}{M_{standaard}}$$

voor beide gevallen de metabolietwerking berekend worden, wanneer naast bekende hoeveelheden metaboliet een hoeveelheid [1A] resp. [2A] antimetaboliet voorkomt. Onder aanname van $K_M = 1$ en $K_A = 1$, 5, 10 en 20 is dit voor toenemende hoeveelheden [A] uitgerekend en de berekende werking of „metabolietgehaltes" zijn in fig. 8 uitgezet tegen de hoeveelheid antimetaboliet, zodat de krommen 1, 2, 3 resp. 4 ontstonden. Door behalve $K_A = 1$ eveneens de waarden 5, 10 en 20 te gebruiken, zijn antagonismen in ogenschouw genomen, waarbij de invloed van de antimetaboliet ten opzichte van de metaboliet steeds zwakker werd, zoals ook uit de ligging van de vier krommen onderling afgeleid kan worden. Dit berust hierop, dat minder [AR] aanwezig is, naarmate K_A groter wordt. Derhalve bestaat er een volledige overeenstemming tussen de wijze waarop de krommen van fig. 8 zijn berekend en de manier waarop die van fig. 6 op grond van de uitkomsten van de tweede proefreeks (tabel 29) zijn ontstaan.

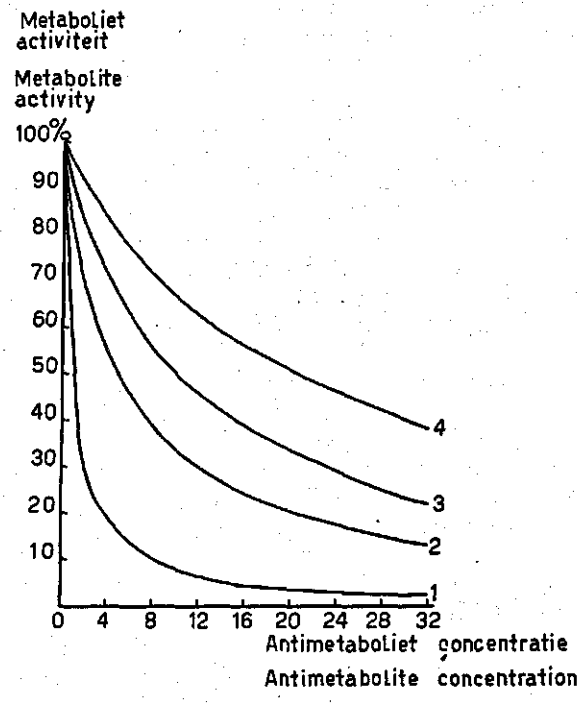


FIG. 8. Metabolietwerking bij competatief antagonisme naast toenemende hoeveelheden antimetaboliet.
Recovery of metabolite activity in competitive antagonism with increasing intakes of antimetabolite.

Inderdaad bestaat er overeenkomst tussen het verloop der krommen van caroteen en vitamine A in fig. 6 en de theoretisch afgeleide voorbeelden in fig. 8. Geheel bevredigend is deze overeenkomst echter niet. Bij een zuiver competatief antagonisme kan de werking van de metaboliet door een toenemende hoeveelheid antimetaboliet geheel te niet gedaan worden. Bij welke antimetabolietheoveelheid dit plaats vindt, hangt af van de „affiniteit" tussen antimetaboliet A en receptormolecule R, d.i. van de waarde van K_A, zoals uit fig. 8 blijkt.

Het verloop der krommen in fig. 6 doet echter vermoeden, dat de werking van vitamine D door stijgende hoeveelheden caroteen (vitamine A) slechts tot een limiet van ongeveer 50 procent verminderd kan worden. Om dit met meer zekerheid te kunnen zeggen, zou de antagonistische invloed van nòg grotere doses vitamine A beproefd moeten worden. Daarom is het beter, voorlopig een niet al te grote betekenis toe te kennen aan het vermeende verschil in het verloop der krommen van de figuren 6 en 8.

Op grond van de thans ter beschikking staande gegevens is het derhalve het meest voor de hand liggend het antagonisme tussen caroteen (vitamine A) en vitamine D competatief te noemen en de beide laatstgenoemde verbindingen als slechts zwakke antagonisten van het vitamine D te beschouwen.

Een zekere terughoudendheid is ook hierom wenselijk, omdat in het huidige geval niet is gewerkt met een geïsoleerd enzym dat slechts de in onderzoek zijnde omzetting kan bewerkstelligen, maar met levende dieren. Er dient dan ook ernstig rekening gehouden te worden met de mogelijkheid, dat het bij het antagonisme tussen caroteen (vitamine A) en vitamine D niet gaat om één enkel enzym dat geremd wordt, maar om een samengestelder biologisch proces, waarvan experimenteel slechts het uiteindelijke resultaat aan de hand van verschillende doseringen bestudeerd is. In een dergelijk situatie kunnen afwijkingen van de theorie verwacht worden, zoals ook het bestuderen van antagonismen met behulp van bacteriesuspensies heeft geleerd.

Er blijft dus, zowel ten aanzien van het antagonisme tussen caroteen (vitamine A) en vitamine D alsook wat het wezen ervan betreft, een aantal duistere punten over. Dat het antagonisme niet altijd aantoonbaar is, zou verklaard kunnen worden uit het competatieve karakter ervan. Dit kan toegelicht worden aan de hand van fig. 7. De invloed van de antimetaboliet, in ons geval dus caroteen (vitamine A), wordt slechts merkbaar onder bepaalde omstandigheden, namelijk bij een niet al te ruim aanbod van metaboliet (vitamine D), gepaard gaande met een zekere overmaat aan antimetaboliet (caroteen, vitamine A). Dit is dus het geval op het centrale rechte deel van de krommen 2 en 3. Wordt het metaboliet- (vitamine D-) aanbod ruimer, dan ontstaan de voorwaarden die gelden voor het bovenste deel van de genoemde krommen, waar de verticale afstanden tussen de verschillende lijnen, d.w.z. de verschillen in werking van éénzelfde metabolietdosis zonder en met toenemende hoeveelheden antimetaboliet, vrijwel geheel verdwijnen.

Zowel ten aanzien van het wezen van het antagonisme alsook wat de identiteit van de antagonist betreft, blijven nog vragen over. In niet mindere mate geldt dit de betekenis van het antagonisme voor de veevoeding. Onwillekeurig dringt zich de vraag op in hoeverre de grote caroteenopneming met het voorjaarsgras, wanneer de vitamine D-voorziening door het zonlicht nog niet maximaal is, nadelige gevolgen kan hebben. In het huidige stadium van het onderzoek is het ontoelaatbaar een verband te leggen tussen de afwijkingen die zich bij melkvee in het begin van de weidetijd voordoen en de overmaat caroteen die dan wordt op-

genomen, welke laatste hoeveelheid, zoals reeds is opgemerkt, ongeveer overeenkomt met het honderdvoudige van hetgeen de norm voorschrijft.

Zo zou het aantal vragen nog te vermeerderen zijn. Alles tezamen genomen mag wel worden besloten, dat het huidige onderzoek uitbreiding nodig heeft, zowel in de breedte als in de diepte.

SAMENVATTING

In hoofdstuk I is erop gewezen dat de behoefte groot is om ten aanzien van het vitamine D over eigen waarnemingen te beschikken. Een onderzoek naar de vitamine D-werking van Nederlandse ruwvoedermiddelen werd derhalve om verschillende redenen van betekenis geacht.

Om een indruk te krijgen van de stand van zaken hieromtrent in het buitenland is in hoofdstuk II een overzicht gegeven van de literatuur aangaande vitamine D-gehaltes in ruwvoedermiddelen.

In hoofdstuk III zijn aan de hand van de literatuur de beide methodes besproken, die voor het bepalen van vitamine D-gehaltes in ruwvoedermiddelen worden toegepast. Het vermoeden, dat de mengmethode, waarbij het hooi door het rachitogene voer wordt gemengd, tot te hoge uitkomsten kan leiden, kon experimenteel bevestigd worden. Deze methode is veelvuldig toegepast door WALLIS (1935, 1938 a, b).

Derhalve is, na enkele oriënterende proeven de extractiemethode gebruikt, zoals die mede door ALLEMANN (1942) is uitgewerkt. Het bleek echter tijdens het onderzoek van een serie ruwvoedermiddelen, dat bij deze methode het vitamine D niet volledig met ether uit het te onderzoeken materiaal werd geëxtraheerd. Dit was wèl het geval, wanneer het hooi eerst met een loogoplossing gekookt werd, waarna het vitamine D overgebracht kon worden in petroleumether. De in deze zin gewijzigde extractiemethode bleek hogere uitkomsten te geven dan die van ALLEMANN (1942).

Vervolgens werd de methode nog verder gewijzigd door het vitamine D, voorkomend in de onverzeepbare fractie van grasvet verder te zuiveren door chromatografie. De aanleiding hiervoor vormde de waarneming, dat bij de biologische bepaling van het vitamine D, de regressielijn van de vitamine D-standaard vrijwel steeds een grotere helling bleek te vertonen dan die van de onderzochte stof. Dit kon verklaard worden door in gras en hooi een stof te veronderstellen, die het vitamine D tegenwerkt („antivitamine D-factor"). Deze kon door chromatografie verwijderd worden, wat bleek uit het wegvallen van het verschil in helling der regressielijnen en het hoger uitvallen van de vitamine D-gehaltes.

Het biologisch deel der vitamine D-bepalingen werd uitgevoerd volgens het curatieve principe met rachitische jonge ratten. Het criterium voor de genezing vormden de röntgenologisch waarneembare veranderingen die tengevolge van het toedienen van vitamine D in de metafyse van het proximale eind van de rechter tibia ontstonden.

In hoofdstuk IV is een overzicht gegeven van de gevonden vitamine D-werking der monsters (tabellen 18–21). In ingekuilde stoppelknollen kon geen vitamine D aangetoond worden, in ingekuild gras gemiddeld 300 i.e. per kg droge stof, in kunstmatig gedroogd gras 500 i.e.; zonder meerekenen van één bijzonder hoge uitkomst was de werking echter ongeveer gelijk aan die van ingekuild gras. De vitamine D-werking van opperhooi bedroeg gemiddeld bijna 1000 i.e. per kg

droge stof, van ruiterhooi 800, zonder meerekenen van één bijzonder hoge waarde echter 575 i.e. per kg droge stof. Stro is, wat de vitamine D-werking betreft, waarschijnlijk ongeveer gelijkwaardig met opperhooi.

Deze uitkomsten vormden een bevestiging voor het vermoeden, dat een vermindering van de invloed van het zonlicht lagere vitamine D-gehaltes meebrengt.

Aan de hand van deze uitkomsten is een beschouwing gegeven over de vitamine D-voorziening van kalveren en melkvee. Kalveren krijgen met volle melk en hooi de eerste maanden na de geboorte te weinig vitamine D. Gemiddeld kan de voorziening van melkvee juist voldoende zijn indien het stalrantsoen 8–10 kg opperhooi bevat of evenveel hooi + stro. Door de grote variatie in de vitamine D-werking van hooi zal dit echter op veel bedrijven niet het geval zijn, terwijl de vitamine D-voorziening in ongunstige zin wordt beïnvloed wanneer het opperhooi in het stalrantsoen geheel of ten dele wordt vervangen door produkten als ruiterhooi en ingekuild gras.

In hoofdstuk V is een overzicht gegeven van de literatuur betreffende factoren, die het vitamine D tegenwerken. Hierover bleken verschillende min of meer op zichzelfstaande mededelingen te bestaan.

In hoofdstuk VI is het eigen werk beschreven, dat verricht is omtrent de opheldering van de identiteit van de in gras en hooi waargenomen „antivitamine D-factor". De werking hiervan kon op verschillende manieren aangetoond worden. De aanwezigheid ervan in melkvet kon niet met voldoende zekerheid vastgesteld worden, wèl echter in kunstmatig gedroogd gras. De factor kon van vitamine D afgescheiden en verder gezuiverd worden met behulp van chromatografie. Er bleek een betrekking te bestaan tussen caroteen en deze „antivitamine D-factor", zonder dat het nog mogelijk was te besluiten, dat deze stoffen identiek zijn.

In hoofdstuk VII zijn de rattenproeven beschreven, die uitgevoerd zijn met synthetisch beta-caroteen en synthetisch vitamine A. Het bleek dat deze verbindingen de rachitis bij ratten, gezet op een rachitogeen rantsoen, niet deden toenemen. Daarentegen kon wel herhaaldelijk waargenomen worden, dat in curatieve proeven de werking van het vitamine D zowel door caroteen als door vitamine A verminderd werd. Hiervoor was het nodig een onfysiologisch grote, maar allerminst toxische hoeveelheid caroteen (vitamine A) te geven.

Bij lammeren bleek een hoeveelheid vitamine A, die de dagelijkse behoefte 100 maal overtrof en die gedurende zeven weken werd verstrekt, aanleiding te geven tot een daling van het P-gehalte in het bloedserum.

Op grond van de experimentele gegevens lijkt het waarschijnlijk, dat het antagonisme een competatief karakter draagt en dat caroteen en vitamine A slechts als zwakke antagonisten van het vitamine D te beschouwen zijn.

SUMMARY

In chapter I it is pointed out that, in every country, it is important to have information relating vitamin D to animal nutrition, including, for example, the vitamin D content of roughages. The importance of geographical position, and hence the intensity of the ultraviolet rays of the sun on vitamin D formation, is stressed. An investigation into the vitamin D content of Dutch roughages was, therefore, considered important, particularly as some modern methods of curing reduce the time of exposure to sunlight.

A review of the literature on the vitamin D content of roughages in other

countries is given in chapter II. The vitamin D content of fresh grass appears to be low while that of hay is high. The marked variations in the values given for hay cannot be entirely explained by differences in time of curing. It is considered probable that all factors which, together with sunlight, influence the vitamin D content of roughages are not yet known.

In chapter III, from the literature to hand, the two methods for determining the vitamin D content of roughages are discussed. It is concluded that the „mixing method", that has often been used by Wallis (1935; 1938 a, b), in which the hay is mixed with the rachitogenic diet might give high results because of the amounts of Ca and P contributed by the sample. This has been confirmed experimentally (Table 10). After some preliminary trials (Tables 11, 12) the „ether-extraction method", which has been extensively studied by Allemann (1942) was chosen. During the assay of a number of hay samples, however, it was evident that vitamin D was incompletely extracted with ethyl ether. By treating the hay with 10% KOH the vitamin could be completely concentrated in petroleum ether (Table 13). This modified extraction procedure gave higher results than the method of Allemann (Table 14).

Subsequently the method was further modified by purifying the vitamin D in the unsaponifiable fraction of hay fat by chromatography. This was done because, in the biological determination of vitamin D, the regression lines for the vitamin D standard had much larger slopes than those for the hay fat (Fig. 2, Table 15). This could be explained by assuming that grass and hay contain a factor antagonistic to vitamin D. This factor could be removed by chromatography on alumina with petroleum ether; the vitamin D containing fraction was removed only after the application of petroleum ether containing 0.5% ethanol. Removal of the factor was confirmed by the disappearance of the differences in the slopes (Table 17) and by the increase in vitamin D potency after chromatography (Table 16). The curative X-ray method was used for all vitamin D determinations.

In chapter IV the results obtained for Dutch roughages are discussed. No vitamin D could be detected in „turnips after stubble" ensiled together with their leaves (Table 19). Grass silage contained, on the average, 300 i.u. vitamin D/Kg D.M. (Table 19) and artificially dried grass 500 i.u. (Table 18); if one very high value is omitted from the latter group, however, grass silage and artificially dried grass had about the same potency. Hay cured in windrows and cocks contained 1000 i.u. vitamin D/Kg D.M. (Table 21) and frame-dried hay 575 i.u., or 800 i.u. if one very high value is included (Table 20). Straw is probably the same as windrow hay.

These findings confirm the conclusion that hays of lower vitamin D potency result from reduced exposure to sunlight during curing. Although the difference between windrow and frame-dried hay is significant, it is not as great as was anticipated from a survey of the literature.

The intake of vitamin D by calves and dairy cows during winter is estimated from these results. It is considered that, on a diet of milk and hay, calves do not get sufficient vitamin D during the first three months after birth (Fig. 3, Table 23); for cows the intake is probably just sufficient if the daily ration contains 8–10 Kg windrow hay or hay and straw. Owing to the great variation in the vitamin D content of hays, intake of the vitamin may not be adequate on all farms. Moreover, the intake will be decreased if part of the windrow hay is replaced by frame-dried or barn-cured hay or by grass silage.

In chapter V a survey is given of the literature dealing with factors which antagonise vitamin D; it turned out that several publications exist on this subject.

In chapter VI our own attempts to elucidate the identity of the vitamin D inhibiting factor are reported. Its existance could be demonstrated in different ways (Fig. 2, Tables 15, 25). Artificially dried grass was a potent source of the factor but its presence in milk fat could not be definitely established (Table 26). As already mentioned the factor could be separated from vitamin D by chromatography (Table 27). Although identification was not possible a relationship appeared to exist between this factor and carotene (Fig. 4).

Experiments, with rats, to test the inhibiting effect of synthetic carotene and vitamin A palmitate on vitamin D are described in chapter VII. It appeared that these compounds did not increase the degree of rickets when newly weaned rats were given the rachitogenic diet (Table 28). On the other hand it was repeatedly observed in curative experiments, that both carotene and vitamin A diminished the degree of healing that occurred when vitamin D alone was given (Fig. 6, Table 29). To obtain a measurable degree of inhibition it was not necessary to give toxic amounts of carotene or vitamin A, 100–800 i.u. daily being sufficient.

In the curative experiments with rats, the regression lines of the vitamin D standard alone or with increasing amounts of carotene or vitamin A were parallel (Fig. 5) and it is suggested that the antagonism is of a competitive nature, both carotene and vitamin A being weak antagonists only.

In experiments with lambs a daily dose of one hundred times the normal vitamin A requirement had, after seven weeks, no effect on the blood serum calcium but caused a lowering of the serum inorganic phosphorus (Table 30).

LITERATUUR

1. ABRAMS, J. T., British Vet. J. **108** (1952) 275–292.
2. ALBADA, M. VAN en P. UBBELS, Mededeling nr **39** (1951) Rijksinst. voor Pluimveeteelt.
3. ALLEMANN, O., Ztschrft Vitaminforsch., Beiheft No **2**. (1942).
4. ANDERSON, J., C. E. DENT, C. HARPER en G. R. PHILPOT, Lancet **267** (1954) 720–724.
5. ARCHIBALD, J. G. en J. D. NEVILLE, Mas. Agr. Exp. Sta. Bull. **398** (1943) 14.
6. ARIËNS, E. J., A. M. SIMONIS en W. M. DE GROOT, Arch. int. Pharmacod. et Thér. **100** (1955) 298–322.
7. BACHARACH, A. L., E. ALLCHORNE en V. HAZLEY, Biochem. J. **25** (1931) 639–642.
8. BECHDEL, S. I., N. W. HILSTON, N. B. GUERRANT en R. A. DUTCHER, Pa. Agr. Exp. Sta. Bull. **364** (1938).
9. BECHDEL, S. I., K. G. LANDSBURG en O. J. HILL, Pa. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. **291** (1933).
10. BECHTEL, H. E., E. T. HALLMAN, C. F. HUFFMAN en C. W. DUNCAN, Mich. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. **150** (1936a).
11. BECHTEL, H. E. en C. A. HOPPERT, Mich. Agr. Exp. Sta. Quart. Bull. **18** (1936b) 153–154.
12. BECKER, E., Vitamine und Hormone **4** (1943) 293–305.
13. BECKER, M., Landw. Forschung **2** (1950) 64–74.
14. BETHKE, R. M., C. H. KICK en W. WILDER, J. Biol. Chem. **98** (1932) 389–403.
15. BIANCA, W., Schweiz. Landw. Monatschr. **30** (1952) 197–213.
16. BILLS, C. E., Biol. Symposia **12** (1947) 409–434.
17. BILLS, C. E., E. M. HONEYWELL, A. M. WIRICK en M. NUSSMEIER, J. Biol. Chem. **90** (1931) 619–636.
18. BOMSKOV, C. en G. SEEMANN, Ztschrft ges. exp. Med. **89** (1933) 771–779.
19. BOOTH, R. G., K. M. HENRY en S. K. KON, Biochem. J. **36** (1942) 445–455.
20. BOURDILLON, R. B., H. M. BRUCE, C. FISHMANN en T. A. WEBSTER, Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser. No. **158** (1931).
21. BOUTWELL, R. K., R. P. GEYER, A. W. HALVERSON en E. B. HART, J. Nutr. **31** (1946) 193–202.

22. BRANDSMA, S., Med. Landbouwhogeschool, Wageningen, **54** (1954) 245–309.
23. BRAUDE, R., K. M. HENRY en S. K. KON, Brit. J. Nutr. **2** (1948) 66–75.
24. BRAUDE, R. en S. K. KON, Brit. J. Nutr. **2** (1948) 403–405.
25. BRAUDE, R., S. K. KON en E. G. WHITE, J. Comp. Pathol. and Therap. **53** (1943) 161–189.
26. BRAUDE, R., S. K. Kon en E. G. WHITE, J. Comp. Pathol. and Therap. **54** (1944) 88–96.
27. BRION, A., R. FERRANDO, M. CHENAVIER en J. PORTAL, Bull. Soc. Chim. Biol. **33** (1951) 151–154.
28. BRITISH STANDARD INSTITUTION, Spec. No. **911** (1940).
29. BROUWER, E., Versl. Landbouwk. Onderz. No. **38**.C. (1932) 145–177.
30. BROUWER, E. en S. BRANDSMA, Med. Landbouwhogeschool, Wageningen, **53** (1953) 31–73.
31. BROUWER, E. en N. D. DIJKSTRA, Versl. Landbouwk. Onderz. No. **47** (17) C (1941).
32. BROUWER, E. en J. C. DE RUYTER DE WILDT, Landbouwk. Tijdschr. **43** (1931) 337–348.
33. BROWN, H. B., A. T. SOHL, E. E. CHAPMAN, C. S. ROSE en E. M. SAURWEIN, J. Biol. Chem. **98** (1932) 207–214.
34. BRUCE, H. M. en R. K. CALLOW, Biochem. J. **28** (1934a) 512–516.
35. BRUCE, H. M. en R. K. CALLOW, Biochem. J. **28** (1934b) 517–528.
36. BRUCE, H. M. en G. E. PHILIPS, Biochem. J. **32** (1938) 1–4.
37. BÜNGER, H., Tierernährung **11** (1939) 157–161.
38. BUNKFELDT, R. en H. STEENBOCK, J. Nutr. **25** (1943) 479–489.
39. CAMPEN, W. A. C. en H. GEERLINGS, Chem. Weekbl. **50** (1954) 385–393.
40. CHARPY, J. en P. PICHAT, C.R. Séances Soc. Biol. **141** (1947) 929–931.
41. CHEVALLIER, A. en C. LAUSECKER, C.R. Soc. Biol. **144** (1950) 1412–1413.
42. CHEVALLIER, A. en C. LAUSECKER, Int. Ztschrft Vitaminforsch. **24** (1952) 99–108.
43. COLOVOS, N. F., H. A. KEENER, A. E. TEERI en H. A. DAVIS, J. Dairy Sci. **34** (1951) 735–742.
44. COPPENS, PH. A. en G. A. METZ, Biochem. Ztschrft **266** (1933) 169–174.
45. COWARD, K. H., The biological standardisation of the vitamins. 2nd ed. 1947. Baillière, Tindall and Cox, London.
46. COWARD, K. H. en E. W. KASSNER, Biochem. J. **34** (1940) 538–541.
47. COWARD, K. H., K. M. KEY en B. G. E. MORGAN, Biochem. J. **26** (1932) 1585–1592.
48. DIEMAIR, W. en G. MANDERSCHEID-SCHWINDLING, Ztschrft anal. Chemie **138** (1953) 1–8.
49. DODDS, G. S. en H. C. CAMERON, Am. J. Anatomy **55** (1934) 135–166.
50. DUKES, H. H., The physiology of domestic animals. 6th ed. 1947. Comstock Publ. Comp. Inc. New York.
51. DYER, F. J., J. Pharm. Pharmacol. **4** (1931) 503–516.
52. DIJK, G. J. VAN, M. J. WIGGERS DE VRIES en K. J. KEUNING, ter perse.
53. EATON, H. D., A. A. SPIELMAN, J. K. LOOSLI, J. W. THOMAS en K. L. TURK, J. Dairy Sci. **30** (1947a) 787–794.
54. EATON, H. D., A. A. SPIELMAN, J. K. LOOSLI, J. W. THOMAS en K. L. TURK, J. Dairy Sci. **30** (1947b) 795–802.
55. EMERIQUE, L., C.R. Acad. Sci. **205** (1937) 879–882.
56. EVERSE, J. W. R., De biologische standaardisatie van het vitamine-D. Proefschrift Leiden, 1931.
57. EWER, T. K., Brit. J. Nutr., **2** (1949) 406–407.
58. EWER, T. K., Nature, **166** (1950) 732–733.
59. EWER, T. K., Brit. J. Nutr. **5** (1951) 287–300.
60. EWER, T. K., Austr. Vet. J. **29** (1953) 310–315.
61. EWER, T. K. en P. BARTRUM, Austr. Vet. J. **24** (1948) 73–85.
62. FITCH, L. W. N., Austr. Vet. J. **19** (1943) 2–20.
63. FITCH, L. W. N., en T. K. EWER, Austr. Vet. J. **20** (1944) 220–226.
64. FREEDMAN, A., Lancet **267** (1954) 1018–1019.
65. GALLUP, W. D., O. O. THOMAS, O. B. ROSS en C. K. WHITEHAIR, J. Animal Sci., **12** (1953) 715–721.
66. GARDNER, W. U., Endocrinology, **32** (1943) 149–160.
67. GOUNELLE, H., H. TEULON en R. PAULAIS, C.R. Soc. Biol. **145** (1951a) 540–541.
68. GOUNELLE, H., H. TEULON en R. PAULAIS, C.R. Soc. Biol. **145** (1951b) 877–879.
69. GOUNELLE, H., H. TEULON en R. PAULAIS, C.R. Soc. Biol. **146** (1952) 711–714.
70. GRANT, A. B., Nature **168** (1951) 789.
71. GRANT, A. B., Nature **172** (1953) 627.
72. GROENEVELD, B. J. B., De invloed van D-vitamine en ultraviolette bestraling bij verschillende verhoudingen van Ca : P in het dieet. Proefschrift Wageningen, 1932.
73. GROSS-SELBECK, C., Klin. Wochenschr. **14** (1935) 61–62.

74. GRIJNS, G., E. BROUWER, J. VAN NIEKERK en J. C. H. VAN WIJNGAARDEN, Hand. Genootsch. Melkk. 1934.
75. GUILBERT, H. R. en J. K. LOOSLI, J. Animal Sci., **10** (1951) 22–41.
76. GULLICKSON, T. W., L. S. PALMER en W. L. BOYD, Min. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. **105** (1935).
77. GYÖRGY, P., Vitamin methods 1950–1951. Acad. Press. Inc. New York.
78. HARRIS, L. J., Bull. Soc. Chim. Biol. **30** (1948) 908–920.
79. HARRISON, H. E. en H. C. HARRISON, J. Clin. Invest. **20** (1941) 47–55.
80. HART, E. B., H. STEENBOCK, E. C. TEUT en G. C. HUMPHREY, J. Biol. Chem. **84** (1929) 367–376.
81. HART, G. H., Nutr. Abstr. Rev. **10** (1940–41) 261–272.
82. HART, M. L. 't, Landbouwk. Tijdschr. **56/57** (1944/45) 477–487.
83. HENDRIKS, J. B., A. F. MORGAN en R. M. FREYTAG, Am. J. Physiol. **149** (1947) 319–332.
84. HIBBS, J. W., W. E. KRAUSS, W. D. POUNDEN, C. F. MONROE en T. S. SUTTON, J. Dairy Sci. **29** (1946) 617–623.
85. HODGSON, R. E. en J. C. KNOTT, J. Agr. Res. **48** (1934) 439–447.
86. HOFF-JØRGENSEN, E., Nature **159** (1947) 99.
87. HOFF-JØRGENSEN, E., Nature **162** (1948) 574.
88. HORN, V., Tiernährung **6** (1934a) 441–448.
89. HORN, V., Tiernährung **6** (1934b) 449–480.
90. HUFFMAN, C. F. en C. W. DUNCAN, J. Dairy Sci. **18** (1935) 432.
91. IWEMA, S., Vlugschrift voor de Landbouw No 36, 1954.
92. JAVILLIER, M. en L. EMERIQUE-BLUM, C.R. Acad. Sci. **212** (1941) 289–292.
93. JONES, J. H., J. Nutr. **20** (1940) 367–376.
94. JUSATZ, H. J., Ztschrft ges. exp. Med. **87** (1933) 529–544.
95. KEENER, H. A., J. Dairy Sci. **37** (1954) 1337–1345.
96. KLEIN OBBINK, H. J. en C. NIEMAN, Ned. Tijdschr. Geneesk. **97** (1953) 872–877.
97. KLOSTERMAN, E. W., D. W. BOLIN, M. R. LIGHT en W. E. DINUSSON, Science **116** (1952) 665–666.
98. KRAUSS, W. E., C. F. MONROE, C. C. HAYDEN en B. H. EDGINGTON, J. Dairy Sci. **22** (1939) 440–441.
99. KRIEGER, C. H. en H. STEENBOCK, J. Nutr. **20** (1940) 125–132.
100. LECOQ, R., C.R. Acad. Sci. **211** (1940) 189–191.
101. LEHNARTZ, E., Einführung in die chemische Physiologie. 6e Aufl. 1943, Springer Verlag, Berlin.
102. LEIGNES BAKHOVEN, H. G. A., Veevoeding. 11e dr. 1951. Wolter's Uitgeversmaatschappij, Groningen.
103. LENKEIT, W., Einführung in die Ernährungsphysiologie der Haustiere. 1e Aufl. 1953. Ferd. Enke Verlag, Stuttgart.
104. LILLY, C. A., C. B. PEIRCE en R. L. GRANT, J. Nutr. **9** (1935) 25–35.
105. LONG, J. W., C. F. HUFFMAN en C. W. DUNCAN, Milk Plant Monthly **25**/7 (1936) 30–36.
106. MADDOCK, C. L. en S. B. WOLBACH, Fed. Proc. **9** (1950) 337.
107. MAN, TH. J. DE, Nature **162** (1948) 574.
108. MATZKO, S. N. en E. V. ZAVADOVSKY, Fiziol. Zh. S.S.S.R. Sechenova **37** (1951) 233–239, naar Nutr. Abstr. Rev. **22** (1952) 355.
109. MAYNARD, L. A., Animal nutrition, 2nd ed. 1947. Mc Graw-Hill Book Comp. Inc. New York.
110. MCCOLLUM, E. V., N. SIMMONDS, P. G. SHIPLEY en E. A. PARK, J. Biol. Chem. **47** (1921) 507–528.
111. MCCOLLUM, E. V., N. SIMMONDS, P. G. SHIPLEY en E. A. PARK, J. Biol. Chem. **51** (1922) 41–49.
112. METZ, G. A. en PH. A. COPPENS, Ned. Tijdschr. Geneesk. **78** (1934) 769–772.
113. MEUNIER, P., Fortschritte der Chemie anorg. Naturstoffe. Band **9** (1952) 88–113.
114. MICHAELIS, L. en M. L. MENTEN, Biochem. Ztschrft **49** (1913) 333–369.
115. MIES, H., Normale Physiologie. 1e Aufl. 1948. Nölke Verlag, Hamburg.
116. MØLLGAARD, H., Tierernährung **15** (1943) 1–26.
117. MOORE, L. A., J. W. THOMAS, W. C. JACOBSON, C. G. MELIN en J. B. SHEPHERD, J. Dairy Sci. **31** (1948) 489–499.
118. MOORE, T. en Y. L. WANG, Biochem. J. **39** (1945) 222–228.
119. MORGAN, A. F., J. B. HENDRIKS en R. M. FREYTAG, J. Biol. Chem. **140** (1941) XCII–XCIII.
120. MORGAN, A. F., L. KIMMEL en N. C. HAWKINS, J. Biol. Chem. **120** (1937) 85–102.
121. MORGAREIDGE, K. en B. O'BRIEN, J. Nutr. **16** (1938) 395–405.

122. MORRISON, F. B., Feeds and feeding. 21th ed. 1949. Morrison Publishing Comp. Ithaca, New York.
123. MOURIQUAND, G., Int. Ztschrft Vitaminforsch. **21** (1949) 6–9.
124. MOURIQUAND, G. en P. MICHEL, C.R. Séances de l'Acad. Sciences **176** (1923) 338–340.
125. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Rec. Nutr. Allowances for Dairy Cattle. Rep. No 3 (1950).
126. NEHLER, G. M., Der Tierzüchter **6** (1954) 363–365.
127. NEWLANDER, J. A., J. Dairy Sci. **31** (1948) 455–460.
128. NEWLANDER, J. A., C. H. JONES en M. W. FOOTE, Verm. Agr. Exp. Sta. Bull. **561** (1950).
129. NEWLANDER, J. A. en W. H. RIDDELL, J. Animal Sci **11** (1952) 419–421.
130. NIEMAN, C. en H. J. KLEIN OBBINK, Vitamins and Hormones, Vol. **12** (1954) 69–99.
131. NOBILE, S., Int. Ztschrft Vitaminforsch. **25** (1954) 243–252.
132. NORMAN, G. F. en A. MITTLER, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **67** (1948) 104–111.
133. O'BRIEN, B. en K. MORGAREIDGE, J. Nutr. **18** (1939) 277–284.
134. OUTHOUSE, J., J. SMITH, L. MERRID en F. R. WHITE, J. Nutr. **14** (1937) 579–595.
135. PALM, T. A., The Practioner **45** (1890) 270–279.
136. QUERIDO, A., Arch. Néerl. Physiol. **20** (1935) 487–538.
137. RODAHL, K., J. Nutrition **41** (1950) 399–422.
138. ROSENBERG, H. R., Chemistry and physiology of the vitamins. 1945. Intersc. Publ. Inc. New York.
139. ROSS, O. B. en W. D. GALLUP, J. Animal Sci. **8** (1949) 628–629.
140. ROSS, R. H. en C. B. KNODT, J. Dairy Sci. **31** (1948) 1062–1067.
141. RUPEL, I. W., G. BOHSTEDT en E. B. HART, Wis. Agr. Expt. Sta. Res. Bull. **115** (1933).
142. RUSSELL, W. C., J. Biol. Chem. **85** (1929–30) 289–297.
143. RYGH, O., Biochem. Ztschrft **270** (1934a) 227–229.
144. RYGH, O., Nature **133** (1934b) 255.
145. RYGH, O., Research **3** (1950) 577.
146. SCHEUNERT, A., Naturwissenschaften **28** (1940) 297–300.
147. SCHEUNERT, A. en J. RESCHKE, Tierernährung **2** (1931) 262–269.
148. SCHEUNERT, A. en M. SCHIEBLICH, Tierernährung **6** (1934) 112–132.
149. SHERMAN, H. C. en A. M. PAPPENHEIMER, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **18** (1921) 193–197.
150. SMITH, M. C. en I. A. BRIGGS, J. Agr. Res. **46** (1933) 235–240.
151. SOHL, A. T., H. B. BROWN, E. E. CHAPMAN, C. S. ROSE en E. E. SAURWEIN, J. Biol. Chem. **98** (1932) 215–224.
152. SPITZER, R. R., G. MARUYAMA, L. MICHAUD en P. H. PHILIPS, J. Nutr. **35** (1948) 185–193.
153. STEENBOCK, H., E. B. HART, C. A. ELVEHJEM en S. W. KLETZIEN, J. Biol. Chem. **66** (1925) 425–440.
154. SUNDERLIN, G., Am. J. Dis. Children **46** (1933) 786–793.
155. TABOR, F. S., R. A. DUTCHER en N. B. GUERRANT, J. Nutr. **12** (1936) 39–58.
156. TEULON, H., C. MARNAY en H. GOUNELLE, C.R. Soc. Biol. **145** (1951b) 831–834.
157. TEULON, H., C. MARNAY en H. GOUNELLE, C.R. Soc. Biol. **146** (1952) 1546–1548.
158. TEULON, H., R. PAULAIS en H. GOUNELLE, C.R. Soc. Biol. **145** (1951a) 542–544.
159. THOENES, F., Jahrb. Kinderheilk. **131** (1931) 1–48.
160. THOENES, F., Deutsche Med. Wochenschrft **61** (1935) 2079–2081.
161. THOMAS, J. W., J. Dairy Sci. **35** (1952) 1107–1116.
162. THOMAS, J. W. en L. A. Moore, J. Dairy Sci. **34** (1951) 916–928.
163. THOMAS, J. W., M. ORAMOTO en L. A. MOORE, J. Dairy Sci. **37** (1954) 1220–1226.
164. THOMAS, O. O., W. D. GALLUP en C. K. WHITEHAIR, J. Animal Sci. **12** (1953) 372–378.
165. TSCHERNIAK, A. en H. JUCKER, Niet gepubliceerd onderzoek.
166. VERHOEVEN, P. en S. IWEMA, Landbouwgids (1955) 438–441.
167. VEDDER, E. B. en C. ROSENBERG, J. Nutrition **16** (1938) 57–68.
168. WALLIS, G. C., J. Dairy Sci. **18** (1935) 213–228.
169. WALLIS, G. C., J. Dairy Sci. **21** (1938a) 315–333.
170. WALLIS, G. C., J. Agr. Res. **57** (1938b) 393–396.
171. WALLIS, G. C., J. Dairy Sci. **22** (1939) 599–606.
172. WALLIS, G. C., So. Dak. Agr. Exp. Sta. Circ. **53** (1944).
173. WALLIS, G. C., So. Dak. Agr. Exp. Sta. Bull. **372** (1946).
174. WALLIS, G. C., Feedstuffs, 24 Sept. 1949a.
175. WALLIS, G. C., (1949b). Persoonlijke mededeling.
176. WALLIS, G. C., J. Am. Vet. Med. Ass. **120** (1952) 392–396.
177. WALLIS, G. C., C. A. SMITH en R. H. FISHMAN, J. Dairy Sci. **32** (1949c) 715.
178. WALLIS, G. C., C. A. SMITH en R. H. FISHMAN, Ann. Meeting Am. Dairy Sci. Ass. 6-22-49; mimeograph, (1949).
179. WEITS, J., Nature **170** (1952b) 170.

180. WEITS, J., Maandbl. Landbouwvoorl. Dienst **9** (1952a) 238–240.
181. WEITS, J., Landbouwk. Tijdschr. **65** (1953) 592–595.
182. WESTER, J., Tijdschr. Diergeneeskunde **56** (1929) 1205–1228; 1256–1284.
183. WESTER, J., Tijdschr. Diergeneeskunde **58** (1931) 1201–1215.
184. WILLIAMS, R. J., R. E. EAKIN, E. BEERSTECHER Jr en W. SHIVE, The biochemistry of B vitamins. 1950. Reinhold Publ. Corp., New York.
185. WODSAK, W., Fette und Seifen **55** (1953) 118–122.
186. WOLBACH, S. B., J. Bone and Joint Surg. **29** (1947) 171–192.
187. WOLBACH, S. B., Hypervitaminosis A. The Vitamins, Vol. 1 (1954) 106–137. Acad. Press Inc. New York.
188. WOLBACH, S. B. en C. L. MADDOCK, Fed. Proc. **8** (1949) 376.
189. WOOLLEY, D. W., A study of antimetabolites. 1952. Wiley Inc. New York.
190. WORDEN, A. N., J. Comp. Pathol. and Therap. **53** (1943) 190–195.
191. WORK, T. S. en E. WORK, The basis of chemotherapy. 1948. Oliver and Boyd Ltd. London.
192. ZUCKER, T. F. en M. BARNETT, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **20** (1923) 375–378.