

## OVER DE TOEPASSING VAN CHLOROPHYL ALS ANTI-BACTERIËLE STOF

DOOR O. BIRMAN, B. KANTOROWICZ EN A. P. VAN STEENIS  
MEDINOS-PRODENTA-RESEARCHLABORATORIUM, AMERSFOORT

Er wordt naar een verklaring gezocht voor het feit, dat de resultaten van proeven over de bactericide werking van chlorophyl bij de verschillende onderzoekers zo zeer uiteenlopen.

De aandacht wordt gevestigd op de invloed van zichtbaar licht hierbij. Door proeven wordt aangetoond, dat de ontwikkeling van zuur in speeksel-glucose mengsels door toevoeging van chlorophyl alleen dan achteruitgaat, als de gebruikte chlorophylsoort kan fluoresceren en licht aanwezig is.

Over de bactericide en desodoriserende werking van chlorophyl zijn vele publikaties verschenen, waarvan sommige negatieve, andere positieve resultaten vermelden. Men wordt voor de vraag gesteld, hoe het onderzoek zulke tegenstrijdige resultaten kon opleveren.

Het verschil in uitkomst zou gelegen kunnen zijn in de verschillende geaardheid der talrijke handelsprodukten. Onder de naam „chlorophyl” komen n.l. preparaten in de handel, die variërende hoeveelheden chlorophylline, chlorophyllid, isochlorophylline, chlorine, rhodine, phäophytine etc. bevatten en het zou begrijpelijk zijn, als de werking afhankelijk was van de samenstelling<sup>1,3,8</sup>).

Ook het metaal, dat complex gebonden in deze groepen voorkomt, zou van invloed kunnen zijn. Vele handelsprodukten bevatten kopercomplexen. Bij deze kan men ook vrije koperionen verwachten, die een bactericidie kunnen veroorzaken<sup>4</sup>).

Merkwaardig is, dat over een samenhang tussen de eventuele anti-bacteriële eigenschappen van chlorophyl en zijn vermogen een *fotodynamische werking* uit te oefenen, in dit verband in de recente literatuur niets te vinden is. De meeste fluorescerende stoffen, waartoe ook het natuurlijke chlorophyl behoort, zijn n.l. in staat een dergelijk effect te veroorzaken.

Dat fluorescerende stoffen in het licht bij aanwezigheid van zuurstof foto-oxydaties teweeg kunnen brengen, welke anders alleen door bestraling met kortgolvig ultraviolet licht (200—300 m $\mu$ ) worden verkregen, is reeds lang bekend. De student O s c a r R a a b ontdekte in 1897-'98 de fotodynamische sensibilisering van parameciën door zichtbaar licht, welk verschijnsel later in hoofdzaak door T a p p e i n e r en J o d l b a u e r<sup>9</sup>) en B l u m<sup>2</sup>) onderzocht werd. Het schijnt, dat de fluorescerende stof aan het substraat geadsorbeerd wordt. Door het invallende licht kan hij dan voor zeer korte tijd op een hoger energieniveau worden

gebracht. De van straling afkomstige energie wordt aan het substraat doorgegeven, waardoor dit „gesensibiliseerd” en bij aanwezigheid van zuurstof irreversibel geoxydeerd wordt.

De fluorescerende sensibilisator werkt a.h.w. als een lichtaccumulator en kan daardoor een energie afgeven, zoals anders alleen door een veel energierijkere, z.g. ioniserende bestraling zou kunnen gebeuren (kortgolvig U.V.-, Röntgen-, gamma straling).

Belangrijk bij dit proces is, dat de fluorescerende stof meestal zelf weinig verandert, terwijl het gesensibiliseerde substraat irreversibele destructie ondergaat. Daardoor kan het dus, evenals bij Röntgenbestraling, tot een summatie komen, waardoor zeer kleine invloeden, mits dikwijls herhaald, toch een belangrijk gevolg kunnen hebben.

Het fotodynamisch effect kan op deze wijze een anti-bacteriële werking tot gevolg hebben. De sterkte daarvan hangt af van de sensibilisator, de lichthoeveelheid en de zuurstofspanning. Bij aanwezigheid van een goede, vooral van een rood fluorescerende, sensibilisator kan reeds bij zichtbaar licht en bij de zuurstofspanning der lucht een duidelijk waarneembare werking worden verkregen.

Omdat voor chlorophylderivaten een porphyrine-groepering karakteristiek is, mag men de bekende rode porphyrine fluorescentie verwachten. Sommige van de in de handel verkrijgbare chlorophylprodukten fluoresceren dan ook, terwijl andere hun fluorescerend vermogen hebben verloren. Bij preparaten, die de fluorescentie wel vertonen, bestaat daarom de mogelijkheid van het boven beschreven fotodynamisch effect; bij produkten, die niet fluoresceren, kan daarmee ook de bactericidie verdwenen zijn.

#### *Hypothese:*

In verband met het bovenstaande komt men tot de veronderstelling, dat van chlorophylpreparaten alleen dan een oxydatief en eventueel bactericid effect verwacht kan worden, als drie factoren samenvallen, n.l. als:

- a. het preparaat bij U.V. belichting (rood) fluoresceert,
- b. een bepaalde zuurstofspanning aanwezig is,
- c. daglicht of kunstlicht toegang heeft tot het gebied van inwerking.

#### *Opzet der proeven:*

De bedoeling van het onderzoek was, de juistheid van de boven opgestelde hypothese te onderzoeken. Hierbij werd van een techniek gebruik gemaakt, die wij reeds eerder hadden toegepast<sup>5)</sup>, nl. de meting van de zuurvorming in speksel, dat in tegenwoordigheid van glucose 1 uur bebroed wordt. Ditmaal werd de invloed nagegaan van licht op de zuurvorming bij dergelijke proeven, indien resp. fluorescerende en niet fluorescerende chlorophylpreparaten worden toegevoegd.

#### *Werkmethode:*

1. Van een proefpersoon wordt op een tijdstip, dat een zo hoog mogelijke zuurvorming verwacht kan worden, 10 ml speksel genomen

door op paraffine te laten kauwen. Het gunstigste ogenblik is zo laat mogelijk na een maaltijd<sup>7)</sup>. Het speeksel wordt goed gehomogeniseerd<sup>5)</sup>.

2. Men neemt twee reageerbuizen van circa 15 ml inhoud en brengt in elk

- 4 ml speeksel,
- 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oplossing (0,005% in water),
- 2 ml chlorophylopplossing (0,004% in water).

Belichting wordt hierbij zoveel mogelijk vermeden.

3. Eén buis (a) wordt na afsluiten met een rubberstop gedurende een bepaalde tijd en met een bepaalde lichtsterkte belicht, waarbij men haar horizontaal gehouden langzaam zo om haar as laat roteren, dat de afstand tot de lichtbron steeds gelijk blijft. De buis wordt zonodig door middel van een ventilator op kamertemperatuur gehouden.

De andere buis (b) behandelt men analoog, doch geheel in het donker.

4. Direct daarna worden 4 ml mengsel uit elk der buizen a en b gebruikt om de hoeveelheid zuur of alkali te bepalen, die nodig is om de pH op 6,6 te brengen. Verbruik resp. x<sub>a</sub> en x<sub>b</sub> ml 0,01 N alkali per ml speeksel. Indien zuur nodig is, wordt dit gerekend als een negatief alkali verbruik.

5. In elk der buizen a en b wordt aan de overgebleven 4 ml mengsel 2 ml glucose-oplossing (7 $\frac{1}{2}$ %-ig<sup>5)</sup> toegevoegd en goed gemengd. Twee 5 ml flesjes worden, elk met de inhoud van een buis, geheel gevuld gedurende 1 uur onder afsluiting van lucht bij 37<sup>0</sup> C in het donker bebroed.

6. Na de bebroeding wordt de pH van de vloeistoffen uit deze flesjes gemeten en de hoeveelheid zuur of alkali bepaald, die nodig is om 1 ml van het mengsel weer op pH 6,6 te brengen.

Verbruik resp. y<sub>a</sub> en y<sub>b</sub> ml 0,01 N alkali per ml speeksel.

#### Verwerking der resultaten:

De hoeveelheid zuur, die in 1 ml speeksel-glucose mengsel tijdens het bebroeden gevormd wordt, wordt telkens berekend door y (zie punt 6 van bovenstaande werkmethode) te verminderen met x (zie punt 4). (In de tabellen zijn de gevonden getallen met de factor 100 vermenigvuldigd; opgegeven is dus (y-x).100.)

De vermindering der zuurvorming wordt bepaald door telkens naast een blancoproef (B) een proef uit te voeren, waarbij één van de factoren, die op de zuurvorming van invloed zou kunnen zijn, is veranderd (A). De vermindering kan dan berekend worden uit het verschil in zuur, ontstaan in de blancoproef en in de eigenlijke proef.

In de tabellen werd deze waarde uitgedrukt in percenten van de hoeveelheid zuur, gevormd in de blanco proef, d.w.z.  $\left(\frac{B-A}{B} \cdot 100\right)$ .

Onder de tabellen zijn behalve de gemiddelde resultaten ook de fluctuaties aangegeven en wel de „standaardafwijking van de enkele bepaling” en de „standaardafwijking van het gemiddelde”, beide berekend volgens Ontwerp normaalblad V 1047<sup>6)</sup>.

## Opmerkingen bij de werkmethode:

Voor de uitvoering der proeven is tijd nodig tussen het ogenblik, waarop de proefpersoon speeksel levert en de plaatsing van de mengsels in de broedstroof. Er werd daarom nagegaan of de pH gedurende deze tijd verandert. Dit bleek het geval te zijn, omdat uit het speeksel CO<sub>2</sub> ontwijkt, waardoor de pH in het begin aanzienlijk oploopt; later wordt deze weer nagenoeg constant. Daarom is het, om de tijdens de eigenlijke proef gevormde hoeveelheid zuur te kunnen meten, nodig te bepalen, hoeveel alkali de proef vlak voor het bebroeden verbruikt om op pH 6,6 gebracht te worden.

Er werd nagegaan of het *licht zonder sensibilisering* invloed uitoefent op de zuurvorming. Dit bleek zelfs bij een zeer grote lichtsterkte niet het geval te zijn (zie tabel I).

TABEL I

*Invloed van licht op de zuurvorming van een speeksel-glucose mengsel.*

Lichtbron: 1000 Watt lamp.

Lichtintensiteit aan het belichte oppervlak:  $1,0 \cdot 10^5$  erg/sec.cm<sup>2</sup>.

Belichtingstijd: 10 minuten.

Belicht oppervlak: 21 cm<sup>2</sup>.

(De chlorophylline-oplossing werd hier vervangen door gedestilleerd water.)

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times$ 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	81	67	-21
2	107	89	-20
3	90	117	23
4	46	53	13
5	102	102	0
6	75	72	-4
7	75	91	18
8	50	62	19
9	98	87	-13
10	102	115	11

gemiddeld . . . . .	3%
standaardafwijking van de enkelv. bepaling . . . . .	17
standaardafwijking van het gemiddelde . . . . .	6

Een bepaalde *zuurstofspanning* der mengsels was nodig om aan punt b der hypothese te voldoen. Het bleek, dat deze spanning in vers gestimuleerd speeksel te laag is en dat pas na lang staan evenwicht met de luchtzuurstof wordt bereikt. Gedurende deze tijd kunnen ongewenste veranderingen in het speeksel plaats vinden. Wordt echter het bereiken

van dit evenwicht niet afgewacht, dan krijgt men sterk wisselende resultaten, welke onderling niet te vergelijken zijn.

Aan een vaste dosering van de aanwezige hoeveelheid zuurstof door toevoeging van een zeer kleine hoeveelheid waterstofperoxyde oplossing werd daarom de voorkeur gegeven. Het waterstofperoxyde wordt door de in het speeksel aanwezige katalase onmiddellijk in water en vrije zuurstof omgezet. Op deze wijze kunnen alle bepalingen direct en bij een constante zuurstofspanning worden uitgevoerd.

De dosering van het waterstofperoxyde werd zo laag gekozen, dat de bij aanwezigheid van zuurstof onvermijdelijke reductie der zuurvorming<sup>5)</sup> zo gering mogelijk bleef. Uit de blanco proeven blijkt, dat deze toevoeging op zichzelf de zuurvorming niet heeft onderdrukt.

Als chlorophylpreparaten werden uitgezocht een fluorescerend en een niet fluorescerend handelsprodukt. Door de leveranciers waren deze omschreven als resp. „Sodium Chlorophyllin (Uncoppered)” en „Sodium copper chlorophyllin”. De beide soorten hadden de volgende eigenschappen:

	„fluorescerend chlorophyl”	„niet fluorescerend chlorophyl”
oplosbaarheid in 100 g water bij 20°C . . . . .	30 g	30 g
„ „ „ 100 g 96% alcohol bij 20°C	0,65 g	0,45 g
stikstofgehalte . . . . .	5,4%	3,1%
ionogeen gebonden Cu . . . . .	nihil	0,08%
complex gebonden Cu . . . . .	nihil	2,2%
fluorescentie in U.V. licht . . . . .	rood	niet

Van deze chlorophylpreparaten werden de toe te voegen hoeveelheden zo gekozen, dat effecten, welke kunnen optreden bij hogere concentraties — b.v. een mogelijk adsorberend vermogen of een bactericide werking door in het koperderivaat aanwezig ionogeen koper — buiten beschouwing kunnen worden gelaten. Dat de gekozen concentratie zonder belichting geen invloed heeft blijkt uit tabel II.

*Resultaten van het onderzoek:*

De eerste proeven over de invloed van belichting op de twee chlorophylpreparaten werden uitgevoerd met een sterke lichtbron en wel met een 100 Watt lamp. De afstand werd zo gekozen, dat een intensiteit van  $1,0 \cdot 10^5$  erg/sec.cm<sup>2</sup> aan het belichte oppervlak verkregen werd. Als belichtingstijd werd 10 minuten gekozen.

Het bleek, dat bij „fluorescerend chlorophyl” een reductie der zuurvorming waargenomen werd en wel van circa 80%, terwijl „niet fluorescerend chlorophyl” in het geheel geen reductie gaf. Hier wordt dus een zeer duidelijk verschil gevonden tussen de beide chlorophylderivaten (zie tabel III).

TABEL II

*Invloed van de gebruikte chlorophyl-preparaten op de zuurvorming in het donker*  
(Bij B werd de chlorophyloplossing vervangen door gedestilleerd water.)

Proeven met „*fluorescerend* chlorophyl”.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel × 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A met „ <i>fluoresc.</i> chlorophyl.”	B zonder chlorophyl	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	172	168	— 2
2	89	94	5
3	150	146	— 3
4	114	123	7
5	138	151	8
6	113	93	—22
7	114	114	0
8	101	101	0
9	87	97	13
10	115	129	11

gemiddeld . . . . . 2%  
standaardafwijking van de enkelv. bepaling . . . . . 10  
standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 3

Proeven met „*niet fluorescerend* chlorophyl”.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel × 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A met „ <i>niet</i> <i>fluorescerend</i> chlorophyl”	B zonder chlorophyl	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	79	64	—23
2	32	32	0
3	92	78	—18
4	79	82	4
5	100	93	— 8
6	86	89	3
7	81	91	11
8	61	62	2
9	78	87	10
10	103	115	10

gemiddeld . . . . . 1%  
standaardafwijking van de enkelv. bepaling . . . . . 12  
standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 4

TABEL III

Invloed van belichting met een 1000 Watt lamp gedurende 10 minuten op de zuurvorming bij aanwezigheid van chlorophylpreparaten.

Proeven met „fluorescerend chlorophyl”.

Lichtbron: 1000 Watt lamp.

Lichtintensiteit aan het belichte oppervlak:  $1,0 \cdot 10^5$  erg/sec.cm<sup>2</sup>.

Belichtingstijd: 10 minuten.

Belicht oppervlak: 21 cm<sup>2</sup>.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times$ 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	24	73	67
2	12	81	85
3	6	19	68
4	5	70	93
5	— 2	38	106
6	46	110	59
7	17	49	65
8	— 1	22	105
9	8	33	76
10	10	78	87

gemiddeld . . . . . 81%

standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 18

standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 6

Proeven met „niet fluorescerend chlorophyl”.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times$ 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	76	67	—13
2	147	146	— 1
3	48	53	9
4	67	78	14
5	68	65	— 5
6	104	94	—11
7	83	85	2
8	140	132	— 6
9	114	122	6
10	92	81	—14

gemiddeld . . . . . — 3%

standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 10

standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 3

Om na te gaan of ook een zwakkere lichtbron nog een reële reductie der zuurvorming geeft, werden verdere proeven genomen met een T.L. buis (Philips 40 Watt, P 33) op een zodanige afstand, dat een lichtintensiteit van slechts  $4 \cdot 10^3$  erg/sec.  $\text{cm}^2$  aan het belichte oppervlak werd verkregen. De overige condities waren gelijk aan die in de proeven van tabel III.

„Fluorescerend chlorophyl” gaf nog steeds een reductie, thans van 56%, terwijl „niet fluorescerend chlorophyl” weer geen reductie vertoonde (zie tabel IV).

Uit tabel III en IV blijkt al, dat de lighthoeveelheid duidelijk invloed heeft op de reductie van de zuurvorming van speeksel-glucose mengsels in tegenwoordigheid van „fluorescerend chlorophyl”. Om een indruk te krijgen, welk verband er bestaat tussen de lighthoeveelheid en de reductie van de zuurvorming, werden nog verdere proeven genomen met de 1000 Watt lamp en de T.L. buis, waarbij de belichtingstijden verkort werden tot 3 minuten. Gevonden werden reducties van resp. 63% en 42% (zie tabel Va en Vb).

TABEL IV

*Inloed van belichting met een T.L. buis gedurende 10 minuten op de zuurvorming bij aanwezigheid van de chlorophylpreparaten.*

Proeven met „fluorescerend chlorophyl”.

Lichtbron: T.L. buis.

Lichtintensiteit aan het belichte oppervlak:  $4 \cdot 10^3$  erg/sec. $\text{cm}^2$ .

Belichtingstijd: 10 minuten.

Belicht oppervlak: 21  $\text{cm}^2$ .

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times$ 100		Vermindering der zuurvorming in %
	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	92	172	47
2	47	92	49
3	16	70	77
4	44	89	51
5	32	79	60
6	44	150	71
7	64	114	44
8	49	138	64
9	47	113	58
10	73	114	36

gemiddeld . . . . . 56%  
 standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 13  
 standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 4



Over de toepassing van chlorophyl als anti-bacteriële stof

Proeven met „niet fluorescerend chlorophyl”.

Proef No.	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$
1	71	79	10
2	31	32	3
3	81	92	12
4	70	79	11
5	89	100	11
6	89	86	-3
7	84	67	-25
8	165	146	-13
9	57	53	-8
10	60	67	10

gemiddeld . . . . . 1%  
 standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 13  
 standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 4

TABEL Va

Invloed van belichting gedurende 3 minuten op de zuurvorming bij aanwezigheid van „fluorescerend chlorophyl”.

Proeven met de 1000 Watt lamp.

Lichtbron: 1000 Watt lamp.

Lichtintensiteit aan het belichte oppervlak:  $1,0 \cdot 10^5$  erg/sec.cm<sup>2</sup>

Belichtingstijd: 3 minuten.

Belicht oppervlak: 21 cm<sup>2</sup>.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times 100$		Vermindering der zuurvorming in %
	A belicht	B onbelicht	
1	26	101	74
2	23	87	74
3	30	115	74
4	58	97	40
5	44	102	57
6	37	114	68
7	33	105	69
8	38	104	63
9	24	45	47
10	53	145	63

gemiddeld . . . . . 63%  
 standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 14  
 standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 5

TABEL Vb

Involed van belichting gedurende 3 minuten op de zuurvorming bij aanwezigheid van „fluorescerend chlorophyl”.

Proeven met de T.L. buis.

Lichtbron: T.L. buis.

Lichtintensiteit aan het belichte oppervlak:  $4 \cdot 10^3$  erg/sec.cm<sup>2</sup>.

Belichtingstijd: 3 minuten.

Belicht oppervlak: 21 cm<sup>2</sup>.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times 100$		Vermindering der zuurvorming in % $\frac{B-A}{B} \cdot 100$
	A belicht	B onbelicht	
1	9	17	47
2	49	94	48
3	31	53	42
4	35	54	35
5	23	34	32
6	31	42	26
7	44	71	38
8	66	111	41
9	35	94	63
10	18	34	47

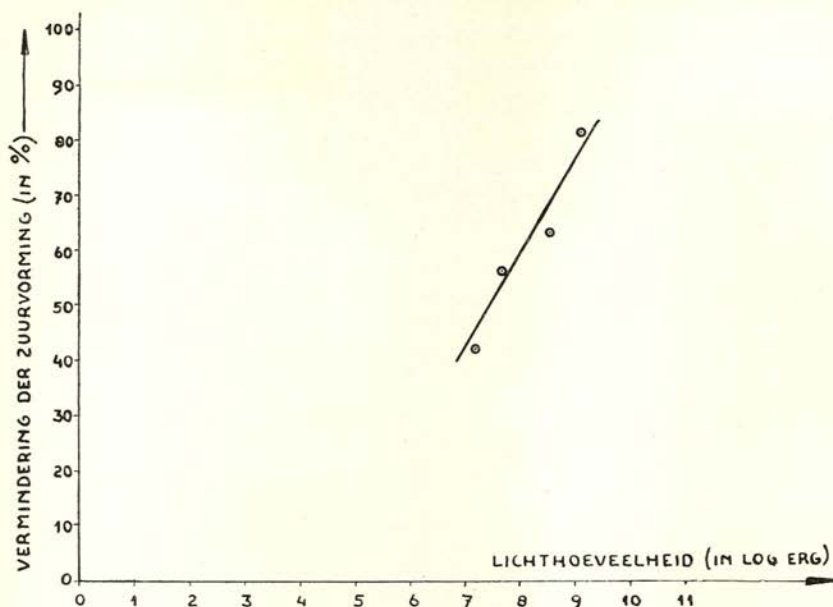
gemiddeld . . . . .	42%
standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . .	10
standaardafwijking van het gemiddelde . . . . .	3

Onder de reeds aangehaalde omstandigheden werden dus met „fluorescerend chlorophyl” de volgende reducties van de zuurvorming verkregen:

lichthoeveelheid (= lichtintensiteit $\times$ tijd $\times$ belicht oppervlak)	reductie van de zuurvorming
$130 \cdot 10^7$ erg	81%
$38 \cdot 10^7$ erg	63%
$5,0 \cdot 10^7$ erg	56%
$1,5 \cdot 10^7$ erg	42%

De samenhang blijkt duidelijk uit de grafiek op pagina 843.

De proeven bij *daglicht* stuiten op de moeilijkheid, dat de lichtintensiteit daarvan zeer wisselend is. Bij steeds dezelfde belichtingstijd werden enige proeven genomen bij zonlicht, bij lichte bewolking en bij zwaardere bewolking. De resultaten bevestigen de verwachtingen (zie tabel VI).



Samenhang tussen lichthoeveelheid en zuurvorming in speeksel-glucose mengsels, bij aanwezigheid van „fluorescerend chlorophyl”

TABEL VI

*Invloed van daglicht gedurende 3 minuten op de zuurvorming bij aanwezigheid van de chlorophylpreparaten.*

Proeven met „niet fluorescerend chlorophyl”.

Proef No.	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel $\times 100$		Vermindering der zuurvorming in %	Belichting
	A belicht	B onbelicht		
			$\frac{B-A}{B} \cdot 100$	
1	54	48	-13	zon
2	85	85	0	„
3	132	156	15	„
4	114	104	-10	„
5	31	33	6	„
6	84	81	-4	„
7	36	37	3	„
8	35	37	5	„
9	77	77	0	„
10	81	77	-5	„

gemiddeld . . . . . 0%  
 standaardafwijking van de enkelvoudige bepaling . . . . . 8  
 standaardafwijking van het gemiddelde . . . . . 2,5

Proeven met „fluorescerend chlorophyl”.

Lichtbron: daglicht.

Belichtingstijd: 3 minuten.

Belicht oppervlak: 21 cm<sup>2</sup>.

	Zuurvorming tijdens bebroeden in ml 0,01 N alkali per ml speeksel × 100		Vermindering der zuurvorming in %	Be- lichting
Proef No.	A belicht	B onbelicht	$\frac{B-A}{B} \cdot 100$	
1	2	94	98	zon
2	5	39	87	„
3	15	79	81	„
4	8	86	91	„
5	7	17	59	licht bewolkt
6	20	53	62	„
7	19	54	65	„
8	13	28	54	„
9	28	49	43	„
10	48	94	49	„
11	19	34	44	zwaar bewolkt
12	69	111	38	„
13	24	34	29	„
14	34	42	19	„
15	58	71	18	„

*Discussie:*

Uit de resultaten blijkt, dat zij de door ons opgestelde hypothese steunen, dat van chlorophylpreparaten alleen dan een oxydatief en eventueel bactericid effect verwacht kan worden, als het preparaat fluoresceert, een bepaalde zuurstofspanning aanwezig is en licht toegang heeft tot het gebied van inwerking. Dat verschillende onderzoekers een bactericide werking van chlorophyl vaststelden en anderen niet, kan dus zijn oorzaak vinden in het gebruik van wel of niet fluorescerende chlorophylsoorten, het wel of niet aanwezig zijn van (lucht)-zuurstof en het uitvoeren van de proeven bij meer of minder sterke belichting.

Ook de tegenstrijdige mededelingen over een desodoriserende werking van chlorophyl hangen misschien met de bovengenoemde factoren samen.

*Samenvatting der resultaten:*

- A. In een speeksel-glucose mengsel vormt zich (ook in tegenwoordigheid van een gering percentage zuurstof) bij bebroeden gedurende 1 uur bij 37°C een bepaalde hoeveelheid zuur.
- B. Toevoeging van 0,001% van een niet fluorescerend chlorophyl preparaat heeft ook bij sterke belichting geen reductie van deze zuurvorming tot gevolg.

*Over de toepassing van chlorophyl als anti-bacteriële stof*

- C. Toevoeging van 0,001% van een fluorescerend chlorophyl preparaat geeft *in het donker* eveneens geen reductie.
- D. Toevoeging van 0,001% van het fluorescerend chlorophyl preparaat geeft daarentegen na *bestraling met zichtbaar licht* (kunstlicht of daglicht) een duidelijke reductie.
- E. De onder punt D genoemde reductie neemt toe met de hoeveelheid bestraling.

Amersfoort, september 1956

*Literatuur:*

1. A m m o n, R. en W o l f f, L.: Hat Chlorophyll eine baktericide bzw. bakteriostatische Wirkung?  
Arzneimittelforschung **5**, 312—14 (1955).
2. B l u m, H. F.: Photodynamic Action, Reinhold, New York, 1941.
3. H e i n, J. W.: Variability of chemical and biologic properties of various water-soluble chlorophyll derivatives.  
Journal D. Res. **32**, 700 (1953).
4. H e i n, J. W.: Effect of coppersulfate on initiation and progression of dental caries in the Syrian hamster.  
Journal D. Res. **32**, 654 (1953).
5. K a n t o r o w i c z, B. en B i r m a n, O.: Acid production in saliva in relation to air contact.  
Journal D. Res. **32**, 601—5 (1953).
6. Weergeven van waarnemingsreeksen, Ontwerp V 1047.  
W a l t m a n Delft 1951.
7. O s t r o l e n k, M; W e i s s, W; E d e l s o n, H. en F r i e d l b e r g, S.: The influence of „Oral antiseptics” on the number of bacteria washed out of the mouth as measured by a rinse technique.  
J. A. Pharm. Ass. **42**, 200 (1953).
8. S t r e l l, M; K a l o j a n o f f, A. en Z u t h e r, F.: Zur Analytik von Chlorophyll-Präparaten.  
Arzneimittelforschung **5**, 640—2 (1955).
9. T a p p e i n e r, H. v. en J o d l b a u e r, A.: Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen,  
T.C.W. Vogel, Leipzig 1907.