Afdeling Microscopie 1984-05-30

RAPPORT 84.52 Pr.nr. 505.0020

Onderwerp: Het aantonen van de aanwezigheid van Solanum nigrum (zwarte nachtschade) in monsters snijmaiskuilvoeder

Verzendlijst: direkteur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. Microscopie (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (De Jong), afd. Toxicologie, CVB Lelystad, afd. Koolhydraat-/Vetchemie (Muuse), sektormap Produktkwaliteit.

8452

Afdeling Microscopie 1984-05-30

RAPPORT 84.52 Pr.nr. 505.0020

Projekt: Ontwikkeling van microscopische en andere optische onderzoekmethoden voor diverse landbouw- en visserijprodukten

Onderwerp: Het aantonen van de aanwezigheid van Solanum nigrum (zwarte nachtschade) in monsters snijmaiskuilvoeder.

Doel:

Het aantonen van bestanddelen van nachtschadeplanten (Solanum nigrum) in monsters snijmaiskuilvoeder door middel van microscopisch onderzoek.

Samenvatting:

Uit de literatuur werden gegevens verzameld over Solanum nigrum, zoals het voorkomen, de morfologie van de plant en het zaad, de toxinen in deze planten en de toxiciteit hiervan voor het vee.
In een vijftal monsters snijmaiskuilvoeder werd door middel van microscopisch onderzoek nagegaan of Solanum nigrum aantoonbaar was.

Conclusie:

De aanwezigheid van het zwarte nachtschadeplanten (S.nigrum) in monsters snijmaiskuilvoeder is vast te stellen door het isoleren en identificeren van de zaden van deze planten. Hoewel in de literatuur vaak gesproken wordt over een solanine- en/of solanidinevergiftiging door S.nigrum, blijkt echter dat deze alkaloiden in deze plant niet voorkomen. Wel komen o.m. de alkaloiden solasonine en solamargine voor. Wanneer de aanwezigheid van S.nigrum in een monster is vastgesteld, is het wenselijk om een kwantitatief chemisch onderzoek in te stellen naar het gehalte aan totaal alkaloiden en/of de alkaloiden solasonine en solamargine.

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong
Medewerkers/Samenstellers: drs W.J.H.J. de Jong, V.G.Z. Pinckaers
Projektleider: drs W.J.H.J. de Jong

1. Inleiding

Bij rundvee, dat gevoederd was met snijmaiskuilvoeder, waarin zich vermoedelijk een vrij grote hoeveelheid zwarte nachtschadeplanten (Solanum nigrum) bevond, traden binnen één week de volgende ziekteverschijnselen op: grote lusteloosheid, weinig of geen eetlust, ernstige diarree in de meest extreme vorm en ademhalingsmoeilijkheden. De produktie daalde sterk wisselend, van bijna volledig uit produktie tot 70 à 80%. In een later stadium traden verlammingsverschijnselen op, verder te vroeg afkalven en moeilijkheden met de nageboorte. Bij onderzoek van bloedmonsters bleken de dieren sterke bloedarmoede te hebben. Na het staken van de voedering en overschakeling op perspulp en andere snijmais verliep het herstel langzaam. De produktie bleef na ± 2 maanden nog duidelijk achter bij voorgaande jaren (persoonlijke mededeling).

De bovengenoemde ziekteverschijnselen komen overeen met die, welke in de literatuur genoemd worden bij een intoxicatie van solanine (2,7,8). De betrokken veehouder wilde de schade op de leverancier van het voeder verhalen. De verzekeringsmaatschappij van deze leverancier was echter van mening, dat het hier slechts een vermoeden betrof en dat het bewijs, dat S.nigrum in het voeder aanwezig was, nog geleverd diende te worden.

Door de veehouder werd derhalve via het Centraal Veevoederbureau in Lelystad het verzoek aan het RIKILT gericht om een aantal monsters snijmaiskuilvoeder te onderzoeken op de aanwezigheid van bestanddelen van Solanum nigrum (zwarte nachtschade).

Om echter S.nigrum in snijmais te kunnen identificeren dient men de morfologische verschillen tussen beide planten te kennen.

Verder is het interessant om na te gaan welke alkaloiden in S.nigrum voorkomen. Hiertoe werd de bestaande literatuur geraadpleegd.

2. Enkele gegevens uit de literatuur over Solanum nigrum L.

2.1 Voorkomen

Solanum nigrum (zwarte nachtschade) behoort tot de nachtschadeachtigen (fam. Solanaceae). Deze familie omvat ca. 2200 soorten en staat bekend om het hoge gehalte aan giftige alkaloiden (8). S.nigrum komt vaak voor op ruderale plaatsen, op bouwland, in moestuinen en langs wegen (5).

De laatste jaren treedt de plant weer sterk op de voorgrond. Bij continuteelt van snijmais kan S.nigrum een hinderlijk onkruid zijn. Vooral bij de late opkomst van het gewas kan S.nigrum zich sterk ontwikkelen. De zaden blijven jarenlang kiemkrachtig en zaaien zich sterk uit (3).
Ook bij bieten kan S.nigrum problemen geven, wanneer de zaaidatum naar begin mei wordt verschoven. Vroeg gezaaide bieten hebben veel minder last, omdat dan de parapluwerking van het bietenblad de kieming van S.nigrum tegenhoudt (4).

2.2 Beschrijving van de plant

S.nigrum is een éénjarige plant, die een hoogte van 10 tot 70 cm berijkt. Ze bloeit van juni tot oktober. De stengels zijn rechtopstaand, kaal of weinig behaard en vooral naar boven hoekig. De bladeren zijn eirond tot bijna driehoekig, die bochtig getand kunnen zijn. De bloeiwijze is scherm-trosvormig. De bloemkroon meestal klein, wit en stervormig. De bes is groen en bij rijpheid zwart met een doorsnede tot 1 cm (5,8).

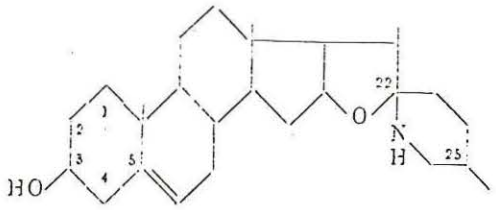
2.3 Beschrijving van het zaad

De zaden van S.nigrum zijn 1,6 tot 2 mm lang, 1,2 tot 1,4 mm breed en 0,6 mm dik. Ze zijn eivormig of scheefeivormig tot rond met een kleine inbochting onder de punt, waar zich de navel bevindt.
De punt van het worteltje is uitwendig te zien. Het oppervlak is grijsgeel, mat en vertoont een netwerk van kleine putjes (1,6).

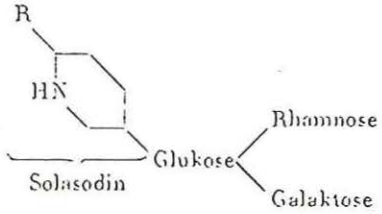
2.4 Toxinen

Het bekendste glycoalkaloide van het genus Solanum - het solanine - werd in 1820 door Desfoss in S.nigrum ontdekt. Bij het onderzoek naar de struktuur van solanine in S.nigrum werd rond 1955 vastgesteld, dat "solanine" uit S.nigrum voor het belangrijkste deel uit solasonine (= γ-solanigrine) en α-solamargine (= δ-solanigrine) bestaat.
Verder komen nog 4 andere alkaloidglycosiden in een geringere hoeveelheid voor (8).
Bij deze glycoalkaloiden zijn de koolhydraten glycosidisch aan een basisch aglycon gebonden. Een enzymatische splitsing vindt plaats door zeer specifieke glycosidasen.

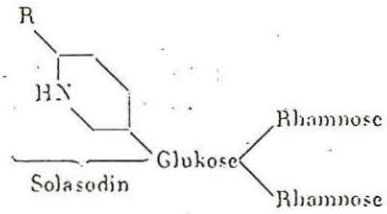
Gemeenschappelijk bij de genoemde glycosiden is het aglycon solanigridine, dat als solasodine 22 a, 25D-spirozoleen-5-3β-ol kan worden geidentificeerd.



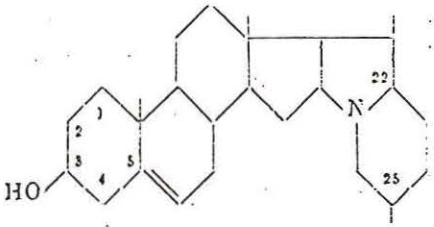
In solasonine komen 3 suikers voor, L-rhamnose, D-glucose en D-galactose.



In α-solamargine twee moleculen L-rhamnose en een molecuul D-glucose.



Het in zeer geringe hoeveelheden voorkomende ε-solanigrine bevat slechts twee moleculen suiker (L-rhamnose en D-glucose). In aardappels en andere nachtschadeachtigen bevindt zich hoofdzakelijk het glycoalkaloide α-solanine. Hiervan heeft het aglycon het solanidine (25 L-solanideen-5-3β-ol) de formule:



Het alkaloidgehalte van S.nigrum schijnt samen te hangen met de grondsoort, het klimaat en het jaargetijde (2). De vorming van alkaloiden zou door zonlicht bevorderd worden (8). Het gehalte aan totaal alkaloiden (TAG) in S.nigrum varieert in de bladeren van 0 tot 1,1% berekend op de droge stof.

De stengeldelen zouden een laag alkaloidgehalte hebben. In de onrijpe bessen werd een gehalte tot 1,6% solasodine vastgesteld (8). De hoeveelheid "solanine" + solasodine in S.nigrum kan varieren van 27 tot 1100 mg per kg (3). Waarschijnlijk wordt S.nigrum door inkuilen met snijmais of andere gehakselde produkten niet ontgiftigd (7).

2.5 Bepalingsmethoden

In de literatuur worden diverse bepalingsmethoden voor de vaststelling van het gehalte aan alkaloiden in S.nigrum beschreven. Het kan o.a. plaats vinden met behulp van ionenwisselaars. Verder bestaat er een colorimetrische methode, een micromethode voor salosodine, een micromethode voor alkaloiden met silicomolybdeenzuur en een alkaloidbepaling met Tropaeolin 00 (8).
Mogelijk kan ook HPLC voor de bepaling van het alkaloidgehalte worden toegepast.

2.6 Toxiciteit

Diverse vergiftigingen van huisdieren door het voederen met S.nigrumplanten zijn bekend. Runderen schijnen gevoeliger te zijn dan schapen. Onder invloed van het maagsap komt uit het glycoside de base "solanine" vrij. Het werkt haemolytisch. Het heeft een prikkelende werking op de slijmhuid. Grote hoeveelheden leiden tot speekselen, stomatitis en hardnekkige diarree. Verder mogelijk tot ademhalingsstoornissen en hartstilstand. Ook eczeemachtige huidveranderingen werden bij runderen en varkens waargenomen (8).
Volgens Stählin bestaan de vergiftigingsverschijnselen uit diarree, slechte eetlust, dorstgevoel, zwakheid, evenwichtsstoringen tot krampen, die de dood tot gevolg hebben.
Deze verschijnselen werden waargenomen bij het vervoederen van een groenvoeder met 4 tot 35% S.nigrum (wat overeenkomt met 2 tot 25 g "solanine" per 100 kg groenvoeder (7).
Corporaal beschrijft de volgende vergiftigingsverschijnselen: braken, koorst en diarree. De dieren worden slap, kortademig en gaan speekselen. Bij hogere doses treden maag-darmontstekingen, leverontsteking en bloedarmoede op, tenslotte raakt het centrale zenuwstelsel verlamd en via ademnood en hartstilstand treedt de dood in (3).

Naast het alkaloidgehalte schijnt ook het hoge gehalte aan nitraat in S.nigrum tot vergiftiging te kunnen leiden.
Dit nitraat, dat in het dier o.a. tot nitriet gereduceerd wordt, kan aanzienlijke hoeveelheden van het haemoglobine tot haemiglobine omvormen. Onder deze omstandigheden zijn nachtschadevergiftigingen als nitraatvergiftigingen te verklaren. Vanzelfsprekend kunnen de door het nitraat veroorzaakte schade dan secundair door het haemolytisch werkende alkaloid versterkt worden (8).

3. Het microscopisch onderzoek

3.1 Monstermateriaal

In verband met de vermoedelijke aanwezigheid van S.nigrumplanten in een snijmaiskuil werden een 5-tal monsters snijmaiskuilvoeder, genomen door het Bedrijfslaboratorium "Mariëndaal" te Oosterbeek, voor onderzoek aangeboden.

3.2 Methoden van onderzoek

a. Het monstermateriaal werd in een mengbak in een dunne laag uitgespreid. Vervolgens werden met behulp van een stereomicroscoop (vergroting ca. 20 maal) en een pincet de bestanddelen geisoleerd, die vermoedelijk niet van snijmais afkomstig waren.

b. Het monstermateriaal werd in kleine hoeveelheden gebracht op een zeef met ronde gaten met een ϕ van 3 mm.
Onder deze zeef bevond zich een zeef met een maaswijdte van 0,5 mm. Met behulp van een harde waterstraal werd het monstermateriaal gedurende enige tijd behandeld. Het residu dat op de tweede zeef achterbleef werd vervolgens overgebracht in een bekerglas van 2 l. Het bekerglas werd gevuld met water, omgeroerd en vervolgens na enige tijd gestaan te hebben werd het bovenste 1/3 deel van de vloeistof met de daarin zwevende deeltjes afgeschonken. Deze bewerkingen werden enige malen herhaald, totdat nog slechts weinig zwevende delen in het bovenste deel van het bekerglas overbleven.
De eventueel aanwezige zaden van S.nigrum bevonden zich in de onder in het glas achterblijvende brij. Het bovenstaande water werd daarna zoveel mogelijk afgegoten en het residu op een zeefgaas (maaswijdte 100 µm) gebracht.

Na uitlekken werd het residu op een groot voorwerpglas van ca. 5 x 10 cm gebracht. Met behulp van een stereomicroscoop (vergroting ca. 20 maal) en een pincet werden de zaden van S.nigrum uit het residu uitgezocht. Identificatie van de zaden werd uitgevoerd door vergelijking van de gevonden zaden met de in de onkruidzadencollectie voorkomende S.nigrumzaden e.a. zaden van diverse nachtschadeachtigen, zoals S.dulcamara (bitterzoet), S.trifolium (driebloemige nachtschade), S.lycopersicum (tomaat) en S.tuberosum (aardappel).

3.3 Resultaat en discussie

a. Bij het onderzoek van het monstermateriaal werden diverse houtige stengeldelen, die mogelijk afkomstig zouden kunnen zijn van S.nigrum, geisoleerd. Voor wat betreft de identificatie van bladbestanddelen bleek het monstermateriaal te fijn gehakseld te zijn. Tussen de parallelnervige bladdelen van mais waren de handnervige bladdelen van S.nigrum niet meer terug te vinden.

b. Bij het isoleren van de zaden in de vijf monsters werden resp. 40, 65, 42, 74 en 57 Solanum nigrumzaden gevonden. Het aantal gevonden zaden geeft nog niet veel informatie over de mate van besmetting van de maiskuil met S.nigrum. Eén nachtschadeplant levert gemiddeld wel 500 zaden op (4). De bloei duurt van juni tot september. Na de bloei worden bessen gevormd. Bij het oogsten van de mais zal het grootste gedeelte van deze bessen reeds afgevallen zijn.
Het is daarom gewenst om - wanneer de aanwezigheid van S.nigrum is vastgesteld - een kwantitatief chemisch onderzoek te verrichten naar het gehalte aan totaal alkaloiden (TAG) en/of de alkaloiden solasonine en solamargine in het kuilvoer.

5. Conclusie

De aanwezigheid van zwarte nachtschadeplanten (S.nigrum) in monsters snijmaiskuilvoeder is vast te stellen door het isoleren en identificeren van de zaden van deze planten.
Hoewel in de literatuur vaak gesproken wordt over een solanine- en/of solanidinevergiftiging door S.nigrum, blijkt echter dat deze alkaloiden in deze plant niet voorkomen. Wel komen o.m. de alkaloiden solasonine en solamargine voor.

Wanneer de aanwezigheid van S.nigrum in een monster is vastgesteld, is het wenselijk om een kwantitatief chemisch onderzoek in te stellen naar het gehalte aan totaal alkaloiden en/of de alkaloiden solasonine en solamargine.

6. Literatuur

1. Brouwer, W., Stählin, A.:
   "Handbuch der Samenkunde", 2. Auflage, Frankfurt (Main), DLG Verlag (1973) p. 500.
2. Clarke, Myra L., Harvey, D.G., Humpreys, D.J.:
   "Veterinary Toxicology", 2th edition, London, Ballière Tindall (1981) p. 253.
3. Corporaal, J., Davids, W., Van Gelder, W.M.J.:
   "Zwarte nachtschade in mais kan gevaarlijk zijn", Boerderij 69 (1983) no. 1, p. 45.
4. Glas, H.:
   "Zwarte nachtschade, een giftig en vooral in mais een lastig onkruid", Boerderij 69 (1984) No. 25, p. 48-49.
5. Heukels, H., Van der Meijden, R.:
   "Flora van Nederland", 20e druk, Wolters Noordhoff, Groningen (1983) p. 332.
6. Martin, A.C., Barkley, W.D.:
   "Seed Identification Manual", second printing, Berkeley and Los Angeles, University of California Press (1973) p. 196.
7. Stählin, A.:
   "Der Beurteilung der Futtermittel" 2. Teil, Methodenbuch Band XII, Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik, Radebeul und Berlin, Neumann Verlag (1957) p. 534.
8. Wiesner, E.:
   "Ernährungsschäden der landwirtschaftlichen Nutztiere", Jena, VEB Gustav Fischer Verlag (1967) p. 137-144.