

# RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION VOOR VEEVOEDERONDERZOEK.

## De stand van het mosterdolievraagstuk

DOOR

Ir. G. B. VAN KAMPEN.

In de praktijk der Rijkslandbouwproefstations heeft de beoordeeling van raapkoek, koolzaadkoek en dergelijke produkten, in het bijzonder de beantwoording van de vraag welk verband er bestaat tusschen mosterdoliegehalte en schadelijke werking, alsmede de juiste bepalingwijze van dat gehalte, steeds vele moeilijkheden opgeleverd.

Eensdeels waren deze moeilijkheden van zuiver chemischen aard: aan den anderen kant vloeiden zij voort uit het feit, dat betrekkelijk weinige gevallen, waarin eene nadeelige werking als vermoedelijk gevolg van het voeren van schadelijke koeken was opgetreden, ter kennis van de proefstations gebracht werden. Daardoor ontbrak voor deze inrichtingen grootendeels de gelegenheid om zich op dit gebied te oriënteren en in het bezit te komen van analysemateriaal, dat waardevolle gegevens had kunnen opleveren.

Alleen bij gevallen met doodelijken afloop en wanneer de hulp van een veearts was ingeroepen, werden, gewoonlijk op initiatief van dezen laatste, een enkele keer monsters van het verdachte voer ten onderzoek opgezonden. Er bleek dan gewoonlijk, dat de verdachte koeken na toevoeging van wit mosterdzaad en water, een ongewoon sterken reuk naar mosterdolie ontwikkelden.

Ook de herkenning van verschillende brassica-soorten, die eene aanwijzing in de gewenschte richting kan geven, levert, wegens de geringe verschillen in microscopische structuur, soms moeilijkheden op, terwijl het verkrijgen van authentieke zaadmonsters zeer bezwaarlijk is.

De moeilijkheid van de beoordeeling wordt nog verhoogd doordat men in de praktijk van de veevoeding te maken krijgt met de verschillende gevoeligheid van verschillende individuen voor bepaalde invloeden.

Aan het sedert 1 Mei 1916 opgeheven Rijkslandbouwproefstation te Wageningen heb ik mij met het vraagstuk van de gevaarlijkheid van mosterdoliehoudende koeken bezig gehouden. Aan bedoeld proefstation bestond hiertoe gereede aanleiding daar voornamelijk in het ressort van dit proefstation veel raapkoek

209555

wordt vervoerd. Van de gedurende het tijdvak 1 Juni 1914—1 Juni 1915 aan de gezamenlijke proefstations onderzochte monsters raapkoek, n.l. 196, een hoeveelheid vertegenwoordigende van ruim  $1\frac{1}{4}$  miljoen K.G. raapkoek, werden alleen te Wageningen 109 monsters ingezonden.

Tengevolge van de opheffing van het Rijkslandbouwproefstation aldaar heb ik dit onderzoek moeten afbreken. Ofschoon de beschikking over meerdere gegevens noodig is om het trekken van scherpe conclusies mogelijk te maken, (welke gegevens eerst na het in gebruik stellen van het nieuwe R.L.P. voor veevoederonderzoek verzameld zullen kunnen worden), achtte ik de thans reeds verkregen resultaten van voldoende belang om medegedeeld te worden, aangezien m.i. een aanvulling en wijziging van het onderzoek aan het veevoederstation wenschelijk is.

In het jaar 1898 werd door Sjollem a<sup>1)</sup> melding gemaakt van door raapkoek veroorzaakte vergiftigingsgevallen bij schapen, welke hem aanleiding gaven hieromtrent een nader onderzoek in te stellen. Daartoe vergeleek hij o.a. de mosterdolie<sup>2)</sup> die door hem verkregen werd uit koeken, geperst van zaden van *brassica nigra* (zwarte mosterd) en uit zaden van *brassica napus*, waarbij hij de volgende verschillen in eigenschappen constateerde. De aetherische olie, die zich na toevoeging van wit mosterdzaad uit *brassica napus* ontwikkelde, had een veel minder prikkelenden reuk dan de aetherische olie, welke uit *brassica nigra* werd verkregen, terwijl die reuk ook veel korter bleef bestaan. Bovendien dreef de eerste olie op water, terwijl de uit *brassica nigra* gevormde allylmosterdolie in water zinkt. De eerste kon dus niet identisch zijn met de laatste.

Door verdere onderzoekingen<sup>3)</sup> toont Sjollem a dan aan dat de olie uit *brassica napus* is de krotonylmosterdolie. (kookpunt  $\pm 174^{\circ}$  C.). Hij trekt dan ook reeds de conclusie dat de kwantitatieve mosterdoliebepaling voor de beoordeeling van de schadelijkheid van raapkoek niet voldoende is en dat de beoordeeling volgens de reukproef de voorkeur verdient. Op voorstel van Sjollem a werd dan ook in 1899 besloten de reukproef naast de kwantitatieve bepaling van de mosterdolie in te voeren. De reuk werd waargenomen na  $\frac{1}{4}$ , 6, 12 en 24 uur, waartoe de tot poeder gebrachte koek in Erlenmeijer kolven met en zonder toevoeging van een weinig wit mosterdzaad met lauw water werd overgoten. Zooals we echter later, bij het vermelden van de onderzoekingen van Jørgensen, zullen zien, kan de toepassing van de reukproef zonder meer, op een dwaalspoor leiden.

De kwantitatieve bepaling geschiedde door gedurende 7 uur een luchtstroom te leiden door een mengsel van 15 gram koek

1) Nederlandsch Landbouw-Weekblad, 15 Januari 1898.

2) Ned Tijdschrift voor Pharmacie, Chemie en Toxicologie, 1899.

3) Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 20, p. 338.

+ 4 gram wit mosterdzaad + 200 c.c. water, dat in een waterbad op 50° C. werd gehouden. De ontwikkelde mosterdolie werd opgevangen in twee achter elkaar staande kolfjes met alkalische kaliumpermanganaatoplossing. Na 7 uur werd op het kokende waterbad onder doorleiden van stoom nog gedurende  $\frac{3}{4}$  uur afgedestilleerd. Uit de gevonden hoeveelheid zwavelzuur werd het gehalte aan mosterdolie berekend.

Daar uit het onderzoek van Sjollemå blijkt, dat verschillende brassicasoorten verschillende mosterdoliën met groot verschil in eigenschappen opleveren, is dus ook het vaststellen van de brassicasoort door het microscopisch onderzoek van veel belang.

In het jaar 1900 werd, voornamelijk naar aanleiding van de publicaties van Jørgensen, besloten, de kwantitatieve bepaling te laten vervallen, indien noch met, noch zonder wit mosterdzaad na 6 uren een mosterdoliereuk van beteekenis was waar te nemen. Was de reuk twijfelachtig of sterk, dan zou de kwantitatieve bepaling\* ook nog uitgevoerd worden. Zou er zonder wit mosterdzaad *geen* reuk, doch *met* wit mosterdzaad *wel* een reuk optreden, dan zou bij den uitslag van de analyse vermeld worden dat bij voeding van de onderzochte raapkoek *alleen*, of met neutraal ander voeder, *geen* gevaar bestond, dat echter de mogelijkheid van schadelijke werking *wel* bestond bij voeding met andere raapkoek samen.

Ten aanzien van de afrekening in verband met mogelijke schadelijke werking werd in October 1903 bepaald om op grond van het mosterdoliegehalte niet te weigeren, doch aan den kooper te adviseeren 25 pct. van de koopsom voorloopig in te houden wanneer het mosterdoliegehalte 0,4 pct. overschreed en af te rekenen nadat de koecken vervoederd waren. De zuiverheid werd dan, wegens het overschrijden van de vastgestelde grens van 0,4 pct., onvoldoende genoemd. Tevens werd op het analyseverslag de volgende waarschuwing gegeven: „De hoeveelheid mosterdolie, die zich ontwikkelt uit het door U ingezonden monster koolzaadkoek/raapkoek is hooger dan normaal. Ofschoon het onzeker is dat deze raapkoek daardoor schadelijk zal zijn voor het vee, zal eenige voorzichtigheid bij het voederen toch wel gewenscht zijn, vooral bij drachtig en zoogend vee.”

Begin 1908 werd besloten alleen de reukproef uit te voeren, zoodat de kwantitatieve bepaling kwam te vervallen. Viel de reukproef positief uit, dan zou de inzender onmiddellijk gewaarschuwd worden. Het bleek echter al spoedig, dat deze wijze van beoordeeling niet gehandhaafd kon blijven. Bij de toepassing van de reukproef toch had men herhaaldelijk moeilijkheden. Zelfs de personen, die het onderzoek geregeld uitvoerden, ondervonden dikwijls moeite met de beoordeeling van den reuk. Aangenaam was de uitvoering dezer methode zeker niet, in het bijzonder niet als het aantal te onderzoeken monsters raapkoek groot was. Een meer objectieve methode was zeker gewenscht. Einde 1910 werd daarom besloten een aan het proefstation te Groningen

uitgewerkte methode in te voeren. Deze berust op de waarnemingen van Dieterich en Gadamèr dat de mosterdolie, in aanraking met ammoniakale zilvernitraatoplossing, onmiddellijk ontleed wordt onder vorming van  $\text{Ag}_2\text{S}$ .

Het door Groningen gegeven voorschrift luidt als volgt: „In een kolf met niet te dunnen wand wordt 10 gram gemalen raapkoek met  $\pm 4$  gram fijngemaakt wit mosterdzaad gebracht en 200 c.c. water toegevoegd. De kolf, welke geplaatst wordt in een waterbad van ongeveer  $50^\circ \text{C}$ . wordt door een glazen buis in verbinding gebracht met een glazen cylinder, waarachter nog een tweede cylinder is geplaatst.

In ieder der twee glazen cylinders wordt 35 c.c. ammoniakale zilvernitraatoplossing gebracht, bereid door 50 c.c.  $\text{AgNO}_3$  (bevattende  $2\frac{1}{2}$  gram  $\text{AgNO}_3$  per liter) en 20 c.c. geconcentreerde ammoniak te mengen.

Nu wordt gedurende 5 à 6 uur lucht doorgezogen bij  $50^\circ \text{C}$ . en daarna nog  $\frac{1}{2}$  à 1 uur terwijl het waterbad op kooktemperatuur is gebracht. De snelheid waarmede de lucht wordt doorgezogen, wordt zóó geregeld, dat de luchtbellèn in de cylinders bijna zijn te tellen, het laatste uur echter wat vlugger, zoodat er wat vloeistof overgaat in de cylinders. Na afloop wordt de inhoud van beide cylinders in een Erlenmeyer-kolf gebracht, onder omschudden even tot koken verhit en warm gefiltreerd. In het filtraat wordt nagegaan of een overmaat aan zilvernitraat aanwezig is of dat nog mosterdolie met zilvernitraat kan worden aangetoond. De te gebruiken hoeveelheid  $\text{AgNO}_3$  is zoo groot genomen, dat ze bijna beantwoordt aan de hoeveelheid mosterdolie, die als nadeelig te beschouwen is (0,4 pct.).

Berekent men met welke hoeveelheid allylmosterdolie de in dit voorschrift opgegeven hoeveelheid  $\text{AgNO}_3$  overeenkomt, dan vindt men slechts 0,32 pct.  $\text{C}_3\text{H}_5\text{CNS}$ . Dat komt omdat de hoeveelheid  $\text{AgNO}_3$  empirisch vastgesteld is; de methode is dan cok slechts benaderend. Zoo blijft er, omdat niet met stoom gedistilleerd wordt, steeds eenige mosterdolie in de kolf terug.

Alleen wanneer de uitkomst van deze proef een overmaat mosterdolie aanwees, werd tevens een reukproef gedaan en als deze eveneens positief uitviel, werd tot waarschuwen op het analyseverslag overgegaan. Deze reukproef werd op de volgende wijze uitgevoerd:

Men brengt in een Erlenmeyer-kolf van 300 c.c. 5 gram van het monster, één gram fijngemaakt wit mosterdzaad en 100 c.c. water. Het kolfje wordt met een kurk gesloten en in een waterbad van  $50^\circ \text{C}$ . geplaatst. Elk uur wordt gedurende 5 minuten lucht door de vloeistof geblazen en geroken. Nadat 5 uur zijn verlopen blaast men zóólang lucht door ( $\pm 15$  minuten) tot geen mosterdolie meer is te ruiken. Dan plaatst men het kolfje opnieuw één uur in het waterbad, blaast weer lucht door en constateert daarbij of nog mosterdolie is te ruiken. Dit resultaat wordt ge-

noteerd als positief ook al is slechts een uiterst zwakke reuk waar te nemen.

Wanneer men nu weet dat een groot gedeelte van de raapkoek die vervoederd wordt, geheel of gedeeltelijk geslagen is uit z.g. Indisch zaad, d.w.z. uit brassicasoorten met een hoog gehalte aan mosterdolie, dan kan het geen verwondering wekken, dat de door het college van directeuren vastgestelde grens van 0,4 pct. herhaaldelijk werd overschreden en evenzoovele malen de waarschuwing op het analyseverslag werd geplaatst. Dat door het herhaalde waarschuwen onder de boeren ten opzichte van raapkoek eenig wantrouwen ontstond behoeft geen betoog, evenmin dat sommige fabrikanten van raapkoek hierdoor schade ondervonden, zooals blijkt uit hunne klachten over de veelvuldige waarschuwingen.

Het kan ook niet ontkend worden, dat de proefstations, in hun ijver om voor de belangen van den boer te waken, het waarschuwen tegen mosterdolie, als gevolg van een te laag gestelde grens, wel wat overdreven hebben, waardoor het gevaar niet denkbeeldig werd dat het gebruik van een overigens goed en betrekkelijk goedkoop voedermiddel sterk zou verminderen.

Met ingang van 6 Maart 1914 werd dan ook de grens van het toegelaten mosterdoliegehalte gebracht van 0,4 pct. op 0,6 pct. Gelijkzeitig kwam de waarschuwingsstrook, die op de analyseverslagger werd gehecht, te vervallen. Van genoemden datum af wordt alleen gewaarschuwd bij afzonderlijk schrijven, dat luidt:

„De hoeveelheid mosterdolie, die zich uit het door U op (datum) ingezonden monster raapkoek kan ontwikkelen is hooger dan men in den regel als normaal beschouwt. Hieruit volgt niet onmiddellijk, dat deze raapkoek bij vervoeding schadelijk zal blijken, doch eenige voorzichtigheid hierbij, vooral bij drachtig en zoogend vee, zij aanbevolen.

Indien zich na de voeding met deze raapkoek bijzondere verschijnselen bij het vee voordoen, dan zal ik hiervan gaarne bericht ontvangen.”

Deze waarschuwing werd dus *alleen* verzonden, indien de AgN O<sub>3</sub>-proef een overmaat van mosterdolie aantoonde en *levens* bij de reukproef na 6 uur nog een reuk naar mosterdolie was waar te nemen.

In de waarschuwing is, in tegenstelling met de vroegere, alleen sprake van raapkoek en wordt koolzaadkoek niet meer genoemd. In deze laatste wordt van bovengenoemden datum af geen mosterdolie meer bepaald. Dit houdt verband met de in den codex voedermiddelen gegeven omschrijving van dit laatste produkt, t.w.: „Koolzaadkoek en de daarmee gelijkgestelde produkten, moeten bereid zijn uit zaden, behoorende tot de soorten brassica rapa of brassica napus, resp. tot variëteiten dezer soorten,” en verder met de meening dat deze soorten een laag gehalte van een weinig gevaarlijke mosterdolie bezitten. In hoeverre deze meening geheel juist is te achten, zal hieronder nog nader worden besproken.

Door Jørgensen <sup>1)</sup> is een nader onderzoek naar de uit raapkoeken verkregen mosterdoliën en naar de beteekenis van het chemisch onderzoek ter vaststelling van de schadelijke eigenschappen van die koeken, verricht.

Diens eerste mededeelingen verschenen in het jaar 1899. De door Jørgensen verkregen resultaten geven aan de beoordeeling van raapkoek door middel van het chemisch onderzoek een vastere grondslag.

In de eerste plaats vestigt Jørgensen de aandacht op het verband tusschen schadelijkheid van de aanwezige mosterdoliën en het stikstofgehalte van de daaruit gevormde thiosinaminen, terwijl hij verder wijst op de rol die volgens hem, bacteriën spelen bij de ontwikkeling van de mosterdolie.

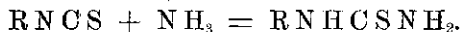
Voor verschillende brassica-soorten bepaalde hij de gehalten aan mosterdolie en tevens aan N van de overeenkomstige thiosinaminen. De hierbij verkregen uitkomsten vergeleek hij met die, gevonden bij verschillende handelsraapkoeken, waaronder eenige, die aanleiding hadden gegeven tot vergiftiging.

Ter bepaling van de mosterdolie ging hij als volgt te werk:

25 gram van de tot poeder gebrachte koek, 5 gram witte mosterd en 250 c.c. water laat men in een gesloten kolf gedurende 1 uur bij gewone temperatuur staan. Daarna wordt onder doorleiden van stoom gedestilleerd tot ongeveer 150 c.c. in den ontvanger, waarin zich 15 c.c. geconcentreerde ammoniak en 40 c.c. alkohol bevinden, zijn overgedestilleerd. Ter afkoeling brengt men de ontvanger in koud water. De vloeistof in den ontvanger wordt in een platina-schaal ingedampt tot een dikvloeibare rest overblijft, die in een waterdroogstoof gedurende een uur wordt gedroogd. Nadat de schaal een nacht in een exsiccator heeft gestaan wordt gewogen en ziet men of het thiosinamin gekristalliseerd is. Is dit het geval, dan wordt hiervan het smeltpunt bepaald. Het overige thiosinamin wordt in warm water opgelost en in een Kjeldahlkolf gebracht. De schaal wordt gedroogd en gewogen. Aan de waterige oplossing wordt 10 c.c. zwavelzuur toegevoegd, waarna verder als bij een gewone N-bepaling wordt gehandeld.

Het percentage mosterdolie wordt als volgt berekend:

De eene helft van de in het thiosinamin aanwezige N is afkomstig van de ammoniak, de andere van de mosterdolie, n.l.:



De helft van het verbruik in c.c. van  $\frac{1}{10}$  normaal zuur wordt derhalve op ammoniak omgerekend en van het thiosinamin-gewicht afgetrokken. Heeft men 25 gram raapkoek gebruikt, dan wordt het percentage mosterdolie door vermenigvuldiging van het gevonden getal met 4 verkregen.

<sup>1)</sup> Die landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen: Bd. 51, blz. 311, 1899; Bd. 52, blz. 269, 1899; Bd. 72, blz. 1, 1910.

Nu vond Jörgensen dat van de handelsmonsters diegene, welke aanleiding tot vergiftiging hadden gegeven, het hoogste gehalte hadden aan stikstof in het thiosinamin. Van een 7-tal dergelijke monsters bedroeg dit gehalte van 22,5 tot 22,8 pct., terwijl het gehalte aan mosterdolie wisselde van 0,79 tot 0,98 pct.

Van de bekende, in zaden of andere plantendeelen voorkomende mosterdoliën, heeft de allylmosterdolie het hoogste gehalte aan N in het thiosinamin, n.l. 24,14 pct. Slechts bij 3 zaadsoorten, n.l. zwarte mosterd, brassica-juncea en sinapis-juncea (Sarepta-Senf) werden door Jörgensen stikstofcijfers verkregen, die met dit theoretische gehalte overeenkwamen. Daaruit trekt hij de conclusie dat slechts deze drie zaadsoorten de allylmosterdolie ontwikkelen.

Het N-gehalte van het thiosinamin van de krotonylmosterdolie, het volgende lid van deze reeks, is 21,54 pct. De in bovengenoemde gevallen gevonden hooge stikstofcijfers wijzen volgens Jörgensen op aanwezigheid van allylmosterdolie, maar tevens moet men in de door hem onderzochte koeken de aanwezigheid van een mosterdolie met een lager N-gehalte aannemen. Al deze monsters bleken verder bij microscopisch onderzoek zaden van brassica-juncea, dus z.g. Indisch zaad, in aanzienlijke hoeveelheid te bevatten, terwijl ze ook een zeer sterken en langdurigen reuk naar mosterdolie ontwikkelden.

Tevens doen de door Jörgensen medegedeelde cijfers zien dat niet het *gehalte* aan mosterdolie *alleen* maatgevend is voor de schadelijkheid, daar bij de ongevaarlijke koeken hoogere mosterdoliegehalten voorkomen.

Ook Jörgensen merkt in zijn eerste verhandeling reeds op dat de reukproef dikwijls een geheel ander denkbeeld van de aanwezige hoeveelheid mosterdolie geeft dan door de kwantitatieve bepaling blijkt. Terwijl Sjollemas de oorzaak alleen zoekt in de verschillende samenstelling der mosterdolie: „il était bien possible, que l'essence de moutarde, qu'on obtient des graines des différentes espèces de Brassica et de Sinapis, dont on fabrique les tourteaux alimentaires, n'est pas la même" <sup>1)</sup> toonde Jörgensen reeds aan dat dit niet de *eenige* oorzaak kon zijn:

„Es sind jedoch einige Fälle vorgefallen, wo man nach dem Ergebnis der microscopischen Untersuchung, sowie nach der Menge und der *Beschaffenheit* <sup>2)</sup> des Senföls einen lange dauernden Geruch erwarten musste, es zeigte sich aber nichtsdestoweniger, dass der Geruch nur einige Stunden dauerte. Meiner Ansicht nach rührt dies ziemlich gewiss von einer Bakteriën-wirkung her, denn das Senföl selbst kann sich, mit Wasser hingestellt, bei 40° ausserordentlich lange halten <sup>3)</sup>, und durch Versuche, die später erwähnt werden, ist diese Mutmassung auch

1) Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 20.

2) Cursiveering van den schrijver.

3) Zooals nader zal blijken, moet deze uitspraak op eene vergissing berusten.

gestützt worden, und deshalb meine ich, dass man nicht in allen Fällen die Geruchprobe, wie ich sie früher vorgeschlagen habe, benutzen kann."

Deze reukproef werd uitgevoerd met 5 gram stof, waaraan werden toegevoegd 1 gram witte mosterd en 100 c.c. water. Jörgensen beproefde daarom den invloed van een „bacteriëndoodende" stof en als zoodanig koos hij thymol; aan elke reukproef werd 2 c.c. thymol van eene 1-procentige alkoholische oplossing toegevoegd. Hij vond (en dit is door mijne waarnemingen bevestigd), dat steeds de toevoeging van thymol eene verlenging van den duur van den mosterdolie-reuk tengevolge heeft en hij trachtte dit verschijnsel te verklaren door aan de thymol-toevoeging het vernietigen van de mosterdolie-ontledende bacteriën toe te schrijven. Zoo gaven twee monsters brassica-rapa (rübsen), waarin eenige vreemde cruciferenzaden, met wit mosterdzaad een reukproef van resp. 4 en 8 uur, terwijl door thymol-toevoeging de reuk resp. 18 en 17 uur bleef bestaan.

Jörgensen meent hieruit tevens de conclusie te kunnen trekken dat in het eerste monster veel meer mosterdolie-destruerende bacteriën aanwezig waren dan in het tweede. Een dergelijk groot verschil in duur van de reukproef zonder en met thymol-toevoeging is door mij slechts bij een enkel onderzocht monster bijna bereikt, n.l. bij D 316 (zie tabel 3), waar de duur van den reuk zonder en met thymol resp. 9 en 17 uur bedraagt.

Zija hier dus werkelijk, volgens de opvatting van Jörgensen, mosterdolie-ontledende bacteriën in eenigszins aanzienlijke hoeveelheid aanwezig, dan moet zich dit ook kenbaar maken in de uitkomst der kwantitatieve bepaling van de mosterdolie.

Jörgensen vermeldt echter slechts één geval (L. VS. Band 72, blz. 9), waarin hij de mosterdolie kwantitatief bepaalde zoowel zonder als met thymol-toevoeging. Hij vond bij de laatste bepaling 0,07 pct. mosterdolie meer en dit mag onbeteekenend genoemd worden. Bij dit monster vermeldt Jörgensen niet den duur van de reukproef zonder en met thymol. Dit ware van belang geweest om den invloed van de bacteriën-werking op het mosterdoliegehalte te kunnen nagaan. Overigens heeft Jörgensen kwantitatieve mosterdoliebepalingen onder toevoeging van thymol slechts gedaan om te bepalen hoe snel de mosterdolie-vorming plaats heeft, wanneer de hoeveelheid myrosine niet vermeerderd wordt, dus zonder toevoeging van wit mosterdzaad. Hij meende eerst, dat staan gedurende 5 uur bij 37° voldoende zou zijn (L. VS. Band 52, blz. 287), doch bracht later dezen tijd op 17 uur. Hij neemt hierbij dus aan, dat door de thymol-toevoeging de ontledende werking op de mosterdolie voorkomen wordt, onafhankelijk van den tijd, gedurende welken deze bij verhoogde temperatuur met water in aanraking is.

Uit zijne onderzoekingen trekt Jörgensen nu als eerste conclusie: „Wenn ein Rapskuchen, mit weissem Senf und Wasser versetzt, in der Zeit von einer Stunde 0,8 pct. Senföl entwickeln



kann, und das aus dem Senföl gebildete Thiosinamin 22,5 pct. Stickstoff enthält, und wenn ferner die Hälfte des Senföls beim 17-stündigem Stehen bei 35° mit Wasser und Thymol sich entwickeln lässt, dann hat man von dem Gebrauch dieses Futterkuchens als Viehfutter abzuraten."

Mij is echter gebleken, dat ook bij aanwezigheid van thymol de hoeveelheid mosterdolie na langeren tijd staan, geleidelijk afneemt:

Tabel 1.

*D 312.* (25 gram koek, 5 gram wit mosterdzaad, 300 c.c. water, 10 c.c. 1 pct. alkoholische thymol).

	Milligrammen thiosinamin.
na 1 uur staan . . . . .	348,6 341,0
na 2 uur staan . . . . .	301,6 309,8
na 5 uur staan . . . . .	300,0 307,2
na 17 uur staan . . . . .	185,5 189,5

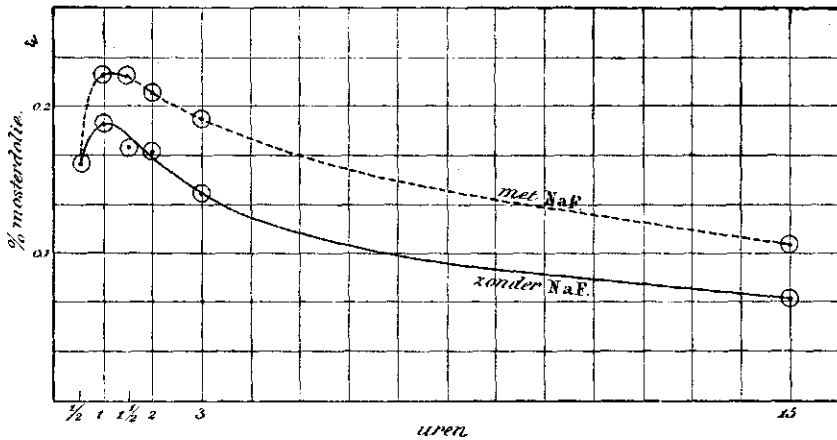
Ook door Brioux <sup>1)</sup> is aangetoond dat zoowel zonder als met een „bacteriën-doodende” stof het mosterdoliegehalte vermindert naarmate de koek langer met water in aanraking is. Brioux gebruikte geen thymol, doch NaF en verrichtte kwantitatieve bepalingen van de mosterdolie, terwijl Jørgensen zich eenvoudig bepaalde tot den invloed van de „bacteriën-doodende” stof op den duur van de reukproef.

De resultaten van Brioux vindt men in onderstaande tabel en grafische voorstelling. Hij gebruikte 25 gram koek met 500 c.c. water en 2 gram NaF en liet in een gesloten kolf bij 37—40° staan. Daarna werd gedestilleerd op een zandbad zonder stoom doorleiden, terwijl het destillaat verzameld werd in een maatkolf van 250 c.c. met een bekende hoeveelheid  $\frac{1}{10}$  n. AgNO<sub>3</sub>. Na afloop van de destillatie werd na filtreren het niet ontlede AgNO<sub>3</sub> volgens Volhard bepaald en hieruit het gehalte aan mosterdolie als C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>CNS berekend.

<sup>1)</sup> L'essence de moutarde des tourteaux de crucifères et en particulier des tourteaux de colza et de navette. *Annales de la science agronomique* 28, p. 241, 1911.

Tabel 2.

Duur van de inwerking.	pct. mosterdolie	
	zonder NaF	met NaF
1/2 uur . . . . .	0,162	0,162
1 " . . . . .	0,187	0,221
1 1/2 " . . . . .	0,172	0,217
2 " . . . . .	0,167	0,207
3 " . . . . .	0,137	0,190
15 " . . . . .	0,067	0,105



Brioux vindt dus door toevoeging van Na F vanaf 1 uur staan, eene vermeerdering van het mosterdoliegehalte van gemiddeld 40 milligram op 100 gram koek; de hoeveelheid gevonden mosterdolie daalt echter, evenals bij de bepalingen zonder thymol, geleidelijk na 1 uur inwerking. Niettegenstaande dus de bacteriënwerking uitgeschakeld geacht kan worden, daalt ook hier het mosterdoliegehalte. Volgens Jörgensen te werk gaande, zou men dus na 17 uur staan een te laag cijfer voor het mosterdoliegehalte vinden.

Bij verschillende monsters heb ik nu nagegaan den invloed van de thymol-toevoeging op de hoeveelheid mosterdolie, bepaald volgens Jörgensen, welke zich na 1 uur staan had gevormd. In de verkregen thiosinaminen werd het gehalte aan N bepaald, terwijl tevens de tijd werd nagegaan, gedurende welken de reuk zonder en met thymol-toevoeging bleef bestaan.

Uit deze cijfers (zie onderstaande tabel), blijkt dat om het ware mosterdoliegehalte zoo nauwkeurig mogelijk te benaderen, thymol-toevoeging noodzakelijk is.

Tabel 3.

Nummer.	N a a m.	Microscopisch onderzoek.	Gewicht van het thiosinamin in mgr. bij gebruik van 25 gr. stof		N-gehalte van het thiosinamin		Duur van den reuk in uren	
			zonder thymol.	met thymol.	zonder thymol.	met thymol.	zonder thymol.	met thymol.
D 312	Raapkoek (Toriakool- zaad). Oogst 1914.	In hoofdzaak br. rapa.	269,5	290,1	20,70	20,95	7	11
D 313	Koolzaadkoek (Donau kool- zaad). Oogst 1913.	In hoofdzaak br. rapa.	208,9	233,9	20,20	20,80	7	10
D 314	Indische raap- koek. (Oogst 1913)	In hoofdzaak Indisch zaad br. juncea.	a. 262,4 b. 263,0	249,0	21,10	21,25	8	11
D 316	Raapkoek.	Indisch zaad br. juncea, weinig br. glauca.	a. 280,6 b. 277,2	309,0 302,8	21,50	21,25	9	17
D 317	Raapkoek.	Indisch zaad br. juncea.	a. 219,4 b. 216,2	236,0	20,80	20,65	8	14
D 334	Raapkoek.	Indisch zaad br. juncea, weinig br. glauca, br. eruca en br. rapa.	a. 238,4 b. 237,0	252,4 256,6	21,85	21,30	11	13
D 335	Raapkoek.	Zuid-Europeesch zaad (vermoedelijk br. dichotoma).	a. 370,0 b. 364,0	384,8 386,8	21,50	21,55	11	14
V 115	Raapkoek.	—	333,2	376,7	20,95	20,70	—	—
V 200	Raapmeel.	In hoofdzaak Indisch zaad.	a. 296,8 b. 302,0	344,0 348,0	21,20	21,20	10	15

Overigens verdient ook de methode van Jörgensen de voorkeur boven die van Brioux, omdat men, wanneer men uit het thiosinamin het gehalte aan mosterdolie berekent, de samenstelling van deze laatste buiten beschouwing kan laten, terwijl Brioux genoodzaakt is op allylmosterdolie om te rekenen.

In verband hiermede zegt Jörgensen (Veruchs St. Bd. 52, blz. 283): „Das von mir nachgewiesene Verhältnis, dass die verschiedenen Samenarten nicht dasselbe Senföl geben, hat selbstverständlich die ganze Frage verwickelter gemacht, als man bisher gemeint hat, und es stösst auch die früher vorgeschlagenen Methoden um, welche bezwecken, auf irgend einem Wege die Menge von flüchtigen Schwefel- oder Stickstoffverbindungen zu bestimmen, die in einer gewissen Zeit durch Behandlung mit Wasser oder Weinsäurelösung gebildet werden können, und dieselben als Allylsenföl zu berechnen.“

Bij het beoordeelen van de resultaten, verkregen bij de mosterdoliebepaling volgens Jörgensen dient men er dus rekening mede te houden dat volgens de kwantitatieve bepaling, zooals deze steeds door de proefstations is verricht, de berekening van het mosterdoliegehalte plaats had uit het gevonden gehalte aan zwavel.

De tweede conclusie van Jörgensen is:

„Wanneer het stikstofgehalte van het thiosinamin 22 pct. niet bereikt, kan men aan de koek, mits op de gewone wijze vervoerd, geen schadelijke werking toeschrijven, ook wanneer de na toevoeging van witte mosterd gedurende een uur ontwikkelde hoeveelheid mosterdolie 1 pct. nadert. Hoe lager het stikstofgehalte is, hoe meer mosterdolie men kan toelaten.”

Bij beschouwing van de door mij gevonden N-cijfers zien we dat geen enkel het door Jörgensen als schadelijk aangegeven gehalte van 22,5 pct. N bereikt, niettegenstaande volgens het microscopisch onderzoek in verschillende gevallen (D 317, 334, 314, 316) hoofdzakelijk zaden van *brassica-juncea* aanwezig blijken te zijn, die volgens Jörgensen het hooge N-cijfer in het thiosinamin veroorzaken. Daarentegen heeft een monster (V 200) met een N-gehalte van 21,18 pct. wel vergiftigingsverschijnselen en zelfs vrij ernstige, veroorzaakt. Van een stal van 30 koeien werden tengevolge van het voederen van deze raapkoek een 20-tal ziek. Toch had de hoeveelheid koek per dag en per koe niet meer bedragen dan 1 K.G., terwijl er voor gezorgd was de raapkoek droog te geven.

In eene vroegere mededeeling <sup>1)</sup> had ik reeds gelegenheid er op te wijzen dat het gehalte aan oplosbare koolhydraten van dit, hoofdzakelijk uit Indisch zaad geslagen monster, in vergelijking met dat van andere, uit Indisch zaad afkomstige monsters, abnormaal laag was. Terwijl het schadelijke monster 5,4 pct. oplosbare koolhydraten, berekend als saccharose bevatte, bedroegen de gehalten bij 3 andere Indische raapkoeken resp. 6,5, 8,6 en 8,9 pct. De invloed, die de teruggang van het suikergehalte in bedoeld monster heeft veroorzaakt, zal mede wel voor de schadelijke werking aansprakelijk gesteld moeten worden. In verband hiermede verdient ook de aandacht, dat het verschil in hoeveelheid mosterdolie, gevonden met en zonder toevoeging van thymol, van de onderzochte monsters bij V 200 het grootst is.

Als derde factor, waarmede voor de beoordeeling van de schadelijkheid van dit monster rekening moet worden gehouden, komt in aanmerking het hooge mosterdoliegehalte, n.l. 1,21 pct.

Vergelijken we de door Jörgensen verkregen resultaten met

<sup>1)</sup> Het gehalte aan oplosbare koolhydraten van voedermiddelen als maatstaf voor de beoordeeling der kwaliteit.

de door mij gevonden cijfers, dan blijkt dat de hier gevonden mosterdoliegehalten over het algemeen veel hooger zijn.

Deze laatste volgen hieronder en eveneens de N-gehalten der overeenkomstige thiosinaminen.

Tabel 4.

Nummer.	Pct. mosterdolie bij een vochtgehalte van 10 pct.	N-gehalte van het thiosinamin.
D 312	1,15 pct.	20,95 pct.
313	0,94 "	20,80 "
314	0,99 "	21,25 "
315	0,27 "	20,70 "
316	1,04 "	21,25 "
317	0,84 "	20,65 "
334	0,90 "	21,30 "
335	1,34 "	21,55 "
343	1,29 "	20,70 "
V 115	1,31 "	20,80 "
200	1,21 "	21,20 "
230	1,27 "	20,85 "
272	0,78 "	21,40 "
352	1,39 "	21,25 "
387	1,10 "	21,10 "
520	0,84 "	21,15 "
996	1,23 "	21,15 "
E 32	1,29 "	21,00 "

Daartegenover vond Jörgensen bij 111 onderzochte monsters raapkoek slechts in één geval een mosterdoliegehalte van 1,29 pct.

Met uitzondering van de monsters V 200 en V 352, na de voeding waarvan over schadelijke werking geklaagd is, hebben deze koeken geen nadeelige gevolgen veroorzaakt, ofschoon de vastgestelde grens voor het mosterdoliegehalte van 0,6 pct. in alle gevallen, op D 315 na, ver is overschreden. Bij microscopisch onderzoek bleek D 315 geslagen te zijn uit zaden van *brassica napus*.

Het hoogst bereikte cijfer voor het N-gehalte van het thiosinamin bedraagt 21,55 pct. (zie tabel 4). d.i. dus het theoretische N-cijfer voor het thiosinamin van de krotonylmosterdolie. Ook Brioux vond lagere cijfers dan Jörgensen voor de N-gehalten der thiosinaminen en wel van 19,0 pct. tot 20,6 pct. bij inlandsch en Indisch zaad.

In navolging van Blankisma <sup>1)</sup> heb ik daarom getracht de

<sup>1)</sup> J. J. Blankisma, Mosterdoliën in Cruciferen. Pharmaceutisch Weekblad 1914, No. 46.

verkregen mosterdoliën te identificeeren met behulp van phenylhydrazine in alcoholische oplossing bij kooktemperatuur. Hierdoor ontstaan volgens een onderzoek van Busch<sup>2)</sup> hoofdzakelijk de 1—4-dialkylthiosemicarbaziden.

Daartoe werd door mij uit 150 gram raapkoek de mosterdolie afgedestilleerd en het destillaat in 96-procentige alcohol opgevangen. De verkregen vloeistof werd met phenylhydrazine aan een terugvloeiakoeler gekookt, de inhoud van de kolf op het waterbad ingedampt en het residu uit benzine omgekristalliseerd.

Op deze wijze werden uit D. 314, volgens het microscopisch onderzoek uit brassica-juncea bestaande, fraaie witte kristallen verkregen met een smeltpunt van 100,5°.

Volgens Jörgensen komt echter in brassica-juncea de allylmosterdolie voor, waarvan de verbinding met phenylhydrazine, het allylphenylthiosemicarbazide volgens Beilstein IV IIIe Auflage, blz. 678 een smeltpunt heeft van 118—119°.

Op gelijke wijze werd door mij het thiosemicarbazide bereid uit de mosterdolie van D. 315, volgens het microscopisch onderzoek bestaande uit brassica-napus, waarin dus volgens Sjollem de krotonylmosterdolie aanwezig is. De verkregen verbinding kristalliseerde in fraaie witte naalden die onder bruinkleuring bij 100° smolten.

Uit het vergiftiging veroorzaakt hebbende monster V 200 kreeg ik op analoge wijze eene verbinding met een smeltpunt van 98 à 99°.

Deze smeltpuntsbepalingen wijzen in dezelfde richting als de stikstofbepalingen in de thiosinaminen.

Tot mijn spijt vond ik de verbinding van phenylhydrazine met de krotonylmosterdolie nergens vermeld. De bereiding hiervan hoop ik ter hand te kunnen nemen zoodra het proefstation voor veevoederonderzoek geïnstalleerd zal zijn.

*Conclusies* Uit het bovenstaande meen ik het volgende te mogen afleiden.

1. Wanneer men gebruik wil maken van de reukproef voor de beoordeeling van eene eventuele schadelijke werking van raapkoek, is het noodzakelijk deze te verrichten onder toevoeging van thymol, natriumfluoride, enz.

Dat men, werkende onder deze omstandigheden, werkelijk aan het beletten van eene gedeeltelijke ontleding van de aanwezige mosterdolie en niet b.v. aan eene vertragende werking op de ontwikkeling der mosterdolie moet denken, bewijzen de uitkomsten der door mij verrichte kwantitatieve bepalingen der mosterdolie zonder en met thymol-toevoeging in verschillende gevallen.

De bacteriëtheorie van Jörgensen wordt door hem niet met voldoende bewijzen gestaafd.

<sup>1)</sup> Ber. d. D. Chem. Ges., 42, 1909.

2. Het verdient aanbeveling, de beoordeeling van de schadelijkheid van raapkoek in de eerste plaats te verbinden aan de combinatie der beide door Jörgensen aangegeven factoren, n.l. mosterdoliegehalte en N-gehalte van het thiosinamin, waarbij men echter de door Jörgensen aangegeven cijfers zal dienen te wijzigen.

Bij de bepaling van het N-gehalte in de thiosinaminen zou de reukproef kunnen vervallen.

Verder moet ook rekening gehouden worden met de uitkomsten van het microscopisch-botanisch onderzoek.

3. Als derde belangrijke factor zal men rekening dienen te houden met het gehalte aan oplosbare koolhydraten, ten einde een indruk te krijgen omtrent de mate van „frischheid” der koek. Er zijn n.l. aanwijzingen, ook van praktische zijde, dat de schadelijke werking met een minder frisschen toestand verband houdt.

Het materiaal, dat voor het verrichten van bovengenoemde onderzoeken heeft gediend, zal noodzakelijkerwijze uitgebreid moeten worden. Daartoe zouden b.v. gedurende 1 jaar of langer van alle aan het proefstation voor het onderzoek van veevoeder inkomende monsters raapkoek, het mosterdoliegehalte en het N-gehalte in het thiosinamin bepaald moeten worden, waarbij bijzondere aandacht te wijden ware aan koeken, waarvan eene schadelijke werking bekend geworden is.

### **Die Beurteilung der Gesundheitsschädlichkeit der Rapskuchen nach der chemischen Analyse.**

*(Zusammenfassung obiger Ausführungen.)*

Die Beurteilung der Rapskuchen, nämlich um auf Grund der chemischen Analyse zu einer eventuellen schädlichen Wirkung derselben schliessen zu können, ist vielfach Gegenstand der Forschung gewesen. Bis heute ist es aber noch nicht, wenigstens in sehr unvollkommener Weise, gelungen, auf Grund der chemischen Analyse, mit Sicherheit die schädliche Wirkung eines Rapskuchens vorbestimmen zu können. Mannigfaltige Versuche sind zu diesem Zwecke angestellt worden. Auch in der Praxis der holländischen Versuchstationen ist dieser Gegenstand immer wieder der Prüfung unterworfen worden.

Das grosse Interesse einer besseren Beurteilung (an den Reichslandwirtschaftlichen Versuchstationen wurden vom 1. Juni 1914 bis zum 1. Juni 1915, 195 Muster Rapskuchen = einer Menge von 1¼ Millionen K.G. untersucht) hat Verf. veranlasst, die Frage einer näheren Prüfung zu unterwerfen.

Verf. hat infolge der Reorganisation der holländischen Versuchstationen seine Untersuchungen unterbrechen müssen; die erzielten Resultate möchten aber nach seiner Meinung von genügendem Interesse sein, um eine vorläufige Mitteilung rechtfertigen

zu können, weil sie nach Verf. eine Ergänzung und Abänderung der bis jetzt von den holländischen Versuchsstationen angewandten Untersuchungsmethoden der Rapskuchen erwünscht erscheinen lassen.

Im Jahre 1898 fand Sjollem, dass verschiedene Brassica-Samen verschiedene Senföle entwickeln konnten, die einen grossen Unterschied in ihren Eigenschaften zeigten. Nach ihm war also die Beurteilung der Rapskuchen auf Grund der quantitativen Bestimmung des Senföls nicht zulässig und war die Beurteilung nach der Geruchprobe zu bevorzugen.

Die Geruchprobe zeigte sich aber nicht immer empfehlenswert und deshalb bemühte man sich eine bessere, objectivere Methode zu finden. An der Versuchsstation Groningen wurde die auf Seite 56 beschriebene empirische Methode ausgearbeitet. Diese Methode stützt sich auf die Beobachtungen von Dieterich und Gadamers, dass das Senföl, in Berührung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, unmittelbar reagirt unter Bildung von  $Ag_2S$ . Wurde bei dieser Probe ein Ueberschuss an Senföl gefunden, das heisst mehr als 0,4 pct., so wurde auch eine Geruchprobe angestellt und wenn diese letztere ebenfalls ein positives Resultat lieferte, wurde der Käufer gewarnt, bei Verfütterung der Rapskuchen sich vorzusehen. Diese Warnung musste oft wiederholt werden und das ist kein Wunder, wenn man weiss, dass ein grosser Teil der Rapskuchen, welche hier zur Fütterung benutzt wird, aus sogenannten indischen Samen gepresst wird. Diese indischen Samen bestehen aus Brassica-Arten mit einem hohen Senfölgelhalt. Die Grenze von 0,4 pct. wurde daher sehr oft überschritten und infolge der oft wiederholten Warnungen beschränkten sich die Landwirte in der Verfütterung der Rapskuchen. Das war sehr zu bedauern, da in den Rapskuchen ein gutes und ziemlich billiges Futtermittel vorliegt.

Nachdem also eine Zeit lang Rapskuchen, deren Senfölgelhalt höher war als 0,4 pct., beanstandet worden waren, wurde im Anfang des Jahres 1914 die Grenze auf 0,6 pct. erhöht. Weiter wurde die Warnung nur gegeben wenn ausserdem noch bei der Geruchprobe nach 6 Stunden ein deutlicher Senfölgelhalt bemerkbar war.

Die Untersuchungen von Jörgensen machten zuerst aufmerksam auf die Beziehung zwischen der Schädlichkeit der Senföle und dem Stickstoffgehalt der aus denselben gebildeten Thiosinamine; weiter spricht er als seine Meinung aus, dass Mikroorganismen bei der Entwicklung des Senföls eine Rolle spielen. Aus den von Jörgensen gefundenen Zahlen erhellt, dass der Senfölgelhalt nicht der einzige Massstab für die Schädlichkeit der Rapskuchen ist, weil bei einem Teil der ungefährlichen Kuchen höhere Gehalte an Senföl gefunden wurden als bei den giftigen Kuchen.

Bei der Geruchprobe fand Jörgensen immer einen länger



dauernden Geruch nach Zusatz von Thymol; den Beweis für seine Bacterien-Theorie liefert Jörgensen aber nicht.

Bei seinen Schlussfolgerungen nimmt Jörgensen an, dass eine einmal gebildete Menge Senföl, auch bei längerem Stehen, mit Wasser und Thymol, unverändert bleibt. Aus Tabelle 1 (Seite 61) ist aber ersichtlich, dass die Menge Senföl, auch bei Anwesenheit von Thymol, bei längerem Stehen allmählich kleiner wird. Brioux hat mit Wasser und NaF dasselbe Resultat erhalten. (Tabelle 2).

Bei mehreren Mustern hat Verf. die Menge Senföl bestimmt, welche sich nach einer Stunde ohne und mit Zusatz von Thymol gebildet hatte. (Tabelle 3). Aus den mitgetheilten Zahlen wird klar, dass der Zusatz von Thymol notwendig ist um den Senfölgelhalt so genau wie möglich kennen zu lernen.

Die zweite Schlussfolgerung, welche Jörgensen aus seinen Ergebnissen zieht, ist: „Wenn der Stickstoffgehalt des Thiosinamins 22 pct. nicht erreicht, darf man den Kuchen, bei Verfütterung in gewöhnlicher Weise, keine gesundheitsschädliche Wirkung beilegen, wenn auch die bei Zusatz von weissem Senf im Verlauf einer Stunde entwickelte Senfölmengung sich 1 pct. nähert; und überhaupt, je niedriger der Stickstoffgehalt ist, um so mehr Senföl darf man zulassen.“

Die vom Verf. gefundenen N-gehalte erreichen niemals 22,5 pct., das ist der Gehalt, welche von Jörgensen als schädlich betrachtet wird, obgleich in vielen Fällen Samen von Brassica juncea vorlagen. Dagegen hat ein Rapskuchen (V 200) mit 21,18 pct. Stickstoff im Thiosinamin schwere Krankheitsfälle bei einem Viehbestande verursacht. In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> hat Verf. schon darauf hingewiesen, dass der Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten in diesem Muster weit niedriger war als derjenige in Mustern, welche ebenso wie das schädliche, aus indischen Samen gepresst worden waren.

Im Gegensatz zu den Resultaten, welche Jörgensen erwähnt, hat Verf. viel höhere Zahlen für die Senfölgelhalte gefunden (Tabelle 4). Mit Ausnahme von 2 Mustern (V 200 und V 352) haben diese Kuchen keinen Schaden verursacht.

Verf. hat weiter versucht die Senföle zu identifizieren durch ihre Verbindungen mit Phenylhydrazine. Diese Untersuchungen sind aber noch nicht abgeschlossen.

Verf. hält es für berechtigt, aus seinen Untersuchungen folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Wenn man die Geruchprobe für die Beurteilung der Schädlichkeit der Rapskuchen benutzen will, ist es notwendig dieselbe unter Zusatz von Thymol, NaF oder dergleichen auszuführen.

<sup>1)</sup> Het gehalte aan oplosbare koolhydraten van voedermiddelen als maatstaf voor de beoordeeling der kwaliteit.

Verelagen van landbouwkundige onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations, No XVIII, 1915.

2. Empfehlenswerter ist es aber, die Schädlichkeit zu beurteilen indem man den Senfölgehalt und den Stickstoffgehalt des Thiosinamins bestimmt. Die von J ö r g e n s e n angegebenen Zahlen sind aber abzuändern.

3. Die Bestimmung des Gehaltes an wasserlöslichen Kohlenhydraten ist ebenfalls wichtig. In der Praxis hat sich nämlich herausgestellt, dass Kuchen, welche in weniger frischem Zustande waren, eine schädliche Wirkung ausübten.