URI
V 51 4)

De pathogenese en aetiologie van de 'tulpenvinger'

DR. G. A. W. VERSPYCK MIJNSSEN

Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde TNO

Wolters-Noordhoff n.v. Groningen 1968

54/7/68

BIBLIOTHEEK NEDERLANDS INSTITUUT
VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE TNO
WASSENAARSEWEG 56 – LEIDEN

Tevens verschenen als proefschrift ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden.

ERRATA

Dr. G. A. W. Verspyck Mijnssen

De pathogenese en aetiologie van de 'tulpenvinger'

blz. 5 onderste regel: (een virusinfectie); dit moet zijn: (een schimmelinfectie).

blz. 32 14e en 13e regel van onderen: ....., zoals die bij een normale lapjesproef bestaat, ... moet vervallen.

blz. 38 Tollensreactie van tekening IV; voor de onderste Tollensvlek is de Rf niet 0,14 maar 0,24.

blz. 43 boven aan de bladzijde staat rechts de structuurformule van het α-methyleen-γ-butyrolacton. De C van de methyleen-groep (links boven) is niet aangegeven.

blz. 64 boven aan de bladzijde: Summary en Conclusions; dit moet zijn: Summary and Conclusions.

Deze publikatie werd bewerkt in de afdeling Arbeidsgeneeskunde van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde TNO (hoofd: DR. F. H. BONJER), het laboratorium voor Experimentele plantensystematiek van de Rijksuniversiteit te Leiden (hoofd: PROF. DR. R. HEGNAUER) en de afdeling Dermatologie van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (hoofd: PROF. DR. M. K. POLANO).

Inhoud

Inleiding 1

HOOFDSTUK I *Enkele botanische en teelttechnische gegevens* 2

1. Historische schets 2
2. Groepering van de gecultiveerde tulpen 3
3. Beknopte beschrijving van de tulpenbol 4
4. Beknopte beschrijving van de tulpenteelt 5

HOOFDSTUK II *Huidafwijkingen in het bloembollenbedrijf* 7

Literatuuroverzicht 7

HOOFDSTUK III *Eigen onderzoek naar de pathogenese van de 'tulpenvinger'* . . . 27

HOOFDSTUK IV *Het afzonderen en zuiveren van de sensibiliserende stof* 29

1. Oriënterende proeven 29
2. Papierchromatografie van de extracten 32
3. Het bereiden van ballaststofarme extracten 34
4. Preparatieve bereiding van het tulpenallergeen 40

HOOFDSTUK V *Onderzoek van het tulpenallergeen* 42

1. Onderzoek van het ruwe allergeen 42
2. Onderzoek van het eigenlijke allergeen 45

HOOFDSTUK VI *Over het voorkomen van het tulpenallergeen in verschillende tulpenvariëteiten* 51

1. Materiaal 51
2. Methode van onderzoek 52
3. Biologische test 52

HOOFDSTUK VII *Maatregelen ter voorkoming van 'tulpenvingers'* 57

Samenvatting en conclusies 59

Summary and conclusions 64

Literatuurlijst 68

Bijlage 70

Inleiding

Haast ieder beroep heeft zijn eigen beroepsziekten. Onder de beroepsziekten nemen de huidziekten een belangrijke plaats in. Zo ook in het bloembollenbedrijf.

Klachten over huidafwijkingen zijn aan hen, die in het bloembollenvak werkzaam zijn, reeds geruime tijd bekend. Dit blijkt zowel uit de geneeskundige literatuur als uit gesprekken met personen die bij het bloembollenbedrijf betrokken zijn. De frequentie van deze huidafwijkingen lijkt zodanig te zijn, dat zij moeten worden opgevat als een reëel vraagstuk: zij kunnen de betrokkenen ongeschikt maken voor de uitoefening van bepaalde werkzaamheden, resp. het aantrekken van werkkrachten bemoeilijken. Uit namen als tulpenvinger, tulip rash, tulpenvuur, daffodil dermatitis, narcissenrot, hyacinthenjeuk en hyacinthenschurft, blijkt dat aan bepaalde bollensoorten specifieke afwijkingen worden toegeschreven. De zgn. 'tulpenvinger' lijkt onder deze aandoeningen een van de belangrijkste te zijn. Zij heeft een eigen beeld met typische kenmerken. De pathogenese van deze afwijking was echter nog onduidelijk.

Wij hebben een onderzoek ingesteld naar de pathogenese van de aandoening en naar de aard van het schadelijke agens. Het laatste werd uit tulpenbollen geïsoleerd en chemisch geïdentificeerd. Daar vele factoren de concentratie van metabolieten in weefsels van planten kunnen beïnvloeden, werd tevens een oriënterend onderzoek naar enkele van deze factoren ingesteld. In het bijzonder werd nagegaan hoe het schadelijk agens over de verschillende delen van cultuurtulpen is verdeeld en of er duidelijke verschillen in pathogeniteit bestaan tussen afzonderlijke vormen (cultivars) van de cultuurtulpen. Bij dit onderzoek werd eveneens een van de zgn. botanische tulpen betrokken. Het verslag van dit onderzoek vormt de inhoud van dit proefschrift.

HOOFDSTUK I

Enkele botanische en teelttechnische gegevens

Voor het begrijpen van huidafwijkingen, die kunnen optreden bij het kweken van tulpenbollen, is enig begrip van de botanie van de tulp en van de hedendaagse bedrijfsvoering bij de bollenteelt noodzakelijk. De ons inziens noodzakelijke informatie wordt in dit hoofdstuk verstrekt.

1. *Historische schets*

De cultuurtulpen zijn voortgekomen uit nog niet met zekerheid geïdentificeerde soorten van het geslacht *Tulipa* (familie *Liliaceae*; klasse Monocotyledoneae). Dit geslacht omvat ongeveer 100 species, waarvan vele in Centraal-Azië, Klein Azië en Zuid-Europa groeien. De cultuurtulpen werden in de 16e eeuw uit Turkije in Midden-Europa geïntroduceerd. KRELAGE (1946) schrijft hierover het volgende:

'De eerste beschrijving van een tulp, die in een Europese tuin in bloei kwam, is afkomstig van Conrad Gesner (1516–1565). Hij had de tulp in 1559 in Augsburg in bloei gezien'. Carolus Clusius (1526–1609) is echter de voornaamste verspreider van de tulp in West-Europa geworden.

Carolus Clusius (Charles de l'Ecluse), in 1593 tot hoogleraar benoemd aan de Universiteit te Leiden, was in 1573 aangesteld als Praefectus van de Keizerlijke medicinale tuin in Wenen. Daar kwam hij in contact met de Oostenrijkse ambassadeur aan het hof van de Sultan van Turkije, Ogier Chislain de Busbecq (1522–1592). Door bemiddeling van de Busbecq kreeg Clusius bollen en zaden van tulpen uit Turkije, die hij later in de zgn. Clusiustuin, een onderdeel van de Hortus Botanicus te Leiden, in cultuur heeft gebracht. Deze Clusiustuin heeft een belangrijke rol gespeeld bij de introductie van de cultuurtulp in West-Europa. Het zaad, waaruit de Augsburger tulpen werden gekweekt, was waarschijnlijk ook afkomstig van de Busbecq. De door bemiddeling van de Busbecq in Midden-Europa geïntroduceerde tulpen waren reeds het resultaat van langdurige veredeling, aangezien in Turkije tulpen sedert eeuwen als sier-

planten hoog werden gewaardeerd. Het is dan ook niet verwonderlijk dat tot op heden de wilde stamvormen van de cultuurtulpen niet met zekerheid konden worden geïdentificeerd. De vele cultigene vormen van de cultuurtulp worden samengevat onder de naam *Tulipa gesneriana*. Pas in de 19e eeuw werd de belangstelling voor wilde soorten uit het genus *Tulipa* opgewekt; een aantal species werd uit Centraal-Azië naar Europa gebracht. Deze zijn in de tuinbouw als 'botanische tulpen' bekend.

2. *Groepering van de gecultiveerde tulpen*

Tulpenteelt en tulpenveredeling werden oorspronkelijk vooral in Holland (zandgronden achter de duinen), in Vlaanderen (Rijssel) en in Engeland bedreven. Men kon derhalve oorspronkelijk de zgn. Hollandse, de Vlaamse en de Engelse groepen van cultuurtulpen onderscheiden. Door veelvuldige hybridisatie vervaagden de grenzen tussen deze oude groepen van Midden-Europese cultuurtulpen. Het enorm grote aantal gekweekte vormen (cultivars), dat in de loop der jaren door de telers werd voortgebracht, wordt derhalve tegenwoordig in hoofdzaak volgens bloeitijd, bloemvorm en hoogte van de planten gegroepeerd. Volgens internationale afspraken worden binnen de cultuurtulp (*Tulipa gesneriana*) 12–15 groepen (vaak ook als rassen aangeduid)van cultivars onderscheiden (BOOM 1950; CHITTENDEN 1951). De belangrijkste van deze groepen van cultivars zijn (groepnummers volgens CHITTENDEN):

A. *Vroegbloeiende tulpen* (omstreeks half april)
1. Duc van Tol tulpen (Duc van Tol Tulips)[1]
2. Enkele, vroege tulpen (single early Tulips)
3. Dubbele, vroege tulpen (double early Tulips)

B. *Middelvroegbloeiende tulpen* (2e helft van april)
4. Mendel tulpen (Mendel Tulips)
5. Triumph tulpen (Triumph Tulips)

C. *Laatbloeiende tulpen* (mei)
6. Cottage tulpen (cottage Tulips)
7. Breeder tulpen of oud-Hollandse tulpen (Dutch Breeders)
9. Darwin tulpen (Darwin Tulips)

1. Deze groep hoort volgens Boom tot de botanische soort *Tulipa suaveolens* Roth.

De 'botanische tulpen' en recente hybriden tussen verschillende species worden in de 'Classified List of Tulip Names' samengevat tot groep 16 (species and First Crosses between species). Uit groep 16 worden thans in Nederland veel gekweekt: *Tulipa fosteriana* Hoog, *Tulipa greigii* Regel en *Tulipa kaufmanniana* Regel. Binnen elke van deze 3 species hebben de telers een reeks cultivars voortgebracht.

3. *Beknopte beschrijving van de tulpenbol*

Bij plantklare tulpenbollen kunnen van buiten naar binnen worden onderscheiden (tekening I, I):
'De bruine huid', een gemodificeerde bolrok, die de bol beschermt.

Drie tot vier vlezige rokken (1, 2, 3); zij bestaan in hoofdzaak uit grote, zetmeel- en suikerhoudende parenchymcellen; elke bolrok wordt aan de binnen- en buitenzijde begrensd door een epidermis, welke door kleinere, zetmeelvrije cellen wordt gevormd.

Morphologisch stellen alle bolrokken gemodificeerde bladscheden voor.

De rokken staan op de 'centrale plaat' (bolstoel; een sterk gemodificeerde stengel).

Na het planten ontwikkelen zich uit de bolstoel bijwortels. Bovendien bevindt zich in het centrum van de bolstoel het groeipunt (4), dat het volgende jaar de bloeistengel voortbrengt. In de oksels van de vlezige bolrokken zijn reeds bolknoppen (klisters) aangelegd (a, b, c). Reeds tijdens het bewaren van de bollen ontwikkelt zich het centrale groeipunt langzaam verder. Na het planten van de bollen in november gaat dit proces verder, zodat de bol in het voorjaar gereed is voor de snelle groei van stengel, bladeren en bloem. Tijdens de snelle ontwikkeling van de bloeistengel in het voorjaar wordt de, in de bolrokken opgeslagen, voedselvoorraad verbruikt. De oude rokken beginnen te verschrompelen, terwijl de door de spruit geproduceerde assimilatieproducten in de nu groeiende klisters worden opgeslagen (tekening I, II). In de tweede helft van mei hebben de klisters zich tot jonge bollen ontwikkeld en zijn de oude bolrokken reeds geheel verschrompeld (tekening I, III). De jonge bollen groeien verder zolang de groene stengel en bladeren assimilaten leveren en bereiken eind mei of begin juni hun definitieve grootte. In deze groeiperiode is de buitenste rok nog vlezig en kleurloos (de 'witte huid'; tekening I, IV). De cellen van deze buitenste rok sterven vervolgens af en de 'witte huid' levert de 'bruine huid', die de nieuwe bol beschermt. Als

de bollen eind juni of in juli gerooid en vervolgens gepeld worden, komen de volledig ontwikkelde dochterbollen (tekening I, I) te voorschijn. Bij het pellen worden de dochterbollen vrijgemaakt van resterende delen van de moederbol.

Tekening I. Ontwikkeling van de tulpenbol (schematisch)

4. *Beknopte beschrijving van de tulpenteelt*

In oktober en november worden gewoonlijk de tulpenbollen geplant. In maart worden de pas opgekomen planten door de zgn. 'ziektezoekers' gecontroleerd, om zieke en afwijkende planten te verwijderen. In het begin van de bloeitijd (eind april begin mei) vindt het bloemensnijden of 'koppen' plaats; hierbij wordt de bloem met een mesje afgesneden en verwijderd. Bij de arbeiders die het koppen uitvoeren, komen huidafwijkingen aan de vingers voor. De planten worden voor het snijden bespoten met middelen tegen het zgn. 'vuur' (een virusinfectie).

In juni en juli worden de bollen gerooid. Dit geschiedt tegenwoordig meestal machinaal. Vroeger werd het rooien door handkracht gedaan. De techniek was als volgt: de grond werd om de bol losgestoken en de bol werd dan met de vingers uitgegraven. Na het rooien worden de bollen (meestal nat) gepeld. Het 'pellen', dat nog niet machinaal kan worden uitgevoerd, omvat het losmaken van de bijbollen en het verwijderen van de resten van de moederbol (vgl. tekening I, III). Dit werk wordt meestal verricht door ongeschoolde, jeugdige of door vrouwelijke krachten. Hierbij treden veel klachten op over 'tulpenvingers'. Vervolgens worden de bollen machinaal gesorteerd en eventueel gewassen. Na het pellen en sorteren worden de bollen gedroogd (op rekken in schuren) en ondergaan zij, afhankelijk van de bestemming, temperatuurbehandelingen. Deze 'temperatuurbehandeling' heeft een betere bloemvorming ten doel.

Augustus en september: de voor verkoop geschikte bollen worden geteld en verpakt. Dit geschiedt in moderne bedrijven met machines. Bij het manueel tellen ondervindt men veel last van tulpenvingers. Het plantgoed blijft nu over en in oktober, november en december wordt dit geplant. Vóór het planten worden de tulpenbollen geïnspecteerd. Bij de inspectie, en indien het planten met de hand gebeurt, komen weer klachten voor over tulpenvingers.

HOOFDSTUK II

Huidafwijkingen in het bloembollenbedrijf

Literatuuroverzicht

In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven over huidafwijkingen, die door werkzaamheden met tulpen, narcissen en hyacinthen kunnen ontstaan.

Op grond van theoretische beschouwingen zijn er 3 principiële mogelijkheden voor het ontstaan van de beschreven huidafwijkingen:

a. Primair toxische stoffen

1. stoffen die door planten geproduceerd worden.
2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering en voor het bestrijden van insecten, virussen en dergelijke.
3. afscheidingsproducten van parasieten.

b. Sensibilisatie door chemische verbindingen

1. stoffen die in planten voorkomen of door planten gesecerneerd worden
2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering, insectenbestrijding, enz.
3. afscheidingsproducten van parasieten.

c. Irritatie door mechanische oorzaken

1. wrijving, bijv. door zand.
2. bestanddelen van planten als harde schillen, naaldvormige kristallen van calciumoxalaat.

Bij vele monocotyle planten komt calciumoxalaat in de vorm van rafidenbundels in zogenaamde rafidencellen of rafiden-idioblasten voor (tekening II). Een rafide is een zeer scherp naaldvormig kristal van calciumoxalaat; in de weefsels van planten komen rafiden uitsluitend verenigd tot rafidenbundels voor, die ingebed in slijm in rafidencellen gelocaliseerd zijn. Bij het verwonden van weefsels kunnen door barsten van de rafidencellen de individuele rafiden vrijkomen. Ook bij het breken van dode delen van, rafidencellen bevattende, planten komen rafiden-

Tekening II. Rafidencellen (schematisch)

A. Intacte en gebarsten rafidencel in de zaadhuid van de wijndruif (volgens Gassner 1955).

B. Geplasmolyseerde intacte rafidencel van een Orchidacee (overlangs) (volgens Molisch 1917).

C. Doorsnede door een niet geplasmolyseerde rafidencel van een Orchidacee (volgens Molisch 1917).

K = kern, p = protoplasma, s = slijm, r = rafidenbundel, w = celwand.

bundels vrij, die min of meer volledig in de individuele rafiden uiteenvallen. De oppervlakken van vrij gekomen rafidenbundels en rafiden zijn uiteraard verontreinigd met bestanddelen (bijv. slijm; cytoplasma; etc.) van de rafidencellen.

De uitdrukking rafide wordt in het vervolg benut voor het aanduiden van scherpe, naaldvormige kristallen van calciumoxalaat, die uit rafidencellen kunnen vrijkomen.

Rafidencellen komen voor bij hyacinthen en narcissen, echter niet bij tulpen.

3. mechanische irritatie door parasieten.

WALSH (1910) is de eerste, die een zgn. 'lilyrash' onderzocht en beschreef. De 'lilyrash' is een op de Scilly-eilanden voorkomende huidafwijking onder de narcissenplukkers en is een voornamelijk aan de handen en armen gelocaliseerde erythemato-papulo-vesiculeuze of pustuleuze aandoening. Mogelijk door contaminatie doet de huid van het gezicht meestal ook mee. Regen en vochtigheid zouden de aandoening in de hand werken. De 'lilyrash' kan zich over de gehele huid uitbreiden en ook chronisch verlopen. Plaatselijk zijn ulceraties, na voorafgegane verwonding der huid, mogelijk. Een veroorzakend agens kon door Walsh niet geïdentificeerd worden. Aan de rafiden, die in de rafidencellen van de plant voorkomen, schrijft Walsh een eventuele irriterende werking toe, die van belang kan zijn voor de pathogenese van de 'lilyrash'. Narcissensoorten vertonen verschillen in intensiteit in hun werking op de huid.

BROERS (1926) beschrijft in het handboek 'Die Schädigungen der Haut' verschillende huidafwijkingen, die door narcissen, hyacinthen en tulpen veroorzaakt worden. Voor de narcissen sluit Broers zich aan bij de opvattingen van Walsh.

Hyacinthenbollen zouden dikwijls huidirritaties veroorzaken. Volgens Broers schrijft FREEMAN dit toe aan kalkkristallen of mijten, die in de buitenste omhulsels van de bol te vinden zouden zijn.

Broers zelf neemt echter aan, dat de irritatie van de huid door het sap van de hyacinthenbollen veroorzaakt wordt. Hij heeft bij een patiënt een, door het werken met hyacinthenbollen, ontstane roodheid en jeuk aan de zijkanten der vingers waargenomen.

Tulpenbollen zouden ook dergelijke afwijkingen veroorzaken, maar deze zijn veel pijnlijker.

OVERTON (1926) onderzocht pakkers en sorteerders van enkele grote bloembollenbedrijven in Engeland om gegevens te verkrijgen over huidafwijkingen, die optreden bij het werken met bloembollen.

Er werd een aantal arbeiders gevonden, dat een precies onder de nagels gelocaliseerde 'dermatitis' had. Door het stukgaan van de huid gaf deze afwijking heftige pijn en arbeidsongeschiktheid. Door alle arbeiders werden de tulpenbollen als de oorzaak aangegeven. De afwijking trad reeds op na enige dagen werken met tulpenbollen.

De pathogenese van deze afwijking laat zich volgens Overton niet alleen door wrijving verklaren. Wrijving speelt minstens een even grote rol bij het werken met hyacinthenbollen en hierbij werd geen enkele klacht geconstateerd. Overton wijst erop dat hyacinthen- en narcissenbollen door meerdere deklagen omgeven zijn, terwijl de tulpenbol slechts één eenvoudige, tamelijk stevige beschermingsschil heeft, die bij manipulatie gemakkelijk stukgaat. Contact met de eigenlijke bolsubstantie is hierbij mogelijk.

Van de chemische samenstelling van het sap der bollen was weinig bekend. Het is Overton experimenteel gelukt met het perssap van tulpenbollen in korte tijd, zonder voorafgaande traumatisering, een subunguale prikkeling te verkrijgen. De auteur beschrijft het sap van de tulpenbol als 'bijtend', zodat wij mogen aannemen dat Overton deze afwijking als een toxische reactie beschouwt. Hij geeft aan, dat desondanks slechts enkele van de werkers de verschijnselen van de subunguale afwijking vertonen. Een oorzakelijk verband met de luis *leptus autumnalis*, zoals destijds werd aangegeven door het Internationale Arbeidsbureau als de veroorzaker van erythemen en irritatie van de conjunctivae bij het werken met hyacinthenbollen, acht hij zeer onwaarschijnlijk, daar het type van de ontsteking in het geheel niet lijkt op een ontsteking met een parasitaire oorsprong.

Bij de arbeiders die met narcissenbollen werkten, kon Overton een loslating van de huid aan de strekzijden van de eindphalangen der vingers constateren.

Het werken met hyacinthenbollen zou geen last veroorzaken, ofschoon Overton met de droge uitwendige schillen van de hyacinthenbol in de hals van een proefpersoon een vrij sterke 'irritatie' kon opwekken.

SCHOUTEN (1927, 1928) heeft onderzoekingen gedaan over de vraag of de jeukverwekkende eigenschap van de hyacinthenbol veroorzaakt wordt door mijten, het sap van de hyacinthenbol, of door rafiden uit de droge omhulsels van de hyacinthenbol.

De hyacinthenbollen worden in droge toestand gesorteerd en ondergaan daarna een temperatuurbehandeling. Bijna alle personen die deze werkzaamheden verrichten, hebben jeukklachten. Soms is de jeuk ondragelijk en slechts een kleine groep mensen (± 10 %) heeft in het geheel geen klachten.

Volgens Schouten is het hoogst onwaarschijnlijk dat het sap van de bol een rol speelt, daar de droge hyacinthenbol door vele vliesjes omgeven is en contact met de eigenlijke bolsubstantie hierdoor onmogelijk is bij het normaal hanteren der bollen.

Om de opvatting van Broers, dat het sap der bollen de oorzaak is van de irritatie, te ontzenuwen werden proeven gedaan met stof en schilletjes der hyacinthenbollen. Het stof en de schilletjes werden met warme alcohol behandeld. De bedoeling hiervan was eventuele aetherische oliën en glycosiden op te lossen. De aldus behandelde substanties werden uitgeperst en daarna gedroogd. Zij gaven evenveel jeukklachten als de onbehandelde materie van de hyacinthenbollen.

Tevens werd door Schouten onderzocht of de aanwezigheid van mijten, als mogelijke oorzaak van de jeuk, in aanmerking komt. Daartoe behandelde hij bollen met een alcoholoplossing om eventueel aanwezige mijten te doden. Na het hernieuwd drogen bleken deze bollen evenveel jeukklachten te geven als onbehandelde bollen.

De vliesjes bevatten rafidencellen, waaruit gemakkelijk de 100–200 μ lange rafiden kunnen vrijkomen.

Schouten vond dat de uitwendige schillen van droge hyacinthenbollen 6,25 % calciumoxalaat bevatten en het stof der werktafels bijna 7 %. De naaldjes zouden in de huid dringen en op deze wijze een mechanische irritatie veroorzaken.

Het feit dat zo'n geïrriteerde jeukende huid door het inwrijven met 10 % zoutzuur (waardoor de naaldjes oplossen) binnen een paar minuten vrij van klachten wordt, is een aanwijzing dat de calciumoxalaatkristallen inderdaad een oorzaak van de jeuk kunnen zijn.

Schouten onderscheidt van de jeuk door hyacinthenbollen een aandoening, die optreedt bij personen werkzaam in de tulpenbollenbedrijven. Deze laatste afwijking zou zich als een 'pustuleus eczeem' aan de vingers en handen voordoen, met somtijds een uitbreiding in het gezicht. Schouten poogde, door het sap van beschadigde jonge tulpenbollen in de huid van de *onderzoekers* te wrijven, een inzicht te verkrijgen in de aetiologie van deze afwijking. Deze onderzoekingen leverden echter geen resultaten op.

KRANENBURG (1930) zette het onderzoek van Schouten voort. Het sorteren van natte hyacinthenbollen gaf geen jeukklachten, het droge stof van de werktafels en vloeren gaf veel bezwaren. Microscopisch kon hij aantonen, dat rafiden vrijkomen door het verpulveren van hyacinthenbollenomhulsels.

WELKER (1931) beschrijft een geval van 'dermatitis', die samenhing met werkzaamheden met tulpen- en narcissenbollen. De afwijking bestond uit jeuk en zwelling van de eindphalangen der vingers met schilfering van de huid en ulceraties onder de nagels.

De patiënt was sedert 12 jaar in bepaalde seizoenen werkzaam met deze bollen. De laatste 6 jaar had hij in deze seizoenen last gekregen van de boven beschreven afwijking. Welker deed scarificatieproeven met waterextracten van narcissen- en tulpenbollen, waarbij bleek dat het tulpenbolextract een positieve reactie gaf.

Ter verdere opheldering van de pathogenese werden vervolgens 'contacttesten' gedaan met een waterextract, met een gedialyseerd 10 % 'zoutextract' en met een watervrij etherextract van de gedroogde tot poeder vermalen tulpenbollen. Hierbij bleek dat het etherextract en het waterextract positieve reacties gaven.

TOUTON (1932) geeft in het 'Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten (Jadassohn)' een opsomming van de tot die tijd bekende literatuur over huidafwijkingen bij werkers met narcissen-, hyacinthen- en tulpenbollen.

Afgezien van het merendeel der onderzoekingen, dat reeds in dit literatuuroverzicht werd behandeld, geeft Touton aan dat HOFFMAN en VON LOW aannemen dat hyacinthenbollen en andere 'knollen' als gewone huidprikkels (mechanisch?) zijn op te vatten. Bovendien wijst Touton op een publicatie van RICHTER (1930), die een geval van een eczeem behandelde, dat door tulpen veroorzaakt zou zijn, en een geval van een huidafwijking van de handen en gezicht, die later overging in een uitgebreide 'dermatitis', veroorzaakt door het afsnijden van narcissen. Richter diende deze patiënten als therapie intracutane injecties toe, respectievelijk van tulpen- en narcissensap. Volgens Richter moet men hierbij op de hoede zijn voor een verergering van de symptomen en de algemene toestand. De eerste injectie met dit perssap gaf in beide gevallen een erythemateuze geïnfiltreerde reactie na ± 48 uur. Bij het tulpeneczeem gaf een 2e injectie, 6 dagen na de eerste injectie toegediend, geen huidreactie. Richter schreef dit toe aan een ingetreden desensibilisatie.

PALMER (1934) beschreef de 'lilyrash' als een hinderlijke papuleuze aandoening aan de handen en onderarmen, volgens hem uitgaande van de uitvoergangen van zweetklieren of van de follikelopeningen, die overgaat in een nattend eczeem, die over het gehele lichaam kan generaliseren. Voorafgaande verwondingen van de huid zijn soms uitgangspunten van deze aandoening.

Vochtigheid van de huid is een belangrijke factor en een individuele gevoeligheid is verder een duidelijk kenmerk.

Palmer trachtte een inzicht in de aetiologie van deze aandoening te verkrijgen door onderzoekingen met intradermale injecties met, overigens niet nader aangeduide, extracten uit delen van 'Trumpet Daffodils' (*Narcissus pseudonarcissus* L.) en van 'Jonquilla Narcissi' (*Narcissus jonquilla* L.). Deze injecties van extracten van het stuifmeel en de bladeren gaven positieve reacties bij patiënten met een 'lilyrash'. De intracutane injecties met een extract van de bladeren gaven reacties na 24 tot 36 uur. Personen die niet lijdende waren aan een ,lilyrash', reageerden negatief of slechts weinig op de injecties van de bladeren en van het stuifmeel. Een extract, gemaakt van de stengels en bladeren van de daffodil, biedt volgens deze onderzoeker mogelijkheden voor een preventieve behandeling. Op grond van deze onderzoekingen meent Palmer de 'lilyrash' als een allergische aandoening te moeten beschouwen.

BERTWISTLE (1935) deed een onderzoek naar een huidafwijking, die in de Engelse bloembollenbedrijven bij de werkers met tulpenbollen veelvuldig zou voorkomen, en een ernstige bedreiging voor de werkzaamheden kan betekenen. Deze afwijking staat bij de bloembollenkwekers bekend onder de naam tulipfinger en zou volgens Bertwistle ook een veel voorkomende aandoening zijn in de Nederlandse bloembollenbedrijven.

De klinische symptomen beginnen reeds 12 uur na contact en zijn gekenmerkt door onverdragelijke tintelingen in de vingertoppen onder de nagels. Deze plekken onder de nagels worden zeer gevoelig en exsudatie van serum treedt op, gevolgd door granulaties tussen nagel en nagelbed. De nagel laat los, een hyperkeratose overlatend; de nagel zelf wordt bros en splijt gemakkelijk. Bij erge gevallen ontstaan subunguale abcessen en 'waterblazen' op de rugzijde der vingers.

Bertwistle bespreekt 3 mogelijkheden, die volgens hem een rol kunnen spelen in de aetiologie van de afwijking: mechanische factoren, de zuurgraad van de bollen en bacteriële invloeden.

CAULFIELD (1937) deed lapjesproeven met een in ether oplosbare fractie van gesnipperde tulpenbollen bij een patiënt met een 'dermatitis', veroorzaakt door werkzaamheden met tulpenbollen. De patiënt had 4 jaar met tulpenbollen gewerkt; de laatste 3 jaar echter met ernstige klachten in de tijd dat hij met tulpenbollen werkzaam was.

Lapjesproeven met de etherfractie gaven krachtige en langdurige reacties; daarentegen waren lapjesproeven met materiaal van een 'zoutextractie' en een 'glycerine-extractie' negatief. Scarificatieproeven gaven negatieve resultaten met alle fracties. Een Prausnitz-Küstner-reactie kon noch voor de scarificatieproeven, noch voor de lapjesproeven opgewekt worden. Volgens Caulfield maakten intramusculaire injecties met de etherfractie een preventieve behandeling van de patiënt mogelijk.

RAPPAPORT en WELKER (1937) beschreven een geval van een tulpenbollen 'dermatitis'. Het veroorzakend agens was aanwezig in een in ether oplosbare fractie van de tulpenbol.

LAPIÈRE en VAN CAUWENBERGE (1956) meenden bij een patiënt een sensibilisatie vastgesteld te hebben voor hyacinthen, aangezien de lapjesproeven met substantie van de hyacinthenbol positieve reacties gaven.

SCHWARTZ, TULIPAN en BIRMINGHAM (1957) beschrijven afwijkingen van de huid door contact met tulpen, hyacinthen en narcissen.

Bij arbeiders, die *beschadigde* hyacinthenbollen sorteren, komt een jeukende squameuse dermatitis voor, met pijnlijke fissuren onder de nagels. Lapjesproeven met gemacereerde pulp van hyacinthenbollen (speciaal Hollandse hyacinthen) geven bij deze ziektegevallen een positieve reactie.

Tulpenbollen kunnen pijnlijke laesies, met desquamatie van de huid onder en om de vingernagels, geven. Volgens Schwartz, Tulipan en Birmingham staat deze afwijking bekend als 'tulpenvinger'. Bol, stengel en bloem zouden in staat zijn deze 'tulpenvinger' te veroorzaken.
Narcissenbollen kunnen huidafwijkingen geven aan de phalangen van de vingers, waarbij de huid gemakkelijk loslaat. 'Cultivars van Trompetnarcissen en van Jonquilla-narcissen' kunnen een dermatitis geven, de zgn. 'lilyrash'.

Een arbeider, werkzaam in een grote broeikas, kreeg, evenals 20 % van de andere arbeiders die daar werkzaam waren, een heftige 'dermatitis' door het werken met de *Narcissus jonquilla*. Lapjesproeven met sap

en bloembladen gaven positieve reacties; het stuifmeel gaf daarentegen negatieve reacties.

Schwartz, Tulipan en Birmingham noemen de 'hyacinthenjeuk' niet in hun opsomming van huidafwijkingen, die door contact met tulpen, hyacinthen en narcissen kunnen ontstaan.

FRANKLAND (1958) meent dat het sap van de stengels, bloemen en bollen van narcissen, tulpen en hyacinthen een primaire irritatie kan veroorzaken, die zich zou uiten in pijnlijke kloven aan de vingers van bloemisten.

Een jeukende 'dermatitis', overgrijpend op de handruggen en polsen, is daarentegen, volgens Frankland, waarschijnlijk een contact-'eczeem'. Lapjesproeven werden echter niet gedaan. De 'rhinitis', waaraan een marktverkopersechtpaar leed, schreef Frankland toe aan insecticiden, die gebruikt worden in kwekerijen van bloembollen.

VAN DER WERFF (1959) maakt onderscheid tussen:

I. de afwijking die ontstaat bij het hanteren van tulpenbollen;
II. de jeuk die het werken met hyacintenbollen belemmert, en
III. de huidafwijkingen die bij personen optreden, die in de narcissencultuur werkzaam zijn.

Hij wijst op het merkwaardige feit dat deze aandoeningen eigenlijk zo weinig de aandacht getrokken hebben. Hij wijt dit voornamelijk aan de mogelijkheden, die de grote bloembollenbedrijven hebben, om arbeiders met bepaalde klachten ander werk te laten doen. Het zijn dan ook de kleine bedrijven die medische hulp inroepen. Het geloof is ook algemeen verbreid dat er weinig aan te doen is.

Ad I. Volgens van de Werff staat de aandoening, die optreedt bij het hanteren van tulpenbollen, bekend als het 'tulpenvuur'. Deze afwijking zou hoofdzakelijk bestaan uit een desquamatie van de huid onder en rondom de nagels, die gepaard kan gaan met pijnlijke kloven aldaar. Een uitbreiding, voornamelijk in het gezicht, is mogelijk, waarbij de huidlaesies de kenmerken vertonen van een erythemato-squameuze dermatose met gezwollen rode en strakke oogleden.

De aetiologie van deze aandoening is volgens van der Werff echter nog niet met zekerheid bekend. Wat de exogene factoren aangaat: het is volgens hem buiten twijfel dat 'naast een primair irriterend effect een

allergische oorzaak de hoofdzaak is in deze gevallen, zoals aangetoond wordt door experimenten, inclusief met controlepersonen, maar ook door therapeutische resultaten'. Naar aanleiding van een ziektegeval bespreekt van der Werff de afwijking, die bekend zou staan als 'tulpenvuur'.

Patiënt vertoonde de typische kenmerken van de afwijkingen, en de klachten hingen samen met werkzaamheden met tulpenbollen; stoppen van het werk gaf verbetering, hervatten van het werk gaf een recidief. Dit prompte recidief trad ook nog op na een 20-jarige onderbreking van de werkzaamheden met tulpenbollen. Vóór het optreden der klachten had patiënt jarenlang zonder klachten met tulpenbollen gewerkt.

Een allergologisch onderzoek, door middel van intracutane injecties met isotonische zoutoplossingen van extracten van verschillende tulpensoorten, gaf voornamelijk het beeld van de 'delayed type' reacties, ofschoon een enkele 'immediate' reactie ook optrad.

Ad II. De jeuk die optreedt bij het werken met hyacinthen, wordt ook wel 'hyacinthenschurft' genoemd. Van der Werff beschrijft deze jeuk als 'een onaangename jeuk met roodheid en zwelling van de huid, die in enkele gevallen samengaat met blaasjesvorming en locale verdikkingen van de huid (vesiculo papuleuze reactie)'. Niet alleen de onbedekte huidgedeelten zijn aangetast; er zijn voorkeurslocalisaties, zoals de binnenzijde van de onderarmen, de oogleden, het gebied om de neus, achter de oren, onderkaak en hals. Ook drukplaatsen, zoals het middel, liesstreek, binnenkant der dijen, geslachtsdelen en rondom de anus zijn voorkeursplaatsen.

Deze afwijkingen zouden vooral optreden gedurende het verwarmingsproces der bollen en gedurende het sorteren, schillen en snijden der hyacinthenbollen. Speciale variëteiten en subvariëteiten geven meer klachten.

De oorzaak van de jeuk wordt door Van der Werff, evenals Schouten en Kranenburg, toegeschreven aan irritatie door rafiden. Hij veronderstelt dat de irritaties niet slechts door de mechanische prikkeling wordt veroorzaakt, maar dat tevens op het rafidenoppervlak vastgehechte bestanddelen van de rafidencellen een rol spelen.

Ad III. Bij de werkers met narcissen kunnen veranderingen opgemerkt worden aan de huid van de handen, oogleden en genitalia. De 'Poetaz'-narcissen zouden speciaal die afwijkingen veroorzaken.

Het bloemen plukken en het bollen inpakken zijn de werkzaamheden,

die de meeste last veroorzaken. De afwijking zou bestaan uit een gelocaliseerde 'exfoliatieve dermatitis' en heeft de naam gekregen van 'lilyrash' of 'narcissenrot'. Een vesiculeuze uitbreiding, die de kenmerken heeft van een vesiculeus eczeem, is vanuit deze haarden mogelijk.

Samenvattend komen volgens *Van der Werff* voor het ontstaan van de bovengenoemde huidafwijkingen de volgende exogene factoren in aanmerking:

a. Uit rafidencellen vrijgekomen rafiden spelen bij hyacinthen en in mindere mate misschien eveneens bij narcissen een rol als aspecifieke primaire irritantia.

b. Specifiek allergene substanties
Van de allergenen, die mogelijk in het sap van de hyacinth, tulp of narcis aanwezig zijn, is niet veel bekend. Er worden verschillende mogelijkheden genoemd: polyhydrobenzenen, micromoleculaire substanties die verbindingen aangaan met eiwitten, etherische oliën, proteïnen, alcaloïden, harsen en met histamine verwante stoffen.

Insecticiden, fungiciden, enz., die in de bloembollencultuur gebruikt worden, kunnen ook als eventuele allergenen opgevat worden en misschien kunnen schimmels eveneens zo'n werking vertonen.

c. Primair toxische stoffen, of primair toxische stoffen die tevens een allergene werking hebben. Een combinatie van een primair toxische stof, die een wegbereider is voor een allergeen, en een allergeen is ook denkbaar.

MC CORD (1962) geeft slechts aan dat de narcis een dermatitis kan geven en plaatselijke desquamatie van de huid. De tulp kan aanleiding geven tot het ontstaan van een 'dermatitis', die onder bloemisten de naam heeft van 'tulipfinger'. De hyacinth veroorzaakt 'pruritis' en 'contact dermatitis'.

Bezien wij de thans beschikbare literatuur over huidafwijkingen als gevolg van het contact met bloembollen, dan kan worden vastgesteld dat er huidafwijkingen worden beschreven als het gevolg van het manipuleren met tulpen en narcissen.

Bij de huidafwijkingen als gevolg van een contact met hyacinthen is het symptoom jeuk alles overheersend, ofschoon er ook gevolgen worden

aangegeven die gelijkenis vertonen met de huidafwijkingen door contact met tulpen en narcissen.

Hieronder zal een kritische bespreking plaatsvinden van de huidafwijkingen van de boven aangeduide drie categoriën en zal worden nagegaan welke aetiologische factoren door de auteurs aanwezig worden verondersteld.

Tulpen

Het klinische beeld van de huidaandoening als gevolg van het werken met tulpenbollen wordt in de literatuur door een aantal onderzoekers met 'dermatitis', zonder nadere specificatie, aangeduid (Richter, Caulfield, Mc Cord). Schouten geeft meer details; de aandoening duidt hij aan als een 'pustuleus eczeem' aan vingers en handen met ook wel afwijkingen in het gezicht. Overton, Welker, Bertwistle, Schwartz, Tulipan, Birmingham, Van der Werff en Frankland zijn nauwkeuriger in de beschrijving van de klinische symptomen. Zij beschrijven de afwijking als een voornamelijk onder en om de nagels gelocaliseerde erythemato-squameuze aandoening, met kloven en ulceraties, die zeer pijnlijk zijn. Bertwistle wijst op het symptoom van het loslaten der nagels, granulaties en hyperkeratotische veranderingen. Uitbreiding vanuit deze laesies op de handen en aantasting van andere huidgedeelten, zoals het gezicht, is mogelijk (Frankland, Van der Werff, Schouten).

Schwartz, Tulipan en Birmingham en Frankland menen dat ook de stengel en bloem in staat zijn deze afwijking te veroorzaken. Schwartz, Tulipan, Birmingham en Van der Werff geven aan dat de huidafwijking, als gevolg van contact met tulpenbollen, in het bloembollenbedrijf bekend staat als 'Tulpenvinger' of 'Tulpenvuur'. Onze waarnemingen bij patiënten en de beschrijving van de afwijking door personen uit het bloembollenvak komen overeen met de symptomen die door Van der Werff en Bertwistle zijn beschreven.

De literatuur geeft echter over de aetiologie en de pathogenese weinig exacte gegevens.

Vergelijken wij de gegevens uit de literatuur met het schema, dat wij in het begin van het hoofdstuk hebben gegeven, dan komen wij tot het volgende:

a. Primair toxische stoffen

1. stoffen die door de tulp geproduceerd worden.
Overton en Broers menen dat huidirriterende chemische invloeden uit het sap van de tulpenbol de huidafwijking veroorzaken. Frankland meent dat ook het sap van de stengels en bloemen van de tulp primair irriterend (toxisch) is. Bij uitbreiding der huidverschijnselen is waarschijnlijk een sensibilisatie opgetreden. Het zou Overton experimenteel gelukt zijn om met het uitgeperste sap van tulpenbollen in korte tijd, zonder voorafgaande traumata, een subunguale prikkeling te verkrijgen. Schouten kon echter met het sap van tulpenbollen geen reacties teweegbrengen bij personen die geen tulpenvingers hadden. Bertwistle meent dat de zuurgraad van de bol eventueel een rol kan spelen.
2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering en voor het bestrijden van insecten, virussen e.d.
In de literatuur wordt hierover met geen woord gerept. Alleen Frankland geeft aan dat een 'toxische rhinitis' een gevolg kan zijn van bepaalde insecticiden, die in de bollencultuur gebruikt worden.
3. afscheidingsproducten van parasieten, bijv. schimmels, bacteriën e.d.
Bertwistle wijst op de mogelijkheid dat bacteriën in de genese van de 'tulip finger' een rol spelen.

b. Sensibilisatie voor chemische verbindingen

1. stoffen, die in de tulpenbol en andere delen van de plant voorkomen.
De onderzoekingen van Richter, Welker, Caulfield en Van der Werff maken het waarschijnlijk, dat een sensibilisatie een essentiële rol speelt in de genese van de tulpenvinger. Proeven met intracutane injecties en lapjesproeven van extracten en perssap gaven positieve reacties. Volgens Richter en volgens Van der Werff waren dit voornamelijk reacties van het zgn. 'delayed type'. Frankland meent, dat alleen de uitbreiding aan de handen een 'contact-eczeem' is.
2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering, insectenbestrijding, enz.
Ofschoon er sensibilisaties bekend zijn voor dergelijke middelen, geeft de literatuur over de huidafwijkingen ten gevolge van het contact met tulpenbollen geen aanwijzingen in die richting. Van der Werff noemt de mogelijkheid, maar gezien de uitslag van de intracutane injecties, lijkt de kans gering dat dit een essentiële rol speelt.

3. afscheidingsproducten van parasieten.
De mogelijkheid, dat de tulpvinger eventueel een bacteriële genese kan hebben, wordt slechts door Bertwistle geopperd.

c. Irritatie door mechanische oorzaken

1. wrijving.
Overton en Bertwistle achten de mogelijkheid zeer gering, dat wrijving de oorzaak van de tulpenvinger is.
2. bestanddelen van planten, zoals harde schilletjes en calciumoxalaatkristallen.
Bertwistle acht een mechanische oorzaak van de tulpenvinger uitgesloten. Hoffman en Von Low achten dit eventueel mogelijk. Volgens Van der Werff bezit de tulp geen rafidencellen, en hij achtte daarom een mechanische oorzaak onwaarschijnlijk.
3. mechanische irritatie door parasieten.
Overton acht een oorzakelijk verband met parasieten hoogst onwaarschijnlijk, aangezien het type van de aandoening in het geheel niet lijkt op een ontsteking met parasitaire oorsprong.

Hyacinthen

Hyacinthenbollen schijnen dikwijls irritaties te veroorzaken (Broers). Uit het literatuuroverzicht blijkt dat pruritis het meest voorkomende symptoom is. Schouten, Kranenburg en Van der Werff hebben de meest uitgebreide onderzoekingen gedaan naar de oorzaak van deze jeuk. Van der Werff beschrijft deze klacht als "een onaangename jeuk met roodheid en zwelling van de huid, die in enkele gevallen samengaat met blaasjesvorming en locale verdikkingen der huid (papulo-vesiculeuze reactie)'. Deze pruritis heeft voorkeurslocalisaties; de onbedekte huid en drukplaatsen zijn de belangrijkste. Bijna alle personen die werkzaamheden verrichten met droge hyacinthenbollen, hebben last van jeukklachten (Schouten). Schwartz, Tulipan en Birmingham vermelden deze pruritisklachten niet in hun verhandeling over door bloembollen veroorzaakte huidafwijkingen. Overton maakt slechts melding van een 'irritatie', die hij met droge hyacinthenschillen heeft opgewekt bij een proefpersoon.

Bloemisten zijn gewend deze jeukende aandoening 'Hyacinthenschurft' te noemen (Van der Werff).

Afgezien van deze jeukende irritatie van de huid, worden in de literatuur gevolgen aangegeven door contact met de bollen, stengels en bloemen van de hyacinth, die gelijkenis vertonen met de afwijking, die wij bij de tulpen hebben leren kennen. Schwarz, Tulipan en Birmingham vermelden, dat een jeukende dermatitis met pijnlijke fissuren onder de nagels voorkomt bij arbeiders, die *beschadigde* hyacinthenbollen sorteren. Broers noemt een geval, waarbij de patiënt na contact met hyacinthenbollen roodheid en jeuk waarnam aan de zijkanten van zijn vingers. Frankland meent dat het sap van de stengels, bol en bloemen van hyacinthen pijnlijke kloven aan de vingers kunnen veroorzaken, met uitbreidingen aan de handen.

Vergelijken wij nu literatuurgegevens betreffende hyacinthen met het schema uit het begin van dit hoofdstuk, dan komen wij tot het volgende overzicht:

a. Primair toxische stoffen.

1. stoffen die door de hyacinth geproduceerd worden.
Frankland meent dat het sap van de stengels, bloemen en bollen van de hyacinth primair kan optreden als irriterende stof. Dit agens zou pijnlijke kloven aan de vingers veroorzaken; bij uitbreiding der huidverschijnselen is waarschijnlijk een sensibilisatie opgetreden. Broers acht de waarschijnlijkheid groot dat irritatie door hyacinthenbollen door het sap van de hyacinthenbol veroorzaakt wordt. Schouten ontkent dit. Van der Werff oppert de mogelijkheid dat de jeuk, die optreedt bij het werken met droge hyacinthenbollen, niet alleen veroorzaakt wordt door een mechanische prikkeling door rafiden. Hij vermoedt dat daarnaast aan het oppervlak van de rafiden vastgeplakte stoffen (cytoplasma, slijm, etc.) van de rafidencellen een rol kunnen spelen bij het veroorzaken van hyacinthendermatitis (chemisch-toxisch effect).

Mc Cord meent dat de hyacinth pruritis veroorzaakt en 'contactdermatitis'.

2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering en voor het bestrijden van parasieten.

Het literatuuroverzicht geeft op dit gebied geen inlichtingen.

3. afscheidingsproducten van parasieten.
Overton vermeldt dat door officiële instanties, die zich bezighouden met arbeidsvraagstukken, de erythemen van de huid en irritaties van de

conjunctivae bij werkers met hyacinthenbollen worden toegschreven aan de *Leptus autumnalis*. In hoeverre een toxische werking aan deze luis moet worden toegeschreven, is niet uit te maken met de gegevens die het literatuuroverzicht verschaft.

b. Sensibilisatie door chemische verbindingen

1. stoffen, die in de hyacinthenplant voorkomen.
Lapière en van Cauwenberge menen bij een patiënt een sensibilisatie voor hyacinthen te moeten vaststellen op grond van de positieve reacties van lapjesproeven met substantie van de hyacinthenbol. Schwartz, Tulipan en Birmingham zijn deze mening ook toegedaan voor het ontstaan van een jeukende dermatitis met pijnlijke kloven aan de vingers bij arbeiders die beschadigde hyacinthenbollen sorteren. Bij deze patiënten werden positieve lapjesproeven gevonden met substantie van de hyacinthenbol.

Frankland meent dat de secundaire uitbreiding van de pijnlijke kloven aan de vingers van arbeiders, die met hyacinthenbollen werken, een 'contact-eczeem' is.

2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering, insectenbestrijding, enz.
Van der Werff noemt de mogelijkheid. In het literatuuroverzicht zijn echter geen voorbeelden van dergelijke sensibilisaties te vinden.

3. afscheidingsproducten van parasieten.
Onder *a*3 werd reeds de mogelijkheid overwogen, dat de luis '*Leptus autumnalis*' erthemen van de huid en irritaties van de conjunctivae zouden veroorzaken. Een allergie t.o.v. afscheidingsproducten van deze luis is theoretisch mogelijk. Aanwijzingen voor deze zienswijze worden echter niet in het literatuuroverzicht gevonden.

c. Irritatie door mechanische oorzaken

1. wrijving.
Volgens Overton veroorzaken werkzaamheden met hyacinthenbollen geen klachten. Hij gebruikt dit feit als argument om aan te tonen dat wrijving geen rol speelt voor het ontstaan van de 'tulpenvinger', daar wrijving bij het hanteren van hyacinthenbollen minstens een even grote rol speelt.

2. bestanddelen van planten, als harde schillen, rafiden.
Schouten en Kranenburg schrijven de jeukverwekkende eigenschap van droge hyacinthenbollen toe aan de irriterende werking van de vrijkomende rafiden.

Van der Werff deelt de mening van Schouten en Kranenburg. Hoffman en Von Low menen dat hyacinthenbollen als gewone (mechanische?) huidprikkels zijn op te vatten.

3. mechanische irritatie door parasieten.

De zienswijze, dat de jeukverwekkende eigenschappen van de hyacinthen bollen berusten op een mechanische irritatie door mijten, lijkt door de onderzoekingen van Schouten hoogst onwaarschijnlijk.

Narcissen

De klinische verschijnselen van de huidafwijkingen, die optreden onder narcissenplukkers, worden door Walsh en Palmer beschreven als een erythemato-papulo-vesiculeuze aandoening, voornamelijk gelocaliseerd aan de handen en onderarmen, die kan overgaan in een nattend eczeem. Contaminatie, door middel van de handen, van het gezicht is mogelijk en men kan dergelijke afwijkingen dan ook in het gezicht vinden. Deze 'lylirash' kan generaliseren of een chronisch beloop krijgen (Walsh). Beide auteurs leggen de nadruk op voorafgaande verwonding van de huid, die een rol kan spelen als uitgangspunten voor de afwijking met mogelijkheid tot oppervlakkige ulceraties. Vochtigheid van de huid is een praedisponerende factor. Volgens Palmer gaat de afwijking voornamelijk uit van de uitvoergangen der zweetklieren en haarfollikels.

Broers sluit zich aan bij de opvatting van Walsh.

Overton en Schwartz, Tulipan en Birmingham menen dat narcissenbollen huidafwijkingen kunnen veroorzaken aan de phalangen der vingers. De verschijnselen zijn hier meer van plaatselijke aard en bestaan uit een exfoliatie van de huid.

Van der Werff schrijft dat bij arbeiders die met narcissen werken, 'huidveranderingen' kunnen plaatsvinden aan de vingers, handen, armen oogleden en genitalia. Van der Werff beschreef ook een 'exfoliatieve dermatitis' aan de vingers van personen, die narcissenbollen verpakken of de bloemen plukken. Volgens Frankland zouden narcissenbollen, stengels en bloemen van de narcis aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van pijnlijke kloven aan de vingers met een mogelijkheid tot eczemateuze uitbreidingen aan de handen. Mc Cord geeft slechts aan dat de narcis een dermatitis en een plaatselijke desquamatie van de huid kan geven.

De literatuur betreffende huidafwijkingen veroorzaakt door narcissen wordt hieronder aan het eerder genoemde schema getoetst:

a. Primaire toxische stoffen

1. stoffen die door de narcis geproduceerd worden.
Frankland meent dat het sap van de stengels, bloemen en bollen van narcissen kan optreden als primair irriterende stof. Mc Cord geeft aan dat de narcis een 'dermatitis' kan geven met plaatselijke desquamatie van de huid. Het is niet met zekerheid uit te maken of hij een zuiver toxische oorzaak aanneemt. Overton laat zich niet uit over de genese van huidafwijkingen als gevolg van contact met de narcis.
2. chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering en voor het bestrijden van insecten, virussen e.d.
3. afscheidingsproducten van parasieten, bijv. schimmels, bacteriën e.d.
Aanwijzingen dat *a*2 en *a*3 een rol spelen, zijn in de literatuur niet te vinden.

b. Sensibilisatie door chemische verbindingen

1. stoffen, die in de narcissenbol en plant voorkomen.
Walsh, Palmer, Broers, Richter en Schwartz, Tulipan en Birmingham nemen een allergische genese aan voor de huidafwijkingen, die veroorzaakt worden door contact met de narcis. Van der Werff is niet duidelijk in zijn oordeel.
2. Chemicaliën, die gebruikt worden voor grondverbetering, insectenbestrijding enz.
3. Afscheidingsproducten van parasieten.
Over *b*2 en *b*3 zijn geen gegevens in de literatuur te vinden.

c. Irritatie door mechanische oorzaken

1. wrijving.
Overton meent dat wrijving geen rol kan spelen, daar hij geen afwijkingen kan constateren bij het hanteren van narcissenbollen.
2. bestanddelen van planten als harde schillen en rafiden.
Walsh schrijft een eventueel irriterende werking toe aan rafiden. Van der Werff acht bij de narcis rafiden van weinig belang.
3. mechanische irritatie door parasieten.
In de literatuur worden hiervoor geen aanwijzingen gevonden.

Wanneer wij nu op grond van deze veelheid van gegevens uit de literatuur trachten tot een samenvatting van het tot dusver bekende te komen, dan zien wij drie ziektebeelden naar voren komen. Ten eerste de tulpenvinger, ten tweede de hyacinthenjeuk en ten derde een aantal minder frequente huidafwijkingen, te wijten aan narcissen en andere planten. Op grond van de literatuur kan men de tulpenvinger beschrijven als 'een aan de vingers gelocaliseerde pijnlijke sub- en periunguale erythemato-squameuse aandoening waarbij kloven, ettering en hyperkeratotische veranderingen kunnen voorkomen'.

In de literatuur zijn de volgende feiten te vinden, die van belang zijn voor onze kennis van de 'tulpenvinger':

a. De aandoening openbaart zich voornamelijk in de tijd dat er met tulpenbollen gewerkt wordt.

b. Uitgaande van de 'tulpenvinger' komen erythemateuze uitbreidingen voor aan de vingers, handen en gezicht. Soms zijn de reacties nog uitgebreider.

c. Personen, die in de tulpencultuur werkzaam zijn, hebben aanvankelijk geen klachten. Soms ontstaat de aandoening na weken, maar meestal na jaren werken met tulpenbollen.

De verschillende auteurs gebruiken begrippen als dermatitis, contactdermatitis, -eczeem e.d. Om verwarring te voorkomen, dienen wij eerst tot een definiëring te komen, wat wij precies hieronder zullen verstaan.

Op grond van praktische overwegingen gebruiken wij de diagnose eczeem in de meest ruime zin van het woord. Onder eczeem verstaan wij een min of meer polymorphe dermatose, met een karakteristiek verloop, waarbij roodheid, schilfering, papels, blaasjes en korsten in bonte afwisseling kunnen voorkomen. Een contacteczeem is dan een eczeem, waarbij een inwerking van buitenaf de belangrijkste aetiologische factor is. Wij zullen deze contacteczemen weer verdelen in contactezemen, die berusten op een allergie ten gevolge van een sensibilisatie en contacteczemen, die berusten op plaatselijk inwerkende schadelijke (toxische) invloeden. Het woord dermatitis wordt door ons niet gebruikt, daar het gemakkelijk tot verwarring aanleiding geeft.

Bezien wij nog eens de verschillende oorzaken, die volgens de geciteerde onderzoekers aanleiding geven tot het ontstaan van tulpenvingers, dan neigen de meeste onderzoekers in de laatste tijd tot een allergische genese.

Enkele onderzoekers wijten daarentegen de aandoening geheel aan orthoergische (toxische) invloeden.

Een combinatie van een allergisch en orthoergisch mechanisme is theoretisch mogelijk, en wel:

1. doordat orthoergische invloeden de wegbereiders kunnen zijn voor een aansluitende sensibilisatie voor dezelfde stof, zoals dit het geval is bij primine, dat in sterke concentratie bij iedereen een toxische reactie geeft, waarna de patiënt voor hogere verdunningen van primine gesensibiliseerd blijkt te zijn (Bloch 1927);
2. doordat orthoergische invloeden de mogelijkheid scheppen dat er een sensibilisatie optreedt voor een andere stof;
3. dat een allergisch contacteczeem onderhouden wordt door orthoergische invloeden.

Dat zuiver mechanische invloeden een essentiële rol spelen in de pathogenese lijkt, gezien de gegevens uit de literatuur, weinig waarschijnlijk. Rafidencellen komen in tulpen niet voor.

Een nader onderzoek over de zogenaamde tulpenvinger zal dus een antwoord moeten geven op de volgende vragen:

1. Is de tulpenvinger een allergische aandoening?
2. Wat is het allergeen dat de tulpenvinger veroorzaakt?
3. Waar komt dit allergeen in de tulpenplant voor?
4. Zijn er tulpensoorten of rassen, die rijker zijn aan het eventuele allergeen dan andere?
5. Welke maatregelen kunnen ter preventie genomen worden?

HOOFDSTUK III

Eigen onderzoek naar de pathogenese van de „tulpenvinger"

Bij de aanvang van het onderzoek (1962) konden wij in de archieven van de Dermatologische afdeling van het Academisch Ziekenhuis te Leiden en van het Gemeenteziekenhuis Zuidwal te Den Haag twee ziektegeschiedenissen van patiënten met huidaandoeningen ten gevolge van contact met tulpen vinden. Een patiënt die tulpenbollen 'gepeld' had, vertoonde symptomen die overeenkwamen met de in de literatuur beschrevene. De andere patiënt, die tulpenbollen afgesneden had, vertoonde een meer algemene eczemateuze reactie, met vesikels, bullae en erosies aan de handen. Lapjesproeven met tulpenbestanddelen vielen bij deze patiënten positief uit.

Het is een opvallend feit dat er in de loop van de jaren zo weinig ziektegevallen onder behandeling kwamen in beide dermatologische centra. Dit is echter in overeenstemming met hetgeen Van der Werff, in zijn onderzoek naar huidafwijkingen in de bloembollencultuur, heeft waargenomen. Van der Werff weet dit aan het in de bollenstreek verbreide geloof, dat er aan deze aandoening weinig te doen is.

Gezien het geringe patiëntenaantal met een acuut beeld, besloten wij ons onderzoek te verrichten met vrijwilligers uit het bloembollenvak. Een proefpersoon[1] moest enige tijd duidelijk klachten van tulpenvingers vertoond hebben. Voor controle werden personen gekozen, die niet afkomstig waren uit de bloembollenstreek, daar vele bewoners uit de bloembollenstreek in contact zijn geweest met bloembollen en mogelijk een zgn. 'stomme' sensibilisatie hebben ondergaan.

Oriënterende onderzoekingen werden eind 1963–begin 1964 met 4 patiënten begonnen. Lapjesproeven met vers materiaal van tulpenbollen[2] gaven positieve reacties bij deze patiënten en negatieve resultaten bij controles. Dit oriënterende onderzoek steunde de opvatting dat een allergische genese ten grondslag ligt aan de tulpenvinger. Dit werd later

1. In het vervolg worden deze proefpersonen *patiënten* genoemd om verwarring te voorkomen. Onder *proefpersonen* of controlepersonen worden voortaan personen verstaan, die nooit verschijnselen van een tulpenvinger vertoond hebben.
2. Cultivar onbekend.

bevestigd door positieve reacties bij 8 patiënten, met negatieve resultaten bij 4 controlepersonen, van lapjesproeven met uitgeponste stukjes bolrok van verse tulpenbollen. Bij de 4 patiënten van het oriënterend onderzoek werd ook nagegaan of het werkzame agens bij het drogen van tulpenbollen bewaard blijft. Hiervoor werden tulpenbollen[1] fijngesneden, de snippers in een droogkast bij 40 °C gedroogd en vervolgens tot poeder gemalen. Voor lapjesproeven werd dit poeder iets bevochtigd met water. De 4 patiënten vertoonden positieve reacties op lapjesproeven met dit poeder. Controles reageerden negatief op dit poeder.

Bij tulpenbollen, die wij tot in de winter op een droge plaats bewaard hadden, bleek de epidermis van de bolrokken (zie hoofdstuk I) gemakkelijk met een mesje los te maken van de onderlaag. Lapjesproeven met stukjes van de losgemaakte epidermis bleken bij 2 patiënten positieve reacties te geven. Het onderliggende weefsel van de bolrok gaf bij de 2 patiënten een negatieve reactie. In het voorjaar van 1964 werden bij 3 patiënten proeven gedaan met de epidermis van de bolrokken van de jonge bijbollen die uit de moederbol ontstaan zijn (zie hoofdstuk I). Deze jonge bollen bleken allergene stoffen niet alleen in de periferie, maar tevens in de centrale weefsels te bevatten.

De lapjesproeven met de epidermis gaven echter de sterkste reacties. Lapjesproeven bij controles waren negatief. Het feit dat het centrale weefsel van de bolrok nu ook positieve lapjesproeven gaf was voor ons aanleiding om ook lapjesproeven te doen met bestanddelen van de uitgegroeide tulpenplant. Proeven bij 5 patiënten wezen uit dat het werkzame agens ook in stengels, bladeren en bloemen van de tulp voorkomt. De bloemblaadjes veroorzaakten over het algemeen minder reacties.

Bij het bovengenoemde onderzoek met 8 patiënten was het uitgeponste stukje bolrok in de lapjesproef altijd zo aangebracht, dat de epidermis in contact kwam met de huid.

Wij mogen aannemen dat de epidermis van de bolrokken een weefsel is, waarin het werkzame agens steeds te vinden is, ook als het bij oude bollen uit overige weefsels van de rokken verdwenen is.

Op grond van de in dit hoofdstuk beschreven bevindingen werd een allergische genese van de tulpenvinger voldoende bewezen geacht[2].

Het onderzoek werd nu gericht naar het opsporen en isoleren van het werkzame agens.

1. Cultivar is ons niet bekend.
2. In 1964 verscheen een publicatie van KLASCHKA, GRIMM en BEIERSDORF, waarin eveneens geconcludeerd werd tot een allergische genese van de tulpenvinger.

HOOFDSTUK IV

Het afzonderen en zuiveren van de sensibiliserende stof

Zoals in hoofdstuk III is aangetoond, is in de tulpenbol een sensibiliserend agens aanwezig. De epidermis van de bolrokken is waarschijnlijk bijzonder rijk aan deze stof.

Het aantonen in en het afzonderen van een onbekende stof uit een gecompliceerd materiaal als een tulpenbol is in beginsel slechts mogelijk door scheidingstechnieken toe te passen, waarbij men telkens nagaat welke fracties allergische reacties kunnen veroorzaken. Bovendien moet men bij het onderzoek rekening houden met de mogelijkheid dat het werkzame agens tijdens de bewerking verandert; het kan omgezet worden tot onwerkzame stoffen of tot toxische stoffen.

HJORTH maakte in 1961, voor een onderzoek naar allergische reacties op Perubalsem, gebruik van kolomchromatografie. Door met elke, in U.V. fluorescerende, zone van de ontwikkelde kolom lapjesproeven te doen, slaagde hij erin de allergeenhoudende fractie te localiseren.

PIRILÄ (1959) maakte gebruik van lapjesproeven met electrophoresestrips bij een onderzoek naar de allergene component van een bacitracine mengsel.

1. *Oriënterende proeven*

25 gram droog tulpenbolpoeder werd achtereenvolgens in een Soxhletapparaat 2 × 8 uur geëxtraheerd met 200 ml petroleumether (Kpt. 40/60°), 200 ml chloroform, 200 ml ethanol 96 % en 200 ml methanol. Het dusdanig geëxtraheerde poeder werd vervolgens nog met water bij kamertemperatuur geëxtraheerd (maceratie: schudmachine). Bij deze wijze van extractie worden de geëxtraheerde stoffen bij het Soxhletteren telkens 2 × 8 uur op de kooktemperatuur van het gebruikte extractiemiddel gehouden. Derhalve worden de verkregen extracten aangeduid met 'de warme reeks'. De verkregen extracten werden bij verminderde druk (± 5 mm kwik) afgedestilleerd, waarbij de temperatuur niet boven de 38 °C kwam. Precies dezelfde reeks extracten werd met 25 gram poeder

door maceratie bij kamertemperatuur bereid (schudmachine 2 × 8 uur). Bij de bereiding van de extracten volgens het maceratieprocédé zijn de geëxtraheerde stoffen nooit aan temperaturen hoger dan 38 °C (afdestillatie onder verminderde druk) blootgesteld. Deze extracten werden derhalve aangeduid als 'de koude reeks'. Van de ingedampte extracten werden oplossingen gemaakt met het oplosmiddel, dat voor de desbetreffende extractie was gebruikt, om deze te testen op hun allergische werking.

Zoals uit de literatuur bekend is, zijn sommige onverdunde oplosmiddelen bij lapjesproeven toxisch voor de huid. Deze oplossmiddelen werden derhalve met water of olijfolie verdund tot een concentratie waarbij geen toxische werking optreedt.

De petroleumether werd tot 60 % verdund met oleum olivarum;
de chloroform werd tot 40 % verdund met oleum olivarum;
de ethanol werd tot 70 % verdund met H_2O;
de methanol werd tot 70 % verdund met H_2O;
de concentratie van de extracten bedroeg in alle oplossingen 2 %.

Het onderzoek met lapjesproeven van deze testextracten gaf de volgende resultaten bij 3 personen, die allergisch reageerden op tulpenbollen.

TABEL I

Lapjesproeven met extracten

extract	Pat. 64–179		Pat. 64–67		Pat. 64–151	
	warme reeks	koude reeks	warme reeks	koude reeks	warme reeks	koude reeks
petroleumether	—	—	—	—	—	—
chloroform	±	—	?	—	—	—
ethanol	++	++	++>	++>	zw +	+
methanol	±	+	+	±	zw +	+
water	—	—	—	—	—	—

verklaring: — = negatief
+ = positief
> = reactie groter dan lapje

De bevindingen waren dus zowel bij de 'warme' als bij de 'koude' reeks bij 3 patiënten gelijk. Proeven bij 3 controles vielen negatief uit. Lapjesproeven met het 5 maal geëxtraheerde tulpenbolpoeder waren bij 4

patiënten negatief. Hieruit bleek dat het werkzame agens volledig was geëxtraheerd.

Uit deze proeven kunnen wij de conclusie trekken dat de allergisch werkzame stof vrijwel kwantitatief met alcohol van 96 % te extraheren is en dat de extractie nauwelijks temperatuurafhankelijk is. Bovendien is aangetoond dat het werkzame agens binnen het onderzochte traject niet temperatuurgevoelig is.

TABEL II

Bij het vooronderzoek toegepaste reagentia op papierchromatogrammen

Reagens	Stoffen die kunnen worden aangetoond	Duidelijke vlekken op het chromatogram
Ninhydrine [1]	aminozuren	+
	aminen	+
Echtblausalz B (Diazoreagens) [2]	vele phenolen	+
Gediazoteerd p-nitroaniline [4]		+
Gediazoteerd sulfanilzuur [2]		+
Ferrichloride [1]		—
Phosphormolybdeenwolframzuur [1]		+
Dragendorff-reagens (Munier en Mackeboeuf) [2]	alkaloiden	—
Aluminiumchloride [1]	verschillende flavonderivaten	+
Antimoonpentachloride [1]	o.a. isoprenoide stoffen (sterinen, triterpenen, etc.)	—
Vanilline-zoutzuur (Volgens Lindt) [3]	catechinen en leucoanthocyanen	+
Dichlorophenolindophenol [1]	organische zuren	—
Aniline-xylose [5]		—
Broomphenolblauw [2]		—
Anilinephtalaat [2]	suikers	+
p-anisidine [2]		+
Ammoniakaal zilvernitraat (volgens Tollens) [2]	reducerende stoffen	+
3,5-Dinitrobenzoëzuur (Kedde) [2]	verbindingen met actieve methyleengroepen	—
Natriumnitroprusside (Legal) [1]	carbonylverbindingen, bepaalde lactonen	—
Jodiumdamp [1]	onverzadigde verbindingen	—

1. Dünnschicht-Chromatographie. E. Stahl Springer Verlag (1962).
2. Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie. E. Merck – Darmstadt.
3. R. Hegnauer: Chemotaxonomie der Pflanzen, Vol. II, blz. 17, Birkhäuser Verlag (1963).
4. H. F. Linskens: Papierchromatographie in der Botanik, Springer Verlag (1959).
5. J. Fitelson: J. Ass. offic. agric. Chemists 46, 626 (1963).

2. *Papierchromatografie van de extracten*

Het lag voor de hand om voor de nadere analyse van actieve extracten de zeer efficiënte papierchromatografie toe te passen.

Om ons hierover te oriënteren werd eerst een ethanolextract bereid door een willekeurige hoeveelheid jonge bollen, ontdaan van de bruine huid, enige dagen bij kamertemperatuur te laten uittrekken met ethanol 96 %. Wij hoopten hiermede een extract te verkrijgen dat relatief veel allergeen zou bevatten. Wij hadden aangetoond (hoofdstuk III) dat in de epidermis het allergene agens in een hoge concentratie aanwezig is en door deze methode werd de epidermis in nauw contact gebracht met de extractievloeistof. Het extract gaf bij patiënten positieve lapjesproeven tegenover negatieve uitslagen bij controlepersonen.

Dit actieve ethanolextract werd gechromatografeerd met de epiphase van het zogenaamde Partridge-mengsel: *n*-butanol/ijsazijn/H_2O (= 4/1/5; volumendelen: te gebruiken na 1 uur separeren). Er werd opstijgend gechromatografeerd (cylindertechniek; stijghoogte ca. 26 cm). Papier Schleicher–Schüll 2043*b* Mgl. Geen accomodatie van het papier.

Door chromatogrammen met een aantal reagentia te besproeien werd getracht een indruk te verkrijgen van de chemische natuur en de de localisatie van de bestanddelen op de chromatogrammen (tabel II).

Hierbij bleek dat een aantal reacties positief was, wat ons slechts beperkte inlichtingen gaf. Om verder te komen werd een poging gedaan om in een chromatogram, gemaakt van de ethanolfractie, de plaats of plaatsen van het allergene agens met lapjesproeven vast te stellen. Personen die positief reageerden op contact met tulpenbollen, werden met een chromatogram als lapjesproef getest. Om de toestand, zoals die bij een normale lapjesproef bestaat, zoveel mogelijk kwantitatief gelijk te maken aan de normale lapjesproef, werd een zelfde hoeveelheid ethanolextract opgezet als voor een normale lapjesproef gebruikelijk is (2 à 3 druppels). De hoeveelheid werkzaam agens in het totale chromatogram is dan ongeveer gelijk aan die in de normale lapjesproef. Het chromatogram werd van de startlijn tot aan het loopfront in gelijke delen verdeeld en genummerd (13 stukjes van 2 cm) en deze stukjes (2 × 2 cm) afgeknipt en afzonderlijk geplakt. Deze droge stukjes papierchromatogram werden aanvankelijk bij 1 patiënt getest. Hierbij werd geen duidelijk resultaat verkregen. Daarom werden de stukjes papierchromatogram met 70 % ethanol bevochtigd en daarna als lapjesproef gebruikt. Bij een patiënt werden nu duidelijke reacties gevonden. Deze positieve reacties kwamen overeen met een aansluitend aantal genummerde delen van het chroma-

togram waarmede geplakt was met een maximum in een der stukjes (zie tekening III)[1].

Tekening III. Papierchromatogram als lapjesproef gebruikt

1. Terwijl wij met deze methode aan het experimenteren waren, verscheen een mededeling van CAIRNS (1964). Cairns deed lapjesproeven met papierchromatogrammen van een primula-extract. Bij lijders aan een primula-eczeem kon hij met bepaalde delen van het papierchromatogram positieve reacties opwekken.

Deze methode lijkt dus bruikbaar voor de localisatie van het allergisch werkend agens op het chromatogram. De methode is ook als zuiveringstechniek te gebruiken, daar de plantaardige producten in het chromatogram, die boven en onder de positief reagerende zone liggen, afgeknipt en zo geëlimineerd kunnen worden. Hierdoor worden stoffen verwijderd, die voor het onderzoek van geen belang zijn. Door de, met lapjesproeven, reagerende zone te elueren verkrijgt men een veel zuiverder oplossing van het allergeen. Daar de patiënt duidelijke reacties vertoonde met lapjesproeven van het met 70 % ethanol bevochtigde chromatogram, is het zeer waarschijnlijk dat de concentratie 70 % ethanol in water ook geschikt is om het werkzame agens te elueren.

Hoe smaller en scherper begrensd de zone is, die bij lapjesproeven reageert, des te zuiverder zal het daarvan afkomstige eluaat zijn. Daar bij ons chromatogram de reagerende zone breed en, gezien de zwakkere reacties van de onderste gedeelten van de zone, onscherp begrensd is, kan er niet van een, voor elutie, bruikbaar chromatogram gesproken worden. De kans is groot dat door elutie van die brede zone nog veel andere inhoudsstoffen medegeëlueerd worden, die de uiteindelijke identificatie kunnen bemoeilijken. Ons verdere onderzoek werd daarom het eerst gericht op het verkrijgen van chromatogrammen met een smalle en scherp begrensde reagerende zone. Dit doel is gemakkelijker te bereiken als de te chromatograferen extracten weinig ballaststoffen bevatten.

3. *Het bereiden van ballaststofarme extracten*

Voor de voortzetting van ons onderzoek werd in het najaar 1964 een grote partij tulpenbollen (Cultivar 'Mrs. T. J. Scheepers'; groep van de cottagetulpen) ingeslagen.

Aangezien wij reeds hadden aangetoond dat de allergene stof in de epidermis van de bolrokken is geconcentreerd, werd de volgende methode voor het verkrijgen van relatief weinig verontreinigde actieve extracten beproefd.

24 kg bollen werden ontdaan van de bruine huid en in porties van 3 kg in een percolator met 2,7 liter ethanol van 96 % afgespoeld. Het opgevangen spoelvocht werd na aanvulling tot 2,7 liter met ethanol 96 % tevens opnieuw gebruikt voor het spoelen van de volgende 3 kg bollen. Op dezelfde wijze werden de bollen een tweede keer in porties van 3 kg oppervlakkig geëxtraheerd. De verenigde extracten werden onder verminderde druk bij 20–25 °C drooggedampt. Er werd 4,8 gram hygros-

SCHEMA I

Bereiding extract C

P = patiënt

SCHEMA II

Fractionering extract C (Bereiding extract D)

P = patiënt, C = controle

copisch droog extract verkregen (extract A). Extract A was onvolledig oplosbaar in 96 % ethanol, maar geheel oplosbaar in 70 % ethanol en in water. Na bereiding van extract A werden de bollen in 4 stukken gesneden en de bolrokken van elkaar losgemaakt. Dit materiaal werd opnieuw in porties van 3 kg volgens het voor de bereiding van extract A beschreven procedure geëxtraheerd en leverde 73 gram hygroscopisch droog extract (extract B).

Extract A en extract B gaven bij patiënten huidreacties bij applicatie van oplossingen van 0,5 % in 70 % ethanol. Controleproeven bij 2 personen waren negatief.

De sterk verhoogde extractopbrengst van de in vieren gesneden tulpenbollen berust ten dele op een vermeerderde extractie van ballaststoffen. Daar de opbrengst van extract A gering was, werden nieuwe methoden van extractie beproefd.

Hele bollen, zonder bruine huid, werden onder continu schudden met 90 % ethanol gedurende een uur gemacereerd en volgens schema I afgewerkt. Extract C werd na mengen met zand verder gefractioneerd (schema II) en hieruit het gezuiverde extract D bereid. Het testen met patiënten van de diverse fasen, tijdens de bereiding van extract C en de fractionering die in extract D resulteerde, leverde ons de volgende informatie:

a. Een klein gedeelte van het geëxtraheerde allergeen is vluchtig: positieve reactie 1e destillaat.
b. Het verkregen extract C bevat veel allergeen.
c. Uit het hygroscopische extract C wordt het allergeen bij driemalige maceratie met absolute ethanol niet volledig geextraheerd.
d. Bij de zuivering van de oplossing van extract C in 80 % ethanol door uitschudden met petroleumether gaat geen allergeen verloren.
e. Extract D bevat waarschijnlijk minder ballaststoffen dan extract C.

Papierchromatografische controle van extract D volgens de reeds beschreven techniek (vgl. blz. 32) toonde aan dat (tekening IV) de vlek met Rf 0,42–0,43 het allergeen bevat en een positieve reactie met Tollensreagens en met ninhydrine geeft. De allergeenbevattende zone was nu smaller en scherper begrensd.

Door toepassing van 2-dimensionale papierchromatografie lukte het ons vervolgens een scheiding te bewerkstelligen van de Tollens-positieve en de ninhydrine-positieve stoffen met Rf 0,42–0,43 in het Partridgemengsel. Voor de 2e dimensie werd het mengsel chloroform/ijsazijn/

Tekening IV. Vergelijking papierchromatogrammen van extract D

water (= 35/50/17,5; volumedelen) gebruikt. Analyse van een reeks 2-dimensionale chromatogrammen leerde ons dat door chromatografie in de 2e dimensie met chloroform/ijsazijn/water de op ninhydrine reagerende verbinding gescheiden werd van de met Tollens-reagens reagerende verbinding. De plaatsen van de vlekken op het 2-dimensionale chromatogram werden nauwkeurig aangegeven (door vergelijking met een met

reagentia besproeid chromatogram), uitgeknipt en afzonderlijk geplakt bij een patiënt (tekening V). De op Tollensreagens reagerende vlek bleek een positieve lapjesproef te geven en de op ninhydrine reagerende vlek een negatieve. De allergene stof is dus hoogst waarschijnlijk identiek met

Tekening V. 2-Dimensionaal papierchromatogram van extract D

TABEL III

Analyse van een- en tweedimensionale papierchromatogrammen van extract D

Reagentia (vgl. tabel II)	Rf-waarden van de aantoonbare vlekken										
	n-butanol/ijsazijn/water						chloroform/ijsazijn/water				
Tollens-reagens	0,80	0,42				0,26		0,70		0,41	
anilinephtalaat		0,39				0,16		0,71		0,49	
p-anisidine		0,40									
ninhydrine		0,58	0,43	0,32	0,22	0,15	0,91	0,76	0,66	0,50	0,37
gediazoteerd sulfanilzuur	0,85						0,91				
reactie patiënt	maximaal bij 0,43						bij 0,70				

de met Tollens-reagens reagerende stof (vgl. tekening V en tabel III); VERSPYCK MIJNSSEN 1965, 1967[1].

Daarmee was een weg aangewezen om het tulpenallergeen praktisch zuiver in handen te krijgen. Onze verder onderzoekingen hadden tot doel de bereiding van ballaststofarme extracten te verbeteren. Bovendien moest de 2-dimensionale chromatografie door een ééndimensionale vervangen worden, aangezien de eerste voor preparatieve doeleinden niet geschikt is.

Op grond van vele proeven viel onze keuze op 80 % aceton als extractiemiddel en op het mengsel *n*-butanol/aceton/water (= 5/1/2; volumedelen) als loopvloeistof. Met deze loopvloeistof verkrijgt men, na besproeien met het Tollens-reagens, een scherpe vlek bij Rf 0,34–0,38 (gemiddeld 0,36; 50 bepalingen); ninhydrine-positieve stoffen zijn op dezelfde plaats, bij gebruik van deze loopvloeistof, niet aantoonbaar. Proeven met patiënten bevestigden dat de vlek met Rf 0,36 het tulpenallergeen bevat.

4. *Preparatieve bereiding van het tulpenallergeen*

Op grond van de beschreven proeven werd, voor de bereiding van een voorraad tulpenallergeen, de volgende werkwijze toegepast. De bollen werden ontdaan van de buitenste schil en vervolgens in een schudmachine 1 uur gemacereerd met 80 % aceton; na vernieuwen van het extractiemiddel werd een tweede keer gedurende 30 minuten gemacereerd.

De verenigde maceraten werden bij verminderde druk en bij een temperatuur van maximaal 50 °C drooggedampt en het verkregen residu boven CaO bewaard.

Per 2,7 kg bollen werd volgens deze methode gemiddeld 15 gram lichtbruin hygroscopisch droog extract verkregen, dat bij testen op patiënten het allergeen bleek te bevatten.

In totaal werd op deze wijze 495 gram droog extract uit bollen van het cultivar 'Mrs. T. John Scheepers' bereid. Uit dit extract werd door middel van preparatieve chromatografie op Whatmanpapier 3 MM het *ruwe allergeen* verkregen.

10 %-oplossingen van het extract in 70 % aceton werden met behulp

1. Hanslian en Kadec (1966) gebruikten bij een onderzoek naar de allergenen van Mansioniahout papierchromatografie van een alcoholisch extract van het houtpoeder. Het papierchromatogram werd als lapjesproef gebruikt.
Blohm en Rajka (1966) gebruikten bij het zoeken naar de allergene fractie in een mengsel van chemicaliën eveneens papierchromatogrammen, die zij als lapjesproeven plakten.

van een tekenpen op de startlijn gebracht; vervolgens opstijgend (cylindertechniek) gedurende 16 uur met de loopvloeistof butanol/aceton/water (5/1/2) gechromatografeerd. Het papier en de ruimte van de cylinder werden voor het chromatograferen niet geaccomodeerd. De zone van het allergeen werd door besproeien van een randstrook van het chromatogram gelocaliseerd. De localisatie van de allergeenbevattende zone werd bovendien vergemakkelijkt, doordat deze in U.V.-licht lichtblauw fluoresceert.

Testen van de uitgeknipte zone bij patiënten bevestigden dat deze het allergeen bevat. Om het allergeen uit de zone te elueren werd de volgende werkwijze toegepast: de zone wordt uitgeknipt en in zijn lengte verticaal in een chromatografiecylinder geplaatst en de onderrand in aanraking gebracht met 70 % aceton. Het agens stijgt in de strook papier omhoog en verzamelt zich in de bovenkant van de strook. De strook wordt nu omgekeerd opgehangen in de chromatografiecylinder, de bovenkant van de strook in contact gebracht met aceton 70 % in een bakje. Door hevelwerking wordt het verzamelde ruwe allergeen geëlueerd, opgevangen en onder verminderde druk ingedampt en gedroogd.

Gemiddeld kon per vel Whatmanpapier 100 mg extract (1 ml 10 %-oplossing) worden verwerkt. De opbrengst ruw allergeen was gemiddeld 20 % van het verwerkte extract. De op deze wijze verkregen stof wordt 'ruw tulpenallergeen' genoemd. Dit ruwe tulpenallergeen werd in een 1 %-oplossing getest bij patiënten en bij controleproefpersonen.

In een later stadium van het onderzoek werd overgegaan tot kolomchromatografische bereiding van ruw allergeen.

Als absorbens werd cellulosepoeder gebruikt en gechromatografeerd werd eveneens met *n*-butanol/aceton/water (5/1/2). Door dunne laag chromatografie en besproeien met Tollens-reagens werden de allergeenhoudende fracties herkend. De opgevangen fracties waren ± 10 ml groot. De ruwe allergeenhoudende fracties werden verenigd en drooggedampt.

Het op deze wijze verkregen ruwe allergeen bleek van dezelfde kwaliteit te zijn als het door preparatieve papierchromatografie bereide 'ruwe tulpenallergeen' (zie hoofdstuk V).

HOOFDSTUK V

Onderzoek van het tulpenallergeen

1. *Onderzoek van het ruwe allergeen*

Het onderzoek naar zuiverheid, chemische eigenschappen en structuur van het, door ons bereide, ruwe tulpenallergeen werd verricht door mevrouw DRS. U. W. BRONGERSMA-OOSTERHOFF[1]. Een verslag van dit onderzoek, zoals dit werd gepubliceerd (BRONGERSMA-OOSTERHOFF 1967) is als bijlage aan deze verhandeling toegevoegd.

Zij vond dat ons ruwe allergeen nog met glucose verontreinigd was. Er zijn sterke aanwijzingen dat het hoofdbestanddeel van het ruwe allergeen een glucoside is: bij hydrolyse met 2 normaal H_2SO_4 ontstaat een lacton + glucose.

Glucose werd papierchromatografisch en gaschromatografisch (suikers omzetten in trimethylsilylethers; methode Sweeley, 1963; vgl. blz. 72) geïdentificeerd. Bovendien werd nog dunne-laag-chromatografie op kiezelgelplaten en sterk zwavelzuur als sproeimiddel (verkoling van alle organische stoffen) ter controle gebruikt; ook bij gebruik van verschillende loopvloeistoffen werd uitsluitend de met glucose overeenkomende vlek gevonden. Hieruit kan worden geconcludeerd dat het ruwe allergeen slechts met glucose verontreinigd is en dat bij de hydrolyse van het glucoside naast het lacton alleen glucose wordt gevormd.

De definitieve identificatie van het aglucon was moeilijker. Chemische reacties wezen op een lacton. De identificatie van dit lacton werd vergemakkelijkt door het feit dat in 1946 door CAVALLITO en HASKELL een lacton met antibiotische eigenschappen uit *Erythronium americanum* was geïsoleerd en als α-methyleen-γ-butyrolacton werd geïdentificeerd. CAVALLITO en HASKELL hadden bovendien aangetoond dat dit α-methyleen-butyrolacton in Erythronium niet vrij voorkomt, maar pas bij zure hydrolyse van de extracten wordt gevormd. Zij veronderstelden dat de genuine stof een glucoside was en achtten de volgende relatie waarschijnlijk:

1. Chemica, verbonden aan de afdeling Chemie en Physica van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde TNO.

Erythronium-glucoside — α-hydroxymethyl-γ-butyrolacton (niet geisoleerd) — α-methyleen-γ-butyrolacton (werkt antibiotisch; irriteert de huid)

Aangezien *Erythronium* en *Tulipa* bij dezelfde onderfamilie (*Lilioideae*) van de Liliaceën behoren en daar bovendien bij de *Lilioideae* γ-methyleen glutaminezuur-derivaten veel voorkomen (HEGNAUER 1963), leek ons identiteit van tulpenglucoside en tulpenlacton met Erythroniumglucoside en Erythroniumlacton niet onwaarschijnlijk. Deze werkhypothese werd nu én door middel van biologische proeven, én door chemisch onderzoek van het bij hydrolyse vrijkomende lacton, op juistheid getest.

Eerst werd nagegaan of Erytrhronium (wij werkten met *Erythronium dens-canis*) allergene stoffen bevat. Lapjesproeven met acetonextracten uit Erythroniumbollen veroorzaakten bij patiënten dezelfde reacties als het tulpenallergeen, terwijl controlepersonen geen reacties te zien gaven. Hiermede was aangetoond dat tulpen en Erythroniumsoorten gelijksoortige allergene stoffen bevatten, en aangezien wij reeds wisten dat bij tulpen de allergene werking berust op de fractie, die in hoofdzaak glucoside bevat (nl. op ons ruwe allergeen), was identiteit van het tulpenlacton met het Erythroniumlacton zeer waarschijnlijk geworden.

Door hydrolyse met 2 normaal H_2SO_4, schudden van het hydrolysaat met chloroform, en verdampen van de chloroform, werd uit het ruwe tulpenallergeen een grotere hoeveelheid lacton bereid. Het verkregen tulpenlacton bleek de volgende eigenschappen te hebben. Het is een olieachtige vloeistof; het is met stoom vluchtig en geeft lactonreacties. De N.M.R.-, de I.R.-, en de U.V.-spectra waren geheel in overeenstemming met de α-methyleen-γ-butyrolacton-structuur, zodat nu de identiteit van het *tulpenlacton* met het *Erythroniumlacton* (= α-methyleenbutyrolacton) bewezen kan worden geacht (BRONGERSMA-OOSTERHOFF 1967). Dit werd nog nader bevestigd door vergelijkend gaschromatografisch onderzoek van de lactonen uit tulpen- en Erythroniumbollen (fig. 1).

De structuur van het tulpen*glucoside* is hiermee uiteraard niet opgehelderd. De vraag of en hoe het glucoside in de plant wordt gesplitst kan evenmin beantwoord worden.

Fig. 1. Gaschromatografisch onderzoek van het α-methyleen-γ-butyrolacton.

402 High Efficiency Gaschromatograph. F. en M. Scientific, (Division of Hewlett Packard). H_2 vlamionisatie detector. Glazen kolommen (4 ft. ¼")'met 15% E.G.S. (polyethyleenglycolsuccinaat) op chromosorb W 60/80 mesh.
Temp. 140 °C. Gassnelheid 50 ml/min. Voordruk 4 atm.

Uit dermatologisch oogpunt leek voortzetting van het onderzoek in twee richtingen het meest dringend.

Ten eerste moest worden nagegaan welke verbinding in feite aansprakelijk is voor de allergene werking. Ons ruwe allergeen is een glucosidepreparaat. Gezien de zeer reactieve natuur van het aglucon lijkt het waarschijnlijk dat niet het glucoside zelf, maar het daaruit gemakkelijk vrijkomende α-methyleenbutyrolacton het eigenlijke allergeen voorstelt.

Ten tweede was het van belang na te gaan of het tulpenallergeen in alle gecultiveerde tulpen voorkomt. Dit gedeelte van ons onderzoek wordt in hoofdstuk VI besproken.

2. *Onderzoek naar het eigenlijke allergeen*

Het analytisch gedeelte van dit onderzoek werd verricht door mevrouw DRS. U. W. BRONGERSMA-OOSTERHOFF. Zij paste in eerste instantie gaschromatografische analyse toe, aangezien met deze methode gemakkelijk kwalitatieve en kwantitatieve informaties kunnen worden verkregen.

Begonnen werd met een onderzoek naar het gaschromatografisch gedrag van het tulpenglucoside, dat betrokken is bij het veroorzaken van allergische reacties. Door omzetting van de suikers tot trimethylsilylethers werden de te analyseren preparaten (ruwe allergeen; acetonextracten uit bollen) geschikt gemaakt voor gaschromatografisch onderzoek.

Onder standaardvoorwaarden (vgl. fig. 2 en 3) werden de volgende preparaten onderzocht:
acetonextract uit tulpenbollen; ruwe allergeen uit tulpenbollen; acetonextract uit bollen van *Erythronium dens-canis*; acetonextract uit narcissenbollen; acetonextract uit crocusbollen.

Het bleek dat de pieken *b* en *c* (fig. 2 en 3) slechts optreden bij gaschromatografie van acetonextracten uit tulpen- en Erythroniumbollen en van het ruwe allergeen uit tulpenbollen. Piek *a* kon aan glucose en piek *d* aan saccharose worden toegeschreven.

Hiermede was aangetoond dat de pieken *b* en *c* kunnen worden toegeschreven aan het tulpenglucoside. Deze pieken treden immers alleen op bij gaschromatografie van preparaten, die allergisch werken en waarin papierchromatografisch het tulpenglucoside kan worden aangetoond.

Crocus en *Narcissus* bevatten het specifieke tulpenallergeen niet; de gaschromatogrammen van hun acetonextracten missen de pieken *b* en *c* geheel.

Bij een vergelijking van de gaschromatogrammen van het acetonextract uit tulpenbollen (fig. 2) en van het ruwe allergeen (fig. 3) blijkt dat het acetonextract suikers (glucose + saccharose) en glucoside ongeveer

Fig. 2. Gaschromatografisch onderzoek van het acetonextract.

402 High Efficiency Gaschromatograph. F. en M. Scientific, (Division of Hewlett Packard). H_2 vlamionisatie detector. Glazen kolommen (4 ft. ¼″) met 5 % SE-52 (F. en M. Scientific) op chromosorb W 60/80 mesh.
Temp. 210 °C. Gassnelheid 50 ml/min. Voordruk 4 atm.

in de verhouding 4 : 1 bevat. Het ruwe allergeen (fig. 3) is praktisch vrij van saccharose en bevat veel minder glucose; de verhouding suikers : glucoside is hier 1 : 4. De resultaten van het gaschromatografisch onder-

Fig. 3. Gaschromatografisch onderzoek van het ruwe allergeen.

402 High Efficiency Gaschromatograph. F. en M. Scientific, (Division of Hewlett Packard). H_2 vlamionisatie detector. Glazen kolommen (4 ft. ¼″) met 5 % SE-52 (F. en M. Scientific) op chromosorb W 60/80 mesh.
Temp. 210 °C. Gassnelheid 50 ml/min. Voordruk 4 atm.

zoek van het ruwe allergeen waren dus geheel in overeenstemming met de uitkomsten van het vroeger verrichte papierchromatografische onderzoek (zie blz. 41).

Het feit dat het tulpenglucoside bij gaschromatografie onder de gekozen voorwaarden (trimethylsilylether; t. 240 °C) twee pieken levert, wijst er op dat waarschijnlijk ontleding of isomerisatie plaats heeft gevonden.

Een onderzoek naar voorwaarden voor ontleding van het glucoside leek onmisbaar voor een meer nauwkeurige analyse van het mechanisme van de, door tulpen, veroorzaakte allergie.

Proeven met het ruwe allergeen (= glucoside verontreinigd met x % glucose) en met tulpenbollen toonden aan dat het glucoside onder bepaalde omstandigheden zeer labiel is:

a. Bij stoomdestillatie wordt het glucoside gesplitst; het destillaat bevat het lacton. Deze eigenschap verklaart de in hoofdstuk IV (schema I) beschreven positieve reactie van een patiënt op een destillaat van ethanolextracten uit tulpenbollen.
b. Worden verse tulpenbollen met fosfaatbuffer van pH 7,5 (werkwijze van BERGMAN e.a. 1967) fijngemaakt, dan verdwijnt het glucoside geheel; men kan uitsluitend het lacton isoleren.
c. Worden tulpenbollen voor de extractie diepgevroren, waarbij cellen worden beschadigd, dan verdwijnt het glucoside eveneens; uit het gevroren materiaal kan alleen nog het lacton worden geisoleerd.

De labiliteit van het tulpenglucoside (vooral indien het in aanraking is met beschadigde cellen van de bol en bij hogere temperaturen) maken de gebruikelijke analytische methoden weinig geschikt voor de beantwoording van de vraag of het glucoside of uitsluitend het splitsingsproduct daarvan, het lacton, het eigenlijke allergene agens is. Biologische proeven zijn veel beter geschikt voor dit doel. Wij wisten reeds dat patiënten positief reageren op lapjesproeven met acetonextracten en met het ruwe allergeen, preparaten die in hoofdzaak tulpenglucoside bevatten. Wij hadden echter ook positieve reacties met destillaten verkregen, nl. met preparaten, die alleen lacton bevatten.

In principe zijn er twee mogelijkheden:

a. Zowel het glucoside als het lacton bezitten de allergene werking.
b. Alleen het lacton werkt allergisch; de positieve reacties verkregen met glucosidepreparaten berusten op afsplitsing van lacton.

Proeven met oplossingen van het lacton in water op proefpersonen en patiënten toonden aan dat het lacton een toxische stof is. Tot een concentratie van $\frac{1}{600}$ v/v veroorzaakte een lactonoplossing in water toxische reacties bij proefpersonen (tabel IV).

TABEL IV

Reacties van het lacton bij proefpersonen

proefpersoon	lacton $\frac{1}{200}$ in aqua	lacton $\frac{1}{300}$ in aqua	lacton $\frac{1}{600}$ in aqua	lacton $\frac{1}{1600}$ in aqua
	24 uur	24 uur	24 uur	24 uur
F	+	±	—	—
Th	++	++	±	—
CaP	+	+	—	—
VA	+	+	—	—
W	+	+	±	—
R	+	+	±	—
H	+	+	±	—
S	+	+	±	—
V	+	+	—	—

+ = positieve reactie — = negatieve reactie

TABEL V

Vergelijkende lapjesproeven met epidermis van de tulpenbol, het ruwe allergeen en het lacton

patient	stukje tulpenbol (epidermis)		glucoside 1 % in 70 % ethanol aqua		lacton $\frac{1}{20\,000}$ in aqua	
	24 uur	48 uur	24 uur	48 uur	24 uur	48 uur
B	++>	++>	++>>	++>	+>	+>
P	++>	++>	++>	++>	++>	++>
M	+++>	+++>	++>	+++>	++>	++>
G	++>	+++>	++>	++>	++>	++>
W	+>	+++>	++>	++>	++>	++>
H	+++>	+++>	+++>	+++>	++>	++>
S	++>	++>	++>	++>	+>	+>

+ = positieve reactie — = negatieve reactie > = reactie groter dan lapje

Patiënten bleken op veel sterkere verdunningen te reageren, wat in overeenstemming is met de opvatting dat zij een allergie voor een in de tulp voorkomende stof hebben. Alle vijf geteste patiënten bleken op een concentratie van $\frac{1}{12\,500}$ te reageren; twee zelfs op een concentratie van $\frac{1}{100\,000}$.

Tot slot werd een aantal patiënten vergelijkend getest met epidermis van de tulpenbol, 1 %-oplossing van het ruwe allergeen (= glucoside) in 70 % ethanol en 0.005 %-oplossing van het lacton in water (tabel V).

Op grond van deze vergelijkende proeven kunnen wij concluderen, dat α-methyleen-γ-butyrolacton physiologisch veel werkzamer is dan het tulpenglucoside. Het is daarom o.i. uitermate waarschijnlijk dat van het in de weefsels van de tulp aanwezige systeem (tulpenglucoside — (enzymen → glucose + α-methyleen-γ-butyrolacton) slechts het lacton allergische werking bezit. De zeer labiele natuur van het glucoside heeft echter tot gevolg dat ook het glucoside zelf indirect (nl. via afsplitsing van lacton) als allergeen moet worden beschouwd[1].

[1]) Inmiddels hebben R. Tschesche e.a. (Tetrahedron Letters 1968, 701) 2 glucosiden, tuliposide A en B, uit tulpen geïsoleerd en de structuur opgehelderd. Het extreem labiele tuliposide A levert bij splitsing het α-methyleenbutyrolacton.

HOOFDSTUK VI

Over het voorkomen van het tulpen-allergeen in verschillende tulpenvariëteiten

Wij hadden reeds aangetoond dat *Erythronium dens-canis* en het cultivar 'Mrs. T. J. Scheepers' van de cultuurtulp hetzelfde allergeen bevatten. Voor de diagnose van tulpenallergie is het belangrijk te weten of de thans geteelde cultuurtulpen alle het allergeen bevatten en zo ja, of het allergeen overal in vergelijkbare concentraties voorkomt. Derhalve besloten wij ter afronding van ons onderzoek een collectie cultuurtulpen te testen.

1. *Materiaal*

Om een eerste indruk van de verspreiding van het tulpenallergeen bij de thans gecultiveerde tulpen te verkrijgen werd een aantal cultivars getest. Hiervoor werd uit het hedendaagse assortiment dusdanig een keuze gedaan, dat de belangrijkste groepen (vgl. blz. 3) elk door één of twee cultivars vertegenwoordigd waren. Het assortiment van de te testen tulpen

TABEL VI

Geteste cultivars van tulpen

Groep (vgl. blz. 3)	Geteste cultivars
1. Duc van Tol tulpen	'Duc van Tol, geel'
2. Enkele vroege tulpen	'Couleur Cardinal'
3. Dubbele vroege tulpen	'Wilhelm Kordes'
4. Mendel Tulpen	'Krelages Triumph'
	'Van der Eerden'
5. Triumphtulpen	'Lustige Witwe'
	'Korneforos'
6. Cottagetulpen	de zgn. *Tulipa viridiflora* Baill.
9. Darwintulpen	'William Pitt'
16. *Tulipa fosteriana* Hoog	'Red Emperor' (= 'Madame Lefeber')
Nieuwste groep van cultuurtulpen	'Apeldoorn'
'Darwintulp hybriden'	'Oxford'

werd op advies van PROF. DR IR P. K. SCHENK, directeur van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse, samengesteld. De heren J. MÖHLMAN en M. R. H. TEN HAGE hebben ons bij het verkrijgen van authentieke cultivars geholpen. De door ons geteste cultivars van tulpen zijn samengebracht in tabel VI.

2. *Methoden van onderzoek*

Het vergelijkend onderzoek met bollen van 12 gecultiveerde tulpen werd met behulp van analytische en van biologische methoden verricht.

Analytische methoden

Uit de bollen werden volgens de reeds beschreven procedure (vgl. blz. 40) acetonextracten bereid. Deze extracten werden onderzocht:

a. Papierchromatografisch (aantonen van het glucoside; techniek blz. 41);
b. gaschromatografisch na omzetting van de suikers in trimethylsilylethers (aantonen en approximatief kwantitatieve bepaling van het glucoside; techniek vgl. blz. 72).

Bij het vergelijkend onderzoek van de 12 monsters van gecultiveerde tulpen (tabel VI blz. 51) bleken op één uitzondering na geen opvallende verschillen in glucosidegehalte voor te komen. De uitzondering maakte het monster uit groep 16, dat wil zeggen het cultivar 'Red Emperor' (= 'Madame Lefeber') van *Tulipa fosteriana* dat een veel geringer gehalte vertoonde. Deze uitkomsten stelden ons in staat om met nieuw materiaal de correlatie tussen analytisch vastgesteld gehalte aan tulpenglucoside en allergene werking te controleren.

3. *Biologische test*

Bij de biologische test werden alle 12 cultivars van tabel VI (blz. 51) betrokken. De proef werd als volgt opgezet:

Van elke cultivar werden op patiënten getest:

a. een stukje bolrok;
b. een 1 %-oplossing van het acetonextract in 70 % ethanol;
c. een papierchromatogram van de sub b beschreven oplossing.

Ad a. Van een stukje tulpenbol werd de epidermis van de rok met de huid van de patiënt en controlepersoon in contact gebracht. Om van elke bol een even groot stukje te testen werd een stukje rok met een kurkboor uitgeponst. Dezelfde kurkboor werd (na schoonmaken) voor alle tests met bolrokken gebruikt.

Ad b De lapjes werden bevochtigd met 2 druppels van de oplossing. Een 1 %-oplossing werd gebruikt, omdat gebleken was dat 0,1 %- en 0,01 %-ige oplossingen van droge acetonextracten van de tulp Mrs. T. J. Scheepers bij patiënten met geringe andersgevoeligheid reeds minder reacties bij lapjesproeven gaven dan een 1 %-oplossing.

Ad c. Er werd een aantal analoge papierchromatogrammen gemaakt met de sub *b* beschreven oplossingen van acetonextracten. Deze chromatogrammen werden gemaakt met evenveel oplossing als voor de lapjesproeven onder *b* werd gebruikt. Het bleek dat 1 ml extract uit onze druppelaar 40 druppels geeft. Hieruit volgt dat 2 druppels overeenkomen met 50 microliter. Op het startpunt van de chromatogrammen werden dus 50 microliter van de oplossing van het droge acetonextract opgebracht. Zoals onder hoofdstuk IV werd beschreven werd de localisatie van het α-methyleenbutyrolactonglucoside in één chromatogram aangetoond met het Tollensreagens. Uit de analoge chromatogrammen werd het overeenkomstige stuk geknipt en met deze stukjes papierchromatogram werden de lapjesproeven uitgevoerd. Om invloeden van onbekende aard (bijv. seizoens, cultuuromstandigheden etc.) uit te sluiten werden bij alle 12 geteste cultivars de voor de proeven benodigde bolrokken en acetonextracten van dezelfde charge bollen bereid.

In totaal zijn er $12 \times 3 = 36$ lapjesproeven mogelijk. Er werd echter aangenomen dat men bij een patiënt-vrijwilliger niet meer dan 6 positieve lapjesproeven mocht veroorzaken, d.w.z. dat men slechts 6 lapjesproeven tegelijkertijd bij een patiënt mocht uitvoeren. Verder bleek dat 24 patiënten het maximum was, dat wij binnen een redelijke tijd bijeen konden brengen. Daarom werd met behulp van de heer P. VAN LEEUWEN, verbonden aan de afdeling Statistiek van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde TNO, het volgende schema opgesteld:

a. de tulpen uit de verzameling werden in 2 'blokken' van 6 gesplitst, zodanig dat telkens als er twee cultivars tot één groep behoorden of in bloeitijd overeenkwamen, deze in verschillende blokken werden geplaatst;

b. elk 'blok' werd bij 12 patiënten op de volgende wijze getest:
Bij 4 patiënten werden alle tulpen uit het 'blok' als bolrok getest, bij 4 patiënten als ethanolextract en bij 4 patiënten als chromatogram.Door de statisticus werd voor iedere patiënt een schema verstrekt, waarop de testsubstanties aselect over de 6 mogelijke plaatsen verdeeld waren. Volgens dit schema werd door een medewerker geplakt. Verder werden afleesschema's verstrekt, waarop de beoordelaar de reacties kon invullen na 24 en 48 uur, zonder dat hij wist welke test hij aflas.

De lapjesproeven werden gewaardeerd volgens de volgende schaal:

—		= geen reactie	= 0
+	(erytheem)	= lichte reactie	= 1
++	(erythemato-papuleus)	= duidelijke reactie	= 2
+++	(erythemato-vesiculo-bulleus)	= zeer duidelijke reactie	= 3

Zwak + werd als + gerekend.

De reactie van de lapjesproeven na 48 uur werd als grondslag aangenomen voor de beoordeling, daar vele reacties pas tussen 24 en 48 uur waren opgetreden, wat in overeenstemming is met het 'allergische' karakter van de reactie.

Blok I: De gemiddelde scores van de reacties op de verschillende tulpen waren:

voor tulp A: 1,58
voor tulp B: 1,25
voor tulp C: 1,42
voor tulp D: 1,42
voor tulp E: 1,67
voor tulp F: 0,75

Bij toetsing met behulp van variantie-analyse blijken de tulpen significant te verschillen ($F_{5.55} = 4{,}47$, $P < 0{,}01$). Bij nadere beschouwing blijkt het tulp F te zijn die deze significantie veroorzaakt, immers met de t-toets van Student voor gepaarde waarnemingen bleek de tulp F significant af te wijken van de 5 andere tulpen.

F–A: $P < 0{,}01$
F–B: $P < 0{,}01$
F–C: $P < 0{,}05$
F–D: $P < 0{,}05$
F–E: $P < 0{,}01$

De tulpen A t/m E verschillen onderling niet significant.

Blok II: Door het uitvallen van de gegevens van 1 persoon zijn de gegevens over het chromatogram wat te gering in aantal geworden. Bij het vergelijken van de uitkomsten is daardoor in hoofdzaak gebruik gemaakt van de bolrok en ethanolextract. De gemiddelde scores van de verschillende tulpen waren:

voor tulp G: 1,25
voor tulp H: 1,63
voor tulp I: 1,63
voor tulp J: 1,50
voor tulp K: 1,88
voor tulp L: 1,63

Hier werden geen significante verschillen gevonden tussen de verschillende tulpen. ($F_{5,35} = 1{,}00$, $P \gg 0{,}20$).

Vergelijking blok I en II.

Met behulp van de χ^2 toets voor gemiddelden werd nagegaan of de tulpen uit de 2 blokken verschillen.

Hierbij bleek dat de tulp F uit blok I significant verschilde van de tulp K ($P < 0{,}01$) en H ($P < 0{,}05$). Hoewel F ook een lagere score geeft dan de andere tulpen uit blok II, kon hier geen significant verschil aangetoond worden.

Controleproeven

Voor de controleproefpersonen werden 12 lapjesproeven tegelijkertijd aanvaardbaar geacht, daar reacties niet te verwachten waren. Hier werden de substraten van de 12 tulpen wel in een keer getest. 12 personen werden aldus onderzocht, en wel 4 controlepersonen met het substraat 'bolrok', 4 controlepersonen met het substraat 'ethanoloplossing' en 4 controlepersonen met het substraat 'papierchromatogram'. De substraten werden aselect over de proefpersonen, en per proefpersoon werden de testsubstanties aselect over de 12 mogelijke plaatsen, verdeeld. Geen enkele lapjesproef vertoonde een positieve reactie.

Conclusies

1. Uit de gegevens kan worden geconcludeerd dat de tulp F (Madame Lefeber) minder sterke allergische reacties geeft bij patiënten dan de andere, in het onderzoek opgenomen, tulpen. Dit bevestigt dus ons ver-

moeden, uitgesproken op grond van het gaschromatografisch onderzoek.

2. Uit de gegevens van de tabel met uitkomsten der lapjesproeven (tabel VII) wordt het waarschijnlijk dat tussen de reacties op de bolrok, ethanoloplossing en chromatogram geen verschillen van betekenis bestaan.

TABEL VII

Beoordeling van de huidreacties na 48 uur, veroorzaakt door lapjesproeven met substraten van 12 cultivars, bij 24 patienten

		Blok 1 tulp								Blok 2 tulp					
	patient	A	B	C	D	E	F		patient	G	H	I	J	K	L
bolrok	1	1	1	1	1	2	0	bolrok	13	1	0	1	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	2		14	0	2	1	0	2	2
	3	1	1	1	1	2	1		15	1	2	2	1	2	1
	4	2	0	0	0	0	0		16	1	2	3	2	2	2
ethanol-oplossing	5	2	1	1	1	1	0	ethanol-oplossing	17	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	1		18	2	2	2	3	2	2
	7	1	1	1	1	1	1		19	1	1	0	1	1	0
	8	3	3	3	3	3	2		20	2	2	2	2	2	2
papier-chromatogram	9	0	1	2	2	2	0	papier-chromatogram	21	2	2	2	1	1	2
	10	1	1	1	1	1	1		22	1	1	1	1	1	1
	11	2	2	2	2	2	1		23	2	2	2	1	2	1
	12	2	0	2	2	2	0		24[1]	–	–	–	–	–	–
total score		19	15	17	17	20	9			15	18	18	15	19	17

1. patient uitgevallen wegens ziekte.

HOOFDSTUK VII

Maatregelen ter voorkoming van „tulpenvingers"

Het α-methyleenbutyrolacton is een zeer reactieve verbinding. Het lijkt daarom mogelijk het α-methyleenbutyrolacton om te zetten in een verbinding, die niet meer in staat is als allergeen in te werken. Dit zou van belang kunnen zijn voor de preventie van 'tulpenvingers', hetzij bij reeds gesensibiliseerden, hetzij ter voorkoming van sensibilisatie bij normalen.

Cavallito en *Haskell* wijzen op de grote reactiviteit van de $-\overset{CH_2}{\overset{\|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ groep ten opzichte van sulfhydrylgroepen. Wij verrichten proeven met cysteïne, een aminozuur met een sulfhydrylgroep. Aangezien cysteïne in de huid voorkomt, is de kans op ongewenste nevenwerkingen gering.

Om na te gaan of het cysteïne inderdaad in staat is de allergene werking van het α-methyleenbutyrolacton te neutraliseren, werden bij patiënten lapjesproeven gedaan met waterige lactonoplossingen, waaraan cysteïne was toegevoegd.

TABEL VIII

Vergelijkende lapjesproeven met lactonoplossingen zonder en met cysteïnetoevoeging.

patiënt	lacton $\frac{1}{20\,000}$ in aqua		lacton $\frac{1}{20\,000}$ in aqua en 1 aeq. Mol. cysteïne		lacton $\frac{1}{20\,000}$ in aqua en 6 aeq. Mol. cysteïne	
	24 uur	48 uur	24 uur	48 uur	24 uur	48 uur
B	+>	+>	+>	+>	∅	∅
P	++>	++>	∅	∅	∅	∅
M	++>	++>	+>	+>	—	—
G	++>	++>	++>	++>	—	±
W	++>	++>	++>	++>	+	+
H	++>	++>	++>	++>	+>	+>
S	+>	+>	+>	±	—	—

+ = positieve reactie, — = negatieve reactie, ∅ = niet gedaan, > = reactie groter dan lapje

Uit de in hoofdstuk V vermelde onderzoekingen was ons bekend dat lactonoplossingen $\frac{1}{20\,000}$ bij patiënten duidelijke positieve reacties geven. Na toevoeging van éénmaal de aequimoleculaire hoeveelheid cysteïne gaf deze oplossing nauwelijks zwakkere reacties te zien. Na toevoeging van 6 maal de aequimoleculaire hoeveelheid cysteïne vielen de reacties óf zwak positief, óf negatief uit (tabel VIII). De mogelijkheid lijkt dus aanwezig om met cysteïnehoudende preparaten (zalven of oplossingen) werkers met tulpenbollen te beschermen tegen de invloed van het α-methyleenbutyrolacton in tulpenbollen.

Pogingen om patiënten met een allergisch contacteczeem met zalven, die het schadelijk agens neutraliseren, te beschermen, hebben in het algemeen gefaald. Desondanks lijkt nader onderzoek gewenst. Meer kans lijkt te liggen in het gebruik van neutraliserende preparaten om sensibilisatie te voorkomen. Nagegaan zal moeten worden in hoeverre personen die geregeld met tulpenbollen omgaan, bereid zijn prophylactische maatregelen te nemen, door cysteïnehoudende preparaten te appliceren.

Samenvatting en conclusies

In dit proefschrift zijn de resultaten van een onderzoek naar de pathogenese van de 'tulpenvinger' en de aard van het schadelijke agens beschreven. Chemische identificatie van het schadelijk agens is mogelijk gebleken.

In *hoofdstuk I* wordt een kort historisch overzicht gegeven van de tulpencultuur, waarbij ook aandacht is geschonken aan de indeling in tulpenrassen, groepen, enz.

Ter oriëntatie worden enkele gegevens over de anatomie van de tulpenbol en de bedrijfsvoering in de tulpencultuur aan dit hoofdstuk toegevoegd.

In *hoofdstuk II* worden de voornaamste publicaties, over oorzaken van huidafwijkingen door planten in het bloembollenbedrijf, besproken. Drie ziektebeelden komen naar voren:

1. de tulpenvinger
2. de hyacinthenjeuk en
3. een aantal minder frequente huidafwijkingen, te wijten aan narcissen en andere planten.

Op grond van deze literatuur kan men de 'tulpenvinger' beschrijven als een aan de toppen van de vingers gelocaliseerde, pijnlijke sub- en periunguale erythemato-squameuze en soms erosieve aandoening. Kloven, ettering en subunguale granulaties en hyperkeratosen kunnen optreden. Soms breidt de aandoening zich verder over de huid uit. Er blijkt geen eenstemmigheid in de literatuur te bestaan over de aard van de 'tulpenvinger'. Er wordt gesproken over dermatitis, eczeem, irritatie en 'aandoening'. Naar aanleiding daarvan wordt eerst een definitie van het begrip eczeem gegeven, en speciaal van de betekenis van orthoergisch en allergisch contacteczeem, zoals deze termen in dit proefschrift gebruikt worden. Daarna wordt nagegaan of de tulpenvinger aan één van deze beide definities voldoet. Een aantal onderzoekers neigt in de laatste tijd ertoe de 'tulpenvinger' als een allergisch contacteczeem te beschouwen.

Andere onderzoekers wijten de aandoening daarentegen aan orthoergische (toxische) invloeden. Een combinatie van een allergische en een orthoergische pathogenese zou theoretisch mogelijk zijn.

In *hoofdstuk III* worden de klinische waarnemingen bij lijders aan tulpenvingers beschreven. Na een samenvatting van onze observaties, die blijken overeen te stemmen met de beschrijving in de literatuur, wordt ingegaan op de pathogenese van de 'tulpenvinger'. Huidtesten met behulp van zgn. 'lapjesproeven' met materiaal van tulpenbollen en planten toonden aan dat een allergische pathogenese ten grondslag ligt aan de afwijking. Lijders aan tulpenvingers immers bleken positief te reageren; normalen reageerden niet. De epidermis van de bolrokken bleek bijzonder rijk te zijn aan het allergeen.

In *hoofdstuk IV* wordt de isolering van het allergisch werkend agens besproken. Het afzonderen van een onbekende stof uit een gecompliceerd materiaal als een tulpenbol is in beginsel slechts mogelijk door scheidingstechnieken toe te passen, waarbij men telkens met lapjesproeven nagaat welke fracties allergische reacties veroorzaken en welke fracties allergische activiteit missen.

Aanvankelijk werd gedroogd poeder van tulpenbollen geëxtraheerd met een reeks oplosmiddelen. Ethanol bleek een geschikt oplosmiddel voor het allergeen te zijn. Bij deze extractiemethode is het allergeen vrijwel kwantitatief met 96 % ethanol te extraheren. Voor de nadere analyse van actieve extracten werd de zeer efficiënte papierchromatografie toegepast. Ter oriëntatie werd eerst een extract bereid door een willekeurige hoeveelheid bollen, ontdaan van de bruine schil, enige dagen te laten uittrekken met ethanol. Blijkens lapjesproeven bij patiënten en proefpersonen bevatte dit extract het allergene agens. Van dit extract werden papierchromatogrammen gemaakt volgens een ééndimensionale techniek. Bij deze papierchromatografische methode werd het vermogen van het allergeen allergische huidreacties te verwekken, gebruikt als middel om de localisatie van het allergeen in het papierchromatogram vast te stellen. Dit geschiedde door het gehele chromatogram in stukjes te verdelen en deze als lapjesproef te gebruiken. De delen van het papierchromatogram waar het allergeen zich bevond, veroorzaakten bij patiënten met klachten van tulpenvingers positieve reacties en geen reacties bij controlepersonen. Deze methode leek dus bruikbaar voor de localisatie van het allergisch werkende agens op het chromatogram.

Hoe smaller en scherper begrensd de zone is, die bij lapjesproeven reageert, des te zuiverder zal het daarvan afkomstige eluaat zijn. Daar bij ons chromatogram de reagerende zone breed en onscherp begrensd is,

kan er niet van een, voor elutie, bruikbaar chromatogram gesproken worden. Ons verdere onderzoek werd daarom het eerst gericht op het verkrijgen van chromatogrammen met een smalle en scherp begrensde zone. Dit doel is gemakkelijker te bereiken naarmate de te chromatograferen extracten minder ballaststoffen bevatten. Het bleek mogelijk een ethanolextract te verkrijgen, dat een hoog gehalte aan allergeen verenigde met een relatief laag gehalte aan niet-relevante stoffen. Dit extract werd weer met dezelfde ééndimensionale papierchromatografie gechromatografeerd. Het allergeenbevattende deel van het papierchromatogram was nu smal en scherp begrensd. Het bleek dat deze zone zowel op ninhydrine als op het zgn. Tollensreagens reageerde. Door een tweedimensionale papierchromatografie was het mogelijk deze te scheiden. Het bleek met lapjesproeven dat de op Tollens reagerende vlek positieve huidreacties geeft. Door deze eigenschap bleek het in het vervolg mogelijk de plaats van het allergeen in papierchromatogrammen vast te stellen, zonder de hulp van lapjesproeven.

Later bleek dat het allergisch werkend agens ook goed in aceton oplosbaar is. Een acetonextract van verse tulpenbollen bleek zeer wel bruikbaar voor papierchromatografie. Door bovendien een andere loopvloeistof te gebruiken werd voor het isoleren van het allergeen een tweedimensionale papierchromatografie overbodig. Er werd voor het verdere onderzoek van een papierchromatografische methode gebruik gemaakt, waarbij met behulp van deze chromatografische scheiding en later elutie van het allergeen bevattende deel van het chromatogram een hoeveelheid ruw allergeen werd verkregen. Deze hoeveelheid ruw allergeen werd gebruikt voor de verdere chemische analyse.

Hoofdstuk V behandelt de chemische identificatie van het allergeen. Met de hulp van mevrouw Drs U. W. Brongersma-Oosterhoff werd het ingedampte ruwe allergeen nader onderzocht op zuiverheid, chemische eigenschappen en structuur. Uit de kwalitatieve analyse werd het waarschijnlijk dat wij te maken hebben met een aan suiker verwante stof (waarschijnlijk een glucoside). Hydrolyse van deze stof bleek glucose op te leveren en een stof, welke door chemische en spectroscopische methoden als het α-methyleen-γ-butyrolacton kon worden geïdentificeerd:

α-methyleen-γ-butyrolacton

Dezelfde stof werd in 1946 door CAVALLITO en HASKELL geïsoleerd uit *Erythronium americanum*, een nauw aan de tulp verwante plant. Dit werd nog nader bevestigd door vergelijkend gaschromatografisch onderzoek van de lactonen uit tulpen en Erythroniumbollen (wij werkten met *Erythronium dens-canis*). Het acetonextract van Erythroniumbollen bleek bovendien gaschromatografisch op essentiële punten identiek te zijn aan het bij de tulp gevonden glucoside met allergene eigenschappen. Verder bleek het acetonextract van *Erythronium dens-canis* bij lijders aan tulpenallergie eveneens positieve reacties te veroorzaken.

Het zuivere α-methyleenbutyrolacton bleek bij proefpersonen toxisch te zijn tot een concentratie van $\frac{1}{600}$, maar bij patiënten met een tulpenallergie waren nog reacties op te wekken met verdunningen van $\frac{1}{100\,000}$. Dit laatste moet als een allergische reactie beschouwd worden. Het is o.i. uitermate waarschijnlijk dat van het in weefsels van de tulp aanwezige systeem (tulpenglucoside — (enzymen) → glucose + α-methyleen-γ-butyrolacton) slechts het lacton allergische werking bezit. De zeer labiele natuur van het glucoside heeft echter tot gevolg dat ook het glucoside zelf indirect (nl. via afsplitsing van lacton) als allergeen moet worden beschouwd.

Hoofdstuk VI. Voor de diagnose van tulpenallergie is het belangrijk te weten of de thans geteelde cultuurtulpen alle het allergeen bevatten en zo ja, of het allergeen overal in vergelijkbare concentraties voorkomt. Ter afronding van ons onderzoek werd een collectie van 12 cultuurtulpen onderzocht. Bij het onder standaardcondities vergelijkend gaschromagrafisch onderzoek van de 12 monsters van gecultiveerde tulpenbollen bleken op één uitzondering na geen opvallende verschillen in glucosidegehalte voor te komen. De uitzondering maakte de cultivar 'Red Emperor' (= 'Madame Lefeber') van *Tulipa fosteriana*. Deze tulp vertoonde een veel geringere concentratie van het α-methyleen-γ-butyrolactonglucoside dan de andere 11 tulpen uit de collectie, die het hedendaagse assortiment moet representeren. Een nader onderzoek bracht aan het licht dat huidtesten met materiaal van de tulp 'Madame Lefeber' statistisch significant zwakkere reacties gaven in vergelijking met materiaal van de andere 11 tulpen. De correlatie tussen analytisch vastgesteld gehalte aan tulpenglucoside en allergene werking werd door dit onderzoek dus nog eens vastgesteld.

In *hoofdstuk VII* worden enige mogelijkheden ter voorkoming van de 'tulpenvinger' ter sprake gebracht.

Het bleek dat het aminozuur cysteïne, toegevoegd aan een waterige oplossing van α-methyleenbutyrolacton, de allergische werking van het

α-methyleenbutyrolacton blokkeert. Dit opent de mogelijkheid personen die geregeld met tulpenbollen werken, te beschermen door uitwendige applicatie van cysteïnehoudende preparaten. De meeste kans op succes lijkt te liggen in een prophylactisch gebruik van dergelijke cysteïnehoudende preparaten om sensibilisatie te voorkomen. De kans om gesensibiliseerde personen afdoende te beschermen tegen de inwerking van het α-methyleenbutyrolacton lijkt minder groot.

Summary en conclusions

This thesis describes the results of an investigation into the pathogenesis of the so-called 'tulip fingers', and into the nature of the offending substance (or substances). It has proved possible to identify the offending substance.

Chapter I gives a short historical survey of the culture of tulips, and their breakdown into groups and variations. It also contains some details on the anatomy of the tulip bulb, and on the operational aspects of bulb-growing.

Chapter II reviews the principal publications on the origin of three types of skin affections caused by flower bulbs:

(1) tulip fingers;
(2) hyacinth itch;
(3) a number of less frequently encountered skin affections caused by narcissus and other plants.

In line with this literature, the 'tulip finger' may be described as a painful, sub-ungual and peri-ungual, erythro-squamous, sometimes erosive, affection of the finger tips. Fissures, suppuration, sub-ungual granulation and hyperkeratosis may result. At times the affection spreads over adjacent skin and even to remote areas. Apparently no unanimity exists about the nature of the affection. One finds it described as dermatitis, eczema, irritation or simply as 'affection'. Therefore, a definition of the eczema concept is given first, and next the meaning is defined of orthoergic and allergic contact eczema within the appropriate context of this thesis. The applicability of either of these definitions to the 'tulip finger' is determined, taking into account that a number of authors tend to consider it as a contact-eczema and that others suspect an orthoergic (toxic) origin. Theoretically, a combination of both origins is feasible.

Chapter III reviews the clinical symptoms of 'tulip fingers' in patients. After a summary of our observations, which agree with pertinent descriptions in the literature, the pathogenesis of the 'tulip finger' is considered. Patients with 'tulip fingers' were subjected to patch-tests with

material from tulip bulbs and plants. These tests have demonstrated that for 'tulip fingers' an allergic genesis has to be accepted. Patients with 'tulip fingers', after all, showed positive reactions to our patch-tests, whereas controls did not.

Chapter IV discusses the isolation of the allergen. Isolation of an unknown substance from such complicated material as that of a flower bulb can only be accomplished by partition techniques, while one regularly checks, by means of patch-tests, which fractions cause allergic reactions and which fractions lack allergenic activity.

Initially, exsiccated powder of tulip bulbs was extracted with a series of solvents and ethanol was found to be a useful solvent for the allergen in question. In this method, the allergen can be extracted almost quantitatively by 96 % ethanol.

It seemed obvious that paper chromatography could be used for further analysis of active extracts. To check this, an extract was prepared by keeping a quantity of bulbs, from which the brown peel had been removed, in ethanol for some days. By means of patch-tests it was shown that this extract contained the allergenic agent. Now, with this extract, one-dimensional paper-chromatograms were made. The localization of the active substance in the paper strips was assessed by dividing them into small pieces and then using these in patch-tests. The pieces containing the allergen caused allergic reactions in patients with 'tulip fingers', and none in controls. This technique seemed to be useful for localizing the allergen in the chromatogram.

The smaller and more sharply defined the zone that is active in patch-tests, the purer will be the eluate that may be prepared from it. In our experiments, though, the active zone was broad and ill-defined. Thus we could not consider our chromatogram a usable one for elution. We therefore tried to obtain better chromatograms with narrow, well-defined active zones; we then needed extracts containing fewer impurities We succeeded in obtaining an ethanolic extract which combined a high content of allergen to a low content of irrelevant substances. This extract we likewise used in one-dimensional paper-chromatography. The active zone was now narrow and well-defined. The zone reacted to ninhydrine and to Tollens reagent. Using a two-dimensional chromatographic technique, we could next part this zone into a Tollens-reacting fraction and a ninhydrine-reacting fraction. Patch-tests showed the Tollens-reacting fraction to be the active one. In subsequent experiments we could now use the Tollens reaction to locate the active substance in our chromatograms, without making use of patch-tests.

We found later that the allergenic agent could very well be extracted with acetone and that an acetonic extract of fresh bulbs could be used efficiently for paper-chromatography. Employing, moreover, a different chromatographic solvent, two-dimensional chromatography was made superfluous. In the subsequent investigations we used a method in which, by means of a chromatographic partition and elution of the active zone, a quantity of crude allergen was obtained. This was used for further chemical analysis.

Chapter V deals with the chemical identification of the allergenic substance. Of the crude allergen, Mrs Drs U. W. Brongersma-Oosterhoff determined the degree of purity, chemical properties and structure. The qualitative analysis pointed to a compound related to sugar (probably a glucoside). Hydrolysis of this compound yielded glucose and a substance which could be identified, by means of chemical and spectroscopic methods, as α-methylene-γ-butyrolactone. Cavallito and Haskell isolated the same substance in 1946 from *Erythronium americanum*, a plant closely related to *Tulipa*. A confirmation was obtained by comparative gas-chromatographic analysis of the lactones from tulip and Erythronium bulbs. In addition, gas-chromatographic analysis of the acetonic extract from Erythronium bulbs proved to be identical, in essential points, with the allergenic glucoside from the tulip bulbs. Moreover, the acetonic extract from *Erythronium dens-canis* bulbs was also found to be allergenic in patients with 'tulip fingers'. The pure α-methylene-γ-butyrolactone was toxic up to a $\frac{1}{600}$ concentration in controls, but in patients with complaints of tulip fingers reactions to patch-tests could still be provoked with dilutions up te $\frac{1}{100\,000}$. The latter reactions must be considered as allergic reactions. In our opinion it is very likely that in the (glucoside — (enzymes) $\rightarrow$ glucose + lactone) system occurring in the tissues of the tulip plant, only the lactone has allergenic properties. As a results of its very unstable nature, the glucoside must be considered indirectly allergenic; it splits off lactone.

Chapter VI. To confirm the diagnosis of 'tulip fingers' in a patient it is important to know if the tulips cultivated nowadays contain the allergenic agent and, if so, in comparable quantities.

To round off our investigations, we decided to analyse the acetonic extracts from a collection of twelve varieties of tulips. The collection had to be, as much as possible, representative of today's assortment of tulips. Standardized gas-chromatographic analyses of twelve acetonic extracts revealed no significant differences in glucoside contents, with one exception: the 'Red Emperor' cultivar (= Madame Lefeber). These

latter tulips exhibited a remarkable scantiness of α-methylene-γ-butyrolactone glucoside in comparison with the other tulips of the collection. Further investigation revealed that patch-tests with material from the 'Madame Lefeber' tulip yielded statistically significant, fewer and weaker reactions in comparisons with those of patch-tests using material from the other eleven tulips. Accordingly, the correlation between α-methylene butyrolactone glucoside and allergenic activity was once more confirmed.

Chapter VII, finally, discusses some possibilities to prevent 'tulip fingers'. We found that addition of the amino-acid cysteïne to an aqueous solution of α-methylene-γ-butyrolactone blocks the allergenic action. This raises hopes to protect workers in the tulip sector through external application of preparations containing cysteïne. Most promising seems to be the prophylactic use of such preparations, thus preventing sensitization. The possibility to protect persons that are already sensitized, however, seems less realistic.

Literatuur

BERGMAN, B. H. H., J. C. M. BEIJERSBERGEN, J. C. OVEREEM and A. KAARS SIJPESTEIN. Isolation and identification of α methylene butyrolactone, fungitoxic substance from tulips. Rec. Trav. chim. (Pays-Bas) 86 (1967) 709–14

BERTWISTLE, A. P. Tulip fingers. Brit. med. J. II (1935) 255

BLOCH, B., und P. KARRER. Chemische und biologische Untersuchungen über die Primelidiosynkrasie. Beibl. zur Vierteljahrsschr. Naturforschenden Gesellschaft in Zürich 72/13 (1927) 1–26

BLOHM, G., and G. RAJKA. A simple method for combined chemical and dermatological analysis of chemical mixtures by paper chromatography. Acta derm.-venereol. (Stockh.) 46 (1966) 432–5

BOOM, B. K. Flora der cultuurgewassen van Nederland; dl. II. Flora der gekweekte kruidachtige gewassen. Wageningen, Veenman, 1950

BROERS, J. H. Berufliche erworbene Hautveränderungen durch Stoffe vorwiegend vegetabilischen Ursprungs; Dermatitis venenata phytogenes. In: Schädigungen der Haut durch Beruf und gewerbliche Arbeit; hrsgs. K. ULLMANN, M. OPPENHEIM und J. R. RILLE; Bd. II, p. 509–48. Leipzig, Voss, 1926

BRONGERSMA-OOSTERHOFF, U. W. Structure determination of the allergic agent, isolated from tulip bulbs. Rev. Trav. chim. (Pays-Bas) 86 (1967) 705–8

CAIRNS, R. J. Plant dermatoses; some chemical aspects and results of patch testing with extracts of Primula obconica. Trans. St John's Hosp. derm. Soc. (Lond.) 50 (1964) 137–43

CAULFIELD, A. H. W. Report of the investigation and successful treatment (preventive) of dermatitis resulting from the handling of tulip bulbs. J. Allergy 8 (1937) 181–4

CAVALLITO, C. J., and T. H. HASKELL. α-Metylene butyrolactone from erythronium americanum. J. Amer. chem. Soc. 68 (1946) 2332–4

CHITTENDEN, F. J. (ed.) Dictionary of gardening. Oxford, Clarendon press, 1951

FITELSON, J. Organic acids in Vanilla extract. J. Ass. offic. agr. Chemists 46 (1963) 626–8

FRANKLAND, A. W. Therapy of the allergic reaction. In: Occupational allergy, p. 88–97. Leiden, Stenfert Kroese, 1958

GASSNER, G. Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Nahrungs- und Genussmittel; 3e Aufl. Stuttgart, Fischer, 1955

HANSLIAN, L., und K. KADLEC. Feststellung der Hautschädigungen durch Inhaltstoffes des Holzes. Berufsdermatosen 14 (1966) 41–8

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen; vol. II, Basel, Birkhäuser Verlag, 1963, 325–9

HJORTH, N. Eczematous allergy to balsams. Copenhagen, Munksgaard, 1961

HOFFMANN, E. Berl. klin. Wschr., 1904. Gecit. door K. TOUTON, 1932

KLASCHKA F., W. GRIMM und H-U. BEIERSDORFF. Tulpen-Kontaktekzem als Berufsdermatose. Hautarzt 15 (1964) 317–21

KONINKLIJKE Algemene Vereniging voor Bloembollencolutuur. The classified list and international register of tulip names. Haarlem, 1965

KRANENBURG, W. R. H. Juckreiz und Dermatitis nach Verarbeitung von Hyacinthen und Tulpen. Zbl. Gewerbehyg. 17 (1930) 73–4

KRELAGE, E. H. Drie eeuwen bloembollenexport. 's-Gravenhage, Rijksuitg., 1946

LAPIÈRE, S., et MME VAN CAUWENBERGE. Quelques cas de sensibilisation a nos plantes d'appartement et de jardin. Arch. belges Derm. 12 (1956) 10–7

LINSKENS, H. F. Papierchromatographie in der Botanik. Berlin, Springer Verlag, 1959

LOW, R. C. Anaphylaxis and sensitisations. Edinburgh, 1924. Gecit. door K. TOUTON, 1932

MCCORD, C. P. The occupational toxicity of cultivated flowers. Industr. Med. Surg. 31 (1962) 365–9

MOLISCH, H. Sitzungsbericht. Akad. Wiss. Wien. math. naturw. Kl. Abt. I. 126 (1917) 231–42

OVERTON, S. Dermatitis from handling flower bulbs. Lancet II (1926) 1003

PALMER, W. H. 'Lily rash': an occupational dermatitis; a possible preventive treatment. Lancet II (1934) 755–6

PIRILÄ, V., and S. ROUHUNKOSKI. On sensitivity to Neomycin and Bacitracin. Acta derm.-venereol. (Stockh.) 39 (1959) 470–6

RAPPAPORT, B. Z., and W.H.WELKER. Tulip bulb dermatitis. J. Allergy 8 (1937) 379–80

RICHTER, W. Uber allergische Erkrankungen der Haut unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Behandlung. Derm. Wschr. 91 (1930) 1327–40

SCHOUTEN, J. D. Huidlijden bij arbeiders in het bloembollenbedrijf. Centraal Verslag Arbeidsinspectie, 1927, p. 316–8; 1928, p. 328–30

SCHWARTZ, L., L. TULIPAN and D. J. BIRMINGHAM. Occupational diseases of the skin; 3d ed. Philadelphis, Lea and Febiger, 1957

STAHL, E. Dünnschicht-Chromatographie. Berlin, Springer Verlag, 1962

SWEELEY, C. C., R. BENTLEY, M. MAKITA and W. W. WELLIS. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivates of sugars and related substances. J. Amer. chem. Soc. 85 (1963) 2497–2507

TOUTON, K. Hauterkrankungen durch phanerogamische Pflanzen und ihre Produkte (Toxicodermia et allergodermia phytogenes). In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten; hrsgb. J. JADASSOHN; Bd. IV, Tl. I, p. 613 und 659. Berlin, Springer Verlag, 1932

VERSPYCK MIJNSSEN, G. A. W. Een papierchromatografische methode voor het opsporen van allergene stoffen in mengsels. Lezing geh. op de 6e federatieve verg. van Medisch-biologische Verenigingen, juni 1965 te Leiden

VERSPYCK MIJNSSEN, G. A. W. Patch testing with paper chromatograms. Dermatologica (Basel) 134 (1967) 379–85

WALSH, D. Investigation of a dermatitis amongst flower-pickers in the Scilly islands, the so-called 'Lily rash'. Brit. med. J. II (1910) 854–6

WELKER, W. H., and B. Z. RAPPAPORT. Dermatitis due to tulip bulbs. J. Allergy 3 (1931) 317

WERFF, P. J. VAN DER. Occupational diseases among workers in the bulb industries. Acta allerg. (Kbh.) 14 (1959) 338–55

Opgenomen met toestemming van het bestuur van de Koninklijke Nederlandse Chemische Vereniging en de redactie van het 'Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. (T. 86 – No. 7 – juli 1967).

547.475.114-314: 632.952

STRUCTURE DETERMINATION OF THE ALLERGENIC AGENT, ISOLATED FROM TULIP BULBS*

BY

ULRIKA W. BRONGERSMA-OOSTERHOFF

Department of Chemistry and Physics of the Netherlands Institute for Preventive Medicine TNO, Leiden.

Handling of tulip bulbs taking place in bulb nurseries often causes a typical allergic reaction of the skin ('tulip fingers')[1]. It is the purpose of this paper to report the results of an investigation into the structure of the chemical compound, possessing the allergic properties.

The principle is a yellow, hygroscopic, non-crystalline substance, which can be obtained by extraction of the tulip bulb (*tulipa gesneriana*) with 70 % ethanol or 70 % acetone and resolving the crude extract by paper chromatography[2]. Paper chromatography (paper Whatman no. 1) gives a Rf-value of 0.63 in ethyl acetate: pyridine : water = 2 : 1 : 2. The allergenic principle is soluble in ethanol and water, but not in cyclohexane, carbon tetrachloride, chloroform, diethyl ether and ethyl acetate. Since it could not be obtained in crystalline form, X-ray analysis could not be used and for this reason other chemical and physical methods had to be used.

* Independently α-methylenebutyrolactone was obtained from tulip bulbs by *Bergman et al.* (cf. p. 709).

1. G. A. W. VERSPYCK MIJNSSEN. Een papierchromatografische methode voor het opsporen van allergene stoffen in mengsels.
Voordracht gehouden voor de 6e Federatieve vergadering van medisch-biologische verenigingen te Leiden, 1965.

2. *Idem.*, Dermatologica (Basel) **1967**, 134 in press.

Results

Sufficient evidence has been collected to characterize the active substance as a glycoside of the lactone I (α-methylenebutyrolactone**).

I

A first orientation yielded a positive Molisch test (sugar, glycoside[4], a positive hydroxamic acid test (esters, lactones[5], and a rapid orange-brown coloration with concentrated sulfuric acid (glycoside[6]).

The main argument for structure I is: hydrolysis with 2 *N*-sulfuric acid and extraction with chloroform yielded a sugar-containing aqueous

Fig. 1

** α-Methylenebutyrolactone was found to be present in Erythronium Americanum[3].

3. C. J. CAVALLITO and T. W. HASKELL, J. Am. Chem. Soc. **68**, 2332 (1946).
4. B. HAYNES, London, Cleaver-Hune press, 1961, p. 40.
5. Ibid. . 52.
6. Ibid. p. 40.

phase (a) and a chloroform extract (b) containing the aglucone. In (a) the presence of glucose alone could be demonstrated by paper chromatography (Rf-value is 0.31 in ethyl acetate: pyridine : water = 2 : 1 : 2), by gas chromatography of the trimethylsilyl ether of the sugar[7] and by preparation of the oszaone.

Evaporation of the chloroform left an oily residue, volatile with steam, giving the following tests: a positive hydroxamic acid test, decoloration of neutral potassium permanganate (unsaturation)[8], and a red-purple coloration with *m*-dinitrobenzoic acid (active methylene group). The presence of an exocyclic C = C double bond αß to the carbonyl group could be deduced from three tests on lactones with unsaturated rings, which yielded negative results: no decoloration with bromine water, no Tollens reaction[8] and no yellow coloration with alkali[9].

Structure I was further substantiated by NMR, IR and UV spectroscopy[1]. The spectra are shown in Figures 1, 2 and 3.

The most convincing evidence follows from the NMR spectrum[10].

The 100 MHz PMR spectrum (Varian HA-100, Fig. 1) of a CCl_4 solution reveals the presence of six hydrogen atoms. The first order chemical shifts in ppm relative to internal TMS (δ-values) and signal assignments are:

δ	multiplicity	relative intensity	assignment
2,96	9	2	a
4.32	3	2	b
5.62	3	1	c
6.17	3	1	d

The first order spin-spin couplin constants: $I_{ab} = 7.5$ Hz, $I_{ac} = I_{ad} = 3.4$ Hz and $I_{cd} < 1$ Hz confirm these assignments.

7. C. C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA and W. W. WELLS, J. Am. Chem. Soc. **85**, 2497 (1963).
8. B. HAYNES, London, Cleaver-Hume press, 1961, pp. 34, 35.
9. J. THIELE, R. FISCHBEIN and E. LOSSOW, Ann. Chemie **319**, 184 (1901).
10. The spectra were recorded at the Organic Chemical Laboratory, Leiden University. MR. J. LUGTENBURG'S contribution to their interpretation is gratefully acknowledged.

The UV spectrum (Carey 14 UV spectrophotometer, Fig. 2) is also in line with the proposed structure. Amongst UV absorption spectra of lactones the maximum at 2050 Å (solvent cyclohexane) is characteristic of αß-unsaturated lactones.

Fig. 2

Fig. 3

In the IR spectrum (Beckman IR 10 infrared spectrophotometer, Fig. 3) the following peaks could be allocated.

1770	cm^{-1}	carbonyl group of the γ lactone
1830, 1660, 925	cm^{-1}	terminal methylene group

The high intensity of the absorption at 2900 Å may be due to slight contamination with a hydroxy compound, possibly water.

A quantitative analysis yielded the following result[1].

Required for the structure of the glycoside

C = 47.41 % H = 6.47 %
Found C = 46.66 % H = 6.53 %.

Further investigations should reveal whether the glycoside or the lactone is responsible for the allergenic principle. This question is still under study with MR. G. A. W. VERSPYCK MIJNSSEN and will be reported elsewhere.

Acknowledgement

I am grateful to PROF. R. HEGNAUER and PROF. H. VELDSTRA for their interest and helpful discussions.

(Received March 3rd. 1967).

11. The micro-analysis was carried out by MR. N. PIETERS and MR. W. J. BUIS at the Organic Chemical Laboratory, University of Amsterdam.