

VOORKOMS VAN VRYE AMINOSURE IN DIE GENUS PROTEA L.

deur

A.J. van Schalkwyk

Proefskrif ingehandig ter vervulling van
die graad M.Sc. in Plantkunde aan
die Universiteit Kaapstad.

April 1986

Promotor: Prof. J.N. Eloff

The University of Cape Town has been given
the right to reproduce this thesis in whole
or in part. Copyright is held by the author.

The copyright of this thesis vests in the author. No quotation from it or information derived from it is to be published without full acknowledgement of the source. The thesis is to be used for private study or non-commercial research purposes only.

Published by the University of Cape Town (UCT) in terms of the non-exclusive license granted to UCT by the author.

VOORKOMS VAN VRYE AMINOSURE

IN DIE GENUS PROTEA L.

DEUR

A.J. VAN SCHALKWYK

INHOUDSOPGAWE

| | |
|--|----|
| HOOFSTUK 1: INLEIDING | 1 |
| HOOFSTUK 2: MATERIAAL EN METODEDES..... | 3 |
| 2.1 Inleiding | 3 |
| 2.2 Materiaal | 3 |
| 2.3 Skeiding van Onoplosbare Verbindings en Lipofiele..... | 3 |
| 2.4 Ioonuitruiling | 5 |
| 2.4.1 Kleinmaatioonuitruiling..... | 5 |
| 2.4.1.1 Katioonuitruiling..... | 5 |
| 2.4.1.2 Anioonuitruiling..... | 7 |
| 2.4.2 Grootmaatioonuitruiling..... | 7 |
| 2.4.2.1 Anioonuitruiling..... | 8 |
| 2.4.2.2 Katioonuitruiling..... | 10 |
| 2.5 Papierchromatografie | 12 |
| 2.5.1 Eendimensionele Papierchromatografie..... | 12 |
| 2.5.2 Tweedimensionele Papierchromatografie..... | 14 |
| 2.6 Outomatiese Aminosuuranalise..... | 15 |
| 2.7 Infrarooispektrumbepaling..... | 16 |
| 2.8 Spesifieke Optiese Rotasiebepaling..... | 16 |
| HOOFSTUK 3: POGINGS OM ISOLERINGSPROBLEME UIT TE SKAKEL..... | 17 |
| 3.1 Inleiding | 17 |
| 3.2 Ru-ekstrakfiltrering | 17 |
| 3.3 Sentrifugering | 18 |
| 3.4 Kristallisering | 18 |
| 3.5 FVP-neerslag | 18 |
| 3.6 Oksidering deur Waterstofperoksied..... | 19 |
| 3.7 Polimerisering | 20 |
| 3.8 Geaktiveerde Koolstof | 21 |
| 3.9 Eterekstrahering | 21 |
| 3.10 Silikajelkolomchromatografie..... | 22 |
| 3.11 Trisakriljelkolomchromatografie..... | 22 |
| 3.12 Temperatuurbehandeling..... | 23 |
| 3.13 Tydbehandeling | 24 |
| 3.14 Anioonuitruiling | 24 |
| 3.15 Katioonuitruiling | 24 |
| HOOFSTUK 4: ISOLERING EN GEDEELTELIKE KARAKTERISERING..... | 26 |
| 4.1 Inleiding | 26 |
| 4.2 Ninhidrienpositiewe Verbindings..... | 26 |
| 4.2.1 Arginien | 26 |
| 4.2.2 Asparagien | 28 |
| 4.2.3 Aspartiensuur | 29 |
| 4.2.4 Etanolamien | 31 |
| 4.2.5 Glutamiensuur | 32 |
| 4.2.6 Triptofaan, Tirosien en Fenielaalanien..... | 33 |
| 4.2.6.1 Geaktiveerde Koolstof Adsorbering..... | 33 |
| 4.2.6.2 Anioonuitruiling..... | 34 |
| 4.2.6.3 Katioonuitruiling..... | 34 |
| 4.2.6.4 Skeiding van Tirosien..... | 34 |

| | |
|---|--------|
| 4.2.6.5 Skeiding van Feniellalanien..... | 36 |
| 4.2.7 Verbinding 3 | 36 |
| 4.2.8 Verbinding 10 | 38 |
| 4.2.9 Verbindings 11 en 12..... | 41 |
| 4.2.10 Verbinding 18 | 42 |
| 4.2.11 Verbinding 39 | 43 |
| 4.2.12 Verbinding 45 | 44 |
| 4.2.13 Verbinding 46 | 45 |
| 4.2.14 Verbinding 47 | 49 |
| 4.2.15 Kleimaat Onsuiver Isolering..... | 50 |
| 4.3 Ninhidriennegatiewe Verbindings..... | 51 |
| 4.3.1 Uit die Metanol-Water Ekstrak..... | 51 |
| 4.3.2 Uit Anioonwatereluut..... | 52 |
| HOOFSTUK 5: VOORKOMS VAN NINHIDRIENPOSITIEWE VERBINDINGS..... | 53 |
| 5.1 Inleiding | 53 |
| 5.2 Papierchromatografies Opgespoorde Verbindings..... | 53 |
| 5.3 Groeperingsanalise | 56 |
| HOOFSTUK 6: GEVOLGTREKKINGS | 61 |
| SAMEVATTING | 67 |
| SUMMARY | 69 |
| DANKBETUIGINGS | 71 |
| LITERATUURVERWYSINGS | 72 |

HOOFSTUK 1

INLEIDING

"Nêrens in die annale van die Suid-Afrikaanse plantkunde sal 'n mens die name vind van Henricus Hudde, Reynerus Paaw, Petrus Hasselaer, Arnoldus Grotenhuys of, wat dit betref, enige van hul vyf landgenote nie, wie se ondernemende maatskappy een van die eerste Hollandse handelsendings om die Kaap na Oos-Indië gestuur het. Tog het ons rede genoeg om hulle te onthou. Hulle het, sonder dat hulle dit wis, die eerste skutshere van die Suid-Afrikaanse plantkunde geword! Carolus Clusius, 'n uitmuntende Renaissancewetenskaplike, vertel ons dat hy deur die vrygewigheid van hierdie "ryk Amsterdamse koopmanne" 'n versameling eksotiese vrugte ontvang het wat deur matrose van hulle vloot in 1597 op 'n skeepstog na Java bymekaar gemaak was. Terwyl die meeste van die vreemde vrugte van tropiese oorsprong was, was een daarvan - 'n gedroogde blomkop van *Protea neriifolia* - van die Kaap afkomstig. Clusius se tekeninge en beskrywing daarvan sewe jaar later, in 1605, was gebeurtenisse van groot historiese betekenis. Nie alleen is dit die eerste geïllustreerde beskrywing van 'n protea nie, dit is ook die eerste geïllustreerde en gepubliseerde rekord van enige Suid-Afrikaanse landplant, en het verskyn in hoofstuk 15 van Clusius se "Exorticatorum Libra Decem" (Antwerpen, 1605)." (Rourke, 1980).

Uit die oogpunt van hierdie brokkie geskiedenis is dit gepas dat Suid-Afrika se nasionale blom 'n protea is; nou nie *Protea neriifolia* nie, maar wel *P. cynaroides*. Verteenwoordigers van die genus beklee 'n ereplek in feitlik elke blomwinkel en aan 'n rangskikking, vars of droog, gee dit 'n eie besondere karakter.

Hulle floreer op stikstofarme grond en kom oor 'n wye verskeidenheid habitatte voor, wat die tuinier altyd 'n keuse vir sy omgewing bied. Die blombedryf het in hom 'n juweel gevind.

Baie oningeligtes beskou "die suikerbos" as 'n versamelnaam vir alle proteas...of te wel die paar soorte waarvan hulle bewus is en die tipiese omwindselblaarvoorkoms van *P. cynaroides* of *P. repens* het. Nog minder weet hulle dat die oorvloedige nectar van *P. repens* in die 18de en 19de eeu as versoeter gebruik is en aan hom alleen hierdie naam besorg het.

Die hoë tannieninhoud van *P. nitida*, wat so kenmerkend van die hele familie blyk te wees (en heelwat probleme in hierdie studie veroorsaak het), is as leerlooi- en stelpmiddel vir



Figuur 1.1 - Die Hollandse plantkundige, Carolus Clusius (1526 - 1609), wat die eerste beskrywing en illustrasie van 'n protea (*P. neriifolia*) in 1605 in sy "Exoticorum Libri Decem" gepubliseer het, die voorblad daarvan en skets. (Uit Rourke 1980, met goedkeuring van die skrywer.)

buikloop aangewend. Sommige inboorlinge het selfs die droë blomkoppe van *P. gaguedi* gebruik om vel van hulle voetsole te skuur en tot in die negentiende eeu is skryfink uit loofblare van *P. nitida* (waboom) gemaak. Skrynwerkers het veral die waboom verkies en heelwat duursame artikels wat eeue gelede gemaak is, is vandag nog in gebruik.

Die protea het dus sy merk op baie gebiede gemaak en omdat dit deel van ons Kaapse fynbos is, mag sy filogenetiese verwantskappe bydra tot die oplossing van die probleem van die unieke fynbosflora. Morfologie, waarop die huidige erkende klassifikasie van *Protea* (o.a. 81 Suider- en 35 Midder-Afrikaanse spesies - Rourke 1980) feitlik uitsluitlik berus, blyk onvoldoende te wees om baie vrae rondom die genus (o.a. ook die filogenie) te beantwoord.

Ander bronne van inligting is dus nodig en chemiese parameters speel 'n groter wordende rol in die ontrafeling van taksonomiese verwantskappe. Vrye aminosure is maar een van 'n verskeidenheid groepe organiese verbindings van genetiese oorsprong, wat in chemotaksonomie gebruik is. Die chemotaksonomie is dus nie 'n aparte, losstaande klassifikasiesisteen nie en behoort op gelyke vlak met ander taksonomiese parameters gesien te word.

Die vrye aminosuurinhoud van Suider-Afrikaanse proteas het met enkele uitsonderings (Van Staden, 1966) min navorsers se aandag getrek. Die meeste ondersoek was redelik oppervlakkig en slegs gegrond op papierchromatografie van 'n paar spesies, sodat 'n dieper studie nodig was. Miskien was die groepe verbindings wat werk in hierdie veld bemoeilik (tanniene die belangrikste), vir die meeste 'n te groot kopseer.

Indien hierdie "probleemverbindings" identifisering, isolering en karakterisering in hierdie studie gaan bemoeilik, sal spesifieke suiwerings tegnieke ontwikkel en toegepas moet word, om ekstrakte vooraf te suiwer. Daar gaan gepoog word om soveel moontlik ninhidrienpositiewe verbindings te identifiseer en te isoleer. Isolate gaan gedeeltelik chemies gekarakteriseer en bewaar word vir 'n opvolgende studie.

HOOFSTUK 2

MATERIAAL EN METODES

2.1 Inleiding

Die basiese metode wat gevolg is om ninhidrienpositiewe verbindings uit plantmateriaal te isoleer en te identifiseer, word hier beskryf. Verskeie "afwykings" moes dikwels ingevoeg word, aangesien spesies en organe se samestelling verskil en so ook die groepe verbindings wat isolering en identifisering bemoeilik. Laasgenoemde metodes word onder "POGINGS OM ISOLERINGSPROBLEME UIT TE SKAKEL" in hoofstuk 3 bespreek.

2.2 Materiaal

Aanvanklik is slegs vars, klaarblyklik gesonde loofblare ewekansig versamel (droë massagewys ewe veel van elke "ouderdomsgroep"). Die groepeeringsanalise (kyk hoofstuk 5) is slegs op hierdie resultate gegrond, sodat orgaanverskille dit dus nie beïnvloed het nie.

Aminosuurkonsentrasies is ook in ander organe bepaal na aanleiding van 'n ondersoek in ons laboratorium deur 'n kollega (Frosch, 1986), nl.:

stingels,
loofblaartjies direk onder bloeiwyse,
omwindselblare,
blomme,
saad,
saadhare en
wortels (groeipunt apart van res).

'n Aansienlik hoër konsentrasie ninhidrienpositiewe verbindings is in baie jong loof, omwindselblare en blomme, vergelyke met ouer loof, gevind en daarom is eersgenoemde drie vir grootskaalse isolering gebruik.

2.3 Skeiding van Onoplosbare Verbindings en Lipofiele

Metode:

Die metode van Bielecki en Turner (1966) is met enkele wysigings gebruik. Kortliks kan dit as volg saamgevat word:

a) Versamelde materiaal is so gou moontlik geweeg en in

MeOH - CHCl₃ - H₂O 12 : 5 : 3 (hierna MCW genoem) fyngekap met 'n homogënisëerder ("Ultra-Turrax" of kommersiële kapper ("Kenwood-blender")). Die volume MCW/droë massa was 300 ml/30 g.

- b) Wanneer van die "Ultra-Turrax" gebruik gemaak is, is vir 10 sekonde periodes met "afkoelintervalle" van 20 sekondes gehomogeniseer.
- c) Ekstrakte is oornag laat staan.
- d) Hierna is dit deur glaswol filtreer.
- e) Lipiedonttrekking is met CHCl₃ gedoen deur 90 ml CHCl₃ + 162 ml H₂O by 300 ml MCW-ekstrak te voeg, te wag dat die bofase helder word en dit dan van die onderste lipiedbevattende CHCl₃-fase te skei.
- f) Stappe a - d is herhaal, die twee metanolwaterfraksies saamgevoeg en onder vakuum gekonsentreer teen 40 - 45 °C, totdat die MeOH ten minste af was.

Bespreking:

Daar is bevind dat berging van vars materiaal teen lae temperatuur, aanvanklik tot 'n verhoging in sommige vrye aminosure se konsentrasie gelei het. Alhoewel gewone vriesing die betroubaarste blyk te gewees het (vriesdroër nie beskikbaar nie), is soms steeds verskille vergeleke met die vars monster waargeneem (Powrie, 1986).

Oonddroging teen 40 °C vir dieselfde tydperk (vir so lank as wat bogenoemde vars materiaal geberg is), het 'n nog groter verhoging tot gevolg gehad. Dit mag toegeskryf word aan die vrystelling van aminosure uit proteïne of peptiede, waarin ensiemaktiwiteit en temperatuur 'n rol speel. Droë massabepaling is dus met 'n deel van die vars monster uitgevoer, terwyl MCW-ekstrahering so gou moontlik na versameling gedoen is. Die gevolg was dat materiaal van die 41 spesies, wat o.a. vir die groeperingsanalise gebruik is, oor 'n tydperk van vier maande versamel is.

Om oormatige verhitting uit te skakel, is die ekstrak met intervale homogënisëer. Die kapper is later vir alle ekstraksies gebruik, aangesien hittevrystelling baie min is, materiaal gewoonlik somer heel in die kapbeker geplaas is en fyn genoeg gekap is vir doeltreffende ekstrahering. Met die gebruik van die homogënisëerder, moes feitlik alle materiaal eers vooraf versnipper word met 'n sker.

'n Eerste ekstraksie het ten minste 70% vrye aminosure uit

die fyn plantmateriaal onttrek en 'n tweede ten minste 'n verdere 20%.

In die geval waar vinnige toetse uitgevoer is (soos om papierchromatografies die teenwoordigheid van spesifieke aminosure vas te stel), is slegs een ekstraksie gedoen. Met die oog op kwantitatiewe resultate, is 'n tweede en derde ook gedoen. Die volume CHCl_3 was in 'n steekproef wat 10 spesies behels het, genoeg om met 'n eerste ekstraksie alle spektrofotometries waarneembare chlorofil uit die oplossing te onttrek.

Skeiding van die lipied- en watermetanoloplosbare fases, is aanvanklik met skeitregters uitgevoer en het ongeveer agt uur geduur. Sentrifugering teen ongeveer 3 000 g vir 10 min het die proses aansienlik versnel.

Sommige verbindings in die metanolwatererekstrak (hierna MW-ekstrak) is baie swak oplosbaar in H_2O alleen (kyk 4.3.1) en daarom is sorg gedra dat die MeOH gedurende vakuümkonsentring afgedamp word. Die gekristalliseerde verbindings is dan onttrek deur sentrifugering of filtrering.

2.4 Ioonuitruiling

Aminosure besit amfoteriese polêre eienskappe, d.w.s. die zwitterioon se nettolading mag positief, neutraal, of negatief wees, afhangende van die pK_a waardes van die spesifieke molekule en die pH van die medium. Hierdie eienskap bied verkeie isoleringsmoontlikhede wanneer van ionuitruilhars gebruik gemaak word.

2.4.1 Kleinmaatioonuitruiling

2.4.1.1 Kationuitruiling

Metode:

- a) Glaskolommetjies (250 mm x 20 mm, 80 mm bedhoogte) is gepak met DOWEX 50W - X8 (H^+) 200 - 400 maat hars.
- b) Die lipiedvrye metanolwater ingedampde monster (maksimum 60 g droë massa) is op die hars geplaas en nadat die monster heeltemal weggesak het, is die kolommetjie met water gewas. Die pypie vanaf die reservoir is deur 'n rubberprop gesteek, wat styf op die kolommetjie gepas het. Die vloeitempo kon dus beheer word deur 'n verstelbare klamp aan die onderpunt van die kolommetjie.
- c) H_2O -wassing is gestaak wanneer die eluaat kleurloos voorgekom het (ongeveer 250 ml). Die eluaat is nie verder

gebruik nie.

- d) Katione is met 150 ml 3,0 N NH_4OH (vloei tempo 1,5 - 2,0 ml/min) afgeëluëer.
- e) Vakuümkonsentrering (tot ongeveer 10 g/ml) teen 40 - 45 °C het die vlugtige NH_3 en van die water onttrek (die "Büchi Rotavapor RE 120"-rolflesapparaat en "Little Giant mod. 13156"-druk/vakuümpomp is gebruik en die vakuüm was 800 - 1 000 mbar).
- f) Die hars is geregenereer deur met H_2O te was tot neutraliteit (oortollige NH_4OH uit), op te volg met 50 ml 4,0 N HCl en 'n tweede H_2O -spoeling tot pH 7.

Bespreking:

Daar is d.m.v. kwantitatiewe titrasie vasgestel dat 10 g (klammasse) DOWEX 50W - X8 (200 - 400 maat) hars voldoende is om alle katione, teenwoordig in 60 g droë Protea materiaal, (blomme en omwindselblare, want dis die organe wat die hoogste konsentrasie ninhidrienpositiewe verbindings bevat - kyk later) te adsorbeer. Die steekproef het 10 spesies behels, waarvan P. cynaroides die meeste katione bevat het. Aangesien kleinkolomkatioonuitruiling met 15 g (bedhoogte 80 mm) hars uitgevoer is, is die kolommetjies nie oorlaai nie.

'n Baie lae persentasie (maksimum 5%) ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer egter nie aan die katioonhars nie en beland dus in die viskose watereluaat. Laasgenoemde word dan deur 'n klein anioonuitruilkolom gestuur (kyk onder), om moontlike anioniese ninhidrienpositiewe verbindings te onttrek. Indien hierdie watereluaat (ook viskoos) steeds positief met ninhidrien toets, word sekere spesifieke suiweringstegnieke (kyk later in die hoofstuk) toegepas. Die hoeveelheid van hierdie verbindings hang definitief af van die volume MW-ekstrak wat op die hars geplaas is. Hoe groter die volume, hoe meer sal die verbindings "afgespoel" word. Dis dan ook belangrik om dieselfde volume H_2O per droë massa vir 'n spesifieke hoeveelheid hars te gebruik.

Aangesien kleinkolomuitruiling vir die voorbereiding van papierchromatografie en outomatiese aminosuuranalise monsters aangewend is en hierdie monsters dus verkieslik soveel moontlik van die verteenwoordigende ninhidrienpositiewe verbindings van die plant moes bevat, is MW-ingedampte ekstrakte eers deur katioonhars gestuur (feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer daaraan). Alhoewel die NH_4OH -eluaat nie viskoos is nie en goed op papierchromatogramme skei, is dit gewoonlik swartbruin van kleur (donkergeel in suurmedium). Die boonste laag hars vorm gewoonlik 'n gekleurde "kors", wat so dig saampak, dat die vloei soms heeltemal

staak. Van die verbindings in hierdie korslaag kon met geen elueermiddel aangewend (selfs 10 N HCl), verplaas word nie. Vermoedelik is tanniene hier ter sprake.

2.4.1.2 Anioonuitruiling

Metode:

- a) Glaskolommetjies van dieselfde grootte as in die geval van kleinkolomkatioonuitruiling (250 mm x 20 mm, maar met bedhoogte 180 mm), is gepak met DOWEX 1 - X8 (CH_3COO^-) 100 - 200 maat hars.
- b) Die H_2O -eluaat (onder vakuüm gekonsentreer) vanaf die katioonkolommetjies is opgeplaas en H_2O -wassing het begin nadat die monster weggesak het. Vloeiëregulering was dieselfde as in bogenoemde geval.
- c) 'n Vloeitempo van 3,0 ml/min is gehandhaaf.
- d) H_2O -wassing is opgevolg met 1,5 N CH_3COOH -eluering. Soms is 'n trapsgewyse gradiënt (bv. 0,1 N, 0,2 N, ens.) aangewend om verbindings van mekaar te skei, gewoonlik in 'n later stadium van isolering, wanneer spoorhoeveelhede van "ongewenste" verbindings uit die eintlike isolaat verwyder word (kyk hoofstuk 4).
- e) Die CH_3COOH is hierna deur kouelugverdamping uit die eluaat verwyder.
- f) Regenerering is slegs deur H_2O -wassing tot pH 6,0 verkry.

Bespreking:

Hoogstens vyf (gewoonlik drie: aspartiënsuur, glutamiënsuur en fosfoserien) ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer aan die anioonhars (teen pH = 5,5 - 6,5). Boonop is die grootste hoeveelheid van drie uit die vyf (o.a. aspartiënsuur en glutamiënsuur) reeds aan die katioonhars geadsorbeer, sodat relatief min hars vir die anioonuitruiling benodig word.

'n Klein persentasie pigment word deur die hars gehou, in teenstelling met die katioonhars. Die H_2O -eluaat hier is steeds baie viskoos.

2.4.2 Grootmaatkatioonuitruiling

Die gradiëntstelsel aangewend het uit die volgende komponente bestaan:

twee elueermiddelreservoirs (5,0 l elk), met mekaar

verbind d.m.v. 'n dun pypie (2,0 mm deursnee) met klamp,

'n peristaltiese pomp,

inspuit/ontlugtingsreservoir,

glaskolom/me

(soms 'n UV-monitor en skrywer) en

outomatiese fraksieversamelaar, wat met 'n kommunikasiekabel aan die peristaltiese pomp verbind is.

Hierdie tegniek is gebruik vir grootskaalse isolering van verbindings.

2.4.2.1 Anioonuitruiling

Metode:

- a) 'n Glaskolom (450 mm x 26 mm, bedhoogte 400 mm) is met DOWEX 1 - X8 (Cl^-) 100 - 200 maat gepak.
- b) Die hars is in die CH_3COO^- -vorm gebring, deur 1 000 ml 4,0 N CH_3COONa (natriumasetaat) daardeur te was en daarna die natriumsout met ongeveer 3 000 ml (groot volume) H_2O uit te loog. Hierna is 800 ml 1,0 N CH_3COOH deurgestuur, gevolg deur H_2O -wassing tot pH 6 (Hirs, Moore en Stein, 1954 - gewysigde metode).
- c) 'n Verstelbare boonste inlaat ("plunger") is aangebring.
- d) Monstergrootte: 70 - 600 g droë massa.
- e) Die vloeitempo was 3,5 ml/min en fraksievolume 10 - 20 ml.
- f) Gradiënteluering was met 0 - 2,0 N CH_3COOH en reservoir-volume 3,0 (1,5 + 1,5) - 4,0 (2,0 + 2,0) l.
- g) Die kolom is slegs met H_2O -wassing tot pH 6,0 herstel.

Bespreking:

Die UV-monitor (214 nm enkelband) en skrywer is aanvanklik slegs aangewend gedurende H_2O -wassing, om aan te dui wanneer die eluaat vry van absorberende verbindings is, sodat eluering van geadsorbeerde verbindings kon begin. Aangesien laasgenoemde eluaat van begin tot einde pigment bevat het en feitlik alle verbindings by 214 nm absorbeer, was hierdie apparaat van weinig nut by die opsporing van ninhidrienposi-

tiewe groepe.

Voor anioonuitruiling was die oplossings se pH 5,5 - 6,5 en onder hierdie toestande adsorbeer slegs vyf ninhidrienpositiewe verbindings aan die anioonhars, sodat skeiding makliker plaasvind as met kationuitruiling waar feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings gebind word. Spore van sommige ander (bv. glisien) is gewoonlik ook in die eerste fraksies teenwoordig. Die proses word ook baie vinniger afgehandel, omdat adsorberende verbindings relatief swak bind (almal af teen 1,3 - 1,5 N CH_3COOH).

Daar is nooit met 'n hoër normaliteit as 2,0 geëlueer nie, omdat gasborrels dan in die kolom ontstaan en 'n swart verkleuring van die hars tot gevolg gehad het, veral met H_2O -wassing daarna.

Gasborrels het deurentyd in die verbinding tussen die twee reservoires ontstaan en is verwyder deur een van die reservoires vinnig op te lig, sodat 'n kortstondige sterk stroom deur die verbinding die gas na die ander houer voer. Borrels het deurvloei van CH_3COOH sodanig blokkeer, dat 'n aansienlike verskil in die reservoires se vloeistofvlakke opgebou het. Indien die drukverskil dan groot genoeg was om die gas te verplaas, veroorsaak dit 'n skielike groot styging in die CH_3COOH -konsentrasie, wat skeiding op die kolom belemmer.

Gedurende eluering, sak die harsvlak (bedhoogte verlaag) soos die elueermiddel se normaliteit toeneem. 'n Verstelbare boonste kolominlaat ("plunger") is dus aangebring, aangesien die afstand wat die inlaat vanaf die harsvlak is, 'n invloed op die gradiënt het: hoe groter die afstand (groter volume), hoe minder steil sal die gradiënt verloop. Hierdie feit is soms nuttig aangewend, wanneer daar tydens 'n skeiding besef is dat die gradiënt te skerp is. Met herstel van die kolom na die CH_3COO^- -vorm (of die H^+ -vorm in die geval van kationuitruiling), is die inlaat weer na die oorspronklike boonste posisie verskuif gedurende H_2O -wassing, omdat die bedhoogte dan weer vergroot.

Asynsuur reageer met die meeste pigment, sodat dit 'n redelike sterk ninhidrienpositiewe reaksie met koltoetsing gee. Die kolrande vertoon duidelik gryspers en die binnekante blouerig. Kolle vertoon egter homogeen (na ontwikkeling), sodat die teenwoordigheid van enige "ware" ninhidrienpositiewe verbinding maklik opgemerk word. 'n Eksperiment is met verskillende ninhidriennegatiewe pigment uitgevoer. Die aangesuurde kolle het almal met feitlik dieselfde intensiteit verkleur (by dieselfde CH_3COOH -konsentrasie). 'n Hoër CH_3COOH -konsentrasie het 'n intenser kleurontwikkeling tot gevolg gehad.

'n Tweede eksperiment is uitgevoer waarin die ninhidrienreaksie van die volgende verbindings getoets is (negatiewe of positiewe ninhidrienreaksie in hakies agter elk): CH_3COOH (negatief), CH_3COOH + ninhidriennegatiewe pigment (swak positief), CH_3COONa (sterk positief), CH_3COONa + ninhidriennegatiewe pigment (sterk positief), HCl + ninhidriennegatiewe pigment (negatief), NaCl + ninhidriennegatiewe pigment (negatief) en NaCl (negatief).

(Konsentrasie van ione = 2,0 N en pigment by elk dieselfde volume. In al bogenoemde gevalle was daar geen beduidende verskil tussen ninhidrien met of sonder buffer pH 5,5 nie.)

Dit kom dus voor asof asetaat (of gedeelte daarvan) in die ninhidrienreaksie benodig word, tesame met natriumione (NaCl en CH_3COOH negatief, CH_3COONa positief) of iets soortgelyks wat waarskynlik in die pigment teenwoordig is (CH_3COOH negatief, CH_3COOH + pigment positief). Waterstof- en chloorione blyk onreëktief te wees (HCl en NaCl + pigment, asook slegs NaCl , negatief).

2.4.2.2 Katjoenuitruiling

Metode:

- a) Die glaskolom (1 000 mm x 26 mm, bedhoogte 950 mm) met verstelbare boonste inlaat is gepak met DOWEX 50W - X8 (H^+) 200 - 400 maat. Voor pakking is die hars herhaaldelik in gedistilleerde gedeïoniseerde H_2O opgeskud en die boonste vloeistoffase afgegooi, totdat laasgenoemde fase helder was (Hirs, Moore en Stein, 1954).
- b) Die vooraf gesuiwerde monster (kyk hoofstuk 3: POGINGS OM ISOLERINGSPROBLEME UIT TE SKAKEL) is d.m.v. die inspuit/ontlugtingsreservoir opgeplaas, droë massa 70 - 600 g.
- c) Vloeitempo 0,5 - 1,5 ml/min en fraksievolume 10 - 20 ml.
- d) Elueermiddels was H_2O , 0 - 6 N NH_4OH (gewoonlik) en 0 - 4 N HCl .
- e) Reservoirvolume het tussen 3,0 (1,5 + 1,5) en 5,0 liter (2,5 + 2,5) gewissel.
- f) Regenerasie van die kolom was soos met die klein katjoonkolommetjie, behalwe dat ongeveer 800 ml 4,0 N HCl na die eerste H_2O -wassing deurgestuur is, i.p.v. 50 ml.

Bespreking:

Anders as met kleinkolomuitruiling, was die kationmonster reeds deur anioonhars. Onder pH-toestande hier gebruik - kyk 2.4.2.1 - bind hoogstens vyf ninhidrienpositiewe verbindings aan die anioonhars. Deurdar anioniese ninhidrienpositiewe verbindings voor kationuitruiling onttrek is, is die "druk" (feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer aan die kationhars) op die kationkolom verminder, sodat 'n beter skeiding moontlik was. Voor anioonuitruiling is die aromatiese groep met geaktiveerde koolstof verwyder (kyk hoofstuk 3), sodat nog minder verbindings vir kationuitruiling beskikbaar was.

Baie fyn hars, wat waarskynlik kolomskeiding beïnvloed, is voor pakking verwyder, deur die hars herhaaldelik in H_2O op te skud en die vloeistoffase af te gooi, totdat laasgenoemde helder vertoon het.

Die vloeitempo was hier stadiger (0,5 ~ 1,5 ml/min) as in die geval van grootmaatanioonuitruiling (3,5 ml/min), omdat die hars se korreldeursnee in laasgenoemde geval groter was en 'n stadiger vloeitempo meer vermenging veroorsaak het.

HCl is aanvanklik as elueermiddel aangewend, maar is met NH_4OH vervang. Selfs so min as 3,0 N HCl het kolomsiffies binne twee lope vernietig. Boonop is die suurdampe skadeliker vir toerusting en is die menslike risiko om daarmee te werk, groter. Ammoniak is baie vlugtig en word maklik onder vakuüm teen 40 °C uit die eluaat onttrek, terwyl soutsuur d.m.v. tydrowende kouelugverdamping verplaas moet word. Onder vakuüm konsentreer die suur sodanig, dat veranderinge aan sommige aminosure se molekulêre struktuur plaasvind, bv. in die geval van aspartiensuur, verskuif die posisie op 'n papierchromatogram aansienlik, alhoewel die ninhidrienkleur steeds blou is.

Die bedhoogte verlaag amper twee keer meer met 3,0 N HCl as met selfs 8,0 N NH_4OH , sodat die verstelbare inlaat naderhand nie met die harsvlak kan kontak maak nie (skag te kort). Waarskynlik is laasgenoemde toe te skryf aan die feit dat H^+ sterker kationiese eienskappe as NH_4^+ besit en die hars dus digter "saampak" met suureluering.

In die geval van HCl, moet koltoetsing met gebufferde ninhidrien uitgevoer word, aangesien baie suur op die papier agterbly en die reaksie inhibeer. Daarteenoor vervlugtig NH_4OH feitlik totaal met droogblasing, sodat (indien enige) 'n skaars merkbare pers ringetjie op die kolrand ontwikkel. Daar word in elk geval 'n kontrolekol (slegs NH_4OH) opgesit, sodat ninhidrienpositiewe verbindings teenwoordig, dadelik onderskei kan word.

Dit blyk dat 6 N NH_4OH alle ninhidrienpositiewe verbindings, wat met suur (HCl en mieresuur) afelueerbaar is, van die hars verplaas.

2.5 Papierchromatografie

Een- en tweedimensioneel dalende papierchromatografie is in selfontwerpte glastenks (agt tenks met maksimum 10 chromatogramme elk van 460 mm x 570 mm) uitgevoer. Monsterkolle is in gram droë massa-ekwivalent uitgedruk en was gewoonlik in watermedium. Aanwending het d.m.v. 'n mikro-pipet geskied en koldroging met loutwarm lug van 'n haardroër. Die koldeursnee was 5 - 10 mm.

2.5.1 Eendimensionele Papierchromatografie

Metode:

a) Analitiese werk:

Whatman 1 en 3, (460 mm x 570 mm) asook Schleicher & Schuell (460 mm x 560 mm) papier is gebruik.

Die beste skeiding is oor die algemeen met n-butanol - asynsuur - water 90 : 10 : 29 pH 2,80 (hierna as BAW bestempel) en waterversadigde fenol pH 4,75 (hierna genoem fenol in teks of H_2O PheOH in die figure) verkry.

Looptyd 18 - 20 uur teen kamertemperatuur (15 - 25 °C).

Na behoorlike droging (kamertemperatuur) is chromatogramme met die ontwikkelingsreagens (0,25% ninhidrien in 'n 5,0% metanoliese oplossing van 2,4,6-kollidien) liggies bespuit en teen 105 °C vir 5 minute geoonddroog, of met 'n warmlughaardroër drooggeblaas.

b) Preparatiewe werk op Whatman 3:

'n Ry identiese kolle of homogene streep van die monster is opgesit, laat loop en gedroog, waarna dwarsbande m.b.v. merkerstroke en relatiewe pigmentposisie (kyk bespreking) geïdentifiseer en uitgeknipt is.

'n Punt van elke strook is spits geknip en in 'n proefbuis geplaas, terwyl die ander einde in 'n watertrog daarbo was.

Die opstelling is in 'n digsluitende chromatografietenk, waarvan die bodem met H_2O bedek was, gedoen. Verbindings is dalend afgeelueer en was totaal verteenwoordig in die

eerste 1 - 2 ml.

Stroke is soms ook versnipper en in H_2O geweek, die H_2O afgegooi (driemaal herhaal en bymekaar gevoeg), gefiltreer (papiervesels teenwoordig) en onder vakuüm gekonsentreer. Deur eers te filtreer voor konsentrering, word minder van die verbinding in die filtreerproses verloor. Hierdie metode is egter nie vir kwantitatiewe werk aangewend nie.

Bespreking:

Eendimensionele papierchromatografie is aangewend vir:

bepaling van die optimum massa-ekwivalent benodig vir tweedimensionele chromatografie,

identifisering van eluaatfraksies van 'n kolomskeiding,

bepaling van 'n verbinding se tweedimensionele posisie en

isolering op Whatman 3 papier.

Voor 'n groep ninhidrienpositiewe verbindings (meer as twee) in 'n monster tweedimensioneel gechromatografeer is, is die optimum massa-ekwivalent daarvoor eers eendimensioneel bepaal, deurdat vier of vyf kolle (vanaf 'n absolute minimum tot 'n definitiewe oorbelading) geloop word. Verbindings in die kleiner massa-ekwivalente is verste van die oorsprong geleë, terwyl oorbelading deur laer R_f -waardes gekenmerk word. Die optimum kolmasse gaan dus net minder wees as daardie massa waar die eerste tekens van oorbelading bespeur word.

Een en twee verbindings se optimum massa is met 'n koltoets vasgestel, deur na die ninhidrienkleurintensiteit te kyk. Dis maklik om die μg -ekwivalent so te skat en daar is d.m.v. standarde vasgestel dat 10 μg van 'n verbinding met min uitsonderings, duidelik tweedimensioneel geskei en sigbaar gemaak kan word. Probleme is egter met donkergekleurde monsters ondervind. Die oplossing was om die monsterkol eers op die toetspapier te plaas, droog te blaas en dan BAW daarop te drup, totdat die nat oppervlak so viermaal die deursnee van die oorspronklike monsterkol was. Feitlik al die donkergekleurde verbindings bly staties, terwyl ninhidrienpositiewe verbindings sirkelvormig na buite chromatografeer. Uit hierdie sirkelvormige chromatogrammetjie kon die optimum kolmasse-ekwivalent vir tweedimensionele papierchromatografie baie akkuraat geskat word, sodat dit later vooraf eendimensionele bepaling (wat etlike uur geduur en meer gekos het, teenoor 'n paar minute) vervang het.

Voordat ninhidrienpositiewe fraksies van 'n skeiding bymekaargevoeg is, is so elke drie of vier (afhangende van die monstergrootte en fraksievolume) eendimensioneel gechromatografeer. 'n Goede "beeld" van die skeiding is so verkry.

Gewoonlik is een of twee verbindings se tweedimensionele posisies eendimensioneel bepaal, omdat die twee "looprigtings" gelyktydig kon plaasvind. Boonop kon kleiner massa-ekwivalente aangewend word (selfs 15 nMol of ongeveer 1 µg, teenoor 45 nMol of so 3 µg tweedimensioneel).

Vir isolering is die monster in 'n ry kolle, of as streep (met gewysigde pasteurpipet) aangewend. Merkerstroke (smal strook van die oorsprong na die loopfront wat uitgeknipt en ontwikkel is) is tesame met "relatiewe pigmentposisie" aangewend vir die bepaling van ninhidrienpositiewe verbindings se posisies op onontwikkelde chromatogramme. Tussen merkerstroke (gewoonlik twee per chromatogram) was daar beduidende variasie in loopafstand, sodat bande deur merkerstroke aangedui, soms aansienlike vermenging in isolate veroorsaak het. Pigment (sigbaar op die stroke en onontwikkelde chromatogram) het hierdie variasie aangedui, sodat dwarsbande baie akkurater volgens die "kontoere" van die chromatogram versamel kon word.

2.5.2 Tweedimensionele Papierchromatografie

Metode:

- a) Whatman 1, asook Schleicher & Schuell papier (dieselfde afmetings as hierbo) is gebruik.
- b) Die eerste dimensie is gewoonlik met BAW geloop (looptyd = 18 - 20 uur) en die tweede met fenol (looptyd = 22 - 24 uur).
- c) Gedroogde chromatogramme is op dieselfde wyse as hierbo ontwikkel.

Bespreking:

Tweedimensionele papierchromatografie is aangewend vir:

identifisering van ninhidrienpositiewe verbindings,

isolering en

konsentrasiebepaling.

Die tweedimensionele posisie (R_f of relatiewe R_f) van 'n verbinding op 'n chromatogram, tesame met sy ninhidrien/kol-

lidien kleurontwikkeling, is 'n goeie parameter vir identifikasie. Boonop gee die intensiteit van ontwikkeling plus koloppervlak, 'n redelik betroubare aanduiding van die hoeveelheid van die verbinding op die chromatogram. Deur die monstervolume in ag te neem, kan hierdie verbinding se konsentrasie-orde in die monster dan bepaal word. Chromatogramme wat 'n outomatiese aminosuuranalise vooraf gegaan het, kon nuttig aangewend word om die monstervolume vir analise te bepaal.

Ontwikkelde chromatogramme is ook aangewend om sekere verbindings op die outomatiese aminosuuranaliseerder te karakteriseer. Daar is vasgestel dat nie meer as 10% van 'n ninhidrienpositiewe verbinding se molekwivalent (aantal mol teenwoordig) gedurende die ninhidrienreaksie behoort te reageer en dus "vernietig" word nie (steekproef met 13 standaardde). Deur chromatogramme eers te ontwikkel, kon kolle akkuraat uitgeknipt, die verbindings afgeëluëer en op die outomatiese aminosuuranaliseerder geplaas word. Alhoewel eluate feitlik altyd "onsuiwer" was, was die uitgeknipte verbinding in 'n beduidende hoër konsentrasie teenwoordig.

Na ontwikkeling is chromatogramme dadelik gefotostateer en sodoende in "swart en wit" bewaar. Behandeling van die oorspronklike chromatogram met Cu^{++} (vir behoud van die ninhidrienkleur) is aanvanklik oorweeg. Die filtreerpapier was egter nie sterk genoeg om in die lêersisteem (wat daaglik hanteer word) gebruik te word nie. Boonop verskyn allerhande vlekke met verloop van tyd op die "gepreserveerde" chromatogramme. Waar nodig, is kleur op die fotostate bygeskryf.

'n Voorkoms- en konsentrasiemuurkaart van 48 ninhidrienpositiewe verbindings uit 41 *Protea* spp. is opgetrek. Van hierdie inligting is gebruik vir die groepeeringsanalise in hoofstuk 5.

2.6 Outomatiese Aminosuuranalise

Die LKB 4150 Alpha analiseerder is gebruik, hoofsaaklik vir kwantitatiewe werk, maar ook as rugsteun vir identifikasie. 'n Standaardprogram vir analise van plantvloeistowwe (Powrie, 1986 - program 2) wat saam met die analiseerder verskaf is, is gebruik. Bufferoplossings en die ninhidrienreagens was ook standaard. 'n Dubbelpen skrywer is aan die integreerder gekoppel, sodat chromatogramme van 440 nm en 570 nm ook apart getrek is (integreerder teken slegs die somtotaal absorpsie in een chromatogram).

2.7 Infrarooispektrumbepaling

Die PERKIN-ELMER 983 infrarooi spektrofotometer is gebruik. Droë gekristalliseerde isolate van geïdentifiseerde (m.b.v. papierchromatografie, gerugsteun deur retensietye op die outomatiese aminosuuranaliseerder) aminosure, asook elk se outentieke standaard (MERCK), is in 'n nujolmedium voorberei (fyngemaal met 'n stamper en fysel in nujol) en die spektrums is tussen 625 nm en 4 000 nm getrek. Die groot piek (eintlik drie pieke) tussen 2 800 nm en 3 000 nm is toe te skryf aan die nujol.

2.8 Spesifieke Optiese Rotasiebepaling

Gekristalliseerde isolate is in H_2O opgelos (10,0 mg/ml), behalwe tirosien wat in 'n 1,0 N HCl (teen dieselfde konsentrasie) oplossing was. Bepalings is met die PERKIN-ELMER 141 POLARIMETER gedoen by 'n temperatuur van 20,0 °C.

HOOFSTUK 3

POGINGS OM ISOLERINGSPROBLEME UIT TE SKAKEL

3.1 Inleiding

Proteas besit verskeie verbindings wat ondersoek na die vrye aminosure belemmer, veral die relatief groot hoeveelheid taniene. Talle pigmentverbindings kom voor en baie besit van die chemiese eienskappe waarvan gebruik gemaak word in navorsing op aminosure, bv. netto elektriese lading, absorpsie by 440 en 570 nm en ooreenstemmende molekulêre grootte.

Probleme deur hierdie verbindings veroorsaak, sluit o.a. in:

adsorpsie aan kolompakstowwe,

belemmering van papierchromatografiese skeiding en identifisering van ninhidrienpositiewe verbindings,

viskositeit verhoed genoegsame konsentrering,

absorpsie by 440 en 570 nm word deur outomatiese aminosuuranaliseerder gemonitor en

polimerisering vorm klonte wat filtreersiffies van apparaat verstop.

Spesies verskil egter wat hulle samestelling van hierdie verbindings betref, sodat sekere ekstraksuiweringstegnieke van soort tot soort verskil het.

3.2 Ru-ekstrakfiltrering

Metode:

- a) Die fyngekapte MCW-ekstrak is deur glaswol in 'n tregter filtreer.
- b) Hierna is die tregterresidu met MCW gewas.
- c) Filtrering met glaswol, asook Whatman 1 papier, is in ander stadiums gebruik, wanneer van partikulêre materiaal in groot volumes ekstrak ontslae geraak is.
- d) Membraanfiltertjies onder vakuüm of druk, is vir meer gekonsentreerde monsters gebruik.

3.3 Sentrifugering

Metode en Bespreking:

Hierdie tegniek is aangewend om meer digte deeltjies (bv. polimere, partikulêre plantreste en kristalle) uit 'n oplossing neer te slaan. Skeiding van die metanolwaterfase van die lipofiliese chloroformfase, is ook aansienlik deur sentrifugering teen 3 000 g vir 10 min (i.p.v. ongeveer 12 uur teen normale swaartekrag) versnel (kyk hoofstuk 2).

3.4 Kristallisering

Metode en Bespreking:

In sommige gevalle, soos met die jong, rooi loofblare van P. rubropilosa, vorm massas naaldvormige klossies kristalle gedurende vakuümkonsentrering van die MW-ekstrak. MeOH word eerste afgedamp, waartydens geen kristallisering plaasvind nie, maar wanneer slegs H₂O teenwoordig is, vertroebel die ekstrak vinnig en klossies wit kristalle sak uit. Onddroging van hierdie kristalle, vorm 'n tumeletjieagtige kors (in die geval van P. rubropilosa was dit 9,02 g per 117,35 g droë materiaal, dus 7,69%).

Na die eerste groep kristalle uit die ekstrak onttrek is, pak 'n tweede groep geel kristalle teen die glashouerwande. Dis ook naaldvormig, maar die naalde is parallel tot mekaar gerangskik en het 'n soliede voorkoms. (Kyk verdere bespreking en karakterisering van hierdie twee kristalvorme in hoofstuk 4 onder "Ninhidriennegatiewe Verbindings".)

Gewoonlik vind kristallisering van ninhidriennegatiewe verbindings in hoogsgekonsentreerde na-DOWEX-ekstrakte (na ionuitruiling), wat vir papierchromatografie, outomatiese aminosuuranalise en finale isolering voorberei is, plaas. Tot dusver is nog net een aminosuur, waarskynlik tirosien, in so 'n ekstrak in kristalvorm neergeslaan.

Ninhidrienpositiewe verbindings is gewoonlik in 'n minimumvolume warm H₂O opgelos en met asetoon gekristalliseer (kyk hoofstuk 4 vir Spesifieke metodes).

3.5 PVP-neerslag

Sommige spesies bevat ninhidriennegatiewe verbindings wat met PVP (polivinielpirrolidoon) reageer, om 'n taai, donker geelbruin neerslag te vorm. Laasgenoemde is baie swak H₂O-oplosbaar, maar goed oplosbaar in alkalie soos NH₄OH. ²In

ander gevalle is die neerslag in die vorm van groot klonte wat maklik verwyderbaar is.

Metode:

- a) Nadat die MW-ekstrak so 75% onder vakuüm gekonsentreer is (MeOH onttrek), om eers van swak H_2O -oplosbare verbindings ontslae te raak, word ongeveer 1,0 g FVP / 20,0 g droë massa daarby gevoeg (massa vooraf bepaal, want spesies verskil t.o.v. FVP-reagerende verbindings).
- b) Effense verhitting (tot nie meer as $50^{\circ}C$ nie) laat die neerslag binne 1 min vorm. Aangesien laasgenoemde teen die houerwande klou, kan die residu maklik afgegoei word. Soms is die neerslag in die vorm van los stukke.

3.6 Oksidering deur Waterstofperoksied

Metode:

- a) Aanvanklik is 10% H_2O_2 -oplossings met 5% NH_4OH behandel en verhit tot ongeveer 50 grade C.
- b) Aangesien H_2O_2 onstabiel in alkaliese medium is, vind oksidasie geredelik plaas vir so 10 minute. Dis van eksotermiese aard, sodat die oplossing se temperatuur gedurende reaksie $100 - 101^{\circ}C$ is.
- c) NH_4OH is met katalase vervang en die oksidasie het teen kamertemperatuur verloop (katalase verwyder deur ionuitruiing hierna).

Bespreking:

Die meeste pigment reageer met H_2O_2 . Daarteenoor is dit bekend dat aminosure baie stabiel onder sulke toestande is. In die geval van pigment, verdwyn die kleur, sodat die oplossing (ekstrak) helderder voorkom. Dit beteken egter nie dat die pigmentmolekuul totaal vernietig is nie.

Gedurende H_2O_2 -oksidase daal die pH drasties (veral in groter monsters), sodat eers van die suur ontslae geraak moes word, voordat ionuitruiing uitgevoer is. Katalase blyk egter onstabiel te wees in die lae pH wat ontstaan, sodat spore van afbreekprodukte na oksidasie in die ekstrak teenwoordig is. Betreklik groot hoeveelhede katalase (tot 1,0 ml) van 'n gekonsentreerde katalase oplossing moes in sekere gevalle bygevoeg word, voordat enige effek waargeneem is. Die katalase is moontlik geïnaktiveer deur die polifenoliese verbindings in die ekstrak. Herhaalde kouelugindamping gedurende die proses (om te probeer verhoed dat die pH so laag

daal) was ook onsuksesvol en katalase het nog steeds ninhidrienpositiewe afbreekprodukte vrygestel. NH_4OH is dus voortaan gebruik. Die gevaar dat peptiede in die ekstrak (bv. verbinding 47 - kyk later in hoofstuk 4) onder hierdie hitte- en suurtoestande mag opbreek, het bestaan, sodat H_2O_2 -oksidasie slegs op isolate, waarvan die vrye ninhidrienpositiewe verbindings se inhoud bekend was, uitgevoer is.

Volgens absorpsiespektrums voor en na oksidasie, word ten minste 90% absorberende verbindings uit die oplossings verwyder deur H_2O_2 -behandeling. Kolompakstowwe herwin feitlik geheel en al hulle oorspronklike kleur na die proses. Eksperimente wat die ionuitruilvermoë van ongebruikte hars met die van pigmentverkleurdes en pigmentverkleurdes, wat met H_2O_2 behandel is, vergelyk, is uitgevoer. Geen beduidende verskil (99%) is gevind nie. Albei verskil ook nie beduidend van nuwe, ongebruikte hars nie.

3.7 Polimerisering

Metode en Bespreking:

'n Monster wat nog nie deur kationhars gestuur is nie en op die anioonkolom geplaas word, se H_2O -eluaat vorm gedurende 'n staantydperk van 24 uur 'n taai swartbruin neerslag. Aangesien dit bekend is dat sommige tanniene met aansuring (eluaat-pH 3,5 - 4,0) sodanig polimeriseer dat dit in 'n waterige oplossing uitsak en die asetonoplosbare neerslag van die eluaat boonop 'n swartblou kleur met FeCl_3 gee, is hierdie taai neerslag waarskynlik van tannienoorsprong.

Indien die neerslag in aseton opgelos word, H_2O bygevoeg word en die aseton dan weer deur vakuümkonsentrasie onttrek word, bly die verbindings in oplossing. Wanneer dit gevolglik op 'n kationhars geplaas word (DOWEX 50W-X8), addeer dit so sterk dat feitlik niks deur selfs 6,0 N HCl (of 16,0 N NH_4OH) verplaas word nie. (Die asetonoplossing is nie direk op die hars geplaas nie, uit vrees dat die aseton moontlik met die hars mag reageer.) Die ongedroogde neerslag is ten minste 8,0% van die totale oorspronklike droë massa.

Blote konsentrasie in 'n waterige medium en 'n paar dae staantyd in die yskas, lei dikwels tot die vorming van 'n presipitaat. Alhoewel sulke ekstrakte in 'n vroeër stadium reeds een of meer maal hoogsgekonsentreer is, is geen presipitaat gevorm nie. Moontlik is presipitasie verhoed deur ander verbindings teenwoordig, of was die viskositeit te hoog om die presipitaat te laat uitsak. In laasgenoemde geval kon die presipitaat weer opgebreek het wanneer die ekstrak in 'n volgende stap verdun is. Die presipitate was gewoonlik wit, geel of swartbruin van kleur.

3.8 Geaktiveerde koolstof

Polifenoliese en ander aromatiiese verbindings (o.a. ook aromatiiese aminosure soos triptofaan, tirosien en fenielalanien) adsorbeer aan geaktiveerde koolstof. Hierdie tegniek kan dus vir ekstraksuivering, maar ook om aromatiiese aminosure van ander te skei, aangewend word.

Metode:

- a) Die koolstof is geaktiveer deur dit vir 1 uur op te skud in 5,0% CH_3COOH , waarna die meeste oortollige CH_3COOH deur H_2O -wassing verwyder is.
- b) Die monster (gewoonlik MW) word bygevoeg en vir 30 min deeglik geskud.
- c) Die koolstof en vloeistof is dan deur 'n trechter met glaswol filtreer en die residu (koolstof + fenole) met H_2O gewas tot die filtraat helder voorgekom het.
- d) Onttrekking van die geadsorbeerde fenole geskied deur die koolstof nou in 5,0% (m/v) fenol in 20,0% (v/v) CH_3COOH goed op te skud, die oplossing af te gooi en die residu met nog fenol-asynsuur te was.
- e) Fenol is d.m.v. eteriekstrahering uit die fenoliese fraksie onttrek.

Bespreking:

Hierdie aromatiiese eluaat word dan eers met PVP, gevolg deur H_2O_2 , behandel, waarna ionuitruiling gewoonlik plaasvind. Aangesien die aromatiiese aminosure ook saam met ander aminosure (bv. valien, alanien leusien/isoleusien en 4-aminobotersuur), afhange van die isoleringsmetode, voorkom, is koolstofadsorpsie dikwels as 'n primêre skeidingstegniek toegepas. In hoofstuk twee is dit genoem dat aromatiiese verbindings gewoonlik eers uit die ekstrak onttrek is, waarna anionuitruiling plaasgevind het en laastens kationuitruiling, om die "druk" op die kationhars te verlig.

3.9 Eteriekstrahering

In sommige gevalle is fenole met dietieleter uit ekstrakte verwyder. Om die fenole eteroplosbaar te maak, moet die wat in die glikoonvorm teenwoordig is (gewoonlik die meeste), eers na die aglikoon (verwyder suikersyketting) gehidroliseer word.

Metode:

- a) Hidrolise is met 2,0 N HCl teen 100 °C vir 30 min uitgevoer.
- b) Die oplossing is dan 2x in 'n skeitregter in eter (helfte die volume van die oplossing) opgeskud en van die boonste eterfase geskei.
- c) Soutsuur is deur kouelugverdamping onttrek.

Bespreking:

Hierdie metode is egter met geaktiveerde koolstofadsorpsie vervang, omdat meer verbindings deur laasgenoemde onttrek is (suikerkettings het ook in die ekstrak agtergebly) en die aromatiere nihidrienpositiewe verbindings terselfdertyd van die res geskei is. Boonop het die gevaar bestaan dat van die peptiede in die ekstrak teenwoordig, kon hidroliseer.

3.10 Silikajelkolomchromatografie

Metode:

- a) Eluering is met die kolomstelsel (elueermiddelreservoir, peristaltiese pomp, kolom, absorpsiemonitor en skrywer en 'n outomatiese fraksieversamelaar) uitgevoer.
- b) Die elueermiddel was H₂O of 0,5 N CH₃COOH.
- c) Swamgroeï op die kolompakstof is met 0,2% n-butanol (hierna BuOH) in die elueermiddel verhoed.

Bespreking:

Verbindings word hier hoofsaaklik op grond van molekulêre grootte geskei. Gedurende die proses, word veral van die groot hoeveelheid tanniene ontslae geraak. Ongelukkig reageer van die verbindings met die jel (Merck Kieseljel 60, 230 - 400 maat). Aromatiere aminosure soos tirosien, triptofaan en fenielalanien reageer moontlik ook met die jel, aangesien daar 'n groot verlies (30% - 80%) van hierdie aminosure was.

3.11 Trisakriljelkolomchromatografie

Trisakriljel (IBF/LKB Trisacryl GF 05) is analoog aan Sephadexjel en skei dus verbindings op grond van molekulêre grootte. Aangesien Sephadex nie bekombaar was nie, is trisakril gebruik.

Metode:

- a) Dieselfde kolomstelsel (beskryf in paragraaf 3.10) is gebruik, met H_2O of $0,5\ N\ CH_3COOH$ in $0,2\%$ $BuOH$ as elueermiddel.
- b) 'n Kort voorafkolom ($40,0\ cm \times 1,6\ cm$) en langer kolom ($100,0\ cm \times 1,6\ cm$) is met trisakriljel gepak, sodat die adsorberende en stadigbewegende verbindings uit die lang kolom gehou is.
- c) Die jel is herwin deur omgekeerde eluering, gewoonlik met die elueermiddel oorspronklik aangewend, maar in gevalle waar baie adsorpsie plaasgevind het, is van $2,0\ M\ NaCl$ gebruik gemaak.

Bespreking:

Die jel aangewend, lewer 'n liniere skeiding van verbindings met molekulêre massas $200 - 2\ 500$. Dit beteken dat die aminosure, waarvan die molekulêre massas meestal tussen 100 en 250 wissel, in 'n smal band afgeelueer is.

Adsorpsie aan die jel vind egter plaas en dit wil voorkom asof sommige aminosure (nie suuraminosure nie) hieronder val. Trisakriljel is gewoonlik slegs aangewend wanneer bekende aminosure, waarvan die gedrag t.o.v. die jel reeds voorheen bepaal is, in die monster teenwoordig was. Verder adsorbeer geen van die verbindings wat die jelkolom verlaat, "onaf-elueerbaar" op DOWEX ionuitruilhars nie. Dit kom dus voor asof dit dieselfde groep is wat in beide gevalle probleme skep.

Volgens die litteratuur behoort geen aminosuur op die trisakriljel te adsorbeer nie. Die resultate kan moontlik aan 'n aminosuur-"tannien"-jel interaksie toegeskryf word.

3.12 Temperatuurbehandeling

Metode en Bespreking:

Ioonuitruileluatefraksies wat by kamertemperatuur ($18 - 25\ ^\circ C$) homogeen donkerbruin gekleur is, vorm gekonsentreerde swartbruin bande bo en/of onder in die proefbuis gedurende bevriesting. Die res van die oplossing word aansienlik ligter en in baie gevalle feitlik glashelder. Met ontvriesting vind vermenging deur diffusie baie stadig plaas. Indien teenwoordig, is die boonste band eerste met 'n pasteurpipet afgesuig en daarna die onderste.

Die hoeveelheid ninhidrienpositiewe materiaal teenwoordig in

die bande, is aansienlik verminder deur die totale oplossing te verdun deur oplosmiddelbyvoeging (gewoonlik H_2O). Die konsentrasie van pigment in die bande bly skynbaar dieselfde, terwyl die ninhidrienpositiewe verbindings, wat blykbaar in die hele oplossingkolom homogeen gekonsentreer is, se konsentrasie in die bande laer is.

Relatiewe digtheidsveranderinge met temperatuurverandering, is moontlik vir bogenoemde verskynsel verantwoordelik. Die oplosmiddel en pH van die oplossing behoort ook 'n rol te speel. Eksperimentering met hierdie tegniek duur voort.

3.13 Iydbehandeling

Metode en Bespreking:

Ninhidrienpositiewe isolate wat d.m.v. ioonuitruiling gesuiwer is, het altyd bruin of geel in waterige oplossing vertoon. Wanneer hierdie isolate in 'n vrieskas vir 'n maand of meer geberg word en die spesifieke ioonuitruilproses weer herhaal word, skei 'n groot fraksie (volgens absorpsiespektrums tussen 200 nm en 750 nm tot meer as 90%) van die absorberende ninhidriennegatiewe verbindings van die ninhidrienpositiewes. Ninhidrienpositiewe verbindings se gedrag t.o.v. die hars bly dieselfde, terwyl 'n groot fraksie van die pigmente s'n blykbaar verander.

3.14 Anioonuitruiling

Metode en Bespreking:

- As spesifieke suiweringsstap, is slegs van klein kolomme (15,0 cm x 2,0 cm), gepak met DOWEX 1 - X8 (CH_3COO^-) (100 - 200 maat), gebruik gemaak en dan gewoonlik op 'n latere stadium van isolering, bv. om van ongewenste spoorhoeveelhede in 'n isolaat ontslae te raak. Die kolomstelsel is nie hier aangewend nie, maar 'n eenvoudige, geslote vloeisistiem.
- Eluering was gewoonlik met 0 - 2 N CH_3COOH en die kolommetjies is geregenereer deur slegs met H_2O te was tot pH 5 - 6.

3.15 Katioonuitruiling

Metode en Bespreking:

- Dok hier is slegs klein kolommetjies as spesifieke suiweringsstap gebruik. Die pakstof was DOWEX 50W - X8 (H^+)

200 - 400 maat).

- b) Die elueermiddel was gewoonlik 0 - 4 N NH_4OH , maar 0 - 2 N HCl is soms aangewend.

HOOFSIUK 4

ISOLERING EN GEDEELTELIKE KARAKTERISERING

4.1 Inleiding

Na aanleiding van die resultate met papierchromatografie verkry en beskikbaarheid van materiaal, is besluit om aminosure uit die volgende drie spesies te isoleer: *E. aurea* ssp. *aurea*, *E. glabra* en *E. rubropilosa*.

Alhoewel daar op ninhidrienpositiewe verbindings gekonsentreer is, is 'n paar van die belangrikste ninhidriennegatiewes, wat algemeen in hoë konsentrasies voorgekom het, ook geïsoleer. Laasgenoemde groep het talle probleme veroorsaak, bv. gedurende ioonuitruiling (kristallisering in die harskolom of "sameklonting" van die harsoppervlak), binne ekstrahouers (neerslag) en selfs op papierchromatogramme (kristallisering gedurende droging van die kol vorm harde kors wat skeiding belemmer - kristalle baie swak oplosbaar in loopvloei-stowwe aangewend).

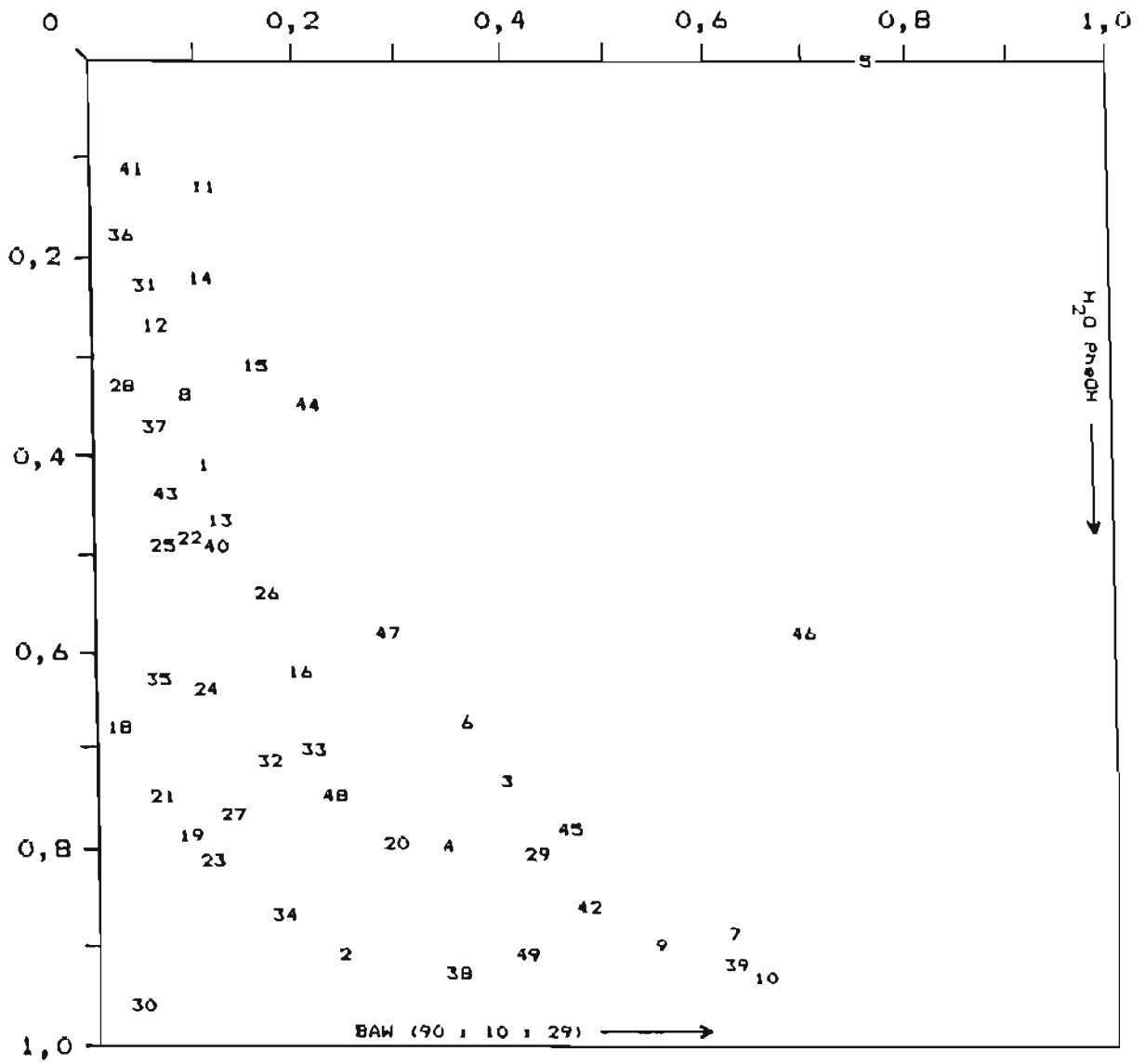
4.2 Ninhidrienpositiewe Verbindings

Suiwer geïsoleerde verbindings is in die kristalvorm gestoor teen -20°C , behalwe die basiese bruin onbekende 10, suur grys onbekende 18, geel onbekende 45, gryspers onbekende 46 en etanolamien, wat in waterige oplossing geberg is by -20°C . Laasgenoemde is ook in 'n donker houer bewaar omdat dit ligsensitief is. Die nommers wat hier gebruik is verwys na Figuur 4.1 en Tabel 4.1, wat dieselfde as Figuur 5.1 en Tabel 5.1 is (vir maklike verwysing). Verbindings se identiteit is voorlopig d.m.v. ko-chromatografie van standaard op papier en retensietye op die outomatiese aminosuuranaliseerder bepaal. Die suiwerheid van die ses gekristalliseerde verbindings is d.m.v. infraroodspektrofotometrie bepaal en vyf se spesifieke optiese rotasie is vasgestel. Kwantitatiewe bepaling is met die aminosuuranaliseerder gedoen en waar verbindings in die kristalvorm was, is dit ook geweeg.

Die prosedure wat gevolg is met die isolering van die ninhidrienpositiewe verbindings, word in telegramstyl weergegee.

4.2.1 Arginien

Suiwering: katioonuitruiling + trisakriljelfiltrering



Figuur 4.1 - Voorstelling om die tweedimensioneel papierchromatografiese posisies van 48 ninhidrienpositiewe verbindings uit 41 Suid-Afrikaanse spesies van *Protea*, aan te dui. (Kyk Tabel 4.1 vir meer besonderhede.)

Tabel 4.1 - Voorlopige identifikasie en eienskappe van ninhi-drienpositiwe verbindings aangedui in Figuur 4.1.

bg = blougroen o = oranje
 bl = blou ob = oranjebruin
 bp = bloupers og = oranjegeel
 br = bruin p = pers
 ge = geel rv = rooiviolet
 gp = gryspers v = violet
 gr = grys
 s = standaardafwyking van die gemiddelde
 gr - p beteken grys verander na pers binne 24 uur

| Nr. | Identiteit | Nin/kol kleur | BAW (90 : 10 : 29) | | H ₂ O PheOH | |
|-----|--------------------------|------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | R _f (s) | R _f Ala (s) | R _f (s) | R _f Ala (s) |
| 1 | serien | br - gp | 0,11(0,02) | 0,58(0,04) | 0,41(0,01) | 0,66(0,03) |
| 2 | prolien | ge - p | 0,24(0,02) | 1,22(0,03) | 0,91(0,01) | 1,46(0,03) |
| 3 | onbekend | o - p | 0,40(0,02) | 2,12(0,06) | 0,73(0,02) | 1,16(0,05) |
| 4 | 4-aminobottersuur | p | 0,34(0,03) | 1,66(0,04) | 0,80(0,01) | 1,29(0,03) |
| 5 | onbekend | gr | 0,77(0,02) | 3,83(0,06) | 0,00(0,00) | 0,00(0,00) |
| 6 | tirosien | gr - p | 0,36(0,01) | 1,79(0,06) | 0,67(0,02) | 1,08(0,04) |
| 7 | leusien/isoleusien | p | 0,61(0,04) | 2,93(0,05) | 0,89(0,02) | 1,44(0,04) |
| 8 | onbekend | o | 0,09(0,01) | 0,47(0,05) | 0,34(0,03) | 0,55(0,05) |
| 9 | fenielalanien | br - p | 0,55(0,04) | 2,70(0,06) | 0,90(0,02) | 1,44(0,05) |
| 10 | onbekend | br - p | 0,64(0,03) | 3,05(0,07) | 0,93(0,01) | 1,50(0,06) |
| 11 | onbekend | ge | 0,11(0,02) | 0,52(0,06) | 0,13(0,03) | 0,21(0,05) |
| 12 | onbekend | ge | 0,06(0,01) | 0,32(0,05) | 0,27(0,03) | 0,44(0,05) |
| 13 | glisien | rv - p | 0,12(0,01) | 0,63(0,04) | 0,47(0,01) | 0,76(0,02) |
| 14 | aspartiensuur | b - p | 0,11(0,01) | 0,56(0,04) | 0,22(0,02) | 0,35(0,03) |
| 15 | glutamiensuur | v - p | 0,16(0,01) | 0,78(0,04) | 0,31(0,02) | 0,50(0,03) |
| 16 | alanien | p | 0,20(0,02) | 1,00(0,00) | 0,62(0,01) | 1,00(0,00) |
| 18 | onbekend | gr - p | 0,02(0,01) | 0,10(0,03) | 0,68(0,02) | 1,09(0,05) |
| 19 | onbekend | bg - p | 0,09(0,01) | 0,42(0,03) | 0,79(0,03) | 1,27(0,04) |
| 20 | etanolamien | ob - gp | 0,29(0,03) | 1,53(0,06) | 0,80(0,01) | 1,30(0,04) |
| 21 | histidien | p | 0,06(0,02) | 0,28(0,07) | 0,75(0,02) | 1,21(0,07) |
| 22 | asparagien | o - ob | 0,09(0,01) | 0,45(0,03) | 0,49(0,01) | 0,79(0,03) |
| 23 | onbekend | p | 0,11(0,00) | 0,62(0,05) | 0,61(0,00) | 1,28(0,07) |
| 24 | glutamien | v - p | 0,11(0,02) | 0,56(0,05) | 0,64(0,02) | 1,03(0,04) |
| 25 | lisien | p | 0,08(0,02) | 0,41(0,05) | 0,49(0,03) | 0,79(0,06) |
| 26 | treonien | gr - p | 0,17(0,02) | 0,87(0,03) | 0,54(0,02) | 0,87(0,02) |
| 27 | arginien | p | 0,13(0,01) | 0,64(0,03) | 0,77(0,01) | 1,24(0,02) |
| 28 | onbekend | p | 0,03(0,01) | 0,17(0,02) | 0,33(0,03) | 0,53(0,05) |
| 29 | valien | gr | 0,43(0,03) | 2,13(0,05) | 0,81(0,02) | 1,31(0,04) |
| 30 | onbekend | gr - p | 0,04(0,01) | 0,19(0,03) | 0,96(0,01) | 1,58(0,02) |
| 31 | ornitien | p | 0,05(0,00) | 0,25(0,01) | 0,23(0,01) | 0,38(0,02) |
| 32 | onbekend | rv - p | 0,17(0,02) | 0,82(0,04) | 0,71(0,02) | 1,14(0,03) |
| 33 | 3-alanien | b | 0,21(0,03) | 1,14(0,03) | 0,70(0,03) | 1,12(0,01) |
| 34 | onbekend | p | 0,18(0,01) | 0,87(0,04) | 0,87(0,01) | 1,41(0,03) |
| 35 | 2,3-diaminopropioonsuur? | v - p | 0,06(0,01) | 0,38(0,03) | 0,63(0,03) | 1,00(0,03) |
| 36 | onbekend | p | 0,03(0,01) | 0,17(0,02) | 0,18(0,03) | 0,29(0,03) |
| 37 | sistien? | v - gp | 0,06(0,01) | 0,29(0,02) | 0,37(0,01) | 0,59(0,01) |
| 38 | pipekoliensuur | bp - -- | 0,35(0,03) | 1,92(0,05) | 0,93(0,01) | 1,49(0,04) |
| 39 | onbekend | v - p | 0,62(0,01) | 2,95(0,07) | 0,92(0,01) | 1,47(0,06) |
| 40 | onbekend | p | 0,11(0,01) | 0,55(0,04) | 0,49(0,01) | 0,79(0,02) |
| 41 | fosfoserien | bp | 0,03(0,01) | 0,16(0,02) | 0,12(0,01) | 0,20(0,02) |
| 42 | triptofaan | br - p | 0,48(0,01) | 2,17(0,04) | 0,86(0,01) | 1,33(0,01) |
| 43 | onbekend | p | 0,07(0,01) | 0,35(0,02) | 0,44(0,01) | 0,71(0,01) |
| 44 | onbekend | p | 0,21(0,01) | 1,05(0,03) | 0,35(0,02) | 0,56(0,03) |
| 45 | onbekend | og - p | 0,47(0,03) | 2,35(0,05) | 0,78(0,02) | 1,26(0,05) |
| 46 | onbekend | gp | 0,72(0,10) | 3,60(0,16) | 0,57(0,07) | 0,92(0,11) |
| 47 | onbekend | bp - p | 0,26(0,02) | 1,30(0,04) | 0,59(0,03) | 0,95(0,05) |
| 48 | onbekend | br - p | 0,23(0,01) | 1,15(0,02) | 0,75(0,01) | 1,21(0,02) |
| 49 | onbekend | o - p | 0,42(0,03) | 2,10(0,05) | 0,91(0,01) | 1,47(0,03) |

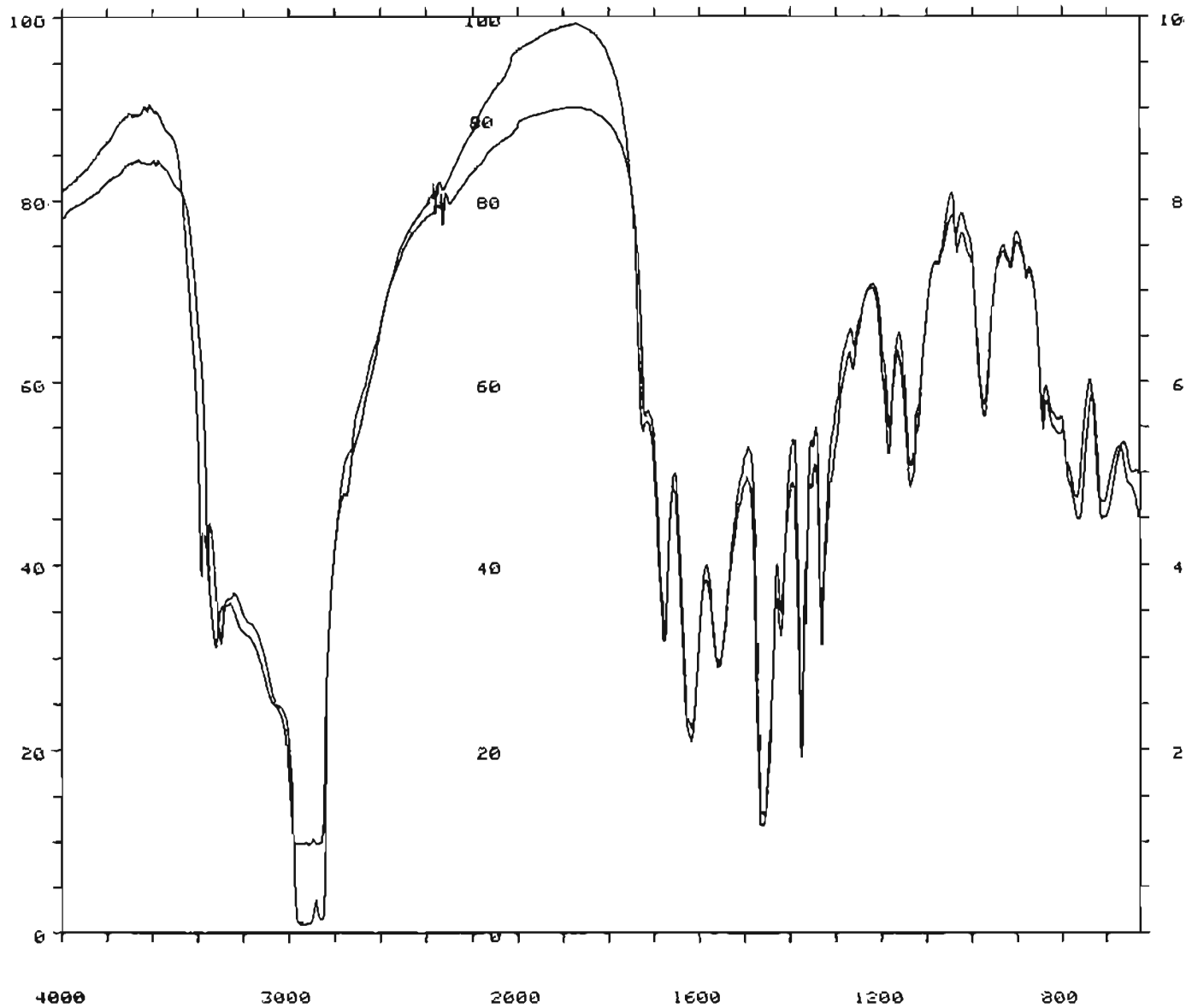
Monster: *P. aurea* ssp. *aurea*
MCW 800 g droog (blomme, blare en stingels).

Metode en Bespreking:

- a) Glaskolom (26 x 1 000 mm) gepak met DOWEX 50W - X8 (H^+) (200 - 400 maat).
- b) Sit monster op, H_2O -wassing tot helder eluaat, 0 - 6 N NH_4OH -eluering, arginien is die laaste ninhidrienpositiese verbinding om die kolom te verlaat (5% oorvleueling met etanolamien).
- c) Vloeitempo 1 ml/min.
- d) Vakuumkonsentrering onttrek NH_3 en 'n deel van die H_2O .
- e) Arginien is baie goed oplosbaar in H_2O , maar so ook die ander verbindings wat saam van die kationkolom geelueer is. Hierdie hoogsversadigde toestand mag die rede wees dat, wanneer aseton by die H_2O -oplossing gevoeg word, 'n deelvolum van die H_2O as 'n onderste fase van die melkerige res skei. Die boonste fase lewer wit kristalle, maar gekleurde kristalle slaan uiteindelik onder neer (kristallisering duur relatief lank: 5 - 7 uur).
- f) Gevolglik is MeOH by die heropgeloste kristalle (asetoon weer bygevoeg) gevoeg, totdat die onderste H_2O -fase net verdwyn. Die kristalle was nou homogeen verkleur.
- g) Aangesien arginien baie swak oplosbaar is in MeOH, is die kristalle daarin opgeskud. Die MeOH-fase het lig verkleur (ongeveer 20% pigment onttrek en waarskynlik nie meer as 5% arginien verloor nie).
- h) Verdere suiwering geskied deur trisakriljelkolomchromatografie en herkristallisering met $H_2O/MeOH/asetoon$.
- i) Die infrarooispektrums van die isolaat en standaard (MERCK: L-arginien) is getrek (Figuur 4.2 - kyk 2.7 vir metode) en die spesifieke optiese rotasie is in water bepaal ($+9,9^\circ$ - kyk 2.8 vir metode).

Uit die resultate in i) blyk dit 'n baie suiwer isolaat van L-arginien te wees.

Interessante opmerking: In vier verskillende orgaanmonsters van *P. neriifolia* (saad, blomme, omwindselblare en loofblare), is tweedimensioneel papierchromatografies opgemerk dat 'n groot hoeveelheid arginien (onopspoorbaar in die vars monsters) na drie maande berging, teenwoordig was. Hoofsaaklik een van die oorspronklik teenwoordig, het verdwyn. Twee-



Figuur 4.2 - Infraroodspektrums van standaard arginien (Merck - bo) en arginien geïsoleer uit *Protea aurea aurea* (onder).

dimensioneel papierchromatografies blyk laasgenoemde ornitien te wees. In die ornitiensiklus, wat in baie plante reeds gevind is, word ornitien deur die uitsplyt van ureum d.m.v. arginase uit arginien gevorm. Dit mag wees dat die omskakeling spontaan plaasgevind het, maar kon ook deur mikroörganismes veroorsaak gewees het, alhoewel die monster teen ongeveer 3 °C geberg was in water en op die oag af ongekontamineer voorgekom het.

Oopbrengs: 18,0 mg

4.2.2 Asparagien

Suiwering: papierchromatografie + anioon- + katioonuitruiling

Monster: *P. aurea* ssp. *aurea*
NH₄OH-eluaat (gemeng vanaf katioonkolomme),
400 g droog (blomme, loof en stingels).

Metode en Bespreking:

- a) Whatman 3 papier (46 x 57 cm), H₂O-gewas.
- b) Eerste dimensie geloop met BAW vir 18 uur.
- c) Dwarsbandversameling en H₂O-eluering volg.
- d) Tweede dimensie eluering was met fenol.
- e) Dwarsbandversameling en H₂O-eluering toon steeds spore van aspartiensuur, sistien, glisien en waarskynlik glutamiensuur op die aminosuuranaliseerder.
- f) Deur 'n klein glaskolom (20 x 200 mm), gepak met DOWEX 1 - X8 (CH₃COO⁻) (100 - 200 maat), waarop die monster beskryf in e) geplaas is, met H₂O te was, is 'n glashelder, pigmentvrye eluaat van asparagien verkry, sonder die spore van aspartiensuur en glutamiensuur, maar met sistien en glisien skaars waarneembaar teenwoordig (slegs op outomatiese aminosuuranaliseerder).
- g) Dieselfde grootte katioonkolommetjie (DOWEX 50W - X8 (H⁺) 200 - 400 maat) lewer ten minste 80% van die asparagien in f) suiwer met 0,5 N NH₄OH, nadat trapsgewys met 0,1 - 0,8 N geëlueer is.
- h) Kristallisering: Die isolaat in g) is opgelos in die minimum volume water teen 50 °C (kookpunt van asetoon = 53 °C). Asetoon is stadig by die oplossing in die proefbuis gevoeg, totdat dit net melkerig vertoon het. Die

proefbuis is deurentyd in 'n groot beker met water (aanvangstemperatuur 50°C) gehou. Na asetonbyvoeging is die proefbuis steeds in die beker water laat staan vir stadige afkoeling. Sodra kamertemperatuur bereik is, is die beker oorgeplaas na 'n koue waterbad teen 10°C . Eers wanneer hierdie temperatuur bereik is, is die proefbuis teen dieselfde temperatuur gesentrifugeer (slegs 500 g vir 5,0 min) en die bovloeistof afgegooi. Die prosedure is drie keer herhaal, waarna die kristalle wit naaldvormig vertoon het.

- i) Die infrarooispektrums van die isolaat en standaard (MERCK: DL-asparagien) is getrek (Figuur 4.3) en die spesifieke optiese rotasie is in water bepaal ($-1,9^{\circ}$). Hieruit blyk dit 'n baie suiwer isolaat van L-asparagien te wees.

Opbrengs: 10,0 mg

4.2.3 Aspartiensuur

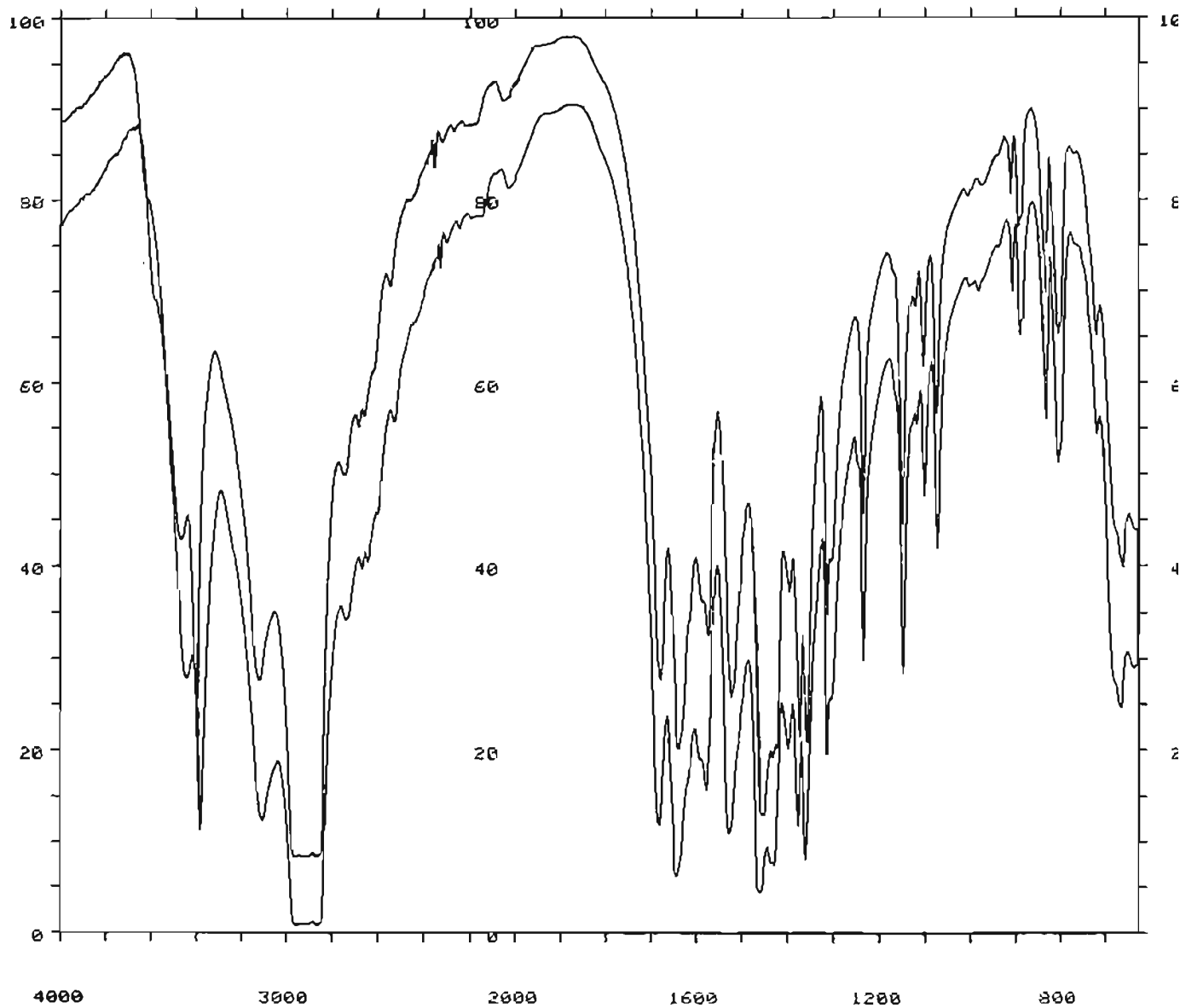
Op drie maniere gesuiwer: 1. Katioonuitruiling
2. Anioonuitruiling
3. Papierchromatografies

1. Katioonuitruiling

Monster: P. aurea ssp. aurea
MCW 800 g droog (blomme, blare en stingels).

Metode:

- a) Glaskolom (1 000 x 26 mm), gepak met DOWEX 50W - XB (H^+) (200 - 400 maat).
- b) Die ingedampde ekstrak is deur klein katioonkolommetjies gestuur.
- c) Eluering is met 4,0 N NH_4OH uitgevoer en die eluaat is onder vakuüm gekonsentreer.
- d) Die konsentraat is op die groot katioonkolom geplaas en met 6,0 liter 0,1 N NH_4OH geëluëer.
- e) Vloei tempo 1,0 ml/min.
- f) Versamel die neutrale pH fraksie waarin aspartiensuur suiwer voorkom (eerste NH_4OH verlaat die kolom na 6,0 liter eluaat).



Figuur 4.3 - Infraroodspektrums van standaard asparagien (Merck - bo) en asparagien geïsoleer uit *Protea aurea aurea* (onder).

2. Anioonuitruiling

Monster: P. glabra
MCW 500 g droog loofblare.

Metode:

- a) Glaskolom (1 000 x 16 mm), gepak met DOWEX 1-XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- b) Die ingedampde ekstrak is direk op die groot kolom geplaas.
- c) Gradiënteluering was met 0 - 2 N CH_3COOH .
- d) Vloeitempo 2,5 ml/min.
- e) Aspartienuur kom suiwer in die laaste 35% ninhidrienpositiewe fraksies voor (bestaande uit eerstens glutamienuur, oorvleuel en opgevolg deur aspartienuur).

Monster: P. rubropilosa
MCW 300 + 500 g droog (rooi, jong loofblare).

Metode:

- a) Stappe a) - d) dieselfde as bogenoemde.
- b) Glutamienuur kom eerste suiwer af, gevolg deur aspartienuur wat oorgaan na die onbekende suur peptied (kyk later isolering van peptied, verbinding 47).
- c) Fraksies vanwaar aspartienuur met die peptied begin vermeng, asook die waarin die peptied suiwer voorkom, is gekombineer, die CH_3COOH deur kouelugverdamping verwyder en weer op die anioonkolom geplaas.
- d) H_2O -wassing en gradiënteluering met CH_3COOH lewer alle ninhidrienpositiewe komponente, behalwe aspartienuur, in die H_2O -eluaat, sodat aspartienuur suiwer versamel is (peptied blykbaar totaal gehidroliseer - komponente almal anionies neutraal).

3. Papierchromatografies

Monster: P. aurea ssp. aurea
100 g droog (blomme, loof en stingels).

Metode:

- a) Whatman 3 papier (460 x 570 mm), H_2O -gewas.

- b) Die MCW-ekstrak is eers deur klein kationuitruilkolommetjies gestuur en met 4,0 N NH_4OH afgeelueer.
- c) Vakuumpkonsentraat is in ewe groot kolle van 300 mg droë massa, 8,0 mm in deursnee en met middelpunte 20,0 mm uitmekaar, op die papier geplaas.
- d) Eerste loop was met BAW in die lengte vir 18 uur.
- e) Dwarsstroke is uitgeknip en afgeelueer met H_2O .
- f) Tweede loop was fenol en kolgrootte dieselfde, vir 24 uur.
- g) Dwarsstroke is weer uitgeknip en afgeelueer met H_2O .
- h) Die isolaat was eendimensioneel papierchromatografies suiwer, maar analise deur die outomatiese aminosuuranaliseerder het die teenwoordigheid van onsuiverhede aangedui.
- i) Isolaat is op die klein anionkolom geplaas en geelueer met 0,1 N, 0,2 N, 0,3 N, 0,4 N en 0,5 N CH_3COOH .
- j) Aspartiensuur was suiwer teenwoordig in die 0,4 N en 0,5 N eluate.

Kristallisering van al die aspartiensuurisolate uit 1, 2, 3 en 4 was met H_2O en asetoon, soos asparagien.

Die infrarooispektrums van die gekombineerde isolate en standaard (MERCK: L-aspartiensuur) is getrek (Figuur 4.4 - die drie pieke tussen 2 800 nm en 3 000 nm is aan die nujol toe te skryf) en die spesifieke optiese rotasie is weer in water bepaal (+3,5°). Dit blyk 'n baie suiwer isolaat van L-aspartiensuur te wees.

Opbrengs: 45,0 mg

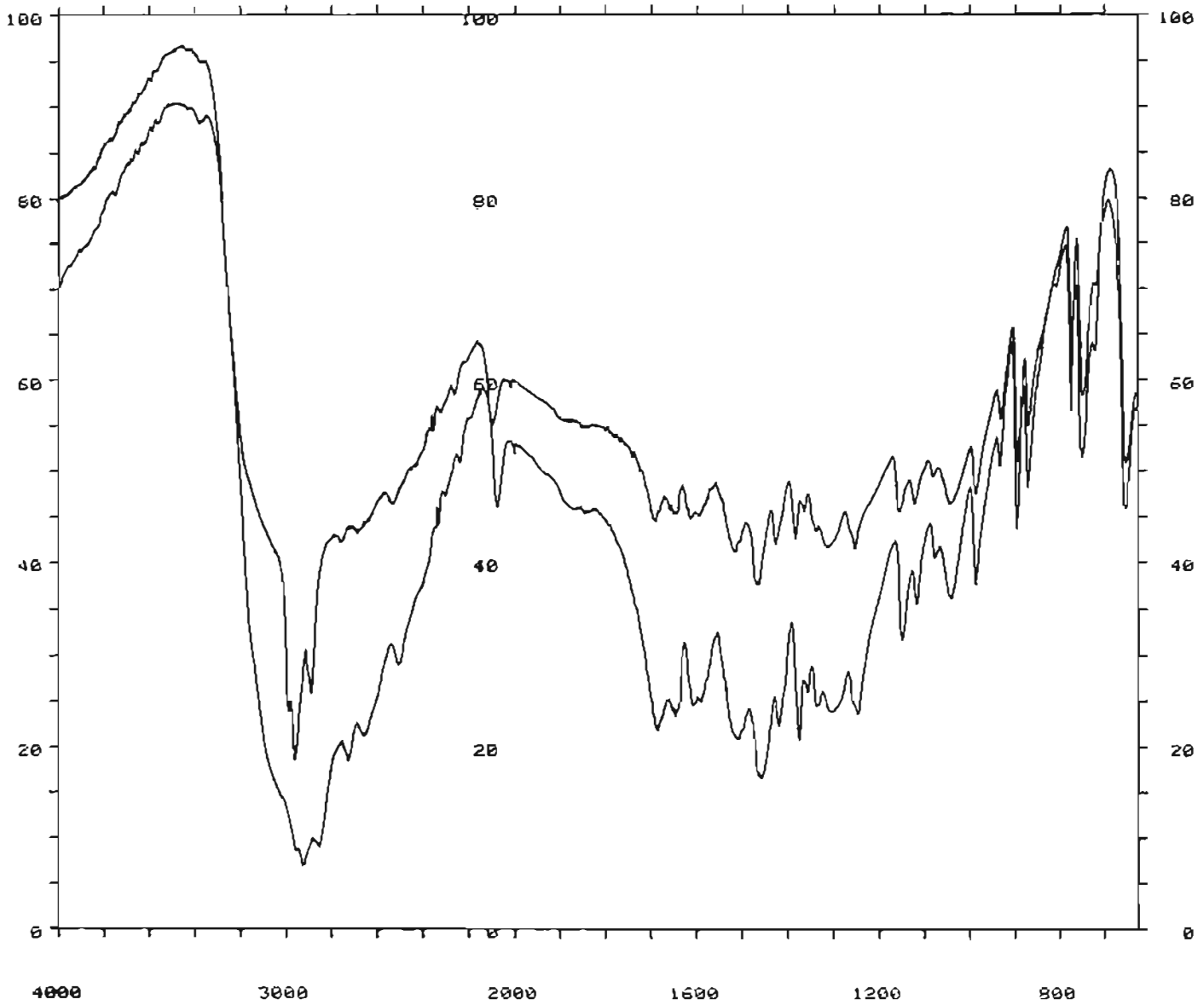
4.2.4 Etanolamien

Suiwering: kationuitruiling

Monster: *F. aurea* ssp. *aurea*
MCW 800 g droog (blomme, blare en stingels)

Metode:

- a) Glaskolom (26 x 1 000 mm) gepak met DOWEX 50W - XB (H^+) (200 - 400 maat).



Figuur 4.4 - Infraroodspektrums van standaard aspartiensusuur (Merck - bo) en aspartiensusuur geïsoleerd uit *Protea aurea*, *P. glabra* en *P. rubropilosa* (onder).

- b) Sit monster op, H_2O -wassing geskied tot helder eluaat, 0 - 6 N NH_4OH -eluering volg en etanolamien is die enigste reagerende verbinding (d.w.s. 100% suiwer) in die tweede laaste ninhidrienpositiewe groep fraksies.
- c) Vloeitempo 1 ml/min.
- d) Vakuumkonsentrasie onttrek NH_3 en 'n deel van die H_2O uit die eluaat.
- e) Aangesien etanolamien ligsensitief is, is dit in waterige oplossing in 'n foeliebedekte glasbottel gestoor. (Die infrarooispektrums is nie getrek nie en die optiese rotasie is ook nie bepaal nie.)

Oopbrengs: 8,0 mg (slegs uit aminosuuranaliseerderdata)

4.2.5 Glutamiensuur

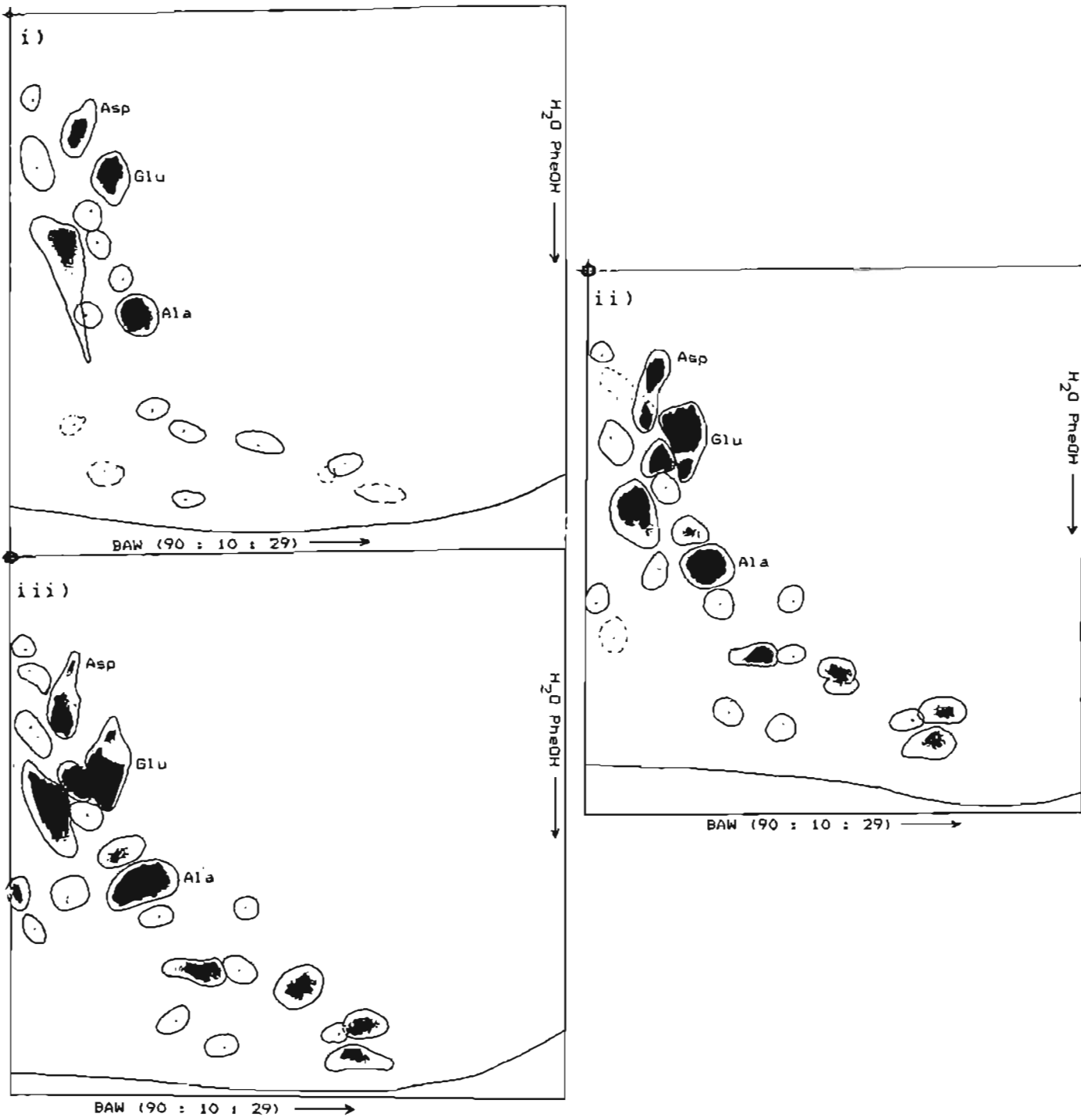
Suiwering: papierchromatografies + anioonuitruiling

Monster: P. glabra
MCW 500 g droog loofblare

Metode en Bespreking:

- a) Glaskolom (16 x 1000 mm), gepak met DOWEX 1 - XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- b) Gradiënteluering met 0 - 2 N CH_3COOH volg.
- c) Vloeitempo 2,5 ml/min.
- d) Drie ninhidrienpositiewe verbindings was in die eluaat teenwoordig: oranjegeel verbinding 45 (eerste), glutamiensuur en aspartiensuur. 'n Aantal fraksies wat slegs glutamiensuur (eendimensioneelpapierchromatografies) bevat, is versamel, maar die outomatiese aminosuuranaliseerder toon spore van aspartiensuur (ongeveer 0,05% van glutamiensuur + aspartiensuur).
- e) Whatman 3 papier: aangesien aspartiensuur en glutamiensuur in feitlik alle loopvloei-stowwe getoets, nie bevredigend vir isolering skei nie, word van die volgende verskynsel by die twee verbindings gebruik gemaak:

Albei verdeel in twee kolle teen hoë konsentrasies met fenol (verwys na P. repens, Figuur 4.5 i/ii/iii). Met hoër wordende konsentrasie, verskuif die kol na 'n groter R_f -waarde en verdwyn die ander totaal (dit lyk dus nie na 'n ewewigsreaksie hier nie). Indien die kol met die hoër



Figuur 4. 5 - *E. repens*: verhoogde konsentrasie effek van aspartienuur en glutamienuur op 'n tweedimensionele papierchromatogram. i) = 250 mg droë massa
 ii) = 450 mg droë massa
 iii) = 650 mg droë massa

R_f herchromatografeer word, toon dit dieselfde gedrag. Aangesien die konsentrasie van glutamiensuur in die eluaat relatief baie groter as aspartiensuur s'n was, kon glutamiensuur verder van aspartiensuur geskei word, deur dat die glutamiensuurkolkonsentrasie 3x verhoog is bo die normale (25 μ g) vir eendimensionele papierchromatografiese skeiding op Whatman 3 papier.

- f) Preparatiewe papierchromatografie met fenol, gevolg deur dwarsbandversameling en H_2O -eluering.
- g) Die res van die groep fraksies wat glutamiensuur bevat het, is op 'n klein anioonkolom geplaas en met 'n 0,1 N trapsgewyse CH_3COOH -gradiënt geëlueer. Glutamiensuur is suiwer in die 0,2 N eluaat versamel.
- h) Kristallisering soos met asparagien.
- i) Die infrarooispektrums van die isolaat en standaard (MERCK: L-glutamiensuur - Figuur 4.6) en die spesifieke optiese rotasie in water (+7,3^o) toon dat die isolaat baie suiwer is en wel L-glutamiensuur is.

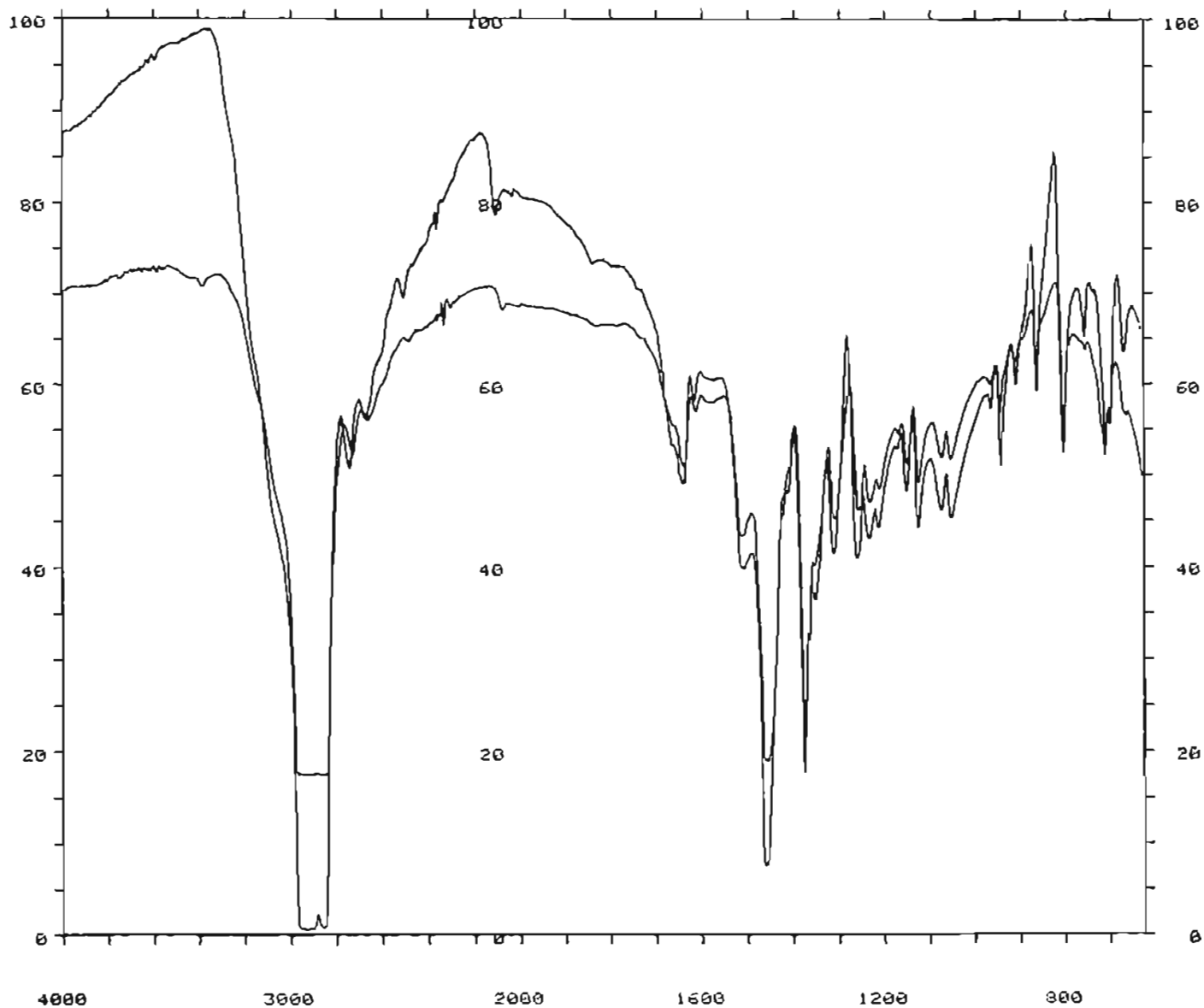
Opbrengs: 12,0 mg

4.2.6 Triptofaan, Tirosien en Fenielalanien

Aangesien hierdie drie aromatiese aminosure nie voldoende op papierchromatogramme geskei het om laasgenoemde tegniek alleen vir isolering aan te wend nie en slegs ionuitruiling ook onsuksesvol was, is besluit op die volgende:

4.2.6.1 Geaktiveerde Koolstof Adsorbering.

Soos in hoofstuk 3 gemeld, word fenoliese verbindings, o.a. ook aromatiese aminosure soos triptofaan, tirosien en fenielalanien, aan die koolstof geadsorbeer. Die meeste (kyk hoofstuk 2 en 3) ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer aan die kationhars, wat meer oorvleueling (vermenging) gedurende eluering tot gevolg het. Om hierdie "druk" op die kationhars te verlaag, word die aromatiese aminosure en ander verbindings eers d.m.v. geaktiveerde koolstof onttrek en hierna die anione met anioonuitruiling, voordat kationhars aan die beurt kom. Die donkerbruin fenoliese koolstoffraksie is dan gewoonlik met H_2O_2 geoksideer na 'n liggeel oplossing, of dit is direk deur H_2O_2 kationhars gestuur om die ninhidrienpositiewe verbindings van die grootste groep fenole te skei.



Figuur 4.6 - Infraroodspektrums van standaard glutamiensuur (Merck - bo) en glutamiensuur geïsoleerd uit *Protea glabra* (onder).

4.2.6.2 Anioonuitruiling

Fenoliese verbindings soos die flavonolde, is swak anionies van aard en daarom is besluit om eers die anioonfraksie uit die monster te verwyder. Fenielaanien, tirosien en triptofaan het waarskynlik 'n netto positiewe lading by die pH-waarde (5,5 - 6,5) wat gebruik is.

Monster: Alle grootskaalse geaktiveerde koolstof ekstrakte, ongeveer 4 000 g droog.

Metode en Bespreking:

- a) Alle ninhidrienpositiewe verbindings (fenielaanien, tirosien, triptofaan en spoorhoeveelhede van vier onbekende verbindings) was in die donkerbruin watereluaat (van die anioonkolom) teenwoordig.
- b) Geen anioniese ninhidrienpositiewe verbindings was in die 2,0 N CH_3COOH -eluaat teenwoordig nie.

4.2.6.3 Katsoonuitruiling

Monster: Gekonsentreerde H_2O -eluaat van anioonskeiding 4.2.6.2.

Metode en Bespreking:

- a) H_2O -eluering lewer drie van die spoorverbindings in die viskose bruin neutrale fraksie.
- b) Gradiënteluering (0 - 6 N NH_4OH) lewer die drie voorlopig geïdentifiseerde aminosure gedeeltelik geskei op.
- c) Die ninhidrienpositiewe fraksies is saamgevoeg (totale volume 270,0 ml), aangesien skeiding nie bevredigend was nie. Die voor- en nafraksies toon heelwat pigment en tesame met die viskose bruin watereluaat beteken dit 'n aansienlike groep verbindings wat van die ninhidrienpositiewe groep geskei is.

4.2.6.4 Skeiding van Tirosien

Metode en Bespreking:

Hier is van 'n uitsonderlike eienskap gebruik gemaak: tirosien, teen 'n konsentrasie van so laag as 0,4 mg/ml in H_2O teen 25,0 °C, lewer reeds die eerste klassies naaldvormige kristalle binne 48 uur.

- a) Die drie aminosure (plus 'n vierde wat in spoorhoeveelhede voorkom en slegs deur die aminosuuranaliseerder

aangedui is) se konsentrasies is m.b.v. die analiseerder bepaal (spoorhoeveelheid se konsentrasie is volgens maksimumwaardes geskat). Die volgende resultate is verkry:

| | | |
|------------------|---------------|--------------------|
| feniellalanien | = 0,074 mg/ml | (totaal = 20,0 mg) |
| tirosien | = 0,050 mg/ml | (totaal = 13,4 mg) |
| triptofaan | = 0,020 mg/ml | (totaal = 5,4 mg) |
| spoorhoeveelheid | = 0,003 mg/ml | (totaal = 0,8 mg) |

Monstervolume = 270,0 ml

- b) Aangesien die drie bekendes se wateroplosbaarheid by 0 °C die volgende is (Windholz, 1983):

| | | |
|----------------|----------------|-------------------------|
| feniellalanien | = 19,800 mg/ml | (29,600 mg/ml by 25 °C) |
| tirosien | = 0,196 mg/ml | (0,453 mg/ml by 25 °C) |
| triptofaan | = 0,230 mg/ml | (11,400 mg/ml by 25 °C) |

is besluit om die 270,0 ml monster "met veiligheid" teen 40,0 °C te vakuümkonsentreer (tot ongeveer 30 ml) en dan tot 20,0 ml met loutewarm lug (oplossingstemperatuur 50,0 - 54,0 °C). Teoreties beteken dit die volgende konsentrasies:

| | |
|------------------|---------------|
| feniellalanien | = 1,000 mg/ml |
| tirosien | = 0,670 mg/ml |
| triptofaan | = 0,270 mg/ml |
| spoorhoeveelheid | = 0,040 mg/ml |

Die onbekende spoorverbinding behoort dus nie teen selfs 0 °C in die 20,0 ml waterige oplossing te kristalliseer nie, selfs indien dit so onoplosbaar soos tirosien (een van die minste H₂O-oplosbare bekende aminosure) is.

- c) Die konsentraat is stadig in 'n waterbad tot 10,0 °C afgekoel, waartydens vertroebeling ontstaan het.
- d) Na 48 uur is die wit klompies kristalle van die oplossing deur sentrifugering (slegs 500 g vir 5,0 min) geskei. Opbrengs: 7,0 mg.
- e) Die kristalle was skynbaar sonder pigment, maar volgens die analiseerder was spore van fenielalanien (1 : 640 tirosien) en triptofaan (1 : 1 050 tirosien) nog teenwoordig. 'n Tweede oplosbaarheidsverskil tussen tirosien en die ander twee is nou gebruik: tirosien is feitlik glad nie oplosbaar in etanol nie, terwyl die ander, alhoewel swak, tot 'n heelwat groter mate is. Aangesien laasgenoemde in baie lae konsentrasies aanwesig was, is die kristalle in 3,0 ml 100% etanol (40 °C) opgeskud, gesentrifugeer teen 500 g vir 5,0 min en die etanol afgegooi. Etanolwassing is drie maal herhaal, waarna

tirosien volgens die aminosuuranaliseerder (toon slegs een piek) suiwer was.

- f) Die infrarooispektrums van die isolaat en standaard (MERCK: L-tirosien) is getrek (Figuur 4.7) en die spesifieke optiese rotasie is in 1,0 N HCl (tirosien is relatief swak oplosbaar in H₂O, sodat die oplossing aangesuur moes word om die konsentrasie van 10 mg/ml by 20,0 °C te verkry) bepaal (-10,7°). Dit blyk 'n baie suiwer isolaat van L-tirosien te wees (die drie pieke tussen 2 800 nm en 3 000 nm is aan die nujol toe te skryf).

OPMERKING: Die oplosbaarheidsgedrag van tirosien is opgemerk toe 'n 1 mg/ml standaardoplossing voorberei is. Tirosien het geredelik opgelos en is as standaard direk daarna vir kromatografie aangewend. 'n Week later was die houertjie deurspek met wit klossies kristalle en moes driemaal meer as voorheen (10,0 µl) van die oplossing aangewend word vir dieselfde resultaat.

4.2.6.5 Skedding van Fenielaalanien

Die ekstrak het nou die drie verbindings bevat: tirosien (nog ongeveer 6,0 mg), triptofaan en fenielaalanien. Papierchromatografies isoleer 'n verbinding wat die verste van die oorsprong beweeg, die suiwerste. Verbindings tussenin bevat gewoonlik spore van veral die wat verder as hulleself beweeg. Dit was ook met hierdie drie die geval en aangesien fenielaalanien in beide loopvloeiistowwe aangewend (BAW en fenol) die verste beweeg, is slegs dit suiwer (volgens die aminosuuranaliseerder) m.b.v. papierchromatografie geïsoleer.

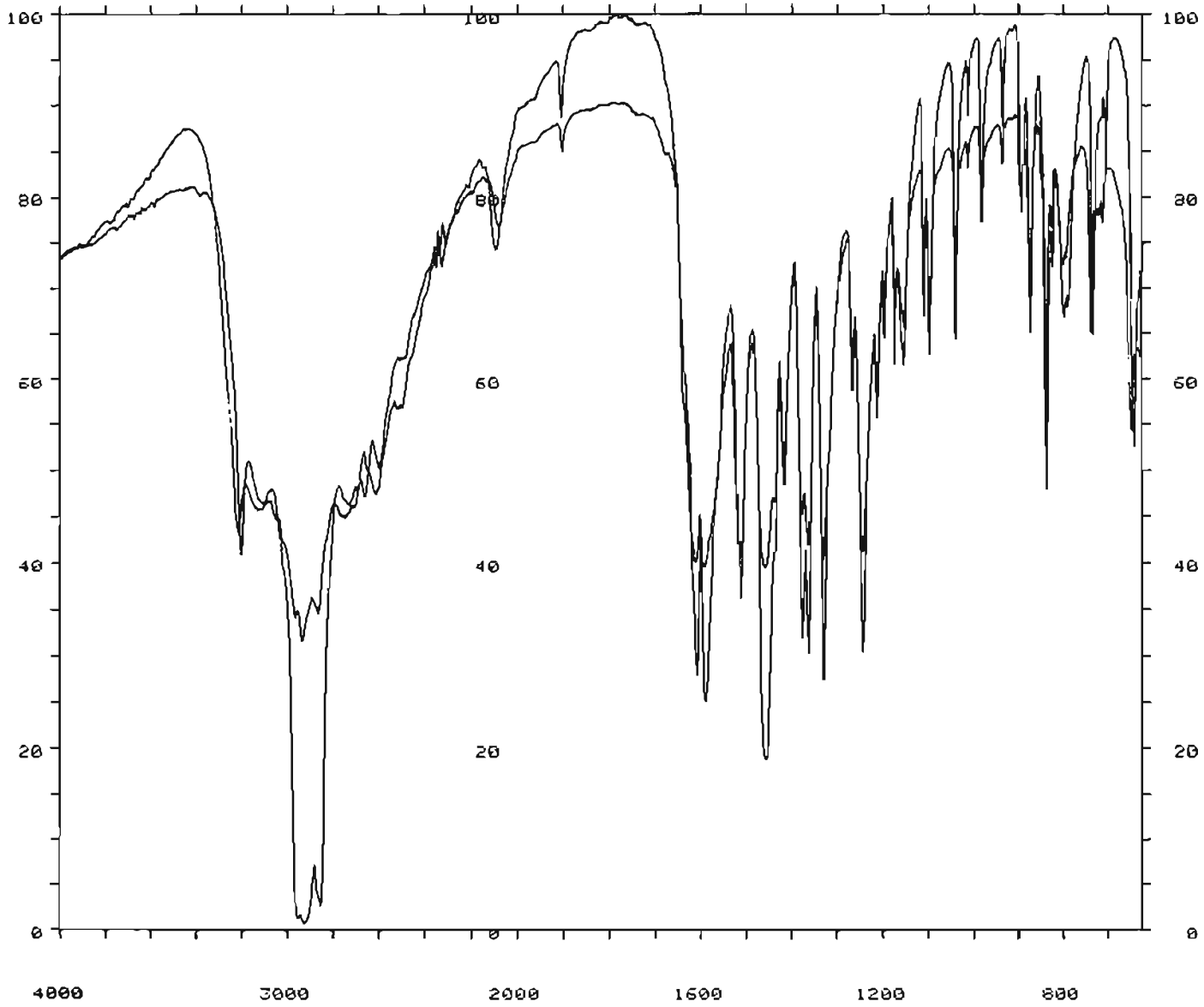
Metode:

- a) Dieselfde as bv. die papierchromatografiese isolering van asparagien vroeër in hierdie hoofstuk.
- b) Kristalliseer met water en asetoon.
- c) Die 7,0 mg kristalle was te min vir spesifieke optiese rotasiebepaling, maar volgens die infrarooispektrums van die isolaat en standaard (MERCK: L-fenielaalanien - Figuur 4.8) blyk dit baie suiwer te wees.

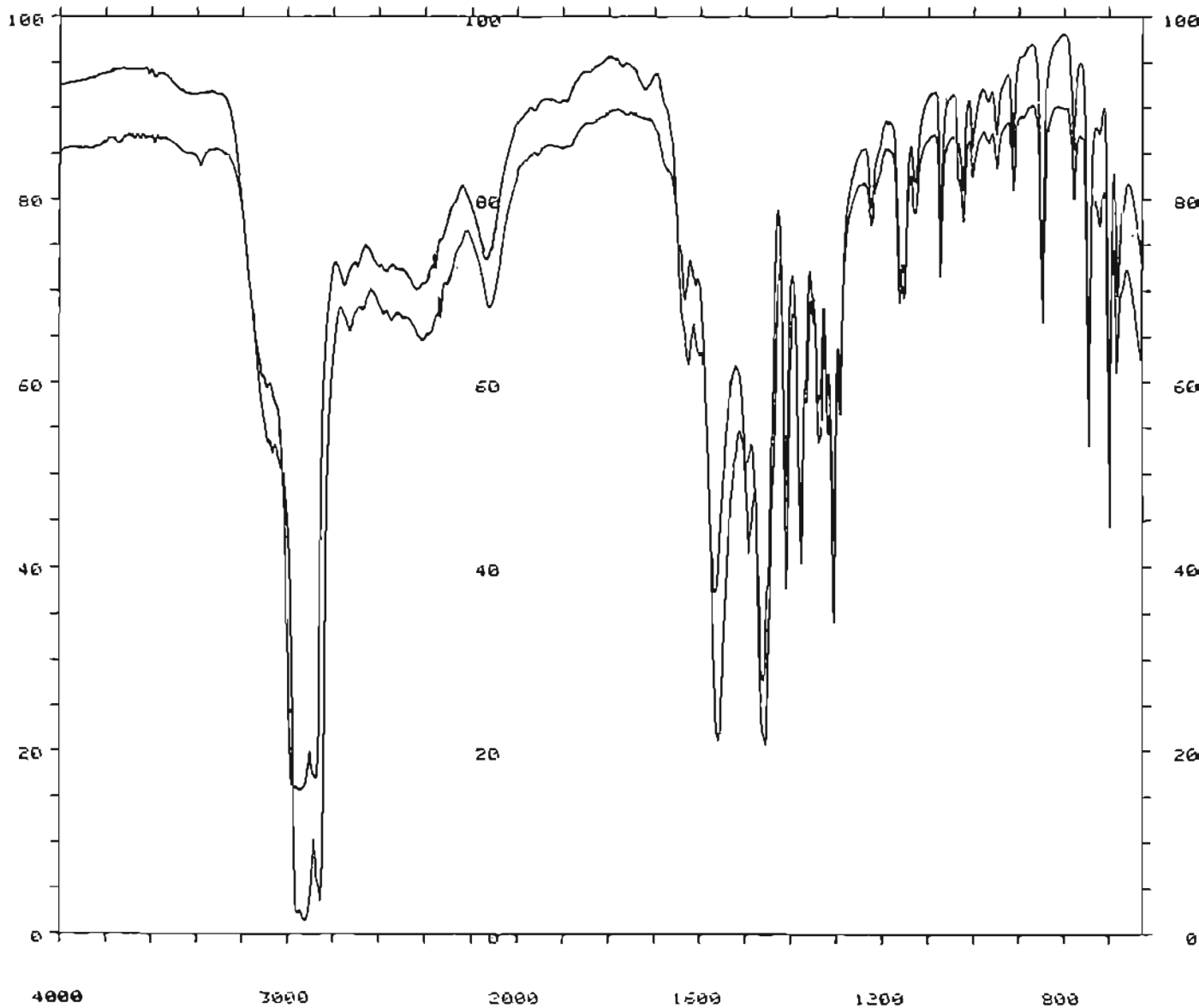
Oopbrengs: 7,0 mg (slegs deel van totale ekstrak)

4.2.7 Verbinding 3

Hierdie verbinding lewer 'n helderoranje kleur met ninhidrien/kollidien en is baie swak kationies (m.a.w. word vroeg van die kationhars verplaas) van aard. Dis in 10 van die 41



Figuur 4.7 - Infraroodspektrums van standaard tirosien (Merck - bo) en tirosien geïsoleer uit *Protea aurea aurea*, *P. glabra* en *P. rubropilosa* (onder).



Figuur 4.8 - Infraroodspektrums van standaard fenielalanien (Merck - bo) en fenielalanien geïsoleer uit *Protea aurea*, *P. glabra* en *P. rubropilosa* (onder).

spesies gevind en is in betreklik hoë konsentrasies teenwoordig. Dit word ook net gedurende die blomseisoen (een maand voor tot drie maande na blomtyd) aangetref in slegs loofblare, stingels en omwindselblare en is totaal afwesig in blomme en sade. Dis nie suiwer geïsoleer nie en het die volgende R_f -waardes: BAW = 0,40 en fenol = 0,73.

Hierdie verbinding kan moontlik 2-(metileensiklopropiel)glisien wees (Grey en Fowden, 1961). Volgens die artikel het laasgenoemde 'n BAW R_f effe groter as die van 4-aminobottersuur (eie resultate BAW R_f 's = 0,34 en 0,40) en 'n fenol- NH_2 R_f = 0,74 (eie bekende fenol R_f = 0,73). Verder is die aanvanklike ninhidrienkleur bruin, wat na twee uur verander na pers. Die onbekende verbinding se aanvanklike ninhidrien/kollidienkleur is oranje en dit verander ook binne 'n paar uur na pers. Ook is daar 'n ooreenkoms in hulle neutrale karakter.

2-(Metileensiklopropiel)glisien is gevolglik uit Litchi chinensis saad geïsoleer en verbinding 3 uit P. cynaroides loofblare:

Metode:

- a) Die sade is geweeg (28 g) en met 'n Kenwoodkapper in MCW fyngemaak, waarna lipiede met faseskeiding (kyk hoofstuk 2) d.m.v. CHCl_3 onttrek is.
- b) Katioonuitruiling (DOWEX 50W-X8 (H^+) 200 - 400 maat hars) is met 'n klein kolommetjie (250 mm x 20 mm en harsbedhoogte 80 mm) uitgevoer.
- c) Katione is met 3,0 N NH_4OH van die hars geëluëer.
- d) Tweedimensionele papierchromatogramme van die katioone-luaat (eers BAW, dan fenol) het slegs een verbinding wat bruin (eintlik oranjebruin) met ninhidrien kleur, getoon. Boonop was die R_f -waardes feitlik dieselfde as in die artikel (Grey en Fowden, 1961).
- e) 'n Isolaat van verbinding 3 is voorberei deur tweedimensionele papierchromatogramme van P. cynaroides se blaarekstrak te loop (BAW en fenol), met ninhidrien te ontwikkel, die oranje verbinding 3 uit te knip en met H_2O af te elueer.
- f) Verbinding 3 is gevolglik tweedimensioneel saam met die totale katioonekstrak van Litchi chinensis gechromatografeer. Kontrolechromatogramme was van die saadekstrak alleen.

Alhoewel die twee bindings baie naby mekaar geleë was op

die chromatogramme (verbinding 3 se R_f -waardes: BAW = 0,40 en fenol = 0,73 teenoor die van die oranjebruin verbinding: BAW = 0,38 en fenol = 0,78), was hulle kolle duidelik onderskeidbaar van mekaar en die ninhidrienkleur ook verskillend. Boonop toon papierchromatogramme van die saadekstrakte geen ninhidrienpositiewe verbinding wat saam met verbinding 3 val nie. Dit blyk dus dat verbinding 3 nie 2-(metileensiklopropiel)glisien is nie.

Verbinding 3 het in die volgende spesies voorgekom:

| | |
|--|-----------------------------------|
| <i>P. acaulos</i> (Microgeanthae) | |
| <i>P. amplexicaulos</i> (Hypocephalae) | |
| <i>P. aurea</i> (Exsertae) | <i>P. cordata</i> (Hypocephalae) |
| <i>P. cynaroides</i> (Protea) | <i>P. glabra</i> (Leiocephalae) |
| <i>P. lacticolor</i> (Exsertae) | <i>P. mundii</i> (Exsertae) |
| <i>P. nitida</i> (Leiocephalae) | <i>P. rupicola</i> (Leiocephalae) |

Dis baie opvallend dat al 10 slegs in die Kaapprovinsie voorkom (van die suidweste tot die suidooste). Interessant (en waarskynlik van chemotaksonomiese waarde) is dat dit in vyf groepe gevind is en dat al die verteenwoordigers van hierdie groepe wat ondersoek is, die onbekende bevat het. Die enigste uitsondering was *P. caffra*: vier spesies van die Leiocephalae is gedoen, nl. *P. caffra*, *P. glabra*, *P. nitida* en *P. rupicola*, maar slegs laasgenoemde drie het die verbinding bevat. *P. caffra* is dan ook die enigste een wat buite die Kaapprovinsie voorkom.

Baie interessant is die voorkoms van hierdie ninhidrienpositiewe verbinding in die spesie *aurea*. *P. aurea* ssp. *aurea* behels twee kleurvariante, nl. rooi en roomwit, terwyl *P. aurea* ssp. *potbergensis* slegs uit 'n roomwit verteenwoordiger bestaan. Die onbekende is alleenlik in die rooi soort gevind (Figuur 4.9), sodat omwindselblaarkleur dalk daarmee verband kon hou. Hierdie gedagte is laat vaar toe die verbinding in albei kleurvariante van *P. lacticolor*, maar nie in die van *P. repens* en *P. perfoliata* nie (almal ook rooi en roomwit), opgespoor is.

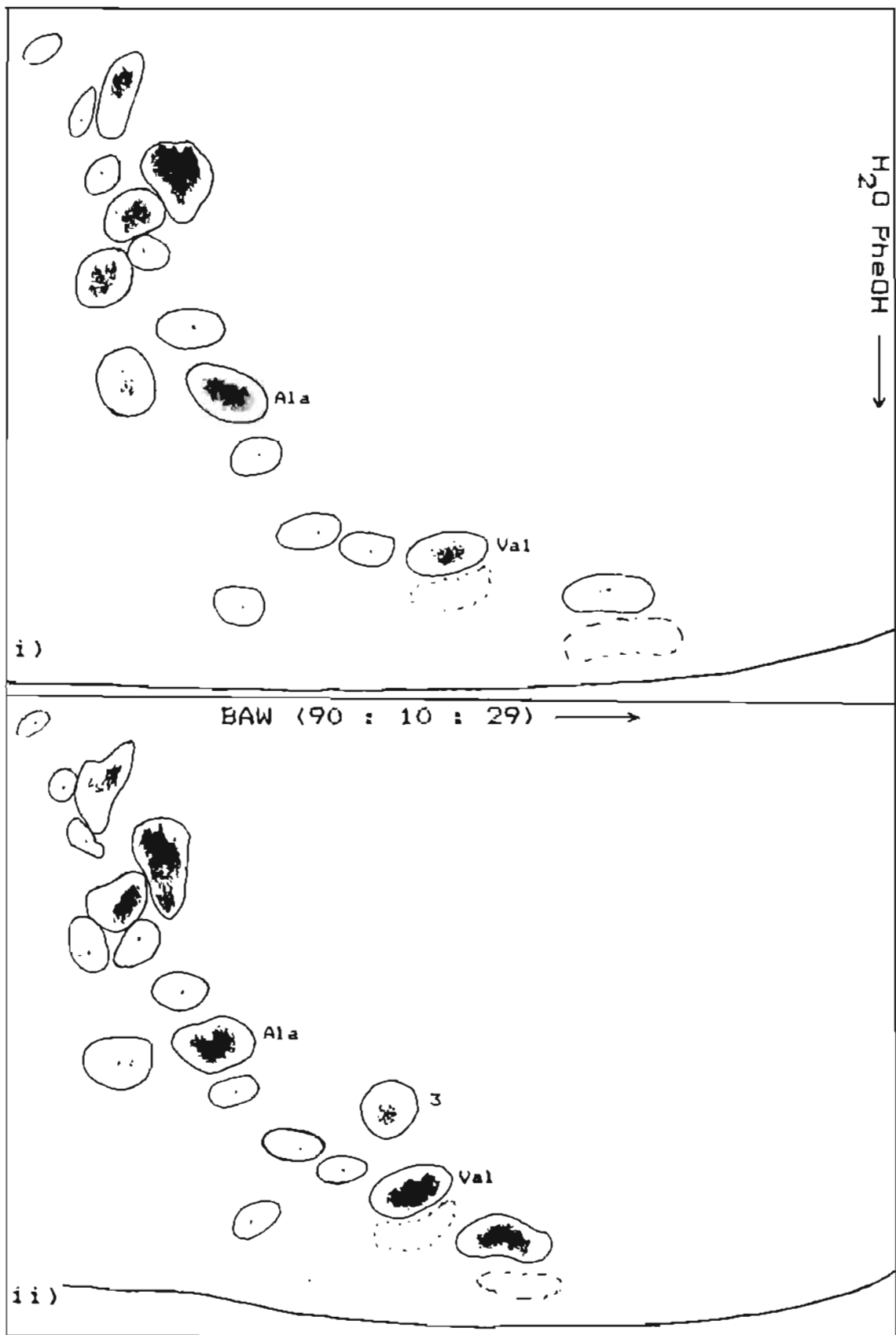
4.2.8 Verbinding 10

Suiwering: katioonuitruiling

Monster: *P. rubropilosa*
na geaktiveerde koolstof en anioonuitruiling 300
+ 500 g droog rooi, jong loofblare

Metode en Bespreking:

Dieselfde isoleringsmetode as in die geval van arginien is



Figuur 4.9 - Tweedimensionele papierchromatogramme van *P. aurea* se room- (i) en rooikleurige (ii) omwindselblare. Let op die teenwoordigheid van verbinding 3 in die rooikleuriges.

aangewend, want hierdie besonder basiese verbinding verlaat die kationhars na arginien, meer as 95% suiwer van ninhidrienpositiewe verbindings (m.a.w. slegs spore arginien teenwoordig). Verbinding 10 is vervolgens van die spore arginien geskei deur trapsgewys (0,1 N, 0,3 N, 0,5 N en 1,0 N) met NH_4OH (klein kationkolommetjie) te elueer. Die onbekende was feitlik slegs in die 1,0 N eluaat (sonder arginien) teenwoordig.

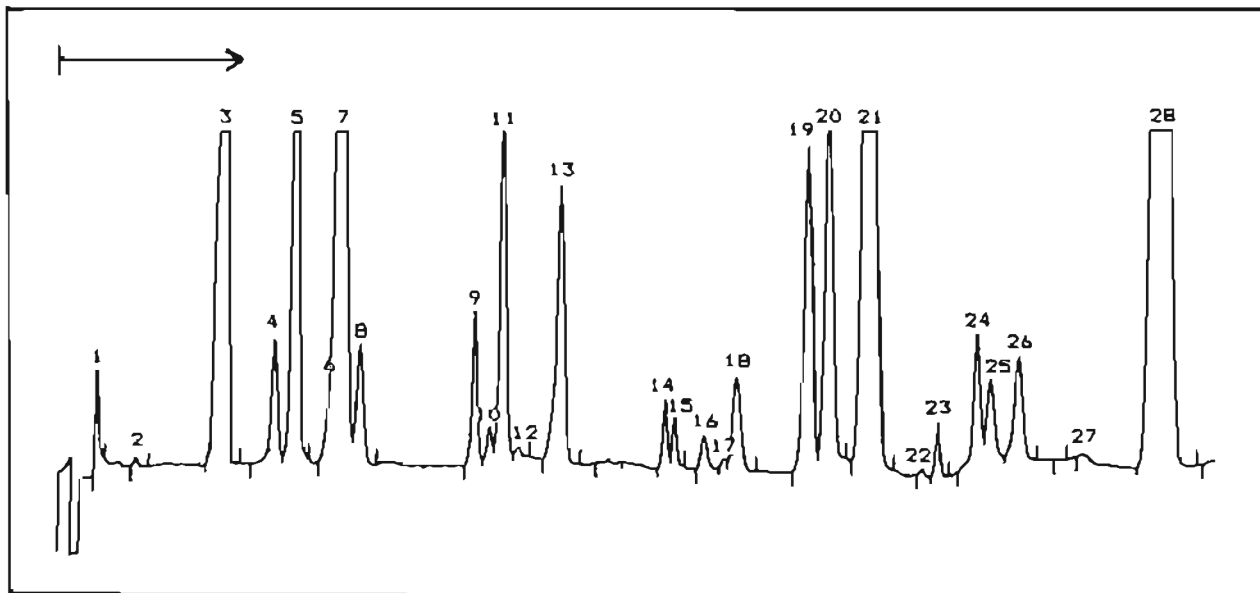
Opbrengs: Onbekend. (Konsentrasies, uitgedruk in massa/volume, van onbekende verbindings kan nie met die aminosuuranaliseerder bepaal word nie, tensy die verbinding voorheen gekristalliseer, geweeg en die massa/piekoppervlakverhouding bepaal is. Die mol/volume konsentrasie kan glad nie bepaal word nie, omdat die molekulêre struktuur onbekend is.) Volgens ninhidrienkleurintensiteit en kolgrootte op papierchromatogramme, word dit op 12 - 15 mg geskat (kristalliseer vir opvolgende studie).

Hierdie verbinding was in relatief hoë konsentrasie teenwoordig in *E. rubropilosa*, wat een van agt (moontlik slegs vyf - kyk onder) uit die 41 ondersoekte proteas is, waarin hierdie verbinding papierchromatografies opgespoor is. Dit besit aansienlik sterker basiese eienskappe as arginien (verlaat die kationkolom heelwat later as arginien gedurende gradiëntelueing) en het 'n bruin ninhidrienkleur, wat feitlik gitswart vertoon wanneer die suiwer isolaat in hoërige konsentrasies gechromatografeer en met ninhidrien ontwikkel word. Die kleur word pers na 'n dag. R_f -waardes is:

BAW = 0,64 en
fenol = 0,93.

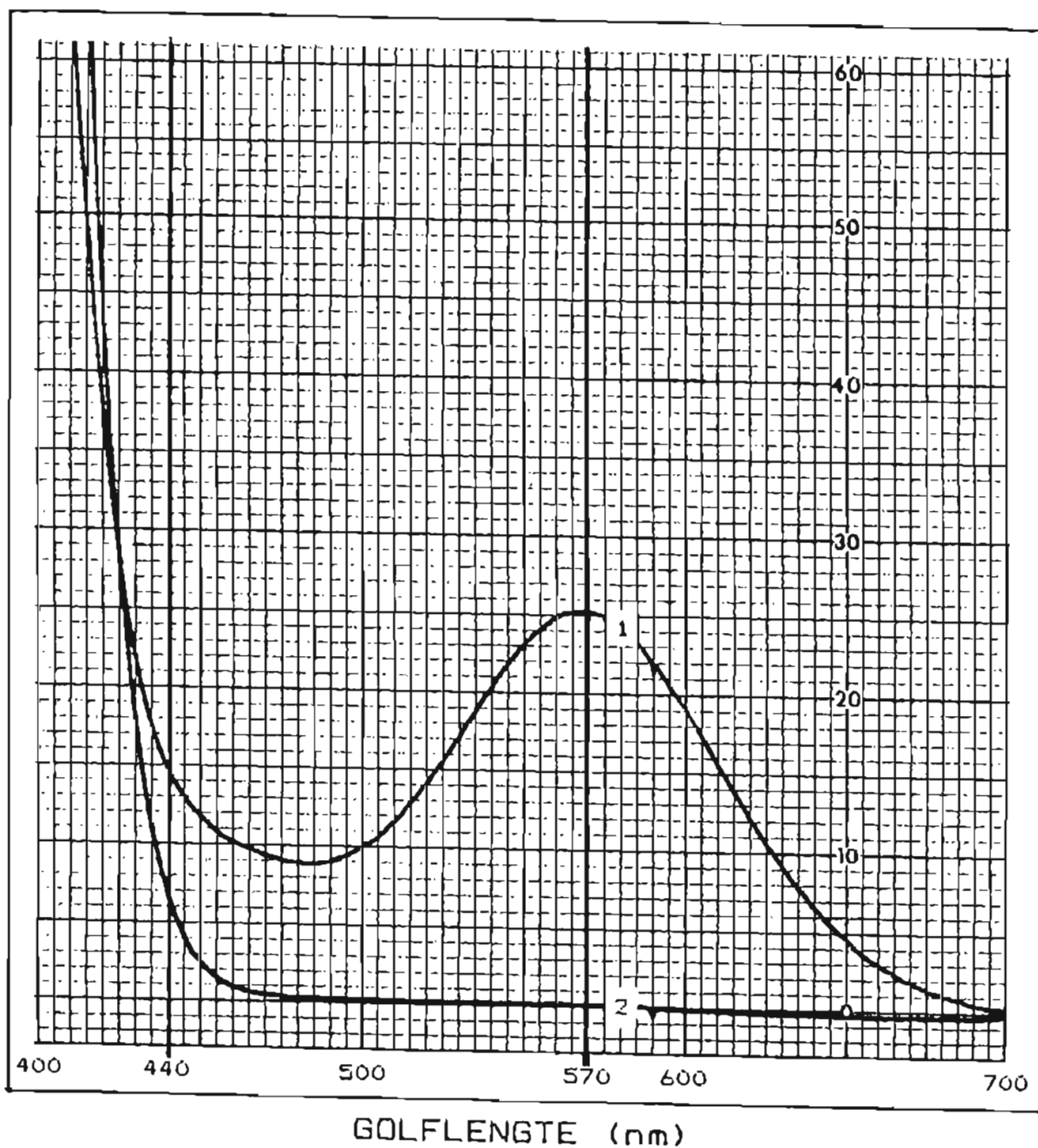
Die onbekende het in albei bogenoemde loopvloei-stowwe die verste van alle gechromatografeerde ninhidrienpositiewe verbindings beweeg, behalwe vir verbindings 46 en 5 in BAW.

Pogings om die retensietyd op die LKB-aminosuuranaliseerder te bepaal, het nie geslaag nie (die outomatiese aminosuuranalise chromatogram van *E. rubropilosa*, Figuur 4.10, toon dus nie hierdie verbinding aan nie). Die verbinding is so basies, dat dit waarskynlik nie met voorsiene buffers van die aminosuuranaliseerder se kolom afgeelueer word nie, selfs nadat die standaardprogramme gewysig is. Die moontlikheid dat die ninhidrienkleur nie by 440 en 570 nm (waar die analiseerder lees) absorbeer nie, het bestaan. 'n Absorpsiespektrum na ninhidrienreaksie is vervolgens getrek, asook van die waterige isolaat alleen (Figuur 4.11 - ninhidrien in H_2O het dieselfde absorpsiespektrum as die ontwikkelde verbinding 10 gelewer, m.a.w. ook geen beduidende absorpsie oor die betrokke spektrum nie). Dit is duidelik dat die onbekende wel by albei golflengtes absorbeer, met naastenby dieselfde absorpsiespektrum as alanien en aspartiensuur (Figuur 4.15).



Figuur 4. 10 - Outomatiese aminosuuranalise van die vrye ninhi-drienpositiewe verbindings in jong loofblare van *P. rubropilosa*. Monsterekwivalent = 140 mg droë massa. Onderstaande is gerugsteun deur papierchromatografie.

| | |
|-------------------------------------|---|
| 1 = fosfoworien (0,13 nm/mg) | 15 = leusien (0,04 nm/mg) |
| 2 = urseum (0,93 nm/mg) | 16 = tiro sien (0,04 nm/mg) |
| 3 = aspartiensuur (0,70 nm/mg) | 17 = 3-alanien (0,01 nm/mg) |
| 4 = treonien (0,14 nm/mg) | 18 = fenielalanien (0,06 nm/mg) |
| 5 = serien (0,28 nm/mg) | 19 = 4-aminobotersuur (0,26 nm/mg) |
| 6 = asparagien ($\pm 0,10$ nm /mg) | 20 = onbekend (maontlik $\pm 0,45$ nm/mg) |
| 7 = glutamiensuur (1,30 nm/mg) | 21 = ammoniak (0,92 nm/mg) |
| 8 = glutamien (0,14 nm /mg) | 22 = onbekend (maontlik $\pm 0,01$ nm/mg) |
| 9 = prolief (0,20 nm/mg) | 23 = ornitien (0,02 nm/mg) |
| 10 = glisien (0,03 nm/mg) | 24 = lisien (0,10 nm/mg) |
| 11 = alanien (0,33 nm/mg) | 25 = onbekend (maontlik $\pm 0,10$ nm/mg) |
| 12 = sitrullien (0,01 nm/mg) | 26 = histidien (0,11 nm/mg) |
| 13 = valien (0,33 nm/mg) | 27 = buffereffek (blanko ook so) |
| 14 = isoleusien (0,05 nm/mg) | 28 = arginien (3,68 nm/mg) |



Figuur 4. 11 - Absorpsiespektrum van verbinding 10 na ninhidrienreaksie, wys dat die verbinding by 440 nm en 570 nm absorbeer en wel deur die aminosuuranaliseerder geles behoort te word.

- 1 = verbinding 10 na ninhidrienreaksie
- 2 = verbinding 10 voor ninhidrienreaksie

Nadat 'n suiwer isolaat (m.a.w. geen pieke was sigbaar op die aminosuuranaliseerderchromatogram nie) vir drie dae in die vrieskas (-20°C) geberg is, toon die analiseerder 'n enkel piekie met dieselfde retensietyd as sitrullien (kan moontlik ook 3-aminobottersuur of valien wees). Laasgenoemde mag dus die eerste afbreekproduk van die onbekende wees. Indien dit sitrullien is en die sterk basiese karakter van die onbekende in ag geneem word, bestaan die moontlikheid dat laasgenoemde met die ornitiensiklus assosieer. Die feit dat slegs een piek ontstaan, beteken dat hierdie vormende tweede verbinding heelwaarskynlik nie aan mikrobiologiese aktiwiteit toegeskryf kan word nie (meer as een piek behoort dan te verskyn). Boonop is die waterige isolaat bevore gehou.

Dis onwaarskynlik dat verbinding 10 'n peptied is, omdat hidrolise vir 24 uur in 6,0 N HCl teen 100°C in 'n verseelde buis, slegs een kol op een- en tweedimensionele papierchromatogramme lewer en geen piek op die aminosuuranaliseerder nie.

Soos vroeër vermeld, verlaat verbinding 10 die kationhars na arginien. Volgens Rao *et al.* (1962) toon homoarginien dieselfde gedrag op dieselfde hars (DOWEX 50W - X8 (H⁺) 200 - 400 maat). R_f -waardes in die betrokke loopvloeistowwe het egter aansienlik verskil, bv. met waterversadigde fenol is verbinding 10 se $R_f = 0,93$, teenoor homoarginien se 0,72. Boonop verskil die ninhidrienkleur ook (pers, teenoor bruin van verbinding 10), sodat ko-chromatografie met die standaard nie gedoen is nie.

Protea rubropilosa (groep Patentiflorae Beard - kyk infragenetiese klassifikasie, Tabel 5.6) bevat die hoogste konsentrasie (ninhidrienkleurintensiteit/droë massa) van hierdie onbekende, terwyl P. comptonii (Patentiflorae Beard), P. lepidocarpodendron (Speciosae Stapf), P. repens (Melliferae Stapf) en P. welwitschii (Lasiocephalae Stapf) effe kleiner hoeveelhede toon. Volgens Rourke (mondelingse mededeling) behoort al vyf hierdie spesies aan die meer primitiewe groepe, veral P. rubropilosa, P. comptonii en P. welwitschii. Laasgenoemde drie se verspreidingsgebiede is in die somer-reënvalstreke van Transvaal (veral Oos-Transvaalse Drakensberge) en Noord-Natal. P. repens en P. lepidocarpodendron kom egter in die Suidelike Kaapprovinsie voor. Geen noemenswaardige ooreenkomste tussen hierdie vyf se blomseisoen, hoogte bo seespieël, tipe plant (wortelstok aanwesig, plat struik, regop struik of boom) en grondsoort kon gevind word nie.

Onsekerheid bestaan oor P. piscina, wat aan die meer ontwikkelde groep Subacaulis (Meisn.) Rourke behoort en dalk 'n baie lae konsentrasie mag bevat. Nog twee minder gevorderde spesies waarvoor bespiegel word, is P. longifolia (Ligulatae)

en *P. speciosa* (Speciosae). Dis interessant dat *P. pudens*, wat volgens Rourke uit *P. longifolia* ontwikkel het a.g.v. 'n grondaanpassing (Rourke, 1980), nie hierdie verbinding in papierchromatografies opspoorbare hoeveelhede bevat het nie. Die twee is egter nogtans deur die rekenaargroepeeringsanalise saamgevoeg (kyk analise in hoofstuk 5).

Die rol van 4-aminobottersuur in plante is, benewens 'n intermediêre metaboliet, waarskynlik 'n stikstofreservoir. Dis baie interessant dat hierdie verbinding in baie hoë konsentrasies in vier van die 41 ondersoekte spesies voorkom, nl. *P. caffra*, *P. comptonii*, *P. rubropilosa* en *P. welwitschii* (Tabel 4.2 - dieselfde as Tabel 5.2 vir maklike verwysing). Al vier die soure kom in hoë suimerreënvalstreke (hoofsaaklik Oos-Transvaal se Drakensberge) voor, waar grond besonder arm aan stikstof (veral gedurende die reënseisoen) is. Verbinding 10 kom in drie van die vier spesies voor. Die ander twee spesies wat ook definitief verbinding 10 bevat, *P. lepidocarpodendron* en *P. repens* (slegs sekerheid oor vyf - kyk vroeër), het ook 4-aminobottersuur in redelike konsentrasies bevat. Indien sy basiese karakter in ag geneem word, asook die feit dat 'n moontlike afbreekproduk dalk 3-aminobottersuur is (vroeër genoem) en daar miskien ook 'n verband tussen verbinding 10 en 4-aminobottersuur is, mag die onbekende 10 'n belangrike stikstofhoudende verbinding wees.

Dis interessant dat dieselfde verbinding ook in broodboomsaad (*Encephalartos altensteinii*) voorkom (Figuur 4.12). Broodbome is 'n primitiewe groep en die feit dat hierdie verbinding feitlik uitsluitlik by van die meer primitiewe proteas (egter nie al die primitiewe verteenwoordigers nie) gevind is, laat die vraag ontstaan of die onbekende verbinding kenmerkend van primitiewe plante is.

4.2.9 Verbindings 11 en 12

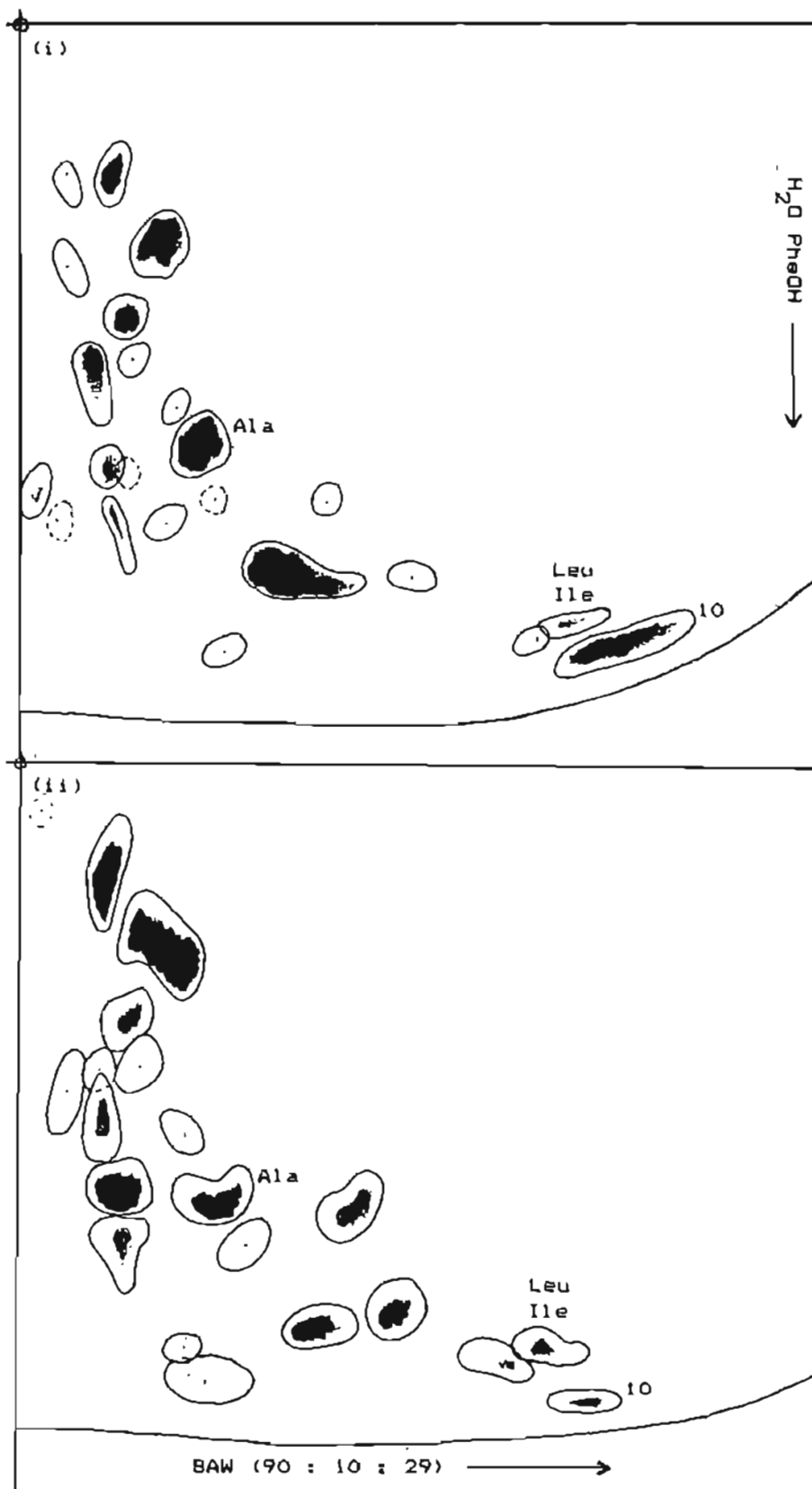
Albei verbindings lewer 'n geel ninhidrien/kollidienkleur en besit lae R_f -waardes:

| | | |
|---------------|-------|--------|
| verbinding 11 | BAW | = 0,11 |
| | fenol | = 0,13 |
| verbinding 12 | BAW | = 0,06 |
| | fenol | = 0,27 |

Tot op hierdie stadium is die twee verbindings nog nie geïsoleer nie, aangesien hulle oor die algemeen in betreklik lae konsentrasies voorkom (Tabel 4.2).

Met die uitsondering van *P. rupicola*, is die twee nooit saam in 'n spesie opgespoor nie. Die volgende ses proteas is ter sprake in die geval van verbinding 11:

P. angustata (Microgeanthae) *P. laetans* (Patentiflorae)



Figuur 4. 12. - Tweedimensionele papierchromatogramme van *P. rubropilosa* se loofblare (i) en *Encephalartos altensteinii* se saad (ii), om die teenwoordigheid van verbinding 10 aan te toon.

P. coronata (Speciosae)
P. denticulata (Subacaulae)

P. laurifolia (Speciosae)
P. rupicola (Leiocephalae)

en verbinding 12:

P. acaulos (Microgeanthae)
P. amplexicaulos (Hypocephalae)
P. aurea ssp. *aurea* (Exsertae)
P. caffra (Leiocephalae)
P. cordata (Hypocephalae)
P. glabra (Leiocephalae)
P. lacticolor (Exsertae)
P. mundii (Exsertae)

P. nitida (Leiocephalae)
P. obtusifolia (Ligulatae)
P. piscina (Subacaulae)
P. rupicola (Leiocephalae)
P. stokoei (Speciosae)
P. sulphurea (Crateriflorae)
P. welwitschii (Lasiocephalae)

Wat die verspreiding van spesies betref waarin verbinding 11 voorkom, is almal inheems aan die Kaapprovinsie, behalwe *P. laetans* (Oos-Transvaal). Blomtyd is feitlik uitsluitlik in die winter en lente. Uit die 15 soorte van die ander groep, is daar eintlik net twee wat buite die algemene patroon val, nl. *P. caffra* en *P. welwitschii*, wat nie uitsluitlik in die Kaapprovinsie voorkom nie en boonop slegs in die somer blom. *P. aurea* ssp. *aurea* en *P. piscina* se blomseisoen strek feitlik dwarsdeur die jaar. Verdere beduidende korrelasies kon nie gevind word nie.

4.2.10 Verbinding 18

Suiwering: anioonuitruiling + papierchromatografie

Monster: *P. rubropilosa*
MW (na geaktiveerde koolstof) 300 g droog jong,
rooi loofblare.

Metode en Bespreking:

- Glaskolom (450 x 26 mm), gepak met DOWEX 1 - XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- H_2O -eluering (voor gradiënteluering met 0 - 2 N CH_3COOH) verwyder neutrale en kationiese verbindings van die anioonhars.
- Vloeitempo 3,0 ml/min.
- Versamel die H_2O -eluaat in twee fraksies. Die eerste bevat feitlik al die anionies neutrale ninhidrienpositiese verbindings, terwyl die tweede hoofsaaklik slegs uit een onbekende bestaan (eendimensionele papierchromatografie toon spore van nog twee).
- Die tweede fraksie is onder vakuüm gekonsentreer (waarna

'n relatief groot massa ninhidriennegatiewe kristalle uitgesak het en verwyder is - kyk onder 4.3: Ninhidriennegatiewe Verbindings).

- f) Die verbinding beweeg feitlik glad nie met BAW nie (R_f 0,01), maar het die verste van die drie met fenol geloop (R_f 0,75), sodat laasgenoemde loopvloeistof aangewend is vir papierchromatografiese isolering (verwys na verduideliking onder suiwering van fenielalanien).
- g) Die isolaat, suiwer volgens die aminosuuranaliseerder (m.a.w. slegs verbinding 18 as piek op chromatogram waarneembaar) is in 5,0% MeOH gevries.

Opmerking: Hierdie grys verbinding is ook uit 'n ontwikkelde tweedimensionele chromatogram (totale kationfraksie van P. rubropilosa) geknip, afgebluur en op die aminosuuranaliseerder gechromatografeer. Die retensietyd het ooreengestem met die van die suur grys isolaat (eintlik effesuur, want dit adsorbeer baie swak aan die anioonhars).

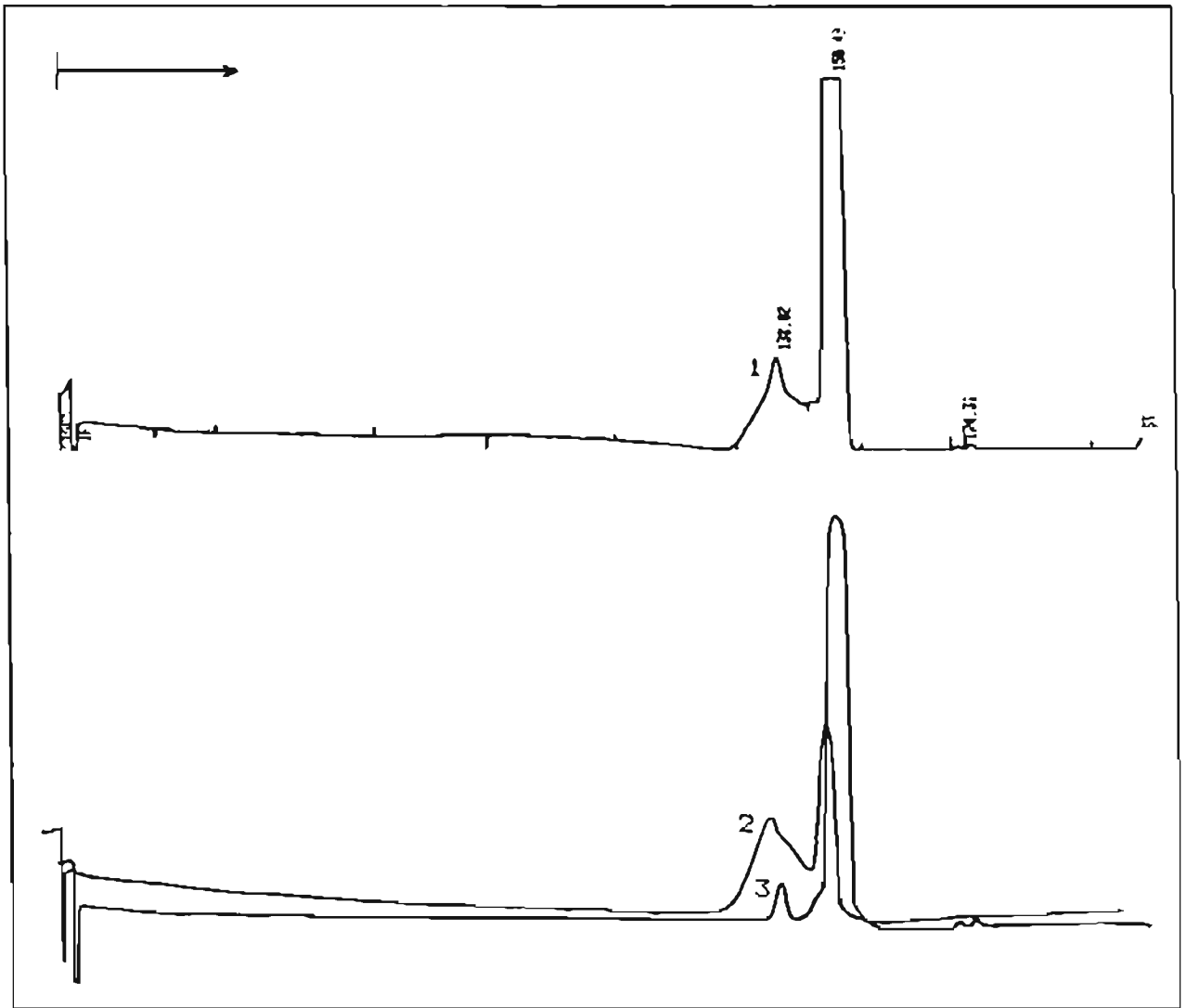
Opbrengs: Papierchromatografies geskat, ~ 6 mg.

4.2.11 Verbinding 39

'n Violet ninhidriennekleurende verbinding kom in relatief lae konsentrasies direk onder leusien/isoleusien op tweedimensionele papierchromatogramme voor (eers BAW, dan fenol) en het dus dieselfde R_f -waarde as leusien/isoleusien in BAW, nl. 0,62. In fenol is die waarde 0,92 en volgens die outomatiese aminosuuranaliseerder is die retensietyd 138,7 min (kyk program onder 2.6).

Onsekerheid het aanvanklik oor hierdie onbekende bestaan, aangesien dit altyd in lae konsentrasies en as 'n "presiese skadubeeld" van leusien/isoleusien direk daaronder op tweedimensionele papierchromatogramme verskyn het. Dieselfde word soms in die geval van valien en alanien waargeneem. Eluering met 0,2% n-butanol in water op trisakriljel lewer eersgenoemde verbinding vermeng met verbinding 45 en waarskynlik verbinding 46 (tesame met sy geassosieerde geel pigment). Hierdie onbekende is ook in 'n eendimensionele papierchromatografiese BAW-isolaat van bogenoemde pigment gevind, aangesien hulle dieselfde R_f -waardes in die geval het.

Volgens die aminosuuranaliseerder besit verbinding 46 dieselfde retensietyd as verbinding 39 en word albei deur die integreerder as 'n enkel piek (verbinding) verwerk. Figuur 4.13 toon verbinding 46, wat feitlik slegs in die 440 nm band absorbeer, tesame met verbinding 39 wat prominent by 570 nm en tot 'n minder mate by 440 nm absorbeer. Die integreer-



Figuur 4.13 - Automatische aminosuuranalyse van verbindingen 39 en 46 toon die integratie van slechts een piek.

1 = 440 nm + 570 nm

2 = 440 nm

3 = 570 nm

der se totale chromatogram (440 + 570 nm) toon 'n samestelling van die twee pieke wat as een piek geïntegreer is. Die belangrikheid van papierchromatografie in assosiasie met outomatiese aminosuuranalise, word hierdeur beklemtoon. Aparte chromatogramme by 440 nm en 570 nm dien ook as 'n uitstekende rugsteun vir die totale geïntegreerde analise.

Twaalf uit die 41 spesies het hierdie verbinding in papierchromatografies opspoorbare hoeveelhede bevat:

| | |
|--|-------------------------------------|
| <i>P. aurea</i> ssp. <i>aurea</i> (Exsertae) | <i>P. laetans</i> (Patentiflorae) |
| <i>P. burchellii</i> (Ligulatae) | <i>P. laurifolia</i> (Speciosae) |
| <i>P. compacta</i> (Ligulatae) | <i>P. mundii</i> (Exsertae) |
| <i>P. denticulata</i> (Subcaules) | <i>P. stokoei</i> (Speciosae) |
| <i>P. glabra</i> (Leiocephalae) | <i>P. sulphurea</i> (Crateriflorae) |
| <i>P. lacticolor</i> (Exsertae) | <i>P. susannae</i> (Ligulatae) |

Al die soorte, behalwe *P. laetans* (Doo-Transvaal), kom slegs in Suid- en Suidwes-Kaapprovinsie voor. Geen ander betekenisvolle ooreenkomste betreffende soort plant, grondtipe, blomseisoen, indeling van Rourke en eie groeiperingsanalise kon gevind word nie.

4.2.12 Verbinding 45

Suiwering: anioonuitruiling

Monster: *P. glabra*
MCW 500 g droog loofblare

Metode:

- Glaskolom (16 x 1 000 mm) met DOWEX 1 - XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- Opsit van MW gekonsentreerde monster en H_2O -wassing tot neutraliteit.
- H_2O -fraksie (= bedvolume) en heel eerste CH_3COOH -eluaat daarna, lewer 'n oranjegeel ninhidrienpositiewe verbinding, in teenwoordigheid van 'n moeilik skeibare (papierchromatografies) geel pigment.

Bespreking:

Met fenol is daar geen skeiding tussen die onbekende en die pigment nie, maar BAW lewer totale verdeling slegs teen relatief baie hoë konsentrasies, wanneer die oranjegeel verbinding se R_f -waarde aansienlik laer as die pigment s'n is. Hoe laer die konsentrasies, hoe groter is die hoeveelheid van die ninhidrienpositiewe verbinding wat met die pigment saam-

val, of beter gestel, slegs 'n deelarea van die pigment oorvleuel. Teen baie lae konsentrasies is die twee onskeibaar (Figuur 4.14). Hierdie is dus waarskynlik nie 'n ewewigstoestand nie, maar veel eerder 'n chemiese interaksie tussen die pigment en die ninhidrienpositiewe verbinding, wat konsentrasieafhanklik is.

Voor die geïsoleerde verbinding 45 op die aminosuuranaliseerder geloop is, is 'n absorpsiespektrum na ninhidrienreaksie tussen 750 en 400 nm getrek en op dieselfde grafiek vergelyk met die spektrums van aspartiensuur, alanien en 3-alanien (Figuur 4.15). 'n Gelyke aantal mol van die drie bekendes is gebruik (elk een amiegroep, dus ook dieselfde aantal stikstofgroepe). Dieselfde molekwivalent van 'n oranje ninhidrienreagerende verbinding, asparagien (ook net een stikstofgroep), is op papier ontwikkel. Die aantal μ l van verbinding 45 wat skynbaar dieselfde kleurintensiteit lewer, is vir die absorpsiespektrum gebruik.

Dis duidelik dat die onbekende relatief baie swak by 570 nm absorbeer, maar die teenoorgestelde geld by 440 nm. Baie interessant is die spektrum van 3-alanien (C_3 -stikstof). Alanien (C_2 -stikstof) absorbeer feitlik twee keer soveel by 570 nm. Aspartiensuur (C_2 -stikstof) en 3-alanien lewer albei 'n helderblou ninhidrienkleur, maar aspartiensuur se absorpsie is ook feitlik twee keer hoër. By 440 nm absorbeer al drie omtrent ewe laag.

Die geel pigment het dieselfde R_f -waardes (BAW en fenol) as 'n swak ninhidrienpositiewe geel pigment wat uit Protea rubropilosa gekristalliseer is, getoon (kyk later in die hoofstuk onder "Ninhidriennegatiewe Verbindings", 4.3.1).

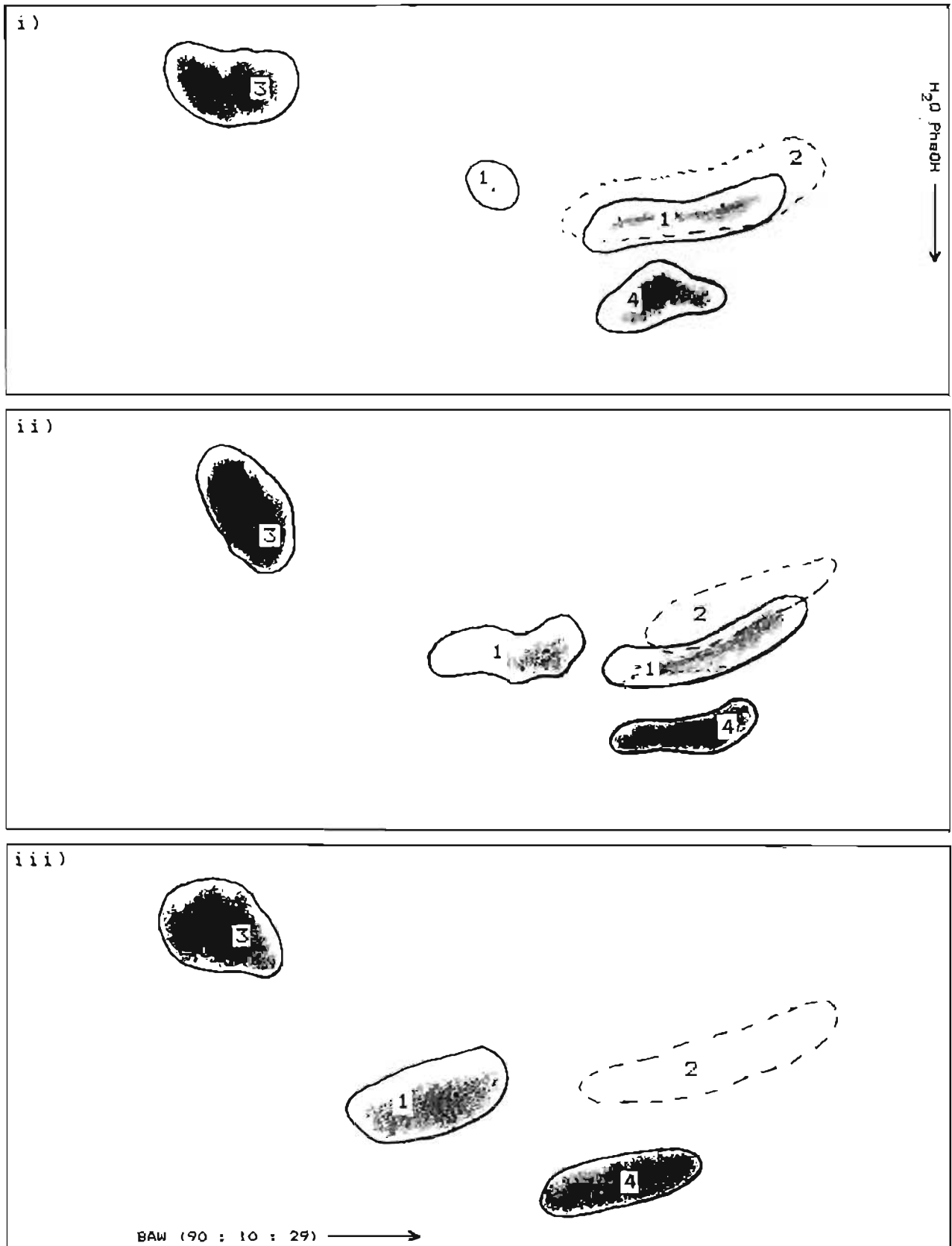
Hierdie pigment is in bogemiddelde konsentrasies in feitlik alle proteakatiooneluute (tot 'n baie mindere mate in aniooneluute) teenwoordig en het 'n groot invloed op veral die eerste rigting van 'n papierchromatogram, deurdat dit R_f -waardes aansienlik verlaag. 'n Ander eienskap op papier, is dat dit oor 'n groot area van die chromatogram versprei.

Opbrengs: Volgens papierchromatografiese skatting was dit ongeveer 6 mg.

4.2.13 Verbinding 46

Vier gekombineerde suiweringstegnieke is aangewend:

1. Anioonuitruiling
2. Katioonuitruiling
3. Trisakrilfiltrering
4. Papierskeiding

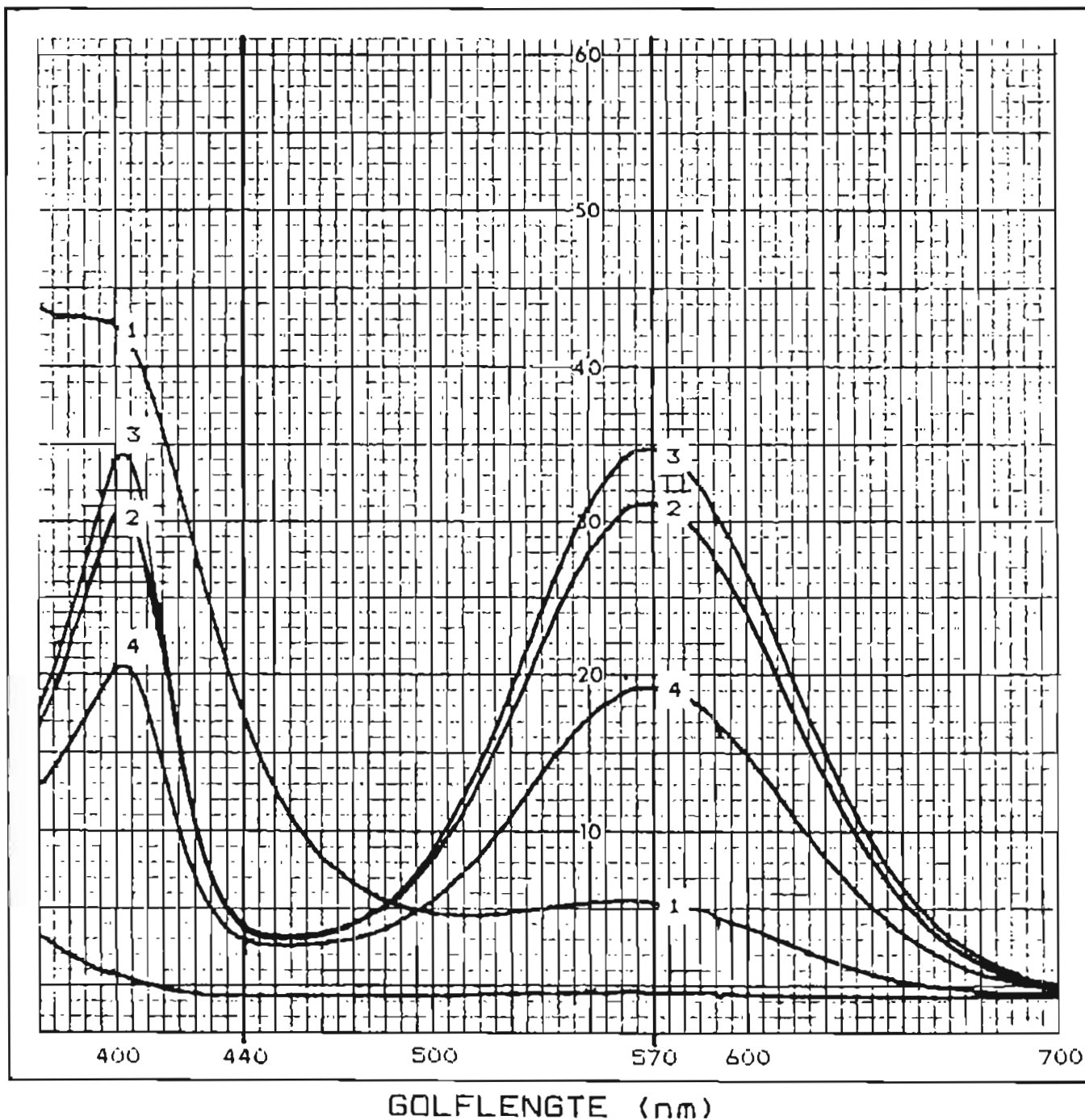


Figuur 4. 14 - *P. glabra*: verhoogde concentratie effek op die tweedimensioneel papierchromatografiese skeiding van verbinding 45 en sy "geassosieerde" geel pigment.

1 = verbinding 45
2 = geel pigment

3 = alanien
4 = fenielalanien

Monstervolume: i) = 20,0 μ l
ii) = 40,0 μ l
iii) = 60,0 μ l



Figuur 4. 15 - Absorpsiespektrum van verbinding 45, aspartie-
suur, alanien en 3-alanien na ninhidrienreaksie.

1 = verbinding 45
2 = aspartiezuur

3 = alanien
4 = 3-alanien

1. Anioonuitruiling

Monster: P. glabra
250 g x 2 droog loofblare

Metode:

- a) Glaskolom (1 000 x 16 mm) met DOWEX 1 - XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- b) Opsit van MW gekonsentreerde ekstrak, H_2O -wassing tot helder eluaat, wat versamel en onder vakuüm gekonsentreer is.
- c) Klein kolommetjie (150 x 20 mm) is aangewend vir die verwydering van aspartiensuurspore uit die trisakril 0,5 N CH_3COOH -eluaat (kyk 3).

2. Katioonuitruiling

Monster: Gekonsentreerde H_2O -eluaat van anioonuitruiling.

Metode:

- a) Glaskolom (26 x 1 000 mm) gepak met DOWEX 50W - XB (H^+) (200 - 400 maat).
- b) Opsit van konsentraat, eerste H_2O -wassing tot ten minste 80% gekleurde verbindings deur is, tweede H_2O -wassing tot helder eluaat.

Bespreking:

Die eerste eluaat is baie viskoos, wat opsporing van ninhidrienpositiewe verbindings belemmer. Daar is aanvaar dat die meeste ninhidrienpositiewe verbindings ook in die tweede, baie minder viskose watereluaat teenwoordig is.

Drie (miskien vier) verbindings in die tweede watereluaat toets ninhidrienpositief: gryspers geassosieer met geel pigment (ninhidrienpositief? - BAW R_f 's hoog) en twee perses met BAW R_f 's, asook konsentrasies, laag.

3. Trisakrilfiltrering

Monster: P. glabra
10 g x 5 droog loofblare

Metode en Bespreking:

- a) Opsit van monster en eluering met 0,2% n-BuOH (inhibeer swamgroei) in H_2O (pH 6,5): gryspers (ninhidrienkleur)

verbinding saam met geel (pigment) verbinding teenwoordig in fraksies 30 - 108 en veral in fraksies 79 - 96.

- b) Eluering met 0,5 N CH_3COOH (pH 3,5) lewer gryspers verbinding in fraksies 15 - 22 slegs saam met spore van aspartiensuur (aspartiensuur is m.b.v. die klein anioonkolommetjie, verwys na 1. c), onttrek), maar in fraksies 23 - 45 egter saam met die geel verbinding. Direk voor en na fraksies 15 - 22 is die eluaat redelik viskoos. Naaldvormige "klossies" wit kristalle (ninhidriennegatief) vorm in gekombineerde fraksie 15 - 22 gedurende vakuumpkonsentrering.

4. Papierskeiding

Monster: Gryspersbevattende eluate (gedeelte) van 2 en 3, ~ 100 g droë massa.

Metode en Bespreking:

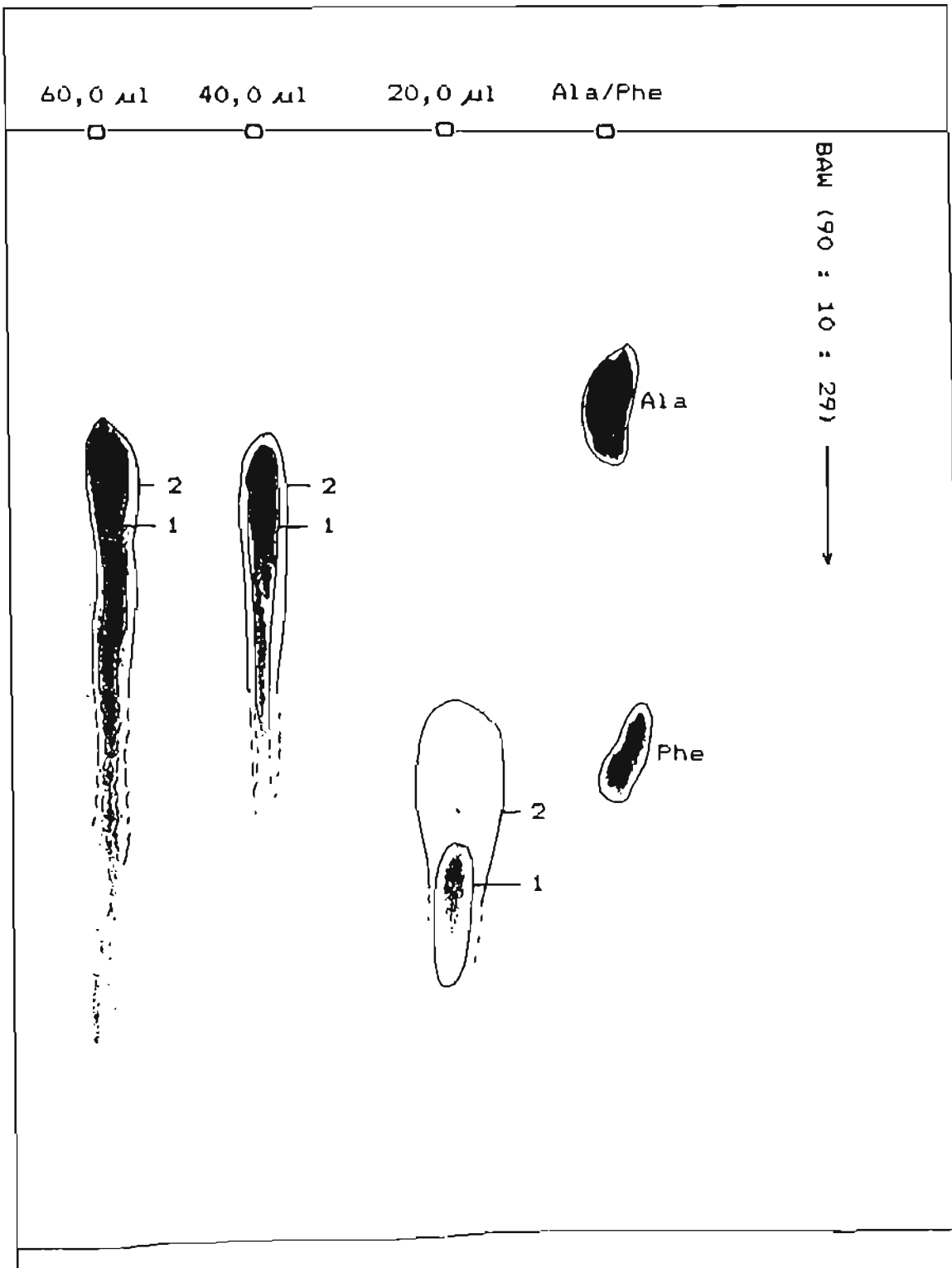
- a) Whatman 3 papier, BAW-chromatografering.
- b) In geval waar geel pigment saam met gryspers verbinding voorkom, is 'n relatief klein kolmassa opgesit, aangesien 'n gedeeltelike skeiding slegs dan geskied. Saam met die geel en gryspers verbindings, was hier ook nog twee ander pers verbindings (verwys na 2). Die vier dwarsbande is versamel en met H_2O geëluëer (geen kristallisering).

Opbrengs: ~ 10 mg (papierchromatografies geskat)

Bespreking:

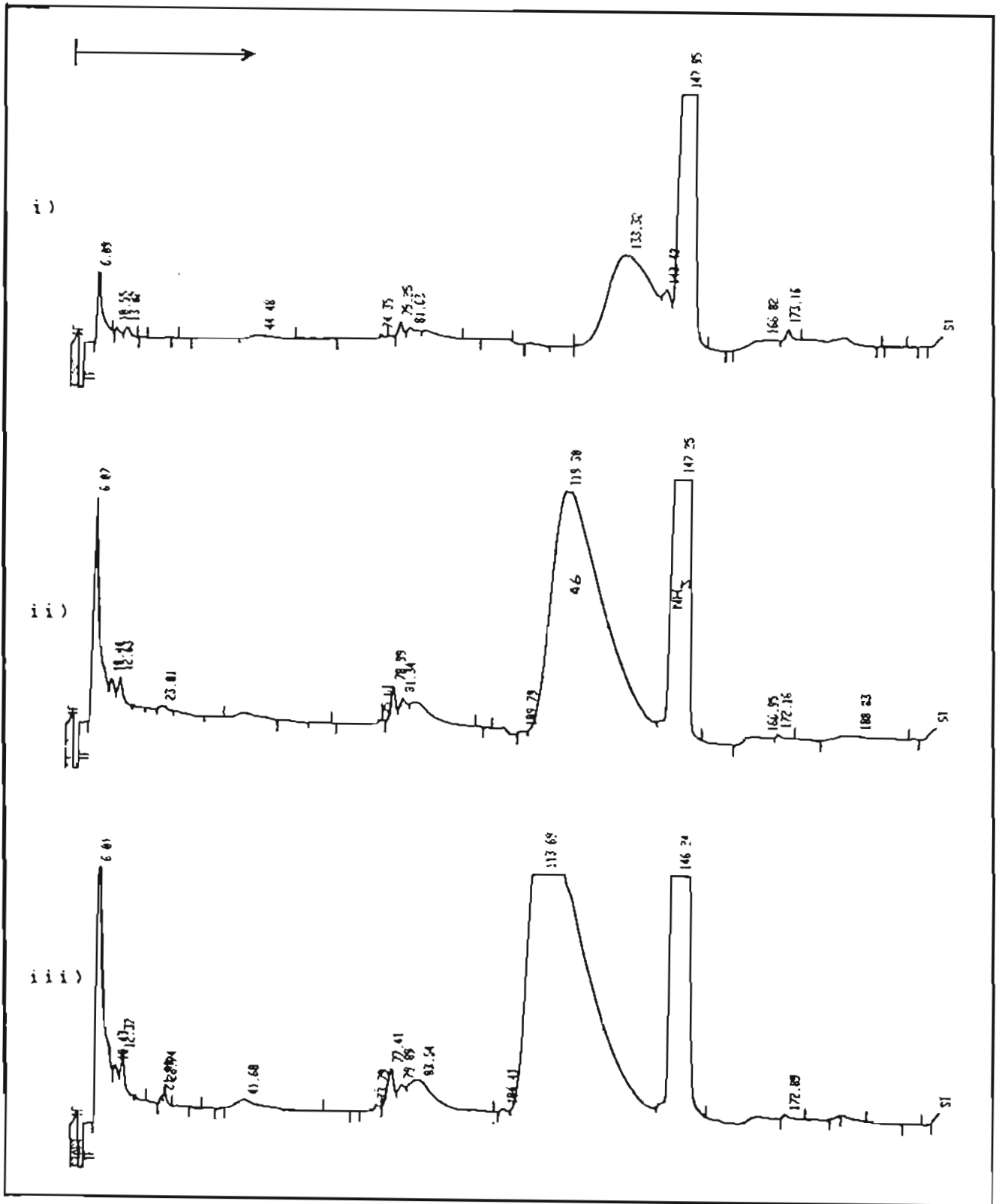
Al 41 spesies bevat hierdie onbekende verbinding in hoë konsentrasies. Dit ontwikkel 'n grys kleur na behandeling met ninhidrien/kollidien en beweeg verder as leusien/isoleusien in BAW. A.g.v. die besondere ioniese karakter (kyk onder), is dit moeilik om R_f -waardes te bepaal en moet dit eers feitlik suiwer geïsoleer word en in baie klein hoeveelhede op papierchromatogramme aangewend word. Waardes verkry, is: BAW = 0,72
fenol = 0,57

Verbinding 46 assosieer onder feitlik alle isoleringstoestande met 'n geel pigment (Figuur 4.16). Gradiënteluering met NH_4OH of HCl vanaf katioonhars, lewer die twee verbindings oor 'n groot aantal fraksies, vanaf die neutrale en anioniese watereluaat, tot feitlik na alle ninhidrienpositiewe katione die kolom verlaat het. Eluering met CH_3COOH vanaf die DOWEX 1 kolom lewer hierdie twee in die neutrale en eerste suureluaat. Probleme met hierdie verbinding is duidelik uit die aminosuuranaliseerderdata (Figuur 4.17), wat nie 'n oorbela-



Figuur 4. 16 - Eendimensionele papierchromatogram van verbinding 46 en sy "geassosieerde" geel pigment. Let op die gedeeltelike skeiding by die laagste konsentrasie. Standaard alaniën en fenielalaniën se massa-ekwivalente was 10 µg.

- 1 = verbinding 46 (gryspers na ninhidrienbehandeling)
- 2 = pigment (reeds geel voor ninhidrienbehandeling)



Figuur 4. 17 - Konsentrasie effek van verbinding 46 op die retensietyd van outomatiese aminosuuranalise:

- i) = 50,0 μ l
- ii) = 100,0 μ l
- iii) = 150,0 μ l

ding blyk te wees nie en van 'n redelik suiwer isolaat is. Alhoewel 'n retensietyd van 119,30 min aangegee is, strek die basis oor ongeveer 33 min, vanaf 110 tot 143 min. Protea-ekstrakte bevat gewoonlik 10 ninhidrienpositiewe verbindings wat retensietye binne hierdie grense het, nl. sistatsoon, isoleusien, leusien, tirosien, 3-alanien, fenielalanien, 3-aminobottersuur, 4-aminobottersuur, etanolamien en ammoniak (Figuur 4.18). Chromatogramme van volledige ekstrakte toon slegs 'n effense kromming van die "basislyn" tussen bogenoemde grense.

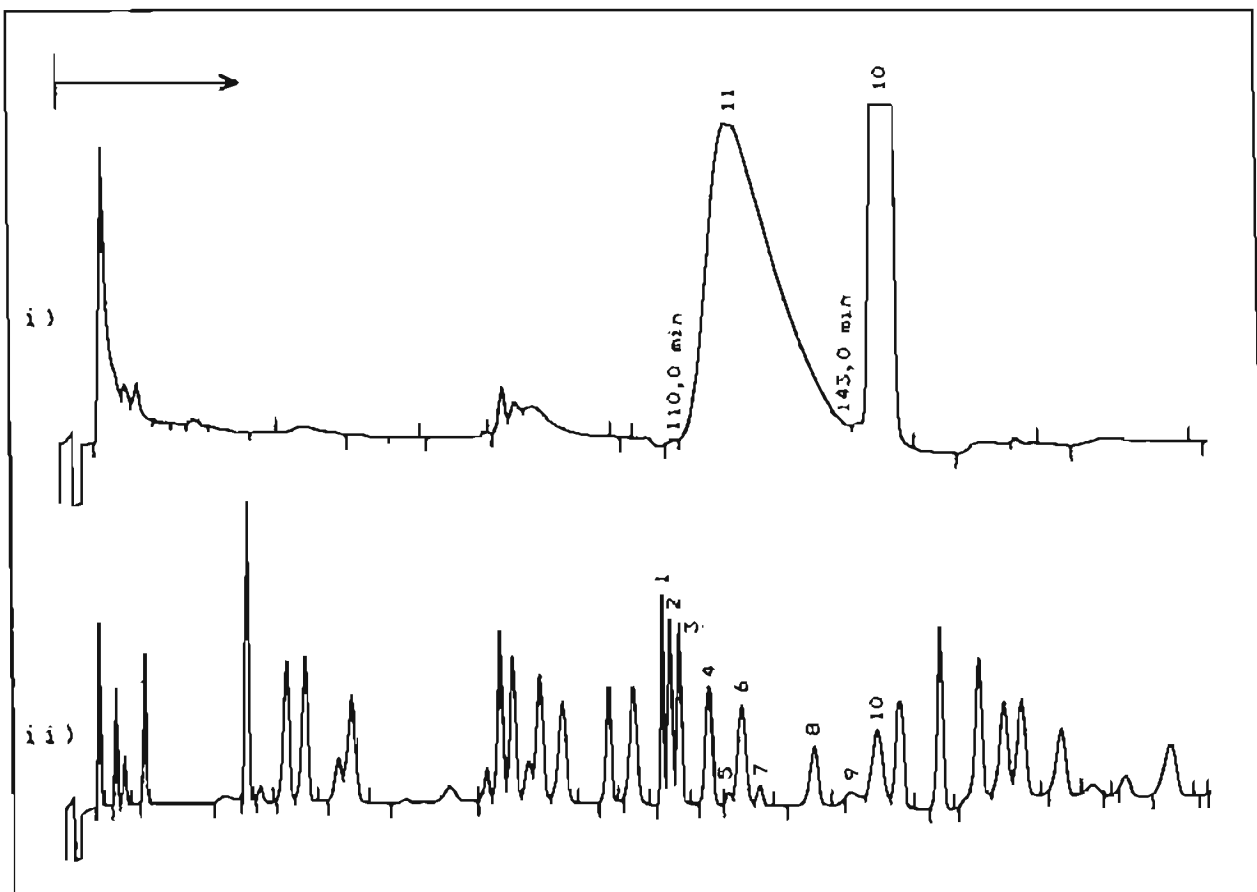
Die betrokke 10 verbindings maak hierdie kromming feitlik onwaarneembaar en lyk dit asof die verbindings goed geskei is, terwyl verbinding 46 glad nie geïntegreer word nie en as basislyn geneem word. Die integreerder kan wel ook die oorspronklike basislyn behou (indien geprogrammeer as "INTG 6"), wat beteken dat 'n deelarea van verbinding 46 by elk van die betrokke pieke se oppervlak getel word en dus 'n vals konsentrasieweergawe van laasgenoemde verbindings gee. Teen hoër konsentrasies saam met nog een verbinding, soos in die geval waar verbinding 39 saam voorkom (Figuur 4.13), word die twee as een geïntegreer. Figuur 4.19 toon dat verbinding 46, na ninhidrienreaksie, feitlik slegs by 440 nm absorbeer en die 570 nm leser onbeduidend registreer.

Nog 'n buitengewone eienskap, is dat konsentrasie 'n groot invloed op die retensietyd van verbinding 46 se aminosuuranalise het, selfs soveel as 20 min. (Figuur 4.17).

Op papierchromatogramme kom hierdie verbinding, in teenstelling met ander ninhidrienpositiewe verbindings, oor 'n wye gebied voor. Eendimensioneel (BAW en fenol) spreid dit in 'n lang "streep" (Figuur 4.16), sodat dit tweedimensioneel as 'n groot, uitgespreide, swak gekonsentreerde kol voorkom. Die lae gebiedskonsentrering maak dit baie moeilik om dit met ninhidrien op te spoor. In teenwoordigheid van die geassosieerde geel pigment, vind die ninhidrienreaksie ook opmerklik swakker plaas, wat opsporing verder belemmer. Papierchromatografies skei die twee verbindings slegs gedeeltelik (hoogstens 50%) teen baie lae konsentrasies (Figuur 4.16)

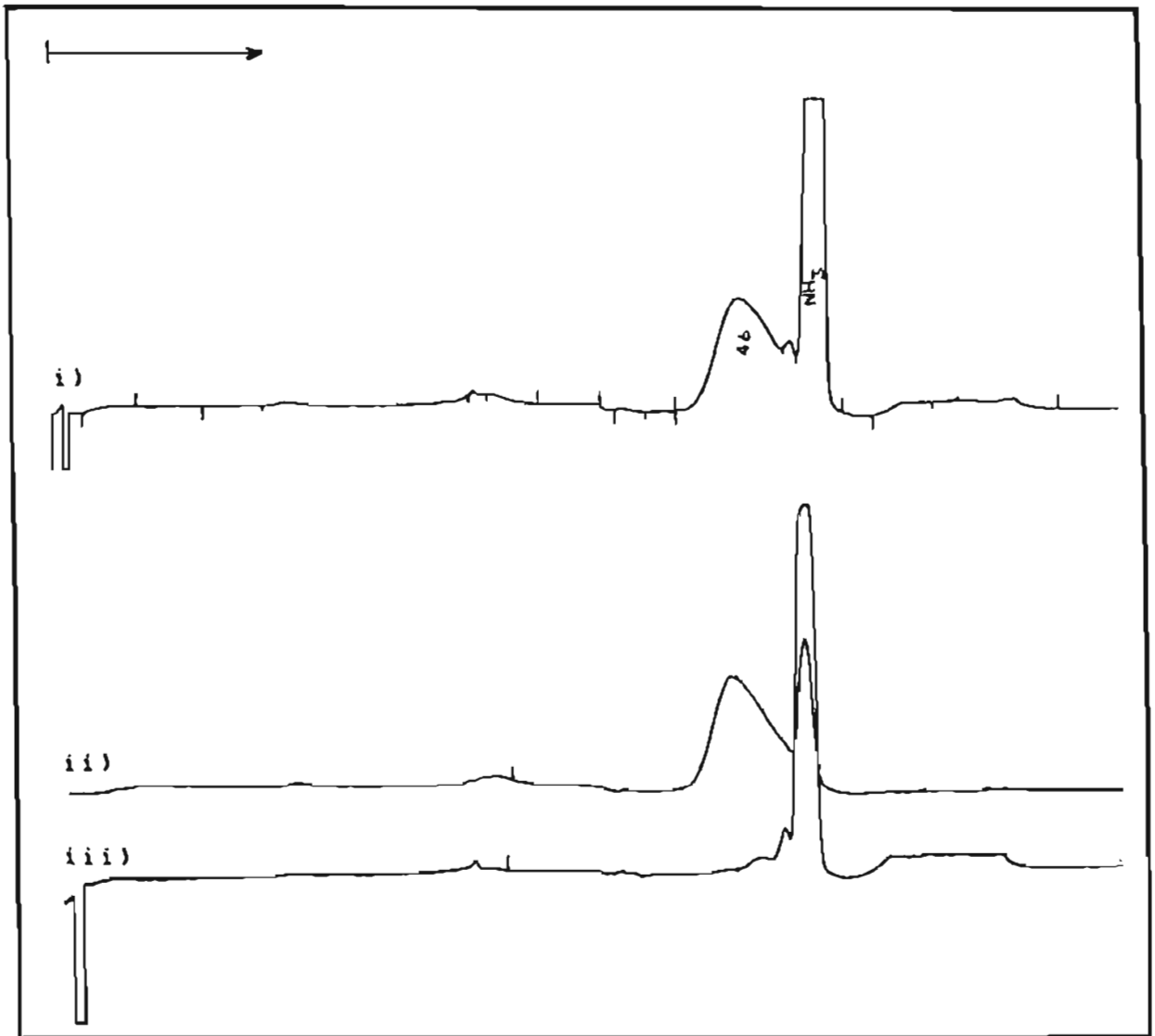
Silikajelchromatografie met 0,2% n-butanol in water, 0,5 en 1,0 N CH_3COOH , lewer verbinding 46 vermeng met die pigment in feitlik al die fraksies. Aangesien heelwat van die pigment en sommige ninhidrienpositiewe verbindings aan die jel adsorbeer, mag hierdie verspreiding oor die totale eluaat aan 'n swak adsorpsie-interaksie tussen die twee verbindings en die jel toegeskryf word.

Met trisakriljelchromatografie (0,2% n-butanol in water) kon die twee vermengdes van die ander ninhidrienpositiewe verbin-



Figuur 4. 18 → Automatische aminosuuranalyse van verbinding 46 (i) en die LKB fysiologiese standaardmengsel (ii), om die verbindings waarvan die integrering deur verbinding 46 beïnvloed mag word, aan te toon.

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1 = sistatioon | 2 = isoleusien |
| 3 = leusien | 4 = tirosien |
| 5 = 3-alanien | 6 = fenielalanien |
| 7 = 3-aminobottersuur | 8 = 4-aminobottersuur |
| 9 = etanolamien | 10 = ammoniak |
| 11 = verbinding 46 | |



Figuur 4. 19 - Automatische aminozuuranalyse van verbinding 46:
 i) = 440 nm + 570 nm
 ii) = 440 nm
 iii) = 570 nm

dings geskei word, maar dit het steeds in 'n groot groep fraksies voorgekom. Ongelukkig is hier ook adsorpsie aan die jel, wat waarskynlik meer as 50% van 'n totale monster se ninhidrienpositiewe verbindings insluit. Dit kom voor asof verbindings met suureienskappe, bv. aspartiensuur en glutamiensuur, egter "ongehinderd" deurbeweeg en in die heel eerste paar fraksies voorkom (die jel is veronderstel om 'n liniere skeiding tussen molekulêre massa 200 en 2 500 te lewer). 'n Aromatiese verbinding soos fenielalanien, kom ook in hierdie fraksies voor, maar gedeeltelike verlies vind plaas (20 - 30%). Die basiese arginien en verbinding 10 lewer ook feitlik 100% opbrengs, maar verlaat die jel in 'n groter groep fraksies (swakker resolusie) as die suur aminosure.

'n Gedeeltelike skeiding van 50 - 60% tussen verbinding 46 en die pigment is met 1,0 N CH_3COOH -eluering op trisakriljel behaal. Eersgenoemde elueer vroeër af, maar kom dan verder vermeng met die pigment voor totdat albei totaal afgewas is.

4.2.14 Verbinding 47

Suiwering: anioonuitruiling

Monster: P. rubropilosa

MW (na geaktiveerde koolstof) 300 g + 500 g droog jong, rooi loofblare.

Metode:

- a) Glaskolom (450 x 26 mm), gepak met DOWEX 1 - XB (CH_3COO^-) (100 - 200 maat).
- b) Gradiënteluering met 0 - 2 N CH_3COOH .
- c) Vloeitempo 3,0 ml/min.
- d) Teenwoordig in die laaste groep ninhidrienpositiewe fraksies (minder as 5% oorvleueling met aspartiensuur).

Opbrengs: Onbekend a.g.v. hidrolise (die verbinding breek baie maklik in 'n verskeidenheid (omtrent nege) ninhidrienpositiewe komponente op gedurende isolering).

Bespreking:

Grootskaalse anioonuitruilingchromatografie van P. rubropilosa se jong loofblaarekstrak, lewer hierdie ninhidrienpositiewe verbinding met sterker suureienskappe as enige ander (bv. aspartiensuur en glutamiensuur). Gedurende kouelugverdamping van asynsuur in die eerste aniooneluuat van die isolaat (daar is twee skeidings gedoen, eers met 300 g en

daarna met 500 g droë massa) is die oplossing se pH voortdurend getoets en nadat alle asynsuur reeds verwyder is, was die pH steeds 2,0. Die pH van aspartiensuur in waterige oplossing is hierna as 3,2 gemeet.

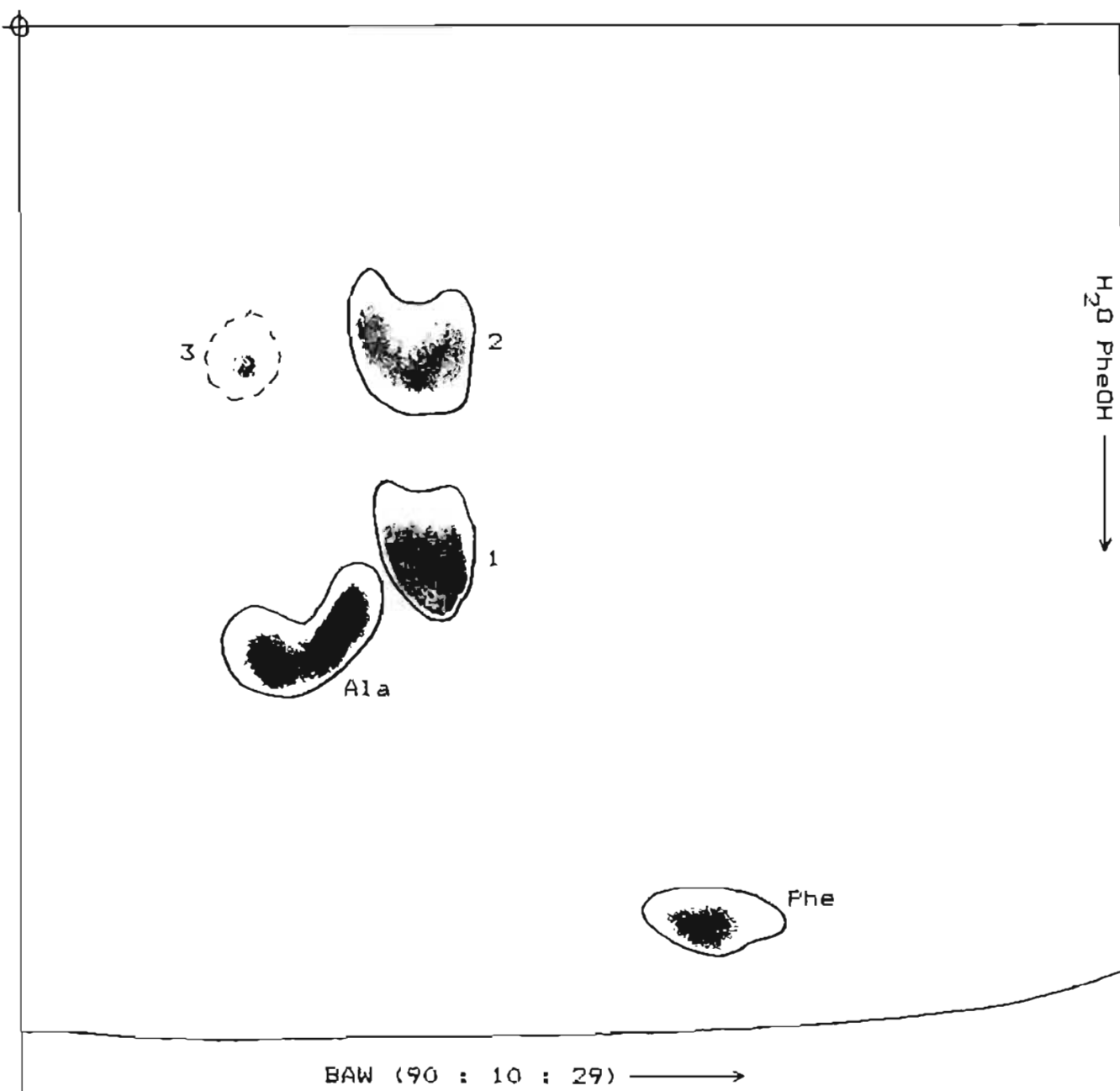
Die isolaat is op die aminosuuranaliseerder en Whatman 1 papier gechromatografeer. Eersgenoemde chromatogram het egter nege pieke getoon, waarvan agt feitlik dieselfde piekoppervlak gehad het. Indien die afbreekprodukte met dieselfde ninhidrienintensiteit reageer, beteken dit dat hierdie agt verbindings ongeveer in gelyke konsentrasies teenwoordig was. Die agt se retensietye stem goed ooreen met die van fosfoerien, treonien, serien, alanien, leusien, tirosien en arginien, terwyl die agste se retensietyd met geen bekende verbinding se geassosieer kon word nie. Die negende besit 'n vyfmaal groter piekoppervlak as die ander agt en het dieselfde retensietyd as glisien.

Tweedimensionele papierchromatografie toon egter twee verbindings (Figuur 4.20 nrs. 1 en 2) met 'n hoë konsentrasie en 'n derde skaars opspoorbaar. Laasgenoemde se R_f waardes (slegs met BAW en fenol geloop) is dieselfde as die van glisien en die ninhidrienkleur dieselfde, nl. rooi tot rooi-violet. Die twee in hoë konsentrasie het feitlik dieselfde BAW R_f 's, maar verskil beduidend in fenol. Hiervolgens blyk dit dus dat die verbinding met die retensietyd van glisien (en hoë konsentrasie) nie alleenlik glisien is nie. Dit mag wees dat daar wel glisien teenwoordig is, soos dit blyk uit die papierchromatogram (Figuur 4.20), maar dat dit saam met 'n ander verbinding (moontlik die onafgebreekte peptied) die aminosuuranaliseerder se kolom verlaat.

Papierchromatografering voor enige indamp-, hitte- of suurbehandeling, toon slegs een kol (nr. 1) met R_f BAW = 0,26 en fenol = 0,59, wat dus die tweedimensionele posisie van die oorspronklike verbinding (waarskynlik 'n peptied) blyk te wees (daar word vermoed dat nr. 2 ook 'n peptied is wat deur die afbreek van nr. 1 ontstaan het). Op die outomatiese aminosuuranaliseerder toon afbreekprodukte reeds direk na fraksieversameling, maar die verbinding met retensietyd die van glisien, blyk die oorspronklike peptied te wees.

4.2.15 Kleinmaat Onsuiver Isolering

Ninhidrienpositiewe verbindings, waarvan die kommersiële standaard nie beskikbaar was nie, is gewoonlik tweedimensioneel papierchromatografies geïsoleer (geloop, ontwikkel met ninhidrien, kol uitgeknipt en afgeglueer - verwys na hoofstuk 2 onder tweedimensionele papierchromatografie) om as "standaard" op die outomatiese aminosuuranaliseerder te dien. Alhoewel spoorhoeveelhede van ander ninhidrienpositiewe verbindings feitlik altyd teenwoordig was, kon die spesifieke



Figuur 4. 20 - Tweedimensionele papierchromatogram van verbinding 47. Alanien en fenielalanien is bygevoeg as standaarde.

- 1 = oorspronklike peptied (verbinding 47)
- 2 = moontlike peptiedafbreekproduk van verbinding 47
- 3 = waarskynlik glisien

verbinding se retensietyd en tot 'n mate konsentrasie/pekopervlak, bepaal word.

4.3 Ninhidriennegatiewe Verbindings

4.3.1 Uit die Metanol-Water Ekstrak

In sommige gevalle, soos met die jong, rooi loofblare van *P. rubropilosa*, vorm massas naaldvormige klossies kristalle gedurende vakuumpkonsentrasie van die MW-ekstrak. MeOH word eerste afgedamp, waartydens geen kristallisering plaasvind nie, maar wanneer nog net H₂O teenwoordig is, vertroebel die ekstrak vinnig en klossies wit kristalle sak uit. Donddroging van hierdie kristalle, vorm 'n tumeletjieagtige kors (in die geval van *P. rubropilosa* was dit 9,02 g per 117,35 g droë materiaal, dus 7,69%).

Na die eerste groep kristalle uit die ekstrak onttrek is, pak 'n tweede groep geel kristalle teen die glashouerwande. Dis ook naaldvormig, maar die naalde parallel tot mekaar gerangskik en het 'n soliede voorkoms. Die twee kristalliserende verbindings word as volg gekarakteriseer:

Tabel 4.3 - Karakterisering van die twee gekristalliseerde verbindings teenwoordig in die jong loofblare van *P. rubropilosa*.

| Eienskap | Eerste | Tweede |
|------------------------------|------------|-----------------|
| a) Kristalkleur | Wit | Geel |
| b) % Van gedroogde massa | 7,6 | 3,4 |
| c) Ninhidrienreaksie | negatief | positief?: geel |
| d) Verloor kristalwater | < 85 °C | 165 °C |
| e) Oplosbaarheid: | | |
| H ₂ O | baie swak | baie swak |
| asetoon | redelik | redelik |
| MeOH | baie swak | goed |
| (na asetoon) | goed | ----- |
| f) Absorpsiemaksimums | 206/278 nm | 220/326 nm |
| g) UV-fluorensensie: | | |
| 254 nm | geen | blou |
| 366 nm | blou | geelgroen |
| h) Reaksie FeCl ₃ | blouswart | blouswart |
| i) R _f : BAW | ----- | 0,61 |
| fenol | ----- | 0,80 |

Dit blyk dus dat albei kristalliserende verbindings (of groepe verbindings) fenolies van aard is (blouswart met FeCl_3), terwyl die tweede ook ninhidrienreagerende stikstof-groep/e mag besit.

Anders as enige van die ander ninhidrienpositiewe verbindings, ontwikkel die vooraf liggeel kleur (verbinding 2) tot 'n intense dieper geel direk na benatting met ninhidrien/kollidien in MeOH by kamertemperatuur. Gedurende en na warmlugdroging bly die kleur steeds intens. Aanvanklik is vermoed dat die MeOH of kollidien dalk vir die reaksie verantwoordelik was, maar ninhidrien in H_2O lewer dieselfde resultaat. MeOH- en kollidienbehandeling vertoon negatief. Die feit dat laasgenoemde verbinding voor ninhidriendroging reeds kleurreaksie toon en ook nie uiteindelik pers word nie, plaas dit eerder onder die "ninhidriennegatiewe" groep.

Albei verbindings is drie maal in MeOH - H_2O opgelos en die MeOH onder vakuum onttrek, sodat dit in H_2O neergeslaan is vir finale suiwering.

4.3.2 Uit Anioonwatereluaat

Monster en Metode:

(Verwys na 4.2.10: Verbinding 1B.)

Die kristalle is baie goed oplosbaar in MeOH en het 'n donker maroenbruin kleur. Dit word blouswart met FeCl_3 , wat weer eens op 'n fenoliese karakter dui. Die kristalmassa was 5,0% van die oorspronklike droë massa van die materiaal.

HOOFSTUK 5

VOORKOMS VAN NINHIDRIENPOSITIEWE VERBINDINGS

5.1 Inleiding

Sedert 1947 is papierchromatografie algemeen aangewend om verbindings teenwoordig in plante (o.a. ook aminosure) te skei, identifiseer en te isoleer.

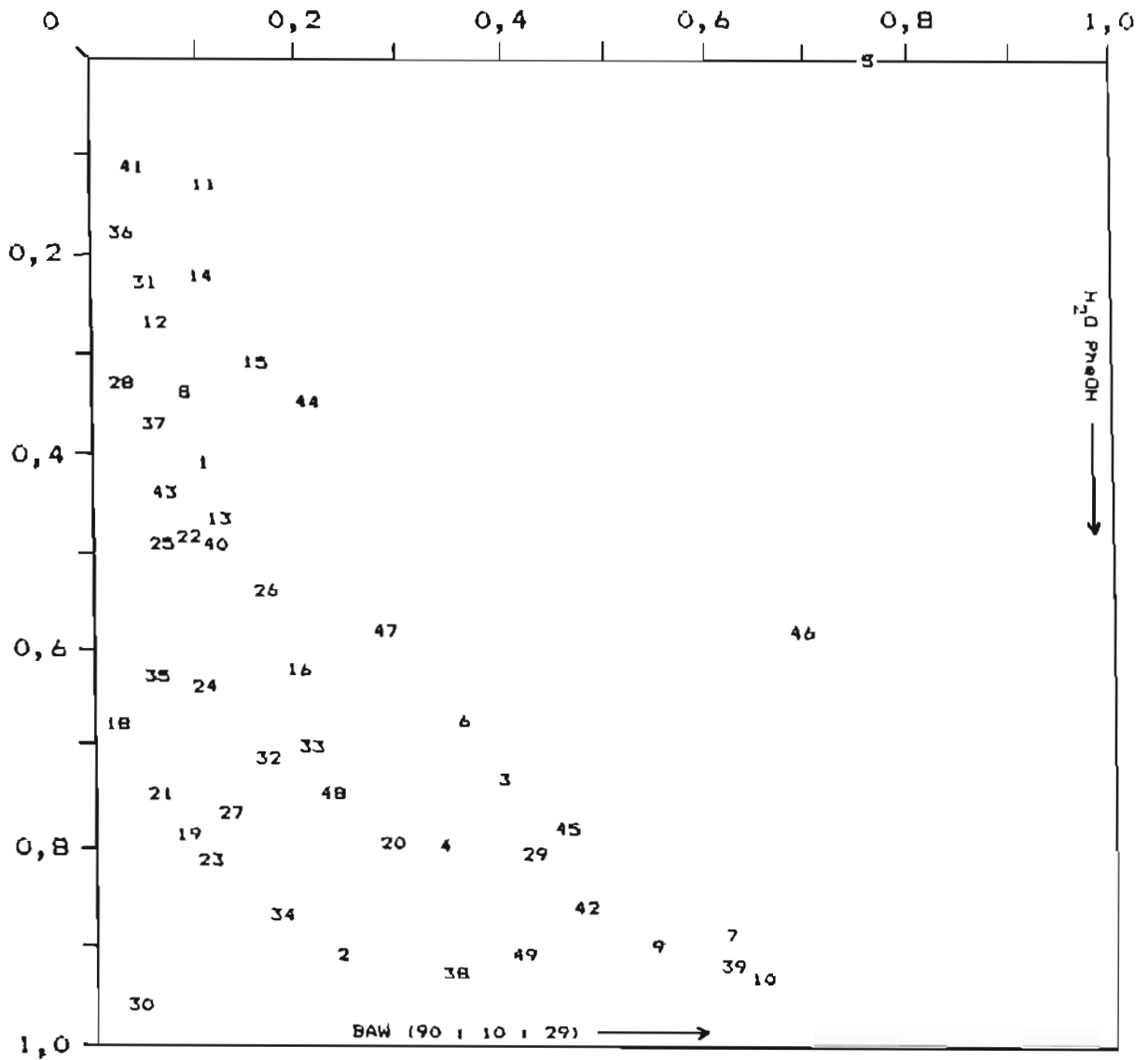
Vandat chemotaksonomie op die voorgrond getree het, is die tegniek van papierchromatografie dikwels gebruik om na aminosuurverwantskappe tussen taksons te kyk. Wat die Proteaceae betref, het Van Staden (1966) reeds die algemene aminosuurvoorkoms en genusverwantskappe tussen sekere verteenwoordigers papierchromatografies ondersoek. Die min ondersoek wat reeds op *Protea* se vrye aminosuurinhoud gedoen is, was oppervlakkig, sodat 'n dieper en meer uitgebreide studie nodig was.

5.2 Papierchromatografies Opgespoorde Verbindings

Volgens Tabel 5.1 behoort die posisie van sommige verbindings volgens die standaardafwyking van hulle gemiddeldes te oorvleuel. Sulke verbindings se relatiewe posisies (relatiewe R_f -waardes) t.o.v. ander bekendes op dieselfde chromatogram, is dan in berekening gebring vir identifikasiedoeleindes. Verbinding 17 is in tabelle en figure uitgelaat of 'n waarde van "0" toegeken, omdat, na dit aanvanklik as 'n aparte verbinding beskou is, dit ook geblyk het glutamiensuur te wees (verwys na konsentrasie effek, figuur 4.5).

Agt-en-veertig ninhidrienpositiewe verbindings is tweedimensioneel papierchromatografies in 41 *Protea* spp. opgespoor. Figuur 5.1 toon die posisie van elk op 'n tweedimensionele papierchromatogram wat met BAW en fenol ontwikkel is, terwyl Tabel 5.1 die verbindings se identiteit, ninhidrien/kolliedienkleurontwikkeling, R_f -waardes en standaardafwyking van die gemiddeldes toon. Tabel 5.2 gee die verskillende verbindings (40 verbindings - verbinding 17 uitgeskakel) wat papierchromatografies in loofblare opgespoor is, se relatiewe konsentrasies in die verskillende spesies weer.

Die standaardafwyking van die gemiddeldes van leusien/isoleusien, fenielalanien en verbinding 46 in BAW was besonder hoog. Die uitsonderlike gedrag van onbekende 46 gedurende isoleringstegnieke aangewend, is in hoofstuk 4 bespreek. Die relatief groot koloppervlak (swak gekonsentreer) op papierchromatogramme in albei loopvloei-stowwe aangewend (BAW en fenol), is vir hierdie hoë standaardafwyking van die gemid-



Figuur 5.1 - Voorstelling om die tweedimensioneel papierchromatografiese posisies van 48 ninhidrienpositiewe verbindings uit 41 Suid-Afrikaanse spesies van *Erotea*, aan te dui. (Kyk Tabel 5.1 vir meer besonderhede.)

Tabel 5.1 - Identifikasie en eienskappe van ninhidrienpositiewe verbindings aangedui in Figuur 5.1.

bg = blougroen o = oranje
 bl = blou ob = oranjebruin
 bp = bloupers og = oranjegeel
 br = bruin p = pers
 ge = geel rv = rooiviolet
 gp = gryspers v = violet
 gr = grys
 s = standaardafwyking van die gemiddelde
 gr - p beteken grys verander na pers binne 24 uur

| Nr. | Identiteit | Nin/kol kleur | BAW (90 : 10 : 29) | | H ₂ O PheOH | |
|-----|--------------------------|------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | R _f (s) | R _f Ala (s) | R _f (s) | R _f Ala (s) |
| 1 | serien | br - gp | 0,11(0,02) | 0,58(0,04) | 0,41(0,01) | 0,66(0,03) |
| 2 | prolien | ge - p | 0,24(0,02) | 1,22(0,03) | 0,91(0,01) | 1,46(0,03) |
| 3 | onbekend | o - p | 0,40(0,02) | 2,12(0,06) | 0,73(0,02) | 1,16(0,05) |
| 4 | 4-aminobottersuur | p | 0,34(0,03) | 1,66(0,04) | 0,80(0,01) | 1,29(0,03) |
| 5 | onbekend | gr | 0,77(0,02) | 3,83(0,06) | 0,00(0,00) | 0,00(0,00) |
| 6 | tirosien | gr - p | 0,36(0,01) | 1,79(0,06) | 0,67(0,02) | 1,08(0,04) |
| 7 | leusien/soleusien | p | 0,61(0,04) | 2,93(0,05) | 0,89(0,02) | 1,44(0,04) |
| 8 | onbekend | o | 0,09(0,01) | 0,47(0,05) | 0,34(0,03) | 0,55(0,05) |
| 9 | fenielalanien | br - p | 0,55(0,04) | 2,70(0,06) | 0,90(0,02) | 1,44(0,05) |
| 10 | onbekend | br - p | 0,64(0,03) | 3,05(0,07) | 0,93(0,01) | 1,50(0,06) |
| 11 | onbekend | ge | 0,11(0,02) | 0,52(0,06) | 0,13(0,03) | 0,21(0,05) |
| 12 | onbekend | ge | 0,06(0,01) | 0,32(0,05) | 0,27(0,03) | 0,44(0,05) |
| 13 | glisien | rv - p | 0,12(0,01) | 0,63(0,04) | 0,47(0,01) | 0,76(0,02) |
| 14 | aspartiensuur | b - p | 0,11(0,01) | 0,56(0,04) | 0,22(0,02) | 0,35(0,03) |
| 15 | glutamiensuur | v - p | 0,16(0,01) | 0,78(0,04) | 0,31(0,02) | 0,50(0,03) |
| 16 | alanien | p | 0,20(0,02) | 1,00(0,00) | 0,62(0,01) | 1,00(0,00) |
| 18 | onbekend | gr - p | 0,02(0,01) | 0,10(0,03) | 0,68(0,02) | 1,09(0,05) |
| 19 | onbekend | bg - p | 0,09(0,01) | 0,42(0,03) | 0,79(0,03) | 1,27(0,04) |
| 20 | etanolamien | ob - gp | 0,29(0,03) | 1,53(0,06) | 0,80(0,01) | 1,30(0,04) |
| 21 | histidien | p | 0,06(0,02) | 0,38(0,07) | 0,75(0,02) | 1,21(0,07) |
| 22 | asparagien | o - ob | 0,09(0,01) | 0,45(0,03) | 0,49(0,01) | 0,79(0,03) |
| 23 | onbekend | p | 0,11(0,00) | 0,62(0,05) | 0,81(0,00) | 1,28(0,07) |
| 24 | glutamien | v - p | 0,11(0,02) | 0,56(0,05) | 0,64(0,02) | 1,03(0,04) |
| 25 | lisien | p | 0,08(0,02) | 0,41(0,05) | 0,49(0,03) | 0,79(0,06) |
| 26 | treonien | gr - p | 0,17(0,02) | 0,87(0,03) | 0,54(0,02) | 0,87(0,02) |
| 27 | arginien | p | 0,13(0,01) | 0,64(0,03) | 0,77(0,01) | 1,24(0,02) |
| 28 | onbekend | p | 0,03(0,01) | 0,17(0,02) | 0,33(0,03) | 0,53(0,05) |
| 29 | valien | p | 0,43(0,03) | 2,13(0,05) | 0,81(0,02) | 1,31(0,04) |
| 30 | onbekend | gr - p | 0,04(0,01) | 0,19(0,03) | 0,96(0,01) | 1,58(0,02) |
| 31 | ornitien | p | 0,05(0,00) | 0,25(0,01) | 0,23(0,01) | 0,38(0,02) |
| 32 | onbekend | rv - p | 0,17(0,02) | 0,82(0,04) | 0,71(0,02) | 1,14(0,03) |
| 33 | S-alanien | b | 0,21(0,03) | 1,14(0,03) | 0,70(0,03) | 1,12(0,01) |
| 34 | onbekend | p | 0,18(0,01) | 0,87(0,04) | 0,87(0,01) | 1,41(0,03) |
| 35 | 2,3-diaminopropioonsuur? | v - p | 0,06(0,01) | 0,38(0,03) | 0,63(0,03) | 1,00(0,03) |
| 36 | onbekend | p | 0,03(0,01) | 0,17(0,02) | 0,18(0,03) | 0,29(0,03) |
| 37 | sistien? | v - gp | 0,06(0,01) | 0,29(0,02) | 0,37(0,01) | 0,59(0,01) |
| 38 | pipekoliensuur | bp - -- | 0,35(0,03) | 1,92(0,05) | 0,93(0,01) | 1,49(0,04) |
| 39 | onbekend | v - p | 0,42(0,01) | 2,95(0,07) | 0,92(0,01) | 1,47(0,06) |
| 40 | onbekend | p | 0,11(0,01) | 0,55(0,04) | 0,49(0,01) | 0,79(0,02) |
| 41 | fosfoserien | bp | 0,03(0,01) | 0,16(0,02) | 0,12(0,01) | 0,20(0,02) |
| 42 | triptofaan | br - p | 0,48(0,01) | 2,17(0,04) | 0,86(0,01) | 1,33(0,01) |
| 43 | onbekend | p | 0,07(0,01) | 0,35(0,02) | 0,44(0,01) | 0,71(0,01) |
| 44 | onbekend | p | 0,21(0,01) | 1,05(0,03) | 0,35(0,02) | 0,56(0,03) |
| 45 | onbekend | ag - p | 0,47(0,03) | 2,35(0,05) | 0,70(0,02) | 1,28(0,05) |
| 46 | onbekend | gp | 0,72(0,10) | 3,60(0,16) | 0,57(0,07) | 0,92(0,11) |
| 47 | onbekend | bp - p | 0,26(0,02) | 1,30(0,04) | 0,59(0,03) | 0,95(0,05) |
| 48 | onbekend | br - p | 0,23(0,01) | 1,15(0,02) | 0,75(0,01) | 1,21(0,02) |
| 49 | onbekend | o - p | 0,42(0,03) | 2,10(0,05) | 0,91(0,01) | 1,47(0,03) |

delde, ook in fenol, verantwoordelik. Hierdie resultate is van tweedimensionele papierchromatogramme, waarvan die eerste looprigting in BAW en die tweede in fenol was, verkry. Sommige ninhidriennegatiewe verbindings loop baie naby aan die BAW-front en dit lyk asof dit die tweede loop in fenol sodanig beïnvloed, dat verbindings met hoër R_f -waardes in BAW (soos 0,40 soos fenielalanien, leusien/iso-leusien en verbindings 46 en 45) "uitkring" na die oorspronklike BAW-front (Powrie, mondelingse mededeling). Die BAW R_f -waardes van laasgenoemde verbindings is dan hoër as voor die tweede loop met fenol. Die effek is egter baie wisselvallig en verskil ook blykbaar tussen spesies, soos wat hulle inhoud van die ninhidriennegatiewe verbindings naby die BAW-front verskil.

Heelwat meer verbindings het 'n hoër standaardafwyking van die gemiddelde met fenol as elueermiddel, nl. fenielalanien, histidien, lisien en verbindings 3, 8, 10, 11, 12, 18, 23, 28, 39, 46 en 47. Dieselfde invloed as in bogenoemde geval kom waarskynlik nie voor nie. Die drie geïdentifiseerde verbindings wat 'n hoër afwyking toon, besit geen gemeenskaplike chemiese eienskap wat hulle van die res van die bekendes onderskei nie. Konsentrasie van die kol mag in die geval van lisien en histidien 'n rol speel, omdat hulle veral in die fenollooprigting oor 'n groot oppervlak sprei. Die ander verbindings konsentreer egter goed.

Vier-en-twintig verbindings is geïdentifiseer (d.m.v. ko-chromatografie van standarde op tweedimensionele papierchromatogramme en die outomatiese aminosuuranaliseerder), terwyl onsekerheid oor 'n verdere twee bestaan, nl. 2,3-diaminopropionsuur en sistien. Ses is in kristalvorm (ook geïdentifiseer d.m.v. infrarooispektrofotometrie van die verbindings en hulle standarde) en een (etanolamien) as vloeistof suiwer geïsoleer (papierchromatografies en volgens die aminosuuranaliseerder, terwyl die gekristalliseerdes se suiwerheid ook d.m.v. infrarooispektrofotometrie bepaal is). Die spesifieke optiese rotasie van laasgenoemde gekristalliseerde verbindings is vasgestel (kyk hoofstuk 4 vir isolering). Vier onbekendes, verbindings 10, 18, 45 en 46, is ook in die vloeistofvorm tydelik bevries vir opvolgende studie. 'n Hele aantal ander is "onsuiwer" (volgens die aminosuuranaliseerder wat twee en meer nMol/160 μ l 440 en 570 nm absorberende verbindings kan opspoor) geïsoleer vir retensie identifisering op die outomatiese aminosuuranaliseerder. 'n Besondere suur verbinding (waarskynlik 'n peptied), verbinding 47, is ook suiwer in oplossing verkry.

Die volgende verbindings was in meer as 75% van die spesies in relatief hoër konsentrasies in die loofblare teenwoordig (kyk Tabelle 5.2 en 5.3): serien, 4-aminobottersuur, aspar-tiensuur, glutamiensuur en alanien. In kleiner hoeveelhede was: prolين, leusien/iso-leusien, fenielalanien en valien.

Tabel 5.3 - Relatiewe belangrikheid van verskillende vrye ninhidrien-positiewe verbindings in die 41 *Protea* isolate wat ondersoek is. (Kyk Tabel 5.1 vir identiteit van verbindings.)

| Verbinding Nr. | Relatiewe Konsentrasie | | Persentasie Spesies waarin voorkom |
|-------------------|------------------------|---------|---------------------------------------|
| | Gemiddeld | Hoogste | |
| 1 | 4,13 | 7 | 98 |
| 2 | 1,97 | 4 | 76 |
| 3 | 5,30 | 8 | 24 |
| 4 | 3,17 | 9 | 82 |
| 5 | 2,22 | 3 | 22 |
| 6 | 1,10 | 2 | 24 |
| 7 | 2,05 | 4 | 90 |
| 8 | 2,96 | 6 | 56 |
| 9 | 1,41 | 3 | 78 |
| 10 | 3,00 | 6 | 20 |
| 11 | 1,40 | 2 | 12 |
| 12 | 2,50 | 5 | 39 |
| 13 | 3,44 | 6 | 61 |
| 14 | 5,21 | 8 | 95 |
| 15 | 8,17 | 9 | 100 |
| 16 | 7,45 | 9 | 98 |
| 18 | 2,25 | 4 | 39 |
| 19 | 4,00 | 4 | 2 |
| 20 | 2,80 | 4 | 12 |
| 21 | 2,00 | 3 | 10 |
| 22 | 2,00 | 5 | 22 |
| 23 | 1,50 | 2 | 5 |
| 24 | 1,93 | 4 | 66 |
| 25 | 5,75 | 9 | 49 |
| 26 | 1,96 | 7 | 59 |
| 27 | 3,60 | 7 | 12 |
| 28 | 1,75 | 4 | 49 |
| 29 | 2,16 | 5 | 90 |
| 30 | 2,00 | 2 | 2 |
| 31 | 1,50 | 2 | 15 |
| 32 | 1,71 | 3 | 17 |
| 33 | 1,14 | 2 | 17 |
| 34 | 1,00 | 1 | 2 |
| 35 | 3,50 | 5 | 5 |
| 36 | 1,36 | 2 | 68 |
| 37 | 3,33 | 4 | 7 |
| 38 | 1,87 | 3 | 37 |
| 39 | 1,85 | 4 | 32 |
| 40 | 3,00 | 3 | 2 |
| 41 | 2,20 | 4 | 12 |

Glisien, glutamien, lisien en treonien, asook verbindings 8, 28 en 36 het ook taamlik algemeen (ongeveer die helfte van die spesies) voorgekom, waarvan glisien en verbinding B in redelike hoë konsentrasies opgespoor is. Tiro sien, etanolamien, histidien, asparagien, arginien, ornitien, 3-alanien, 2,3-diaminopropioonsuur (?), sistien (?), fosfoserien, asook verbindings 3, 5, 10, 11, 19, 23, 30, 32, 34 en 40 het in baie min (minder as 25%) van die spesies voorgekom.

Gedurende die blomseisoen het serien, glisien, asparagien en prolien se konsentrasies in die loofblare drasties gestyg. Feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings het tydens hierdie seisoen toegeneem. Blomme en omwindselblare het gemiddeld 'n 10 x hoër konsentrasie as loofblare getoon (Prosch, 1986). 'n Toename in die loof (oud en jonk) net voor en gedurende blomtyd, beteken dat hierdie verbindings waarskynlik daar vervaardig en na die blomme getranslokeer word. Hoë konsentrasies (nie so hoog soos in blomme en omwindselblare nie) van veral glutamiensuur, glutamien, asparagien en serien kom in die wortelgroei-punte voor, terwyl die res van die wortel se inhoud relatief laag is (Powrie, 1986). Die hoër groeiaktiwiteit in wortelpunte is heel moontlik hiervoor verantwoordelik.

Interessant was die hoër konsentrasies in die loofblaartjies direk onder die bloeiwyse, vergeleke met ander loof (ongeveer 3 x meer). Dit mag toegeskryf word aan die hoë konsentrasie in die bloeiwyse, wat die konsentrasie in naasliggende organe laat verhoog, eerder as 'n hoogs aktiewe vervaardigingsentrum in hierdie blaartjies.

Sommige ninhidrienpositiewe verbindings kon slegs gedurende blomtyd opgespoor word, bv. nr's 19 en 23. Etanolamien was papierchromatografies ook slegs in hierdie tyd sigbaar, alhoewel die aminosuuranaliseerder feitlik altyd spore daarvan getoon het (ongeveer 10 nMol / 150 mg droë massa).

Aanvanklik is slegs van kationuitruiling op DOWEX 50W - X8 (H^+) 200 - 400 maat hars in die ondersoek gebruik gemaak, maar 'n hele aantal verbindings adsorbeer baie swak (bv. glisien, fosfoserien, aspartiensuur en onbekendes 3 en 39), terwyl sommige glad nie bind nie (bv. onbekendes 45, en 47). Van laasgenoemde twee groepe het glisien, onbekendes 3, 39 en 45, asook 46, baie swak of glad nie aan die anioonhars geadsorbeer nie. Glutamiensuur blyk ewe goed deur albei harse gehou te word. Kwantitatiewe werk moet dus op die kation, anioon en neutrale fraksies gedoen word. Laasgenoemde fraksie verg egter verdere suiweringsbehandeling voordat dit enigsins op papier chromatografeerbaar is (verwys na POGINGS OM ISOLERINGSFROBLEME UIT TE SKAKEL, hoofstuk 3).

In ooreenstemming met Van Staden (1962), is bevind dat gluta-

miensuur feitlik altyd die verbinding met die hoogste konsentrasie was. Die jong loofblare van *P. rubropilosa* bevat egter twee maal meer arginien as glutamiensuur (tweede meeste teenwoordig hier).

5.3 Groeperingsanalise

Orgaan- en habitatverskille tussen ninhidrienpositiese verbindings (hoofsaaklik konsentrasieverskille) kom voor (Prosch, 1986) en daarom is slegs loofblare (alle ouderdomme) wat in Kirstenbosch Botaniese Tuin versamel is, vir die groeperingsanalise aangewend. Dit is ook bevind dat pluktyd (watter tyd van dag versamel) moontlik 'n rol speel. Die blare is gevolglik tussen 10h00 en 11h00 in die somermaande September tot Januarie versamel.

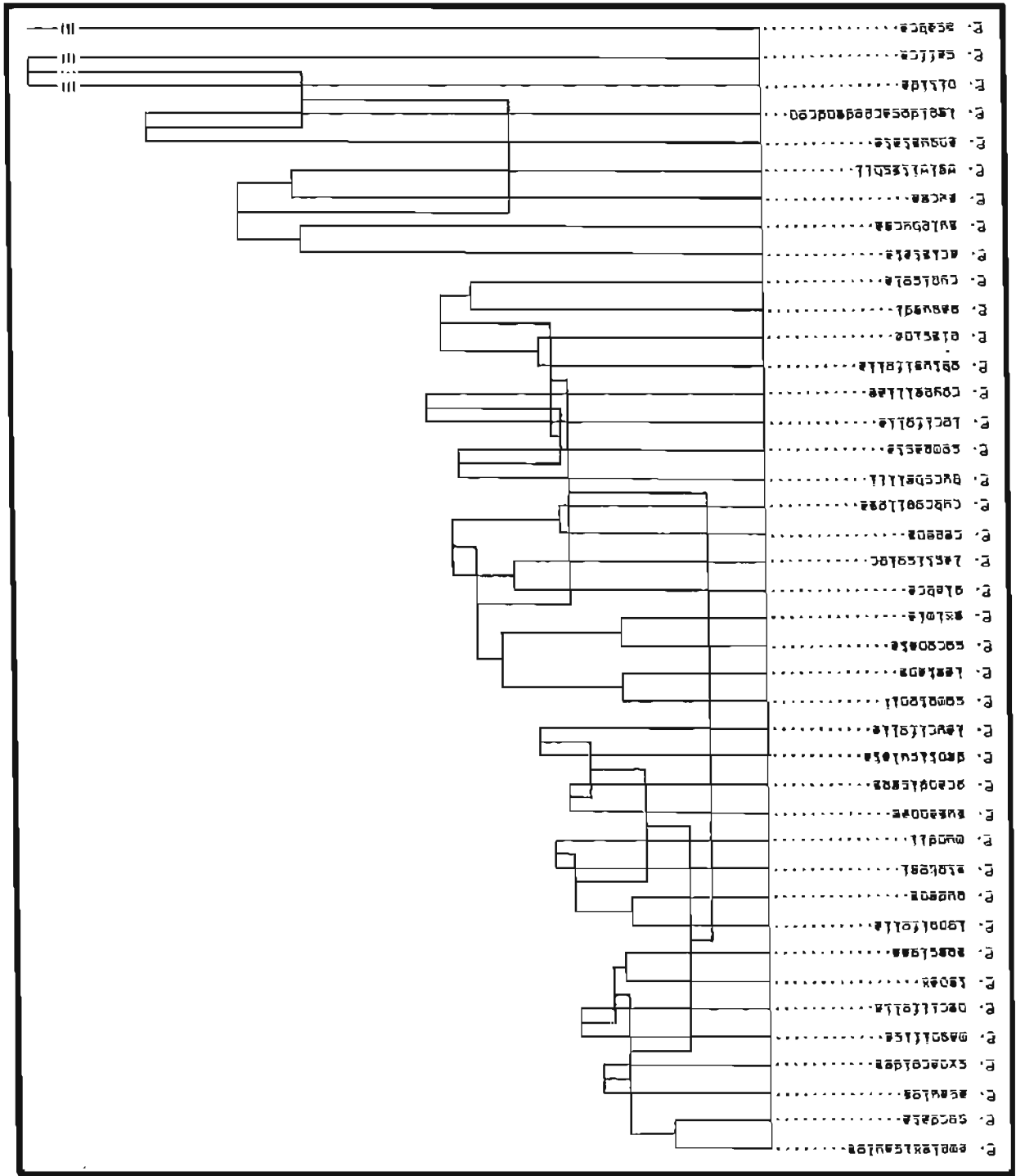
Die groeperingsanalise se program is voorsien deur Prof. Murray van Stellenbosch Universiteit en is uitgevoer deur 'n "IBM-XT Persoonlike Rekenaar". Die data wat gebruik is, word in Tabel 5.4 weergegee. Die analise berus op ooreenkoms tussen die spesies se ninhidrienpositiese verbindings, asook relatiewe konsentrasies daarvan. Sewe-en-dertig van die 48 verbindings is aangewend, uitgedruk in 'n arbitrêre skaal van 0, 1 en 2 (in vergelyking met die 0 - 9 skaal in Tabelle 4.2 en 5.2, is 0 = 0, 1 = 1 - 4 en 2 = 5 - 9). In albei skale dui "0" 'n papierchromatografies onopspoorbare hoeveelheid aan. Die droë massa-ekwivalent was, soos ook in Tabelle 4.2 en 5.2, telkens 500 g.

Die een-en-veertig spesies is in naasverwante groepe van twee, vier, agt, sestien en twee-en-dertig ingedeel, met 'n vyfde agtledige groep apart. Een spesie, *P. scabra*, is afsonderlik gegroep, waarskynlik vanweë sy groot verskil met die ander (Figuur 5.2). Volgens die indeling van Rourke val hy onder die Subacaulos, waarvan nog twee voorbeelde, *P. denticulata* en *P. piscina*, gedoen is. Laasgenoemde twee is egter met spesies van die naasverwante groepe Speciosae (*P. laurifolia*) en Ligulatae (*P. obtusifolia*) ingedeel.

Die volgende groepe word onderskei:

Tabel 5.5 - Agtledige groepering van die 41 *Protea* spp. deur die rekenaargroeperingsanalise.

| | | | |
|----------|--|----------|--|
| Groep 1: | <i>P. amplexicaulos</i> <i>P. cordata</i> <i>P. acaulos</i> <i>P. cynaroides</i> <i>P. magnifica</i> <i>P. nerifolia</i> <i>P. tenax</i> <i>P. speciosa</i> | Groep 4: | <i>P. burchellii</i> <i>P. compacta</i> <i>P. lorifolia</i> <i>P. roupelliae</i> <i>P. obtusifolia</i> <i>P. piscina</i> <i>P. gagedi</i> <i>P. rupicola</i> |
| Groep 2: | <i>P. longifolia</i> <i>P. pudens</i> <i>P. stokoei</i> <i>P. mundii</i> <i>P. susannae</i> <i>P. grandiceps</i> <i>P. denticulata</i> <i>P. laurifolia</i> | Groep 5: | <i>P. aristata</i> <i>P. sulphurea</i> <i>P. aurea</i> <i>P. welwitschii</i> <i>P. angustata</i> <i>P. lepidocarpodendron</i> <i>P. nitida</i> <i>P. caffra</i> |
| Groep 3: | <i>P. comptonii</i> <i>P. laetans</i> <i>P. coronata</i> <i>P. eximia</i> <i>P. glabra</i> <i>P. lacticolor</i> <i>P. repens</i> <i>P. rubropilosa</i> | Groep 6: | <i>P. scabra</i> |



Figuur 5.2 - Rekenaargroepeeringsanalise van 41 Suid Afrikaanse verteenwoordigers van Protea, op grond van 37 tweedimensioneel papierchromatografies opspoorbare ninhidrienpositiese verbindings.

Interessante ooreenkomste met Rourke se indeling is egter gevind (vergelyk Figuur 5.2 en Tabel 5.6):

P. amplexicaulos en *P. cordata*: Hierdie twee spesies was die enigste verteenwoordigers van die hoogs-ontwikkelde groep Hypocephalae wat ondersoek is.

P. acaulos en *P. cynaroides*: *P. cynaroides* se posisie op die "gevorderdheidsleer" is onseker. Sommige kenners beskou hom as primitief, terwyl ander weer gevorderdheid in hom raaksien. Hy is dan ook die enigste protea met 'n blaarsteel en die alleenverteenwoordiger van die groep Protea. Dis baie interessant dat die analise hom saam met *P. acaulos* groepeer. Laasgenoemde en *P. angustata* is die enigste twee verteenwoordigers van die groep Microgeanthae wat ondersoek is. *P. angustata* word egter ten spyte van 'n groot verskil, saam met *P. lepidocarpodendron* van die Seciosae ingedeel. Volgens Rourke (mondelinge mededeling) is die Microgeanthae (*P. acaulos*) nabyverwant aan die Crateriflorae, wat moontlik oorsprong aan die hoogs ontwikkelde Hypocephalae gegee het. Soos reeds hierbo genoem, behoort *P. amplexicaulos* en *P. cordata* aan laasgenoemde groep. Dui die feit dat die paar *P. acaulos* en *P. cynaroides* saam met die paar van die Hypocephalae ingedeel word, op gevorderdheid vir *P. cynaroides*?

P. magnifica en *P. neriiifolia*: Albei behoort aan die groep Speciosae.

P. pudens en *P. longifolia*: Volgens Rourke (Rourke 1980) het *P. pudens* waarskynlik uit *P. longifolia* ontwikkel, a.g.v. 'n grondaanpassing. Die enigste natuurlike habitat van eersgenoemde is 'n smal strook van tien by drie kilometer in die Suid-Kaap tussen Elim en Bredasdorp. Die grondsoort is 'n swaar klei, gevorm uit Bokkeveldskalie met 'n bymengsel van waaisand en *P. pudens* is waarskynlik die enigste protea wat natuurlik in hierdie grond aard.

Die verspreidingsgebied van *P. longifolia* omring hierdie kleistrook en bestaan uit dagsome van Tafelbergsandsteen. Die feit dat talle natuurlike basters van die twee op die grens tussen die grondsoorte voorkom, dui op genetiese verwantskap.

Die agtledige groep *P. longifolia*, *P. pudens*, *P. stokoei*, *P. mundii*, *P. susannae*, *P. grandiceps*, *P. denticulata* en *P. laurifolia*: Die Ligulatae het waarskynlik oorsprong gegee aan die meer ontwikkelde groep Subacaules, maar is ook baie naby verwant aan die Speciosae (Rourke, mondelinge mededeling). Uit bogenoemde agt spesies is dit slegs *P. mundii* (Exsertae) wat nie aan een van hierdie

Tabel 5.6 - Infrageneriese klassifikasie van *Erotea* in Suidelike Afrika (Rourke, skriftelike mededeling).

| | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Groep Lasiocéphalae Stapf | Groep Crinitae Rourke | Groep Ligulatae Stapf |
| <i>E. calfra</i> | <i>E. foliosa</i> | <i>E. burchellii</i> |
| <i>E. dracomontana</i> | <i>E. intonsa</i> | <i>E. compacta</i> |
| <i>E. glabra</i> | <i>E. montana</i> | <i>E. eximia</i> |
| <i>E. inopina</i> | <i>E. tenax</i> | <i>E. longifolia</i> |
| <i>E. nitida</i> | <i>E. vestitae</i> | <i>E. obtusifolia</i> |
| <i>E. subulens</i> | | <i>E. pubens</i> |
| <i>E. ovata</i> | | <i>E. cupelliae</i> |
| <i>E. cupicola</i> | | <i>E. susanna</i> |
| <i>E. simplex</i> | | |
| | Groep Microgeanthae Stapf | |
| Groep Patentiflorae Beard | <i>E. acaulos</i> | Groep Speciosae Stapf |
| <i>E. comptonii</i> | <i>E. angustata</i> | <i>E. coronata</i> |
| <i>E. curvata</i> | <i>E. convexa</i> | <i>E. grandiceps</i> |
| <i>E. laetans</i> | <i>E. laevis</i> | <i>E. holosericea</i> |
| <i>E. cybroeiflora</i> | <i>E. revoluta</i> | <i>E. laurifolia</i> |
| | | <i>E. lepidocarpodendron</i> |
| Groep Lasiocéphalae Stapf | Groep Crateriflorae Rourke | <i>E. lorifolia</i> |
| <i>E. gauderi</i> | <i>E. effusa</i> | <i>E. magnifica</i> |
| <i>E. helwitschii</i> | <i>E. namaquana</i> | <i>E. oerliifolia</i> |
| | <i>E. pendula</i> | <i>E. speciosa</i> |
| | <i>E. recurvata</i> | <i>E. storkii</i> |
| | <i>E. sulphurea</i> | |
| | | Groep Obvallatae Stapf |
| Groep Proteae | Groep Pinifoliae Stapf | <i>E. caespitosa</i> |
| <i>E. cyathoides</i> | <i>E. acuminata</i> | |
| | <i>E. canaliculata</i> | Groep Subcaules (Meisn.) Rourke |
| Groep Paracynaroideae Stapf | <i>E. neoa</i> | <i>E. aspera</i> |
| <i>E. cryophila</i> | <i>E. ptyophylla</i> | <i>E. denticulata</i> |
| <i>E. erulosa</i> | <i>E. scolymcephala</i> | <i>E. lorea</i> |
| <i>E. pleurolobula</i> | <i>E. witzemberglana</i> | <i>E. discina</i> |
| <i>E. scolopendriifolia</i> | | <i>E. castilionifolia</i> |
| | Groep Parviflorae Rourke | <i>E. scabra</i> |
| Groep Melliferae Stapf | <i>E. mucronifolia</i> | <i>E. scorizoverifolia</i> |
| <i>E. aristata</i> | <i>E. ovata</i> | |
| <i>E. lanceolata</i> | | Groep Exsertae Stapf |
| <i>E. ceras</i> | Subgenus Hypocephalae (Meis) | <i>E. aurea</i> |
| | Groep Hypocephalae | <i>E. lactiglor</i> |
| | <i>E. aenlexicaulos</i> | <i>E. mundii</i> |
| | <i>E. cordata</i> | <i>E. punctata</i> |
| | <i>E. desuccens</i> | <i>E. subvestita</i> |
| | <i>E. humiflora</i> | <i>E. venusta</i> |
| | <i>E. subulifolia</i> | |

drie naasverwante groepe behoort nie.

P. comptonii en *P. laetans*: Die saamgegroepeerdes behoort aan die primitiewe groep Patentiflorae. 'n Derde verteenwoordiger was *P. rubropilosa* wat, interessant genoeg, saam met *P. regens* van die Melliferae ingedeel is. Albei bevat dan ook die besondere basiese verbinding 10, wat in slegs vyf (hoogstens agt) uit die 41 ondersoekte spesies opgespoor is (verwys na 4.2.8).

P. coronata en *P. eximia*: Behoort aan die baie nabyverwante Speciosae en Ligulatae.

P. burchellii en *P. compacta*: Is van die groep Ligulatae. Volgens Rourke (1980) is *P. obtusifolia* die waarskynlike naasverwant van *P. compacta*. Eersgenoemde is egter saam met *P. piscina* van die naasverwante Subacaulae ingedeel.

P. lorifolia en *P. roupelliae*: Is weer eens verteenwoordigers van die groepe Speciosae en Ligulatae.

P. gaguedi en *P. rupicola*: Albei behoort aan 'n primitiewe groep: eersgenoemde aan die Lasiocephalae en die ander aan die Leiocephalae.

P. nitida en *P. caffra*: Ten spyte van 'n groot verskil, word hierdie twee verteenwoordigers van die primitiewe Leiocephalae tog saam ingedeel.

Daar was 'n paar faktore wat die groeperingsanalise kon beïnvloed. Seisoenverskille is die groot faktor, veral die blomseisoen. Dit sou dus nie help om al die materiaal op een dag te versamel nie, aangesien blomtyd tussen die spesies verskil. Vars materiaal behoort ook so gou moontlik geëkstraheer te word (kyk hoofstuk 2) en daarom het versameling oor vier maande geskied. Indien materiaal in dieselfde stadium van blom gesny is, sou seisoene van die jaar (winter, somer, ens.) waarskynlik weer 'n invloed gehad het.

Seisoenverskille het dus waarskynlik konsentrasies van verbindinge "buite verband" geruk, sodat dit nie 'n groot rol in die analise gegee is nie (skaal 0 - 2, i.p.v. 0 - 5 of 0 - 9 - Tabel 5.4). Konsentrasies is boonop geskat vanaf tweedimensionele chromatogramme, terwyl sommige verbindinge in onopspoorbare hoeveelhede, dalk die indeling sou verander.

Verder is triptofaan en sewe onbekende verbindinge wat slegs in omwindselblare en blomme papierchromatografies opgespoor is (verbindinge 19, 23, 30, 43, 44, 48 en 49) en wat definitief met die blomseisoen te korreleer is, uitgeskakel. Verbindinge wat later in grootskaalse ekstrakte van dieselfde

spesie (bv. *P. rubropilosa*, *P. glabra* en *P. aurea*) opgespoor is, is ook nie gebruik nie (verbindings 45, 46 en 47), omdat van hulle moontlik ook by ander spesies voorgekom het teen konsentrasies te laag om papierchromatografies waar te neem.

Meer spesies sou 'n betroubaarder analise gelewer het. 'n Spesifieke naasverwant wat nie ondersoek is nie, sal met 'n ander spesie in sy plek vervang word. Waar een spesie per groep (van Rourke), bv. *P. tenax*, *P. acaulos* en *P. sulphurea*, geanaliseer is, is dit outomaties met 'n ander geassosieer.

Seisoensvariasie ten spyte, wil dit voorkom asof daar tog chemotaksonomiese waarde in 'n vergelyking van soorte se vrye aminosure lê. Papierchromatografie behoort gekombineer te word met 'n sensitiewer kwantitatiewe metode soos outomatiese aminosuuranalise. In die geval van *Protea* blyk die vrye aminosuurkonsentrasie egter baie laag (Figure 4.5 en 4.10) te wees t.o.v. ander plantgroepe (bv. Eloff, 1968), sodat aminosure moontlik nie 'n goeie chemotaksonomiese maatstaf in hierdie genus is nie.

GEVOLGTREKKINGS

Die meeste ninhidrienpositiewe verbindings het onder die toestande wat gebruik is, aan kationuitruilhars geadsorbeer (by pH 5,5 - 6,5). Die groot volume water waarmee die kolommetjies gewas is om so veel as moontlik van die gekleurde verbindings te verwyder, het gelei tot die waarneming dat 'n gedeelte van veral die meer suur aminosure van die kolom afgeelueer is. Die aantal ninhidrienpositiewe verbindings wat aan kationhars adsorbeer, kan aansienlik verminder word (vir beter eluaatskeiding), deur die aromatiese fraksie eers met geaktiveerde koolstof te onttrek, gevolg deur anioonuitruiling onder toestande waar slegs die suur aminosure geadsorbeer word en laastens kationuitruiling.

Ammoniumhidroksied is om verskeie redes 'n beter elueermiddel as soutsuur vir kationuitruilchromatografie van protea-ekstrakte en asynsuur lewer goeie resultate met anioonuitruiling.

Polifenole is waarskynlik die belangrikste groep verbindings wat chromatografering (veral papier- en ionuitruilchromatografie), isolering en karakterisering van vrye ninhidrienpositiewe verbindings in Protea belemmer.

Verwydering van hierdie "ongewensde" verbindings is met geaktiveerde koolstofadsorpsie, polivinilpirrolidoonneerslag, waterstofperoksiedoksidering, suurpolimerisering, jelchromatografie, temperatuurbehandeling en ionuitruiling gekoppel met tydsverloop (veroudering van die ekstrakt), teweeggebring.

Ionuitruiling (veral kationuitruiling) was die mees suksesvolle ekstraksuiweringsmetode en ander metodes is gewoonlik direk daarvoor of daarna toegepas. Feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings adsorbeer aan kationhars (in hierdie geval DOWEX 50W-X8 (H⁺) 200 - 400 maat), terwyl die meeste van hierdie probleemverbindings in die viskose neutrale en anioniese watereluaat beland. Die anioniese fraksie (ninhidrienpositiewe sowel as ninhidriennegatiewe verbindings) in laasgenoemde eluaat is relatief klein. Wanneer ekstrakte of isolate vir 'n tyd gestoor word, vind daar veranderings plaas wat daartoe lei dat relatief meer ninhidriennegatiewe verbindings die kationkolom verlaat as wanneer die monster jonger is.

Geaktiveerde koolstofadsorpsie was waarskynlik die mees suksesvolle suiweringsmetode naas ionuitruiling, in die sin dat dit nie net 'n groot gedeelte van die "ongewensde" verbindings uit ekstrakte onttrek het nie, maar terselfdertyd ook die aromatiese ninhidrienpositiewe fraksie, sodat laasgenoem-

de dan van die grootste hoeveelheid ninhidrienpositiewe verbindings geskei is.

Polivinielpirrolidoonneerslag kon net in sommige gevalle toegepas word, omdat spesies verskil t.o.v. verbindings wat neergeslaan kan word met PVP. Waterstofperoksiedoksidase het die nadeel gehad dat die oplossing se temperatuur sterk gestyg het en/of dat die pH gedaal het, wat tot die afbreek van labiele aminosure of peptiede kan lei.

Sommige verbindings (ook ninhidrienpositiewes) reageer met silika- en trisakriljel, sodat jelchromatografie slegs gebruik is wanneer verbindings wat gesuiwer moes word, se gedrag t.o.v. die jel bekend was. Party isolate het gekleurde bande bo en onder in houers gevorm gedurende afkoeling en bevriësing en deur hierdie pigment dan uit die oplossing te verwyder, is 'n baie suiwerder isolaat verkry.

Arginien en etanolamien isoleer die suiwerste (95 - 100% van die fraksies waarin hierdie verbindings voorkom, bevat geen ander ninhidrienpositiewe verbindings nie) met gradiëntelue-ring aangewend op die kationhars, terwyl aspartiensuur en glutamiensuur die beste (35% van die fraksies) met anioonuitruiling gesuiwer is. In *P. rubropilosa* kom die basiese onbekende verbinding 10 voor wat ook in ten minste 95% van die fraksies suiwer met gradiëntelue-ring op kationhars verkry is, asook die peptied, verbinding 47, wat met anioonuitruiling meer as 95% onvermeng herwin kon word. Laasgenoemde twee verbindings het die mees basiese (verbinding 10) en suurste (verbinding 47) eienskappe op anioonuitruilhars getoon. In al die gevalle moes anioonuitruiling egter met ander metodes (bv. papier-, jelchromatografie en waar moontlik laastens kristallisering) gekombineer word om die spesifieke verbindings suiwer (volgens papierchromatografie, outomatiese aminosuuranalise en infrarooispektrofotometrie) te verkry.

Protea bevat relatief min vrye ninhidrienpositiewe verbindings te oordeel aan literatuur oor ander groepe buite die familie. *Protea* groei op stikstofarme grond en aangesien aminosure belangrike stikstofhoudende verbindings in plante is, mag basiese aminosure soos arginien en die onbekende ninhidrienpositiewe verbinding 10, wat sterker basiese eienskappe as arginien besit en waarskynlik 'n groter aantal stikstofatome sal hê as neutrale of suur aminosure, veral 'n groot rol in die stikstofmetabolisme van hierdie plante speel.

Dis baie interessant dat 4-aminobottersuur in besonder hoë konsentrasies in feitlik uitsluitlik soorte van die hoë sommerreënvalgebiede voorkom, nl. *P. caffra*, *P. comptonii*, *P. rubropilosa* en *P. welwitschii* (Tabel 5.2). Die besonder

basiese verbinding 10, wat in slegs vyf (hoogstens agt) spesies opgespoor is, kom in drie van eersgenoemde vier spesies voor. Die ander twee (van die vyf) spesies waarin verbinding 10 ook definitief voorkom, *P. lepidocarpodendron* en *P. repens*, bevat ook 4-aminobottersuur in beduidende konsentrasies. Daar mag dus 'n verband tussen 4-aminobottersuur en verbinding 10 bestaan (die moontlikheid bestaan dat die afbreekproduk wat deur die aminosuuranaliseerder in 'n aanvanklik suiwer isolaat van verbinding 10 opgespoor is, 3-aminobottersuur is). Twee ander moontlike identiteite van die afbreekproduk volgens aminosuuranaliseerderretensietye is die van valien en sitrullien. Indien dit sitrullien is, mag dit wees dat verbinding 10 met die ornitiensiklus assosieer. Die feit dat hierdie onbekende verbinding uitsluitlik in primitiewe proteas (en ook broodboomsaad wat ondersoek is) voorkom, beteken dalk dat dit 'n kenmerk van primitiewe plante is, of dan dat primitiewe plante hoër konsentrasies daarvan bevat.

'n Ander interessante onbekende is verbinding 3, wat moontlik 2(metileensiklopropiel)glisien kon wees. Papierchromatografie het egter getoon dat dit nie laasgenoemde verbinding is nie, maar moontlik nou verwant mag wees volgens die besondere ninhidrienkleur. Dit is in 10 spesies, wat almal in die Kaapprovinsie voorkom, opgespoor. Aanvanklik is dit in die rooikleurige variant van *P. aurea* gevind, maar nie in die rooikleuriges nie. Dit het gelyk asof die aanwesigheid daarvan met die omwindselblaarkleur verband hou, maar die teendeel is bewys toe dieselfde kleurvariante van *P. lacticolor*, *P. neriifolia* en *P. repens* ondersoek is.

Verbinding 46 word oor 'n relatief lang tyd van die aminosuuranaliseerder se kolom afgeëluëer, wat kwantitatiewe resultate mag beïnvloed, deurdat die integreerder in sommige gevalle deelopervlakke van verbinding 46 se piek by die van ander verbindings, wat gedurende dieselfde tyd die kolom verlaat, tel, terwyl verbinding 46 glad nie geïntegreer word nie. Outomatiese aminosuuranalise blyk hieruit nie betroubaar te wees as die enigste metode vir kwantitatiewe werk en identiteitsbepaling van ninhidrienpositiewe verbindings nie, maar behoort gerugsteun te word deur 'n ander metode soos papierchromatografie.

Sommige peptiede adsorbeer ook aan ioonuitruilhars, soos die sterk suur verbinding 47 wat heel laaste van alle anioniese ninhidrienpositiewe verbindings die anioonhars verlaat. Hierdie onbekende is hittelabel en dra moontlik by tot sommige aminosure se konsentrasie in die isolaat. Kwantitatiewe resultate mag dus deur sulke peptiede beïnvloed word.

Agt-en-veertig vrye ninhidrienpositiewe verbindings (waarvan 24 m.b.v. ko-chromatografie met standarde op papier en die

outomatiese aminosuuranaliseerder geïdentifiseer is) is in een-en-veertig Protea spesies opgespoor. Vyf-en-veertig daarvan was in ekstrakmonsters van 500 mg droë massa (of minder) op ontwikkelde tweedimensionele papierchromatogramme sigbaar. Die ander drie is gedurende grootskaalse isolering opgespoor.

Ses aminosure is in kristalvorm geïsoleer en hulle identiteit is d.m.v. ko-chromatografie op papier en die outomatiese aminosuuranaliseerder, asook infrarooispektrofotometrie met hulle outentieke standaarde, bepaal. 'n Sewende geïdentifiseerde isolaat was etanolamien wat in waterige medium bevries is en waarvan die identifikasie slegs deur ko-chromatografie op papier en die aminosuuranaliseerder gedoen is, terwyl die besondere oranjebruin ninhidrien/kollidienkleurontwikkeling daarvan ook tot 'n mate identiteit bevestig het.

Vier geïsoleerde ninhidrienpositiewe verbindings kon nie geïdentifiseer word nie. Suiwerheid van die 11 isolate is d.m.v. ko-chromatografie met standaarde op papier en die aminosuuranaliseerder bepaal. Die gekristalliseerde verbinding is ook d.m.v. infrarooispektrofotometrie vir suiwerheid getoets en hulle spesifieke optiese rotasie dui aan dat hulle van die laevo-vorm is.

Verbindings kon maklik op mikroskaal geïsoleer word deur die papierchromatogram eers te loop, dan met ninhidrien te ontwikkel (minder as 10% van die verbinding reageer in die geval met ninhidrien) en die kol wat die verbinding bevat, uit te knip en af te elueer. Hierdie isolering is aangewend om spesifieke verbindings se retensietipe op die aminosuuranaliseerder te bepaal.

Glutamiensuur en waarskynlik onbekende 46 was in alle ondersoekte gevalle in die hoogste konsentrasies teenwoordig, behalwe in die geval van P. rubropilosa, waar die arginieninhoud hoër was. Alhoewel verbinding 46 in sulke hoë konsentrasies teenwoordig was, is dit nie in die groeperingsanalise gebruik nie, omdat dit slegs in grootskaalse ekstrakte opgespoor is (of op eendimensionele papierchromatogramme waar die monster oorbelaai is) en nie sigbaar vertoon het op ontwikkelde tweedimensionele papierchromatogramme nie.

Serien, 4-aminobottersuur, aspartiensuur, glutamiensuur en alanien was in meer as 75% van die ondersoekte spesies se loofblare in relatief hoë konsentrasies teenwoordig (tweedimensioneel papierchromatografies opspoorbaar), terwyl prolien, leusien/isoleusien, fenielalanien en valien in kleiner hoeveelhede voorgekom het. Tiro sien, etanolamien, histidien, asparagien, arginien, ornitien, 3-alanien, fosfoserien en waarskynlik 2,3-diaminopropioonsuur en sistien (laasgenoemde twee se identiteit is onseker) is in minder as 25% van die

spesies wat ondersoek is, opgespoor.

Seisoensvariasie, waarvan blomseisoen die belangrikste is, het waarskynlik die grootste invloed op die "chemotaksonomiese betroubaarheid" van vrye ninhidrienpositiese verbindings. Dit ten spyte, asook die feit dat hier slegs van papierchromatografie as kwalitatiewe en kwantitatiewe maatstaf (identiteit en konsentrasie daardeur bepaal) vir die groeperingsanalise gebruik gemaak is, is daar ooreenkomste met bestaande morfologies-taksonomiese indeling gevind. In die geheel blyk dit egter dat vrye aminosure in die genus Protea nie naastenby dieselfde waarde het as wat al in chemotaksonomiese ondersoeke met ander chemotaksonomiese parameters in ander taksons, opgemerk is nie. Die relatief lae konsentrasie vrye aminosure in Protea is waarskynlik 'n sterk bydraende faktor wat daartoe lei dat die chemotaksonomiese waarde van hierdie groep verbindings vir die genus bevraagteken word.

Die volgende geleenthede vir navorsing het uit hierdie resultate na vore gekom en dit sal verdere aandag kry.

Nadat bykomstige resultate ingewin is en vergelyk is met ander chemiese data m.b.t. Protea, bv. flavonoïde (Scott, 1985), gaan die groeperingsanalise herhaal word.

Ongeïdentifiseerde verbindings wat suiwer geïsoleer is, gaan chemies gekarakteriseer word. Verbinding 10 geniet hier veral prioriteit. Indien dit 'n verbinding is wat nog nie vantevore in plante aangetref is nie, gaan die metabolisme daarvan ondersoek word in plante waarin dit voorkom.

Proteas is aangepas om op stikstofarme grond te groei. Wortelte vergroot die absorpsieoppervlak van wortels, wat ook 'n verhoging in die stikstofopnametempo mag hê. Aanpassings in die metabolisme behoort interessant te wees en aminosure speel waarskynlik 'n groot rol daarin. 'n Ondersoek na an- en kataboliese aktiwiteit in hierdie plante se stikstofmetabolisme mag interessante aanpassings onthul.

Proteas groei in stikstofarme grond en daarom kan 'n mens verwag dat die plant dit nie kan bekostig om stikstof op onbelangrike verbindings te verspil nie. Stikstofhoudende verbindings behoort dus 'n belangrike biologiese funksie te vervul en die aminosure wat wel voorkom behoort 'n belangrike biologiese aktiwiteit te hê. Vrye aminosure mag bv. plante teen patogene organismes beskerm (Bell, 1981), sodat die plantpatoloog uit hierdie oogpunt mag baat by bestaande kennis van die vrye aminosuurvoorkoms, asook toekomstige meer uitgebreide ondersoeke. Daar gaan gepoog word om moontlike korrelasies tussen siekteweerstand en aminosuurkonsentrasie te bepaal. Dit sal ook interessant wees om die invloed van

infeksie deur patogene organismes op aminosuurmetabolisme na te gaan. Voorlopige resultate wat alreeds behaal is (eie resultate), dui daarop dat hierdie 'n vrugbare studieveld kan wees.

SAMEVATTING

Die motivering vir hierdie studie was tweërlei van aard, nl. om bykomstige kennis oor vrye aminosuursamestelling van Protea in te win en die chemotaksonomiese waarde daarvan te bepaal.

Vars plantmateriaal is so gou moontlik met metanol - chloroform - water geëkstraheer en die lipofiele fraksie is met faseskeiding, deur nog chloroform en water by te voeg, onttrek. Isolate vir papierchromatografie is deur kleinskaalse ionuitruiwing (maksimum 60 g droë massa en monster-pH 5,5 - 6,5) op kation- (DOWEX 50W-X8 (H⁺) 200 - 400 maat) en anioonhars (DOWEX 1-X8 (CH₃COO⁻) 100 - 200 maat) voorberei, terwyl die neutrale fraksie ook gechromatografeer is indien dit ninhidrienpositief getoets het. Katione is met NH₄OH afgeelueer (soms HCl) en anione met CH₃COOH, terwyl neutrale verbindings in beide gevalle met H₂O afgewas is. Gradiënt-eluering met dieselfde elueermiddels vanaf hierdie harse is vir grootskaalse (70 - 600 g droë massa) isolering gebruik. Feitlik alle ninhidrienpositiewe verbindings is deur die kationuitruiwhars gebind.

Dit blyk dat veral verbindings wat met FeCl₃ reageer (polifenole, waarskynlik hoofsaaklik tanniene) isolering en karakterisering van aminosure bemoeilik. Metodes om van hierdie inhiberende verbindings ontslae te raak, behels geaktiveerde koolstofadsorpsie, polivinielpirrolidoonneerslag, waterstofperoksiedoksidase, suurpolimerisering, jelchromatografie, temperatuurbehandeling en tydafhanklike ionuitruiwing.

Die meeste van hierdie "ongewenste" ninhidriennegatiewe verbindings is deur ionuitruiwing van die ninhidrienpositiewes geskei, terwyl verouderde ekstrakte nog beter skeiding tussen die twee groepe verbindings gelewer het. Naas ionuitruiwing was geaktiveerde koolstofadsorpsie die suksesvolste en boonop is die aromatiese ninhidrienpositiewe groep van die res deur hierdie proses geskei. Polivinielpirrolidoonneerslag kon net in sommige spesies se geval aangewend word, terwyl waterstofperoksiedoksidase met hitte- en/of suurvrystelling gepaard gegaan het, wat moontlik tot verandering in die struktuur van labiele aminosure en peptiede kon lei. Sommige verbindings (ook ninhidrienpositiewes) reageer met silika- en trisakriljel, sodat jelchromatografie slegs gebruik is wanneer verbindings wat gesuiwer moes word, se gedrag t.o.v. die jel bekend was. Isolate vorm partykeer pigmentringe bo en onder in houers gedurende bevriesing en deur hierdie bande uit die oplossings te verwyder, is baie suiwerder isolate verkry.

Een- en tweedimensioneel dalende papierchromatografie is primêr aangewend vir identifisering van verbindings, maar goeie aanduiding van konsentrasies kon ook daaruit afgelei word. Outomatiese aminosuuranalise het as kwantitatiewe maatstaf gedien, en retensietye het identiteit deur papierchromatografie bepaal, gerugsteun.

Sewe bekende (identiteit bevestig deur ko-chromatografie van standarde op papier en die outomatiese aminosuuranaliseerder, asook met infraroispektrofotometrie) en vier onbekende ninhidrienpositiewe verbindings is suiwer geïsoleer. Drie onbekende ninhidriennegatiewe fenoliese verbindings, wat in baie hoë konsentrasies teengekom is, is gekristalliseer. Die infraroispektrums van suiwer geïsoleerde gekristalliseerde bekende verbindings (aspartiensuur, glutamiensuur, arginien, asparagien, tirosien en fenielalanien), waarvan die outentieke standarde beskikbaar was, het die suiwerheid en finaal die identiteit bevestig. Die spesifieke optiese rotasie van laasgenoemde verbindings, behalwe die van fenielalanien wat nie bepaal is nie, het aangetoon dat hulle laevo-aminosure was.

Altesaam 48 ninhidrienpositiewe verbindings is in 41 spesies van *Protea* papierchromatografies opgespoor (waarvan drie, verbindings 45, 46 en 47, slegs gedurende grootskaalse isolering opgespoor is). Interessante onbekende verbindings is veral 3, 10 en 46, maar ook 11, 12, 18, 39, 45 en 47.

Daar bestaan orgaan-, habitat- en seisoenverskille in die voorkoms van vrye ninhidrienpositiewe verbindings en blomseisoenverskille is waarskynlik hoofsaaklik verantwoordelik vir "chemotaksonomiese onbetroubaarheid" van die groeperingsanalise. Die relatief lae konsentrasie vrye aminosure in *Protea* lei daartoe dat die gebruik daarvan as chemotaksonomiese maatstaf bevraagteken kan word. Ooreenkomste met bestaande erkende indeling, gebaseer op morfologiese kenmerke, is nie-teenstaande gevind.

SUMMARY

The motivation of this study was two-fold, viz. to gain additional knowledge of free amino acid composition of *Protea* and to determine its chemotaxonomic significance.

Fresh plant material was extracted as rapidly as possible with methanol - chloroform - water and the lipid fraction removed by phase separation, achieved by the further addition of chloroform and water. Isolates for paper chromatography were prepared by small-scale ion-exchange (maximum 60 g dry mass and sample pH 5,5 - 6,5) on cation - (DOWEX 50W-X8 (H⁺) 200 - 400 mesh) and anion-resin (DOWEX 1-X8 (CH₃COO⁻) 100 - 200 mesh), while the neutral fraction was also chromatographed if it reacted positively when tested with ninhydrin. Cations were eluted with NH₄OH (sometimes HCl) and anions with CH₃COOH, while neutral compounds were washed off with H₂O in both cases. Gradient elution with the same eluants were carried out, using these resins, for large-scale (70 - 600 g dry mass) isolation. Almost all ninhydrin-positive compounds bound to the cation exchange resin.

It appears that compounds reacting with FeCl₃ (polyphenols, apparently mainly tannins) hinder the isolation and characterisation of amino acids. Methods for removal of these interfering compounds include activated charcoal adsorption, PVP precipitation, hydrogenperoxide oxidation, acid polymerisation, gel chromatography, temperature treatment, and time dependent ion exchange.

Most of these undesirable ninhydrin-negative compounds were separated from the ninhydrin-positive ones by ion exchange, while aged extracts gave even better separation between the two groups of compounds. Activated charcoal adsorption was also successful and in addition separated aromatic and non-aromatic ninhydrin-positive compounds. PVP precipitation could only be applied to certain species, while hydrogenperoxide oxidation accompanied by heat- and/or acid-liberation, possibly caused a change in the structure of labile amino acids and peptides. Certain ninhydrin-positive compounds react with silica and trisacryl gel, so that gel chromatography could only be used when the behaviour of the compounds to be purified with regard to the gel was known. Isolates sometimes formed pigment bands during freezing, and by removing these bands from the solutions, much purer isolates were obtained.

One- and two-dimensional descending paper chromatography were mainly applied for identification of compounds, and gave some indication of their concentration. Automatic amino acid

analysis served as a quantitative measure, and provided confirmation of the identities of individual amino acids as determined by paper chromatography.

Seven known (identities determined by co-chromatography of standards on paper and the automatic amino acid analyser, as well as by infra-red spectrometry) and four unknown ninhydrin-positive compounds were isolated in a pure form. Three unknown ninhydrin-negative phenolic compounds, that were detected in very high concentrations, were crystallised. Infra-red spectra of pure, isolated, crystallised, known compounds (aspartic acid, glutamic acid, arginine, asparagine, tyrosine and phenylalanine) for which authentic standards were available, confirmed their purity and finally their identity. The specific optical rotation of the above-mentioned compounds, apart from phenylalanine which was not determined, showed that they were laevo-rotatory.

Altogether 48 ninhydrin-positive compounds were detected in 41 species of Protea by paper chromatography (of which three, compounds 45, 46 and 47, were detected only during large-scale isolation). Interesting unknown compounds were especially 3, 10 and 46 but also 11, 12, 18, 39, 45 and 47.

Patterns of free ninhydrin-positive compounds appear to vary with season, habitat and plant organ used, giving rise to the apparent "chemotaxonomic" unreliability of the cluster analysis. The relatively low concentration of free amino acids in Protea questions their usefulness as chemotaxonomic parameters. Nevertheless, similarities with existing classification, based on morphological characteristics, were found.

DANKBETUIGINGS

Prof. J.N. Eloff vir leiding as toesighouer en beskikbaarstelling van fasiliteite.

Kollegas D.S. Prosch, L.W. Powrie en G. Scott vir samewerking en hulp.

Personeel van Kirstenbosch Botaniese Tuin vir verdraagsaamheid, hulp en fasiliteite.

Die Plantkunde- en Chemiedepartement van Universiteit Kaapstad vir fasiliteite en inligting.

=====

LITERATUURVERWYSINGS

- Andreae, W.A. en Good, N.E., 1955. The Formation of Indole-acetylaspartic Acid in Pea Seedlings. *Plant Physiol.* 30: 380 - 382.
- Aronow, L. en Kerdel-Vegas, F., 1965. Seleno-Cystathionine, a Pharmacologically Active Factor in the Seeds of *Lecythis ollaria*. *Nature (London)* 205(4977): 1185 - 1186.
- Baker, I. en Baker, H.G., 1976. Analyses of Amino Acids in Flower Nectars of Hybrids and their Parents, with Phylogenetic Implications. *New Phytol.* 76: 87 - 98.
- Beard, J.S., 1959. The Origin of African Proteaceae. *J. S. Afr. Bot.* 25: 231 - 235.
- Bell, E.A., 1963. A New Amino-Acid, γ -Hydroxyhomoarginine, in *Lathyrus*. *Nature (London)* 199: 70 - 71.
- Bell, E.A., 1971. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Comparative Biochemistry of Non-Protein Amino Acids. Academic Press, London.
- Bell, E.A., 1981. The Non-Protein Amino Acids Occurring in Plants. *Progress in Phytochemistry* 7: 171 - 196.
- Bell, E.A. en Fellows, L.E., 1966. Occurrence of S-Hydroxy-L-tryptophan as a Free Plant Amino-acid. *Nature (London)* 210(5035): 529.
- Bell, E.A., Nulu J.R. en Cone, C., 1971. L-Dopa and L-3-Carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a New Imino Acid, from Seeds of *Mucuna mutisiana*. *Phytochemistry* 10: 2191 - 2194.
- Bell, E.A. en O'Donovan, J.P., 1966. The Isolation of α - and γ -Oxalyl Derivatives of α, γ -Diaminobutyric Acid from Seeds of *Lathyrus latifolius*, and the Detection of the α -Oxalyl Isomer of the Neurotoxin α -Amino- β -oxalylaminopropionic Acid which Occurs together with the Neurotoxin in this and Other Species. *Phytochemistry* 5: 1211 - 1219.
- Bell, E.A. en Tirimanna, A.S.L., 1963. Occurrence of γ -Hydroxyarginine in Plants. *Nature (London)* 197(4870): 901 - 902.

- Bieleski, R.L., and Turner, N.A., 1966. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography. *Analytical Biochemistry* 17: 278 - 293.
- Brandner, G. en Virtanen, A.I., 1963. Isolierung und Synthese von γ -Hydroxy-L-glutamin. *Acta Chem. Scand.* 17: 2563 - 2565.
- Burroughs, L.F., 1957. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid: a New Amino-Acid in Ferry Pears and Cider Apples. *Nature (London)* 179: 360 - 361.
- Clark-Lewis, J.W. en Mortimer, P.I., 1959. Occurrence of 4-Hydroxypipercolic Acid in Acacia Species. *Nature (London)* 184: 1234 - 1235.
- Daley, L. S. en Bidwell, R.G.S., 1977. Phosphoserine and Phosphohydroxypyruvic Acid: Evidence for their Role as Early Intermediates in Photosynthesis. *Plant Physiol.* 60: 109 - 114.
- Ellington, E.V. et al., 1959. Amino-Acids and Peptides. Part II. The Constitution of Hypoglycin A. *J. Chem. Soc. (I)*: 80 - 85.
- Eloff, J.N., 1968. Fluorasetaat-, Aminosuur- en Organiese Suurmetabolisme van Gifblaar (Dichapetalum cymosum Engl.). D.Sc.-proefskrif, Fakulteit Natuurwetenskappe, Potchefstroomse Universiteit vir C.H.O.
- Eloff, J.N. en Grobbelaar, N., 1969. Isolation and Characterization of N-Methyl-L-Serine from Dichapetalum cymosum. *Phytochemistry* 8: 2201 - 2204.
- Elsworth, J.F. en Martin, K.R., 1971. Flavonoids of the Proteaceae, Part I. A Chemical Contribution to Studies on the Evolutionary Relationships in the S. African Proteoideae. *J. S. Afr. Bot.* 37(3): 199 - 212.
- Emery, T., 1965. Isolation, Characterisation, and Properties of Fusarinine, a 5-Hydroxamic Acid Derivative of Ornithine. *Biochemistry* 4: 1410 - 1417.
- Fowden, L., 1958. New Amino Acids of Plants. *Biol Rev* 33(4): 393 - 441.
- Fowden, L., 1972. Amino Acid Complement of Plants. *Phytochemistry* 11: 2271 - 2276.
- Fowden, L., 1973. Amino Acids. *Phytochemistry* II: 1 - 29.

- Fowden, L., 1974. Nonprotein Amino Acids from Plants: Distribution, Biosynthesis, and Analog Functions. *Recent Advances in Phytochemistry* 8: 95 - 122.
- Fowden, L., 1976. Amino Acids: Occurrence, Biosynthesis and Analogue Behaviour in Plants. *Perspectives in Experimental Biology* 2: 263 - 272.
- Fowden, L., 1981. Nonprotein Amino Acids. *The Biochemistry of Plants* 7: 215 - 247.
- Fowden, L. en Done, J., 1953. A New Transamination Reaction. *Nature (London)* 171: 1068 - 1069.
- Fowden, L. en Lea, P.J., 1979. Herbivores. Mechanism of Plant Avoidance of Autotoxicity by Secondary Metabolites, Especially by Nonprotein Amino Acids. Academic Press, London.
- Fowden, L. en MacGibbon, C.M., 1972. Newly Characterized Amino Acids from *Blighia unijugata*. *Phytochemistry* 11: 1105 - 1110.
- Fowden, L. en Smith, A., 1968. Newly Characterized Amino Acids from *Aesculus californica*. *Phytochemistry* 7: 809 - 819.
- Fowden, L. en Steward, F.C., 1957. Nitrogenous Compounds and Nitrogen Metabolism in the Liliaceae. *Ann. Bot.* XXI(81): 53 - 84.
- Gmelin, R., Kjaer, A. en Olesen Larsen, F., 1962. N-Acetyl-L-djenkolic Acid, a Novel Amino Acid Isolated from *Acacia farnesiana* Willd. *Phytochemistry* 1: 233 - 236.
- Goodwin, T.W. en Mercer, E.I., 1983. Introduction to Plant Biochemistry. Sec ed. Pergamon Press, New York.
- Grobbelaar, N., Pollard, J.K. en Steward, F.C., 1955. New Soluble Nitrogen Compounds (Amino- and Imino-Acids and Amides) in Plants. *Nature (London)* 175(4460): 703 - 708.
- Gulati, D.K., et al., 1981. Comparative Toxicity of some Naturally Occurring and Synthetic Non-Protein Amino Acids. *Environmental and Experimental Botany* 21(2): 225 - 230.
- Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd., London.

- Hattori, S. en Komamine, A., 1959. Stizolobic Acid: a New Amino-Acid in *Stizolobium hassiag*. Nature (London) 183: 1116 - 1117.
- Hirs, C.H.W., Moore, S. en Stein, W.H., 1952. Isolation of Amino Acids by Chromatography on Ion Exchange Columns; Use of Volatile Buffers. J. Biol. Chem. 195: 669 - 683.
- Hirs, C.H.W., Moore, S. en Stein, W.H., 1954. The Chromatography of Amino Acids on Ion Exchange Resins. Use of Volatile Acids for Elution. J. Amer. Chem. Soc. 76: 6063 - 6065.
- Hulme, A.C. en Arthington, W., 1954. Methyl Proline in Young Apple Fruits. Nature (London) 173: 588 - 589.
- Ireland, R.J. en Joy, K.W., 1981. Two Routes of Asparagine Metabolism in *Pisum sativum* L. Planta 151: 289 - 292.
- Jadot, J., Casimir, J. en Alderweireldt, F., 1963. Caractérisation de la L-threo-β-Hydroxyleucine a Partir de *Deutzia gracilis*. Biochim. Biophys. Acta 78: 500 - 504.
- Kaldy, M.S. en Kereliuk, G.R., 1984. A Dual Column System Using Lithium Buffers for the Analysis of Free Amino Acids Commonly Found in Plant Extracts. Can. Inst. Food Sci. Technol. 17(3): 168 - 171.
- Kjaer, A. en Larsen, P.O., 1963. D-(3-Carboxy-4-hydroxyphenyl)-glycine and Related Amino Acids in Higher Plants. Acta Chem. Scand. 17: 2397 - 2409.
- Labanauskas, C.K. et al., 1981. Protein and Free Amino Acids in Field-Grown Cowpea Seeds as Affected by Water Stress at Various Growth Stages. Plant and Soil 63: 355 - 368.
- Liss, I., 1962. N-Acetyldiaminobuttersäure, eine Neue Aminosäure aus dem Latex von *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch. Phytochemistry 1: 87 - 88.
- Mansford, K. en Raper, R., 1956. The Free and Combined Amino-Acids in some Plant Juices. Ann. Bot. 20(78): 287 - 295.
- Marumo, S. en Hattori, H., 1969. Isolation of D-4-Chloro-tryptophane Derivatives as Auxin-Related Metabolites from Immature Seeds of *Pisum sativum*. Planta (Berl.) 90: 208 - 211.

- Matikkala, E.J. en Virtanen, A.I., 1962. A New γ -Glutamyl-peptide, γ -L-Glutamyl-S-(prop-1-enyl)-L-cysteine, in the Seeds of Chives (Allium schoenoprasum). Acta Chem. Scand. 16(10)III: 2461 - 2462.
- Matikkala, E.J. en Virtanen, A.I., 1963. New γ -Glutamylpeptides Isolated from the Seeds of Chives (Allium schoenoprasum). Acta Chem. Scand. 17(6)II: 1799 - 1801.
- Meier, L.K., Olsen, O. en Sorensen, H., 1979. Acidic Amino Acids in Reseda luteola. Phytochemistry 18: 1505 - 1509.
- Meyer, J.J.M., 1984. Die Isolering, Identifisering en Biosintese van Sekere Vrye Aminosure van Acacia mellifera subsp. detinens. M.Sc.-proefskrif, Fakulteit Wis- en Natuurkunde, Universiteit van Pretoria.
- Morris, C.J., et al, 1961. Isolation of Beta - Alanine from Iris tingitana (var. Wedgewood). Nature (London) 190(4777): 718 - 719.
- Mwauluka, K. et al., 1975. L-3-(3-Aminomethylphenyl)alanine, a New Amino Acid from Seeds of Combretum zeyheri. Biochem. Physiol. Pflanzen 168: 15 - 18.
- Noma, M., Noguchi, M. en Tamaki, E., 1971. A New Amino Acid, Nicotianamine, from Tobacco Leaves. Tetrahedron Lett. (22): 2017 - 2020.
- Pollard, J.K., Sondheimer, E. en Steward, F.C., 1958. New Hydroxyamino-Acids in Plants and their Identification. Nature (London) 182: 1356 - 1357.
- Powrie, L.W., 1986. The Use of Free Amino Acids as Chemotaxonomic Indicators in Diastella Salisb. and Leucospermum R.Br. M.Sc.-proefskrif, Fakulteit Natuurwetenskappe, Universiteit Kaapstad.
- Frosch, D.S., 1986. An Evaluation of Free Amino Acids as Chemotaxonomic Markers in Protea L. Species. M.Sc.-proefskrif, Fakulteit Natuurwetenskappe, Universiteit Kaapstad.
- Radhakrishnan, A.N. en Giri, K.V., 1954. The Isolation of alloHydroxy-L-Proline from Sandal (Santalum album L.). Biochem. J. 58: 57 - 61.
- Rao, S.L.N., Adiga, P.R. en Sarma, P.S., 1964. The Isolation and Characterization of B-N-Oxalyl-L- α , β -Diaminopropionic Acid: a Neurotoxin from the Seeds of Lathyrus sativus. Biochemistry 3: 432 - 436.

- Rao, S.L.N., Ramachandran, L.K. en Adiga, P.R., 1962. The Isolation and Characterization of L-Homoarginine from Seeds of *Lathyrus sativus*. *Biochemistry* 2(2): 298 - 300.
- Rosenthal, G.A., 1982. Plant Nonprotein Amino and Imino Acids: Biological, Biochemical, and Toxicological Properties. Academic Press, New York.
- Scott, G., 1985. The Systematic Significance of Certain Flavonoids in the Genus *Protea* L. M.Sc.-proefskrif, Fakulteit Natuurwetenskappe, Universiteit Kaapstad.
- Scott, R., 1954. Observations on the Iodo-Amino-Acids of Marine Algae using Iodine-131. *Nature (London)* 173: 1098 - 1099.
- Steward, F.C., Zacharius, R.M. en Pollard, J.K., 1954. Nitrogenous Compounds in Plants: Recent Knowledge Derived from Paper Partition Chromatography. *Ann. Acad. Scient. Fennicae* 60: 321 - 366.
- Stock, W.D. en Lewis, O.A.M., 1982. Extraction of Nitrate Reductase from Members of the South African Proteaceae. *S. Afr. J. Bot.* 1(4): 124 - 126.
- Suzuki, T., 1982. Changes in Total Nitrogen and Free Amino Acids in Stem Cuttings of Mulberry (*Morus alba* L.). *J. Exp. Bot.* 33(132): 21 - 28.
- Van Staden, J., 1966. A Paper Chromatographic Survey of Free Amino Acids and Related Compounds in the Proteaceae. *J. S. Afr. Bot.* 32(1): 77 - 86.
- Vogel, A.I., 1951. A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis. Theory and Practice. Longmans, Green and Co., London.
- Wilding, M.D. en Stahmann, M.A., 1962. Hydroxyaspartic Acid from Alfalfa and Clover Roots. *Phytochemistry* 1: 241 - 244.
- Windholz, M. (red.), 1983. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 10 ed. Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A.
- Yu, C., Claybrook, D.L. en Huang, A.H.C., 1983. Transport of Glycine, Serine and Proline into Spinach Leaf Mitochondria. *Arc. Biochem. Biophys.* 227(1): 180 - 187.
