

**CHEMIESE KOMMUNIKASIE VAN DIE  
SUID-AFRIKAANSE GORDELAKKEDISSE**

deur



Proefskrif ingelewer vir die graad

**Doktor in die Wysbegeerte**

aan die

**Universiteit van Stellenbosch**

Promotor: Prof. B.V. Burger

Stellenbosch

Medepromotor: Dr. M. le Roux

Desember 2003

## VERKLARING

Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die werk in hierdie proefskrif vervat my oorspronklike werk is en dat ek dit nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê het nie.

S. Louw

## OPSOMMING

Die ouvolk, *Cordylus giganteus*, is 'n bedreigde akkedisspesie van die familie Cordilidae. Daar is gespekuleer dat twee soorte velkliere wat by hierdie familie akkedisse voorkom, naamlik die femorale- en generasiekliere, betrokke is by semiochemiese kommunikasie van hierdie diere. Ander velkliere, asook die kliere in die akkedisse se kloaka, is ook potensiële bronne van semiochemiese verbindings. Die bestudering van hierdie potensiële bronne van chemiese boodskappe by *C. giganteus* is as 'n beginpunt gebruik om die semiochemiese kommunikasie van die akkedisse van die familie Cordilidae beter te verstaan. Ter uitbreiding van hierdie studie is die femorale klierafskeiding van die Kaapse gordelakkedis, *C. cordylus*, ook ondersoek.

Die femorale en generasieklierafskeidings van *C. giganteus* en die femorale klierafskeidings van *C. cordylus* is chemies gekarakteriseer deur van analitiese tegnieke, naamlik gaschromatografie, lae resolusie GC-MS, GC-HR-MS, MO-TMS derivatisering en retensietydvergelyking, gebruik te maak. Talle verbindings is nie geïdentifiseer nie omdat hulle in 'n baie lae konsentrasie in die afskeidings voorkom, en/of saam met ander komponente elueer, wat veroorsaak dat daar nie massaspektra vir hierdie suiwer komponente verkry kon word nie.

Verbindingstipes wat in die afskeidings voorkom, sluit die volgende in:

- Karboksielsure - versadig en onversadig
- Alkohole
- Ketone
- Aldehiede - versadig en onversadig
- Esters - versadig en onversadig
- Koolwaterstowwe - versadig en onversadig
- Nitriële
- Amiede - versadig en onversadig
- $\gamma$ -Laktone
- Skwaleen
- $\alpha$ -Tocopherol
- Steroïede

Kwantitatiewe analyses van die femorale en generasieklierafskeidings van verskeie ouvolk akkedisse het getoon dat daar duidelike kwantitatiewe verskille tussen die afskeidings van mannetjies en wyfies is (in die geval van die femorale klierafskeidings), maar dat daar geen duidelike patroon in die verskille tussen die femorale en generasieklierafskeidings van individuele akkedisse van dieselfde geslag is nie. Daar is kwalitatiewe seisoenale verskille tussen die femorale klierafskeidings van individue van *C. giganteus* gevind.

Identification of these various compounds as a starting point for the study of the broad species belonging to the genus *C. giganteus* (family Cichlidae) and the seasonal variation of the femoral gland secretion of the large cichlid genus *C. giganteus*. Gas chromatography, low resolution mass spectrometry and retention time comparison were used for the identification of the femoral gland secretions of *C. giganteus* and the seasonal variation of the femoral gland secretion of *C. giganteus* was determined because of their low concentrations in the secretions. The compounds were purified and analysed for pure compounds because of the low concentrations. Compounds identified in the femoral gland secretions of *C. giganteus* are:

- Carboxylic acids - saturated and unsaturated
- Alcohols
- Ketones
- Aldehydes - saturated and unsaturated
- Esters - saturated and unsaturated
- Hydrocarbons - saturated and unsaturated
- Nitriles
- Amides - saturated and unsaturated
- $\gamma$ -Lactams
- Squalene
- $\beta$ -Tocopherol
- Steroids

## SUMMARY

The sungazer, *Cordylus giganteus*, is an endangered lizard species belonging to the family Cordylidae. It has been speculated that the function of semiochemical communication is performed by two types of skin glands, the femoral glands and the generation glands, which are also found in this family of lizards. Other skin glands and also the cloacal glands are further possible sources of semiochemicals. The investigation of these potential sources of chemical messages in *C. giganteus*, served as a starting point towards a better understanding of the chemical communication of lizard species belonging to the family Cordylidae. In continuation of this study the femoral gland secretion of the Cape girdled lizard, *C. cordylus*, was also investigated.

Gas chromatography, low resolution GC-MS, GC-HR-MS, MO-TMS derivatisation and retention time comparison were used as analytical techniques in the chemical characterization of the femoral and generation gland secretions of *C. giganteus* and the femoral gland secretion of *C. cordylus*. Some compounds were not identified because of their low concentration in the secretions and/or mass spectra could not be obtained for pure compounds because of co-elution with other compounds.

Compounds identified in the femoral gland secretion include the following:

- Carboxylic acids - saturated and unsaturated
- Alcohols
- Ketones
- Aldehydes - saturated and unsaturated
- Esters - saturated and unsaturated
- Hydrocarbons - saturated and unsaturated
- Nitriles
- Amides - saturated and unsaturated
- $\gamma$ -Lactones
- Squalene
- $\alpha$ -Tocopherol
- Steroids

Quantitative analysis of the femoral and generation gland secretions of a number of sungazers indicated distinct differences between the secretions of males and females (in the case of the femoral gland secretions), but no apparent trend could be found in the differences between the femoral and generation gland secretions of individual lizards of the same gender. Qualitative seasonal differences were however observed in the femoral gland secretions of all individuals of *C. giganteus*.

## BEDANKINGS

- Prof. Burger – Vir al die hulp, leiding en ondersteuning. Ek kon nie ‘n beter studieleier, mentor en persoon gekies het om my studies by voort te sit nie.
- Tannie Marieta – Baie dankie vir al die hulp, leiding en goeie geselskap.
- Michelle – Dankie vir die bystand en goeie tye.
- Dr. Weber – Baie dankie vir al die hulp, veral vir jou waardevolle kennis met die sinteses.
- Jaco Minnaar – Dankie vir die waardevolle, vriendelike en geduldige hulp met die hoë-resolusie-massaspektrometrie.
- Die Soöloë (Prof. Van Wyk, Lanral en Alex) – Dankie vir die versameling van monsters en die interessante insette in die navorsing.
- Tannie Wina – Dankie vir die wonderlike tee tye, geselskap, liefde en ondersteuning.
- Baie, baie dankie aan al my vriende wat my bygestaan het in al die goeie en moeilike tye.
- ‘n Wêreld van dank aan my pa en ma, Frikkie en Marina Louw vir al die vorme van ondersteuning denkbaar, en dat julle saam met my geswoeg het om my te bring waar ek vandag is.
- Laastens dank ek die Here vir die geloof van ‘n kind in ‘n wêreld van grootmense.

# INHOUDSOPGAWE

## HOOFSTUK I

<b>INLEIDING</b>	1
CHEMIESE BOODSKAPPE EN GEASSOSIEERDE KLIERE	3
Femorale kliere	4
DIE WAARNEMING VAN CHEMIESE BOODSKAPPE	5
VOORBEELDE VAN CHEMIESE KOMMUNIKASIE TUSSEN AKKEDISSE	7
Die woestyn iguana, <i>Dipsosaurus dorsalis</i>	8
Die groen iguana, <i>Iguana iguana</i>	9
<b>DOELSTELLINGS</b>	10
<b>VERWYSINGS</b>	11

## HOOFSTUK II

<b>DIE CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE FEMORALE KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK</b>	14
CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AFSKEIDING	17
Versadigde alifatiese karboksielsure	17
Onversadigde alifatiese karboksielsure	22
Versadigde alifatiese alkohole	24
Versadigde alifatiese ketone	26
Onversadigde alifatiese aldehyd	27
Alifatiese esters	28
n-Pentakosaan	30
Skwaleen	31



$\alpha$ -Tokoferol	32
Steroïde	33
- Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	33
- Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	39
- Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	41
- Cholest-4-en-3-oon	42
- Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol	44
- Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	45
- Lanosterol	46
- Ongeïdentifiseerde verbindings	48

<b>VERWYSINGS</b>	80
-------------------	----

### HOOFSTUK III

<b>KWANTITATIEWE ANALISE VAN DIE FEMORALE KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK</b>	84
VERSAMELING VAN DIE MONSTERS EN VERWERKING VAN DIE DATA	85
VERGELYKING TUSSEN INDIVIDUE VAN DIESELFDE EN VAN VERSKILLENDE GESLAGTE	86
SEISOENALE VARIASIES	90
GEVOLGTREKKINGS	92

### HOOFSTUK IV

<b>DIE CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE GENERASIEKLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK MANNETJIE</b>	99
CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AFSKEIDING Versadigde alifatiese karboksielsure	99 103

Onversadigde alifatiese karboksielsure	103
Versadigde alifatiese alkohole	104
Versadigde alifatiese ketone	104
Versadigde alifatiese aldehiede	104
Onversadigde alifatiese aldehied	105
Heksadekaan-4-olied	106
Versadigde alifatiese nitriële	107
Versadigde alifatiese amiede	108
Alkene	111
Versadigde en onversadigde alifatiese ester	112
Skwaleen	115
Steroïde	115
- 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol	115
- 5 $\alpha$ -Cholestan-3-ole	120
- 3-Etoksicholestaan	121
- Cholestan-3-oon of cholestan-2-oon	122
- 5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	123
- 5 $\beta$ -Ergostanol	124
- 5 $\beta$ -Stigmastanol	125
- Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, lanosterol en cholest-4-en-3-oon	126
 ONGEÏDENTIFISEERDE VERBINDINGS	 126
 <b>VERWYSINGS</b>	 157
 HOOFSTUK V	
 <b>KWANTITATIEWE ANALISE VAN DIE GENERASIE- KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK MANNETJIE</b>	 160
VERSAMELING VAN DIE MONSTERS EN VERWERKING VAN DIE DATA	160
Individuele variasie	163

Seisoenale variasie	163
Gevolgtrekkings	170
<b>VERWYSINGS</b>	180

## HOOFSTUK VI

<b>CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE FEMORALE KLIERAFSKEIDING VAN DIE KAAPSE GORDELAKKEDIS</b>	181
---	-----

CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AFSKEIDING	183
Versadigde alifatiese karboksielsure	183
Onversadigde alifatiese karboksielsure	186
Versadigde alifatiese alkohole	186
Onversadigde alifatiese aldehyd	187
$\gamma$ -Laktone	187
Versadigde alifatiese esters	188
Skwaleen	189
Steroïde	190
- Cholesterol en $5\alpha$ -cholestan-3-ol	190
- Cholesta-5,7-dien- $3\beta$ -ol, ergost-5-en- $3\beta$ -ol, lanost-8-en- $3\beta$ -ol en stigmast-5-en- $3\beta$ -ol	190
- Ongeïdentifiseerde steroïede	191

<b>VERWYSINGS</b>	200
-------------------	-----

## HOOFSTUK VII

<b>EKSPERIMENTEEL</b>	201
ALGEMEEN	201
ANALITIESE TEGNIEKE	201
Gaschromatografiese skeidings	201

Gaschromatografie-massaspektrometriese analises (GC-MS)	202
<b>VERSAMELING EN MONSTERVOORBEREIDING</b>	203
Versameling en monstervoorbereiding vir kwalitatiewe analises	203
- Femorale kliere van <i>C. giganteus</i>	203
- Generasiekliere van <i>C. giganteus</i>	203
- Femorale kliere van <i>C. cordylus</i>	204
Versameling en monstervoorbereiding vir kwantitatiewe analises	204
- Femorale kliere	204
- Generasiekliere	204
- Eksterne standaard	205
Metoksiem-trimetielsiliel (MO-TMS) derivatisering van die steroïede in die afskeidings	205
<b>SINTESE VAN VERWYSINGSVERBINDINGS</b>	206
Dodekielpropenoaat	206
Heksadekanaal	206
Heksadekaannitriël	207
Ikosaanamied	208
2-Dekielheptaandioësuur	208
Metiel-2-oksoheptadekanoaat	210
Tetradekaan-4-olied	211
Oktadekieltetradekanoaat	212
<b>VERWYSINGS</b>	226

## HOOFSTUK I

**INLEIDING**

Die mens kommunikeer al lank deur van sekere hulpmiddels gebruik te maak, van posklippe, briewe en telegramme, tot sateliettelevisie en die internet. Hoewel lewende organismes op fisiese stimulasie vanuit die natuur deur middel van gehoor, sig en gevoel reageer, is daar ook nog 'n ander belangrike kommunikasiemiddel, naamlik chemiese kommunikasie. Chemiese kommunikasie tussen organismes kan vir 'n wye verskeidenheid doeleindes aangewend word, wat varieer van die gebruik van sekslokstowwe, tot blomme wat insekte vir bestuivingsdoeleindes lok. Die eerste werklik sistematiese ondersoek van die reuk-gestimuleerde gedrag van insekte, is deur die Franse entomoloog, Jean-Henri Fabre, uitgevoer.<sup>1</sup> Hy het in 1904 die navorsing van sy voorgangers voortgesit en 'n wyfie Europese pouoogmot wat nog klam was na metamorfose, onder 'n gaasdeksel in sy studeerkamer geplaas. Die aand was daar sowat 40 Europese pouoogmot mannetjies wat om die gaasdeksel gevlieg het. Hy het die eksperiment nog agt aande herhaal, en het gevind dat die mannetjies die huis maklik opspoor, en na 'n soektog die wyfie ook in sy studeerkamer vind. Hy het byvoorbeeld ook die wyfie in 'n laai gesit sodat die mannetjies haar nie kon sien nie, of haar omring met skerp ruikende stowwe soos sekere olies en naftaleen. Onder hierdie omstandighede, en selfs in stormagtige weer, het die mannetjie motte daarin geslaag om die wyfie op te spoor. Hy het ook bevind dat 'n voorwerp waarop 'n wyfiemot gesit het, steeds mannetjies aantrek nadat sy verwyder is, veral as die voorwerp van absorberende materiaal bestaan het.<sup>2</sup> Hierdie tipe lokstowwe wat die mannetjies na wyfies toe lok, is maar slegs een voorbeeld van die tipe chemiese verbindings waaraan Regnier in 1971 die benaming semiochemiese verbindings toegeken het.<sup>3</sup>

Die vakgebied semiochemie, afgelei van die Griekse woord vir sein, *semeion*, handel oor die chemie van sogenaamde semiochemiese verbindings, deur middel waarvan organismes met mekaar in hul natuurlike omgewing kommunikeer. Semiochemiese

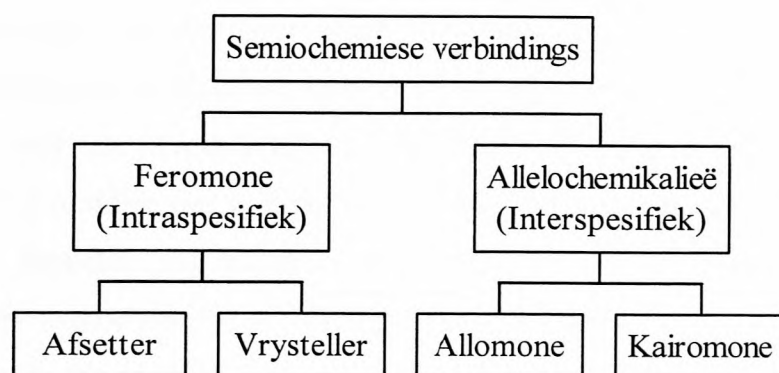
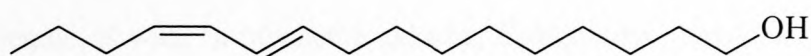


Fig. 1.1: Klassifikasie van chemiese verbindings wat deur organismes vir chemiese kommunikasie gebruik word.

verbindings kan in twee groepe verdeel word, naamlik feromone en allelochemikalieë (Fig. 1.1).<sup>4</sup> Die term feromoon is afgelei van die Griekse woorde, *pherein*, “om oor te dra”, en *hormon*, “om te prikkel”, en verwys na die semiochemiese interaksies wat tussen organismes van dieselfde spesie plaasvind (intraspesifieke kommunikasie).<sup>4,5</sup> Allelochemikalieë is semiochemiese verbindings wat vir interaksies tussen organismes van verskillende spesies gebruik word (interspesifieke kommunikasie). Beide feromone en allelochemikalieë word ook in twee verdere tipes onderverdeel.

Die eerste tipe is afsetter-feromone, wat ‘n langtermyn fisiologiese verandering in die ontvanger tot gevolg het. Die tweede tipe is die vrysteller-feromone wat ‘n onmiddellike reaksie, wat as ‘n gedragsverandering waargeneem kan word, by die ontvanger uitlok.<sup>4</sup> Butenandt en sy medewerkers was in 1959 die eerste groep wat daarin kon slaag om ‘n feromoon, naamlik die verbinding *trans*-10-*cis*-12-heksadekadiën-1-ol, wat deur die sywurmmotwyfie, *Bombyx mori*, afgeskei word, te identifiseer.<sup>6</sup>



*trans*-10-*cis*-12-heksadekadiën-1-ol

Hierdie verbinding word deur die sywurmmot gebruik as 'n sekslokstof,<sup>6</sup> en kan as 'n vrysteller-feromoon geklassifiseer word. Die twee tipes allelochemikalieë staan bekend as kairomone en allomone. Kairomone word gedefiniër as die semiochemiese verbindings wat die organisme wat die boodskap ontvang bevoordeel, soos byvoorbeeld 'n roofdier wat sy prooi deur middel van reuk kan opspoor, of 'n insek wat deur 'n bepaalde geur na sy voedselplant gelok word. Allomone word weer gedefiniër as semiochemiese verbindings wat deur organismes tot hul eie voordeel afgeskei word. Voorbeelde van allomone is die afskeidings wat insekte ter verdediging afskei, of die reuk van 'n blom wat vir bestuiwingdoeleindes insekte lok.<sup>4</sup> 'n Interessante voorbeeld van laasgenoemde is waar *Ophrus* orgideë seksuele stimulasie vir bestuiwingdoeleindes by sommige manlike bye en wespe van die orde Hymenoptera veroorsaak. Die mannetjies se paringsinstink word gestimuleer deur die parfuum wat van een van die blare van die blom, naamlik die labellum, afkomstig is. Die *Ophrus* orgidee het die vermoë om verskillende stadiums van die mannetjies se paringsgedrag te stimuleer, van die naderende vlug tot by die poging om te paar. Die paringsbewegings wat die insek dan op die labellum uitvoer, veroorsaak dat die blom se stuifmeel losgemaak word, sodat bestuiwing kan plaasvind.<sup>1</sup>

Behalwe die voorbeelde wat hierbo genoem is, word semiochemiese verbindings soos byvoorbeeld alarmferomone en spoorferomone vir baie ander doeleindes gebruik.<sup>3</sup>

### **Chemiese boodskappe en geassosieerde kliere.**

Die studie van chemiese boodskappe, oftewel semiochemiese verbindings of feromone, word nou erken as 'n integrale deel van die navorsing in verband met reptiele se sosiale gedrag.<sup>7</sup> Afskeidings wat vir intraspesifieke kommunikasie deur akkedisse gebruik word, kan hul oorsprong hê in die liggaamsoppervlak, die kloak en spesifieke kliere soos byvoorbeeld die femorale kliere.<sup>8,9</sup> 'n Voorbeeld van die gebruik van eersgenoemde, is waar 'n mannetjie akkedis, *Eublepharis macularius*, strydvlug teenoor mannetjies van dieselfde spesie optree, in teenstelling met hofmakery wat deur wyfies uitgelok word. As die wyfies egter vervel, tree die mannetjie teenoor hulle op met dieselfde aggressiwiteit as waarmee hy teenoor ander mannetjies optree. Hierdie gedrag word geïnterpreteer as die reaksie van mannetjies op beide geslagte,

gebaseer op die waarneming van sekere chemiese verbindings wat gewoonlik teenwoordig is in die vel van die wyfie, maar wat afwesig is wanneer die wyfie vervel.<sup>10,11</sup>

Voorbeelde van akkedisse waarvan die gedrag deur die reuk van die kloak beïnvloed word, is *Eumeces laticeps*, *E. fasciatus* en *E. inexpectatus*. Die volwasse *E. laticeps*, sal meer gereeld met sy “tong toets” (die tong word vinnig uitgesteek en weer terug getrek, om ‘n monster van die omringende lug te toets; Eng. “tongue flick”) as hy aan die reuk van die kloak van ‘n akkedis van dieselfde spesie blootgestel word, as wanneer hy aan die reuk van die kloak van akkedisse van ander spesies van dieselfde genus soos *E. fasciatus* en *E. inexpectatus*, blootgestel word.<sup>12,13</sup> Hierdie en ander waarnemings dui daarop dat volwasse akkedisse van die genus *Eumeces* in staat is om te onderskei tussen die reuk van die kloak van akkedisse van dieselfde spesie en ander akkedisse van dieselfde genus.<sup>13</sup> Een van die bronne van die wyfie se feromone waarop die mannetjie *E. laticeps* reageer, is die urodale klier, ‘n klier wat slegs in die kloak van wyfies voorkom, en wat gedurende die paartyd baie aktief is.<sup>13,14,15</sup> Die reuke wat deur hierdie genus gebruik word om spesies en geslag te identifiseer, het dus hul oorsprong in die urodale klier.<sup>13</sup>

### Femorale kliere

Femorale kliere kom in baie akkedisse voor en word aangetref op die ventrale oppervlakte van ‘n akkedis se dye (Fig. 1.2 a en b<sup>16</sup>). Hulle bestaan uit buise en follikels van epidermale en dermale oorsprong en die enigste uitwendig waarneembare gedeeltes van die kliere is die femorale porieë.<sup>17</sup> Min of meer dieselfde aantal kliere kom in albei geslagte voor, maar is in sommige gevalle afwesig by die wyfie. Die kliere is ook gewoonlik groter by die mannetjies.<sup>18</sup> Die kliere produseer groot hoeveelhede holokriene afskeiding wat ‘n prop in die buisies vorm, en daar word algemeen aanvaar dat die femorale kliere meer aktief tydens die paartyd van die akkedisse is, en dat die mannetjies meer afskeiding produseer as die wyfies.<sup>17,18,19,20</sup>



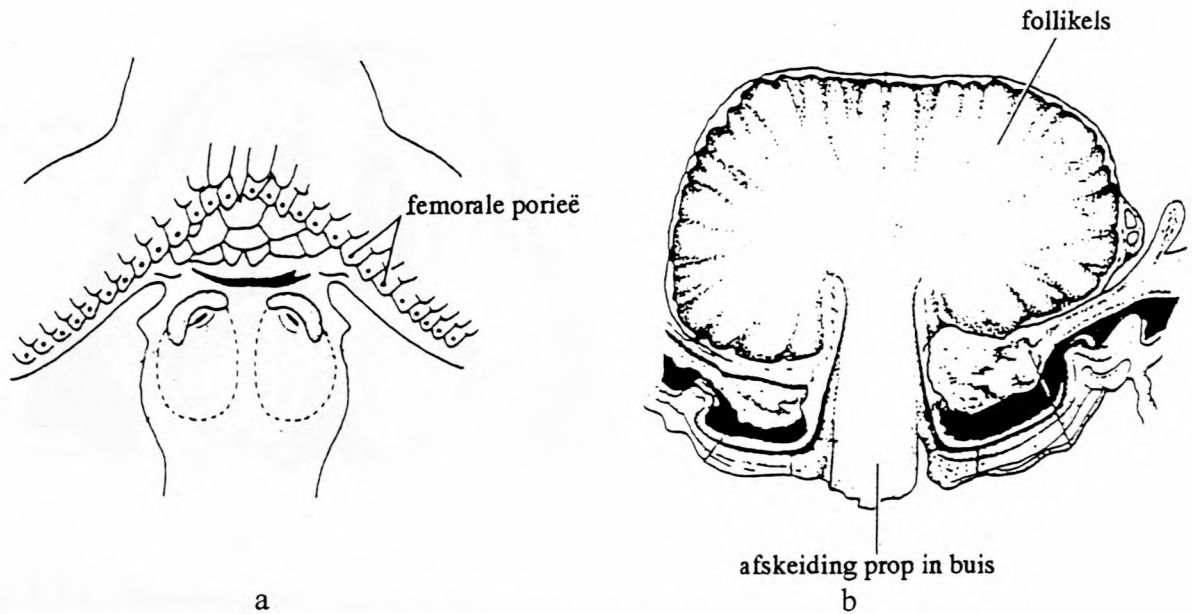


Fig. 1.2 a: Ventrale aansig van die akkedis *Gymnodactylus pulchellus* se onderlyf.

b: Mikroskopiese snit deur die middel van 'n femorale klier van die akkedis *Crotaphytus collaris*.

Baie ander kliere is al in akkedisse beskryf, insluitende generasie<sup>21</sup>, dorsale, ventrale en hemipenale kliere.<sup>18</sup> Al toon sommige van hierdie kliere seisoenale variasie in die produksie van die afskeidings, met die hoogste produksie tydens die paartyd, is daar geen studies wat toon watter invloed hierdie afskeidings op die gedrag van die diere het nie.<sup>18</sup>

### Die waarneming van chemiese boodskappe.

Die olfaktoriese sisteem, in samewerking met die vomeronasale orgaan (Jacobson se orgaan), word deur akkedisse gebruik om chemiese boodskappe waar te neem. Die eksterne neusopening van die akkedis, is verbind met 'n sak wat lei na die voorkant van die hoof olfaktoriese kamer. Aan die agterkant van die hoof olfaktoriese kamer is daar 'n vernouing, die nasofaringeale buis, wat deur die interne neusopening lei na die bukkale holte. Hierdie nasale holtes is slegs gedeeltelik bedek met sensoriese epiteel, wat hoofsaaklik aan die dorsale oppervlakte van die hoof olfaktoriese kamer voorkom.<sup>22</sup> Dit is hierdie sensoriese epiteel van die olfaktoriese sisteem, wat

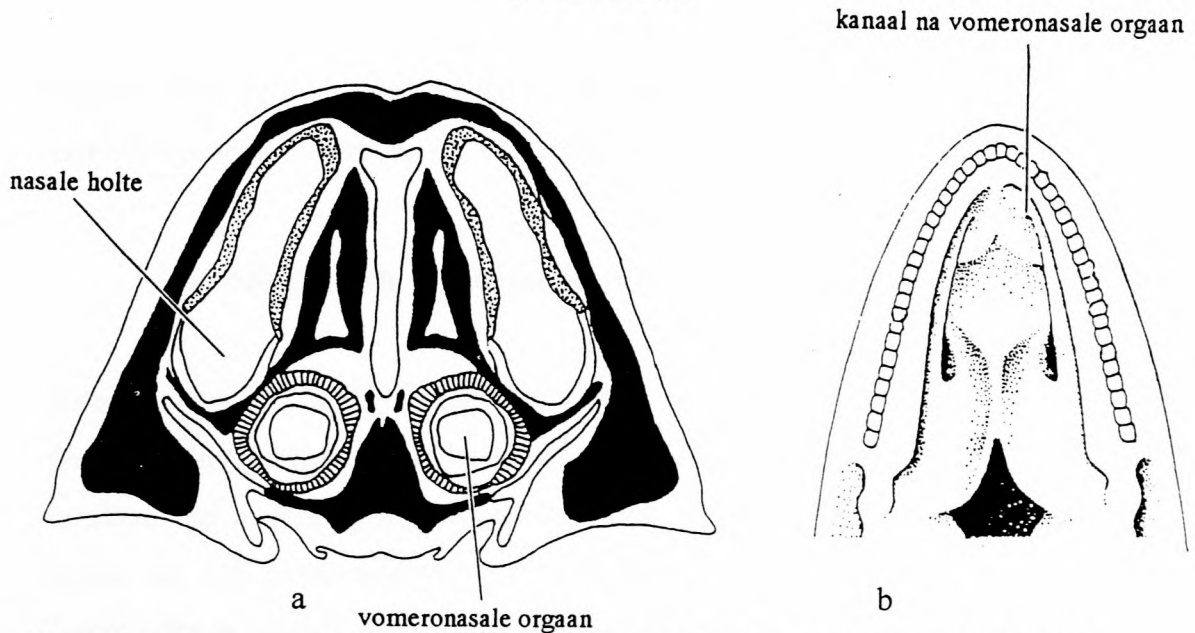


Fig. 1.3 a: Diagrammatiese snit deur die snoet van die akkedis *Tiliqua scincoides scincoides*.

b: Ventrale aansig van die verhemelte van die akkedis *Iguana iguana*.

verantwoordelik is vir die waarneming van vlugtige verbindings in die lug wat die akkedis deur sy neus inasem.<sup>23</sup>

Van al die reptiele is dié van die orde Squamata, wat akkedisse en slange insluit, se vomeronasale organe die beste ontwikkel. Die gepaarde vomeronasale organe is onder die nasale holtes geleë en is verbind met die mond, deur middel van kanale wat aan die voorkant van die verhemelte uitkom<sup>24</sup> (Fig. 1.3 a<sup>25</sup> en b<sup>26</sup>). Die tong van die akkedis help om minder vlugtige en nie-vlugtige verbindings uit die omgewing na hierdie kanale te beweeg.<sup>24,27</sup> 'n Gevurkte tong soos dié van 'n slang, bevorder die voorsiening van hierdie verbindings aan die twee kanale nog meer. Die vervoer van hierdie verbindings na die binnekant van die vomeronasale organe word aangehelp deur silia wat in groewe in die kanale voorkom.<sup>24</sup>

'n Aanvaarde metode om 'n akkedis se reaksie op chemiese boodskappe te ondersoek, is om te kyk na hoe dikwels hy tongtoetsgedrag vertoon as hy byvoorbeeld in die nabyheid van 'n afskeiding van 'n ander akkedis geplaas word.<sup>28</sup> As 'n akkedis deur hierdie tipiese gedrag die lug met sy tong toets, is dit moontlik dat hy probeer om vlugtige verbindings beter waar te neem.<sup>29</sup> As hy die oppervlakte waar die sekreet

voorkom met sy tong toets, is dit verder moontlik dat hy daardeur die nie-vlugtige verbindings deur middel van die vomeronasale orgaan probeer waarneem.<sup>30,24</sup>

### **Voorbeelde van chemiese kommunikasie tussen akkedisse.**

Aangesien in die huidige studie aanvanklik hoofsaaklik aandag gegee is aan die femorale klierafskeiding van die akkedis *Cordylus giganteus*, word die gepubliseerde resultate van navorsing in verband met twee akkedisspesies, naamlik die woestyniguana en die groen iguana, wat vermoedelik hul femorale kliere vir chemiese kommunikasie gebruik, vervolgens kortliks bespreek.

Vir individuele identifikasie moet die samestelling van onderlinge semiochemiese boodskappe verskillend wees. Chemiese verbindings met hoë molekulêre massas, soos byvoorbeeld steroïede, kan dus moontlik meer geskik wees vir hierdie doel as baie vlugtige verbindings, aangesien eersgenoemde meer komplekse strukture kan besit as laasgenoemde en dus moontlik meer informasie as die vlugtige verbindings kan oordra. Minder-vlugtige verbindings met hoë molekulêre massas het ook die eienskap dat hulle waargeneem kan word, selfs al is die individu wat die verbindings afgeskei het nie meer teenwoordig nie. Sulke relatief nie-vlugtige verbindings is dus geskik vir die merking van 'n individu se woongebied.<sup>29</sup>

Hoewel sulke verbindings geskik is om sekere funksionele boodskappe oor te dra, is dit moeilik vir die ontvanger om hulle waar te neem, weens hul lae vlugtigheid. Een manier waarop hierdie probleem oorkom sou kon word, is die aanwesigheid in die afskeiding van 'n visueel waarneembare komponent, wat byvoorbeeld fluoresserend is en wat die ontvanger na die gemerkte gebied kan lok.<sup>31,32</sup> Indien die omgewing waarin die akkedisse hulself bevind van so 'n aard is dat 'n visuele boodskap nie maklik waargeneem kan word nie, byvoorbeeld in digte plantegroei, moet die chemiese boodskap ook vlugtige verbindings bevat. Die vlugtige verbindings word dus oor 'n afstand deur die ontvanger waargeneem en dit kan hom dan na die minder-vlugtige verbindings lok, waar nog meer inligting verkry kan word.<sup>29</sup>

**Die woestyn-iguana, *Dipsosaurus dorsalis***

Die femorale kliere van 'n woestyn-iguana, *Dipsosaurus dorsalis*, word moontlik gebruik om sy woongebied te merk. Deur sy agterbene oor klippe te sleep, word die sekreet van die femorale kliere aan die omgewing oorgedra. Die woestyn-iguana kom egter in warm, droë gebiede voor. Daar word dus vermoed dat hierdie akkedisse geneig sal wees om van chemiese boodskappe, wat hoofsaaklik bestaan uit chemiese verbindings wat nie maklik degradeerbaar is nie en wat ook nie vlugtig is nie, gebruik te maak.<sup>28</sup> Daar is bepaal dat 80% van die afscheidings van die femorale kliere van die woestyn iguana uit proteïene bestaan. Deur middel van kernmagnetiese resonansie (KMR) spektrometrie is bepaal dat die oorblywende 20% van die afskeiding hoofsaaklik uit langketting karboksielsure, en ook uit trigliseriedes en steroïede bestaan.

Met behulp van weerkaatsingspektroskopie is vasgestel dat die afskeiding langgolflengte ultraviolet lig in die 350 tot 400 nanometer gebied, sterk absorbeer. Vir 'n dier wat lig in hierdie golflengte gebied kan waarneem, sal sulke UV-absorberende stowwe donker voorkom teen die agtergrond van iets soos sand, wat lig goed reflekteer.<sup>33,28</sup> Daar is trouens ook vasgestel dat hierdie akkedisse wel die vermoë het om die femorale klier sekreet op hierdie wyse op te spoor. Na die visuele lokalisering van die sekreet, kan die akkedis dan nader beweeg, om die nodige informasie van die minder-vlugtige komponente van die afskeiding te verkry.<sup>31</sup>

Die studies wat in verband met die femorale klierafskeiding uitgevoer is, het daarop gedui dat die woestyn-iguana moontlik van 'n reukvergelykingsmeganisme vir herkenning gebruik maak, waarmee hy sy eie femorale klierafscheidings kan herken en moontlik ook tussen dié van ander individue kan onderskei. Akkedisse tongtoets soms hul eie serte nadat hulle ander akkedisse se sekreet teekom het. Op hierdie manier kan hulle moontlik hul eie sekreet met 'n ander s'n vergelyk. Hierdie proses word 'n reukvergelykings-herkenningsmeganisme genoem. Dit is moontlik dat 'n gekombineerde metode gebaseer op self-herkenning en reukvergelyking, vir die akkedis voldoende is om sy woongebied te herken.<sup>34</sup>

### Die groen iguana, *Iguana iguana*

Die groen iguana, *Iguana iguana*, bewoon vogtige, tropiese gebiede. Daar kan dus verwag word dat die aard van hul chemiese boodskappe anders as dié van die woestyn iguana sal wees.<sup>28</sup> Daar is gevind dat die femorale klierafskeiding van die groen iguana wel uit 'n hoër persentasie vlugtige verbindings bestaan en dat dit nie langgolflengte ultraviolet lig absorbeer nie.<sup>28,35</sup> Deur middel van gaschromatografie-massaspektrometriese analises (GC-MS) is vasgestel dat daar C<sub>14</sub> tot C<sub>26</sub> versadigde, en C<sub>16</sub> tot C<sub>24</sub> onversadigde langketting-karboksielsure in die afskeiding voorkom. Deur middel van GC-MS analises is ook bepaal dat daar agt steroïede in die sekreet voorkom, waarvan twee nie geïdentifiseer is nie. Die geïdentifiseerde steroïede is 5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol (epicoprostanol), cholest-5-en-3 $\beta$ -ol (cholesterol), cholest-5-en-24-metiel-3 $\beta$ -ol (campesterol), cholesta-5,22-dien-24 $\beta$ -etiel-3 $\beta$ -ol (stigmasterol), 4,4,14 $\alpha$ -trimetiel-cholesta-8,24(5 $\alpha$ )-dien-3 $\beta$ -ol (lanosterol) en 24-etiel-cholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol). Die een ongeïdentifiseerde sterol se massaspektrum het getoon dat die molekulêre massa twee Dalton (Da) laer is as dié van cholesterol en dat dit dus 'n dehidrocholesterol kan wees. Die tweede ongeïdentifiseerde sterol het 'n molekulêre massa 14 Da hoër as dié van cholesterol en die verbinding bevat dus waarskynlik 'n addisionele metiel groep.<sup>35</sup> Die karboksielsuurkomponent van die afskeiding raak wel meer tydens die paarseisoen van die akkedisse, maar daar is geen verskil in die relatiewe hoeveelhede van die karboksielsure tussen individue nie.<sup>35</sup> Deur middel van poliakrielamiedjel-elektroforese is vasgestel dat individue se femorale klierafscheidings nie dieselfde proteïensamestelling het nie.<sup>36, 37</sup>

Hierdie studies van die femorale klierafskeiding van die groen iguana dui dus op die moontlikheid dat die akkedisse eers die vlugtige komponente van die afskeiding waarneem, wat hulle dan slegs na die afskeiding toe lok, waarna daar dan van die minder-vlugtige verbindings meer informasie verkry kan word.<sup>29</sup>

## DOELSTELLINGS

Die doel van hierdie studie is om die semiochemiese kommunikasie van die Suid-Afrikaanse gordelakkedis (Cordylidae) te bestudeer, deur verskillende potensiële bronne van semiochemiese verbindings wat op die diere se liggame voorkom te ondersoek. Verskillende velkliere asook 'n reeks kliere in die kloak is al beskryf in hierdie familie akkedisse. Voorbeelde van hierdie velkliere is die generasie- en femorale kliere, waarvoor gespekuleer is dat hulle moontlik by semiochemiese kommunikasie betrokke kan wees. *Cordylus giganteus* is 'n bedreigde akkedisspesie en daar is besluit om eers hierdie diere se femorale- en generasie kliere te bestudeer. Hierdie materiaal moet eerstens chemies gekarakteriseer word, waarna die kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille tussen die chemiese samestelling van die materiaal van individue van dieselfde en verskillende geslag, asook seisoenale variasies, indien enige, ondersoek sou kon word. Hierdeur sou dus moontlik vasgestel kon word watter kliere die semiochemikalieë produseer, en ook watter verbindings deur hierdie kliere geproduseer word. Ter uitbreiding van hierdie studie is die femorale klierafskeiding van die Kaapse gordelakkedis, *C. cordylus*, chemies gekarakteriseer.

Die ideale afsluiting van hierdie navorsing sou die bevestiging wees van die resultate deur middel van gedragstudies, verkieslik in die veld en uitgevoer deur soöloë. Indien positiewe resultate behaal word, sou dieselfde prosedure gevolg kan word om semiochemiese kommunikasie by ander akkedisspesies te ondersoek.

## VERWYSINGS

1. B. Kullenberg en G. Berström, *Endeavour*, **34**, pp. 59-66 (1975).
2. J.H. Fabre, *Souvenirs Entomologiques*, 8ste uitgawe, Parys (1904) - Verwysing uit "Insect Sex Attractants", M. Jacobson, Interscience Publishers, New York (1965), p. 60.
3. F.E. Regnier, *Biol. Reprod.*, **4**, pp. 309-326 (1971).
4. E.S. Albone, "Mammalian Semiochemistry. The investigation of Chemical Signals between Mammals", Wiley & Sons, New York (1984), pp. 1-5.
5. P. Karlson en M. Lüscher, *Nature* (London) **183**, pp. 55-56 (1959).
6. A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm en E. Hecker, *Z. Naturforsch*, **14**, 283 (1959) - Verwysing uit "Insect Behaviour", R.W. Matthews en J.R. Matthews, John Wiley & Sons, New York (1978), p. 193-194.
7. R.T. Mason, "Reptilian Pheromones", Hoofstuk 4, p. 115, in "Biology of the Reptilia. Hormones, Brain, and Behaviour.", Volume 18 - "Physiology E", C. Gans (red.), The University of Chicago Press, Chicago en Londen (1992).
8. C.A. Simon, "A Review of Lizard Chemoreception", Hoofstuk 6, p. 127, in "Lizard Ecology. Studies of a Model Organism.", R.B. Huey, E.R. Pianka en T.W. Schoener (red.), Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts en Londen (1983).
9. Verwysing 7, p. 165.
10. M.Halpern, verwysing 7, Hoofstuk 7, p. 473.

11. R.T. Mason en W.H.N. Gutzke, *J. Chem. Ecol.*, **16**, pp. 27-36 (1990).
12. W.E. Cooper en L.J. Vitt, *Anim. Behav.*, **34**, pp. 367-376 (1986).
13. Verwysing 10, pp. 470-471.
14. W.E. Cooper, Jr., W.R. Garstka en L.J. Vitt, *Herpetologica*, **42** (3), pp. 361-366 (1986).
15. S.E. Trauth, W.E. Cooper, Jr., L.J. Vitt en S.A. Perrill, *Herpetologica*, **43** (4), pp. 458-466 (1987).
16. K.R. Porter, "Herpetology", W.B. Saunders Company, Philadelphia, London en Toronto (1972), Fig. 4.10, p. 125.
17. C.J. Cole, *J. Morphol.*, **118**, pp. 119-136 (1966).
18. Verwysing 7, p. 166-167.
19. C.J. Cole, *Herpetologica*, **22** (3), pp. 199-206 (1966).
20. B. Fergusson, S.D. Bradshaw en J.R. Cannon, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **57**, pp. 371-376 (1985).
21. J.H. Van Wyk en P.Le F.N. Mouton, *Amphibia-Reptilia*, **13**, pp. 1-12 (1992).
22. Verwysing 16, pp. 187-189.
23. M.A. Stander, "Chemiese Karakterisering van die Preorbitale Afskeiding van die Suni, *Neotragus Moscatus*", M.Sc.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1997), pp. 8-9.
24. Verwysing 8, pp. 119-121.



25. Verwysing 8, Fig. 6.1, p. 120.
26. T.S. Parsons, "The Nose and Jacobson's Organ", Hoofstuk 2, Fig. 14 E, p. 122, in "Biology of the Reptilia.", Volume 2 - "Morphology B", C. Gans en T.S. Parsons (red.), Academic Press, New York (1970).
27. C.J. Wysocki, G.K. Beauchamp, R.R. Reindinger, en J.L. Wellington, *J. Chem. Ecol.*, **11**, p. 1147-1159 (1985).
28. A.C. Alberts, *Brain. Behav. Evol.*, **41**, pp. 255-260 (1993).
29. A.C. Alberts en D.I. Werner, *Anim. Behav.*, **46**, pp. 197-199 (1993).
30. Verwysing 10, p. 426.
31. A.C. Alberts, *Anim. Behav.*, **38**, pp. 129-137 (1989).
32. D. Duvall, B.M. Graves en G.C. Carpenter, *Copeia*, 1987 (4), pp. 1028-1031.
33. A.C. Alberts, *J. Chem. Ecol.*, **16**, pp. 13-25 (1990).
34. A.C. Alberts, *Copeia*, 1992 (1), pp. 229-232.
35. A.C. Alberts, T.R. Sharp, D.I. Werner en P.J. Weldon, *J. Chem. Ecol.*, **18**, pp. 703-712 (1992).
36. A.C. Alberts, *Copeia*, 1991 (1), pp. 69-79.
37. A. C. Alberts, J.A. Phillips en D.I. Werner, *Copeia*, 1993 (3), pp. 775-781.

## HOOFSTUK II

**DIE CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE FEMORALE  
KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK.**

Die reuse-gordelakkedis, *Cordylus giganteus*, ook bekend as die ouvolk (Eng: sungazer), is die grootste soort akkedis van die genus *Cordylus*. Hierdie akkedisse kan van snoet tot kloaak 'n lengte van tot 200 mm bereik, met 'n totale lengte van tot 400 mm. Hulle is gepantser met doringagtige gepunte skubbe, wat veral op die agterkop en ook op die nek en stert, groot en lank is.<sup>1</sup> Die rug van 'n volwasse akkedis is geel tot donkerbruin. Die kant van die kop, die sye en die maag is 'n dowwe geel kleur, en 'n grys-bruin kleur kom soms op die bors voor. Jong akkedisse het oneweredige rooibruin dwarslyne op hulle rûe en ook swart en geel stroke met verskeie oranje tot rooi skubbe op hulle sterte.<sup>2</sup>

Die ouvolk leef saam in kolonies in gate in die grond, wat gewoonlik gemiddeld ongeveer 17 meter van mekaar af, en ongeveer 420 mm diep en 1800 mm lank is. Die gate eindig stomp af, waar dit nie vergroot is om 'n kamer te vorm nie. Elke gat word slegs deur een individu bewoon, behalwe in sommige gevalle waar daar jong akkedisse saam met 'n volwasse akkedis woon. Die akkedisse sit gereeld gedurende die dag by hul gate se openinge, wat noord of noordwes wys om sodoende meer son te ontvang. Vandaar dan die naam "sungazer".<sup>2</sup> Figuur 2.1 is 'n foto van die ouvolk. *C. giganteus* se habitat word versprei in *Themeda* graslande of in oorgangsgebiede daarvan, in die noord-oos Vrystaat en die aanliggende gedeeltes van die weste van KwaZulu-Natal, asook suid-oos Mpumalanga<sup>1,2</sup> (Fig. 2.2.)<sup>1</sup>. Hulle is versprei oor 14 van die 48 magistraatsdistrikte van die Hoëveld Landboustreek (Fig. 2.3.)<sup>1</sup> Die ouvolk se dieet bestaan hoofsaaklik uit invertebrata soos byvoorbeeld kewers, sprinkane, termiete en spinnekoppe, en hulle sit en wag in 'n hinderlaag om sodoende hul prooi te bekom. *C. giganteus* het in aanhouding 'n leeftyd van meer as 20 jaar.<sup>2</sup>



Fig. 2.1: Die ouvolk, *Cordylus giganteus*.

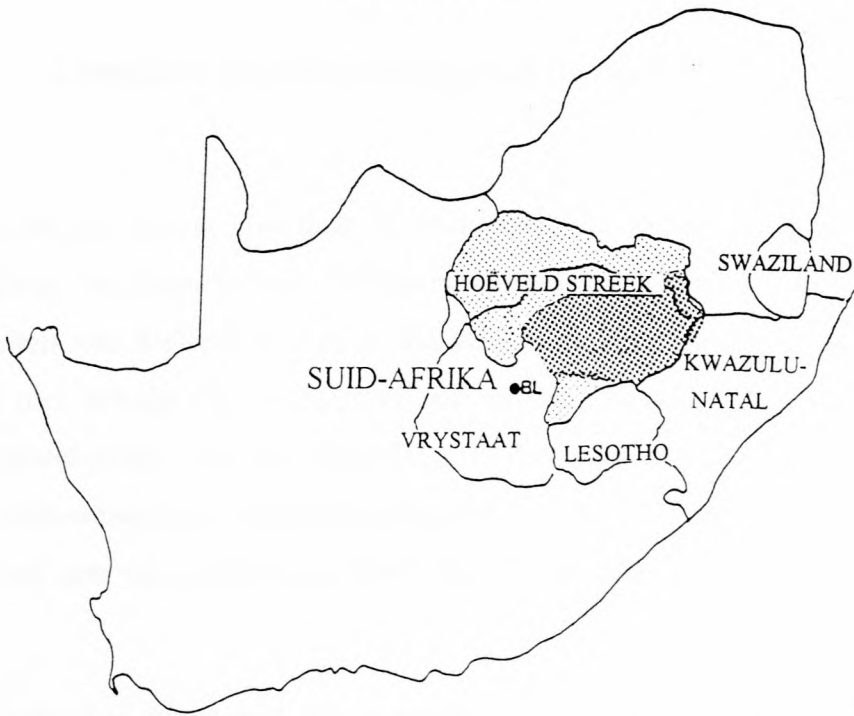


Fig. 2.2: Kaart van Suid-Afrika wat die verspreiding van *Cordylus giganteus* (donker skadu) in die Hoëveldstreek (ligte skadu) aandui. BL = Bloemfontein.

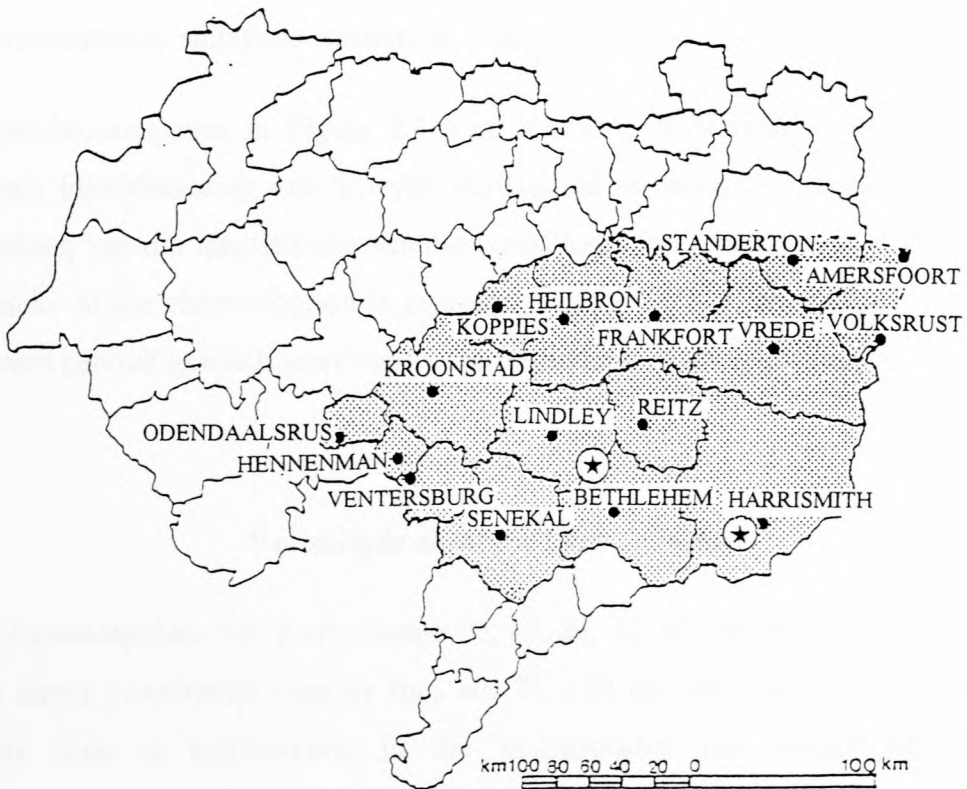


Fig 2.3: Kaart van die Hoëveldstreek wat die magistraatsdistrikte aandui waar *Cordylus giganteus* voorkom. Die sterre dui plekke aan waar daar al studies gedoen is.

## **Chemiese karakterisering van die afskeiding.**

Op elke dy van die ouvolk kom daar 10 tot 12 femorale porieë voor.<sup>2</sup> Die femorale klierafskeidings van mannetjie en wyfie akkedisse is by die Departement Soölogie aan die Universiteit van Stellenbosch en in die veld in die Vrystaat versamel, deur die afskeidings met behulp van 'n haartangetjie uit die femorale kliere te druk. Die dichlorometaanekstrakte van die afskeidings is met behulp van gaschromatografie (GC) en gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS) geanaliseer. 'n Kapillêre glaskolom wat met die apolêre stasionêre fase PS-089-OH belaag is, is vir analyses gebruik.

Die komponente van die ekstrak is met behulp van die lae-resolusie elektronimpak-massaspektra (EI-MS) van die GC-MS analyses, en gepubliseerde data geïdentifiseer. Hierdie identifikasies is daarna met behulp van gaschromatografie bevestig, deur die retensietye van die komponente van die ekstrak te vergelyk met die retensietye van die ooreenstemmende sintetiese standaarde, indien beskikbaar.

Die gaschromatogram in Figuur 2.4 a en b van 'n dichlorometaanekstrak van die femorale klierafskeiding van 'n wyfie akkedis, sal as verwysing gebruik word in die bespreking van die identifikasie van die verskillende komponente van die afskeiding. Die pieke in die chromatogram is genommer van 1 tot 173, en daar sal van hierdie nommers gebruik gemaak word om na die verbindings in die afskeiding te verwys.

### **Versadigde alifatiese karboksielsure**

Die EI-massaspektra van Komponente 10, 15, 24, 32, 47, 54, 67, 76, 87, 95 en 108, bevat almal prominente ione by  $m/z$  60, 73, 129 en 185 (Fig. 2.5 tot Fig. 2.15). Hierdie ione is kenmerkend in die massaspektra van langketting alifatiese karboksielsure.

## HOOFSTUK II

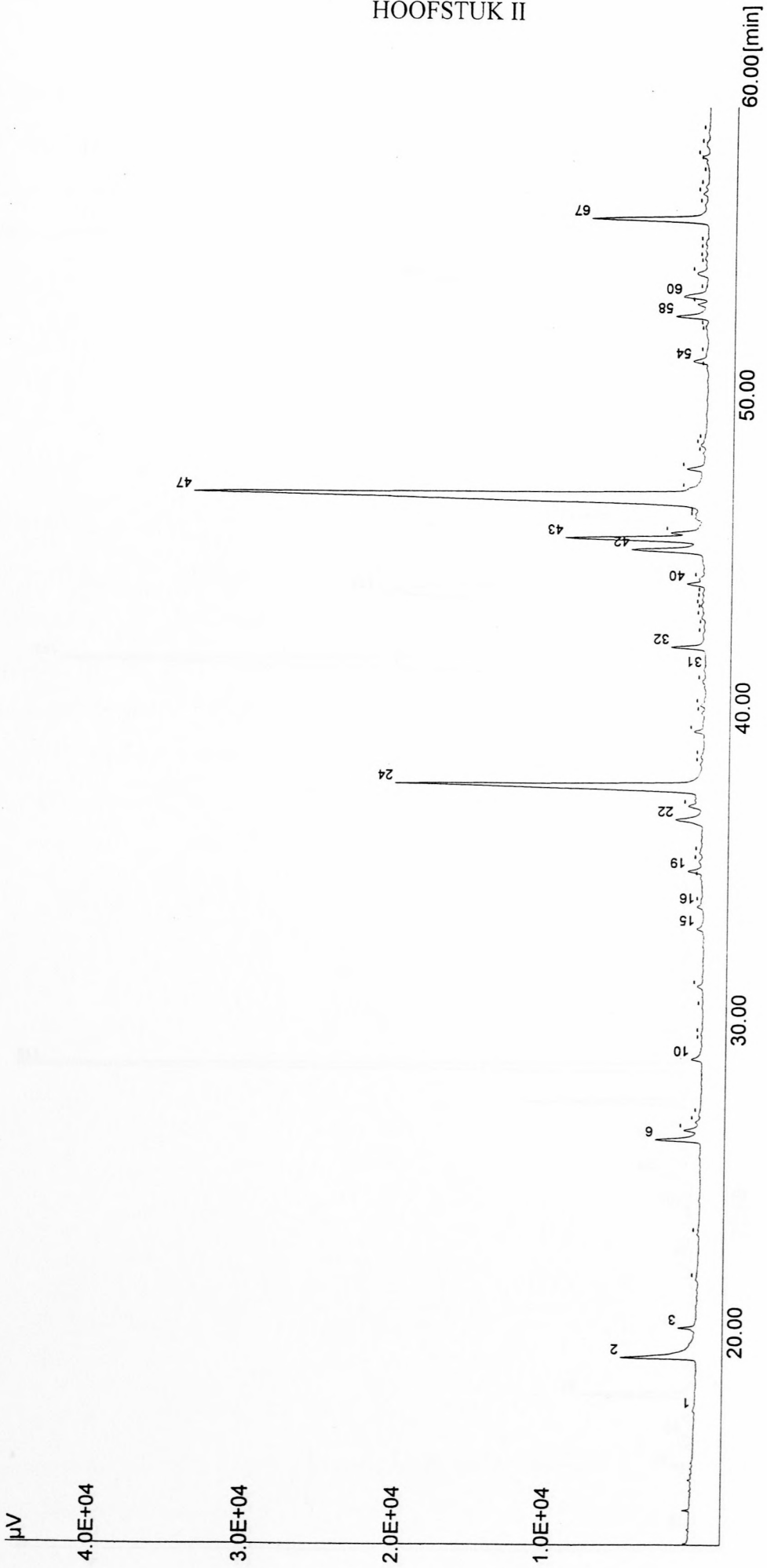


Fig. 2.4 a: Gaschromatografiese analise van die dichlorometaan ekstrak van die femorale klierafskeiding van die ouvolk, met PS-089-OH as stasionêre fase.

# HOOFSTUK II

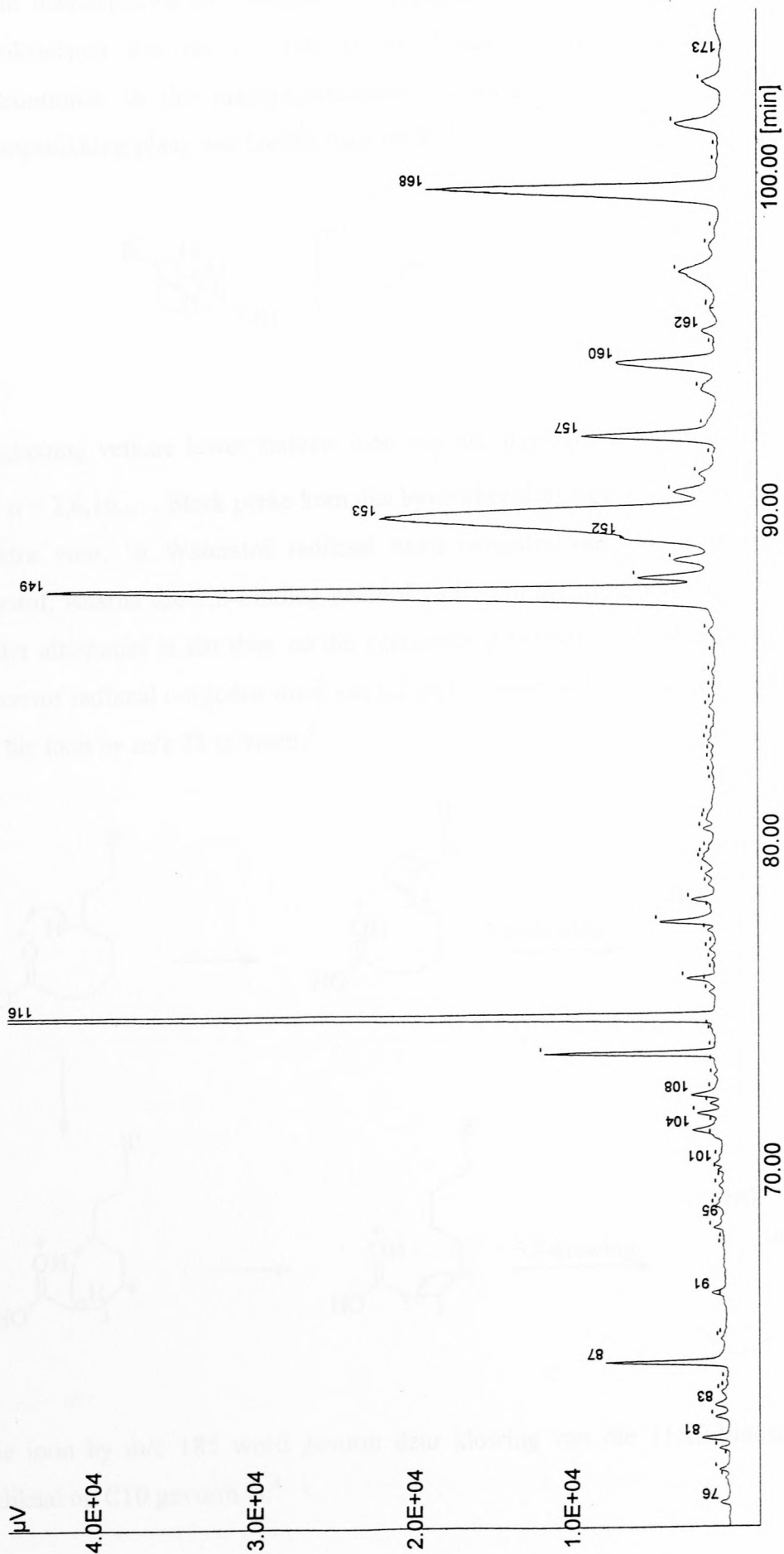
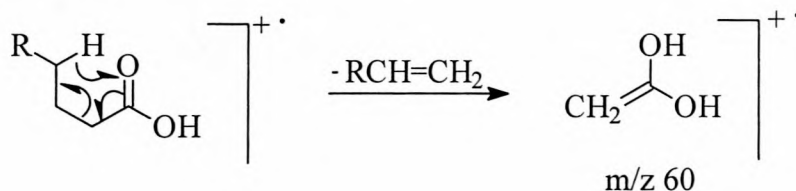
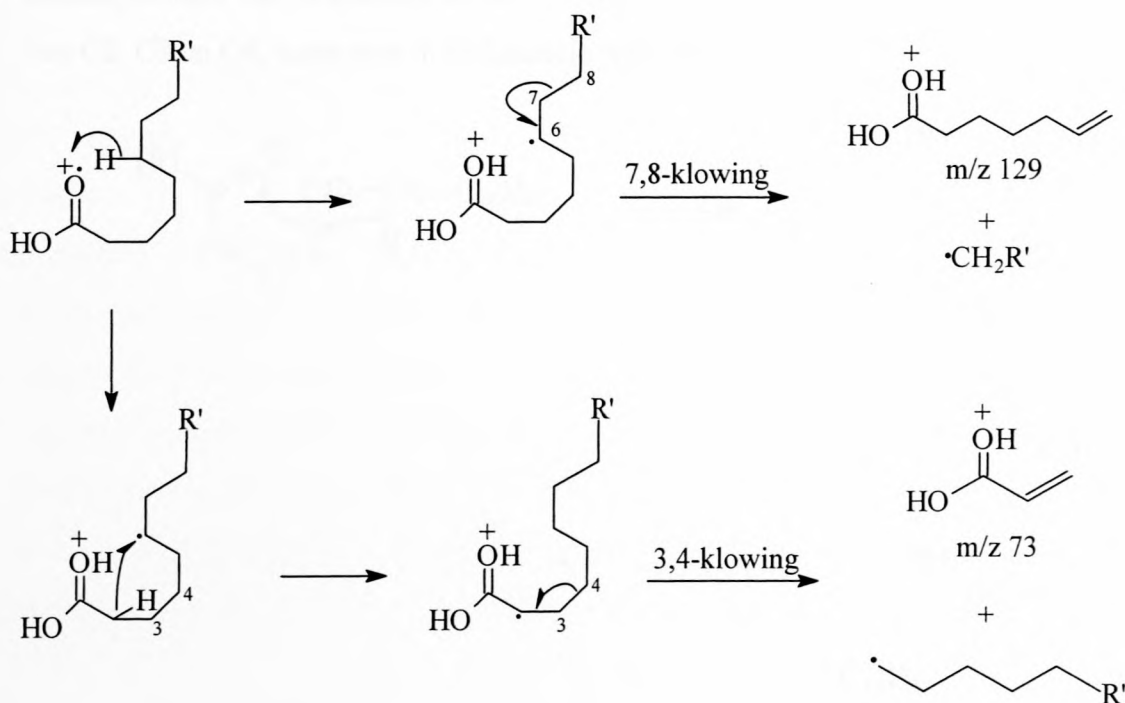


Fig. 2.4 b: Gaschromatografiese analise (vervolg) van die dichlorometaan ekstrak van die femorale klierafskeiding van die ouvolk, met PS-089-OH as stasionêre fase.

In die massaspektra van langketting karboksielsure dui 'n ioon by  $m/z$  60 op 'n karboksielsuur wat nie  $\alpha$ -vertak is nie. Nadat 'n alifatiese karboksielsuur deur elektronimpak in die massaspektrometer geïoniseer is, vind daar 'n McLafferty herrangskikking plaas wat hierdie ioon lewer:<sup>3</sup>

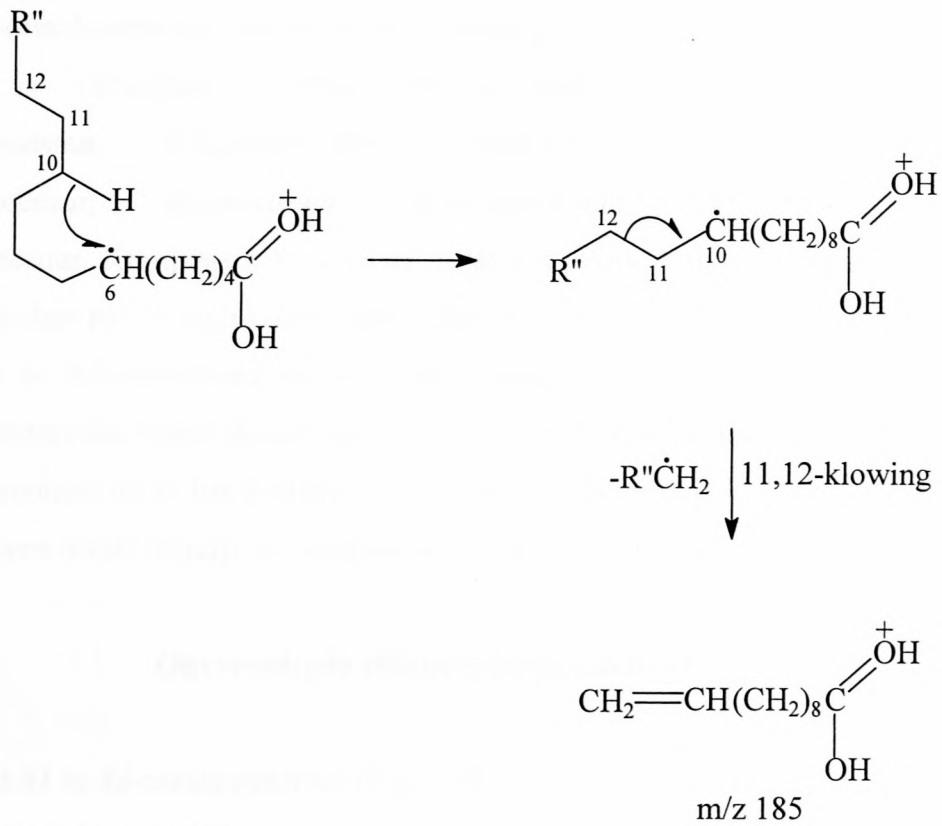


Langketting vetsure lewer stabiele ione met die algemene formule  $[(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]^+$ , met  $n = 2,6,10,\dots$ . Sterk pieke kom dus byvoorbeeld by  $m/z$  73, 129 en 185 in hierdie spektra voor. 'n Waterstof radikaal word oorgedra van C6 na die geïoniseerde suurstof, waarna die 7,8-binding gekloof word, om die ioon by  $m/z$  129 te vorm. 'n Ander alternatief is dat daar ná die genoemde waterstof oordrag 'n verdere waterstof radikaal oorgedra word van C2 na C6, waarna die 3,4-binding gekloof word om die ioon by  $m/z$  73 te vorm:<sup>4</sup>

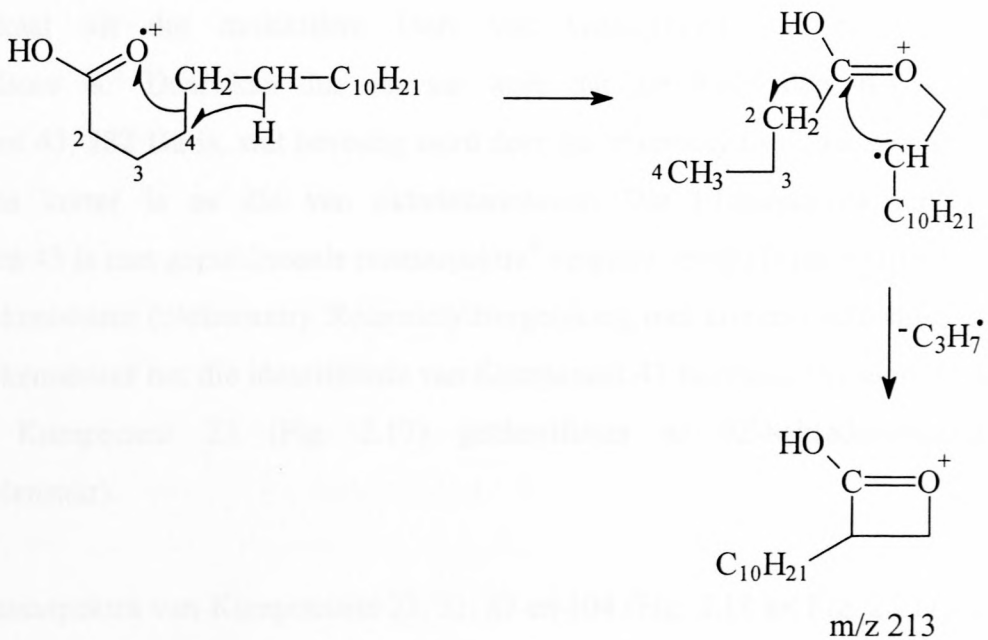


Die ioon by  $m/z$  185 word gevorm deur klowing van die 11,12-binding, nadat 'n radikaal op C10 gevorm is:<sup>4</sup>





In hierdie spektra is die M-43 ioon ook prominent, byvoorbeeld by m/z 213 in die massaspektrum van heksadekanoësuur. Hierdie ione word gevorm deur die eliminasië van C2, C3 en C4, saam met 'n addisionele waterstofatoom:<sup>4</sup>



Prominente molekulêre ione is ook meestal in die massaspektra van die alifatiese karboksiesure sigbaar, waaruit daar met inagneming van die M-43 ioon afgelei is

hoeveel koolstofatome die suur bevat. Komponente 10, 15, 24, 32, 47, 54, 67, 76, 87 en 108 is vervolgens geïdentifiseer as onderskeidelik tetradekanoësuur, pentadekanoësuur, heksadekanoësuur, heptadekanoësuur, oktadekanoësuur, nonadekanoësuur, ikosanoësuur, henikosanoësuur, dokosanoësuur en tetrakosanoësuur. Komponent 95 kom in 'n lae konsentrasie in die ekstrak voor, en gevolglik is daar nie 'n molekulêre ioon sigbaar nie. Hierdie komponent het 'n langer retensietyd as dokosanoësuur en 'n korter retensietyd as tetrakosanoësuur en die retensietydintervalle tussen Komponent 95 en elk van hierdie twee verbindings, is ewe groot. Komponent 95 is dus geïdentifiseer as trikosanoësuur. Die identifikasie van die karboksielsure is met behulp van retensietydvergelyking bevestig.

### **Onversadigde alifatiese karboksielsure**

Komponent 43 se EI-massaspektrum (Fig. 2.16) toon 'n prominente piek by  $m/z$  264, en 'n swak piek by  $m/z$  282, op grond waarvan aanvaar is dat laasgenoemde piek die molekulêre ioon verteenwoordig, en dat die ioon by  $m/z$  264 die  $M-H_2O$  ioon is. Die tipiese karboksielsuuriene by  $m/z$  60 en  $m/z$  73 kom wel voor, maar met 'n veel laer intensiteit as dié in die massaspektra van die versadigde karboksielsure. Daar is verder ook aanvaar dat die swak piek by  $m/z$  265 toegeskryf kan word aan die verlies van 'n OH radikaal uit die molekulêre ioon, wat kenmerkend van onversadigde karboksielsure is.<sup>5</sup> Daar kan dus aanvaar word dat die molekulêre massa van Komponent 43, 282 Da is, wat bevestig word deur die retensietyd van die verbinding wat effens korter is as dié van oktadekanoësuur. Die EI-massaspektrum van Komponent 43 is met gepubliseerde massaspektra<sup>6</sup> vergelyk, en dit is geïdentifiseer as 9Z-oktadekanoësuur (oleïensuur). Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese 9Z-oktadekanoësuur het die identifikasie van Komponent 43 bevestig. Op soortgelyke wyse is Komponent 22 (Fig. 2.17) geïdentifiseer as 9Z-heksadekanoësuur (palmitoleïensuur).

Die EI-massaspektra van Komponente 23, 31, 83 en 104 (Fig. 2.18 tot Fig. 2.21) toon ook die ione wat tipies in die massaspektra van karboksielsure van hierdie tipe met lae intensiteite voorkom by  $m/z$  60 en  $m/z$  73. Komponente 23 en 31 se retensietye is effens korter as dié van onderskeidelik Komponent 24 (heksadekanoësuur) en

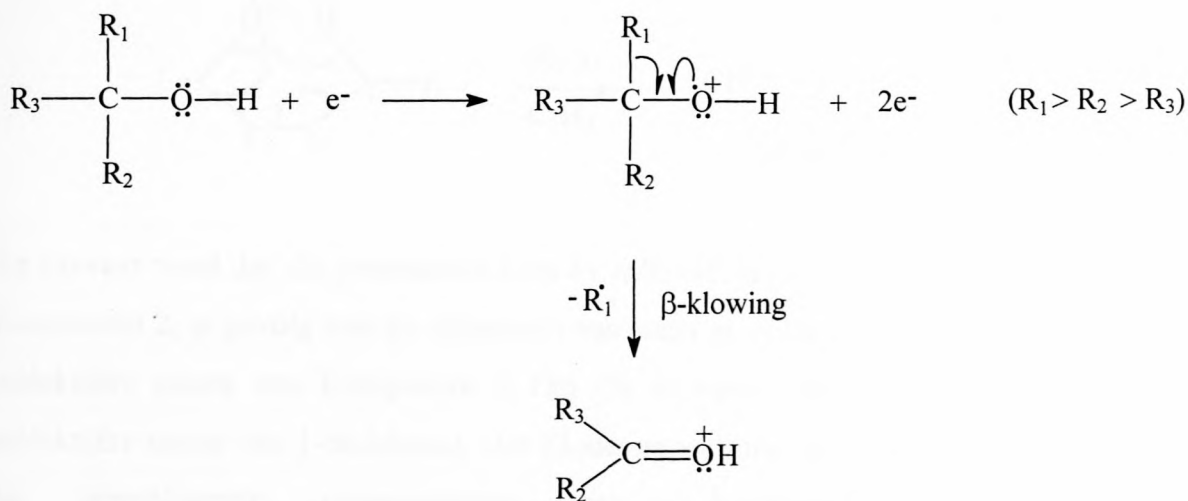
Komponent 32 (heptadekanoësuur), waarvan daar afgelei is dat hulle moontlik onversadige sure is. Komponent 23 is dus moontlik 'n heksadekanoësuur, terwyl Komponent 31 moontlik 'n heptadekanoësuur is. In 'n poging om die posisie van die dubbelbindings te bepaal, is die femorale klierafskeiding met dimetieldisulfied (DMDS) behandel, maar weens die kompleksiteit van die monster kon die posisie van die dubbelbindings nie vasgestel word nie en hierdie komponente is dus nie geïdentifiseer nie.

Daar is aanvaar dat die ione by  $m/z$  320 en  $m/z$  348 in die EI-massaspektra van onderskeidelik Komponent 83 en Komponent 104, aan die verlies van 'n molekule water uit die molekulêre ioon toegeskryf kan word, waarvan afgelei is dat beide hierdie komponente ook onversadige sure is. Komponent 83 se retensietyd is effens korter as dié van Komponent 87 (dokosanoësuur), en dit sou dus 'n dokosenoësuur kan wees. Komponent 104 se retensietyd is weer effens korter as dié van Komponent 108 (tetrakosanoësuur), waarvan afgelei is dat dit moontlik 'n tetrakosenoësuur is. Die posisie van die dubbelbindings in hierdie verbindings is eweneens onseker.

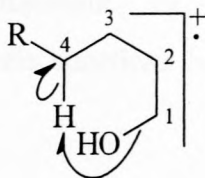
Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  280 in die EI-massaspektrum van Komponent 42 (Fig. 2.22), die verbinding se molekulêre ioon is. Die tipiese karboksielsuurione by  $m/z$  60 en  $m/z$  73 kom ook in die massaspektrum van Komponent 42 voor, weereens met 'n laer intensiteit as dié in die versadigde karboksielsure se massaspektra. Die molekulêre ioon verskyn in hierdie geval twee massaeenhede laer as die molekulêre ioon van 9Z-oktadekanoësuur, en aangesien Komponent 42 se retensietyd effens korter is as dié van 9Z-oktadekanoësuur, is vermoed dat Komponent 42 moontlik 'n oktadekadiënoësuur is. Deur vergelyking van die EI-massaspektrum van komponent 42 met gepubliseerde data<sup>7</sup> is hierdie komponent as 9Z,12Z-oktadekadiënoësuur (linoleïensuur) geïdentifiseer en retensietydvergelyking van Komponent 42 met die kommersiële sintetiese 9Z,12Z-oktadekadiënoësuur het die identifikasie bevestig. Op soortgelyke wyse is vasgestel dat Komponent 58 ook 'n onversadigde karboksielsuur is. Komponent 58 se EI-massaspektrum (Fig. 2.23) is met gepubliseerde massaspektra<sup>6</sup> vergelyk, en dit is as 8Z,11Z,14Z-ikosatriënoësuur geïdentifiseer.

### Versadigde alifatiese alkohole

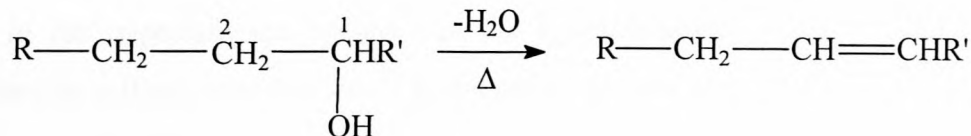
Die EI-massaspektra van Komponente 2 en 17 (Fig. 2.24 en Fig. 2.25) toon twee reekse pieke by  $m/z$  41, 55, 69,... en by  $m/z$  43, 57, 71,..., waarvan die intensiteit afneem met toename in die massa van die ione. Hierdie reekse kom tipies voor in die massaspektra van onvertakte langketting 1-alkohole<sup>8</sup> en 1-alkene. Die molekulêre ione van primêre en sekondêre alkohole is gewoonlik baie swak, en dié van tersiêre alkohole kan gewoonlik glad nie waargeneem word nie. Die belangrikste algemene fragmentasie wat by alkohole plaasvind, behels die klowing van die binding in die  $\beta$ -posisie ten opsigte van die suurstofatoom. In hierdie klowing word die grootste groep aan die  $\alpha$ -koolstofatoom meer gereedelik uit die molekulêre ioon geëlimineer soos volg:<sup>8,9</sup>



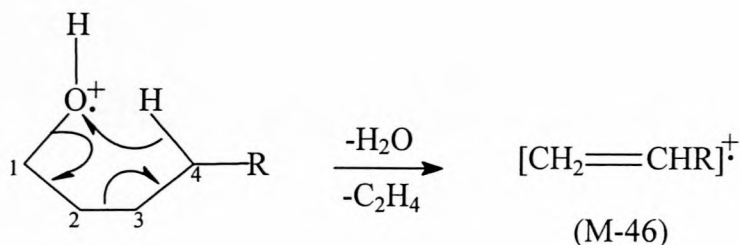
Die molekulêre ioon verloor baie gereedelik water om 'n  $M - \text{H}_2\text{O}$  ioon te vorm. Hierdie proses vind oorheersend plaas deur middel van 'n 1,4-eliminasië van water waarskynlik *via* die volgende intermediêre sikliese stuktuur:<sup>8</sup>



Verlies van water kan ook plaasvind deur middel van 'n 1,2-eliminasië tydens termiese dehidrasie, wat deur die warm inlaatsisteem bevorder kan word, voordat ionisasie plaasvind:<sup>8,9</sup>



Die opeenvolgende eliminasië van water en etileen word ook gewoonlik waargeneem by alkohole met meer as drie koolstofatome. 'n Prominente M-46 ion word dus hierdeur gevorm:<sup>8,9</sup>

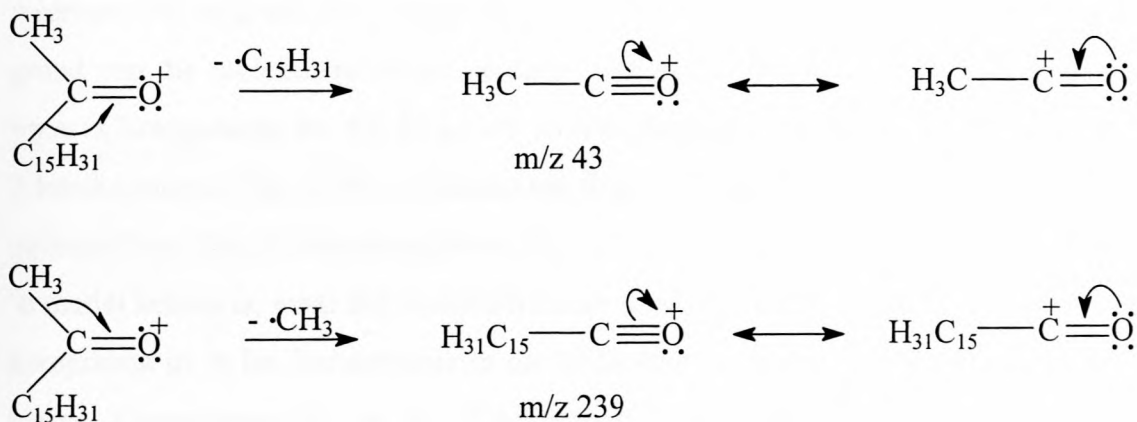


As aanvaar word dat die prominente ion by  $m/z$  140 in die EI-massaspektrum van Komponent 2, as gevolg van die eliminasië van water en etileen ontstaan, behoort die molekulêre massa van Komponent 2 186 Da te wees, wat ooreenstem met die molekulêre massa van 1-dodekanol. Die EI-massaspektrum van Komponent 2 is met die gepubliseerde massaspektrum van 1-dodekanol<sup>10</sup> vergelyk en retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese 1-alkanole het die identifikasie van hierdie komponent as 1-dodekanol bevestig.

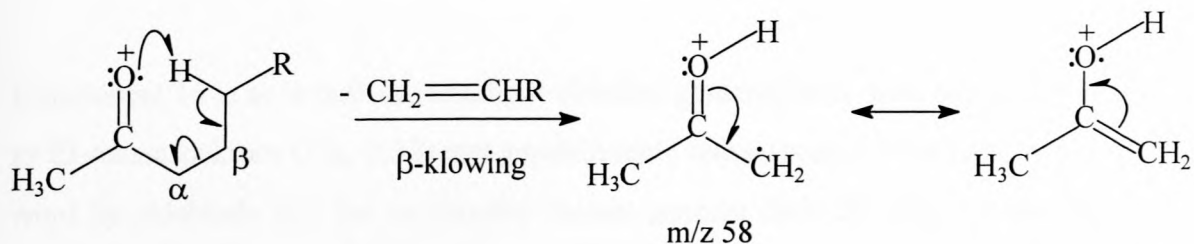
Komponent 17 se EI-massaspektrum vertoon dieselfde basiese struktuur as dié van Komponent 2, maar aangesien Komponent 17 in 'n lae konsentrasie in die ekstrak voorkom, is geen M-46 ion waargeneem nie. Komponent 17 het egter 'n korter retensietyd as heksadekanoësuur, maar 'n langer retensietyd as pentadekanoësuur, en daar is dus vermoed dat Komponent 17 1-heksadekanol kan wees. Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese 1-heksadekanol, het bevestig dat Komponent 17 wel 1-heksadekanol is.

## Versadigde alifatiese ketone

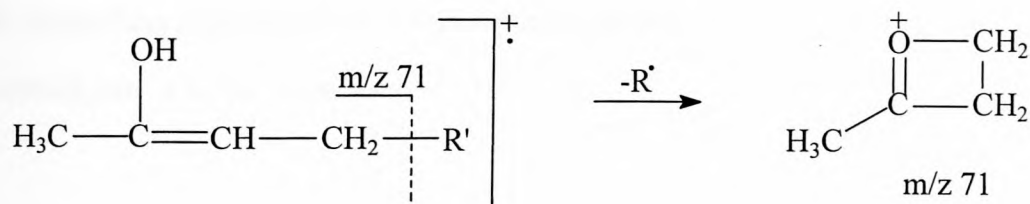
Die molekulêre ioon word gewoonlik duidelik in die massaspektra van ketone waargeneem.<sup>11</sup> Prominente ione word ook gevorm weens die klowing van die C-C binding in die  $\alpha$ -posisie ten opsigte van die karbonielgroep, om die resonansiegestabiliseerde asilium ioon te vorm.<sup>12</sup> In die geval van byvoorbeeld 2-heptadekanoon vind dit soos volg plaas:



Die EI-massaspektrum van Komponent 19 (Fig. 2.26) se basispiek word by m/z 43 waargeneem, en daar is ook 'n baie sterk piek by m/z 58. Hierdie prominente pieke kom altyd in die massaspektra van metielketone voor.<sup>13</sup> Die ioon by m/z 58 word gevorm by metielketone wat 'n  $\gamma$ -waterstof bevat,<sup>14</sup> deurdat  $\beta$ -klowing plaasvind deur middel van 'n McLafferty herrangskikking:<sup>12</sup>



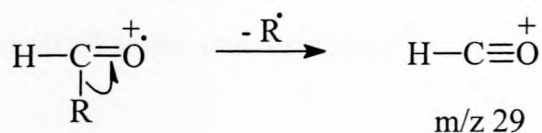
'n Fragmentasie wat moontlik kan bydra tot die intensiteit van die prominente piek by m/z 71, is die eenvoudige  $\gamma$ -klowing. Die dryfkrag van hierdie fragmentasie hou moontlik verband met die breking van die alliliese binding in die enol vorm, of die vorming van 'n sikliese oksonium ioon na die binding gebreek het.<sup>13</sup>



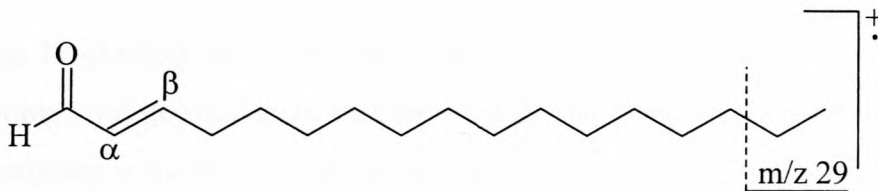
Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  254 in die massaspektrum van Komponent 19, die molekulêre ioon verteenwoordig. Die piek by  $m/z$  239 is dus die M-15 ioon wat weens die verlies van die metiel groep, deur middel van  $\alpha$ -klowing, ontstaan. Dit staaf weereens die aanname dat Komponent 19 'n metielketoon is, en vervolgens is dit op grond van die molekulêre massa geïdentifiseer as 2-heptadekanoon. Op soortgelyke wyse is Komponente 40, 60, 81 en 101 as onderskeidelik 2-nonadekanoon (Fig. 2.27), 2-henikosanoon (Fig. 2.28), 2-trikosanoon (Fig. 2.29) en 2-pentakosanoon (Fig. 2.30) geïdentifiseer. Die EI-massaspektrum (Fig. 2.31) van Komponent 91 toon ook dat dit 'n metiel ketoon is, maar die molekulêre ioon word nie waargeneem nie omdat hierdie komponent in 'n lae konsentrasie in die afskeiding voorkom. Die retensietydinterval tussen Komponente 91 en 81 (2-trikosanoon), is egter dieselfde as dié tussen Komponente 91 en 101 (2-pentakosanoon), waarvolgens Komponent 91 dus as 2-tetrakosanoon geïdentifiseer is. Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese 2-heptadekanoon en 2-nonadekanoon het die identifikasies van Komponente 19 en 40 bevestig. Die identifikasie van Komponente 60, 81, 91 en 101 is ondersteun deur hul relatiewe retensietyd met dié van Komponente 19 en 40 te vergelyk.

### Onversadigde alifatiese aldehyd

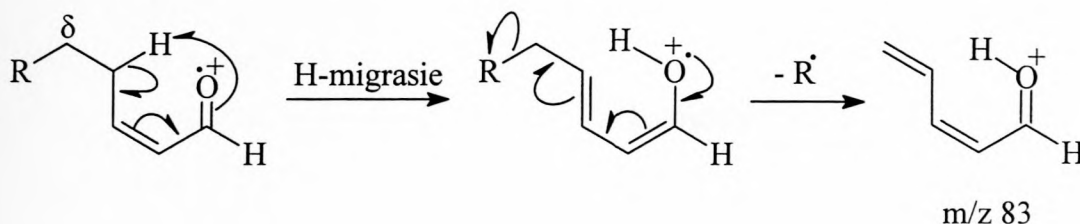
Komponent 16 is as 'n  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyd geïdentifiseer, deur vergelyking van sy EI-massaspektrum (Fig. 2.32) met gepubliseerde massaspektra.<sup>6</sup> Die ioon by  $m/z$  29 word by aldehyde met lae molekulêre massas gevorm deur die klowing van die  $\alpha$ -binding:<sup>15</sup>



By langketting aldehyede met hoë molekulêre massas word hierdie piek egter aan die vorming van 'n  $C_2H_5^+$  ioon toegeskryf.<sup>15</sup>



Die herrangskikking met die gepaardgaande verlies van die  $\delta$ -alkiel groep uit die molekulêre ioon, wat in die geval van Komponent 16 die ioon by  $m/z$  83 vorm, is kenmerkend van die massaspektra van  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyede en ketone:<sup>16</sup>

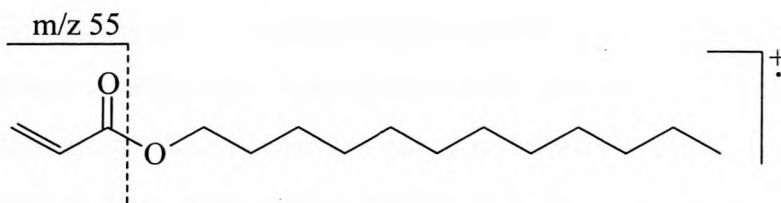


GC analise van die beskikbare sintetiese standaarde, 13*Z*-oktadekenaal en 9*Z*-heksadekenaal, het getoon dat die retensietyd van Komponent 16 korter is as die retensietyd van 13*Z*-oktadekenaal en langer as dié van 9*Z*-heksadekenaal. Deur sy relatiewe retensietyd in ag te neem, is Komponent 16 as 2*Z*- of 2*E*-heptadekenaal geïdentifiseer.

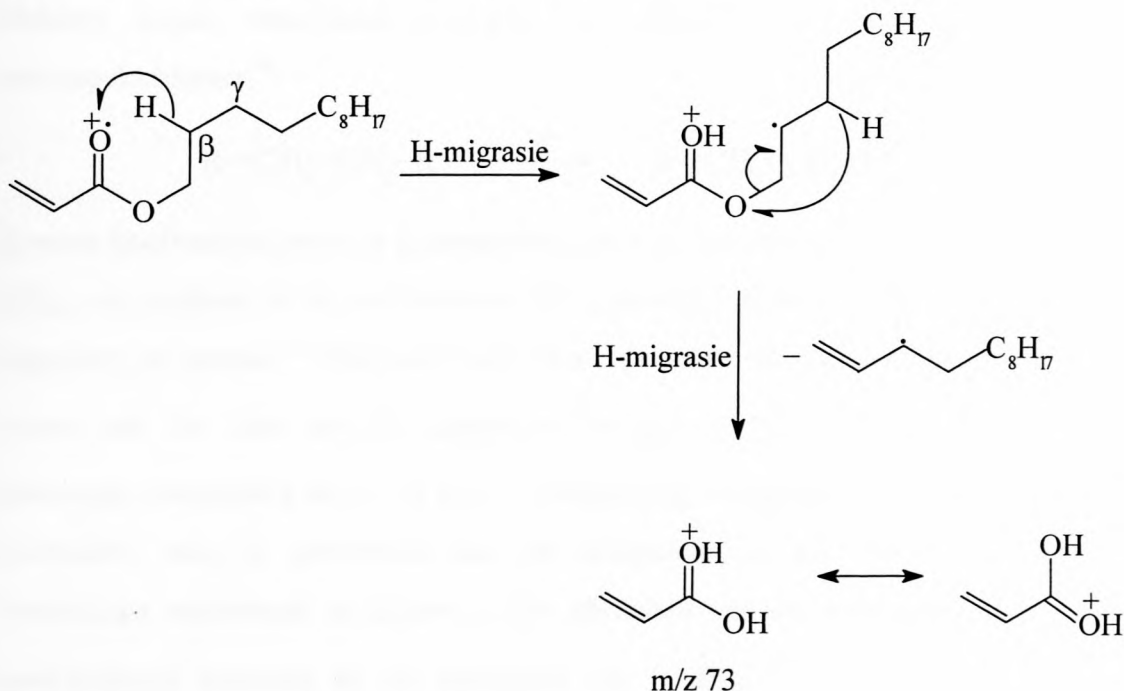
### Alifatiese esters

Deur die EI-massaspektrum van Komponent 6 (Fig. 2.33) met gepubliseerde massaspektra<sup>17</sup> te vergelyk, is hierdie komponent as óf dekiel-, óf dodekielpropenoaat geïdentifiseer. Die basispiek by  $m/z$  55 word gevorm deur die klowing van die binding tussen die karbonielkoolstof en die suurstofatoom:<sup>18</sup>





Esters van langketting alkohole vorm diagnostiese ione deur die eliminasië van die alkiel ketting, wat gepaard gaan met die oordrag van twee waterstofatome.<sup>18</sup> Tydens die fragmentasie word die waterstofatome vanaf die  $\beta$ - en  $\gamma$ -posisies oorgedra<sup>19</sup>, om in die geval van Komponent 6 die ioon by  $m/z$  73 te vorm:



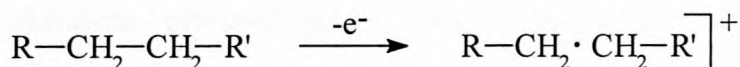
Retensietydvergelyking met gesintetiseerde dekielpropenoaat en dodekielpropenoaat het bevestig dat Komponent 6 dodekielpropenoaat is.

Vergelyking van die EI-massaspektrum van Komponent 7 (Fig. 2.34) met gepubliseerde massaspektra<sup>6,17</sup> het daarop gedui dat hierdie verbinding moontlik 'n alkohol, alkeen, of metiel ester kan wees. Die prominente ioon by  $m/z$  75 het egter bevestig dat Komponent 7 nie een van hierdie verbindingstipes kan wees nie. Deur van gaschromatografie-hoë-resolusie-massaspektrometrie (GC-HR-MS) gebruik te maak, is die akkurate massas van die basispiek en die  $m/z$  75 ioon onderskeidelik as 57.03595 en 75.04503 bepaal. Hieruit is bereken dat die molekulêre formules van hierdie ione onderskeidelik  $H_5C_3O$  en  $H_7C_3O_2$  is. Een van die moontlikhede wat hieruit ontstaan het, is dat die ione by  $m/z$  57 en  $m/z$  75 die versadigde vorms is van

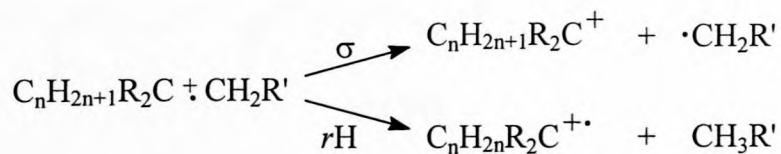
onderskeidelik die ione by  $m/z$  55 en  $m/z$  73 in die massaspektrum van Komponent 6. Hierdie moontlikheid is ondersteun deur die feit dat Komponent 7 kort na komponent 6 uit die GC-kolom elueer. Komponent 7 is dus as dodekielpropanoaat geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensiedyvergeliking met die gesintetiseerde standaard bevestig.

### n-Pentakosaan

Elektron impak veroorsaak ionisasie van alifatiese koolwaterstowwe in die massaspektrometer:<sup>20</sup>



Gewone koolwaterstowwe se massaspektra toon groepe pieke wat 14 massa eenhede ( $\text{CH}_2$ ) van mekaar af is, en waarvan die intensiteite afneem met toename in die fragmente se massas.<sup>21</sup> Die mees prominente pieke in elk van hierdie groepe stem ooreen met die ione met die algemene formules  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$  en  $[\text{C}_n\text{H}_{2n-1}]^+$ , met maksimum intensiteite vir  $n = 3$  en  $4$ .<sup>20</sup> Langketting, versadigde koolwaterstowwe se molekulêre ione is gewoonlik met lae intensiteite in die spektra aanwesig.<sup>22</sup> Vertakkings veroorsaak 'n afname in die intensiteit van die molekulêre ioon en 'n karakteristieke toename in die intensiteit van  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$  en  $[\text{C}_n\text{H}_{2n}]^+$  ione wat gevorm word. Klowing vind plaas by die vertakte koolstofatoom wat die lading behou. Verlies van die grootste alkiel groep vind by voorkeur plaas.<sup>20</sup>



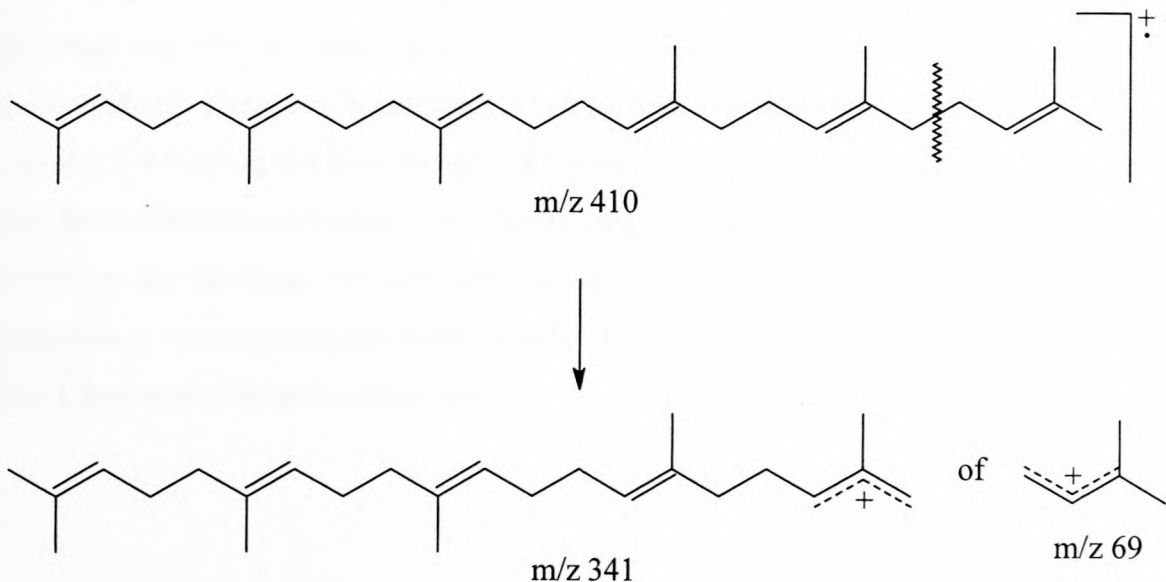
( $r\text{H}$  = waterstof herrangskikking)

Die EI-massaspektrum van Komponent 80 (Fig. 2.35) toon hierdie groepe pieke wat 14 massa eenhede van mekaar af is, maar geen molekulêre ioon is waarneembaar nie. Deur die EI-massaspektrum van Komponent 80 met gepubliseerde massaspektra<sup>6</sup> te vergelyk, is dit as 'n versadigde alifatiese koolwaterstof geïdentifiseer. Komponent 80

is deur retensietydvergelyking met sintetiese standaarde as n-pentakosaan geïdentifiseer.

### Skwaleen

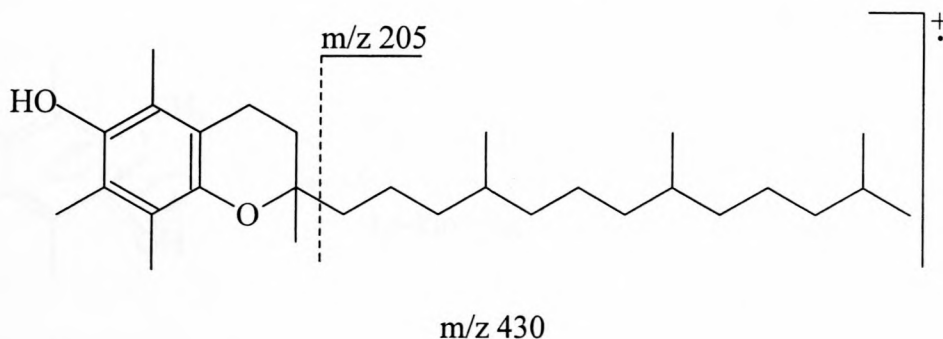
In die EI-massaspektrum van Komponent 116 (Fig. 2.36) kom die basispiek by  $m/z$  69 en 'n verdere prominente piek by  $m/z$  81 voor. 'n Klein piek wat moontlik die molekulêre ioon kan verteenwoordig, kom by  $m/z$  410 voor. 'n Verbinding met 'n soortgelyke spektrum is voorheen in 'n GC-MS-analise van die dorsale klierafskeiding van die springbok gevind, en is op grond van onder andere die verbinding se  $^1\text{H}$  KMR spektrum as skwaleen geïdentifiseer.<sup>23</sup> Deur vergelyking van die betrokke massaspektrum met gepubliseerde massaspektra<sup>6</sup>, is Komponent 116 as skwaleen geïdentifiseer. Die basispiek verteenwoordig die  $m/z$  69 ioon wat deur die alliliese klowing van die 4,5-binding gevorm word. Hierdie klowing word bevorder aangesien die betrokke binding bi-allilies is:<sup>24</sup>



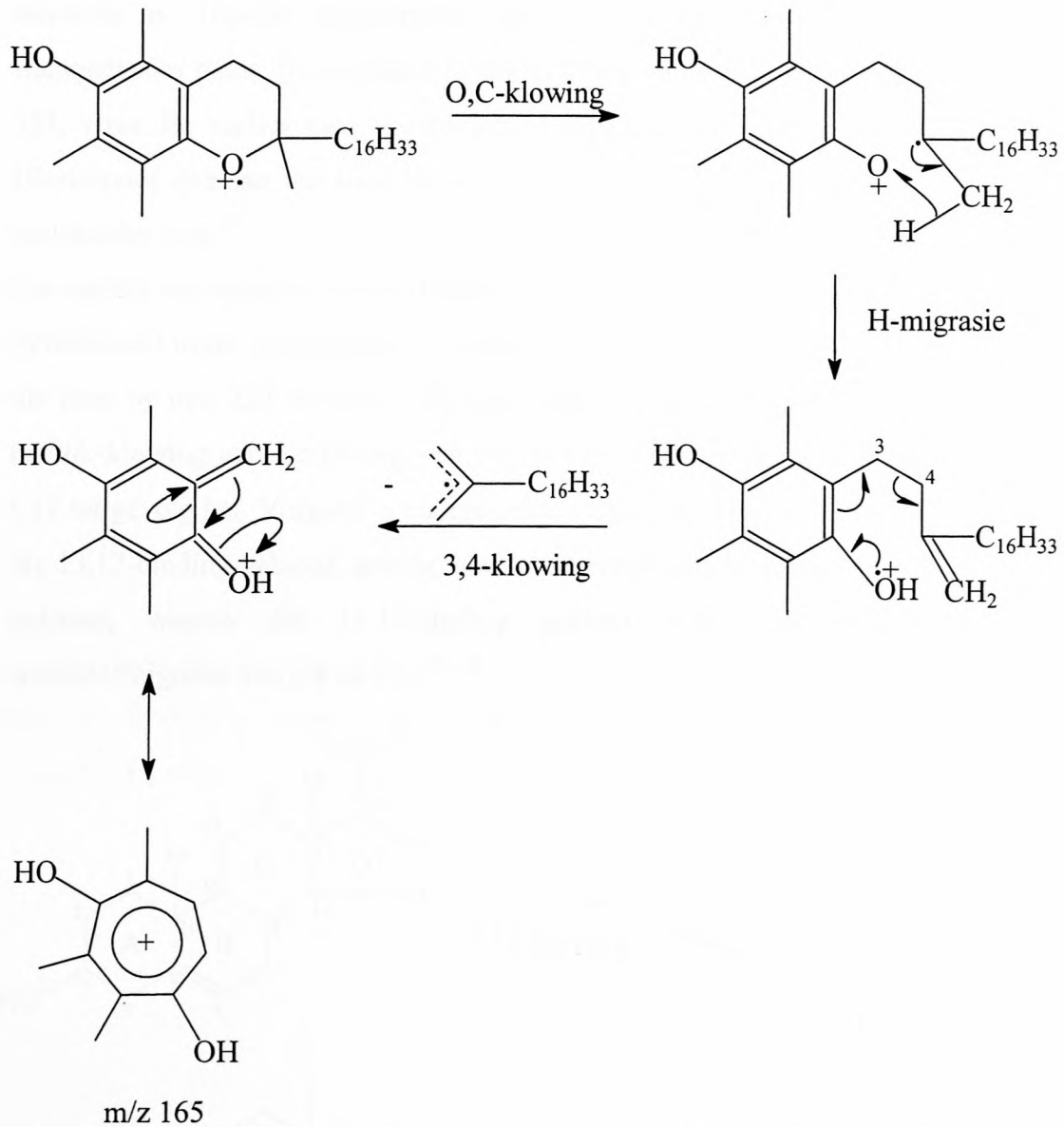
Die lading kan ook op die ander fragment van die molekule bly om die  $m/z$  69 ioon by  $m/z$  431 te lewer. Retensietydvergelyking met kommersiële beskikbare skwaleen het die identifikasie bevestig.

**$\alpha$ -Tokoferol**

Die EI-massaspektrum van Komponent 152 (Fig. 2.37) toon 'n basispiek by  $m/z$  165 en 'n prominente piek by  $m/z$  430, wat moontlik die molekulêre ion kan verteenwoordig. Deur die EI-massaspektrum met gepubliseerde massaspektra<sup>17</sup> te vergelyk, is Komponent 152 as  $\alpha$ -tokoferol (vitamien E) geïdentifiseer.



Die ion by  $m/z$  205 ontstaan deur die verlies van die syketting en die basispiek word deur 'n proses wat die klowing van die nie-aromatiese ring behels, gevorm. Na klowing van die O-C-binding vind waterstofoordrag van die metielgroep na die suurstofatoom plaas, om 'n radikaalkatoom te lewer wat deur die homolitiese splyting van die 3,4-binding die ion by  $m/z$  165 lewer. Die partiële radikaalkatoomkarakter van die suurstofatoom in die heterosikliese ring van die molekulêre ion, kan beskou word as die dryfkrag vir die klowing van die O-C-binding.<sup>25</sup> 'n Voorgestelde meganisme waarvolgens die ion by  $m/z$  165 vanuit die molekulêre ion gevorm word, kan soos volg geformuleer word:



Retensietydvergelyking met sintetiese  $\alpha$ -tokoferol het die identifikasie bevestig.

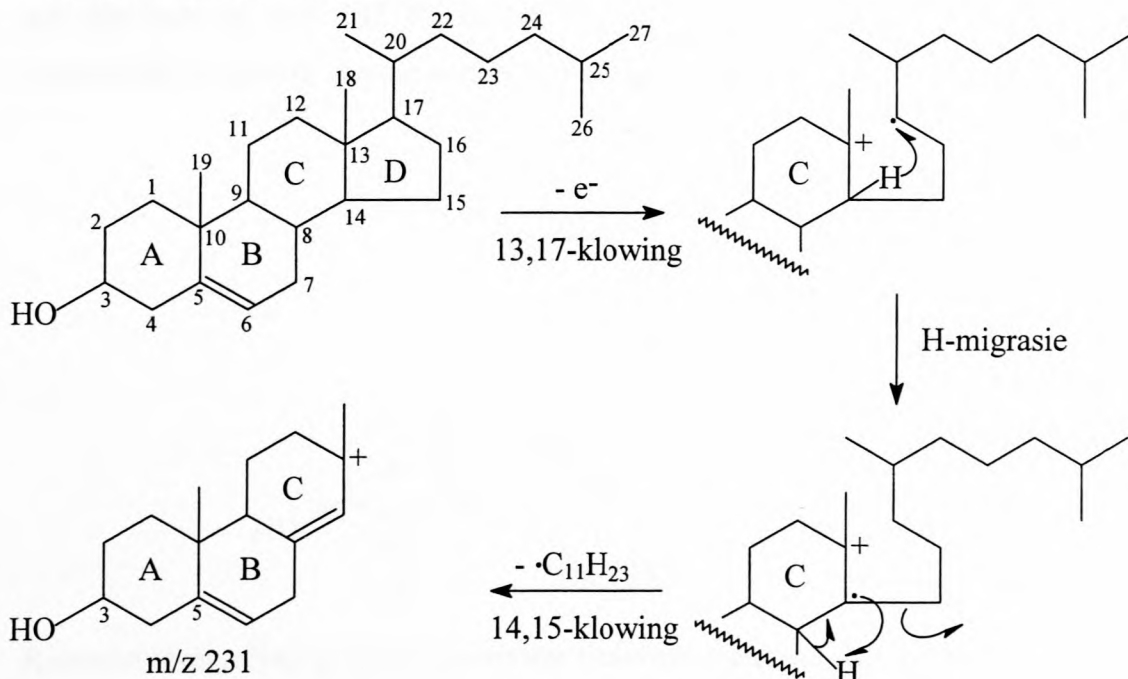
## Steroïede

### Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol

Die EI-massaspektrum van Komponent 149 (Fig. 2.38 a) het prominente pieke by  $m/z$  145, 213, 231, 255, 275, 301, 353, 368 en 386. 'n Piek wat moontlik die molekulêre ioon verteenwoordig, kom by  $m/z$  386 voor. Deur vergelyking van die EI-massaspektrum met gepubliseerde massaspektra,<sup>17</sup> is Komponent 149 geïdentifiseer as cholest-5-en-3 $\beta$ -ol (cholesterol). Die ioon by  $m/z$  371, dit wil sê  $[M-15]^+$ , word gevorm deur die verlies van 'n metiel groep, wat 'n karakteristieke fragmentasie van

steroïede is. Hierdie fragmentasie vind ook dikwels gekombineerd met ander fragmentasies plaas, byvoorbeeld by die vorming van die M-(15 + 18) ioon met m/z 353, waar die verlies van 'n metielgroep gepaard gaan met die verlies van water. Hierteenoor ontstaan die ioon by m/z 368 deur die verlies van slegs water uit die molekulêre ioon.<sup>26</sup>

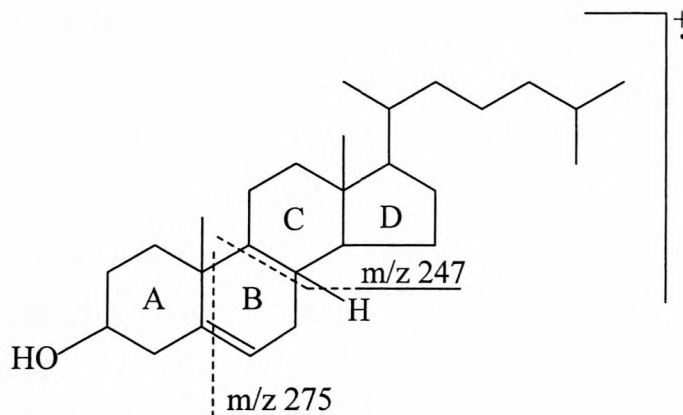
Die verlies van water vind ook dikwels gekombineerd met ander fragmentasies plaas, byvoorbeeld in die geval waar die syketting op C17 asook water geëlimineer word, om die ioon by m/z 255 te vorm.<sup>26</sup> Steroïede wat 'n syketting op C17 bevat, ondervind maklik klowing van die D-ring, wat verlies van die syketting saam met C15, C16, en C17 tot gevolg het. Volgens 'n voorgestelde meganisme vir hierdie fragmentasie word die 13,17-binding gekloof, gevolg deur 'n waterstofoordrag van C14 na die gevormde radikaal, waarna die 14,15-binding gekloof word, gepaardgaande met 'n waterstofmigrasie van C8 na C14:<sup>27,28</sup>



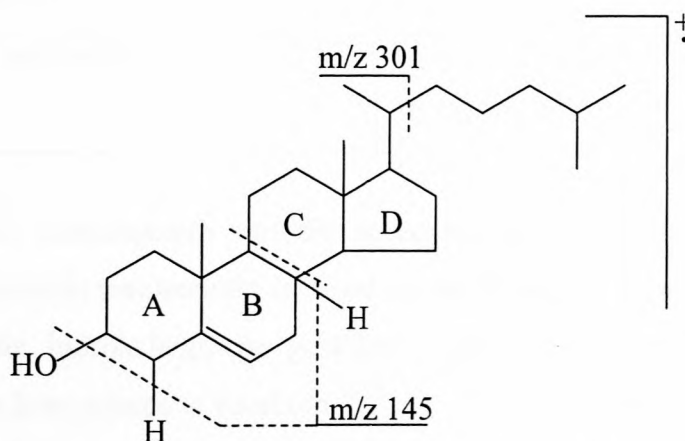
Die ioon by m/z 231 ontstaan dus op hierdie wyse, en as hierdie fragmentasie gepaard gaan met die verlies van water, word 'n ioon by m/z 213 gevorm.

Die ione by m/z 247 en m/z 275 ontstaan deur die klowing van die B-ring. Daar is opgemerk dat die ioon by m/z 275 nie prominent is as die B-ring versadig is nie en die fragmentasie is dus moontlik afhanklik van die aanwesigheid van 'n C5-dubbelbinding in die verbinding. Hierdie ioon word vermoedelik gevorm deur die klowing van die 9,10- en die 5,6-bindings. Ten einde laasgenoemde klowing moontlik

te maak, moet daar dus 'n verskuiwing van die dubbelbinding plaasvind, aangesien verwag word dat 'n enkelbinding meer gereedlik as 'n dubbelbinding gebreek sal word:<sup>26</sup>



Kloring van die C-ring, gepaardgaande met die verlies van water, het die vorming van die ion by  $m/z$  145 tot gevolg<sup>26</sup> en die ion by  $m/z$  301 (M-85) ontstaan waarskynlik as gevolg van die verlies van  $C_6H_{13}$  uit die syketting.<sup>29</sup>



Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese materiaal, het die identifikasie van Komponent 149 as cholest-5-en-3 $\beta$ -ol bevestig.

'n Aanvaarde metode vir die GC-MS identifikasie van sterioëde is die analise van die massaspektra van die metoksiem-trimetielsilieleterderivate (MO-TMS-derivate) van die sterioëde wat karbonielgroepe bevat. Die sterioëde se hidroksielgroepe word terselfdertyd na trimetielsilieleters (TMS-eters) omgesit, wat laer polariteit as die uitgangsverbindinge het en wat dus goeie gas-chromatografiese eienskappe toon.

Vergelyk Tabel 2.1 in verband met die retensietyd verskil tussen die steroïede en hul derivate. Klowings wat deur die hidroksielgroep beïnvloed word, is dikwels meer

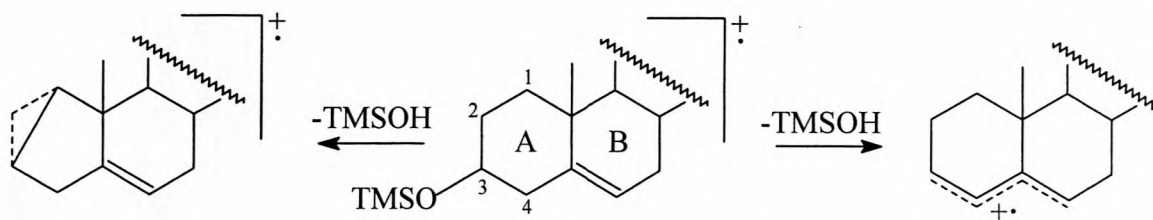
Tabel 2.1: Die retensietye van die steroïede geïdentifiseer in die femorale klierafskeiding van die ouvolk, *Cordylus giganteus*, en die retensietye van hul ooreenstemmende trimetielsiliel-derivate (TMS-derivate).

Komponent nommer	Steroïed	Rt (min.)	TMS-derivaat	Rt (min.)	$\Delta$ Rt (min.)
149	Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	78.414	Cholest-5-en-3 $\beta$ -OTMS	80.738	2.324
153	Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	79.816	Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -OTMS	82.428	2.612
157	Ongeïdentifiseerde steroïed	81.438	Ongeïdentifiseerde steroïed se derivaat	84.856	3.418
160	Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	82.828	Ergost-5-en-3 $\beta$ -OTMS	85.561	2.733
168	Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol	86.110	Lanost-8-en-3 $\beta$ -OTMS	87.620	1.510
171	Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	87.282	Stigmast-5-en-3 $\beta$ -OTMS	90.356	3.074
172	Lanosterol	88.101	Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -OTMS	89.704	1.603

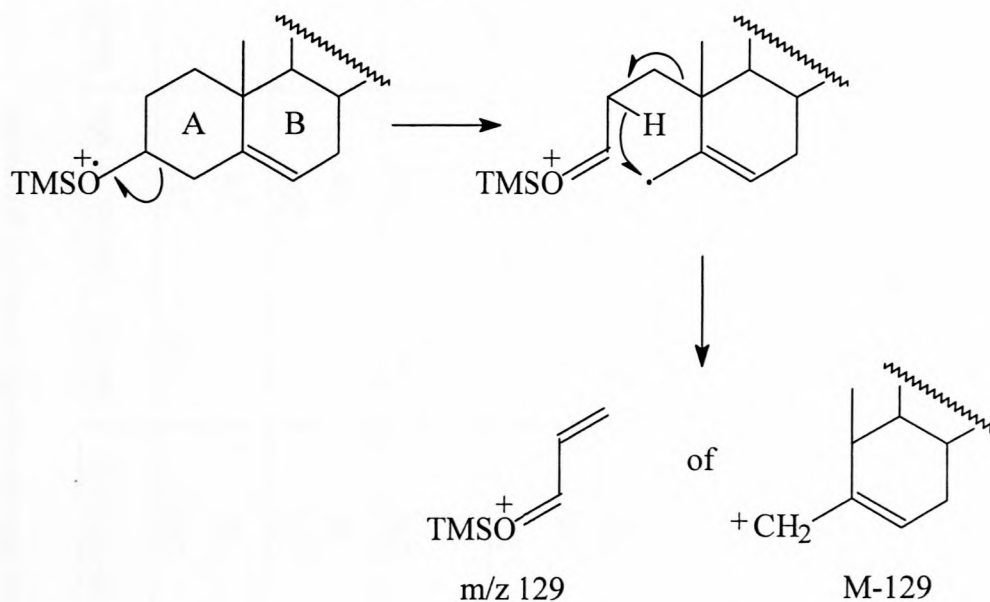
prominent in die massaspektra van die ooreenstemmende TMS-eters.<sup>30</sup> As keto-groepe in die steroïede teenwoordig is, word die metieloksiemderivate (MO-derivate) berei voordat die hidroksielgroepe gesilileer word, om die vorming van TMS-enoleters met die keto-groepe te voorkom.<sup>31,32</sup>

Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  458 in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 149 (Fig. 2.38 b) die molekulêre ioon is. Die pieke by  $m/z$  443, 368 en 353 verteenwoordig dus onderskeidelik die M-15, M-TMSOH en die M-(TMSOH + 15) ione. Die pieke in die massaspektrum by  $m/z$  73 en 75 verteenwoordig onderskeidelik die  $[(CH_3)_3Si]^+$  en  $[(CH_3)_2SiOH]^+$  ione.<sup>33</sup> Vanaf die TMS-eter van cholesterol kan beide 'n 1,3-eliminasië van TMSOH (wat die oordrag van H1 behels) en 'n 1,2-eliminasië (wat die oordrag van H4 behels) plaasvind:





Die delokalisering van die ioon radikaal oor vier koolstofatome wat die aktiveringsenergiekomponent van die reaksie effektief kan verlaag, kan as die dryfkrag vir die laasgenoemde eliminasië beskou word.<sup>34</sup> Die karakteristieke ioon by  $m/z$  129 (basispiek) en die ioon by  $m/z$  329 (M-129) is kenmerkend van  $\Delta^5$ -3-hidroksisteroïede, en word soos volg gevorm:<sup>33,35,36</sup>



Die verlies van die syketting gepaardgaande met die verlies van TMSOH, lewer die ioon by  $m/z$  255. Die klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van TMSOH lewer die ioon by  $m/z$  213. Die ione by  $m/z$  247 en  $m/z$  275 ontstaan deur die klowing van die B-ring, net soos by die ongederivatiseerde cholesterol. Klowing van die C-ring gepaardgaande met die verlies van TMSOH lewer die ioon by  $m/z$  145. 'n Samevatting van sommige kenmerkende ione in die massaspektra van die TMS-derivate van die steroïede wat hier bespreek word, word in Tabel 2.2 gegee.

## HOOFSTUK II

Tabel 2.2: Sommige kenmerkende fragmente en hulle genormaliseerde intensiteite (kursief) van die TMS-derivate van die steroïede geïdentifiseer in die femorale klierafskeiding van die ouvolk, *Cordylus giganteus*.

TMS-derivaat van:	M	M-15 <sup>a</sup>	M-90 <sup>b</sup>	M-(90+15)	M-129 <sup>c</sup>	M-(sk. <sup>d</sup> +90)	M-(D-ring <sup>e</sup> +90)	M-(C-ring <sup>f</sup> +90)	EI-massa-spektrum
Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	458	443	368	353	329	255	213	145	Fig. 2.38 b
	7	2	26	15	32	14	10	33	
Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	456	441	366	351	-*	253	211	143	Fig. 2.39 b
	5	>0	16	70	-	18	25	64	
Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	472	457	382	367	343	255	213	145	Fig. 2.40 b
	4	2	24	10	24	9	9	28	
Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol	500	485	410	395	-	297	255	173 / 175	Fig. 2.42 b
	5	10	2	100	-	2	9	20 / 19	
Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	486	471	396	381	357	255	213	145	Fig. 2.43 b
	5	2	17	8	18	11	10	34	
Lanosterol	498	483	(408)	393	-	297	255	173 / 175	Fig. 2.44 b
	5	9	-	38	-	3	14	13 / 9	

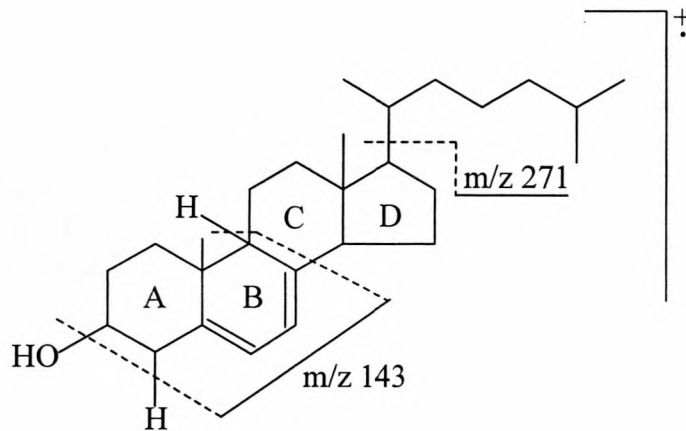
a: Verlies van 'n metiel groep; b: Verlies van TMSOH; c: Verlies van TMSO(CH)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>; d: sk. = syksetting op C17; e: Klowing van die D-ring; f: Klowing van die C-ring; \* M-131 kom wel voor by m/z 325 (62); Die fragment in hakies is nie waarneembaar in die massaspektrum nie weens te lae konsentrasie.

**Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol**

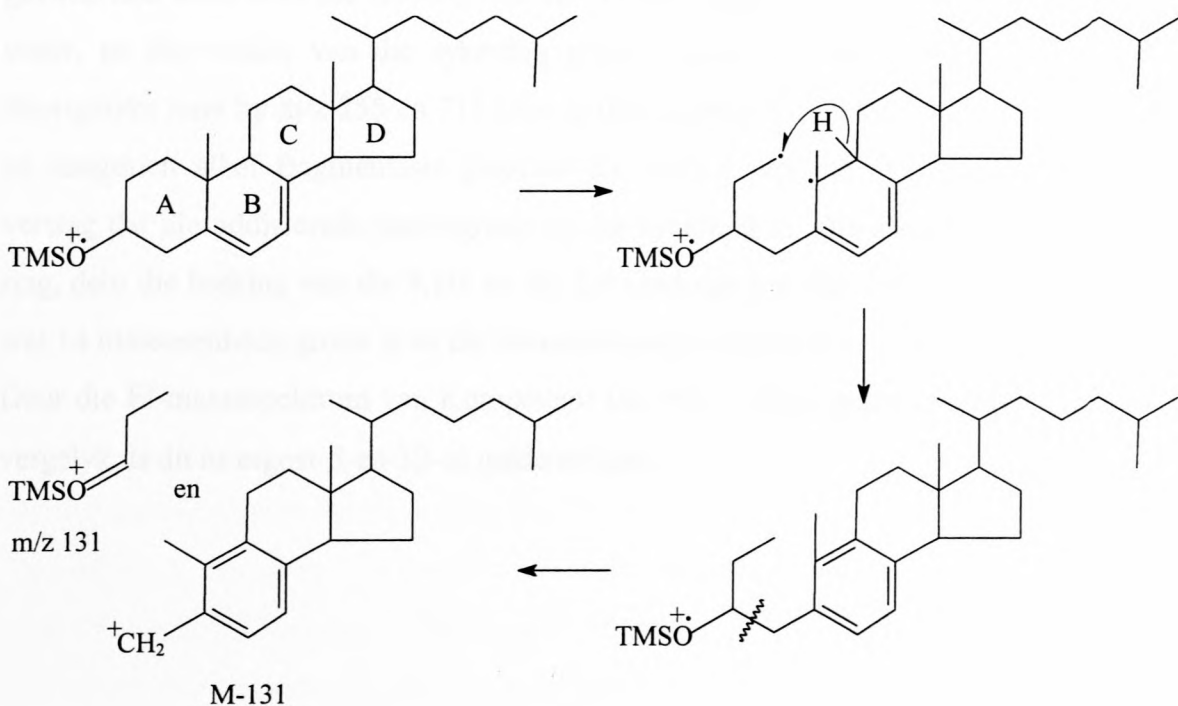
Deur vergelyking van die EI-massaspektrum van Komponent 153 (Fig. 2.39 a) met gepubliseerde massaspektra,<sup>6</sup> is hierdie komponent geïdentifiseer as 'n steroïed, wat moontlik cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol kon wees. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  384 die molekulêre ioon is, waarvan afgelei is dat Komponent 153 moontlik een dubbelbinding meer as cholesterol het. Die pieke by  $m/z$  369, 366 en 351 sou dus onderskeidelik die M-15, M-18 en M-(15+18) ione kon verteenwoordig in ooreenstemming met soortgelyke ione wat in die massaspektrum van cholesterol voorkom. Die ione by  $m/z$  271 en  $m/z$  253 word onderskeidelik gevorm deur die verlies van die syketting, en deur die eliminasië van die syketting gepaardgaande met die verlies van water uit die molekulêre ioon.

Deur slegs hierdie ione in aanmerking te neem kan daar egter nog nie afgelei word of die syketting versadig is al dan nie. Die rede hiervoor is dat indien die syketting 'n onversadigde binding in een van die posisies 22, 23, 24 of 25 bevat, die verlies van die syketting gekombineerd met die verlies van twee waterstofatome plaasvind.<sup>27,37</sup> Dieselfde ione sal dus waargeneem word, onafhanklik daarvan of die syketting versadig is of nie.

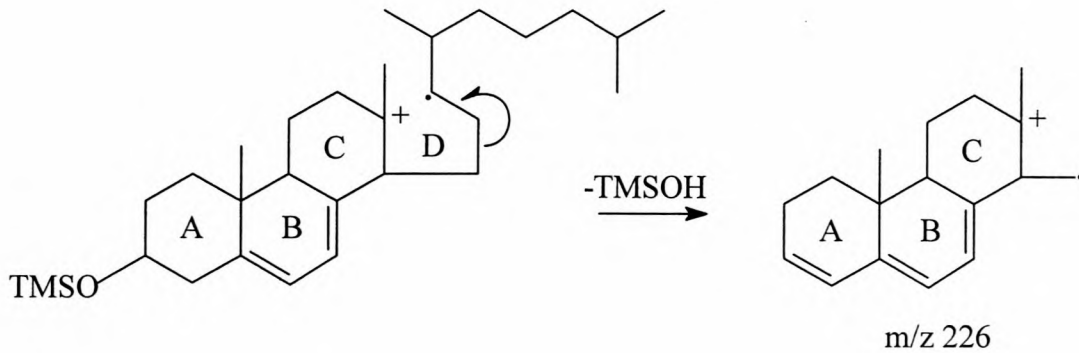
Die ioon by  $m/z$  211 wat waarskynlik vorm deur klowing van die D-ring, gepaardgaande met die eliminasië van water, is 2 massaeenhede kleiner as die ooreenstemmende ioon van cholesterol. Dit dui dus daarop dat die tweede dubbelbinding moontlik in die A,B of C ringe moet voorkom. Die ioon by  $m/z$  143, wat moontlik gevorm word deur die klowing van die C-ring gepaardgaande met die verlies van water, dui egter daarop dat die tweede dubbelbinding in die A of B ringe moet voorkom. Deur die verdere vergelyking van die betrokke massaspektrum met gepubliseerde massaspektra<sup>17</sup> teen hierdie agtergrond, is Komponent 153 as cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer.



Sommige van die kenmerkende ione in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 153 (Fig. 2.39 b) word in Tabel 2.2 gegee. Naas die basispiek by  $m/z$  73 is die ioon met die hoogste relatiewe intensiteit die  $M-(TMSOH + 15)$  ioon by  $m/z$  351. Een van die uitsonderings in hierdie massaspektrum is 'n baie prominente ioon by  $m/z$  325, wat 'n  $M-131$  ioon is in plaas van 'n  $M-129$  ioon. 'n Prominente ioon by  $m/z$  131 word ook in hierdie massaspektrum aangetref in plaas van 'n ioon by  $m/z$  129. Hierdie ione kom tipies voor in die EI-massaspektra van die TMS-eters van  $\Delta^{5,7}$ -dienole.<sup>38,39</sup>

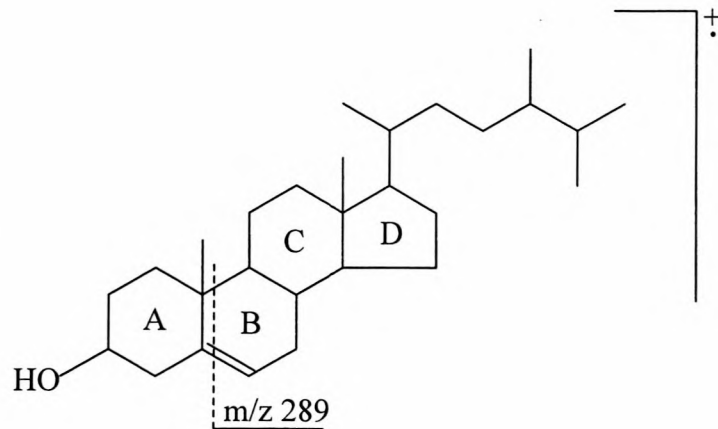


'n Ander tipe klowing van die D-ring, waar die syketting saam met C16 en C17 verloor word gepaardgaande met die verlies van TMSOH, het die ioon by  $m/z$  226 tot gevolg.<sup>27,32</sup>

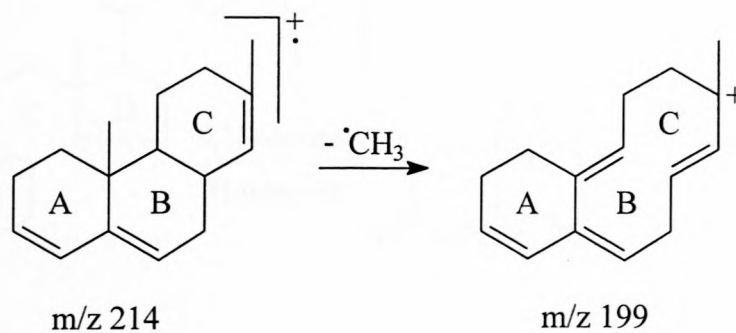


### Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol

Deur die EI-massaspektrum van Komponent 160 (Fig. 2.40 a) met gepubliseerde massaspektra<sup>6</sup> te vergelyk, is dit as 'n stereoïed, moontlik ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, geïdentifiseer. Daar is aanvaar dat die ioon by m/z 400 die molekulêre ioon is, wat sou beteken dat Komponent 160 een metileengroep meer as cholesterol bevat. Die pieke by m/z 385, 382 en 367 verteenwoordig dus waarskynlik onderskeidelik die M-15, M-18 en M-(15+18) ione, terwyl die ioon by m/z 145 in terme van die klowing van die C-ring, gekombineer met die verlies van water uit die molekulêre ioon, geïnterpreteer sou kon word. Die ione by m/z 213 en m/z 255 sou onderskeidelik gevorm kon word deur die klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water, en die verlies van die syketting gekombineer met die verlies van water. Soortgelyke ione by m/z 255 en 213 kom in die massaspektrum van cholesterol voor, en aangesien albei fragmentasie prosesse die verlies van die syketting behels, is verwag dat die addisionele metielgroep op die syketting is. Die klowing van die B-ring, deur die breking van die 9,10- en die 5,6-bindings sou dan die ioon by m/z 289, wat 14 massaenhede groter is as die ooreenkomstige fragment van cholesterol, lewer. Deur die EI-massaspektrum van Komponent 160 met verdere gepubliseerde data<sup>17</sup> te vergelyk, is dit as ergost-5-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer.

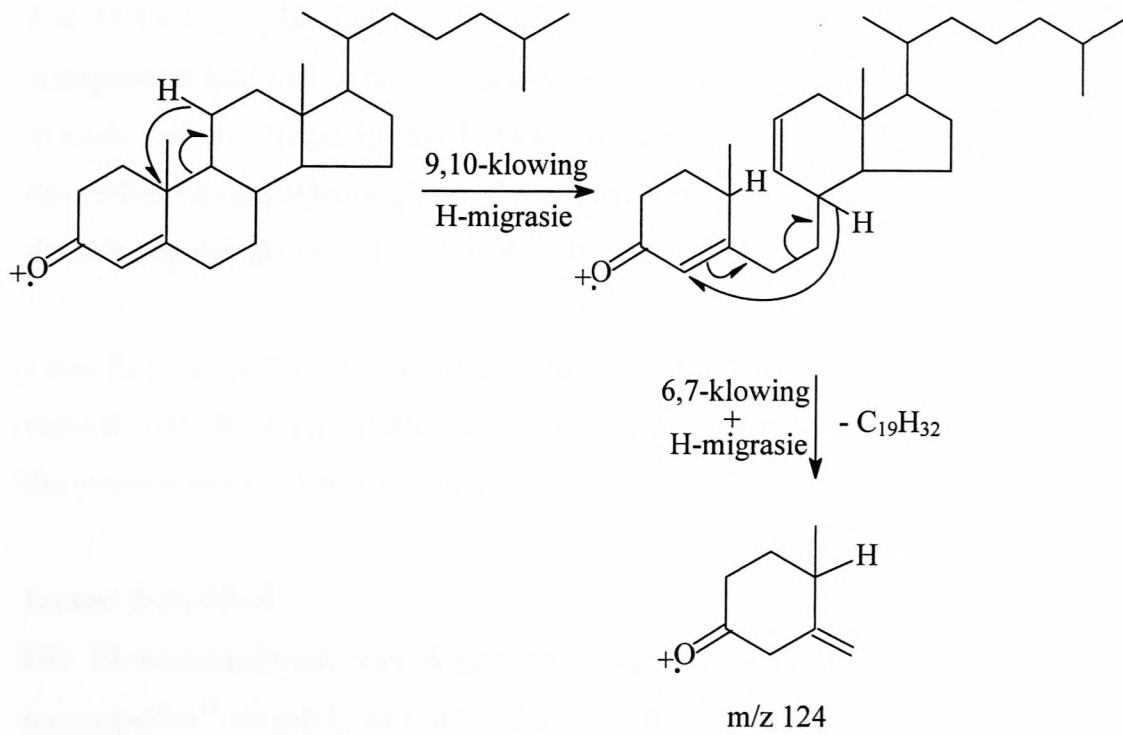


Behalwe vir die ione wat in Tabel 2.2 gegee word, is daar slegs 'n paar ander ione in die EI-massaspektrum van die TMS-eter van Komponent 160 (Fig. 2.40 b) wat noemenswaardig is. Die ione by  $m/z$  261 en  $m/z$  289 word deur middel van die twee B-ring klowings gevorm. Die basispiek word ook in hierdie geval, net soos by cholesterol, by  $m/z$  129 aangetref, aangesien Komponent 160 ook 'n  $\Delta^5$ -3-hidroksisteroïed is. Die ioon by  $m/z$  199 word waarskynlik gevorm deur die verlies van 'n metielgroep nadat 'n klowing van die D-ring, gepaardgaande met die eliminasië van TMSOH, plaasgevind het.<sup>32</sup>

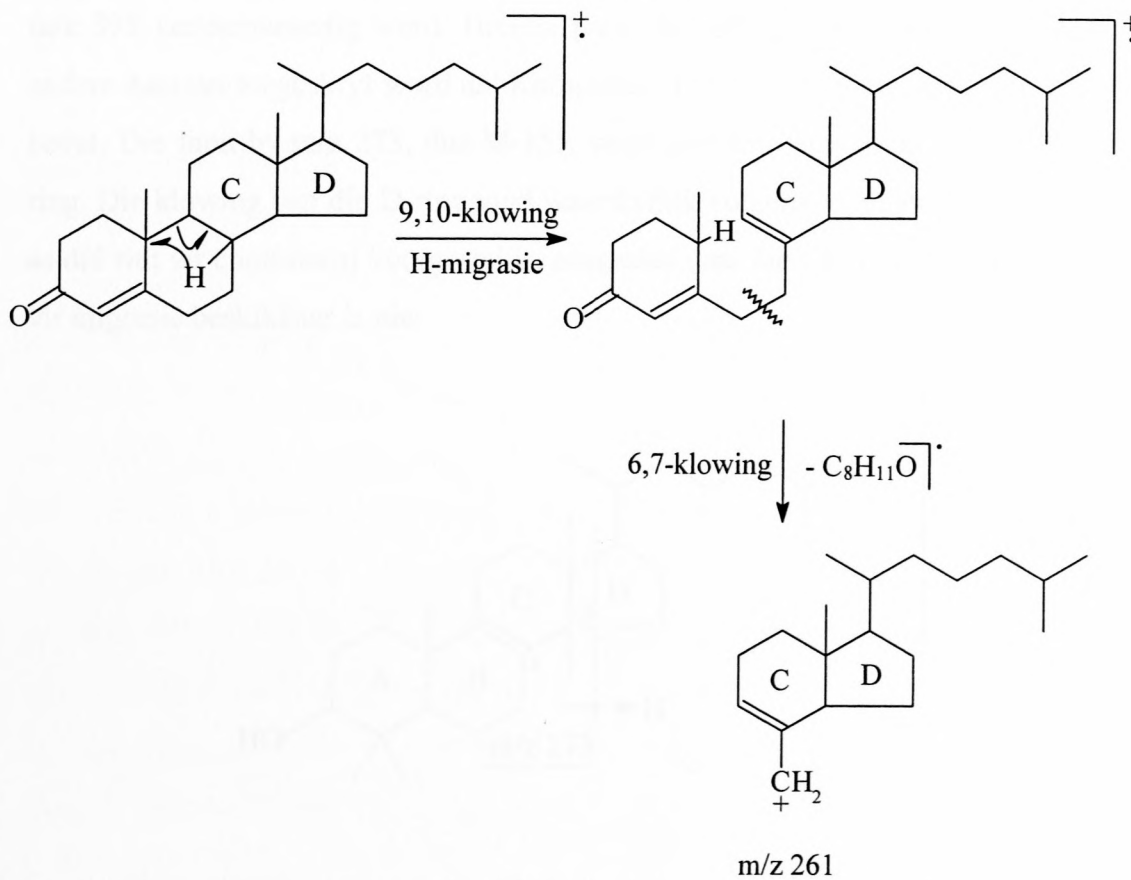


### Cholest-4-en-3-oon

Die EI-massaspektrum van Komponent 162 (Fig. 2.41) is vergelyk met gepubliseerde massaspektra<sup>17</sup> waardeur dit as cholest-4-en-3-oon geïdentifiseer is. Die prominente piek by  $m/z$  124 kom tipies in die massaspektra van  $\Delta^4$ -3-keto-steroïede voor, en die meganisme waardeur hierdie ioon gevorm word, kan soos volg geformuleer word:<sup>37</sup>



Die lading word ook tot 'n mindere mate, tydens 'n soortgelyke fragmentasie, deur die C en D ringsisteem behou om 'n ioon by m/z 261 te lewer:<sup>40</sup>

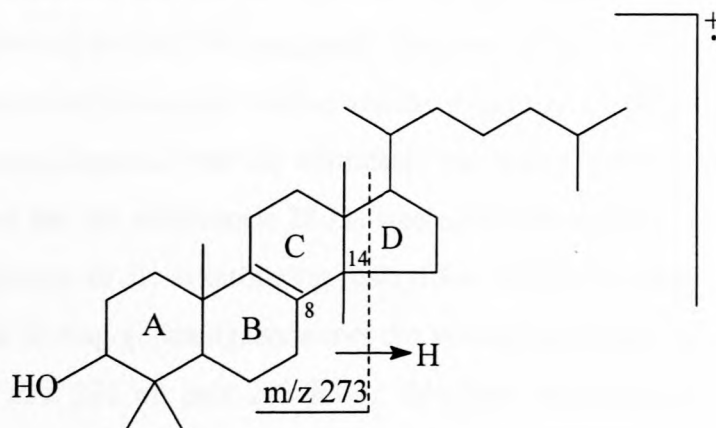


Die M-15 ioon kom by  $m/z$  369 voor, en geen M-18 of M-(15+18) ione word waargeneem nie, wat moontlik kan aandui dat Komponent 162 'n ketoongroep bevat in stede van 'n hidroksielgroep. Die ioon by  $m/z$  271 ontstaan moontlik as gevolg van die verlies van die syketting, terwyl die prominente piek by  $m/z$  229 moontlik weens die klowing van die D-ring, soos beskryf by cholesterol, gevorm word.

Geen EI-massaspektrum kon vir die MO-TMS-derivaat van Komponent 162 verkry word nie, moontlik omdat hierdie komponent in 'n baie lae konsentrasie voorkom in die monster wat vir derivatisering gebruik is.

### Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol

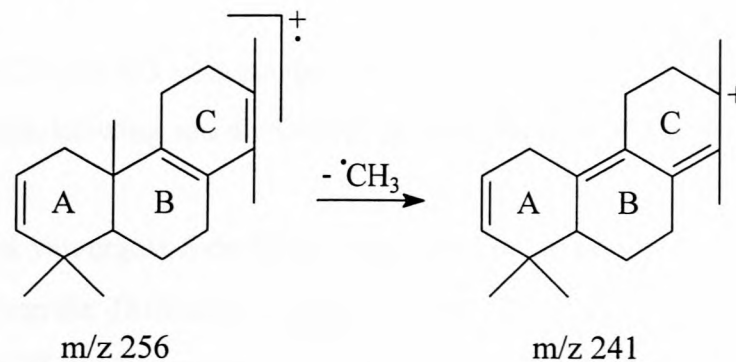
Die EI-massaspektrum van Komponent 168 (Fig. 2.42 a) is met gepubliseerde massaspektra<sup>17</sup> vergelyk, en is as lanost-8-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer. Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  428 die molekulêre ioon verteenwoordig, wat daarop dui dat Komponent 168 drie metielgroepe meer as cholesterol bevat. Daar is afgelei dat die M-15 en M-(15+18) ione onderskeidelik deur die prominente pieke by  $m/z$  413 en  $m/z$  395 verteenwoordig word. Hierdie pieke se hoë intensiteit kan moontlik onder andere daaraan toegeskryf word dat Komponent 168 meer metielgroepe as cholesterol bevat. Die ioon by  $m/z$  273, dus M-155, word gevorm deur die klowing van die D-ring. Die klowing van die D-ring vind waarskynlik volgens 'n ander meganisme plaas as dié wat vir cholesterol voorgestel is, aangesien daar nie C8- of C14-waterstofatome vir migrasie beskikbaar is nie:



In die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 168 (Fig. 2.42 b) word geen ione by  $m/z$  129 of M-129 aangetref nie, waarskynlik weens die

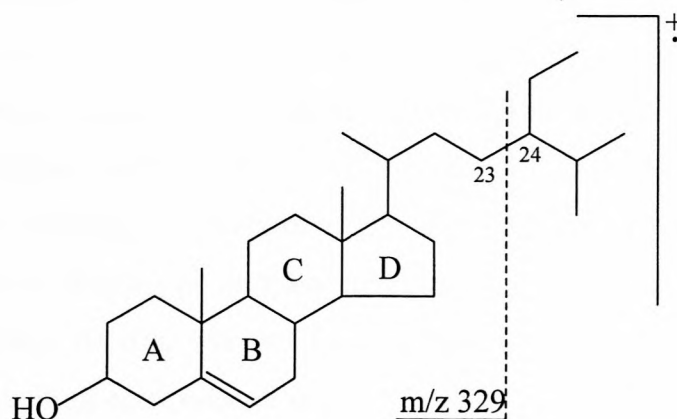


afwesigheid van 'n C5-dubbelbinding. In hierdie massaspektrum word die basispiek by  $m/z$  395 aangetref, wat die  $M-(TMSOH + 15)$  ioon verteenwoordig. Klowing van die C-ring gepaardgaande met die eliminasië van TMSOH kan moontlik beide die ione by  $m/z$  173 en 175 lewer, aangesien dit verwag sou word dat die fragmentasië volgens 'n ander meganisme sal plaasvind weens die aanwesigheid van die C8-dubbelbinding. Die vorming van die ioon by  $m/z$  241 is moontlik soortgelyk aan dié van die ioon by  $m/z$  199 in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van ergost-5-en-3 $\beta$ -ol (Fig. 2.40 b):



### Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol

Op grond van die ooreenstemming van die EI-massaspektrum (Fig. 2.43 a) met gepubliseerde massaspektra,<sup>17,41</sup> is Komponent 171 tentatief as stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer. Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  414 die molekulêre ioon verteenwoordig, en dat die molekulêre massa van Komponent 171 dus 28 Da hoër as dié van cholesterol is. Hieruit volg dat die ione by  $m/z$  399 (redelike lae intensiteit) en  $m/z$  381 onderskeidelik aan die  $M-15$  en  $M-(15+18)$  prosesse toegeskryf kan word. Die  $M-18$  ioon word by  $m/z$  396 aangetref. Die ione by  $m/z$  273 en  $m/z$  255 sou dus moontlik onderskeidelik deur die verlies van die syketting, en deur die eliminasië van die syketting gepaardgaande met die eliminasië van water, gevorm kon word. Hieruit kan afgelei word dat die addisionele 28 Da waarna hierbo verwys is, aan 'n etielgroep of twee metielgroepe in die syketting toegeskryf kan word. Klowing van die D-ring en klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water, kan dus die ione by onderskeidelik  $m/z$  231 en  $m/z$  213 lewer. Die ioon by  $m/z$  329 sou waarskynlik gevorm kon word deur die klowing van die 23,24-binding weens die vertakking op C24:

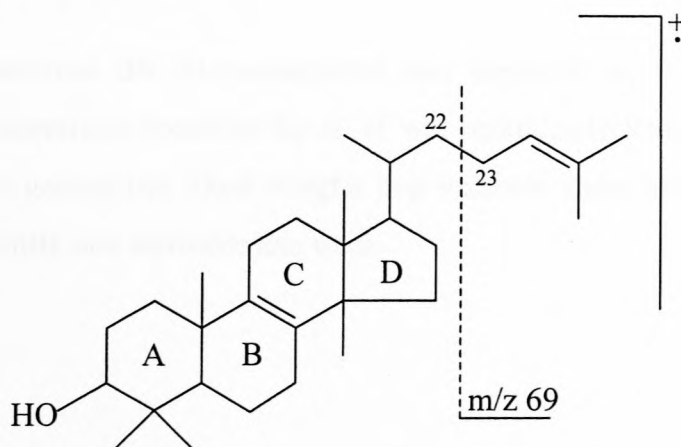


Die ione by  $m/z\ 275$  en  $303$  ontstaan deur die klowings van die B-ring, en die ioon by  $m/z\ 145$  word deur klowing van die C-ring, gepaardgaande met die verlies van water, gevorm.

Soos in die geval van ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, kom daar ook 'n ioon by  $m/z\ 199$  in die EI-massaspektrum van die TMS-eter van stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (Fig. 2.43 b) voor. Naas die basispiek by  $m/z\ 73$  is die ioon met die hoogste relatiewe intensiteit dié by  $m/z\ 129$ .

### Lanosterol

Die EI-massaspektrum van Komponent 172 (Fig. 2.44 a) is met gepubliseerde massaspektra<sup>17,42</sup> vergelyk, en is as lanosterol (lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol) geïdentifiseer. Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z\ 426$  die molekulêre ioon verteenwoordig, wat daarop dui dat Komponent 172 een dubbelbinding meer as lanost-8-en-3 $\beta$ -ol (Komponent 168) bevat. Die basispiek by  $m/z\ 69$  word moontlik gevorm deur die klowing van die 22,23-binding:



Die prominente pieke by  $m/z$  411 en  $m/z$  393 verteenwoordig onderskeidelik die M-15 en M-(15+18) ione. Die ioon by  $m/z$  297 word gevorm deur die verlies van die syketting, wat daarop dui dat die addisionele dubbelbinding op die syketting voorkom, en wat die identifikasie van Komponent 172 as lanosterol ondersteun. Gewoonlik in die geval waar die syketting 'n onversadigde binding in een van die posisies 22, 23, 24 of 25 bevat, vind die verlies van die syketting gekombineerd met die verlies van twee waterstofatome plaas. As daar ook 'n C8-dubbelbinding voorkom, word hierdie tipe verlies van die syketting egter onderdruk.<sup>27,37</sup> Klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water het die ioon by  $m/z$  255 tot gevolg.

Die prominente ione by  $m/z$  69 en  $m/z$  429 (M-69) in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 172 (Fig. 2.44 b) word waarskynlik gevorm soos uiteengesit in die bespreking van die massaspektra van die ongederivatiseerde lanosterol, en is weereens 'n aanduiding dat die addisionele dubbelbinding by C24 voorkom. Die piek by  $m/z$  241 verteenwoordig waarskynlik die ioon wat ook in die EI-massaspektrum van lanost-8-en-3 $\beta$ -ol (Komponent 168) se TMS-derivaat (Fig. 2.42 b) voorkom. Die M-(TMSOH + 15) ioon by  $m/z$  393 is ook baie prominent in die massaspektrum van Komponent 172 se TMS-derivaat. Klowing van die C-ring gepaardgaande met die eliminasië van TMSOH kan in hierdie geval ook, soos by lanost-8-en-3 $\beta$ -ol, moontlik die ioon by  $m/z$  173 sowel as die ioon by  $m/z$  175 lewer. Dit is interessant om op te merk dat die TMS-derivaat van lanosterol voor dié van stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol elueer, terwyl die elueringsvolgorde omgekeerd is in die geval van die ongederivatiseerde steroïede (kyk Tabel 2.1).

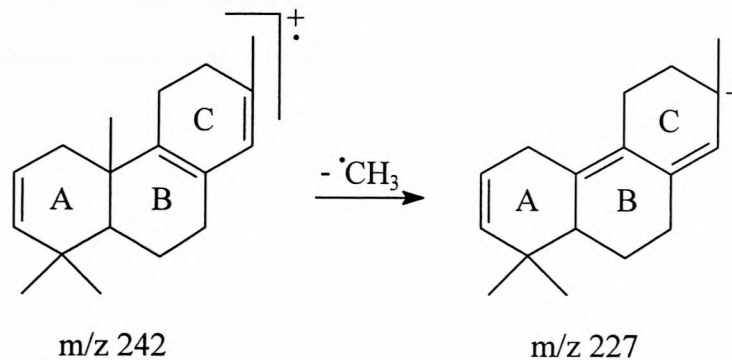
Die steroïede waarvan die EI-massaspektra hier bespreek is, is slegs dié wat in redelike hoë konsentrasie teenwoordig is, of wat beduidende kwantitatiewe variasie tussen akkedisse getoon het. Daar is egter nog verskeie ander komponente van die ekstrakt wat moontlik ook steroïede kan wees.

### Ongeïdentifiseerde verbindings

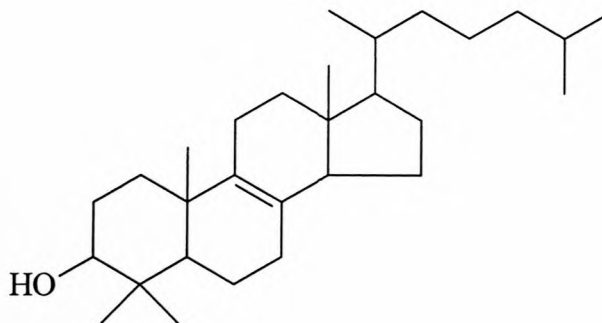
Uit die vergelyking van die EI-massaspektrum van Komponent 157 (Fig. 2.45 a) met gepubliseerde massaspektra<sup>6,17,42</sup>, het dit geblyk dat hierdie komponent 'n steroïed is. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  414 die molekulêre ioon is, en vervolgens is afgelei dat die piek by  $m/z$  399 die M-15 ioon verteenwoordig. Die molekulêre massa van die verbinding is dus skynbaar 28 Da hoër as dié van cholesterol, en daar is vermoed dat Komponent 157 twee metielgroepe meer as cholesterol bevat. Dit sou die hoër relatiewe intensiteit van die ioon by  $m/z$  399 in vergelyking met die ooreenstemmende M-15 piek in die massaspektrum van cholesterol kan verklaar. 'n Ioon by  $m/z$  381, wat aan 'n M-(15+18) proses, oftewel die verlies van water gepaardgaande met die verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ioon toegeskryf sou kon word, dui daarop dat Komponent 157 moontlik 'n hidroksielgroep mag bevat. Die ioon by  $m/z$  301 ontstaan moontlik weens die verlies van die syketting en die ioon by  $m/z$  259 moontlik weens die klowing van die D-ring. Komponent 157 kon egter nie finaal geïdentifiseer word nie.

Die peke by  $m/z$  486,  $m/z$  471 en  $m/z$  381 in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 157 (Fig. 2.45 b) verteenwoordig onderskeidelik die molekulêre ioon, die M-15 ioon en die M-(TMSOH + 15) ioon. 'n Belangrike kenmerk van hierdie massaspektrum is die afwesigheid van die  $m/z$  129 en M-129 ione wat by die TMS eters van die  $\Delta^5$ -enole aangetref is. Hierdie massaspektrum se M-(TMSOH + 15) piek is ook die basispiek, net soos in die massaspektrum van die TMS-eter van lanost-8-en-3 $\beta$ -ol (Fig. 2.42 b), wat moontlik kan impliseer dat die dubbelbinding by C8 voorkom. Die ioon by  $m/z$  283 ontstaan moontlik weens die verlies van die syketting gepaardgaande met die verlies van TMSOH en die ioon by  $m/z$  241 moontlik weens die klowing van die D-ring, gepaardgaande met die verlies van TMSOH. As hierdie massaspektrum met dié van cholesterol vergelyk word, kan moontlik aangeneem word dat daar nie 'n addisionele metielgroep op die syketting of die D-ring voorkom nie. Indien albei addisionele metielgroepe op die A- of B-ring voorkom sal die ioon by  $m/z$  173 deur die klowing van die C-ring gepaardgaande met die verlies van TMSOH gevorm word. Indien net een addisionele metielgroep daar voorkom kan hierdie fragmentasie die ioon by  $m/z$  159 tot gevolg hê. Die vorming van die ioon by  $m/z$  227 is moontlik analoog aan dié van die ioon by  $m/z$  241 in die

massaspektrum van die TMS-eter van lanost-8-en-3 $\beta$ -ol (Fig. 2.42 b), maar in die geval van Komponent 157 is daar natuurlik net een metielgroep minder in die verbinding aanwesig, as in lanost-8-en-3 $\beta$ -ol, byvoorbeeld:



Teen hierdie agtergrond, en aangesien die massaspektra van die TMS-derivate van Komponent 157 en lanost-8-en-3 $\beta$ -ol baie ooreenstem, is afgelei dat Komponent 157 moontlik 4,4-dimetiel-cholest-8-en-3 $\beta$ -ol kan wees:



Hierdie vermoede kon egter nie met behulp van gepubliseerde data bevestig word nie.

Deur die EI-massaspektrum van Komponent 119 (Fig. 2.46) met gepubliseerde massaspektra te vergelyk<sup>5,6</sup> is vasgestel dat dit moontlik 'n steroïed is. Die basispiek in die massaspektrum is by  $m/z\ 43$ , en 'n prominente piek kom by  $m/z\ 366$  voor. Daar is vasgestel dat Komponente 125 en 127 ook moontlik steroïede is deur hul EI-massaspektra met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup> te vergelyk (Fig. 2.47 en 2.48). Beide Komponente 125 en 127 se EI-massaspektra toon basispieke by  $m/z\ 43$ , en beide toon ook prominente pieke by  $m/z\ 364$ .

Sintetiese standaarde was nie beskikbaar om die identifikasie van Komponente 153, 160, 162, 168, 171 en 172 te bevestig nie.

Alhoewel Komponent 59 in die GC-analises waargeneem word, kon daar nie 'n suiwer EI-massaspektrum vir hierdie komponent verkry word nie, as gevolg van die swak skeiding van Komponente 58, 59 en 60 in die GC-MS analises (Fig. 2.49). Komponent 112 se EI-massaspektrum (Fig. 2.50) het 'n basispiek by  $m/z$  43 en die ioon met die hoogste massa wat waargeneem word, is die ioon by  $m/z$  282.

1	1,2-Dioksietaan	
2	1,3-Dioksietaan	
3	1,4-Dioksietaan	
4	1,2-Dioksietaan	
5	1,3-Dioksietaan	
6	1,4-Dioksietaan	
7	1,2-Dioksietaan	
8	1,3-Dioksietaan	
9	1,4-Dioksietaan	
10	1,2-Dioksietaan	
11	1,3-Dioksietaan	
12	1,4-Dioksietaan	
13	1,2-Dioksietaan	
14	1,3-Dioksietaan	
15	1,4-Dioksietaan	
16	2-Heksadekseen	
17	1-Heksadekseen	
18	1,2-Dioksietaan	
19	2-Heksadekseen	
20	2-Heptadekseen	
21	2-Heksadekseen	
22	2-Trioksietaan	
23	2-Propioksietaan	
24	2-Tetraoksietaan	
25	2-Pentoksietaan	
26	2-Heksadekseen	
27	2-Heptadekseen	
28	2-Oktadekseen	
29	2-Nonadekseen	
30	2-Desadekseen	
31	2-Undekseen	
32	2-Dodekseen	
33	2-Tridekseen	
34	2-Tetradekseen	
35	2-Pentadekseen	
36	2-Heksadekseen	
37	2-Heptadekseen	
38	2-Oktadekseen	
39	2-Nonadekseen	
40	2-Desadekseen	
41	2-Undekseen	
42	2-Dodekseen	
43	2-Tridekseen	
44	2-Tetradekseen	
45	2-Pentadekseen	
46	2-Heksadekseen	
47	2-Heptadekseen	
48	2-Oktadekseen	
49	2-Nonadekseen	
50	2-Desadekseen	
51	2-Undekseen	
52	2-Dodekseen	
53	2-Tridekseen	
54	2-Tetradekseen	
55	2-Pentadekseen	
56	2-Heksadekseen	
57	2-Heptadekseen	
58	2-Oktadekseen	
59	2-Nonadekseen	
60	2-Desadekseen	
61	2-Undekseen	
62	2-Dodekseen	
63	2-Tridekseen	
64	2-Tetradekseen	
65	2-Pentadekseen	
66	2-Heksadekseen	
67	2-Heptadekseen	
68	2-Oktadekseen	
69	2-Nonadekseen	
70	2-Desadekseen	
71	2-Undekseen	
72	2-Dodekseen	
73	2-Tridekseen	
74	2-Tetradekseen	
75	2-Pentadekseen	
76	2-Heksadekseen	
77	2-Heptadekseen	
78	2-Oktadekseen	
79	2-Nonadekseen	
80	2-Desadekseen	
81	2-Undekseen	
82	2-Dodekseen	
83	2-Tridekseen	
84	2-Tetradekseen	
85	2-Pentadekseen	
86	2-Heksadekseen	
87	2-Heptadekseen	
88	2-Oktadekseen	
89	2-Nonadekseen	
90	2-Desadekseen	
91	2-Undekseen	
92	2-Dodekseen	
93	2-Tridekseen	
94	2-Tetradekseen	
95	2-Pentadekseen	
96	2-Heksadekseen	
97	2-Heptadekseen	
98	2-Oktadekseen	
99	2-Nonadekseen	
100	2-Desadekseen	
101	2-Undekseen	
102	2-Dodekseen	
103	2-Tridekseen	
104	2-Tetradekseen	
105	2-Pentadekseen	
106	2-Heksadekseen	
107	2-Heptadekseen	
108	2-Oktadekseen	
109	2-Nonadekseen	
110	2-Desadekseen	
111	2-Undekseen	
112	2-Dodekseen	
113	2-Tridekseen	
114	2-Tetradekseen	
115	2-Pentadekseen	
116	2-Heksadekseen	
117	2-Heptadekseen	
118	2-Oktadekseen	
119	2-Nonadekseen	
120	2-Desadekseen	
121	2-Undekseen	
122	2-Dodekseen	
123	2-Tridekseen	
124	2-Tetradekseen	
125	2-Pentadekseen	
126	2-Heksadekseen	
127	2-Heptadekseen	
128	2-Oktadekseen	
129	2-Nonadekseen	
130	2-Desadekseen	
131	2-Undekseen	
132	2-Dodekseen	
133	2-Tridekseen	
134	2-Tetradekseen	
135	2-Pentadekseen	
136	2-Heksadekseen	
137	2-Heptadekseen	
138	2-Oktadekseen	
139	2-Nonadekseen	
140	2-Desadekseen	
141	2-Undekseen	
142	2-Dodekseen	
143	2-Tridekseen	
144	2-Tetradekseen	
145	2-Pentadekseen	
146	2-Heksadekseen	
147	2-Heptadekseen	
148	2-Oktadekseen	
149	2-Nonadekseen	
150	2-Desadekseen	
151	2-Undekseen	
152	2-Dodekseen	
153	2-Tridekseen	
154	2-Tetradekseen	
155	2-Pentadekseen	
156	2-Heksadekseen	
157	2-Heptadekseen	
158	2-Oktadekseen	
159	2-Nonadekseen	
160	2-Desadekseen	
161	2-Undekseen	
162	2-Dodekseen	
163	2-Tridekseen	
164	2-Tetradekseen	
165	2-Pentadekseen	
166	2-Heksadekseen	
167	2-Heptadekseen	
168	2-Oktadekseen	
169	2-Nonadekseen	
170	2-Desadekseen	
171	2-Undekseen	
172	2-Dodekseen	
173	2-Tridekseen	
174	2-Tetradekseen	
175	2-Pentadekseen	
176	2-Heksadekseen	
177	2-Heptadekseen	
178	2-Oktadekseen	
179	2-Nonadekseen	
180	2-Desadekseen	
181	2-Undekseen	
182	2-Dodekseen	
183	2-Tridekseen	
184	2-Tetradekseen	
185	2-Pentadekseen	
186	2-Heksadekseen	
187	2-Heptadekseen	
188	2-Oktadekseen	
189	2-Nonadekseen	
190	2-Desadekseen	
191	2-Undekseen	
192	2-Dodekseen	
193	2-Tridekseen	
194	2-Tetradekseen	
195	2-Pentadekseen	
196	2-Heksadekseen	
197	2-Heptadekseen	
198	2-Oktadekseen	
199	2-Nonadekseen	
200	2-Desadekseen	

Tabel 2.3: Verbindings geïdentifiseer in die femorale klierafskeiding van die ouvolk, *Cordylus giganteus*.

Komponent nommer	Verbinding	EI-massa-spektrum	Identifikasie
10	Tetradekanoësuur	Fig. 2.5	a,b
15	Pentadekanoësuur	Fig. 2.6	a,b
24	Heksadekanoësuur	Fig. 2.7	a,b
32	Heptadekanoësuur	Fig. 2.8	a,b
47	Oktadekanoësuur	Fig. 2.9	a,b
54	Nonadekanoësuur	Fig. 2.10	a,b
67	Ikosanoësuur	Fig. 2.11	a,b
76	Henikosanoësuur	Fig. 2.12	a,b
87	Dokosanoësuur	Fig. 2.13	a,b
95	Trikosanoësuur	Fig. 2.14	a,b
108	Tetrakosanoësuur	Fig. 2.15	a,b
43	9Z -Oktadekanoësuur	Fig. 2.16	a,b
22	9Z -Heksadekanoësuur	Fig. 2.17	a,b
23	Heksadekanoësuur	Fig. 2.18	b,c,e
31	Heptadekanoësuur	Fig. 2.19	b,c,e
83	Dokosanoësuur	Fig. 2.20	b,c,e
104	Tetrakosanoësuur	Fig. 2.21	b,c,e
42	9Z,12Z -Oktadekadiënoësuur	Fig. 2.22	a,b
58	8Z,11Z,14Z -Ikosatriënoësuur	Fig. 2.23	b,c
2	1-Dodekanol	Fig. 2.24	a,b
17	1-Heksadekanol	Fig. 2.25	a,b
19	2-Heptadekanoon	Fig. 2.26	a,b
40	2-Nonadekanoon	Fig. 2.27	a,b
60	2-Henikosanoon	Fig. 2.28	b,c
81	2-Trikosanoon	Fig. 2.29	b,c
101	2-Pentakosanoon	Fig. 2.30	b,c
91	2-Tetrakosanoon	Fig. 2.31	b,c
16	2-Heptadekenaal	Fig. 2.32	b,c,f
6	Dodekielpropenoaat	Fig. 2.33	a,b
7	Dodekielpropanoaat	Fig. 2.34	a,b
80	n-Pentakosaan	Fig. 2.35	a,b

Tabel 2.3 (vervolg)

Komponent nommer	Verbinding	EI-massa-spektrum	Identifikasie
116	Skwaleen	Fig. 2.36	a,b
152	$\alpha$ -Tokoferol	Fig. 2.37	a,b
149	Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.38 a	a,b,d
153	Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.39 a	b,d
160	Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.40 a	b,d
162	Cholest-4-en-3-oon	Fig. 2.41	b
168	Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.42 a	b,d
171	Stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.43 a	b,d
172	Lanosterol	Fig. 2.44 a	b,d
157	Ongeïdentifiseerde steroïed	Fig. 2.45 a	b,d
119	Ongeïdentifiseerde steroïed	Fig. 2.46	b
125	Ongeïdentifiseerde steroïed	Fig. 2.47	b
127	Ongeïdentifiseerde steroïed	Fig. 2.48	b
59	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 2.49	b
112	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 2.50	b

a: Retensietyd; b: Gepubliseerde data; c: Lei af uit relatiewe retensietye;  
d: Identifiseer met behulp van TMS-derivaat; e: Posisie van dubbelbinding onseker; f: E/Z-Isomerie onseker.



CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

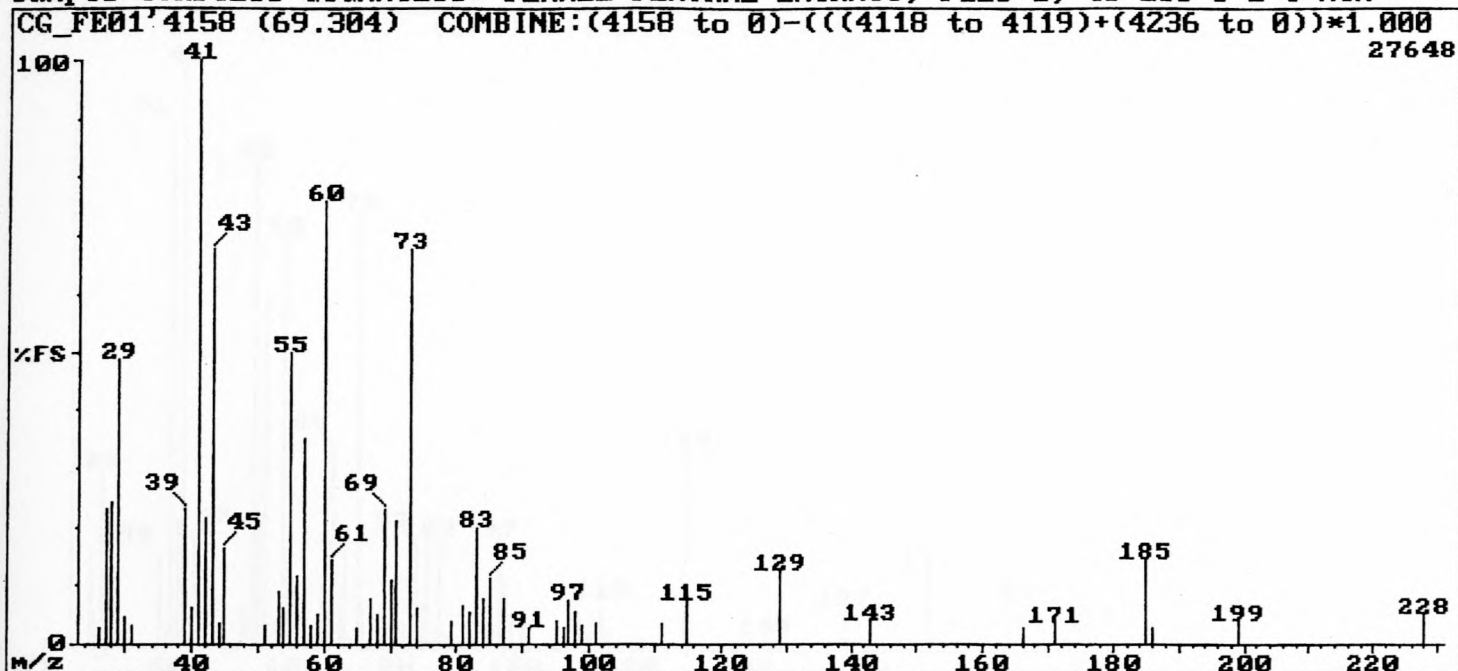


Fig. 2.5: EI-massaspektrum van Komponent 10 - tetradekanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

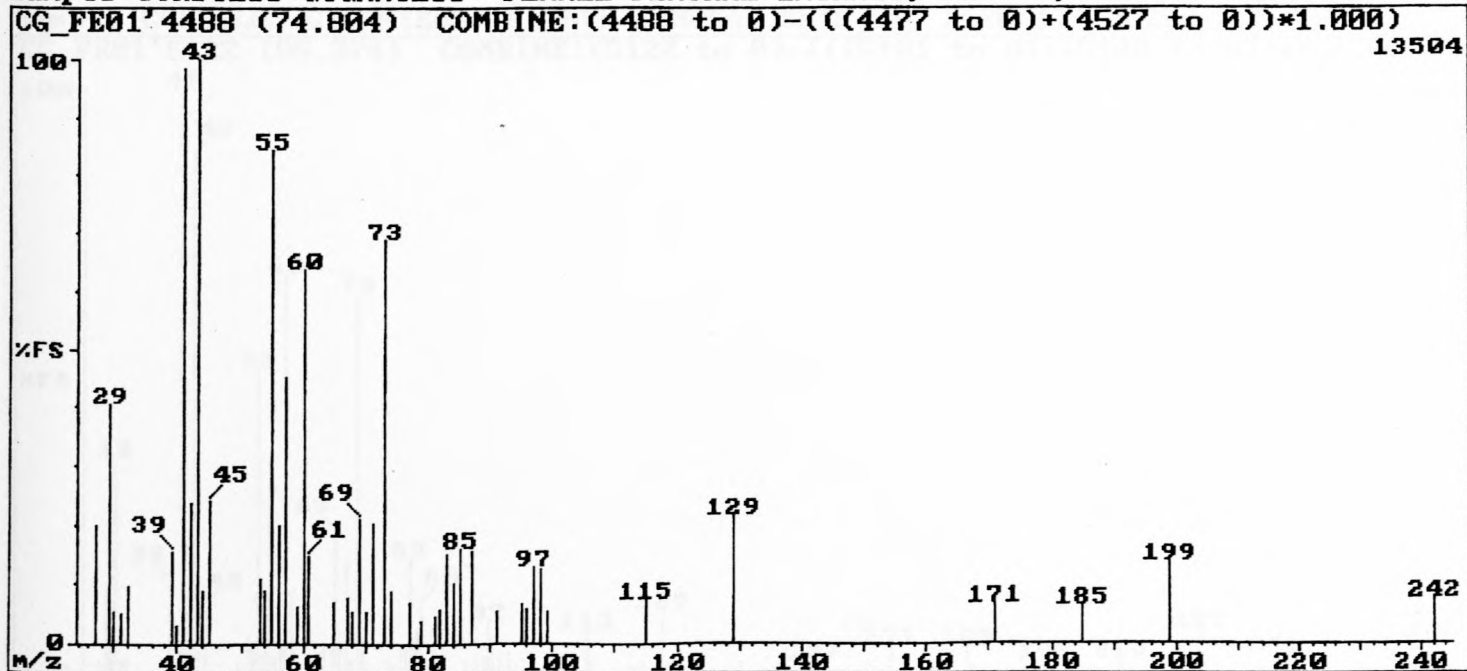


Fig. 2.6: EI-massaspektrum van komponent 15 - pentadekanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

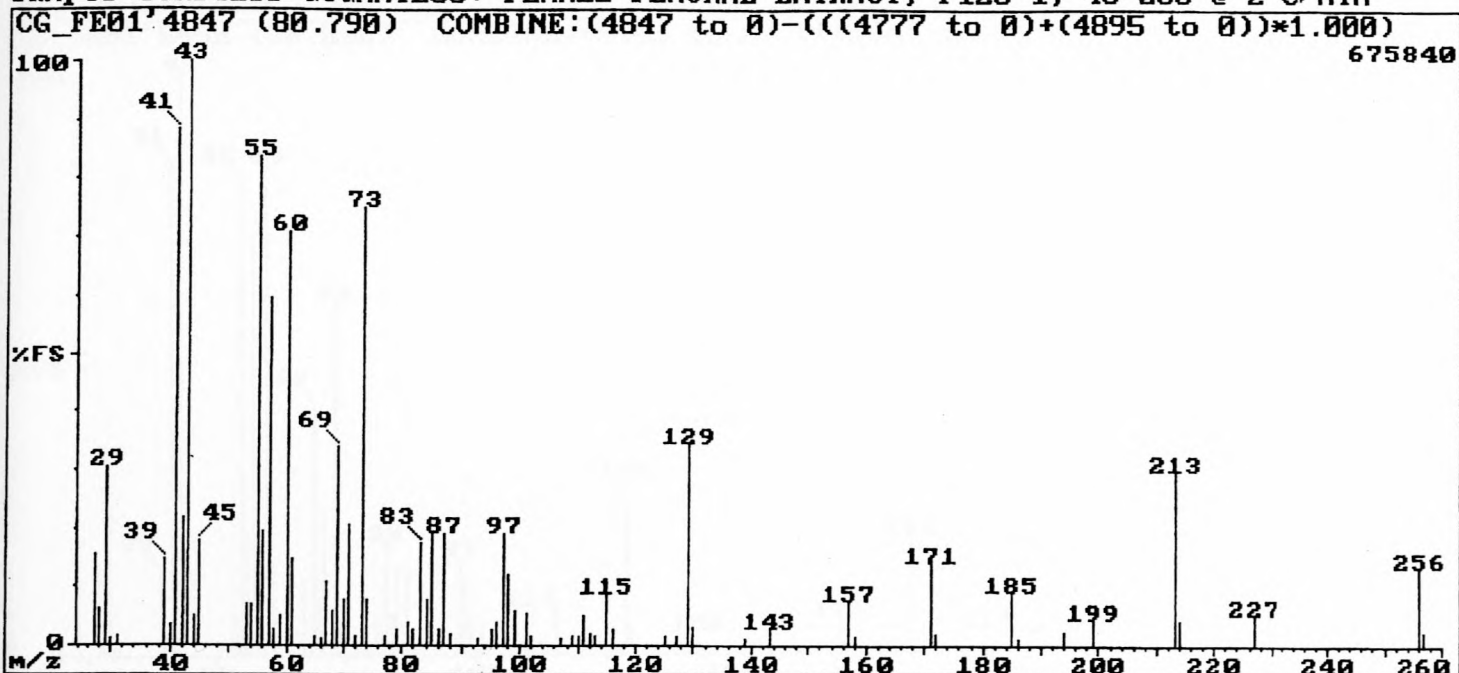


Fig. 2.7: EI-massaspektrum van Komponent 24 - heksadekanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

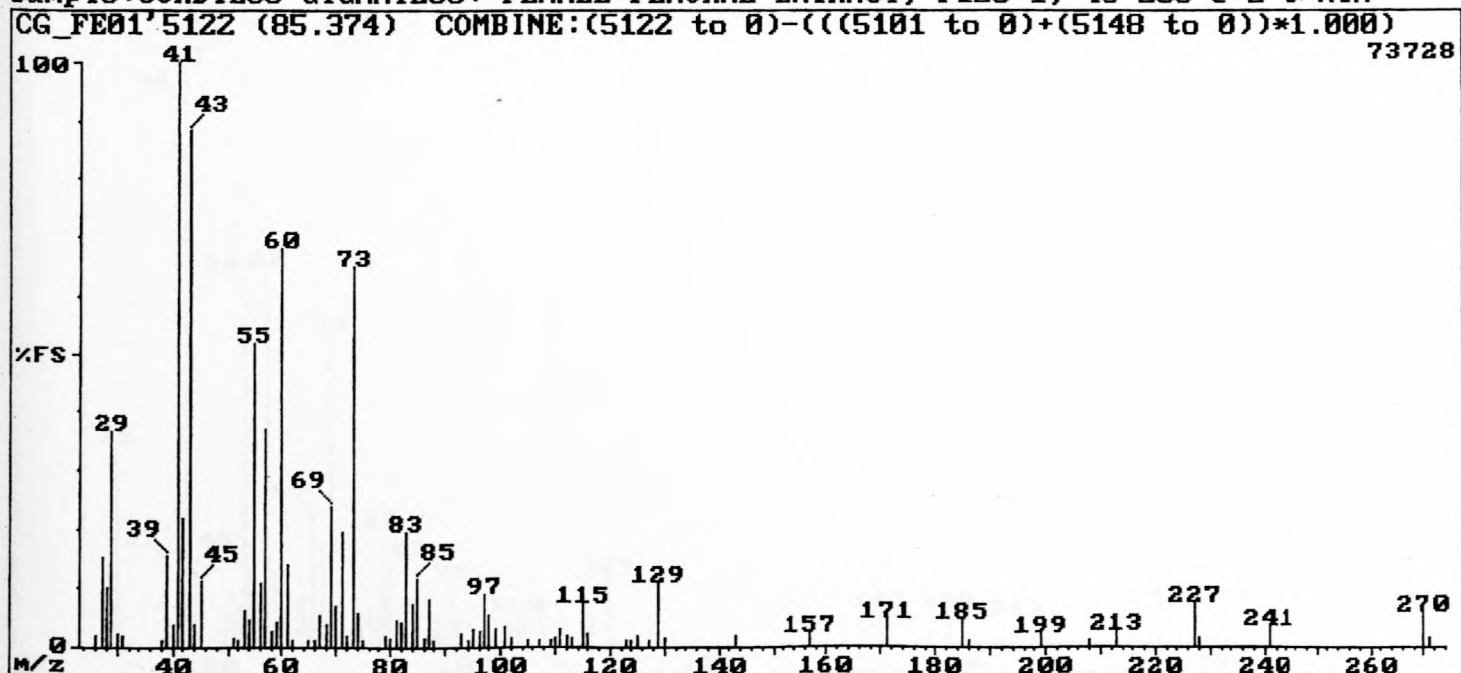


Fig. 2.8: EI-massaspektrum van Komponent 32 - heptadekanoësuur.

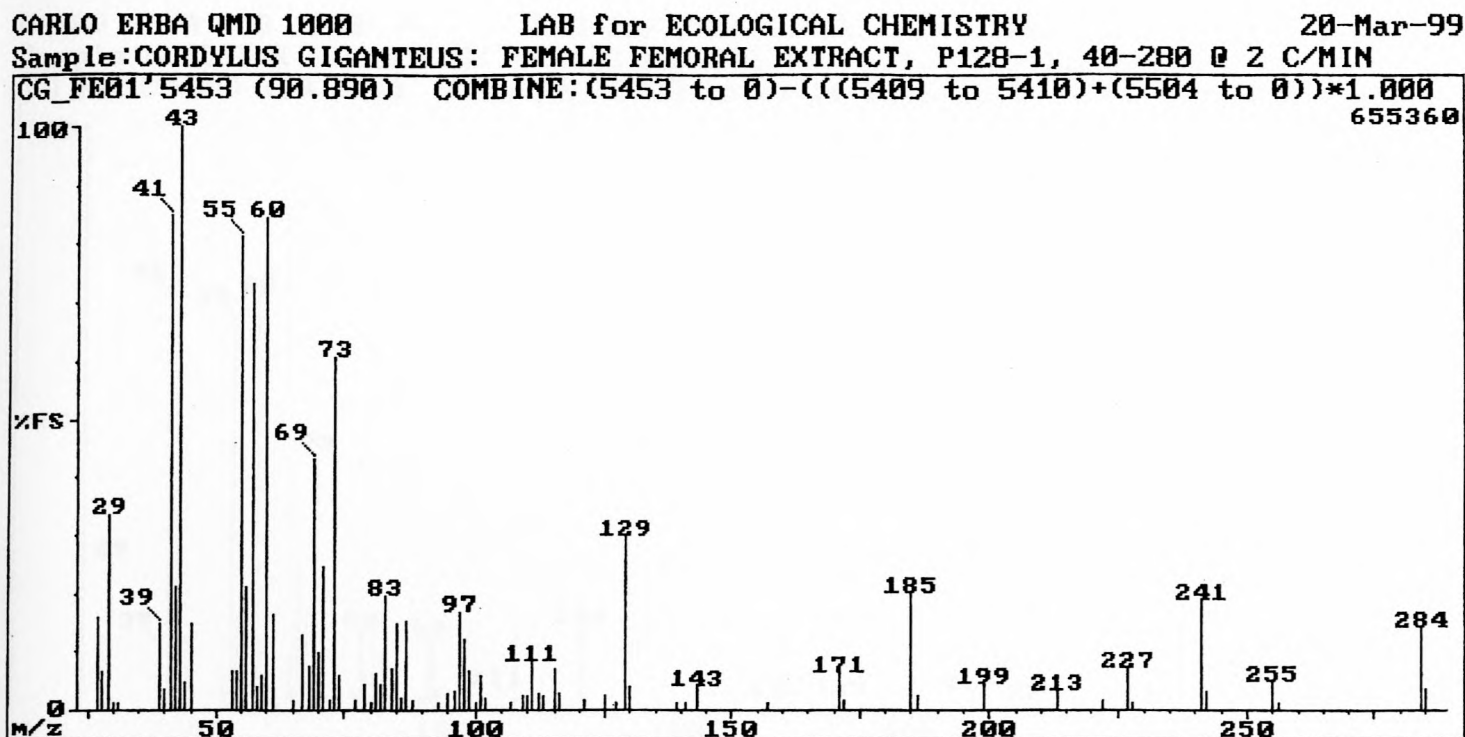


Fig. 2.9: EI-massaspektrum van Komponent 47 - oktadekanoësuur.

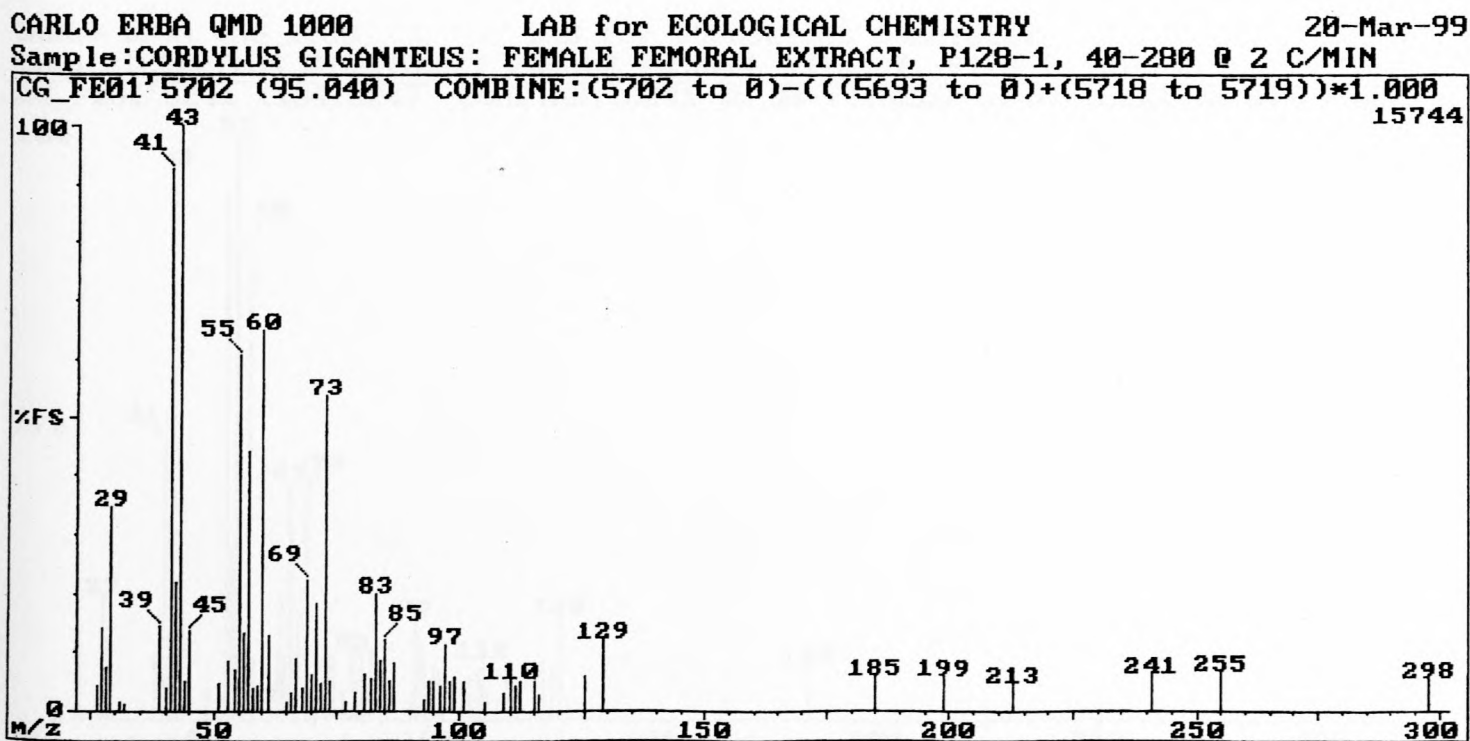


Fig. 2.10: EI-massaspektrum van Komponent 54 - nonadekanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

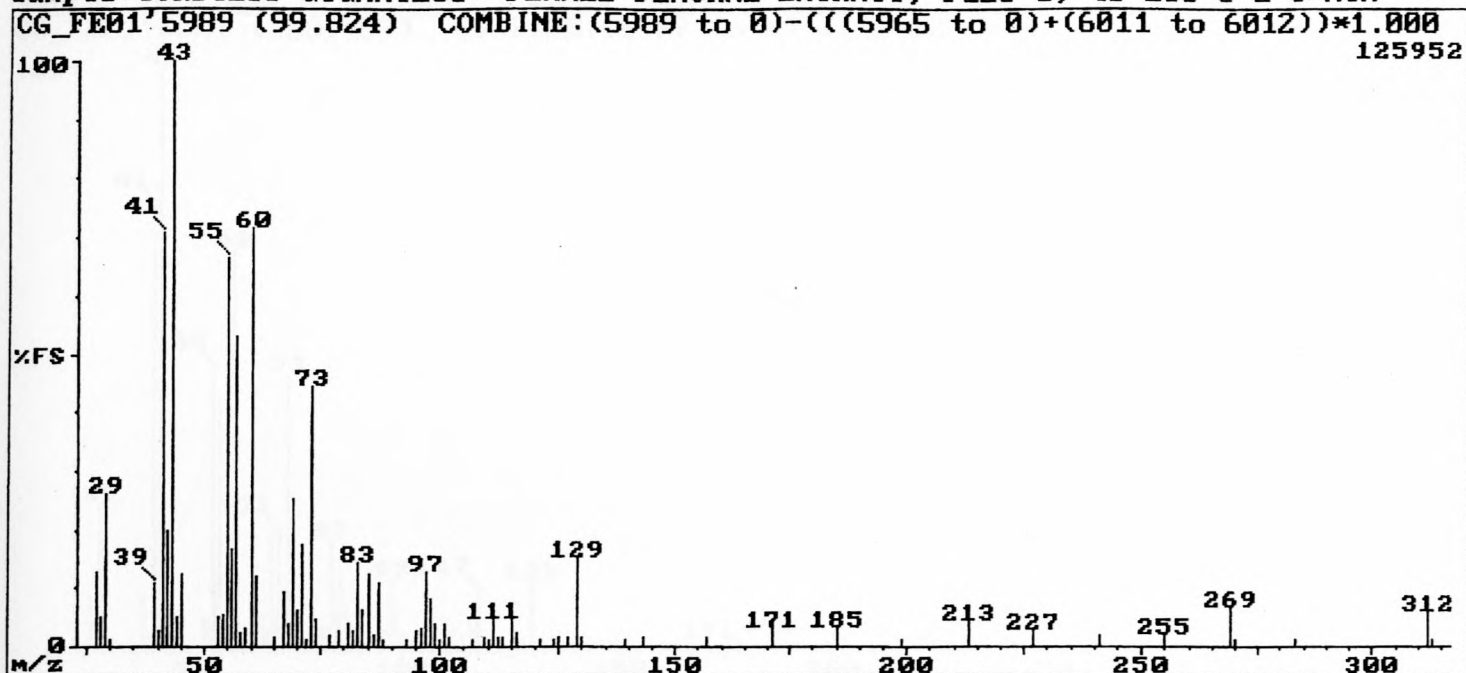


Fig. 2.11: EI-massaspektrum van Komponent 67 - ikosanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

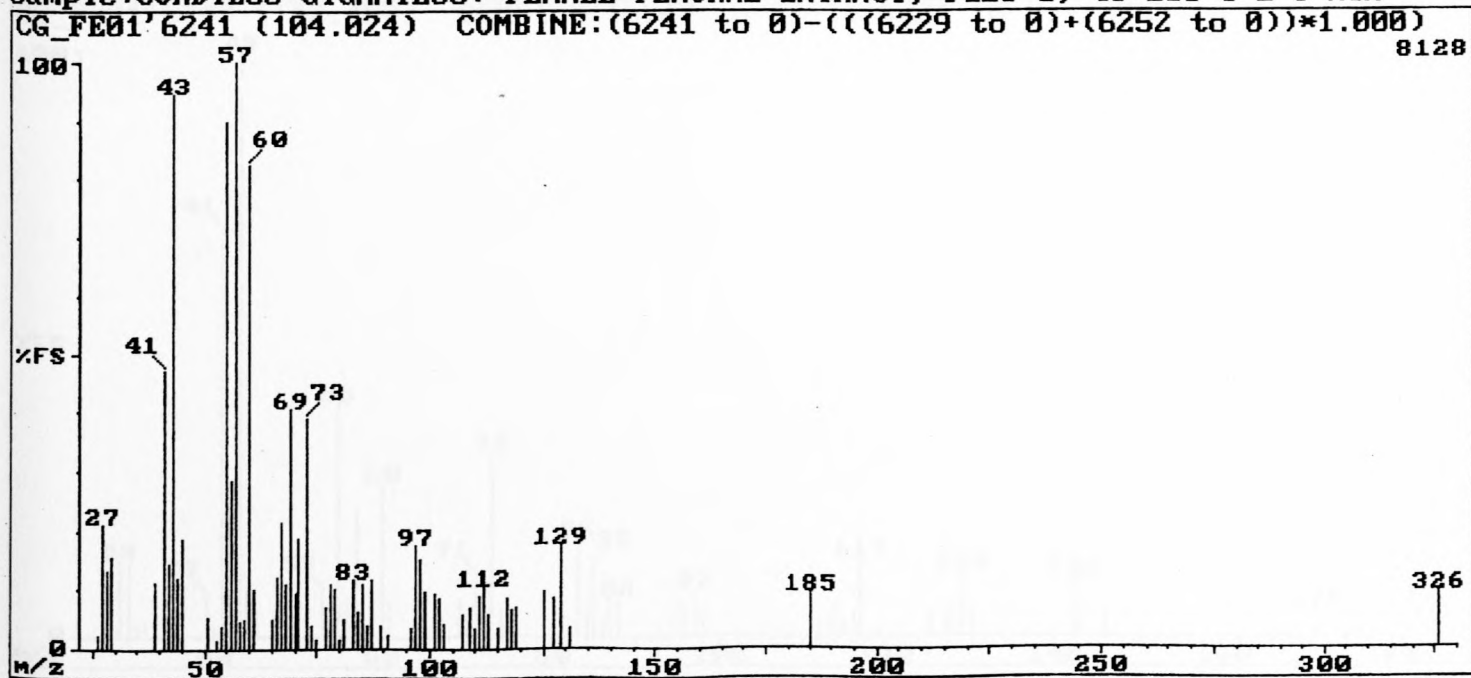


Fig. 2.12: EI-massaspektrum van Komponent 76 - henikosanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

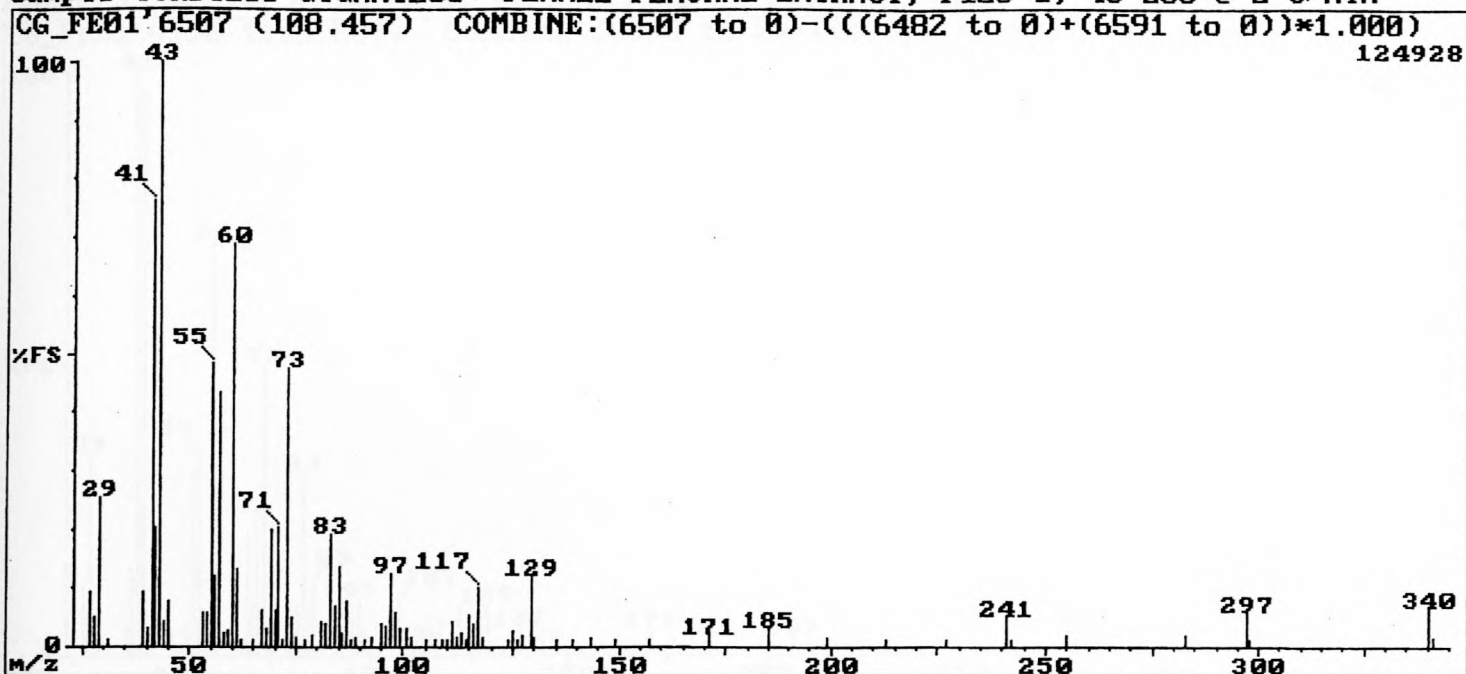


Fig. 2.13: EI-massaspektrum van Komponent 87 - dokosanoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

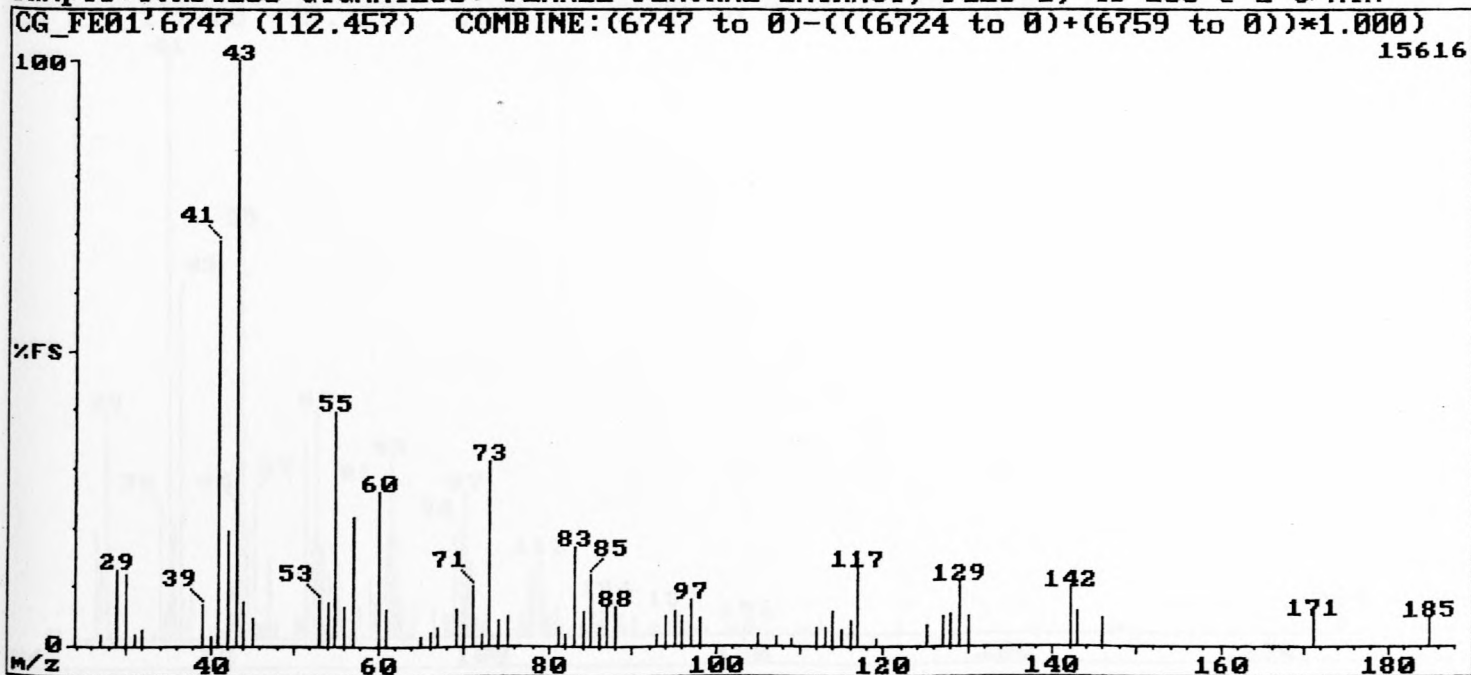


Fig. 2.14: EI-massaspektrum van Komponent 95 - trikosanoësuur.

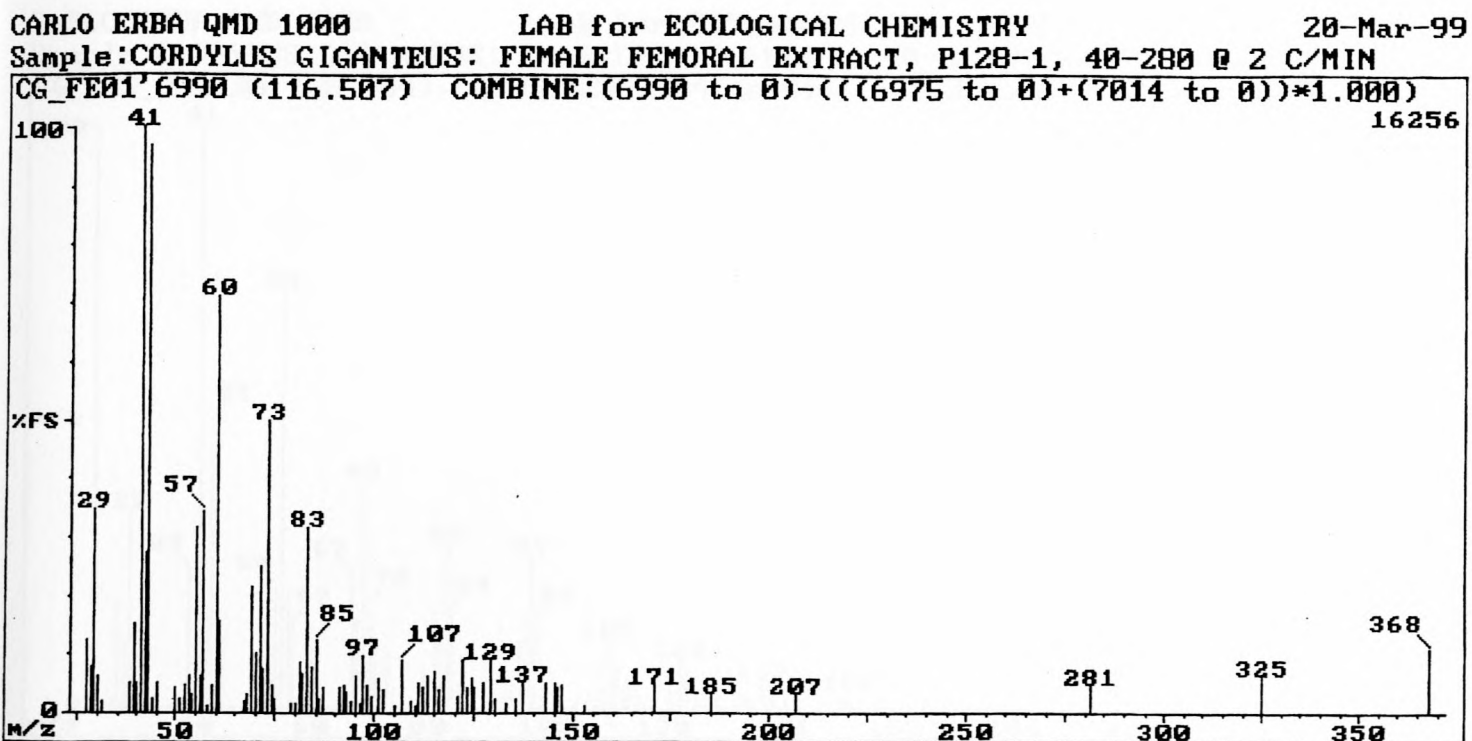


Fig. 2.15: EI-massaspektrum van Komponent 108 - tetrakosanoësuur.

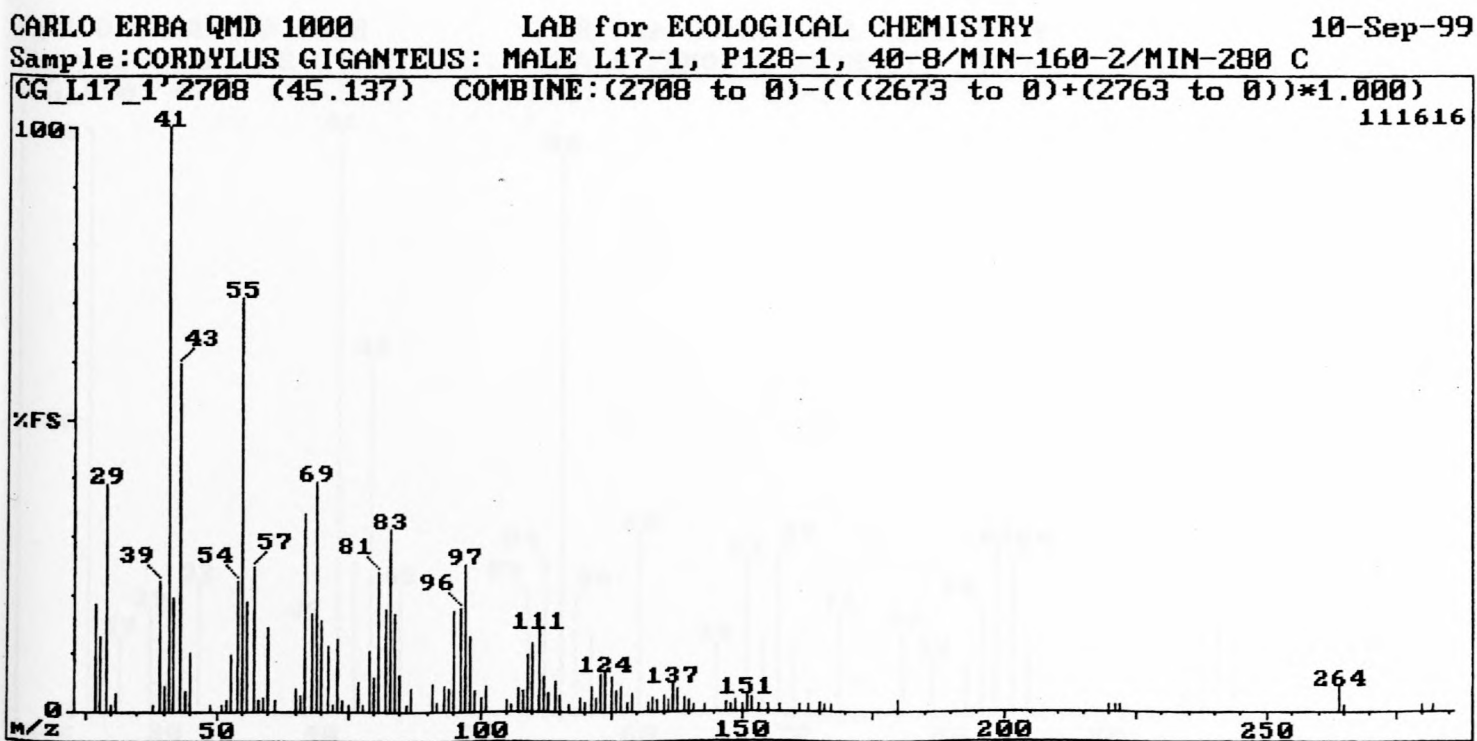


Fig. 2.16: EI-massaspektrum van Komponent 43 - 9Z-oktadekenoësuur.

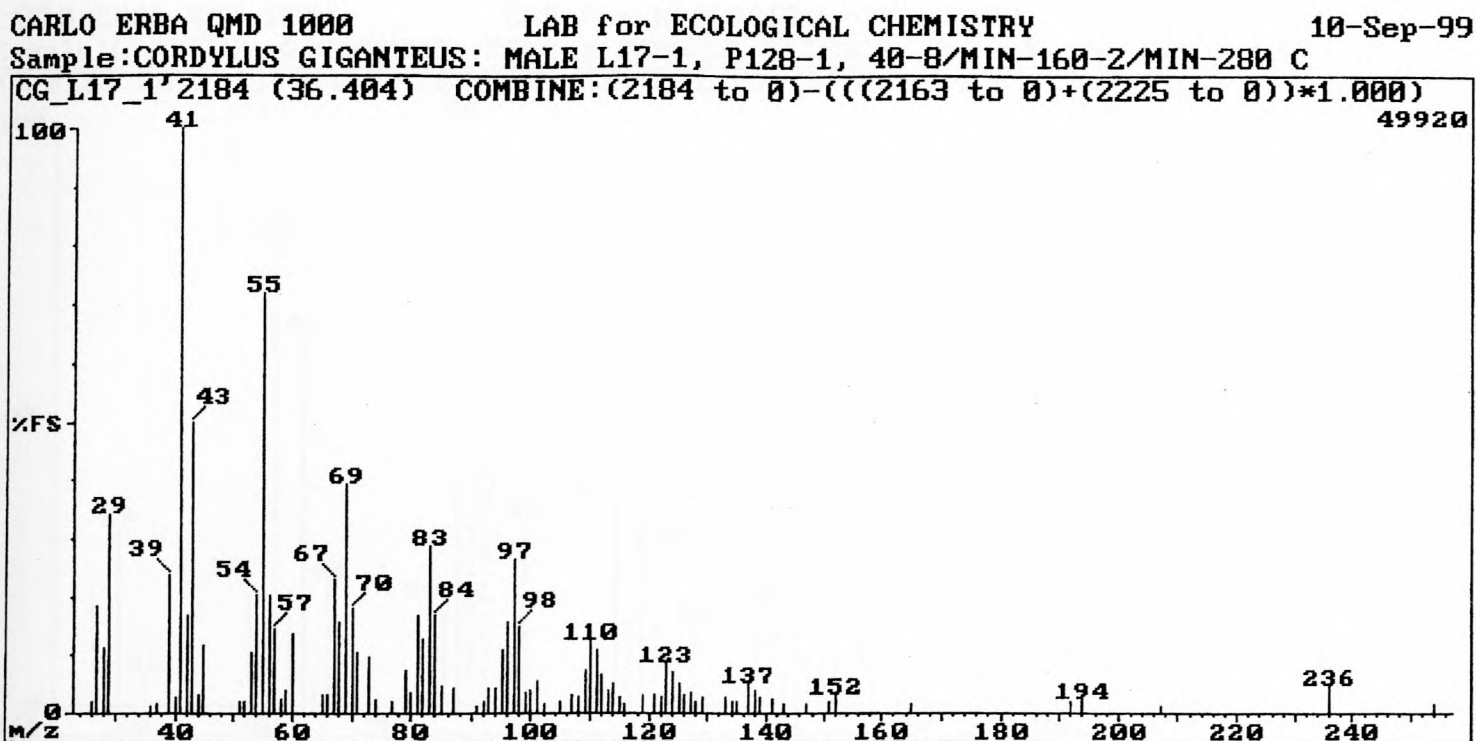


Fig. 2.17: EI-massaspektrum van Komponent 22 - 9Z-heksadekenoësuur.

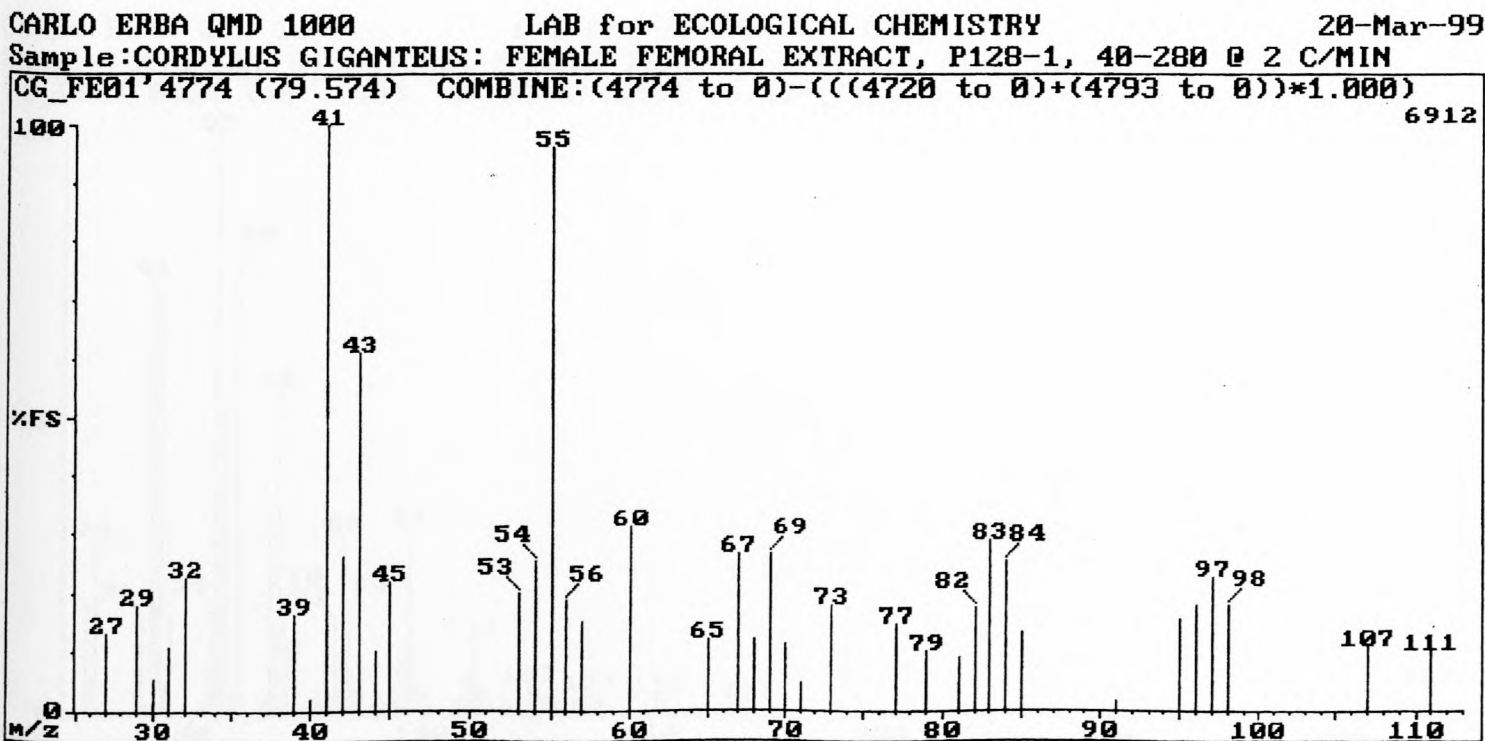


Fig. 2.18: EI-massaspektrum van Komponent 23 - heksadekenoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

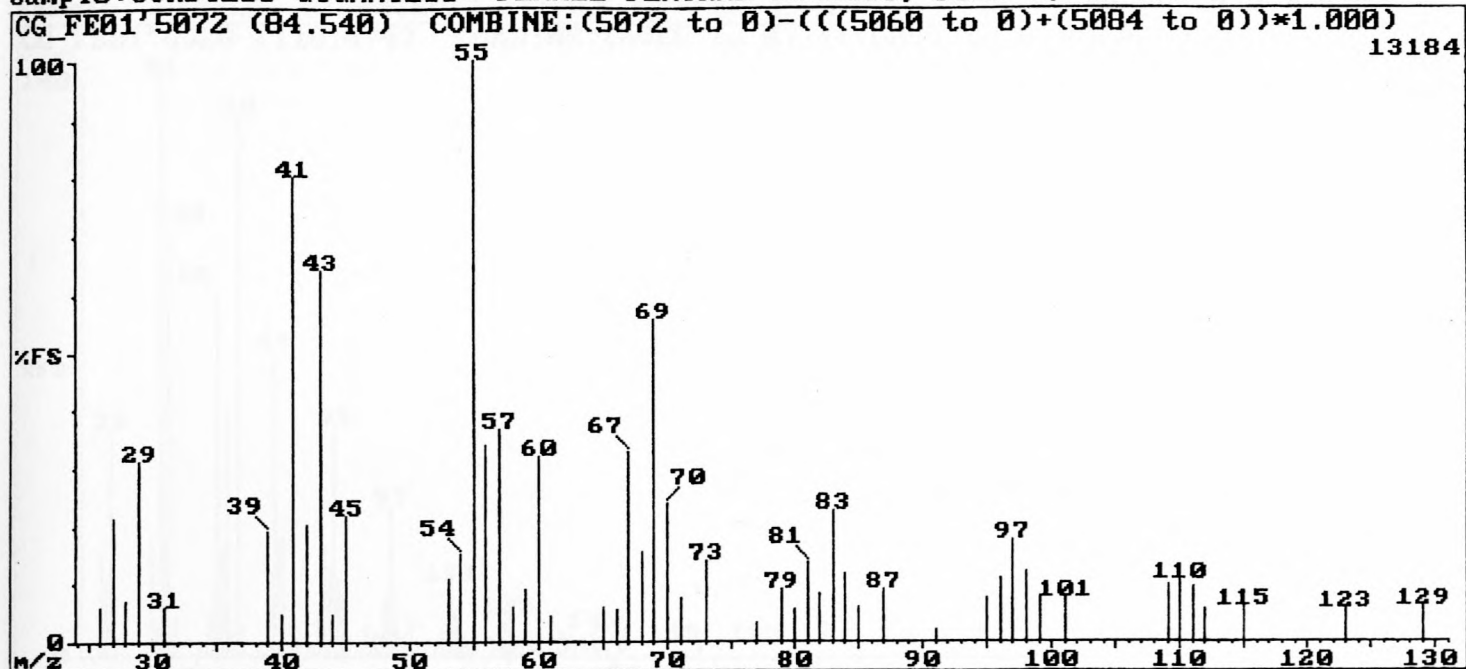


Fig. 2.19: EI-massaspektrum van Komponent 31 - heptadekenoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

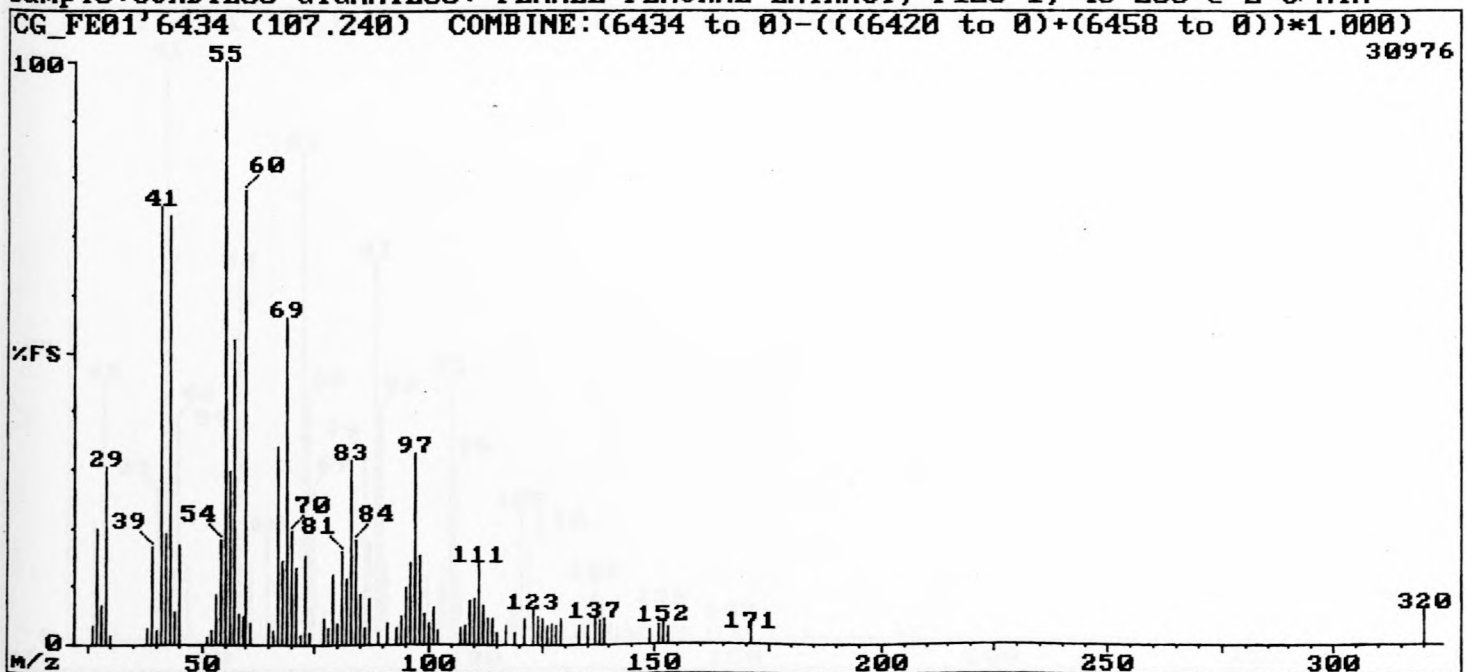


Fig. 2.20: EI-massaspektrum van Komponent 83 - dokosenoësuur.



CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 20-Mar-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

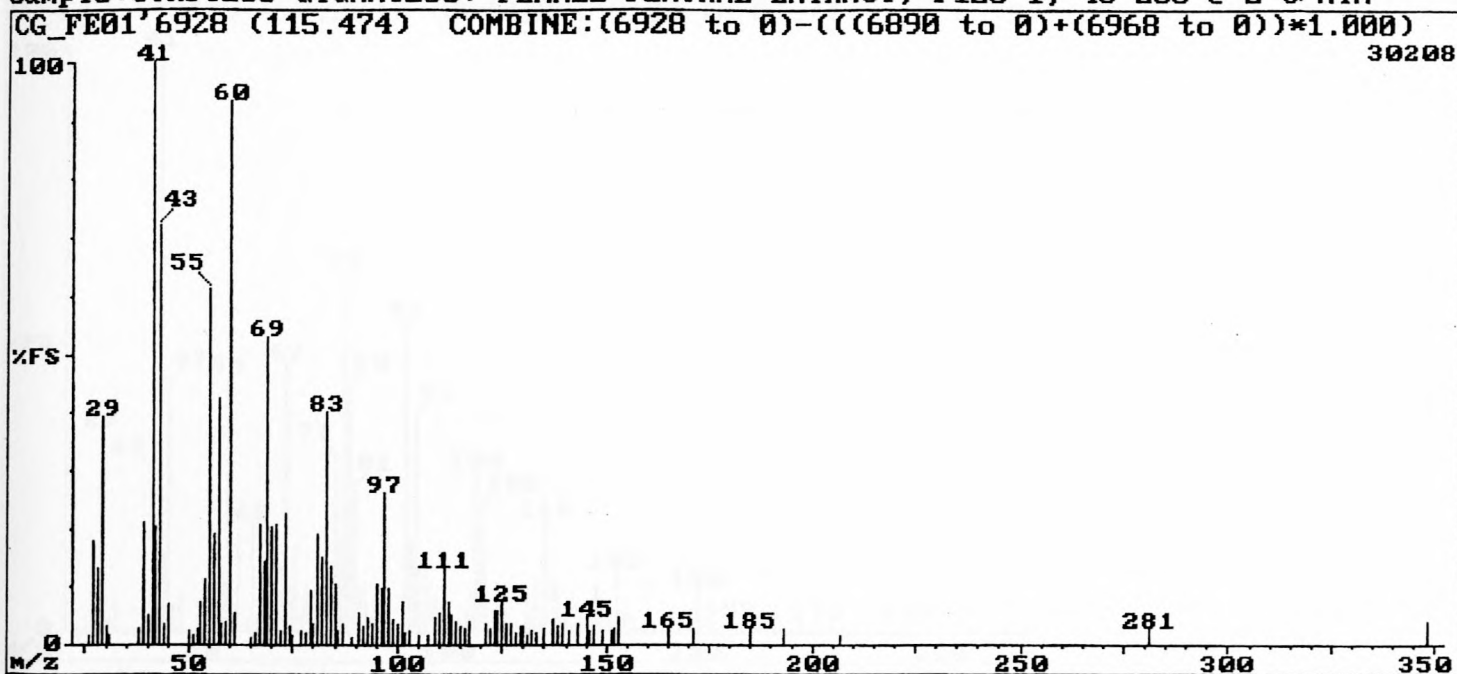


Fig. 2.21: EI-massaspektrum van Komponent 104 - tetrakosenoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 10-Sep-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MALE L17-1, P128-1, 40-8/MIN-160-2/MIN-280 C

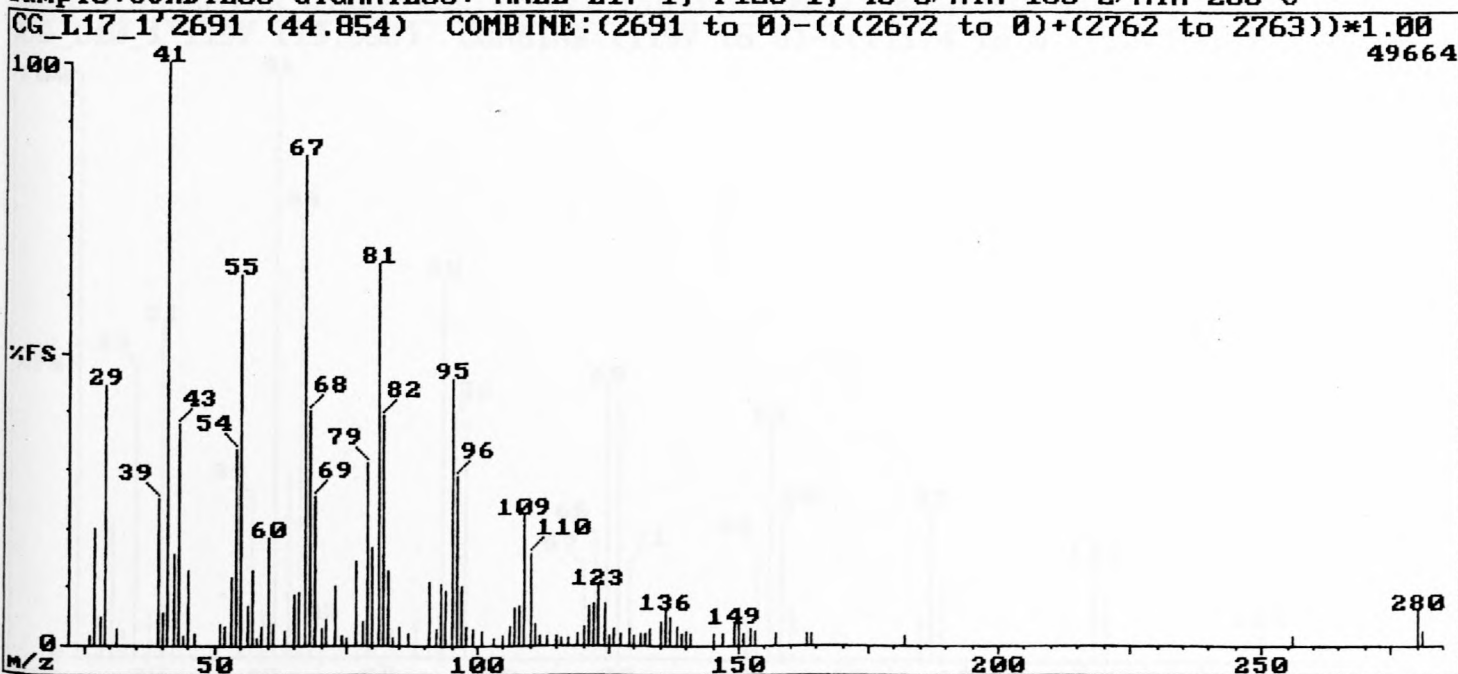


Fig. 2.22: EI-massaspektrum van Komponent 42 - 9Z,12Z-oktadekadiënoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 10-Sep-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MALE L17-1, P128-1, 40-8/MIN-160-2/MIN-280 C

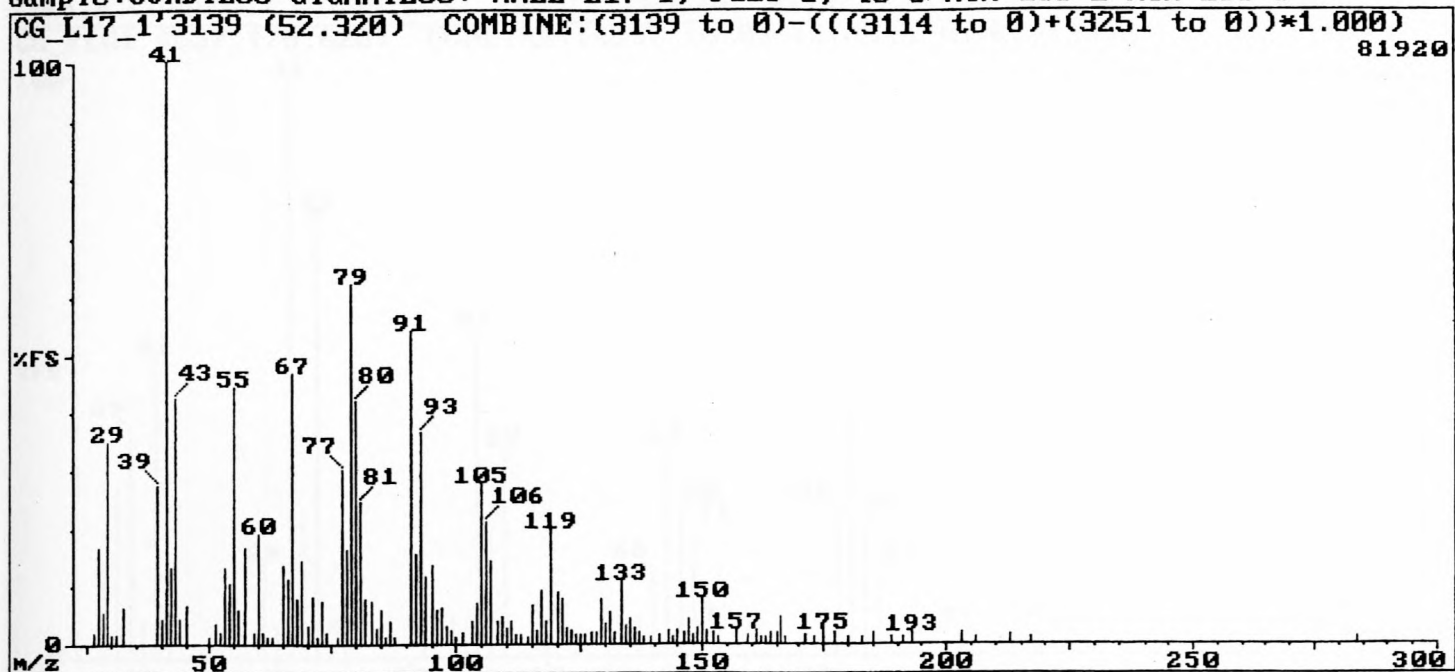


Fig. 2.23: EI-massaspektrum van Komponent 58 - 8Z,11Z,14Z-ikosatriënoësuur.

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 09-Sep-99  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS:FEMALE L10-1, P128-1, 40-8/MIN-160-2/MIN-280 C

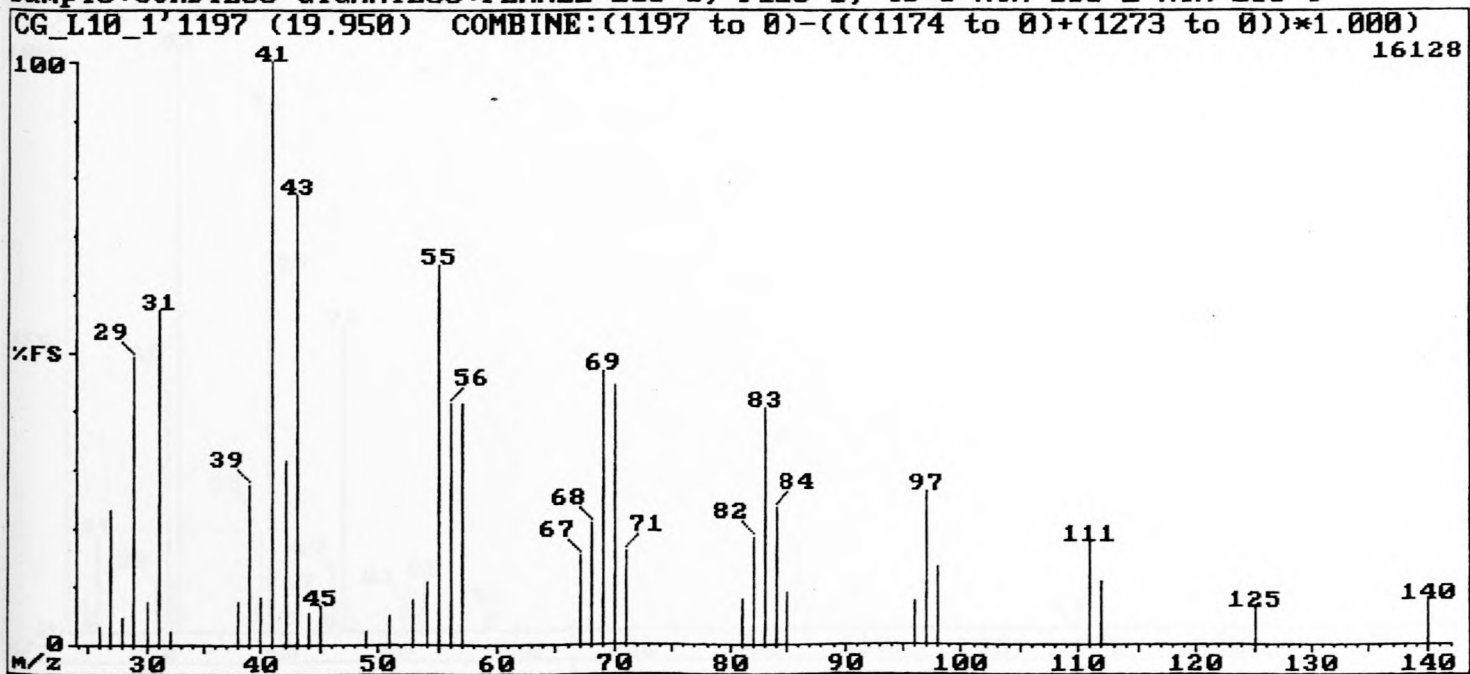


Fig. 2.24: EI-massaspektrum van Komponent 2 - 1-dodekanol.

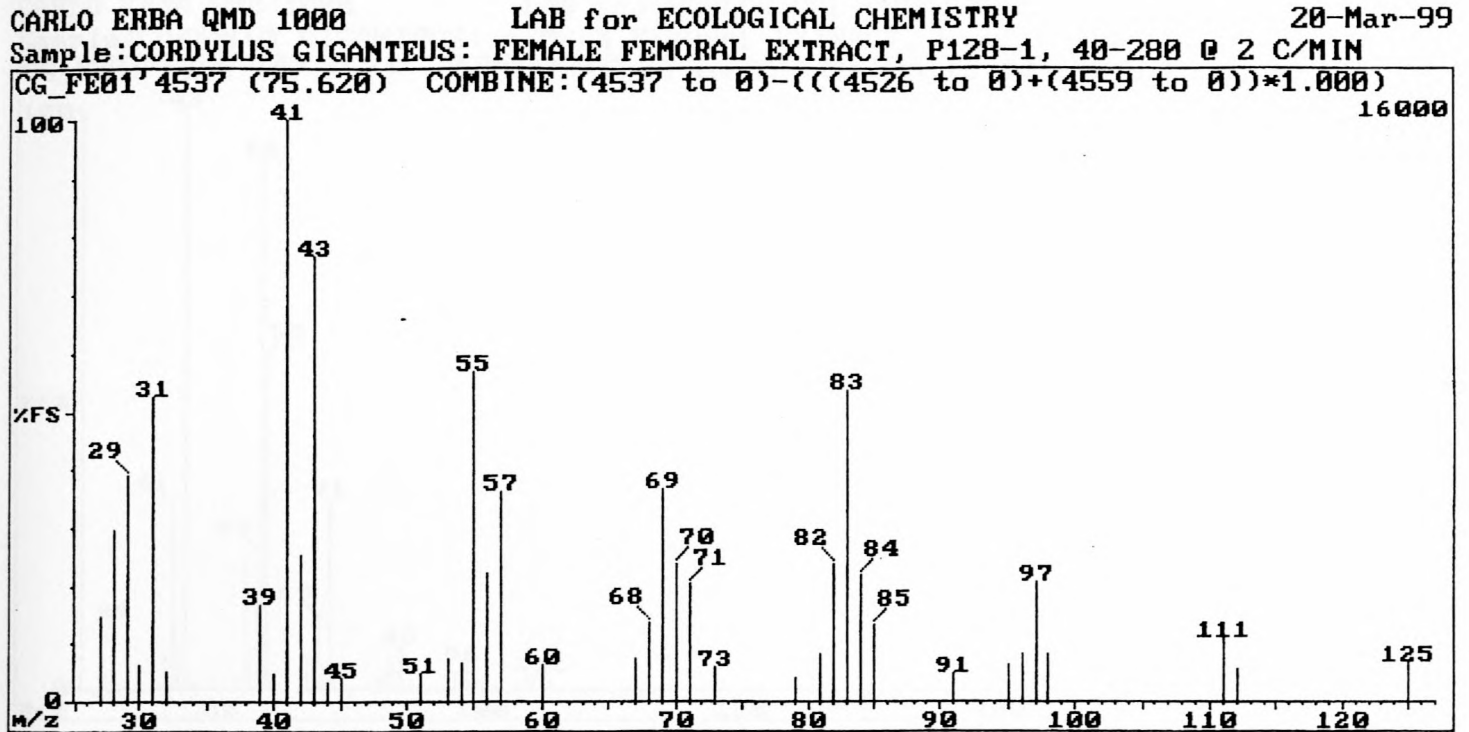


Fig. 2.25: EI-massaspektrum van Komponent 17 - 1-heksadekanol.

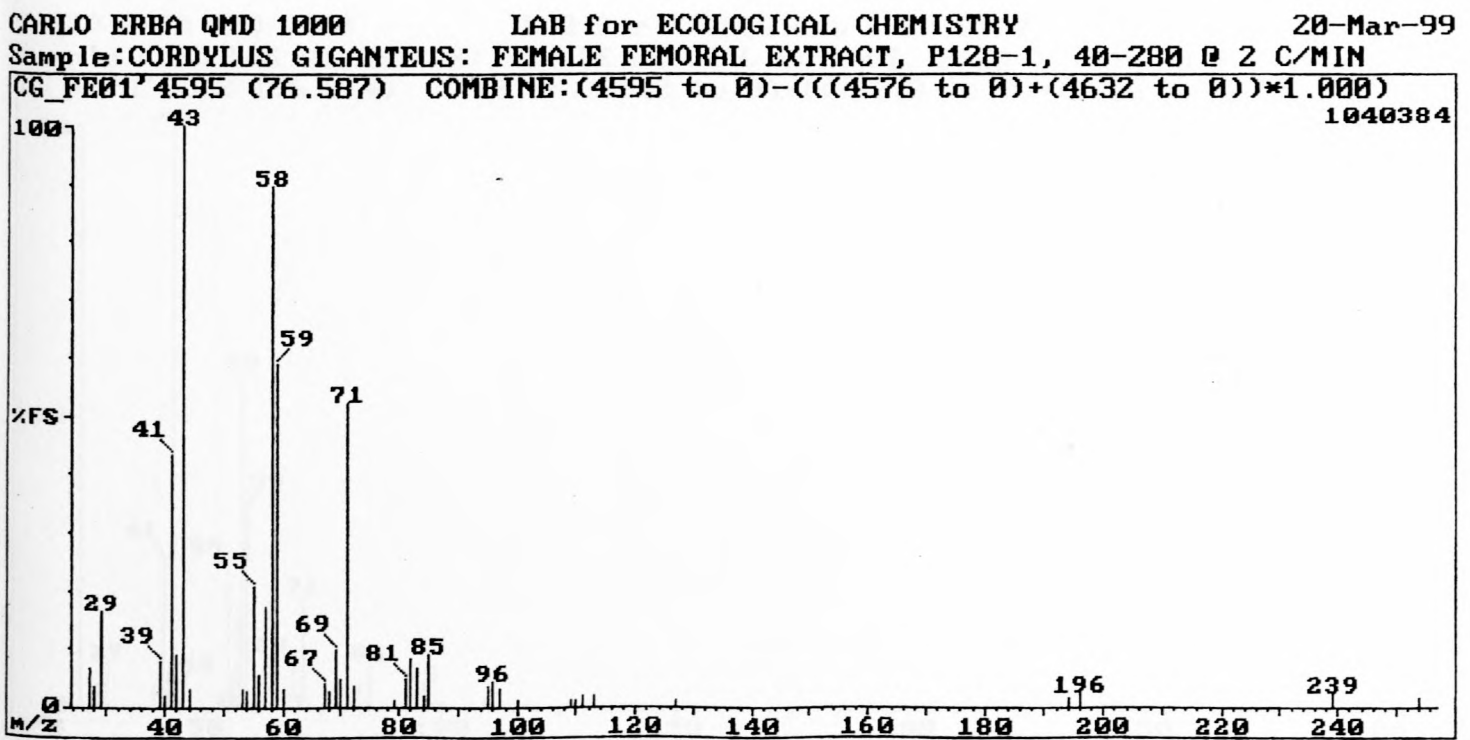


Fig. 2.26: EI-massaspektrum van Komponent 19 - 2-heptadekanoon.

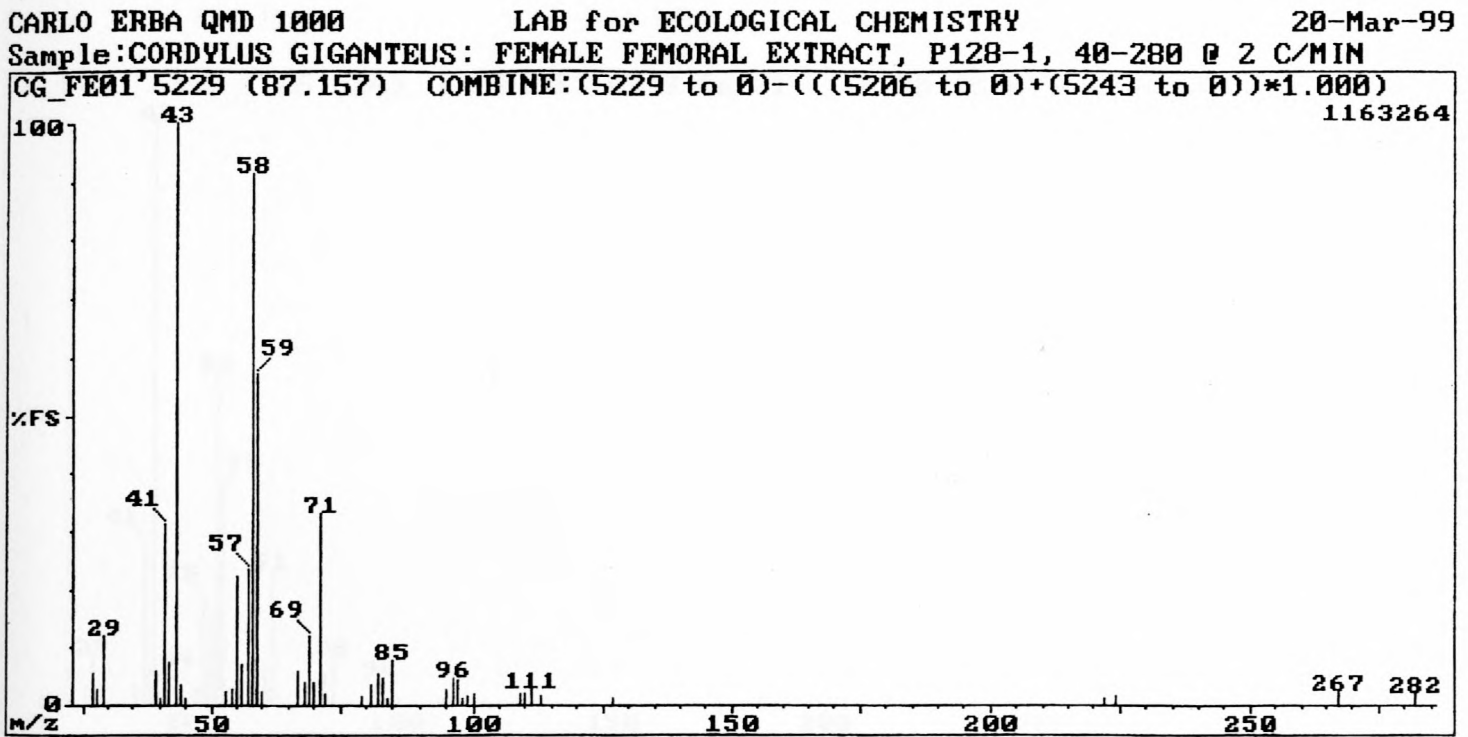


Fig. 2.27: EI-massaspektrum van Komponent 40 - 2-nonadekanoon.

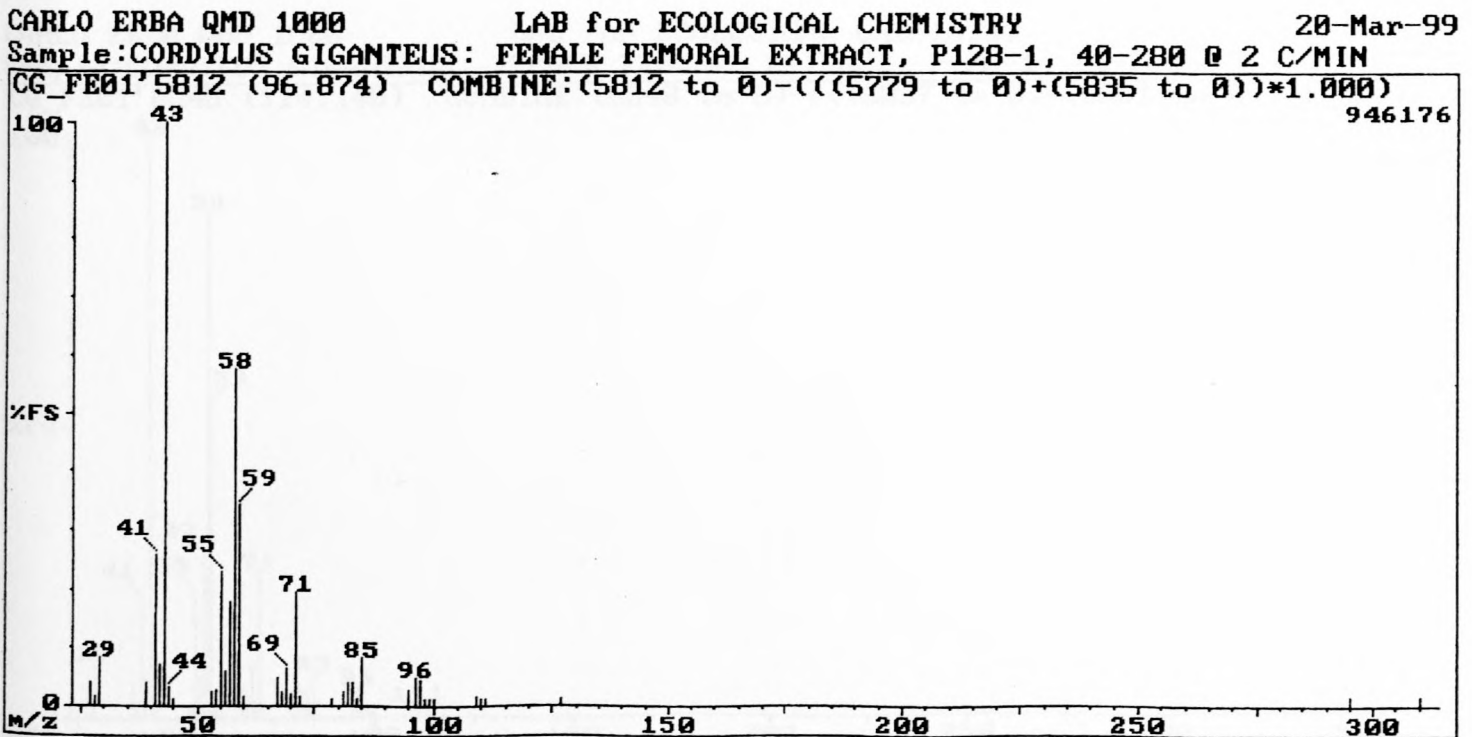


Fig. 2.28: EI-massaspektrum van Komponent 60 - 2-henikosanoon.

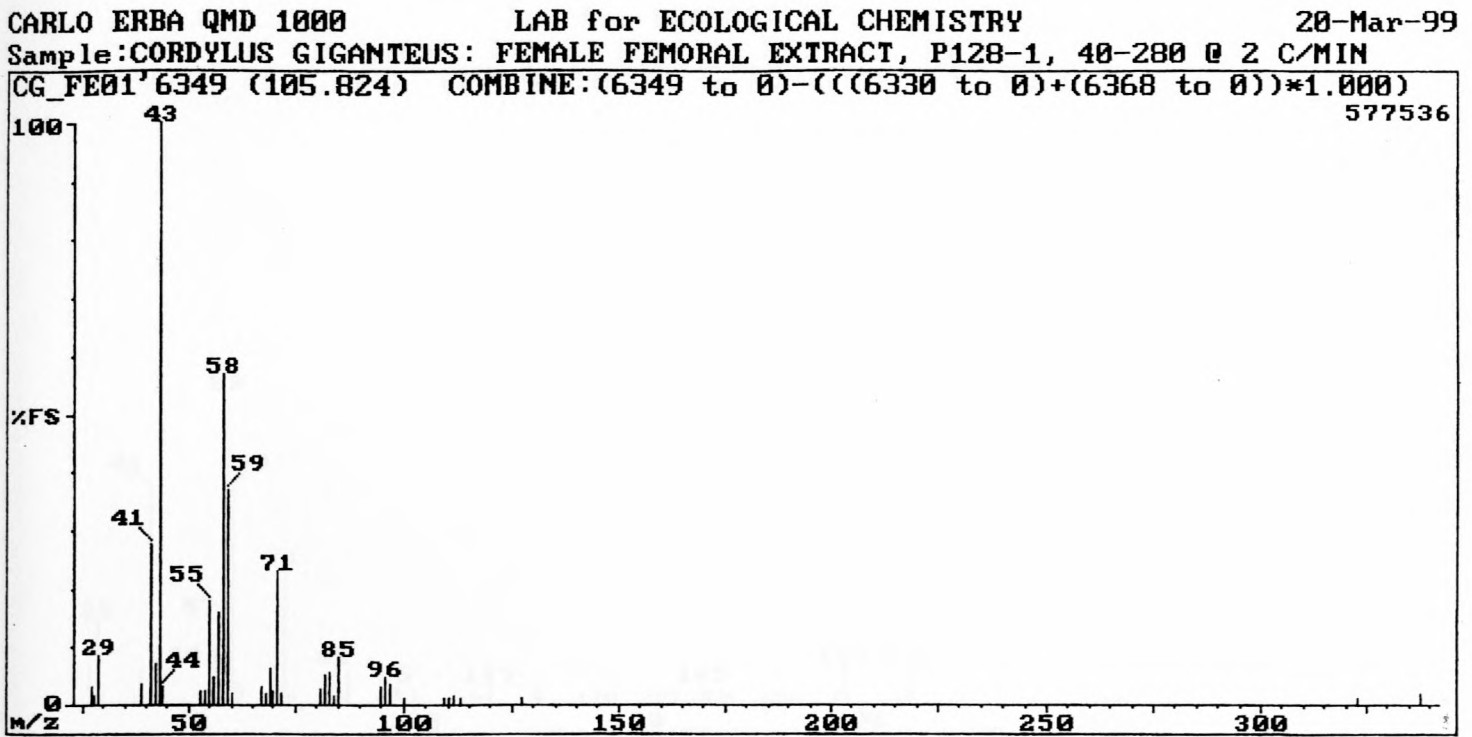


Fig. 2.29: EI-massaspektrum van Komponent 81 - 2-trikosanoon.

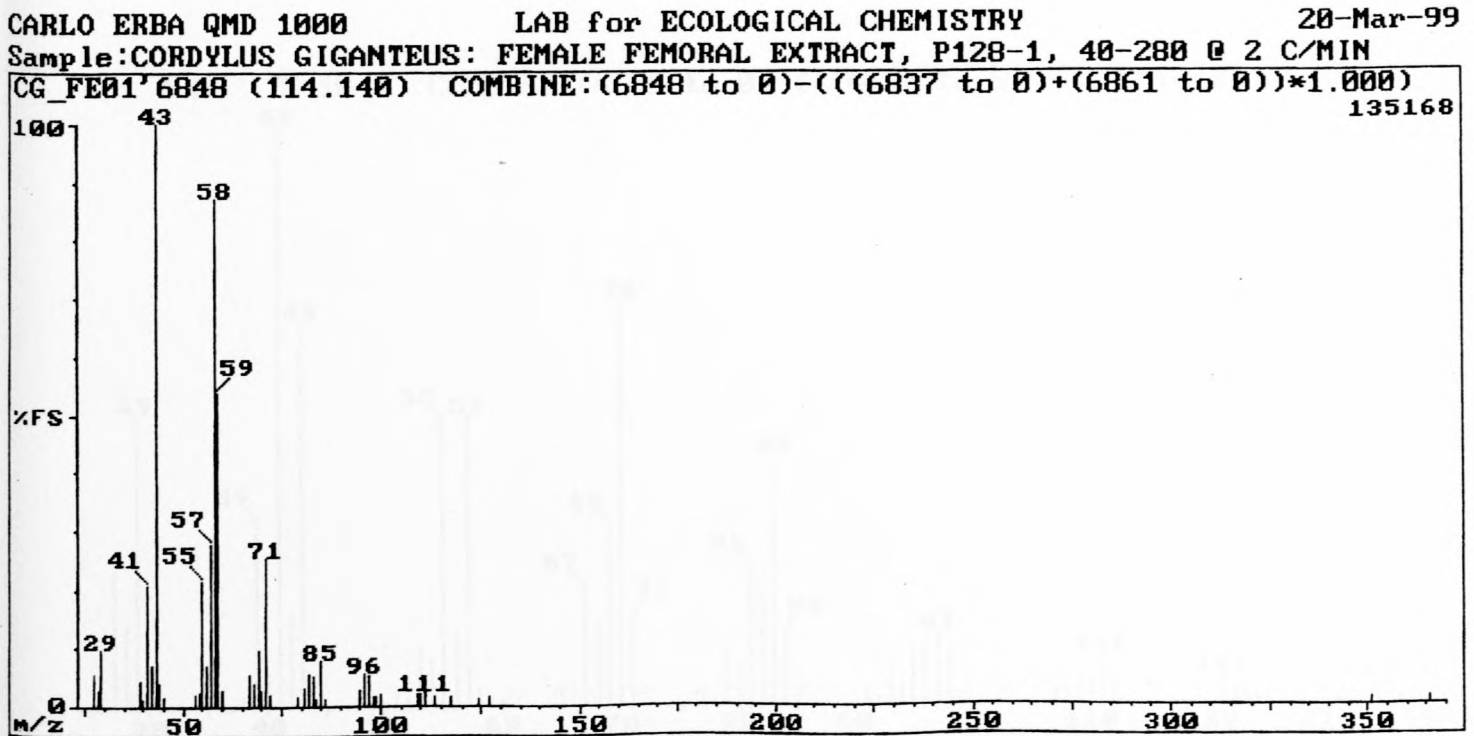


Fig. 2.30: EI-massaspektrum van Komponent 101 - 2-pentakosanoon.

## HOOFSTUK II

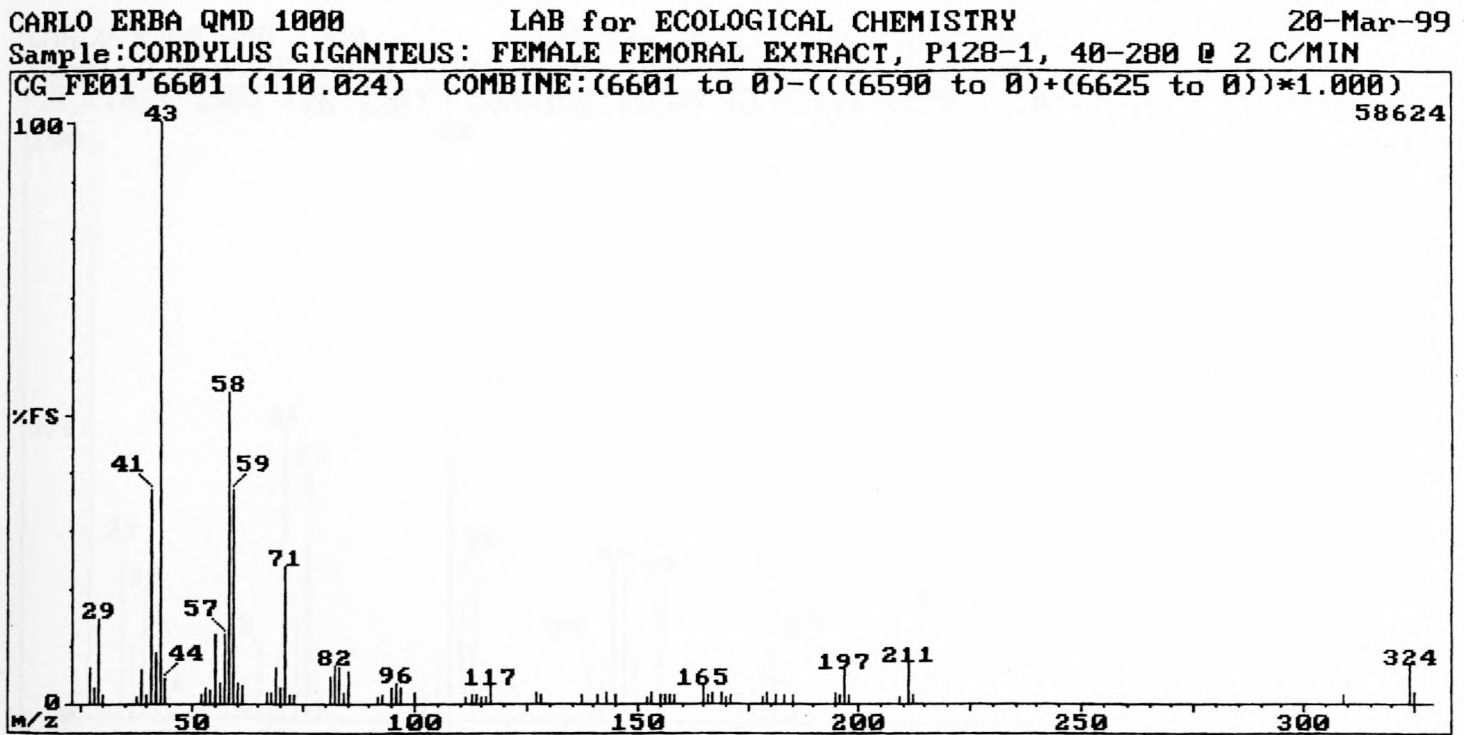


Fig. 2.31: EI-massaspektrum van Komponent 91 - 2-tetrakosanoon.

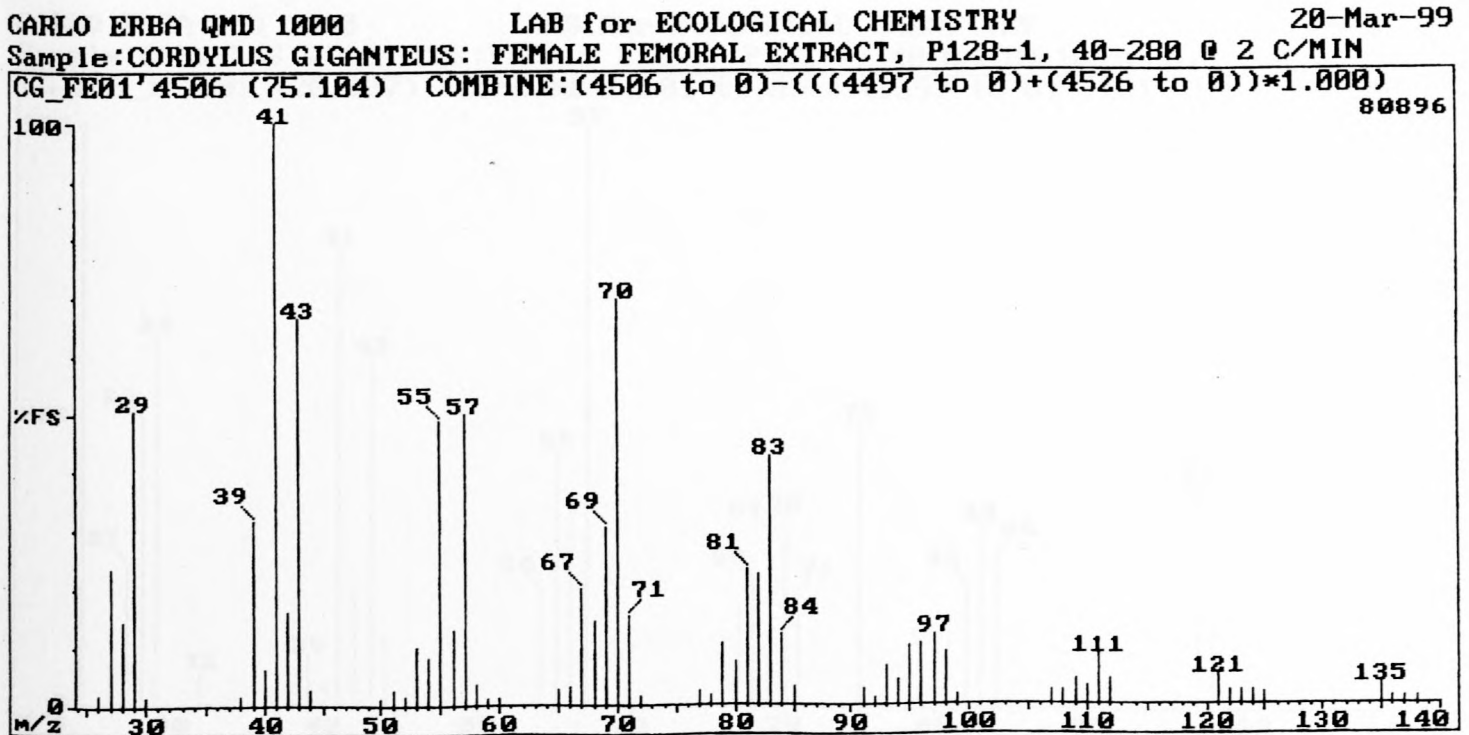


Fig. 2.32: EI-massaspektrum van Komponent 16 - 2-heptadekenaal.

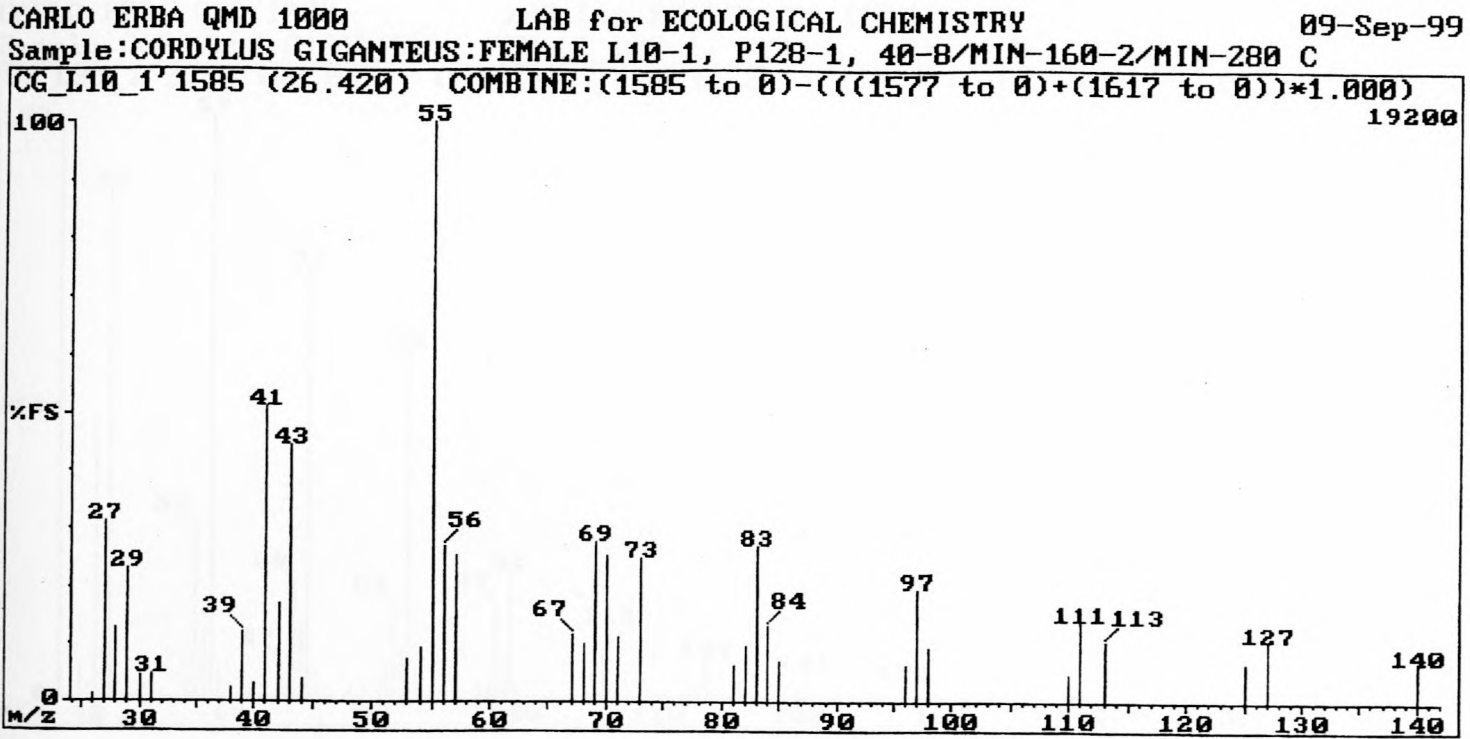


Fig. 2.33: EI-massaspektrum van Komponent 6 - dodekielpropenoat.

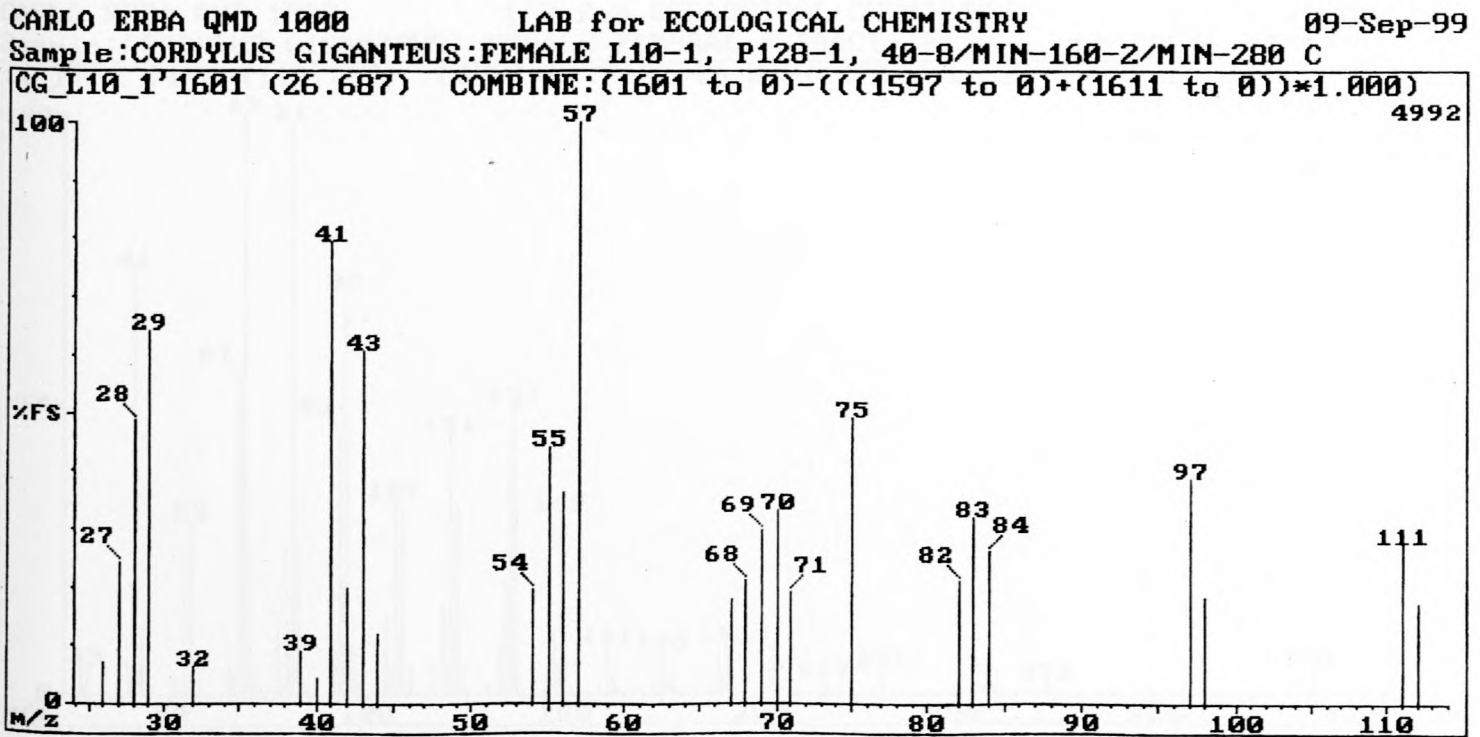


Fig. 2.34: EI-massaspektrum van Komponent 7 - dodekielpropenoat

## HOOFSTUK II

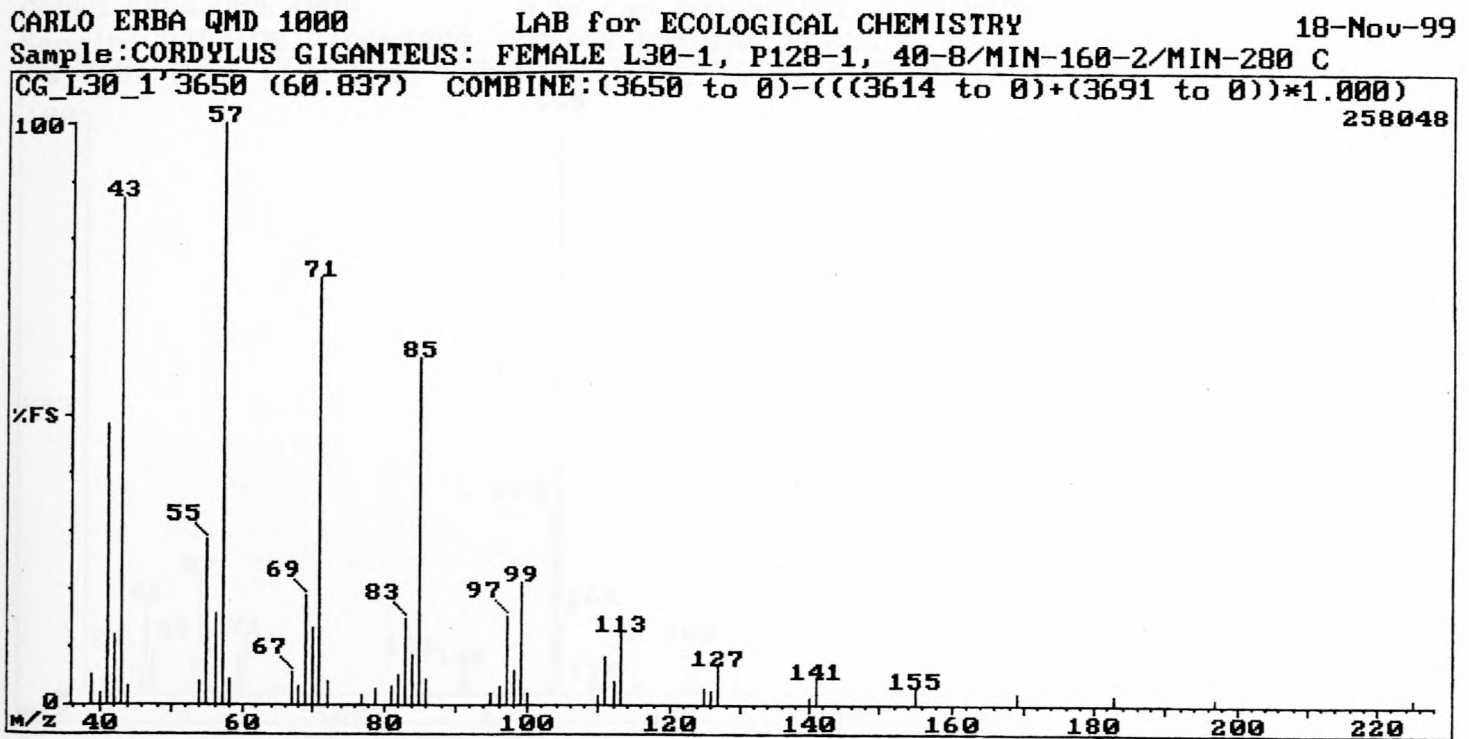


Fig. 2.35: EI-massaspektrum van Komponent 80 - n-pentakosanoon

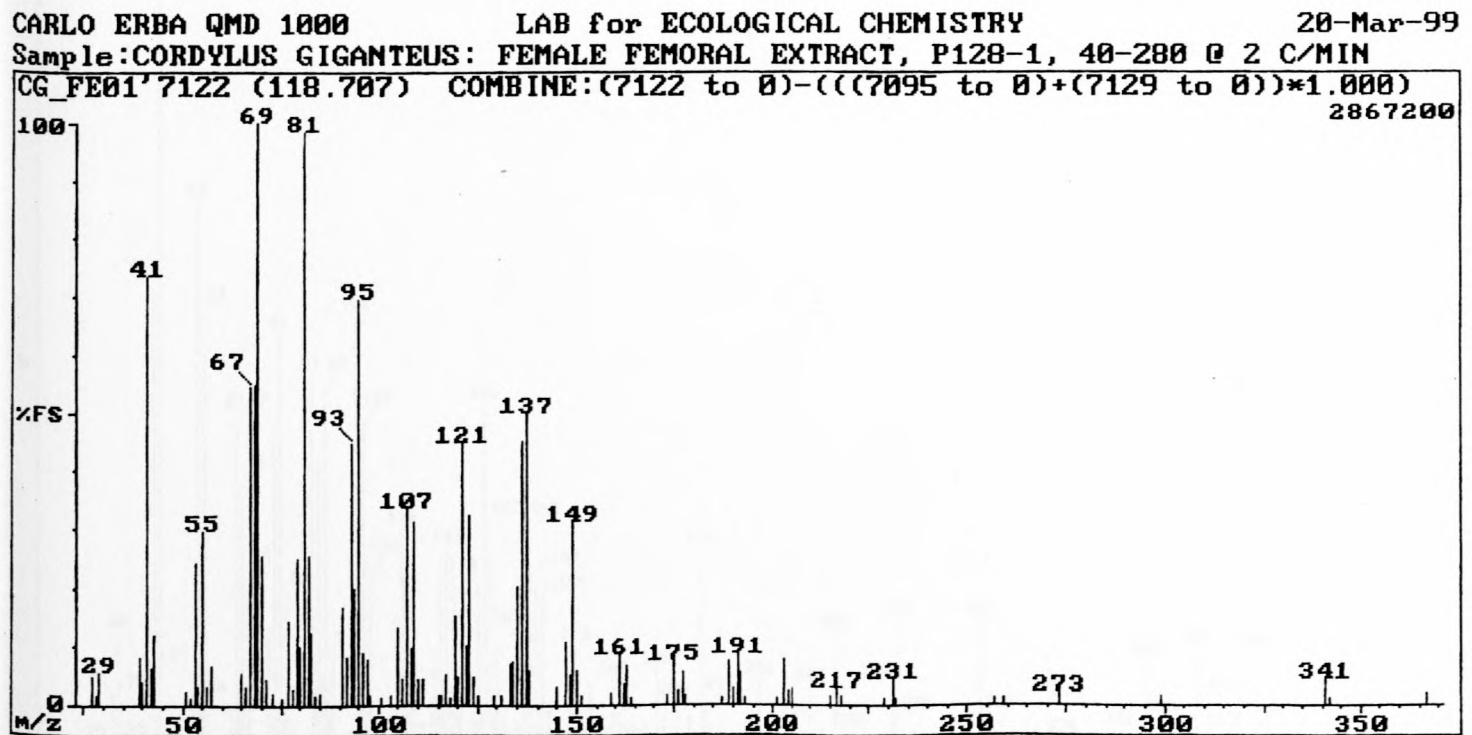


Fig. 2.36: EI-massaspektrum van Komponent 116 - skwaleen



## HOOFSTUK II

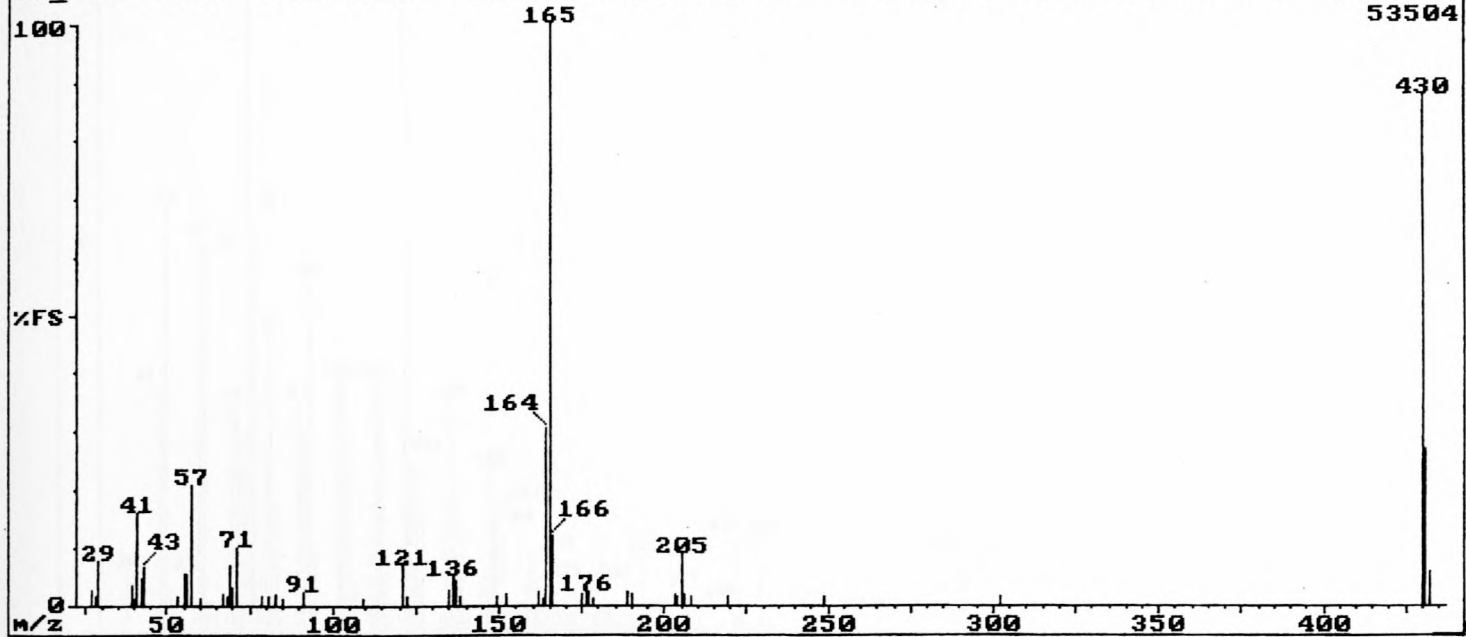
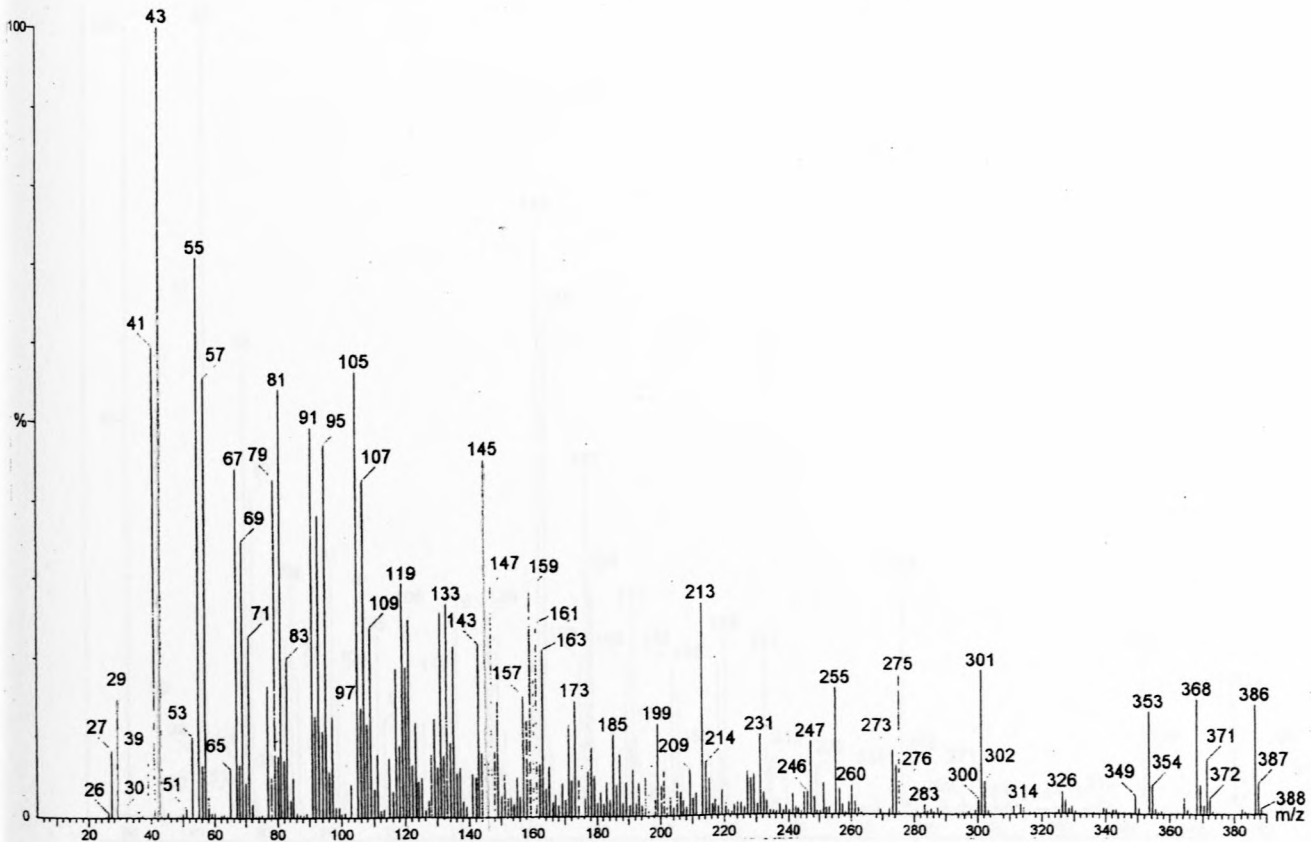
CARLO ERBA QM0 1000

LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY

20-Mar-99

Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: FEMALE FEMORAL EXTRACT, P128-1, 40-280 @ 2 C/MIN

CG\_FE01'7955 (132.594) COMBINE:(7955 to 0)-(((7945 to 0)+(7967 to 0))\*1.000)

Fig. 2.37: EI-massaspektrum van Komponent 152 -  $\alpha$ -tokoferolFig. 2.38 a: EI-massaspektrum van Komponent 149 - cholest-5-en-3 $\beta$ -ol

## HOOFSTUK II

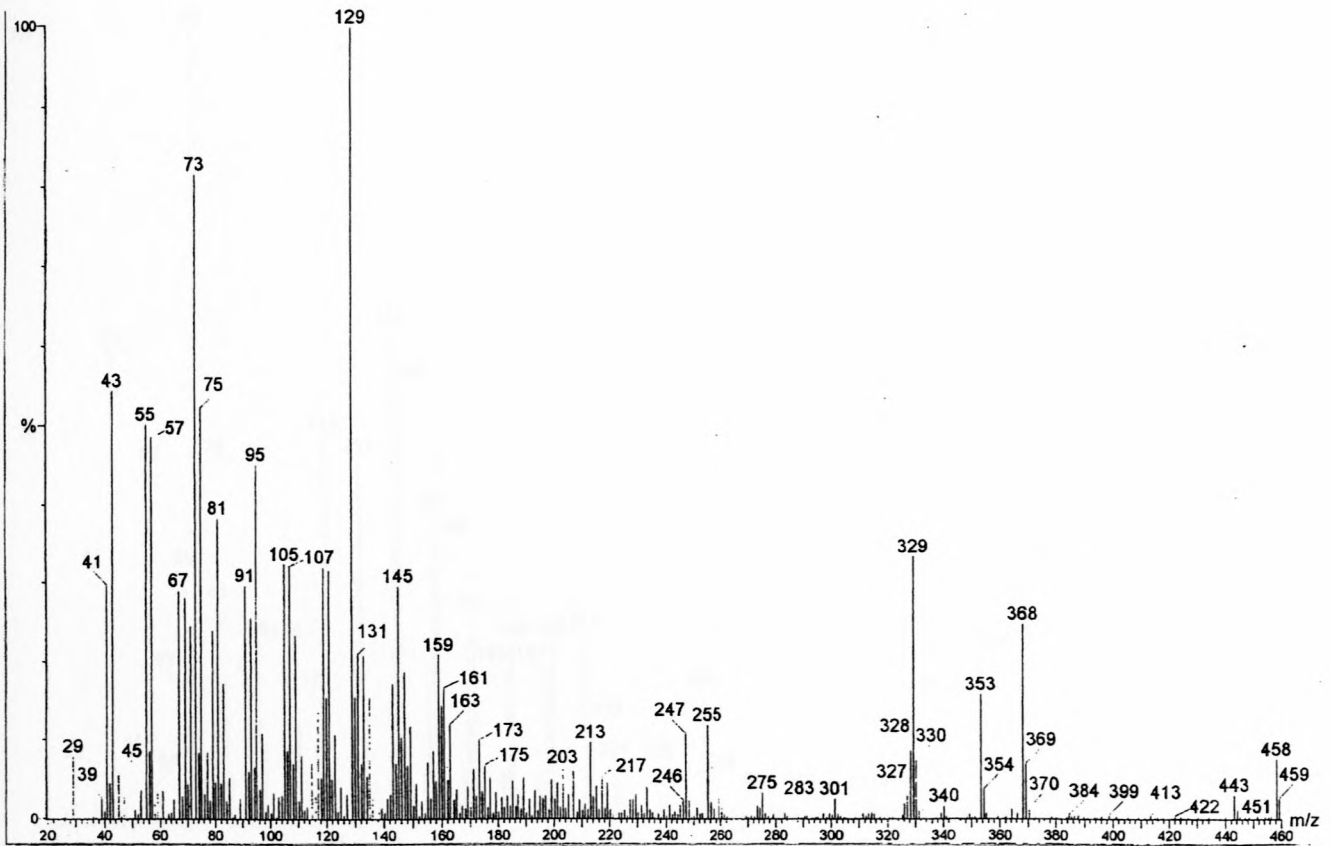


Fig. 2.38 b: EI-massaspektrum van cholest-5-en-3β-OTMS

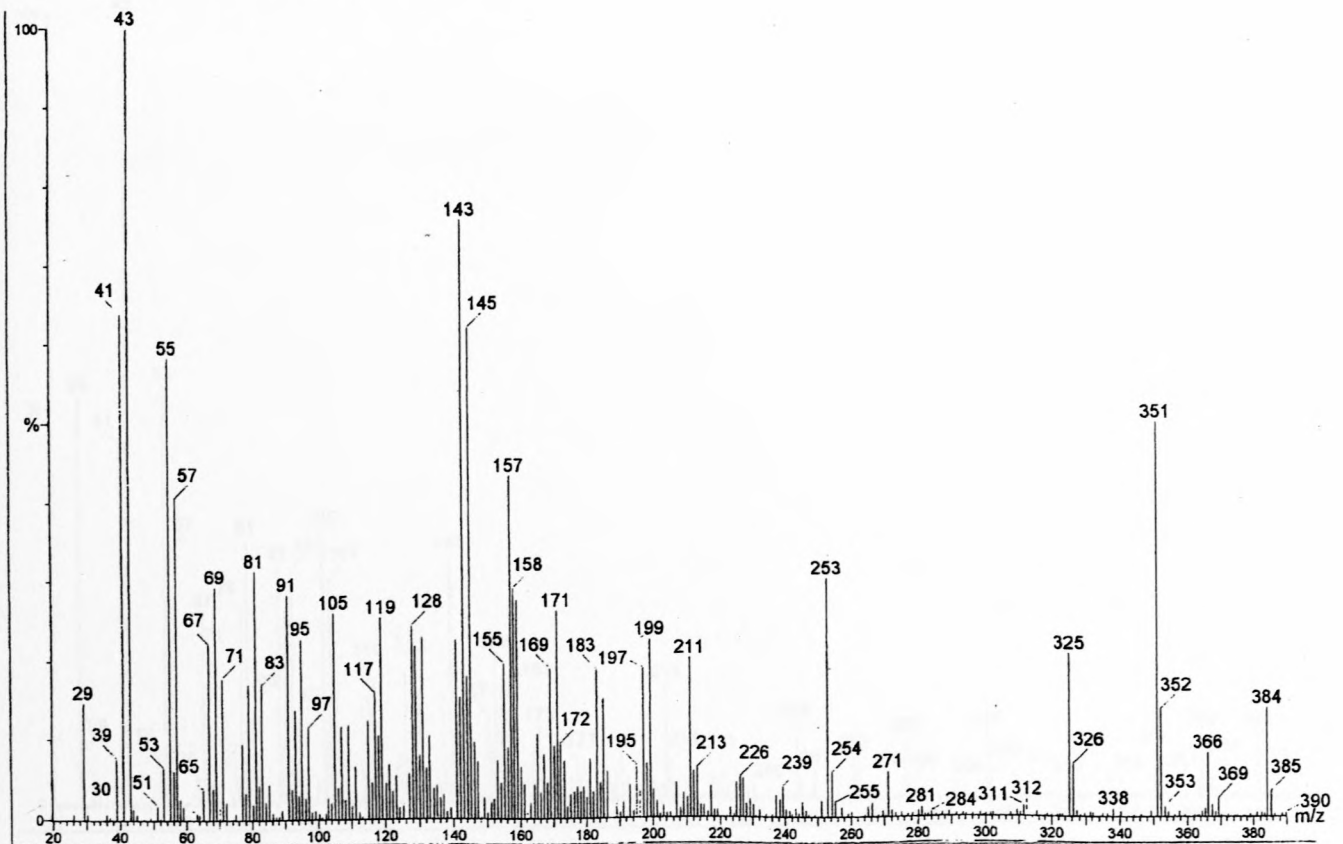
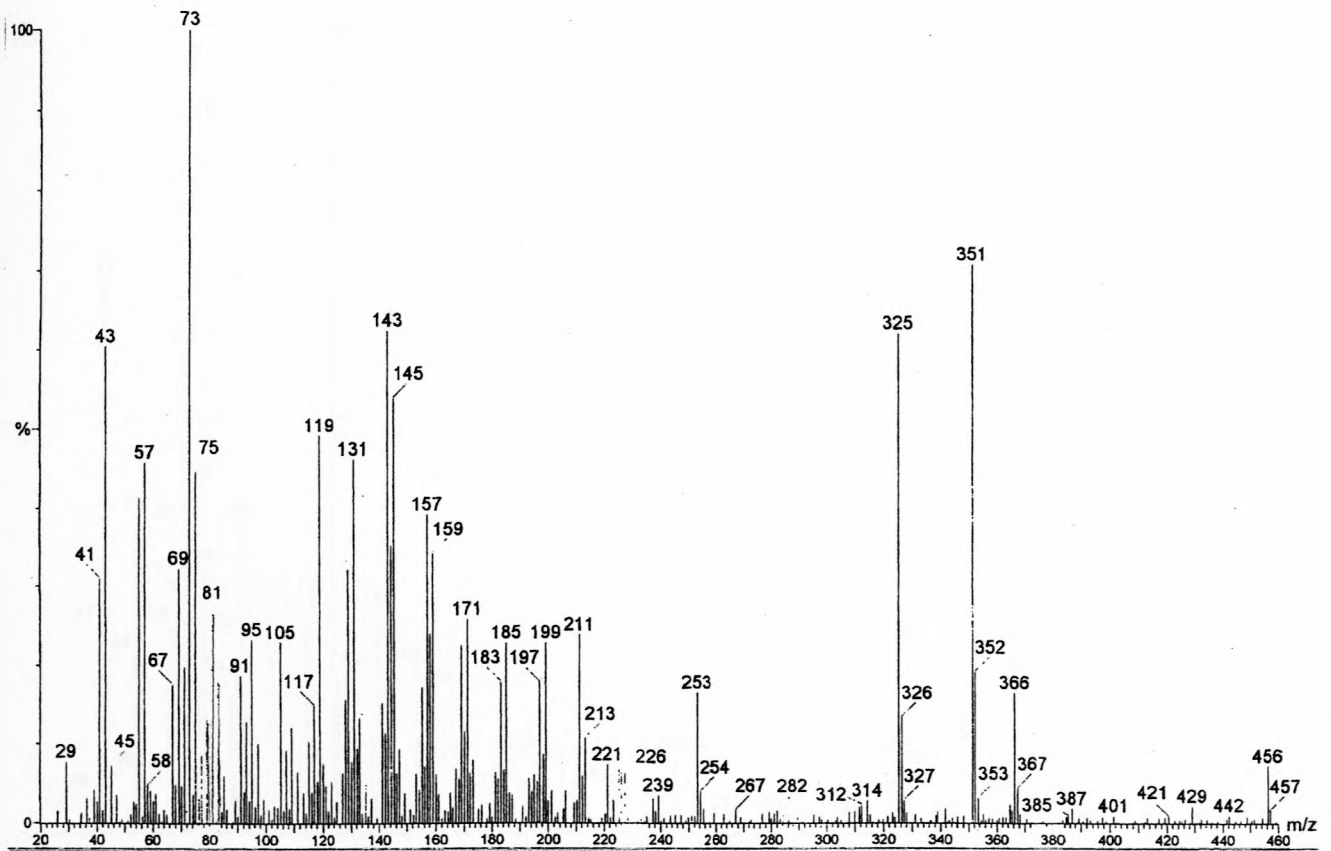
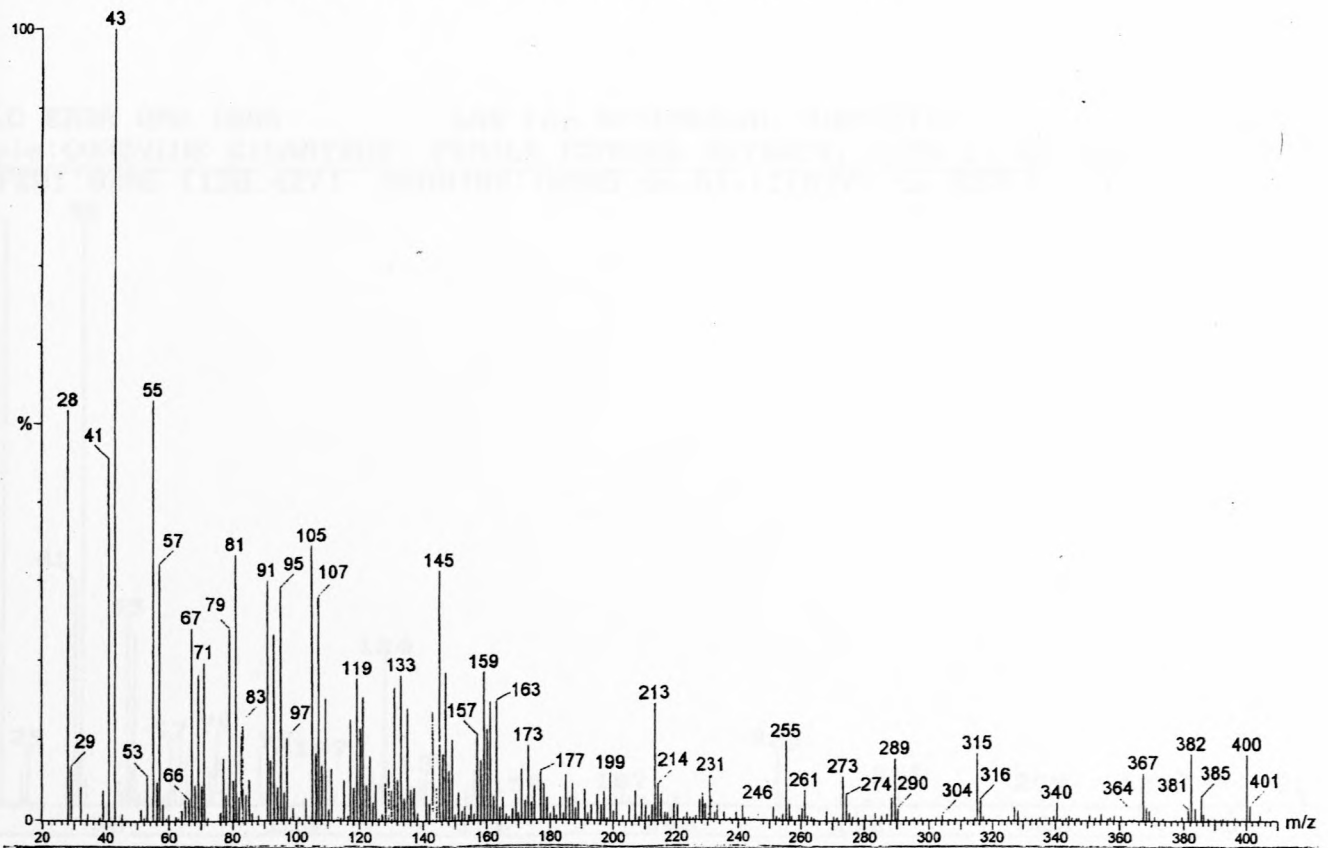


Fig. 2.39 a: EI-massaspektrum van Komponent 153 - cholesta-5,7-dien-3β-ol

## HOOFSTUK II

Fig. 2.39 b: EI-massaspektrum van cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -OTMSFig. 2.40 a: EI-massaspektrum van Komponent 160 - ergost-5-en-3 $\beta$ -ol

## HOOFSTUK II

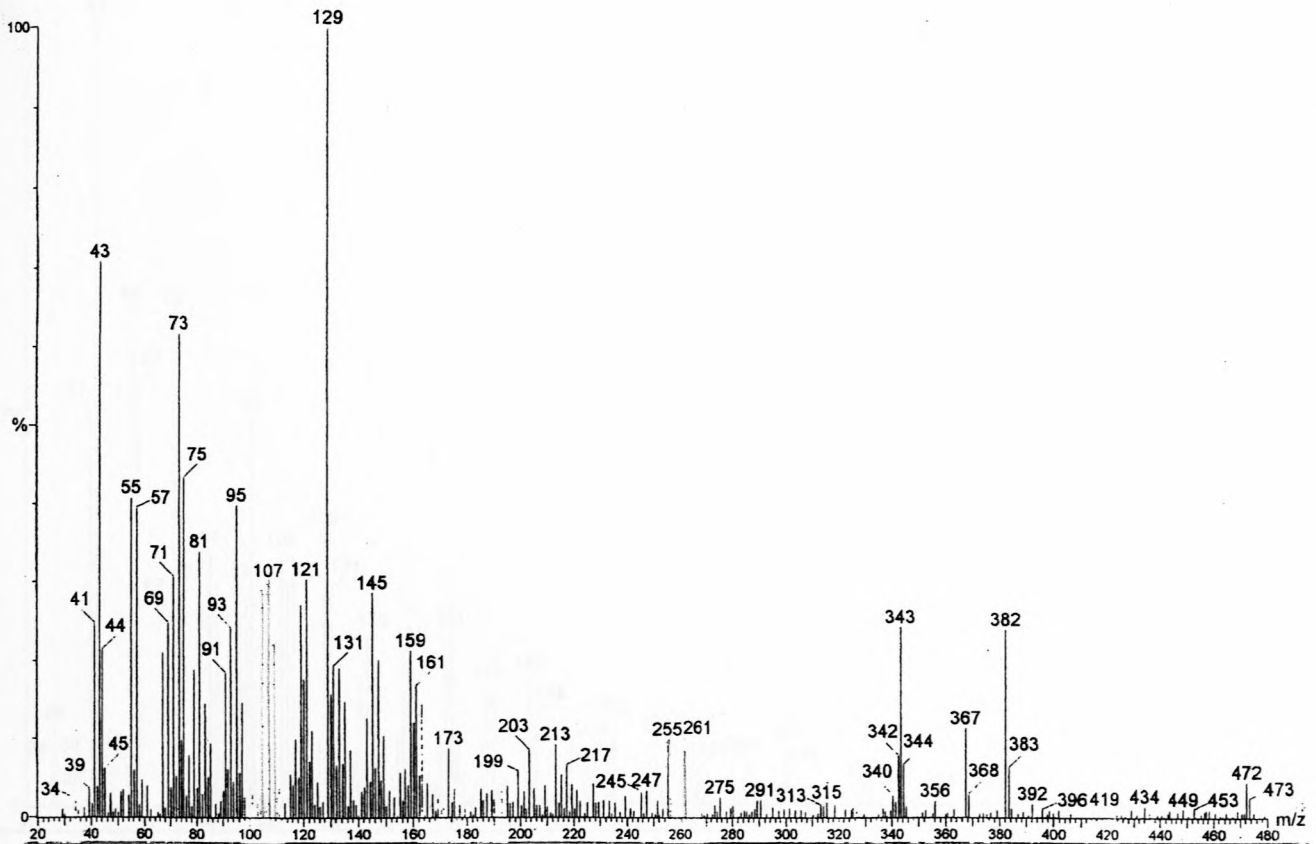
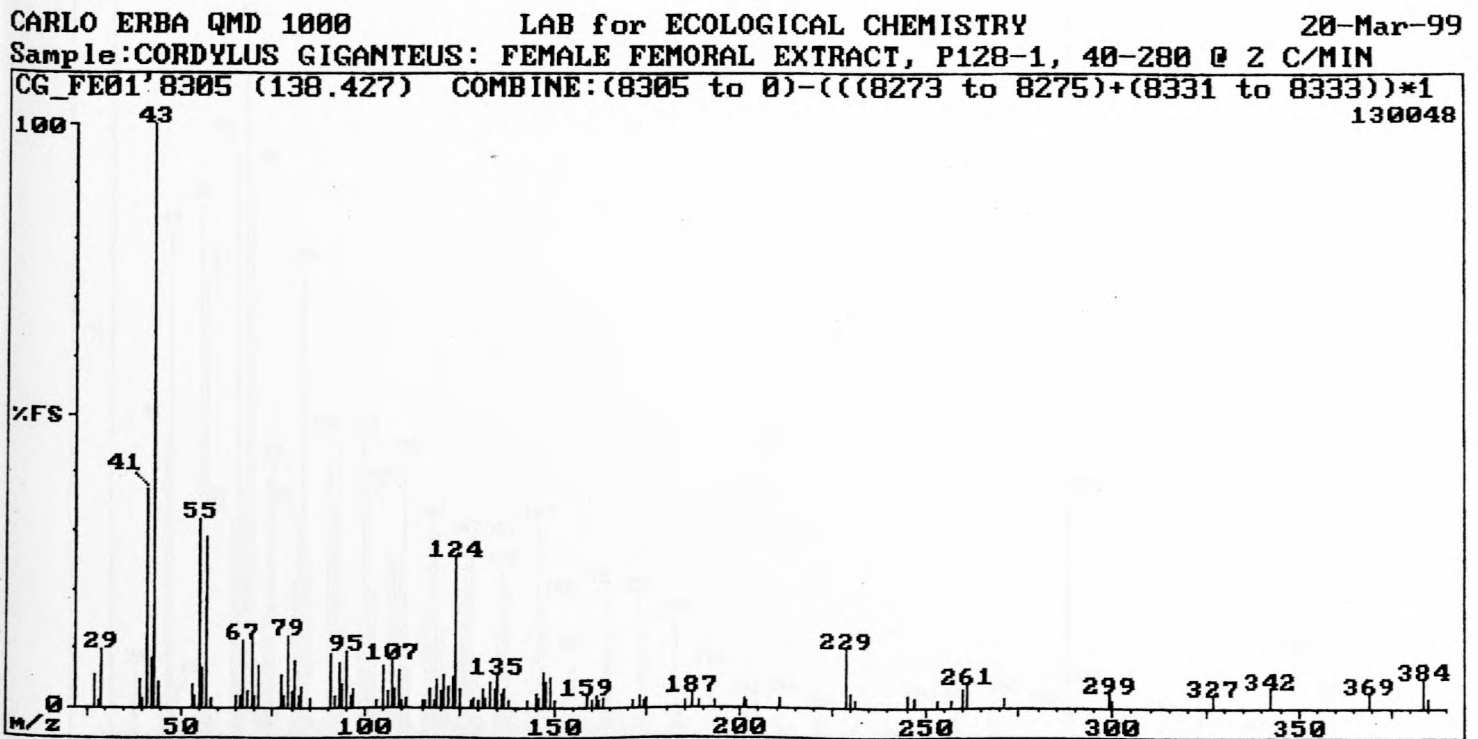
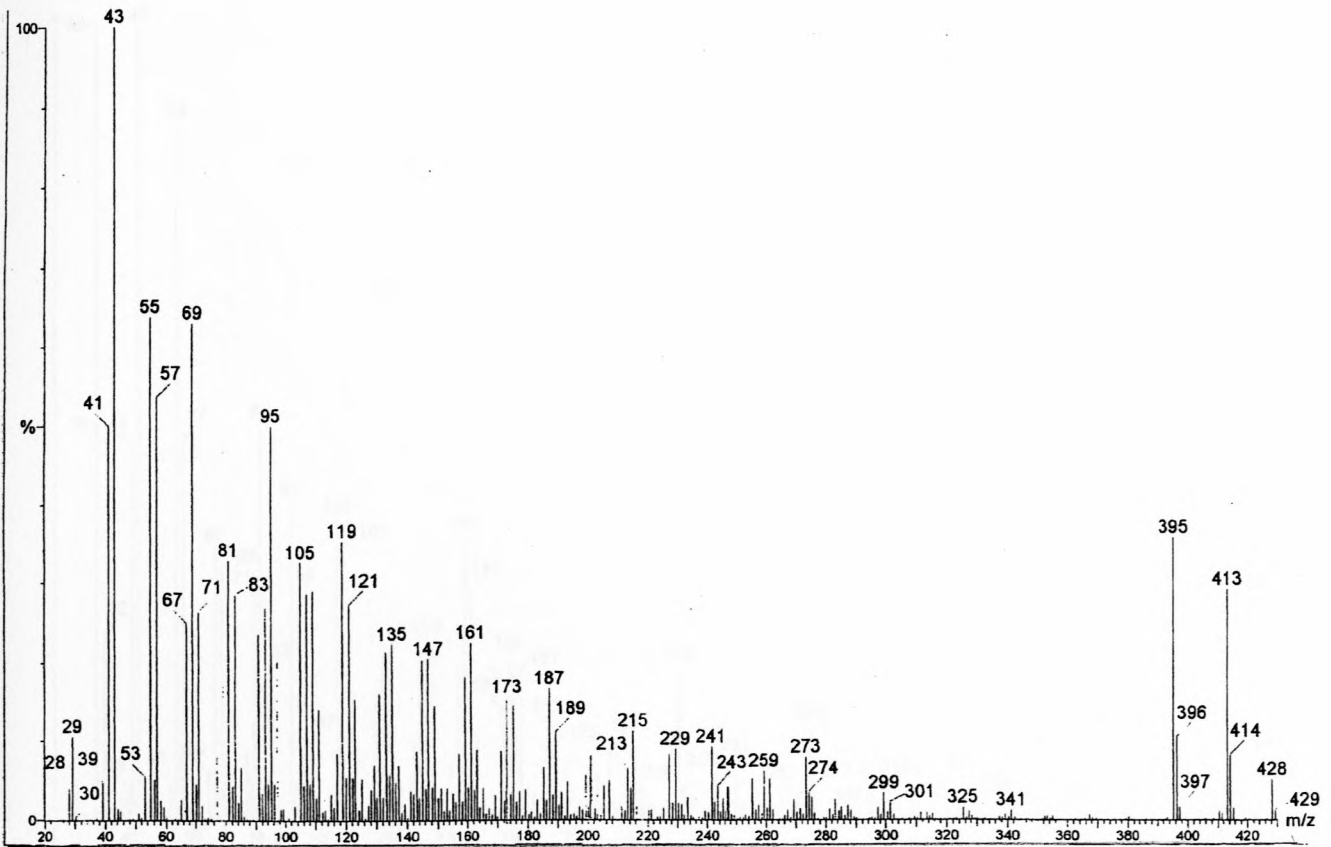
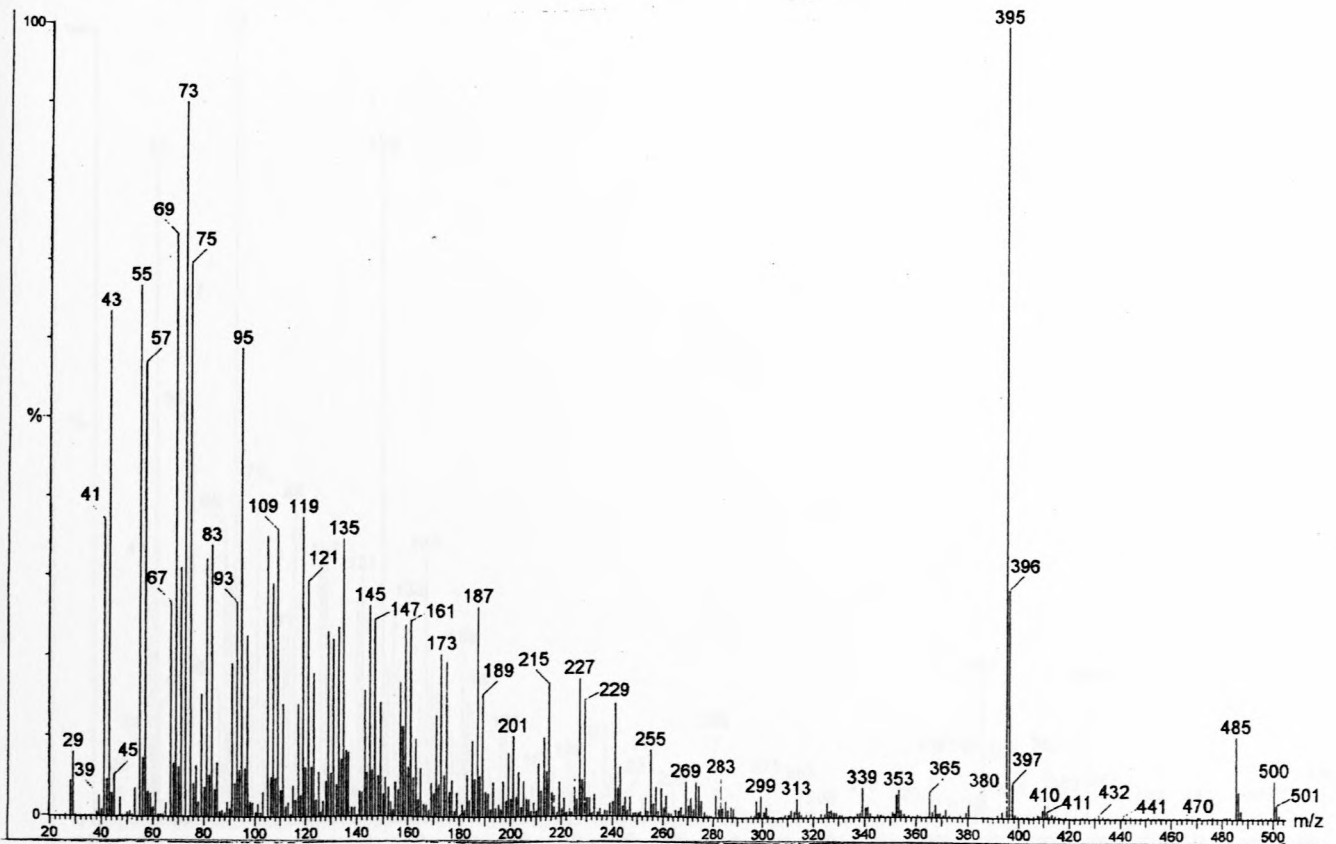
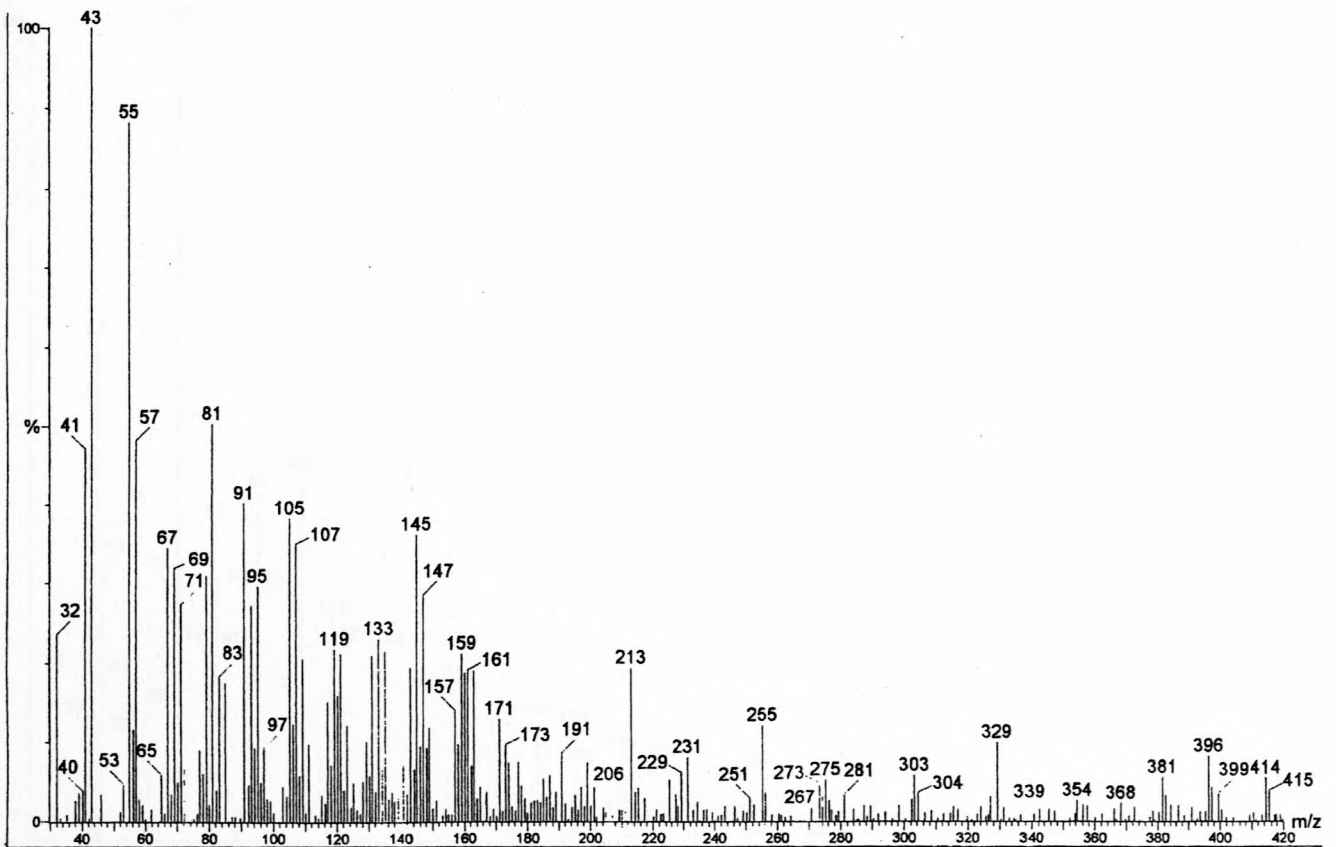
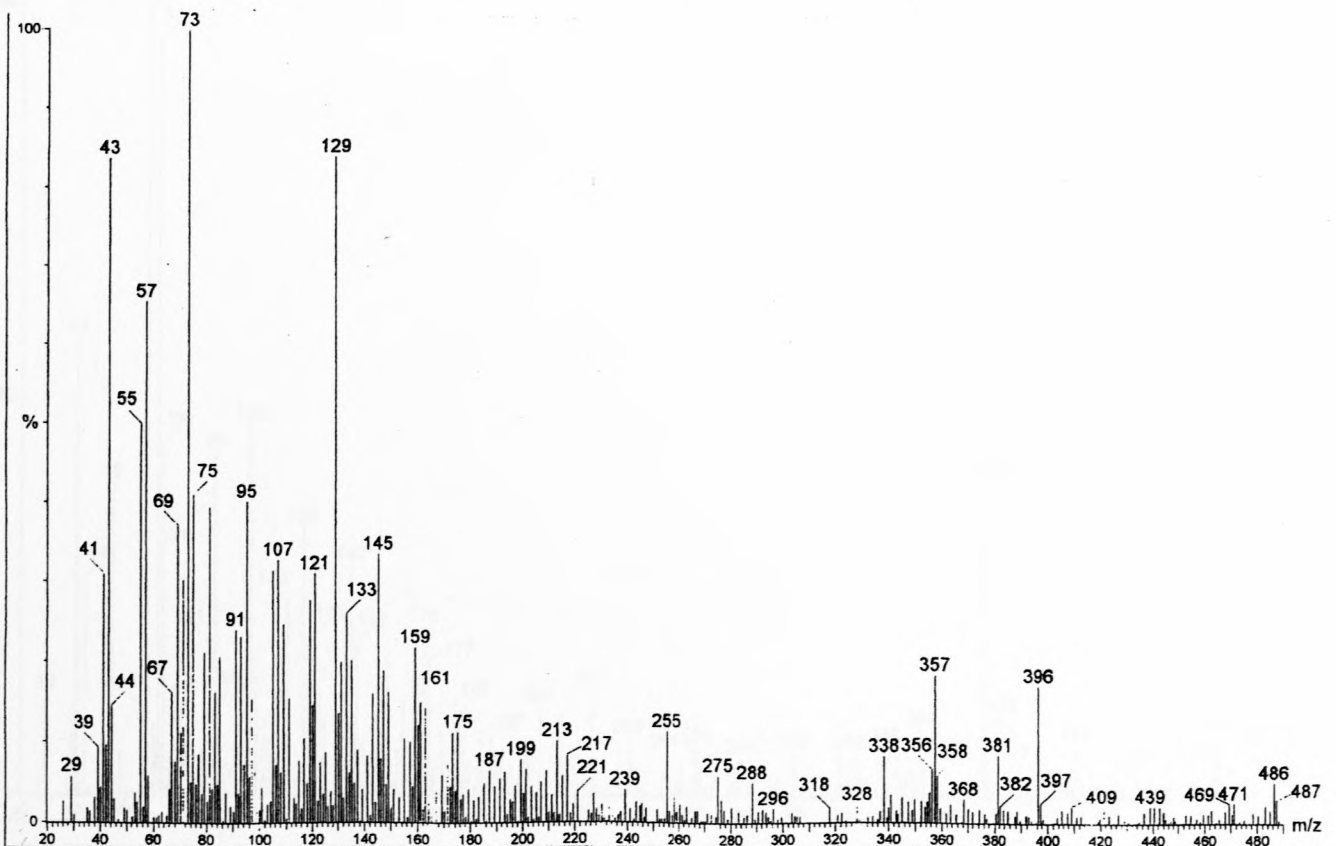
Fig. 2.40 b: EI-massaspektrum van ergost-5-en-3 $\beta$ -OTMS.

Fig. 2.41: EI-massaspektrum van Komponent 162 - cholest-4-en-3-oon

Fig. 2.42 a: EI-massaspektrum van Komponent 168 - lanost-8-en-3 $\beta$ -olFig. 2.42 b: EI-massaspektrum van lanost-8-en-3 $\beta$ -OTMS

Fig. 2.43 a: EI-massaspektrum van Komponent 171 – stigmast-5-en-3 $\beta$ -olFig. 2.43 b: EI-massaspektrum van stigmast-5-en-3 $\beta$ -OTMS

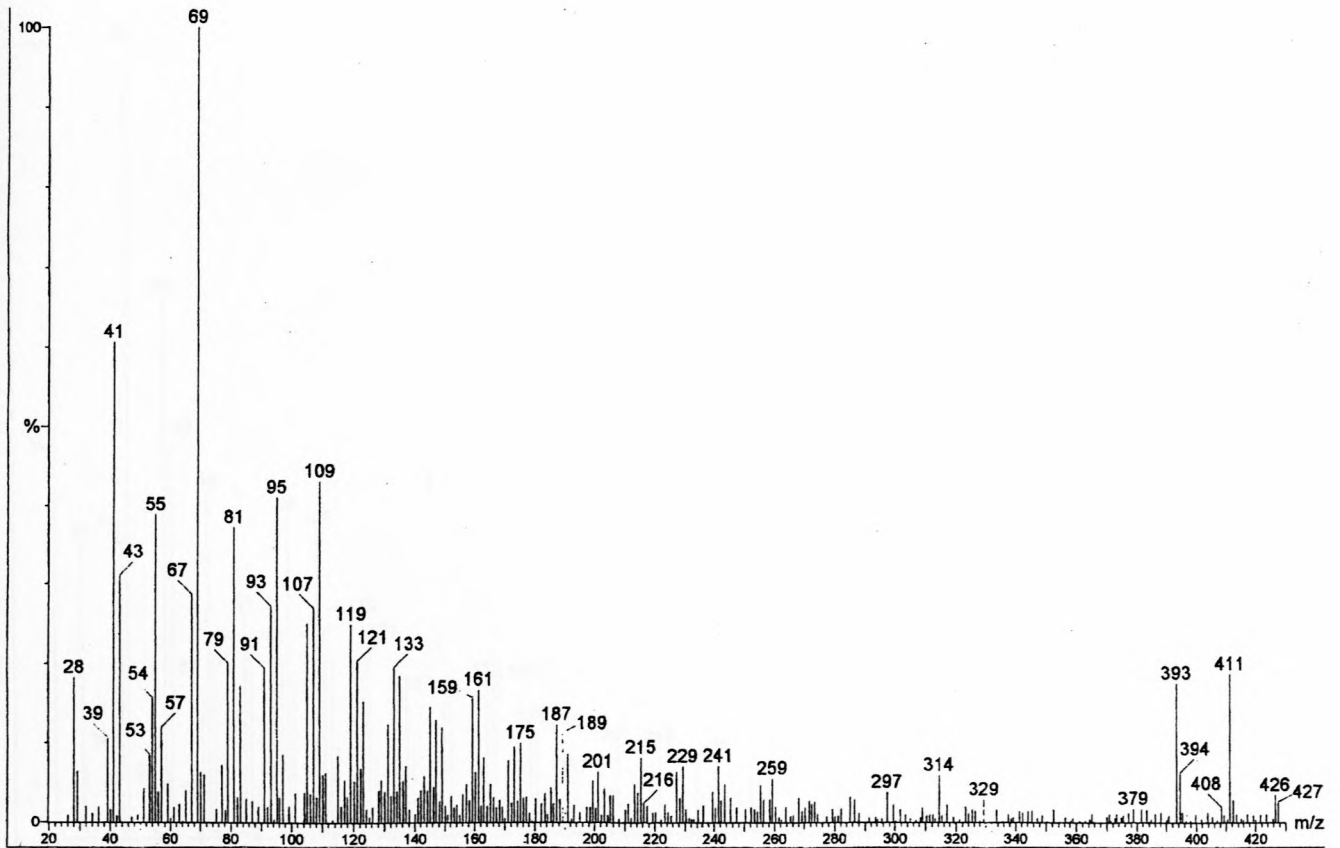
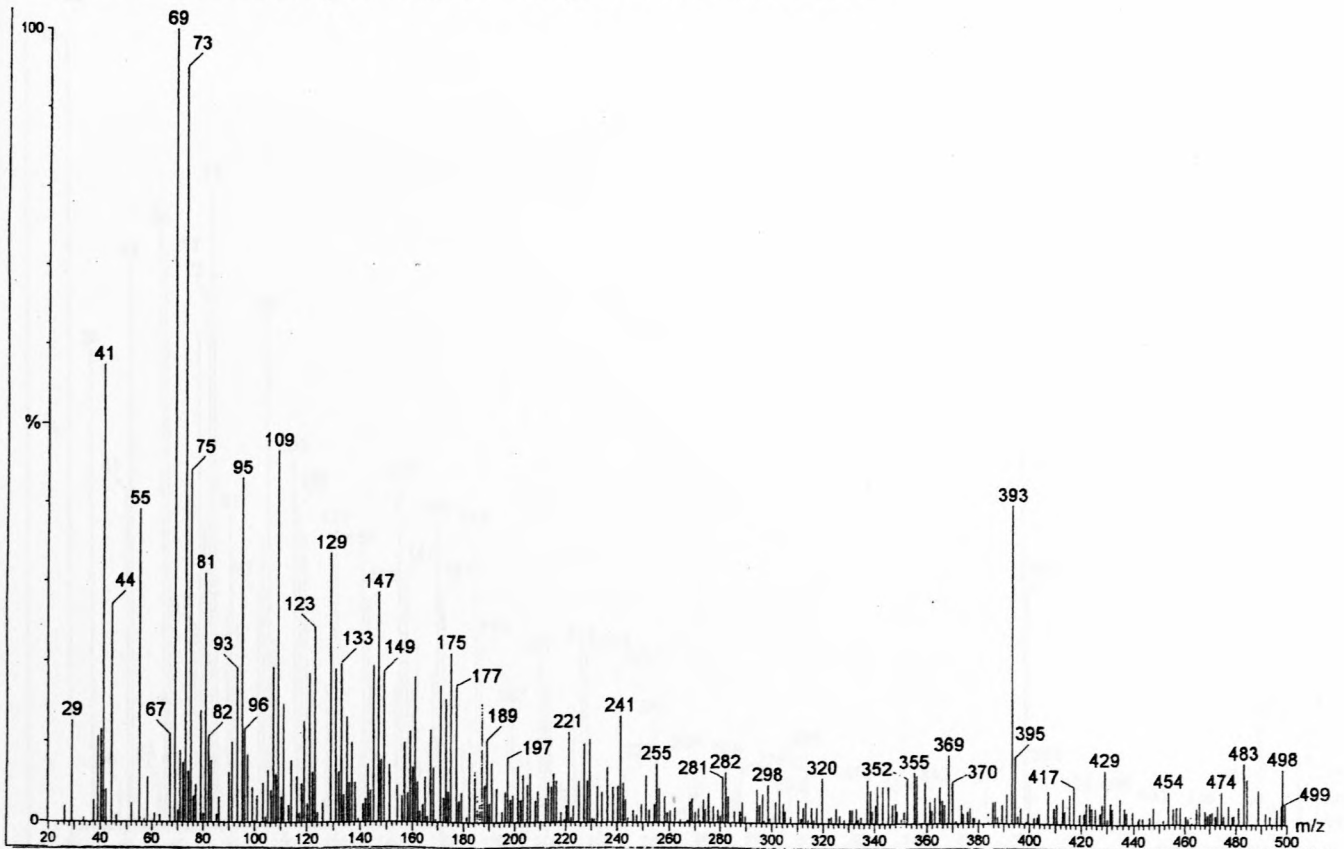


Fig. 2.44 a: EI-massaspektrum van Komponent 172 – lanosterol

Fig. 2.44 b: EI-massaspektrum van lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -OTMS

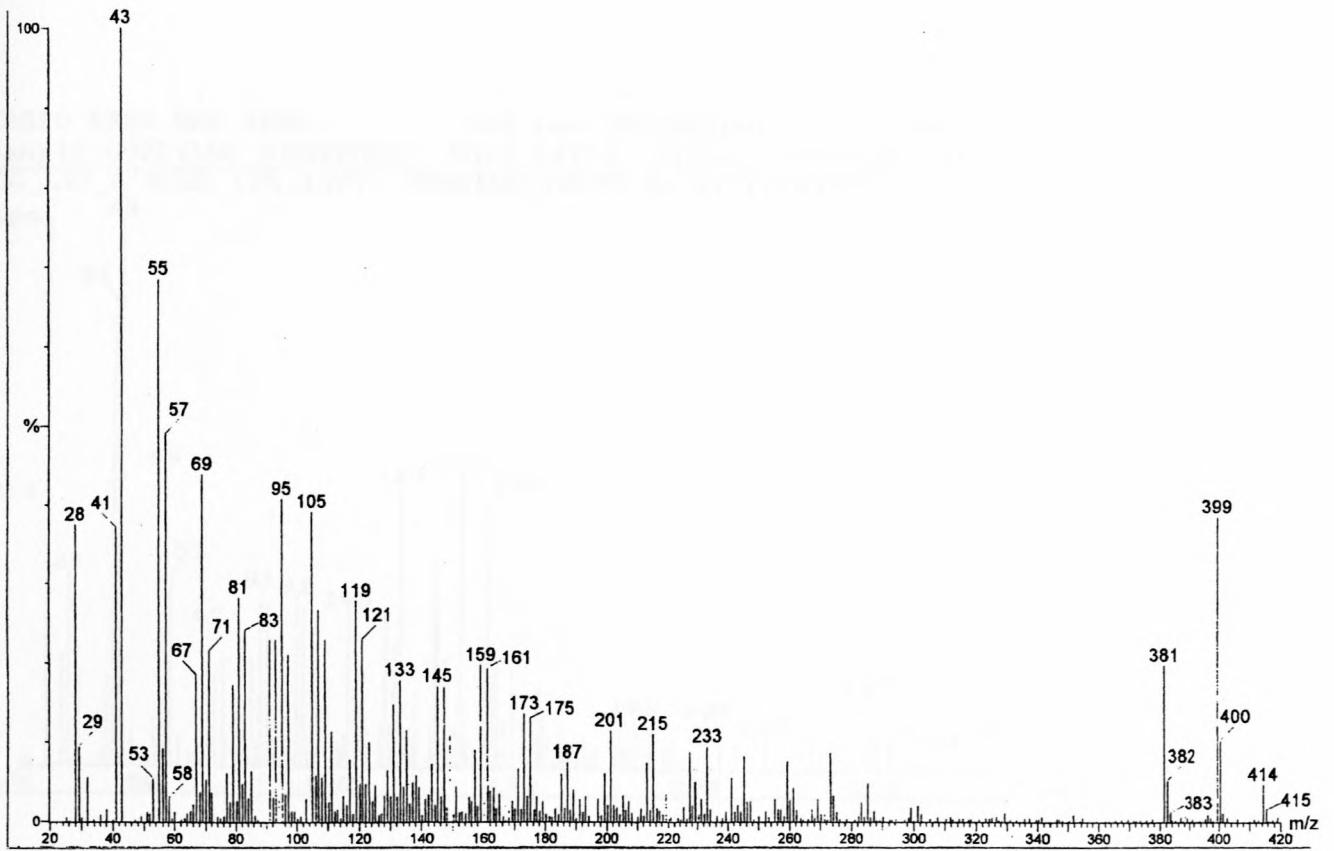


Fig. 2.45 a: EI-massaspektrum van Komponent 157 – ongeïdentifiseerde steroïed

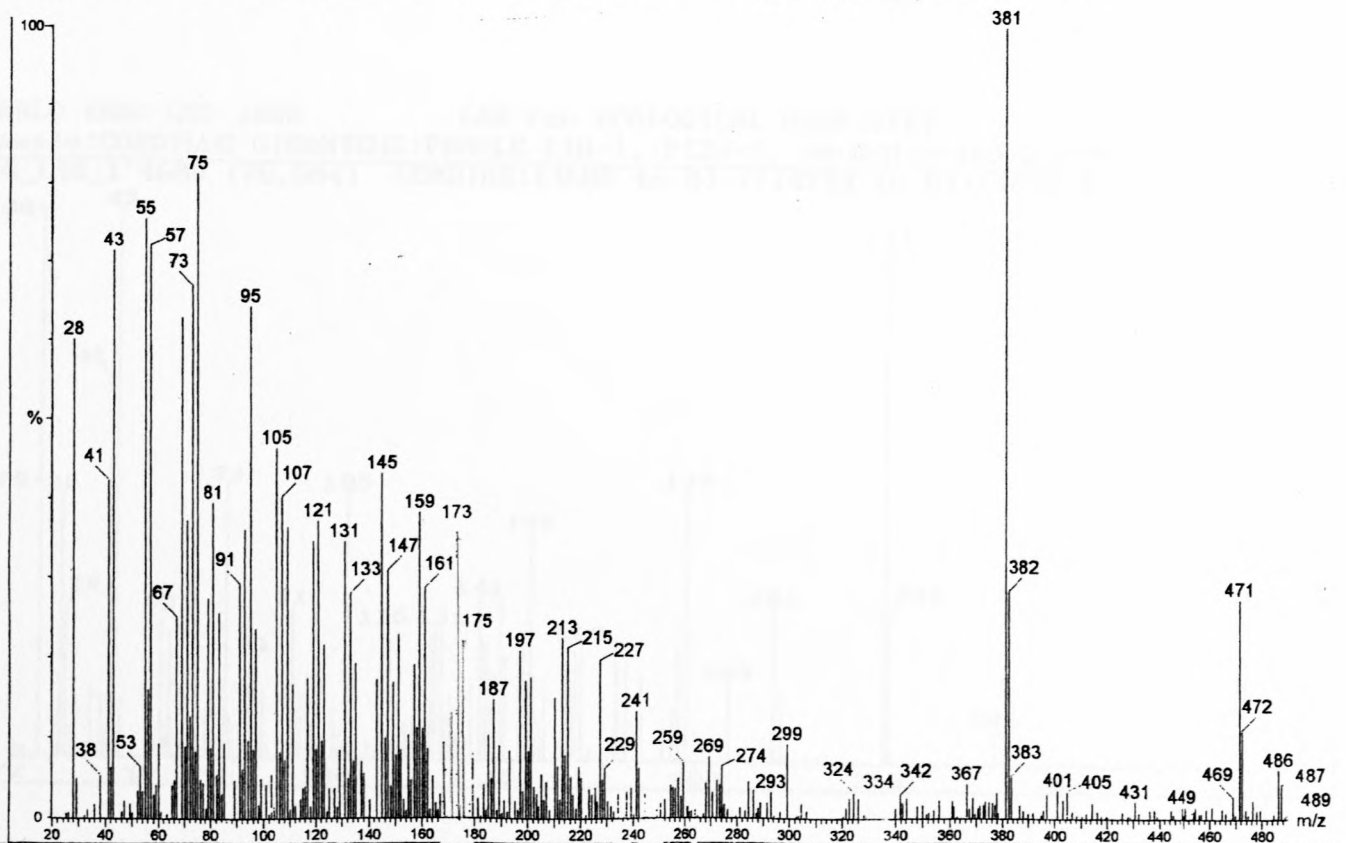


Fig. 2.45 b: EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 157





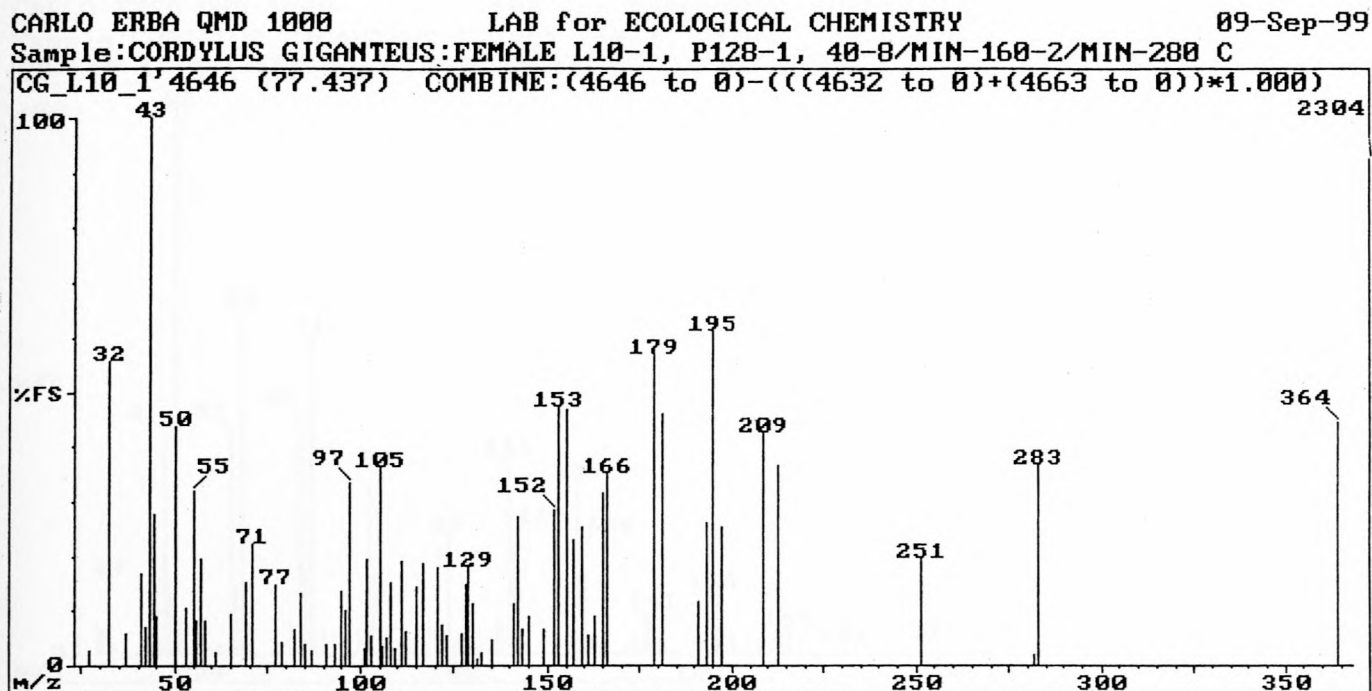


Fig. 2.48: EI-massaspektrum van Komponent 127 – ongeïdentifiseerde steroïed

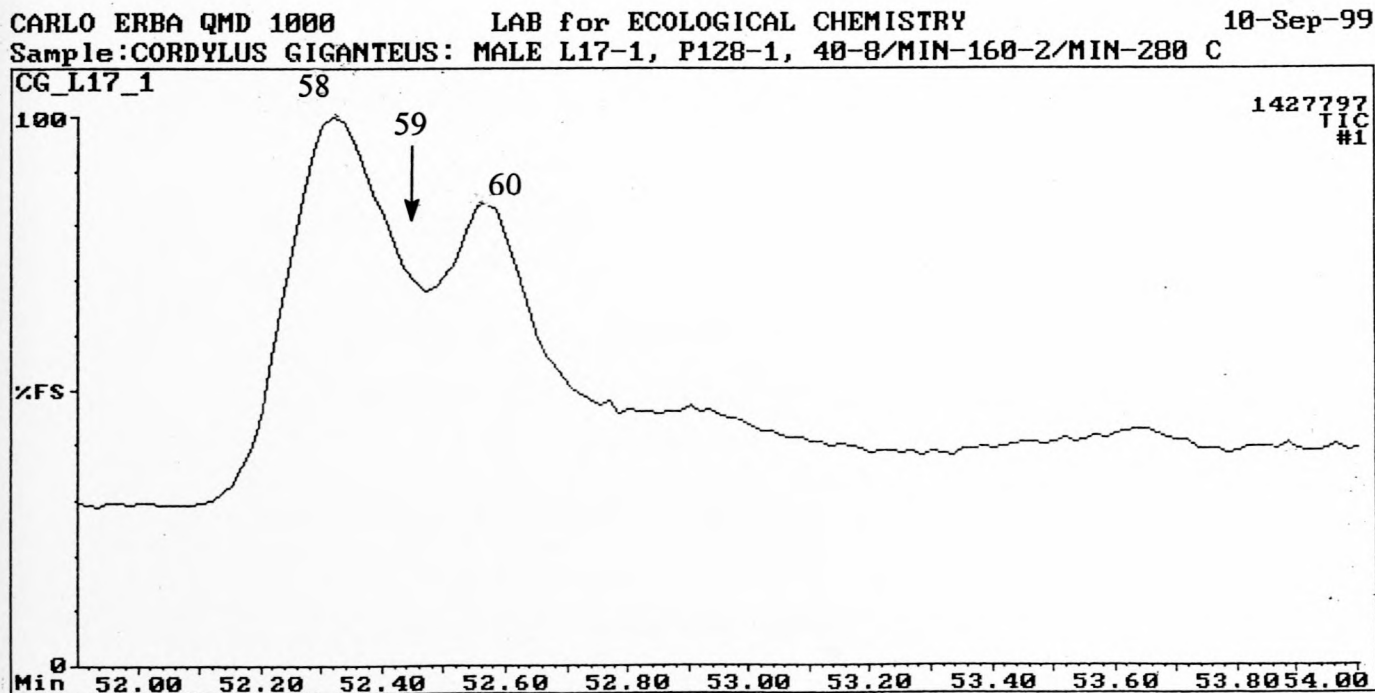


Fig. 2.49: EI-massaspektrum van Komponent 59 – ongeïdentifiseerde verbinding

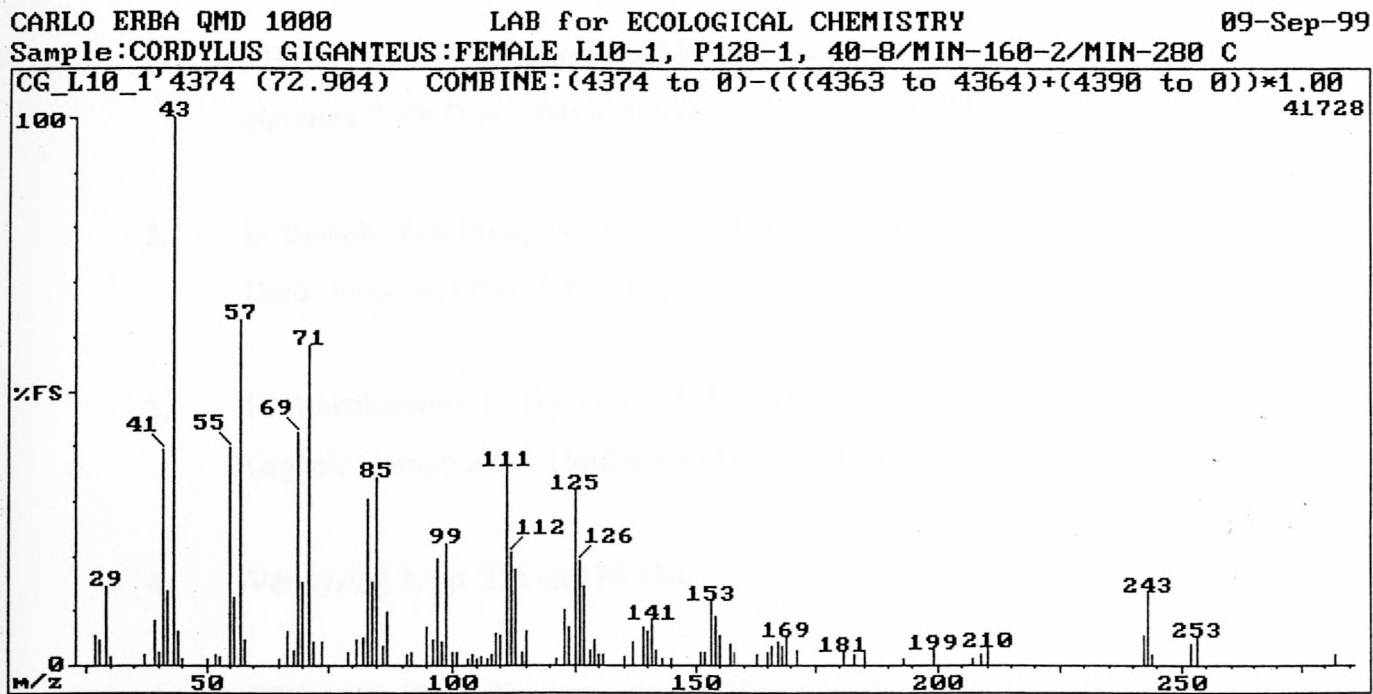


Fig. 2.50: EI-massaspektrum van Komponent 112 – ongeïdentifiseerde verbinding

**VERWYSINGS**

1. J.H. van Wyk. "Life History and Physiological Ecology of the Lizard *Cordylus giganteus*", Ph.D-proefskrif, Universiteit van Kaapstad (1992), pp. 1-6.
2. B. Branch "Field Guide to Snakes and Other Reptiles of Southern Africa", Derde uitgawe, Struik Uitgewers, Kaapstad (1998), p. 189.
3. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc., San Francisco (1967), p. 214.
4. Verwysing 3, pp. 215 en 179-180.
5. F.W. McLafferty, "Interpretation of Mass Spectra", W.A. Benjamin, Londen (1973), p.142.
6. Gerekenariseerde NBS-Biblioteek.
7. E. Stenhagen, S. Abrahamsson en F. McLafferty, "Registry of Mass Spectral Data", John Wiley & Sons, Londen (1974), Volume 3, p. 1739, AA-1857-2.
8. Verwysing 3, pp. 94-102.
9. D.J. Pasto en C.R. Johnson, "Organic Structure Determination", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. (1969) p. 272.
10. Verwysing 7, Volume 1, p. 807, AD-420.
11. F.W. McLafferty en F. Turecek, "Interpretation of Mass Spectra", University Science Books, California (1993), p. 247.
12. R.M. Silverstein, G.C. Bassler en T.C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc. (1991), p. 24.

13. Verwysing 3, pp. 134 - 138.
14. Verwysing 9, p. 279.
15. Verwysing 3, p.130.
16. Verwysing 11, pp.250 en 145-146.
17. "Wiley Registry of Mass Spectral Data", Sesde uitgawe, John Wiley & Sons, Inc.
18. Verwysing 12, pp. 27-28.
19. Verwysing 3, pp. 184-186.
20. Verwysing 11, p. 226.
21. Verwysing 9, p.266.
22. Verwysing 12, p. 17.
23. M. le Roux, "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Samestelling van Eksokriene Klierafskeidings van die Bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*), Springbok (*Antidorcas marsupialis*) en Grysbok (*Raphicerus melanotis*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1980), p.62.
24. Verwysing 11, p. 230.
25. S.E. Schepelle, R.K. Mitchum, C.J. Rudolph, Jr., K. F. Kinneberg en G. V. Odell, *Lipids*, **7**, pp. 297-304 (1971).
26. S. S. Friedland, G. H. Lane, Jr., R.T. Longman, K.E. Train en M. J. O'neal, Jr., *Anal. Chem.*, **31**, pp. 169-174 (1959).

27. H. Budzikiewicz, "Steroids", Hoofstuk 10, pp. 255-259, in "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", G.R. Waller (red.), Wiley (Interscience), New York (1972).
28. L. Tökés, G.Jones, en C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, pp. 5465-5477 (1968).
29. A.E. Nell, "Reuksintuiglike kommunikasie: Chemiese Karakterisering van die Interdigitale en Preorbitale Afskeidings van die Bontebok, *Damaliscus dorcas dorcas* en die Grysboek, *Damaliscus dorcas phillipsi*", Ph.D.-proeskrif, Universiteit van Stellenbosch (1992), p. 158.
30. C. J. W. Brooks en B. S. Middleditch, "Some Aspects of Mass Spectrometry in Steroid Analysis", Hoofstuk 6, pp. 157-164, in "Modern Methods of Steroid Analysis", E. Heftmann (red.), Academic Press, New York en Londen (1973).
31. J-P. Thenot en E. C. Horning, *Anal. Lett.*, **5**, pp. 21-33 (1972).
32. C. H. L. Shackleton, *Endocrine Reviews*, **6**, pp. 441-486 (1985).
33. G. von Unruh en G. Spiteller, *Tetrahedron*, **26**, pp. 3303-3311 (1970).
34. M. A. Quilliam en J. B. Westmore, *Steroids*, **29**, pp. 579-611 (1977).
35. Verwysing 26, p.262.
36. J. Diekman en C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **32**, pp. 1005-1012 (1967).
37. S. G. Wyllie en C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **33**, pp. 305-313 (1968).
38. Verwysing 30, pp. 147-148.

39. C. J. W. Brooks, E. C. Horning en J. S. Young, *Lipids*, **3**, pp. 391-402 (1968).
40. Verwysing 26, p. 268.
41. G. von Unruh en G. Spittler, *Tetrahedron*, **26**, pp. 3289-3301 (1970).
42. Gerekenariseerde NIST-biblioteek.

## HOOFSTUK III

**KWANTITATIEWE ANALISE VAN DIE FEMORALE  
KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK.**

Soos genoem in Hoofstuk I, het verskeie studies getoon dat sekere akkedisse die vermoë het om, deur middel van chemiese kommunikasie, te onderskei tussen geslag, spesies en moontlik ook individue van dieselfde geslag. Daar is gevind dat die akkedis *Cordylus cordylus*, wat aan dieselfde genus as *C. giganteus* behoort, die feromone van akkedisse van dieselfde spesie waarneem.<sup>1</sup> *C. cordylus* kan onderskei tussen die feromone van mannetjies en wyfies,<sup>1</sup> en ook tussen sy eie feromone en dié van ander individue van dieselfde geslag.<sup>2</sup> Die femorale kliere is waarskynlik een van die bronne van hierdie chemiese boodskappe.<sup>1,2</sup> Alberts het die rol van die femorale kliere in chemiese kommunikasie ondersoek, en het gevind dat hierdie kliere waarskynlik vir hierdie doel gebruik word.<sup>3</sup> Daar is dus besluit om nie bloot net die femorale klierafskeidings van *C. giganteus* chemies te karakteriseer nie, maar om ook die kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille tussen die afskeidings van verskillende mannetjies en wyfies tydens verskillende tye van die jaar, te ondersoek. Hierdeur is daar dus ook probeer om vas te stel watter van die komponente van die afskeiding moontlik die belangrikste is, en om dan spesiale aandag aan hierdie komponente te gee. Op hierdie manier is daar dus gepoog om op 'n sinvolle wyse sommige van die doelwitte van hierdie studie te bereik, naamlik om te bevestig dat *C. giganteus* hul femorale kliere vir chemiese kommunikasie gebruik en om die feromone wat vir hierdie doel gebruik word, te identifiseer.



## Versameling van die monsters en verwerking van die data

Die femorale klierafskeidings van verskeie akkedisse van beide geslagte, is in die veld op drie verskillende tye van die jaar met behulp van 'n haartangetjie in afsonderlike flessies versamel.<sup>4</sup> Die materiaal is in 'n vrieskas bewaar totdat dit geanaliseer is. Die monsters is individueel, onder dieselfde kondisies, gaschromatografies geanaliseer (Fig. 2.4 a en b), nadat dichlorometaanekstrakte daarvan gemaak is soos beskryf in Hoofstuk VII. Verteenwoordigende monsters is ook aan GC-MS analise onderwerp. Die aard van die femorale klierafskeiding is sodanig dat dit nie moontlik is om al die organiese materiaal kwantitatief uit die afskeiding te ekstraheer, die ekstrak kwantitatief van die residuele materiaal te skei en te analiseer nie. Dit was dus nie moontlik om met 'n metode waarin daar van ekstrakte gebruik gemaak is, 'n kwantitatiewe bepaling van die samestelling van die vlugtige organiese komponente van die afskeiding te doen nie. Dit is vir die doel van hierdie ondersoek in elk geval nie as absoluut noodsaaklik beskou nie, solank die relatiewe konsentrasies van die komponente betroubaar bepaal sou kon word. Vir die analise van die dichlorometaanekstrakte is Komponent 47, geïdentifiseer as oktadekanoësuur, as pseudo-interne standaard gebruik en is die kwantitatiewe data vir die ander komponente in die ekstrak met betrekking tot hierdie verbinding genormaliseer. Die absolute kwantiteite van die komponente is nie bepaal nie, en in onderstaande bespreking word hierdie genormaliseerde relatiewe kwantiteite dus gebruik.

Die femorale klierafskeidings van 11 mannetjies en 12 wyfies wat gedurende April 1998 versamel is, is geanaliseer, asook die afskeidings wat van 5 van hierdie mannetjies en 5 wyfies in Oktober 1998 en ook in Januarie 1999 versamel is. Om die bespreking te vergemaklik, word na die monsters en die analises daarvan as byvoorbeeld F10\_1 verwys. Die F word gebruik om 'n wyfie aan te dui, die getal 10 is die nommer van die betrokke akkedis en die getal 1 aan die einde verwys daarna dat die afskeiding in April 1998 versamel is. Die kodes F10\_2 en F10\_3, verwys dus na die afskeidings van wyfie akkedis nommer 10 wat onderskeidelik in Oktober 1998 en Januarie 1999 versamel is. Die kode M3\_1, verwys dus na die afskeiding van mannetjie nommer 3 wat in April 1998 versamel is. Meer inligting in die verband verskyn in Tabel 3.1.

## **Vergelyking tussen individue van dieselfde en van verskillende geslagte**

Eerstens is gekyk na die analyses van die monsters wat in April 1998 versamel is om verskille in die samestelling van die afskeidings van individue van dieselfde en verskillende geslagte te ondersoek. Dit is nie bekend watter komponente semiochemies aktief is nie en dus is al die komponente, van Komponent 1 tot Komponent 173, vergelyk ten opsigte van kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille. Daar is feitlik geen beduidende kwalitatiewe verskille gevind nie, maar daar was wel gevalle waar sekere komponente nie in sommige van die onderskeie gaschromatogramme sigbaar was nie. Hierdie komponente was egter altyd in 'n baie lae konsentrasie (gemiddeld minder as 0,05% van die totale ekstrak samestelling) in die ekstrakte teenwoordig waar hulle wel sigbaar was, en daarom is dit moontlik dat hulle totale afwesigheid nie betekenisvol is nie. Uitsluitel oor hierdie onsekerheid sal slegs met behulp van veldtoetse verkry kan word.

Hoe sensitief die akkedisse se olfaktoriese sisteem is om verskille in die relatiewe konsentrasies van die komponente van die afskeiding waar te neem, is ook nie bekend nie. Die moontlikheid bestaan dat die akkedisse klein verskille in sekere komponente se konsentrasies kan waarneem, en dat die komponente wat in hierdie hoofstuk bespreek word nie noodwendig die enigste komponente is wat vir chemiese kommunikasie gebruik word nie. Al die komponente het wel tot 'n sekere mate in verskillende analyses kwantitatiewe verskille getoon, maar daar was slegs 18 komponente van die afskeidings waarvan die verskille op die oog af beduidend genoeg was om moontlik as betekenisvol beskou te kon word, naamlik Komponente 2, 6, 7, 24, 58, 59, 67, 80, 87, 112, 116, 119, 125, 127, 149, 153, 162 en 168 (Tabel 3.2). Sowat 76% (min. 62% en maks. 85%) van die totale samestelling van die geëkstraëerde gedeelte van die afskeiding bestaan uit hierdie 18 komponente, en sowat 60% (min. 38% en maks. 74%) van die totaal bestaan uit die pieke wat gemiddeld die 5 grootste pieke is (uitsluitende die interne standaard, Komponent 47), naamlik Komponente 24, 116, 149, 153 en 168. Die identifikasie van hierdie komponente is reeds in Hoofstuk II bespreek.

Tabel 3.1: Monsters van femorale klierafscheidings wat ondersoek is.

Mannetjies			Wyfies		
4/98	10/98	1/99	4/98	10/98	1/99
M3_1	-	-	F6_1	F6_2	F6_3
M4_1	M4_2	M4_3	F10_1	F10_2	F10_3
M7_1	-	-	F13_1	-	-
M9_1	-	-	F16_1	-	-
M11_1	M11_2	M11_3	F18_1	-	-
M12_1	M12_2	M12_3	F19_1	F19_2	F19_3
M17_1	M17_2	M17_3	F20_1	-	-
M24_1	-	-	F21_1	-	-
M25_1	-	-	F22_1	-	-
M26_1	-	-	F23_1	-	-
M27_1	M27_2	M27_3	F30_1	F30_2	F30_3
-	-	-	F31_1	F31_2	F31_3

Tabel 3.2: Die komponente van die femorale klierafskeiding van *Cordylus giganteus* waarvan die relatiewe konsentrasies moontlik betekenisvol verskil.

Komponent nommer	Verbinding
2	1-Dodekanol
6	Dodekielpropenoaat
7	Dodekielpropanoaat
24	Heksadekanoësuur
58	8Z,11Z,14Z-Ikosatriënoësuur
59	Ongeïdentifiseerde verbinding
67	Ikosanoësuur
80	n-Pentakosaan
87	Dokosanoësuur
112	Ongeïdentifiseerde verbinding
116	Skwaleen
119	Ongeïdentifiseerde steroïed
125	Ongeïdentifiseerde steroïed
127	Ongeïdentifiseerde steroïed
149	Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol
153	Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol
162	Cholest-4-en-3-oon
168	Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol

Die relatiewe kwantitatiewe hoeveelhede van Komponente 2, 6, 7, 24, 58, 59, 67, 80, 87, 112, 116, 119, 125, 127, 149, 153, 162 en 168 in die verskillende femorale klierafskeidings wat in April 1998 versamel is, verskyn in Tabel 3.3. Die relatiewe kwantitatiewe verskille van die 5 komponente wat gemiddeld met die hoogste konsentrasie in die ekstrak voorkom (uitsluitende komponent 47), word vervolgens bespreek:

Dit is onmiddellik duidelik dat Komponent 116 altyd die hoofkomponent is by die mannetjies (Fig. 3.1), en dat Komponent 168 die tweede hoogste relatiewe konsentrasie het, behalwe by M24\_1 waar Komponent 149 die tweede hoogste relatiewe konsentrasie het. Die hoofkomponente by die wyfies (Fig. 3.2) is gewoonlik óf Komponent 149 óf Komponent 153. 'n Uitsondering is F23\_1 waar Komponent 47 die hoofkomponent is. In die gevalle waar Komponent 149 die hoofkomponent is, is gevind dat Komponent 153 die tweede hoogste relatiewe konsentrasie het, terwyl in die gevalle waar Komponent 153 die hoofkomponent is, Komponent 149 weer die tweede hoogste relatiewe konsentrasie het. In die geval van F23\_1 waar Komponent 47 die hoofkomponent is, is gevind dat Komponente 153 en 149 onderskeidelik die tweede en derde hoogste relatiewe konsentrasies het. Behalwe vir 'n paar uitsonderings, is gevind dat Komponent 24 se relatiewe konsentrasie hoër by die mannetjies as by die wyfies is.

Die relatiewe kwantitatiewe verskille van die res van die uitgesoekte komponente van die ekstrak word nou bespreek (Fig. 3.3 en Fig. 3.4):

Daar is opgelet dat Komponent 58 se relatiewe konsentrasie, behalwe vir 'n paar uitsonderings, hoër is by die mannetjies as by die wyfies. Dit is egter belangrik om te let daarop dat 'n oorsaak vir die kwantitatiewe variasie van Komponent 58, naamlik 8Z,11Z,14Z-ikosatriënoësuur, moontlik die feit is dat dit maklik outoksidase kan ondergaan as gevolg van die twee bi-alliliese metileengroepe wat in die verbinding voorkom. Komponente 112 en 162 het geen opvallende tendense getoon nie, maar aansienlike variasie kom voor in die relatiewe konsentrasies van hierdie komponente in die afskeidings van individuele diere. Komponent 162 het byvoorbeeld 'n hoë relatiewe konsentrasie by F20\_1, terwyl by F16\_1 dit selfs glad nie sigbaar is nie.

## HOOFSTUK III

Tabel 3.3: Die relatiewe konsentrasies van geselekteerde komponente in die verskillende femorale klierafskeidings wat in April 1998 versamel is, genormaliseer met betrekking tot dié van komponent 47 waarvan die konsentrasie gelyk gestel is aan 100.

Individue	Komponente																	
	2	6	7	24	58	59	67	80	87	112	116	119	125	127	149	153	162	168
M3_1	16.57	8.51	2.16	126.74	47.78	1.45	10.38	0.24	9.04	0.40	709.61	4.74	3.62	1.08	173.97	55.74	0.34	308.33
M4_1	33.30	9.61	2.73	125.57	13.13	0.26	12.29	0.52	13.61	12.26	773.10	6.68	19.27	1.13	207.85	83.93	1.53	243.20
M7_1	28.79	5.55	0.92	61.38	5.96	0.16	7.71	0.00	7.00	0.67	335.75	4.34	4.74	0.79	165.32	71.22	1.75	175.29
M9_1	29.91	6.47	1.18	103.73	27.60	0.00	7.65	0.00	6.21	1.42	263.95	4.78	3.71	0.62	119.16	93.46	0.57	120.49
M11_1	6.38	3.40	0.85	105.95	46.61	0.00	10.54	0.12	11.47	4.02	367.86	3.53	5.21	3.11	121.15	92.90	0.29	198.77
M12_1	8.08	3.07	0.45	81.35	27.19	0.80	10.25	0.00	11.36	8.30	515.84	8.34	16.64	1.18	218.88	111.44	1.03	280.90
M17_1	14.67	6.59	1.24	157.74	78.84	1.56	10.82	0.70	9.08	4.79	390.92	4.03	4.33	0.64	104.17	66.86	0.37	241.39
M24_1	40.51	11.77	1.95	89.72	32.45	0.00	9.23	0.00	8.48	2.62	491.92	5.35	6.82	1.17	265.03	161.27	1.68	245.70
M25_1	12.58	4.94	0.81	109.17	50.67	1.60	5.96	0.25	5.35	0.66	374.70	2.18	2.05	0.84	94.03	56.53	0.19	131.09
M26_1	27.00	7.99	1.76	82.39	6.92	0.12	13.70	0.00	12.51	0.87	462.31	10.72	4.63	0.64	137.95	51.01	3.20	418.51
M27_1	5.96	3.64	1.20	110.15	27.89	1.85	12.51	0.24	13.72	6.04	530.04	10.72	7.00	0.89	157.39	51.72	1.17	208.44
F6_1	14.67	4.91	1.25	40.54	9.70	0.25	9.47	0.84	10.70	4.81	52.24	1.41	8.27	2.14	83.00	132.61	1.80	48.88
F10_1	9.44	4.35	1.05	42.95	3.62	0.69	13.33	0.88	13.60	16.55	128.99	3.26	7.28	2.59	195.33	164.70	2.68	86.58
F13_1	57.19	13.64	2.03	75.07	18.42	0.49	7.15	0.83	6.98	25.37	187.07	4.31	20.93	8.81	507.24	636.56	0.98	12.47
F16_1	31.51	15.54	2.17	50.23	3.08	0.78	7.69	1.43	5.07	2.59	83.40	2.96	9.04	2.12	148.89	203.41	0.00	110.17
F18_1	48.72	14.29	3.33	59.39	5.43	0.36	11.37	0.79	11.60	3.89	73.13	3.20	10.98	3.01	184.33	201.17	5.05	138.55
F19_1	6.69	3.35	0.68	33.98	1.49	0.22	16.32	0.30	18.41	7.89	62.16	4.86	6.68	1.96	116.25	81.50	1.27	93.90
F20_1	25.49	8.05	1.60	49.51	4.90	0.49	9.52	0.53	10.32	62.62	50.03	2.86	12.73	4.37	144.72	184.29	11.88	66.64
F21_1	27.44	8.34	1.65	30.12	4.37	0.55	7.97	0.81	7.30	8.50	62.81	3.51	6.05	1.93	131.13	82.17	0.44	78.84
F22_1	41.50	9.90	1.76	59.82	5.60	1.65	13.18	2.72	12.53	1.20	121.93	2.96	9.99	2.78	137.65	147.44	0.29	101.77
F23_1	12.87	4.32	1.14	48.98	9.85	0.32	9.50	0.42	9.12	0.55	40.45	0.95	4.08	1.50	56.59	81.79	0.42	34.48
F30_1	9.38	4.41	1.12	38.22	14.34	1.85	12.75	4.03	17.30	16.81	146.99	6.59	16.66	5.22	268.23	222.89	3.75	127.31
F31_1	21.30	7.18	1.85	37.62	4.04	1.53	11.39	2.23	11.46	1.44	80.19	2.70	6.56	2.00	112.99	85.26	0.25	86.63

Die relatiewe konsentrasie van Komponent 80 is in die algemeen effens laer by die wyfies as by die mannetjies, terwyl Komponente 2, 6, 7, 59, 87, 119, 125 en 127 se kwantitatiewe verskille geen spesifieke patrone toon nie, hoewel daar soms redelike groot verskille tussen individue is. Die feit dat Komponente 59 en 80 nie sigbaar is in sekere analyses nie, is nie as betekenisvol beskou nie, aangesien hulle in elk geval in die meeste gevalle in 'n baie lae konsentrasie voorkom.

### **Seisoenale variasies**

Om die verskille in die samestelling van die femorale klierafscheidings van die akkedisse gedurende verskillende tye van die jaar te ondersoek, is die analyses van die monsters wat in Oktober 1998 en Januarie 1999 versamel is (Tabel 3.4 en Tabel 3.5), en ook die analyses van die ooreenstemmende monsters wat in April 1998 versamel is (Tabel 3.3), vergelyk. In die geval van Komponente 24, 58, 59, 67, 80, 87, 112, 116, 119, 125, 127, 149, 153, 162 en 168 stem die kwantitatiewe resultate van hierdie analyses ooreen met die resultate vir die April 1998 versameling wat hierbo bespreek is. Die grootste verskille wat waargeneem is, is egter kwalitatiewe verskille tussen monsters wat verskillende tye van die jaar versamel is (Fig. 3.5). Komponente 2, 6 en 7 is, behalwe vir 'n paar uitsonderings, feitlik glad nie in die afscheidings wat in Oktober 1998 versamel is teenwoordig nie. Hulle is egter meestal teenwoordig in die klierafscheidings wat tydens Januarie 1999 versamel is, alhoewel hul relatiewe kwantiteite meestal laer is as dié wat in April 1998 versamel is.

Tabel 3.4: Die relatiewe konsentrasies van geselekteerde komponente in die verskillende femorale kliefafskeidings wat in Oktober 1998 versamel is, genormaliseer met betrekking tot dié van Komponent 47 waarvan die konsentrasie gelyk gestel is aan 100.

Individue	Komponente																	
	2	6	7	24	58	59	67	80	87	112	116	119	125	127	149	153	162	168
M4_2	0.00	0.09	0.04	167.69	26.53	0.80	13.35	0.25	12.55	9.90	735.15	15.19	13.11	1.36	383.68	70.28	11.53	402.66
M11_2	0.00	0.00	0.00	98.65	24.42	1.25	14.62	0.85	16.14	5.21	251.69	14.82	8.43	1.60	212.59	46.72	6.22	267.26
M12_2	0.00	0.00	0.00	119.20	12.56	0.13	12.03	0.00	15.59	5.89	100.65	10.46	10.71	0.87	206.66	80.03	2.93	134.39
M17_2	0.00	0.06	0.00	163.11	40.75	2.24	11.84	0.27	9.08	2.85	173.61	6.60	4.33	0.85	143.68	50.94	0.62	286.14
M27_2	0.53	0.00	0.00	107.42	6.18	0.00	14.51	0.00	15.22	3.50	342.46	47.27	6.46	1.51	365.64	56.77	1.24	413.70
F6_2	0.00	0.00	0.00	37.44	3.51	0.25	9.98	0.00	11.34	3.19	25.14	3.36	12.01	4.00	165.32	192.53	2.45	59.60
F10_2	0.00	0.00	0.00	36.71	0.98	0.15	14.13	0.30	14.85	4.84	30.54	2.37	5.12	1.32	75.85	53.60	7.31	38.65
F19_2	0.00	0.00	0.09	36.09	1.31	0.00	16.53	0.08	18.92	7.19	27.90	6.82	5.67	2.44	128.84	65.79	8.05	83.53
F30_2	0.00	0.00	0.00	33.22	3.91	0.20	14.26	0.60	17.06	8.16	36.70	6.37	12.52	2.87	262.75	95.29	5.78	61.97
F31_2	0.00	0.00	0.00	53.86	3.56	0.25	11.21	0.35	9.86	0.51	27.62	7.06	17.35	3.77	188.11	89.67	125.51	80.75

Tabel 3.5: Die relatiewe konsentrasies van geselekteerde komponente in die verskillende femorale kliefafskeidings wat in Januarie 1999 versamel is, genormaliseer met betrekking tot dié van Komponent 47 waarvan die konsentrasie gelyk gestel is aan 100.

Individue	Komponente																	
	2	6	7	24	58	59	67	80	87	112	116	119	125	127	149	153	162	168
M4_3	0.64	1.62	0.21	171.49	72.25	1.92	13.28	0.44	15.38	6.95	1084.44	10.36	14.42	1.48	320.62	95.85	21.51	312.41
M11_3	0.22	1.07	0.07	91.81	47.42	0.71	13.74	0.19	14.58	3.35	516.72	10.55	6.11	0.79	125.63	66.97	0.86	269.86
M12_3	0.26	1.00	0.09	70.67	25.34	0.52	10.73	0.07	12.73	1.50	283.22	4.08	3.06	1.14	99.72	100.12	0.21	130.61
M17_3	0.53	0.86	0.07	147.23	45.15	1.48	11.58	0.28	9.82	0.91	318.23	8.41	2.25	0.63	99.98	42.82	0.43	196.70
M27_3	0.00	0.55	0.20	110.08	31.91	0.62	12.16	0.44	15.30	2.90	686.64	34.45	4.90	1.47	283.49	69.12	1.88	342.91
F6_3	5.93	7.36	0.50	36.42	16.73	0.86	9.02	0.40	9.69	3.11	83.05	2.81	7.57	1.64	129.82	211.02	0.00	56.28
F10_3	1.06	3.25	0.15	61.74	12.22	0.19	11.36	0.59	11.94	20.09	216.93	8.79	25.03	5.85	166.96	247.75	0.40	199.25
F19_3	0.39	0.94	0.10	40.81	4.70	0.23	11.64	0.16	12.49	2.01	30.57	3.27	2.57	1.34	42.87	71.00	0.45	66.56
F30_3	0.00	0.10	0.09	36.10	15.78	0.49	14.45	1.30	17.97	19.71	146.06	12.86	16.09	5.57	397.00	249.56	5.58	120.60
F31_3	0.85	1.54	0.34	52.36	11.12	0.50	11.07	0.61	7.74	0.65	111.80	7.19	6.85	2.11	249.79	107.90	79.44	77.60

### **Gevolgtrekkings**

Dit is nou duidelik dat daar wel kwantitatiewe verskille is tussen die femorale klierafscheidings van individue van verskillende geslagte, en dat daar kwalitatiewe verskille by akkedisse van beide geslagte gedurende verskillende tye van die jaar voorkom. Daar is ook gevind dat die afscheidings van individue van dieselfde geslag ten opsigte van enkele komponente grootliks van mekaar verskil, maar geen spesifieke patroon kon in hierdie gevalle waargeneem word nie. Of waargenome verskille in die samestelling van die femorale klierafscheidings enigsins 'n rol in die chemiese kommunikasie van die dier speel, kan egter nie gesê word nie. Slegs deur verdere ondersoek, wat ook gedragstudies met die akkedisse moet insluit, sal vasgestel kan word of hierdie verskille werklik van semiochemiese belang is.



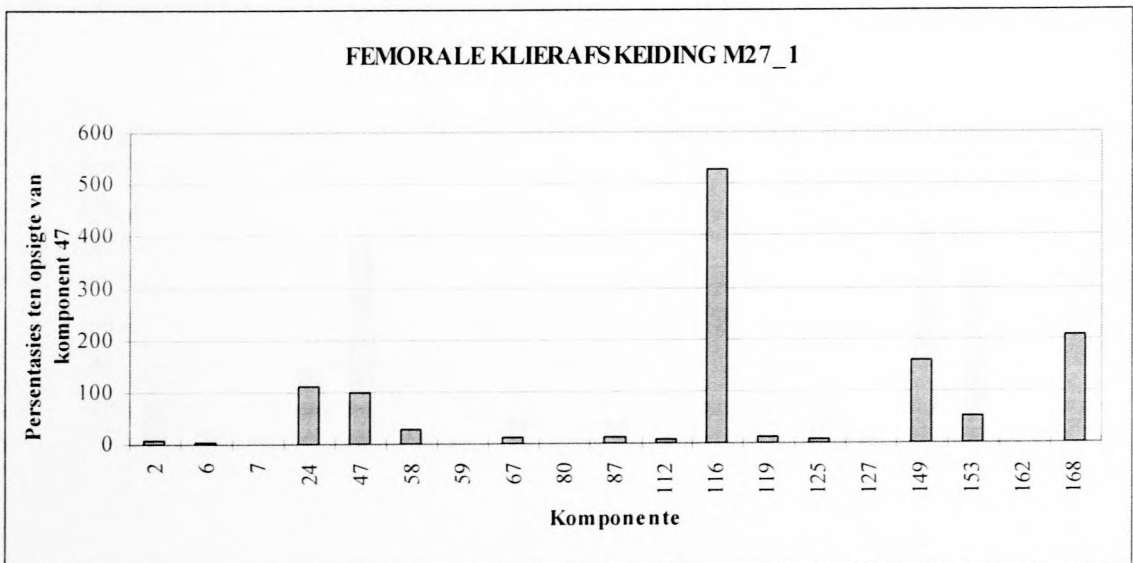
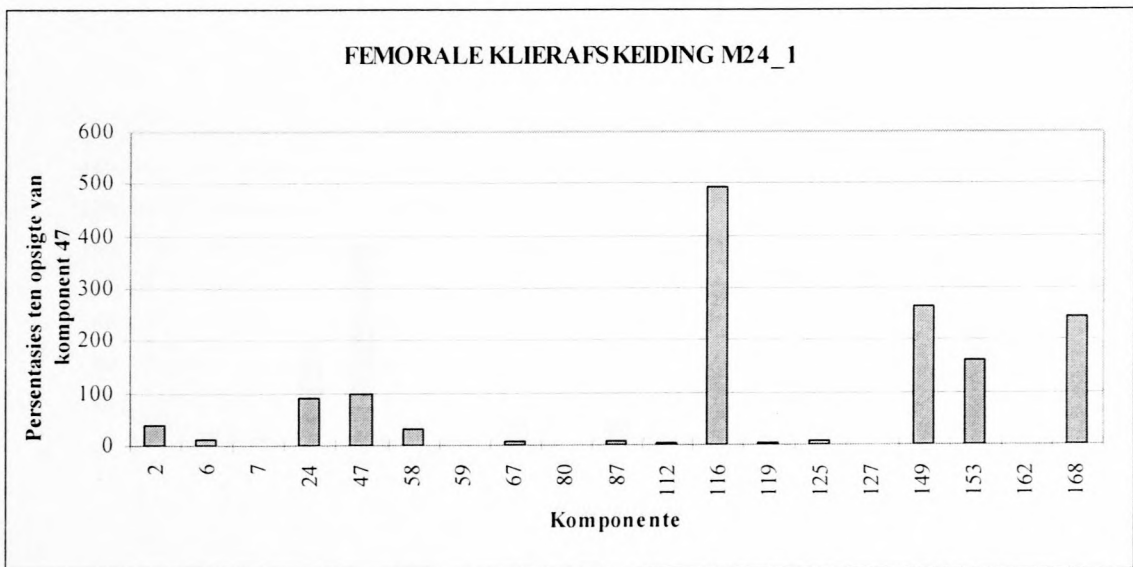
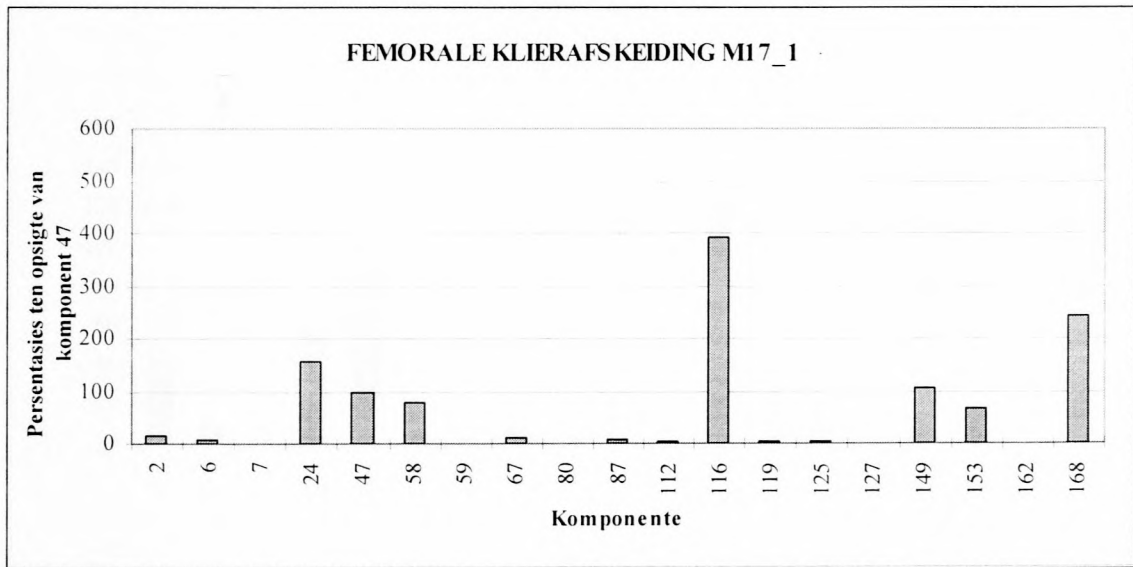


Fig. 3.1: Grafiese voorstellings van die relatiewe kwantiteit van geselekteerde komponente van die femorale klierafskeidings van 'n paar ouvolk mannetjies.

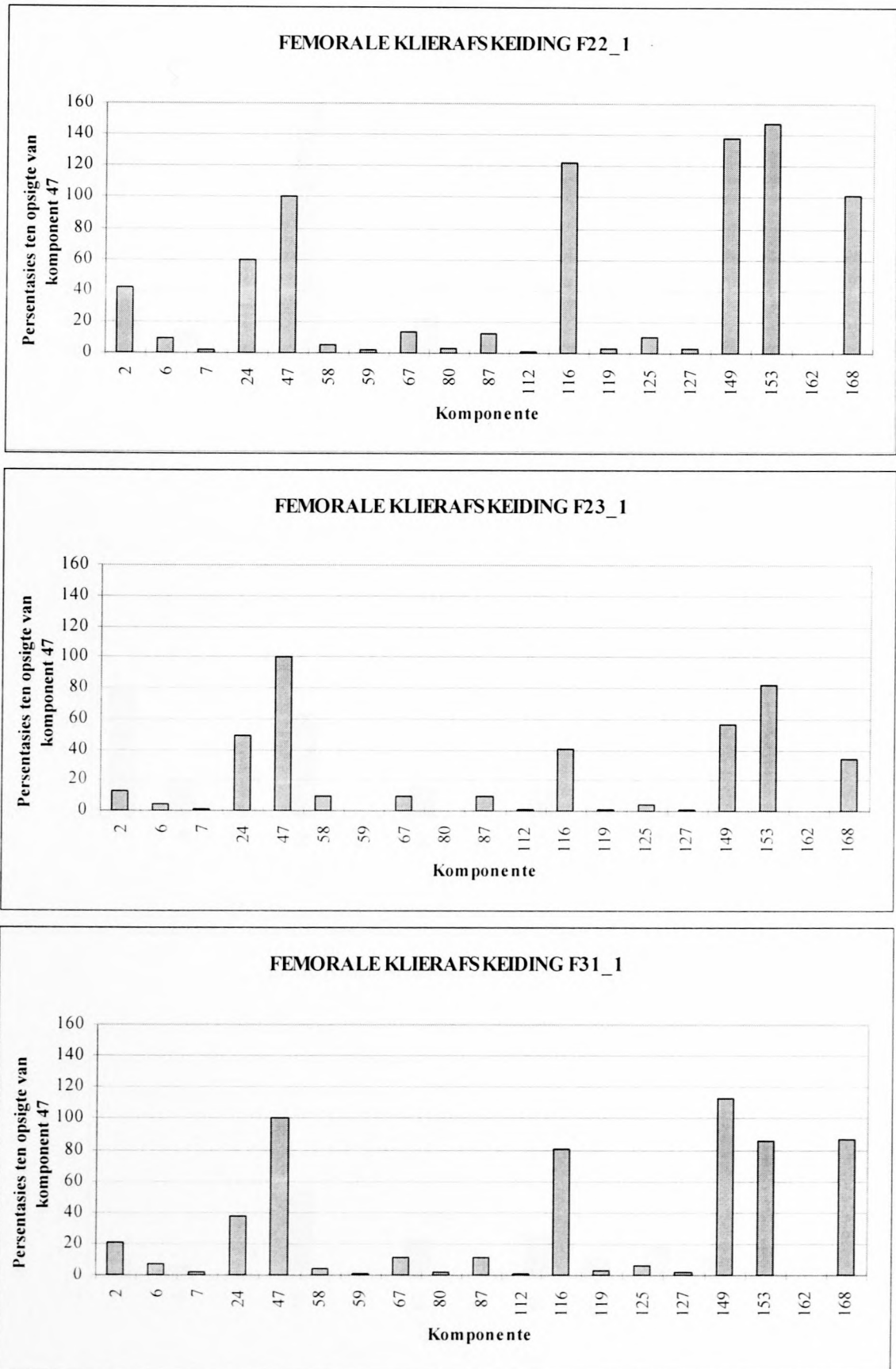


Fig. 3.2: Grafiese voorstellings van die relatiewe kwantiteit van geselekteerde komponente van die femorale klierafskeidings van 'n paar ouvolk wyfies.

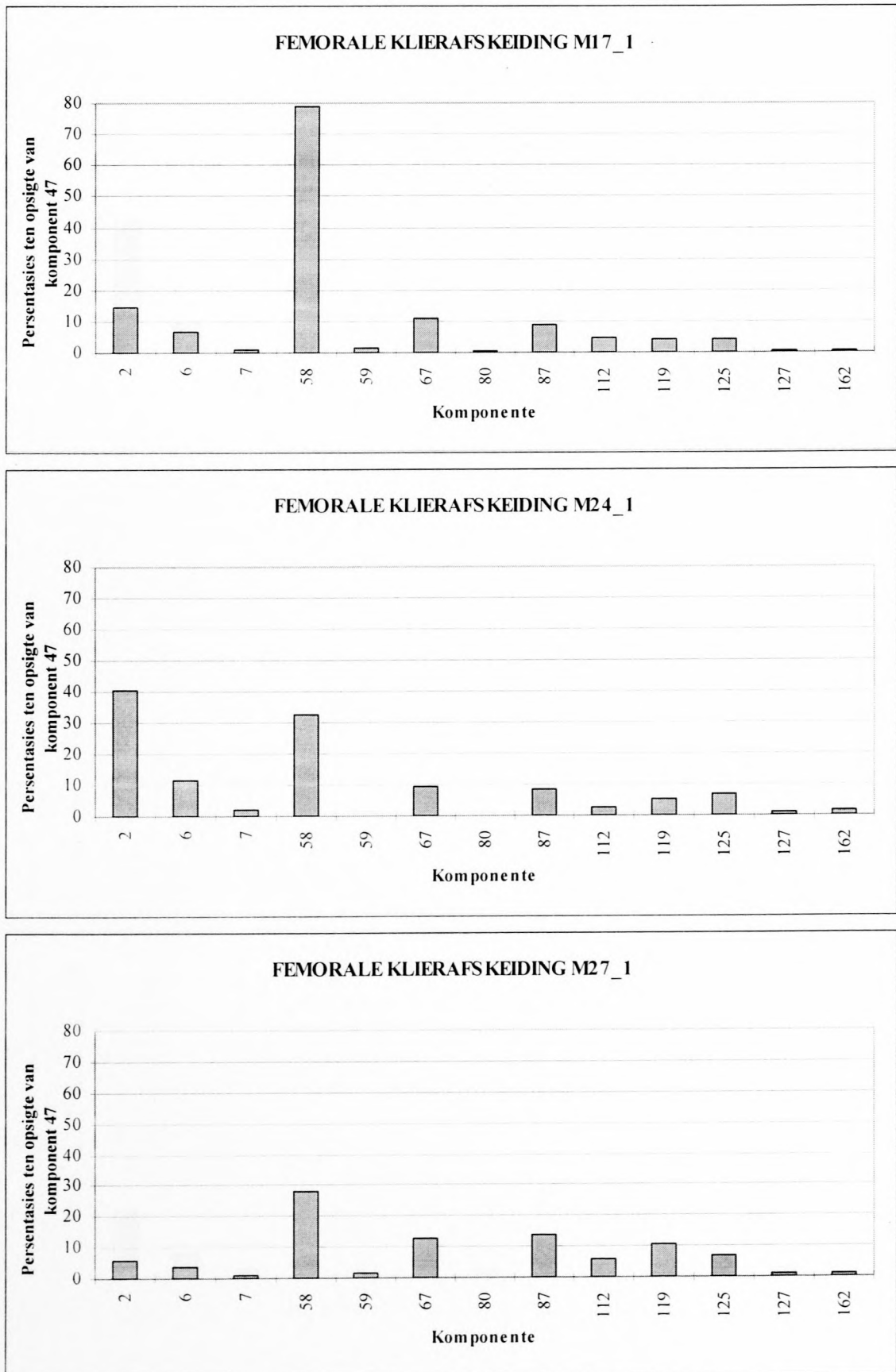


Fig. 3.3: Grafiese voorstellings van die relatiewe kwantiteit van geselekteerde komponente (uitsluitende die 5 grootste pieke) van die femorale kliefafskeidings van 'n paar ouvolk mannetjies.

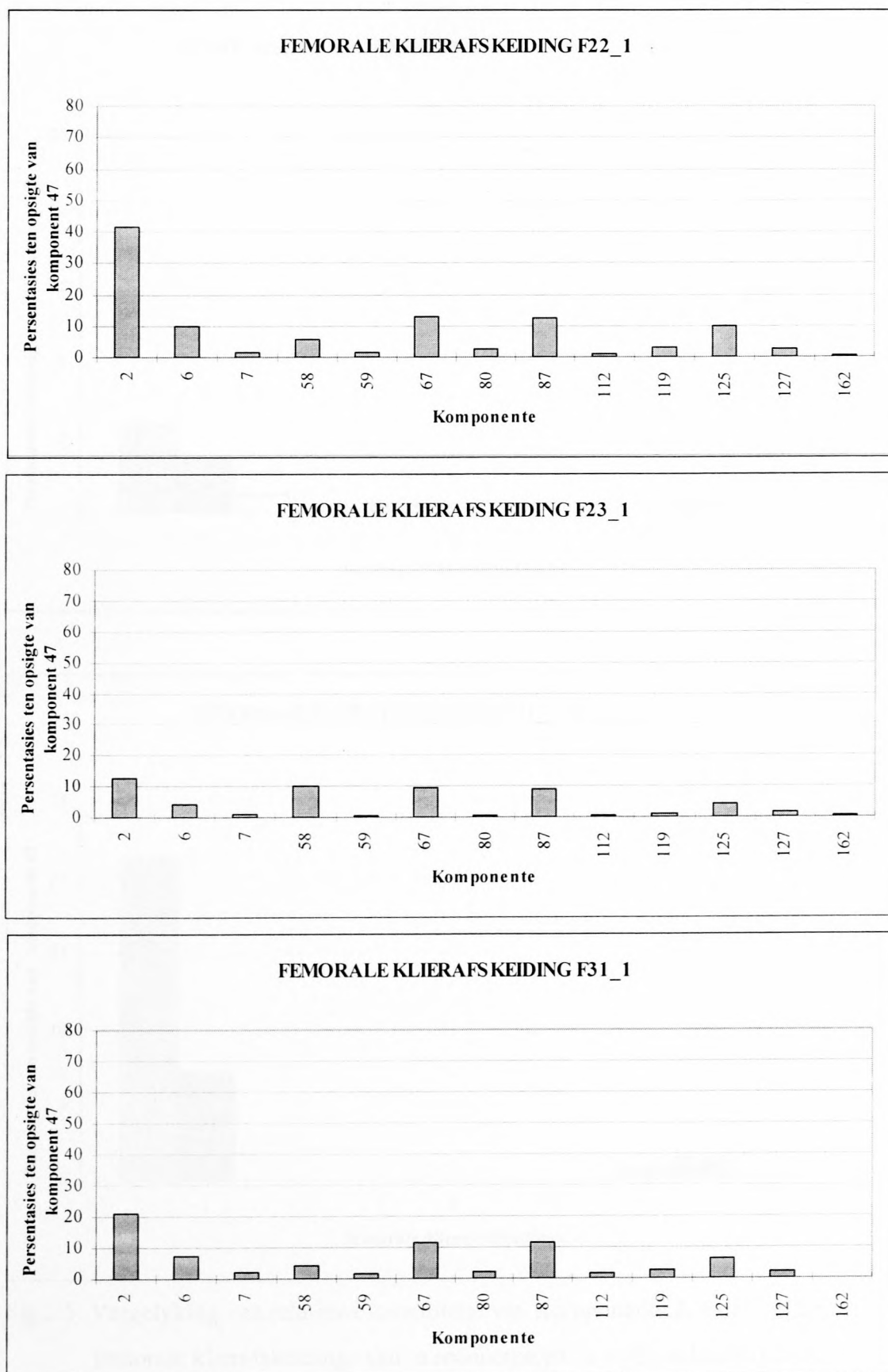


Fig. 3.4: Grafiese voorstellings van die relatiewe kwantiteit van geselekteerde komponente (uitsluitende die 5 grootste pieke) van die femorale klierafskeidings van 'n paar ouvolk wyfies.

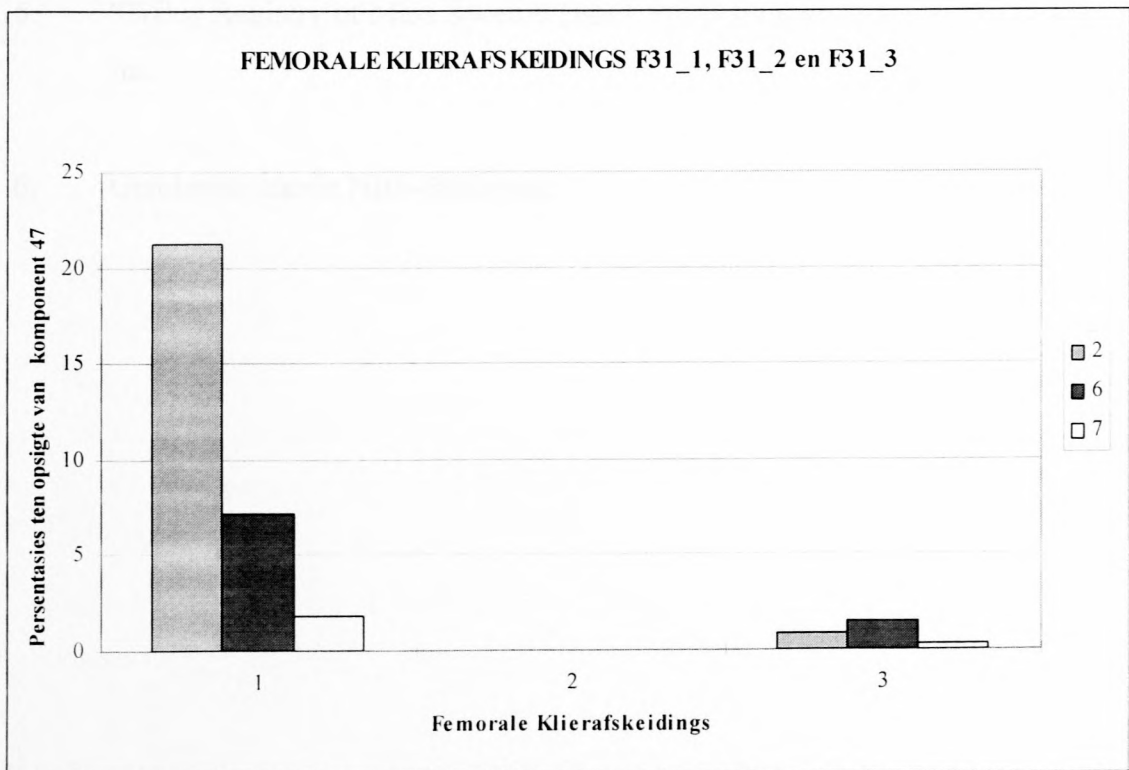
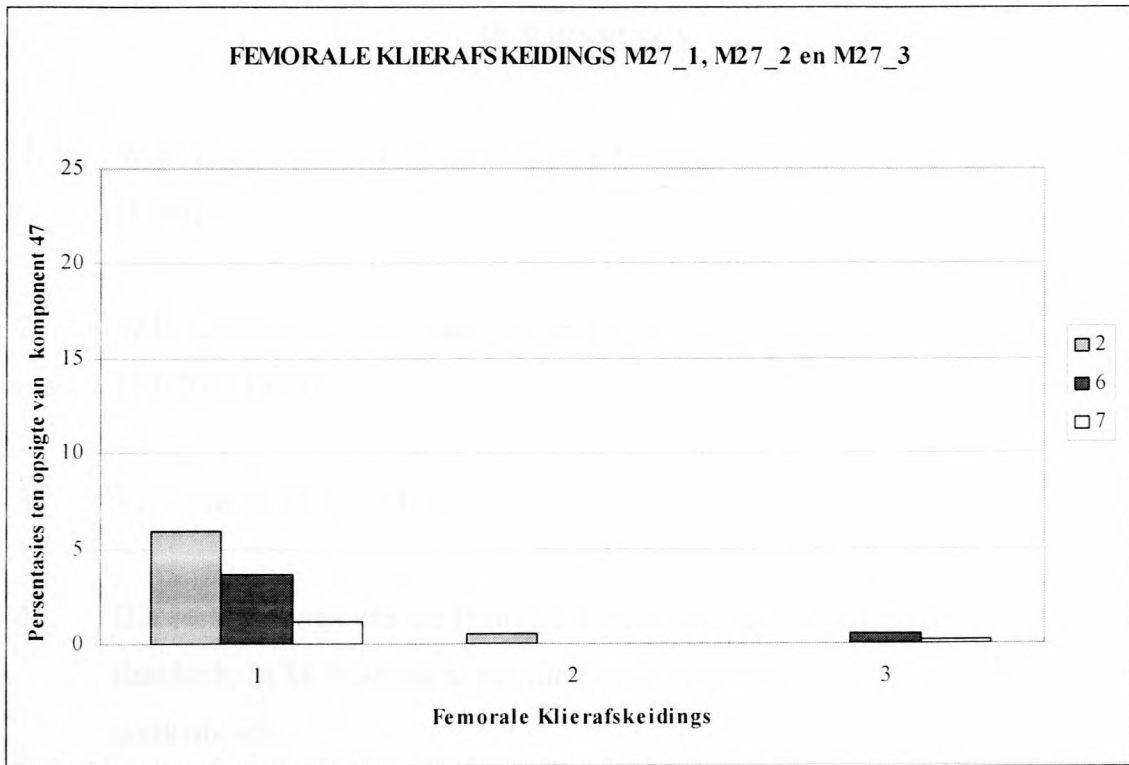


Fig 3.5: Vergelyking van relatiewe kwantiteite van Komponente 2, 6 en 7 in die femorale klierafskeidings van 'n mannetjie en 'n wyfie akedis tydens verskillende tye van die jaar.

## VERWYSINGS

1. W.E. Cooper, Jr., J.H. Van Wyk en P.Le F.N. Mouton, *Copeia*, **4**, pp. 839-844 (1996).
2. W.E. Cooper, Jr., J.H. Van Wyk en P.Le F.N. Mouton, *J. Chem. Ecol.*, **25**, pp. 197-208 (1999).
3. Verwysings 28, 29, 31, 33, 34, 35, 36 en 37 van Hoofstuk I.
4. Die versamelings van die femorale klierafskeidings is gedoen deur Mnr. L. Ruddock, 'n M.Sc.-student van die Departement Soölogie, Universiteit van Stellenbosch.
5. "Wiley Registry of Mass Spectral Data", Sesde uitgawe, John Wiley & Sons, Inc.
6. Gerekenariseerde NBS-Biblioteek.

## HOOFSTUK IV

**DIE CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE  
GENERASIEKLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK  
MANNETJIE.**

Ten einde die moontlikheid van chemiese kommunikasie tussen akkedisse van die spesie *Cordylus giganteus* verder te ondersoek, is nog 'n potensiële bron van chemiese boodskappe, naamlik die generasiekliere, ondersoek deur onder andere die chemiese samestellings van die afskeiding van hierdie kliere te ondersoek.

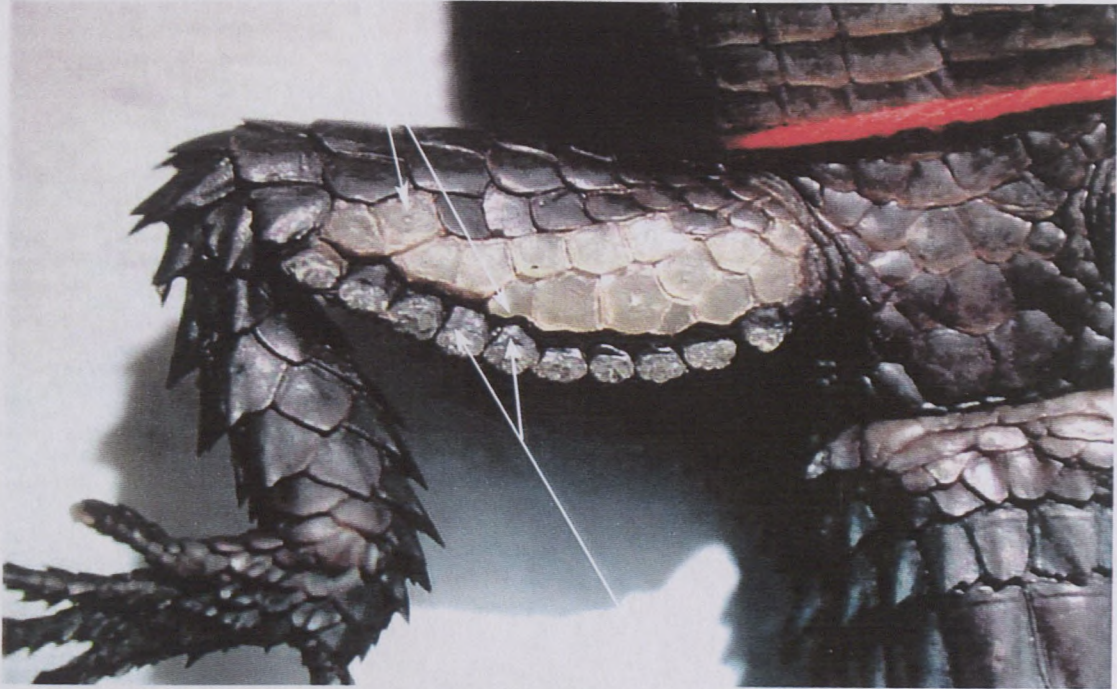
**Chemiese karakterisering van die afskeiding.**

Generasiekliere is epidermale, klieragtige skubbe (Eng: glandular scales) wat op die dye van die voor- en agterbene van slegs die manlike *Cordylus giganteus* voorkom<sup>1</sup> (Fig. 4.1). Die materiaal van die generasiekliere is in die veld in die Vrystaat versamel, waarna dichlorometaanekstrakte daarvan gemaak is soos beskryf in Hoofstuk VII. Hierdie ekstrakte is met behulp van GC en GC-MS geanaliseer. 'n Kapilêre glaskolom wat met die apolêre stasionêre fase PS-089-OH belaa is, is vir die analyses gebruik.

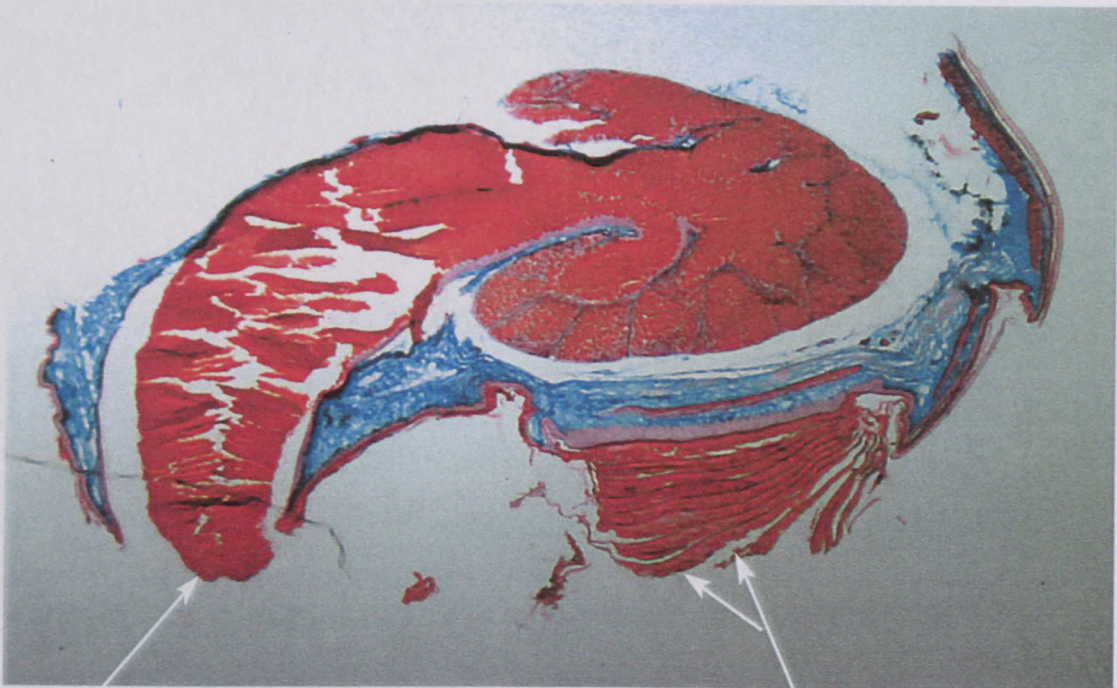
Die voorlopige identifikasie van die komponente van die ekstrak is gedoen soos in die geval van die femorale kliere, en die korrektheid van die afleidings is op dieselfde wyse bevestig. In sommige gevalle is die massaspektrometriese identifikasies met behulp van gaschromatografie-hoë-resolusie-massaspektrometrie (GC-HR-MS) bevestig.

Die gaschromatogram in Figuur 4.2 a en b van 'n dichlorometaanekstrak van die generasiekliermateriaal van die agterbeen van 'n mannetjie akkedis, sal as verwysing gebruik word in die bespreking van die identifikasie van die verskillende komponente van die afskeiding. Die pieke in die chromatogram is genommer volgens hulle retensietye (in minute) in 'n GC analise, en daar sal van hierdie syfers gebruik gemaak word om na die verbindings in die afskeiding te verwys.

Generasie kliere



Femorale kliere



Femorale klierafskeiding

Generasieklier lae

Fig. 4.1: Agterbeen van 'n Suid-Afrikaanse gordelakkedis, *C. Niger*, en 'n histologiese snit deur die agterbeen van 'n Suid-Afrikaanse gordelakkedis.



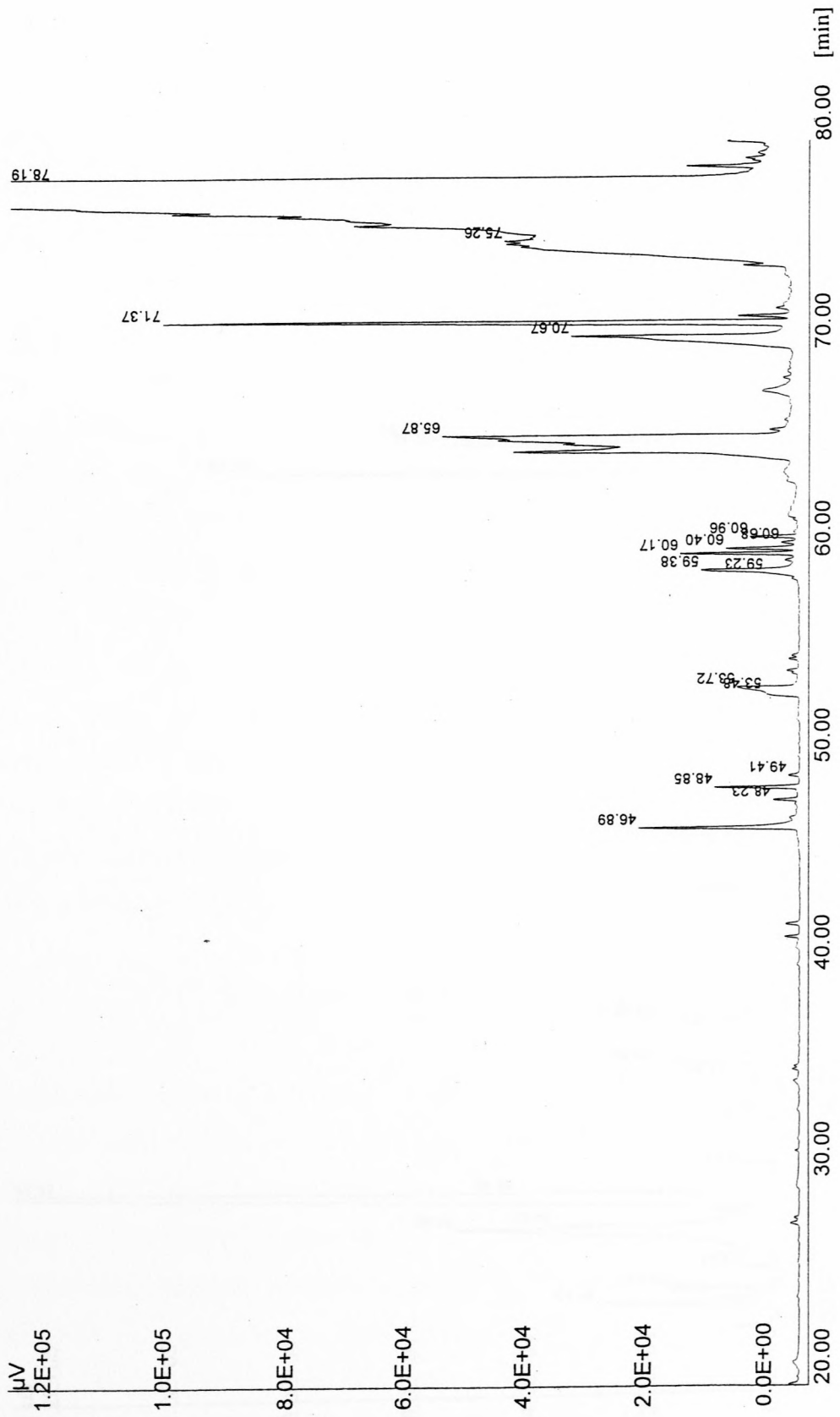


Fig. 4.2 a: Gaschromatografiese analyse van die dichlorometaanekstrak van die generasie-  
 klierafskeiding van die ouvolk, met PS-089-OH as stasionêre fase.

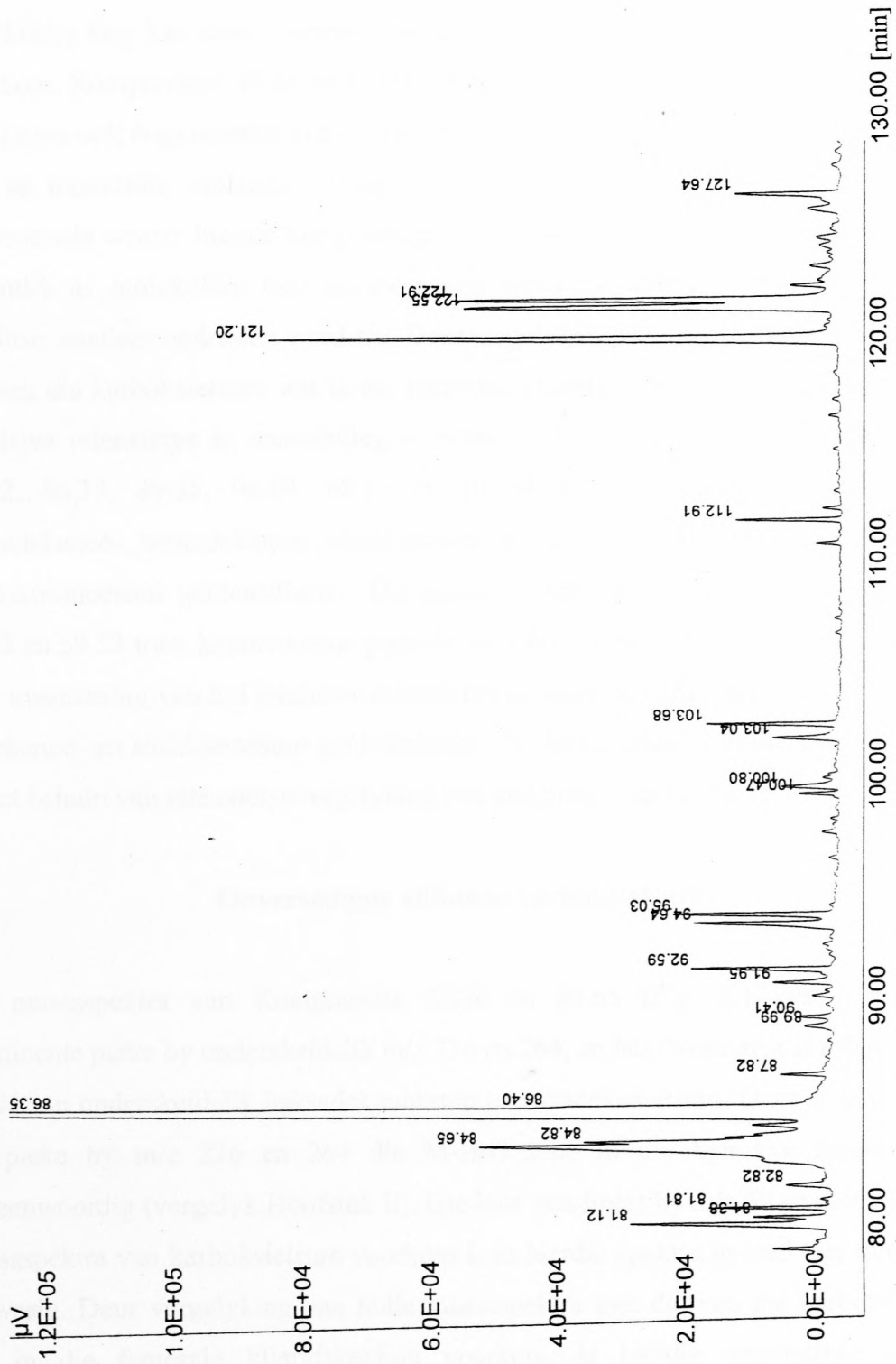


Fig. 4.2 b: Gaschromatografiese analise (vervolg) van die dichlorometaanekstrak van die generasie-  
 klierafskeiding van die ouvolk, met PS-089-OH as stasionêre fase.

### Versadigde alifatiese karboksielsure

Die massaspektra van Komponente 65.87, 70.58, 78.19, 81.12, 86.35, 94.64 en 98.73 (kyk na soortgelyke massaspektra in Hoofstuk II, Fig. 2.5 tot 2.9, Fig. 2.11 en 2.12) toon kenmerkende pieke by  $m/z$  60, 73, 129, 185, terwyl ione wat moontlik die molekulêre ione kan wees, by onderskeidelik  $m/z$  228, 242, 256, 270, 284, 312 en 326 voorkom. Komponente 89.35 en 103.04 se massaspektra (soortgelyk aan Fig. 2.10 en 2.13) toon ook bogenoemde kenmerkende ione, maar die massaspektra bevat nie ione wat as moontlike molekulêre ione oorweeg sou kon word nie. Weens die lae konsentrasie waarin hierdie komponente in die afskeidings aanwesig is, kon ione wat moontlik as molekulêre ione oorweeg kon word nie van die agtergrond in lae-resolusie analyses onderskei word nie. Deur vergelyking van hierdie massaspektra met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding voorkom, en deur hul relatiewe retensietye in aanmerking te neem, is Komponente 65.87, 70.58, 78.19, 81.12, 86.35, 89.35, 94.64, 98.73 en 103.04 as tetradekanoë-, pentadekanoë-, heksadekanoë-, heptadekanoë-, oktadekanoë-, nonadekanoë-, ikosanoë-, henikosanoë- en dokosanoësuur geïdentifiseer. Die massaspektra van Komponente 33.27, 40.30, 53.72 en 59.23 toon kenmerkende pieke by  $m/z$  60, 73 en 129 (Fig. 4.3 tot 4.6), en is deur inagneming van hul relatiewe retensietye as onderskeidelik nonanoë-, dekanoe-, dodekanoë- en tridekanoësuur geïdentifiseer. Die identifikasie van die karboksielsure is met behulp van retensietydvergelyking met sintetiese standaarde bevestig.

### Onversadigde alifatiese karboksielsure

Die massaspektra van Komponente 75.26 en 84.65 (Fig. 2.17 en 2.16) toon prominente pieke by onderskeidelik  $m/z$  236 en 264, en hul retensietye is effens korter as dié van onderskeidelik heksadekanoësuur en oktadekanoësuur. Daar is aanvaar dat die pieke by  $m/z$  236 en 264 die  $M-H_2O$  ione in die betrokke massaspektra verteenwoordig (vergelyk Hoofstuk II). Die ione wat tipies by  $m/z$  60 en  $m/z$  73 in die massaspektra van karboksielsure voorkom is in hierdie spektra in veel laer intensiteit aanwesig. Deur vergelyking van hulle massaspektra met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding voorkom, is hierdie verbindings as 9Z-heksadekanoësuur en 9Z-oktadekanoësuur geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensietydvergelyking met sintetiese standaarde bevestig.

### Versadigde alifatiese alkohole

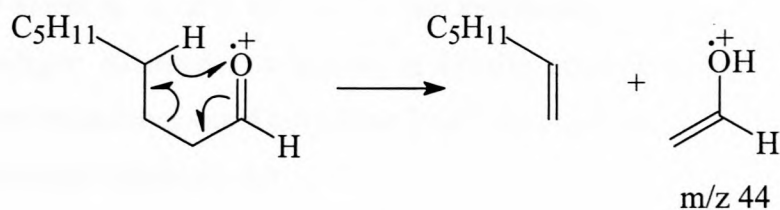
Die EI-massaspektra van Komponente 46.89, 60.40, 66.12, 70.93 (Fig. 2.24, 4.7, 4.8 en 2.25) toon twee reekse pieke by  $m/z$  41, 55, 69,... en by  $m/z$  43, 57, 71,..., waarvan die intensiteit afneem met toename in die massa van die ione. Hierdie reekse kom tipies voor in die massaspektra van onvertakte langketting 1-alkohole en 1-alkene. Retensietydvergelyking met 'n reeks kommersiële sintetiese alkohole het getoon dat bogenoemde komponente onderskeidelik dodekanol, tetradekanol, pentadekanol en heksadekanol is.

### Versadigde alifatiese ketone

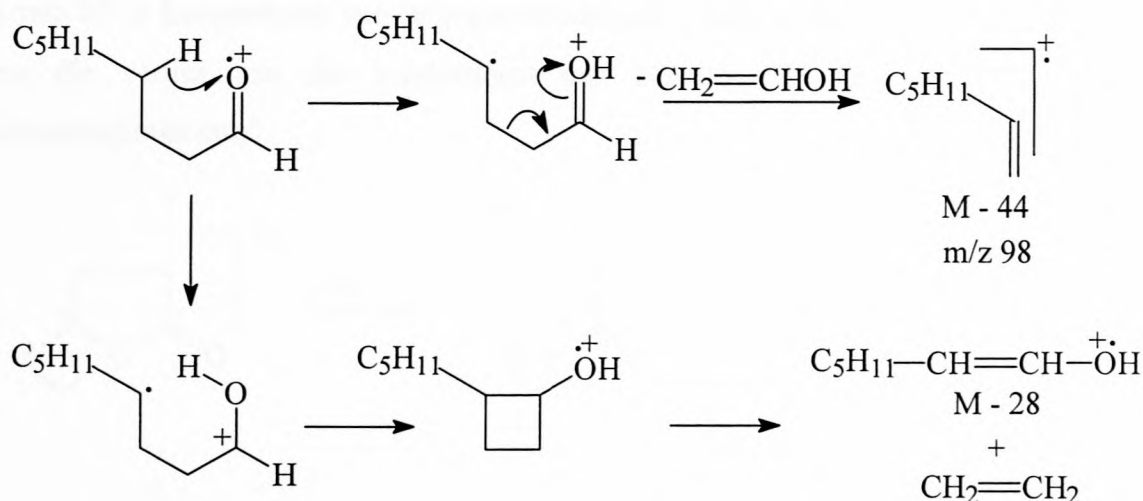
Die EI-massaspektra van Komponente 54.39, 60.96 en 71.61 (Fig. 4.9, 4.10 en 2.26) toon prominente pieke by  $m/z$  43, 58 en 71 wat kenmerkend is van versadigde alifatiese ketone en wat reeds in Hoofstuk II bespreek is. Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  226 in die massaspektrum van Komponent 60.96, die molekulêre ioon verteenwoordig. Die piek by  $m/z$  211 is dus die M-15 ioon wat deur die verlies van die metielgroep ( $\alpha$ -klowing) ontstaan. Vervolgens is hierdie komponent op grond van die molekulêre massa geïdentifiseer as 2-pentadekanoon. Deur die retensietye van Komponente 54.39 en 71.61 relatief tot dié van 2-pentadekanoon in ag te neem, is hulle as onderskeidelik 2-tetradekanoon en 2-heptadekanoon geïdentifiseer. Komponente 60.96 en 71.61 se identeite is met behulp van retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese standaarde bevestig.

### Versadigde alifatiese aldehyede

Die EI-massaspektra van Komponente 20.05, 28.07, 55.08, 61.78 en 67.99 (Fig. 4.11 - 4.15) is met gepubliseerde data<sup>2</sup> vergelyk, waarvolgens die komponente tentatief as versadigde alifatiese aldehyede geïdentifiseer is. By aldehyede met vier koolstofatome of meer is 'n  $\gamma$ -waterstof beskikbaar vir die oordrag na die karboniel-suurstof wat gepaardgaan met  $\beta$ -klowing *via* 'n sesledige sikliese oorgangstoestand. Die resultaat is die eliminasië van 'n neutrale olefiën en die vorming van 'n enolradikaalkatïon by  $m/z$  44. In die geval van byvoorbeeld nonanaal vind dit soos volg plaas:<sup>3</sup>



Die EI-massaspektrum van nonanaal sal ook onder andere 'n prominente ioon by  $m/z$  98 toon, as gevolg van die verlies van 44 massaeenhede van die molekulêre ioon. Dit is ook die gevolg van  $\beta$ -klowing met waterstofoordrag, behalwe dat die lading in hierdie geval op die alkeenfragment bly.<sup>3</sup> Prominente M-28 ione word ook by langketting aldehyede gevorm deur die eliminasië van etileen.<sup>4</sup>



Hierdie ione word ook in die EI-massaspektrum van Komponent 20.05 aangetref en dit is dus as nonanaal geïdentifiseer. Komponente 28.07, 55.08, 61.78 en 67.99 is vervolgens onderskeidelik geïdentifiseer as dekanaal, tetradekanaal, pentadekanaal en heksadekanaal. Die identifikasie van hierdie komponente is deur retensietydvergelyking met sintetiese standaarde bevestig.

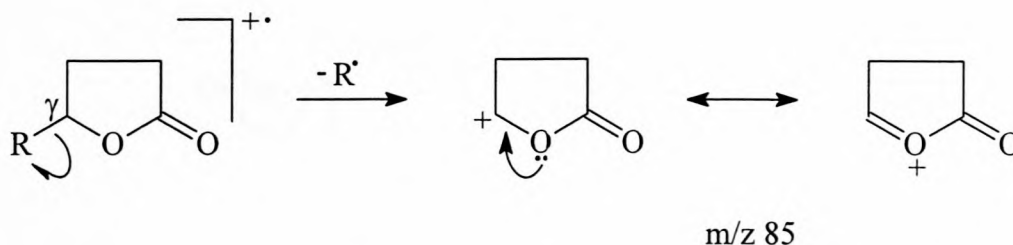
### Onversadigde alifatiese aldehyd

Die EI-massaspektrum van Komponent 70.67 (Fig. 2.32) is met gepubliseerde data<sup>2</sup> vergelyk en is as 'n  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyd geïdentifiseer. Deur vergelyking van hierdie massaspektrum met dié van die onversadigde alifatiese aldehyd wat in die femorale klier geïdentifiseer is (Komponent 16 in Hoofstuk II), is hierdie identifikasie bevestig. Soos in die geval van laasgenoemde komponent word 'n prominente ioon by

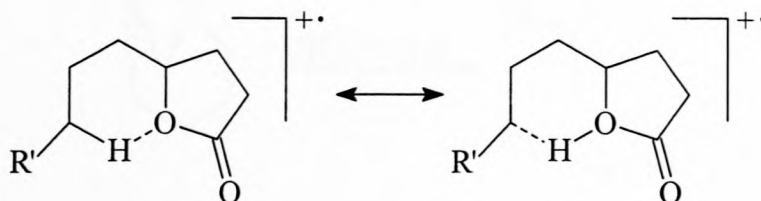
$m/z$  29 sowel as 'n ioon by  $m/z$  83, wat kenmerkend van die massaspektra van  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyde en ketone in hierdie massaspektrum aangetref. Deur die relatiewe retensietyd van Komponent 70.67 in aanmerking te neem is dit as  $2E$ - of  $2Z$ -heptadekenaal geïdentifiseer.

### Heksadekaan-4-olied

'n Besonder intensiewe basispiek kom by  $m/z$  85 in die EI-massaspektrum van Komponent 81.83 (Fig. 4.16) voor en die vergelyking van hierdie massaspektrum met gepubliseerde data<sup>5</sup> het getoon dat hierdie komponent 'n  $\gamma$ -laktoon kan wees. Die ioon by  $m/z$  85 is kenmerkend van 'n  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktoonring, en word gevorm deur die verlies van die  $\gamma$ -substituent met behoud van die lading op die laktoonringfragment:<sup>6</sup>



Die verlies van water (M-18) kom voor by laktone wat 'n  $\gamma$ -substituent met 'n kettinglengte van drie of meer koolstofatome bevat. Hierdie waterverlies vind waarskynlik deur een of meer komplekse prosesse plaas waarby 'n waterstofatoom van die  $\gamma$ -koolstofatoom van die  $\gamma$ -substituent betrokke is. So 'n waterstofatoom is steries in 'n gunstige posisie om aan die vorming van 'n sikliese sesledige oorgangstoestand deel te neem:<sup>7</sup>

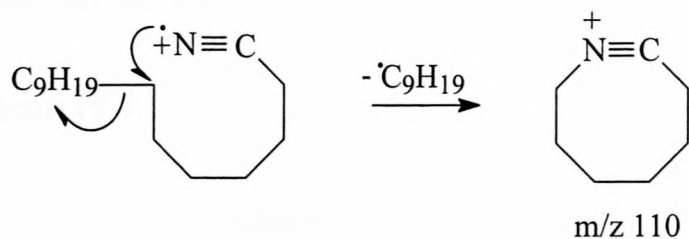


In die EI-massaspektrum van Komponent 81.38 is daar 'n ioon by  $m/z$  236 wat toegeskryf kan word aan die verlies van water uit die molekulêre ioon. Daar kan dus aanvaar word dat hierdie komponent se molekulêre massa 254 Da is, die molekulêre

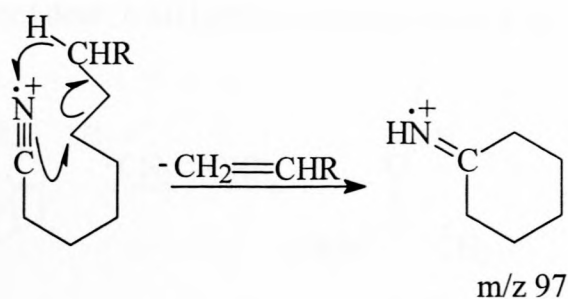
massa van heksadekaan-4-olied. Komponent 81.38 is dus as heksadekaan-4-olied geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese verbinding, bevestig.

### Versadigde alifatiese nitriële

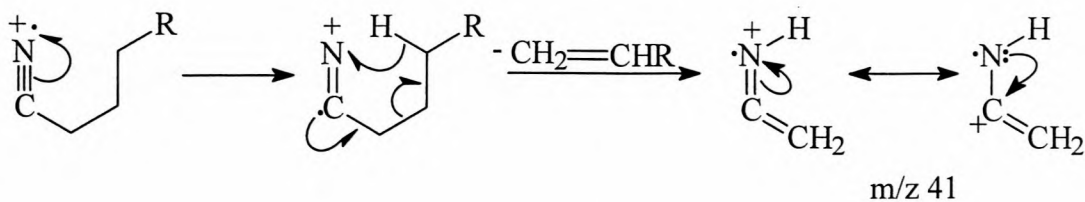
In die EI-massaspektra van alifatiese nitriële kom daar kenmerkende  $[C_nH_{2n-1}N]^+$  en  $[C_nH_{2n-2}N]^+$  ionreekse voor, wat isobaries is met die koolwaterstof ionreekse,  $[C_nH_{2n-1}]^+$  (m/z 27, 41, 55, ...) en  $[C_nH_{2n-2}]^+$  (m/z 26, 40, 54, ...).<sup>8</sup> Die vorming van  $[(CH_2)_nCN]^+$  ione word by langketting nitriële begunstig waar  $n = 5, 6$  en  $7$ , deur die vorming van sewe-, ag- of nege ledige ringe.<sup>9</sup> Hierdie ringstrukture word deur verplasingreaksies gevorm.<sup>9,10</sup>



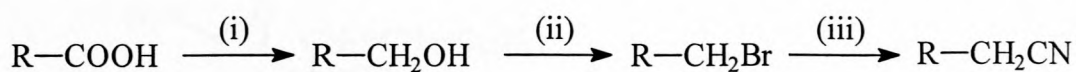
Teen hierdie agtergrond, en deur die vergelyking van Komponente 71.37 en 81.81 (Fig. 4.17 en 4.18) se EI-massaspektra met gepubliseerde data<sup>2</sup>, is hierdie komponente as alifatiese nitriële geïdentifiseer. Die prominente ioon by m/z 97 word soos volg gevorm:<sup>9</sup>



Die ioon by m/z 41 wat deur die basispiek verteenwoordig word, word deur 'n McLafferty herrangskikking gevorm:<sup>11</sup>



Komponente 71.37 en 81.81 is daarna deur middel van retensietydvergelyking met gesintetiseerde standaarde as onderskeidelik heksadekaannitriël en oktadekaannitriël geïdentifiseer. Hierdie verbindings is gesintetiseer volgens Reaksieskema IV-1 deur die reduksie van die toepaslike sure na alkohole, bromiedsubstitusie van die hidroksielgroepe, gevolg deur substitusie met sianied:

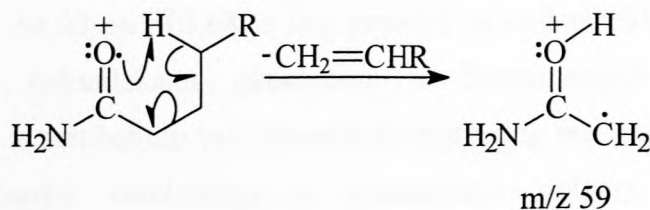


(i)  $\text{LiAlH}_4$ , eter; (ii)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HBr}$ ; (iii)  $\text{NaCN}$ , triëtileenglikol

Reaksieskema IV-1

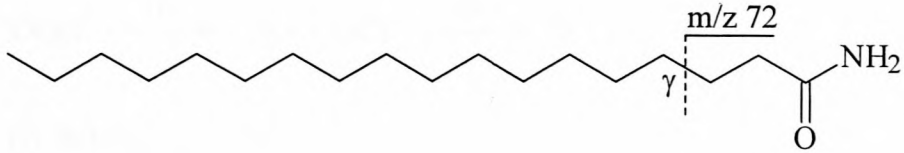
### Alifatiese amiede

Komponente 81.17, 84.82, 86.40, 89.99, 95.03, 99.34 en 103.68 se EI-massaspektra toon prominente ione by  $m/z$  59 en 72 (Fig. 4.19 tot 4.25 a). Vergelyking van die massaspektra met gepubliseerde data<sup>2</sup> het getoon dat hierdie verbindings moontlik langketting amiede kan wees. Die prominente ioon by  $m/z$  59 in die EI-massaspektra van langketting amiede word deur 'n McLafferty herrangskikking gevorm:<sup>12</sup>

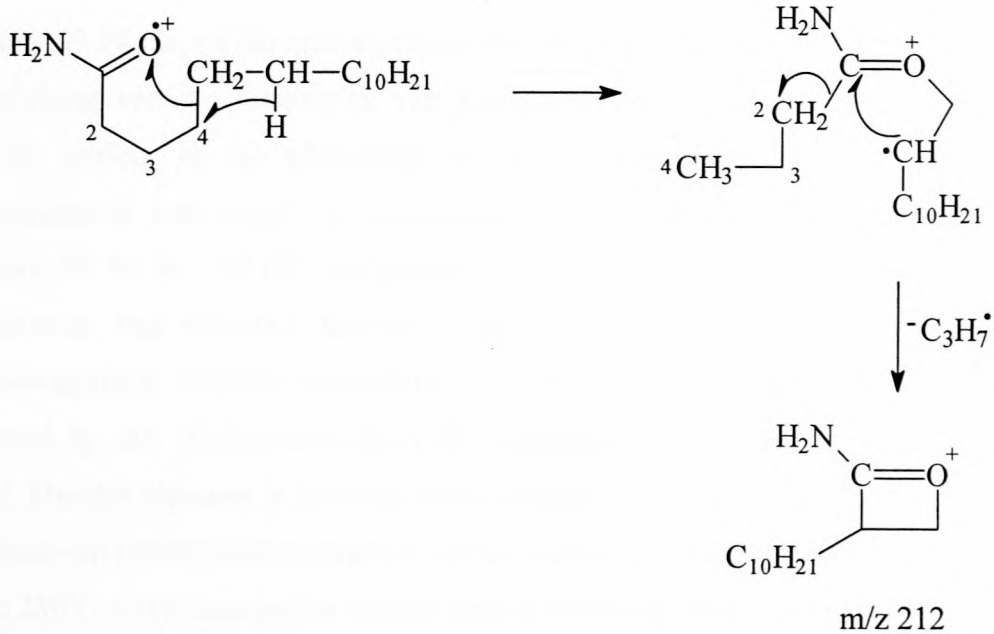


Die ioon by  $m/z$  72 vorm waarskynlik weens  $\gamma$ -klowing wat moontlik deur die vorming van 'n vierlidringstruktuur bevoordeel word.<sup>13</sup>

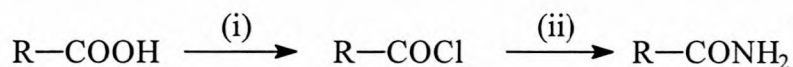




Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  255 in die EI-massaspektrum van Komponent 86.40 die molekulêre ioon is, waardeur dit as heksadekaanamied geïdentifiseer is. Die ioon by  $m/z$  212 word waarskynlik gevorm op soortgelyke wyse as die M-43 ioon wat bespreek is by die alifatiese karboksielsure in die femorale klierafskeiding (Hoofstuk II):



In die EI-massaspektra van Komponente 81.17, 84.82, 95.03 en 103.68 word die M-43 ioon by onderskeidelik  $m/z$  198, 210, 240 en 268 aangetref, en by Komponent 84.82 word daar ook 'n molekulêre ioon by  $m/z$  253 waargeneem. Komponente 81.17, 84.82, 86.40, 95.03 en 103.68 is dus tentatief as onderskeidelik pentadekaan-, 9Z-heksadekeen-, heksadekaan-, oktadekaan-, en ikosaanamied geïdentifiseer, en die identifikasies is met behulp van retensietydvergelyking met gesintetiseerde standarde bevestig. Hierdie verbindings is gesintetiseer volgens Reaksieskema IV-2 waarvolgens 'n karboksielsuur met die verlangde koolstofkettlinglengte na die suurchloried en dié na die verlangde amied omgesit is:



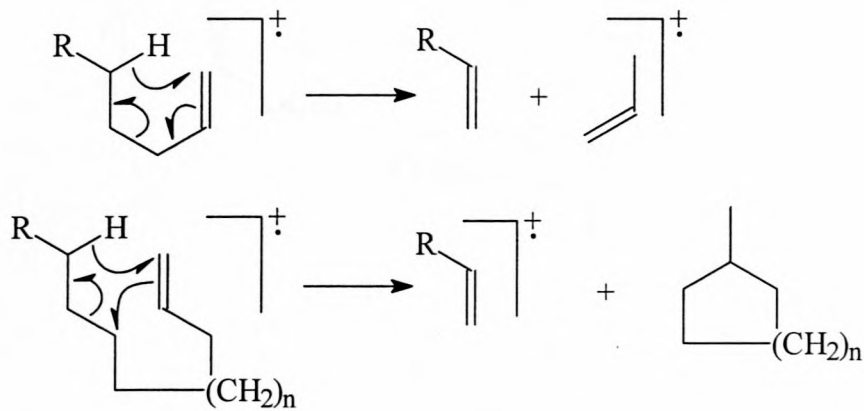
(i)  $\text{SOCl}_2$ ; (ii)  $\text{NH}_3$

#### Reaksieskema IV-2

Die EI-massaspektrum van Komponent 89.99 toon nie 'n molekulêre ioon of 'n M-43 ioon nie, weens hierdie verbinding se lae konsentrasie in die afskeiding. Die verbinding is nogtans volgens sy relatiewe retensietyd tentatief as heptadekaanamied geïdentifiseer. Die  $m/z$  59 en 72 ione is nie so prominent in die EI-massaspektrum van Komponent 99.34 nie, en die massaspektrum lyk besonder baie soos dié van 'n nitriël. 'n Vergelyking van die retensietyd van Komponent 99.34 met dié van die ander amiede en nitriële in die afskeiding het getoon dat hierdie komponent slegs nonadekaanamied kan wees. 'n Interessante verskynsel wat onder andere by Komponent 99.34 en 103.68 waargeneem is, is die "nitriëlkarakter" van die EI-massaspektrum, wat moontlik deur die eliminasië van water uit die amied in die gaschromatografiese sisteem of ioonbron ontstaan. Redelike prominente ione word byvoorbeeld by  $m/z$  97 en  $m/z$  110 in die massaspektrum van Komponent 103.68 aangetref. Hierdie hipotese is bevestig deur die analise van sintetiese eikosaanamied met die bron- en tussenvlaktemperatuur van die massaspektrometer onderskeidelik by  $250^\circ\text{C}$  en  $280^\circ\text{C}$  wat massaspektra van die amied gelewer het wat slegs baie swak ione by  $m/z$  59 en  $m/z$  72, kenmerkend van 'n amied bevat het (Fig. 4.25 b), terwyl hierdie ione prominente is in massaspektra wat verkry is met die bron- en tussenvlaktemperatuur beide by  $200^\circ\text{C}$  (Fig. 4.25 c). Wat hierdie verskynsel nog interessanter maak, is die resultate wat met die analise van die sintetiese ikosaanamied, sowat 18 maande na bogenoemde analises verkry is (Fig. 4.25 d). In hierdie geval was die bron- en tussenvlaktemperatuur onderskeidelik by  $240^\circ\text{C}$  en  $280^\circ\text{C}$  en geen "nitriëlkarakter" is in die EI-massaspektrum waargeneem nie. Daar kan in hierdie stadium, voordat verdere navorsing van die verskynsel gedoen is, nie verklaar word waarom laasgenoemde analise massaspektra met normale amiedkarakter gelewer het nie.

## Alkene

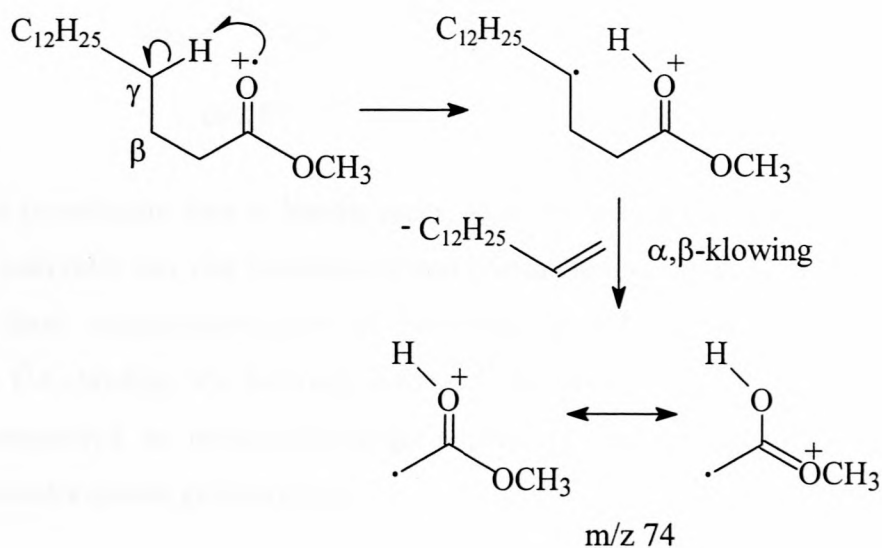
Ione met die algemene formule  $[C_nH_{2n-1}]^+$ , waarvan die intensiteit afneem met toename in massa van die ione, is dominerend in die EI-massaspektra van mono-ondersadigde alkene. Behalwe vir hierdie ione word daar ook redelik prominente ione met die algemene formule  $[C_nH_{2n}]^+$  aangetref. Die vorming van hierdie ione vind moontlike volgens 'n McLafferty herrangskikking, en herrangskikkings met groter sikliese oorganstoestande, plaas:<sup>14</sup>



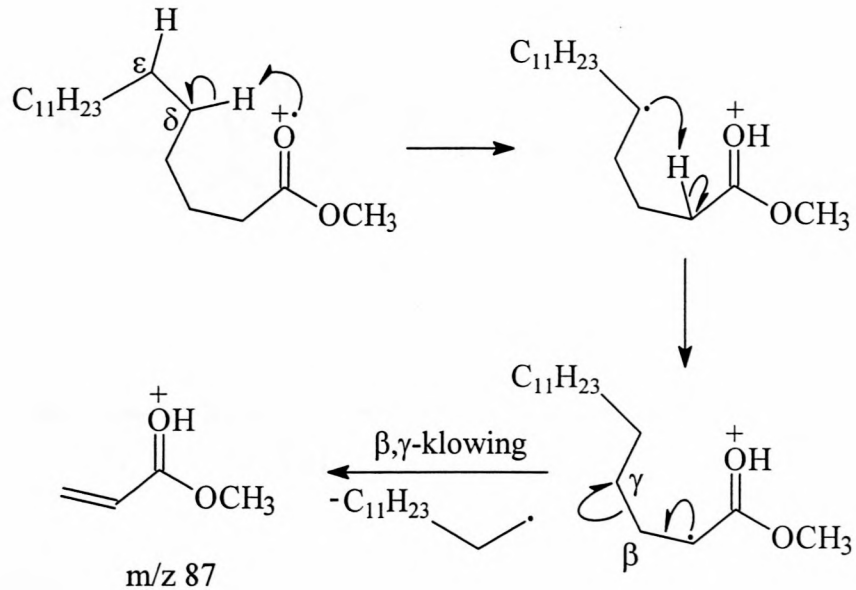
In die massaspektra van alkene, is die molekulêre ioon meer prominent as in die geval van die versadigde analoë, as gevolg van beter stabilisering van die positiewe lading na verwydering van een  $\pi$ -elektron.<sup>14</sup> Komponente 41.63 en 48.23 se EI-massaspektra (Fig. 4.26 en 4.27) bevat bogenoemde ioonreeks en is dus as alkene geïdentifiseer. Hierdie komponente se molekulêre ione is egter nie in hul EI-massaspektra waargeneem nie, en Komponente 41.63 en 48.23 is dus deur retensietydvergelyking met 'n reeks 1-alkene onderskeidelik as 1-tetradeken en 1-pentadeken geïdentifiseer.

### Versadigde en onversadigde alifatiese esters

Vergelyking van Komponent 72.95 se massaspektrum (Fig. 4.28) met gepubliseerde data<sup>2</sup> het getoon dat dit moontlik 'n metielester kan wees. Metielesters toon die verwagte reaksies van die karbonielgroep, naamlik  $\alpha$ -klowing (hierdie ione is nie baie prominent in die betrokke massaspektrum nie) en  $\beta$ -klowing wat met 'n  $\gamma$ -waterstof-herrangskikking gepaardgaan:

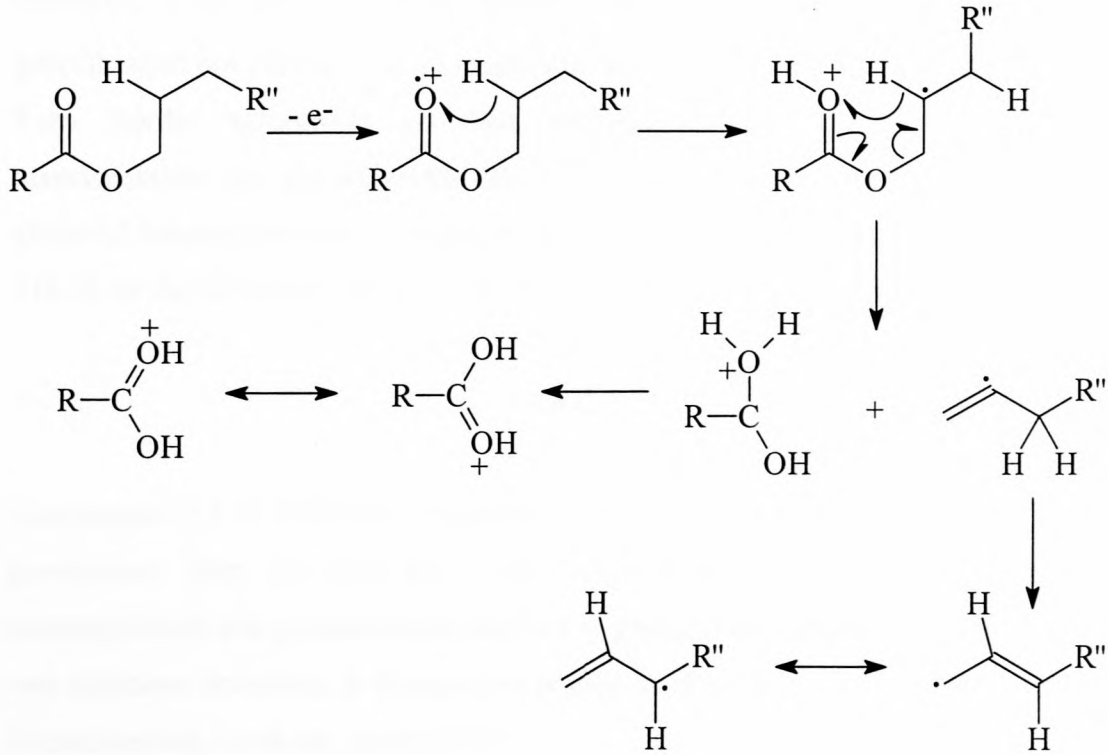


Wat die relatiewe intensiteite van die  $[\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_n]^+$  ione by  $m/z$  87, 143, 199, 255, ... ( $n = 2,6,10,14$ ) in hulle massaspektra betref, toon langketting alkanoate 'n patroon wat verskil van dié van die  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$  ione van die  $n$ -alkane wat afnemende intensiteite met die toenemende fragmentmassa toon. Die  $m/z$  87 ioon vorm deur die migrasie van die  $\delta$ - (of  $\epsilon$ -) waterstof, gevolg deur 'n 1,4- (of 1,5-) waterstofverskuiwing en die klowing van die binding tussen die  $\beta$ - en  $\gamma$ -koolstofatome:

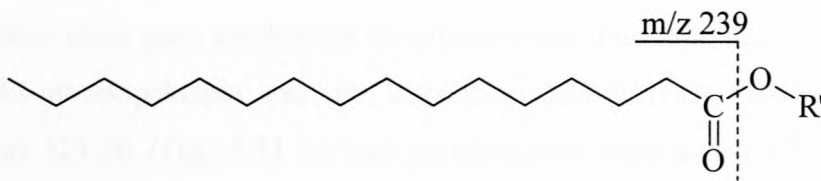


Die ander prominente ione in hierdie reeks, soos byvoorbeeld die ioon by  $m/z$  143, en wat met intervale van vier koolstowwe van bostaande ioon verskil, word waarskynlik gevorm deur verplasingreaksies of bevooroordeelde 1,4-waterstofmigrasies wat die naburige C-C-binding vir klowing aktiveer.<sup>15</sup> Komponent 72.95 wat met 'n effens korter retensietyd as heksadekanoësuur elueer, is deur retensietydvergelyking as metielheksadekanoaat geïdentifiseer.

Versadigde alifatiese langkettingesters [RCOOR'] se massaspektra toon 'n prominente ioon  $[\text{RCO}_2\text{H}_2]^+$  wat gevorm word deur 'n dubbel waterstof-herrangskikking waarby die estergroep betrokke is:<sup>16</sup>



Hieruit kan dus afgelei word wat die molekulêre massa van die suurgedeelte van die ester is. Dit is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  257 in die EI-massaspektrum van Komponent 118.35 (Fig. 4.29) gevorm word deur hierdie herrangskikking, waaruit afgelei kon word Komponent 118.35 'n alkielheksadekanoaat is. Nog 'n prominente ioon wat in die massaspektra van langketting alifatiese esters aangetref word, is die asilium ioon  $[RCO]^+$ , wat in hierdie geval by  $m/z$  239 voorkom:<sup>16,17</sup>



'n Diagnostiese ioon wat gebruik kan word om die molekulêre massa van die alkohol gedeelte van die ester te bepaal is die  $[R'-1]^+$  ioon, wat in hierdie geval by  $m/z$  168 in die massaspektrum aangetref word.<sup>16,17</sup> Komponent 118.35 is dus as dodekielheksadekanoaat geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensietydvergelyking met die gesintetiseerde verbinding bevestig.

Komponent 117.61 se EI-massapektrum (Fig. 4.30) toon prominente ione by  $m/z$  236 en  $m/z$  255. 'n Karakteristieke ioon wat in die massaspektrum van alkenoë esters

voorkom, is die  $[\text{RCO}-1]^+$  ioon. Hierdie ioon saam met die  $[\text{RCO}_2\text{H}_2]^+$  ioon kan gebruik word om die molekulêre massa van die suurgedeelte van die ester te bepaal.<sup>17</sup> Teen hierdie agtergrond en deur vergelyking van Komponent 117.61 se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2,16,17</sup> is hierdie komponent geïdentifiseer as 'n alkiel-9Z-heksadekenoaat. Aangesien Komponent 117.61 kort voor Komponent 118.35 uit die GC-kolom elueer, is dit as dodekiel-9Z-heksadekanoaat geïdentifiseer.

### Skwaleen

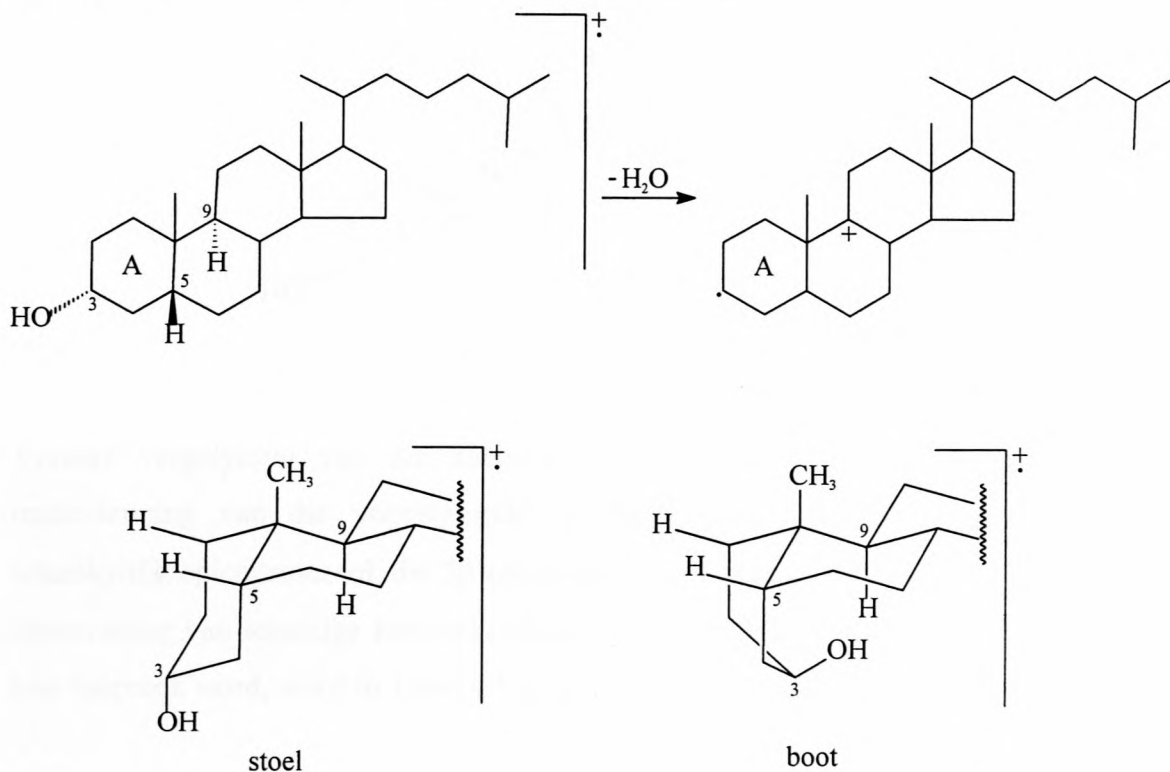
Komponent 112.91 se EI-massaspektrum (Fig. 2.36) het 'n basispiek by  $m/z$  69 en 'n prominente ioon by  $m/z$  81. Deur vergelyking van hierdie komponent se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup> en sy gaschromatografiese retensietyd van dié van sintetiese skwaleen, is hierdie komponent as skwaleen, wat ook in die femorale klierafskeiding voorkom, geïdentifiseer.

### Steroïede

#### 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol

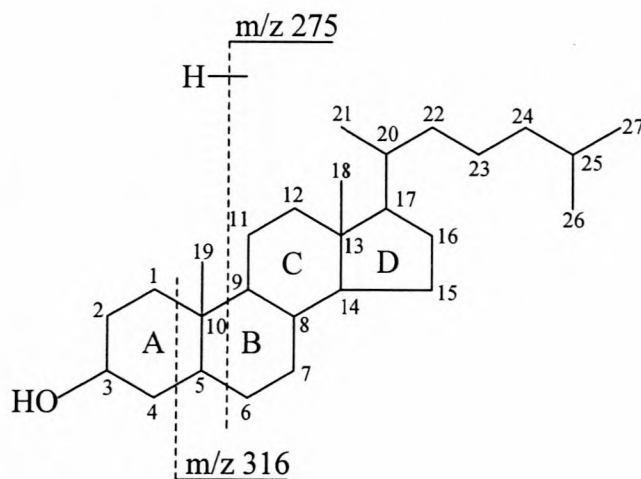
Die EI-massaspektrum van Komponent 121.20 (Fig. 4.31 a) toon prominente pieke by  $m/z$  388, 370, 355, 316, 257, 233 en 215. 'n Piek wat moontlik aan die molekulêre ioon toegeskryf kan word, kom by  $m/z$  388 voor. Deur vergelyking van die EI-massaspektrum met gepubliseer massaspektra<sup>2,18</sup> is Komponent 121.20 as 'n steroïed geïdentifiseer, maar geen eenduidige identifikasie was moontlik nie. Deur vergelyking van die EI-massaspektrum van die trimetielsilieleterderivaat (TMS-derivaat) van Komponent 121.20 (Fig. 4.31 b) met gepubliseerde massaspektra<sup>18</sup>, is dit as 5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol geïdentifiseer. Hierdie moontlikheid is reeds gestaaf deur die feit dat die molekulêre ioon 2 Da hoër as dié van cholesterol is (Hoofstuk II) wat daarop dui dat Komponent 121.20 nie 'n dubbelbinding soos cholesterol bevat nie. Die prominente ione by  $m/z$  370 en 355 is onderskeidelik die M-18 en M-(15+18) ione en die minder prominente ioon by  $m/z$  373 is die M-15 ioon, soos verduidelik in Hoofstuk II. In die geval van 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol vind eliminasië van die 3 $\alpha$ -OH groep waarskynlik meestal saam met die 9 $\alpha$ -H vanuit die metastabiele molekulêre

ioon plaas. Dit is voorgestel dat die konformasie van die A-ring na die boot vorm verander word om hierdie eliminasiemoontlik te maak:<sup>19</sup>



Verder word ione by  $m/z$  275 en 257 onderskeidelik gevorm deur die verlies van die syketting, en deur die eliminasiemoontlik gepaardgaande met die verlies van water uit die molekulêre ioon. Klowing van die B-ring deur die breking van die 9,10- en 5,6-bindings kan moontlik ook 'n ioon by  $m/z$  275 tot gevolg hê, soos in die geval van cholesterol. Hier sou dit met 'n gelyktydige verskuiwing van 'n waterstof kon plaasvind. Klowing van die D-ring, en klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water, het die vorming van die ione by onderskeidelik  $m/z$  233 en 215 tot gevolg. By steroïede soos hierdie, met 'n versadigde A- en B-ringsisteme en 'n hidroksielgroep op C3, vind daar klowing van die A-ring plaas om die ioon by  $m/z$  316 te vorm.<sup>20</sup>





Verdere vergelyking van die massaspektrum met gepubliseerde data<sup>21</sup> het ter ondersteuning van die voorafgaande afleidings getoon dat Komponent 121.20 waarskynlik epicoprostanol, die  $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -ol isomeer van cholestan-3-ol, is. 'n Samevatting van sommige kenmerkende ione in die massaspektra van die sterole wat hier bespreek word, word in Tabel 4.1 gegee.

Dit is dus duidelik dat die ioon by  $m/z$  460 in die EI-massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 121.20 (Fig. 4.31 b) die molekulêre ioon moet wees.<sup>18</sup> (Vergelyk Tabel 4.2 in verband met die retensietyd verskil tussen die sterioëde en hul derivate.) Die pieke by  $m/z$  445, 370 en 355 verteenwoordig dus onderskeidelik die M-15, M-TMSOH en die M-(TMSOH + 15) ione in hierdie massaspektrum. Die basispiek in die massaspektrum by  $m/z$  75 verteenwoordig die  $[(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}]^+$  ioon.<sup>22</sup> Die verlies van die syketting gepaardgaande met die verlies van TMSOH het die ioon by  $m/z$  257 tot gevolg. Die ioon by  $m/z$  305 word gevorm deur die klowing van die D-ring. Die klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van TMSOH het die vorming van die ioon by  $m/z$  215 tot gevolg. Klowing van die C-ring gepaardgaande met die verlies van TMSOH het die vorming van die ioon by  $m/z$  147 tot gevolg. 'n Ander tipe klowing van die D-ring, waar die syketting saam met C16 en C17 afgesplyt word, gepaardgaande met die verlies van TMSOH, lewer die ioon by  $m/z$  230.<sup>23,24</sup>

Tabel 4.1: Sommige kenmerkende ione met genormaliseerde intensiteit (kursief) in die massaspektra van die sterole geïdentifiseer in die generasieklierafskeiding van die ouvolk, *Cordylus giganteus*. (Die sterole wat al in Hoofstuk II bespreek is, is hier weggelaat)

komponent nommer	Verbinding	M	M-15 <sup>e</sup>	M-18 <sup>b</sup>	M-(15+18)	M-(sk. <sup>c</sup> + 18)	M-D-ring <sup>d</sup>	M-(D-ring + 18)	EI-massa- spektrum
121.20	5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol	388 <i>17</i>	373 <i>12</i>	370 <i>56</i>	355 <i>23</i>	257 <i>12</i>	233 <i>38</i>	215 <i>100</i>	Fig. 4.31 a
122.55	5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	388 <i>20</i>	373 <i>24</i>	370 <i>4</i>	355 <i>17</i>	257 <i>5</i>	233 <i>70</i>	215 <i>92</i>	Fig. 4.32 a
122.91	5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	388 <i>27</i>	373 <i>25</i>	370 <i>2</i>	355 <i>13</i>	257 <i>5</i>	233 <i>73</i>	215 <i>99</i>	Fig. 4.33 a
124.38	5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	386 <i>47</i>	371 <i>19</i>	368 <i>3</i>	353 <i>5</i>	255 <i>54</i>	231 <i>25</i>	213 <i>33</i>	Fig. 4.36 a
125.32	5 $\beta$ -Ergostanol	402 <i>6</i>	387 <i>5</i>	384 <i>21</i>	369 <i>8</i>	257 <i>9</i>	233 <i>15</i>	215 <i>82</i>	Fig. 4.37 a
129.52	5 $\beta$ -Stigmastanol	416 <i>7</i>	401 <i>5</i>	398 <i>23</i>	383 <i>9</i>	257 <i>10</i>	233 <i>16</i>	215 <i>82</i>	Fig. 4.38

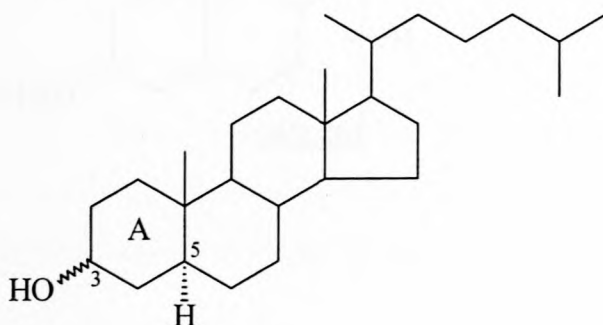
a: Verlies van 'n metiel groep; b: Verlies van water; c: sk. = syksetting op C17; d: Klowing van die D-ring.

Tabel 4.2: Die retensietye van sommige stereoïede geïdentifiseer in die generasieklierafskeiding van die ouvolk, *Cordylus giganteus*, en die retensietye van die ooreenstemmende O-metieloksiem- of trimetielsiliel-derivate (MO- of TMS-derivate).

Komponent nommer	Stereoïed	Rt (min.)	MO-/TMS-Derivaat	Rt (min.)	Rt Verskil
121.20	5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol	131.560	5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -OTMS	132.144	0.584
122.55	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	133.794	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -OTMS	137.594	3.800
122.91	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	134.144	5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -OTMS	137.960	3.816
123.75	Cholestan-2/3-one	135.894	2/3-MO-cholestaan	139.394	3.500
124.38	5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	136.627	5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -OTMS	140.677	4.05
125.32	5 $\beta$ -Ergostanol	138.060	5 $\beta$ -Ergostan-3-OTMS	138.444	0.384

**5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha/\beta$ -ol**

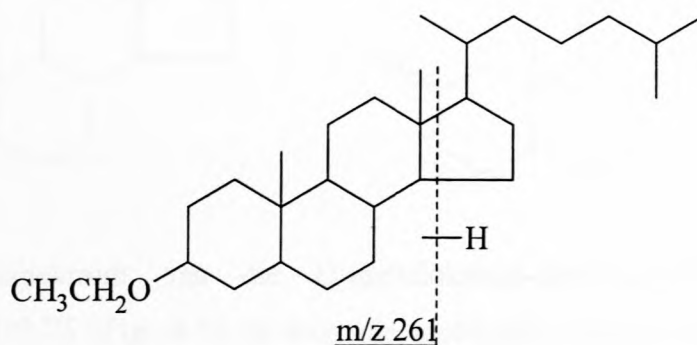
Komponente 122.55 en 122.91 se EI-massaspektra (Fig. 4.32 a en 4.33 a) toon prominente ione by onder andere  $m/z$  388, 373, 355, 233 en 215. Hierdie massaspektra stem baie ooreen met dié van Komponent 121.20 (5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol). Aangesien hierdie drie komponente se retensietye van mekaar verskil, en na aanleiding van sekere verskille in die massaspektra, wat hieronder bespreek word, is daar afgelei dat hulle waarskynlik verskillende stereoisomere van cholestan-3-ol is. Die vorming van bogenoemde ione sal dus op dieselfde wyse as by Komponent 121.20 geskied. 'n Groot diagnostiese verskil in die massaspektra van die isomere is die ione wat gevorm word deur die eliminasië van water uit die molekulêre ioon, as gevolg van die verbindings se stereochemiese invloed op die eliminasië meganisme.<sup>25,19</sup> Oor die algemeen toon die massaspektra van C17 gesubstitueerde steroïede met 'n *cis*-A/B ringaansluiting (5 $\beta$ -H) prominente  $[M-H_2O]^+$  ione, terwyl die ooreenstemmende massaspektra van steroïede met 'n *trans*-A/B ringaansluiting (5 $\alpha$ -H) baie swak  $[M-H_2O]^+$  ione toon.<sup>19</sup> Dit is duidelik dat die intensiteit van die ioon by  $m/z$  370 (M-18) heelwat hoër is relatief tot die ioon by  $m/z$  373 (M-15) in die massaspektrum van Komponent 121.20 as in die massaspektra van Komponente 122.55 en 122.91, wat daarop dui dat die eliminasië van water meer gereidelik in die eersgenoemde geval plaasvind. In vergelyking met die intensiteit van die ioon by  $m/z$  233 is die intensiteit van die ioon by  $m/z$  215 laer in die massaspektra van Komponente 122.55 en 122.91 as in die massaspektrum van Komponent 121.20 is. Die klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water vind waarskynlik dus ook meer gereidelik in die laasgenoemde geval plaas. Teen hierdie agtergrond en deur die verdere vergelyking van Komponente 122.55 en 122.91 se EI-massaspektra met gepubliseerde data,<sup>21</sup> is afgelei dat hierdie twee komponente dus 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha/\beta$ -ol is. Daar kon egter nie uit hul massaspektra afgelei word of die hidroksielgroepe  $\alpha$  of  $\beta$  is nie.



Vergelyking van die EI-massaspektra van die TMS-derivate van Komponente 122.55 en 122.91 (Fig. 4.32 b en 4.33 b) met gepubliseerde data<sup>2</sup> het ook bevestig dat hierdie komponente 5 $\alpha$ -cholestan-3-ole is. 'n Verskil tussen die 5 $\alpha$ - en 5 $\beta$ -isomere is onder andere dat meer prominente ione by  $m/z$  305 en 262 aangetref word in die massaspektra van die 5 $\alpha$ -isomere, terwyl die massaspektrum van die 5 $\beta$ -isomeer 'n baie prominente ioon by  $m/z$  257 toon.

### 3-Etoksicholestaan

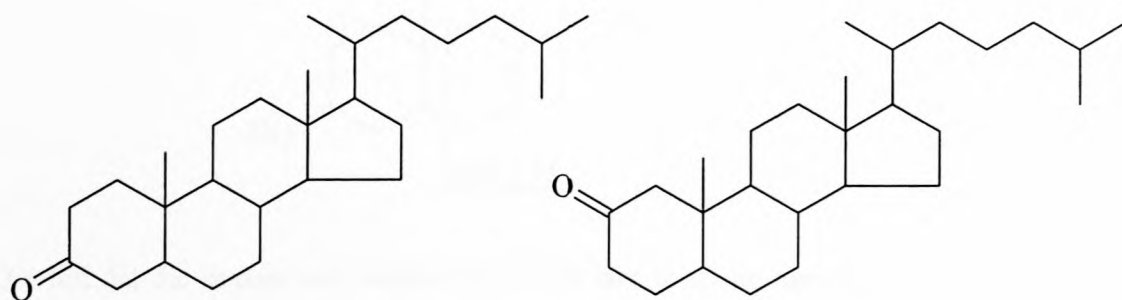
Die EI-massaspektrum van Komponent 123.51 (Fig. 4.34) stem ook besonder ooreen met dié van die cholestan-3-ole. Daar is egter 'n paar essensiële verskille, onder andere die ione by  $m/z$  401, 416 en 430. Dit is vasgestel deur 'n enkelioon chromatogram dat die  $m/z$  430 ioon afkomstig is van 'n onsuiverheid, wat nagenoeg saam met Komponent 123.51 elueer. As dit vervolgens aanvaar word dat die ioon by  $m/z$  416 die molekulêre ioon van Komponent 123.51 is, is afgelei dat die ione by  $m/z$  401 en 370, onderskeidelik die M-15 en M-46 ione van die betrokke verbinding kan wees. 'n Moontlikheid wat oorweeg is vir die ontstaan van die M-46 ioon, is die eliminasië van etanol (46 Da) uit die molekulêre ioon. Vergelyking van die EI-massaspektrum van Komponent 123.51 met gepubliseerde data<sup>2</sup> het getoon dat hierdie komponent moontlik 3-etoksicholestaan kan wees, waarvoor eliminasië van etanol uit die molekulêre ioon verwag sou kon word. Ter ondersteuning van hierdie gevolgtrekking kan aangevoer word dat 'n ioon by  $m/z$  261 in die massaspektrum van hierdie verbinding voorkom, dus by 'n  $m/z$  28 Da hoër as die ioon wat in die massaspektrum van cholestan-3-ol by  $m/z$  233 voorkom en wat in die geval van laasgenoemde verbinding aan die klowing van die D-ring toegeskryf word.



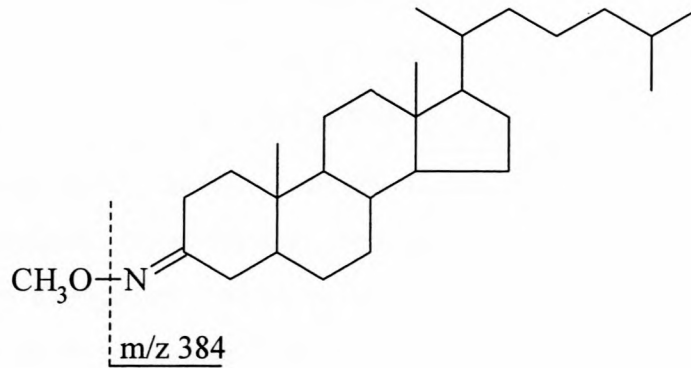
Die vorming van die prominente ione by  $m/z$  355, 316 en 215 in die massaspektrum van Komponent 123.51 kan op dieselfde wyse verklaar word as die ooreenstemmende ione in die massaspektrum van Komponent 121.20 ( $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -ol), met die verskil dat die fragmentasies by Komponent 121.20 gepaardgaande met die verlies van water plaasvind, terwyl dit by Komponent 123.51 met die verlies van etanol gepaardgaan.

### Cholestan-3-oon of cholestan-2-oon

Vergelyking van Komponent 123.75 se EI-massaspektrum (Fig. 4.35 a) met gepubliseerde data<sup>18,26</sup> het getoon dat hierdie verbinding moontlik cholestan-3-oon of cholestan-2-oon is. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  386 die molekulêre ioon is en die ioon by  $m/z$  371 dus die M-15 ioon is. Aangesien die molekulêre massa van hierdie komponent 2 Da hoër as dié van cholest-4-en-3-oon is (Hoofstuk II) dui dit ook daarop dat Komponent 123.75 nie 'n C-C dubbelbinding bevat nie. Die basispiek by  $m/z$  231 in die massaspektrum van Komponent 123.75 sou dan moontlik deur klowing van die D-ring gevorm kon word.<sup>27</sup> Volgens gepubliseerde data<sup>27</sup> bevat die massaspektrum van die  $5\beta$ -isomeer van cholestan-3-oon, naamlik coprostan-3-oon, 'n prominente ioon by  $m/z$  316, wat deur die klowing van die A-ring gevorm word. Hierdie ioon is nie in die massaspektrum van Komponent 123.75 waargeneem nie, en dus kan hierdie komponent óf cholestan-3-oon óf cholestan-2-oon wees. Daar kan egter nie deur middel van massaspektrometrie tussen hierdie isomere onderskei word nie.<sup>27,28</sup>



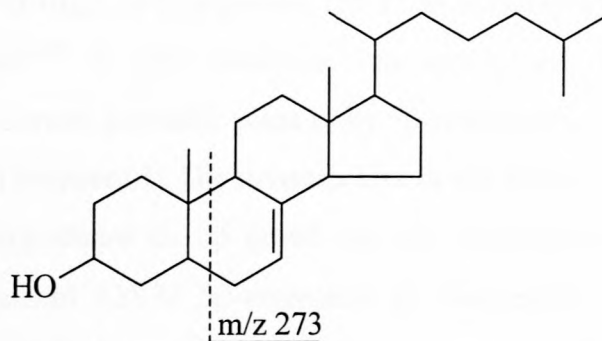
Die EI-massapektrum van die O-metieloksiem-derivaat (MO-derivaat) van Komponent 123.75 (Fig. 4.35 b) toon die molekulêre ioon en die M-15 ioon by onderskeidelik  $m/z$  415 en 400. Die kenmerkende ioon van OM-derivate, wat deur die klowing van die N-O-binding gevorm word, word by  $m/z$  384 aangetref.<sup>29</sup>



Die prominente ioon by  $m/z$  260 word waarskynlik gevorm deur die klowing van die D-ring. Die massaspektrum van die MO-derivaat van Komponent 123.75 het egter geen verdere informasie oor die komponent se struktuur verskaf nie.

#### **5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol:**

Vergelyking van Komponent 124.38 se EI-massaspektrum (Fig. 4.36 a) met gepubliseerde data<sup>2</sup> het getoon dat dit moontlik 5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -ol kan wees. Sommige van die kenmerkende ione in die EI-massaspektrum van die Komponent 124.38 word in Tabel 4.1 gegee. 'n Noemenswaardige ioon is dié by  $m/z$  273, wat nie net as gevolg van die verlies van die syketting uit die molekulêre ioon nie, maar ook waarskynlik ook deur die klowing van die B-ring gevorm kan word:



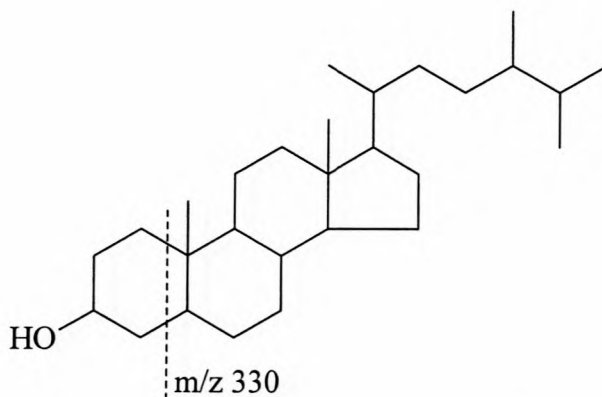
Die feit dat die massa van hierdie ioon 2 Da laer is as dié van die ooreenstemmende ioon in die EI-massaspektrum van cholesterol, ondersteun moontlik die afleiding dat daar 'n 7,8-dubbelbinding in hierdie verbinding aanwesig is. Deur vergelyking van Komponent 124.38 se massaspektrum met gepubliseerde data,<sup>21,26</sup> is die identifikasie van hierdie komponent as 5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -ol bevestig.

Die TMS-derivaat van Komponent 124.38 (Fig. 4.36 b) het prominente ione by onder andere  $m/z$  458, 443, 368, 353, 255 en 213 getoon. Die ione by 458, 443, 386 en 353 is onderskeidelik die  $M^+$ ,  $M-15$ ,  $M-TMSOH$  en  $M-(TMSOH + 15)$  ione. Die verlies van die syketting en die klowing van die D-ring wat beide met die verlies van TMSOH gepaardgaan, lewer die ione by onderskeidelik  $m/z$  255 en 213. Verdere vergelyking van Komponent 124.38 se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2,21,26</sup> het ook getoon dat dit  $5\alpha$ -cholest-7-en- $3\beta$ -ol is.

### 5 $\beta$ -Ergostanol

Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  402 in die EI-massaspektrum van Komponent 125.32 (Fig. 4.37 a) die molekulêre ioon verteenwoordig. Aangesien hierdie komponent se molekulêre massa 14 Da hoër is as dié van cholestan-3-ol, bevat hierdie verbinding waarskynlik een metielgroep meer as cholestan-3-ol. Vergelyking van die massaspektrum van Komponent 125.32 met gepubliseerde data<sup>21,26</sup> het getoon dat dieselfde prominente ione wat in  $5\alpha$ -ergostanol (24-metiel- $5\alpha$ -cholestan-3-ol) se massaspektrum voorkom, ook in Komponent 125.32 se massaspektrum aangetref word. Die intensiteite van die  $M-18$  ioon by  $m/z$  384, asook die ioon by  $m/z$  215 wat weens die klowing van die D-ring gepaardgaande met die verlies van water gevorm word, is relatief hoër as die ione by onderskeidelik  $m/z$  387 ( $M-15$ ) en  $m/z$  233 (klowing van die D-ring) in Komponent 125.32 se massaspektrum as wat dit in die gepubliseerde data<sup>21,26</sup> is. Die eliminasië van water vind dus in die geval van Komponent 125.32 meer gereedlik plaas as by  $5\beta$ -ergostanol, soos by die  $5\beta$ -isomeer van cholestan-3-ol bespreek is. Die massaspektra in die databasisse<sup>21,26</sup> is dié van die  $5\alpha$ -isomeer van ergostanol en op grond van die voorafgaande bespreking is dus afgelei dat Komponent 125.32  $5\beta$ -ergostanol is. Aangesien hierdie verbinding net soos cholestan-3-ol ook 'n versadigde A-B-ringsisteem en 'n hidroksielgroep op C3 in sy struktuur bevat, vind klowing van die A-ring plaas om die ioon by  $m/z$  330 te lewer (14 Da hoër as by cholestan-3-ol):

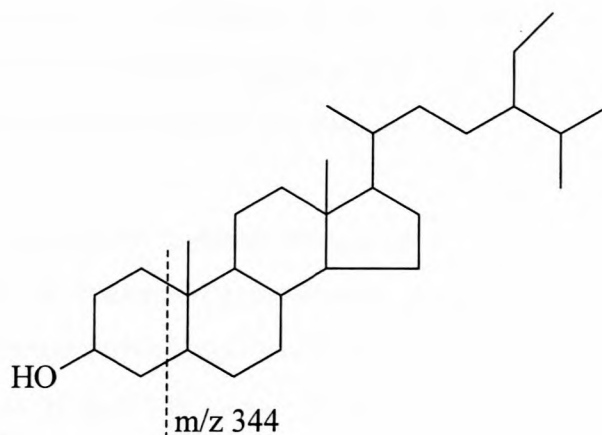




Die piek by  $m/z$  474 in die massaspektrum van die TMS-derivaat van Komponent 125.32 (Fig. 4.37 b) verteenwoordig die molekulêre ioon. Die pieke by  $m/z$  459, 384 en 369 verteenwoordig dus onderskeidelik die M-15, M-TMSOH en die M-(TMSOH + 15) ione. Ione by  $m/z$  257, 230, 215 en 147 is ook aanwesig in die massaspektrum van Komponent 121.20 ( $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -ol).

### **$5\beta$ -Stigmastanol**

Daar is aanvaar dat die molekulêre ioon in die EI-massaspektrum van Komponent 129.52 (Fig. 4.38) deur die piek by  $m/z$  416 verteenwoordig word en dat die molekulêre massa van hierdie verbinding 28 Da hoër is as dié van cholestan-3-ol. Hierdie verbinding bevat dus óf twee metielgroepe óf 'n etielgroep meer as cholestan-3-ol. Vergelyking van die massaspektrum van Komponent 129.52 met gepubliseerde data<sup>26</sup> het getoon dat dieselfde prominente ione in hierdie massaspektrum voorkom as wat in dié van  $5\alpha$ -stigmastanol (24-eties- $5\alpha$ -cholestan-3-ol) waargeneem word. Net soos by Komponent 125.32 ( $5\beta$ -ergostanol) het die ione in die massaspektrum van Komponent 129.52, wat onder andere ook die eliminasië van water behels, relatief hoër intensiteite as in die gepubliseerde massaspektrum van  $5\alpha$ -stigmastanol. Op dieselfde wyse as by die bespreking van Komponent 125.32, is hieruit afgelei dat Komponent 129.52  $5\beta$ -stigmastanol is. In hierdie geval vind die klowing van die A-ring plaas om die ioon by  $m/z$  344 te lewer, wat 28 Da hoër as die ooreenstemmende ioon by cholestan-3-ol is:



Geen EI-massaspektrum kon vir die TMS-derivaat van Komponent 129.52 verkry word nie, moontlik omdat hierdie komponent in 'n baie lae konsentrasie in die monster wat vir derivatisering gebruik is, voorkom.

#### **Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, lanosterol en cholest-4-en-3-oon**

Die EI-massaspektrum van Komponent 126.97 (Vergelyk Figuur 2.40 a in Hoofstuk II) toon prominente pieke by onder andere  $m/z$  400, 382 en 367, wat waarskynlik die  $M^+$ , M-18 en M-(18+15) ione van hierdie verbinding is. Die komponent in die femorale klierafskeiding met dieselfde retensietyd en 'n identiese massaspektrum is as ergost-5-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer (Hoofstuk II). Teen hierdie agtergrond en deur die vergelyking van Komponent 126.97 se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup>, is dit as ergost-5-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer. Die EI-massaspektrum van Komponent 132.18 (Fig. 2.44 a) toon prominente pieke by onder andere  $m/z$  426, 411 en 393, wat waarskynlik die  $M^+$ , M-15 en M-(18+15) ione van hierdie verbinding is. In hierdie geval is die massaspektrum ook met gepubliseerde data<sup>2</sup> en, soos hierbo, met dié van die femorale klier vergelyk, waarvolgens dit as lanosterol geïdentifiseer is. Op dieselfde wyse is Komponent 127.64 (Fig. 2.41) as cholest-4-en-3-oon geïdentifiseer.

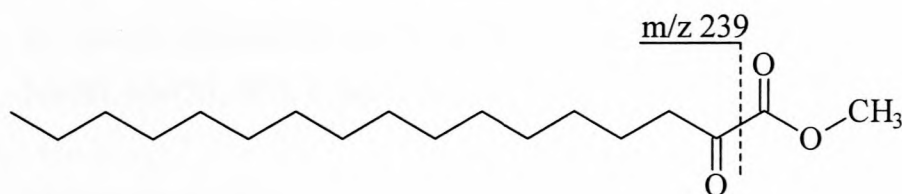
#### **Ongëidentifiseerde verbindings**

'n Paar ongëidentifiseerde komponente van die ekstrak kan moontlik ook steroïede wees. Sommige van hierdie verbindings kom in 'n baie lae konsentrasie in die afskeiding voor, en/of elueer saam met ander komponente, wat veroorsaak dat daar nie suiwer massaspektra vir hierdie komponente verkry kan word nie. In die geval van

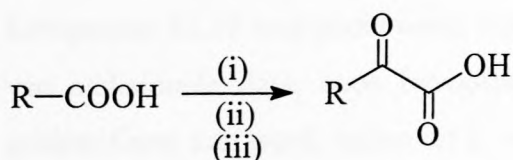
komponente in voldoende konsentrasies in die afskeiding aanwesig is, sou die probleem van onsuiver massaspektra opgelos kon word deur 'n ander GC-kolom te gebruik. Hierdie komponente is egter in die huidige studie nie verder ondersoek nie.

Sommige van die komponente in die generasieklierafskeiding kon nie geïdentifiseer word nie omdat daar nie voldoende gepubliseerde data beskikbaar is nie. Sekere van hierdie ongeïdentifiseerde verbindings word kortliks hier bespreek.

'n Prominente ioon is by  $m/z$  239 in die EI-massaspektrum van Komponent 87.82 (Fig. 4.39 a) waargeneem, saam met koolwaterstof ioonreëksie by  $m/z$  43, 57, 71, ... en  $m/z$  41, 55, 69, ... van afnemende intensiteit met die toename van molekulêre massa. Vergelyking van Komponent 87.82 se EI-massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup> het getoon dat dit moontlik metiel-2-oksoheptadekanoaat kan wees. Deur van GC-HR-MS gebruik te maak, is die akkurate massa van die ioon by  $m/z$  239 as 239.23414 bepaal, waaruit die molekulêre formule van hierdie ioon as  $H_{31}C_{16}O$  bereken is, dit wil sê die samestelling van die asiliumioon wat soos volg uit die volgende  $\alpha$ -ketoëster, metiel-2-oksoheptadekanoaat gevorm sou kon word:



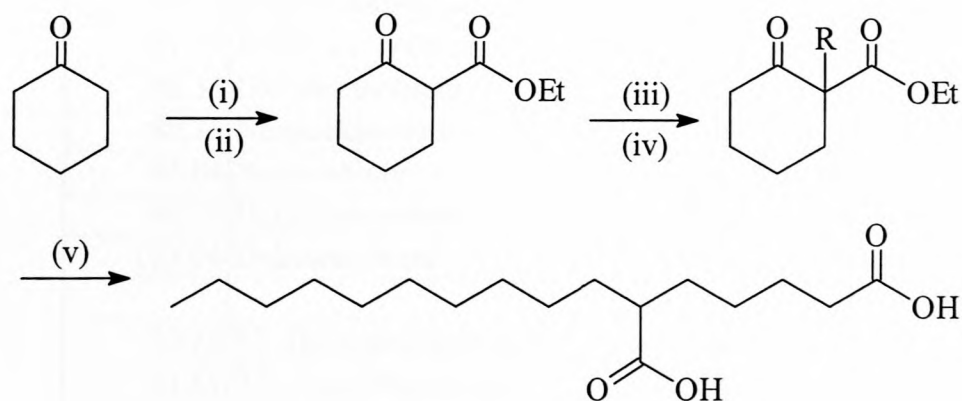
Hierdie verbinding is uit onder andere heksadekanoësuur gesintetiseer (Reaksieskema IV-3) en die massaspektrum van die sintetiese verbinding (Fig. 4.39 b) het besonders goed ooreengestem met dié van Komponent 87.82. Aangesien die sintetiese verbinding met 'n korter retensietyd geëlueer het, is Komponent 87.82 dus nie metiel-2-oksoheptadekanoaat nie. Komponente 77.93 en 82.82 het soortgelyke massaspektra (Fig. 4.40 en 4.41) waarin die prominente ioon by  $m/z$  239 ook voorkom.



(i) LDA, THF; (ii) dimetieloksaal; (iii)  $NaHCO_3$

Reaksieskema IV-3

Nog 'n interessante komponent wat nie geïdentifiseer kon word nie, is Komponent 92.59. Hierdie komponent se EI-massaspektrum (Fig. 4.42 a) toon prominente pieke by  $m/z$  60, 73, 101 en 114, en die massaspektrum stem baie ooreen met dié van 1,7-heptaandioësuur.<sup>2</sup> Dit sou egter verwag word dat 1,7-heptaandioësuur heelwat vroeër as Komponent 92.59 uit die GC-kolom sal elueer. As 'n eerste moontlikheid is 2-dekiel-heptaandioësuur vir vergelyking met Komponent 92.59 soos volg (Reaksieskema IV-4) uit onder andere dekielbromied gesintetiseer:



(i) NaOEt, diëtieloksalaat; (ii) Fe (s),  $\Delta$ ; (iii) NaOEt; (iv) Dekielbromied; (v) NaOH, MeOH, HCl, C (s).

#### Reaksieskema IV-4

Die massaspektrum (Fig. 4.42 b) van hierdie verbinding het aansienlik van dié van Komponent 92.59 verskil. Deur van GC-HR-MS gebruik te maak is die akkurate massas van die  $m/z$  101 en 114 ione onderskeidelik as 101.04747 en 114.05541 bepaal. Hieruit is bereken dat die molekulêre formules van hierdie ione onderskeidelik  $H_7C_4O_2N$  en  $H_8C_5O_2N$  is en dit was dus duidelik dat die eerste benadering nie korrek was nie. Uit die hoë-resolusie informasie kan 'n groot aantal moontlike strukture vir Komponent 92.59 voorgestel word, maar hierdie verbinding sal egter slegs met behulp van addisionele data, soos byvoorbeeld KMR of infrarooi spektroskopie, finaal geïdentifiseer kan word, indien dit in voldoende kwantiteit uit die afskeiding geïsoleer kan word.

Tabel 4.3 Verbindings geïdentifiseer in die generasieklierafskeiding van die ouvolk,  
*Cordylus giganteus*.

Komponent nommer	Verbinding	EI-massa-spektrum	Identifikasie
33.27	Nonanoësuur	Fig. 4.3	a,b
40.30	Dekanoësuur	Fig. 4.4	a,b
53.72	Dodekanoësuur	Fig. 4.5	a,b
59.23	Tridekanoësuur	Fig. 4.6	a,b
65.87	Tetradekanoësuur	Fig. 2.5	a,b
70.58	Pentadekanoësuur	Fig. 2.6	a,b
78.19	Heksadekanoësuur	Fig. 2.7	a,b
81.12	Heptadekanoësuur	Fig. 2.8	a,b
86.35	Oktadekanoësuur	Fig. 2.9	a,b
89.35	Nonadekanoësuur	Fig. 2.10	b,c
94.64	Ikosanoësuur	Fig. 2.11	a,b
98.73	Henikosanoësuur	Fig. 2.12	a,b
103.04	Dokosanoësuur	Fig. 2.13	a,b
75.26	9Z-Heksadekanoësuur	Fig. 2.17	a,b
84.65	9Z-Oktadekanoësuur	Fig. 2.16	a,b
46.89	Dodekanol	Fig. 2.24	a,b
60.40	Tetradekanol	Fig. 4.7	a,b
66.12	Pentadekanol	Fig. 4.8	a,b
70.93	Heksadekanol	Fig. 2.25	a,b
54.39	2-Tetradekanoon	Fig. 4.9	b,c
60.96	2-Pentadekanoon	Fig. 4.10	a,b
71.61	2-Heptadekanoon	Fig. 2.26	a,b
20.05	Nonanaal	Fig. 4.11	a,b
28.07	Dekanaal	Fig. 4.12	a,b
55.08	Tetradekanaal	Fig. 4.13	a,b
61.78	Pentadekanaal	Fig. 4.14	b,c
67.99	Heksadekanaal	Fig. 4.15	a,b
70.67	2-Heptadekanaal	Fig. 2.32	b,c,e
72.95	Metielheksadekanoaat	Fig. 4.16	a,b
81.38	Heksadekaan-4-olied	Fig. 4.17	a,b
71.37	Heksadekaannitriël	Fig. 4.18	a,b
81.81	Oktadekaannitriël	Fig. 4.19	a,b
81.17	Pentadekaanamied	Fig. 4.20	a,b
84.82	9Z-Heksadekaanamied	Fig. 4.21	a,b

Tabel 4.3 (vervolg)

Komponent nommer	Verbinding	EI-massa-spektrum	Identifikasie
86.40	Heksadekaanamied	Fig. 4.21	a,b
89.99	Heptadekaanamied	Fig. 4.22	b,c
95.03	Oktadekaanamied	Fig. 4.23	a,b
99.34	Nonadekaanamied	Fig. 4.24	b,c
103.68	Ikosaanamied	Fig. 4.25 a	a,b
41.63	1-Tetradkeen	Fig. 4.26	a,b
48.23	1-Pentadkeen	Fig. 4.27	a,b
72.95	Metielheksadekanoaat	Fig. 4.28	a,b
118.35	Dodekielheksadekanoaat	Fig. 4.29	a,b
117.61	Dodekiel-9Z -heksadekenoaat	Fig. 4.30	b,c
112.91	Skwaleen	Fig. 2.36	b,c
121.20	5 $\beta$ -Cholestan-3 $\alpha$ -ol	Fig. 4.31 a	b,d
122.55	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	Fig. 4.32 a	b,d
122.91	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	Fig. 4.33 a	b,d
123.51	3-Etoksicholestaan	Fig. 4.34	b
123.75	Cholestan-2/3-oon	Fig. 4.35 a	b,d
124.38	5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 4.36 a	b,d
125.32	5 $\beta$ -Ergostanol	Fig. 4.37 a	b,d
129.52	5 $\beta$ -Stigmastanol	Fig. 4.38	b
126.97	Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.40 a	b
132.18	Lanosterol	Fig. 2.44 a	b
127.64	Cholest-4-en-3-oon	Fig. 2.41	b
87.82	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 4.39 a	
77.93	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 4.40	
82.82	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 4.41	
92.59	Ongeïdentifiseerde verbinding	Fig. 4.42 a	

a: Retensietyd; b: Republiseerde data; c: Afgelei uit relatiewe retensietye;

d: Geïdentifiseer met behulp van MO-/TMS-derivaat; e: E/Z-Isomerie onseker

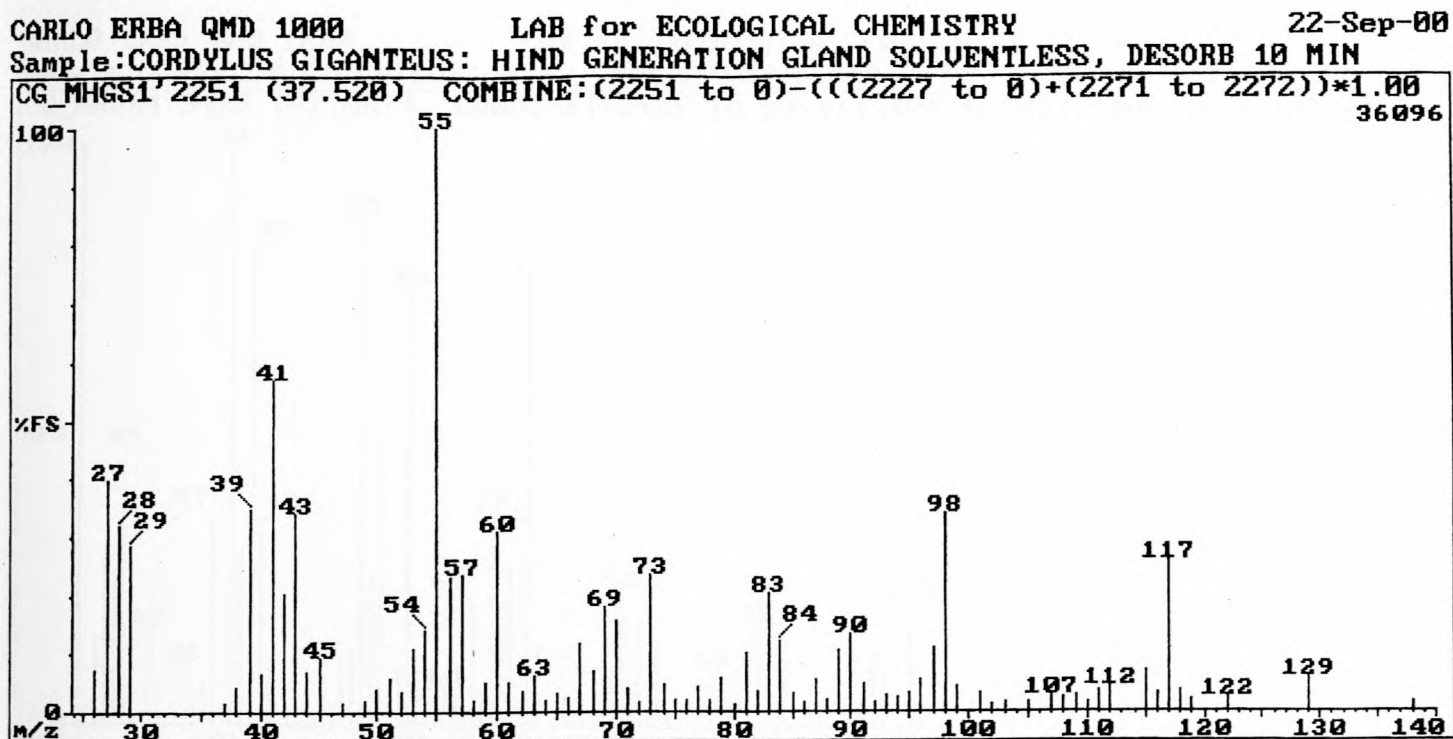


Fig. 4.3: EI-massaspektrum van Komponent 33.27 - nonanoësuur

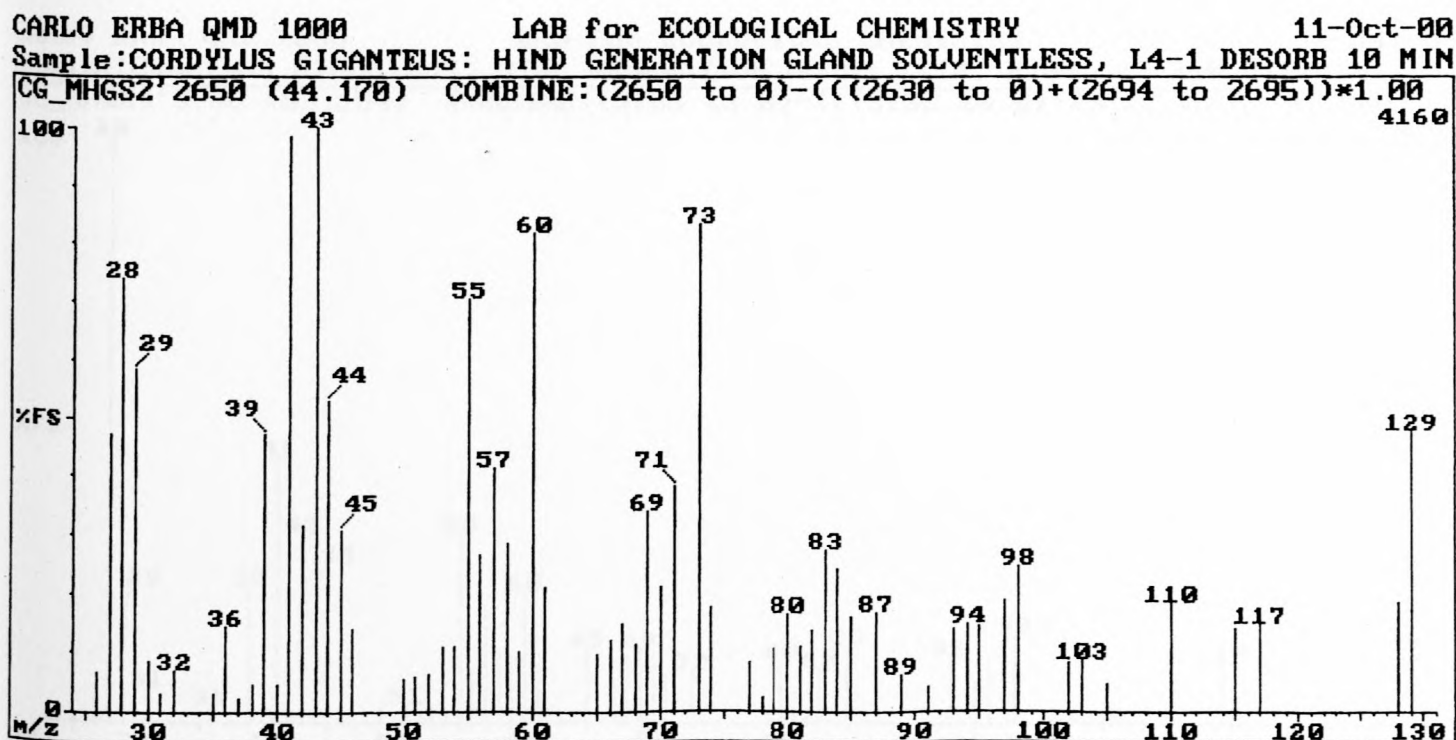


Fig. 4.4: EI-massaspektrum van Komponent 40.30 - dekanoësuur

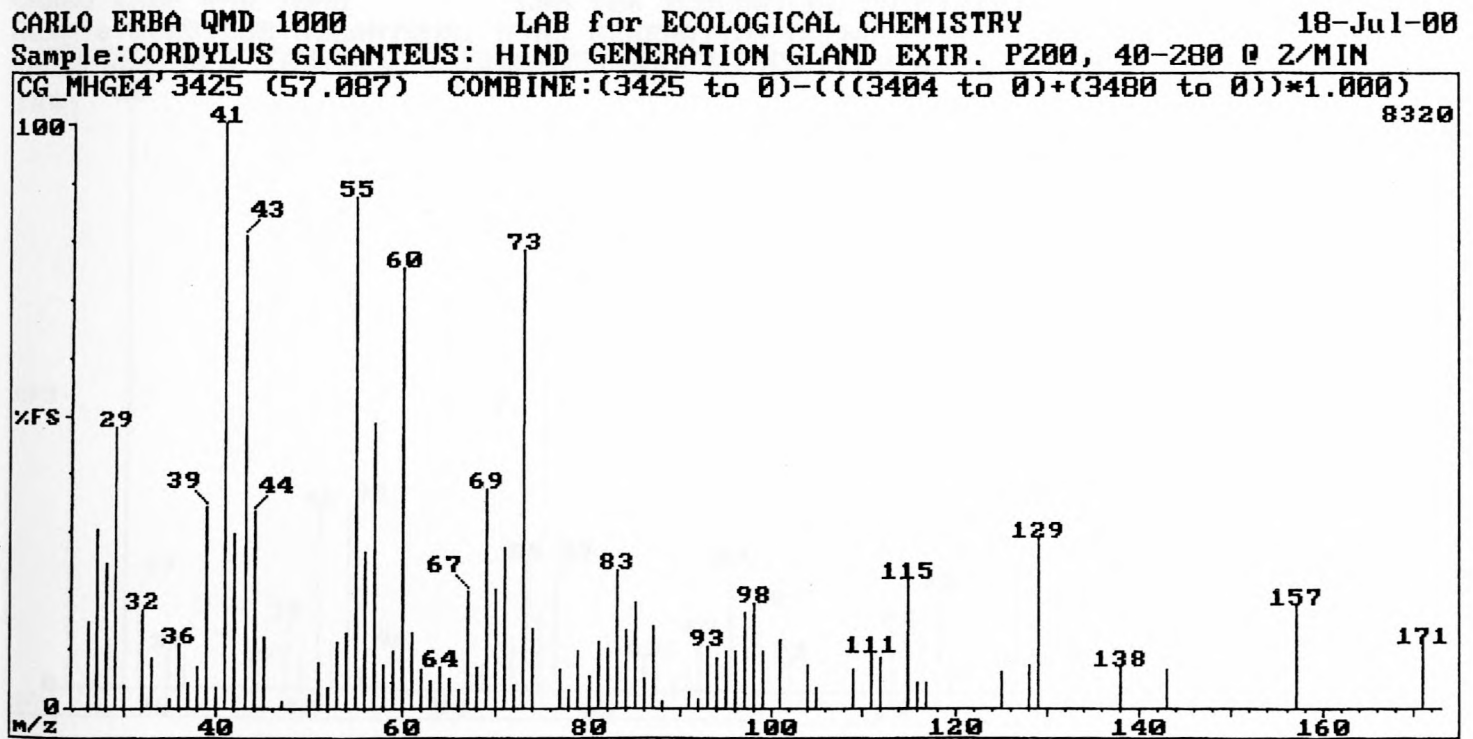


Fig. 4.5: EI-masspektrum van Komponent 53.72 - dodekanoësuur

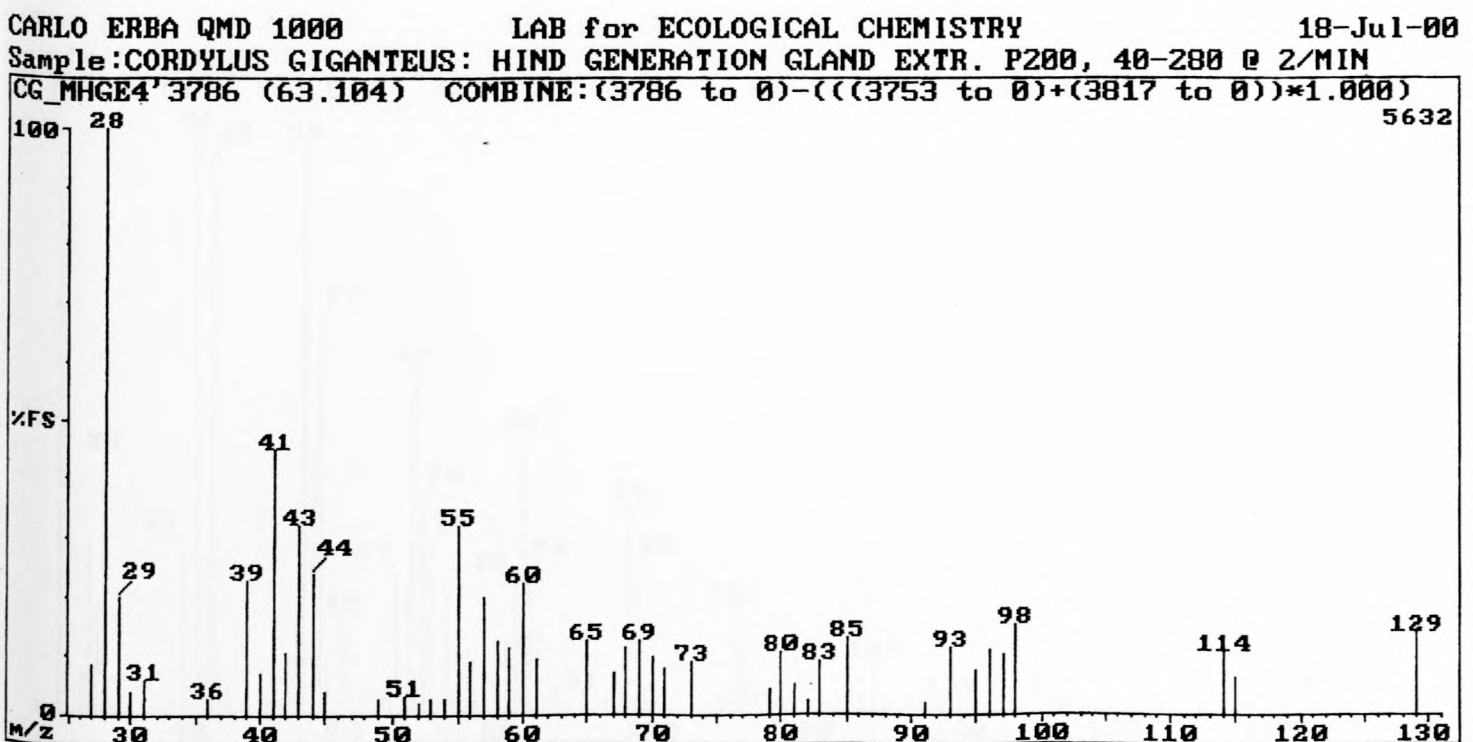


Fig. 4.6: EI-masspektrum van Komponent 59.23 - tridekanoësuur



CARLO ERBA QM1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 18-Jul-00  
 Sample: CORDYLUS GIGANTEUS: HIND GENERATION GLAND EXTR. P200, 40-280 @ 2/MIN

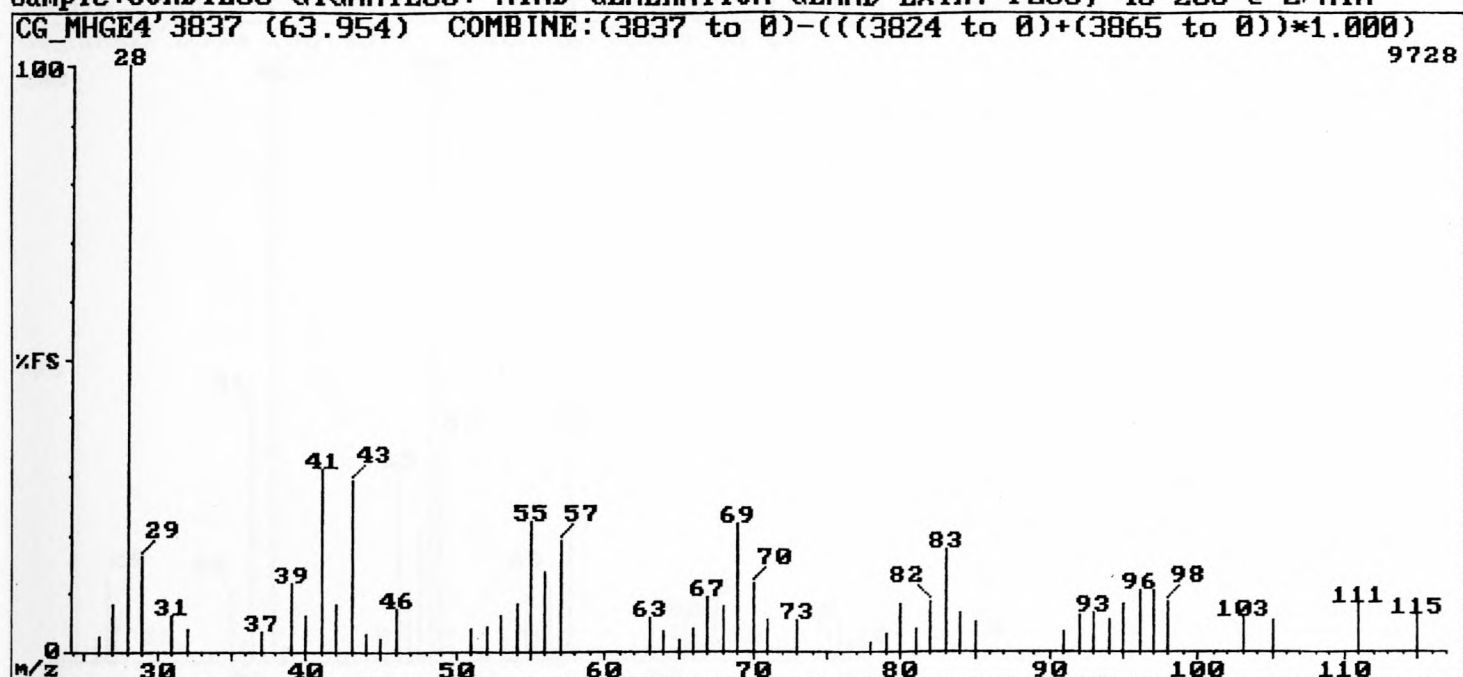


Fig. 4.7: EI-massaspektrum van Komponent 60.40 - tetradekanol

CARLO ERBA QM1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 18-Jul-00  
 Sample: CORDYLUS GIGANTEUS: HIND GENERATION GLAND EXTR. P200, 40-280 @ 2/MIN

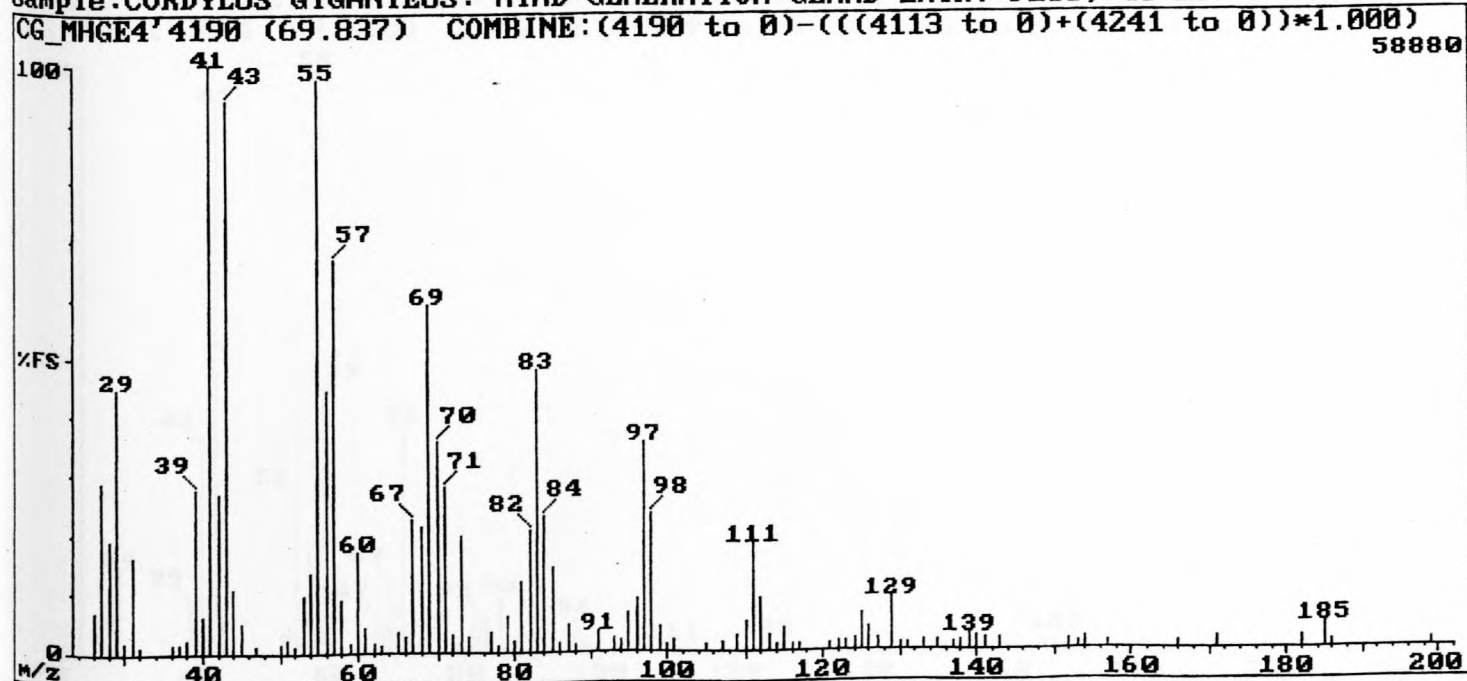


Fig. 4.8: EI-massaspektrum van Komponent 66.12 - pentadekanol

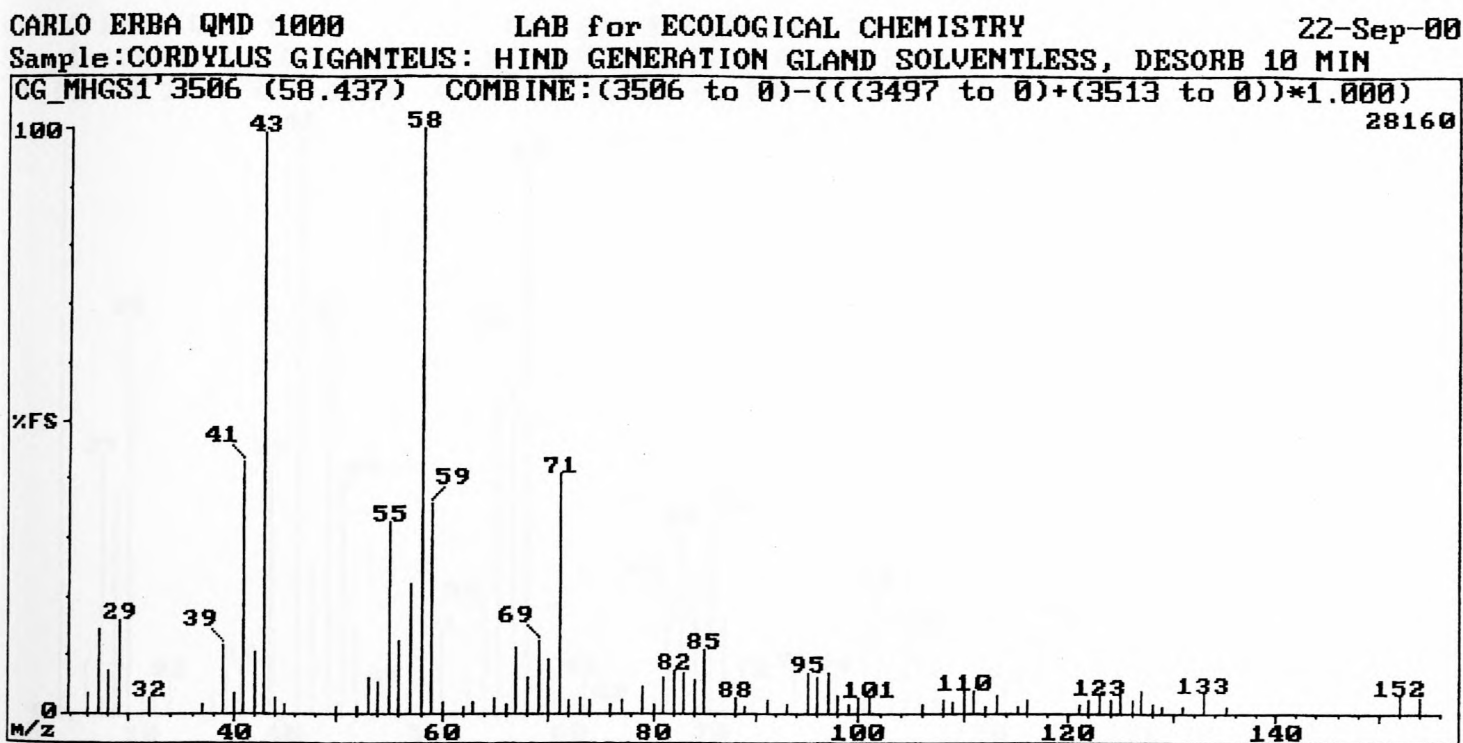


Fig. 4.9: EI-masspektrum van Komponent 54.39 - 2-tetradekanoon

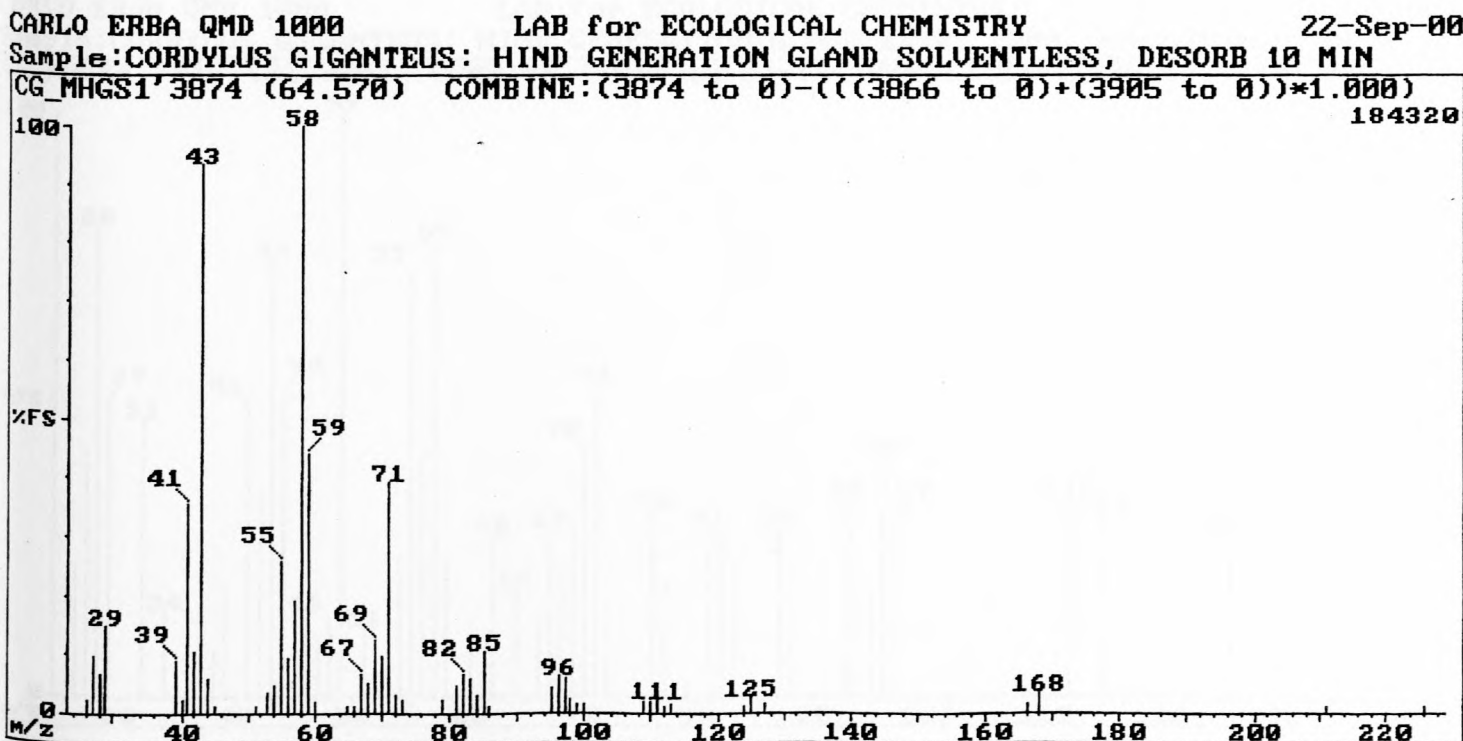


Fig. 4.10: EI-masspektrum van Komponent 60.96 - 2-pentadekanoon

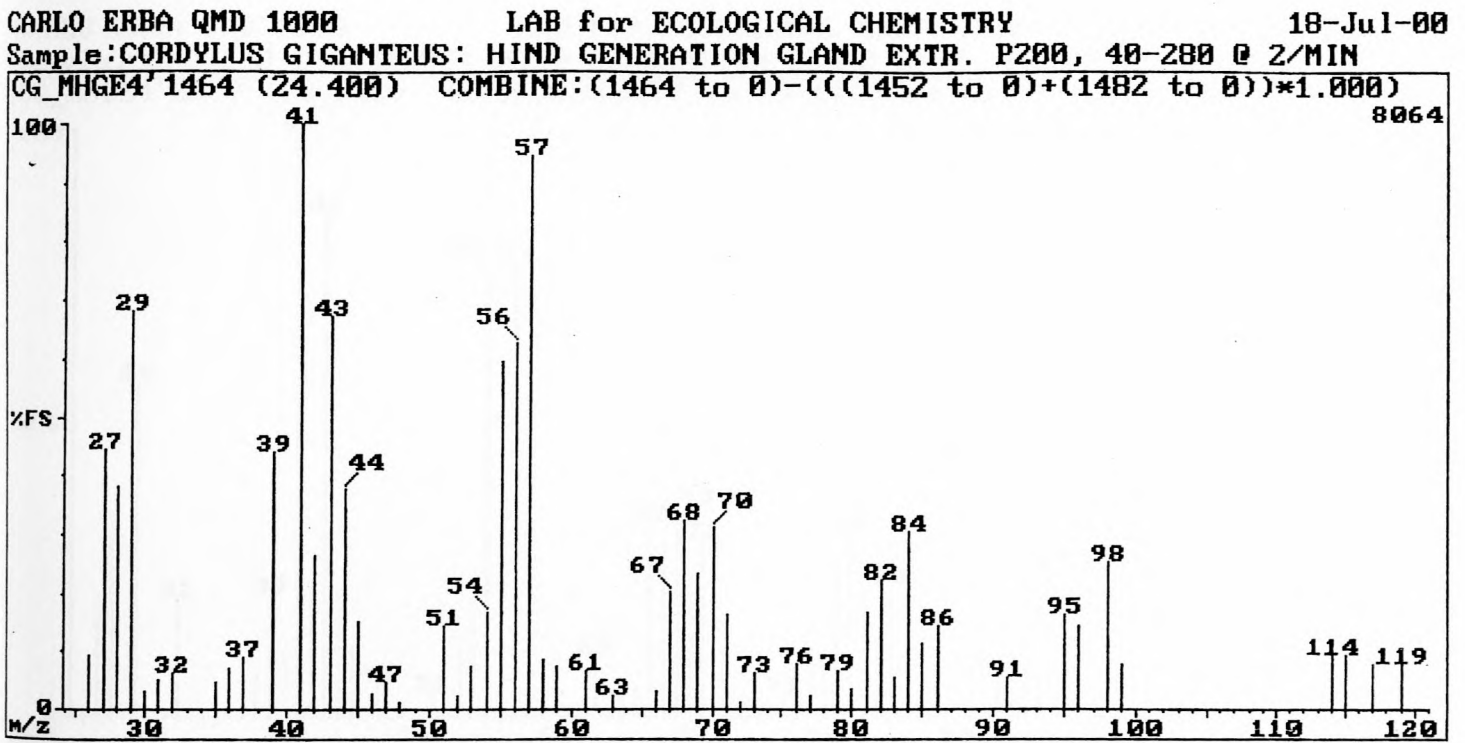


Fig. 4.11: EI-massaspektrum van Komponent 20.05 - nonanaal

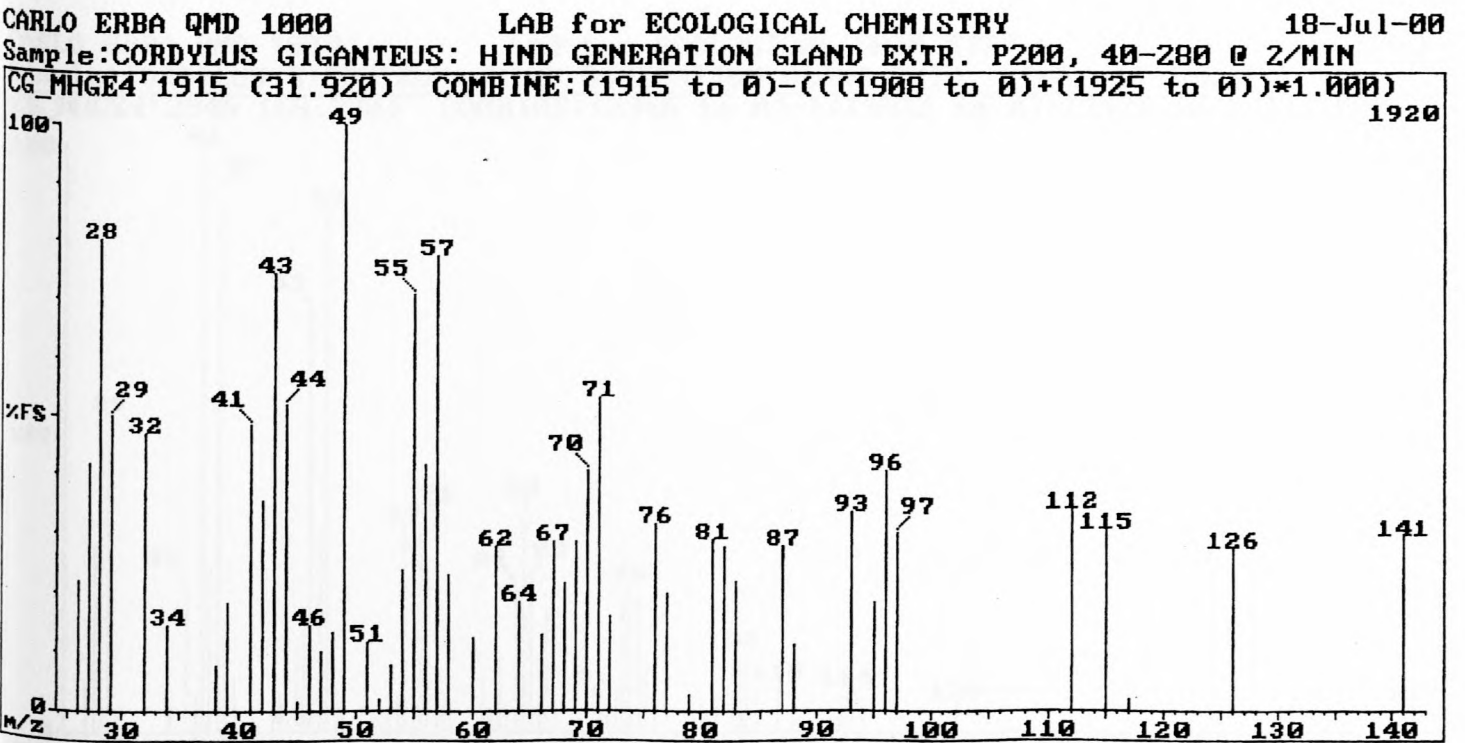


Fig. 4.12: EI-massaspektrum van Komponent 28.07 - dekanaal

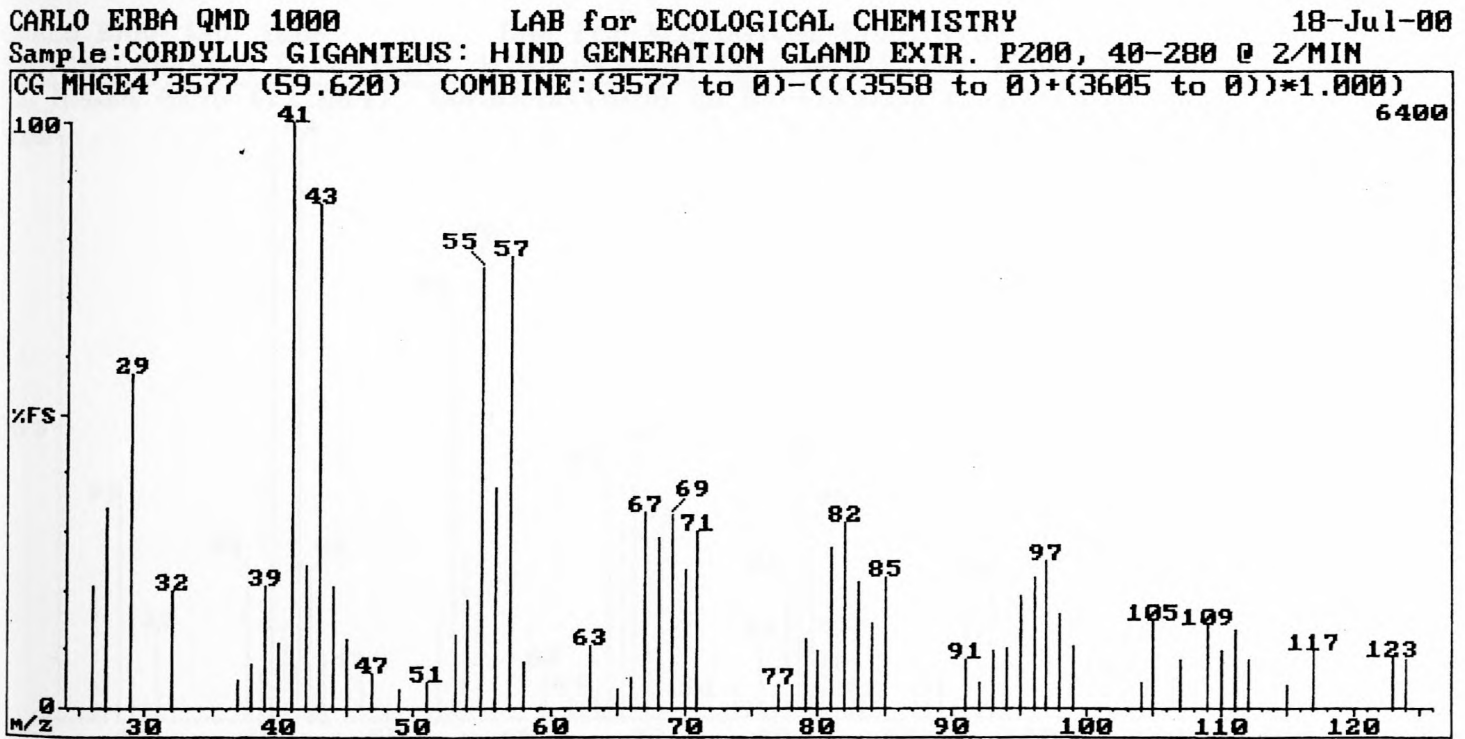


Fig. 4.13: EI-massaspektrum van Komponent 55.08 - tetradekanaal

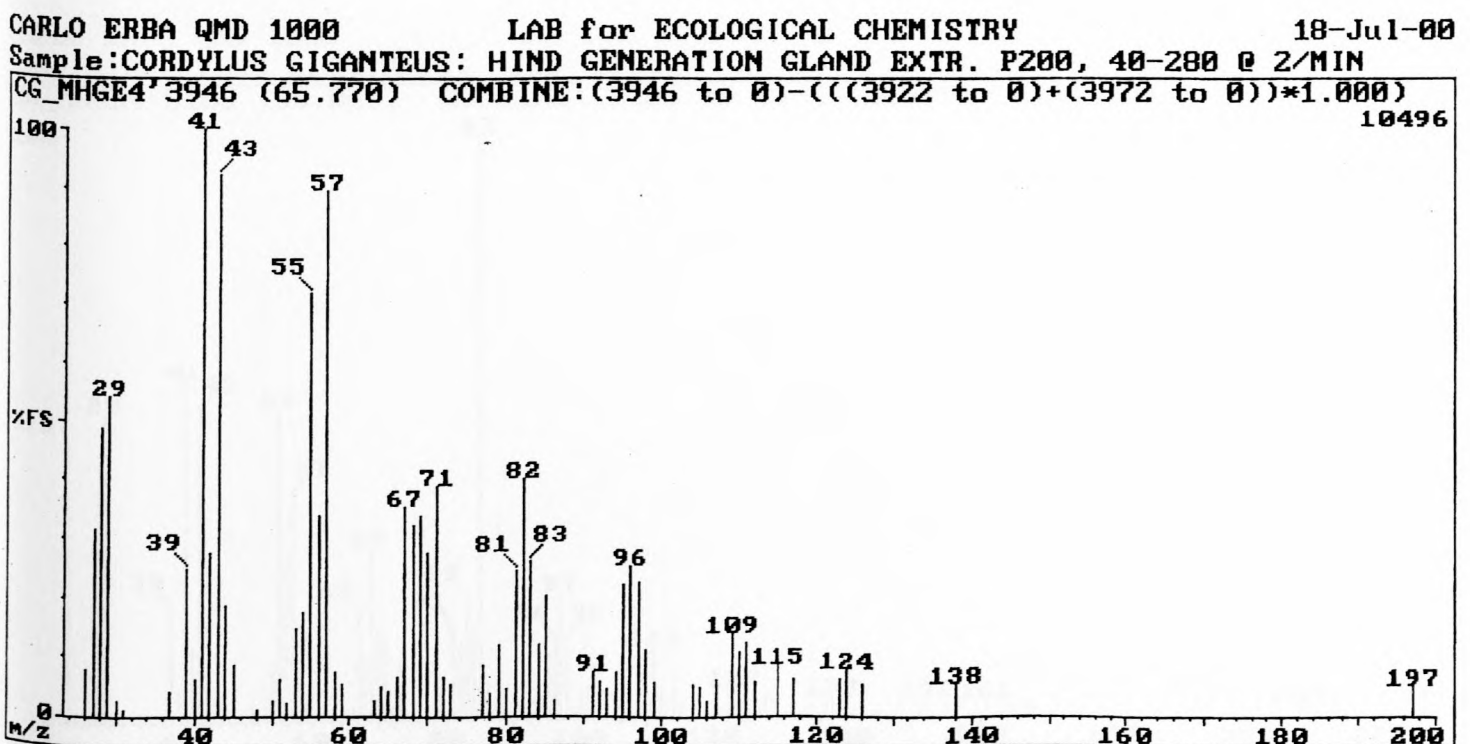


Fig. 4.14: EI-massaspektrum van Komponent 67.78 - pentadekanaal

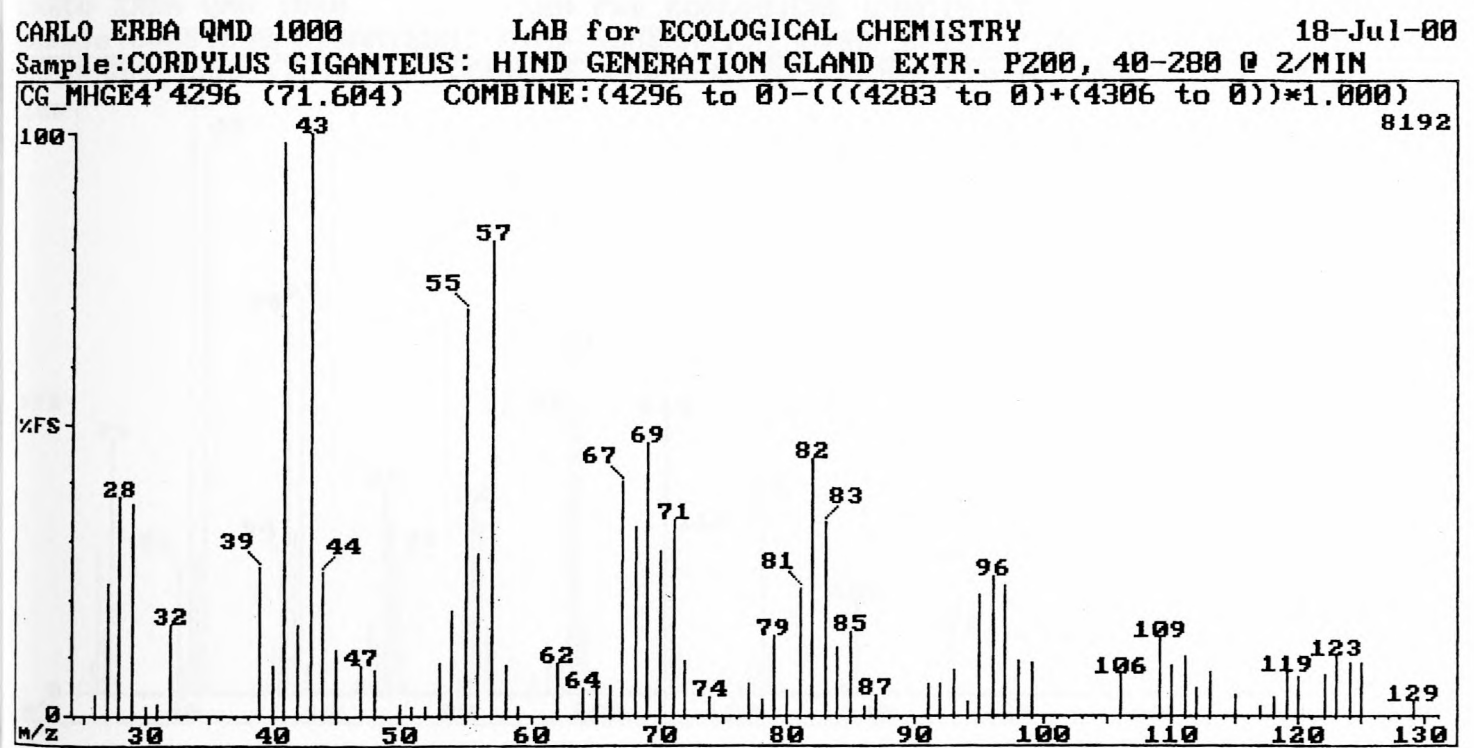


Fig. 4.15: EI-massaspektrum van Komponent 67.99 - heksadekanaal

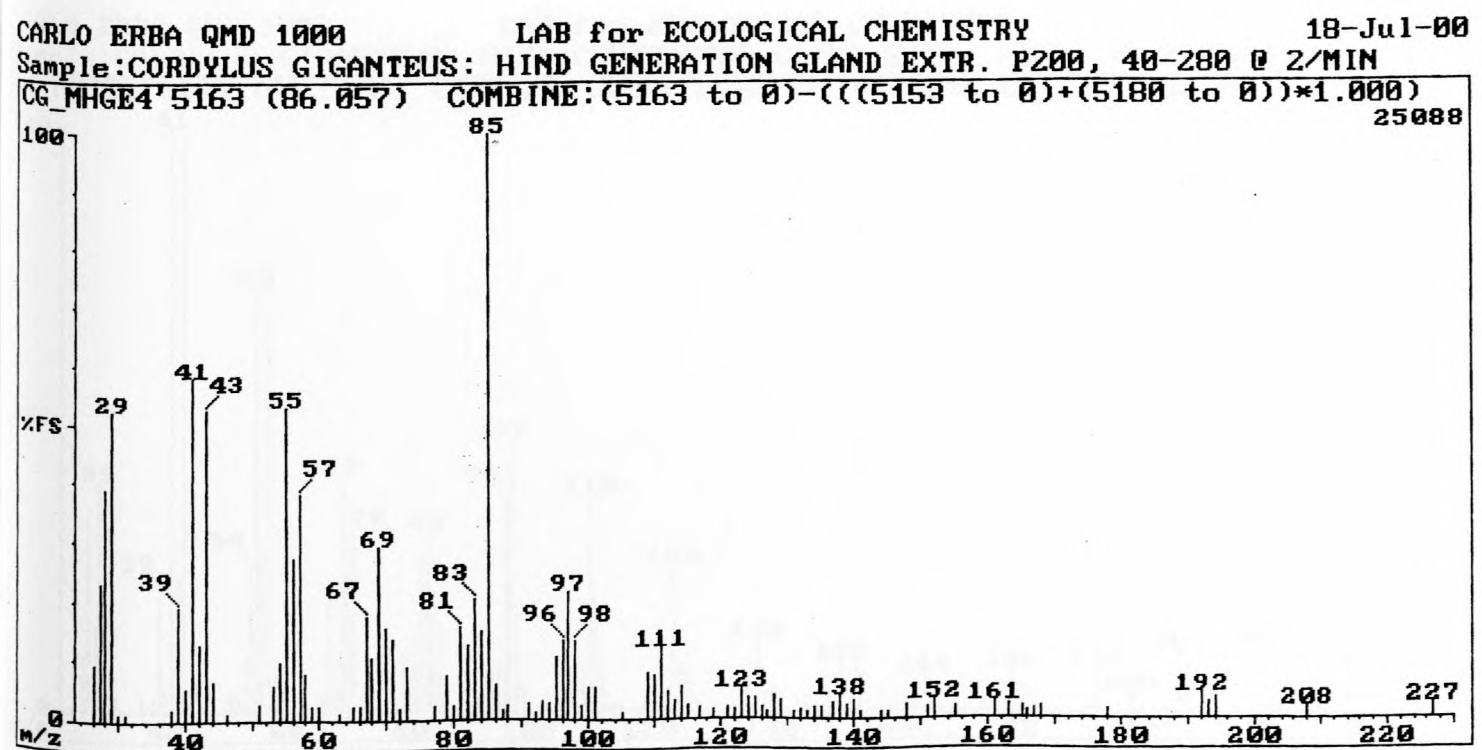


Fig. 4.16: EI-massaspektrum van Komponent 81.38 - heksadekaan-4-olied.

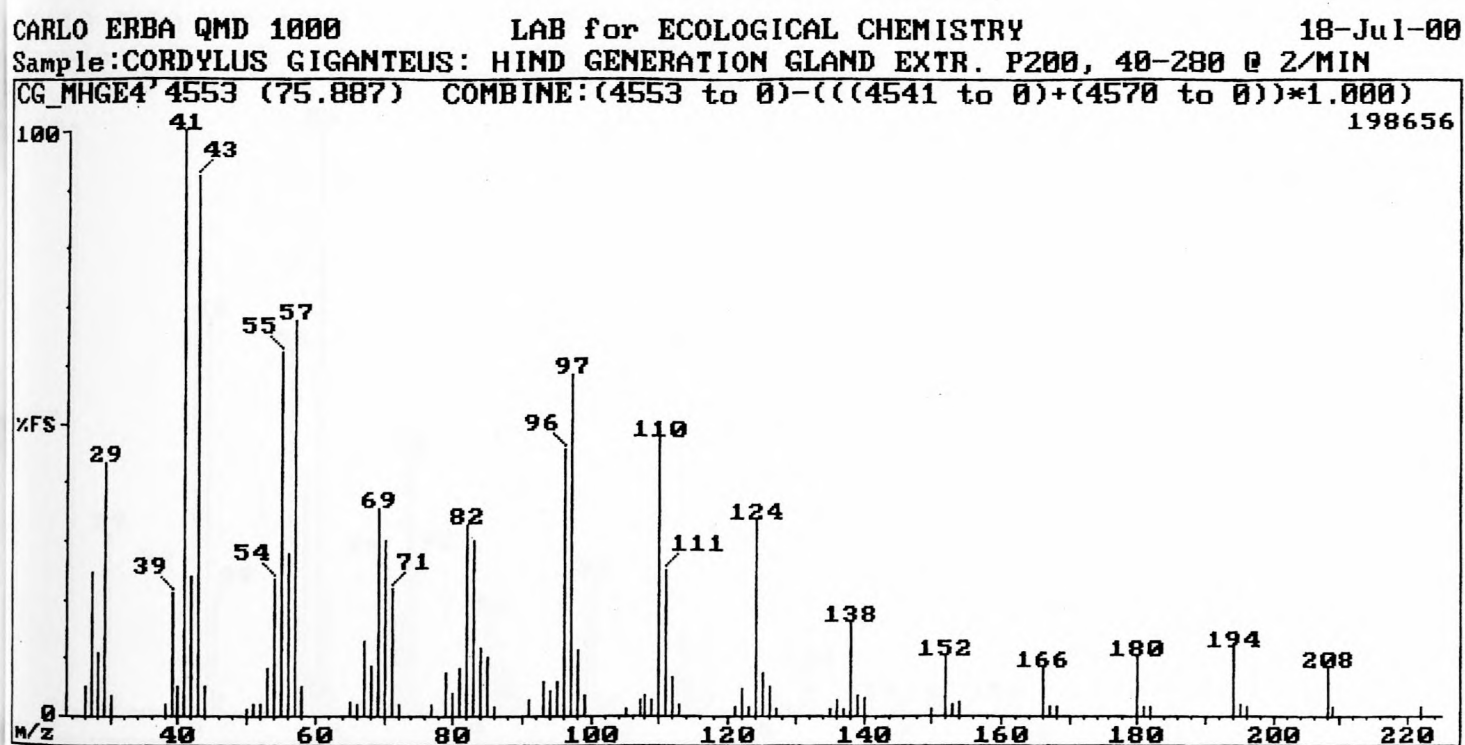


Fig. 4.17: EI-massaspektrum van Komponent 71.37 - heksadekaannitriël

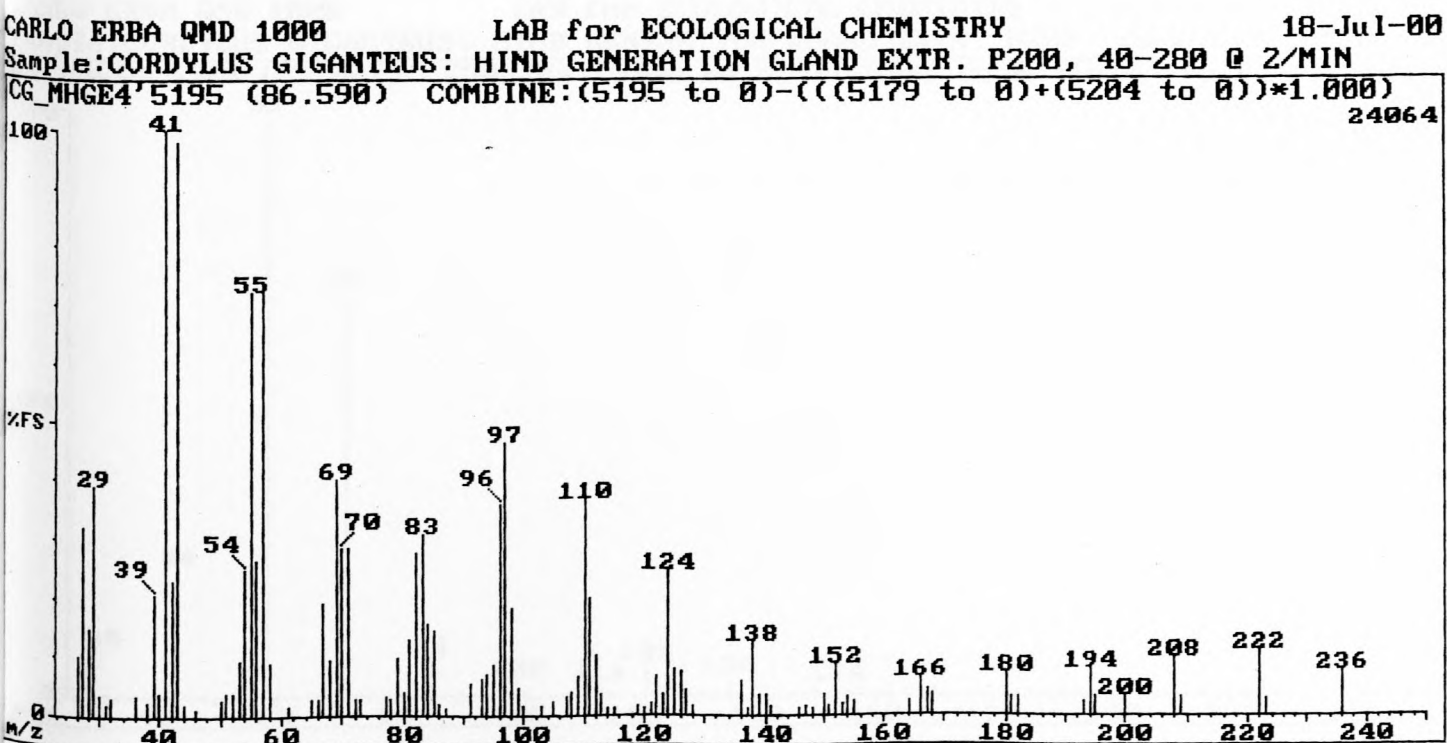


Fig. 4.18: EI-massaspektrum van Komponent 81.81 - oktadekaannitriël

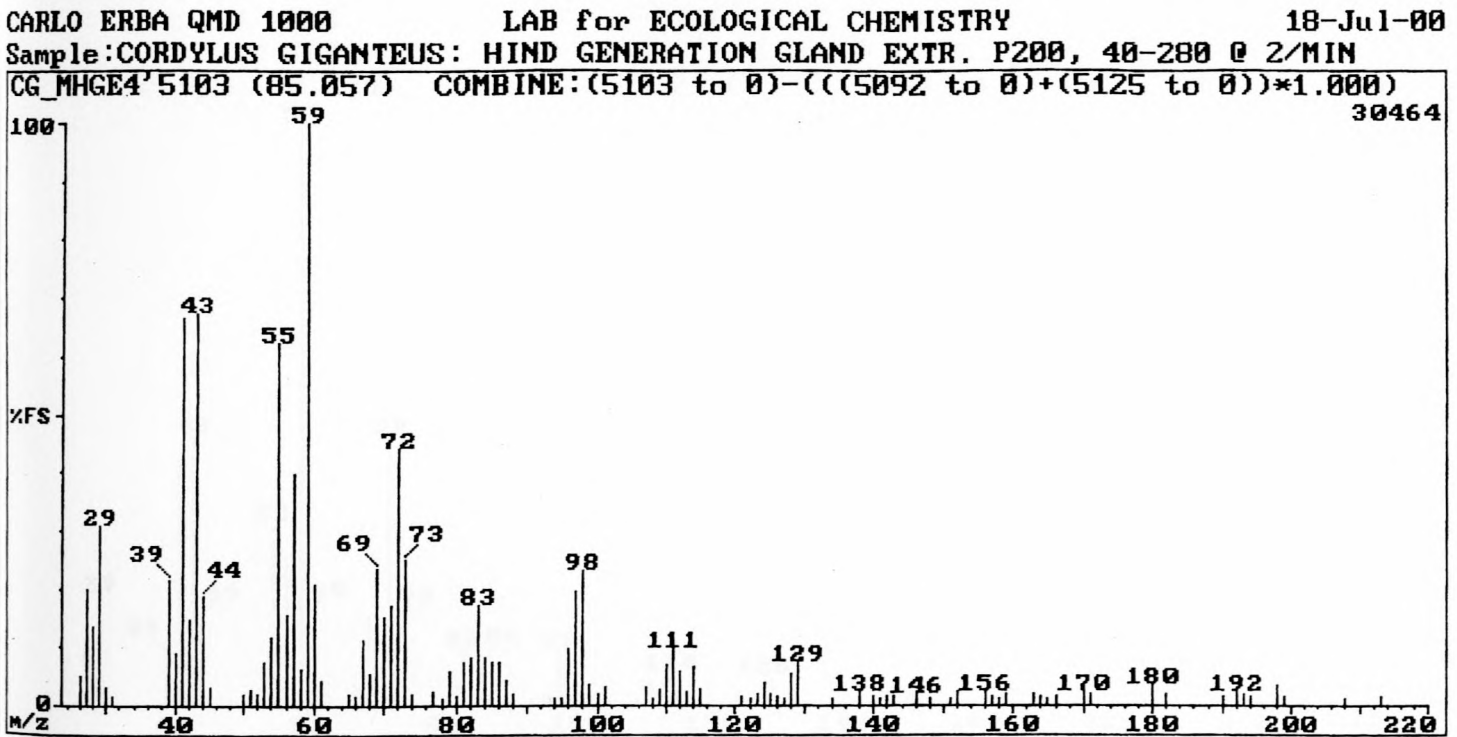


Fig. 4.19: EI-massaspektrum van Komponent 81.17 - pentadecaanamide

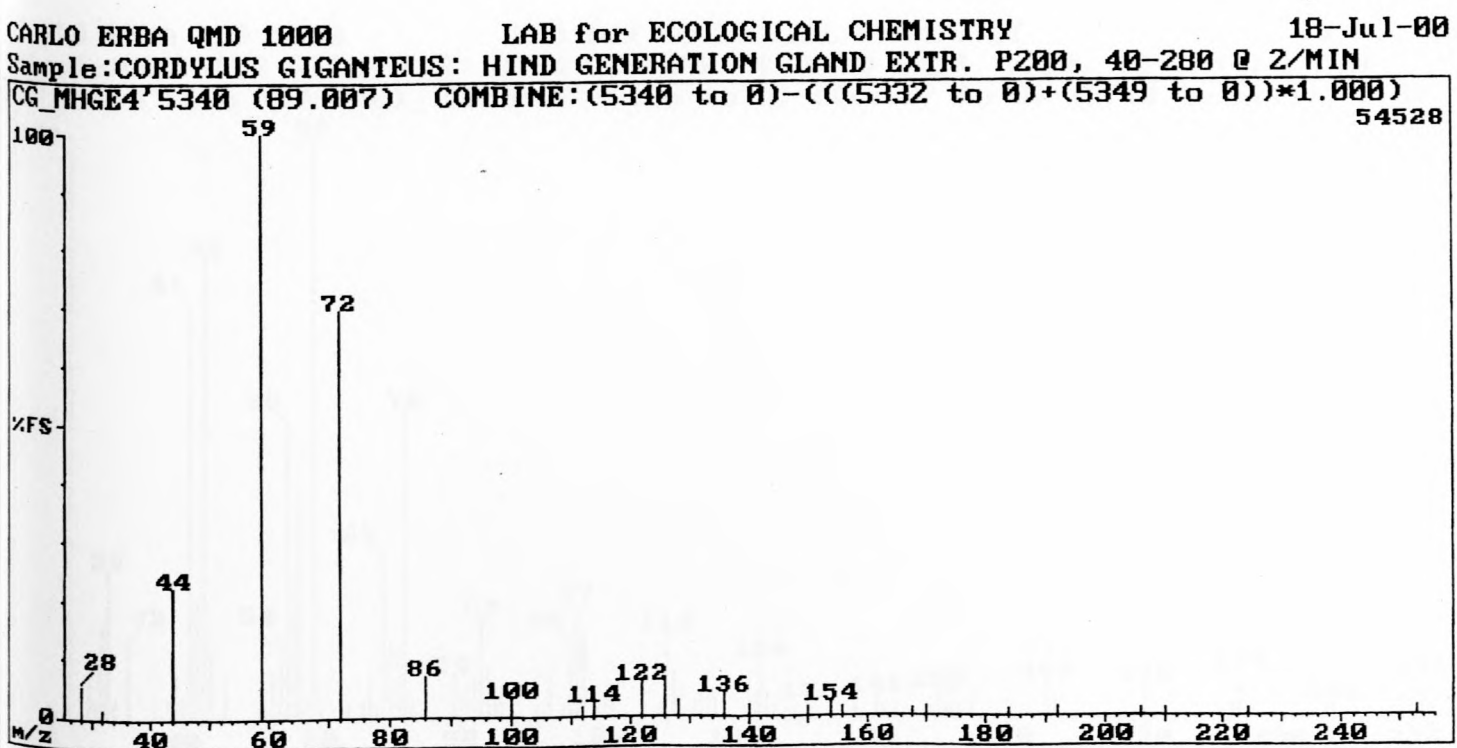


Fig. 4.20: EI-massaspektrum van Komponent 84.82 - 9Z-heksadekeenamide

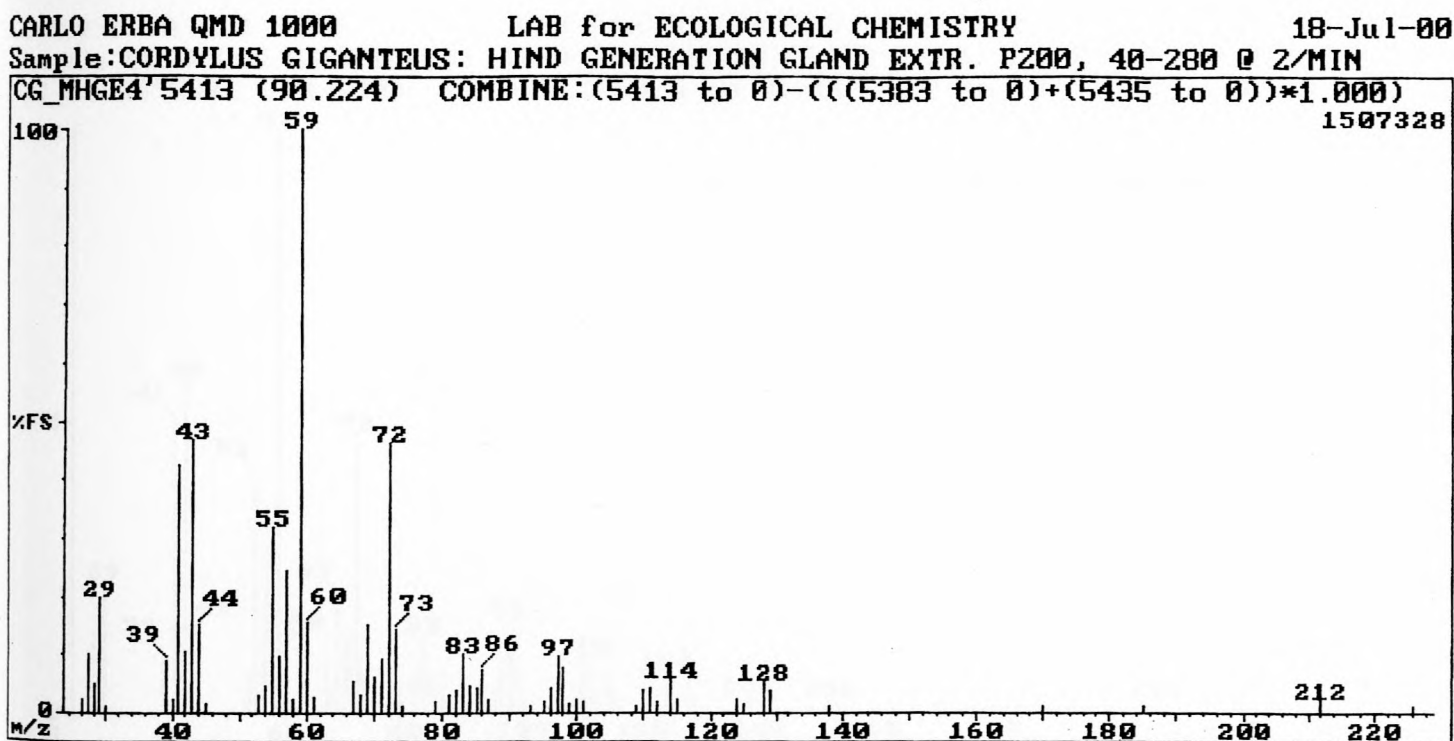


Fig. 4.21: EI-massaspektrum van Komponent 86.40 - heksadekaanamied

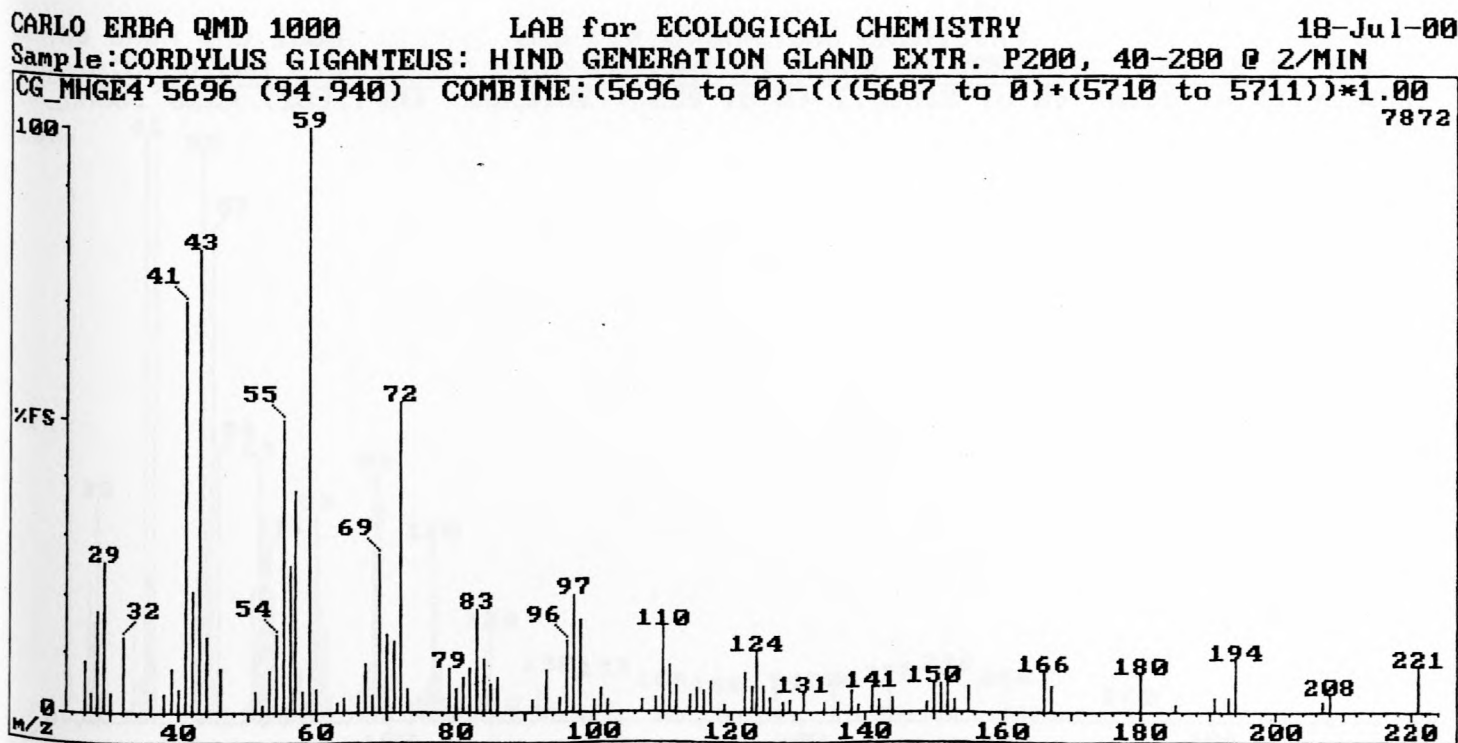


Fig. 4.22: EI-massaspektrum van Komponent 89.99 - heptadekaanamied



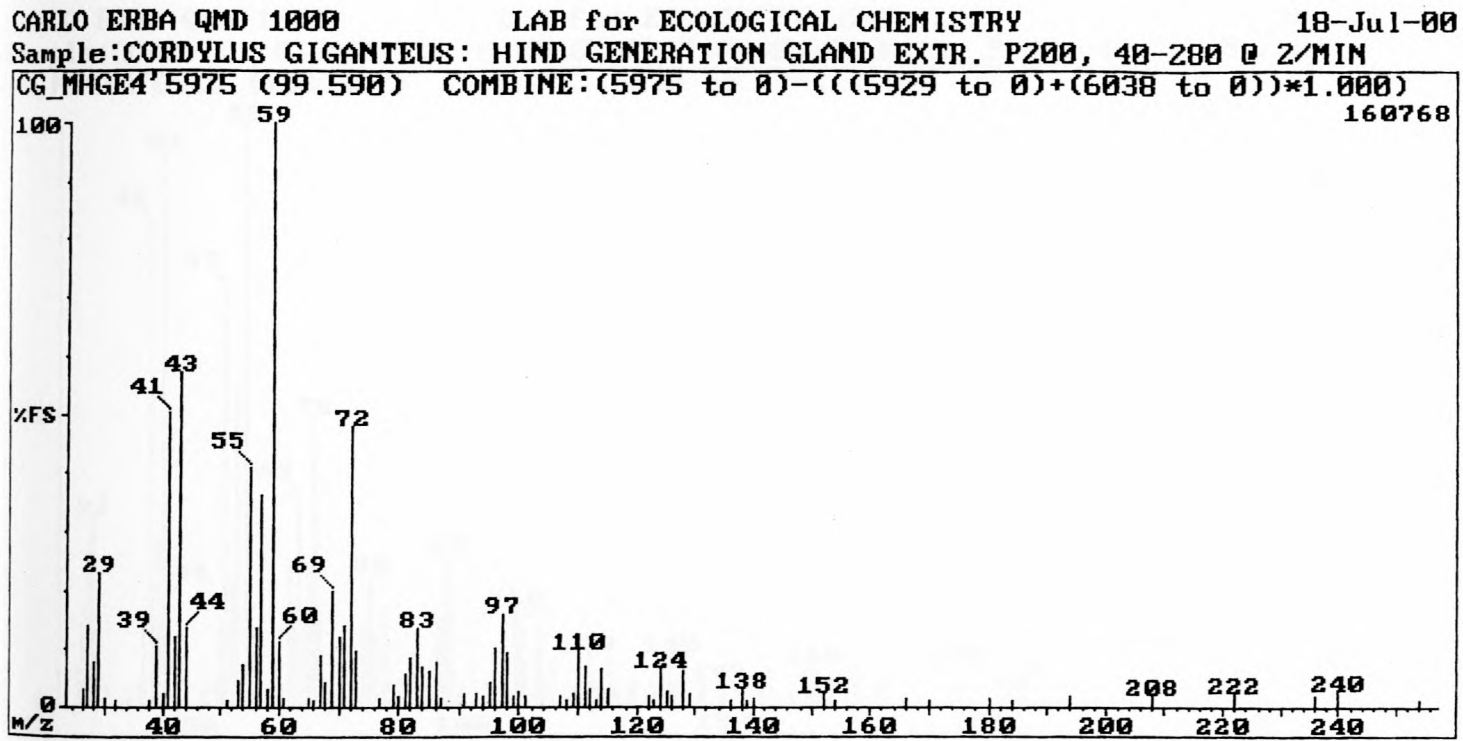


Fig. 4.23: EI-massaspektrum van Komponent 95.03 - oktadekaanamied

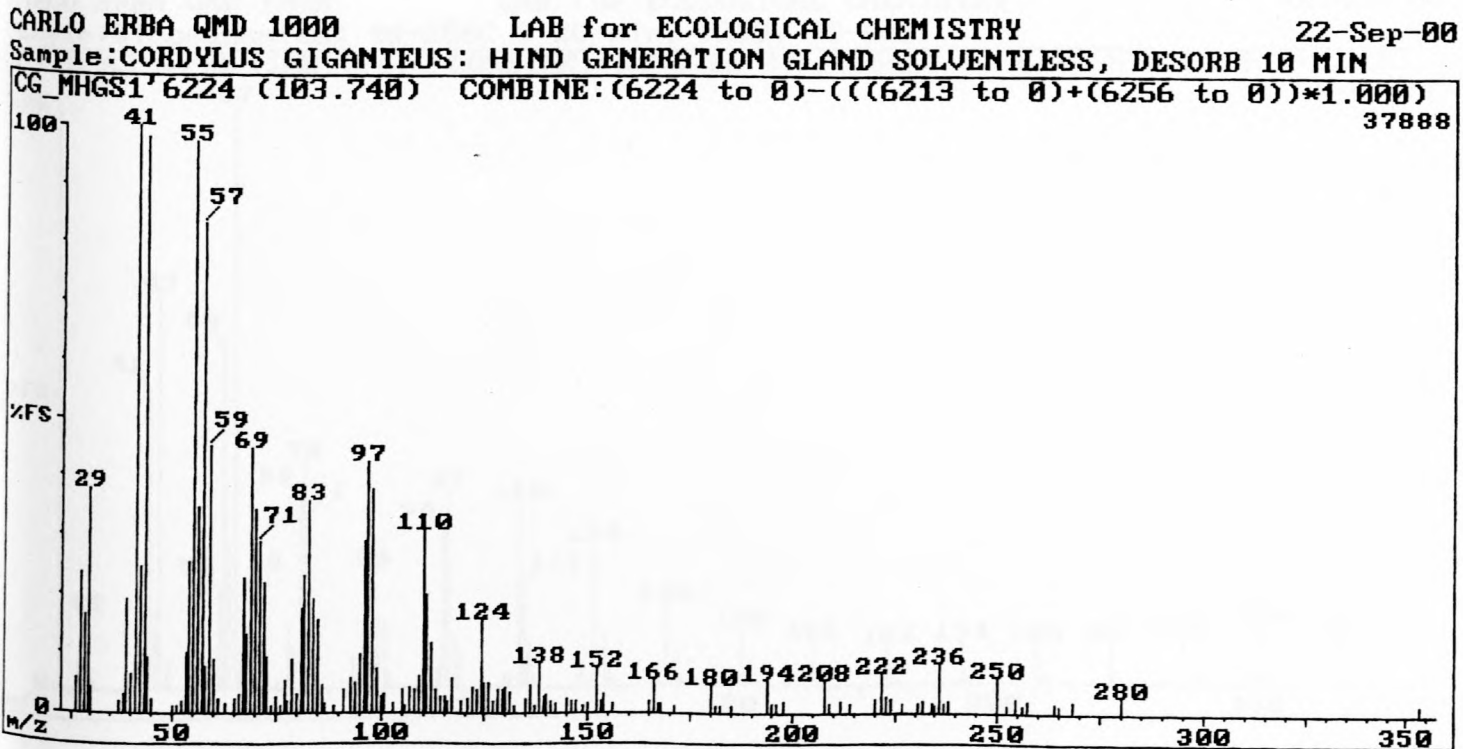


Fig. 4.24: EI-massaspektrum van Komponent 99.34 - nonadekaanamied

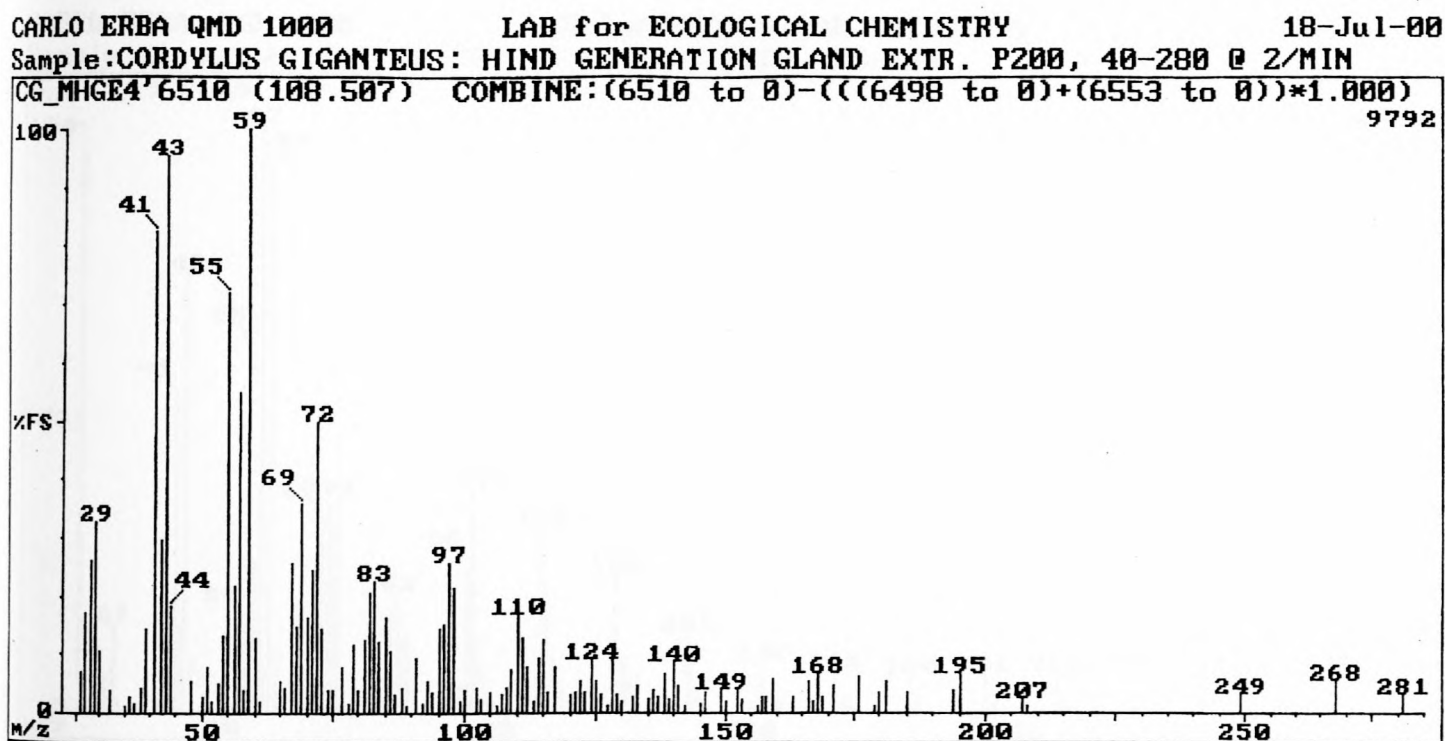


Fig. 4.25 a: EI-massaspektrum van Komponent 103.68 - ikosaanamiid

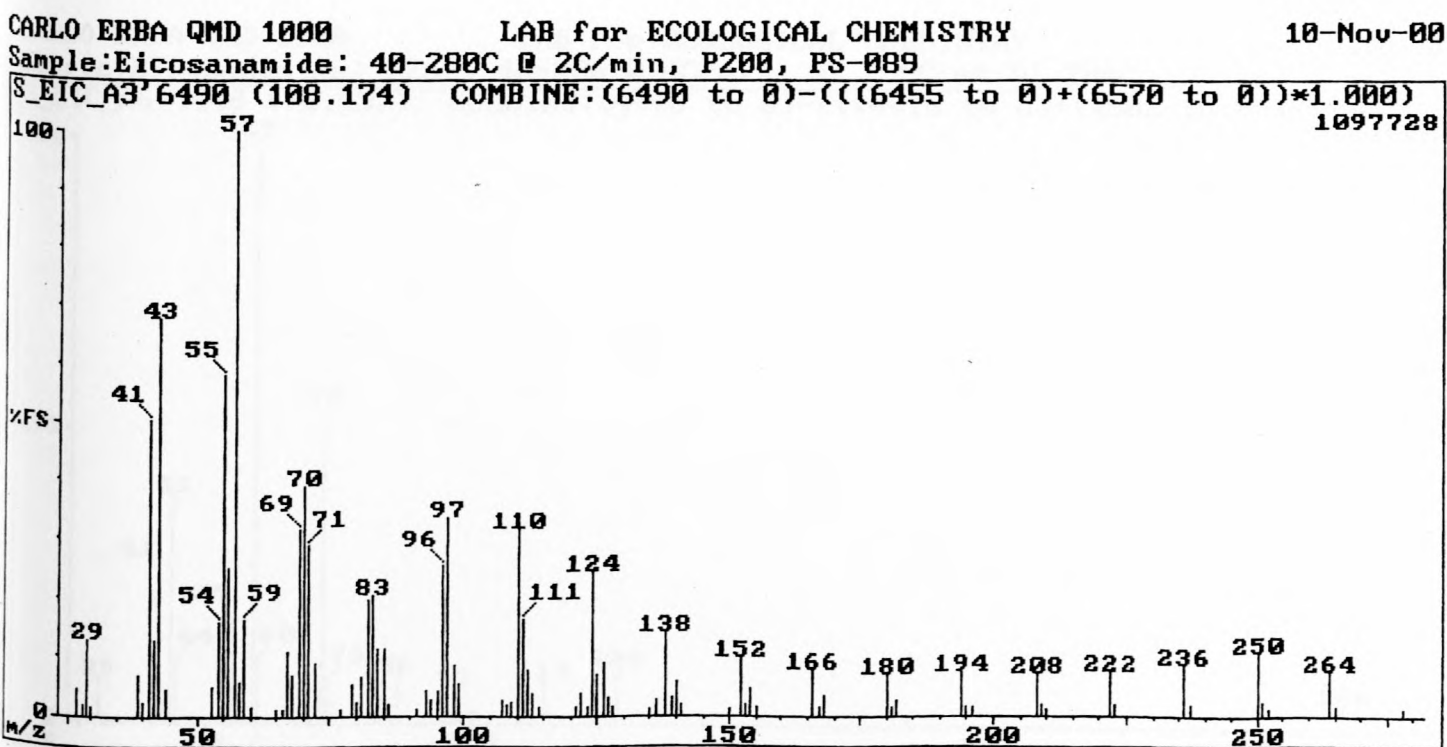


Fig. 4.25 b: EI-massaspektrum van sintetiese ikosaanamiid

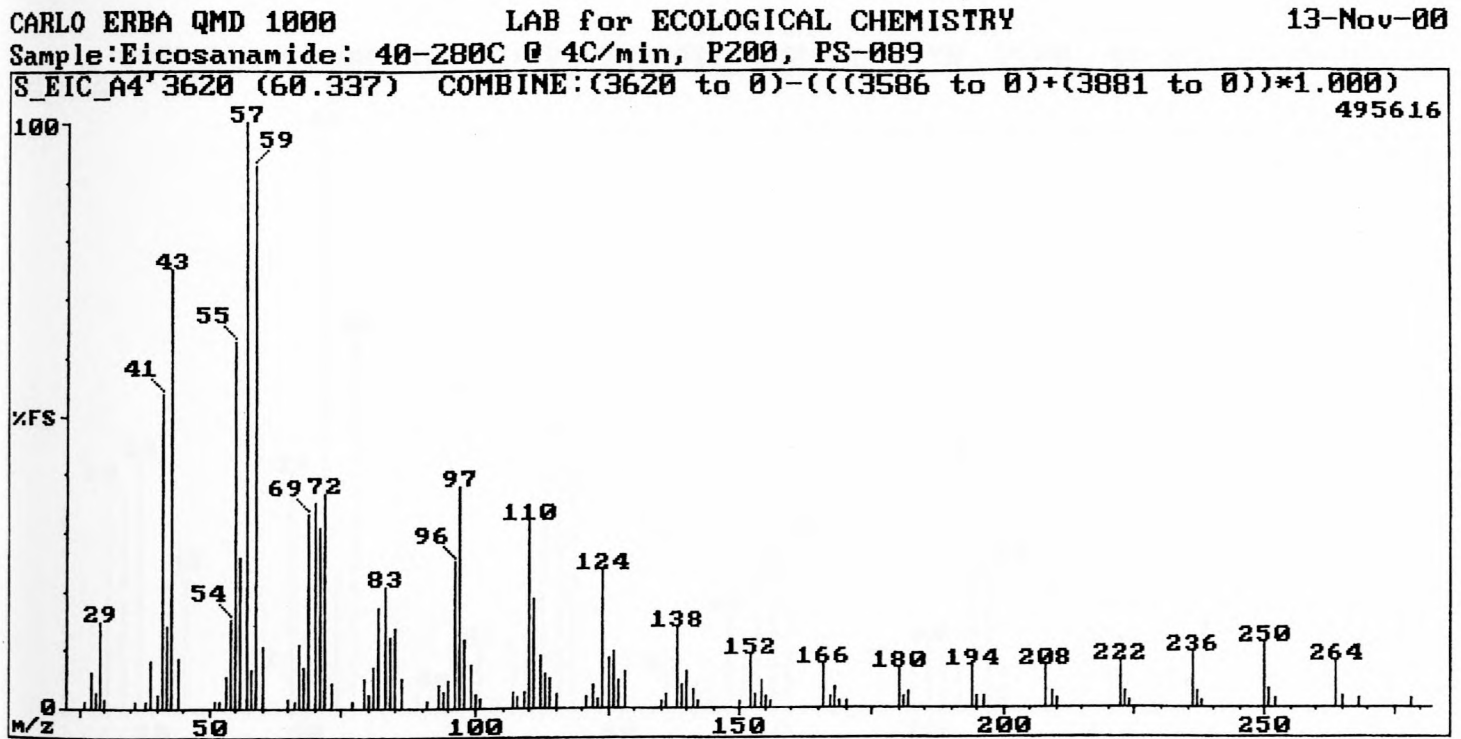


Fig. 4.25 c: EI-massaspektrum van sintetiese ikosaanamid

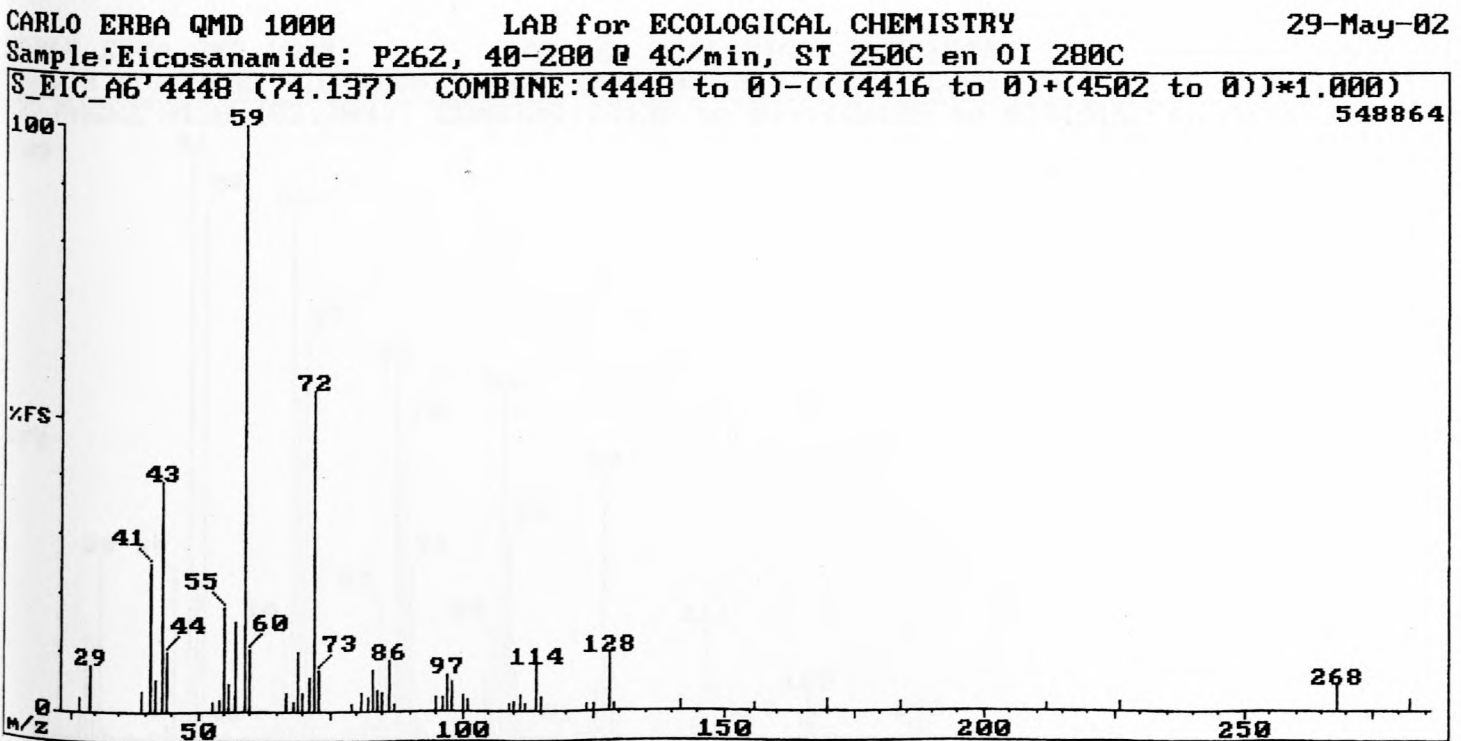


Fig. 4.25 d: EI-massaspektrum van sintetiese ikosaanamid

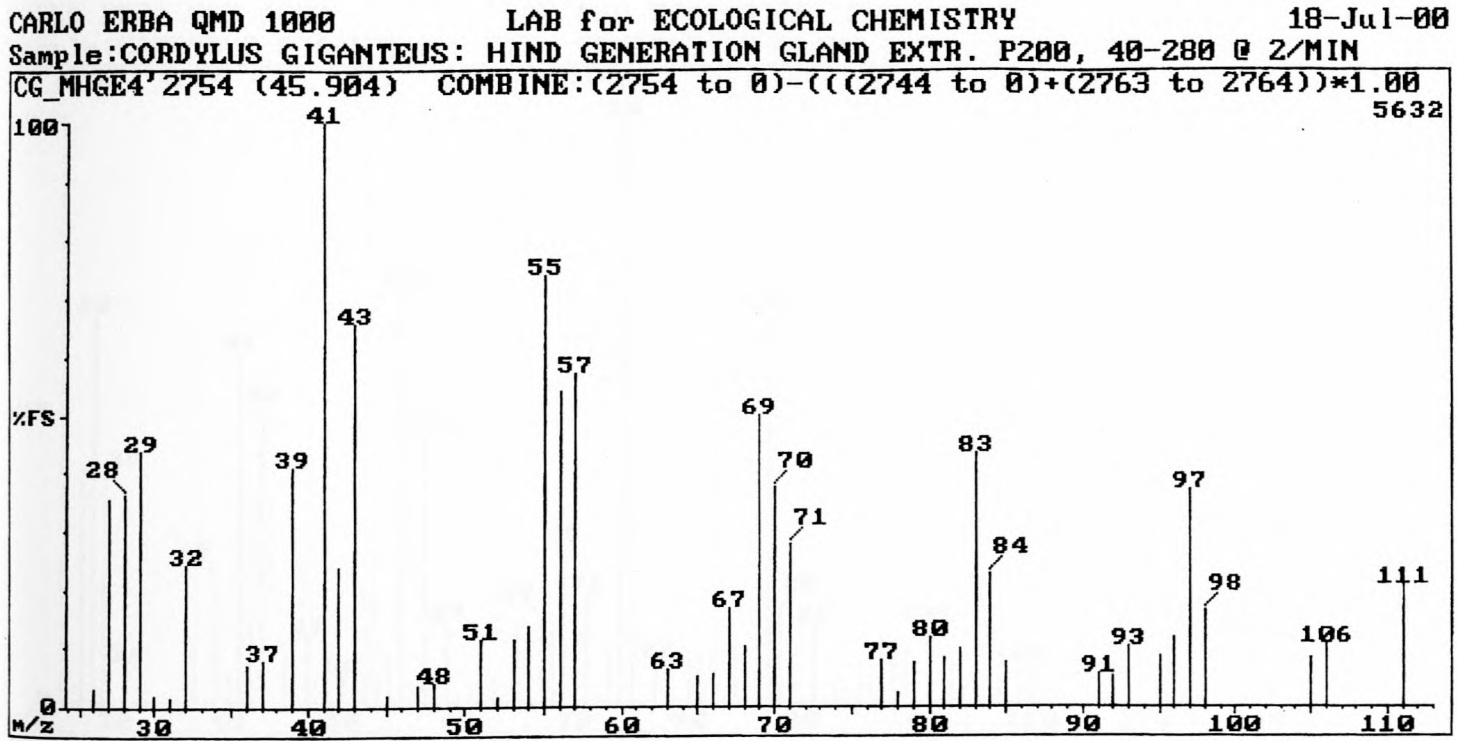


Fig. 4.26: EI-massaspektrum van Komponent 41.63 - 1-tetradeken

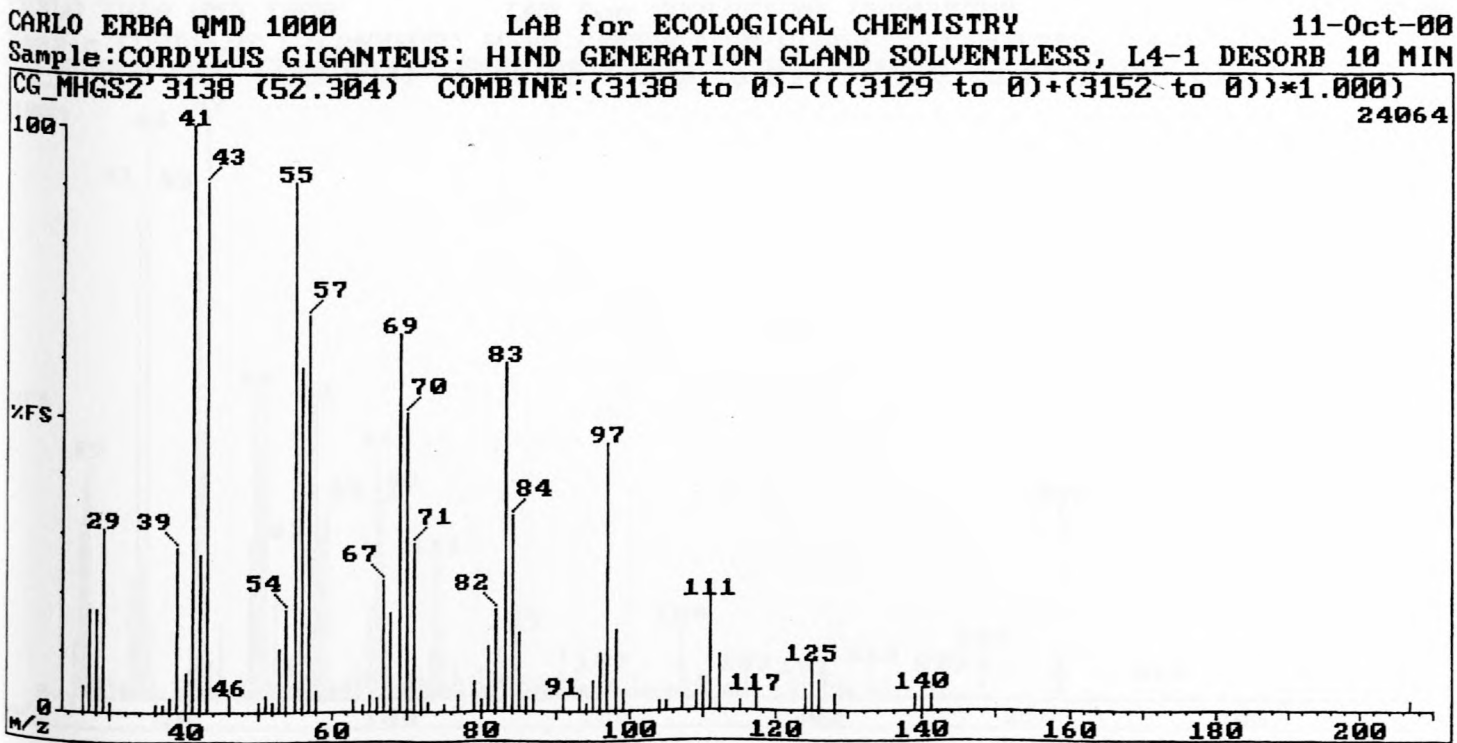


Fig. 4.27: EI-massaspektrum van Komponent 48.23 - 1-pentadekeen

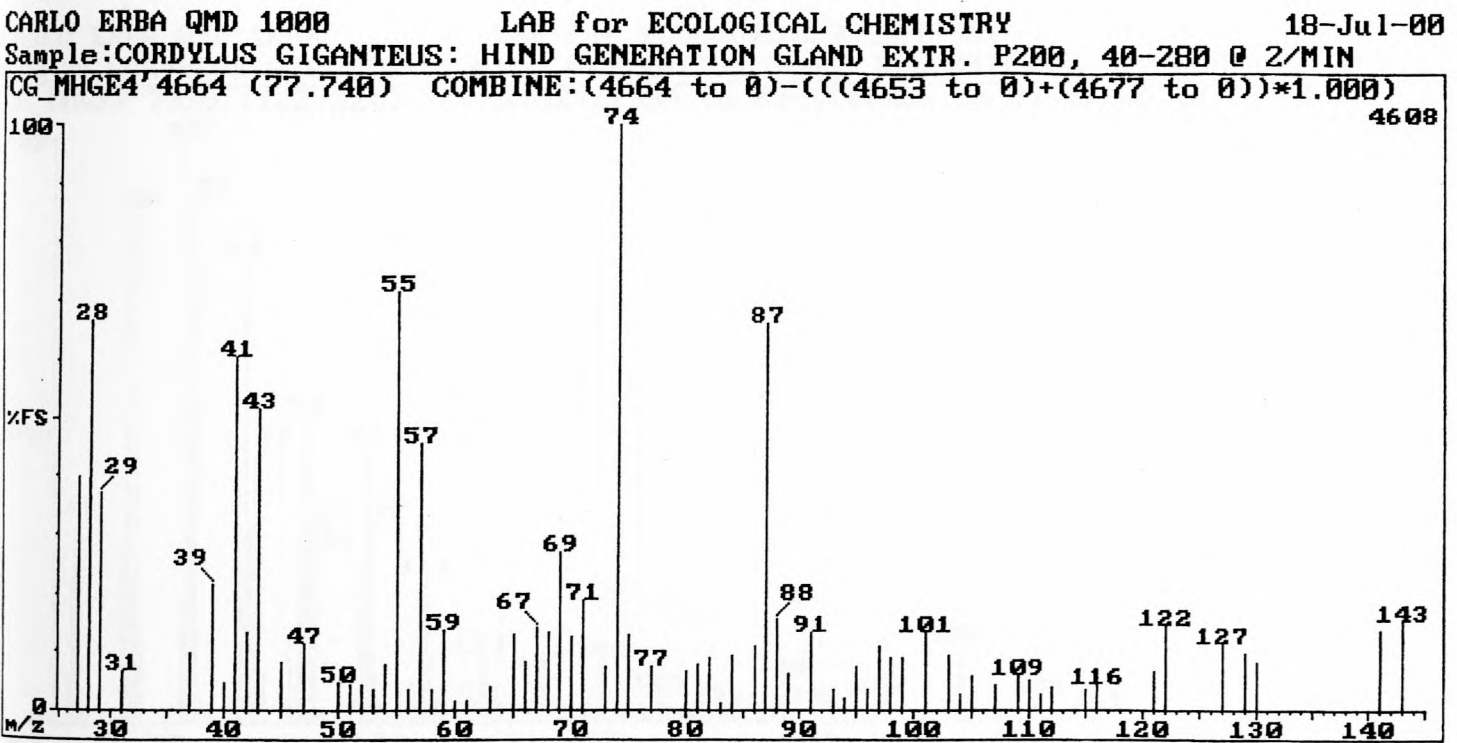


Fig. 4.28: EI-massaspektrum van Komponent 72.95 - metielheksadekanoaat

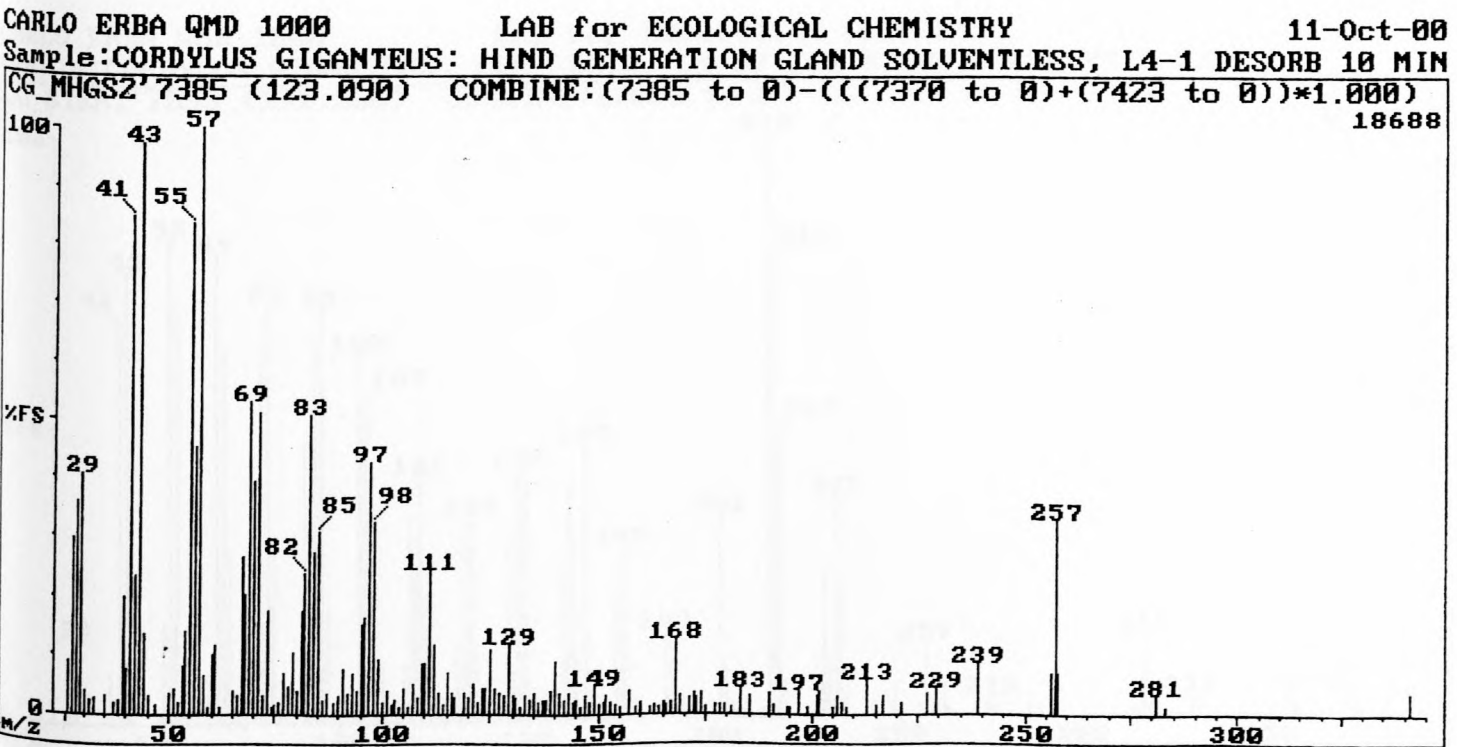


Fig. 4.29: EI-massaspektrum van Komponent 118.35 - dodekielheksadekanoaat

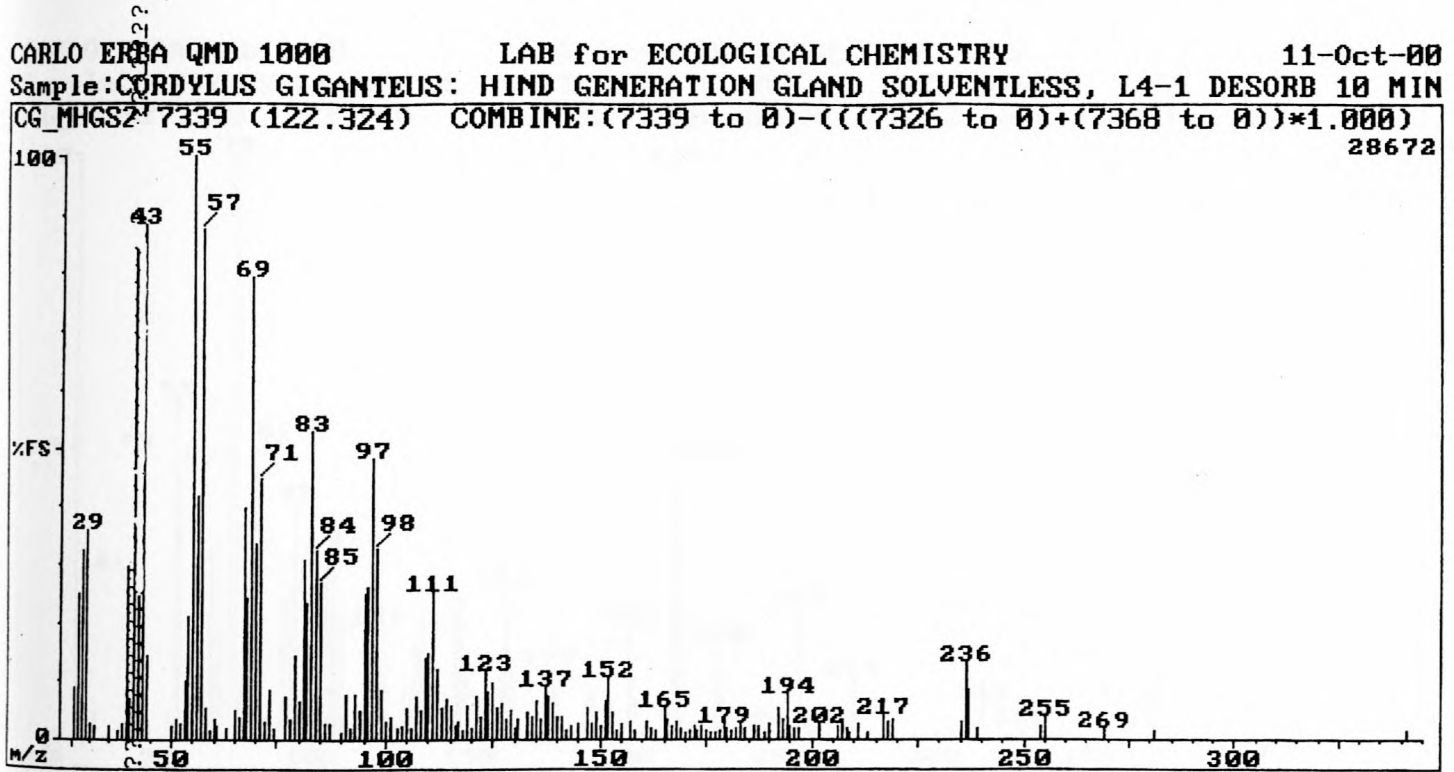


Fig. 4.30: EI-massaspektrum van Komponent 117.61 - dodekiel-9Z-heksadekenoaat

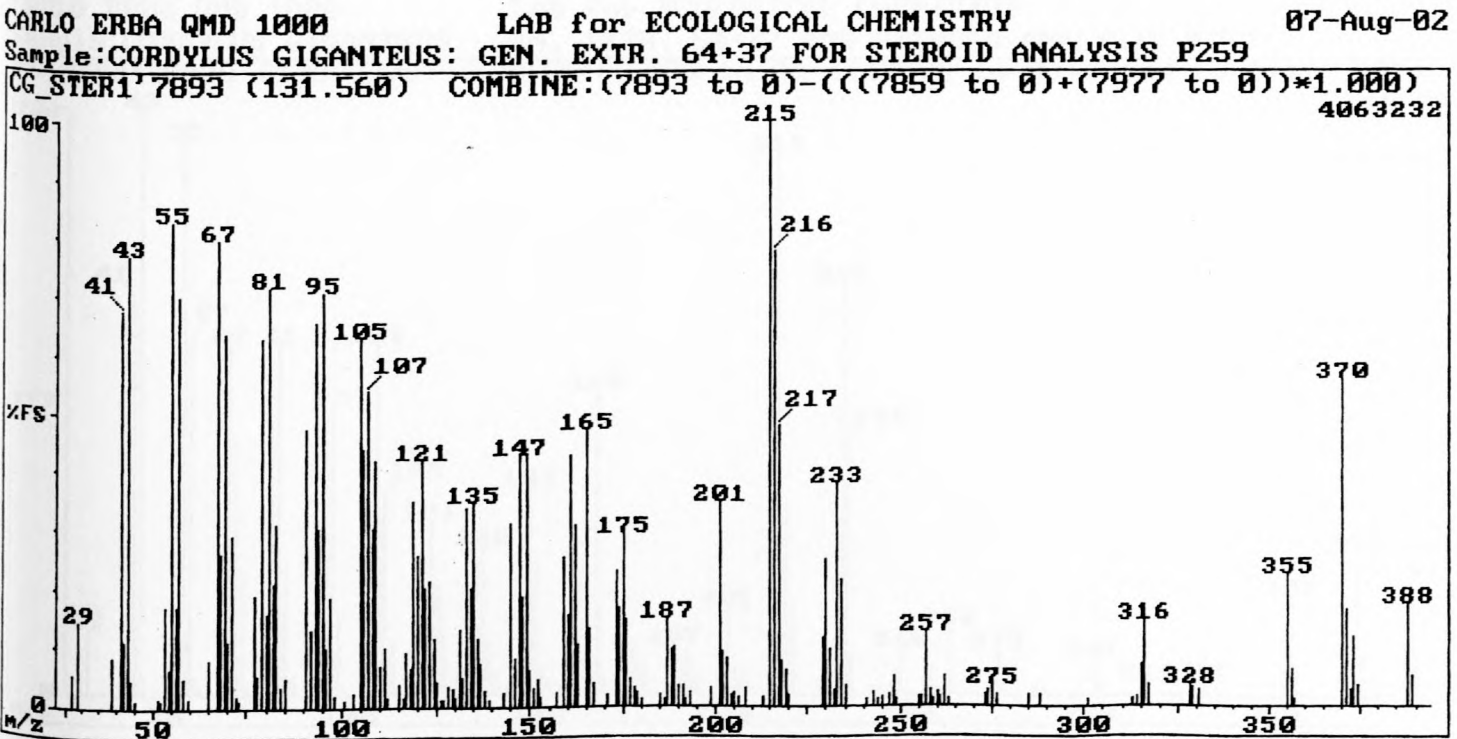


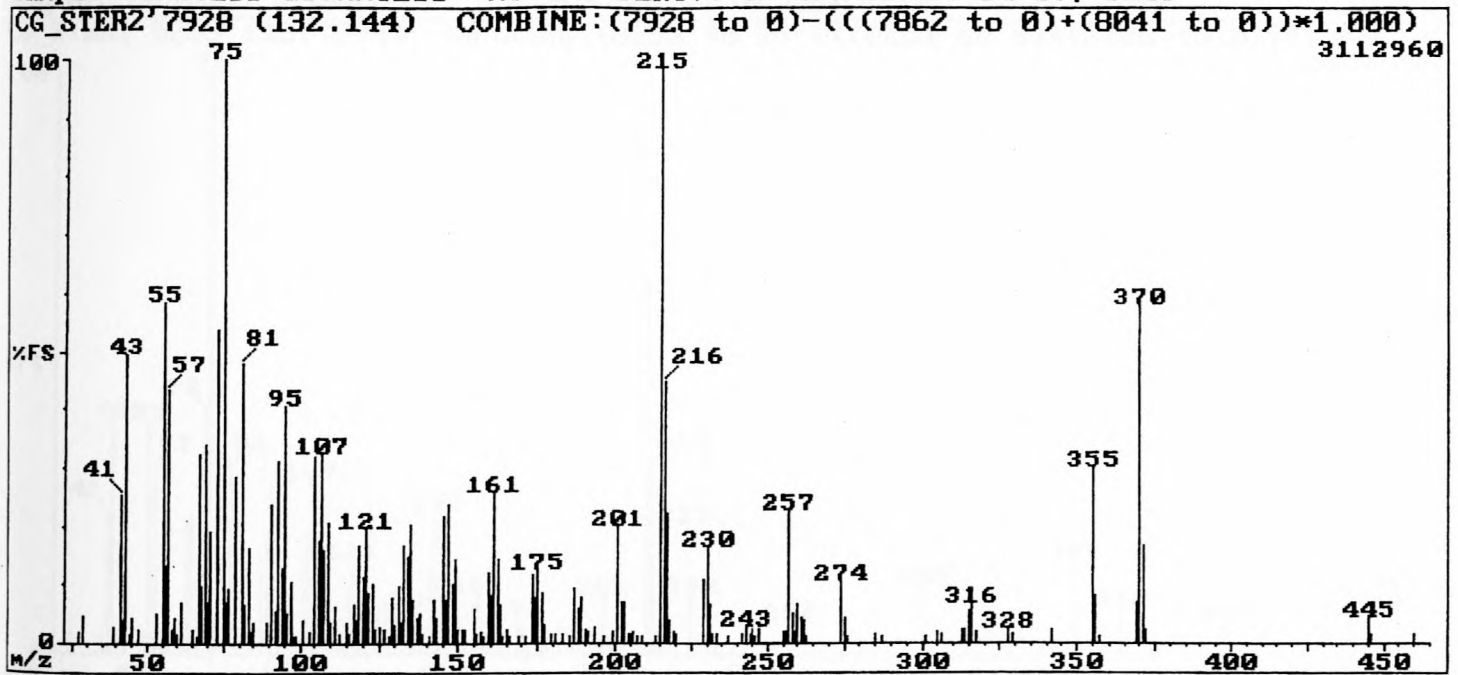
Fig. 4.31 a: EI-massaspektrum van Komponent 121.20 - 5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ -ol

CARLO ERBA QMD 1000

LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY

07-Aug-02

Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MO-TMS DERIV. OF GEN. EXTR. 64+37, P259

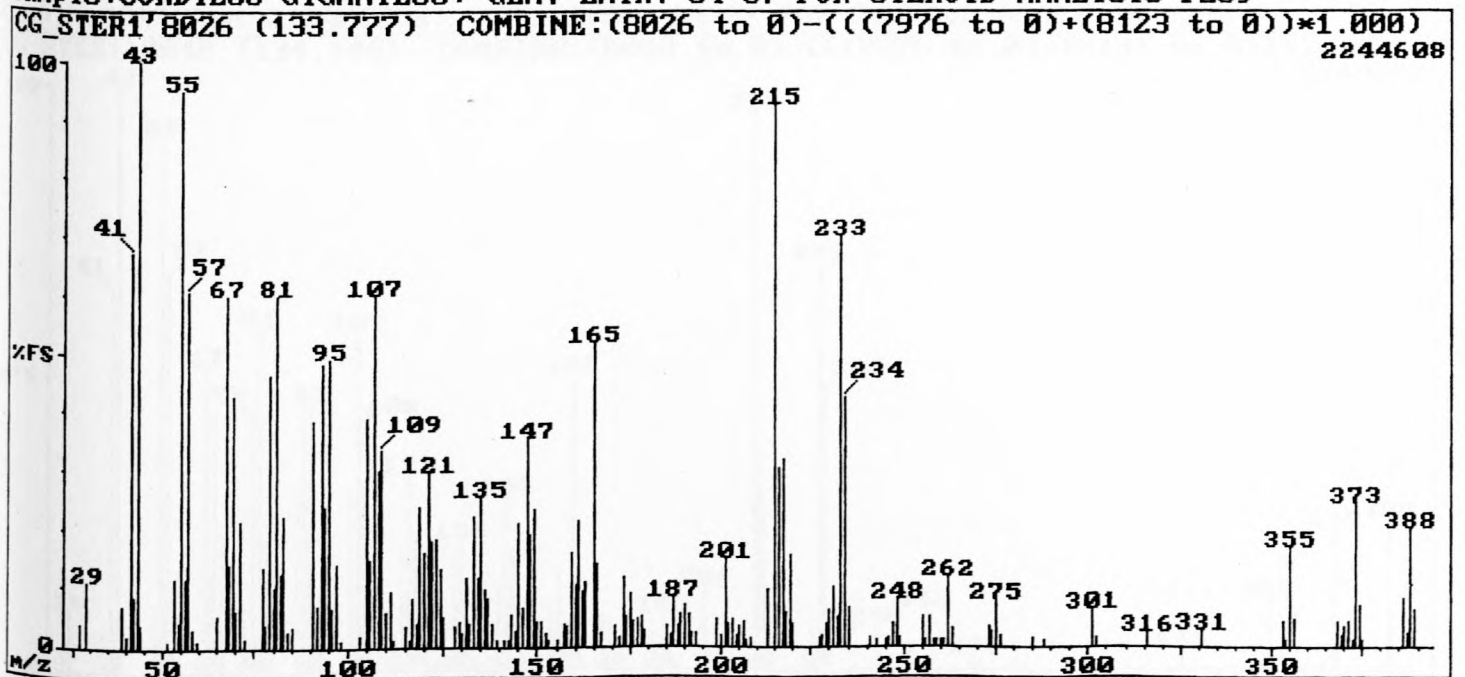
Fig. 4.31 b: EI-massaspektrum van  $5\beta$ -cholestan- $3\alpha$ -OTMS

CARLO ERBA QMD 1000

LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY

07-Aug-02

Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: GEN. EXTR. 64+37 FOR STEROID ANALYSIS P259

Fig. 4.32 a: EI-massaspektrum van Komponent 122.55 -  $5\alpha$ -cholestan- $3\alpha/\beta$ -ol

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MO-TMS DERIV. OF GEN.EXTR. 64+37, P259

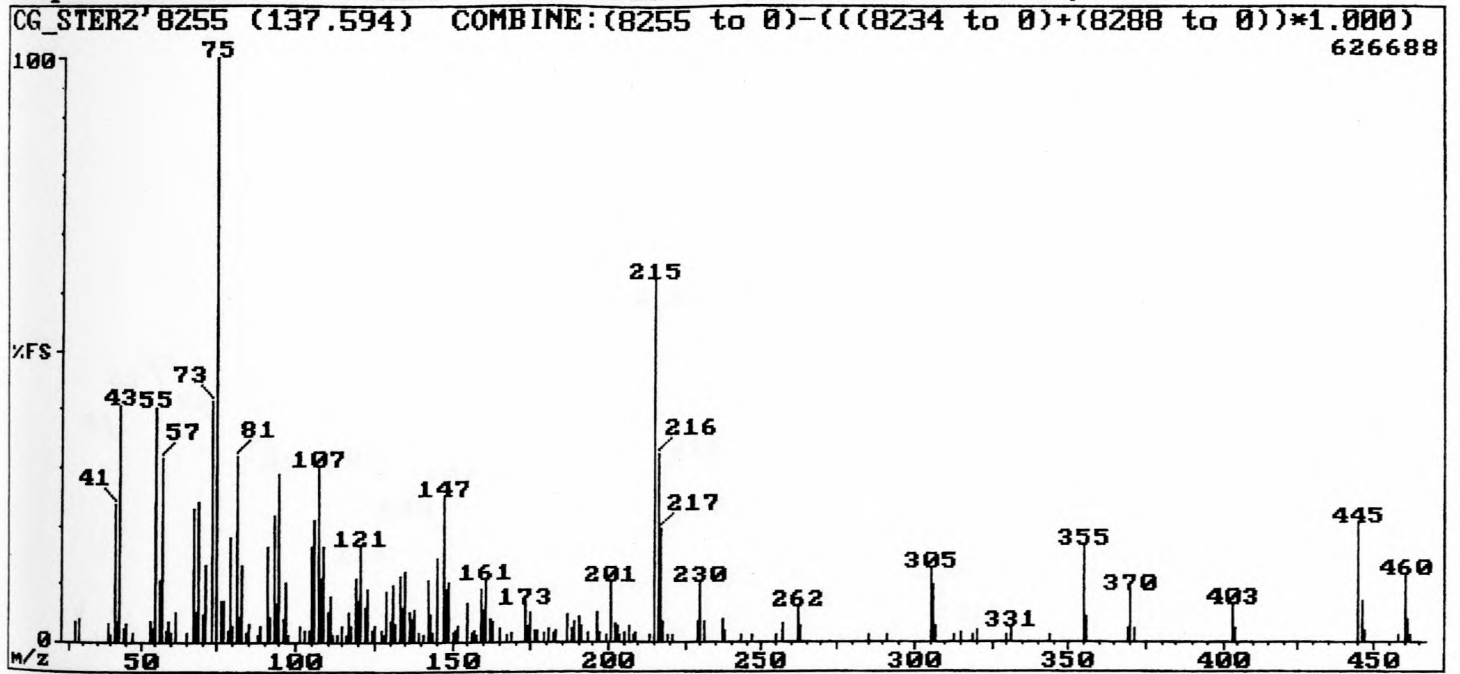


Fig. 4.32 b: EI-massaspektrum van 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -OTMS

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: GEN. EXTR. 64+37 FOR STEROID ANALYSIS P259

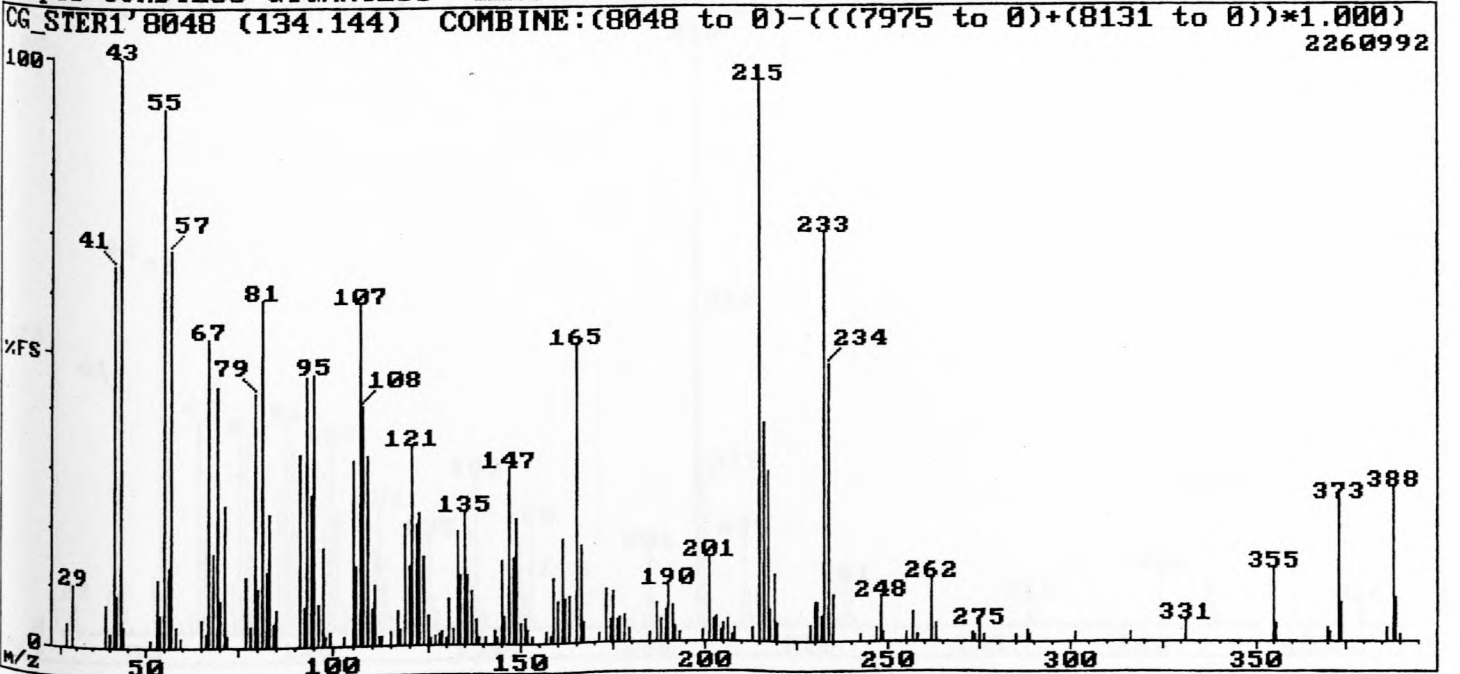


Fig. 4.33 a: EI-massaspektrum van Komponent 122.91 - 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol



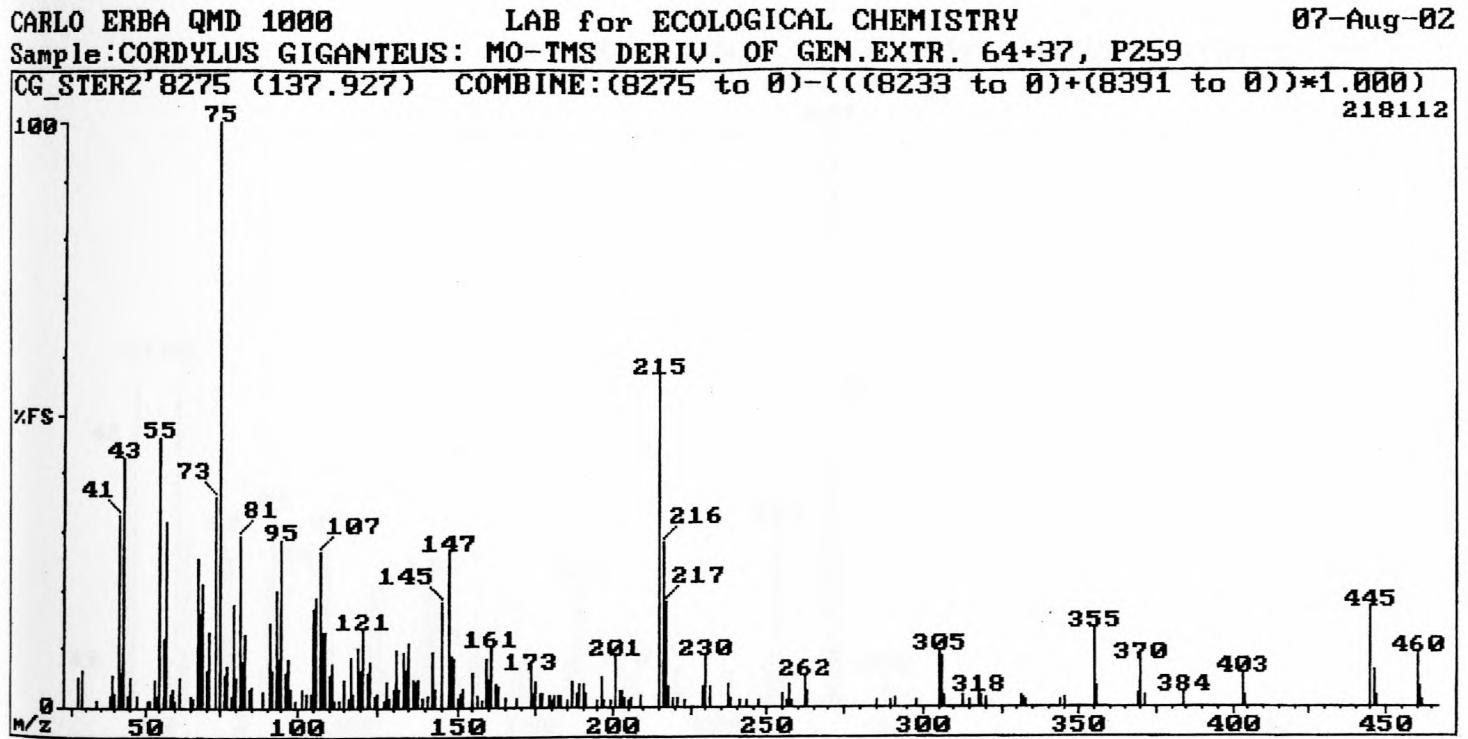
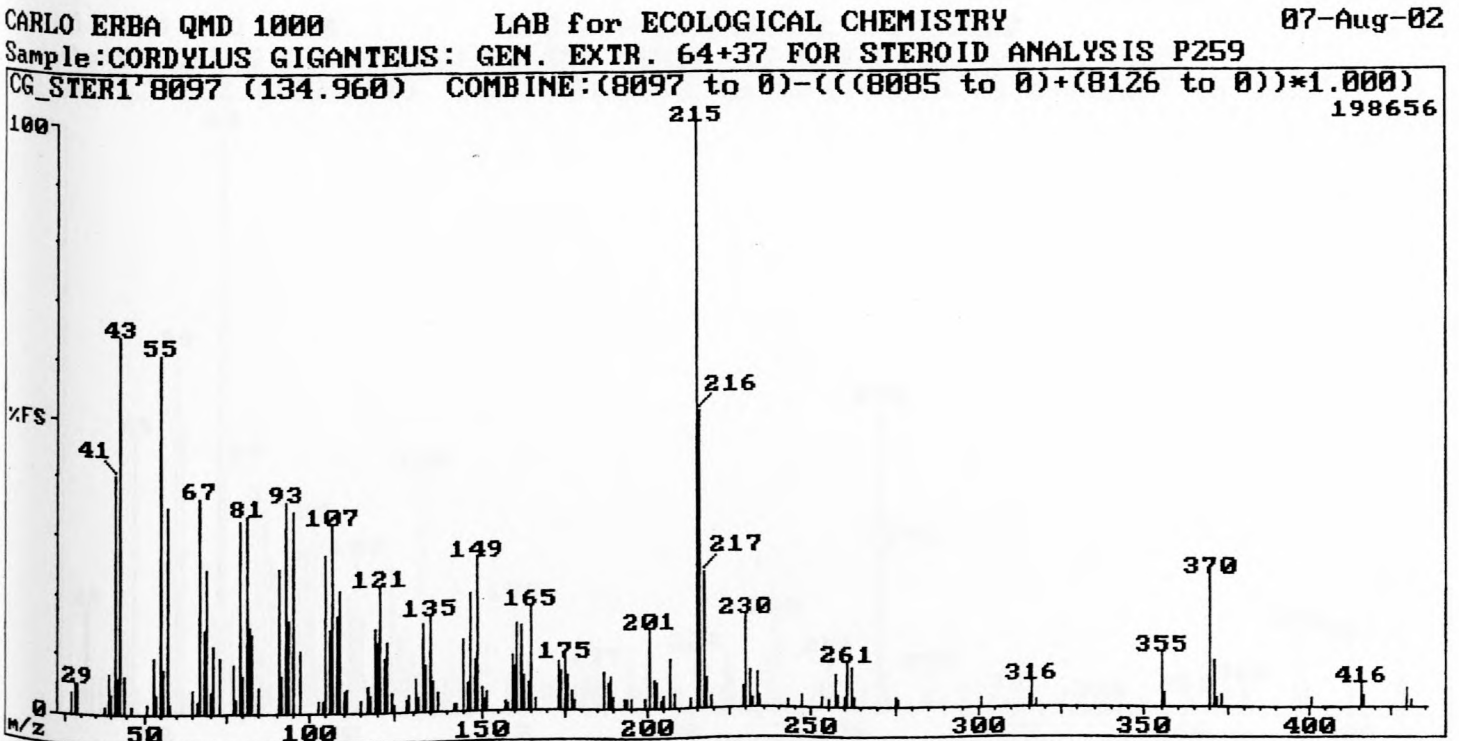
Fig. 4.33 b: EI-massaspektrum van 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol

Fig. 4.34: EI-massaspektrum van Komponent 123.51 - 3-etocholestan

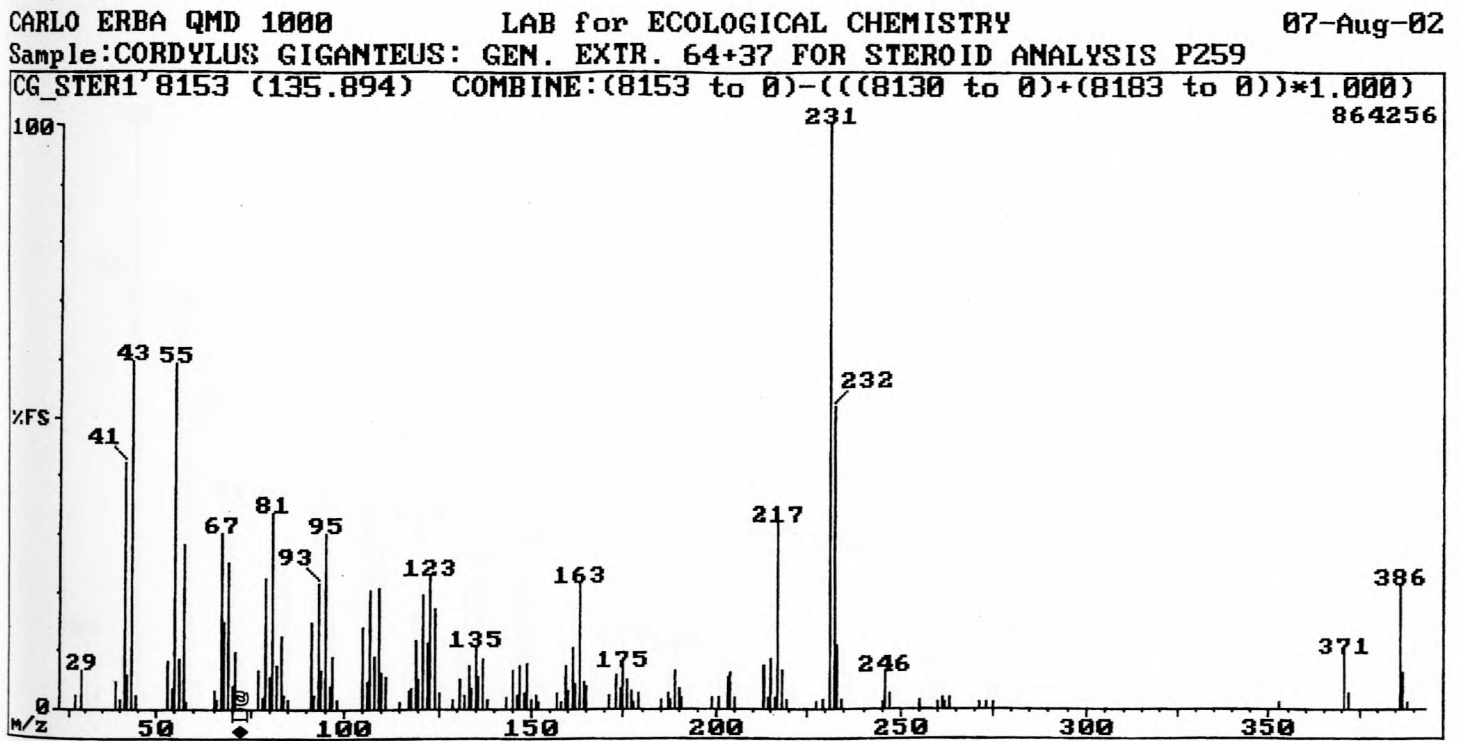


Fig. 4.35 a: EI-masspektrum van Komponent 123.75 - cholestan-2/3-oon

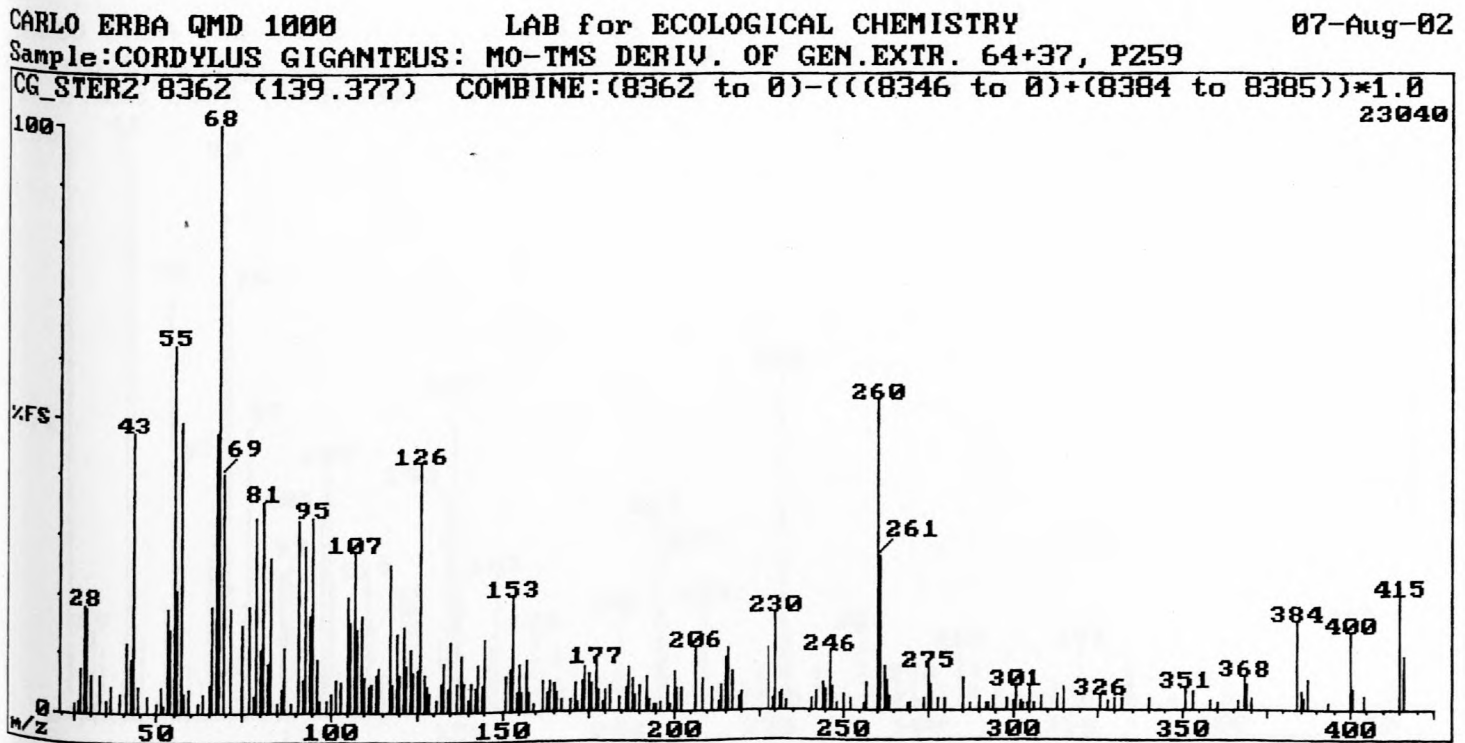


Fig. 4.35 b: EI-masspektrum van 2/3-(O-metieloksiem)-cholestaan

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: GEN. EXTR. 64+37 FOR STEROID ANALYSIS P259

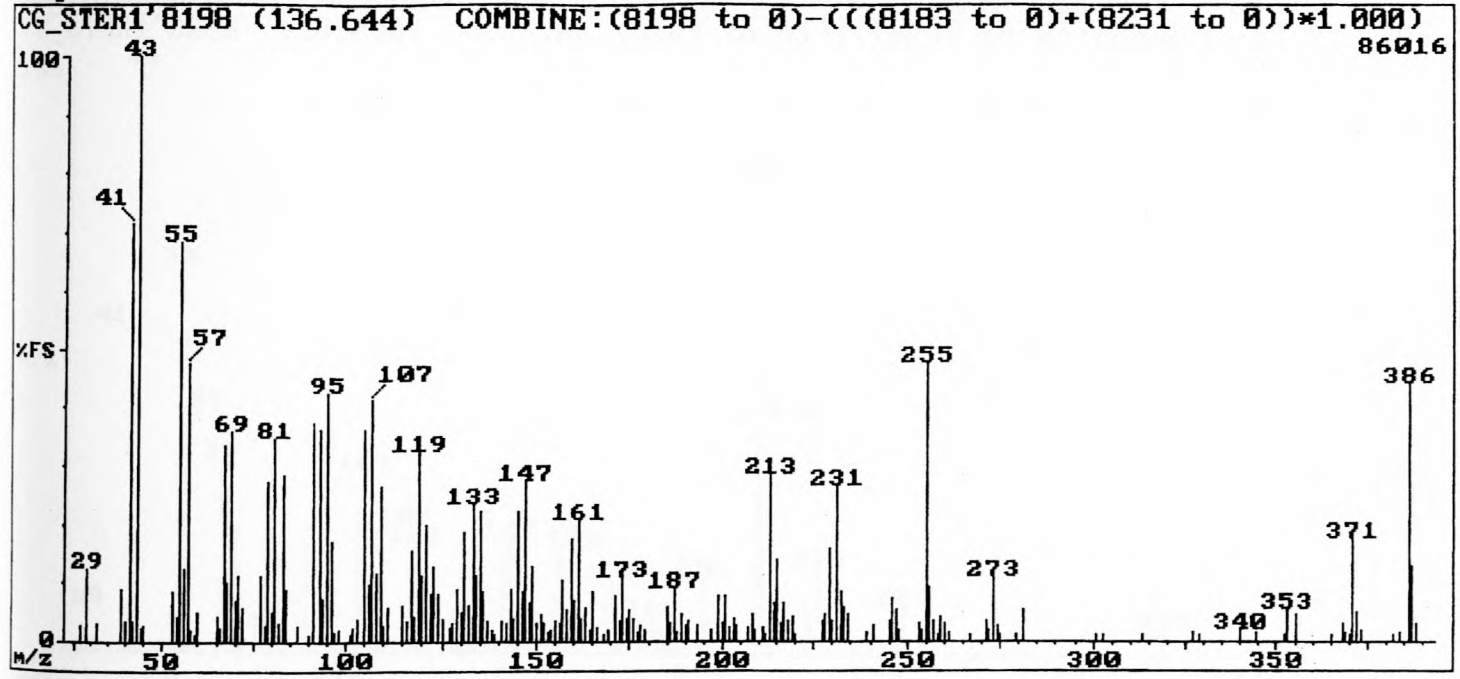


Fig. 4.36 a: EI-massaspektrum van Komponent 124.38 - 5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -ol

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MO-TMS DERIV. OF GEN. EXTR. 64+37, P259

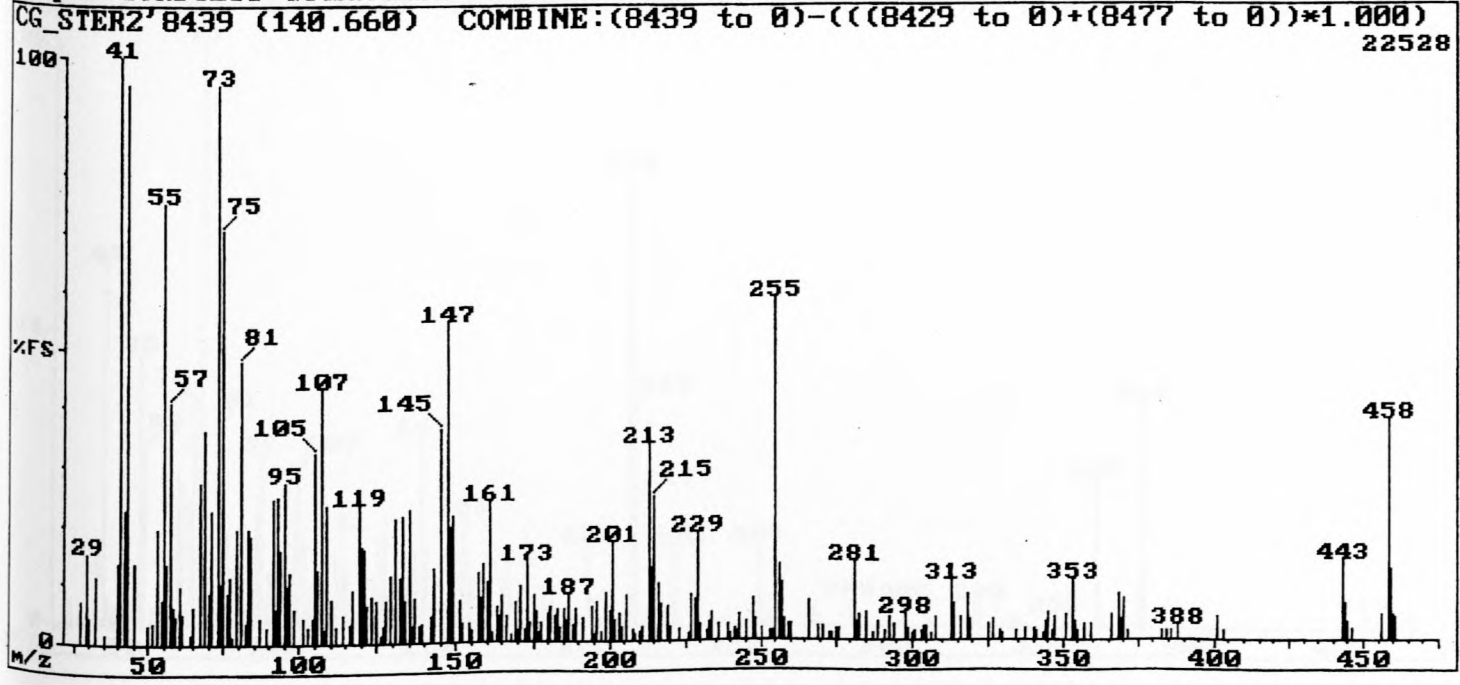


Fig. 4.36 b: EI-massaspektrum van 5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -OTMS

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: GEN. EXTR. 64+37 FOR STEROID ANALYSIS P259

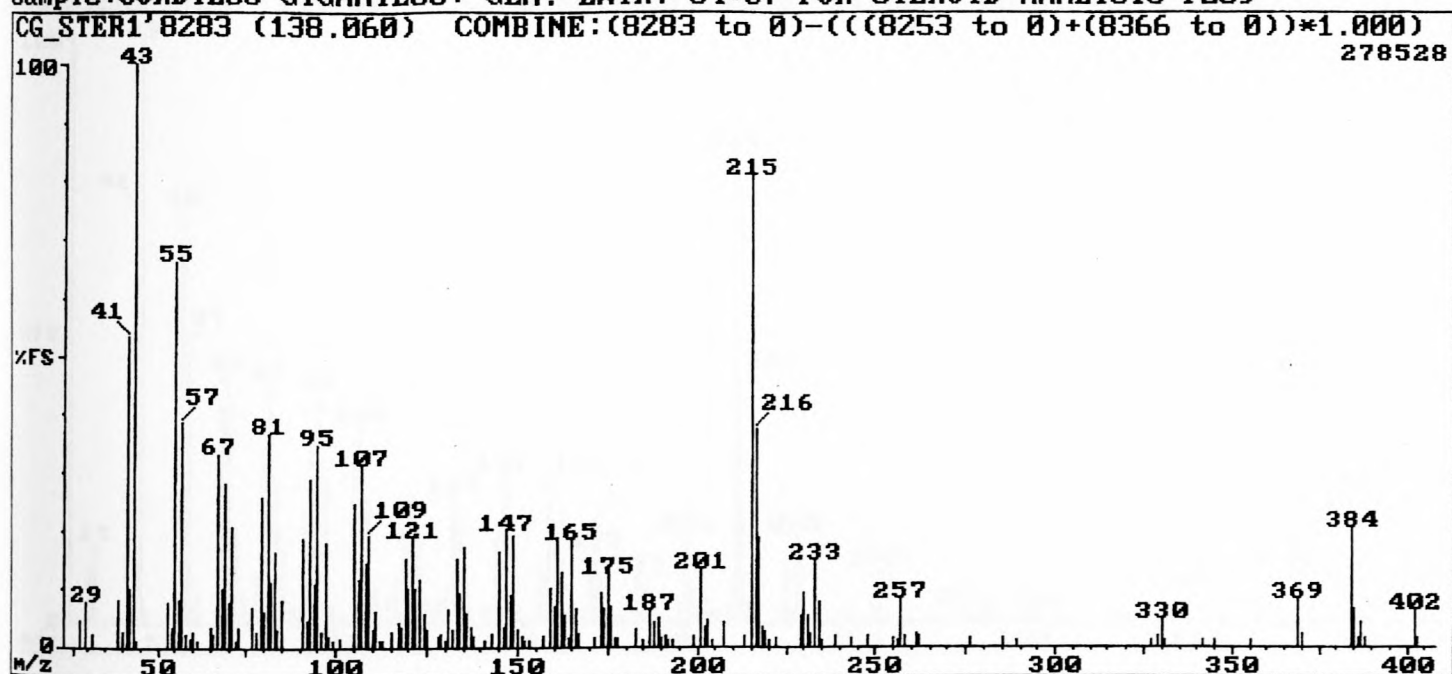


Fig. 4.37 a: EI-massaspektrum van Komponent 125.32 - 5 $\beta$ -ergosterol

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample:CORDYLUS GIGANTEUS: MO-TMS DERIV. OF GEN.EXTR. 64+37, P259

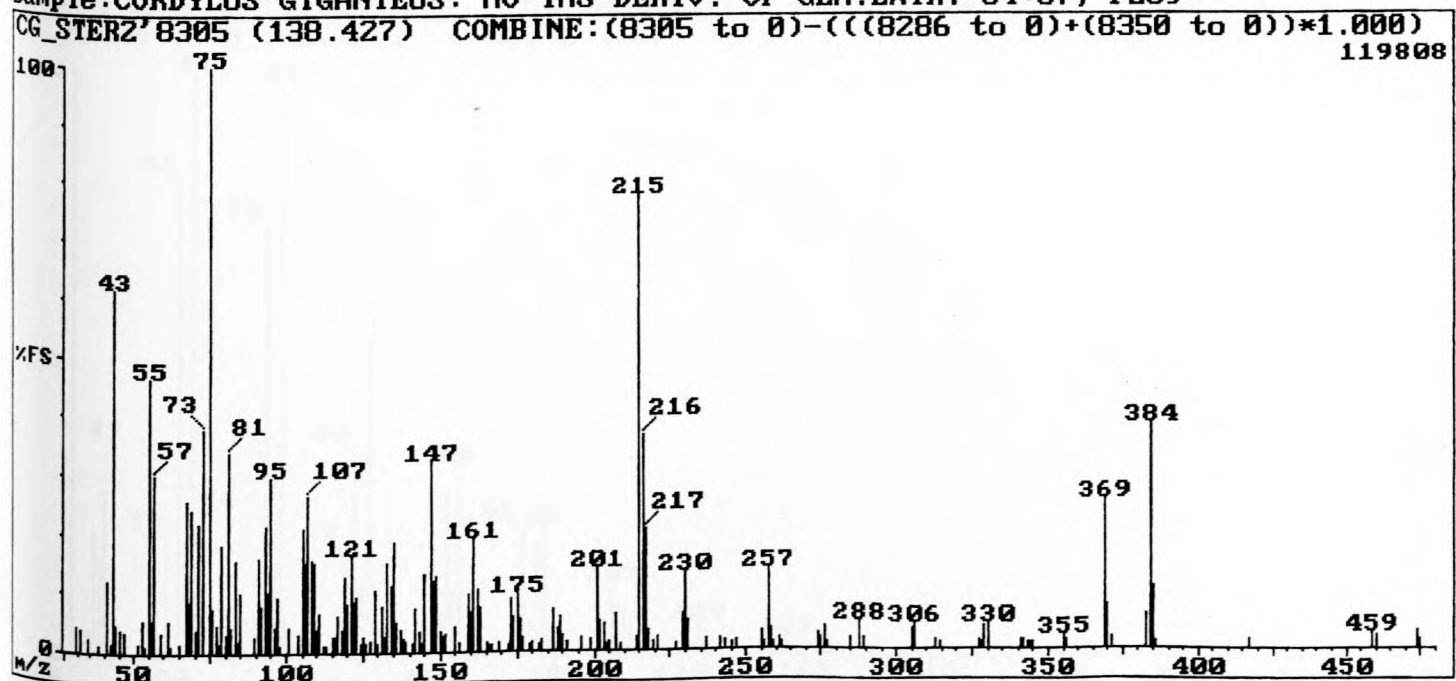


Fig. 4.37 b: EI-massaspektrum van 5 $\beta$ -ergosterol-OTMS

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 07-Aug-02  
 Sample: CORDYLUS GIGANTEUS: GEN. EXTR. 64+37 FOR STEROID ANALYSIS P259

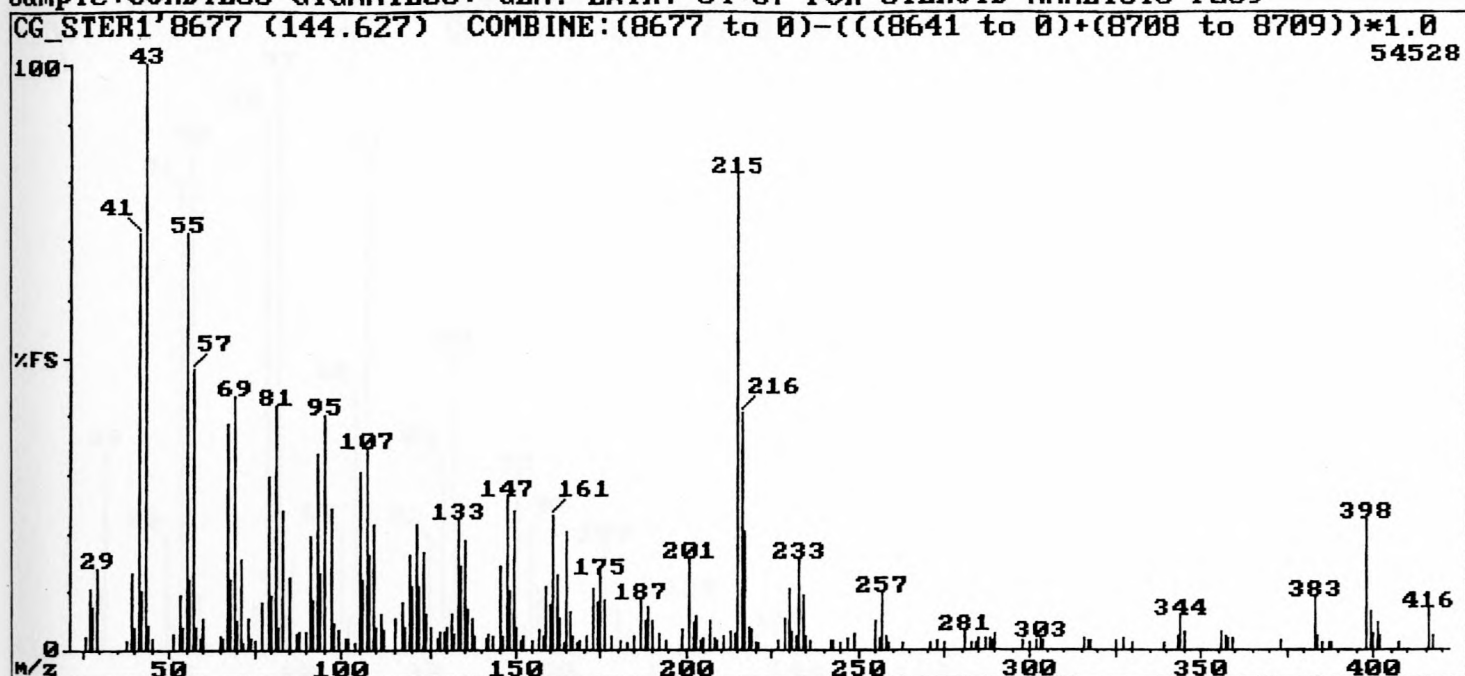


Fig. 4.38: EI-massaspektrum van Komponent 129.52 - 5 $\beta$ -stigmastanol

CARLO ERBA QMD 1000 LAB for ECOLOGICAL CHEMISTRY 18-Jul-00  
 Sample: CORDYLUS GIGANTEUS: HIND GENERATION GLAND EXTR. P200, 40-280 @ 2/MIN

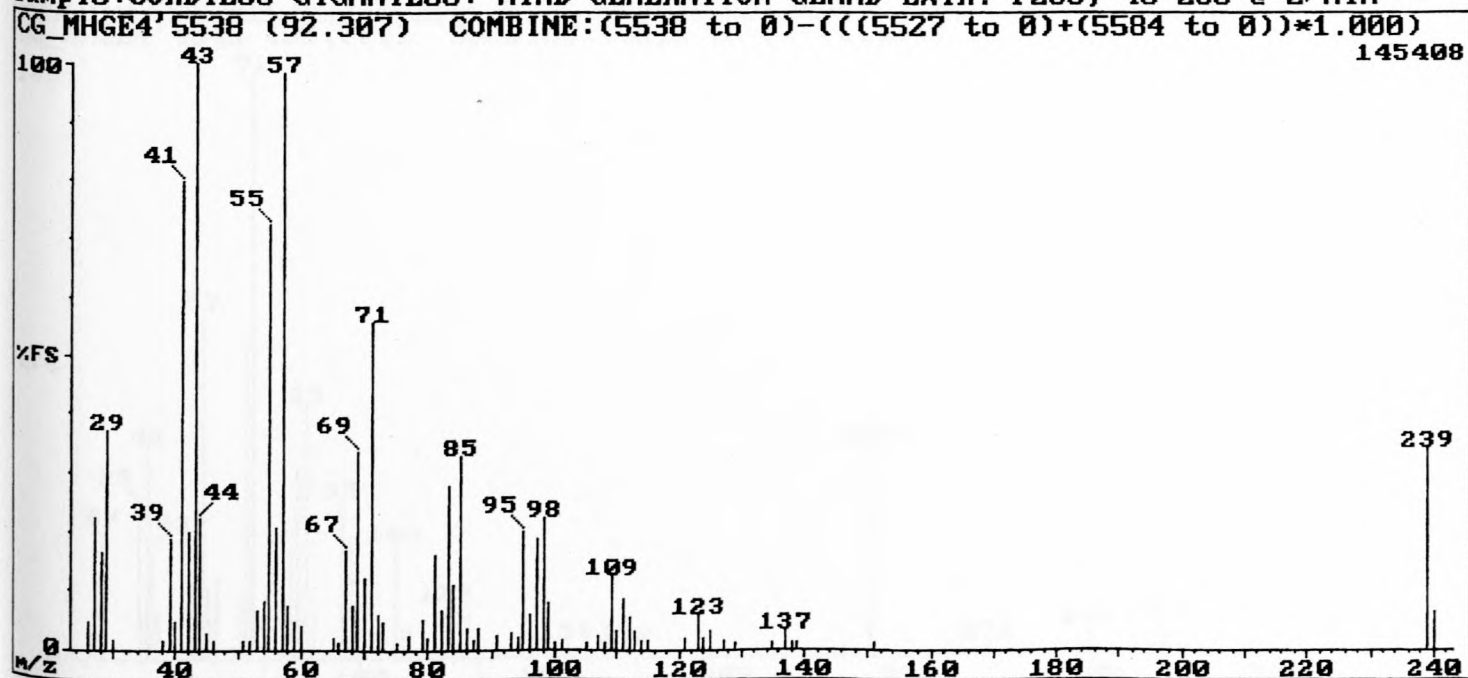


Fig. 4.39 a: EI-massaspektrum van Komponent 87.82 - ongeïdentificeerde verbinding

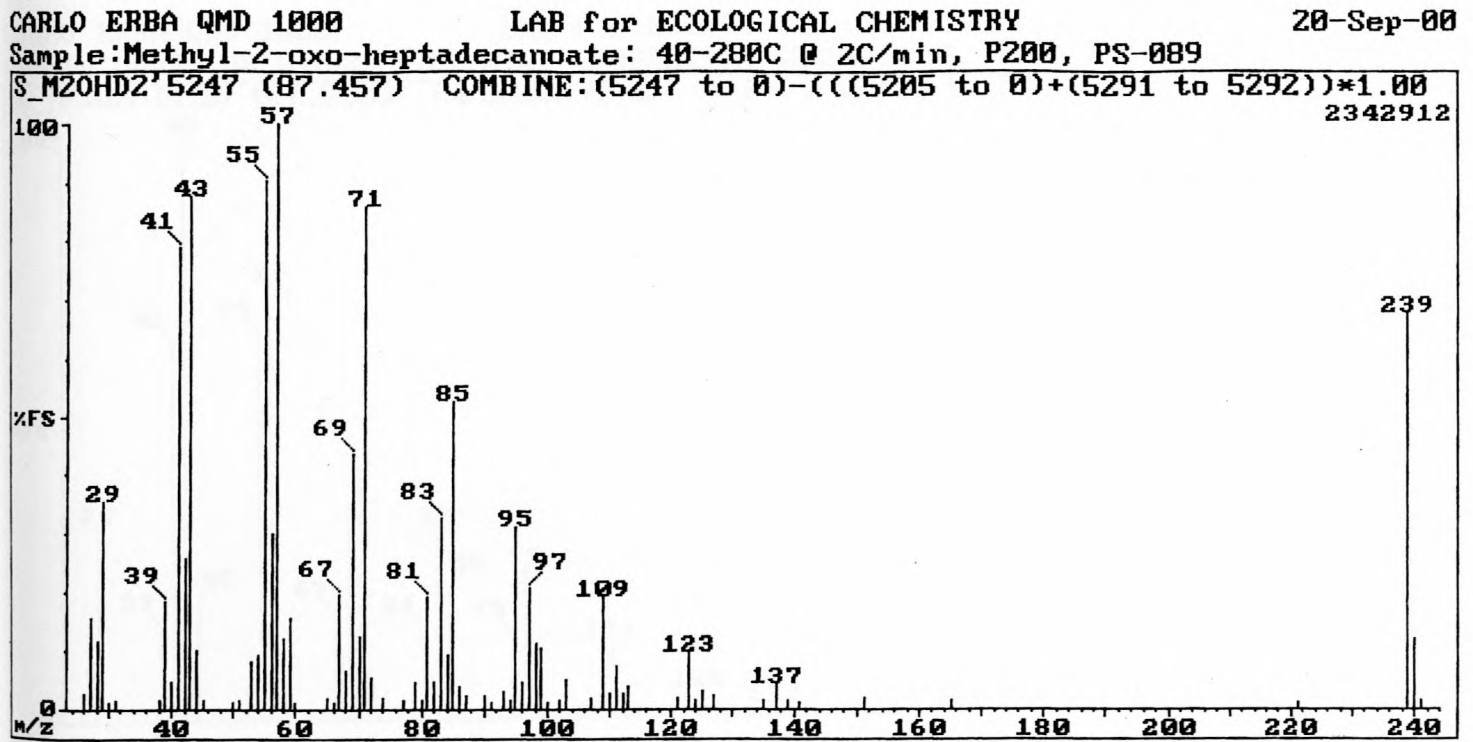


Fig. 4.39 b: EI-massaspektrum van sintetiese metiel-2-okso-heptadekanoaat

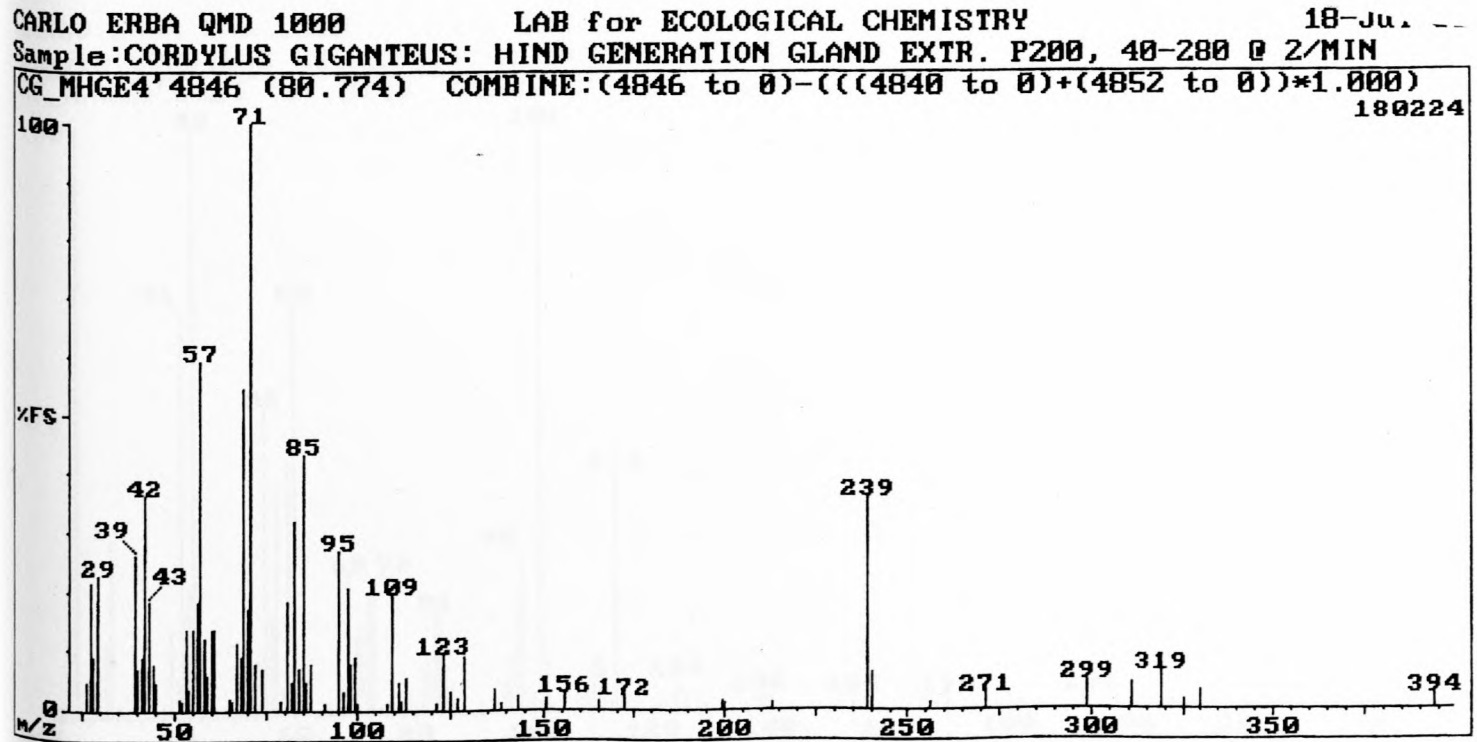


Fig. 4.40: EI-massaspektrum van Komponent 77.93 - ongeïdentifiseerde verbinding

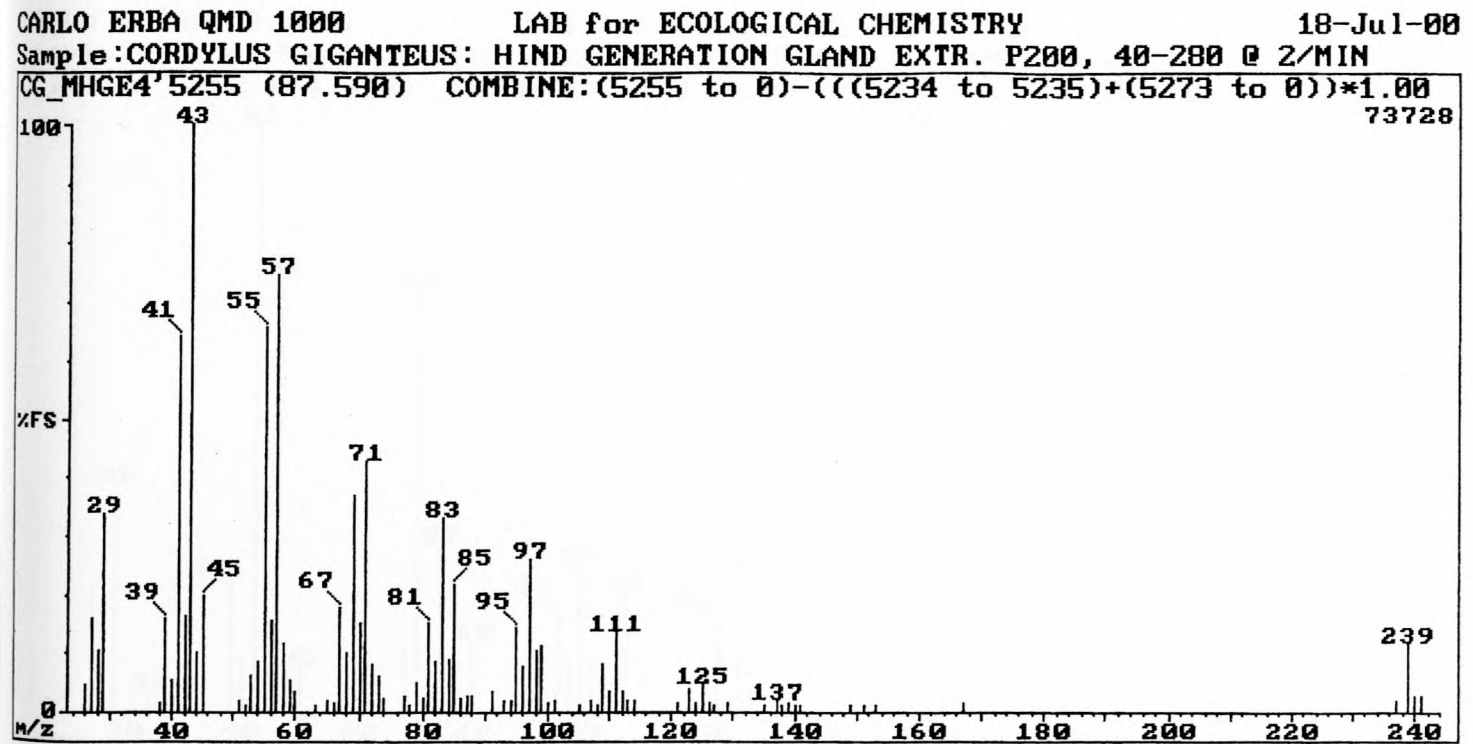


Fig. 4.41: EI-massaspektrum van Komponent 82.82 - ongeïdentificeerde verbinding

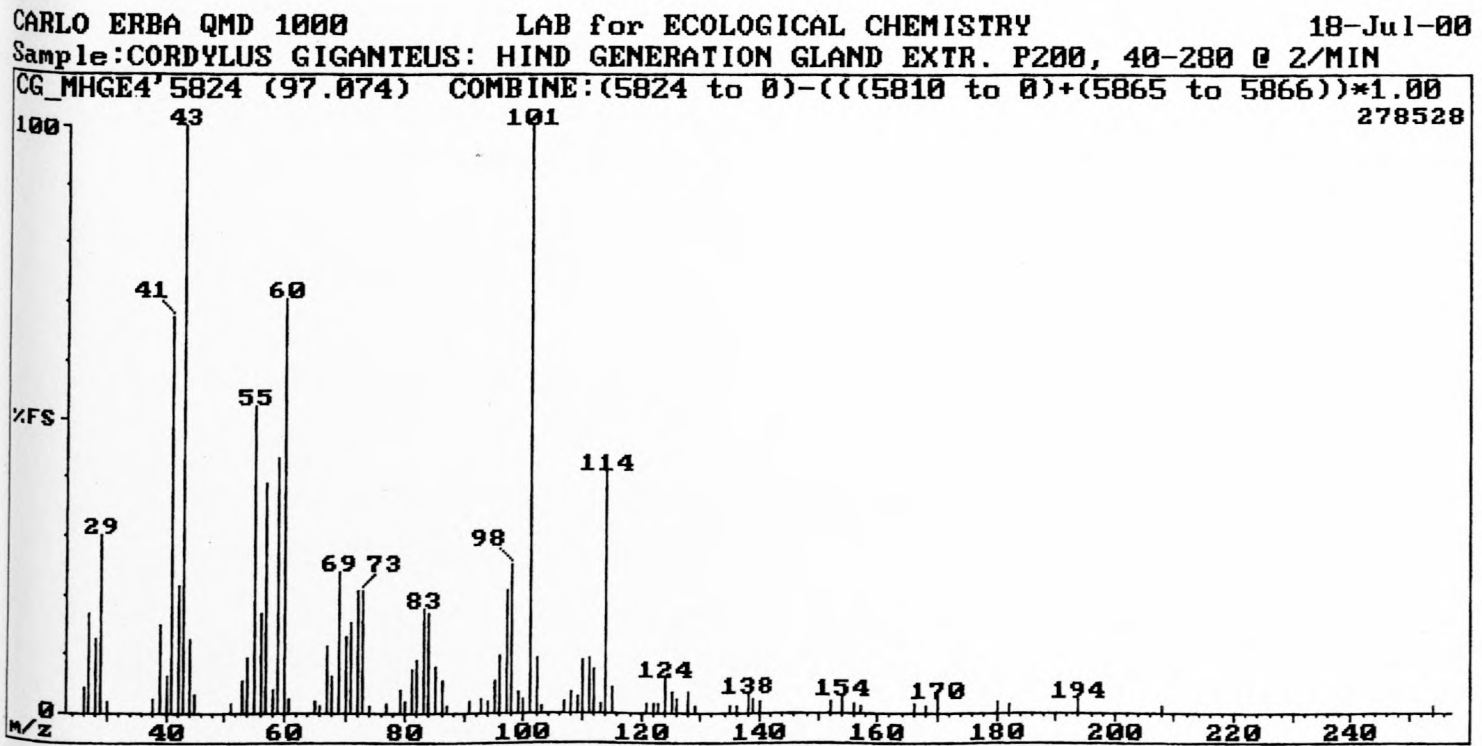


Fig. 4.42 a: EI-massaspektrum van Komponent 92.59 - ongeïdentificeerde verbinding

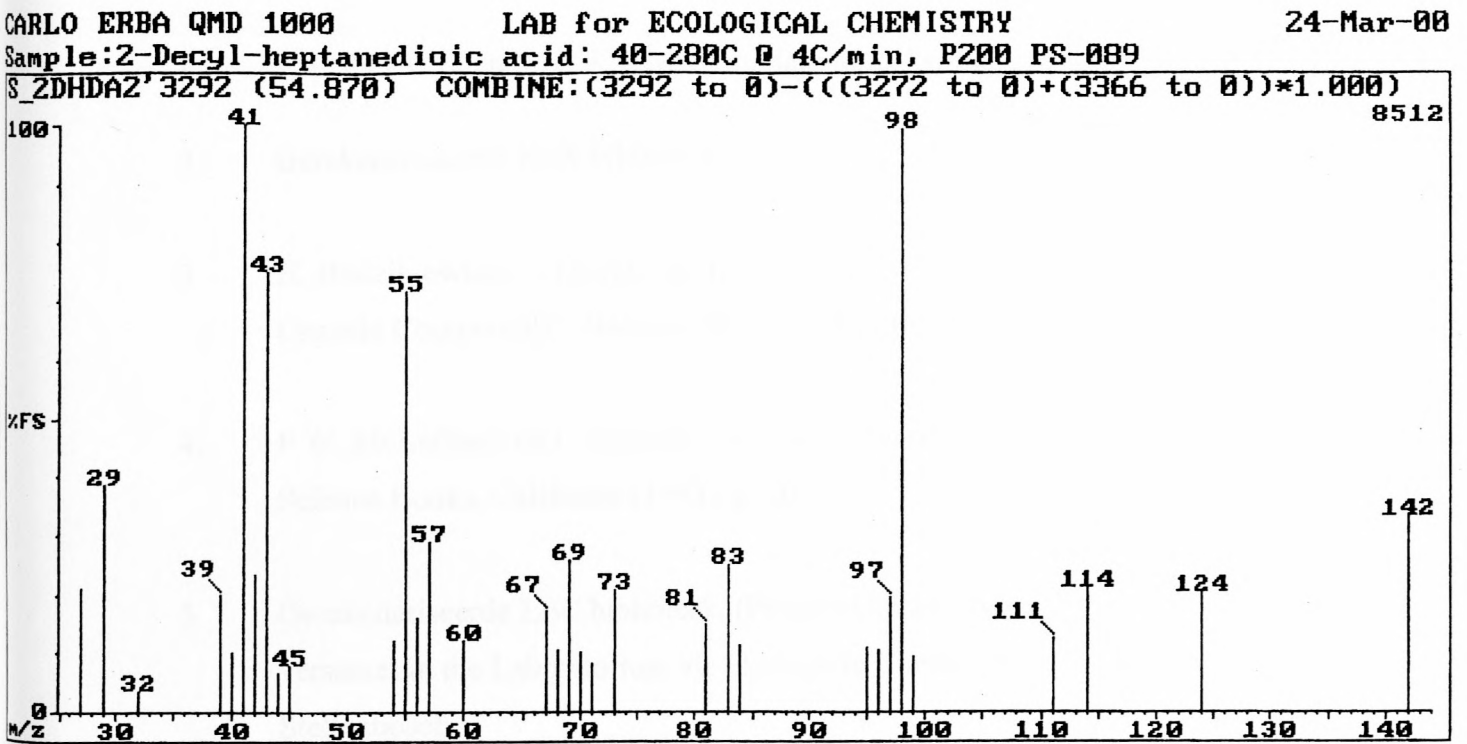


Fig. 4.42 b: EI-massaspektrum van 2-dekiel-heptaandioësuur



**Verwysings**

1. J.H. Van Wyk en P.Le F.N. Mouton, *Amphibia-Reptilia*, **13**, pp. 1-12 (1992).
2. Gerekenariseerde NBS-biblioteek.
3. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc., San Francisco (1967), pp. 130-134.
4. F.W. McLafferty en F. Turecek, "Interpretation of Mass Spectra", University Science Books, California (1993), p. 204.
5. Gerekenariseerde LEC biblioteek. (Persoonlike data basis van massaspektra versamel in die Laboratorium vir Ekologiese Chemie, Universiteit van Stellenbosch.)
6. E. Honkanen, T. Moisio en P. Karvonen, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 370-374 (1965).
7. W.H. McFadden, E.A. Day en M.J. Diamond, *Anal. Chem.*, **37**, 89-92 (1965).
8. Verwysing 4, pp. 277-278.
9. Verwysing 3, pp. 411.
10. Verwysing 4, pp. 213.
11. R.M. Silverstein, G.C. Bassler en T.C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc. (1991), p. 32.
12. Verwysing 11, p.31.
13. Verwysing 3, p. 336.

14. Verwysing 3, pp. 55-56.
15. Verwysing 4, pp. 252-254.
16. B. Reiter, M. Lechner, R. Aichholz en E. Lorbeer, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **22**, pp. 514-520 (1999).
17. B. Reiter en E. Lorbeer, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, pp. 881-888 (2001).
18. Gerekenariseerde NIST-biblioteek
19. Z. V. I. Zaretskii, J. M. Curtis, A. G. Brenton, J. H. Beynon en C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.*, **23**, pp. 460-468 (1988).
20. S. S. Friedland, G. H. Lane, Jr., R.T. Longman, K.E. Train en M. J. O'neal, Jr., *Anal. Chem.*, **31**, pp. 169-174 (1959).
21. NIST databasis, "Nist Mass Spectral Search Program, Version 1.5".
22. G. von Unruh en G. Spiteller, *Tetrahedron*, **26**, pp. 3303-3311 (1970).
23. H. Budzikiewicz, "Steroids", Hoofstuk 10, pp. 255-259, in "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", G.R. Waller (red.), Wiley (Interscience), New York (1972).
24. C. H. L. Shackleton, *Endocrine Reviews*, **6**, pp. 441-486 (1985).
25. Z. V. I. Zaretskii, J. M. Curtis, A. G. Brenton, J. H. Beynon en C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.*, **23**, pp. 453-459 (1988).
26. "Wiley Registry of Mass Spectral Data", Sesde uitgawe, John Wiley & Sons, Inc.
27. H. Budzikiewicz, C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, pp. 1430-1439 (1962).

28. Verwysing 23, p. 263.
29. C. J. W. Brooks en B. S. Middleditch, "Some Aspects of Mass Spectrometry in Steroid Analysis", Hoofstuk 6, pp. 170-172, in "Modern Methods of Steroid Analysis", E. Heftmann (red.), Academic Press, New York en Londen (1973).

## HOOFSTUK V

**KWANTITATIEWE ANALISE VAN DIE GENERASIE-  
KLIERAFSKEIDING VAN DIE OUVOLK MANNETJIE**

Kwantitatiewe vergelyking van die verbindings van die generasiekliere van individuele akkedisse soos in die geval van die femorale kliere gedoen is, is essensieel vir die bepaling van hierdie kliere se bydrae tot die chemiese kommunikasie tussen die individuele akkedisse. Die verskille in die chemiese samestelling van die generasieklierafskeidings wat op die voor- en agterbene van die manlike akkedisse voorkom, asook kwantitatiewe seisoenale variasies van die afskeidings is ondersoek.

**Versameling van die monsters en verwerking van die data**

Die generasiekliermateriaal van verskeie mannetjies is in die veld op drie verskillende tye van die jaar met behulp van 'n haartangetjie in afsonderlike flessies versamel.<sup>1</sup> Die materiaal is in 'n vrieskas bewaar totdat dit geanaliseer is. Die monsters is afgeweg (*ca.* 2 mg) en individueel, onder dieselfde kondisies gaschromatografies geanaliseer, deur van die direkte inlaatmetode wat in Hoofstuk VII beskryf word, gebruik te maak. Verteenwoordigende monsters is ook aan GC-MS analise onderwerp.

Na voltooiing van die werk in Hoofstuk III is besluit om die moontlikheid te ondersoek om hier van 'n direkte inlaat metode (sonder om die vlugtige organiese verbindings te ekstraheer) gebruik te maak. In beginsel bestaan die metode uit die termiese desorpsie van die vlugtige komponente van die afskeiding van die skubagtige generasieklier wat op 'n gesilileerde glaswolpluisie in die inlaatvoering van 'n GC geplaas word. Komponent 78.19, geïdentifiseer as heksadekanoësuur, is as eksterne standaard gebruik, aangesien hierdie komponent altyd die hoogste relatiewe konsentrasie in al die monsters het, en die akkedisse waarskynlik dus nie op grond van die konsentrasie van hierdie komponent tussen individue sou kon onderskei nie. 'n Bekende volume van 'n oplossing van die standaard is op 'n glaswolpluisie in 'n inlaatvoering geplaas, die oplosmiddel is toegelaat om te verdamp en die heksadekanoësuur is daarna soos in die geval van die vlugtige klierafskeidingskomponente termies gedesorbeer en kwantitatief gaschromatografies bepaal. Hierdie metode is nie ideaal nie aangesien die klein volume van

die standaardoplossing nie uiters akkuraat afgemeet kan word nie. Verder geskied die desorpsie van vlugtige komponente uit die vaste matriks, waarin die vlugtige komponente van die afskeiding aanwesig is, nie so volledig soos die desorpsie van die interne standaard van die glaswol af nie. Ten spyte van hierdie probleem is hierdie bepaling metode bo ander moontlike metodes verkies. Dit is byvoorbeeld onmoontlik om die organiese materiaal in die afskeiding kwantitatief uit die soliede matriks te ekstraheer en die ekstrakt en die onoplosbare residu kwantitatief van mekaar te skei en die relatief groot volume oplosmiddel wat vir so 'n ekstraksie benodig word, in te damp sonder om van die geëkstraheerde materiaal te verloor nie.

Die organiese materiaal van die generasieklierafskeidings van die voorbene en agterbene van 10 mannetjie-akkedis wat tydens April 1998 en Oktober 1998, asook tydens Januarie 1999 versamel is, is geanaliseer. In die bespreking word daar na die monsters en die analise daarvan verwys as byvoorbeeld 26H1 waar 26 die nommer van die betrokke akkedis, en H 'n agterbeen (Eng. Hindleg) aandui, terwyl die getal 1 daarna verwys dat die klier materiaal in April 1998 versamel is. Die kodes 50F2 en 50F3 verwys dus na die generasieklierafskeidings van die voorbeen (Eng. Foreleg) van akkedis nommer 50 wat onderskeidelik in Oktober 1998 en Januarie 1999 versamel is. Hierdie kodes word in Tabel 5.1 gebruik. Elkeen van die betrokke monsters bevat meer as 160 komponente. Die totale massa van al hierdie komponente in elke monster is bereken, waarna die gemiddelde, maksimum en minimum waardes, van die onderskeie voor- en agterbeen monsters, vir elke seisoen bereken is (Tabel 5.2 en Fig. 5.1).

In die kwantitatiewe analises van die femorale kliere is slegs die relatiewe kwantiteite van die komponente bepaal. Aangesien die absolute kwantiteite (in ng/mg klier materiaal) van die komponente in die generasiekliermateriaal bepaal is, sou dit moontlik wees om van gevorderde statistiese metodes (deur byvoorbeeld sagteware soos Statistica te gebruik) gebruik te maak om die data te analiseer. Om die statistiese ontleding van die kwantiteite van meer as 160 komponente op die beste moontlike manier te doen, sou daar egter meer as 160 monsters vir hierdie studie beskikbaar moes wees. Aangesien so 'n groot aantal monsters nie beskikbaar was, en waarskynlik nooit beskikbaar sal wees nie, is daar dus 'n analise van die kwantitatiewe data uitgevoer om te sien of daar bepaalde patrone of tendense waargeneem kan word nie. Net soos in Hoofstuk III gemeld is dit nie bekend watter van die komponente in

Tabel 5.1. Monsters van generasie kiermateriaal wat ondersoek is.

Voorbeen			Agterbeen		
4/98	10/98	1/99	4/98	10/98	1/99
4F1	2F2	2F3	4H1	2H2	2H3
5F1	3F2	3F3	5H1	3H2	3H3
8F1	9F2	9F3	8H1	9H2	9H3
17F1	41F2	41F3	17H1	41H2	41H3
24F1	45F2	45F3	24H1	45H2	45H3
25F1	47F2	47F3	25H1	47H2	47H3
26F1	49F2	49F3	26H1	49H2	49H3
27F1	50F2	50F3	27H1	50H2	50H3
28F1	52F2	52F3	28H1	52H2	52H3
34F1	53F2	53F3	34H1	53H2	53H3

Tabel 5.2.

Totale massa van die komponente van die generasie klier materiaal, in ng/mg klier materiaal

	Gem	Min	Max
F1	28312.40	22505.96	37526.75
F2	25211.87	19823.37	36159.41
F3	25787.48	14028.49	32461.06
H1	20439.95	8063.10	32002.22
H2	21413.39	16917.82	29180.95
H3	19940.92	7618.12	27735.96

die generasieklierafskeiding semiochemies aktief is nie en hoe sensitief die akkedisse se olfaktoriese sisteme is nie. In die kwantitatiewe analises van die femorale kliere is 'n aantal komponente uitgesoek wat, op die oog af, groot kwantitatiewe verskille getoon het. In die geval van die generasiekliere word sulke verskille ook waargeneem, maar dit is nie in dié geval as voldoende beskou om slegs die kwantitatiewe variasie van hierdie komponente te ondersoek nie. 'n Voorlopige ondersoek is onderneem om sodoende dié komponente te elimineer wat nie kwantitatief noemenswaardig tussen monsters verskil nie. Die relatiewe standaard afwyking (RSTDV) van elke komponent is bereken deur die standaard afwyking van elkeen se kwantiteite, in al 60 analises, te deel deur hul gemiddelde kwantiteite. Die komponente waarvan die RSTDV onder 80 is, is vervolgens geëlimineer. Daar was ook 'n aantal komponente van die afskeidings waarvan die verskille op die oog af beduidend genoeg was om moontlik as betekenisvol te beskou, maar waarvan die RSTDV kleiner as 80 is. 'n Addisionele 21 komponente is dus bygevoeg by die komponente waarvan die RSTDV groter is as 80, om die volledige groep van 121 komponente wat ondersoek is, te lewer. Die 21

addisionele komponente is Komponente 13.76, 35.22, 42.24, 53.72, 60.40, 60.96, 65.10, 65.87, 70.58, 81.12, 81.81, 84.65, 84.82, 92.59, 94.64, 95.03, 103.04, 103.68, 123.51, 123.75 en 127.64.

Sowat 54% (min. 41% en maks. 62%) van die totale samestelling van die vlugtige gedeelte van die afskeiding bestaan uit Komponent 78.19 (heksadekanoësuur). Sowat 52% (min. 32% en maks. 71%) van die oorblywende 46% van die vlugtige gedeelte van die afskeiding, bestaan uit die uitgesoekte komponente.

### **Individuele variasie**

Die relatiewe kwantitatiewe verskille van die uitgesoekte komponente tussen individuele monsters is ondersoek, om vas te stel watter monsters beduidend van die ander verskil. Dit is bekend dat daar 'n 95% sekerheid bestaan dat indien 'n sekere waarde buite die gebied  $X + 2s$  of  $X - 2s$  val, waar  $X$  die gemiddelde en  $s$  die standaardafwyking vir 'n statistiese monster verteenwoordig,<sup>2</sup> dié waarde statisties beduidend is. Die  $X$ ,  $X + 2s$  en  $X - 2s$  waardes is vir elkeen van die uitgesoekte komponente bereken, en die statisties beduidende waardes is vervolgens bepaal. Die monsters 26F1 en 53F2 is dié waarin die meeste komponente met statisties beduidende kwantiteite voorkom (meer as dubbeld die aantal komponente as by enige van die ander monsters). Die resultate word in Tabel 5.3 opgesom. Fig 5.2 toon die relatiewe konsentrasies van hierdie verbindings in die twee monsters en Fig 5.3 is 'n grafiese voorbeeld van die variasie in die statistiese beduidende waardes. Interessante verbindings is gebruik as voorbeelde, naamlik Komponent 71.37 (heksadekaannitriël), Komponent 92.59 ('n ongeïdentifiseerde verbinding wat onder andere stikstof bevat) en Komponent 95.03 (oktadekaanamied). Dit is opmerklik hoe relatief min variasie by Komponent 71.37 voorkom in vergelyking met die ander komponente.

### **Seisoenale variasie**

'n Poging is aangewend om die uitgesoekte komponente volgens seisoenale variasie te kategoriseer, deur onder andere van hul gemiddelde konsentrasies gebruik te maak. Die komponente waarvan die gemiddelde konsentrasies hoër is in seisoen 1, seisoen 2 en seisoen 3 word gegee in onderskeidelik Tabel 5.4, Tabel 5.5 en Tabel 5.6. Die gemiddelde

Tabel 5.3. Komponente wat statisties beduidende konsentrasies in analises 26F1 en 53F2 toon.

Komponent nommer	Verbinding	Groot Gem.	Gem+2s	Gem-2s	26F1	53F2
8.58	-	2.11	5.49	-1.27	7.60	8.10
11.39	-	3.44	11.40	-4.53	16.23	14.28
12.12	-	2.86	7.76	-2.05	9.99	9.12
15.57	-	0.57	2.41	-1.26	2.57	0.31
16.38	-	2.76	8.55	-3.02	10.24	8.28
21.09	-	4.92	15.34	-5.49	20.42	16.81
26.97	-	2.10	6.30	-2.10	6.88	6.10
27.80	-	2.42	8.54	-3.70	12.34	6.84
29.61	-	7.78	46.49	-30.93	70.68	1.22
33.27	Nonanoësuur	1.24	3.98	-1.51	6.39	2.26
35.38	Ongeïdentifiseerd	1.98	6.76	-2.81	4.37	6.98
40.30	Dekanoësuur	1.06	3.21	-1.09	5.15	4.01
42.24	Ongeïdentifiseerd	7.33	17.35	-2.70	20.33	17.28
46.89	1-Dodekanol	69.30	318.33	-179.72	601.95	17.19
47.70	-	1.34	4.41	-1.73	0.95	4.42
49.41	-	5.15	25.30	-15.00	51.64	1.02
53.48	-	13.41	38.60	-11.77	60.13	43.83
59.23	Tridekanoësuur	37.49	106.10	-31.12	31.63	169.44
59.38	-	33.80	114.98	-47.39	232.30	81.32
59.85	Ongeïdentifiseerd	3.70	12.61	-5.21	1.73	26.54
60.17	-	26.33	103.14	-50.48	191.85	5.57
60.40	1-Tetradekanol	23.64	54.23	-6.95	31.13	62.00
60.68	-	4.05	15.70	-7.59	21.15	1.64
60.96	2-Pentadekanoon	14.91	38.72	-8.90	20.27	43.12
61.21	-	1.97	7.31	-3.36	7.37	2.28
65.10	-	320.87	585.24	56.51	852.38	456.34
65.87	Tetradekanoësuur	605.65	1279.78	-68.48	925.81	1527.45
70.93	Heksadekanol	16.19	59.71	-27.32	22.49	84.13
71.37	Heksadekaannitriël	281.04	841.13	-279.05	1368.79	1486.85
71.61	2-Heptadekanoon	15.73	43.59	-12.12	30.43	100.14
79.41	Ongeïdentifiseerd	1.12	3.24	-1.00	3.63	0.97
81.12	Heptadekanoësuur	128.59	243.65	13.53	260.14	247.98
81.17	Pentadekaanamied	51.78	191.19	-87.63	183.99	349.05
82.05	Ongeïdentifiseerd	1.58	4.67	-1.51	7.00	0.00
82.20	Ongeïdentifiseerd	2.94	7.68	-1.79	9.51	0.00
85.55	Ongeïdentifiseerd	13.99	63.47	-35.49	11.85	67.38
88.10	Ongeïdentifiseerd	2.22	7.13	-2.69	8.09	6.33
89.35	Nonadekanoësuur	1.36	5.57	-2.84	12.60	2.06
89.99	Heptadekaanamied	19.06	54.56	-16.43	112.78	57.90
90.97	-	6.15	22.48	-10.19	31.74	28.97



Tabel 5.3 (vervolg)

Komponent nommer	Verbinding	Groot Gem.	Gem+2s	Gem-2s	26F1	53F2
91.60	-	3.24	8.57	-2.10	13.40	7.23
92.59	Ongeïdentifiseerd	90.39	215.52	-34.75	264.37	251.15
93.48	Ongeïdentifiseerd	2.66	7.05	-1.73	9.25	6.04
95.03	Oktadekaanamied	135.35	272.34	-1.63	237.77	297.23
95.43	-	2.94	7.90	-2.02	9.05	8.90
96.06	-	2.80	7.47	-1.87	14.83	8.25
96.47	Ongeïdentifiseerd	4.20	12.33	-3.93	7.18	14.86
100.47	Ongeïdentifiseerd	24.12	67.94	-19.70	100.50	77.67
100.80	Ongeïdentifiseerd	65.35	176.22	-45.52	159.07	243.45
103.96	-	1.80	4.83	-1.22	3.97	5.18
108.38	-	0.48	2.51	-1.56	0.39	2.79
109.26	-	6.25	16.58	-4.08	3.51	23.04
110.80	Ongeïdentifiseerd	2.18	10.29	-5.94	25.38	1.40
117.21	-	2.92	7.96	-2.12	0.66	10.35
118.35	Dodekielheksadekanoaat	8.41	46.74	-29.93	127.45	11.22
122.14	-	3.81	13.69	-6.08	19.93	24.92
123.51	3-Etoksicholestaan	26.16	66.65	-14.33	96.42	76.69
125.68	Ongeïdentifiseerd	28.45	74.05	-17.16	51.06	78.24
126.04	Ongeïdentifiseerd	11.61	31.53	-8.30	39.16	51.42
130.90	-	13.91	48.90	-21.08	57.48	93.23

- Weens hierdie komponente se lae konsentrasies in die monsters wat vir GC-MS analise gebruik is, of weens onvoldoende skeiding tussen hierdie komponent en ander verbindings, kon geen suiwer massaspektra vir hulle verkry word nie.

Tabel 5.4. Komponente waarvan die konsentrasies gemiddeld die hoogste is in seisoen 1  
(in ng/mg kliermateriaal).

Komp. no	Gem 1	Gem 2	Gem 3	Min 1	Min 2	Min 3	Max 1	Max 2	Max 3	RSTDV
3.11	6.51	3.78	1.97	0.00	0.00	0.00	17.79	14.46	6.36	97.99
3.37	7.10	1.92	0.99	0.00	0.00	0.00	19.23	7.09	6.19	124.30
3.90	1.56	1.25	0.17	0.00	0.00	0.00	5.01	4.80	1.01	133.22
4.98	0.68	0.57	0.24	0.09	0.00	0.00	3.75	1.57	0.62	107.14
16.38	4.14	3.37	0.79	0.22	0.15	0.14	12.71	8.32	4.51	104.74
28.07	3.92	2.68	1.91	0.41	0.73	0.37	15.72	4.38	5.00	83.18
29.61	20.56	0.96	1.60	0.00	0.00	0.00	122.69	4.39	6.10	248.77
33.27	2.55	0.94	0.29	0.00	0.30	0.00	6.39	2.26	0.83	111.19
40.08	0.33	0.18	0.15	0.08	0.00	0.00	1.31	0.59	0.90	108.74
40.30	1.57	1.21	0.45	0.00	0.16	0.00	5.15	4.01	1.42	101.69
46.89	186.72	8.73	12.23	0.52	2.11	4.06	601.95	55.41	35.85	179.66
49.41	13.99	0.66	0.78	0.93	0.00	0.12	51.64	3.94	3.00	195.67
53.48	16.90	12.40	11.14	0.90	1.28	0.46	60.13	43.83	31.70	93.87
53.72	49.54	41.63	36.56	16.88	3.78	3.27	103.82	178.67	97.05	72.94
59.38	40.19	26.52	33.87	3.21	1.61	1.03	232.30	81.32	91.46	120.11
60.17	63.68	2.77	13.46	0.00	0.00	0.00	191.85	45.34	39.07	145.85
60.68	9.38	1.71	1.23	0.52	0.08	0.22	30.79	3.46	3.31	143.64
61.78	7.95	6.38	1.75	0.00	0.90	0.21	22.24	16.53	5.89	101.51
63.64	11.56	3.70	4.43	3.78	0.70	0.55	24.97	20.37	10.92	99.86
64.06	29.61	4.75	10.83	8.66	1.17	1.38	62.38	17.89	43.24	104.60
65.10	349.54	315.31	300.69	99.52	135.18	64.30	852.38	637.75	473.68	41.19
65.87	617.15	611.59	599.35	211.02	86.45	118.45	1267.50	1527.45	1262.08	55.65
67.99	4.52	1.25	0.76	0.54	0.35	0.29	56.38	3.25	1.26	330.64
70.58	269.82	243.20	169.03	48.87	65.20	38.19	742.47	840.92	357.31	65.40
71.37	306.09	285.80	257.50	24.28	42.11	17.44	1368.79	1486.85	634.33	99.65
75.26	3226.21	921.76	1540.21	918.91	147.03	290.60	8361.61	6244.13	5873.20	103.54
79.41	1.33	0.96	1.07	0.00	0.39	0.12	7.76	1.74	2.77	94.43
81.81	31.86	27.34	31.09	3.37	5.04	2.89	70.54	66.22	62.44	65.55
84.65	620.04	203.83	453.05	77.17	14.15	145.88	1536.51	772.73	1072.08	79.80
89.35	1.78	1.56	0.68	0.00	0.26	0.35	12.60	10.66	1.09	154.23
89.99	21.78	18.57	16.35	3.25	1.41	2.58	112.78	57.90	45.91	93.10
93.48	3.25	2.34	2.41	0.73	0.34	0.44	10.50	9.20	5.38	82.48
110.80	4.50	1.25	0.70	0.37	0.27	0.32	25.38	7.77	1.53	186.49
112.91	105.15	31.90	34.48	4.91	1.07	1.19	345.11	208.17	123.20	122.69
115.00	2.83	1.20	1.29	0.51	0.35	0.23	9.62	2.35	3.25	98.26
115.58	0.77	0.53	0.48	0.00	0.20	0.00	2.92	1.04	1.31	81.71
117.61	15.07	1.19	1.20	0.94	0.11	0.21	68.25	5.81	5.49	185.85
118.35	18.74	3.60	2.55	0.31	0.41	0.20	127.45	11.22	6.53	228.01
124.38	16.83	10.07	14.29	2.26	0.62	3.21	65.08	36.43	42.64	87.79

Tabel 5.5. Komponente waarvan die konsentrasies gemiddeld die hoogste is in seisoen 2.  
(in ng/mg kliermateriaal).

Komp. no	Gem 1	Gem 2	Gem 3	Min 1	Min 2	Min 3	Max 1	Max 2	Max 3	RSTDV
4.48	9.46	17.52	2.45	2.60	0.00	0.00	25.83	41.49	10.75	106.37
8.58	2.47	2.99	0.87	0.20	0.18	0.13	7.60	8.10	2.07	80.23
11.39	3.25	5.23	1.77	0.29	0.46	0.05	16.23	15.90	11.99	115.97
12.12	3.46	4.02	1.18	0.10	0.16	0.17	9.99	9.12	2.56	85.79
14.92	6.97	7.57	1.01	0.54	0.39	0.00	24.27	40.50	13.94	141.17
20.05	3.92	8.03	1.39	0.00	0.08	0.00	13.21	18.17	4.34	111.39
21.09	5.25	6.32	3.14	0.00	0.00	0.19	20.42	16.81	14.55	105.77
26.97	1.50	2.92	1.81	0.12	0.01	0.00	6.88	9.55	6.66	99.96
27.32	0.63	1.27	0.85	0.18	0.16	0.00	1.84	2.56	2.92	81.60
27.80	2.90	3.16	1.19	0.00	0.00	0.12	12.34	17.49	3.51	126.30
35.38	2.29	3.17	0.66	0.17	0.24	0.27	7.01	8.58	1.74	121.13
42.24	6.56	8.71	6.64	1.23	1.76	0.77	20.33	19.83	14.59	68.42
50.94	1.14	2.14	0.39	0.22	0.12	0.10	1.93	36.90	1.68	384.95
54.23	0.46	1.80	0.66	0.11	0.40	0.07	0.89	8.89	1.74	139.29
59.23	16.09	53.44	41.98	1.43	9.71	2.42	71.33	169.44	120.23	91.50
61.59	0.40	1.44	0.37	0.00	0.00	0.00	1.85	17.98	1.53	310.45
66.12	6.61	12.21	8.47	2.80	1.77	2.44	12.26	63.02	17.35	94.26
70.93	5.58	23.13	19.33	0.57	2.28	0.32	22.49	89.99	95.50	134.36
71.61	15.60	16.00	15.52	5.72	1.00	6.20	36.45	100.14	28.00	88.53
71.97	4.18	14.53	4.54	0.64	1.09	0.74	15.06	114.82	11.07	204.19
72.95	4.54	11.86	4.21	0.98	0.88	1.48	9.20	169.47	15.12	310.29
81.12	124.93	140.24	120.04	28.06	66.09	17.94	264.11	247.98	193.61	44.74
81.17	22.69	86.61	43.79	3.96	10.52	6.27	183.99	349.05	223.00	134.61
82.20	2.42	3.90	2.41	0.34	0.00	0.31	9.51	9.26	6.05	80.42
85.55	7.01	17.59	16.89	0.00	0.35	0.46	33.16	95.49	114.70	176.83
88.10	1.71	3.48	1.35	0.00	0.31	0.00	8.09	13.53	4.56	110.75
90.97	3.95	10.46	3.76	0.09	0.17	0.11	31.74	30.86	12.94	132.93
92.59	70.43	118.11	80.51	6.34	27.73	9.53	264.37	251.15	157.41	69.22
93.67	4.90	9.25	7.41	1.73	3.37	2.25	9.78	38.61	16.02	86.26
94.64	110.74	137.15	102.53	50.14	11.65	43.96	202.24	333.18	189.41	46.56
95.03	94.40	182.12	126.20	30.11	59.86	33.80	237.77	315.42	278.31	50.60
95.43	1.68	4.69	2.33	0.09	1.31	0.28	9.05	9.02	5.77	84.46
96.06	2.80	3.67	1.83	0.59	1.39	0.58	14.83	8.25	4.28	83.52
96.47	1.64	7.97	2.81	0.13	0.18	0.12	7.18	14.86	10.76	96.80
100.47	17.64	33.37	20.28	0.86	2.76	0.65	100.50	77.67	58.70	90.83
100.80	34.62	106.37	52.75	1.06	20.40	0.75	159.07	243.45	140.25	84.83
103.04	24.72	30.46	29.96	5.86	1.78	12.11	66.21	62.86	56.55	52.69
103.68	63.06	130.87	78.88	30.49	59.00	47.34	114.87	190.95	122.95	43.10
103.96	0.80	2.32	2.22	0.20	0.81	0.69	3.97	5.18	9.28	83.85
108.38	0.08	1.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79	4.95	0.00	213.34
109.26	2.14	10.22	6.14	0.54	2.54	0.20	3.59	23.04	14.51	82.64
113.43	4.34	24.98	16.43	0.34	1.64	1.78	20.40	62.03	57.77	103.08
116.72	2.19	5.52	1.69	0.53	0.47	0.46	5.09	16.37	3.37	105.49
117.21	2.85	4.23	1.67	0.50	0.14	0.09	10.97	10.35	5.37	86.31
122.14	2.32	5.90	3.04	0.11	0.36	0.21	19.93	24.92	11.28	129.95
123.51	21.70	37.07	18.86	4.46	3.06	2.60	96.42	93.24	34.71	77.38
123.75	27.15	29.99	23.56	8.12	15.86	6.66	125.96	87.91	35.20	69.70
125.68	14.41	43.70	26.27	2.79	5.14	3.32	51.06	80.35	93.81	80.16
126.04	9.14	17.36	8.09	3.22	2.22	1.27	39.16	51.42	22.58	85.74
127.93	1.33	6.83	3.58	0.14	2.27	1.27	3.59	14.70	8.65	80.48
128.91	2.41	7.75	5.65	0.56	0.56	0.91	7.34	27.75	14.28	103.09
130.90	7.46	24.98	8.63	0.35	1.57	0.56	57.48	93.23	37.03	125.80

Tabel 5.6. Komponente waarvan die konsentrasies gemiddeld die hoogste is in seisoen 3 (in ng/mg kliermateriaal).

Komp. no	Gem 1	Gem 2	Gem 3	Min 1	Min 2	Min 3	Max 1	Max 2	Max 3	RSTDV
6.02	1.17	1.00	1.86	0.44	0.00	0.09	4.52	6.78	7.87	122.29
13.76	0.46	0.59	1.03	0.09	0.04	0.22	0.93	1.53	3.30	79.31
15.57	0.62	0.31	0.79	0.09	0.00	0.12	5.55	0.84	4.23	159.96
34.67	3.50	1.96	4.48	0.55	0.73	0.34	9.67	5.10	12.55	91.04
35.22	2.86	4.11	5.08	0.11	0.61	1.11	9.23	9.02	10.97	68.34
41.63	14.29	5.17	29.81	0.69	1.46	1.08	58.70	20.23	86.50	126.81
47.38	6.10	1.09	6.80	0.70	0.07	0.61	16.97	2.79	15.33	93.93
47.70	1.20	1.25	1.58	0.06	0.13	0.23	4.46	4.73	7.52	114.75
48.23	15.49	9.10	24.31	3.24	2.09	3.66	50.60	29.16	63.81	89.00
48.85	54.79	37.03	83.68	9.27	13.19	10.94	149.00	121.64	201.58	89.81
54.52	4.99	3.36	7.39	0.12	0.38	0.28	12.87	9.83	16.13	84.57
55.24	2.33	4.17	4.48	0.00	0.15	0.07	12.24	14.98	16.76	126.21
59.85	2.40	3.72	4.98	0.17	0.30	0.07	6.60	26.54	14.72	120.54
60.40	22.53	22.07	26.96	4.69	3.34	3.55	49.73	62.00	59.95	64.70
60.96	14.07	13.17	17.50	2.49	0.12	2.20	39.78	44.24	38.13	79.84
61.21	0.93	2.39	2.51	0.00	0.00	0.00	7.37	8.14	8.60	135.00
68.93	3.04	3.00	12.74	0.35	0.68	0.60	7.05	12.68	90.22	207.70
70.67	98.42	135.22	146.48	3.96	13.37	6.32	689.61	429.36	378.09	118.18
82.05	1.27	1.52	1.90	0.16	0.00	0.00	7.00	6.21	3.80	97.69
84.82	183.54	159.07	191.82	67.01	39.97	59.04	319.81	310.54	429.05	40.90
87.82	11.80	15.35	21.10	0.83	0.00	0.00	36.80	44.16	54.19	89.77
91.60	3.13	2.92	3.55	0.63	0.69	0.64	13.40	9.39	9.16	82.53
102.63	2.92	3.17	3.73	0.76	0.91	0.40	9.89	14.98	23.70	111.29
110.38	1.09	1.65	3.55	0.32	0.23	0.32	2.40	4.67	20.59	143.06
111.31	0.61	1.41	2.58	0.00	0.44	0.28	3.43	2.50	13.14	123.63
112.00	0.80	1.04	2.58	0.05	0.27	0.31	4.14	2.85	13.12	136.12
112.34	1.65	1.18	4.23	0.34	0.27	0.13	6.66	2.68	32.89	196.87
112.67	0.23	0.39	1.58	0.00	0.13	0.09	0.72	0.97	11.29	216.26
114.21	2.58	5.12	11.52	0.88	3.01	1.75	5.18	7.13	53.52	139.41
127.64	27.83	39.96	41.31	5.41	0.39	4.33	99.34	144.99	114.94	79.98

konsentrasies (Gem 1, 2 en 3), maksima (Maks 1, 2 en 3) en minima (Min 1, 2 en 3) van die komponente word in hierdie tabelle gelys. Vyf komponente van elke seisoenale kategorie is as voorbeelde gekies om die diverse seisoenale kwantitatiewe variasies wat voorkom te illustreer. Die gemiddelde konsentrasie van elkeen van hierdie komponente is afsonderlik vir die voorbeen- en agterbeen-monsters, in al drie seisoene, bereken. Die maksimum en minimum konsentrasies van elke komponent in die betrokke voorbeen- en agterbeen-monsters is saam met hierdie gemiddelde kwantiteite in Fig 5.4 tot Fig 5.6 grafies voorgestel. Fig 5.7 tot Fig. 5.9 toon die relatiewe konsentrasies van sekere van die komponente wat bespreek

word, soos wat hulle in die volgende kategorieë voorkom. Die eerste kategorie is dié komponente wat duidelike seisoenale patrone, asook verskille in hul relatiewe konsentrasies in die voorbeen- en agterbeen-monsters toon, byvoorbeeld Komponente 41.63, 48.23, 54.52, 100.80, 112.91 en 115.00. Die konsentrasies van Komponente 112.91 en 115.00 is gemiddeld hoër in seisoen 1, en is hoër in die agterbeen-monsters as in die voorbeen-monsters (Fig. 5.4). Die konsentrasie van Komponent 100.80 is weer gemiddeld hoër in seisoen 2, en is hoër in die voorbeen-monsters as in die agterbeen-monsters (Fig. 5.5). Die konsentrasies van Komponente 41.63, 48.23 en 54.52 is gemiddeld hoër in seisoen 3, en is hoër in die voorbeen-monsters as in die agterbeen-monsters (Fig. 5.6). Dit is byvoorbeeld duidelik dat die minimum voor- en agterbeen konsentrasies van Komponent 54.52 in seisoen 3, laer is as die ooreenstemmende minima van seisoen 2, en ook laer is as die voorbeen minimum van seisoen 1. Dit illustreer dus dat die konsentrasie van hierdie komponent by sekere akkedisse die laagste in seisoen 3 kan wees (byvoorbeeld monster 2F3<2F2), al is hierdie komponent se konsentrasie gemiddeld hoër in hierdie seisoen (Fig. 5.6 en 5.7).

Die tweede kategorie is dié van Komponente 65.87, 71.61, 81.12 en 87.82 waarvan die gemiddelde, maksimum en minimum konsentrasies in die voorbeen-monsters hoër is as in die ooreenstemmende waardes van die agterbeen-monsters. Op die oog af kom die variasie in die seisoenale gemiddeldes as nie besonder beduidend voor nie. Die konsentrasies van Komponente 65.87 en 87.82 is gemiddeld hoër in onderskeidelik seisoen 1 en 3, terwyl die konsentrasies van Komponente 71.61 en 81.12 gemiddeld hoër is in seisoen 2. As die grafiese voorstellings van die betrokke kwantiteite van byvoorbeeld Komponent 65.87 (Fig. 5.4 en 5.7) beskou word, kan gesien word dat die maksimum konsentrasies van hierdie komponent, in beide die voorbeen- en agterbeen-monsters, hoër is in seisoen 2 as in seisoen 1. Dit is dus duidelik dat hierdie verbinding nie noodwendig in 'n hoër konsentrasie in die eerste seisoen voorkom nie, maar slegs gemiddeld hoër is in hierdie seisoen.

Die laaste kategorie sluit in Komponente 28.07, 46.89, 66.12, 123.75 en 47.38 wat óf seisoenaal, óf tussen voorbeen- en agterbeen-monsters, 'n onduidelike patroon van relatiewe konsentrasies toon. Die konsentrasies van Komponente 28.07 en 46.89 is gemiddeld hoër in seisoen 1. Komponent 46.89 toon 'n baie duidelike seisoenale patroon, maar nie so 'n duidelike patroon wat die voor- en agterbene betref nie (Fig.5.4). Die konsentrasie van Komponent 28.07 is gemiddeld hoër in die voorbeen-monsters, maar die hoogste konsentrasie wat in enige van die analyses voorkom, is die maksimum konsentrasie in 'n agterbeen-monster

(8H1) in seisoen 1 (Fig. 5.4 en 5.9). Voorbeelde van komponente in hierdie kategorie waarvan die konsentrasies gemiddeld hoër in seisoen 2 is, is komponente 66.12 en 123.75. Die voor- en agterbeen konsentrasies van Komponent 123.75 gee verskillende patrone in elke seisoen, en al is hierdie komponent se konsentrasie gemiddeld hoër in seisoen 2, is die maksimum konsentrasie wat voorkom, gevind in seisoen 1 (Fig. 5.5 en 5.9). Laastens is die konsentrasie van Komponent 47.38 gemiddeld hoër in seisoen 3, maar die hoogste konsentrasie van hierdie komponent, en ook die hoogste gemiddelde voorbeen konsentrasie daarvan, kom egter in seisoen 1 voor (Fig. 5.6 en 5.9). Die voor- en agterbeen kwantiteite gee ook verskillende patrone in elke seisoen.

Daar is sommige komponente waarvan die variasie in meer as een van hierdie sogenaamde kategorieë ingedeel kan word, wat dit nog moeiliker maak om tot 'n algemeen aanvaarbare slotsom te kom.

### **Gevolgtrekkings**

In die kwantitatiewe analise van die femorale klierafscheidings (Hoofstuk III) was daar duidelike patrone tussen mannetjies en wyfies waargeneem. Hoewel daar soms groot verskille tussen die femorale klierafscheidings van individue van dieselfde geslag waargeneem is, kon daar nie duidelike patrone waargeneem word nie. Aangesien die generasiekliere net by die mannetjies voorkom, kon slegs die individuele variasie ondersoek word waar, net soos by die femorale kliere, redelike komplekse verskille waargeneem is. Met die inligting wat in hierdie ondersoek aan die lig gekom het sal etoloë moontlik in gedragstudies waarin die natuurlike afscheidings en sintetiese monsters gebruik word, kan vasstel watter chemiese verbindings in semiochemiese kommunikasie by die akkedisse aangewend word en of die kompleksiteit van die afscheidings enige semiochemiese implikasies het.

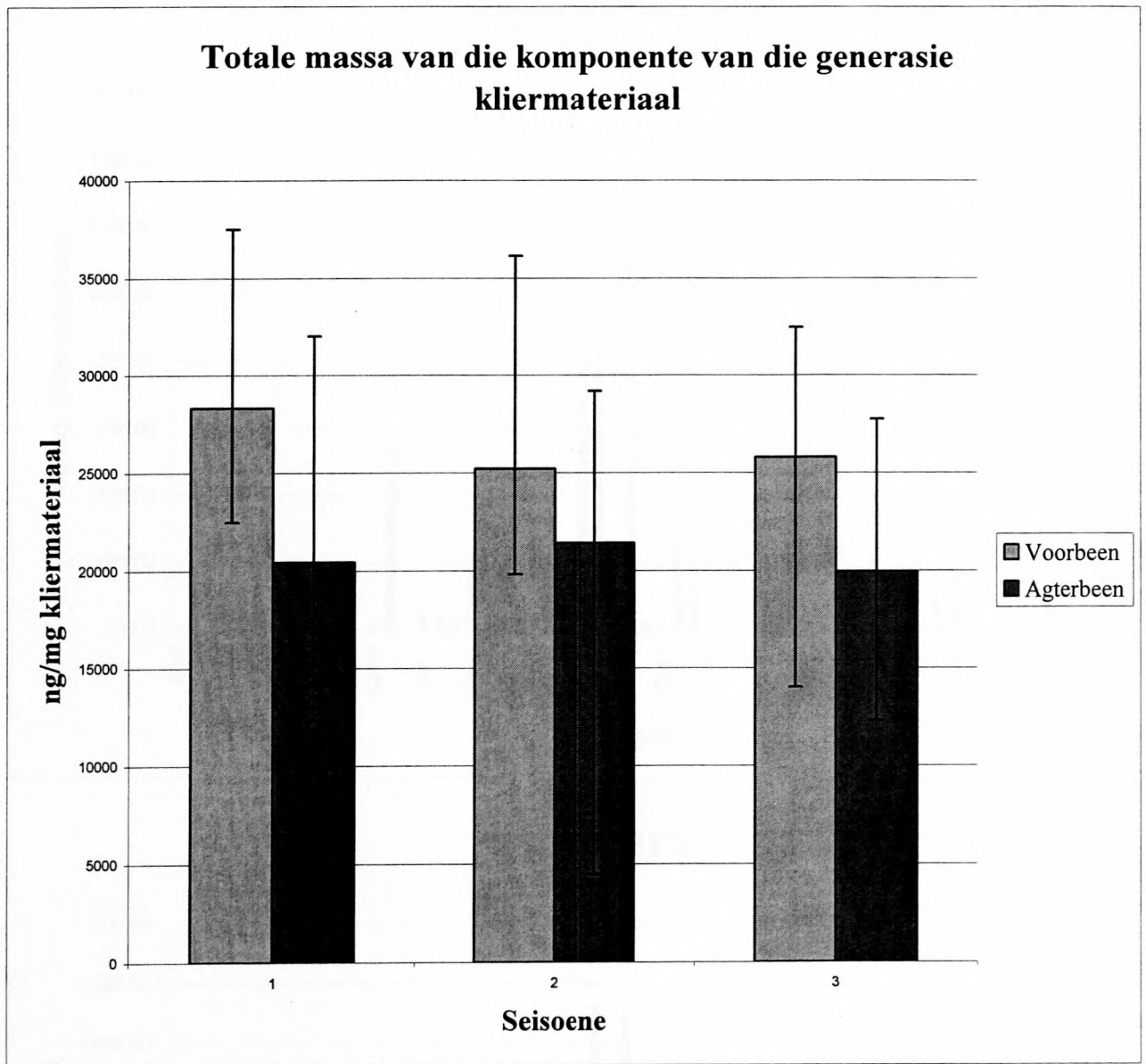


Fig. 5.1 Gemiddeldes, maksima en minima van die totale massas van die komponente van die onderskeie generasie klier monsters van die voor- en agterbene, in die drie seisoene.

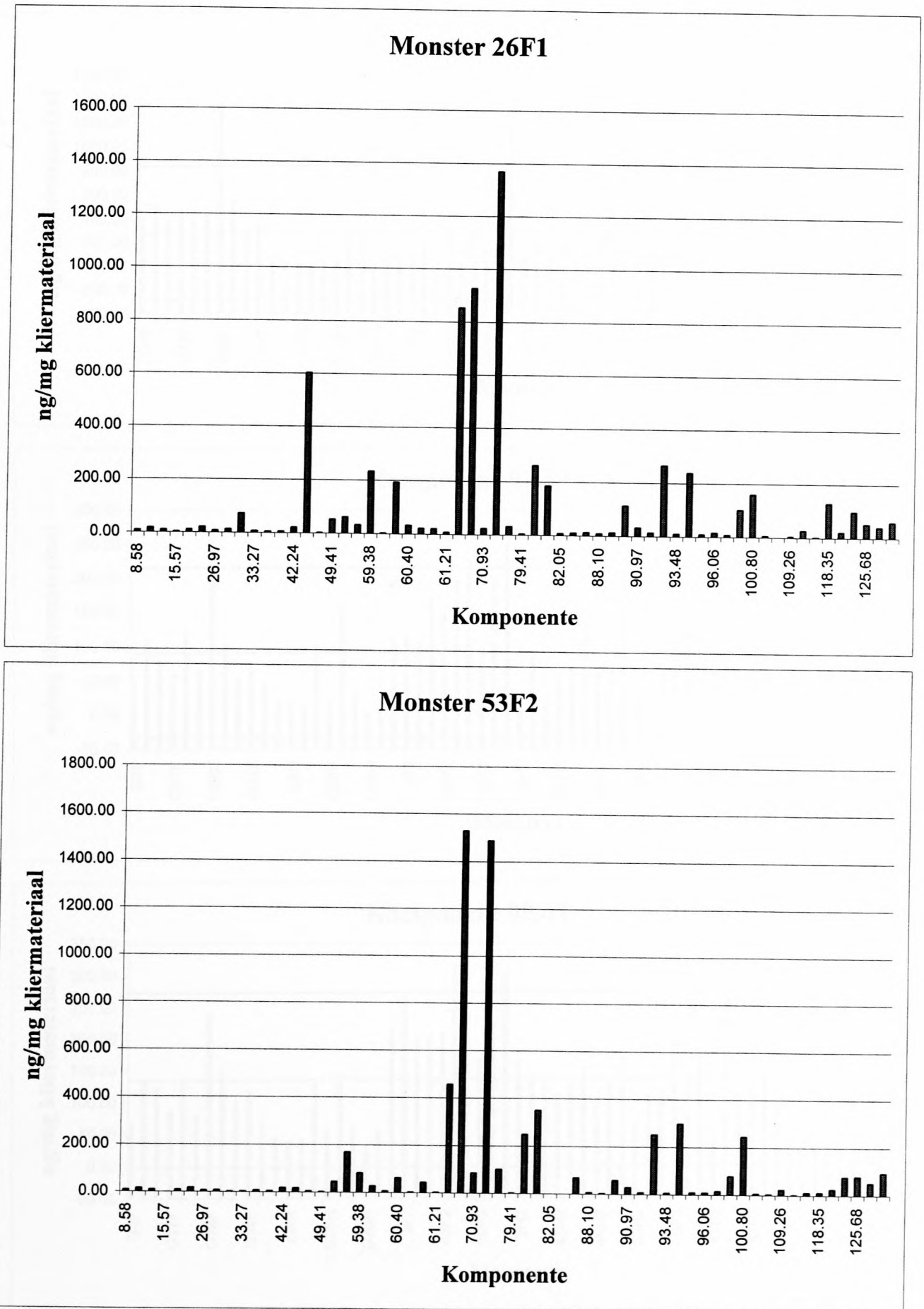


Fig. 5.2. Grafiese voorstelling van die relatiewe konsentrasies van die komponente wat statisties beduidende waardes in hierdie monsters toon.



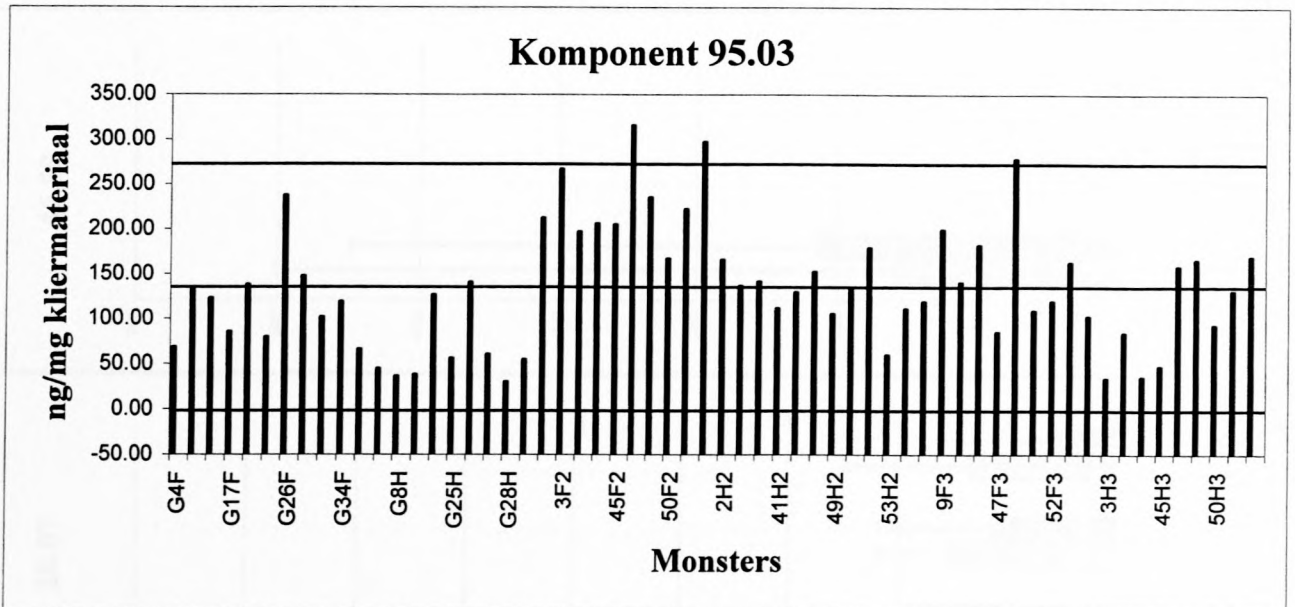
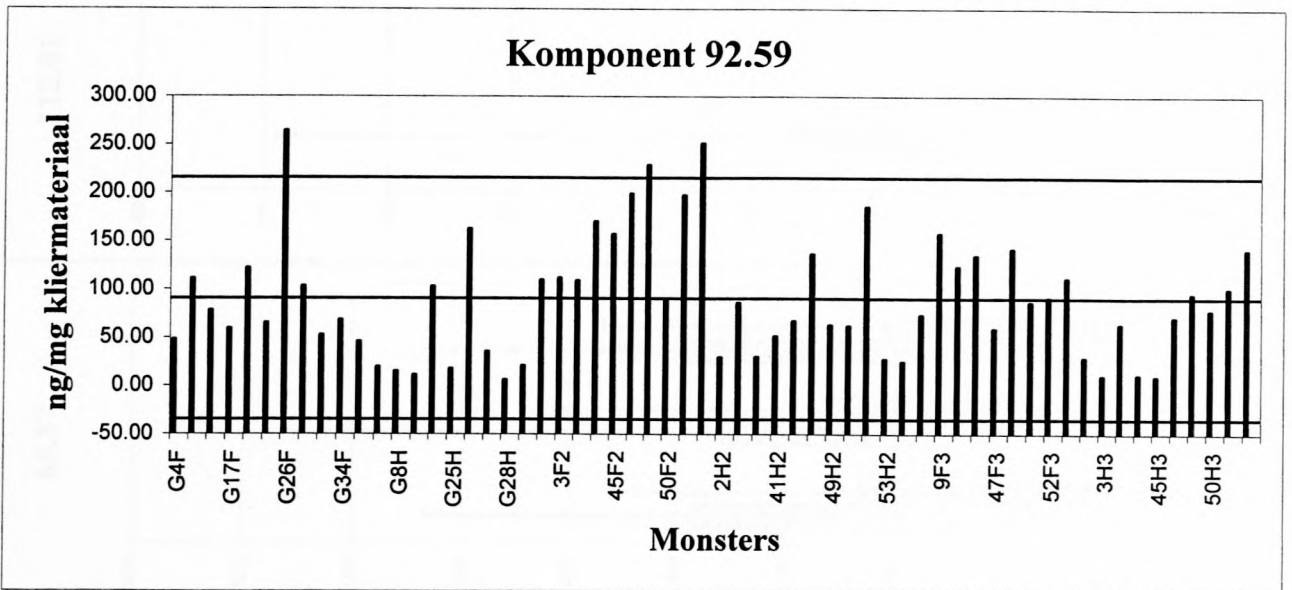
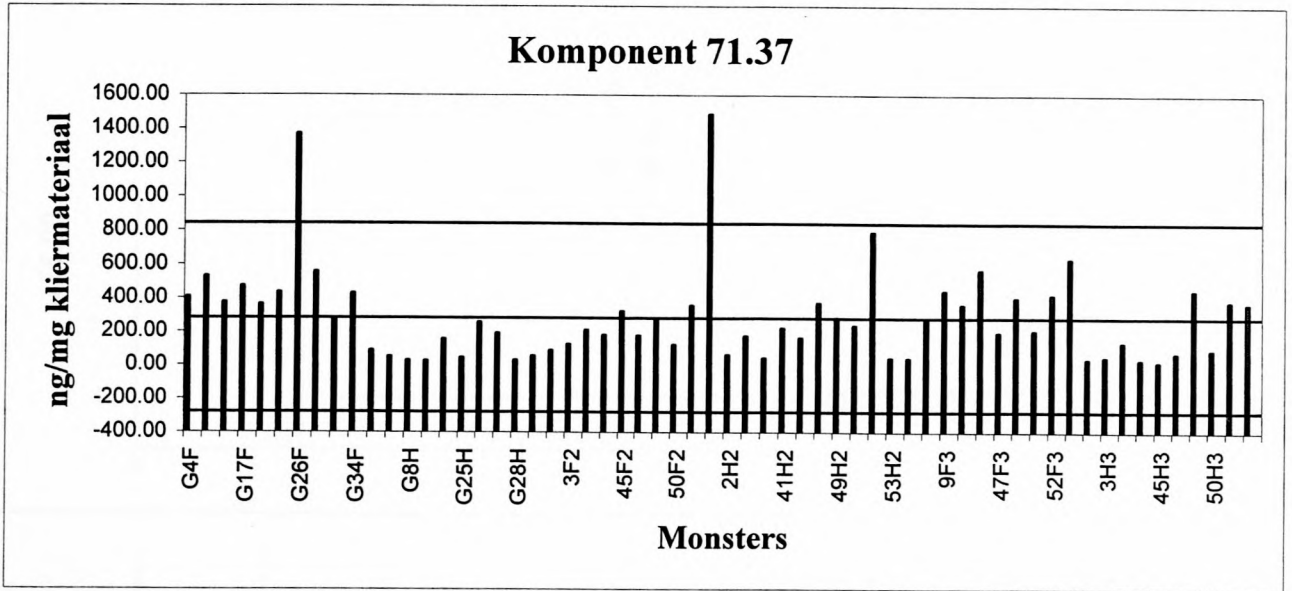


Fig. 5.3. Grafiese voorstelling van die konsentrasies van 'n paar komponente in al 60 monsters. Die horisantale lyne (van bo na onder) is die betrokke  $X + 2s$ ,  $X$  en  $X - 2s$  waardes.

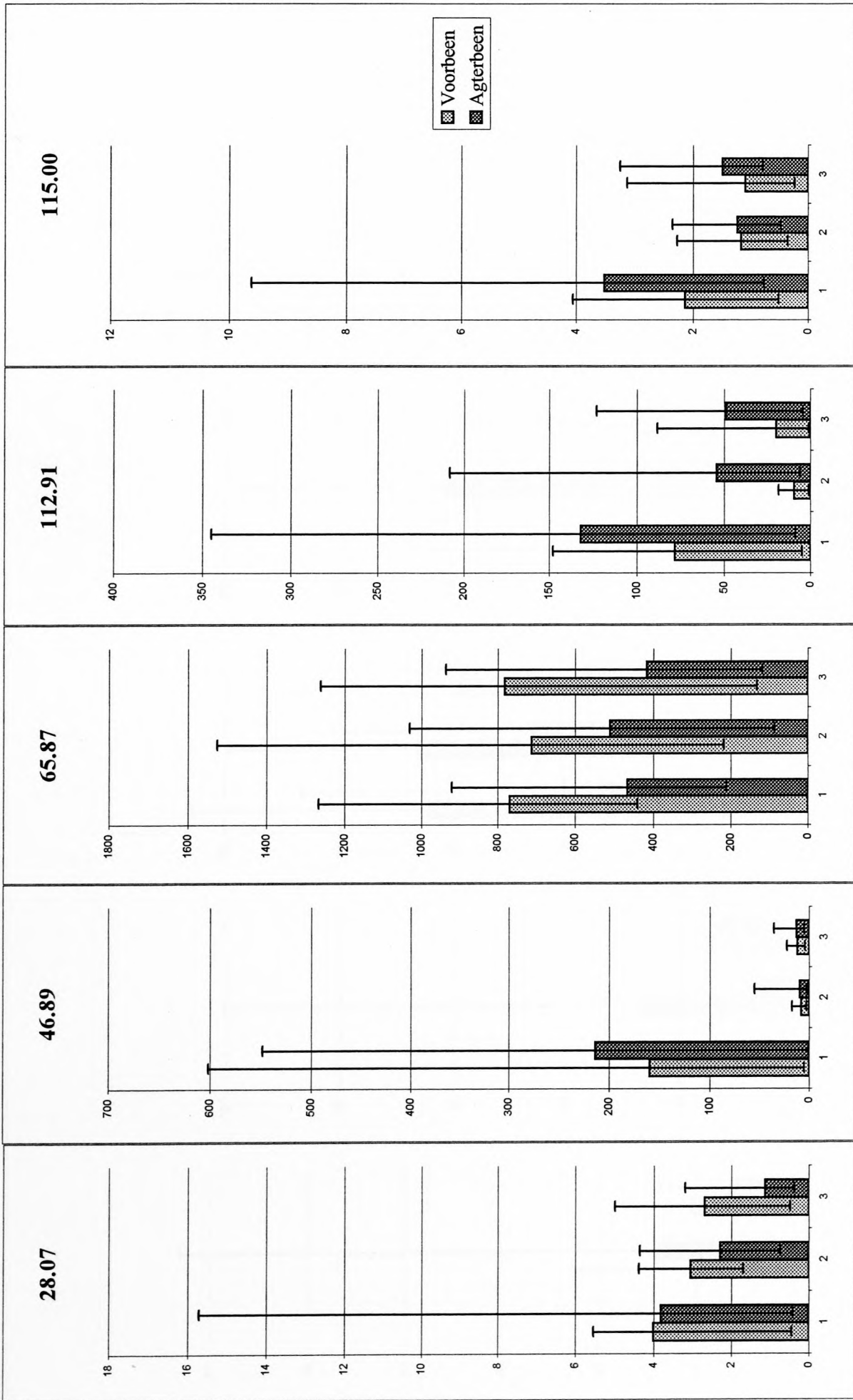


Fig. 5.4. Grafiese voorstelling van die gemiddelde, maksimum en minimum konsentrasies van die monsters van die kliere op die voor- en agterbene in die drie seisoene. Die gemiddelde konsentrasies van hierdie paar komponente (oor al 60 analyses) is die hoogste in seisoen 1.

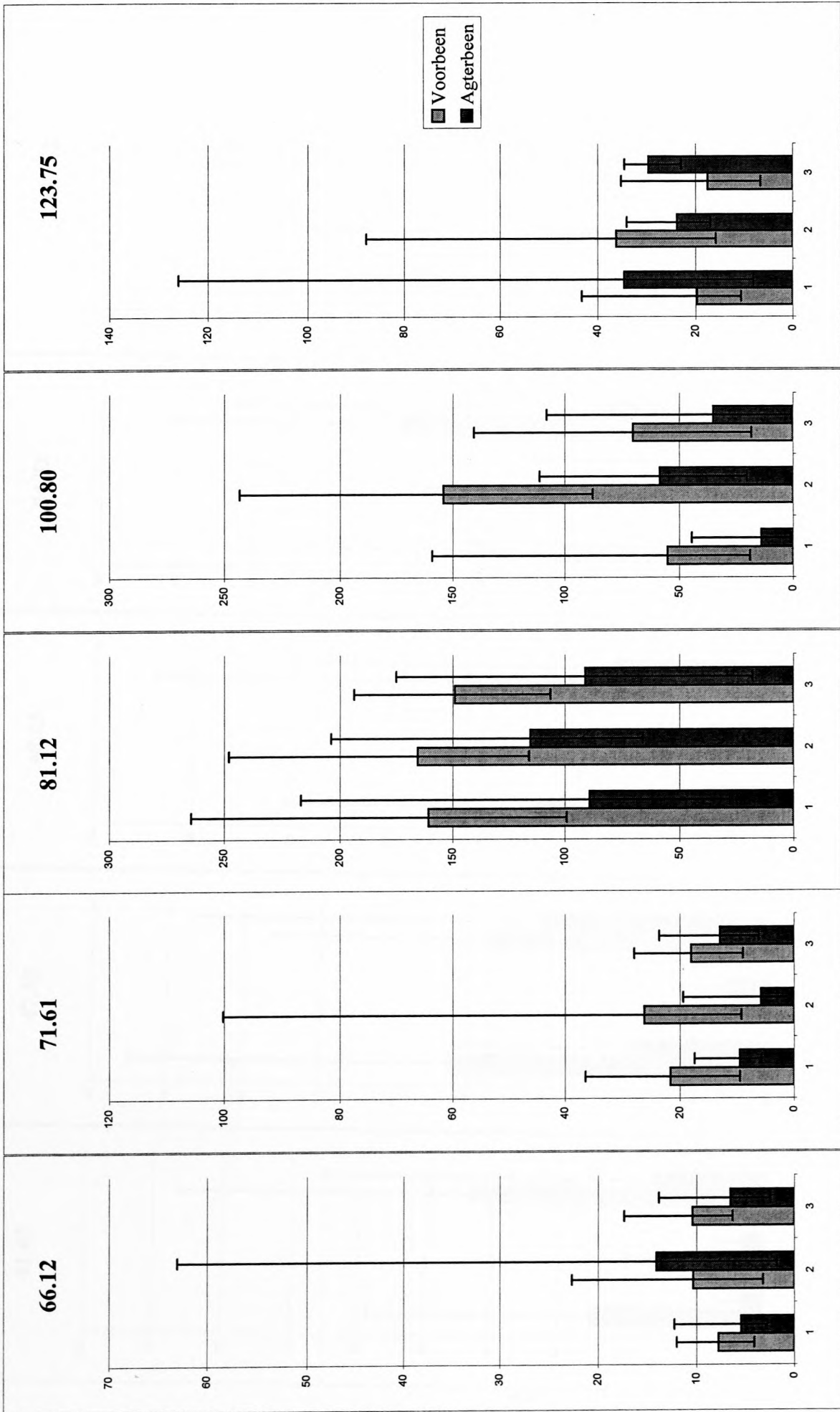


Fig. 5.5. Grafiese voorstelling van die gemiddelde, maksimum en minimum konsentrasies van die monsters van die kliere op die voor- en agterbene in die drie seisoene. Die gemiddelde konsentrasies van hierdie paar komponente (oor al 60 analyses) is die hoogste in seisoen 2.

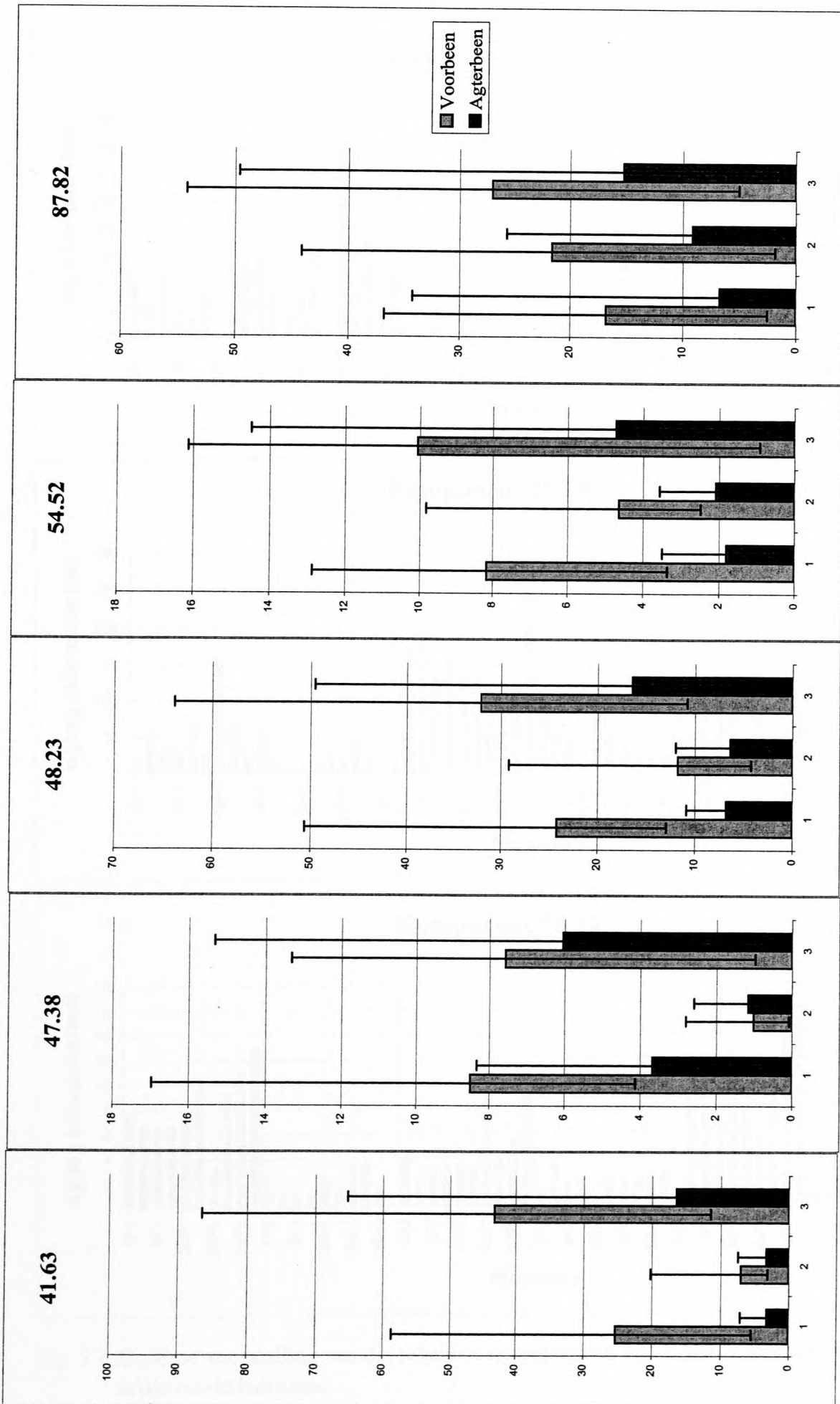


Fig. 5.6. Grafiese voorstelling van die gemiddelde, maksimum en minimum konsentrasies van die monsters van die kliere op die voor- en agterbene in die drie seisoene. Die gemiddelde konsentrasies van hierdie paar komponente (oor al 60 analyses) die hoogste in seisoen 3.

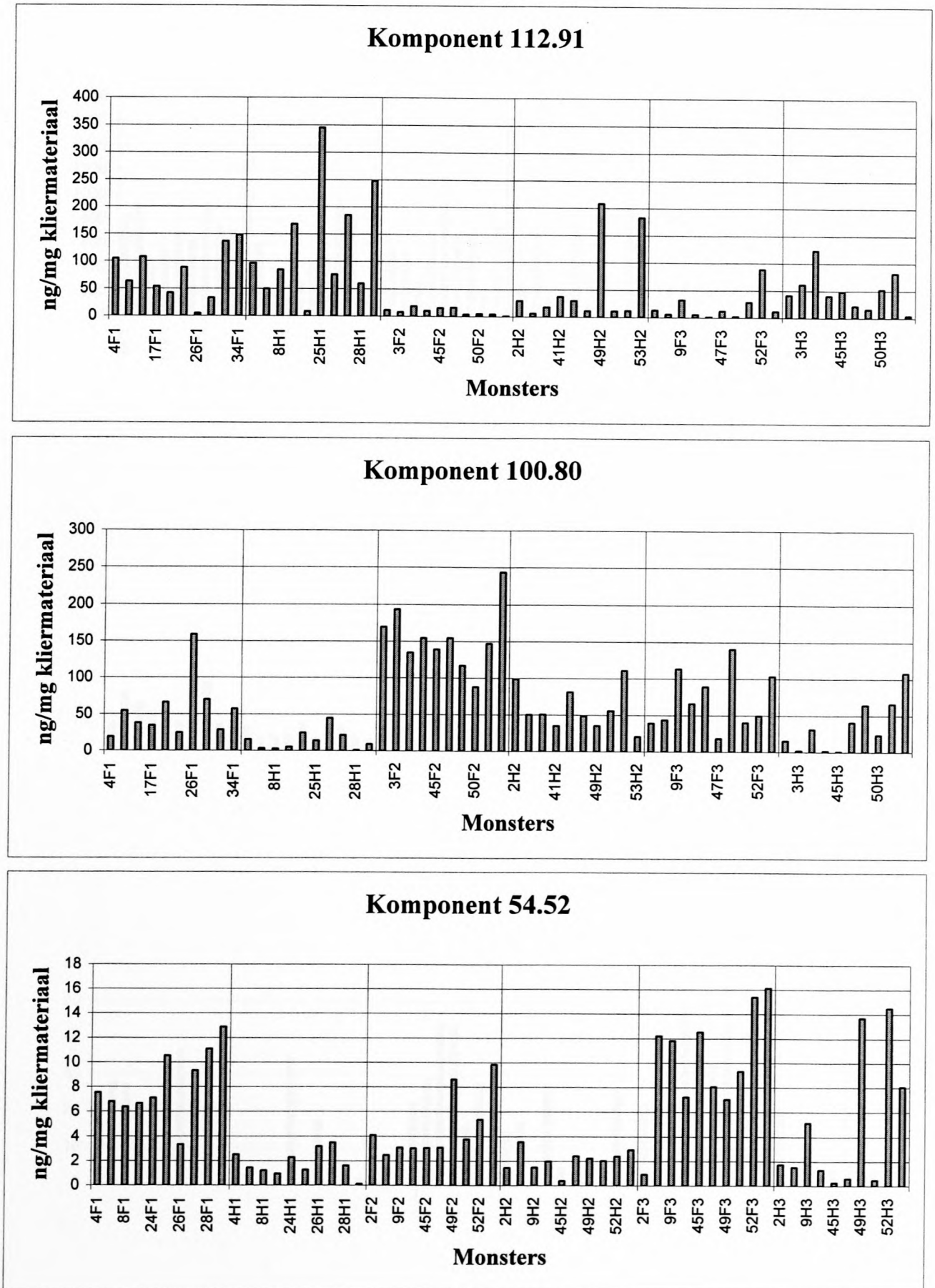


Fig. 5.7. Grafiese voorstelling van die relatiewe konsentrasies van 'n paar komponente in die eerste kategorie.

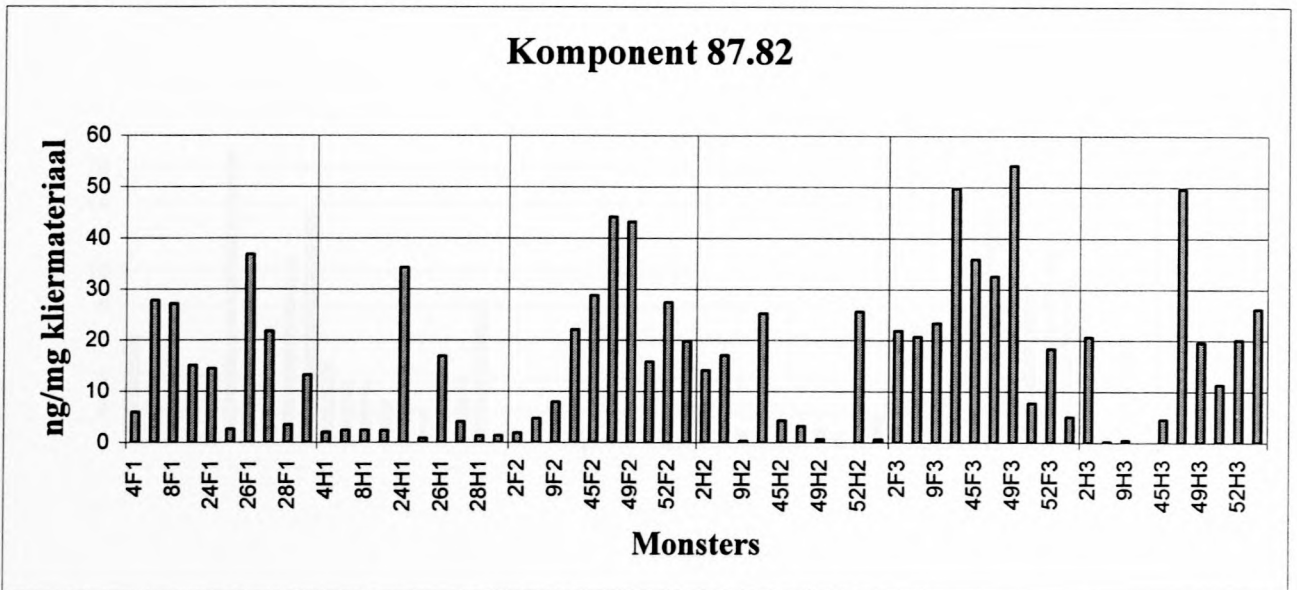
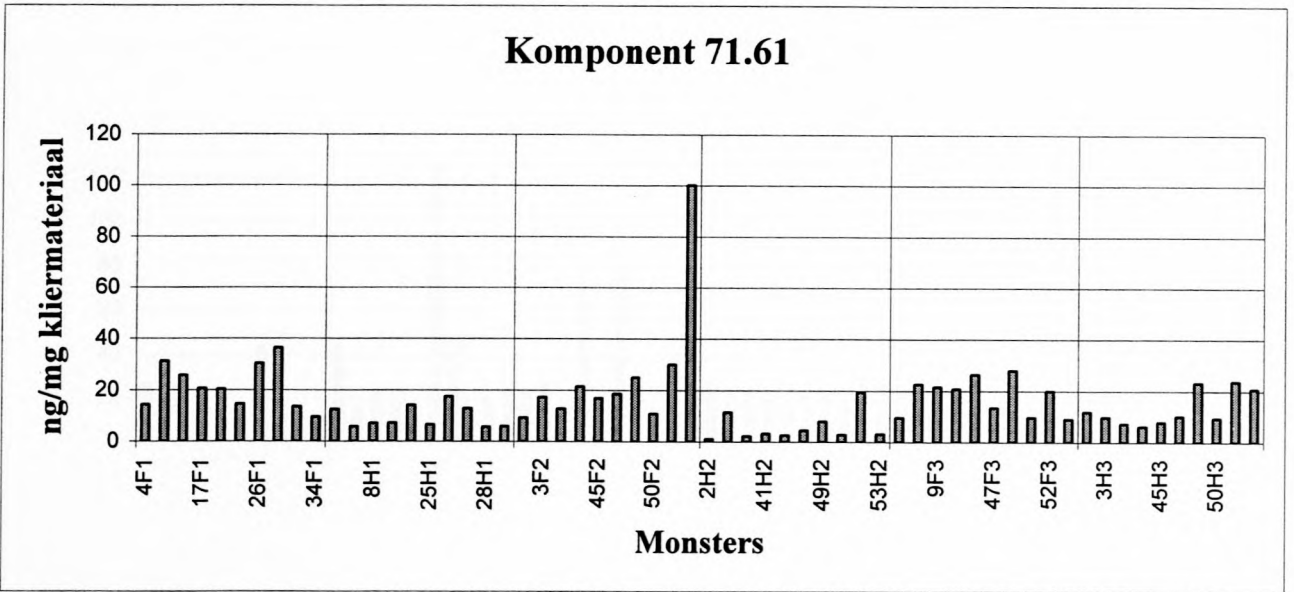
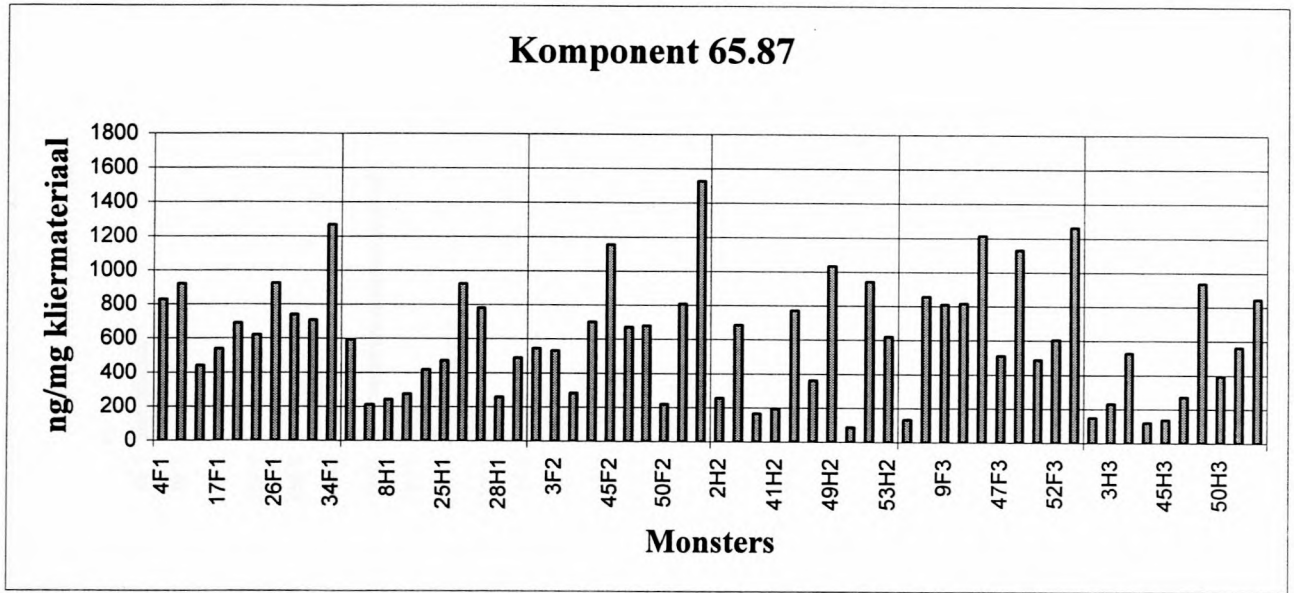


Fig. 5.8. Grafiese voorstelling van die relatiewe konsentrasies van 'n paar komponente in die tweede kategorie.

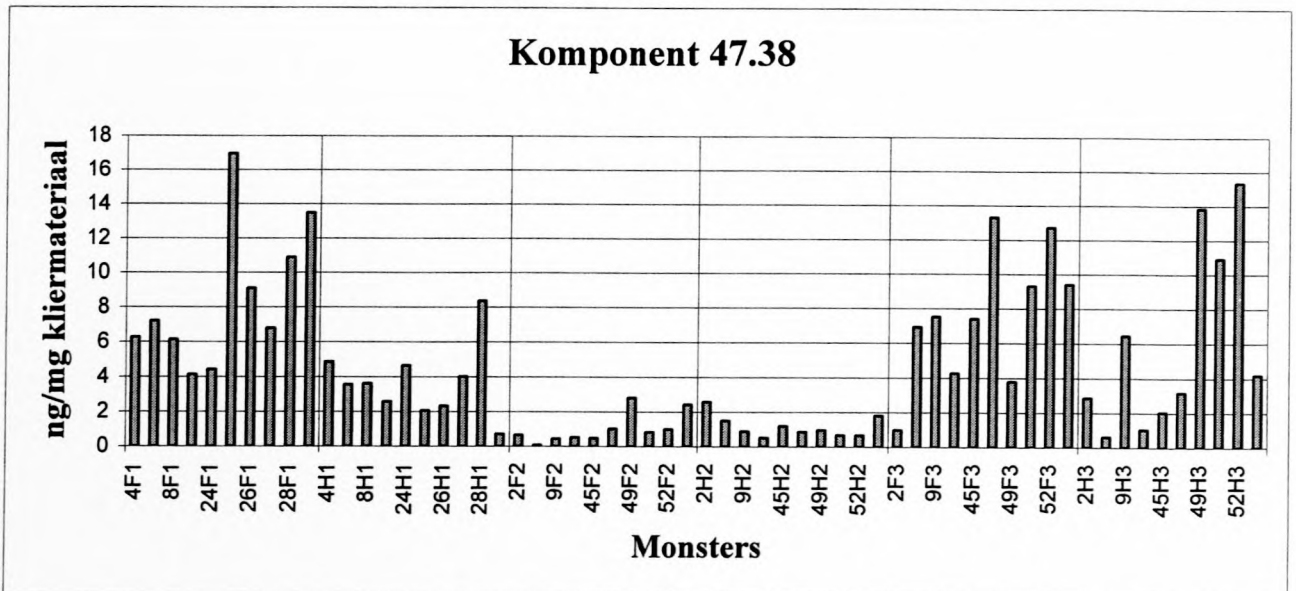
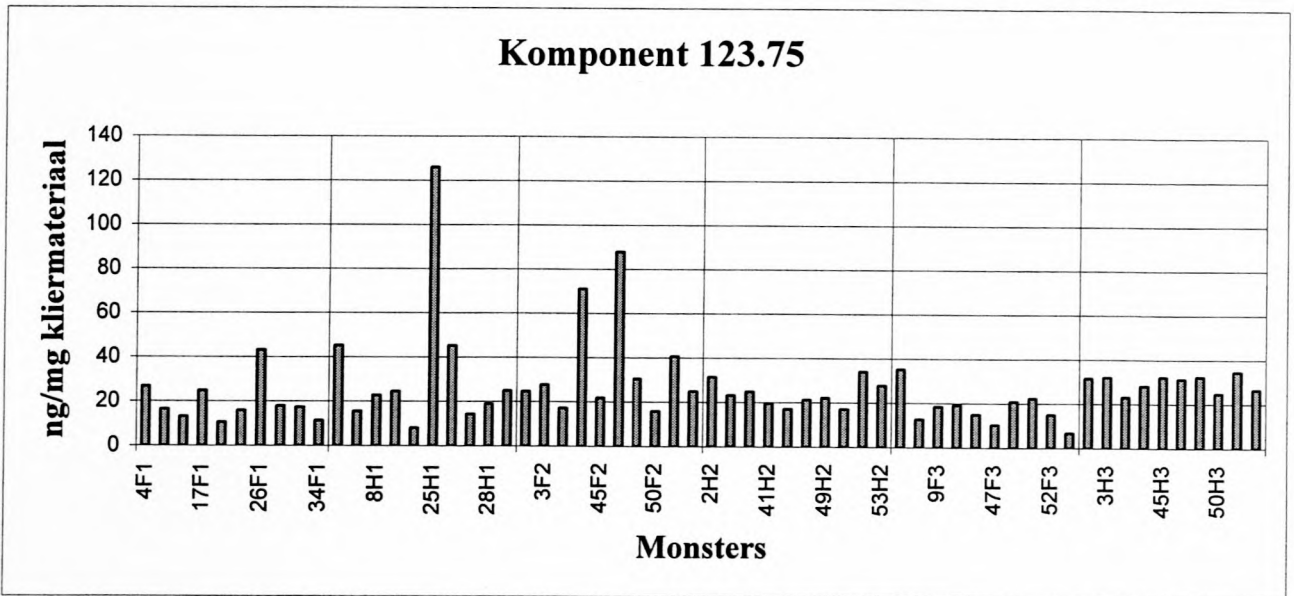
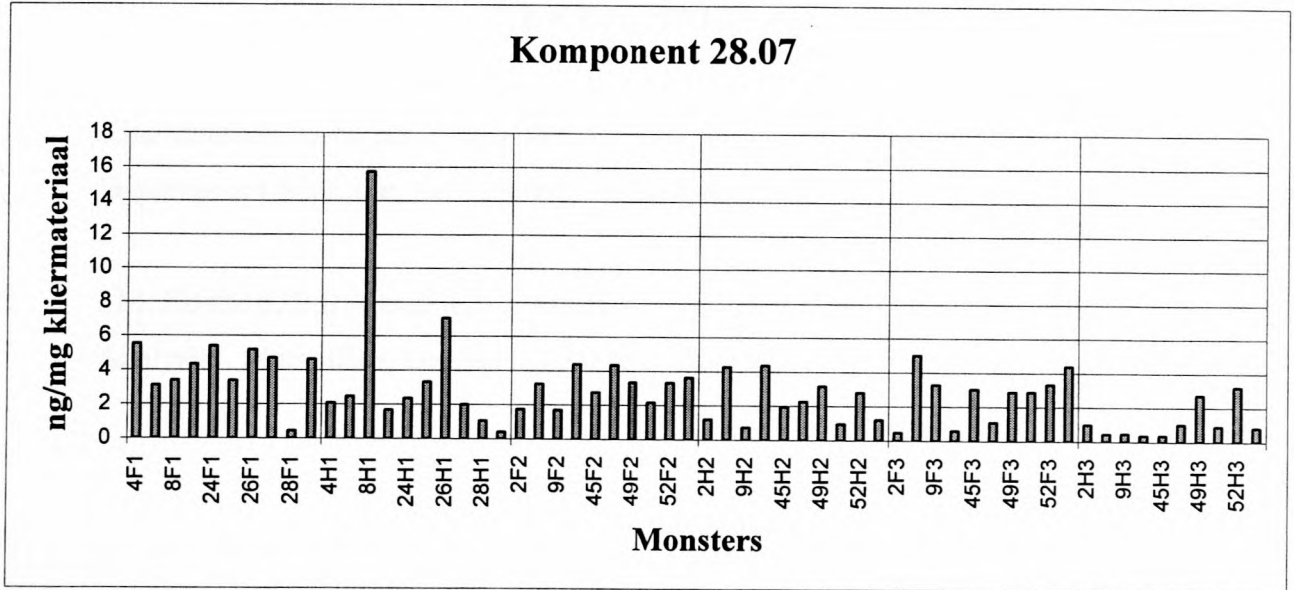


Fig. 5.9. Grafiese voorstelling van die relatiewe konsentrasies van 'n paar komponente in die derde kategorie.

**VERWYSINGS**

1. Klier materiaal is versamel deur Mnr. L. Ruddock, 'n M.Sc.-student van die Departement Soölogie, Universiteit van Stellenbosch.
2. I.M. Kolthoff, E.B. Sandell, E.J. Meehan en S. Bruckenstein, "Quantitative Chemical Analysis", Macmillan, Londen (1969), pp. 380-395.



## HOOFSTUK VI

**CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE FEMORALE  
KLIERAFSKEIDING VAN DIE KAAPSE GORDELAKKEDIS**

Die Kaapse gordelakkedis, *Cordylus cordylus*, is 'n klein akkedis met 'n lengte van snoet tot kloak wat normaalweg wissel vanaf 65 mm tot 85 mm, hoewel 'n lengte van 98 mm ook al aangeteken is. Die akkedis het 'n afgeplatte liggaam met 'n driehoekige, afgeplatte kop en is gepantser met skubbe, waarvan dié op die stert doringagtig is. Die Kaapse gordelakkedis het gewoonlik 'n vaal- tot rooibruin kleur met oneweredige donker merke en met 'n vaal geel tot vaal rooi-bruin maag. In sommige gevalle kom daar ook oneweredige roomkleurige strepe op die rug voor. Figuur 6.1 is 'n foto van die Kaapse gordelakkedis.

Die Kaapse gordelakkedis leef in kolonies in gebiede waar daar klipskeure is om in te skuil. Hulle is aktief gedurende die vroeë oggend en aand, en die heel dag as dit bewolk is, wanneer hulle op soek is na insekte om te eet. *C. cordylus* se habitat in die binneland is die bergagtige graslande van die Noordoos-Kaap en Suidoos-Vrystaat en ook Transkei (Oos-Kaap). Teen die kus strek hul habitat vanaf Saldanha tot in Oos-Londen, maar hulle kom nie in die omgewing van George en Witelsbos voor nie. *C. cordylus* het in aanhouding 'n leeftyd van tot 15 jaar.<sup>1</sup>



Fig. 6.1: Die Kaapse gordelakkevis, *Cordylus cordylus*.

## Chemiese karakterisering van die afskeiding

Op elke dy van die Kaapse gordelakkedis kom daar 4 tot 10 femorale porieë voor.<sup>1</sup> Die femorale klierafskeidings van mannetjie en wyfie akkedisse is in die veld in die Wes-Kaap net buite Stellenbosch versamel, deur die afskeidings met behulp van 'n haartangetjie uit die femorale kliere te druk. Die dichlorometaanekstrakte van die afskeidings is met behulp van GC en GC-MS geanaliseer. 'n Kapillêre glaskolom wat met die apolêre stasionêre fase PS-089-OH belaag is, is vir die analyses gebruik.

Die komponente van die afskeiding is soos in die geval van die femorale en generasiekliere van *C. giganteus* tentatief op grond van massaspektrometriese data geïdentifiseer en die identifikasie is deur gaschromatografiese en massaspektrometriese vergelyking met sintetiese materiaal bevestig.

Die gaschromatogram in Figuur 6.2 a en b van 'n dichlorometaanekstrak van die femorale klierafskeiding van 'n mannetjie akkedis, sal as verwysing gebruik word in die bespreking van die identifikasie van die verskillende komponente van die afskeiding. Die nommers van die pieke in die totale-ioonstroomchromatogram (TIC) is die nommers van die massaspektra wat in die betrokke GC-MS analise teen een spektrum per sekonde opgeneem is en sal gebruik word om na die verbindings in die afskeiding te verwys.

### Versadigde alifatiese karboksielsure

Die EI-massaspektra van Komponente 1695, 1930, 2197, 2447, 2725, 2980, 3244 en 3754 van die femorale klierafskeiding van *C. cordylus*, toon almal prominente ione by onder andere  $m/z$  60, 73, 129 en 185 (Kyk na soortgelyke massaspektra in Hoofstuk II, Fig. 2.5 tot 2.11 en Fig. 2.13), terwyl ione wat moontlik die molekulêre ione kan wees by onderskeidelik  $m/z$  228, 242, 256, 270, 284, 298, 312 en 340 voorkom. Deur vergelyking van hierdie massaspektra met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding van *C. giganteus* voorkom, en deur hul relatiewe retensietye in aanmerking te neem, is Komponente 1695, 1930, 2197, 2447, 2725, 2980, 3244 en 3754 onderskeidelik as tetradekanoë-, pentadekanoë-, heksadekanoë-, heptadekanoë-, oktadekanoë-, nonadekanoë-, ikosanoë- en dokosanoësuur geïdentifiseer. Die identifikasie is deur retensietydvergeelyking met sintetiese standaard bevestig.

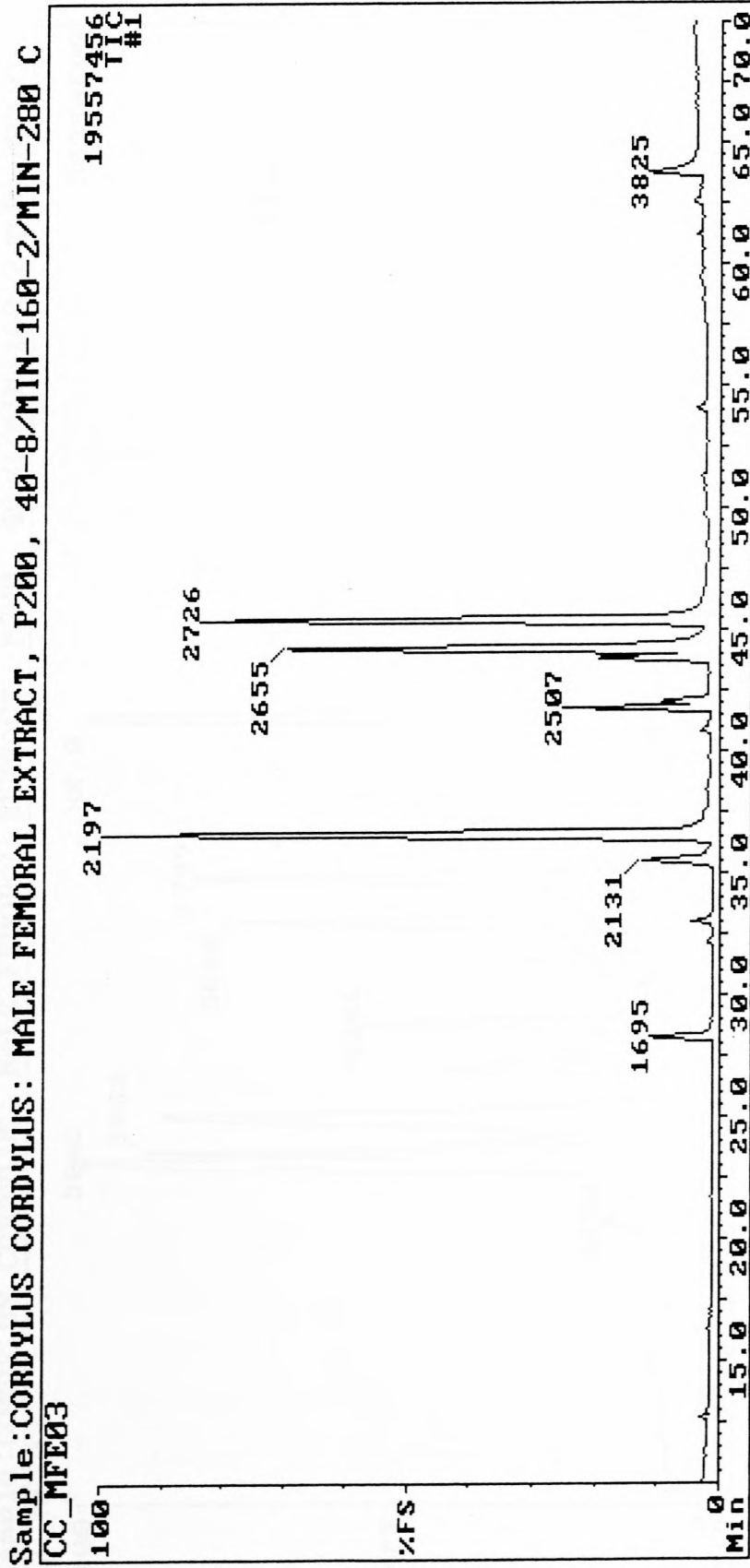


Fig. 6.2 a: Totale ionstroom gaschromatogram van die dichlorometaan ekstrakt van die femorale klierafskeiding van die Kaapse gordelakedis, met PS-089-OH as stasionêre fase.

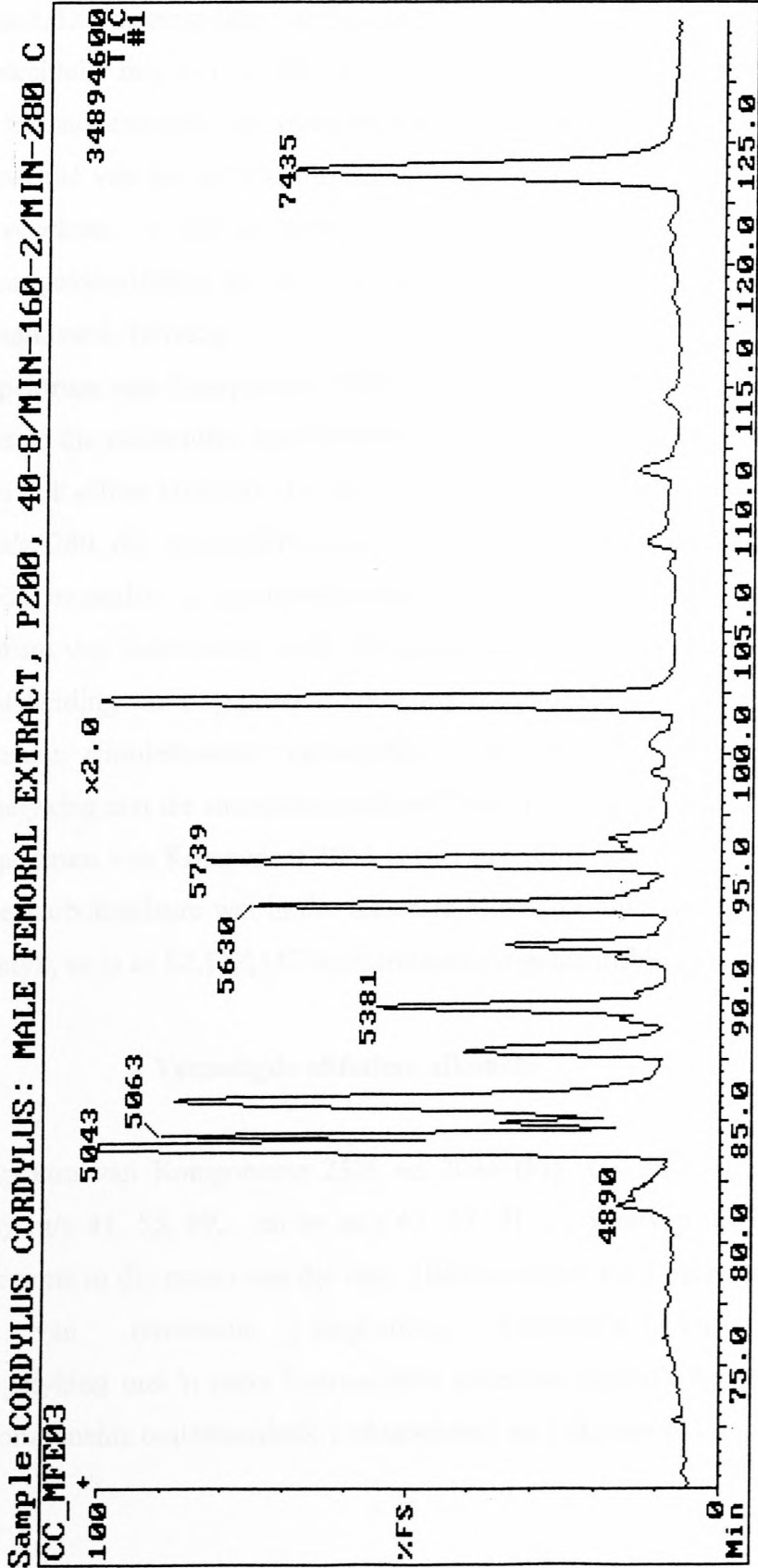


Fig. 6.2 b: Totale ionstroom gaschromatogram (vervolg) van die dichlorometaan ekstrak van die femorale klierafskeiding van die Kaapse gordelakkedis, met PS-089-OH as stasionêre fase.

### Onversadigde alifatiese karboksielsure

Die massaspektra van Komponente 2131, 2654, 2630 en 3064 (Fig. 2.17, 2.16, 2.22 en 2.23) toon ook die tipiese karboksielsuur ione by  $m/z$  60 en 73, maar die pieke is van laer intensiteit. Die massaspektra van Komponente 2131 en 2654 toon prominente pieke by onderskeidelik  $m/z$  236 en 264, en hul retensietye is effens korter as dié van onderskeidelik heksadekanoësuur en oktadekanoësuur. Deur vergelyking van hierdie massaspektra met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding van *C. giganteus* voorkom, is hierdie komponente as 9Z-heksadekanoësuur en 9Z-oktadekanoësuur geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensietydvergelyking met sintetiese standaard bevestig.

Die EI-massaspektrum van Komponent 2630 toon 'n prominente ioon by  $m/z$  280, wat 2 Da laer is as die molekulêre ioon van 9Z-oktadekanoësuur. Hierdie komponent se retensietyd is ook effens korter as dié van 9Z-oktadekanoësuur. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  280 die molekulêre ioon is, en daar is gevolglik vermoed dat Komponent 2630 moontlik 'n oktadekadiënoësuur kan wees. Deur vergelyking van die massaspektrum van Komponent 2630 met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding van *C. giganteus* voorkom, is hierdie komponent as 9Z,12Z-oktadekadiënoësuur (linoleïensuur) geïdentifiseer, en die identifikasie is deur retensietydvergelyking met die sintetiese standaard bevestig.

Die EI-massaspektrum van Komponent 3064 is met gepubliseerde massaspektra<sup>2</sup>, en met dié van die karboksielsure wat in die femorale klierafskeiding van *C. giganteus* voorkom, vergelyk, en is as 8Z,11Z,14Z-ikosatriënoësuur geïdentifiseer is.

### Versadigde alifatiese alkohole

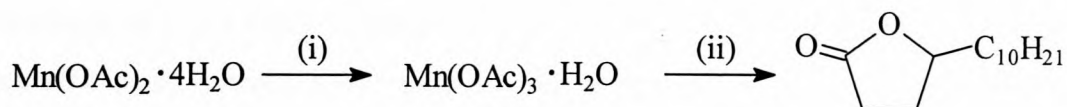
Die EI-massaspektra van Komponente 2506 en 3046 (Fig. 6.3 en 6.4) toon twee reekse pieke by  $m/z$  41, 55, 69,... en by  $m/z$  43, 57, 71,..., waarvan die intensiteit afneem met toename in die massa van die ione. Hierdie reekse kom tipies voor in die massaspektra van onvertakte langketting 1-alkohole en 1-alkene. Retensietydvergelyking met 'n reeks kommersiële sintetiese alkohole het getoon dat bogenoemde komponente onderskeidelik 1-oktadekanol en 1-ikosanol is.

### Onversadigde alifatiese aldehyd

Die EI-massaspektrum van Komponent 1965 (Fig. 2.32) is met gepubliseerde data<sup>2</sup> vergelyk, waarvolgens dit as 'n  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyd geïdentifiseer is. Deur vergelyking van hierdie massaspektrum met dié van die onversadigde alifatiese aldehyd wat in die femorale en generasie klierafskeidings van *C. giganteus* geïdentifiseer is (Komponent 16 in Hoofstuk II), is die identifikasie van Komponent 1965 as 2E- of 2Z-heptadekenaal bevestig.

### $\gamma$ -Laktone

Die besonder prominente basispiek by  $m/z$  85 in die EI-massaspektra van Komponente 1978, 2522 en 3076 (Fig. 6.5, 4.17 en 6.6) aanwesig en die vergelyking van hierdie massaspektra met gepubliseerde data<sup>3</sup> het getoon dat hierdie komponente  $\gamma$ -laktone kan wees. Die ioon by  $m/z$  85 word gevorm deur die eliminasië van die  $\gamma$ -substituent van die laktoonring soos in Hoofstuk IV verduidelik. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  236 in die EI-massaspektrum van Komponent 2522 gevorm word deur die verlies van water uit die molekulêre ioon. Hierdie komponent se molekulêre massa is dus waarskynlik 254 Da, die molekulêre massa van heksadekaan-4-olied. Teen hierdie agtergrond en deur die vergelyking van Komponent 2522 se massaspektrum met dié van heksadekaan-4-olied wat in die generasieklierafskeiding van *C. giganteus* geïdentifiseer is, is hierdie komponent as heksadekaan-4-olied geïdentifiseer. Die M-18 ione is egter nie in die massaspektra van Komponente 1978 en 3076 waarneembaar nie, maar hierdie komponente is nogtans op grond van hul relatiewe retensietye as onderskeidelik tetradekaan-4-olied en oktadekaan-4-olied geïdentifiseer. Die identifikasie van hierdie komponente is deur retensietydvergelyking met sintetiese standaarde bevestig. Tetradekaan-4-olied is gesintetiseer volgens Reaksieskema VI-1 waar die mangaan(II)asetaat-tetrahidraat opeenvolgend geoksideer en gedehidreer word na mangaan(III)asetaat-monohidraat, wat dan met 1-dodekeen reageer om die betrokke  $\gamma$ -laktoon te lewer.

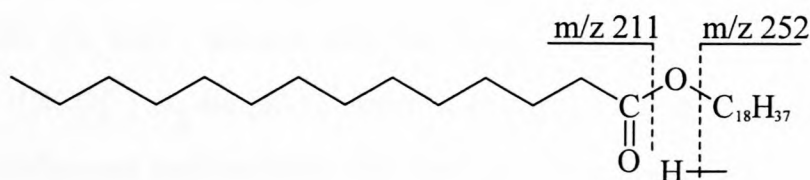


(i) AcOH, KMnO<sub>4</sub>, (AcO)<sub>2</sub>O; (ii) 1-Dodekeen, NaOAc

Reaksieskema VI-1

### Versadigde alifatiese esters

Die EI-massaspektrum van Komponent 6138 (Fig. 6.7) toon prominente ione by onder andere  $m/z$  211, 229 en 252. Deur vergelyking van hierdie komponent se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup> is dit as 'n langketting alifatiese ester geïdentifiseer. Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  229 gevorm word deur 'n dubbel waterstofharrangskikking waarby die estergroep betrokke is (Hoofstuk IV), waaruit afgelei is dat Komponent 6138 'n alkieltetradekanoaat is. Die piek by  $m/z$  211 verteenwoordig dus die asiliumioon  $[\text{RCO}]^+$  en die ioon by  $m/z$  252 is waarskynlik die  $[\text{R}'-1]^+$  ioon waarvan afgelei is dat Komponent 6138 waarskynlik oktadekiel-tetradekanoaat is:



Die EI-massaspektrum van Komponent 7436 (Fig. 6.8) toon prominente ione by onder andere  $m/z$  257 en  $m/z$  239, en hierdie spektrum stem ooreen met dié van 'n langketting alifatiese ester.<sup>2</sup> Daar is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  257 deur die dubbel waterstofharrangskikking gevorm word, en dus word die asiliumioon by  $m/z$  239 aangetref. Op grond hiervan is Komponent 7436 tentatief as 'n alkielheksadekanoaat geïdentifiseer. In 'n vorige studie is gevind dat langketting alifatiese esters wat dieselfde aantal koolstofatome bevat en dus dieselfde molekulêre massa het, maar waarvan die alkiel- en alkanoaatgroepe verskil, en onder bepaalde kondisies kan koeleer.<sup>4</sup> In die EI-massaspektrum van Komponent 7436 word 'n prominente ioon by  $m/z$  229 en 'n ioon by  $m/z$  211, wat elk met 28 Da verskil van die ione by



onderskeidelik  $m/z$  257 en 239, waargeneem. Hiervan is afgelei dat daar moontlik 'n alkieltetradekanoaat saam met die alkielheksadekanoaat elueer, en dat Komponent 7436 dus uit 'n mengsel van hierdie twee esters bestaan. Nog 'n ioon wat in Komponent 7436 se massaspektrum waargeneem word, is 'n  $[R'-1]^+$  ioon by  $m/z$  280, wat daarop dui dat een van die esters 'n ikosielalkanoaat is. Retensietydvergelyking met gesintetiseerde materiaal het bevestig dat Komponent 7436 onder andere ikosielheksadekanoaat bevat en dat die ander ester dus dokosieltetradekanoaat is.

Die EI-massaspektrum van Komponent 5270 (Fig. 6.9 a) is met gepubliseerde data<sup>2</sup> vergelyk, op grond waarvan dit aanvanklik as 'n steroïed geïdentifiseer is. Uit die enkelioonchromatogramme van die ione by onder andere  $m/z$  201 en  $m/z$  381 ( $M-(18 + 15)$ ) (Fig. 6.9 b), is afgelei dat hierdie komponent en Komponent 5282 feitlik volledig ko-elueer. Deur noukeurig dekonvolering van die oorvleulende pieke is redelik bruikbare massaspektra verkry (Fig. 6.9 c en Fig. 6.10). Deur vergelyking van hierdie spektra met gepubliseerde data<sup>2</sup> is afgelei dat Komponent 5270 'n langketting ester en Komponent 5282 'n steroïed is. Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  452 in die EI-massaspektrum van Komponent 5270 (Fig. 6.9 c), die molekulêre ioon van die ester verteenwoordig, waaruit afgelei is dat die ione by  $m/z$  201, 183 en 252 onderskeidelik die ioon gevorm deur die dubbel waterstof-herrangskikking, die asiliumioon ( $[RCO]^+$ ) en die  $[R'-1]^+$  ioon is. Op grond hiervan is die ester dus as oktadekiel-dodekanoaat geïdentifiseer. Die steroïed, Komponent 5282, wat saam met hierdie ester elueer, word later in hierdie hoofstuk bespreek.

### Skwaleen

Komponent 4365 se EI-massaspektrum (Fig. 2.36) het 'n basispiek by  $m/z$  69 en 'n prominente ioon by  $m/z$  81. Deur vergelyking van hierdie massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup> en deur retensietydvergelyking is Komponent 4365 as skwaleen, wat ook in die femorale klier van *C. giganteus* voorkom (Komponent 116 in Hoofstuk II), geïdentifiseer.

## Steroïede

### **Cholesterol en 5 $\alpha$ -cholestan-3-ol**

Die EI-massaspektrum van Komponent 5043 (Kyk na soortgelyke massaspektrum in Hoofstuk II, Fig. 2.38 a) toon prominente ione by  $m/z$  145, 213, 231, 255, 275, 301, 353, 368 en 386. 'n Piek wat moontlik die molekulêreioon verteenwoordig, kom by  $m/z$  386 voor. Deur die vergelyking van sy massaspektrum met gepubliseerde data<sup>5</sup> en met die massaspektra van die steroïede wat in die femorale klier van *C. giganteus* voorkom, is hierdie komponent as cholesterol geïdentifiseer.

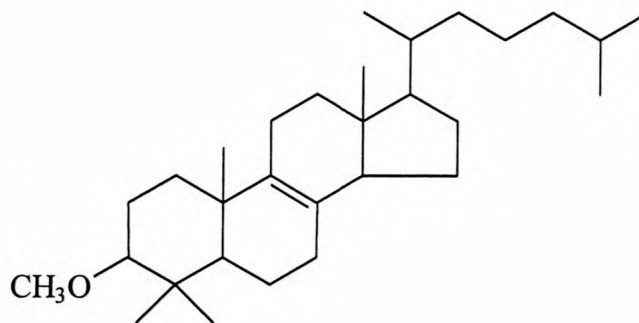
Komponent 5062 se EI-massaspektrum (Fig. 4.33 a) toon prominente ione by onder andere  $m/z$  388, 373 en 355, waarskynlik onderskeidelik die  $M^+$ ,  $M-15$  en  $M-(18+15)$  ione van hierdie verbinding. Vergelyking van hierdie massaspektrum met gepubliseerde data<sup>2</sup> en met die massaspektra van die steroïede wat in die generasieklier van *C. giganteus* geïdentifiseer is, het getoon dat Komponent 5062 'n isomeer van 5 $\alpha$ -cholestan-3-ol is. Deur verder hierdie komponent se relatiewe retensietyd in aanmerking te neem, is vasgestel dat dit dieselfde isomeer van 5 $\alpha$ -cholestan-3-ol is as Komponent 122.91 in die generasieklierafskeiding van *C. giganteus* (Hoofstuk IV).

### **Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol, ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, lanost-8-en-3 $\beta$ -ol en stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol**

Daar is aanvaar dat die pieke by  $m/z$  384, 400, 428 en 414 in die massaspektra van onderskeidelik Komponente 5149, 5381, 5630 en 5739 (Fig. 2.39 a, 2.40 a, 2.42 a en 2.43 a) die molekulêre ione van hierdie komponente verteenwoordig. Deur vergelyking van hierdie komponente se massaspektra en retensietye met gepubliseerde massaspektra<sup>2,5</sup> en met die massaspektra en retensietye van komponente van die femorale klier van *C. giganteus*, is Komponente 5149, 5381, 5630 en 5739 as onderskeidelik cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol, ergost-5-en-3 $\beta$ -ol, lanost-8-en-3 $\beta$ -ol en stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol geïdentifiseer.

### Ongeïdentifiseerde steroïede

Daar is aanvaar dat die piek by  $m/z$  428 in die EI-massaspektrum van Komponent 5093 (Fig. 6.11) die molekulêre ioon verteenwoordig. Hiervan is afgelei dat die ione by  $m/z$  413 en 381, onderskeidelik M-15 en M-(15 + 32) ione is. 'n Moontlikheid wat oorweeg is vir die ontstaan van die M-(15 + 32) ioon, is die eliminasië van metanol (32 Da) gepaardgaande met die verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ioon. Die molekulêre massa van die verbinding is 42 Da hoër as dié van cholesterol, en daar is gevolglik vermoed dat Komponent 5093 twee metielgroepe (28 Da) meer as cholesterol bevat, en dat die teenwoordigheid van 'n metoksigroep in plaas van 'n hidroksigroep die molekulêre massa met 'n verdere 14 Da bokant dié van cholesterol verhoog. Aangesien hierdie massaspektrum tot 'n mate ooreenstem met dié van Komponent 157 (ongeïdentifiseerde steroïed), wat in die femorale klier van *C. giganteus* voorkom, is metoksi-4,4-dimetiël-cholest-8-een as moontlike struktuur van Komponent 5093 oorweeg:



Die ioon by  $m/z$  381 in die massaspektrum van Komponent 5093 kan dus op soorgelyke wyse gevorm word as die  $m/z$  381 ioon in Komponent 157 se massaspektrum, behalwe dat daar in hierdie geval die verlies van metanol gepaardgaande met die verlies van 'n metielgroep plaasvind in plaas van die verlies van water gepaardgaande met die verlies van 'n metielgroep.

Deur die EI-massaspektrum van Komponent 5282 (Fig. 6.10), wat vroeër bespreek is met gepubliseerde data<sup>2</sup> en met die massaspektra van die steroïede wat in die femorale- en generasie kliere van *C. giganteus* voorkom te vergelyk, is vasgestel dat dit dieselfde verbinding as die ongeïdentifiseerde steroïed, Komponent 157, in die femorale klierafskeiding van *C. giganteus*, is.

Soos aan die einde van die besprekings van die steroïede in die generasie en femorale klierafskeidings van *C. giganteus* opgemerk, kom daar in die femorale klierafskeiding van *C. cordylus* ook 'n paar ander komponente voor wat moontlik steroïede kan wees.

In die geval van *C. cordylus* is daarvan melding gemaak dat die diere ook oor ander bronne van chemiese boodskappe behalwe die femorale kliere kan beskik. Daar is byvoorbeeld die kliere in die kloak, die generasie kliere, die ventrale vel en ook ander afscheidingsprodukte.<sup>6</sup> Hierdie bronne van chemiese boodskappe word ook by *C. giganteus* aangetref. Ondersoeke soortgelyk aan dié wat op die femorale- en generasie klierafskeidings van *C. giganteus* uitgevoer is, insluitende kwantitatiewe analise van die klierafskeidings, sal op elk van hierdie bronne van beide akkedisspesies uitgevoer moet word om hulle moontlike semiochemiese funksies, indien enige, vas te stel. Dit is dus duidelik dat daar nog 'n groot hoeveelheid werk in verband met die chemiese kommunikasie van hierdie diere gedoen moet word.

Tabel 6.1: Verbindings geïdentifiseer in die femorale klierafskeiding van die Kaapse gordelakkedis, *Cordylus cordylus*.

Komponent nommer	Verbinding	EI-massa-spektrum	Identifikasie
1695	Tetradekanoësuur	Fig. 2.5	a,b
1930	Pentadekanoësuur	Fig. 2.6	a,b
2197	Heksadekanoësuur	Fig. 2.7	a,b
2447	Heptadekanoësuur	Fig. 2.8	a,b
2725	Oktadekanoësuur	Fig. 2.9	a,b
2980	Nonadekanoësuur	Fig. 2.10	a,b
3244	Ikosanoësuur	Fig. 2.11	a,b
3754	Dokosanoësuur	Fig. 2.13	a,b
2131	9Z-Heksadekanoësuur	Fig. 2.17	a,b
2654	9Z-Oktadekanoësuur	Fig. 2.16	a,b
2630	9Z,12Z-Oktadekadiënoësuur	Fig. 2.22	a,b
3064	8Z,11Z,14Z-Ikosatriënoësuur	Fig. 2.23	b,c
2506	1-Oktadekanol	Fig. 6.3	a,b
3046	1-Ikosanol	Fig. 6.4	a,b
1965	2-Heptadekenaal	Fig. 2.32	b,c,d
1978	Tetradekaan-4-olied	Fig. 6.5	a,b
2522	Heksadekaan-4-olied	Fig. 4.17	a,b
3076	Oktadekaan-4-olied	Fig. 6.6	a,b
6138	Oktadekieltetradekanoaat	Fig. 6.7	a,b
7436a	Ikosielheksadekanoaat	Fig. 6.8	a,b
7436b	Dokosieltetradekanoaat	Fig. 6.8	b
5270	Oktadekioldodekanoaat	Fig. 6.9 c	b
5043	Cholesterol	Fig. 2.38 a	a,b
5062	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\alpha$ / $\beta$ -ol	Fig. 4.33 a	b
5149	Cholesta-5,7-dien-3b-ol	Fig. 2.39 a	b
5381	Ergost-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.40 a	b
5630	Lanost-8-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.42 a	b
5739	Stigamast-5-en-3 $\beta$ -ol	Fig. 2.43 a	b
5093	Metoksisteroïed	Fig. 6.11	b
5282	Ongeïdentifiseerde steroïed	Fig. 6.10	b

a: Retensietyd; b: Gepubliseerde data; c: Lei af uit relatiewe retensietye;  
d: E/Z-Isomerie onseker.

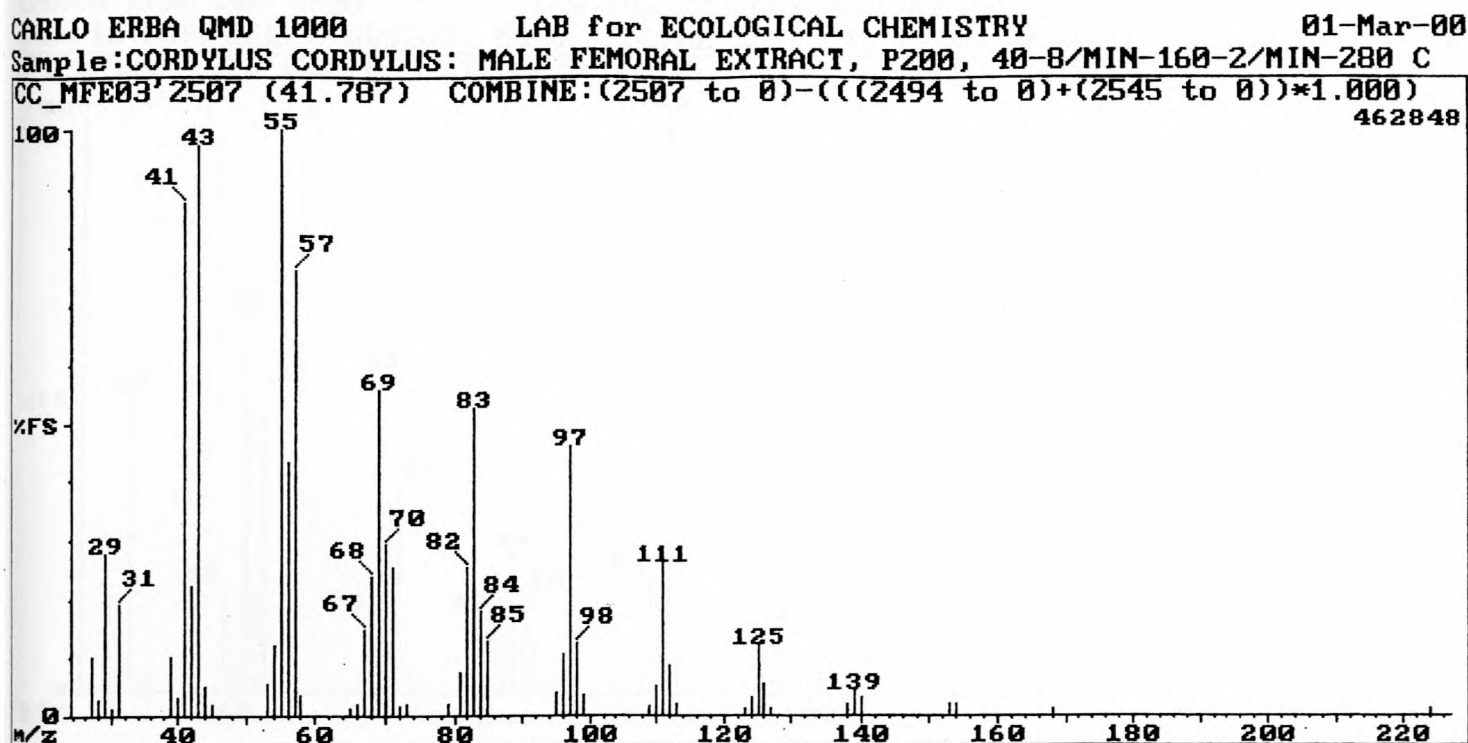


Fig. 6.3: EI-masspektrum van Komponent 2506 - 1-oktadecanol

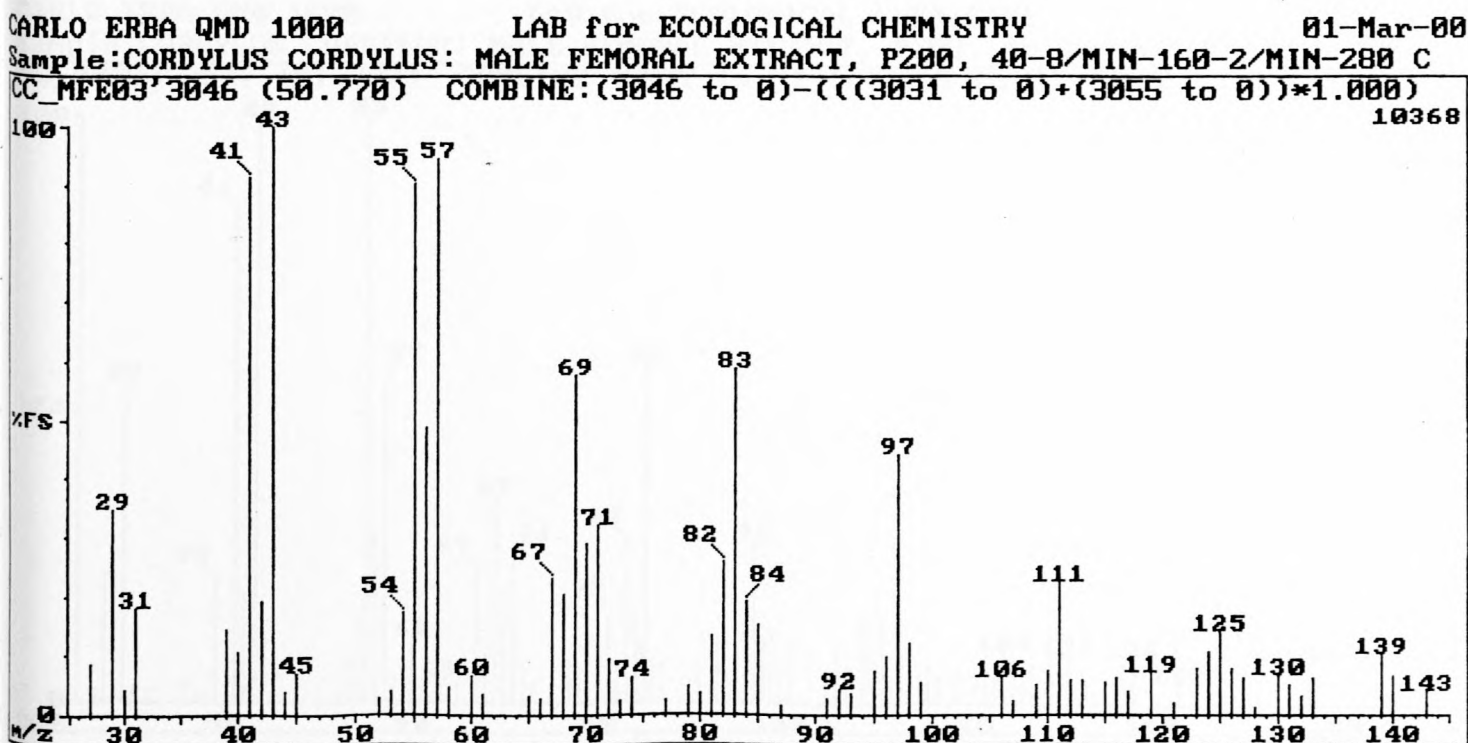


Fig. 6.4: EI-masspektrum van Komponent 3046 - 1-ikosanol

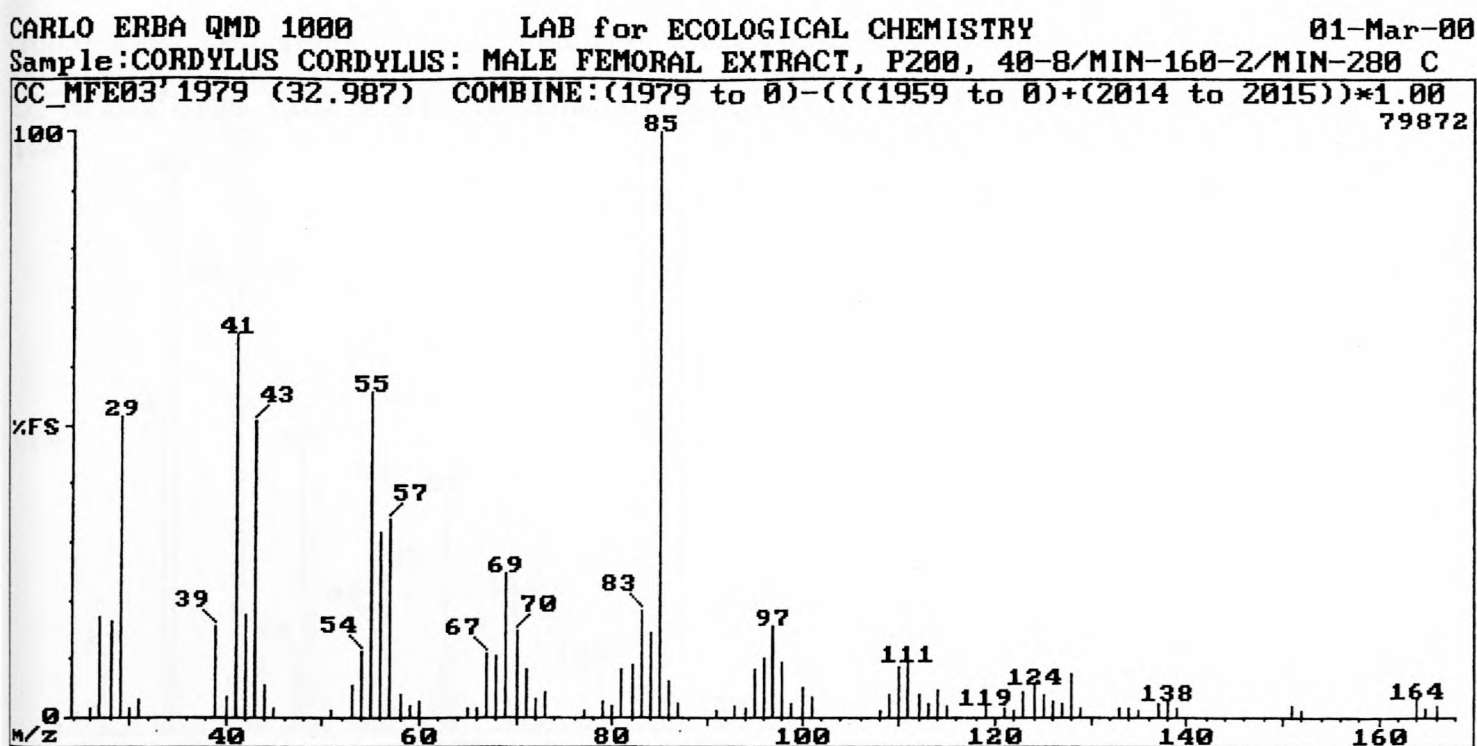


Fig. 6.5: EI-massaspektrum van Komponent 1978 - tetradekaan-4-olied

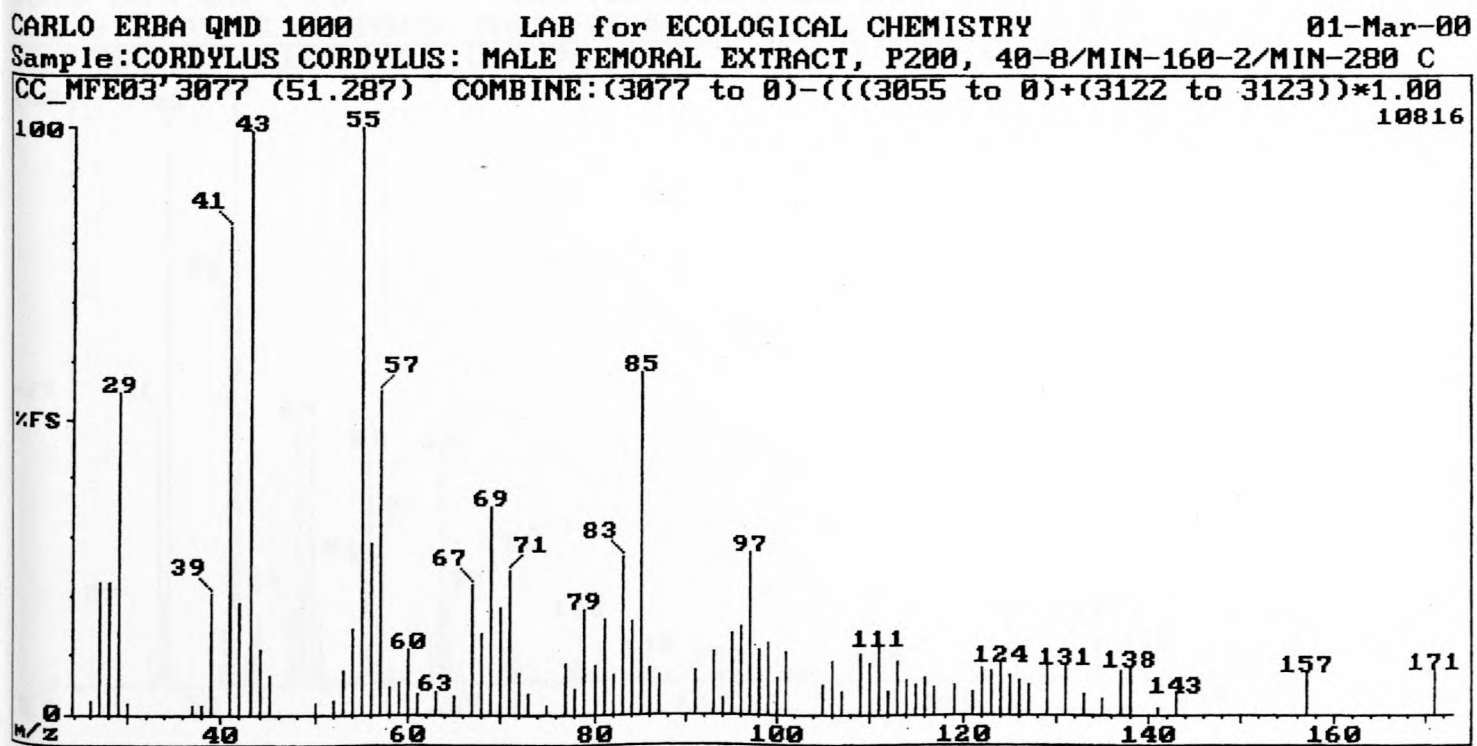


Fig. 6.6: EI-massaspektrum van Komponent 3076 - oktadekaan-4-olied

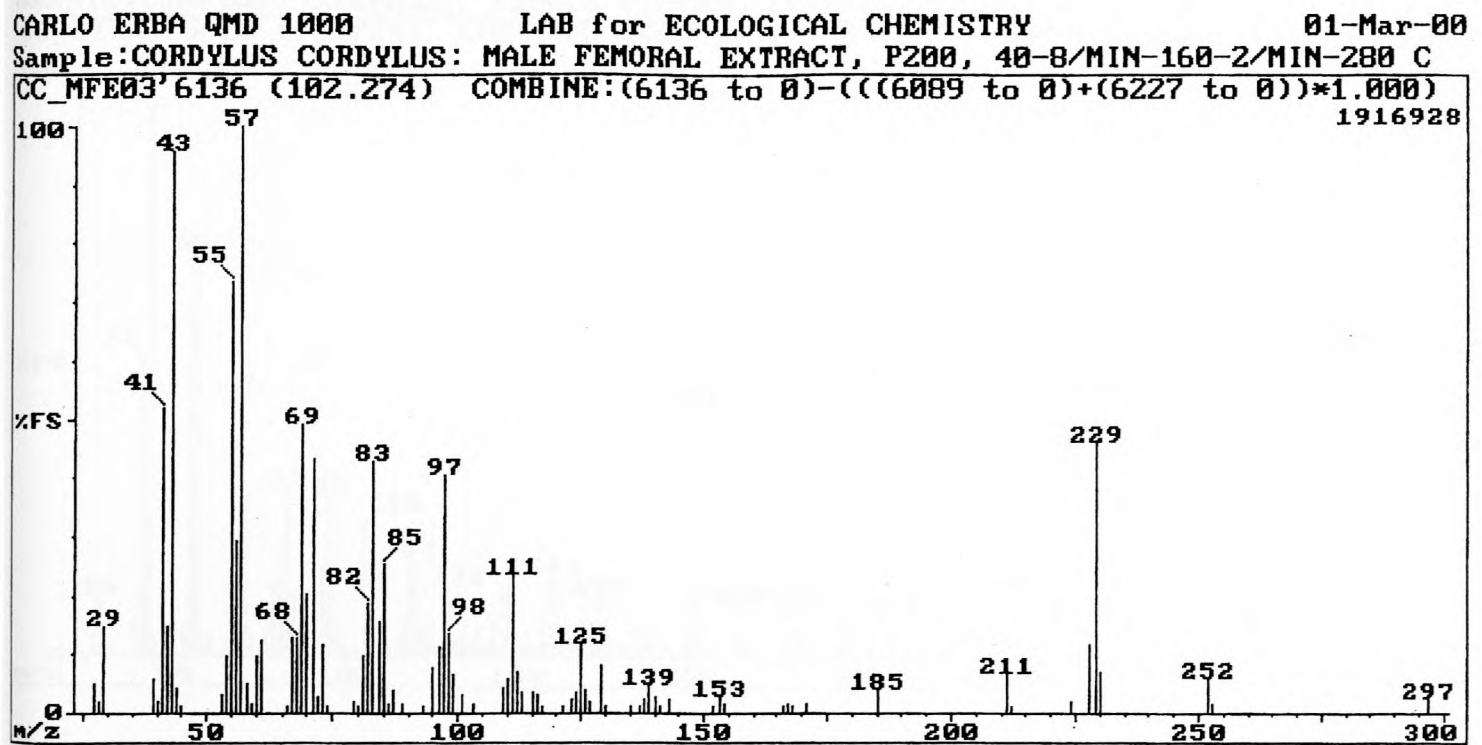


Fig. 6.7: EI-massaspektrum van Komponent 6138 - oktadekiltetradekanoaat

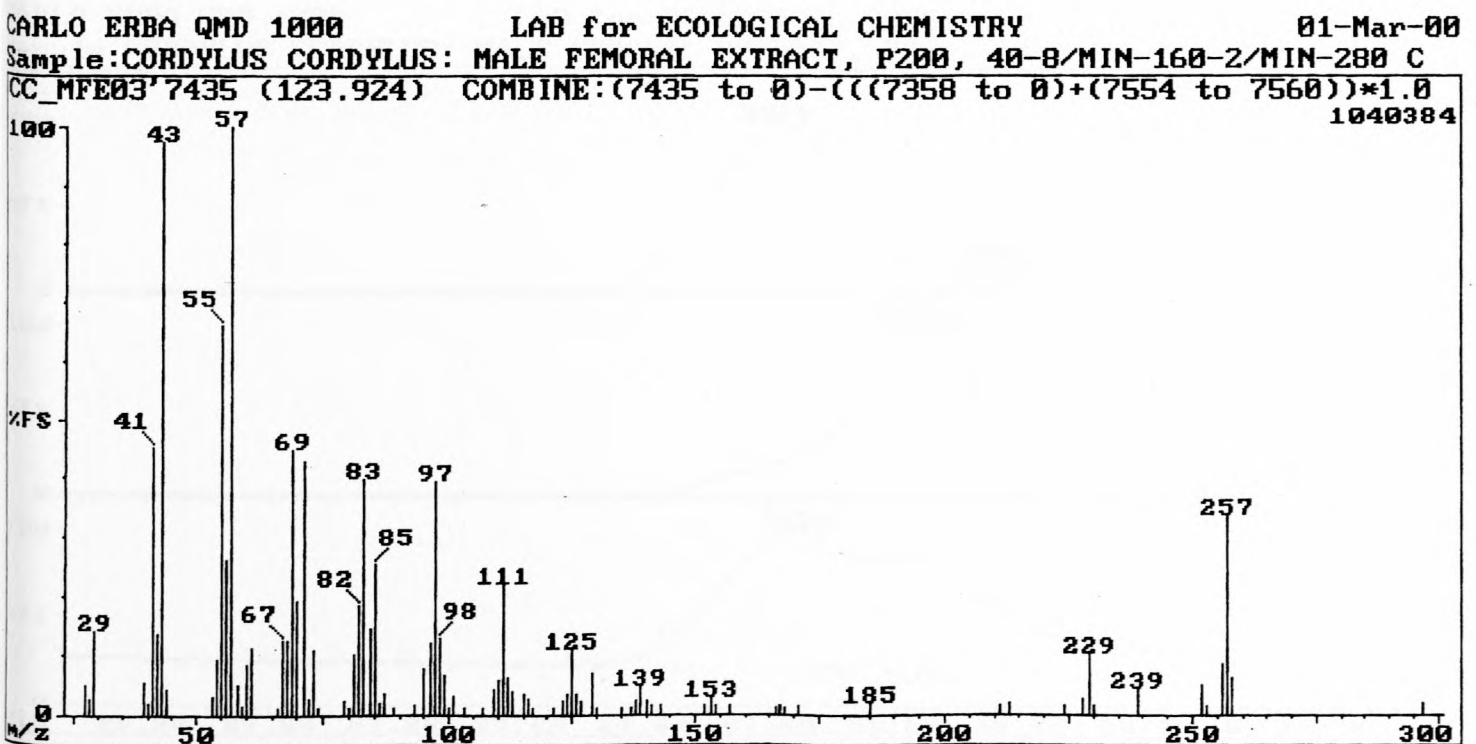


Fig. 6.8: EI-massaspektrum van Komponent 7436 - ikosielheksadekanoaat en dokosieltetradekanoaat



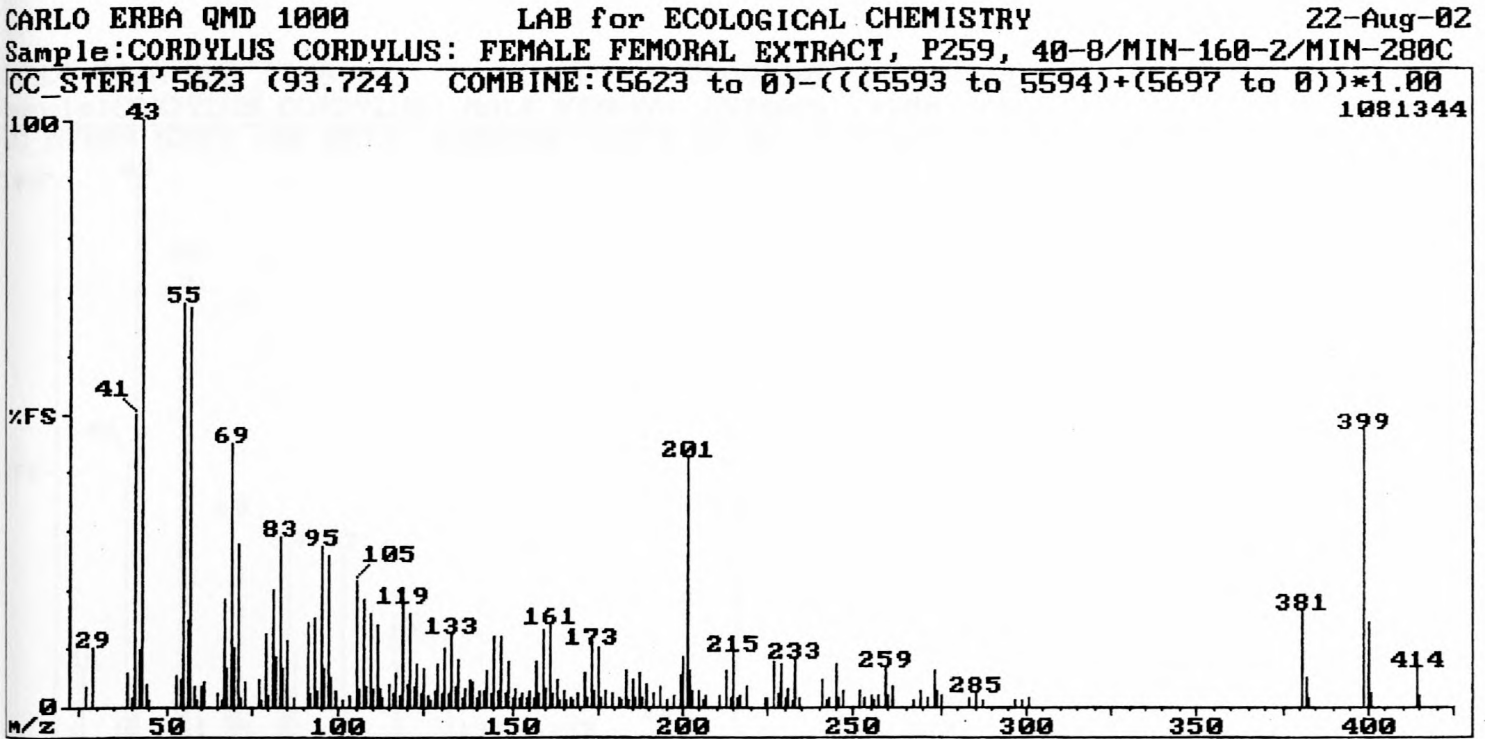


Fig. 6.9 a: EI-massaspektrum van Komponent 5270 en 5282 - oktadekiel-dodekanoaat en 'n ongeïdentifiseerde steroïed

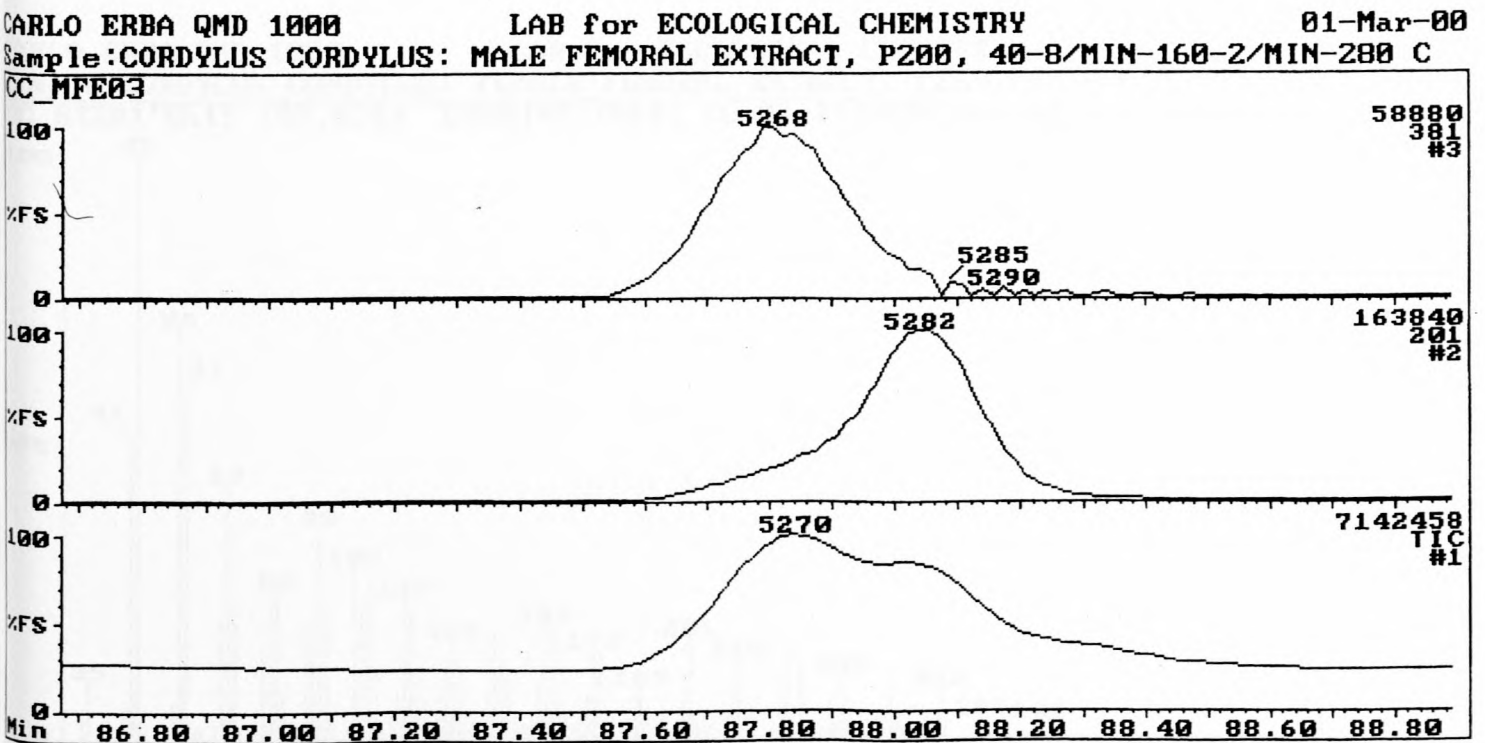
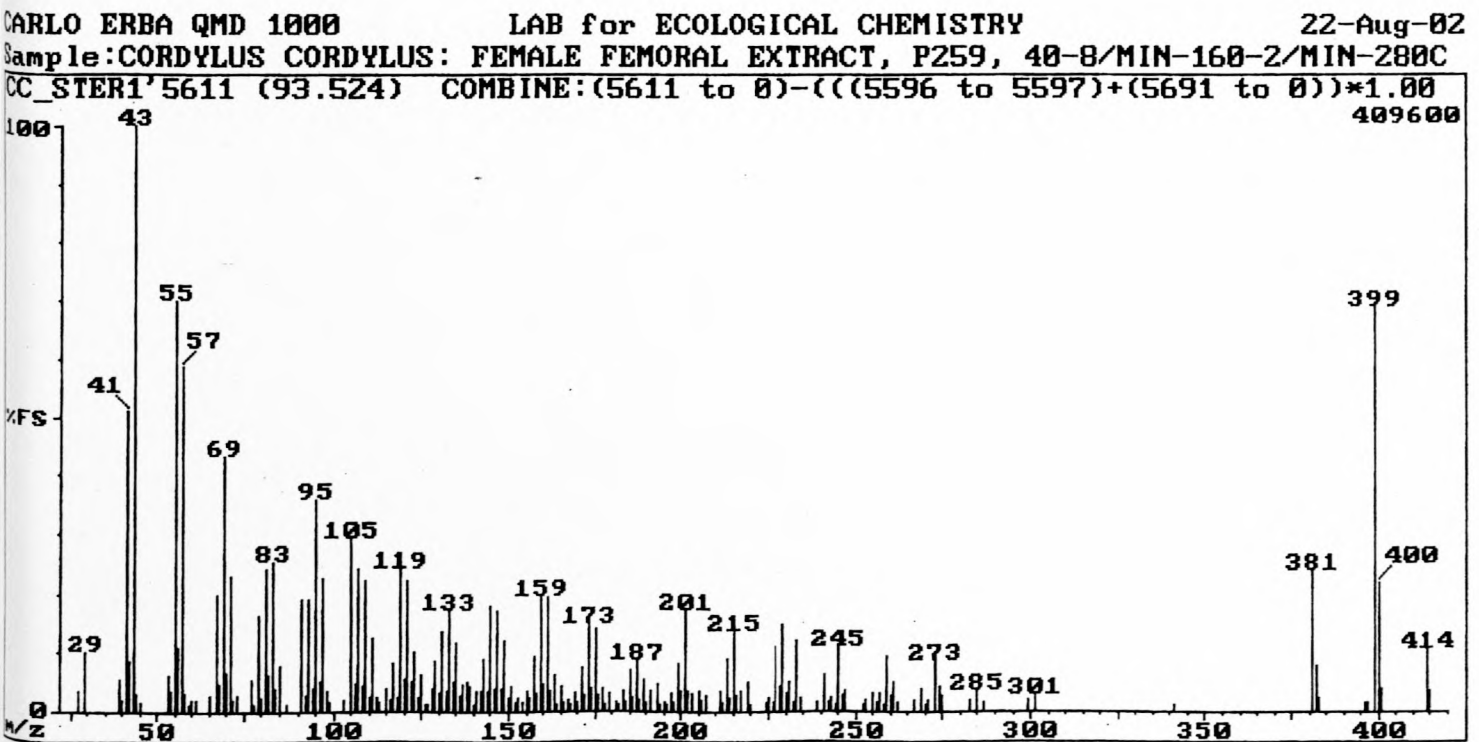
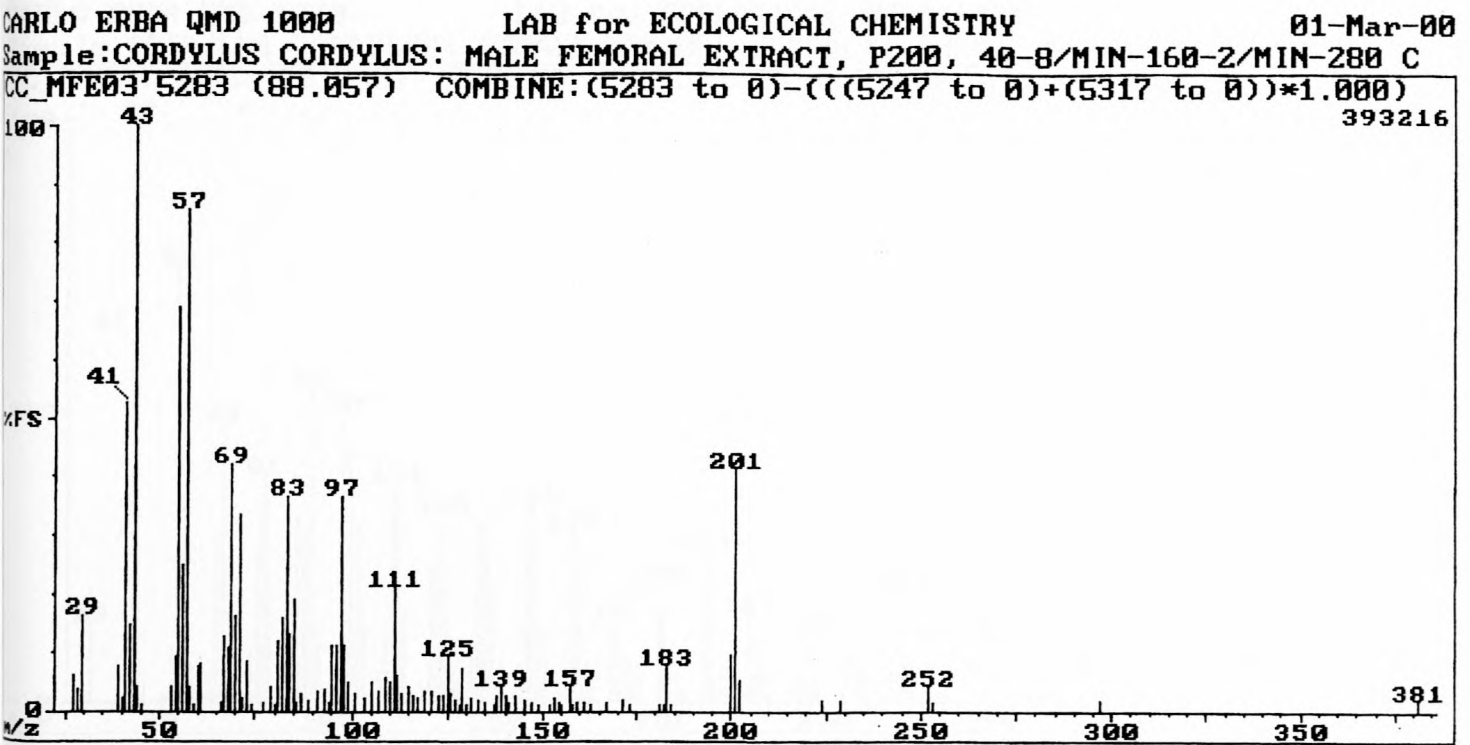


Fig. 6.9 b: Enkel ion chromatogramme van die ione by m/z 201 en m/z 381 wat onderskeidelik in die EI-massaspektra van Komponente 5270 en 5282 voorkom.



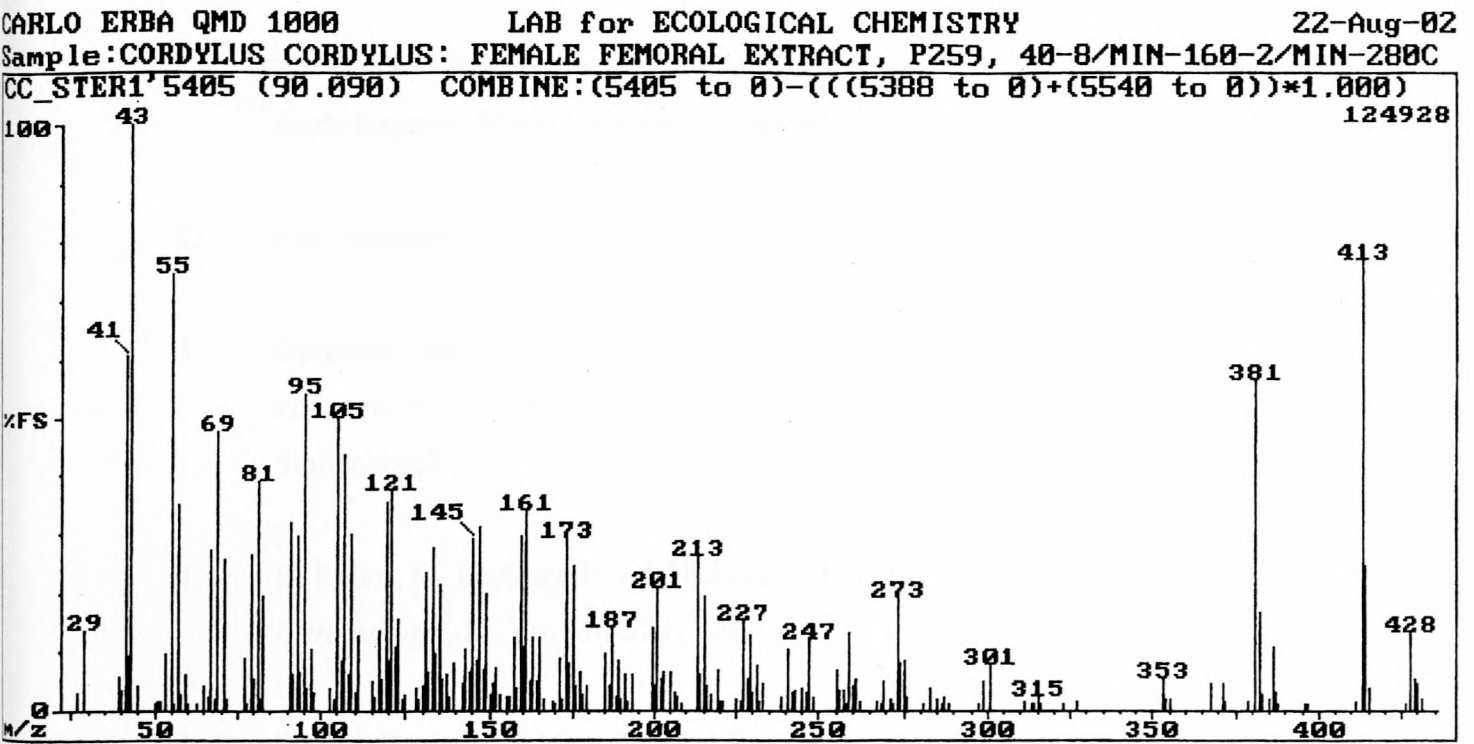


Fig. 6.11: EI-massaspektrum van Komponent 5093 - metoksisteroïd

**Verwysings**

1. B. Branch, "Field Guide to Snakes and other Reptiles of Southern Africa", derde uitgawe, Struik uitgewers, Kaapstad, pp. 187-188 (1998).
2. Gerekenariseerde NBS-biblioteek.
3. Gerekenariseerde LEC biblioteek. (Persoonlike data basis van massaspektra versamel in die Laboratorium vir Ekologiese Chemie, Universiteit van Stellenbosch.)
4. B. Reiter, M. Lechner, R. Aichholz en E. Lorbeer, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **22**, pp. 514-520 (1999).
5. "Wiley Registry of Mass Spectral Data", Sesde uitgawe, John Wiley & Sons, Inc.
6. W.E. Cooper, Jr., J.H. Van Wyk en P.Le F.N. Mouton, *J. Chem. Ecol.*, **25**, pp. 197-208 (1999).

## HOOFSTUK VII

**EKSPERIMENTEEL****Algemeen**

Alle Pyrex-glasapparaat wat vir die hantering van biologiese materiaal gebruik is, is vooraf deeglik gewas waarna dit in 'n muffeloon by 500°C verhit is om enige spore van organiese materiaal te verwyder. Dichlormetaan (Fluka, residu-analitiese gehalte) is vir ekstraksie doeleindes gebruik. Spuite is gereinig deur die dichlormetaan onder vakuum deur die spuit te suig, en die naalde en suierstafies deeglik met die dichlormetaan af te spoel.

**Analitiese tegnieke****Gaschromatografiese skeidings**

GC-analises is uitgevoer met Carlo Erba 4160 en 5300 (Mega) gaschromatograwe toegerus met vlam-ionisasie detektors en 'n Grob-inlaatsistiem. 'n Inlaatstroomverdeling van 1:10 is gebruik. Die 40 m x 0,3 mm glaskolomme wat gebruik is, is vervaardig deur die Laboratorium vir Ekologiese Chemie en is belaag met 'n 0,25 µm film van die apolêre stasionêre fase PS-089-OH, wat 'n silanol-getermineerde (95%)-metiel-(5%)-fenielpolisiloksaan kopolimeer is. Die analises van die femorale klierafskeiding van *Cordylus giganteus* is gedoen met helium as draergas, by 'n druk van ongeveer 0,8 kg/cm<sup>2</sup> wat 'n liniêre draergasvloeï van 28,6 cm/sek deur die kolom gelewer het. Analises van die generasieklierafskeidings van *C. giganteus* en van die femorale klierafskeidings van *C. cordylus* is gedoen met waterstof as draergas, by bogenoemde druk wat 'n liniêre draergasvloeï van 50 cm/sek deur die kolom gelewer het. Die vlam-ionisasie detektor se temperatuur is by 280°C gehou, terwyl die inlaatteratuur by 220°C gehou is. Monsters is ingespuï of ingelaat (direkte inlaat metode Hoofstuk V) met stroomverdeling en is termies gefokuseer by 'n temperatuur van ongeveer 30°C. Die temperatuurprogram, 40°C (0 min.) teen 2°C/min. tot 280°C (60 min.), is vir die generasieklierafskeidings gebruik.

Aanvanklik is dieselfde temperatuurprogram vir die femorale klierafskeidings van beide akkedisspesies gebruik. Daar is egter gevind dat geen komponente van die femorale klierafskeidings in ongeveer die eerste uur van die analise elueer nie. Om tyd te bespaar is die volgende temperatuurprogram gebruik: 40°C (0 min.) teen 8°C/min tot 160°C (0 min.) en teen 2°C/min. tot 280°C (60 min.). Gesintetiseerde en kommersiële verbindings is in aparte botteltjies of in mengsels, met konsentrasies van ongeveer 0,5 tot 1,0 µl/ml dichlorometaan, opgemaak. Om die gaschromatografiese retensietye van die verbindings in die ekstrak en dié van die gesintetiseerde of kommersiële verbindings te vergelyk, is die bogenoemde oplossings, onder dieselfde kondisies as die ekstrak, aan GC-analise onderwerp. Indien die retensietye ooreengestem het, is die oplossings van die sintetiese verbindings saam met die ekstrak ingespuut, om deur waarneming van 'n toename in die piekhoogte en/of piekoppervlakte van die betrokke piek te bevestig dat die verbinding korrek geïdentifiseer is.

'n Omniscrite D5000 registreerder is vir die registrering van analoog gaschromatogramme gebruik, terwyl 'n rekenaar toegerus met Borwin Intuitive Chromatography Software (weergawe 1.22) gebruik is vir die opneem van kwantitatiewe gaschromatografiese data.

### **Gaschromatografie-massaspektrometriese analises (GC-MS)**

Elektron impak (EI) massaspektra is verkry by 70 eV oor 'n massagebied van 25 tot 500 Dalton en van 25 tot 550 Dalton vir die analises van die steroïedderivate, deur van 'n Carlo Erba QMD 1000 GC-MS instrument gebruik te maak, en deur die massaspektra op te neem met die Lab Base programmatuur van VG Analytical. Sommige massaspektra is verkry deur van 'n Fisons MD 800 GC-MS instrument, toegerus met Masslab Version 1.12 sagteware, gebruik te maak. Dieselfde soort kolomme en kondisies as wat in die GC-analises gebruik is, is ook vir die GC-MS-analises gebruik. Die gasvloei is ingestel om 'n dooie tyd van 129 sekondes (lug) te lewer. 'n Brontemperatuur van 200°C en 'n tussenvlaktemperatuur van 250°C is deurgaans gebruik, behalwe vir sommige analises van die sintetiese amiede (Hoofstuk IV).

## Versameling en monstervoorbereiding

### Versameling en monstervoorbereiding vir kwalitatiewe analises

#### **Femorale kliere van *C. giganteus***

Die femorale klierafscheidings van 'n mannetjie en 'n wyfie akkedis, wat in die Hoëveld graslande in die Vrystaat gevang is en by die Departement Soölogie aan die Universiteit van Stellenbosch aangehou is, is versamel deur die afscheidings met behulp van 'n haartangetjie uit hul femorale kliere te druk.<sup>1</sup> Die afscheidings van die akkedisse is in aparte glasbotteltjies geplaas, waarna daar 150 µl dichlorometaan by elke monster gevoeg is. Die afscheidings is met dun glasstafies fyngedruk om sodoende so veel as moontlik van die oplosbare materiaal te ekstraheer. Daarna is die ekstrakte individueel deur sinterglas filttertjies in Reacti-Vials deur middel van sentrifugasie gefiltreer om van die onopgeloste materiaal ontslae te raak. Die dichlorometaan is toegelaat om stadig by kamertemperatuur in te damp om die ekstrakt tot 'n konsentrasie geskik vir analise te konsentreer. 'n Volume van 0,2 tot 1,0 µl van die gekonsentreerde dichlorometaanekstrak is per analise gebruik.

#### **Generasiekliere van *C. giganteus***

Die boonste laag van die generasiekliere van 'n mannetjie akkedis is in die veld in die Hoëveld graslande in die Vrystaat versamel deur die boonste laag van die klieragtige skubbe met behulp van 'n haartangetjie te verwyder. Die versamelde materiaal is in glas botteltjies in 'n koelhouer bewaar.<sup>2</sup> Daarna is dit vir 'n tydperk by -20°C gestoor, waarna dit na Stellenbosch vervoer is en by -70°C gestoor is by die Departement Soölogie aan die Universiteit van Stellenbosch. Die generasiekliermateriaal van die voorbene en agterbene van die dier is in aparte glasbotteltjies (1,8 ml) oorgeplaas, 100 µl dichlorometaan is by die materiaal in elke botteltjie gevoeg en die resulterende suspensie is by -10°C gestoor totdat die analises uitgevoer kon word. Voor elke analise is die betrokke botteltjie vir 20 minute in 'n ultrasoniese bad geplaas om ekstraksie te bevorder, waarna die dichlorometaan onder stikstof ingedamp is om die ekstrakt tot 'n konsentrasie geskik vir analise te konsentreer. Die mengsel is vir 'n paar sekondes gesentrifugeer, om die vaste laag en vloeistof laag beter te skei, maar die onoplosbare materiaal is nie deur middel van filtrasie verwyder nie. 'n Volume van

1,0  $\mu\text{l}$  van die gekonsentreerde dichlorometaanekstrak, vry van vaste materiaal, is per analise gebruik.

### **Femorale kliere van *C. cordylus***

Die femorale klierafscheidings van mannetjie en wyfie akkedisse is net buite Stellenbosch (Wes-Kaap) in die veld versamel deur die afscheidings met behulp van 'n haartangetjie uit die femorale kliere te druk.<sup>1</sup> Die afscheidings van die akkedisse is in glasbotteltjies geplaas en in 'n vrieskas by  $-10^{\circ}\text{C}$  bewaar totdat dit benodig is vir analises. 'n Gedeelte van hierdie versamelde materiaal is geëkstraheer deur ongeveer 0,5 ml dichlorometaan by elke monster te voeg en die afscheidings met 'n dun glasstafie fyn te druk om soveel as moontlik van die oplosbare materiaal op te los. Die ekstrak is behandel en gekonsentreer soos beskryf vir die femorale klierafscheidings van *C. giganteus*. 'n Volume van 0,4 tot 1,0  $\mu\text{l}$  van die gekonsentreerde dichlorometaanekstrak is vir die afsonderlike analises gebruik. Die ekstrak is by  $-10^{\circ}\text{C}$  gestoor.

### **Versameling en monstervoorbereiding vir kwantitatiewe analises**

#### **Femorale kliere**

Die femorale klierafscheidings van mannetjie en wyfie *C. giganteus* is, soos vroeër beskryf, in die veld in die Hoëveld graslande in die Vrystaat versamel in Eppendorf buisies, en is in die veld in 'n koelhouer bewaar. Die materiaal is net soos die generasiekliere gehanteer, en elkeen van die monsters is net soos die generasiekliere berei, behalwe dat dit vir 30 minute in plaas van 20 minute in die ultrasoniese bad gelaat is, en dat die monsters nie gesentrifugeer is nie.

#### **Generasie kliere**

Die generasiekliermateriaal is versamel en gestoor soos vroeër beskryf. Die verskillende akkedisse se generasiekliermateriaal is volgens 'n direkte inlaat metode geanaliseer, wat vervolgens bespreek sal word. Vir elke analise is die betrokke kliermateriaal ( $\pm 2$  mg) akkuraat afgeweg tot die naaste 0,01 mg in 'n aluminiumfoelie weegskuitjie, wat vooraf met dichlorometaan gereinig is. Die bekende massa kliermateriaal is daarna kwantitatief oorgebring in 'n GC glasvoering,



waarin daar 'n klein glaswol pluisie aangebring is. Die glasvoering is vir 10 minute in die inlaat (by 220°C) van 'n GC gesit terwyl die gedesorbeerde vlugtige verbindings van die klier materiaal deur die draergas na die kolom oorgedra is. Die vlugtige materiaal is termies in die inlaatgedeelte van die kolom gefokusseer by *ca.* 30°C. Die glasvoering is vervolgens verwyder, en met 'n skoon glasvoering vervang, waarna die temperatuurprogram begin is.

### **Eksterne standaard**

Heksadekanoësuur is as eksterne standard gebruik. 'n Standaardoplossing met 'n konsentrasie van 1,14 mg/ml dichlorometaan is gebruik. Van hierdie standaardoplossing is monsters van presies 1 µl met behulp van 'n mikrosput op 'n klein pluisie glaswol in 'n inlaatvoering aangebring. Die oplosmiddel is toegelaat om te verdamp, waarna die monster by 220°C van die glaswol gedesorbeer en in die inlaatgedeelte van die kolom termies by 30°C gefokusseer is en vervolgens geanaliseer is volgens die metode wat hierbo vir die generasiekliermateriaal beskryf is. Die kwantitatiewe data wat uit die analyses van die eksterne standaard en die kliermateriaal verkry is, is gebruik om die kwantiteite van die verskillende komponente wat in 1 mg van die generasiekliermateriaal aanwesig is, te bereken (Hoofstuk V).

### **Metoksiem-trimetielsiliel (MO-TMS) derivatisering van die steroïede in die afskeidings<sup>3</sup>**

Metoksielamienhidrochloried (5,23 mg, 0,0626 mmol) opgelos in 50 µl piridien (gedistilleer en gedroog op kalsiumhidried) is by ongeveer 1 mg van die gedroogde dichlorometaanekstrak van die femorale klierafskeiding gevoeg, en die reaksiemengsel is vir 15 minute in 'n oond by 60°C verhit. Daarna is die piridien in 'n stikstofatmosfeer afgedamp, trimetielsilielimidiasool (75 µl, 0,0511 mmol) is by die monster gevoeg en die reaksiemengsel is vir 2 uur in 'n oond by 100°C verhit. Terwyl die flessie nog warm was, is die reaksiemengsel in 'n stikstofatmosfeer gekonsentreer. Ongeveer 2 µl van hierdie oplossing is aan GC-MS-analise onderwerp. Die steroïede in die generasieklierafskeiding is op 'n soortgelyke wyse gederiviseer.

## Sintese van verwysingsverbindings

Al die chemikalieë wat vir sintetiese werk gebruik is, is van Aldrich Chemical Co., Merck, Saarchem, NT Laboratories of B.D.H. Laboratory Chemicals Devision aangekoop.

### Dodekielpropenoaat

Dodekielpropenoaat is deur omestering uit *n*-dodekanol en metielpropenoaat gesintetiseer volgens Rehberg.<sup>4</sup> 'n Mengsel van *n*-dodekanol (16,3 g, 87,5 mmol), metielpropenoaat (25,0 g, 291 mmol), *p*-tolueensulfoonsuur-monohidraat (2,00 g, 1,05 mmol) en hidrokinoon (0,350 g, 3,18 mmol) is vir 30 minute onder terugvloei in 'n stikstofatmosfeer in 'n oliebad verhit. Die temperatuur van die oliebad is verlaag, en die gevormde metanol/metielpropenoaat-aseetroop is oor 'n tydperk van 4½ uur by 62 - 63°C afgedistilleer soos wat dit gevorm het. Die oormaat metielpropenoaat is daarna by 80°C afgedistilleer, om dodekielpropenoaat (20,654 g, 98%) as residu te lewer. Deur middel van GC-MS-analise en GC-analise gepaardgaande met die gebruik van Borwin Intuitive Chromatography Software, is bepaal dat die produk 97% suiwer was, met dodekanol as die enigste onsuiverheid. Vergelyk massaspektra Figure 7.1 a en b onderskeidelik. Dekielpropenoaat en dodekielpropenoaat is op 'n soortgelyke wyse gesintetiseer. Kyk massaspektra Figure 7.2 en 7.3 onderskeidelik.

### Heksadekanaal

Heksadekanaal is uit heksadekanol berei deur oksidasie met chroomsuur.<sup>5</sup> Chroomsuur is berei deur gekonsentreerde swawelsuur (2,9 ml, 0,0570 mol) by natriumdichromaat-dihidraat (4,00 g, 0,0160 mol) opgelos in water (12 ml), te voeg en daarna die oplossing na 'n totale volume van 20 ml te verdun. Yskoue chroomsuur (ca. 2,07 ml) is drupsgewys oor 'n tydperk van 10 minute by 'n oplossing van heksadekanol (0,5 g, 2,07 mmol) opgelos in eter (6 ml) gevoeg, terwyl die reaksiemengsel magneties geroer en by ca. 0°C gehou is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere 5 minute by 0°C geroer, waarna die eter en waterlae geskei is. Die waterlaag

is twee keer met eter (5 ml) geëkstraheer, en die gekombineerde eterlae is twee keer met natriumkarbonaatoplossing (10 ml, 5%), en twee keer met water (10 ml) gewas. 'n Klein hoeveelheid water en eter is met die laaste was bygevoeg, om skeiding van die lae te vergemaklik. Die eterlaag is gedroog op watervrye magnesiumsulfaat, waarna die droogmiddel afgefiltreer is en die eter afgedamp is met behulp van 'n rotasieverdamper, om heksadekanaal (0,16 g, 32%) as produk te lewer. Pentadekanaal is op 'n soortgelyke wyse gesintetiseer. Kyk massaspektra Figure 7.4 en 7.5 onderskeidelik.

### Heksadekaannitriël

*Pentadekanol:* Pentadekanol is berei uit pentadekanoësuur deur reduksie met litiumaluminiumhidried (LAH).<sup>6</sup> LAH (0,2 g, 0,00526 mol) is stadig by droë eter (36 ml) gevoeg, terwyl die oplossing magneties geroer is by kamertemperatuur onder droë kondisies. Meer LAH (0,8 g, 0,0211 mol) is by die oplossing gevoeg, wat vir 10 minute by kamertemperatuur en daarna vir 15 minute by 80°C (oliebad) onder reflux geroer is. Pentadekanoësuur (2,0 g, 0,00826 mol), opgelos in eter (30 ml), is oor 'n tydperk van 10 minute by die LAH oplossing gevoeg, terwyl die reaksiemengsel in 'n ysbad afgekoel is. Die reaksiemengsel is vir 1 uur onder reflux by 60°C geroer, waarna dit in 'n ysbad afgekoel is terwyl agtereenvolgens klam eter (20 ml) en swawelsuur (40 ml, 0,01 M) versigtig bygevoeg is. Die twee lae is geskei en die waterlaag is drie keer met eter (20 ml) geëkstraheer. Die gekombineerde eter lae is drie keer met water (20 ml) gewas om van die oorblywende anorganiese soute ontslae te raak. Die eterlaag is vir 20 minute met watervrye magnesiumsulfaat gedroog, die droogmiddel is afgefiltreer en die eter is afgedamp om die suiwer pentadekanol (1,47 g, 78%) te lewer. Kyk massaspektrum Figuur 7.6.

*1-Bromopentadekaan:* 1-Bromopentadekaan is uit pentadekanol berei deur bromiedsubstitusie van die hidroksielgroep.<sup>7</sup> Pentadekanol (0,56 g, 0,00246 mol) is by 50°C gesmelt saam met gekonsentreerde swawelsuur (0,12 g, 0,00122 mol) en waterstofbromied (48%, 0,497 g, 0,00295 mol) waarna die reaksiemengsel vir 6 uur by 80°C geroer is. Die reaksiemengsel is afgekoel en in yswater gegiet, en die verlangde produk is met eter geëkstraheer, suurvry gewas en op die gewone manier geïsoleer om 1-bromopentadekaan (0,48 g, 67%) te lewer. Kyk massaspektrum

Figuur 7.7.

*Heksadekaannitriël:* Heksadekaannitriël is uit 1-bromopentadekaán berei deur substitusie van broom met sianied.<sup>8</sup> 'n Mengsel van 1-bromopentadekaán (0,48 g, 0,00165 mol), natriumsianied (0,101 g, 0,00206 mol) en triëtileenglikol (ca. 1 ml) is stadig verhit tot by 140°C terwyl die reaksiemengsel geroer is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere 3 uur by hierdie temperatuur geroer, waarna dit by water (10 ml) gevoeg is en die organiese produk met chloroform geëkstraheer is. Die gekombineerde chloroformekstrakte is met water tot neutraal gewas en oor watervrye magnesiumsulfaat gedroog. Die droogmiddel is afgefiltreer en die chloroform is afgedamp om heksadekaannitriël (0,25 g, 64%) te lewer. Oktadekaannitriël is op 'n soortgelyke wyse berei. Kyk massaspektra Figure 7.8 en 7.9.

### **Ikosaanamied**

Ikosaanamied is uit ikosanoësuur berei deur omsetting na die ooreenstemmende suurchloried gevolg deur die substitusie van die chloried met 'n amien.<sup>9</sup> Ikosanoësuur (0,2 g, 0,641 mmol) is met tionielchloried (1 ml, 0,00138 mmol) vir 30 minute gerefluks, waarna die mengsel afgekoel, en die oorblywende tionielchloried afgedistilleer is. Gekonsentreerde ammoniakoplossing (3 ml, 25%) is stadig by die suurchloried gevoeg terwyl die reaksiemengsel in 'n ysbad afgekoel is. Die gevormde amied is afgefiltreer en met water wat 'n bietjie etanol bevat het, gewas. Die produk is op filtreerpapier by kamertemperatuur gedroog om ikosaanamied (0,13 g, 65%) te lewer. Pentadekaanamied, 9Z-heksadekaanamied, heksadekaanamied en oktadekaanamied is op 'n soortgelyke wyse berei. Kyk massaspektra Figure 7.10 - 7.14.

### **2-Dekielheptaandioësuur**

*Etielsikloheksanoon-2-karboksilaat:*<sup>10</sup> 'n Natriumetilaatoplossing is berei uit natrium (23 g, 1,00 mol) en absolute etanol (300 ml). 'n Yskoue mengsel van diëtieloksalaat (146 g, 1,00 mol) en sikloheksanoon (98 g, 1,00 mol) is oor 'n tydperk van 15 minute by die etilaatoplossing gevoeg, terwyl die reaksiemengsel meganies geroer is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere uur geroer terwyl dit eers met die sout/ys-mengsel

afgekoel is, en daarna vir  $6\frac{1}{2}$  uur by kamertemperatuur geroer is. Verdunde swawelsuur (ca. 12%) is drupsgewys by die reaksiemensel gevoeg terwyl 'n temperatuur van ca.  $10^{\circ}\text{C}$  gehandhaaf is met behulp van 'n sout/ys-mengsel. Die suur reaksiemengsel is met water verdun tot 'n totale volume van 2000 ml, en die organiese material is met benseen geëkstraheer. Die gekombineerde benseenekstrakte is met water suurvry gewas en die organiese produk volgens die konvensionele metodes geïsoleer. Fraksionering van die produk het 'n fraksie ( $82 - 94^{\circ}\text{C} / 30 \text{ mm Hg}$ ) gelewer wat onveranderde sikloheksanoon en diëtieloksalaat bevat het, waarna die verlangde produk, etiel-2-sikloheksanoonglioksilaat, by  $132 - 136^{\circ}\text{C} / 5 \text{ mm Hg}$  ( $57,02 \text{ g}, 29\%$ ) afgedistilleer is. Spore ysterpoeier is by hierdie produk ( $57,02 \text{ g}, 0,288 \text{ mol}$ ) gevoeg, en die gevormde etiel-2-sikloheksanoonkarboksilaat ( $14,12 \text{ g}, 29 \%$ , bereken op die glioksilaat as uitgangstof) is by  $90^{\circ}\text{C} / 2 \text{ mm Hg}$  afgedistilleer. Kyk massaspektrum Figuur 7.15.

*2-Dekiel-2-karboëtoksisikloheksanoon:* 2-Dekiel-2-karboëtoksisikloheksanoon is berei uit etiel-2-sikloheksanoonkarboksilaat deur alkilering.<sup>11</sup> Absolute etanol (15 ml) is oor 'n tydperk van 5 minute drupsgewys by natrium (0,69 g, 0,030 mol) gevoeg, terwyl magneties geroer is. Etiel-2-sikloheksanoonkarboksilaat (5,00 g, 0,0252 mol) opgelos in absolute etanol (5 ml) is oor 'n tydperk van 15 minute drupsgewys by die mengsel gevoeg terwyl die reaksiemengsel verhit word, met die oliebad by ca.  $80^{\circ}\text{C}$ . Die temperatuur is verhoog om 'n stadige terugvloei te handhaaf, waarna 1-dekielbromied (6,63 g, 0,0300 mol) opgelos in etanol (5 ml), oor 'n tydperk van 20 minute drupsgewys by die reaksiemengsel gevoeg is. Die reaksiemengsel is vir  $1\frac{1}{2}$  uur onder stadige terugvloei magneties geroer, waarna dit oornag onder argonatmosfeer by kamertemperatuur laat staan is. Die reaksiemengsel is verhit en geroer onder stadige reflux vir 'n verdere 6 uur, is weer oornag laat staan, en is weer laat reflux vir 'n verdere  $6\frac{1}{2}$  uur. Water (40 ml) is gebruik om die neerslag wat gevorm het op te los, en eter (15 ml) is bygevoeg om die organiese laag te ekstraheer. Die waterlaag is nog twee keer met eter (15 ml) gewas, en die gekombineerde organiese lae is met magnesiumsulfaat gedroog. Die droogmiddel is afgefiltreer en die eter is afgedamp om die onsuiver produk te lewer. Die oorblywende 1-dekielbromied en etiel-2-sikloheksanoonkarboksilaat is by  $78 - 86^{\circ}\text{C} / 3 \text{ mm Hg}$  afgedistilleer om 2-dekiel-2-karboëtoksisikloheksanoon (4,44 g, 62%, bereken op die glioksilaat as

uitgangstof) te lewer. Kyk massaspektrum Figuur 7.16.

*2-Dekiel-1,7-heptaandioësuur*: 2-Dekiel-1,7-heptaandioësuur is uit 2-dekiel-2-karboëtoksisikloheksanoon berei deur die metode van Snyder et al.<sup>10</sup> Natriumhidroksied (2,43 g, 0,0608 mol) is oor 'n tydperk van 15 minute in metanol (ca. 7,28 ml) opgelos, terwyl geroer is met die oliebad by 120°C. 2-Dekiel-2-karboëtoksisikloheksanoon (4,44 g, 14,32 mmol) is oor 'n tydperk van 40 minute by die reaksiemengsel gevoeg terwyl dit geroer is by 120°C, waarna die reaksiemengsel vir 2½ uur by hierdie temperatuur geroer is. Water (14,5 ml) is by die reaksiemengsel gevoeg en die metanol is afgedistilleer, waarna gekonsentreerde soutsuur (5,095 ml, 0.100 mmol) drupsgewys by die reaksiemengsel gevoeg is terwyl verhit en geroer is. Aktiewe koolstof (0,1 g, 0,0083 mol) is by die reaksiemengsel gevoeg wat vir nog 5 minute onder terugvloei gekook is, waarna dit deur 'n Buchnerfilter gefiltreer is. Nadat die filtraat oornag gestaan het, is die produk drie keer met eter (20 ml) geëkstraheer en die eterlaag is drie keer met water (30 ml) gewas. Die organiese laag is vir 1 uur met watervrye magnesiumsulfaat gedroog, die droogmiddel is afgefiltreer en die eter is afgedamp om die onsuiver produk te lewer. By 'n mengsel van die gevormde kristalle en water (40 ml) en is daar genoeg natriumkarbonaat gevoeg sodat die kristalle oplos en die oplossing 'n pH van 10 bereik. Nog water (40 ml) is by die oplossing gevoeg, waarna die oplossing vier keer met eter (20 ml) gewas is. Die eterlaag is toegelaat om te skei van die oorblywende water en hierdie waterlaag is ook twee keer gewas met eter (15 ml). Gekonsentreerde soutsuur is by die gekombineerde waterlae gevoeg totdat die oplossing 'n pH van 1 bereik. Daarna is die produk drie keer geëkstraheer met eter (20 ml) en die gekombineerde eterlae is vier keer met water (20 ml) gewas. Die eterlaag is gedroog, gefiltreer en ingedamp om suiwer (100% GC-MS) 2-dekiel-1,7-heptaandioësuur (1,23 g, 29%) te lewer. Kyk massaspektrum en <sup>13</sup>C-KMR spektrum Figure 7.17 a en b.

### **Metiel-2-oksoheptadekanoaat**

*Litiumdiisopropielamien*: Litiumdiisopropielamien is uit diisopropielamien berei deur reaksie met butiellitium.<sup>12</sup> Voorafgedroogde tetrahydrofuraan (THF) is deur 'n kolom aluminiumoksied (aktiwiteit I) gechromatografeer om dit te droog, en om van enige

peroksiede wat moontlik teenwoordig kon wees, ontslae te raak. Diisopropielamien is vir twee dae gedroog met kalsiumhidried, waarna dit vir 20 minute onder terugvloei met die hidried verhit is en daarna van die kalsiumhidried afgedistilleer is. Butiellitium (1,6 M oplossing in heksaan, 9,8 ml, 0,016 mol) is by 'n oplossing van die diisopropielamien (2,19 ml, 0,016 mol) in THF (10 ml) gevoeg terwyl die reaksiemengsel met 'n ysbad afgekoel is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere uur by 0°C geroer terwyl die vorming van litiumdiisopropielamien voltooi is.

*Metiel-2-oksoheptadekanoaat*: Metiel-2-oksoheptadekanoaat is uit heksadekanoësuur berei deur die metode van Hangauer.<sup>13</sup> Die litiumdiisopropielamienoplossing in THF is afgekoel tot -78°C met behulp van 'n mengsel van droë ys en metanol en met 'n oplossing van heksadekanoësuur (1,0 g, 0,0039 mol) in THF (10 ml) behandel. Die temperatuur van die reaksiemengsel is vervolgens oor 'n tydperk van 2 uur geleidelik tot by 50°C verhoog en hierdie temperatuur is vir 'n verdere 20 minute gehandhaaf terwyl die reaksiemengsel geroer is. Die reaksiemengsel is weer na -78°C afgekoel en met 'n oplossing van dimetieloksaal (0,92 g, 0,00780 mol) in THF (5 ml) behandel. Die temperatuur van die reaksiemengsel is toegelaat om oor 'n tydperk van 'n uur tot -40°C te styg, waarna dit toegelaat is om oor 30 minute kamertemperatuur te bereik. Die reaksiemengsel is by versadigde natriumbikarbonaatoplossing (50 ml) gevoeg en vir 30 minute geroer. Die produk is met eter uit die oplossing geëkstraheer en die eterlaag is met swawelsuur (20%) en versadigde natriumchloriedoplossing gewas. Die eterlaag is gedroog en ingedamp om die verlangde produk, metiel-2-oksoheptadekanoaat (1,23 g, 105,6%) met 'n suiwerheid (GC-MS) van 25% te lewer. Kyk massaspektrum Figuur 7.18.

### **Tetradekaan-4-olied**

*1-Dodekeen*: 1-Dodekeen is uit 1-dodekielbromied berei deur eliminasië.<sup>14</sup> 1-Dodekielbromied (24,93 g, 0,100 mol) en etiel-disikloheksielamien<sup>15</sup> (31,4 g, 0,150 mol) is vir 19 uur met behulp van 'n verhittingsmantel by 180°C verhit, terwyl die reaksiemengsel meganies geroer is. Die reaksiemengsel is vervolgens tot kamertemperatuur afgekoel en die gevormde sout afgefiltreer en met petroleumter gewas. Die filtraat en petroleumterekstrak is gekombineer, die petroleumter afgedistilleer en die produk by 89°C / 10 mm Hg gedistilleer om suiwer (GC-MS) 1-

dodekeen (11,49 g, 68%) te lewer. Vergelyk massaspektrum Figuur 7.19.

*Tetradekaan-4-olied*: Tetradekaan-4-olied is uit 1-dodekeen berei deur die metode van Heiba et al.<sup>16</sup> 'n Mengsel van asynsuur (5,32 g, 0,0887 mol) en mangaan(II)-asetaat-tetrahidraat (10,26 g, 0,0419 mol) is in 'n argonatmosfeer tot by 90°C verhit, terwyl die reaksiemengsel magneties geroer is. Kaliumpermanganaat (1,57 g, 0,00993 mol) en asynsuuranhidried (16,7 ml, 0,164 mol) is agtereenvolgens by die reaksiemengsel gevoeg, terwyl die temperatuur van die reaksiemengsel tussen 90°C en 100°C gehou is. 1-Dodekeen (5,00 g, 0,0298 mol) en watervrye natriumasetaat (23,85 g, 0,291 mol) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna dit vir 3 uur onder terugvloei verhit is. Nadat die reaksiemengsel na kamertemperatuur afgekoel is, is dit met water (100 ml) verdun. Die produk is herhaaldelik met benseen geëkstraheer en op die gewone manier geïsoleer om tetradekaan-4-olied in 'n swak opbrengs van 1,5% en redelike lae suiwerheid (GC-MS) te lewer. Kyk massaspektrum Figuur 7.20.

### Oktadekieltetradekanoaat

Oktadekieltetradekanoaat is berei uit tetradekanoësuur en oktadekanol deur verestering.<sup>17</sup> Tetradekanoësuur (0,845g, 3,700 mmol), tolu eensulfoonsuur-monohidraat (0,020g, 0,105 mmol) en oktadekanol (1,001g, 3,701 mmol) is in benseen (15 ml) opgelos en vir drie ure onder terugvloei verhit, terwyl die gevormde water met behulp van 'n waterskeier uit die reaksiemengsel verwyder is. Die reaksiemengsel is met benseen (5 ml) verdun en agtereenvolgens met natriumbikarbonaatoplossing en water gewas. Die verlangde produk, oktadekieltetradekanoaat (1.73 g, 97%), is op die gewone manier geïsoleer. Ikosiel- en dodekielheksadekanoaat is op 'n soortgelyke wyse gesintetiseer. Kyk massaspektra Figure 7.21 - 7.23.



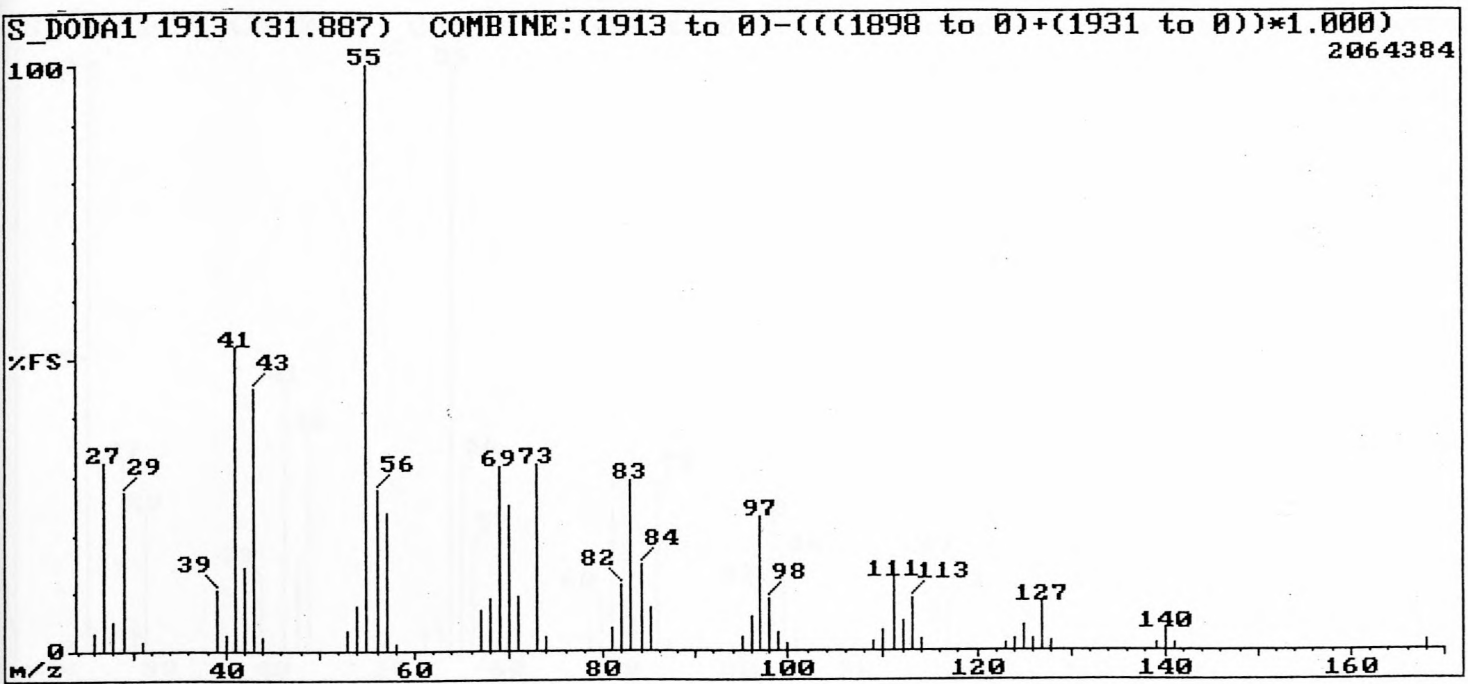


Fig. 7.1 a: EI-massaspektrum van dodekielpropenoaat.

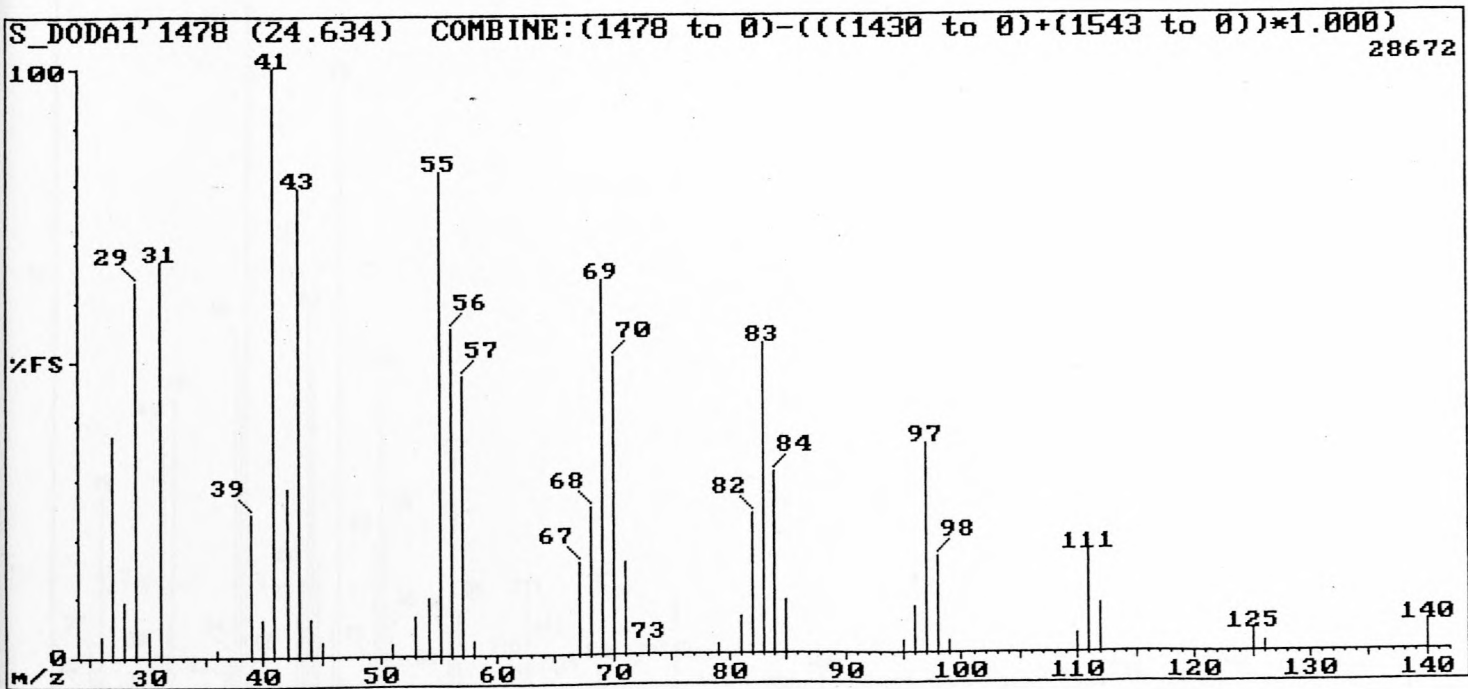


Fig. 7.1 b: EI-massaspektrum van dodekanol.

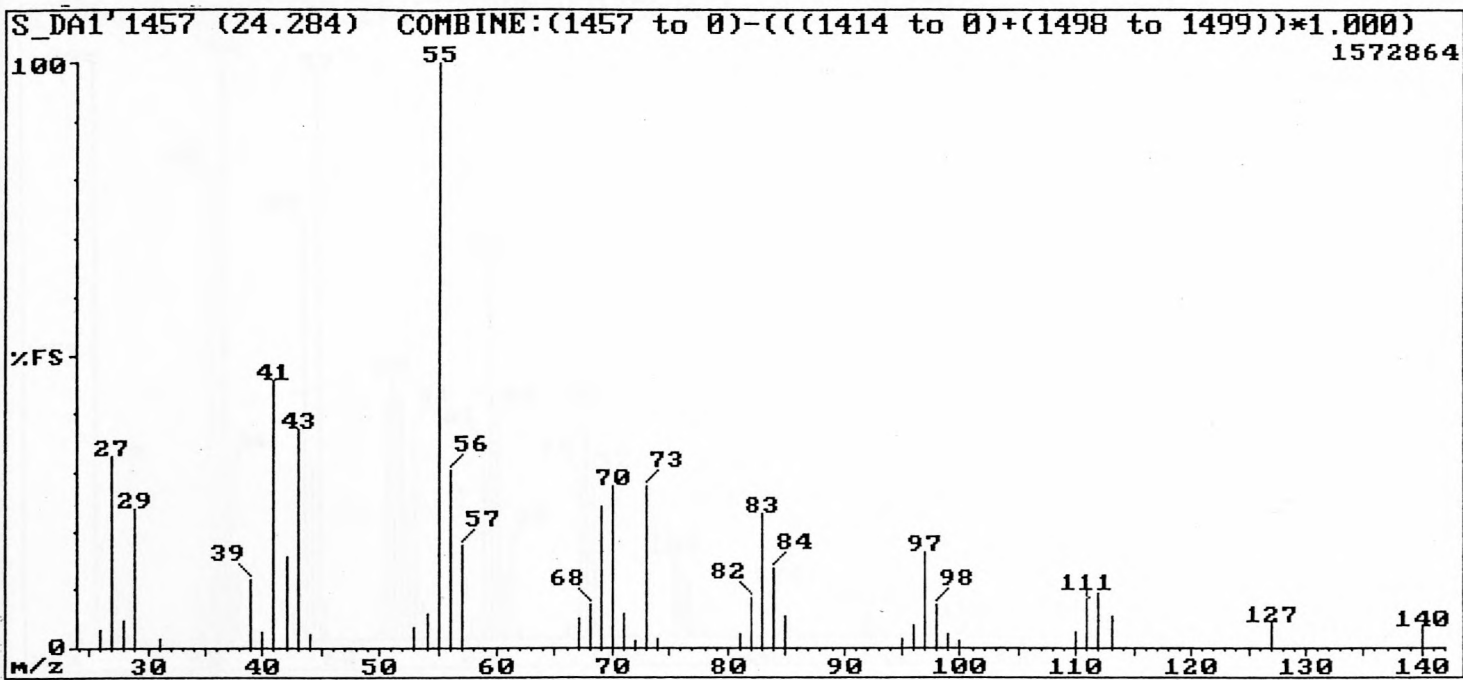


Fig. 7.2: EI-massaspektrum van dekielpropenoaat.

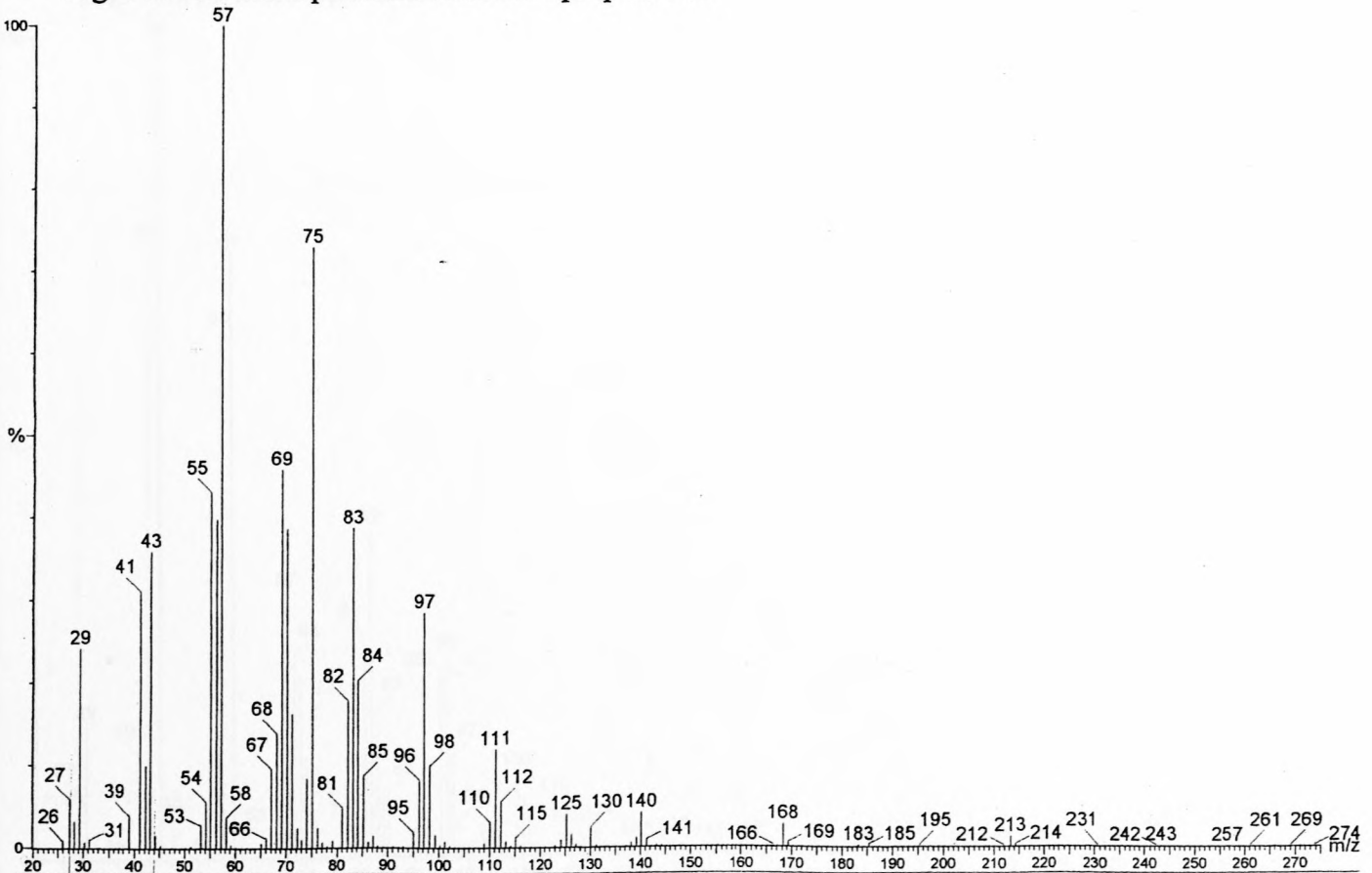


Fig. 7.3: EI-massaspektrum van dodekielpropanoaat.

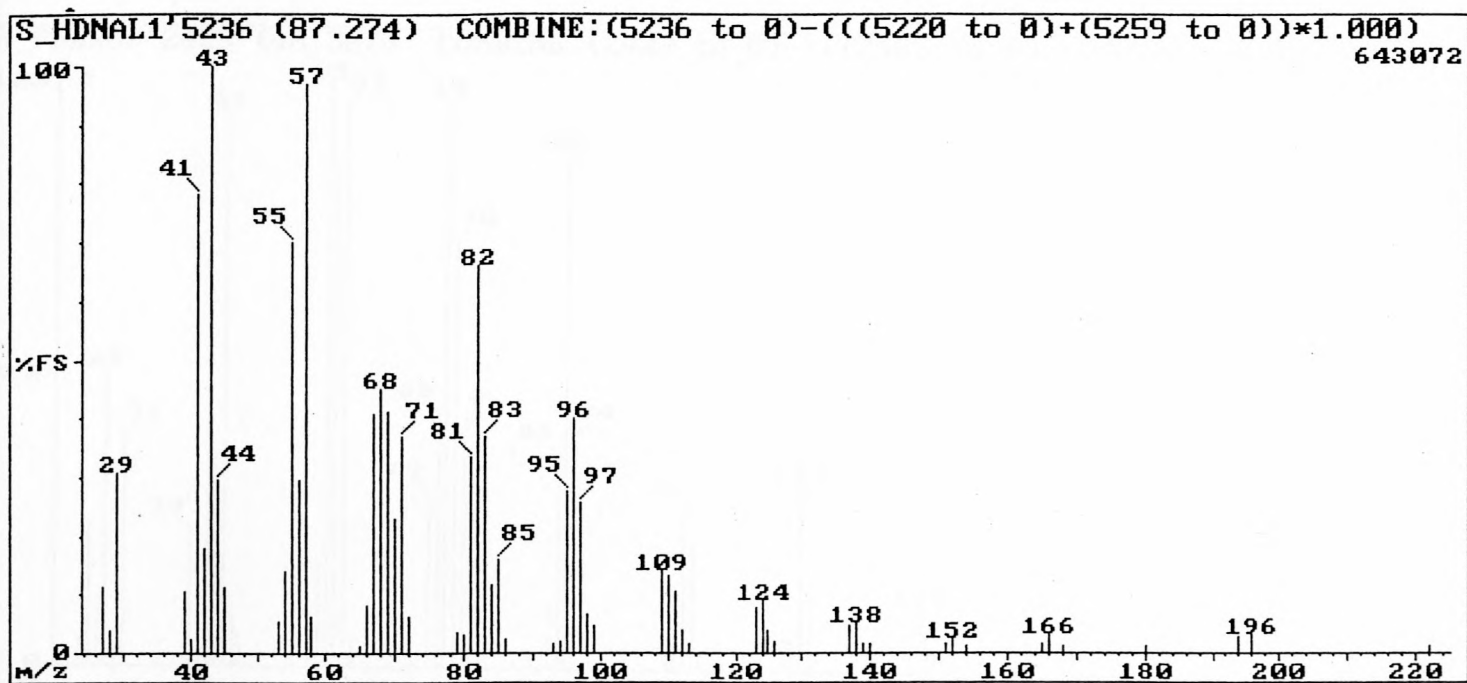


Fig. 7.4: EI-masspektrum van heksadekanaal.

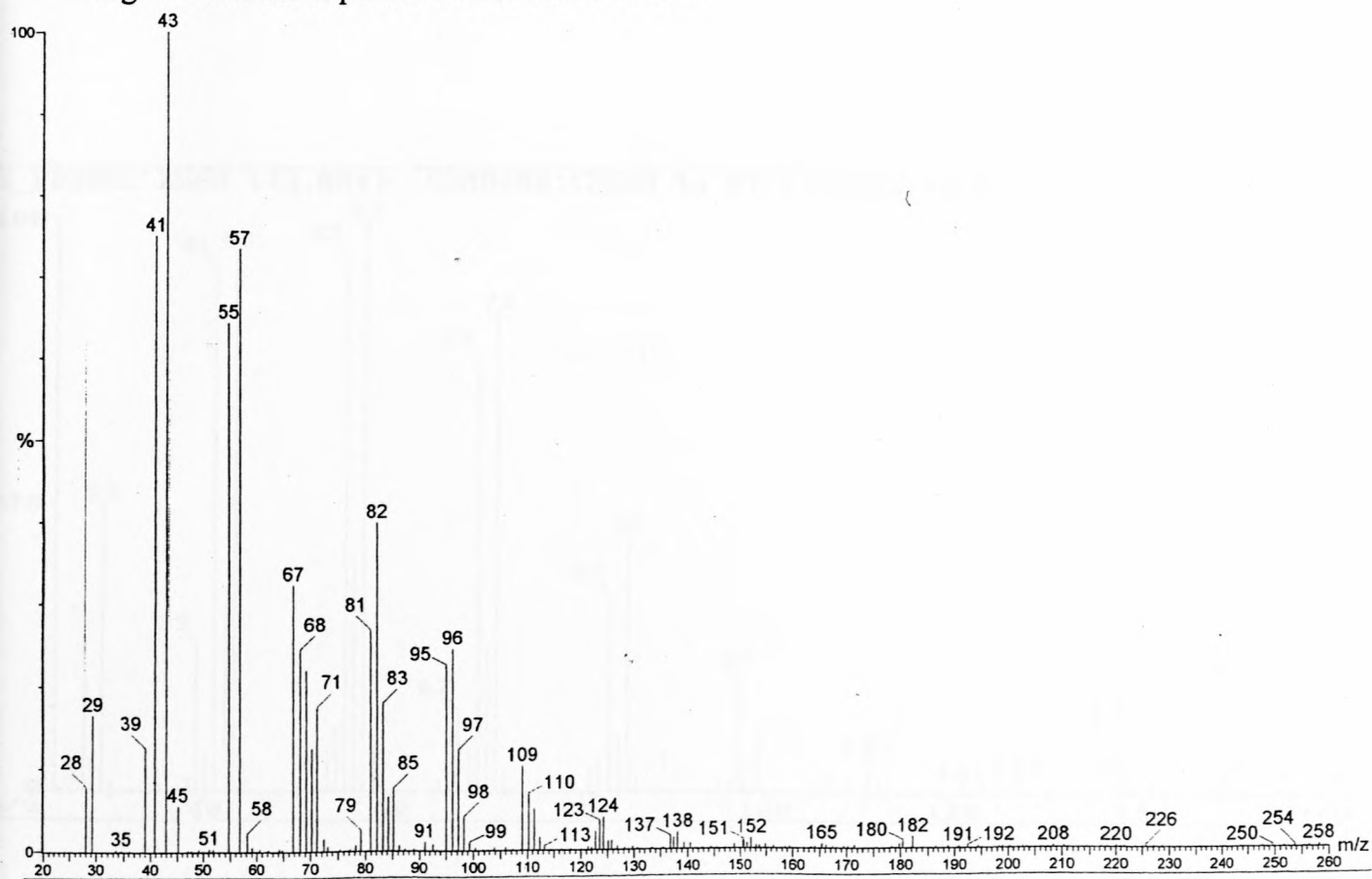


Fig. 7.5: EI-masspektrum van pentadekanaal.

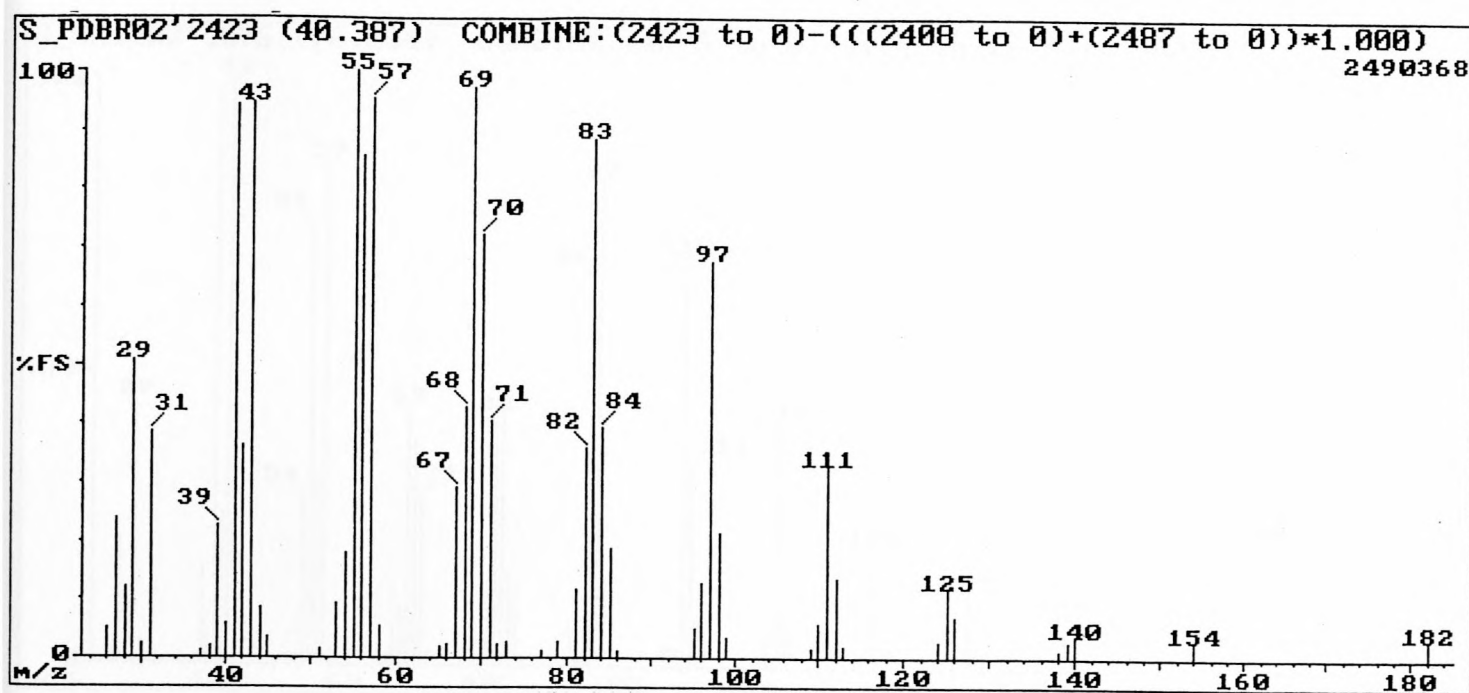


Fig. 7.6: EI-massaspektrum van pentadecanol.

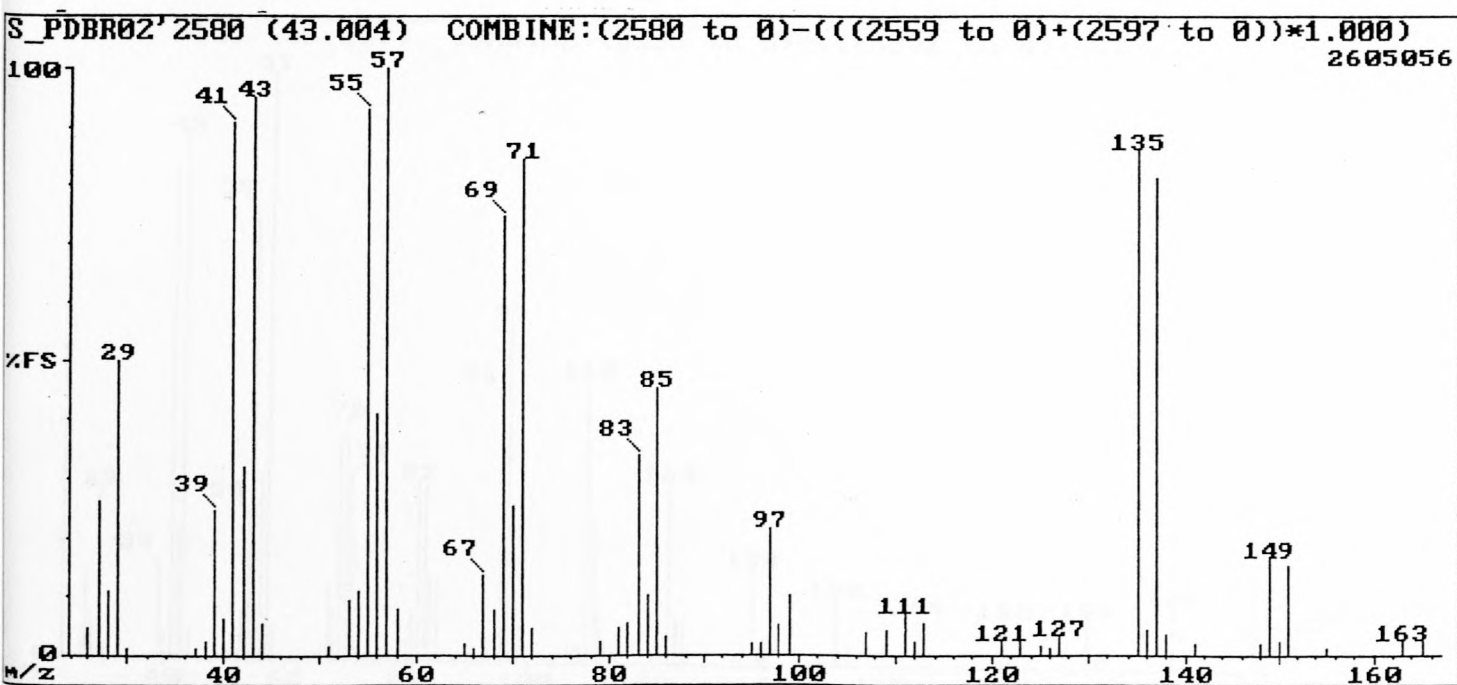


Fig. 7.7: EI-massaspektrum van 1-bromopentadecaan.

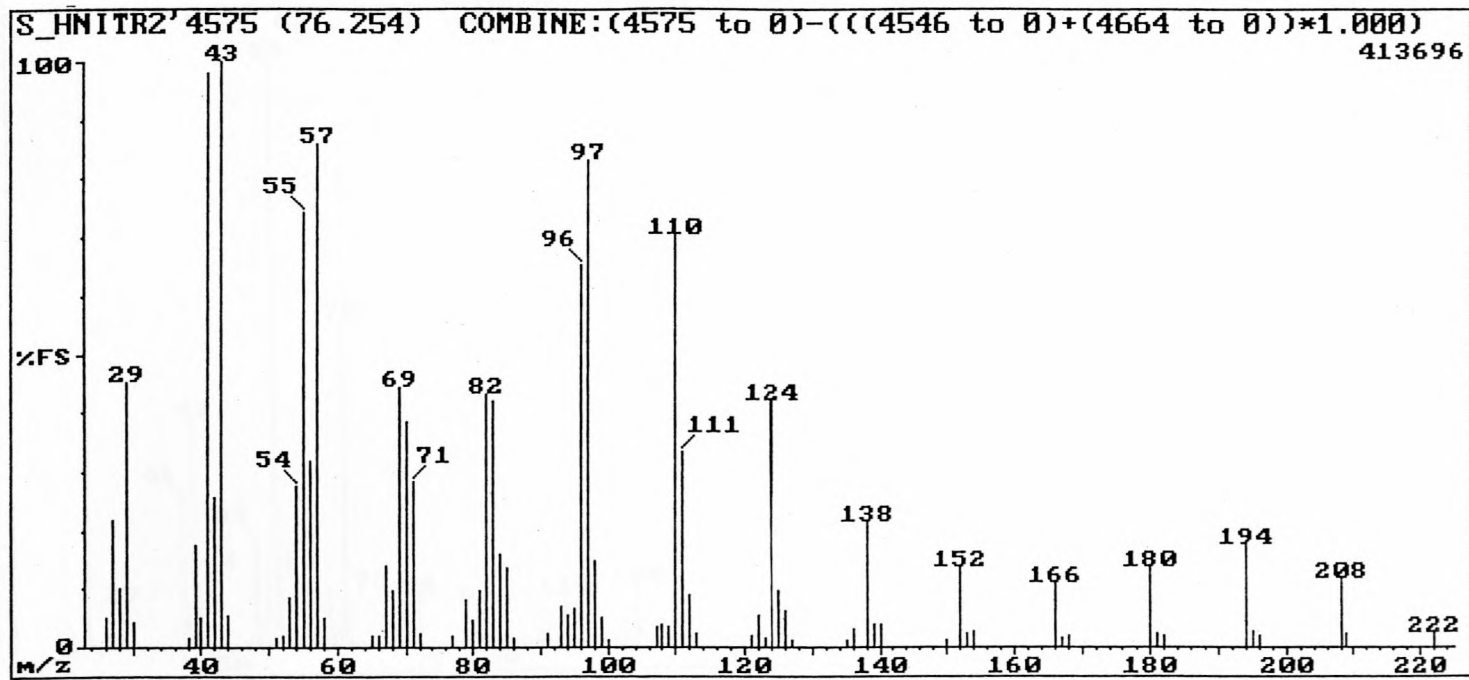


Fig. 7.8: EI-massaspektrum van heksadekaannitriël.

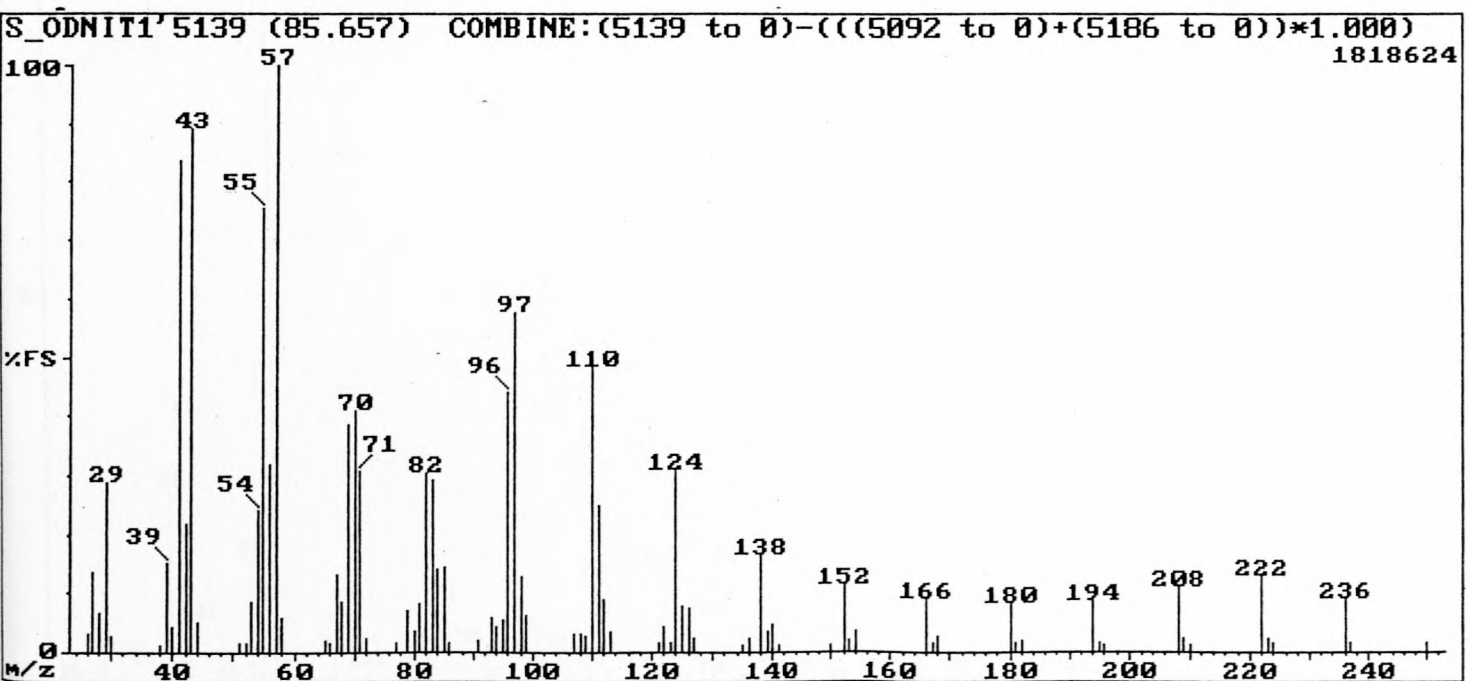


Fig. 7.9: EI-massaspektrum van oktadekaannitriël.

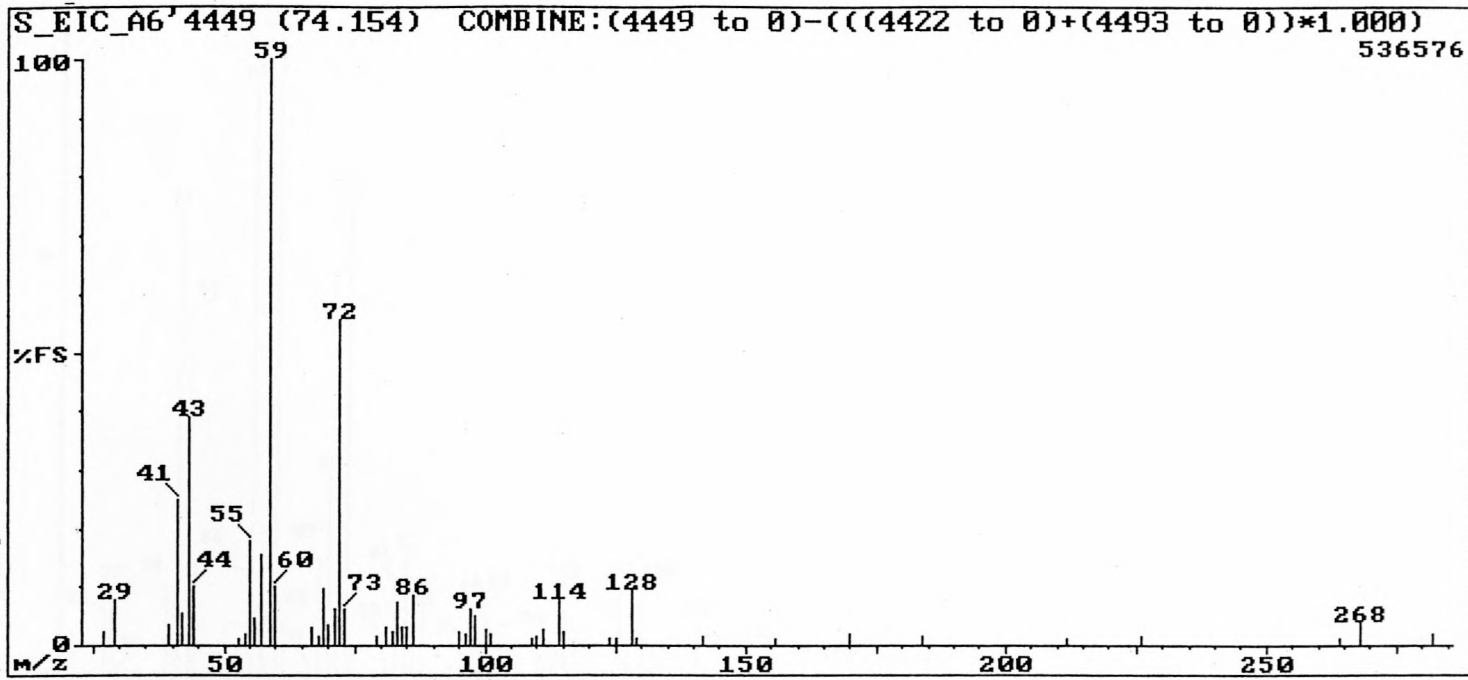


Fig. 7.10: EI-masspektrum van ikosaanamide.

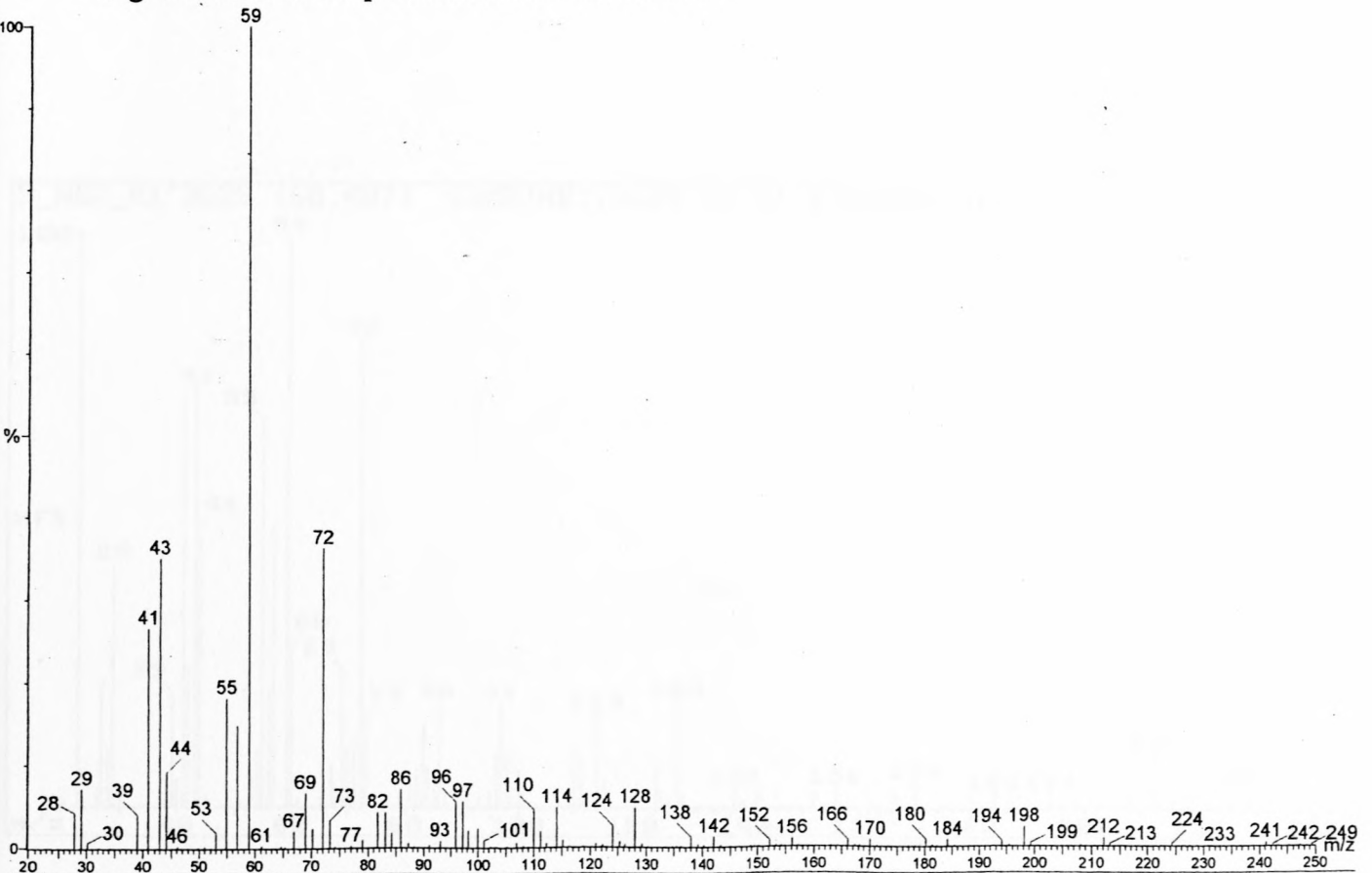


Fig. 7.11: EI-masspektrum van pentadecaanamide.

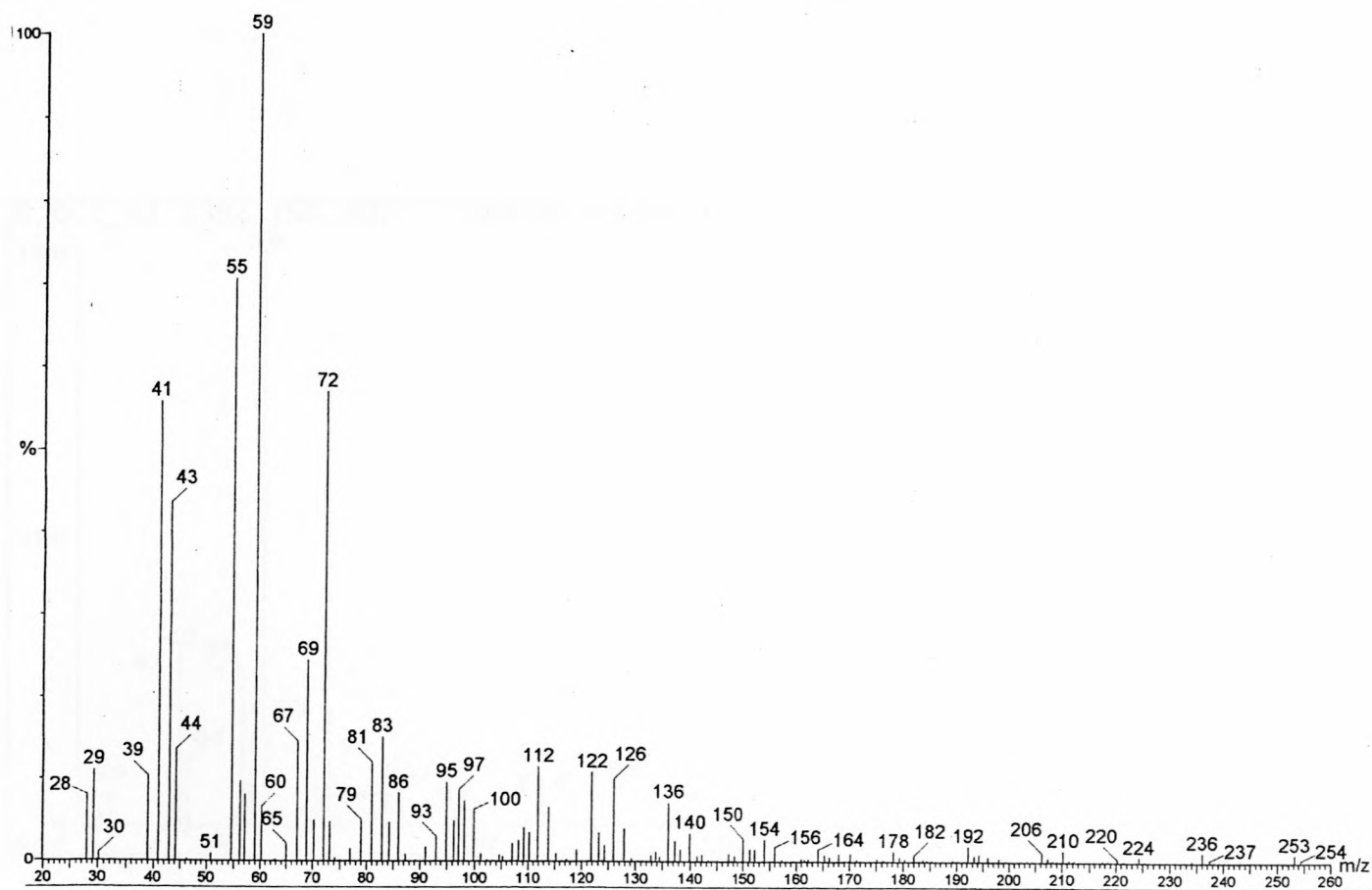


Fig. 7.12: EI-massaspektrum van 9Z-heksadekeenamied.

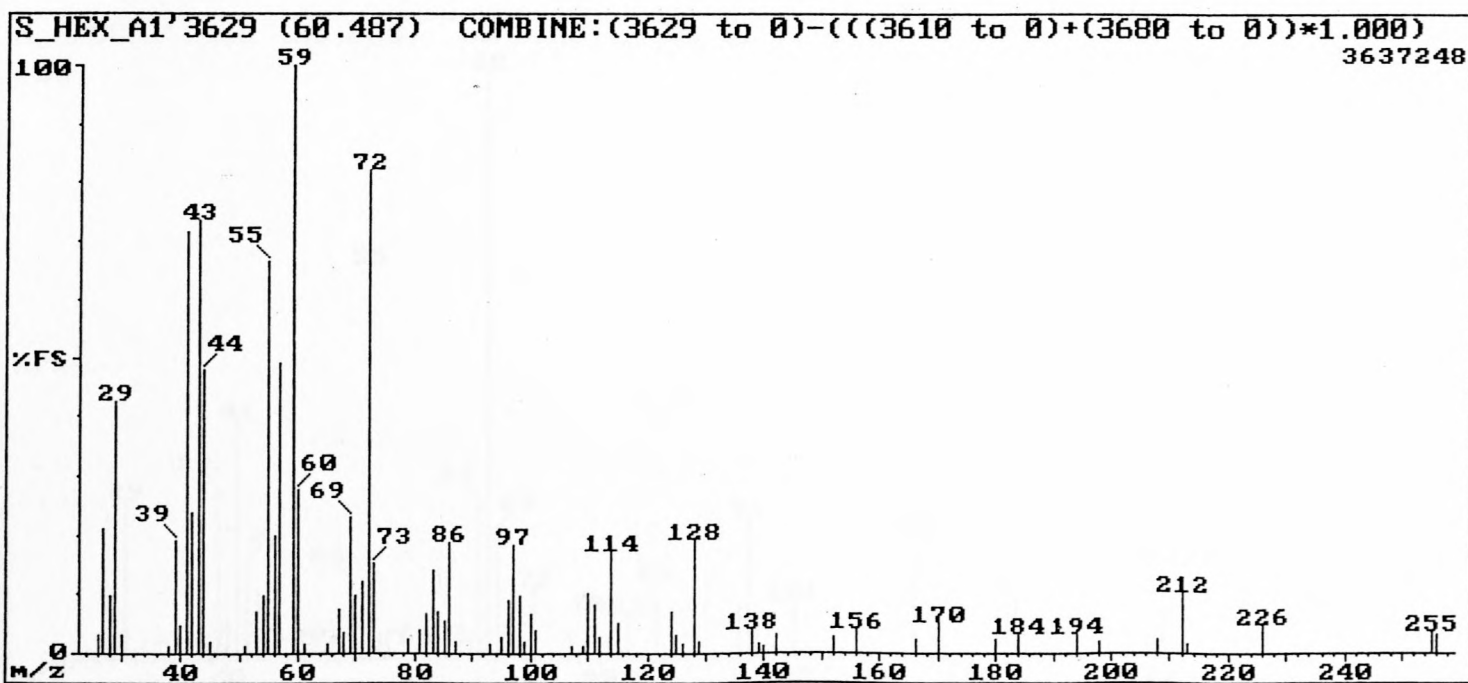


Fig. 7.13: EI-massaspektrum van heksadekaanamied.

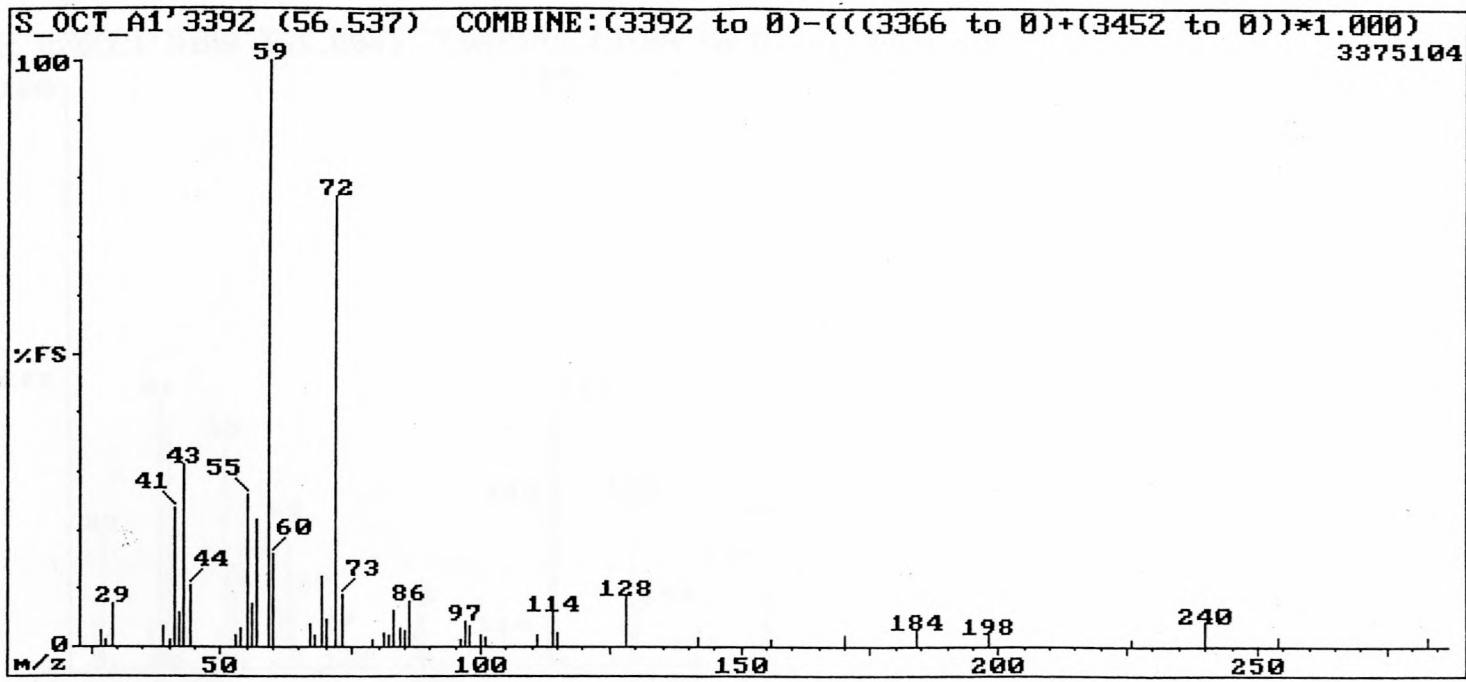


Fig. 7.14: EI-massaspektrum van oktadecaanamide.

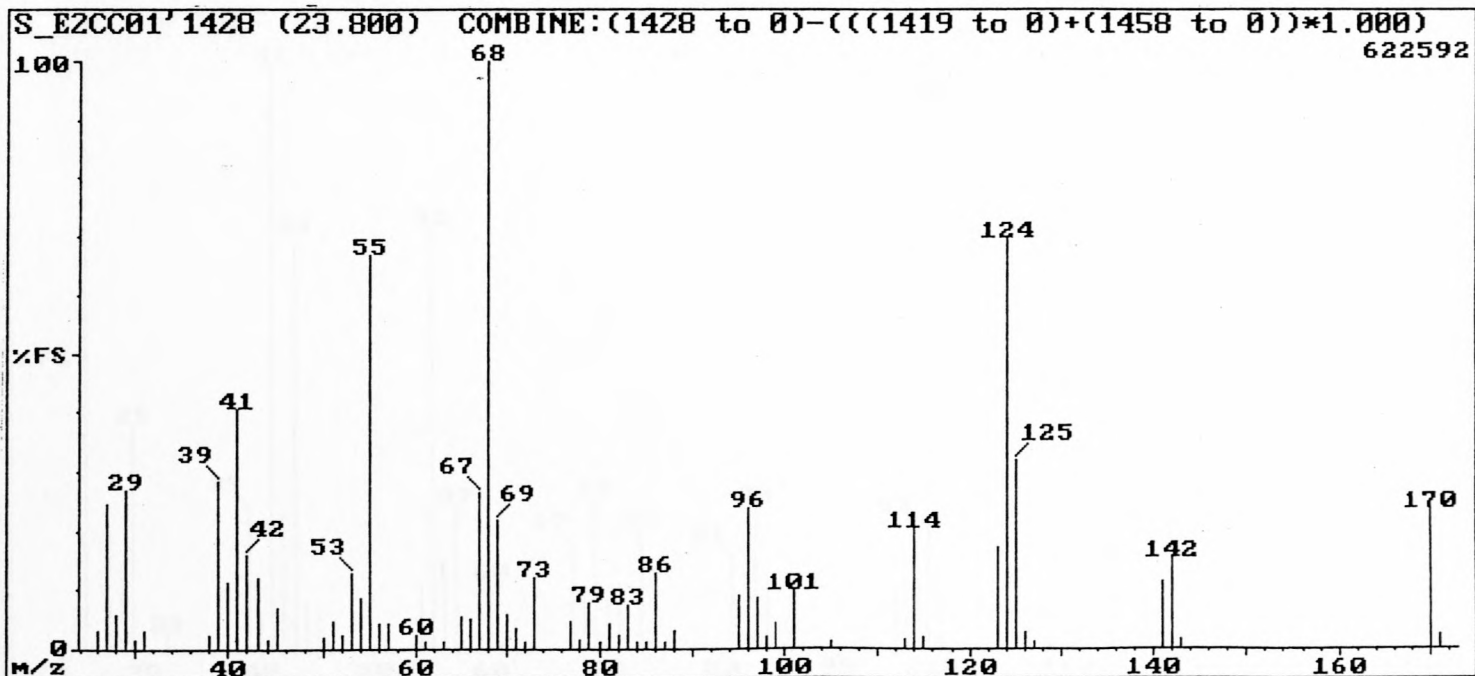


Fig. 7.15: EI-massaspektrum van etielsikloheksanoon-2-karboksilaat.



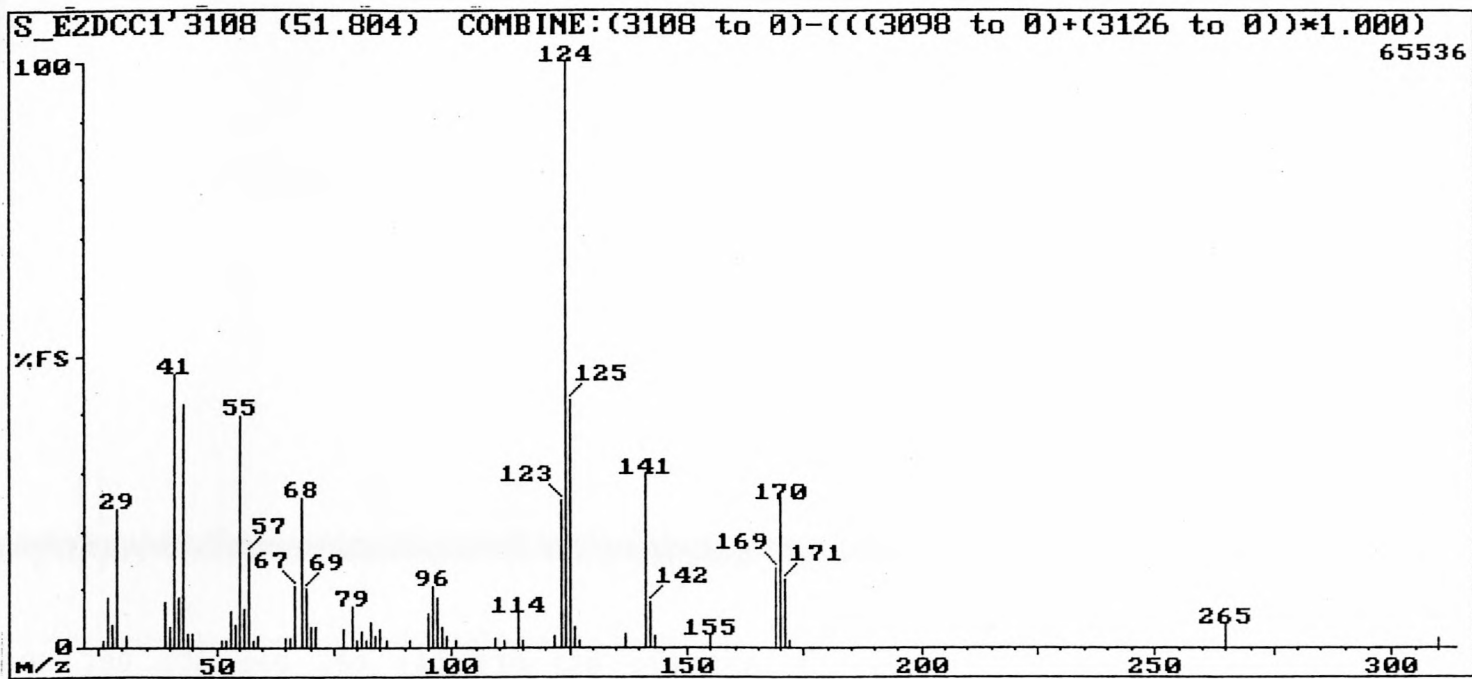


Fig. 7.16: EI-massaspektrum van 2-dekiel-2-karboëtoksisikloheksanon.

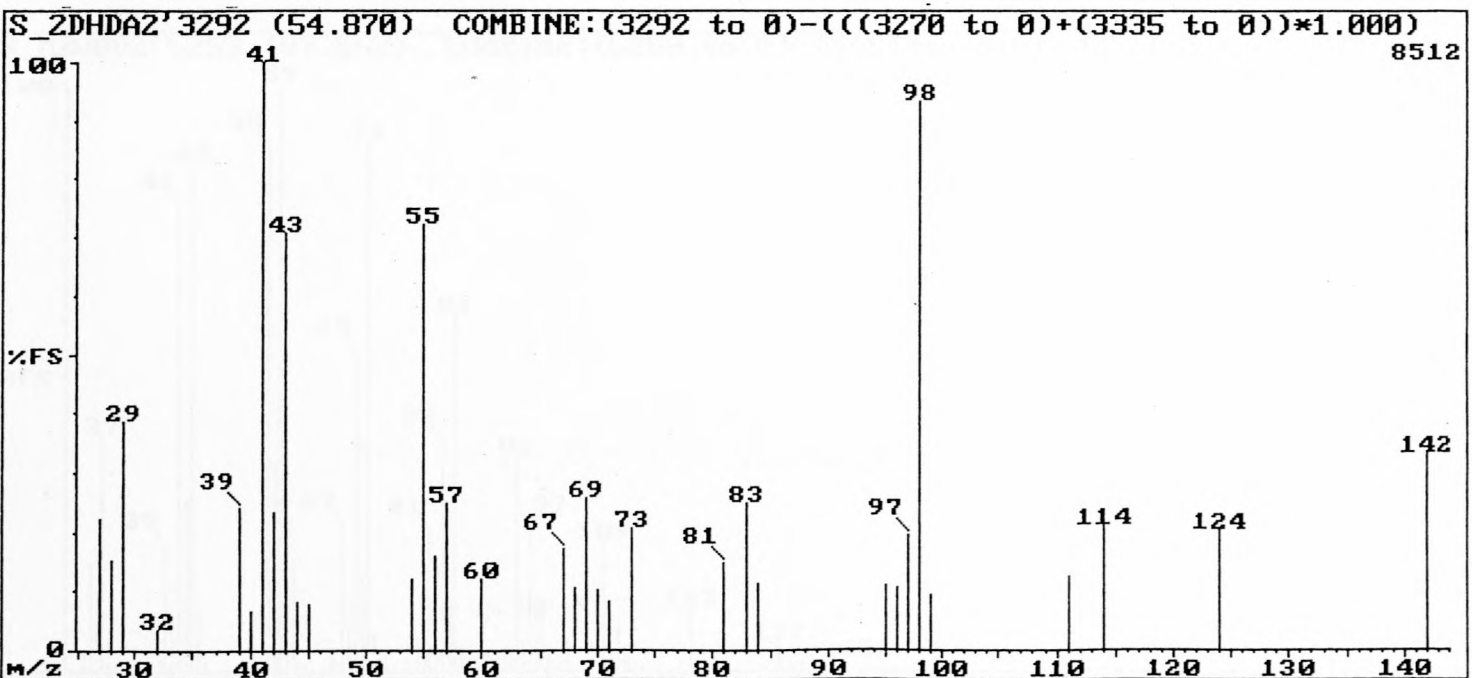


Fig. 7.17 a: EI-massaspektrum van 2-dekiel-1,7-heptaandioësuur.

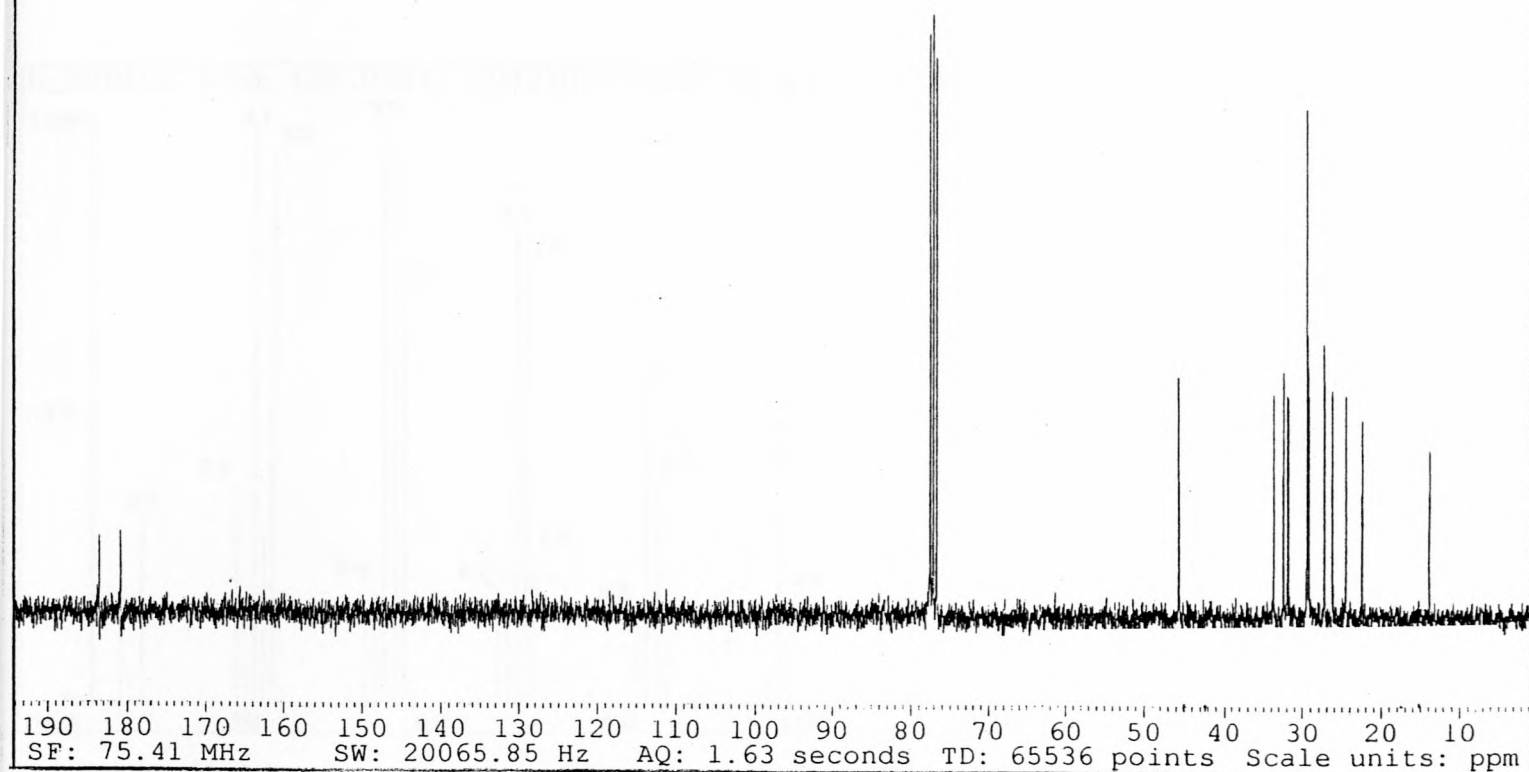


Fig. 7.17 b:  $^{13}\text{C}$  KMR-spektrum van 2-dekiel-1,7-heptaandioësuur.

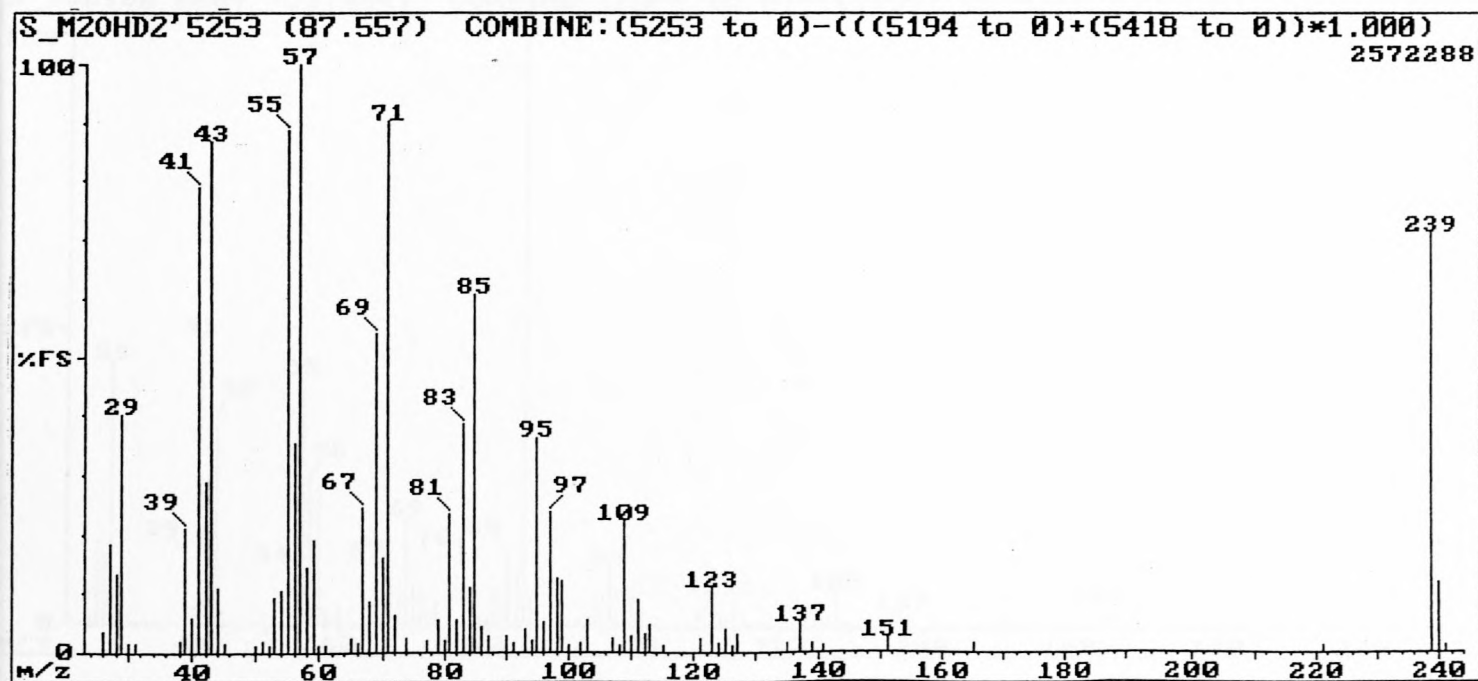


Fig. 7.18: EI-massaspektrum van metiel-2-oksoheptadekanoaat.

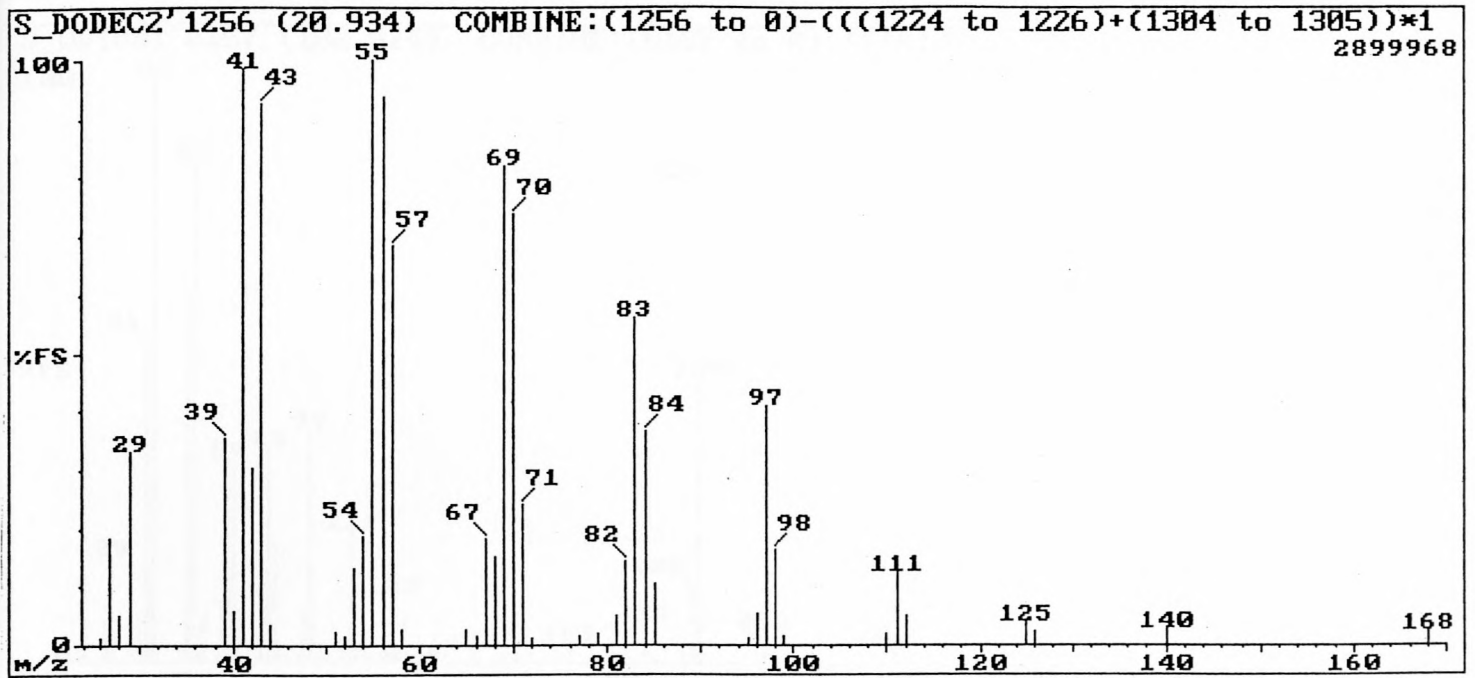


Fig. 7.19: EI-massaspektrum van 1-dodekeen.

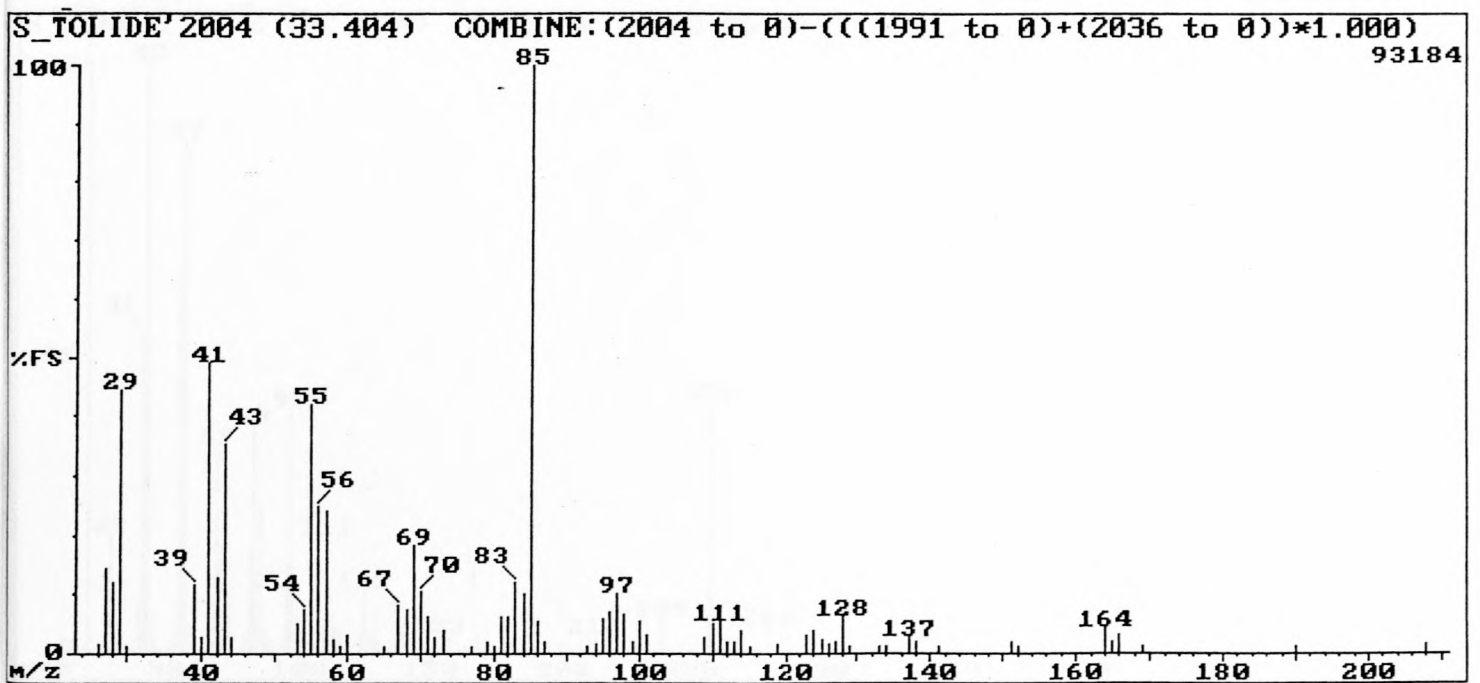


Fig. 7.20: EI-massaspektrum van tetradekaan-4-olied.

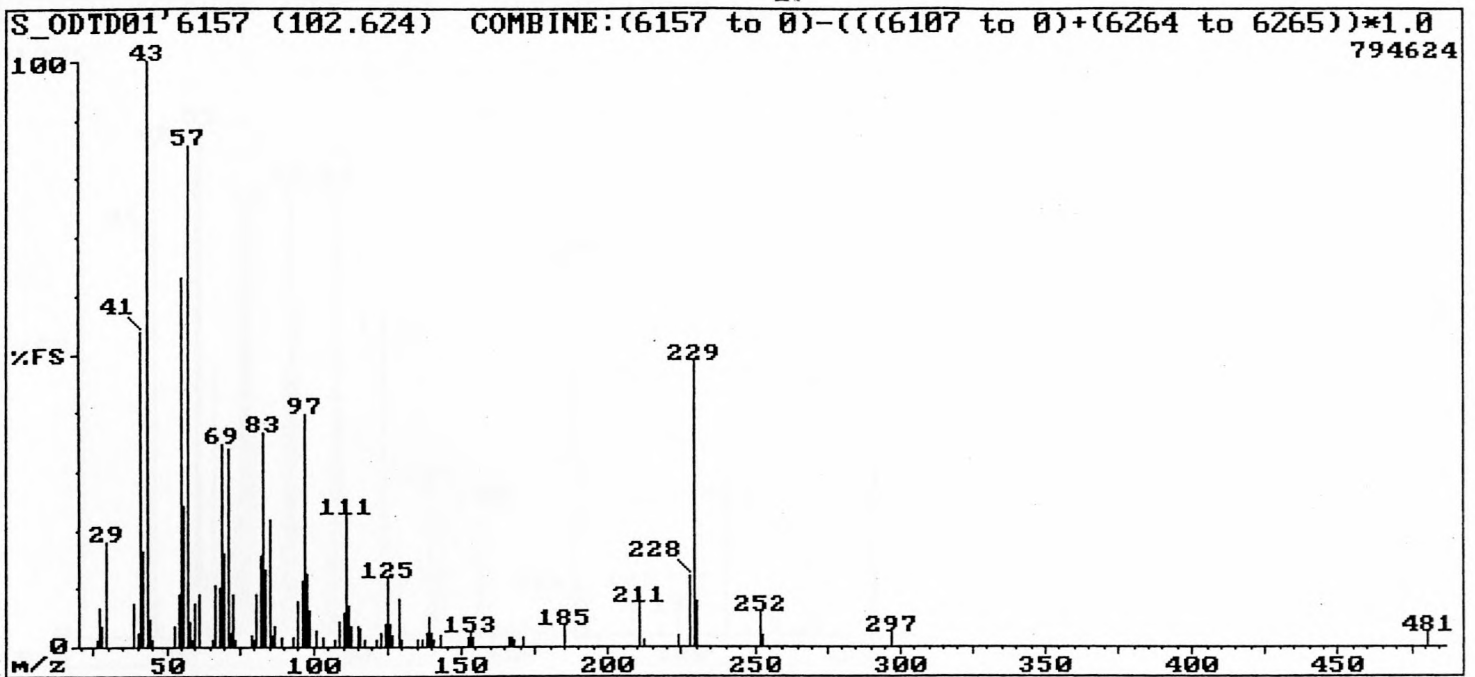


Fig. 7.21: EI-massaspektrum van oktadekieltetradekanoaat.

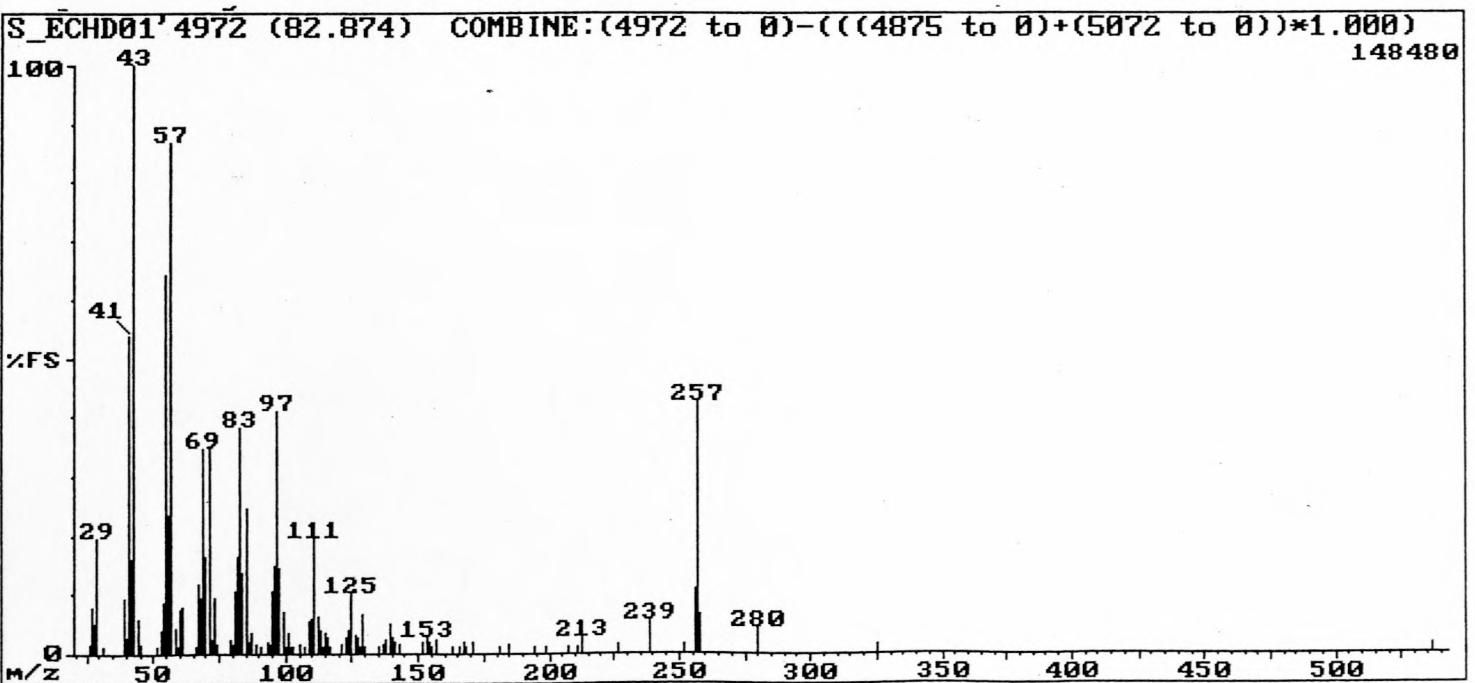


Fig. 7.22: EI-massaspektrum van ikosielheksadekanoaat.

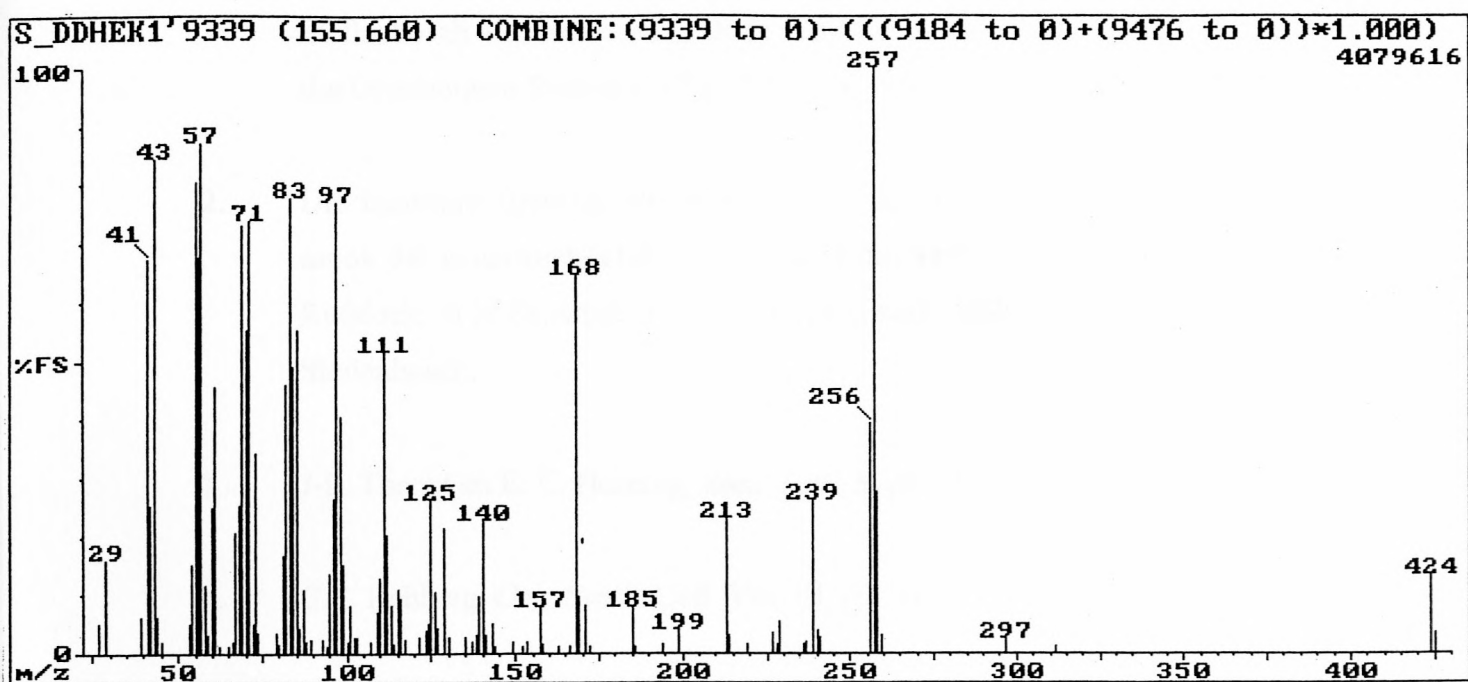


Fig. 7.23: EI-massaspektrum van dodekielheksadekanoaat.

## VERWYSINGS

1. Die femorale klierafskeidings wat vir die kwalitatiewe analises gebruik is, is in Stellenbosch versamel met die hulp van Mnr. A. Searby, 'n M.Sc.-student van die Departement Soölogie, Universiteit van Stellenbosch.
2. Die femorale klierafskeidings wat vir die kwantitatiewe analises gebruik is, asook die generasieklierafskeidings is in die Vrystaat versamel deur Mnr. L. Ruddock, 'n M.Sc.-student van die Departement Soölogie, Universiteit van Stellenbosch.
3. J-P. Thenot en E. C. Horning, *Anal. Lett.*, **5**, pp. 21-33 (1972).
4. C.E. Rehberg, *Org. Synth. Coll. Vol. III*, pp.146-148 (1955).
5. A. I. Vogel, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", vyfde uitgawe, Longman Group UK Limited, London, p. 609 (1989).
6. F. G. Mann en B. C. Saunders, "Practical Organic Chemistry", vierde uitgawe, Longman Scientific and Technical, p. 155 (1960).
7. B.J. Hazzard, "Organicum: Practical Handbook of Organic Chemistry", Pergamon Press Ltd., Oxford (1973), p. 195.
8. Verwysing 7, p. 224.
9. Verwysing 7, p. 631 en verwysing 6, pp. 1261-1262.
10. H. R. Snyder, L. A. Brooks en S. H. Shapiro, *Org. Syn. Coll. Vol. II*, p. 531 (1943).
11. Verwysing 7, p. 511.

12. Verwysing 5, p. 603.
13. D. G. Hangauer Jr., *Tetrahedron Letters*, **22**, pp. 2439-2442 (1981).
14. Verwysing 7, pp. 247-248 metode B.
15. Verwysing 7, p. 213.
16. E. I. Heiba, R. M. Dessau, A. L. Williams en R. G. Rodewald, *Org. Synth*, **61**, p. 22 (1983).
17. Verwysing 7, p. 421.

## **CIRRICULUM VITAE**

Stefan Louw is gebore op 25 Oktober 1976 in Bellville. Na hy in 1994 van die Hoër Tegniese Skool Bellville gematrikuleer het, het hy sy studie loopbaan aan die Universiteit van Stellenbosch begin. Hy het in 1997 sy BSc-graad en in 1998 sy BSc-honneurs in chemie verwerf. In 1999 het hy sy navorsing met 'n MSc in chemie begin. Na ongeveer een jaar is sy MSc-graad opgegradeer na 'n PhD, wat na 'n verdere vier jaar voltooi is.