

DIE ANTOSIANIENPIGMENTE VAN VITIS VINIFERA
cv. BARLINKA

deur

D.S. BASSON



Skripsie goedgekeur ter verkryging van die graad van

MAGISTER

in

VOEDSELWETENSKAP

aan die Universiteit van Stellenbosch,

November, 1964.

BEDANKINGS.

Die skrywer wil graag sy dank betuig teenoor:

Dr. B.H. Koeppen vir sy waardevolle leiding en belangstelling.

Prof. I.S. Perold vir kritiek gelewer op die geskrewe werk.

Dr. J.T. Meynhardt vir sy belangstelling en die materiaal wat hy goedgunstiglik verskaf het.

Die Departement van Landbou-Tegniese Dienste vir toestemming om hierdie werk vir tesisdoeleindes te gebruik en prof. R.I. Nel vir die fasiliteite wat hy beskikbaar gestel het, asook mej. E. Potgieter vir tekenwerk gedoen en vir haar morele bystand.

INHOUD

	Bladsy
INLEIDING	1
1. EKSPERIMENTEEL	5
1.1 Isolاسie van die antosianienpigmente uit die druiwedoppe	5
1.1.1 Apparaat en materiaal gebruik	5
1.1.2 Voorbereiding en opberging van die druiwedoppe	7
1.1.3 Ekstraksie van die kleurstowwe	7
1.1.4 Chromatografiese reiniging van die kleurstof-ekstrak	8
1.1.5 Chromatografiese isolاسie van die pigmente	9
1.1.6 Kristallisasie van die individuele pigmente	10
1.2 Identifikاسie van die pigmente	13
1.2.1 Hidrolise-studies	13
1.2.1.1 Gekontroleerde suurhidrolise	13
1.2.1.2 Alkalihidrolise	15
1.2.2 Bepaling van die posisie van substitusie en die tipe suikers teenwoordig	16
1.2.2.1 Konvensionele suurhidrolise	16
1.2.2.2 Oksidasie met waterstofperoksied	17
1.2.3 Konfigurاسie van die A- en B-ringe	18
1.2.3.1 Alkalismelt	18
1.2.3.2 Oksidasie met waterstofperoksied	19
1.2.3.3 Oksidasie met verdunde bytsoda-oplossing	19
1.2.4 Ultravioletabsorpsiespektra bepaling	20

1.2.4.1	Spektra van die antosianiene	20
1.2.4.2	Spektra van die aglikone	20
1.2.4.3	Spektra van die aluminiumchloriedchelate	21
1.2.4.4	Bepaling van die molare verhouding aglikoon: suiker in pigment C	21
1.2.4.5	Bepaling van die molare verhouding antosia- nien: asielres in pigment A	21
1.2.5	Infrarooiabsorpsiespektra bepalings	22
1.2.6	Die bereiding van standaard merkers	23
1.2.6.1	Antosianidiene	23
1.2.6.2	p-Kumaarsuur	24
1.2.6.3	3-Metoksigallussuur	26
2.	RESULTATE EN BESPREKING	28
2.1	Algemene opmerkings ten opsigte van die chro- matografiese gedrag van antosianiene	28
2.2	Hidrolise-studies	32
2.2.1	Gekontroleerde suurhidrolise	32
2.2.2	Alkali h hidrolise	35
2.3	Bepaling van die tipe en posisie van substi- tusie van die suikers teenwoordig	36
2.3.1	Konvensionele suurhidrolise	36
2.3.2	Oksidasie met waterstofperoksied	37
2.4	Konfigurasie van die A- en B-ringe	39
2.4.1	Alkalismelt	39
2.4.2	Oksidasie met waterstofperoksied	41
2.4.3	Oksidasie met verdunde bytsoda oplossing	42

2.5	Bepaling van die ultravioletabsorpsiespektra	43
2.5.1	Struktuurbeplating met behulp van aluminium-chloriedchelate	45
2.5.2	Afleidings vanaf die spektra aangaande die aantal en posisie van substitusie van die suikerreste teenwoordig in die pigment	46
2.5.3	Afleiding vanaf die spektrum van pigment A van die molare verhouding van antosianien: asielres	50
2.5.4	Bepaling van die molare verhouding antosianien: asielres in pigment A	51
2.5.5	Bepaling van die molare verhouding aglikoon: suiker in pigment C	53
2.6	Bepaling van die infrarooiabsorpsiespektra	54
2.7	Algemene opmerkings ten opsigte van die voorkoms van pigmente A, B, C, D en E	57
3	SLOTSOM	63
	VERWYSINGS	66

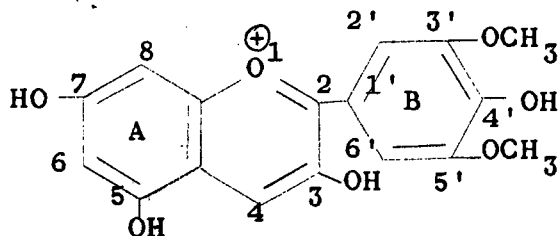
INLEIDING

Kleur speel 'n baie belangrike rol in die kwaliteitsbepaling van druiwe vir tafel-doeleindes. 'n Groot probleem by Barlinka (Vitis vinifera) druiwe is dat die kleurontwikkeling dikwels onreëlmatig en wisselvallig is, al word die druif in alle ander opsigte behoorlik ryp. Aangesien kleur so 'n belangrike rol by die aanneemlikheid van voedsel speel, is 'n goeie kleurontwikkeling 'n noodsaaklike vereiste vir 'n goeie kwaliteit produk. Douglas (1951) en Le Roux (1960) meld bv. dat die onvermoë van die Barlinka cultivar om onder sekere omstandighede ten volle swart te kleur 'n beperkende faktor in die verbouing daarvan is. As in aanmerking geneem word dat Barlinka gedurende die 1962-63 seisoen vyftig persent van die Suid-Afrikaanse druiwe-uitvoer behels het (Anoniem, 1963), blyk die belangrike finansiële implikasies duidelik wat hierdie swak kleurontwikkeling vir die Republiek se uitvoermarkte inhou. Die probleem van swak kleur kom ook by ander cultivars, soos bv. Red Emperor en Flaming Tokay voor (Douglas, 1951).

Ten einde die faktore wat 'n rol speel by die kleurontwikkeling in Barlinka druiwe wetenskaplik te bestudeer en te verstaan, is 'n kennis van die meganisme van kleurstofbiosintese essensieel. Alvorens hierdie meganisme egter ondersoek kan word, is 'n deeglike kennis nodig van die aard en soort pigmente wat in die normaalgekleurde, ryp Barlinkadruifkorrel voorkom.

Van die mooiste en mees uitstaande kleure in die natuur word teweeggebring deur antosianiene waarvan die kleure oor die hele gebied van rooi, pers na blou strek. Die naam antosian is vir die eerste keer deur Marquart (1835) voorgestel om slegs die blou pigment in die koringblou aan te dui. Hierdie term is later in 'n wyer begrip aanvaar om die hele groep soortgelyke pigmente in te sluit, omdat dit beseft is dat die rooi en blou kleure deur 'n enkele pigmentsoort veroorsaak word. Die chemiese samestelling van antosianiene het vir die eerste keer bekend geword na 'n ondersoek deur Willstätter & Everest (1913) i.v.m. die blou kleurstof in die koringblom.

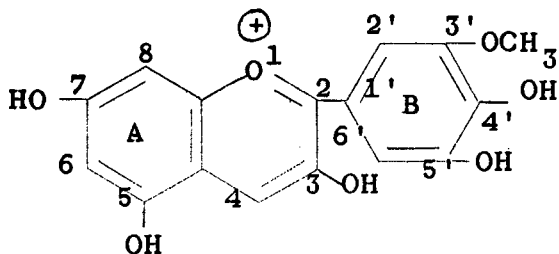
In die laaste helfte van die vorige eeu het die kleurstof in druie ook groot belangstelling gewek, maar dit was nie voor 1915 dat Willstätter & Zollinger (1915) daarin kon slaag om 'n kristallyne pigment uit die blou doppe van 'n Noord-Italiaanse cultivar van V. vinifera te isoleer nie. Hierdie verbinding wat oor die pikraat as 'n kristallyne chloried verkry is, is oenien genoem en is gevind om die monoglukosied van 'n dimetoksidelfinidien te wees (I). Verdere navorsing



Malvidien (3', 5'- dimetoksidelfinidien of oenidien)

het bevestig dat die hoofkleurstof van ander pers-swart cultivars van Europese druif (V. vinifera) uit oenien bestaan. Die woord oenien is afgelei van die Griekse woord „Oenos” wat wyn beteken. Die pigment is later deur Levy, Pasternak & Robinson (1931) gesintetiseer, wat bewys het dat dit bestaan uit 3-β -D-glukosiöldelfinidien-3', 5'-dimetiel-eter (malvidien-3-β -D-monoglukosied) wat identies was met die natuurlike produk wat uit V. vinifera (cultivar Fogarina) geïsoleer is.

Na 'n ondersoek van verskeie spesies van die genus Vitis, het Anderson & Nabenhauer (1926) tot die gevolgtrekking gekom dat die kleurstof in die donkerblou cultivars, soos bv. Concord (V. labrusca), hoofsaaklik uit die monoglukosiede van monometiöldelfinidien (petunidien) (II) bestaan, terwyl V. vinifera



Petunidien (3'-metoksidelfinidien)

II

en basters van Amerikaanse druifsoorte met V. vinifera oenien as die hoofpigment sou besit.

Na die daarstelling van papierchromatografie in hierdie veld deur Bate-Smith (1948), wat 'n baie noukeurige metode van analise meegebring het, kon Ribéreau-Gayon & Ribéreau-Gayon (1958) toon dat bogenoemde stelling 'n te groot vereenvoudiging

van die feite was. Hierdie werkers beskou die toestand van metilering van die antosianien as van aansienlike minder belang as die toestand van glikosidasie. Nadat hulle die pigmentasie van tagtig basters, dertig cultivars van V. vinifera en 'n reeks van Amerikaanse spesies ondersoek het, het hulle tot die volgende slotsom geraak:

1. In geen geval word diglikosiede in V. vinifera gevind nie, maar sekere Amerikaanse spesies (V. berlandieri) bevat ook geen diglikosiede nie.

2. Die teenwoordigheid van diglikosiede is kenmerkend vir V. riparia en V. rupestris.

3. Uit 'n genetiese oogpunt is die diglikosiediese aard dominant, d.w.s. kruisings van V. vinifera met V. riparia of V. rupestris bevat die diglikosiediese aard. Volgens die genetiese wette sal die resessiewe monoglikosiediese aard van die vinifera egter weer te voorskyn tree as die baster self weer met V. vinifera gekruis word.

Die toestand by wyne wat chromatografies ondersoek word, kan dus as volg opgesom word:

1. Indien die chromatogram die teenwoordigheid van 'n diglikosied aantoon, is dit seker dat dit 'n basterwyn is.

2. Indien die chromatogram die afwesigheid van diglikosiede toon, dan is dit hoogs waarskynlik 'n vinifera wyn.

Die oorsprong van Barlinka druiwe is onseker. Die cultivar is in 1910 vir die eerste maal deur Professor A.I. Perold

na Suid-Afrika gebring. Hy het die druifsoort in Noord-Afrika te Novi, sowat vyftig myl van Algiers, gevind. Alhoewel dit gou geblyk het dat Barlinka 'n uitstekende tafeldruif is, kon Perold (1926) geen beskrywing daarvan in die literatuur vind nie. Dit is interessant dat selfs vandag nog, Suid-Afrika die enigste land in die wêreld is waar hierdie druif kommersieël verbou word.

Taksonomies skyn dit asof Barlinka 'n kultivar van V. vinifera kan wees, maar die moontlikheid dat dit 'n baster is, kan nie uitgesluit word nie. In die lig van bostaande is die volgende studie ten opsigte van die kleurstof in die doppe van Barlinka gedoen.

1. EKSPERIMENTEEL

1.1 Isolasie van die antosianienpigmente uit die druiwedoppe.

1.1.1 Apparaat en materiaal gebruik.

(a) Apparaat

Preparatiewe chromatografie is uitgevoer in geïnsuleerde vlekvrystaal chromatografie kabinette (Reco A 300 en A 125, Research Specialities Co., Berkeley, Kalifornië). Whatman 3 MM (46 X 57 cm.) chromatografie piere is vir hierdie doel gebruik en Whatman no. 1 vir chromatografiese vergelyking met standaard merkers. Laasgenoemde proses is in Shandon glaskabinette uitgevoer. Deurgaans is van afwaartse chromatografie gebruik gemaak.

b. Oplosmiddelsisteme

Die oplosmiddelsisteme wat gebruik is by die chromatografiese ondersoek en skeiding van die pigmente word in tabel 1 opgesom.

TABEL 1.

Samestelling en afkortings van die oplosmiddelsisteme

Samestelling	Verhouding (volgens volume)	Afkorting
n-Butanol-asynsuur-water	4:1:2.2	BAW
n-Butanol-2N soutsuur	1:1	BuHCl
Bensien-asynsuur-water	125:72:3	Bens.
n-Butanol-bensien-piridien-water	5:1:3:3	Bu-BPW
Asynsuur-soutsuur-water	30:3:10	Forestal
Mieresuur-soutsuur-water	5:2:3	HCOOH
Asynsuur-water	2:98	2% HOAC
Asynsuur-water	15:85	15% HOAC
Fenol-water	75:25	PhOH

Al hierdie oplosmiddels se komponente is mengbaar met mekaar, behalwe in geval van Bu-BPW waar die boonste (organiese) laag gebruik is.

c. Spreireagense.

Bis-gediasoteerde bensidien (Koch & Krieg, 1938)

Die reagens bestaan uit twee oplossings, A en B wat net voor gebruik gemeng word. Oplossing A bestaan uit 'n suspensie van bensidien (5 g.) in gekonsentreerde soutsuur (14 ml.)

wat opgelos word in gedistilleerde water (980 ml.). Oplossing B bestaan uit 'n 10% (g/v) oplossing van natriumnitriet in water. Drie dele van A word by twee dele van B gevoeg en die mengsel gebruik net sodra dit helder word en 'n liggeel kleur aanneem.

Anilienwaterstofoksaalaat (Horrocks & Manning, 1949)

Die reagens word berei deur anilien (0.9 ml.) met 0.1N oksaalsuur (100 ml.) onmiddellik voor gebruik te meng en die chromatogramme word na dit gesprei is, vir agt minute by 100° verhit.

1:1:2 Voorbereiding en opberging van die druiwedoppe

Nadat die trosse van swartryp Barlinka druiwe deeglik onder kraanwater gewas is om stof en ander vuilheid te verwyder, is die doppe met die hand van die korrels afgetrek. Die vleisgedeelte van die korrels bevat geen antosianienpigmente nie. Die doppe is vervolgens herhaaldelik met kraanwater en uiteindelik met gedistilleerde water gewas om alle vry suikers te verwyder. Daarna is die doppe drooggeklad tussen twee groot chromatografie papiere, in 'n polietileen-sakkie geplaas en by -15° opgeberg. Chromatografiese analise het bewys dat die kleurstof in die doppe na verskeie maande nog identies met dié van die vars materiaal was.

1:1:3 Ekstraksie van die kleurstawwe

Die doppe (300 g.) is met metanoliese 1% (V/V) soutsuur

(1,200 ml.) vir 5 minute in 'n Waring Blendor opgemaal. Die ekstrak is afgefiltreer en die ekstraksieproses in die Waring Blendor is vyf maal met suiwer metanol (900-1200 ml.) herhaal. Na die laaste ekstraksie was die filtraat prakties kleurloos en die fyngemaalde doppe was slegs ligpienk gekleurd. Die gesamentlike ekstrak (6 liter) is onder verminderde druk in 'n roterende verdamper by 30-35° ingedamp tot ongeveer 460 ml. Omdat antosianiene onstabiel is ten opsigte van hoë temperatuur, is metanol 'n besonder geskikte ekstraheermiddel. Behalwe dat dit 'n baie goeie oplosmiddel vir die pigmente is, kan dit maklik by lae temperatuur ingedamp word. 'n Bietjie soutsuur is bygevoeg om te verseker dat die pigmente volledig in die kationvorm verkeer en dat die pH aan die suurkant bly, want antosianiene is ook onstabiel by hoë pH.

1:1:4 Chromatografiese reiniging van die kleurstofekstrak

Die gekonsentreerde ekstrak (460 ml.) is in gelyke hoeveelhede (7 ml. per papier) met behulp van 'n pipet in strepe oor die breedte, ongeveer 5 cm. vanaf die kant, op Whatman 3MM papiere (66) geplaas en met waterige 1% soutsuur gechromatografeer. Die kleurstofkonsentrasie op die chromatogramme is hier te hoog om die komponente in individuele bande te laat skei en die doel van hierdie proses was slegs om alle vry suikers en ander water-oplosbare onsuiverhede uit te was. Die oplosmiddel is toegelaat om van die papier af te drup en daar is voortgegaan totdat die voorste rand van die kleurstofband oor

ongeveer 'n kwart tot 'n derde van die papier se lengte beweeg het (18-24 uur). Op die beginlyn van die papiere het 'n wasagtige grys-groen onsuiverheid agtergebly.

Die breë kleurstofband is met waterige 70-80% metanol geëluëer en die eluaat onder verminderde druk by 30-35° tot 25 ml. ingedamp.

1:1:5 Chromatografiese isolasie van die pigmente

Die donkerrooi konsentraat (seksie 1:1:4) is in gelyke hoeveelhede (2.5 ml. per papier) op 132 Whatman 3MM papiere geplaas en in BAW gechromatografeer totdat die oplosmiddel-front oor die lengte van die hele papier beweeg het (17-20 uur). Die kleurstof het hier in vyf duidelike bande geskei wat genommer is A, B, C, D en E in volgorde van afnemende R_f -waarde. Die benaderde R_f -waardes, kleure en relatiewe hoeveelhede waarin die bande voorkom, word in tabel 2 opgesom.

TABEL 2

R_f -waardes in BAW, kleure en hoeveelheid
waarin Barlinka pigmente voorkom.

Pigment	R_f -waarde	Kleur	Hoeveelheid*
A	0.69	Pers-rooi	5
B	0.45	Oranje-rooi	5
C	0.42	Pers-rooi	10
D	0.38	Blou	2
E	0.35	Blou	2

* Die hoeveelhede is relatief soos met die oog geskat volgens die breedte en kleurintensiteit van die bande.

Ander oplosmiddels soos BuHCl en waterige 1% soutsuur is ook vir die isolasieproses uitgetoets, maar geeneen het sulke goeie resultate soos BAW gelewer nie. Kolomchromatografie vir preparatiewe doeleindes is ook uitgetoets. Sellulose wat as die beste draermateriaal vir hierdie doel beskou word (Seikel, 1962), met BAW en BuHCl as oplosmiddelsisteme (Endo, 1957), is gebruik. Behalwe dat geen bevredigende skeiding verkry kon word nie, was dit ook moeilik om die butanoliese eluaat verder te verwerk.

1:1:6 Kristallisatie van die individuele pigmente

Die vyf bande A, B, C, D en E (seksie 1:1:5) is apart geëluëer met waterige 80% metanol. Die eluate is onder verminderde druk by 30-35° ingedamp totdat dit heeltemal waterig was (20-25 ml.) en gefiltreer. Die verdere behandeling is deur die aard van die individuele komponente bepaal.

Komponent A.

Die gesamentlike konsentraat uit twee eksperimente is gekombineer en onder verminderde druk oor watervrye kalsiumchloried in 'n vakuundesikkator ingedamp totdat 'n dik afsaksel gevorm het. Hierdie afsaksel is afgefiltreer, opgelos in absolute etanol en met gekonsentreerde soutsuur aangesuur tot 'n suurkonsentrasie van 5-6%. Die suur oplossing is weer in die vakuundesikkator geplaas en na twee dae het fyn, donkerrooi naaldjies begin uitsak. Die kristalle is afgefiltreer, met absolute etanol gewas, in die desikkator gedroog en by -15°C

gebêre. In een geval was dit nodig dat die eluaat van A nog 'n keer met BAW op papier gechromatografeer moes word voordat die kleurstofkomponent rein genoeg was om onder bogenoemde kondisies te kristalliseer.

Opbrengs: 16 mg. chromatografies rein kristalle uit 600 g. doppe.

Komponent B.

Die gesamentlike konsentraat uit twee eksperimente is gekombineer en oornag in die koelkas gelaat, waarna dik, donker, bruin-rooi naalde uitgesak het. By verdere konsentrasie onder verminderde druk in die desikkator het nog meer naalde uitgesak. Toe die konsentraat in baie klein volume bestaan het, is 'n bietjie absolute etanol bygevoeg en is dit verder in die desikkator ingedamp. Hierop het nog naalde, fyner en rooier as die eerstes, uitgesak. Na 'n paar dae het die naalde dikker en donkerder van kleur geword. Chromatografies was die fyner naaldjies identies met die dikker naalde wat eerste uitgesak het. Die kristalle was besonder maklik oplosbaar in water, selfs in water by 0°. Hulle is afgefiltreer, met 'n minimum hoeveelheid absolute etanol gewas, by kamertemperatuur in 'n desikkator gedroog en by -15° gebêre.

Opbrengs: 14 mg. chromatografies rein kristalle uit 600 g. doppe.

Komponent C.

Die konsentraat is op dieselfde wyse as die van komponent A

behandel en die kristallyne materiaal wat uitgesak het, is twee maal omgekristalliseer uit etanoliese 5% soutsuur. Die donkerrooi fyn naaldjies het baie soos die kristalle van komponent A gelyk. Die kristalle is afgefiltreer, met absolute etanol gewas, onder verminderde druk in 'n desikkator gedroog en by -15° gebêre.

Opbrengs: 154 mg, chromatografies rein kristalle uit 300 g. doppe.

Komponent D.

Hierdie komponent was in baie klein hoeveelhede teenwoordig en die konsentraat van die eluaat afkomstig uit drie eksperimente is onder verminderde druk in die vakuüm-desikkator tot byna droog ingedamp. 'n Klein bietjie waterige 1% soutsuur is bygevoeg en die oplossing by -5° gelaat. Na verskeie dae het klein donkerblou korrels kristallyne materiaal, wat min oplosbaar was in water, uitgesak. Dit is afgefiltreer, met water gewas, onder verminderde druk in die desikkator gedroog en by -15° gebêre.

Opbrengs: 2 mg. chromatografies rein kristalle uit 900 g. doppe.

Komponent E.

Dit was in net sulke klein hoeveelhede as komponent D teenwoordig. Dit is op dieselfde wyse as komponent D behandel en het identiese resultate gelewer.

Opbrengs: 2 mg. chromatografies rein kristalle uit 900 g. doppe.

In al die gevalle het wit kristallyne materiaal in die desikkator uitgesak sodra die volume van die konsentraat baie klein geword het. Dit het die kristallisatie van die pigmente baie bemoeilik want waar dit saam met die kristallyne pigmente uitgesak het, kon die materiaal nie van die kleurstowwe afgeskei word nie. Om daarvan ontslae te raak, moes dit herhaaldelik afgfiltreer word. Aan die begin het die stof uitgesak in die vorm van fyn wit naalde en later as vierkantige plaatjies, tipies soos vir gewone tafelsout.

Toetse vir 'n tartraat volgens Feigl (1960) op die fyn naalde het positiewe resultate gelever. Aangesien daar heelwat kaliumbitartraat in druiwe voorkom, kan dit wees dat wynsteensuur as gevolg van die relatief hoë soutsuurkonsentrasie daaruit vrygestel word en dit dan as naaldvormige kristalle uitsak. Omdat kaliumione ook in die proses vrygestel word en die chloriedioonkonsentrasie in die oplossing relatief hoog is, was die plaatjies wat later uitgesak het, waarskynlik kaliumchloried, want toetse vir die teenwoordigheid van 'n chloried in hierdie kristalle was sterk positief.

1.2 Identifikasie van die pigmente.

1.2.1 Hidrolise-studies.

1.2.1.1 Gekontroleerde suurhidrolise.

Vir hierdie ondersoek is die metode van Chandler & Harper

(1961) met klein wysigings gebruik. Kristallyne pigmente A, B en C (1-2 mg.) is in absolute etanol (2 ml.) opgelos en die oplossing met soutsuur aangesuur totdat dit 2 N ten opsigte van hierdie suur was. Die oplossing is gekook in 'n apparaat wat met 'n terugvloeiakoeler voorsien was. Laasgenoemde is met 'n prop afgesluit sodat die kokende oplossing nie onnodig aan lugsuurstof blootgestel is nie. Na 5 en ook na 20 minute is monsters van die hidrolisaat geneem en chromatografies ondersoek in Forestal, Mieresuur en BAW. By pigmente D en E is van die moederloog (1 ml.) gebruik gemaak in plaas van kristallyne materiaal en dit is verder net soos hierbo behandel.

Omdat dit bekend is dat die teenwoordigheid van soutsuur 'n effek op die R_f -waarde van antosianiene het (Bate-Smith, 1948), is die aglikone aan die einde van die proses met isoamielalkohol (3 X, 2 ml.) geëkstraheer. Die gekombineerde alkoholiese ekstrakte is met verskeie volumes bensien verdun, die antosianidienne met waterige 1% soutsuur (2 ml.) geëkstraheer (Robinson & Robinson, 1932) en chromatografies ontleed.

Aangesien pigment C in soveel groter konsentrasie as die ander komponente voorgekom het, was dit in hierdie geval ook moontlik om dit op groter skaal te hidroliseer. Die pigment (15 mg.) in absolute etanol (4 ml.) is aangesuur tot 5 N ten opsigte van soutsuur en vir 20 minute onder 'n terugvloeiakoeler gekook. Fyn donkerbruin-rooi naaldjies (7 mg.) van die antosianidien het uitgesak na afkoeling van die hidrolisaat in die koelkas.

1.2.1.2 Alkalihidrolise.

Kristallyne materiaal van pigmente A, B en C (1 mg.) en moederloog (1 ml.) van D en E is afsonderlik opgelos in 2 N bytsoda oplossings (2 ml.) en die reaksiemengsels vir 2 tot 3 uur by kamertemperatuur gehou. In al die gevalle het die oplossing dadelik 'n donkerblou kleur aangeneem en na 2 uur was dit geel tot geel-bruin. Dit is daarna met gekonsentreerde soutsuur aangesuur, die antosianiene met iso-amielalkohol geëkstraheer en oorgedra in waterige 1% soutsuur (seksie 1.2.1.1). Die waterige oplossing is toe chromatografies in BAW met ongehidroliseerde pigmente A, B, C, D en E vergelyk.

Omdat slegs pigment A 'n nuwe pigment met 'n ander R_f -waarde na alkalihidrolise gelewer het, is die hidrolise op pigment A herhaal en die aangesuurde hidrolisaat met eter geëkstraheer (5 X). Die eterlaag is oor watervrye natriumsulfaat gedroog, gefiltreer en onder verminderde druk by 50-60° ingedamp tot dit net droog was. Die residu is in 'n paar druppels metanol opgelos en chromatografies in BAW en 2% HOAc met *p*-kumaarsuur vergelyk. Die antosianien is met iso-amielalkohol geëkstraheer en in dieselfde oplosmiddels chromatografies met pigment C vergelyk.

1.2.2 Bepaling van die posisie van substitusie en die tipe suikers teenwoordig.

1.2.2.1 Konvensionele suurhidrolise.

Suurhidrolise is uitgevoer op 'n mengsel van die moederloog oplossings van pigmente A, B, C, D en E (0.25 ml. elk) wat met soutsuur aangesuur is tot 'n konsentrasie van ongeveer 5 N ten opsigte van laasgenoemde. Die suuroplossing is vir 15 minute onder 'n terugvloeiakoeler gekook, met water (0.5 ml.) verdun en met iso-amielalkohol (3 X, 2 ml.) opgeskud totdat die waterige laag kleurloos was. Om die soutsuur uit die waterige laag te verwyder, is dit opgeskud (3 X) met 'n 10% (V/V) oplossing van di-n-oktielmetielamien in chloroform (2 ml.) (Harborne & Sherratt, 1957b). Hierdie stap is nodig aangesien die suikers in die teenwoordigheid van suur geneig is om strepe in plaas van kolle tydens die chromatografie daarvan te vorm (Lederer & Lederer, 1957). Spore van die amien is uit die waterige laag verwyder deur dit met chloroform (2 ml.) op te skud (3 X). Die helder waterige oplossing is gebruik om chromatografies vir suikers te toets in die oplosmiddels BAW, PhOH en BuBPW met glukose, galaktose, rhamnose, xilose, en arabinose as standaard merkers. Die chromatogramme is almal vir ten minste 24 uur ontwikkel en die oplosmiddel het van die onderpunt van die papier afgedrup. Hierna is dit deeglik gedroog, met die spreireagens anilienwaterstofoksalaat bespuit en by 100° verhit totdat die suikerkolle sigbaar geword het.

1.2.2.2 Oksidasie met waterstofperoksied.

Die metode van Karrer & de Meuron (1932), soos gewysig deur Chandler & Harper (1961), is toegepas. Die kleurstof (1-2 mg.) is opgelos in metanol (0.3 ml.) en 30% waterstofperoksied (40 μ l) is bygevoeg. Na 4 uur by kamertemperatuur is palladium katalis (n paar grein) bygevoeg en die reaksiemengsel vir nog 20 uur gelaat. Gekonsentreerde (0.880) ammoniumhidroksiedoplossing (50 μ l) is toe bygevoeg en die oplossing vir 1 minuut in 'n kokende waterbad verhit. Die reaksiemengsel is direk op papier geplaas en chromatografies vir suikers ondersoek.

As kontrole is hesperetin-7-glukosied (1 mg.) in 0.005 N ammoniumhidroksied gesuspendeer. Dit is verder netsoos die pigmente met waterstofperoksied geoksideer, die oortollige oksideermiddel ontbind en die oksidasieproduk met ammoniumhidroksied gehidroliseer. Omdat glukose ook in hierdie geval gevind is as 'n reaksieproduk, is besluit om die verhittingstyd van 5 minute, soos deur Chandler & Harper (1961) aangegee, na 1 minuut te verkort. Onder hierdie kondisies het geen glukose by die 7-glukosied vrygekome nie, maar die reaksie het nog goeie resultate met die pigmente gelewer.

1.2.3 Konfigurasie van die A- en B-ringe.

1.2.3.1 Alkalismelt.

Die mikrometode, soos deur Roux (1958) ontwikkel, is toegepas. Die kleurstof (1-2 mg.) is in die bol van 'n smeltbuis

15 cm. lank en 0.8 cm. interne deursnit, geplaas. Die buis is horisontaal gehou en een kaliumhidroksiedpilletjie op 'n posisie sowat 2 cm. vanaf die onderent van die buis geplaas. Die pilletjie is versigtig met 'n klein vlammetjie verhit tot dat dit gesmelt het terwyl sorg gedra is dat die antosianiene self nie verhit is nie. Sodra die pilletjie tot 'n helder vloeistof gesmelt het, is die buis vertikaal gedraai sodat die gesmelte materiaal op die pigment gevloei het. Die oplossing is in 'n vloeistofvorm behou deur nog te verhit, maar sorg is gedra dat die vloeistof nie kook nie. Na 90 sekondes is die buis vinnig in 'n stroom koue lug afgekoel.

Die vaste materiaal is daarna in 5 N swawelsuur opgelos terwyl die bol van die buis in water verkoel is. Hierdie suur oplossing is met vaste natriumbikarbonaat geneutraliseer tot dit alkalies teenoor lakmoes was. Die fenole is met verskeie porsies eter geëkstraheer en die gekombineerde eter-ekstrakte oor watervrye natriumsulfaat gedroog.

Die waterige oplossing is weer met 5 N swawelsuur aangesuur en die fenoliese karboksielsure is met verskeie porsies eter geëkstraheer. Die eterekstrakte is gekombineer en oor watervrye natriumsulfaat gedroog.

Die eter-ekstrakte van die fenole en die fenoliese karboksielsure is gefiltreer, onder verminderde druk by 50-60° drooggedamp en die residu's is in metanol (3-5 druppels) opgelos. Hierdie oplossings is chromatografies ontleed in RAW, Bens. en 15% HOAc met floroglusinol, gallussuur, protokatesjoësuur en

p-hidroksibensoësuur as standaard merkers.

1.2.3.2 Oksidasie met waterstofperoksied.

Chandler & Harper (1961) se metode om suikerreste in die 3-posisie te bepaal is aangepas om die konfigurasie van die B-ring vas te stel. Die prosedure (seksie 1.2.2.2) is uitgevoer maar na die verhitting met ammoniumhidroksied is die oplossing met soutsuur aangesuur om te verseker dat die fenoliese karboksielsure in hul vry vorm verkeer. Die oplossing is met eter geëkstraheer en die eterekstrak is gedroog, gekonsentreer, op papier geplaas en chromatografies in BAW, Bens. en 15% HOAc ontleed met seringsuur, vanilliensuur en p-hidroksibensoësuur as standaard merkers.

1.2.3.3 Oksidasie met verdunde bytsoda-oplossing.

Bytsoda-oksidasie, soos beskryf deur Karrer & de Meuron (1927), is aangepas om op mikroskaal uitgevoer te kan word. Die kleurstof (1-2 mg.) is in 2 N bytsodaoplossing (1.5 ml.) opgelos en die oplossing vir 1 uur met uitsluiting van lug in 'n kokende waterbad verhit. Die oplossing is afgekoel, aangesuur met soutsuur en met eter geëkstraheer. Die eter is afgedamp en die residu in 'n minimum metanol opgelos en chromatografies in BAW, Bens. en 15% HOAc met standaard gallussuur, 3-metoksigallussuur, protokatesjoësuur en vanilliensuur vergelyk.

1.2.4 Ultravioletabsorpsiespektra bepalinge.

Die Zeiss model PM Q11 spektrofotometer is vir hierdie bepalinge gebruik. Blanke's is in elke geval berei om presies identies te wees met die oplosmiddel waarin die pigmente en p-kumaarsuur, opgelos was.

1.2.4.1 Spektra van die antosianiene.

Oplossings van omtrent 3.3 μ -M van die pigmente in metanoliese 0.1% (g./v.) soutsuur is gebruik vir die bepaling van die ultravioletabsorpsiespektra oor die gebied 230-600 m μ . In geval van pigmente A en C asook van malvidien en p-kumaarsuur, waar genoeg suiwer-kristallyne materiaal beskikbaar was, is die materiaal eers onder verminderde druk oor fosforpentoksied in 'n Abderhalden droogapparaat vir 2 uur by 100^o en 12 uur by kamertemperatuur gedroog voordat standaard oplossings in metanoliese 0.1% (g./v.) soutsuur opgemaak is. Vanaf die ekstinksiewaardes by die hoër golflengte absorpsiemaksimum is die molare ekstinksiëkoëffisiënte bereken. In geval van malvidien en p-kumaarsuur was dit nodig om die oplossings verder te verdun om gerieflike absorpsie lesings te verkry.

1.2.4.2 Spektra van die aglikone.

Die pigmente (1 mg.) is met 5 N etanoliese soutsuur (1-2 ml.) vir 20 minute by 100^o gehidroliseer. Die hidrolisaat is oornag in 'n vakuum desikkator onder verminderde druk oor water-vrye kalsiumchloried drooggedamp. 'n Geskikte verdunning van die residu in metanoliese 0.1% (g./v.) soutsuur is gemaak en

die absorpsiespektrum oor die gebied 230-600 m μ is bepaal.

1.2.4.3 Spektra van die aluminiumchloriedchelate.

Na die bepaling van die spektra van die aglikone en antosianiene in metanoliese 0.1% (g./v.) soutsuur, is 'n 5% (g./v.) oplossing van aluminiumchloried in etanol (4 druppels) by die pigment in die kwartssel gevoeg. Die inhoud van die sel is goed gemeng en na 5 minute is die spektrum oor die gebied 500-600 m μ bepaal.

1.2.4.4 Bepaling van die molare verhouding aglikoon: suiker in pigment C.

'n Bekende gewig (4.62 mg.) droë kristallyne pigment C is onder uitsluiting van lug met 5 N etanoliese soutsuur (2 ml.) gehidroliseer deur die oplossing vir 20 minute onder 'n terugvloeikoeler te kook. Die oplossing is met suiwer metanol na 'n geskikte volume (250 ml.) verdun sodat die gewigskonsentrasie van die soutsuur ongeveer 0.1% was. Die absorpsie van die oplossing by 547 m μ is gemeet en die konsentrasie malvidien deur middel van die molare ekstinksiekoëffisiënt by 547 m μ is bereken. Hieruit en uit die oorspronklike gewig antosianien geneem, kon die molare verhouding aglikoon: suiker bepaal word.

1.2.4.5 Bepaling van die molare verhouding antosianien: asielres in pigment A.

Pigment A is met bytsoda gehidroliseer (seksie 1.2.1.2) en die absorpsiespektrum van die aangesuurde hidrolisaat is in

metanoliese 0,1% soutsuur oor die gebied 230-600 $m\mu$ bepaal.

In Tweede hoeveelheid van pigment A (5.09 mg.) is met byt-soda gehidroliseer (seksie 1.2.1.2), aangesuur met soutsuur en die hidrolisaat met natriumchloried versadig om die oplosbaarheid van die vrygestelde suurres in die waterige laag te verminder. Die oplossing is met eter (3 X, 3 ml.) geëkstraheer en die eterekstrak is onder verminderde druk by 50-60° drooggedamp. Die residu is opgelos in metanoliese 0,1% soutsuur (200 ml.) en die absorpsiespektrum oor die gebied 230-600 $m\mu$ is bepaal. Die waterige laag wat die antosianien bevat het, is oornag onder verminderde druk oor watervrye kalsiumchloried in 'n vakuum desikkator gelaat om enige spore van eter wat 'n invloed op die absorpsiespektrum van die antosianien kon hê, te verwyder. Daarna is dit met metanoliese 0,1% (g./v.) soutsuur na 'n geskikte volume (250 ml.) verdun en die absorpsiespektrum oor die gebied 230-600 $m\mu$ bepaal.

1.2.5 Infrarooiabsorpsiespektra bepalinge.

In Perkin Elmer Model 21 infrarooispektrofotometer, toegerus met natriumchloried prisma's is vir hierdie bepalinge gebruik. Die tegniek, soos beskryf deur Ribéreau-Gayon & Josien (1960), waar van kaliumbromiedskyfies gebruik gemaak word, is toegepas. Droë kristallyne materiaal is in al die gevalle gebruik. In Konsentrasie van 1 mg./250 mg. kaliumbromied is vir pigmente A, B en E gebruik, terwyl 'n konsentrasie van 0.6 mg./250 mg. vir pigmente C, D en malvidien en 0.3 mg./250 mg. vir p-kumaarsuur

beter resultate gelewer het. Die spektra van al die verbindings is oor die gebied 5-15 mikron ($2,000-700\text{ cm}^{-1}$) bepaal. Die spektrum van 'n nujol emulsie van pigment C is ook oor dieselfde gebied bepaal.

1.2.6 Die bereiding van standaard merkers.

Al die standaard merkers was van kommersiële oorsprong, behalwe petunidienchloried, peonidienchloried, *p*-kumaarsuur en 3-metoksigallussuur wat plaaslik onverkrygbaar was en dus as volg berei is.

1.2.6.1 Antosianidiene.

(1) Petunidienchloried.

Droë fyngemaalde doppe (3 g.) van Cabernet Sauvignon (V. vinifera) (goedgunstiglik geskenk deur mnr. H. Malan, Departement van Chemie, Universiteit van Stellenbosch) wat vooraf met eter geëkstraheer is om wasse te verwyder, is geëkstraheer met metanoliese 1% (V/V) soutsuur (100 ml.) en daarna met suiwer metanol (4 X, 100 ml.). Die ekstrak is onder verminderde druk gekonsentreer en preparatief op Whatman 3 MM papiere (10) in BAW gechromatografeer. Ses bande het ontstaan en die een wat Malan (1963) as petunidien-3-monoglukosied geïdentifiseer het, is met waterige 80% (V/V) metanol geëlueer en gekonsentreer. 'n Deelvolum (2 ml.) van hierdie konsentraat is met 5 N etanoliese soutsuur gehidroliseer en die vrygestelde petunidienchloried as merker gebruik.

(ii) Peonidienchloried.

Peonidien is deur reduktiewe asetilasie, uit isorhamnetien (Goedgunstiglik geskenk deur dr. B.K. Nortje, N.I.V.V., Stellenbosch) berei volgens die metode van Krishnamurthy, Krishnamoorthy & Seshadri (1963). Isorhamnetien (15 mg.), sinkpoeier (15 mg.) en vars gesmelte natriumasetaat (8 mg.) is in water-vrye asynsuuranhidried (1 ml.) gesuspendeer en gekook in 'n apparaat waarvan die terugvloeiakoeler met 'n water-vrye kalsiumchloried-buis afgesluit is om waterdamp uit te sluit. Na 1 uur is nog sinkpoeier (15 mg.) bygevoeg en vir 'n verdere uur gerefluks. By hierdie mengsel is 'n 10% oplossing van soutsuur in n-propanol (2 ml.) gevoeg en geplaas in 'n proefbuis wat met 'n geslypte prop dig afgesluit is. Die prop is met twee spiraalveertjies in posisie gehou. Die buis is vir 2 uur in 'n kokende waterbad verhit totdat 'n dieprooi oplossing ontstaan het. Die oplossing is afgekoel en water is bygevoeg totdat 'n troebelheid as gevolg van die neerslag van flobavene ontstaan het. Die oplossing is gefiltreer en die filtraat as sulks is vir chromatografiese vergelyking gebruik.

Die hidrolise is onder druk in n-propanol gedoen om die ontstaan van flobavene teen te werk (Pigman, Anderson, Fisher, Buchanan & Browning, 1953).

1.2.6.2 p-Kumaarsuur.

Dit is gesintetiseer volgens 'n modifikasie van Sonn (1913) se metode. By p-hidroksibensaldehyd (5 g.) is vars gesmelte

kaliumasetaat (8 g.) en watervrye asynsuuranhidried (12.5 ml.) gevoeg. Die mengsel is gekook onder 'n lugterugvloei-koeler wat afgesluit is met watervrye kalsiumchloried; eers vir 1 uur by 160° en daarna vir 3 uur by $170-180^{\circ}$. Die rooi-bruin massa wat ontstaan het, is effens afgekoel (ongeveer 100°) en in kokende water (100 ml.) gegiet. Geel asetiel-p-kumaarsuur het uitgesak. Om die asetaat te hidroliseer, is verdunde bytsoda-oplossing by die warm mengsel gevoeg totdat al die geel asetaat opgelos het. Die harsagtige reste is warm afgefiltreer en die alkaliese filtraat is afgekoel. By aansuring met gekonsentreerde soutsuur het lang geel naalde van p-kumaarsuur uitgesak. Die kristalle is uit warm water omgekristalliseer.

Opbrengs: 1.5 g.

Kaliumasetaat is in plaas van natriumasetaat in hierdie bereiding gebruik aangesien die refluks tyd daardeur met ongeveer die helfte ingekort word. Bytsoda kon gebruik word om die asetielderivaat te hidroliseer, maar dit is nie die geval by die bereiding van kaneelsuur nie, want hier sal enige oormaat bensaldehyd en bytsoda Cannizzaro se reaksie ondergaan om bensoësuur te vorm. Dit is moeilik om kaneelsuur van bensoësuur te reinig.

Van die geel kristallyne p-kumaarsuur is verder gereinig deur dit onder verminderde druk te sublimeer in 'n sublimeerbuis wat met 'n waterverkoelde koue „vinger” toegerus was. Die temperatuur is stadig van 180° tot 210° verhoog. Die heeltemal

wit gesublimeerde materiaal wat op die koue vinger neergeslaan het, is omgekristalliseer uit warm water waarop dit wit naaldjies gelewer het.

Smeltpunt: 205° (Swaar sublimasie)

1.2.6.3 3-Metoksigallussuur.

Die suur is berei volgens die metode van Fischer & Freudenberg (1913). Gallussuur (20 g.) is opgelos in asetoon (100 ml.) en met uitsluiting van lug, in 'n stikstofatmosfeer, is 2 N bytsoda-oplossing (160 ml.) bygevoeg. Die rooibruin mengsel is afgekoel tot -5° C en terwyl deeglik geroer is, is 'n 12% fosgeenoplossing in tolueen (120 ml.) vinnig bygevoeg. 'n Emulsie en 'n ligbruin neerslag wat nie meer baie gevoelig vir lugoksidatie was nie, het ontstaan. Die mengsel is dadelik met petroleumeter (3 X, 100 ml.) geëkstraheer om die tolueen en asetoon te verwyder. Die mengsel is daarna met gekonsentreerde soutsuur (13.5 ml.) aangesuur en afgekoel in 'n vriesmengsel. Wit gallussuurkarbonaat het uitgesak en na 1 uur is dit afgefiltreer en versigtig met water gewas. Die materiaal is dadelik onder verminderde druk oor fosforpentoksied in 'n vakuundesikkator gedroog aangesien ^{die} verbinding nie baie stabiel in die teenwoordigheid van water is nie. Die produk is verder gereinig deur dit om te kristalliseer uit 'n oplossing van asetoon (40 ml.) in water (2 ml.). Die kristalle is afgefiltreer, met asetoon gewas en onder verminderde druk oor watervrye kalsiumchloried in 'n vakuundesikkator gedroog.

Opbrengs: 4.5 g. Smeltpunt: 250°

Die derivaat (4.2 g.) is gemetileer deur dit te suspendeer in koolstoftetrachloried (140 ml.) en oormaat eteriese diasometaan by te voeg. Die droë eteroplossing van diasometaan is volgens die metode van Koeppen (1961) berei. Gasborrels het vinnig afgekom en wit naalde het begin uitsak. Na 15 minute by kamertemperatuur is die mengsel onder verminderde druk by 25° ingedamp. Die konsentraat is vir 'n paar uur by -5° afgekoel en die kristalle wat gevorm het, is afgefiltreer, met asetoon gewas en in 'n vakuundesikkator gedroog.

Opbrengs: 3.94 g. Smeltpunt: 131-132°

Die gemetileerde derivaat (3.9 g.) is gehidroliseer deur dit in kokende water (60 ml.) op te los en verder te kook totdat die volume ongeveer 'n derde van die oorspronklike was. Gasevolusie het tydens die proses plaasgevind. Die oplossing is toe verder met 2 N natriumsoda-oplossing (20 ml.) in 'n geslote houër by kamertemperatuur behandel om die metielestergroep te hidroliseer. 'n Lagie petroleumeter is op die oppervlakte van die oplossing gegiet om oksidasie deur lugsuurstof te beperk. Na 24 uur is die oplossing aangesuur met 5 N soutsuur en na 1-2 uur by -5° C is die wit naalde van 3-metoksigallussuur afgefiltreer, met water gewas en in 'n vakuundesikkator gedroog.

Opbrengs: 1.8 g. Smeltpunt: 215° (Met swaar sublimasie)

2. RESULTATE EN BESPREKING.

2.1 Algemene opmerkings ten opsigte van die chromatografiese gedrag van antosianiene.

Om 'n antosianien noukeurig te bestudeer, is die eerste vereiste dat dit in 'n baie rein toestand verkry moet word. Die ou metodes wat kortliks bestaan uit ekstraksie met metanoliese 1% soutsuur, herhaaldelik neerslaan met eter of loodsoute, oplossing in 5% soutsuur en dan kristallasie oor die pikraat is omslagtig. Baie kleurstof kan verlore gaan en dit is verder baie moeilik om komponente wat slegs in klein konsentrasie voorkom volgens hierdie metode te skei. In geval van druiwe byvoorbeeld, waar daar drie of meer antosianiene teenwoordig is, is hierdie soort isolasie baie moeilik, indien nie onmoontlik nie. Brown (1940) het tog daarin geslaag om hierdie tegniek te gebruik by die isolasie van kristallyne muskadinien (petunidien-3, 5-diglukosied), die hoofpigment van Muscadine druiwe.

Vroeëre pogings om antosianiene met behulp van adsorpsiechromatografie op kolomme te skei, wat so suksesvol met karotenoiëdpigmente is, was nie baie geslaagd nie (Li & Wagenknecht, 1956). Dit was nie voor die daarstelling van papierverdelingschromatografie deur Bate-Smith (1948) in hierdie veld dat bevredigende chromatografiese metodes vir die skeiding van die antosianiene en verwante flavonoïëdverbindinge beskikbaar was nie. Hierdie tipe papierchromatografie is 'n logiese uitbreiding van die toetse wat deur Robinson & Robinson (1931, 1932) gebruik is

om tussen die verskillende groepe glikosiede te onderskei volgens hulle verdeling tussen water en amielalkohol.

Omdat antosianiene in die vorm van katione in suur medium verkeer en slegs stabiel is by 'n lae pH, word chromatografie normaalweg uitgevoer in sisteme wat suur bevat. As die oplosmiddelsisteme nie minerale suur bevat nie, soos bv. BAW, is dit belangrik dat genoeg suur in die oorspronklike ekstrak teenwoordig moet wees om die pigment in sy kation-vorm te behou soos dit op die papier afbeweeg (Bate-Smith, 1948).

Die oplosmiddelsisteme wat vir antosianiene gebruik word, is hoofsaaklik op twee tipes chromatografiese prosesse gebaseer (Harborne, 1958a):

1. Verdelingschromatografie. Die oplosmiddelsisteme is organies en die bewegende fase is swak polêr van aard. Vir antosianiene bevat hierdie sisteme gewoonlik 'n alkohol, bv. butanol, as die hoofkomponent.
2. Adsorpsiechromatografie. Die oplosmiddelsisteme is sterk polêr en waterig van aard.

Goeie voorbeelde van oplosmiddelsisteme vir (i) is BAW en BuHCl en vir (ii) waterige soutsuur of ook water-asynsuur-10N-soutsuur. (82:15:3)

Konstante verhoudings tussen R_f -waarde en die struktuur van antosianiene is al beskryf deur werkers soos Abe & Hyashi (1956) en Harborne (1958a). Die verwantskap sou die beste ingesien word indien dit in verhouding tot spesiale struktuurmodifikasies beskou word:

(a) Hidroksilasie.

Hoe meer fenoliese hidroksielgroepe, hoe laer is die R_f -waardes in beide tipes oplosmiddelsisteme. Die R_f -waardes neem dus af soos die polariteit van die aglikoon toeneem. Dit is volgens verwagting, want by verdelingschromatografie sal die meer polêre verbinding minder oplosbaar wees in die bewegende swak-polêre fase en dus nie so ver beweeg nie. By adsorpsiechromatografie speel stereochemiese effekte blykbaar die hoofrol. Dit is bekend dat plat strukture sterk geadsorbeer word op sellulose. Dus hoe meer polêr die aglikoon, deste sterker word dit op die papier geadsorbeer en hoe laer is die R_f -waarde.

(b) Metilering.

Hoe meer hidroksielgroepe in die aglikoon gemetleer is, hoe hoër is die R_f -waarde daarvan in beide tipes oplosmiddelsisteme. Metilering van 'n hidroksielgroep verlaag die polariteit van die verbinding, dit word meer oplosbaar in die swak-polêre bewegende fase en beweeg dus verder op die chromatogram. By adsorpsiechromatografie adsorbeer die minder polêre verbinding minder sterk aan die stasionêre fase en beweeg verder, maar soos reeds bespreek is die platheid van die struktuur die vernaamste faktor wat die mobiliteit daarvan in waterige oplosmiddelsisteme bepaal. Die toename in R_f -waarde wat deur metilering teweeggebring word, is effens minder as die afname wat deur hidroksilasie veroorsaak word. Dus het dieselfde glikosiede van malvidien en sianidien ongeveer dieselfde R_f -waardes.

baie meer oplosbaar in die organiese fase sodat asilering 'n toename in R_f -waarde by partisiechromatografie tot gevolg het. Omdat die verbinding minder polêr is, sal dit minder oplosbaar wees in die meer polêre waterige oplosmiddelsisteme van adsorpsiechromatografie en dus hier 'n afname in R_f -waarde tot gevolg hê.

2.2 Hidrolise-studies.

2.2.1 Gekontroleerde suurhidrolise.

Deur gekontroleerde suurhidrolise kan die aantal glikosiediese reste wat teenwoordig is, vasgestel word deur na te gaan hoeveel eenvoudiger glikosiede tydens die hidrolise vrygestel word (Harborne, 1957). So kan 3-diglikosiede byvoorbeeld van 3,5-diglikosiede onderskei word deurdat hulle tydens gekontroleerde suurhidrolise een en twee eenvoudiger glikosiede respektiewelik lewer. Antosianiene wat drie suikerreste bevat, gee weer twee of vier eenvoudiger glikosiede op hierdie manier. Chandler & Harper (1962) het verskeie sure, byvoorbeeld fosforsuur, swawelsuur, asynsuur ens. vir hierdie doel uitgetoets en gevind dat verdunde soutsuur die beste resultate lewer. Hierdie reagens is derhalwe ook vir die huidige ondersoek gekies. Die hidrolise proses van die pigmente is voortgesit totdat geen eenvoudiger glikosiede gevorm is nie, d.w.s. totdat net een kol op die papierchromatogram waargeneem kon word. Hierdie kol verteenwoordig die aglikoon van die betrokke antosianien. In tabel 3 word die aantal intermediêre glikosiede aangetoon wat

gevind is in die reaksiemengsels nadat die proses vyf minute verloop het.

Uit tabel 3 kan gesien word dat malvidien-3,5-diglukosied slegs in BAW die verwagte vier kolle gelewer het. Die kol met R_f -waarde 0.31 was baie dof. Die twee kolle met R_f -waarde 0.41 en 0.43 verteenwoordig waarskynlik die intermediêre 3- en 5-monoglukosiede, terwyl die kol met R_f -waarde 0.60 die aglikoon aandui. In Forestal kon net twee kolle, met byna dieselfde R_f -waarde, behalwe die aglikoon aangedui word. Omdat hulle R_f -waardes so na aan mekaar geleë is, skyn dit asof hulle die twee intermediêre monoglukosiede kan wees, terwyl die diglikosied waarskynlik tot so 'n mate deur die erg suur oplosmiddel-sisteem gehidroliseer is dat dit nie aangetoon kon word nie. In HCOOH kon daar net een tussenproduk aangetoon word, waarskynlik omdat dié sisteem nie die twee monoglukosiede goed van mekaar kon skei nie.

In BAW toon ook pigment A drie kolle, nl. dié van die onghidroliseerde pigment, een kol wat met pigment C en nog 'n kol wat met malvidien ooreenstem. Pigment A is dus hoogs waarskynlik 'n geasileerde antosianien, want indien dit meer glikosielreste as pigment C sou hê, sou sy R_f -waarde laer en nie hoër as die van pigment C gewees het nie.

Die resultate in tabel 3 dui daarop dat pigmente B, C, D en E waarskynlik monoglikosiede is, want slegs twee komponente was na 5 minute in die hidrolisaat aanwesig en een van hierdie komponente se R_f -waardes het altyd ooreengestem met die

R_f -waarde van die ongehidroliseerde pigment. Nadat 20 minute gehidroliseer is, was slegs die tweede komponent teenwoordig, sodat aangeneem kan word dat dit die aglikoon verteenwoordig. Die feit dat ook geen nuwe komponente ontstaan het as langer as 20 minute gehidroliseer is nie, ondersteun hierdie stelling.

Die onwaarskynlikheid van die voorkoms van 3,5-diglikosiede word bevestig deurdat geeneen van die pigmente op die papier onder ultravioletlig gefluoresseer het nie. Volgens Harborne & Sherratt (1957a) toon 5- en 3,5-diglikosiede, veral van die peonidien en pelargonidien derivate, sterk fluoressensie onder ultravioletlig.

Uit tabel 3 blyk dit ook dat die aglikone van pigmente A en C met malvidien, B met peonidien, D met petunidien en E met delfinidien ooreenstem. Dit is gevind dat die aglikone baie gou, veral in BAW, verdof en daar is dus sorg gedra om die chromatogramme so min as moontlik aan lig bloot te stel.

2.2.2 Alkalihidrolise

As 'n pigment na versigtige hidrolise met verdunde alkali 'n ander pigment met 'n ander R_f -waarde lewer, is dit 'n goeie aanduiding dat die oorspronklike pigment geasileer is. Slegs pigment A het op alkalihidrolise 'n nuwe pigment gelewer en laasgenoemde is identies met pigment C bevind. Chromatografiese ondersoek van 'n eterekstrak van pigment A na alkalihidrolise het die teenwoordigheid van p-kumaarsuur getoon. Behalwe dat die R_f -waarde van die asielres in verskillende

oplosmiddels met dié van p-kumaarsuur ooreengestem het, toon dit net soos die standaard merker 'n violet-blou fluoressensie by blootstelling aan ammoniakdampe onder ultravioletlig (Harborne, 1963 Swain, 1953). Die asielres is verder deur sy ultravioletabsorpsiespektrum in metanoliese 0.10% soutsuur (seksie 2.5.5) as p-kumaarsuur geïdentifiseer.

Die antosianien wat uit die hidrolisaat met iso-amielalkohol geëkstraheer is, is onderwerp aan gekontroleerde suurhidrolise. Dit het resultate identies met die van pigment C gelewer.

Die hoë R_f -waarde wat pigment A in BAW getoon het, was reeds 'n goeie aanduiding dat dit uit 'n geasileerde pigment bestaan, want geen beskrywing van 'n nie-geasileerde antosianien met so 'n hoë R_f -waarde in BAW kon in die literatuur gevind word nie (Basson, 1963). 'n Kenmerk van hierdie tipe pigment is dat dit gewoonlik twee kolle op 'n chromatogram toon, al word dit herhaaldelik gereinig. Dit is te wyte daaraan dat die asiel-antosianienband relatief onstabiel is en dat die suurres dus tydens die chromatografiese proses vry kom (Harborne, 1958). 'n Monster suiwer, kristallyne pigment A het ook hierdie chromatografiese gedrag vertoon.

2.3 Bepaling van die tipe en posisie van substitusie van die suikers teenwoordig.

2.3.1 Konvensionele suurhidrolise

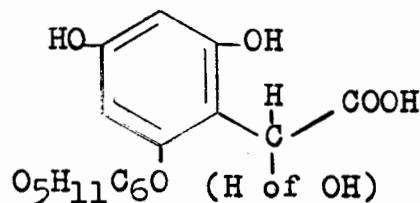
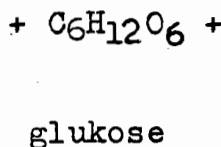
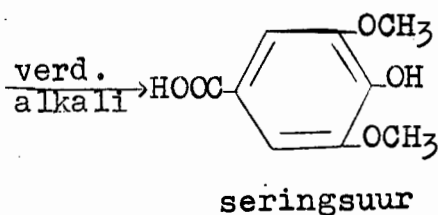
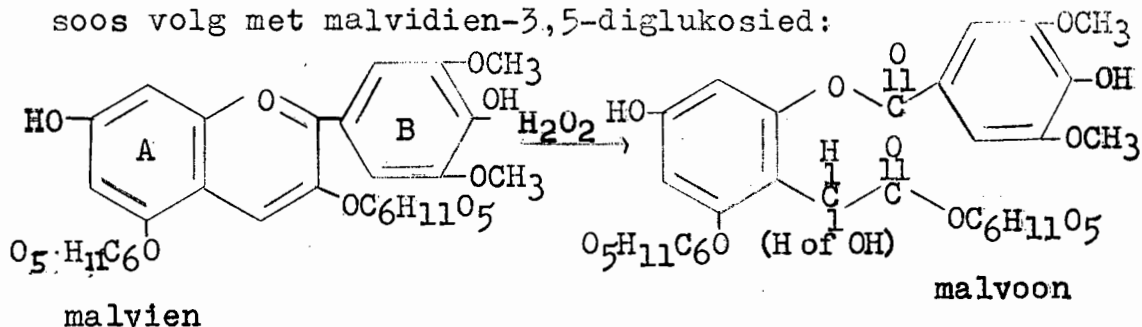
Die suurhidrolisaat van 'n mengsel van die vyf pigmente teenwoordig, het slegs een tipe suiker, nl. glukose bevat.

Hierdie resultaat is nie onverwags nie, want volgens Ribéreau-Gayon (1959) is nog geen ander tipe suiker in antosianiene uit druiwedoppe gevind nie. In die literatuur kon nêrens 'n geval van 'n ander tipe suiker by druifantosianiene gevind word nie.

In die lig van die resultate wat by gekontroleerde suurhidrolise (seksie 2.2.1) verkry is, skyn dit dus asof al die pigmente in Barlinka druiwe uit monoglukosiede bestaan. In die natuur is nog geen monoglikosidiese antosianien gevind wat die suikerres op 'n ander plek as in die 3-posisie bevat nie, behalwe by die buitengewone antosianidie, luteolinidin en apigeninidin, wat geen 3-hidroksigroep bevat nie (Harborne, (1963)). Dus kan op hierdie stadium al aanvaar word dat al die pigmente in Barlinka druiwe uit 3-monoglukosiede bestaan. Direkte bewys vir hierdie stelling is egter ook voor hande.

2.3.2 Oksidasie met waterstofperoksied.

Hierdie prosedure, soos beskryf deur Chandler & Harper (1961), splits slegs die suikerres teenwoordig in die 3-posisie af. Volgens Karrer & de Meuron (1932) verloop die reaksie soos volg met malvidien-3,5-diglukosied:



Malvoon is al in kristallyne vorm verkry, maar die presiese struktuur van die verbinding is nog onseker. Dus is die struktuur van die afbouproduk van die A-ring ook onbekend want dit kon nog nie geïsoleer of gesintetiseer word nie.

Omdat die pigmente in Barlinka druiwe op hierdie behandeling almal glukose gelewer het, kan dus met groot sekerheid aanvaar word dat hulle almal uit 3-monoglukosiede bestaan.

Toe die eksperiment met 'n groter konsentrasie van pigment A (3 mg.) uitgevoer is (seksie 1.2.2.2), is 'n komponent met 'n heelwat hoër R_f -waarde as dié van glukose in al drie oplosmiddelsisteme gevind. Hierdie produk het met die anilienwaterstofoksalaat spreireagens net soos 'n suiker gereageer, maar die kol het ook by blootstelling aan ammoniakdampe onder ultravioletlig gefluoresseer. Volgens Harborne (1964) en Birkofer & Kaiser (1963) bestaan hierdie komponent uit glukose verester met p-kumaarsuur, wat beteken dat die suur in die antosianien met die glikosielres verester is.

In die geval van pigment A was dit opvallend dat dit heelwat langer as die ander pigmente geneem het om in teenwoordigheid van waterstofperoksied te ontkleur. Dit is moeilik om te verklaar hoe die asielres hierdie stabiliteit aan die molekule kan verleen as dit aan die suikerres en nie aan die aglikoon self gekoppel is nie. Ook sou verwag word dat die esterband tussen die suiker en asielres tydens hidrolise met ammoniumhidroksied gebreek sal word aangesien die vrystelling van glukose vanaf die geoksideerde antosianien ook deur alkaliese

hidrolise van 'n esterband veroorsaak word. Die esterband tussen die asielres en die antosianien was egter onder hierdie kondisies stabiel teenoor ammoniak aangesien die kleurstof nie na pigment C afgebreek het toe die ammoniak behandeling direk op pigment A uitgevoer is nie. Dit skyn dus asof hierdie esterband stabiel teenoor verdunde ammoniumhidroksiedbehandeling is.

2.3 Konfigurasie van die A- en B-ringe.

2.4.1 Alkalismelt

Hierdie metode is deur Willstätter & Mallison (1915) ontwikkel om die konfigurasie van die A- en B-ringe in flavonoïede te bepaal. Al die metoksielgroepe, indien teenwoordig, word afgesplits tydens die proses waar die A- en B-ring van mekaar geskeur word. By die 5,7-dioksi-antosianiene sal die A-ring aanleiding gee tot floroglusinol as dit aan alkalismelt onderwerp word. Hierdie produk word chromatografies maklik uitgeken want dit gee 'n kenmerkende rooi-pers kleur met gediasoteerde bensidien spreireagens. By blootstelling aan ammoniakdampe fluoresseer floroglusinol op papier met 'n blou-violet kleur.

Die B-ring sal aanleiding gee tot p-hidroksibensoësuur, protokatesjoësuur en gallussuur waar die pigmente aan die pelargonidien-, sianidien- en delfinidiengroep respektiewelik behoort. Met gediasoteerde bensidien spreireagens het gallussuur geel, protokatesjoësuur bruin-geel en p-hidroksibensoësuur helder geel op chromatogramme vertoon. Kenmerkend van

p-hidroksibensoësuur is dat sy kleur met die spreireagens ongeveer 5 minute geneem het om te ontwikkel, terwyl die ander sure onmiddellik 'n kleur getoon het.

Al die pigmente wat uit Barlinka druiwe geïsoleer is, het na alkalismelt floroglusinol gelewer wat beteken het dat almal 5,7-dioksi-antosianiene is. Almal het aanleiding gegee tot gallussuur, behalwe pigment B wat protokatesjoësuur gelewer het en dus aan die sianidienreeks behoort. In hierdie reeks is slegs twee antosianiene, nl. sianidien en peonidien bekend. Pigment B kan dus moontlik 'n glukosied van peonidien wees, veral aangesien sy aglikoon met peonidien ooreenstem (tabel 3).

In die delfinidienreeks, waaraan pigmente A, C, D en E volgens die resultate van alkalismelt behoort is drie antosianiene nl. delfinidien, petunidien en malvidien bekend. Dit is reeds getoon dat al die pigmente in Barlinka druiwe uit 3-monoglukosiede bestaan en dat slegs pigment A geasileer is. Omdat pigmente C, D en E aan dieselfde reeks behoort, verskil hulle dus hoogs waarskynlik net in graad van metilering. In BAW het pigment C die hoogste en pigment E die laagste R_f -waarde, dus blyk dit dat pigment C die meeste en pigment E die minste metoksielgroepe bevat. Dit dui dus daarop dat pigment C van malvidien, pigment E van delfinidien en pigment D van petunidien afgelei is. Dit is in ooreenstemming met die resultate wat by gekontroleerde suurhidrolise gevind is. Dit is reeds getoon (seksie 2.2.2) dat pigment A uit pigment C geasileer met p-kumaarsuur bestaan. Die identifikasie van gallussuur in

die alkalismelt van komponent A was dus heeltemal volgens verwagting.

2.4.2 Oksidasie met waterstofperoksied.

Dit is bekend (Hyashi, 1962) dat 30% waterstofperoksied met antosianiene reageer wat geen visinale hidroksielgroepe bevat nie om die ooreenstemmende bensoësuur derivate uit die B-ring te lewer sonder om die metoksielgroepe af te splits. Die mikrometode van Chandler & Harper (1961) om die suikerres in die 3-posisie deur oksidasie met waterstofperoksied vas te stel, is in hierdie werk aangepas om die konfigurasie van die B-ring te bepaal. Sover uit die literatuur vasgestel kon word, is hierdie mikrometode nog nie deur ander werkers vir hierdie doel gebruik nie. Om goeie resultate te kry, was dit nodig om ten minste 3 mg. van die antosianien te oksideer.

Volgens hierdie tegniek het pigmente A en C seringsuur en pigment B vanilliensuur gelewer. Dit dui dus baie sterk daarop dat pigmente A en C derivate van malvidien en pigment B 'n derivaat van peonidien is. Dit bevestig ook die resultate wat by alkalismelt (seksie 2.4.1) en by suurhidrolise (seksie 2.2.1) gevind is. Volgens die resultate wat by alkalismelt verkry is, was dit ook moontlik dat pigment B 'n sianidienderivaat kon wees. Hierdie antosianidien bevat egter visinale hidroksielgroepe en sal dus nie na oksidasie met waterstofperoksied bensoësuur derivate lewer nie.

Die feit dat pigmente D en E by hierdie behandeling geen

bensoësuurderivate gelewer het nie, dui aan dat hulle heel waarskynlik visinale hidroksielgroepe in die B-ring bevat. Omdat beide pigmente aan die delfinidienreeks behoort en slegs in graad van metilering verskil (seksie 2.4.1), kan een van hulle slegs een metoksielgroep in óf die 3'- óf die 5'- posisie bevat, maar nie die 4'-posisie nie, terwyl die ander geen metoksielgroepe kan bevat nie. Volgens hul R_f -waardes in BAW is pigment D waarskynlik die monometiel-derivaat en pigment E die derivaat sonder metoksielgroepe. Dit steun dus die gevolgtrekkings in seksie 2.4.1 en die resultate by suurhidrolise (seksie 2.2.1) waar afgelei is dat pigment D 'n derivaat van petunidien en pigment E 'n derivaat van delfinidien is.

2.4.3 Oksidasie met verdunde bytsoda-oplossing.

In die literatuur is slegs gevalle gevind waar hierdie tipe reaksie op makro- of semi-mikroskaal gedoen is. Akiyoshi, Webb & Kepner (1963) het bv. 45 mg. kleurstof per behandeling gebruik. In die huidige ondersoek is die metode egter gemodifiseer vir gebruik op mikroskaal.

Soos reeds bespreek (seksie 2.4.2) kon geen bensoësuurreste as produkte van peroksied-oksidasie van pigmente D en E geïdentifiseer word nie en die konfigurasie van die B-ringe van hierdie pigmente is dus volgens die bytsoda-oksidasietegniek ondersoek. Pigment B is as kontrole op 'n soortgelyke wyse behandel. Pigment D het 3-metoksigallussuur, pigment E gallussuur en pigment B vanilliensuur gelewer. Dit bevestig dus die resultate

in seksies 2.2.1, 2.4.1 en 2.4.2 waar afgelei is dat pigmente B, D en E waarskynlik derivate van peonidien, petunidien en delfinidien respektiewelik is.

2.5 Bepaling van die ultravioletabsorpsiespektra.

Alhoewel antosianiene 'n kenmerkende intense absorpsie in die gebied 500-550 m μ toon, is die verskille in die spektra van die individuele pigmente relatief klein (Jurd, 1962). Hierdie spektra is dus van minder belang by die identifikasie van individuele antosianiene, veral as hulle in 'n minder suiwer vorm verkeer (Hyashi, 1962). Die intensiteit en posisie van die maksima in die sigbare gebied verskuif aansienlik met veranderinge in pH (Sondheimer & Kertesz, 1948) en oplosmiddel (Bradfield & Flood, 1952). So byvoorbeeld neem die golflengtes van maksimum absorpsie agtereenvolgens af in etanol, metanol en water, d.w.s. soos die polariteit van die oplosmiddel toeneem. Die kondisies waaronder die spektra bepaal word, moet dus noukeurig gespesifiseer word.

Uit die golflengte van maksimum absorpsie kan 'n aanduiding verkry word van die groep waaraan die pigment behoort. Volgens die waardes wat Harborne (1958b) gepubliseer het, lê die gebied van maksimum absorpsie vir die pelargonidienreeks by 498-520 m μ , vir die sianidienreeks by 522-535 m μ en vir die delfinidienreeks by 533-544 m μ , soos bepaal in metanoliese 0.01% soutsuur.

In hierdie ondersoek is gebruik gemaak van metanoliese 0.1% (g./v.) in plaas van metanoliese 0.01% soutsuur omdat 'n

waar afgelei is dat pigmente D en E visinale hidroksielgroepe bevat. Dit feit dat die absorpsiemaksimum van pigment E 'n groter bathochromiese verskuiwing as dié van pigment D ondergaan het, bevestig ook die afleiding dat pigment D 'n derivaat van petunidien en pigment E 'n derivaat van delfinidien is, want delfinidien besit drie visinale hidroksielgroepe teenoor die twee van petunidien. Die feit dat die spektra van pigmente A en C geen verandering by die byvoeging van aluminiumchloried ondergaan het nie, pas in by die afleidings in seksies 2.4.1 en 2.4.2 dat hulle waarskynlik uit derivate van malvidien bestaan. Die spektra van die aglikone ondersteun hierdie gevolgtrekkings, want soortgelyke resultate as met die glikosiede is ook hier gevind.

Dit is reeds tydens alkalismelt (seksie 2.4.1) getoon dat pigment B aan die sianidienreeks behoort en by oksidasie met peroksied en verdunde bytsoda (seksies 2.4.1 en 2.4.3) is gevind dat pigment B waarskynlik van peonidien afgelei is. Omdat geen verandering in spektrum van pigment B na byvoeging van aluminiumchloried plaasvind nie, pas dit in by hierdie feite, want derivate van sianidien self sou wel 'n bathochromiese verskuiwing getoon het.

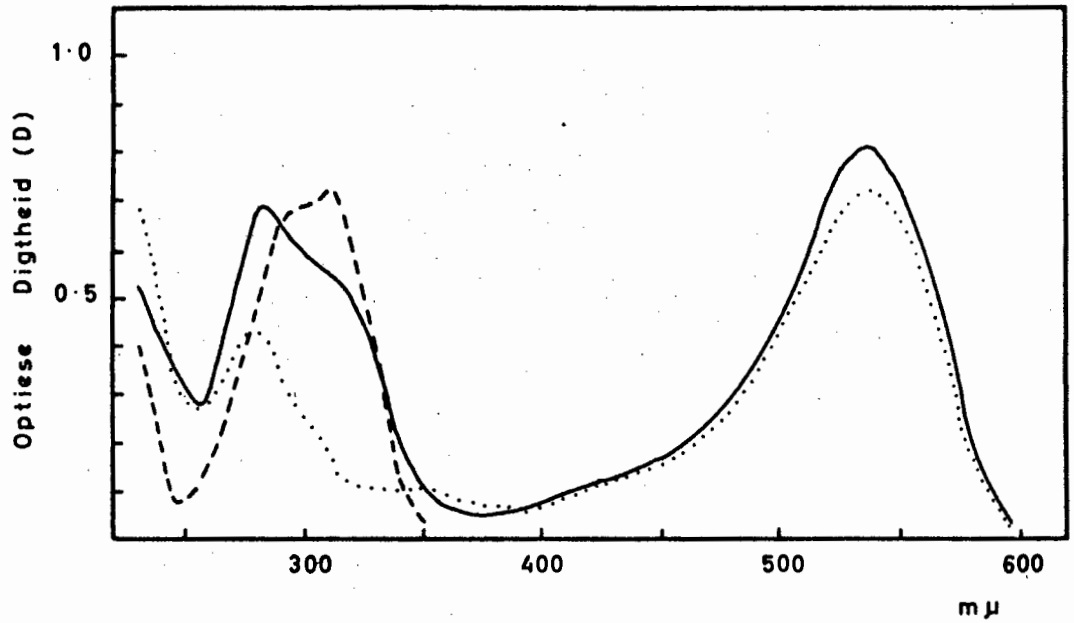
2.5.2 Afleidings vanaf die spektra aangaande die aantal en posisie van substitusie van die sukerreste teenwoordig in die pigment.

Volgens Harborne (1958b, 1963) kan op die volgende drie maniere afleidings ten opsigte van die posisie van substitusie

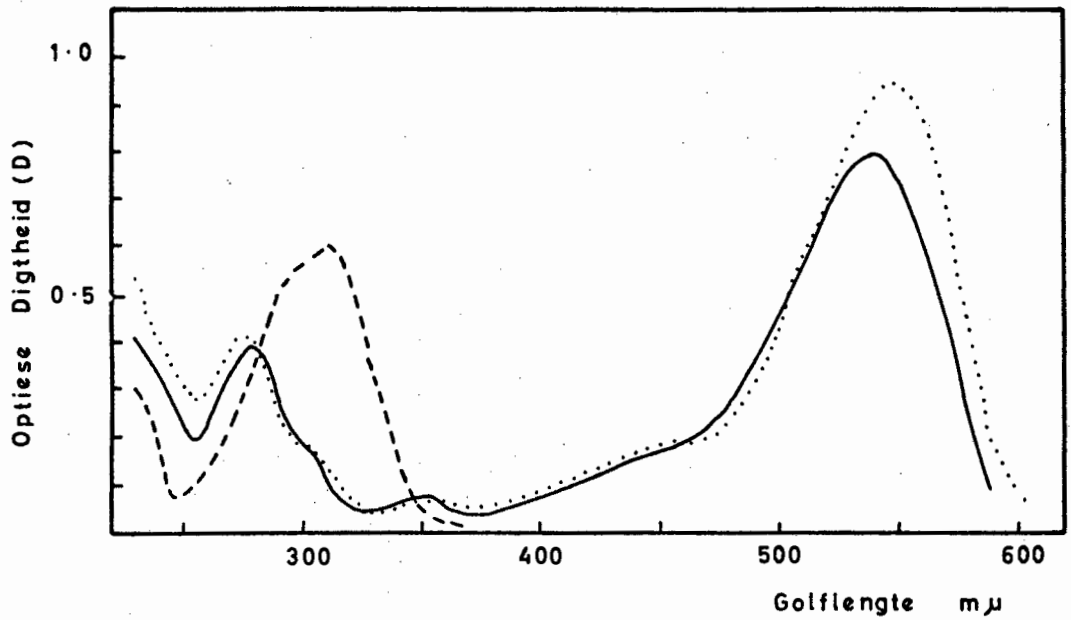
van die suikerreste in antosianiene vanaf hulle absorpsiespektra gemaak word:

(i) Die algemene effek van glikosidasie op die sigbare spektrum van die antosianidien is om dit na korter golflengtes te verskuif. Die grootte van hierdie hipsochromiese verskuiwing hang af van watter en hoeveel hidroksielgroepe geglikosideer is. Die grootste verskuiwing vind plaas by die invoeging van 'n suikerres by die 3-posisie en die invoeging van 'n suikerres by die 5-posisie gee 'n verskuiwing van slegs die helfte so groot. Slegs baie klein verskille kan waargeneem word tussen die posisie van die maksima van pigmente met suikerreste in beide die 3- en 5-posisies en die maksima van antosianiene wat 'n suikerres net in die 3-posisie bevat. Volgens Harborne (1958b) toon die spektra van antosianiene met 'n vry 5-hidroksielgroep 'n duidelike skouer in die gebied 410-450 m μ , net voor die hoofpiek.

Die spektra van die pigmente A, B, C, D en E het geeneen hierdie skouer baie duidelik getoon onder die kondisies wat in die huidige ondersoek gebruik is nie (fig. I en II), maar al die vroeëre resultate (seksies 2.2.1 en 2.3.2) dui tog duidelik daarop dat die pigmente uit slegs 3-monoglukosiede bestaan, d.w.s. hulle het almal die 5-hidroksielgroep vry. Die spektra van die aglikone van die pigmente toon aan die ander kant hierdie skouer wel duidelik (malvidin en die aglikoon uit pigment B, fig. I en II). Die gevolgtrekking wat gemaak kan word, is dat glikosidasie in beide die 5- en die 3-posisie neig om hierdie skouer uit te stryk.

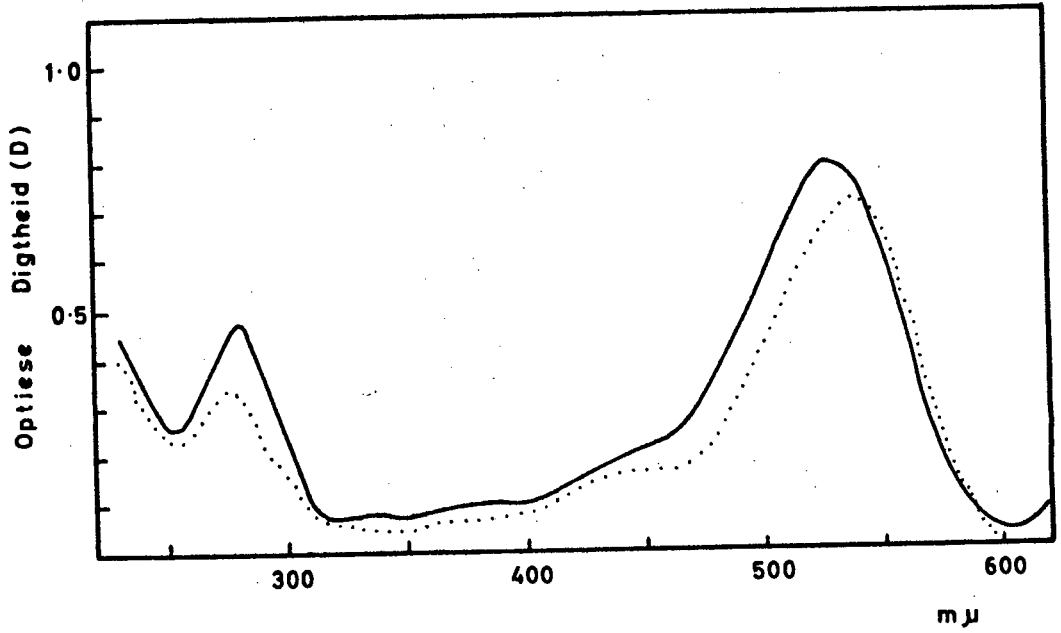


Ultravioletspektra van pigment A (—),
suurgedeelte (----) en antosianien uit pigment A (.....)

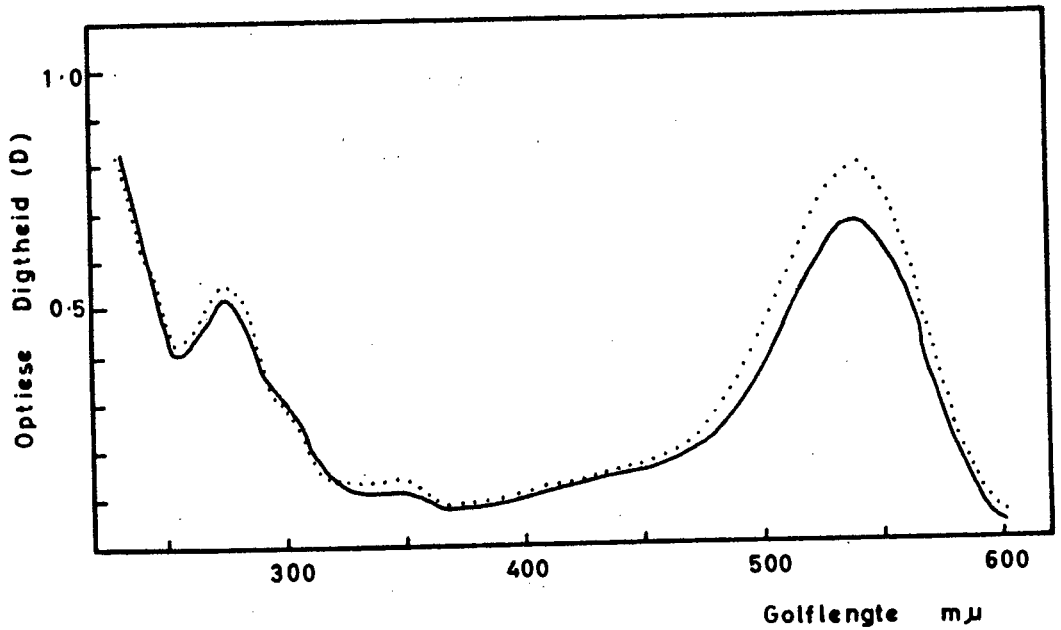


Ultravioletspektra van pigment C (—),
p-kumaarsuur (----) en malvidien (.....)

Figuur 1



Ultravioletspektra van pigment B (—)
en van die aglikoon van pigment B (.....)



Ultravioletspektra van pigmente D (—) en E (.....)

Figuur II

(ii) Die beste manier om die verskille tussen die spektra van antosianiene met 'n vry 5-hidroksielgroep en dié met 'n gesubstitueerde 5-hidroksielgroep uit te druk, is volgens Harborne (1958b) om die verhouding van die optiese digtheid by 'n arbitrêr gekose golflengte (d.i. 440 m μ) tot die optiese digtheid by die hoër golflengte van maksimum absorpsie as 'n persentasie uit te druk. Die persentasie intensiteit by 440 m μ van die antosianiene wat nie 'n vry 5-hidroksielgroep bevat nie, is ongeveer die helfte van die ooreenstemmende waardes vir antosianiene waar die 5-hidroksielgroep vry is. Harborne (1958b) vind die volgende gemiddelde persentasie vir hierdie verhoudings by derivate met die 5-hidroksielgroep gesubstitueer: pelargonidienderivate 20%, sianidienderivate 12% en delfinidienderivate 10%. Vir pigmente met 'n vry 5-hidroksielgroep is hierdie persentasies respektiewelik 39%, 23% en 18%. Dit is gevind (tabel 5) dat hierdie waarde vir pigmente A, C, D en E wat aan die delfinidienreeks behoort, tussen 19 en 21% geleë is. Vir pigment B, 'n peonidienderivaat, is hierdie waarde 24%. Dit is dus in goeie ooreenstemming met Harborne (1958b) se resultate vir die ooreenstemmende 3-glikosiede met vry 5-hidroksielgroepe.

(iii) Harborne (1963) het verder gevind dat die laer golflengte absorpsiemaksimum (265-280 m μ , Band I) van 3,5-diglikosiede konstant minder intens is as dié van die ooreenstemmende 3-mono- en -di-glikosiede. Hierdie werker het die optiese digtheid van die laer golflengte absorpsiemaksimum (Band I) uitgedruk as 'n persentasie van die optiese digtheid van die hoër

golflengte absorpsiemaksimum (Band II) en beweer dat die gemiddelde persentasie vir 3,5-diglikosiede by 42% (± 7) en vir 3-di- en -mono-glikosiede by 63% (± 6) geleë is.

Hierdie bewering het deurgaans gegeld vir pigment B (tabel 5) en tot 'n mindere mate vir pigmente D en E, waar die persentasie te hoog gevind is. Volgens Harborne (1964) se gegewens sou

TABEL 5.

Persentasie verhoudings van optiese digtheid by die laer $\lambda_{\text{maks.}}$ (Band I): optiese digtheid by die hoër $\lambda_{\text{maks.}}$ (Band II) en optiese digtheid by 440 m μ : hoër $\lambda_{\text{maks.}}$ (Band II).

Pigment	$\frac{E \lambda_{\text{maks.}} \text{ (Band I)}}{E \lambda_{\text{maks.}} \text{ (Band II)}} \%$	$\frac{E_{440 \text{ m } \mu}}{\lambda_{\text{maks.}} \text{ (Band II)}} \%$
A	87	20 *
B	60	24 (26)
C	49	19 (18)
D	77	21 (18)
E	70	20 (18)

* Die syfers tussen hakies is die waardes vir ooreenstemmende antosianiene, soos deur Harborne (1958b) aangegee.

pigment C egter dan 'n 3,5-diglikosied wees en dit is heeltemal strydig met die resultate van suurhidrolise, oksidasie met waterstofperoksied (seksies 2.2.1 en 2.2.3) en met die chromatografiese gedrag van die pigment. Harborne (1964) toon syfers vir verskeie 3-diglikosiede wat hy ondersoek het maar geslegs die waardes van drie 3-monoglikosiede aan, nl. die van die 3-monorhamnosiede van peonidien, petunidien en malvidien wat hy vind om 60%, 54% en 54% respektiewelik te wees. Laasgenoemde

twee syfers is reeds 3% onderkant die minimum grens wat die skrywer self vir 3-glikosiede aantoon. Dit wil dus voorkom asof hierdie verhouding nie baie betroubaar is nie.

2.5.3 Afleiding vanaf die spektrum van pigment A van die molare verhouding van antosianien: asielres.

Harborne (1958b, 1964) beweer dat pigmente wat met p-kumaarsuur geasiëleer is, maklik uitgeken kan word aan hulle absorpsiespektra weens die feit dat hulle twee absorpsiemaksima in die ultravioletgebied by ongeveer 290 m μ en 310 m μ toon. Dit is te wyte aan die super-ponering van die absorpsie van p-kumaarsuur self ($\lambda_{\text{maks.}}$: 311 m μ) op dié van die pigment. By pigment A is egter net een piek ($\lambda_{\text{maks.}}$: 283m μ) in hierdie gebied gevind, alhoewel die pigment nog sterk by 310 m μ absorbeer waar die ander ongeasiëleerde pigmente relatief swak absorpsie toon (fig. I). Ook Malan (1963) het slegs een absorpsiemaksimum in hierdie gebied gevind toe hy 'n pigment ondersoek het wat bestaan uit malvidien-3-monoglikosied geasiëleer met een molekule p-kumaarsuur.

Harborne (1958b) het tot die gevolgtrekking gekom dat die verhouding van die optiese digtheid by 310 m μ tot die optiese digtheid by die hoër golflengte absorpsiemaksimum, uitgedruk as 'n persentasie, as 'n maatstaf kan dien vir die molare verhouding antosianien: p-kumaarsuur in die geasiëleerde pigment. Waar laasgenoemde verhouding 1:1 is, was eersgenoemde waarde 60-70%; vir 'n verhouding van 2:1 was dit 31% en vir 'n verhouding van

1:2, 91-107%. Die optiese digtheid by 310 m μ in die spektrum van pigment A is uitgewerk as 'n persentasie van die optiese digtheid by 536 m μ (hoër golflengte absorpsiemaksimum) en dit is gevind om 69% te wees, wat dus dui op 'n 1:1 molare verhouding van antosianien: p-kumaarsuur in hierdie pigment.

2.5.4 Bepaling van die molare verhouding antosianien: asielres in pigment A.

'n Direkte bepaling van hierdie verhouding kon gedoen word deur gebruik te maak van die molare ekstinksiëkoëffisiënte soos aangetoon in tabel 6. Hierdie molare ekstinksiëkoëffisiënte is eksperimenteel bepaal aangesien dit nie in die literatuur te

TABEL 6.

Logaritme van die molare ekstinksiëkoëffisiënte (ϵ) van pigmente A en C, malvidien en p-kumaarsuur by absorpsiemaksima in metanoliese 0.1% soutsuur.

	λ maks. (m μ)	log ϵ
A	536	4.48
C	538	4.47
Malvidien	547	4.50
p-kumaarsuur	311	4.32

vinde was nie. Malvidien se molare ekstinksiëkoëffisiënt is wel reeds deur Ribéreau-Gayon (1959) in 'n tesis gepubliseer (Chandler & Harper, 1962), maar hierdie werk was onverkrygbaar. Harborne (1960) het ook van molare ekstinksiëkoëffisiënte

gebruik gemaak by die vasstelling van die molare verhouding aglikoon: suiker in antosianiene, maar die waardes is nie gepubliseer nie.

Die absorpsiespektrum van die bytsoda-hidrolisaat van pigment A is bepaal (seksie 1.2.4.6) en die konsentrasie is bereken as malvidien- β -monoglukosied deur gebruik te maak van die ekstinksie by 538 m μ ($\log \epsilon$, 4.47). Hiervan kon bereken word wat die absorpsie by 311 m μ sou wees indien pigment C alleen teenwoordig was. Die verskil tussen hierdie waarde en die eksperimentele waarde is dus toe te skryf aan die vry p-kumaarsuur in die hidrolisaat. Aangesien die molare ekstinksiekoëffisiënt van p-kumaarsuur bekend was (Tabel 6), kon die konsentrasie daarvan in die hidrolisaat bereken word. Hieruit is die molare verhouding van pigment C: p-kumaarsuur bereken en dit het op 1:1.17 te staan gekom. Die korrelasie is uitstekend want dit kan verwag word dat 'n klein verlies van die kleurstof onder die alkaliese hidrolitiese kondisies sou plaasvind.

Die resultaat bevestig die afleiding in seksie 2.5.3 waar volgens die metode van Harborne (1958b) bereken is dat pigment A geasileer is met net een molekule p-kumaarsuur.

Die verhouding kon op 'n ander wyse bevestig word. Bytsoda-hidrolise is weer op pigment A gedoen, maar die asielres is kwantitatief met eter geëkstraheer. Die spektrum was identies met dié van p-kumaarsuur (fig. I), wat nog 'n bewys is vir die identiteit van die asielres. Die konsentrasie p-kumaarsuur in die eteroplossing kon bereken word vanaf die ekstinksie

by $311 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon$, 432). Op soortgelyke wyse is die hoeveelheid antosianien in die hidrolisaat bepaal en die molare verhouding antosianien: p-kumaarsuur bereken. Dit het te staan gekom op 1:1.11.

Dit is dus duidelik dat pigment A bestaan uit een molekule pigment C (malvidien-3-monoglukosied) geasileer met een molekule p-kumaarsuur.

2.5.5 Bepaling van die molare verhouding aglikoon: glukose in pigment C.

'n Bekende gewig van pigment C is aan suurhidrolise onderwerp en die absorpsiespektrum van 'n standaard verdunning van die hidrolisaat is bepaal. Deur van die molare ekstinksiekoëffisiënt van malvidien by $547 \text{ m}\mu$ gebruik te maak, kon die hoeveelheid malvidien vrygestel in die hidrolisaat bereken word. Hieruit kon die gewig malvidien ekwivalent aan die oorspronklike gewig antosianien bereken word en dus ook die suiker: aglikoon verhouding in die antosianien. Hierdie verhouding is gevind om 1.18:1 te wees en dien as 'n direkte bewys dat pigment C 'n monoglikosied is.

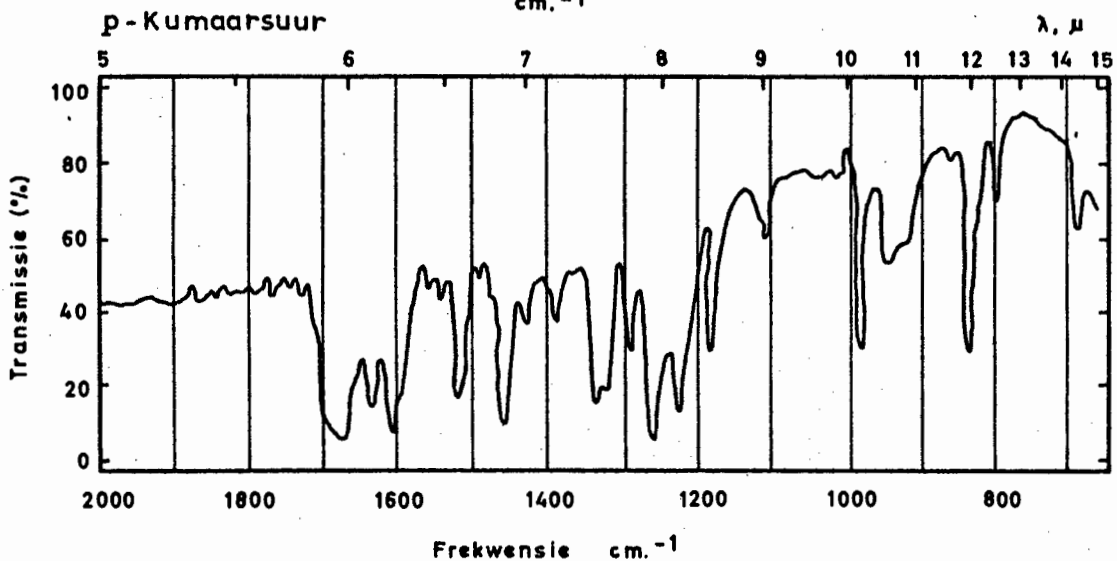
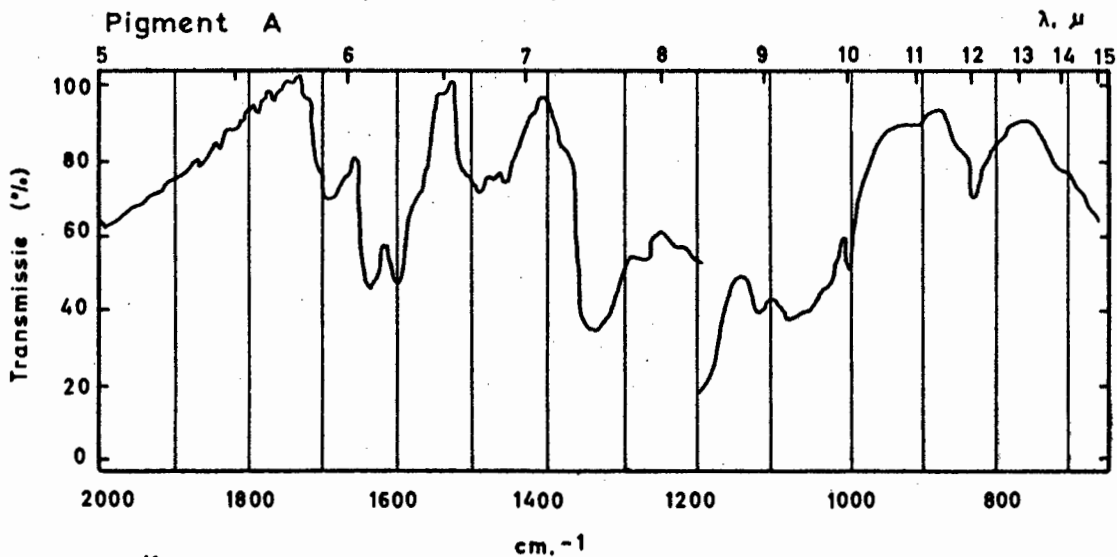
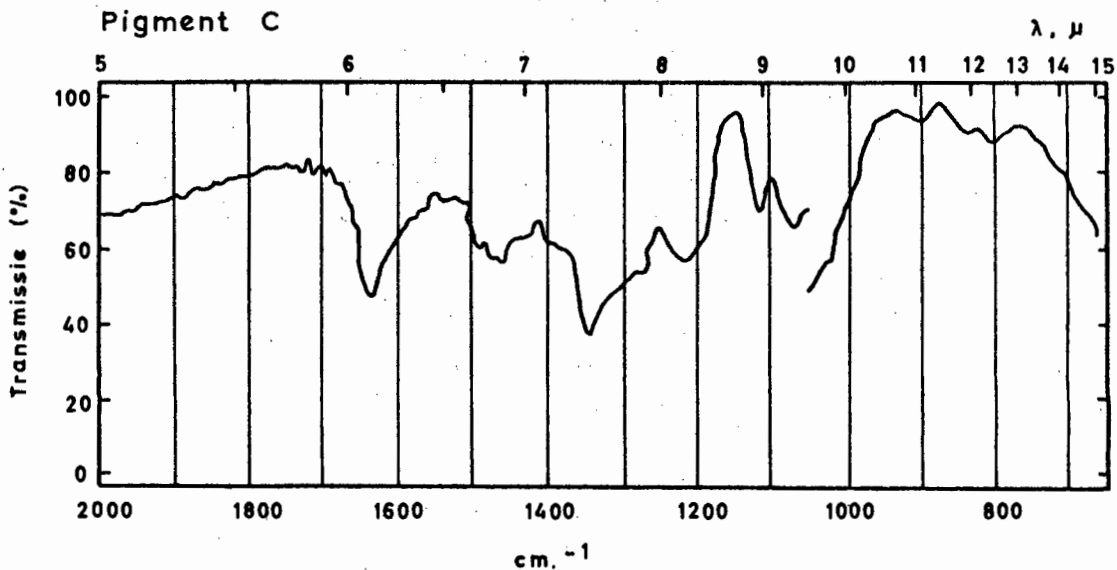
Die effens hoë suiker: aglikoon verhouding is te verwagte. Dit kan toegeskryf word aan 'n gedeeltelike ontbinding van die aglikoon onder die eksperimentele kondisies aangesien dit goed bekend is dat antosianidien neig om onstabiel te wees as dit aan hitte en lig blootgestel word. Daar is dus gepoog om die kookproses tydens hidrolise so kort as moontlik te maak deur 'n

hoër suurkonsentrasie te gebruik en die hidrolisaat so min as moontlik aan direkte lig bloot te stel. Nogtans is daar binne 'n uur nadat die spektrum op die hidrolisaat bepaal is, reeds al 'n klein afname in die konsentrasie van malvidien waargeneem.

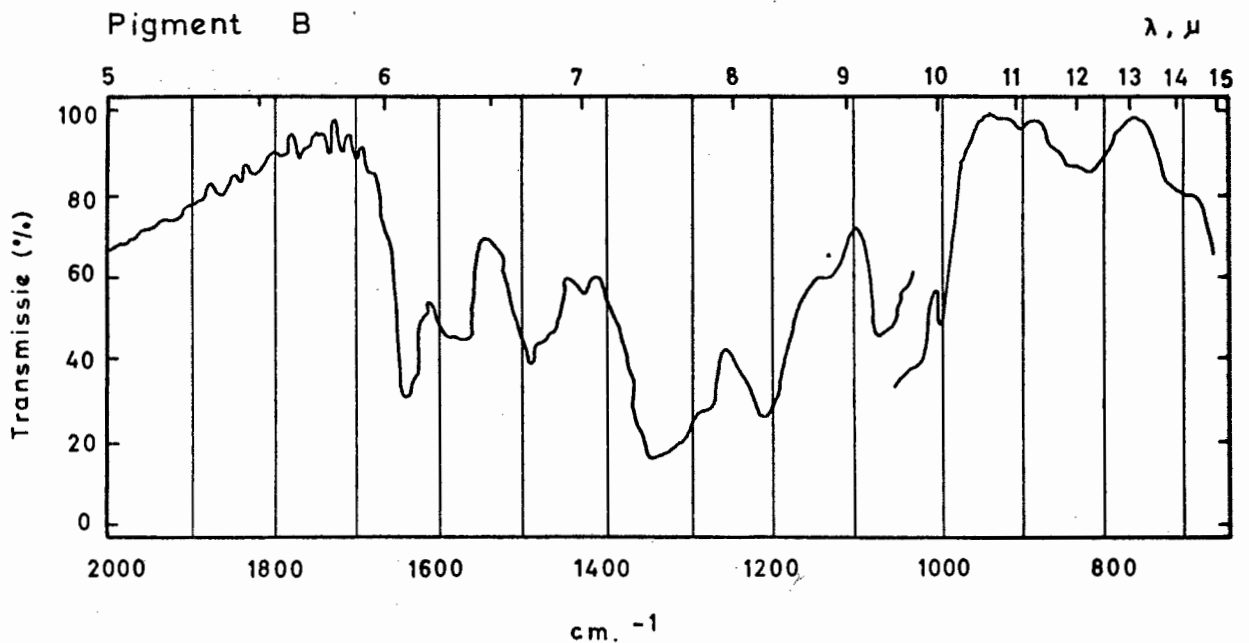
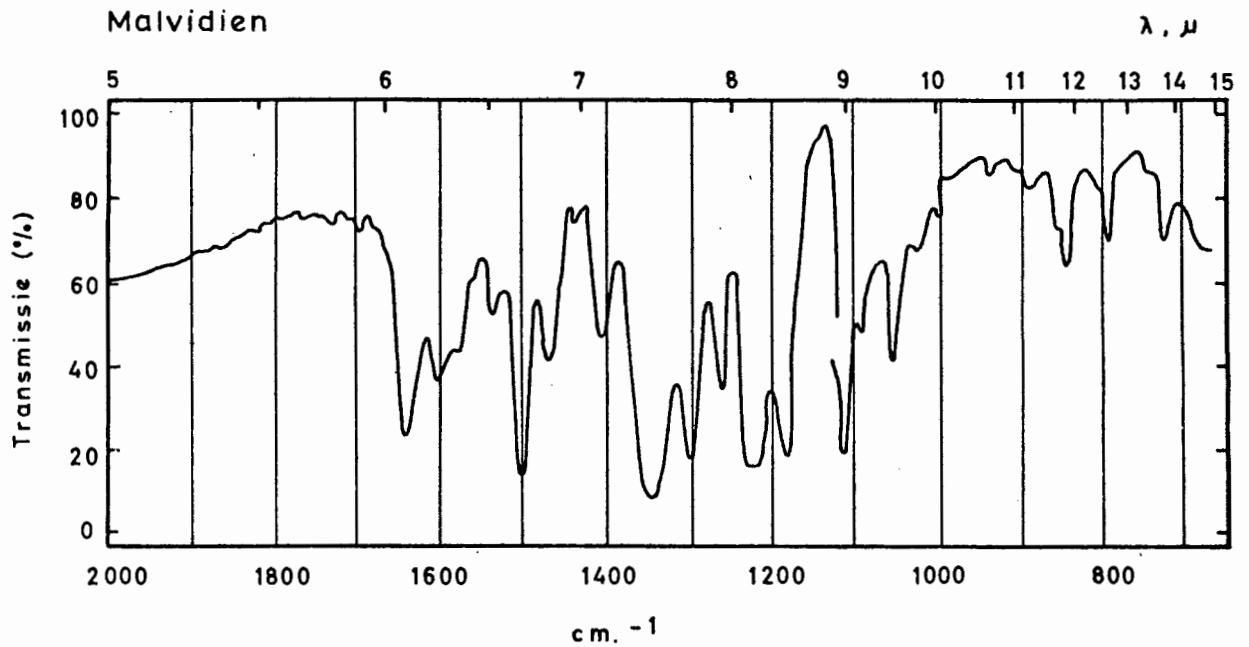
2.6 Bepaling van die infrarooiabsorpsiespektra.

Omdat antosianiene onoplosbaar is in nie-polêre oplosmiddels soos koolstofbisulfied en koolstoftetrachloried wat gewoonlik gebruik word by die bepaling van infrarooispektra, is gebruik gemaak van die kaliumbromiedskyfie tegniek. Die metode waar 'n emulsie van die verbinding met nujol gemaak word en die spektrum bepaal word deur die emulsie tussen twee natriumchloriedskyfies te plaas, is ook uitgetoets. Omdat daar egter 'n relatief groot hoeveelheid (5 mg.) antosianien vir hierdie tegniek nodig was en die nujol ook absorpsie pieke gee in die gebied waar die antosianiene absorbeer, is hierdie tegniek nie verder gebruik nie. Die konsentrasie van die pigmente in die kaliumbromiedskyfies was sodanig dat dit soms nodig was om die spektrofotometer se sensitiwiteit te verminder in die omgewing van $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ ($9-10\ \mu$), vandaar die gebroke lyn in die spektra van pigmente A, B, C en D (fig. III, IV en V). Geen duidelike pieke, maar slegs 'n algemene hoë absorpsie, kon in die gebied $4,000-2,000\text{ cm}^{-1}$ ($2.5-5.0\ \mu$) verkry word, dus is die spektra slegs in die gebied $2,000-700\text{ cm}^{-1}$ ($5-14\ \mu$) bepaal.

Die enigste gepubliseerde gegewens oor die infrarooispektra van antosianiene is die van Ribereau-Gayon & Josien (1960)

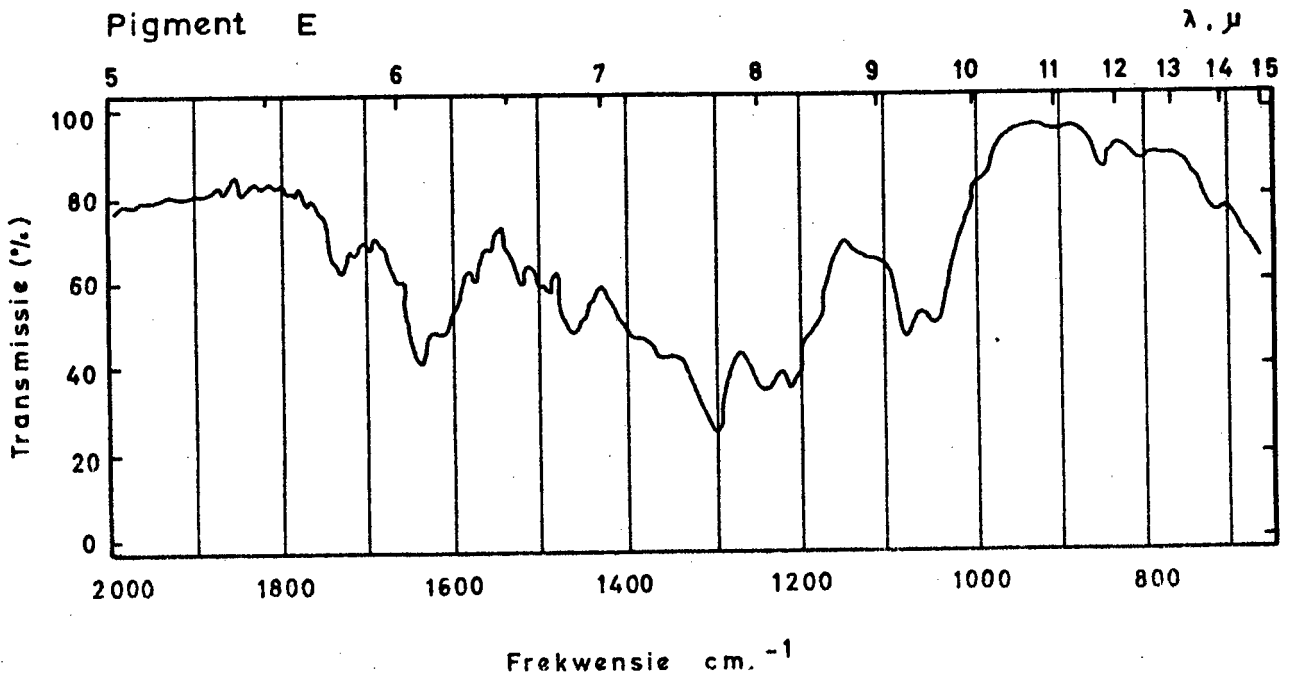
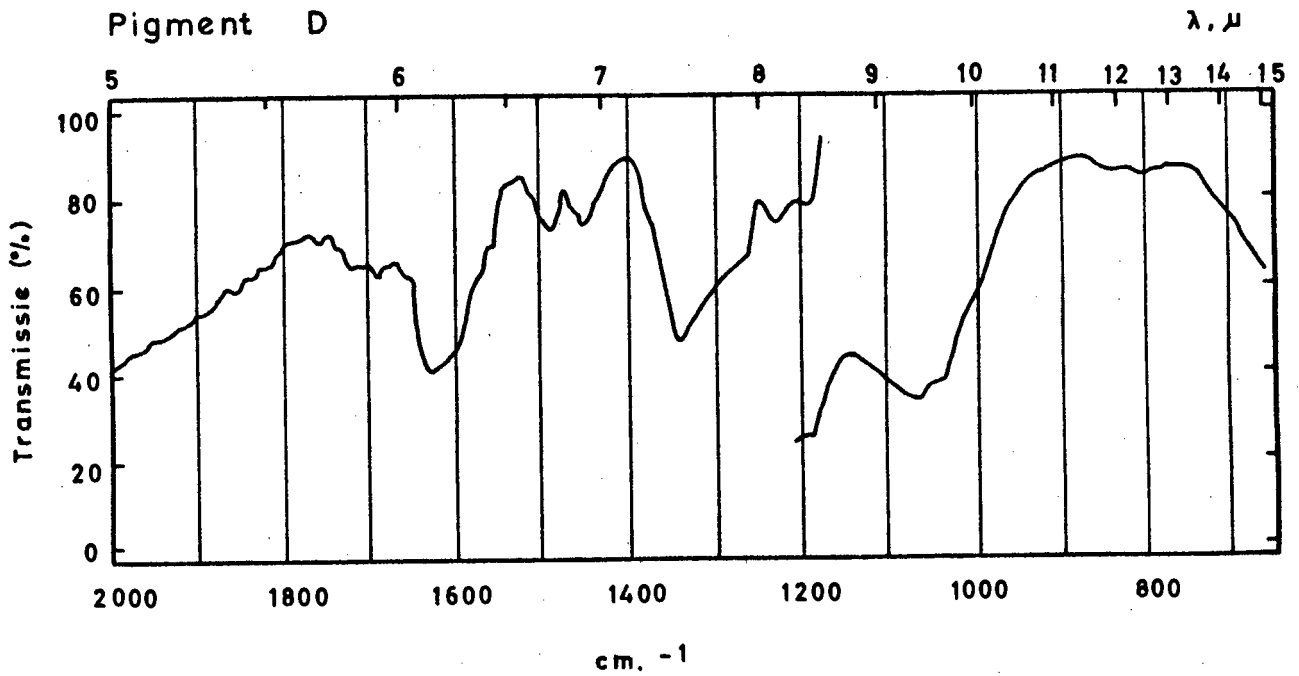


Infraroïspektra van Pigmente C, A en p-kumaarsuur
Figuur III



Infrarooispektra van Malvidien en Pigment B

Figuur IV



Infrarooispektra van Pigmente D en E

Figuur V

wat die spektra oor die gebied $1800-700 \text{ cm}^{-1}$ ($5.5-14 \mu$) van die ses bekendste antosianidieë, nl. pelargonidien, sianidien, delfinidien, peonidien, petunidien en malvidien gepubliseer het. Volgens hierdie werkers toon al ses antosianidieë 'n kenmerkende absorpsiepiek by $1637 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ wat te wyte is aan die oksoniumsuurstof wat met 'n aromatiese ring gekonjugeer is. In die omgewing van 1590 cm^{-1} is 'n piek gevind wat te wyte is aan aromatiese C-C rekking. By peonidien, petunidien en malvidien is kenmerkende klein piekies by $1462 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ en $1428 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ gevind wat dié navorsers toegeskryf het aan die teenwoordigheid van metoksielgroepe. Verder het al die aglikone sterk absorpsie in die gebied $1170-1350 \text{ cm}^{-1}$ getoon waar fenoliese hidroksielgroepe en metielgroepe absorbeer.

Dit is moeilik om die spektra van die pigmente A, B, C, D en E (fig. III, IV en V) met hierdie gepubliseerde spektra van die aglikone te vergelyk, want soos Ribéreau-Gayon & Josien (1960) gevind het, word die pieke afgeplat, veral in die gebied $1350-1500 \text{ cm}^{-1}$, indien 'n glikosielres teenwoordig is. Die spektrum van malvidien (fig. IV) het egter 'n baie goeie ooreenkoms getoon met dié wat Ribéreau-Gayon & Josien (1960) vir hierdie antosianidien gepubliseer het. In die huidige studie was die resolusie van die spektrum ook heelwat beter.

Die kenmerkende piek te wyte aan die oksoniumioon is deur al die glikosiede A, B, C, D en E duidelik in die omgewing van 1635 cm^{-1} getoon. Die spektrum van p-kumaarsuur (fig. III)

toon ook 'n piek in hierdie posisie, te wyte aan 'n C=C sisteem gekonjugeer met 'n aromatiëse ring (Bellamy, 1958). Hierdie spektrum het ook 'n groot afgeplatte piek by $1675-1695\text{ cm}^{-1}$ getoon te wyte aan die C=O groep in 'n α,β -onversadigde aromatiëse suur (Bellamy 1958). 'n Soortgelyke piek is ook teenwoordig in die spektrum van pigment A (fig. III), te wyte aan die C=O groep in die esterband tussen p-kumaarsuur en malvidien- β -monoglukosied. Verdere pieke wat deur die spektra van pigment A en p-kumaarsuur getoon word en nie deur die ander nie, is gevind by 1115 en 830 cm^{-1} . Beide hierdie pieke is te wyte aan CH-absorpsie in aromatiëse verbindings en hulle posisies is kenmerkend vir p-gesubstitueerde aromatiëse verbindings (Bellamy, 1958).

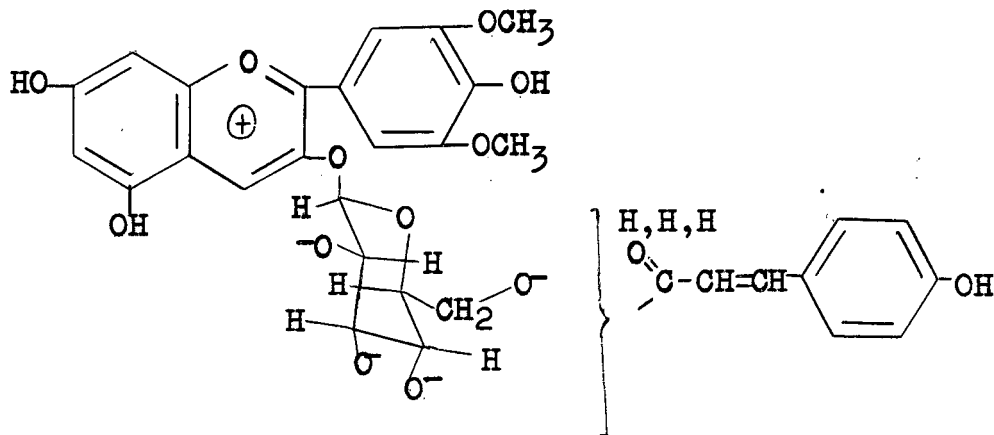
Die klein piek in die omgewing van 1460 cm^{-1} wat deur Ribereau-Gayon & Josien (1960) aan die teenwoordigheid van metoksielgroepe toegeskryf word, is egter in die spektra van al die pigmente van Barlinka gevind, ook by pigment E wat geen metoksielgroepe bevat nie. Dit skyn dus asof hierdie piek eerder te wyte kan wees aan aromatiëse C-C rekking (Bellamy, 1958) want selfs die spektrum van p-kumaarsuur toon hierdie piek. Die ander klein piek by 1430 cm^{-1} wat aan metoksielgroepe toegeskryf word, kon slegs in die spektra van pigment B en malvidien aangetoon word.

Alhoewel Ribèreau-Gayon & Josien (1960) beweer dat die infrarooispektra van die aglikone 'n definitiewe metode van identifikasie bied, wil dit voorkom asof hierdie spektra in geval

van die glikosiede net as 'n identifikasie hulpmiddel kan dien. By geasileerde verbindings, soos A, blyk dit egter van spesiale belang te wees, want hier word duidelike pieke in die spektrum gevind wat nie by die spektra van ongeasileerde antosianiene voorkom nie.

2.7 Algemene opmerkings ten opsigte van die voorkoms van pigmente A, B, C, D en E.

Pigment A.

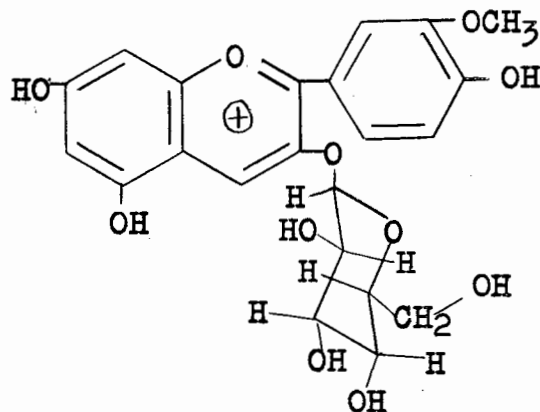


Malvidien-3-monoglukosied geasileer met een molekule p-kumaarsuur

Hierdie tipe geasileerde antosianiene kom dikwels in druiwe voor. Ingalsbe, Neubert & Carter (1963) het byvoorbeeld gevind dat die hoofpigment in Concord druiwe bestaan uit delfinidien- en sianidien-3-monoglukosied geasileer met p-kumaarsuur. In blomme, bv. petunias (Birkofer, Kaiser, Koch, Donike & Wolf, 1963) kom die tipe pigment baie algemeen voor. Alhoewel verskeie derivate van malvidien geasileer met p-kumaarsuur in die literatuur beskryf is, soos bv. geasileerde malvidien

-3-diglukosied (Ensatien) in die Iris (Willstätter & Weil, 1916) en geasileerde malvidien-3-isorhodeosoglukosied (Negretein) in Solanum (Hyashi, 1962), is die voorkoms van malvidien-3-monoglukosied geasileer met een molekule p-kumaarsuur minder bekend. Malan (1963), Drawert (1961) en Colagrande & Grandi (1960) maak wel melding van die teenwoordigheid van hierdie pigment in V. vinifera, maar geen geval kon in die literatuur gevind word waar die pigment in kristallyne vorm geïsoleer is nie. Dit blyk dus dat hierdie antosianien tydens die huidige ondersoek vir die eerste keer in chromatografies rein kristallyne vorm uit plantaardige materiaal geïsoleer is.

Pigment B.



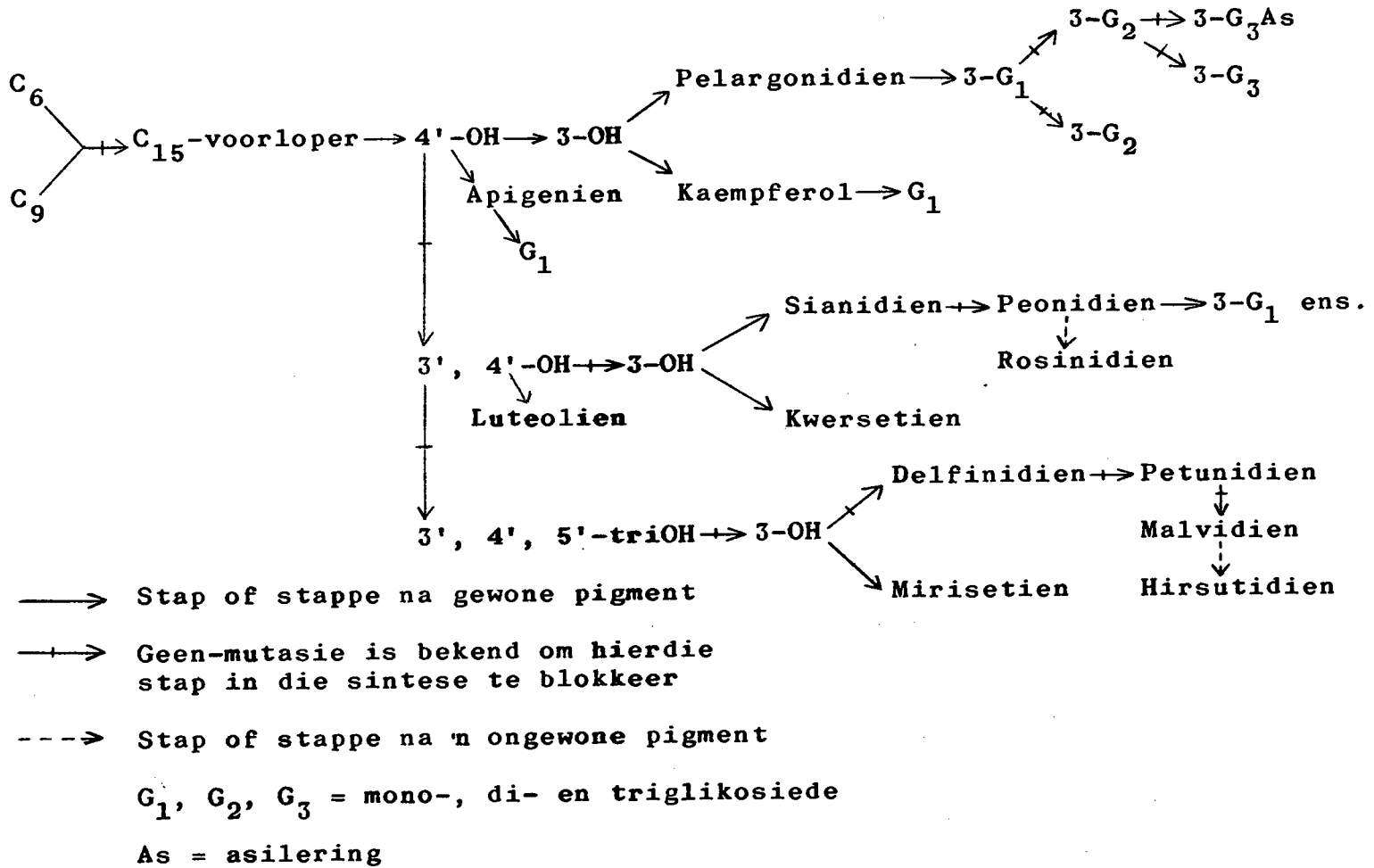
Peonidien-3-monoglukosied

Derivate van peonidien kom algemeen en in groot hoeveelhede in verskillende druifsoorte voor. Drawert (1961) het byvoorbeeld gevind dat peonidien-3-monoglukosied 45% van die

totale antosianieninhoud in Muscat de Hamburg (V. vinifera) uitmaak. In al agt cultivars van V. vinifera wat die skrywer ondersoek het, was die konsentrasie van die pigment hoër as 10% van die totale antosianieninhoud. Derivate van peonidien kom ook in ander vrugte voor, bv. peonidien-3-monoglukosied („oxy-coccisianien“) in Oxycoccus macrocarpus (Hyashi, 1962). Die-selwde antosianien kom ook in blomme, bv. in petunias (Birkofer, Kaiser, Koch & Lange, 1963) voor.

Omdat peonidien 'n gemetileerde derivaat van sianidien is, kan verwag word dat waar eersgenoemde teenwoordig is, laasgenoemde ook gevind sal word, veral as die biosintese skema (fig. VI) van Harborne (1962) in gedagte gehou word. Volgens hierdie skema word peonidien uit sianidien gevorm. Pigmente afgelei van sianidien kom egter selde in V. vinifera voor, alhoewel Drawert (1961) die voorkoms van die 3-monoglukosied daarvan in V. vinifera beskryf het. Robinson & Robinson (1932) het ook die voorkoms van hierdie pigment in Suid-Afrikaanse rooi Hane-pootdruwe (V. vinifera) beskryf. Ribéreau-Gayon & Ribereau-Gayon (1958) beweer egter dat waar sianidien in die suurhidrolisaat van die pigmente van 'n Vinifera cultivar gevind word, die waarskynlikheid baie groot is dat dit 'n neweproduk is as gevolg van die werking van die soutsuur op 'n leuko-derivaat wat teenwoordig is. Die afwesigheid van 'n sianidien-glukosied by Barlinka is dus in ooreenstemming met die algemene pigmentasie in Europese druiwe.

Indien die biosintese skema van Harborne (1962) dus korrek

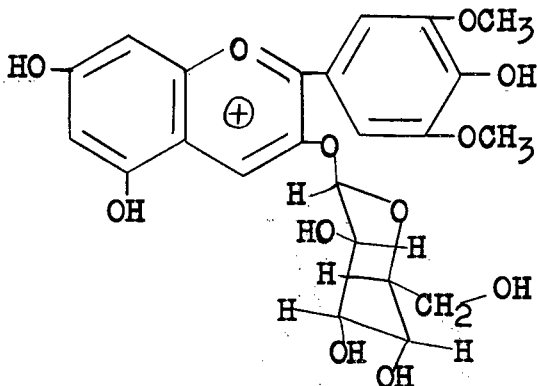


Die Pad van flavonoïed-biosintese gebaseer op genetiese studies (Harborne, 1962).

Figuur VI

is, beteken dit dat peonidien onmiddellik uit sianidien gevorm word sodra laasgenoemde ontstaan.

Pigment C.



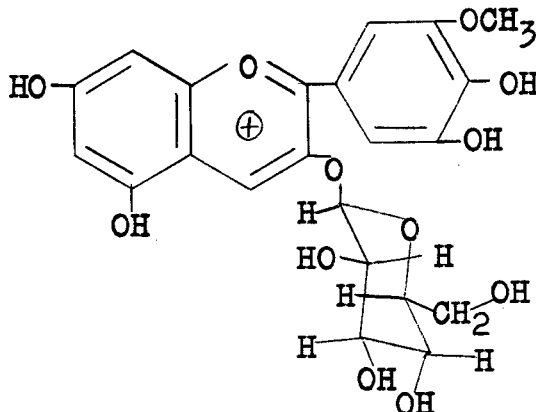
Malvidien-3-monoglukosied

Pigmente afgelei van malvidien kom baie algemeen en in die meeste druifsoorte voor. Die eerste antosianien wat in kristallyne vorm uit druiwe berei is, was dan ook malvidien-3-monoglukosied (Willstätter & Zollinger, 1915). In Europese druifsoorte beslaan malvidien-3-monoglukosied gewoonlik 30-40% van die totale hoeveelheid antosianiene wat teenwoordig is (Drawert, 1961) en dit is verreweg ook die hoofpigment in Barlinka druiwe.

Pigment D.

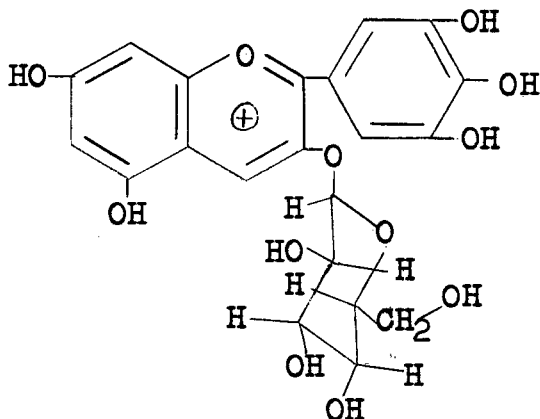
Veral in V. vinifera kom petunidienderivate in klein hoeveelhede en minder algemeen voor (Drawert 1961). In blomme, bv. in petunias (Birkofer, Kaiser, Koch & Lange, 1963) vanwaar

dit ook sy naam ontleen, kom hierdie tipe pigment algemeen voor.



Petunidien-3-monoglukosied

Pigment E.



Delfinidien-3-monoglukosied

Delfinidien-glikosiede kom meer algemeen as dié van petunidien in druiwe voor (Drawert, 1961). In blomsoorte, bv. delfinidien-3-monoglukosied in Viola tricolor (Hyashi, 1962) is

dit een van die algemeenste pigmente.

Volgens die biosintese skema van Harborne (1962) behoort malvidien uit petunidien en petunidien uit delfinidien gevorm te word. As die skema korrek is, geskied die metileringsproses ook in die geval van Barlinka baie vinnig. Die gesamentlike voorkoms van pigmente A, C, D en E is dus heeltemal volgens verwagting. Die voorkoms van pigment B, 'n peonidien-glukosied, pas nie mooi by die patroon in nie. Moontlik lê die ewewig by die vorming van peonidien uit sianidien so ver aan die kant van peonidien dat die voorkoms van sianidien in die druiwe nie met papierchromatografie vasgestel kan word nie.

Die indentifikasie van pigment A as malvidien- β -monoglukosied geasileer met een molekule p-kumaarsuur en pigmente B, C, D en E as die β -monoglukosiede van peonidien, malvidien, petunidien en delfinidien respektiewelik, pas mooi in by hulle chromatografiese gedrag in BAW. Omdat pigmente C, D en E slegs in graad van metilering verskil en in alle ander opsigte identies is, kan verwag word dat hulle R_f -waardes in BAW min van mekaar sal verskil. Pigment C bevat twee, pigment D een en pigment E geen metoksielgroepe. Pigment C sal dus 'n effens hoër R_f -waarde as pigment D hê, terwyl die R_f -waarde van laasgenoemde weer effens hoër as die van pigment E sal wees (seksie 2.1). In die praktyk is dit ook so gevind (tabel 2). Volgens Harborne (1958a) het dieselfde glikosiede van sianidien en malvidien ongeveer dieselfde R_f -waardes. Dit beteken dat peonidien-glikosiede, m.a.w. mono-gemetileerde sianidien-glikosiede,

'n effens hoër R_f -waarde as die ooreenstemmende sianidien- en malvidien-glikosiede sal hê. Pigment B se R_f -waarde was dan ook effens hoër as dié van pigment C (tabel 2). Die buitengewoon hoë R_f -waarde van pigment A in BAW word verklaar deurdat dit in geasileerde verbinding is.

Omdat dit gevind is dat al die pigmente in Barlinka-druif uit β -monoglukosiede bestaan, ondersteun dit die gedagte baie sterk dat Barlinka 'n cultivar van V. vinifera is, want soos reeds genoem, is die voorkoms van slegs β -monoglukosiede 'n kenmerk van die Europese druifsoorte.

3. SLOTSOM.

- (i) Vyf antosianienpigmente A, B, C, D en E in volgorde van afnemende R_f -waarde in BAW, is uit die doppe van Barlinka druiwe geïsoleer en gekristalliseer.
- (ii) Die aglikone van die pigmente is geïdentifiseer deur suurhidrolise en chromatografiese vergelyking van die hidrolise produkte met standaard merkers in verskeie oplosmiddelsisteme.
- (iii) Die aantal, identiteit en posisie van substitusie van die suikerreste in elke pigment is met behulp van gekontroleerde suurhidrolise en oksidasie met waterstofperoksied vasgestel.
- (iv) Die konfigurasie van die aglikoon in elke pigment is vasgestel met behulp van alkalismelte, oksidasie met waterstofperoksied en oksidasie met verdunde bytsoda-oplossing. Laasgenoemde twee metodes is tydens hierdie ondersoek as mikrotegnieke

ontwikkel.

(v) Deur die ultravioletabsorpsiespektra van hierdie pigmente te bestudeer, is die identiteit van die pigmente verder bevestig. Die molare ekstinksiëkoëffisiënte vir pigmente A en C, vir malvidien en vir p-kumaarsuur is bepaal sodat die molare verhouding aglikoon: glukose in pigment C bepaal kon word. So kon ook die molare verhouding antosianien: p-kumaarsuur in pigment A op twee verskillende maniere vasgestel word.

(vi) Die infrarooiabsorpsiespektra van die vyf pigmente en van malvidien is bepaal.

(vii) Peonidien, 3- metoksigallussuur en p-kumaarsuur is volgens modifikasies van bestaande tegnieke sinteties berei om as vergelykings-substansie te dien.

(viii) Die finale identiteit van die pigmente is soos volg:

Pigment A: malvidien-3-monoglukosied geïsoleer met een molekule p-kumaarsuur. Hierdie pigment is sover vasgestel kon word vir die eerste keer in rein kristallyne vorm uit 'n natuurlike bron geïsoleer.

Pigment B: peonidien-3-monoglukosied.

Pigment C: malvidien-3-monoglukosied.

Pigment D: petunidien-3-monoglukosied.

Pigment E: delfinidien-3-monoglukosied.

(ix) Pigment C kom in die grootste konsentrasie as hoofpigment voor, terwyl pigment A en B in heelwat kleiner hoeveelhede

voorkom. Pigmente D en E kom slegs in spoorhoeveelhede voor.

(x) Omdat al die pigmente uit 3-monoglukosiede bestaan kan Barlinka met 'n groot mate van sekerheid as 'n cultivar van Vitis vinifera beskryf word.

VERWYSINGS

- Abe, Y. & Hayashi, K. (1956). Further studies on paper chromatography of anthocyanins, involving an examination of glycoside types by partial hydrolysis. Bot. Mag., Tokyo, 69, 577. (Deur Akiyoshi, Webb & Kepner, 1963).
- Akiyoshi, M., Webb, A.D. & Kepner, R.E. (1963). The major anthocyanin pigments of Vitis vinifera varieties Flaming Tokay, Emperor and Red Malaga. J. Food Science 28(2), 177-181.
- Anderson, R.J. & Naubenhauer, F.P. (1926). A contribution to the chemistry of grape pigments. IV. The anthocyanins of Isabella grapes. J. Amer. chem. Soc. 48, 2997-3003.
- Anoniem (1963). Deciduous Fruit Board Annual Report. Addendum Deciduous Fruit Grower 13(1).
- Basson, D.S. (1963). Die antosianienpigmente. Seminaar gelewer vir BSc.-Honneurs in voedselwetenskap. Universiteit van Stellenbosch.
- Bate-Smith, E.C. (1948). Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. Nature, Lond., 161, 835-838.
- Bellamy, L.J. (1958). The infra-red spectra of complex molecules. London: Methuen & Co. Ltd.
- Birkofer, L. & Kaiser, C. (1963). Methode zur Bestimmung des Acyl- und Zuckerrestes in Anthocyanidin-3-(acyl)-disacchariden. Z. Naturf. 18b, 337.
- Birkofer, L., Kaiser, C., Koch, W. & Lange, H.W. (1963). Nicht acylierte Anthocyane in Blüten von Petunia hybrida. Z. Naturf. 18b, 367-370.
- Birkofer, L., Kaiser, C., Koch, W., Donike, M. & Wolf, D. (1963). Acylierte Anthocyane II. Cis-trans-Isomerie bei Acyl-anthocyanen. Z. Naturf. 18b, 631-634.
- Bockian, A.H., Kepner, R.E. & Webb, A.D. (1955). Skin pigments of the Cabernet Sauvignon grape and related progeny. J. Agr. Food Chem. 3, 695-699.

- Bradfield, A.E. & Flood, A.E. (1952). The direct measurement of the absorption spectra of some plant phenols on paper strip chromatograms. J. chem. Soc. pp. 4740-4744.
- Brown, W.L. (1940). Anthocyanin pigment of the Hunt muscadine grape. J. Amer. chem. Soc. 62, 2808-2810.
- Colagrande, O. & Grandi, G. (1960). The anthocyanin pigments of grapes. Ann. sper. agrar., Rome, 14 (3) 325-327 (Deur Chem. Abstr. 54, 25060c).
- Chandler, B.V. & Harper, K.A. (1961). Identification of saccharides in anthocyanins and other flavonoids. Aust. J. Chem. 14(4), 586-595.
- Chandler, B.V. & Harper, K.A. (1962). A procedure for the absolute identification of anthocyanins: the pigments of Blackcurrant fruit. Aust. J. Chem. 15(1), 114-120.
- Douglas, W.S. (1951). Solution to the problem of poor colour in Barlinka grapes. Deciduous Fruit Grower 1(11), 17-18.
- Drawert, F. (1961). Uber Anthocyane in Trauben, Mosten und Weinen. Vitis 2, 288-304.
- Endo, T. (1957). Column chromatography of anthocyanins. Nature, Lond., 179, 378-379.
- Feigl, F. (1960). Spot tests in organic analysis. London: Elsevier Publishing Co.
- Fischer, E. & Freudenberg, K. (1913). Uber das Tannin und die Synthese ähnlicher Stoffe. III. Hochmolekulare Verbindungen. Ber. dtsh. chem. Ges. 46, 1116-1138.
- Geissman, T.A., Jorgenson, E.C. & Harborne, J.B. (1953). Effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. Chem. & Ind. p. 1389.
- Harborne, J.B. (1957). Variations in the glycosidic pattern of anthocyanins. Nature, Lond., 179, 429.
- Harborne, J.B. (1958a). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. J. Chromatog. 1, 473-487.

- Harborne, J.B. (1958b). Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochem. J. 70, 22-28.
- Harborne, J.B. (1960). Plant polyphenols. I. Anthocyanin production in the cultivated potato. Biochem. J. 74, 262-269.
- Harborne, J.B. (1962). Biosynthesis of flavonoids and anthocyanins. The chemistry of flavonoid compounds. (T.A. Geissman, 1962) London: Pergamon Press Ltd.
- Harborne, J.B. (1963). Plant polyphenols. IX. The glycosidic pattern of anthocyanin pigments. Phytochemistry 2(1), 85-97.
- Harborne, J.B. (1964). Plant polyphenols. XI. The structure of acylated anthocyanins. Phytochemistry 3(2), 151-160.
- Harborne, J.B. & Sherratt, H.S.A. (1957a). Variations in the glycosidic patterns of anthocyanins II. Experientia 13, 486-487 (Deur Hyashi, 1962).
- Harborne, J.B. & Sherratt, H.S.A. (1957b). Identification of the sugars of anthocyanins. Biochem. J. 65, 23P-24P.
- Horrocks, R.H. & Manning, G.B. (1949). Partition chromatography on paper. Lancet 256, 1042.
- ^aHyashi, K. (1962). The anthocyanins. The chemistry of flavonoid compounds. (T.A. Geissman, 1962) London: Pergamon Press Ltd.
- Ingalsbe, D.W., Neubert, A.M. & Carter, G.H. (1963). Concord grape pigments. J. Agr. Food Chem. 11, 263-268.
- Jurd, L. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. The chemistry of flavonoid compounds. (T.A. Geissman, 1962) London: Pergamon Press Ltd.
- Karrer, P. & de Meuron, G. (1932). Helv. chim. Acta 15, 1212 (Deur Chandler & Harper, 1962).
- Karrer, P. & Widmer, R. (1927). Untersuchungen über Pflanzenfarbstoffe. I. Über die Konstitution einiger Anthocyanidine. Helv. chim. Acta 10, 5.
- Koch, J.E. & King, W. (1938). Chem. Ztg. 62, 140 (Deur Lindstedt, 1950).

- Koeppen, B.H. (1961). The flavonoid constituents of Aspalathus acuminatus. D.Sc. thesis in food technology. University of Stellenbosch.
- Krishnamurthy, H.G., Krishnamoorthy, V. & Seshadri, T.R. (1963). Preparation of anthocyanins from related flavonoids. Phytochemistry 2(1), 47-60.
- Lederer, E. & Lederer, M. (1957). Chromatography. London: Elsevier Publishing Co.
- Le Roux, M.S. (1960). Wye priële is voordelig vir Barlinka druiwe. Boerdery in S.A. 28, 375-395.
- Levy, L.F., Posternak, T. & Robinson, R. (1931). Experiments on the synthesis of the anthocyanins. Part VIII. A synthesis of oenin chloride. J. chem. Soc. p. 2701-2715.
- Li, K.C. & Wagenknecht, A.C. (1956). The anthocyanin pigments of sour cherries. J. Amer. chem. Soc. 78, 979-980.
- Lindstedt, G. (1950). Constituents of pine heartwood. XX. Separation of phenolic heartwood constituents by paper chromatography. Acta chem. scand. 4, 448.
- Malan, H. (1963). Flavonoids of black grape varieties grown in South Africa. M.Sc. thesis in agriculture. University of Stellenbosch.
- Marquart (1835). Eine chemisch-physiol. Abhandlung Bonn (Deur Hyashi, 1962).
- Perold, A.I. (1926). Handboek oor wynbou. Stellenbosch: Pro Ecclesia-Drukkery.
- Pigman, W., Anderson, E., Fisher, R., Buchanan, M.A. & Browning, B.L. (1953). Color precursors in spruce and western Hemlockwoods and inner barks. TAPPI 36(1), 4.
- Ribéreau-Gayon, P. (1959). Recherches sur les Anthocyanes des Végétaux. Libraire Générale de L'Enseignement, Paris (Deur Chandler & Harper, 1962 en Ingalsbe et al, 1963).
- Ribéreau-Gayon, P. & Josien, M.-L. (1960). Contribution à l'étude des anthocyanes par spectrométrie infrarouge. Bull. Soc. chim. Fr. p. 934-937.

- Ribéreau-Gayon, J. & Ribéreau-Gayon, P. (1958). The anthocyanins and leucoanthocyanins of grapes and wines. Am. J. Enol. 9(1), 1-9.
- Robinson, G.M. & Robinson, R. (1931). A survey of anthocyanins I. Biochem. J. 25, 1687-1705.
- Robinson, G.M. & Robinson, R. (1932). A survey of anthocyanins II. Biochem. J. 26, 1647-1664.
- Roux, D.G. (1958). Methods of fractionation and identification of constituents of condensed tannins. J. Amer. Leath. Chem. Ass. LIII(7), 394-395.
- Seikel, M.K. (1962). Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. The chemistry of flavonoid compounds. (T.A. Geissman, 1962) London: Pergamon Press Ltd.
- Sondheimer, E. & Kertesz, Z.I. (1948). The anthocyanin of strawberries. J. Amer. chem. Soc. 70, 3476-3479.
- Sonn, A. (1913). Die Konstitution des Naringenins. Phloroglucin-ester von Phenol-carbonsäuren. Ber. dtsh. chem. Ges. 46, 50-59.
- Swain, T. (1953). The identification of coumarins and related compounds by filter-paper chromatography. Biochem. J. 53, 200-208.
- Willstätter, R. & Everest, A.E. (1913). Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoff der Kornblume. Liebigs Ann. 401, 189-232.
- Willstätter, R. & Mallison, H. (1915). Untersuchungen über die Anthocyane. III. Über den Farbstoff der Preiselbeere. Liebigs Ann. 408, 40.
- Willstätter, R. & Zollinger, E.H. (1915). Untersuchungen über die Anthocyane. VI. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. Liebigs Ann. 408, 83.
- Willstätter, R. & Weil, F.J. (1916). Liebigs Ann. 412, 178
(Deur Hayashi, 1962).