

**DIE CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE  
REUKMERKVLOEISTOF VAN DIE BENGAALSE TIER,  
*PANTHERA TIGRIS TIGRIS***

deur

MARLIZE Z VIVIERS

Tesis ingelewer ter voldoening aan die vereistes vir die graad

**Magister in Natuurwetenskappe**

aan die

**Universiteit van Stellenbosch**

Suid-Afrika

Studieleier: Professor B.V. Burger

Stellenbosch

Medestudieleier: Doktor M. le Roux

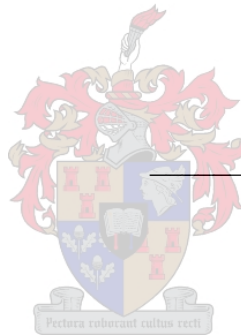
April 2006

## VERKLARING

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

---

Marlize Z Viviers



---

Datum

# OPSOMMING

Selfs al word die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris*, as 'n bedreigde spesie geklassifiseer en verskyn die tier op die IUCN se "Red Data List", is daar min inligting oor die samestelling van die dier se reukmerkvlloeistof bekend. Die sproei van hierdie reukmerkvlloeistof is die hoofvorm van semiochemiese kommunikasie in alle katspesies. In sommige katspesies, insluitend die Bengaalse tier, bestaan die gesproeide vlloeistof nie uit suiwer urine nie, maar is dit 'n mengsel van urine en reukkliafskeidings.

Die doel van hierdie studie was om die vlugtige verbindings in die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier te karakteriseer om sodoende 'n beter begrip van die semiochemiese kommunikasie van die tier te verkry. Die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier is chemies gekarakteriseer deur van analitiese tegnieke, naamlik gaschromatografie, lae-resolusie gaschromatografie-massaspektrometrie, chemiese-ionisasie-massa-spektrometrie en retensietyd-vergelyking gebruik te maak. Homoloë reekse van alkane, alkohole, aldehiede, ketone, karboksielsure,  $\gamma$ - en  $\delta$ -laktone, amiede en laktame is in die reukmerkvlloeistof teenwoordig. Verder is daar ook esters en stikstofverbindinge geïdentifiseer. Van hierdie geïdentifiseerde verbindings is die onvertakte alkane, versadigde alkohole, aldehiede, metielketone, versadigde karboksielsure en  $\gamma$ - en  $\delta$ -laktone verbindings wat algemeen in soogdiersekresies voorkom. Verbindings wat egter minder algemeen voorkom is vertakte metielketone, vertakte karboksielsure, aromatiese sure, dimetielesters van dikarboksielsure en amiede. Die urine bevat 'n ftaalsuurester. Dit is bekend dat die ftaalsuuresters wat algemeen in die polimeerindustrie gebruik word, wyd verspreid in die natuur voorkom en dat hierdie besoedeling endokrienontwrigtende gevolge kan hê.

Die hitte, humiditeit en reën wat kenmerkend is van tiere se natuurlike habitat, maak dit 'n vereiste vir organismes om van 'n fikseermiddel gebruik te maak indien 'n lang leeftyd vir semiochemiese boodskappe verseker moet word. Die verbindings en die konsentrasies waarin die vlugtige organiese komponente in onderskeidelik die lipied- en urinefraksies van die tier se reukmerkvlloeistof voorkom, is bepaal en met mekaar vergelyk. Hierdie studie het bewyse gevind dat die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof 'n groter affiniteit vir die vlugtige organiese komponente het as die urine en dus die leeftyd van die betrokke semioboodskap kan verleng.

## SUMMARY

Although the Bengal tiger, *Panthera tigris tigris*, appears on the IUCN Red Data List for endangered animals, very little information is available in the literature on the components of this animal's marking fluid. Scent marking is the main form of communication in all cat species. In some species, including the Bengal tiger, the liquid used for spraying is not pure urine, but is mixed with scent gland secretions.

The objective of this study was to characterise the volatile components in the marking fluid of the Bengal tiger to achieve a better understanding of the semiochemical communication of this animal. The marking fluid of the tiger was characterised through the use of analytical techniques, such as gaschromatography, low resolution gas chromatography - mass spectrometry and retention time comparison. Homologous series of alkanes, alcohols, aldehydes, methyl ketones, carboxylic acids,  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones, amides and lactams, as well as esters and nitrogen containing compounds, were identified. Of these identified compounds the unbranched alkanes, saturated alcohols, aldehydes, branched methyl ketones, saturated carboxylic acids and  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones are commonly found in mammalian secretions. Compounds that aren't as common in their secretions are the methyl ketones, branched carboxylic acids, dimethyl esters of dicarboxylic acids and amides. The marking fluid contains a phthalic acid ester. Phthalic acid esters are used in the polymer industry and are nowadays found almost everywhere in nature. It is known that these pollutants have endocrine disrupting properties.

The heat, humidity and wet conditions that are characteristic of the Bengal tiger's natural habitat makes it necessary for the tiger to make use of a fixative to prolong the life of the semiochemical message. The compounds and the concentrations in which these compounds are present in the urine and the lipid fraction of the marking fluid of the tiger was determined and compared to assess the fixative role of the lipids. This study has provided evidence that the lipid material has a greater affinity for the volatile organic constituents of the marking fluid and that it can therefore extend the lifetime of a semiochemical message left by the tiger.



## BEDANKINGS

Hiermee wil ek die volgende persone en instansies opreg bedank:


- Prof. Ben V. Burger, vir al die hulp, leiding, en ondersteuning.
- Dr. Maritha le Roux, vir bystand, ondersteuning, geselsies en proeflees van die tesis.
- Wina Burger, vir aanmoediging, teetye, en lekker geselsies.
- Dr. M.W. Bredenkamp en Prof. I. Green, vir die optree as eksaminatore.
- Tygerberg Dieretuin, en in die besonder vir Werner Fourie wat geen moeite ontsien het om my te help met die versameling van reukmerkvlloeistof nie.
- Vir finansiële bystand: NRF, Prof. Burger en my ouers.
- My ouers, familie en vriende, vir belangstelling, ondersteuning en motivering.
- My medestudente in LECUS, vir bystand, vriendskap en goeie tye.
- My Skepper en Hemelse Vader vir die talente en voorregte, genade en ontelbare seëninge.



# INHOUDSOPGAWE

## HOOFSUK 1

<b>Inleiding en Doelstelling</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Algemene Inleiding</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Chemiese Kommunikasie by Soogdiere</b>	<b>2</b>
1.2.1 Wat is feromone?	3
1.2.2 Dualistiese feromone	5
1.2.3 Vervaardiging van semiochemiese verbindings	7
1.2.4 Vrystelling van semioverbindings	9
1.2.5 Waarneming van semioverbindings	10
<b>1.3 Verhouding tussen Struktuur en Funksionaliteit</b>	<b>12</b>
1.3.1 Beperkings op chemiese boodskappe tydens chemiese kommunikasie	12
1.3.2 Vereistes vir effektiewe oordrag van inligting	14
1.3.2.1 Territoriale reukmerkferomone	15
1.3.2.2 Direk-vrygestelde feromone	16
<b>1.4 Die Bengaalse Tier, <i>Panthera tigris</i></b>	<b>17</b>
1.4.1 Algemene beskrywing	18
1.4.2 Verspreiding en habitat	19
1.4.3 Dieet	19
1.4.4 Voortplanting	20

1.4.5 Lewensverwagting	21
1.4.6 Gedrag en kommunikasie	21
1.4.7 Semiochemiese kommunikasie by tiere	22
1.4.7.1 Model vir reukmerkgedrag	24
1.4.7.2 Reukmerk- en territoriale gedrag	25
1.4.7.3 Pro-estrus reukmerkgedrag	25
1.4.7.4 Vergelyking van reukmerkstrategieë	26
1.4.8 Bewaring van die tierspesies	26
1.4.8.1 Semiochemiese kommunikasie in die bewaring van katspesies	27
<b>1.5 Doelstelling van Hierdie Studie</b>	<b>29</b>
<b>Verwysings: Hoofstuk 1</b>	<b>31</b>
 <p><b>HOOFSTUK 2</b></p> <p><small>Pectora roborant cultus recti</small></p>	
<p><b>Identifisering van Chemiese Verbindings teenwoordig in die Urine van die Bengaalse tier, <i>Panthera Tigris</i></b></p>	
<b>2.1 Chemiese Karakterisering van die Urine van die Bengaalse Tier</b>	<b>42</b>
2.1.1 Versadigde alifatiese koolwaterstowwe	42
2.1.2 Terpenoïede	44
2.1.3 Versadigde alifatiese alkohole	51
2.1.4 Versadigde alifatiese vertakte alkohol	52
2.1.5 Onversadigde alifatiese alkohole	53
2.1.6 Aromatiese alkohole	56

2.1.7 Furfurielalkohol	58
2.1.8 Versadigde alifatiese aldehyede	61
2.1.9 Onversadigde alifatiese aldehyede	63
2.1.10 Aromatiese aldehyd	64
2.1.11 Versadigde alifatiese alkanone	65
2.1.12 Versadigde alifatiese vertakte ketone	68
2.1.13 Aromatiese ketoon	71
2.1.14 Versadigde alifatiese karboksielsure	71
2.1.15 Versadigde alifatiese vertakte karboksielsure	78
2.1.16 Onversadigde alifatiese karboksielsure	82
2.1.17 Aromatiese karboksielsuur	83
2.1.18 Versadigde alifatiese etielester	84
2.1.19 Diësters	86
2.1.20 Versadigde $\gamma$ -laktone	89
2.1.21 Onversadigde $\gamma$ -laktone	90
2.1.22 Versadigde $\delta$ -laktone	92
2.1.23 Amiede	94
2.1.24 Versadigde laktame	97
2.1.25 Dimetielsulfoon	100
2.1.26 Onvolledig geïdentifiseerde verbindings	107
2.1.27 Ongeïdentifiseerde verbindings	111
<b>Verwysings: Hoofstuk 2</b>	<b>166</b>



## HOOFSTUK 3

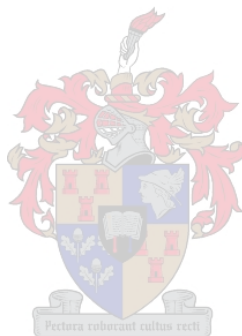
	<b>Resultate en Bespreking</b>	<b>172</b>
3.1	<b>Analise van 'n DCM-Ekstrak van die Urine</b>	173
3.2	<b>Bodamp-analise van die Urine</b>	174
3.3	<b>Analise van die Vlughtige Organiese Komponente van die Lipied-fraksie</b>	176
3.4	<b>Kwalitatiewe Samestelling van die Reukmerkvlloeistof</b>	177
3.5	<b>Kwantitatiewe Analise van die Reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier</b>	179
Verwysings:	<b>Hoofstuk 3</b>	186



## HOOFSTUK 4

	<b>Eksperimenteel</b>	<b>189</b>
4.1	<b>Algemeen</b>	189
4.2	<b>Versameling van Materiaal en Monstervoorbereiding</b>	189
4.3	<b>Analitiese Metodes</b>	192
4.3.1	Instrumentasie	192
4.3.1.1	Gaschromatografiese analises	192
4.3.1.2	Gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS)	192

4.3.2	Monsterneming en inlaatmetodes	193
4.3.2.1	Konvensionele monsterinlaat	193
4.3.2.2	Monsterneming met behulp van die SEP-tegniek	193
4.3.2.3	Inlaat-interne termiese desorpsie	194
4.3.2.4	Kwantitatiewe analise	194
4.3.2.5	Analises van gesintetiseerde standaarde en retensietydvergelyking	195
<b>4.4</b>	<b>Sintese van Verwysingsverbindinge</b>	<b>195</b>
4.4.1	Bereiding van 3-metiel-2-ketone	195
4.4.2	Bereiding van $\alpha$ -metielkarboksiesure	196
4.4.3	Bereiding van diësters	197
<b>Verwysings:</b>	<b>Hoofstuk 4</b>	<b>199</b>



# HOOFSTUK 1

## INLEIDING EN DOELSTELLING

### 1.1 Algemene Inleiding

Enigiemand wat al diere se gedragpatrone bestudeer het, hetsy vanuit 'n klassieke soölogiese-, gedragsekologiese- of sielkundige perspektief, weet dat kommunikasie die grondslag is vir die bestaan van die diereryk. In die afwesigheid van kommunikasie sou diere nie kon voortplant nie. Komplekse interaksies vind plaas by hoogs sosiale diere, kommunikasie wat verder strek as wat nodig is vir voortplanting om te kan plaasvind. Deur effektiewe kommunikasie rangskik diere hulself volgens hulle relatiewe status in hulle gemeenskap. Die belangrike rol wat kommunikasie by alleenlewende diere speel, is nie so voor-die-hand-liggend soos byvoorbeeld by die heuningby nie, maar kommunikasie met lede van dieselfde spesie is egter vir hierdie diere net so belangrik.<sup>1</sup> Die seine wat diere gebruik vir kommunikasie het ontwikkel in diverse vorme, wat bepaal word deur die omgewing waarin die boodskap versprei word en die fisiologiese toerusting van die ontvanger en die afsender van die boodskap. Dit het gelei tot die ontwikkeling van verskillende vorms van kommunikasie: chemiese-, ouditiewe-, visuele- en sensoriese kommunikasie.

Dit is moeilik om kommunikasie allesinsluitend te definieer, en vooraanstaande wetenskaplikes op die gebied van dierekommunikasie se definisies varieer steeds radikaal. Wilson<sup>2</sup> definieer kommunikasie as 'n aksie van een organisme, of sel, wat die gedragpatroon van 'n ander organisme, of sel, op 'n adaptiewe wyse verander. Met adaptief word bedoel dat die uitsending van die boodskap, die reaksie daarop, of beide, tot 'n sekere mate deur natuurlike seleksie geneties geprogrammeer moet wees. Hierdie definisie is meer algemeen as Dusenbery<sup>3</sup> se definisie wat sogenaamde "ware kommunikasie" beperk tot situasies waar die sein geskep word deur die afsender wat inligting verskaf aan die ontvanger, en sy reaksie adaptief verander.

Die meeste skrywers stem saam dat kommunikasie die volgende behels: die verskaffing van inligting (met behulp van seine of aanwysings) deur 'n afsender, die waarneming van die inligting deur die ontvanger, en sy reaksie daarop. Hierdie definisie laat ruimte vir misleiding deur die afsender, afluistery, of ander tipes van seinitbuiting deur die ontvanger van die boodskap. Daarom is dit goed om te onderskei tussen gevalle van koöperatiewe

boodskapsending, waar beide die sender en die ontvanger daaruit voordeel trek, en tussen nie-koöperatiewe boodskapsending, waar slegs die afsender of die ontvanger bevoordeel word.<sup>4</sup>

Toepassings wat spruit uit die studie van dieregedragspatrone en kommunikasie is eindeloos. Gedragstudies op muise het getoon dat chemiese verbindings gebruik word om ovulasie te stimuleer of te inhibeer, menstruele siklusse te sinkroniseer, sowel as miskrame te induseer. Deur insekte se kommunikasie te bestudeer is nie-toksiese verbindings ontdek wat gebruik kan word om peste te beheer. Bedreigde spesies kan beter beskerm word indien die nodige inligting in verband met hul natuurlike gedragspatrone, onder andere sosiale interaksies, voortplanting, kommunikasie, en die diere se unieke vereistes vir oorlewing, deur doelgerigte navorsing ingesamel kan word. Basiese gedragstudies in verband met voortplantingsgedrag het, byvoorbeeld, gelei tot verbeterde teelmetodes vir bedreigde spesies wat in dieretuine en wildreservate aangehou word.<sup>5,6</sup>

## 1.2 Chemiese Kommunikasie by Soogdiere

Diere se persepsie van die wêreld word gevorm deur hulle sintuiglike waarnemings. Inligting verkry uit die omgewing word geprosesseer deur visuele-, ouditoriese-, sensoriese- en olfaktoriese waarneming. Die inligting word gebruik vir oriëntasie en voeding, en vir kommunikasie met ander individue. Chemiese kommunikasie is die belangrikste medium waardeur inligting oorgedra word tussen diere, hulle omgewing en ander lewende organismes. Hierdie soort kommunikasie word moontlik gemaak deur die vrystelling en waarneming van semiochemiese verbindings. Sedert die begin van lewe op aarde, het eensellige organismes oor die vermoë beskik om selektief sekere chemiese verbindings waar te neem en te gebruik vir hulle sellulêre metabolisme. Vroeë metasoë het alleenlik op chemiese kommunikasie staat gemaak om die afskeiding van hul gamete te sinkroniseer, en sodoende te sorg dat bevrugting tussen gelyksoortige sperm- en eierselle kon plaasvind.<sup>7</sup>

Daar is baie inligting beskikbaar oor diere se afhanklikheid van semiochemiese kommunikasie. Sommige diere ervaar niks anders behalwe 'n chemiese wêreld nie, en hulle gedragspatrone word gereguleer deur 'n klein aantal chemiese verbindings. Navorsing oor inseksemiochemiese kommunikasie het die mens se kennis oor die gedragspatrone van diere aansienlik uitgebrei, en 'n groot aantal insekferomone is reeds chemies geïdentifiseer. Omdat



feromone verbindings is wat algemeen in die natuur voorkom, en nie toksies is nie, kan hierdie feromone gebruik word om insekplae te beheer op 'n omgewingsvriendelike wyse.<sup>8</sup>

Insekte wat in komplekse gemeenskappe lewe, bied vir die navorser ideale sisteme om semiochemiese kommunikasie te bestudeer. Sosiale insekte (alle miere, alle termiete, sommige bye en perdebye) woon saam in groot groepe, van tienduisende tot miljoene individue, en take word uitgevoer deur 'n groep individue wat saamwerk. Die blaarsnyermier, *Atta cephalotes*, wat in die tropiese reënwoude in Suid-Amerika voorkom, is 'n goeie voorbeeld hiervan. Blaarsnyermiere kom in kolonies van tot 2 miljoen miere voor, en woon in reekse ondergrondse kamers. Verkennermiere soek geskikte plantmateriaal vir die kolonie om te versamel. Die fungus wat in die ondergrondse kamers op die blare gekweek word, maak die kolonie se hoofvoedselbron uit. Een boom kan wel die kolonie se voedselbehoefte bevredig, maar 'n enkele mier kan nie so 'n ryk bron benut nie. Die verkennermiere los dus 'n chemiese spoor om ander miere na die boom te lei, en al die miere werk saam om die blare te oes. Die spoorferomoon wat die miere stimuleer om die nes te verlaat en hulle lei na die voedselbron, is die verbinding metiel-4-metielpiroom-2-karboksilaat<sup>9</sup> (Fig. 1.1). Daar is min aspekte van sosiale insekgedrag wat nie bemiddel word deur chemiese kommunikasie nie, en die chemiese sintuie van sosiale insekte is baie goed ontwikkel. Die meeste modelle vir olfaktoriese kommunikasie is gegrond op die waarneming van verskillende spesies se sosiale gedragpatrone.<sup>10</sup>

Dit is egter moeiliker om chemiese kommunikasie in hoër vertebrate, soos soogdiere, te bestudeer. Soogdiere gebruik oor die algemeen wel minder komplekse molekules vir semiochemiese kommunikasie, maar verkry kompleksiteit deur 'n kombinasie van 'n groot aantal verbindings van verskillende verbindingstipes wat as 'n enkele feromoon optree, te gebruik.<sup>11</sup> Wat verder uitdagings in soogdierferomoonstudies skep, is die kompleksiteit van vertebrate se sosiale gedragpatrone, en die probleme om gedraganalises suksesvol uit te voer in laboratoriumomgewings sowel as in die diere se natuurlike habitatte.

### 1.2.1 Wat is feromone?

Feromone is oorspronklik in 1959 deur Karlson en Lüscher<sup>12</sup> gedefinieer as verbindings wat uitgeskei word deur 'n individu en wat ontvang word deur 'n tweede individu van dieselfde spesie, by wie 'n spesifieke reaksie veroorsaak word. Die reaksie wat feromone ontlok, varieer

tussen langtermyn, onomkeerbare fisiologiese reaksies, tot spesifieke, feitlik onmiddellike gedragspatroonveranderings.<sup>13</sup>

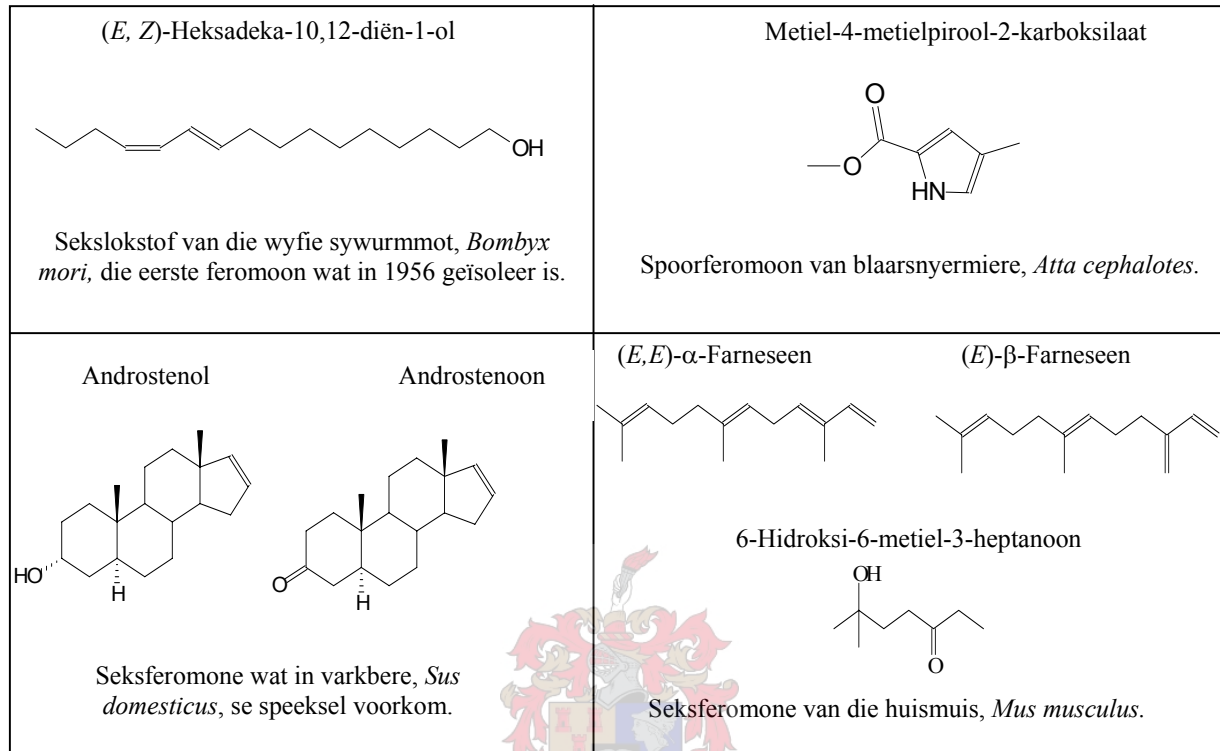


Fig. 1.1: Voorbeelde van semiochemiese verbindings.

Wilson<sup>14</sup> het feromone in 1963 onderverdeel in afsetter- en vrystellerferomone op grond van verskillende gedragpatrone wat bepaalde feromone ontlok. Afsetterferomone veroorsaak langtermyn fisiologiese verandering van die endokrien- en reproduksiesisteme by die ontvanger. 'n Voorbeeld van afsetterferomone is die urinêre feromone van die manlike muis wat die voorplantingstoestand van die wyfies verander.<sup>5</sup> Vrystellerferomone het weer 'n onmiddellike gedragreaksie tot gevolg, soos die geval is by sekslokstowwe, alarm- en aggregasieferomone van soogdiere en veral insekte.<sup>15</sup> Die effek van vrystellerferomone op soogdiergedrag kan gesien word by die Asiese olifant, *Elephas maximus*. Die manlike olifant toets gedurig die wyfie se urine met sy slurp, en wanneer die wyfie op hitte is, neem hy vroulike seksferomone waar, wat dan tot paringsgedrag lei.<sup>16</sup> Party semiochemiese verbindings tree op as beide afsetter- en vrystellerferomone. Die heuningby, *Apis mellifera L.*, produseer feromone wat werkerbye om haar aantrek (vrysteller), wat hommels lok op paringsvlugte (vrysteller), wat die ontwikkeling

van voortplantingsorgane by werkerbye inhibeer (afsetter), en wat verskeie aspekte van die kolonie se funksionering reguleer (vrysteller).<sup>17</sup>

Die term *feromoon* is afgelei van die Griekse woord *pherein*, wat "oordrag", en *hormōn*, wat "om te stimuleer", beteken. 'n Breër term vir die chemiese verbindings betrokke by dierekommunikasie is *semiochemiese verbindings*.<sup>18</sup> Die woord is afgelei van die Griekse woord *semeion* wat "sein" beteken. Streng gesproke is feromone 'n subklas van semiochemiese verbindings, wat spesifiek gebruik word vir kommunikasie tussen lede van dieselfde spesie. Hulle is dus intraspesifieke chemiese seine.

Semiochemiese verbindings wat verantwoordelik is vir die oordrag van inligting tussen verskillende spesies, word *allelochemiese verbindings* genoem. 'n Groep allelochemiese verbindings bekend as *allomone* bevoordeel hoofsaaklik die individu wat die boodskap uitstuur, soos dit die geval is by sekere spinnekoppe wat spesifieke motferomone sintetiseer, om die motte nader lok tot binne die spinnekop se aanvalsarea. 'n Ander groep, die *kairomone*, bevoordeel weer hoofsaaklik die ontvanger van die boodskap. Gespesialiseerde predatoriese kewers maak byvoorbeeld gebruik van baskewers se feromone om hulle op te spoor. Die predatore gebruik dus hul prooi se feromone as kairomone.<sup>19</sup> Die feromoonkonsep word opgesom in Fig. 1.2.

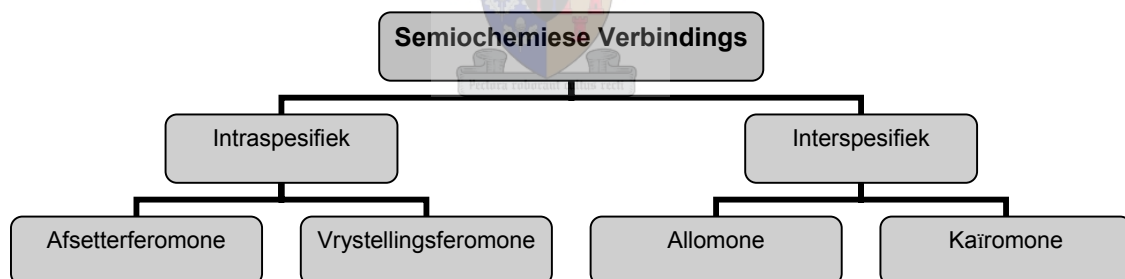


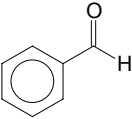
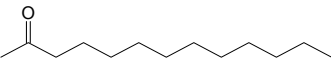
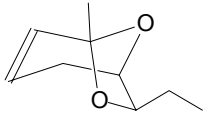
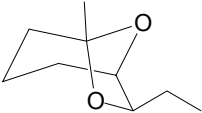
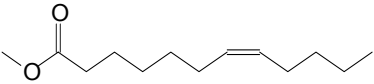
Fig. 1.2: Die feromoonkonsep.

## 1.2.2 Dualistiese feromone

Rasmussen et al.<sup>20</sup> het in 1990 ontdek dat die Asiese olifant, *Elephas maximus*, en sekere motspesies dieselfde seksferomoon, (*Z*)-7-dodekenielasetaat, deel. Hierdie ontdekking is besonder interessant want dit illustreer belangrike punte oor feromone wat in diere en insekte voorkom. Eerstens dui dit die alomteenwoordigheid van feromone aan. Regdeur die diereryk,

word meer interaksies bemiddel deur feromone as deur enige ander tipe boodskappe. Tweedens illustreer die gemeenskaplike gebruik van een komponent om 'n semiochemiese boodskap oor te dra die onafhanklike evolusie van spesifieke molekules as chemiese seine by spesies wat nie naby verwant aan mekaar is nie (Tabel 1.1).

**Tabel 1.1: Verskillende diere wat dieselfde feromone, of feromone met soortgelyke strukture, gebruik<sup>21</sup>**

Verbinding	Funksie	Voorkoms	
		Dier	Familie, Genus
 Bensaldehyd	Spoorferomoon	Bye	<i>Apidae, Xylocopa</i>
	Verdedigingferomoon	Miere	<i>Formicidae, Veromessor</i>
	Manlike seksferomoon	Motte	<i>Noctuidae, Pseudaletia</i>
 2-Tridekanon	Alarmferomoon	Miere	<i>Formicidae, Acanthomyops</i>
	Verdedigingsferomoon	Termiete	<i>Termopsidae, Schedorhinotermes</i>
 Dehidro-ekso-brevikomien	Manlike seksferomoon	Muise	<i>Muridae, Mus</i>
 Ekso-brevikomien	Aggregasieferomoon	Baskewers	<i>Scolytidae, Dendroctonus</i>
 (Z)-7-Dodekenielasetaat	Vroulike seksferomoon	Olifante	<i>Elephantidae, Elephas</i>
		Motte	140 motspesies (as enkele komponent of as komponent van 'n multikomponent-feromoon)

Hierdie tipe ooreenstemmings is die gevolg van die algemene oorsprong van lewe: basiese ensimatiiese paaie is algemeen vir alle multi-sel organismes, en die meeste klasse molekules word

regdeur die diereryk verkry. Derdens wys dit dat soogdiere net soos insekte ook klein molekules, op hulle eie of in komplekse mengsels, kan gebruik as seksferomone.<sup>22</sup>

### 1.2.3 Vervaardiging van semiochemiese verbindings

Feromone word geproduseer en uitgeskei op twee verskillende maniere. Eerstens deur middel van goed gedefinieerde afscheidingskliere wat hul produk buite die dier se liggaam uitskei; en tweedens deur uitskeiding deur liggaamsopeninge en organe wat betrokke is by spysvertering en voortplanting, soos die mond, anus, kloak, penis en vulva. Die chemiese verbindings wat feromonaal aktief is, kan makliker geïdentifiseer word as hulle deur gespesialiseerde eksokriene kliere afgeskei word as wanneer hulle uitscheidingsprodukte is.

Vertebrate en invertebrate beskik oor verskeie kliere wat sekere chemiese stowwe vervaardig. Endokriene kliere stel hormone in die bloedstroom vry wat die liggaam se interne metaboliese prosesse reguleer. Eksokriene kliere is weer kliere wat buite die dier se liggaam voorkom, of wat intern voorkom met kanale wat buite die dier se liggaam open. Hulle funksie is om die dier se vel of liggaamsbedekking in 'n goeie kondisie te hou, of om semiochemiese verbindings te produseer. Daar is twee tipes eksokriene kliere, naamlik vetkliere en sweetkliere (Fig. 1.3). Beide hierdie tipes kliere het goed gedefinieerde strukture wat hoogs spesifieke chemiese verbindings produseer, berg, en vrystel. Die vrystelling van hierdie produkte gaan gewoonlik gepaard met spesifieke gedragspatrone waaruit die funksie van die vrygestelde chemiese verbindings afgelei kan word.<sup>23</sup>

Alle liggaamsafscheidings kan potensieel feromonale kommunikasiemiddels wees. Die primêre funksie van eksokriene kliere wat geassosieer is met die verteringstelsel, is die produksie van verteringschemikalieë, maar hierdie verbindings kan ook 'n sekondêre rol vervul en as feromone optree. Die androgeenaafgeleides  $5\alpha$ -androst-16-en-3-oon en  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ol wat in die speeksel van varkbere afgeskei word, is voorbeelde hiervan (Fig.1.1). Hierdie twee verbindings het feromonale werking deurdat hulle varksôe wat op hitte is lok, en veroorsaak dat die sôe 'n karakteristieke paringshouding inneem. Die twee verbindings is ook by krimpvarkies, *Atelerix frontalis*, gevind.<sup>24</sup>

Die produksie van urine is nie net een van die belangrikste meganismes van uitskeiding van metaboliese afval nie, dit dien ook as 'n bron van chemiese boodskappe vir baie organismes.

Urine verskaf 'n gedetailleerde beskrywing van 'n dier se interne fisiologiese toestand aan waarnemers in die omgewing. Dit skep dus die nodige basis vir ontwikkeling van gespesialiseerde semiochemiese sisteme.<sup>25</sup> Navorsing is al gedoen in verband met die feromonale rol wat urine in baie spesies speel. Die vlugtige verbindings is hoofsaaklik afkomstig van die voorhuidkliere.

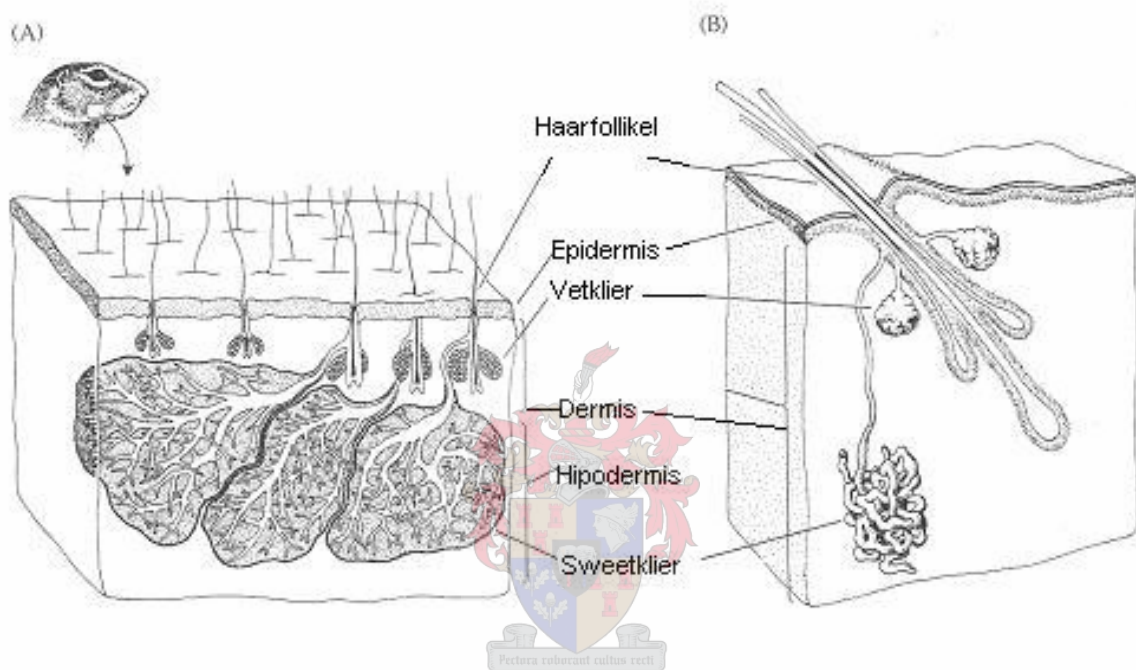


Fig. 1.3: Huidkliere in soogdiere. (A) Mongoolse woestynmuis, *Meriones unguiculatus*, se wangklier. (B) Mens se vel.<sup>26</sup>

Hierdie kliere stel hulle afscheidingsprodukte vry in die urine *via* 'n kanaal wat aansluit naby die urinebuis se opening.<sup>27</sup> Urine as medium vir semiochemiese kommunikasie is veral belangrik by die regulering van sosiale interaksies by knaagdiere. Die urine van volwasse manlike muis bevat hoë konsentrasies vlugtige komponente, onder andere (*R,R*)-3,4-dehidro-*ekso*-brevikomien (DB), (*S*)-2-*sek*-butiel-4,5-dihidrotiasool (BT), (*E,E*)- $\alpha$ -farneseen, (*E*)- $\beta$ -farneseen en 6-hidroksi-6-metiel-3-heptanoon (Fig. 1.1). Hierdie urinêre verbindings van muismannetjies dien as afsetterferomone wat hoofsaaklik die voortplantingstadia van die wyfies reguleer om by hul sosiale omstandighede aan te pas.<sup>5</sup>

Mikroorganismes is nog 'n bron van vlugtige chemiese verbindings by sommige diere. Klein voue of holtes in die vel wat vog of urine kan terughou, verskaf die ideale kondisies vir bakteriële groei. Bakterieë metaboliseer van die dier se afscheidingsprodukte en produseer weer op hul beurt 'n hele aantal verskillende vlugtige metaboliese afvalprodukte, waarvan sommige optree as feromone.<sup>28</sup>

#### 1.2.4 Vrstelling van semioverbindings

Diere maak gebruik van verskeie metodes om semiochemiese verbindings vry te stel. Die metode word bepaal deur die viskositeit van die afscheidingsproduk, die posisie van die klier op die dier se liggaam, en die ontvanger van die chemiese boodskap.

Vloeibare afscheidings, soos die afweerstowwe van sekere insekte, byvoorbeeld, kan vrygestel word as 'n kort kragtige stroom, en kan gerig word na 'n spesifieke individu of teiken. Alarm-, bedreigings-, en verdedigingsferomone word tipies op hierdie manier uitgeskei deur miere, muishonde en bombardeerkewers. Urinerig word op dieselfde wyse beheer en gerig deur, byvoorbeeld, die Bengaalse tier. Urine kan gebruik word om spesifieke areas in 'n dier se territoriale gebied te merk, soos by knaagdiers, katspesies en honde. Vloeibare afscheidings kan ook stadig in die lug afgeskei word, soos die seksferomone wat verskeie insekspesies gebruik om lede van die teenoorgestelde geslag te lok.<sup>29</sup>

Nie-vloeibare afscheidings moet afgevyf of afgesmeer word op 'n spesifieke oppervlakte. Voorbeelde hiervan is die smeer van preorbitale afscheidings op takkies deur verskeie bokspesies; en die merk van klippe met feromonale klierafscheidings deur sekere akkedisse. Baie diere smeer vetklierafscheidings oor hul eie liggame. Die fisiese en chemiese eienskappe van die substraat waarop die afskeiding gedeponeer word, soos die oppervlak, poreusheid en chemiese polariteit, beïnvloed die tempo waarteen die boodskap vrygestel word en die leeftyd van die sein. Omgewingsfaktore wat ook die seinleefyd affekteer is humiditeit, temperatuur, wind en sonlig.<sup>30</sup>

Spesifieke strukture en gedragpatrone word gebruik om chemiese boodskappe oor te dra. Hare speel dikwels 'n gespesialiseerde rol om reuk te versprei en kan byvoorbeeld gebruik word as 'n borsel om afscheidings op voorwerpe te deponeer, of kan aangepas wees met 'n growwe oppervlakte om as substraat vir die chemiese verbindings op te tree. Gedragpatrone wat die



verspreiding van chemiese boodskappe versterk is, onder andere, die oordrag van afscheidings na die dier, waarna die stert deur die lug gewaai word in die rigting van die teiken-individu.<sup>31</sup>

### 1.2.5 Waarneming van semioverbindings

Die basiese meganisme vir die waarneming van chemiese seine is dieselfde in die geval van 'n reseptor in 'n eensellige organisme en vir reseptore in sensoriese organe wat uit 'n aantal selle saamgestel is. Waarneming vind plaas wanneer 'n stimulusmolekuul tydelik bind aan 'n spesifieke proteïenreseptormolekule in 'n sel, of in 'n chemosensoriese orgaan. Die reseptorproteïen verander van vorm of sy chemiese samestelling verander en die veranderings inisieer biochemiese prosesse in die sel. Die intensiteit van die respons neem toe soos die konsentrasie van die stimulusmolekules toeneem en daar 'n groter aantal molekules aan reseptorproteïene bind. In meer gevorderde chemosensoriese organe is die reseptorproteïene geleë in die membrane van gespesialiseerde sensoriese selle. Die chemiese- of vormverandering van die proteïen depolariseer die sel. Depolarisasie beïnvloed die geleiding oor die selmembran, wat 'n senuwee-impuls genereer.

Chemosensoriese selle is gemodifiseerde silliaselle of mikrovilliselle. Die sillia- of die mikrovilliselle strek tot buite die reseptorsel en maak direk kontak met die eksterne omgewing. Hulle verskaf 'n groot membraanoppervlakte waar die binding met stimulus-molekules kan plaasvind. Silliaselle kom hoofsaaklik voor in die olfaktoriese organe van vertebrate, terwyl mikrovilliselle hoofsaaklik in die smaak- en ander kontakreseptore voorkom. Senuwees van die chemosensoriese selle is versamel in 'n ganglion of olfaktoriese lob. Hier vind sommasie- en inisiasie-prosesse van die sensoriese invoer plaas, voordat die sein na die brein gestuur word.<sup>32</sup>

Die meeste gewerweldes besit 'n addisionele chemosensoriese orgaan, wat die vomeronasale orgaan (VNO), of die Jacobson-orgaan, genoem word. Voëls, krokodille, en sekere akkedis-, akwatiese soogdier- en aapspecies het nie 'n vomeronasale sisteem nie, terwyl visse se olfaktoriese- en vomeronasale sisteme nie van mekaar geskei is nie. Die gepaarde vomeronasale organe is by ander gewerweldes van die hoof olfaktoriese orgaan geskei. In die meeste spesies word hulle omsluit in 'n kapsule, wat gevorm word deur die vomero-kraakbeen. By soogdiere kom hulle voor binne 'n lob aan beide kante van die basis van die neusseptum. Die vomeronasale lumen is gedeeltelik bedek met chemosensoriese vomeronasale dekweefsel.



Hierdie dekweefsel bevat bipolêre sensoriese neurons soortgelyk aan dié in die hoof olfaktoriese epiteellaag, met mikrovilli op die neurons se blootgestelde oppervlakte. Vomeronasale reseptormolekules beskik oor die vermoë om met spesifieke stimulusmolekules te bind.

Soogdiere se VNO bestaan uit 'n verlengde buis wat *via* 'n kanaal uitmond in die vloer van die neusholte in die geval van onder andere knaagdiere en mense, of in die nasopalatienkanaal, ook genoem Stenson se kanaal, in die geval van, onder andere, karnivore, unguulate en sekere primaatspesies (Fig. 1.4).

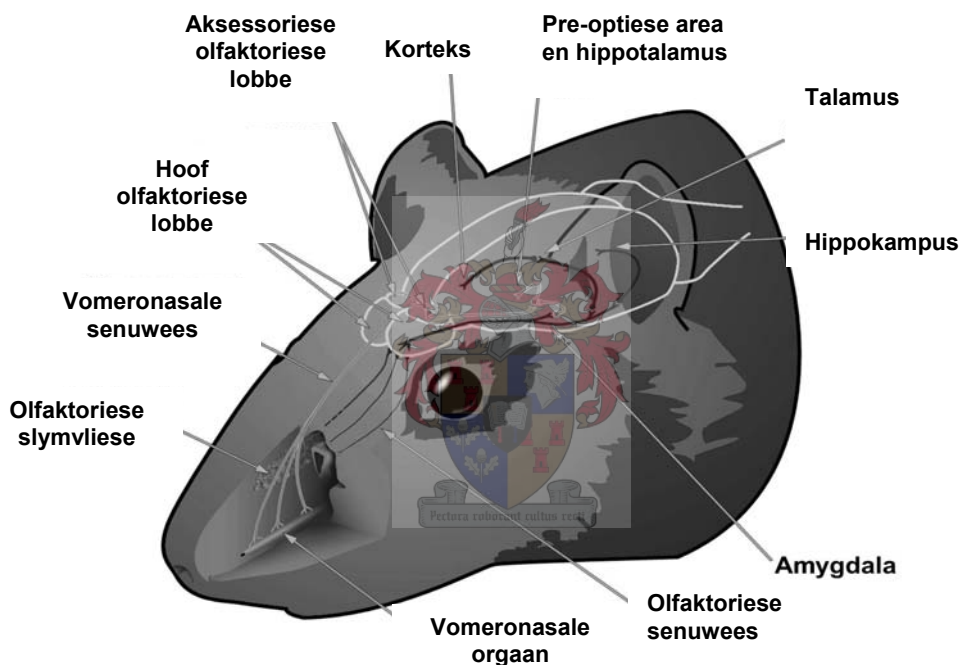


Fig. 1.4: Die vomeronasale sisteem.

Die nasopalatienkanaal is 'n deurweg tussen die verhemelte en die neus- en mondholties, sodat in die geval van die tweede groep spesies, stimuli die VNO bereik deur die neus of die mond. Die vomeronasale sensoriese neurons is hoogs selektief vir spesifieke verbindings teen baie lae konsentrasies, net soos die gespesialiseerde feromoon-sensoriese selle van insekte.<sup>33</sup>

Olifante dra chemosensoriese stimuli oor na die nasopalatienkanaal deur gebruik te maak van die meganosensoriese "vinger" aan die punt van die slurp.<sup>34</sup> By die meeste spesies word die

toegang van stimulusmolekules na die reseptors gereguleer deur 'n outonomies beheerde vaskulêre pompmeganisme.<sup>33</sup> Sekere ungulate (perde, beeste, bokke) en sommige karnivore (katspesies) vertoon sogenaamde "flehmen" gedrag. Die dier lig sy kop, krul die bo-lip terug en steek sy tong uit (Fig. 1.11). Flehmengedrag help om toegang van stimulusmolekules tot die reseptor-epiteellagie te bevorder.<sup>35</sup>

Volgens definisie bestaan die reuksintuig uit die neus en nasale slymvliese wat vlugtige verbindings kan waarneem. Daarvolgens is die VNO nie deel van die reuksintuig nie, maar deel van 'n groter chemosensoriese sisteem wat voorkom by soogdiere. Die VNO kan groot molekules waarneem wat nie baie vlugtig is nie en dus nie deur die neus waargeneem kan word nie. 'n Voorbeeld hiervan is molekules wat gebruik word om inligting oor die seksuele identiteit van 'n dier oor te dra.<sup>36</sup> Die VNO is egter nie slegs 'n feromoonreseptororgaan nie, maar neem ook baie ander chemiese verbindings waar.<sup>37</sup>

## **1.3 Verhouding tussen Struktuur en Funkisionaliteit**

### **1.3.1 Beperkings op chemiese boodskappe in chemiese kommunikasie**

'n Wye verskeidenheid chemiese verbindings, almal organiese verbindings, word gebruik vir semiochemiese kommunikasie. Die molekules se chemiese samestelling hou verband met die manier waarop transmissie plaasvind, en of die boodskap deur middel van diffusie, 'n lug- of waterstroom, of direkte kontak oorgedra word.

Semiochemiese verbindings wat in die lug vrygestel word, moet vinnig verdamp, en dus vlugtig wees.<sup>38</sup> 'n Molekule se vlugtigheid is afhanklik van sy molekulêre grootte, sowel as sy chemiese samestelling. Die boonste limiet vir feromone wat in die lug vrygestel word is ongeveer 300 Da. Die oorgrote meerderheid van feromone wat lug as 'n verspreidingsmedium gebruik, bestaan uit 5–20 koolstofatome. Molekules wat in hierdie grootte-orde val, toon groot variasie in die vorm, grootte en verskeidenheid van funksionele groepe. Dit raak uit 'n energie-oogpunt duur vir die organisme om die groot molekules te vervaardig. Groter molekules is ook te groot vir diffusie om effektief plaas te vind. Hierteenoor kom feromone met minder as 5 koolstofatome min voor omdat hulle uiters vlugtig is en dus slegs vir die oordrag van seine met 'n kort leeftyd geskik is. Hulle bied ook te min moontlikhede vir strukturele variasies vir spesie-spesifieke kommunikasie. Feromone toon groot variasie met betrekking tot die posisie van

funksionele groepe, die posisie van dubbelbindings, en die teenwoordigheid van sikliese strukture en vertakkings. Stikstof- en swawelatome kom algemeen in feromone voor. Die invloed van hierdie variasies op 'n molekule se molekulêre massa is meestal betreklik gering. Dit mag egter 'n groot invloed op die vorm en die grootte van die molekule hê en affekteer dus die manier waarop die molekule deur reseptorselle waargeneem word.<sup>39</sup>

Alhoewel die hoofbeperking op chemiese seine bepaal word deur die fisiologiese samestelling van sensoriese organe, kan eienskappe van semiochemiese seine verander word deur die diffusieparameters van die chemiese verbinding te verander teen relatiewe lae energetiese koste. 'n Verbinding se vlugtigheid, wat 'n funksie van sy molekulêre massa en chemiese samestelling is, bepaal byvoorbeeld grootliks hoe lank die chemiese sein aktief bly en watter verspreidingspatroon dit in sy omgewing sal aanneem. Verskeie eienskappe van chemiese boodskappe, insluitend verspreidingsarea, lokaliseerbaarheid, intensiteit en waarneembaarheid, asook informatiewe inhoud, is aangepas vir spesifieke sosiale funksies. Die omgewing waarin die sein blootgestel word, vereis verdere aanpassings van die sein. Gewoonlik help hierdie aanpassings om die energetiese koste vir die dier wat die boodskap uitstuur, te verlaag. As natuurlike seleksie die strukturele eienskappe van chemiese boodskappe optimiseer vir spesifieke kommunikasiefunksies, behoort dit moontlik te wees om chemiese seine se fisiese eienskappe te voorspel op grond van hulle sosiale funksies. Daar kan byvoorbeeld voorspel word dat alarmferomone van mierspesies baie vlugtig moet wees sodat hulle nie vir lank in die omgewing bly nadat hulle hul betrokke funksie verrig het nie. Dit is dan ook die geval by sekere mierspesies.<sup>40</sup> Aan die ander kant moet territoriale reukmerke relatief nie-vlugtige verbindings wees, wat nie maklik deur heersende atmosferiese toestande gedegradeer kan word nie. Die semiochemiese boodskap sal dan lank nadat die reukmerk agtergelaat is, steeds gedetailleerde inligting oor die individu se identiteit, sosiale status, en voorplantingstoestand kan verskaf. Natuurlike seleksie bevoordeel die gebruik van kommunikasiestrategieë waar effektiewe seinoordrag plaasvind, sowel as strategieë wat minimale energetiese koste vereis. Een van die unieke eienskappe van chemiese seine is dat verskillende lengtes van seinleef tyd geselekteer kan word. Sodanige seleksie kan inwerk op die chemiese eienskappe van die feromone soos vlugtigheid en stabiliteit, wat die sein 'n leeftyd van 'n paar sekondes tot 'n paar jaar kan gee. In Fig. 1.5 word 'n vergelyking van molekulêre massas van seksferomone, individuele herkenningsferomone en territoriale reukmerkferomone vir vyf ordes soogdiere gegee.

In elke orde is die molekulêre massas van seksferomone die laagste, gevolg deur herkenningsferomone, met territoriale reukmerkferomone wat die hoogste molekulêre massas besit. Omdat die eienskappe van chemiese boodskappe in ruimte en tyd beïnvloed word deur omgewingsfaktore, is die meganisme waardeur die struktuur aangepas word afhanklik van die omgewing waarin die boodskap oorgedra word. Die primêre faktore wat die eienskappe van chemiese seine beïnvloed, is temperatuur, humiditeit en wind. Oor die algemeen verhoog hoë temperatuur en hoë humiditeit die verdampings- en diffusietempo, wat veroorsaak dat die chemiese boodskap vinniger versprei en die seinleefyd verkort word.<sup>41</sup>

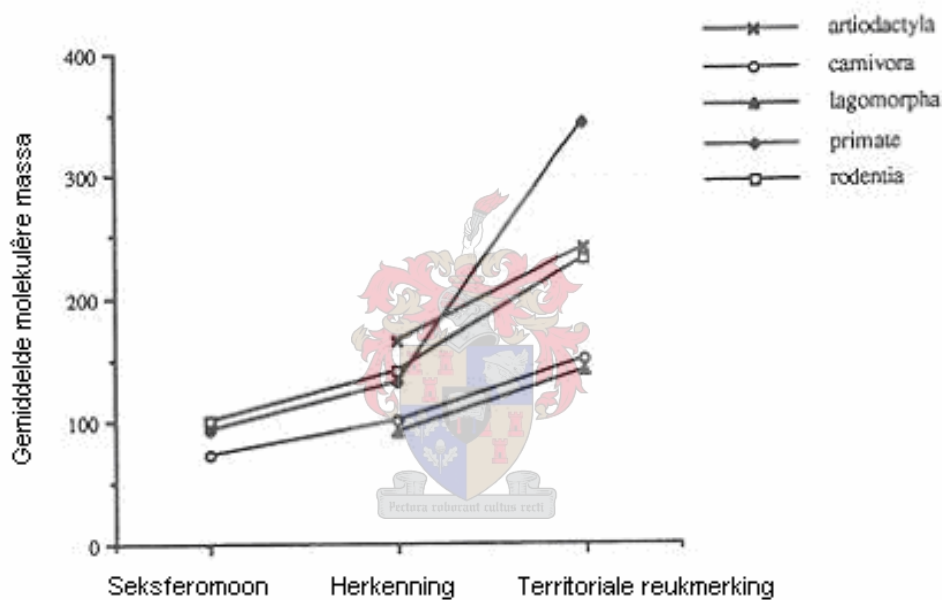


Fig. 1.5: Vergelyking van molekulêre massas van verskillende tipes feromone.<sup>41</sup>

### 1.3.2 Vereistes vir effektiewe oordrag van inligting

Chemiese kommunikasie word bespreek vir twee breë groepe seinstrategieë, naamlik:

- Territoriale reukmerkferomone, wat vrygestel word in die omgewing om later waargeneem te word in die afwesigheid van die afsender van die boodskap.
- Direk-vrygestelde feromone, seine wat direk vrygestel word en waargeneem word deur die ontvanger in die teenwoordigheid van die afsender, byvoorbeeld seksferomone, alarmferomone en individuele- en groepsherkenningsferomone.

### 1.3.2.1 Territoriale reukmerkferomone

Territoriale reukmerkseine moet nie-vlugtige verbindings met lae vlugtighe (hoë kookpunte) wees, omdat hulle 'n lang seinleef tyd moet hê om die boodskap oor te dra lank nadat die sender uit die omgewing wegbeweeg het. Klank- en visuele-seine, daarenteen, dra slegs die boodskappe oor terwyl hulle geskep word. In die geval van semiochemiese boodskappe wat as territoriale reukmerkseine optree, word die reukmerk met 'n spesifieke plek geassosieer. Territoriale reukmerke se seinleef tyd is baie langer as enige ander semiochemiese seine, en is dus meer onderworpe aan degradasie as gevolg van verlengde blootstelling aan son, wind en ander omgewingsfaktore. Om die seinleef tyd te verhoog, moet territoriale reukmerke beskerm word teen chemiese degradasie sowel as verlies van vlugtige verbindings.

Diere wat groot territoriale gebiede het wat hulle moet afbaken, maak gebruik van fikseermiddels om die vlugtige verbindings se seinleef tyd te verleng. Op dié wyse neem die frekwensie waarteen die dier sy gebied moet merk af, en word sy energetiese insette laer. Semiochemiese seine kan op verskillende maniere aangepas word om die seinleef tyd te verleng, sonder om die vlugtigheid van die verbindings te verander, of die hoeveelheid afskeiding te verhoog. Een strategie wat veral deur soogdiere gebruik word, is die insluiting van 'n draercomponent by die afskeiding waardeur die verdampingstempo van die vlugtige verbindings vertraag word. Sebum, 'n voorbeeld van so 'n draercomponent, is 'n lipiedryke stof wat deur die vetkliere vervaardig word. Langketting-verbindings wat in hierdie afskeiding voorkom, kan ook dien om die verdampingsproses te vertraag, soos byvoorbeeld skwaleen, wat in die afskeidings van baie spesies aanwesig is. Skwaleen word ook kommersieel as fikseermiddel in kosmetiese middels gebruik.<sup>41</sup>

In die urine van die meeste knaagdierspesies kom groot hoeveelhede proteïene voor. Heelwat navorsing is al gedoen in verband met die rol wat proteïene vervul in chemiese kommunikasie. Vlugtige semiochemiese verbindings bind met die proteïene teenwoordig in soogdierreukmerkafskedings, wat hulle seinleef tyd verleng deur stadige vrystelling. Die proteïene kan optree as draermolekules vir geassosieerde vlugtige verbindings, en onlangse navorsing het gewys dat die proteïene nie slegs draers is nie, maar ook 'n integrale deel van die muis se feromonale sisteem uitmaak.<sup>42</sup>

Ook deur die substraat waarop die chemiese sein agtergelaat word te verander, kan die afsender die leef tyd van die sein verander teen 'n baie lae energetiese inset. Die meeste

natuurlike substrate is nie absoluut inert nie en die oppervlakte, poreusheid en chemiese lading affekteer die tempo waarteen die sein vrygestel word.<sup>41</sup>

### 1.3.2.2 Direk-vrygestelde feromone

Semiochemiese boodskappe wat oor kort afstande gebruik word, verskaf gedetailleerde inligting oor identiteit, sosiale status en voortplantingstatus. Die verbindings moet dus oor genoegsame molekulêre diversiteit beskik om komplekse boodskappe te kodeer.

Seksferomone is vlugtige verbindings wat direk vrygestel word, om potensiële maats direk na mekaar te lok. Om hulle funksie effektief te verrig, moet hulle hoë diffusietempo's besit, sodat hulle maklik en vinnig waargeneem kan word. Insek-alarmeromone moet ook baie vlugtig wees sodat hulle nie aktief bly nadat die oorspronklike waarskuwingsfunksie uitgevoer is nie. Dit is ook die geval by sekere mierspesies.<sup>40</sup> Insek-alarmeromone se algemene funksie is om werkers op te roep na die gevaarsones, terwyl gewerweldes se alarmseine ook kan optree as dreigseine, en dikwels gebruik word om ander diere af te skrik. In die laaste geval moet 'n semiochemiese boodskap met 'n langer seinleef tyd gebruik word om 'n teenstander suksesvol af te weer.

'n Voorbeeld van die spesifieke aanpassing van 'n semiochemiese boodskap, word by die dwergmuishond aangetref. Beide anale- en wangklierafskeidings word deur dié dier vir reukmerkdoeleindes gebruik. Die anale klierafskeidings wat gebruik word om territoriale gebiede af te baken, is aktief vir tot 10 dae, terwyl die wangklierafskeidings wat gebruik word tydens dreigvertoning, slegs 1-2 dae aktief bly. Aggressieferomone het 'n kort leeftyd, slegs lank genoeg om aktief te wees terwyl die dier bedreig voel.<sup>43</sup>

Nog 'n ontwerpeienskap wat belangrik is, is die tyd wat dit vir die sein neem om maksimum sterkte te bereik. Dit is voordelig vir die organisme om die maksimum aantal ontvangers te bereik teen 'n minimum energie-inset. Vir seine wat direk uitgeskei word en wat aktief is binne 'n klein area, is die eenvoudigste oplossing om afskeidings te vervaardig met lae molekulêre massas en vinnige vrystellingstempo's wat slegs in die teenwoordigheid van die geteikende ontvanger vrygestel word. Vir sommige sekslokmiddels en die meeste herkenning- en alarmferomone, blyk dit die strategie te wees wat deur die meeste diere gebruik word. Om effektief te wees, moet afsenders van boodskappe verseker wees dat die afskeidings beskikbaar

sal wees as hulle benodig word. Wanneer afskeidings vatbaar is vir chemiese ontbinding, is dit nodig om die verbindings se stabiliteit binne die reukklier te verhoog. Hierdie strategie word veral deur reptielspesies gebruik. Vitamien E, 'n verbinding wat bekend is vir sy inhiberende effek op lipiedoksidase, kom byvoorbeeld in beide die keel- en parakloakkliere van die Amerikaanse krokodil, *Alligator mississippiensis*, voor.<sup>44,45</sup>

Groter molekules besit oor die algemeen meer komplekse molekulêre strukture, en kan dus meer inligting oordra as kleiner molekules. Groter molekules is egter nie baie vlugtig nie, en dit maak hulle moeilik waarneembaar. Deur die vrystelling van kleiner, vlugtige molekules saam met die minder vlugtige groot molekules, word die ontvanger van die sein gelei in die rigting van die boodskap. As die ontvanger die bron van die sein bereik, word gedetailleerde inligting deur die groter molekules oorgedra. Hierdie meganisme word byvoorbeeld in die semiochemiese kommunikasiesisteem van goue hamsters gebruik. Die vlugtige verbinding wat die mannetjies na die wyfies lok, is dimetioldisulfied. Sodra die mannetjies kontak maak met die wyfies, word 'n tweede, minder vlugtige proteïenverbinding waargeneem wat paring induseer.<sup>46</sup> 'n Energeties voordelige manier om 'n boodskap se inligtingsinhoud te verhoog, is deur lae molekulêre massa molekules te gebruik wat produkte is van anaerobiese mikrobiële werking.<sup>47</sup> Die klam, warm voue en holtes op diereliggame is ideale omgewings vir die groei van mikroörganismes. Die anale sakke van die Indiese muishond bevat byvoorbeeld 'n reeks van ses vlugtige karboksielsure wat bakteriële fermentasieprodukte is.<sup>48</sup> Hierdie ses karboksielsure kom in verskillende konsentrasies by individuele diere voor, en maak individuele herkenning moontlik. Alhoewel die muishonde dieselfde substrate vir bakteriële fermentasie produseer, word hulle gekoloniseer deur verskillende bakteriële flora wat unieke reuke skep.

## 1.4 Die Bengaalse Tier, *Panthera tigris tigris*

Die Bengaalse tier is 'n majestueuse dier (Fig. 1.6), en al word hy gevrees vir party van sy eienskappe, word hy bewonder vir sy krag, spoed, en sy pragtige voorkoms. Schaller<sup>49</sup> het geskryf: *"Like all cats, the tiger presents a violent contrast between gentleness and courage, shyness and persistence. To see a tiger striding on velvety paws across a meadow of yellow grass, with the fading rays of the setting sun harmonizing with its tawny, black-striped coat –*



*self-assured, a picture of barely contained power, yet lithe grace, the very symbol of physical beauty, strength and dignity – is surely one of the greatest aesthetic experiences in nature."*



Fig. 1.6: Die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris*<sup>§</sup>

#### 1.4.1 Algemene beskrywing

Die tier is die grootste van al die Felidae. Hy het 'n kragtige en gespierde liggaamsbou, en is goed ontwikkel om sy prooi te bekruip. Sy gestreepte pels laat hom toe om onsigbaar te word teen 'n groot verskeidenheid agtergronde. Die tier se streeppatrone is so uniek aan elke individu soos wat vingerafdrukke by die mens is. Die kleur van sy pels varieer van 'n oranje-rooi

---

<sup>§</sup> Fotograaf onbekend



tot 'n geelbruin kleur. Tiere wat in meer noordelike areas voorkom, is groter en hulle het dikker pelse met 'n ligter kleur. Hoe verder suid die tiere voorkom, hoe kleiner is hulle, met dunner, donkerder gekleurde pelse. Die tier se wange, keel, onderlyf en die binnekante van sy ore en bene is wit. Die agterkante van sy ore is swart met 'n opvallende wit kol in die middel van die oor.<sup>50</sup> Die gemiddelde groottes van die Bengaalse tier word opgesom in Tabel 1.2. As al die wêreld se katte met mekaar vergelyk moet word, is die Siberiese tier die grootste, die Bengaalse tier die tweede grootste, gevolg deur die Afrika leeu.

**Tabel 1.2: Grootte van die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris***

<i>Panthera tigris tigris</i>	Massa (kg)		Totale lengte (m)		Skouerhoogte (m)	Stertlengte (m)
	Mannetjie	Wyfie	Mannetjie	Wyfie		
	180-258	100-160	2.7 – 3.1	2.4 – 2.65		

#### 1.4.2 Verspreiding en Habitat

Die tier kom voor in 'n groot verskeidenheid habitate: vanaf die tropiese immergroen woude van Suid-Asië tot die dennewoude van Sibirië. Bengaalse tiere kom hoofsaaklik voor in die woude in die sentrale en suidelike dele van Indië, die Terai-Duar graslande, die mangrove-moerasse van die Sundarbands en in die grasvlaktes aan die voet van die Himalaja-gebergtes, asook in die woude van Bhutan. Die groot geografiese verspreiding van die tier impliseer 'n besondere aanpasbaarheid by verskillende omgewingstoestande.<sup>51</sup> Die drie basiese ekologiese vereistes vir die ideale habitat vir 'n tier is 'n vorm van digte beskutting, volop prooi en toegang tot water. Uiterste temperature kan maklik weerstaan word.<sup>52</sup> Fig. 1.7 wys die verspreiding van die verskillende tierspesies oor die wêreld.

#### 1.4.3 Dieet

Tiere is heel bo aan die voedselketting. Hulle is opportunistiese jagters, en maak jag op enige beskikbare prooi. Hul dieet bestaan hoofsaaklik uit groot soogdiere, soos varke, bokke, buffels en soms olifant- en renosterkalfies. In uitsonderlike gevalle sal tiere selfs diere soos

luiperds, voëls (hoofsaaklik poue en fisante), krokodille, skilpaaië, rotte, paddas en visse eet. Tiere sal slegs jag maak op hierdie diere indien daar geen ander beskikbare prooi is nie. Die tier se natuurlike prooi se getalle het so drasties verminder in die laaste jare, dat mak diere, onder andere beeste, bokke en selfs honde, ook gereeld deur die tier gejaag word.

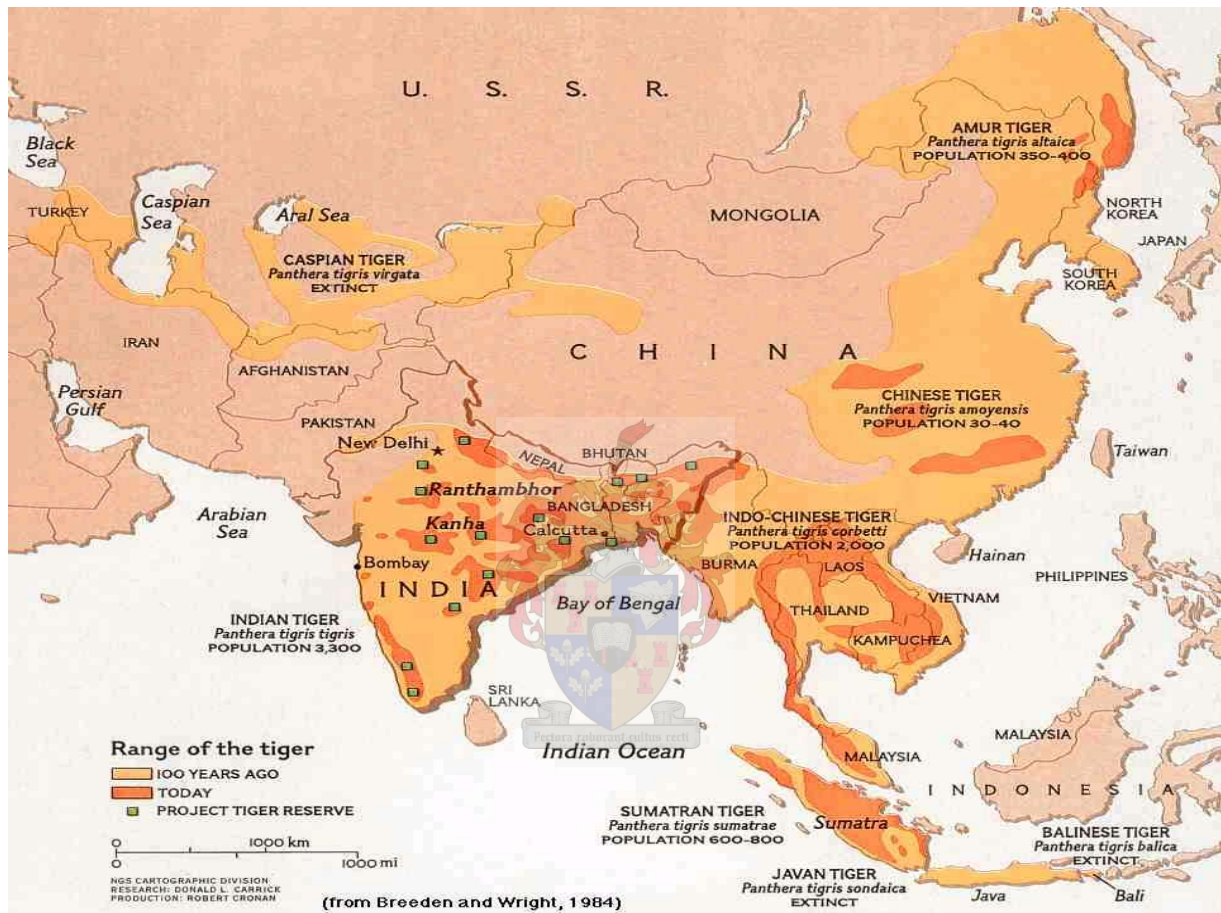


Fig. 1.7: Verspreiding van die verskillende tierspesies oor die wêreld.<sup>53</sup>

#### 1.4.4 Voortplanting

Tiere het nie 'n definitiewe paarseisoen nie en paring vind dwarsdeur die jaar plaas, hoewel die mees algemene tydperk vanaf die einde November tot vroeg in April is. Gewoonlik word 2 tot 3 welpies elke 2 jaar gebore. Dragtyd is 104–106 dae en tierwyfies skenk geboorte in grotte, digte vegetasie of rotsagtige skuilings.<sup>50</sup> Indien al die welpies sterf, kan 'n tweede werpsel

binne 5 maande gebore word. In die meeste gevalle kan estrus beheer word, en sal 'n tier nie op hitte kom terwyl haar welpies nog afhanklik van haar is nie.

#### 1.4.5 Lewensverwagting

In hul natuurlike omgewing kan tiere 10–12 jaar oud word, terwyl tiere in gevangenskap 'n ouderdom van tussen 18 en 22 jaar kan bereik. Hierdie verskille kan aan verskeie faktore toegeskryf word, onder andere aan die stryd om oorlewing van die wilde tier in die natuur; die druk wat geplaas word op die tier deur die groeiende menslike bevolking; en die beskikbaarheid van veeartsenykundige sorg vir tiere in gevangenskap in tye van siekte.

Die oorgrote meerderheid wilde, volwasse tiere sterf deur menslike toedoen. Hulle word geskiet, in strikke gevang, of vergiftig. In uitsonderlike gevalle kan 'n tier noodlottig gewond word deur buffels, wilde varke of olifante. Die grootste rede vir die afname in die tier se getalle is die verlies aan habitat en die verlies aan natuurlike prooi wat daarmee gepaard gaan.<sup>54</sup>

#### 1.4.6 Gedrag en Kommunikasie

Tiere het spesifiek afgebakende gebiede. Die grootte van individue se gebiede varieer drasties en is afhanklik van die beskikbaarheid van prooi, die tipe habitat waarin die tier homself bevind, asook die geslag en ouderdom van die tier.<sup>50</sup> Individue patrolleer nie hul gebiede daaglik nie, maar die gebied word besoek oor 'n periode van 'n paar dae of weke en word gemerk met urine en ontlasting. Die grootte van Indiese tiere se gebiede varieer tussen 200 en 1000 km<sup>2</sup>, hoewel territoriale gebiede van 64 km<sup>2</sup> tot so groot soos 9252 km<sup>2</sup> ook al aangeteken is.<sup>55</sup> Mannetjies se gebiede oorvleuel met 'n hele aantal wyfies s'n. 'n Manlike tier laat geen ander mannetjies toe om sy gebied te betree nie. Tierwyfies merk ook hul gebiede, maar anders as mannetjies sal hulle nie hul gebiede verdedig nie.<sup>56</sup>

Tiere is oor die algemeen alleenlewende diere, behalwe vir die interaksie tussen die welpies en hulle ma. Dit gebeur soms dat individue wat naby mekaar woon, sosiale gedrag vertoon. Vir tiere is dit meer lonend om alleen te jag, en dus vorm hulle normaalweg nie sosiale groepe soos wat by leus gesien word nie.

Anders as die meeste katspesies het tiere geen vrees vir water nie, en kan hulle baie goed swem (Fig. 1.8). Tydens die warm Indiese somers lê hulle dikwels half-lyf in mere en damme op

die warmste tyd van die dag. In die Ganges-Brahmaputra mangrove-delta van die Sundarbans in Indië en Bangladesh, word gereeld gesien dat hulle in strome en riviere swem.<sup>57</sup> Tieraanvalle op mense is baie raar, maar vind tog plaas. Die toename in die menslike bevolking in Asië lei daartoe dat veral houtkappers, vissers, heuningversamelaars en boere in tere se natuurlike habitat inbeweeg. Dit veroorsaak toenemende konflik tussen tere en mense. Oor die algemeen is dit die tere wat sieklik, beseer of oud is, wat nie in staat is om hul gewone prooi te vang nie, wat op mense jagmaak.<sup>53</sup>

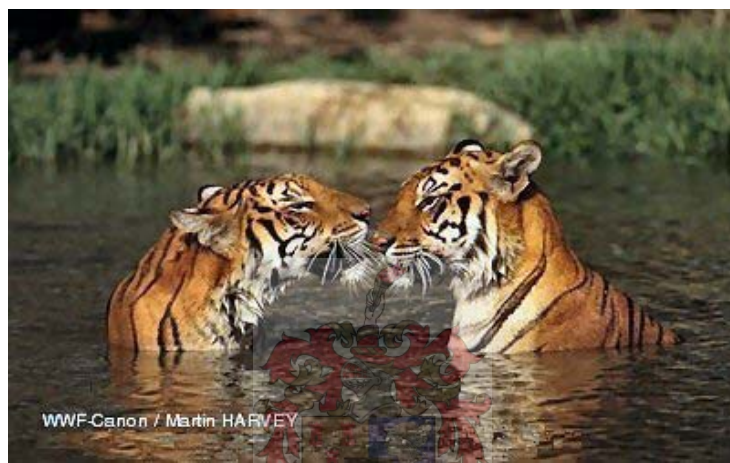


Fig. 1.8: Bengaalse tere wat in die water speel.

#### 1.4.7 Semiochemiese kommunikasie by tere

Daar is vyf verskillende geassosieerde gedragpatrone wat tere gebruik vir semiochemiese kommunikasie, naamlik die sproei van 'n reukmerkvlloeistof wat bestaan uit 'n mengsel van urine en 'n klierafskeiding (Fig. 1.9); die laat van skraapmerke op die grond wat gepaard gaan met merking met fekale- en anale sakafskeidings; die laat van krapmerke ("clawing") op voorwerpe (Fig. 1.10); wang-vryfgedrag; en die platdruk van vegetasie. Eersgenoemde twee gedragpatrone is die belangrikste vorms van reukmerking by tere.<sup>58</sup> Die gedragspatroon waarin tere die reukmerkvlloeistof in 'n opwaartse rigting sproei om hulle gebied af te baken, is vir die eerste keer deur Locke<sup>59</sup> in 1954 opgeteken en is in 1967 baie goed deur Schaller<sup>60</sup> beskryf (Fig. 1.9). Beide geslagte baken hul gebiede af deur hierdie urine- en klierafskeidingmengsel op bome en bosse te spuit. Dit bestaan uit 'n emulsie van helder, geel urine en 'n vetterige, wit komponent.



Die reukmerkvlloeistof het 'n definitiewe muskusreuk.<sup>61</sup> Hierdie olfaktoriese sein word nie net gebruik om gebiede af te baken nie, maar ook om individue te identifiseer.<sup>62</sup> Tere wat op die reukmerk afkom, gaan staan en vertoon Flehmengedrag soos beskryf deur Leyhausen<sup>63</sup> (Fig. 1.11). Die meeste reukmerking vind plaas by die grense van die tere se gebiede. Wanneer tierwyfies op hitte kom, neem die frekwensie van reukmerking toe in beide geslagte.<sup>57</sup>



Fig. 1.9: Bengaalse tier sproei sy reukmerkvlloeistof.



Fig. 1.10: Krapmerkgedrag.

Tiere kies spesifieke bome en bosse uit om te reukmerk. Smith et al.<sup>57</sup> het drie-en-dertig tere in die Koninklike Chitwan Nasionale Park in Nepal bestudeer. Hulle het gevind dat spesifieke bome en bosse waarskynlik gekies word op grond van die grootte van die boom of bos en die hoek waarteen die plante leun. Die reukmerk word gesproei op die beskutte onderkant van die leunende boom of bos. Bramachary en Dutta glo tere selekteer hierdie spesifieke bome en bosse om die reukmerk teen reënval te beskerm.<sup>64</sup>



Fig. 1.11: Bengaalse tiere wat Flehmengedrag vertoon.

Die platdruk van vegetasie, skraap- en wang-vryfgedrag dra slegs 'n klein persentasie tot reukmerking by. Die rol wat hierdie gedragpatrone in reukkommunikasie speel, is nie baie duidelik nie, maar die belangstelling wat tiere in hierdie merkplekke toon, dui daarop dat hierdie gedrag wel 'n rol speel in kommunikasie tussen tiere.<sup>57</sup> Reiger<sup>65</sup> reken wang-vryfgedrag is nie 'n vorm van reukmerking nie, maar dat dit eerder die dier toelaat om reuke van individue waarmee hy in aanraking kom, beter waar te neem en te leer ken.

#### 1.4.7.1 Model vir reukmerkgedrag

Smith et al.<sup>57</sup> het die volgende model vir reukmerkgedrag in katspesies voorgestel: Elke keer as individue van dieselfde geslag mekaar raakloop ontstaan die moontlikheid vir besering. Die waarskynlikheid om 'n bepaalde individu raak te loop in 'n spesifieke area is 'n funksie van die lokale digtheid en ouderdom van daardie individu se reukmerke. Dus kan 'n dier die moontlikheid van besering evalueer op grond van die intensiteit van die lokale reukveld. As 'n spesifieke deel van die dier se gebied moeilik bereikbaar is, of nie baie hulpbronne het nie, sal die dier dié gebied minder besoek en daardie deel van sy gebied minder reukmerk. Ander individue sal dus kan aflei dat die risiko om die eenaar van die gebied raak te loop, skraal is. Die voordeel wat behaal kan word deur 'n spesifieke area te betree, kan dus opgeweeg word teen die risiko van besering en die tyd wat die dier verwyder gaan wees van ander hulpbronne, sowel as die afstand wat afgelê moet word. Indien die moontlikheid om 'n ander tier raak te loop, en dus die risiko van besering groter is as die voordele wat die gebied inhou, kan die dier besluit om die gebied liever te verlaat.<sup>57</sup>

#### 1.4.7.2 Reukmerk- en territoriale gedrag

Smith<sup>57</sup> se navorsing bevestig die hipotese dat reukmerking 'n rol speel in die vestiging en instandhouding van tiere se individuele gebiede. Die verdediging van individue se gebiede kan óf direk plaasvind, deur byvoorbeeld 'n geveg tussen tiermannetjies, óf deur middel van indirekte gedrag wat onder andere chemiese en visuele merke insluit.<sup>66</sup> Alhoewel direkte konfrontasie lei tot 'n verandering in territoriale gebiede by tiere, blyk reukmerking die primêre metode te wees vir die vestiging en instandhouding van territoriale grense.

Die reukmerkgedrag kan volgens Leyhausen<sup>67</sup> slegs geïnterpreteer word as 'n territoriale verdedigingsmeganisme indien daar waargeneem word dat 'n potensiële indringer die olfaktoriese sein opmerk en dan die gebied verlaat. Schaller<sup>68</sup> is egter van die opinie dat reaksies op die sein vertraag is, en dat die waarneming van 'n onmiddellike reaksie dus nie as 'n akkurate maatstaf dien vir die rol wat die reukmerk speel nie. 'n Alternatiewe hipotese is dat die reukmerke inligting verskaf oor die fisiese krag van die teenstaander.<sup>69</sup>

#### 1.4.7.3 Pro-estrus reukmerkgedrag

Die toename in frekwensie waarteen reukmerking plaasvind voor tierwyfies in estrus is, in vergelyking met wanneer wyfies in estrus is, dui daarop dat die pro-estrus reukmerking die begin van estrus aandui. Choudhury,<sup>70</sup> Kleiman<sup>71</sup> en Brahmachary<sup>72</sup> het in afsonderlike ondersoeke op wilde en mak tiere gevind dat tiere meer gereeld reukmerk in die pro-estrus stadium en reukmerking dan staak sodra paring plaasgevind het. Tierwyfies adverteer hul teenwoordigheid sodra hul gereed raak om te paar. Shumake<sup>73</sup> het gevind dat rotmannetjies, *Rattus rattus*, die sterkste reaksie toon as hulle blootgestel word aan pro-estrus rotwyfie-urine. Soortgelyke eksperimentele toetse met tier-urine van pro-estrus en estrus wyfies kan die rol wat reukmerking speel in voortplantingsgedrag, help verklaar.

Tiermannetjies merk meer gereeld en teen 'n hoër frekwensie in die maande wanneer tierwyfies op hitte is. In die teenwoordigheid van 'n wyfie, is tiermannetjies meer gesteld op moontlike teenstaanders as om nog 'n wyfie te lok. Schaller<sup>68</sup> het gevind dat leemannetjies gewoonlik langs leeuwefies wat op hitte is, reukmerk. Die mannetjie vertoon die gedrag moontlik om sy eksklusiewe regte op die wyfie te adverteer.

#### 1.4.7.4 Vergelyking van reukmerkstrategieë

Tiere merk oral in hul gebiede, maar die mees intensiewe reukmerking vind plaas by hul territoriale grensgebiede. Verskeie studies<sup>74,75</sup> het gewys dat wolwe en jakkalse ook meer intensief reukmerk by hul territoriale grensgebiede, maar anders as die tiere wat in die Koninklike Chitwan Nasionale Park in Nepal bestudeer is, het die wolwe en jakkalse die totale grensgebied van hul territorium gereukmerk en so 'n tipe olfaktoriese poel geskep. Die verskille in merkpatrone is verwant aan hoe dig die vegetasie is. Tiere in Chitwan het vasgestelde roetes waarlangs hulle deur die digte bosse beweeg en vanwaar hulle hul prooi bekrui. <sup>58</sup> Tiere wyk selde af van hierdie vasgestelde roetes. Die areas waarin die meeste reukmerking voorkom, is waar hierdie roetes territoriale grense nader, en waar die waarskynlikheid om ander tiere raak te loop, hoog is. Hierdie konsentrasie van reukmerkseine op strategiese areas van territoriums is waarskynlik 'n algemene patroon vir reukmerking deur ander karnivore wat hulself ook in gebiede van digte plantegroei bevind, waar dit onekonomies is om die totale grense van hul habitat te patrolleer.

MacDonald<sup>76</sup> het gevind dat 'n groep rooijakkalse, *Canis mesomelas*, wat in 'n oop habitat geleef het, die totale buitengrens van hul gebied gemerk het. 'n Buurgroep jakkalse, wie se gebied gekarakteriseer is deur digte bosse wat moontlike toegangsroetes vir indringers beperk het, het slegs hul hoofbeweegroetes gereukmerk. Hierdie veelsydigheid in reukmerkgedrag wat omgewingsfaktore in ag neem, wys hoe belangrik vergelykende intraspesifieke studies is om 'n volledige begrip van gedragpatrone by diere te kry. Om die rol wat habitatstruktuur speel in die merkgedrag by die tier beter te verstaan, sal verdere navorsing gedoen moet word op die kommunikasie- en territoriale gedrag van tiere wat in oper, minder digte habitats voorkom.<sup>57</sup>

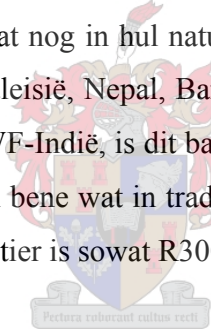
#### 1.4.8 Bewaring van tierspesies

Die tier is geklassifiseer as 'n bedreigde spesie deur die IUCN ("The International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources")<sup>77</sup>, en is ook geplaas op Appendiks 1 van die "Convention of International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora" (CITES). Die Bengaalse tier is een van die tiersubspesies wat die minste bedreig is, en wat die meeste in sy natuurlike habitat voorkom. Die ander subspesies ervaar groter druk vir oorlewing. Die Chinese tier, *Panthera tigris amoyensis*, is die mees bedreigde subspesie. Verder het daar in



die laaste honderd jaar reeds drie van die agt tiersubspesies uitgesterf. Hulle is die Javaanse tier, *Panthera tigris sondaica*, die Balinese tier, *Panthera tigris balica*, en die Kaspiese tier, *Panthera tigris virgata*.<sup>78</sup>

Die grootste bedreiging ten opsigte van die tier se oorlewing is die verlies van habitat, konflik tussen mense en tiere en onwettige stroopjagters.<sup>79</sup> Die toenemende druk op tiere se habitat en droogte bedreig hul voortbestaan. Die tier verloor sy habitat teen 'n skrikwekkende tempo. Hedendaagse tierhabitats strek oor van die mees digbevolkte gebiede in die wêreld. Die menslike bevolking in hierdie spesifieke areas vermeerder teen 'n groter tempo as die gemiddelde aanwastempo in die res van die wêreld. Teen die jaar 2002 was daar meer as een miljard mense in Indië.<sup>80</sup> Dit is een sesde van die wêreld se totale bevolking. Die groot konsentrasie mense op een plek plaas enorme druk op die natuurlike habitat van wilde diere. Die vernietiging van habitat veroorsaak 'n afname in tiergetalle, sowel as 'n afname in getalle van hul natuurlike prooi. Dit dwing die tier om in die ontwikkelde areas en plaasgebiede vir prooi te gaan soek. Gevolglik is konflik tussen mense en die tiere wat nog in hul natuurlike habitat voorkom aan die toeneem, veral in die Russiese Verre-Ooste, Maleisië, Nepal, Bangladesh, Sumatra (Indonesië) en Indië.<sup>53</sup> Volgens Ravi Singh, hoof van die WWF-Indië, is dit baie winsgewend om in tiere handel te dryf. Tiere word geskiet vir hul vel, pote en bene wat in tradisionele Chinese medisyne gebruik word, en as randafwerking aan baadjies. Een tier is sowat R300 000 werd.<sup>81</sup>



#### 1.4.8.1 Semiochemiese kommunikasie in die bewaring van katspesies

Katspesies is oor die algemeen uitstekende predatore en dit is dus belangrik vir bioloë en wildbewaarders om hulle populasiesyfers akkuraat te kan bepaal, om te weet watter effek hulle op die prooi in hulle omringende omgewing het, asook om dramatiese veranderinge in hulle getalle te monitor. Dis is egter feitlik onmoontlik om 'n direkte opname van katspesies se getalle te maak, omdat die meeste spesies naglewende en skugter diere is. Die metodes wat tans gebruik word is 'n kombinasie van eeu-oue tegnieke en die nuutste tegnologie.

'n Antieke tegniek wat tot vandag gebruik word, is om katte op grond van hulle spore uit te ken. Dit is egter selfs vir 'n bekwame spoorsnyer moeilik om individuele katte op dié wyse uit te ken, en akkurate bepalings van die bevolkingsdigtheid kan dus nie met hierdie metode verkry word nie. Skatologie is 'n moderne sensustegniek, waarin die ontlasting van diere versamel word en individue onderskei word *via* genustipering. Die tegniek is baie betroubaar, maar die

versameling van ontlasting kan 'n uitdaging wees. Kamerastrikke ("camera traps") wat op strategiese plekke in die diere se habitat geplaas word, en die neem van foto's van die diere, is 'n uitstekende metode om individue uit te ken. Vir die tegniek om suksesvol te wees, moet die bestudeerde gebied geografies en demografies geslote wees, wat beteken dat geen diere die gebied mag inkom of verlaat tydens die sensus nie. In die praktyk is dit egter onmoontlik, want diere sterf, migreer en spreid uit.

In Amerika is die reukstasie-opnamemetode ontwerp om katte te tel. Hierdie metode skakel sekere variasies in spoortellings uit deur die katte te lok na 'n sentrale opnamestasie waar 'n lokmiddel, gewoonlik sintetiese vetsure, geplaas word. Om duidelike katspore te kan waarneem, word 'n uniforme substraat rondom die stasie geplaas. 'n Dun laag poeier of selfs 'n metaalplaat bedek met roet, kan gebruik word. Die digtheid van die spore om die stasie word as maatstaf van die omgewing se katpopulasie aanvaar. Die opnamemetode is baie suksesvol, en soms kan daar tussen verskillende individue onderskei word, wat 'n baie belangrike aspek van sensusopnames is.

Die Indiese regering gebruik reeds vir baie jare tiere se unieke spooreienskappe om hulle te tel. Ullas Karanth, die hoof van die "Wildlife Conservation Society" (WCS) in Indië, bestudeer wilde tiere al vir 20 jaar, en hy is van mening dat hierdie tegniek nutteloos is. Hy het ook die vermoë van ervare Indiese wildbewaarders om inligting vanaf tierspore te verkry, getoets en die resultate was glad nie bevredigend nie. Alhoewel 75 % van die wildbewaarders die geslag van die tiere kon vasstel, was hulle nie in staat om te bepaal of die spore voor- of agterpote, linker- of regterpote was nie. Nie een van die bewaarders kon die getal tiere bepaal nie en getalle het drasties gevarieer, met die hoogste geskatte waarde wat tot 600 % te hoog was. Spooruitkenningstegnieke is 'n koste-effektiewe metode om 'n benaderde idee te kry van die populasiegetalle van 'n spesifieke katspesie in 'n omgewing, maar dit is nie 'n baie akkurate metode nie.

Wetenskaplikes van die WCS het metodes gesoek om die populasiegetalle van die laaste oorlewende Asiese jagluiperds te bepaal. Daar is minder as 100 diere wat in die Dasht-e-Kavir woestyn in sentrale Iran voorkom, en daarom kon tegnieke soos kamerastrikke nie gebruik word nie. Met die hulp van die Dieretuin in New York het hulle 'n metode ontwikkel om die diere te lok na 'n punt waar 'n haarmonster geneem kan word. Reukwater word gesproei op 'n harde metaalborsel wat teen 'n boom vasgespyker is, en wat die katte induseer om daarteen te skuur.

Op grond van die DNA verkry vanaf die haarmonsters kan verskillende individue uitgekien word. Eksperimente is op verskeie katspesies met verskillende soorte reukwater van verskillende handelsmerke uitgevoer, en daar is gevind dat die jagluiperds, leeus, luiperds en tiere voorkeur getoon het vir Calvin Klein se parfuim *Obsession For Men*. Ander gunsteling was *Samsara*, *L'Air du Temps*, *Paco Rabonne* en *Drakka Noir*. Die effek van sekere parfuumsorte is later in Suid-Afrika getoets op wilde katspesies. Party leeus en luiperds het belangstelling getoon, maar oor die algemeen het die reukwater nie dieselfde effek gehad op Suid-Afrika se wilde katte as die katspesies in die New Yorkse Dieretuin nie.<sup>82</sup>

Die grootste probleem met die meeste van die bogenoemde opnamemetodes vir die kwantitatiewe bepaling van populasiestatus, is om die diere te kry om na 'n spesifieke opnamestasie te kom. Daarna kan 'n hele aantal tegnieke met sukses gebruik word, onder andere kamerastrikke, haarmonsterneming, en reukstasie-opnamemetode.

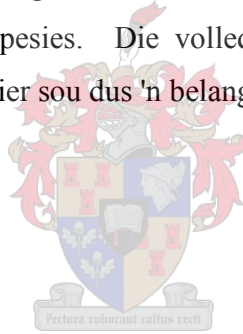
## 1.5 Doelstelling van Hierdie Studie

Die doel van hierdie studie was om die vlugtige verbindings teenwoordig in die reukmerkvloeistof van die Bengaalse tier (*Panthera tigris tigris*) te karakteriseer om sodoende 'n beter begrip van die semiochemiese kommunikasie van die tier te verkry. Vorige studies wat deur Brahmachary, Dutta en Poddar-Sarkar onderneem is om tierferomone te identifiseer was betreklik onvolledig. Ses van die twintig artikels deur hierdie outeurs gepubliseer, is belangrik.<sup>83, 84, 85, 86, 87, 88</sup> Die analitiese tegnieke waarvan in hulle studie gebruik gemaak is, naamlik stoomdistillasie, papier-chromatografie en dunlaag-chromatografie, laat veel te wense oor. Die meer volledige chemiese karakterisering van die verbindings teenwoordig in die reukmerkvloeistof van die Bengaalse tier was dus die hoof doelwit van hierdie ondersoek.

Die sproei van reukmerkvloeistof is die belangrikste vorm van semiochemiese kommunikasie in hierdie diere. Die vloeistof wat gesproei word is nie suiwer urine nie, maar bestaan uit urine gemeng met reukkliafskeidings. Beide geslagte spuit die vloeistof terugwaarts en opwaarts deur die urinekanaal. Die reukmerk wat agtergelaat word, verskaf inligting oor hoe onlangs die tier in die area verkeer het, die geslag van die dier, en in die geval van tierwyfies, of hulle in estrus is. Daar is beplan om ook die fikserende rol wat die lipiede in die reukmerk-afskieding van die Bengaalse tier speel, te-ondersoek. Die hitte, humiditeit en reën wat

kenmerkend is van tiere se natuurlike habitat, maak dit 'n vereiste vir semiochemiese boodskappe om 'n fikseermiddel te hê om die leeftyd van die chemiese sein te verleng. Daar is dus beoog om die verbindings en die konsentrasies waarin hulle voorkom, in onderskeidelik die lipied- en urinefraksies van die tier se reukmerkvlloeistof te bepaal, en te vergelyk om te bepaal of die lipiede wel 'n fikserende rol speel.

Soos in 'n vorige afdeling aangetoon, is die lok van die diere na die opnamestasies die grootste probleem wat ondervind word met opnamemetodes wat gebruik word om katspesies se populasiestatus te bepaal. Daarna kan 'n hele aantal tegnieke met sukses gebruik word, onder andere kamerastrikke, haarmonsterneming, en reukstasie-opnamemetode. Deur van verbeterde lokmiddels gebruik te maak, sou al die bogenoemde sensustegnieke verbeter kan word. Semiochemiese klierafskeidings en reukmerkvlloeistof is potensiele lokmiddels, en deur die afskeidings van verskillende katspesies te analiseer kan die sintetiese ekwivalente van die afskeidings berei word om die diere na opnamestasies te lok, en om sodoende 'n bydrae te lewer tot die bewaring van bedreigde katspesies. Die volledige chemiese karakterisering van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier sou dus 'n belangrike bydra tot die bewaring van hierdie spesie kon lewer.



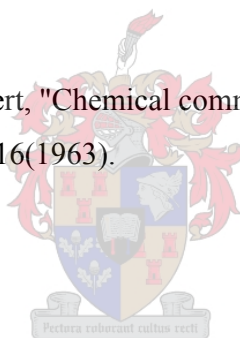
## Verwysings: Hoofstuk 1

1. H.H. Shorey, "Animal Communication by Pheromones", Academic Press, New York, 1976, p. 1.
2. E.O. Wilson, "Sociobiology", Belknap Press, Harvard, Massachusetts, 1975.  
Verwysing in T.D. Wyatt, "Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste", Cambridge University Press, Cambridge, 2003, p. 3.
3. D.B. Dusenbery, "Sensory Ecology. How Organisms Acquire and Respond to Information", W. H. Freeman and Company, New York, 1993, p. 37. Verwysing in T.D. Wyatt, "Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste", Cambridge University Press, Cambridge, 2003, p. 3.
4. J.W. Bradbury en S.L. Vehrencamp, "Principles of Animal Communication", Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 1998, pp. 2-3.
5. P.A. Brennan en E.B. Keverne, "Something in the air? New insights into mammalian pheromones", *Curr. Biol.* **14**:R81-R89(2004).
6. Verwysing 4, p. 6.
7. Verwysing 4, p. 279.
8. T.D. Wyatt, "Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste", Cambridge University Press, Cambridge, 2003, pp. 251-269.
9. R.G. Riley, R.M. Silverstein, B. Carroll en R. Carrol, "Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate: A volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*", *J. Insect Physiol.* **4**:651-654(1974).

10. J. Traniello, "Olfaction and chemical communication", pp. 167-185 (1996), in "Test studies for laboratory teaching", Volume 18, J.C. Glase (red.), Proceedings of the 18<sup>th</sup> Workshop/ Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
11. E.S. Albone, "Mammalian Semiochemistry. The Investigation of Chemical Signals Between Mammals", John Wiley & Sons Ltd., New York, 1984, p. 5.
12. P. Karlson en M. Lüscher, "'Pheromones' a new term for a class of biologically active substances", *Nature* **183**:155-156(1959).
13. Verwysing 11, pp. 2-5.
14. E.O. Wilson, "Pheromones", *Sci. Am.* **208**:100-114(1963).
15. Verwysing 11, pp. 2-5.
16. J. Lazar, D.R. Greenwood, L.E. Rasmussen en G.D. Prestwich, "Molecular and functional characterization of an odorant binding protein of the Asian elephant, *Elephas maximus*: implications for the role of lipocalins in mammalian olfaction", *Biochemistry* **41**:11786-11794(2002).
17. C.I. Keeling, K.N. Slessor, H.A. Higo, en M.L. Winston, "New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4486-4491(2003).
18. J.H. Law en F.E. Regnier, *Ann. Rev. Biochem.* **40**:533(1971).
19. Verwysing 8, p. 2.
20. L.E.L. Rasmussen, T.D. Lee, W.L. Roelofs, A.J. Zang en G.D. Daves, "Insect pheromone in elephants", *Nature* **379**:684(1996).

21. Verwysing 8, pp. 4-6.
22. Verwysing 8, p. 5.
23. Verwysing 4, pp. 283-286.
24. Verwysing 4, p. 284.
25. K.M. Dorries, R.E. Adkins en B.P. Halpern, "Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs", *Brain Behav. Evol.* **49**:53-62(1997). In verwysing 5.
26. Verwysing 11, pp. 165-210.
27. F.H. Bronson en W.K Whitten, *J. Reprod Fert.* **15**:131(1968).
28. Verwysing 11, p. 135.
29. J.S. Elkington en R.T. Carde, "Odor dispersion", in "Chemical Ecology of Insects", J.W. Bell en R.T. Carde (red.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1984, pp. 73-91.
30. Verwysing 4, p. 304.
31. Verwysing 4, p. 316.
32. Verwysing 4, p. 311.
33. Encyclopedia of Reproduction, E. Knobil en J.D. Neill (red.), Academic Press, California, 1998, pp. 1004-1006.

34. L.E. Rasmussen, M.J. Schmidt, R. Henneous, D. Groves en G.D. Daves, "Asian Bull Elephants: Flehmen-like responses to extractable components of female elephant estrous urine", *Science* **217**:159-162(1982).
35. Verwysing 11, p. 14.
36. C. Evans, "Vomeronal Chemoreception in Vertebrates A Study of The Second Nose", Imperial College Press, London, 2003, p. xi-xii.
37. R.E. Johnston, "Chemical Communication and Pheromones. The Types of Chemical Signals and the Role of the Vomeronal System", in "The Neurobiology of Taste and Smell", T.E. Finger, W.L. Silver en D. Restrepo (red.), 2<sup>de</sup> Uitgawe, Wiley-Liss, Inc., New York, 2000, p. 121.
38. E.O. Wilson en W.H. Bossert, "Chemical communication among animals", *Recent Prog. Horm. Res.* **19**:673-716(1963).
39. Verwysing 4, pp. 281-283.
40. E.O. Wilson, "Chemical communication within animal species", pp. 133-155, in "Chemical Ecology", E. Sonderheimer en J.B. Simeone (red.), Academic Press, New York, 1970.
41. A.C. Alberts, "Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates", *Am. Nat.* **139**:S63-S89(1992).
42. B.V. Burger, "Mammalian Pheromones", *Top. Curr. Chem.* **240**:231-278(2005).
43. O.A.E. Rasa, "Marking behaviour and its social significance in the African dwarf mongoose, *Helogale undulata rufula*", *Z. Tierphysiol.* **32**:293-318(1973). In verwysing 41.



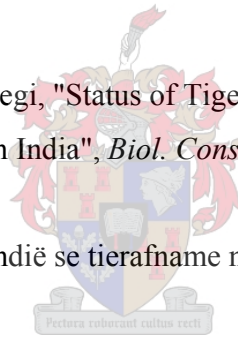


44. P.J. Weldon en H.W. Sampson, "The gular glands of *Alligator mississippiensis*: histology and preliminary analysis of lipoidal secretions", *Copeia* **1**:80-86(1988).
45. P.J. Weldon, A. Shafagati en J.W. Wheeler, "Lipids from the paracloacal glands of the American aligator (*Alligator mississippienis*)", *Lipids* **23**:727-729(1988).
46. A.G. Singer, R. Macrides en W.G. Agosta, "Chemical studies of hamster reproductive pheromones", pp. 347-350. Verwysing in D. Müller-Schwarze en R.M. Silverstein (red.), "Chemical signals: vertebrates and aquatic invertebrates", Vol. 3, Plenum, New York, (1983).
47. Verwysing 11, p. 135.
48. M.L. Gorman, "A mechanism for individual recognition by odour in *Herpestes auropunctatus* (Carnivora: Viverridae)", *Anim. Behav.* **24**:141-145(1976).
49. G.B. Schaller, "My year with the tigers", *Life* **58**:60-66(1965).
50. G.B. Schaller, "The Deer and the Tiger", University of Chicago Press, Chicago, 1967, p. 224.
51. V. Mazák, "Panthera Tigris", *Mamm. Species* **152**:1-8(1981).
52. H.C.B. Grzimek, "Grzimek's Animal Encyclopedia", Volume 12: Mammals III, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1975, p. 348.
53. WWF Position Statement, *Solving Conflicts between Asian big cats and humans: A portfolio of conservation action*, 13<sup>th</sup> Meeting of the Conference of the Parties to CITES, Bangkok, 2-4 October 2004, Global Species Programme, WWF International.
54. Verwysing 50, pp. 236-238.

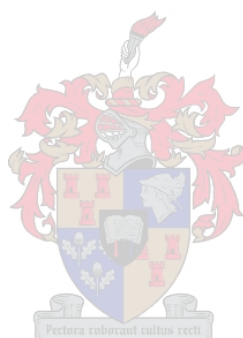
55. Verwysing 52, p. 349.
56. Verwysing 50, pp. 302-303.
57. J.L.D. Smith, C. McDougal en D. Miquelle, "Scent marking in free-ranging tigers, *Panthera tigris*", *Anim. Behav.* **3**:1-10(1989).
58. A. Locke, "The Tigers of Tenggenu", Londen. In verwysing 50.
59. Verwysing 50, pp. 251-256.
60. Verwysing 50, p. 252.
61. Verwysing 52, pp. 348-349.
62. P. Leyhausen, "Beobachtungen an Löwen-Tiger-Bastarden mit einigen Bemerkungen zur Systematik der Grosskatzen", *Z. Tierphysiol.* **7**:48-83(1950). In verwysing in 50.
63. R.L. Brahmachary en J. Dutta, "On the pheromones of tigers: experiments and theory", *Am. Nat.* **118**:561-567(1981).
64. I. Reiger, "Scent rubbing in carnivores", *Carnivore* **2**:17-25(1978).
65. S. Breeden en B. Wright, "Tiger! Lord of the Indian Jungle", *Natl. Geogr. Mag.* **166**:748-773(1984).
66. R.F. Ewer, "The Carnivores", Cornell University Press, Ithaca, New York, 1973. In verwysing 57.
67. P. Leyhausen, "The communal organization of solitary animals", *Symp. Zool. Soc. London* **14**:249-263(1965). In verwysing 57.

68. G.B. Schaller, "The Serengeti Lion: a Study of Predator-Prey Relations", Chicago University Press, Chicago, 1972, pp. 137-141.
69. P.M. Waser en R.H. Wiley, "Mechanisms and evolution of spacing in mammals", In "Handbook of Behavioral Neurobiology", P. Marler en J.G. Yanderberg (red.), Plenum Press, New York, 1980, pp. 159-223. In verwysing 57.
70. S.R. Choudhury, "Olfaction ecology of peak cubbing in Simlipal tiger", *Indian For.* **103**:577-588(1979).
71. D.G. Kleiman, "The estrous cycle in the tiger (*Panthera tigris*)", **2**:60-75, in "The World's Cats", R.L. Eaton (red.), Woodland Park Zoo, Seattle, 1974. In verwysing 57.
72. M. Poddar-Sarkar, R.L. Brahmachary en J. Dutta, "Scent Marking in the Tiger", in "Advances in the Biosciences. Chemical Signals in Vertebrates VII", **93**, R. Apfelbach (red.), Elsevier Science Ltd, Engeland, 1994, pp. 339-344.
73. S.A. Shumake, "The search for applications of chemical signals in management", in D. Müller-Schwarze en M.M. Mozell (red.), "Chemical Signals in Mammals", Plenum Press, New York, 1977, pp. 357-375. In verwysing 57.
74. D.W. Macdonald, "Some observations and field experiments on the urine marking behavior of the red fox, *Vulpes vulpes*", *Z. Tierphysiol.* **51**:1-22(1979). In verwysing 57.
75. F.W. Harrington en L.D. Mech, "Wolf pack spacing: howling as territory independent spacing mechanism in a territorial population", *Behav. Ecol. Sociobiol.* **12**:161-168(1983).

76. D.W. Macdonald, "The flexible social system of the golden jackal, *Canis aureus*", *Behav. Ecol. Sociobiol.* **5**:17-38(1979).
77. J. Baillie en B. Groombridge, "1996 IUCN Red List of Threatened Animals", *IUCN*, Gland (1996). Verwysing in Q-H. Wan en S-G. Fang, "Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species", *Forensic Sci. Int.* **131**:75-78(2003).
78. I. Michler, "Tigers in Africa", *Afr. Geogr.* **11**:27-31(2003).
79. U. Ramakrishnan, R.G. Coss en N.W. Pelkey, "Tiger decline caused by the reduction of large ungulate prey: evidence from a study of leopard diets in southern India", *Biol. Conserv.* **89**:113-120(1999).
80. A.J.T. Johnsingh en A.S. Negi, "Status of Tiger and Leopard in Rajaji-Corbett Conservation Unit, northern India", *Biol. Conserv.* **111**:385-393(2003).
81. Die Burger, 2005/03/29, "Indië se tierafname noop ondersoek", *Nasionale Pers*, Kaapstad, Suid-Afrika.
82. G. Balme, "Counting Cats", *Afr. Geogr.* **13**:37-43(1998).
83. R.L. Brahmachary en J. Dutta, "On the pheromones of tiger: experiments and theory", *Am. Nat.* **118**:561-567(1981).
84. R.L. Brahmachary, "Ecology and chemistry of mammalian pheromones", *Endeavour* **10**:65-68(1986).
85. R.L. Brahmachary, M. Poddar-Sarkar en J. Dutta, "Chemical communications in the tiger and the leopard", In: "Chemical Signals in Vertebrates", R.L. Doty en D. Müller-Schwarze (red.), 6<sup>de</sup> Uitgawe, Plenum Press, New York, 1992, pp. 471-475.



86. R.L. Brahmachary en M. Poddar-Sarkar, In: "Chemical Signals in Vertebrates", R.L. Doty en D. Müller-Schwarze (red.), 7<sup>de</sup> Uitgawe, Pergamon, Oxford, 1995.
87. R.L. Brahmachary, M. Poddar-Sarkar en J. Dutta, "The aroma of rice...and tiger", *Nature* **344**:26(1990).
88. R.L. Brahmachary, "The expanding world of 2-acetyl-1-pyrroline", *Curr. Sci.* **71**:257-258(1996).



## HOOFSTUK 2

# IDENTIFISERING VAN CHEMIESE VERBINDINGS TEENWOORDIG IN DIE REUKMERKVLOEISTOF VAN DIE BENGAALSE TIER

Die Bengaalse tier merk sy territoriale gebied deur reukmerkvloeistof op spesifieke plekke te sproei. Die reukmerkvloeistof bestaan uit urine, en 'n mengsel van lipiede<sup>1</sup> wat as 'n laag bo-op die urine waargeneem word nadat die versamelde urine 'n rukkie gestaan het. Met behulp van sentrifugering is hierdie twee fases van mekaar geskei en apart geanaliseer. In die bespreking van die identifikasie van die vlugtige organiese komponente van die twee fases sal na die apolêre lipiedfase meestal as die lipiedfraksie verwys word.

Die vlugtige verbindings teenwoordig in die bodamp van die urine is deur middel van sorpsie in die polidimetielsiloksaan (PDMS)-rubber van die monsterverrykingstafie of SEP ("Sample Enrichment Probe") gekonsentreer vir gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS). Van verskeie kapillêre kolomme belaa met verskillende polêre en apolêre fases, het 'n kolom belaa met die polêre fase AT1000 die beste resultate gelever, waarskynlik omdat daar talle karboksielsure en ander polêre verbindings in die versamelde materiaal aanwesig is. GC-MS analise van die monster van die vlugtige verbindings wat uit die bodamp van die urine verryk is, het 'n totale ioonstroomchromatogram (TIC) gelever waarin 'n groot aantal pieke waargeneem kon word.

Om te verseker dat al die organiese komponente van die urine geïdentifiseer sou kon word, is die urine nogtans ook met dichlormetaan (DCM) geëkstraheer. Hierdie ekstrak is op die konvensionele manier met GC-MS geanaliseer, maar die resultate was teleurstellend aangesien die TIC slegs 'n paar pieke bevat het. Deur chemiese-ionisasiemassaspektra met behulp van gaschromatografie-chemiese-ionisasiemassaspektrometrie (GC-CIMS) op te neem, was dit moontlik om inligting te verkry in verband met die molekulêre massas van sommige van die verbindings waarvan die elektronimpak (EI)-massaspektra nie molekulêre ione bevat nie. Ongelukkig is die chemiese ionisasie (CI)-ioonbron van die beskikbare massaspektrometer swak ontwerp, sodat die verlangde CI-spektra nie vir alle verbindings verkry kon word nie. Die

identifikasie van die vlugtige organiese komponente van die urine is bevestig deur vergelyking van die gaschromatografiese-retensietye van die natuurlike verbindings met dié van kommersieel beskikbare verwysingsverbindings of verbindings wat in die laboratorium gesintetiseer is. Vir hierdie doel is mengsels van die sintetiese verbindings wat die verbindings in nagenoeg dieselfde kwantiteite as die natuurlike materiaal bevat het, met die natuurlike materiaal gemeng en met behulp van GC-MS geanaliseer om te bevestig dat die retensietye van die sintetiese en natuurlike verbindings identies is.

Vir gaschromatografiese (GC)- en GC-MS-analise van die vlugtige organiese komponente van die lipiedfraksie, is 'n monster van hierdie olie opgelos in DCM en op die konvensionele manier ingespuut. Die resultate was egter onbevredigend aangesien die TIC slegs 'n paar pieke bevat het. Deur 'n monster van die onverdunde vloeibare lipiedfraksie sonder verdunning in te spuit, is goeie resultate verkry. Hierdie inlaatmetode wat daarop berus dat die desorpsie van die vlugtige verbindings uit 'n swaar olie, hoewel dit stadig verloop, nogtans goeie resultate kan lewer, is nadat die metode in hierdie ondersoek gebruik is, deur Grob et al.<sup>2</sup> in detail in die literatuur beskryf.

By die ekstraksie van die urine met DCM het daar 'n redelik soliede laag materiaal tussen die boliggende urine en die onderliggende DCM gevorm. Daar is aangeneem dat hierdie materiaal gedenatureerde proteïene kan wees. Die materiaal is geïsoleer en met elektronsproei-massaspektrometrie (ESMS) ondersoek. Dit het geblyk dat die materiaal uit 'n komplekse mengsel verbindings bestaan en daar is besluit om hierdie faset voorlopig nie verder te ondersoek nie.

Omdat daar in die bespreking van die resultate van hierdie ondersoek na 'n hele aantal verskillende TIC's en massaspektra verwys word, word van die volgende numereringsstelsel gebruik gemaak:

- TIC van die bodamp van die urine (Fig. T2.1a en Fig. T2.1b).
- TIC van vlugtige komponente van die lipiedfraksie (Fig. T2.2a en Fig. T2.2b).
- TIC van die dichlorometaanekstrak van die urine (Fig. T2.3a en Fig. T2.3b).
- Massaspektra van verbindings in die bodamp van die urine, byvoorbeeld B188 (Fig. 2.4), [Die verbinding met die nommer 188 elueer met 'n retensietyd van 188 s (188/60 min) in die TIC wat in Fig. T2.1a gegee word en die massaspektrum verskyn in Fig. 2.4.]

- Massaspektra van vlugtige komponente van die lipiedfraksie word byvoorbeeld as L2152 (Fig. 2.5) volgens dieselfde sisteem genommer.
- Massaspektra van vlugtige komponente van die ekstrak word byvoorbeeld as E5544 (Fig. 2.104) ook volgens dieselfde sisteem genommer.
- Chemiese-ionisasie-elektronimpak-massaspektra word byvoorbeeld as CE2796 (Fig. 2.41) genommer. [Die betrokke komponent het dus 'n retensietyd van 2796 s (2796/60 min) en word waargeneem in die CI-TIC van die ekstrak.]

Die verbindings wat geïdentifiseer is in die reukmerkvlouestof van die Bengaalse tier word aan die einde van Hoofstuk 2 in Tabel 2.1 gelys.

## 2.1 Chemiese Karakterisering van die Reukmerkvlouestof van die Bengaalse Tier

### 2.1.1 Versadigde alifatiese koolwaterstowwe

Versadigde koolwaterstowwe word in die ioonbron van 'n massaspektrometer geïoniseer deur die verwydering van 'n elektron uit 'n  $\sigma$ -binding:



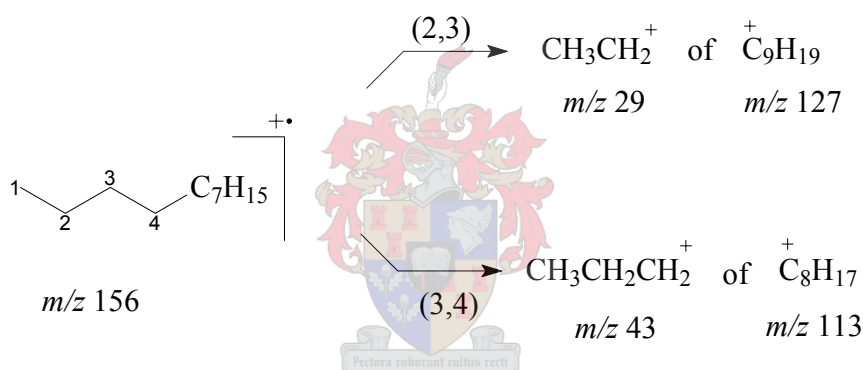
Die massaspektra van onvertakte koolwaterstowwe bevat tipies ioongroepe wat 14 atoommassa-eenhede ( $\text{CH}_2$ -eenhede) van mekaar in die spektra aanwesig is. Die ionspesies met die hoogste intensiteit in elkeen van hierdie ioongroepe het die samestelling  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$  en verskyn dus by  $m/z$  29, 43, 57, 71, ..., terwyl die ander prominente ionspesie,  $[\text{C}_n\text{H}_{2n-1}]^+$ , by  $m/z$  27, 41, 55, 69, ... in die spektra aanwesig is. Die relatiewe intensiteit\* van die ione verminder met toenemende fragmentmassa.<sup>3</sup> Die molekulêre ioon is gewoonlik teenwoordig, selfs al besit die ioon in sommige gevalle 'n lae intensiteit. Vertakte koolwaterstowwe se dominante splitsing vind by voorkeur by 'n punt van vertakking plaas, wat 'n duidelike waarneembare verandering in die normale fragmentasiepatroon tot gevolg het, en wat die identifisering van die punt van vertakking

\* Die terme intensiteit, intens en sterk word in die bespreking van die massaspektra van verbindings gebruik vir ione wat stabiel is en waarvan daar dus 'n groot aantal in die ioonbron gevorm word, en is ekwivalent aan die Engelse terme "abundant" en "abundance". Die term swak word gebruik om aan te dui dat daar 'n klein aantal ione van die betrokke spesie in die ionbron gevorm word.

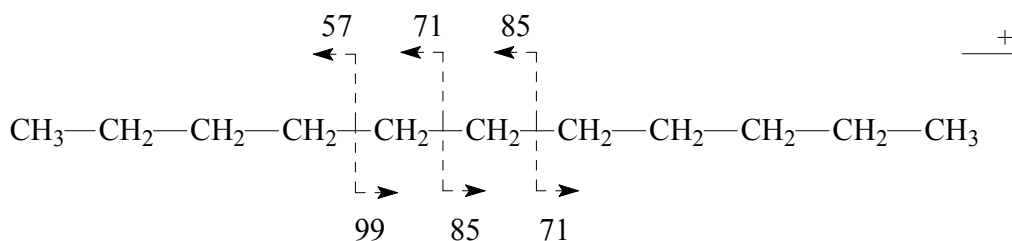


moontlik maak. 'n Afname in die intensiteit van die molekulêre ion word ook waargeneem by vertakte koolwaterstofverbindings. Terselfdertyd word 'n kenmerkende toename in die intensiteite van die  $[C_nH_{2n+1}]^+$  en  $[C_nH_{2n-1}]^+$  ione waargeneem.

Die EI-massaspektra van Komponente B108, B188 (Fig. T2.1a; Fig. 2.4) en B916 wat voorkom in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a) vertoon bogenoemde tipiese ioongroepe. Al drie bogenoemde komponente het molekulêre ione met hoë intensiteite by onderskeidelik  $m/z$  142, 156 en 198, wat daarop dui dat die komponente waarskynlik onvertakte koolwaterstofverbindings is. Komponent B188 (Fig. T2.1a; Fig. 2.4) word as verteenwoordigend van hierdie groep gebruik in die bespreking van die massaspektra van versadigde, alifatiese koolwaterstowwe. Die ione by  $m/z$  127, 113, 43 en 29 kan soos volg gerasionaliseer word:<sup>4</sup>



Die lading kan op enigeen van die gevormde fragmente behoue bly, met die voorkeur verlies van die grootste alkielradikaal. Elke verdere verlies van 14 atoommassa-eenhede het die vorming van ione by  $m/z$  99, 85, 71, en 57 tot gevolg. Die fragmentasiepatroon kan skematies soos volg voorgestel word:

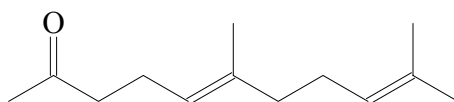


Komponent H188

Op grond van hierdie inligting is die komponente B108, B188 en B916 tentatief as dekaan, undekaan en tetradekaan geïdentifiseer, waarna die strukture van hierdie verbindings bevestig is deur middel van retensietydvergelyking met sintetiese monsters.

## 2.1.2 Terpenoïede

Die ioon by  $m/z$  43 is die basispiek van die EI-massaspektrum van Komponent L2152 en die ioon met die hoogste massa in die massaspektrum van hierdie komponent kom by  $m/z$  194 voor. Afgesien van 'n prominente ioon by  $m/z$  69, bevat die massaspektrum geen ander insiggewende ione wat 'n aanduiding kon gee van die struktuur van hierdie komponent nie. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog<sup>5</sup> het 2-dodekenaal as eerste keuse voorgestel. Dit is egter bekend dat metielketone se basispeke by  $m/z$  43 voorkom,<sup>6</sup> en 'n ioon by  $m/z$  69 besit oor die algemeen 'n hoë intensiteit by onversadigde ketone met 'n allieffunksionaliteit.<sup>7</sup> Hierdie ioon is die produk van 'n allieklowingsreaksie. Daar is aanvaar dat die  $m/z$  194 ioon die komponent se molekulêre ioon is omdat ketone se molekulêre ione gewoonlik waarneembaar is. Aangesien die biblioteeksoektog ook 6,10-dimetiel-5,9-undekadiën-2-oon (geranielasetoon), waarin hierdie struktuurelemente voorkom, as vierde keuse voorgestel het, is Komponent L2152 (Fig. T2.2a; Fig. 2.5) tentatief as geranielasetoon geïdentifiseer. Ander prominente ione by  $m/z$  136, 151 en 176 is in die massaspektrum van Komponent L2152 aanwesig.

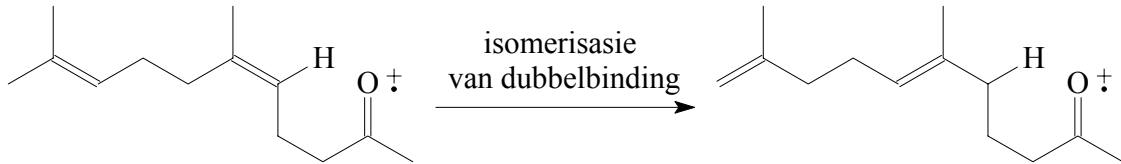


Geranielasetoon

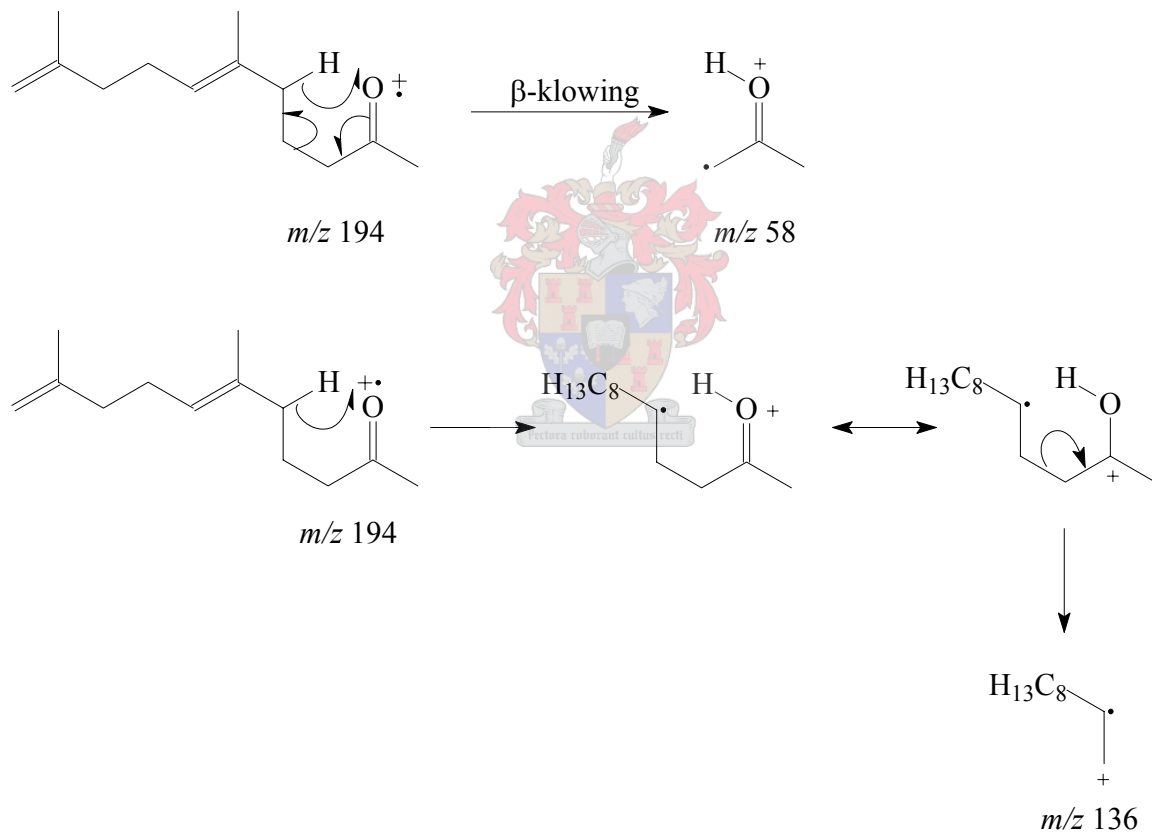
Indien onversadigde ketone 'n vinielwaterstofatoom in die  $\gamma$ -posisie het, word die vorming van ione deur waterstofherrangskikking gevolg deur  $\beta$ -klowingreaksies (McLafferty-herrangskikking) drasties beperk. Dus het hierdie  $OE^+$  ione<sup>†</sup> baie lae intensiteite.<sup>7</sup> Geranielasetoon se  $\gamma$ -waterstofatoom is in so 'n vinielposisie aanwesig en dus is waterstofherrangskikking en  $\beta$ -klowing onwaarskynlik. 'n McLafferty-klowingsreaksie kan egter

<sup>†</sup> 'n Ioon waar die elektron in die valensorbitaal ongepaard is, of 'n radikaal ioon.

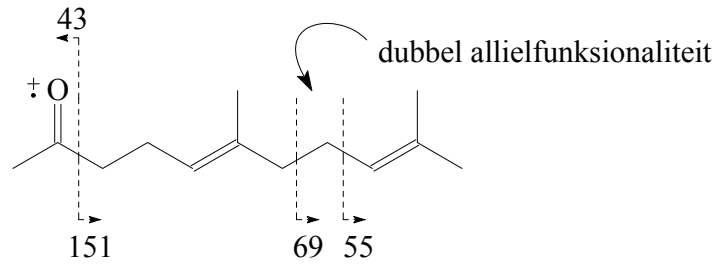
plaasvind indien isomerisasie van die dubbelbinding na 'n meer gunstige posisie plaasvind. In die geval van geranielasetoon, is so 'n isomerisasie van die dubbelbinding wel moontlik:<sup>8</sup>



Sodanige isomerisasie sou 'n McLafferty-herrangskikking en  $\beta$ -klowingsreaksies moontlik maak om ione by onderskeidelik  $m/z$  58 en  $m/z$  136 te vorm:

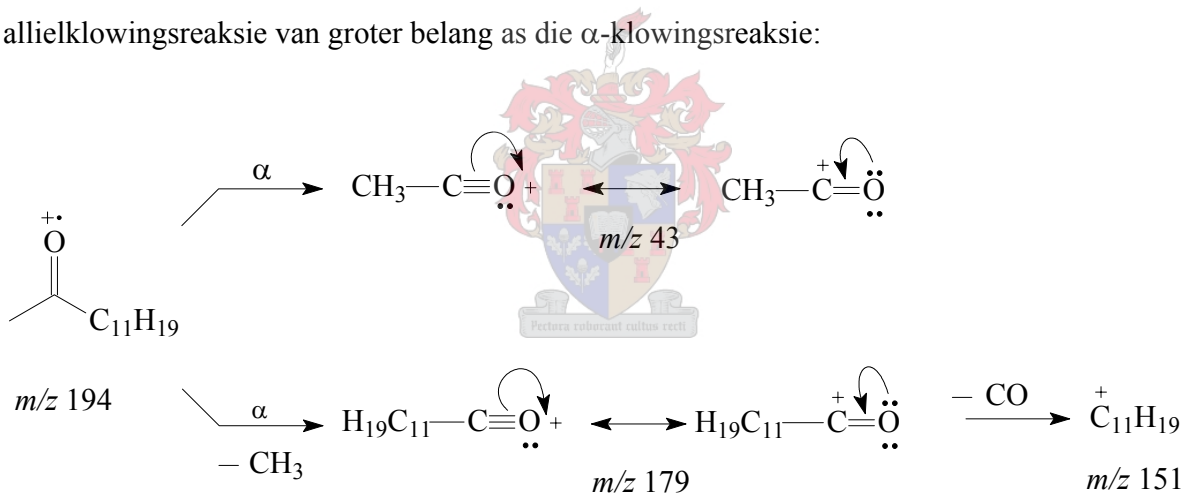


Net soos in die geval van langketting-alkene vind dubbelbinding-isomerisasie nie in alle verbindings plaas nie, en die  $m/z$  69 ioon wat die produk van dubbele allielklowing is, besit 'n hoër intensiteit as selfs die ioon wat gevorm word deur  $\alpha$ -klowing by  $m/z$  151 (Dias *et al.*<sup>9</sup>):



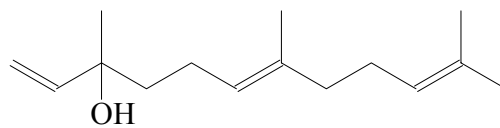
Komponent L2152

Die twee prominente ione wat by  $m/z$  43 (basispiek) en  $m/z$  179 voorkom, kan verklaar word deur die klowing van die koolstof-koolstof binding  $\alpha$  ten opsigte van die karbonielgroep in die ioon by  $m/z$  194, om resonansie-gestabiliseerde asiliumione by  $m/z$  43 en  $m/z$  179 te vorm.<sup>10</sup> Verder kan die laasgenoemde asiliumioon 'n molekule CO verloor om 'n ioon by  $m/z$  151 te vorm.<sup>6</sup> As die relatiewe intensiteit van die onderskeie ione in ag geneem word, is die allielklowingsreaksie van groter belang as die  $\alpha$ -klowingsreaksie:



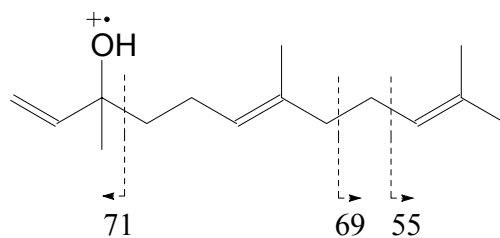
Die ioon by  $m/z$  176 kan moontlik toegeskryf word aan die verlies van 'n watermolekule uit die molekulêre ioon. Die identifikasie van geranielasetoon (6,10-dimetiel-5,9-undekadien-2-oon), teenwoordig in die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier (Fig. T2.2a), is deur die retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster bevestig. Hoewel hierdie verbinding nie 'n terpenoïed in die normale sin van die term is nie, kan dit as 'n terpenoïedafgeleide beskou word en word dit dus in hierdie afdeling bespreek.

In die EI-massaspektrum van Komponent B2800 (Fig. T2.1a; Fig. 2.6) wat voorkom in die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a), word prominente ione by  $m/z$  41 (basispiek), 69, 93, 107 en 161 waargeneem. Van hierdie ione kom dié by  $m/z$  69 en 93 asook die effens swakker ioon by  $m/z$  136 tipies in die massaspektra van terpenoïede voor. Hoewel die betrokke massaspektrometriese data nie besonder goed met die beskikbare gepubliseerde data<sup>5</sup> ooreengestem het nie, is hierdie komponent nogtans tentatief geïdentifiseer as 3,7,11-trimetiel-1,6,10-dodekatrien-3-ol (nerolidol).



Nerolidol

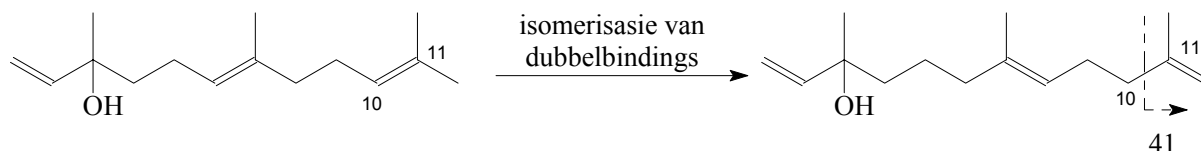
Indien daar aanvaar word dat die  $[M-H_2O]^+$  ioon teenwoordig is by  $m/z$  204 en dat die  $[M-CH_3-H_2O]^+$  ioon teenwoordig is by  $m/z$  189, behoort Komponent B2800 se molekulêre massa 222 Da te wees, wat ooreenstem met die molekulêre massa van nerolidol. Anders as wat die geval is by gewone tersiêre alkohole, waar die  $\alpha$ -klowingsreaksies verantwoordelik is vir die vorming van die ione wat die grootste intensiteit besit,<sup>11</sup> speel hierdie klowingsreaksie nie so 'n belangrike rol by nerolidol nie, alhoewel laasgenoemde verbinding ook 'n tersiêre alkoholfunksie besit. Net soos in die geval van langketting-alkene is die  $m/z$  69 ioon wat die produk van allielklowing is, 'n ioon wat kenmerkend is van terpenoïedverbindinge.



Komponent B2800

Die  $\alpha$ -klowingsreaksie wat verantwoordelik is vir die vorming van die grootste alkiel-fragment, en dus die verwagte grootste intensiteit behoort te besit, word geheel oorskadu deur die

dubbele allielklowing van die ketting. Die vorming van die basispiek by  $m/z$  41, kan moontlik verklaar word deur 'n (10,11)-klowingsreaksie nadat isomerisasie van die dubbelbindings plaasgevind het:



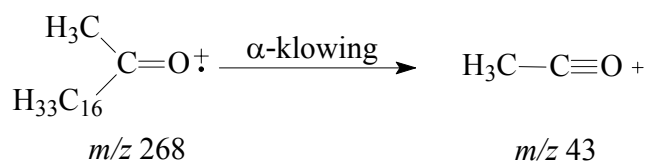
Kommersieel beskikbare sintetiese nerolidol is gebruik vir retensietydvergelyking en Komponent B2800 is op grond van ooreenstemmende retensietyd en massaspektrometriese eienskappe as nerolidol geïdentifiseer.

Die EI-massaspektrum van Komponent L3093 (Fig. T2.2b; Fig. 2.7) het prominente ione wat tipies in die massaspektra van versadigde koolwaterstowwe voorkom, maar uit die onreëlmatige afname in die relatiewe intensiteite van die ione in hierdie massaspektrum is dit duidelik dat die verbinding meervoudig vertak moet wees. Aan die ander kant, is die prominensie van die ione by  $m/z$  43 en 58 egter ook tipies van metielketone<sup>6</sup>. Komponent L3093 is dus tentatief as heksahidrofarnesielasetoon geïdentifiseer deur vergelyking van sy EI-massaspektrum met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup>.

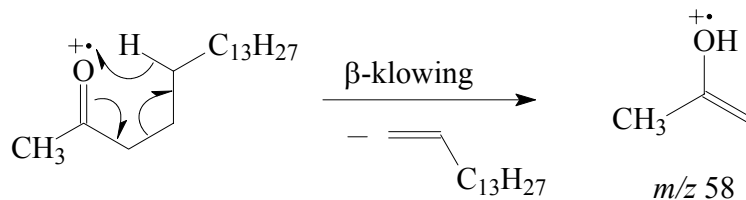


Heksahidrofarnesielasetoon

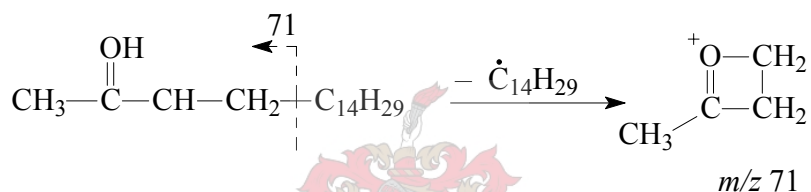
In hierdie verbinding word die prominente ion by  $m/z$  250 gevorm deur die verlies van 'n watermolekule uit die molekulêre ion om 'n  $[M-18]^+$  ion te vorm. Die vorming van die basispiek volg die algemene  $\alpha$ -klowing-fragmentasiepatroon wat by alle 2-alkanone waargeneem word:



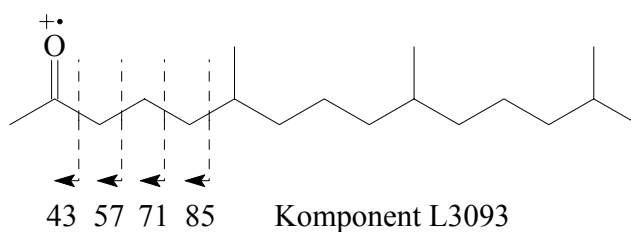
Die prominente ioon by  $m/z$  58 kan deur die volgende McLafferty-herrangskikking verklaar word:



$\gamma$ -Klowing dra moontlik by tot die intensiteit van die ioon by  $m/z$  71. Die dryfkrag vir hierdie fragmentasiepatroon is waarskynlik die breek van die allielbinding wat lei tot die vorming van 'n enol, of die vorming van 'n sikliese oksonium ioon na die binding gebreek het.<sup>12</sup>



Die moontlike vorming van hierdie en ander prominente ione kan skematies soos volg aangedui word:

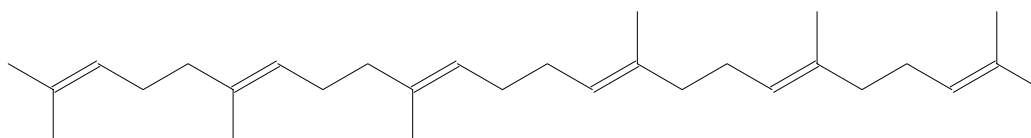


Deur retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster is die komponent eenduidig as heksahidrofarnesielasetoon geïdentifiseer.

In die EI-massaspektrum van Komponent B5383 (Fig. T2.1b; Fig. 2.8) kom die basispiek by  $m/z$  69 en 'n verdere prominente ioon by  $m/z$  81 voor. Met die uitsondering van 'n ioon met 'n lae intensiteit by  $m/z$  410, wat moontlik die molekulêre ioon kan verteenwoordig, bevat die spektrum nie inligting waaruit die struktuur van die verbinding sondermeer afgelei kan word nie.

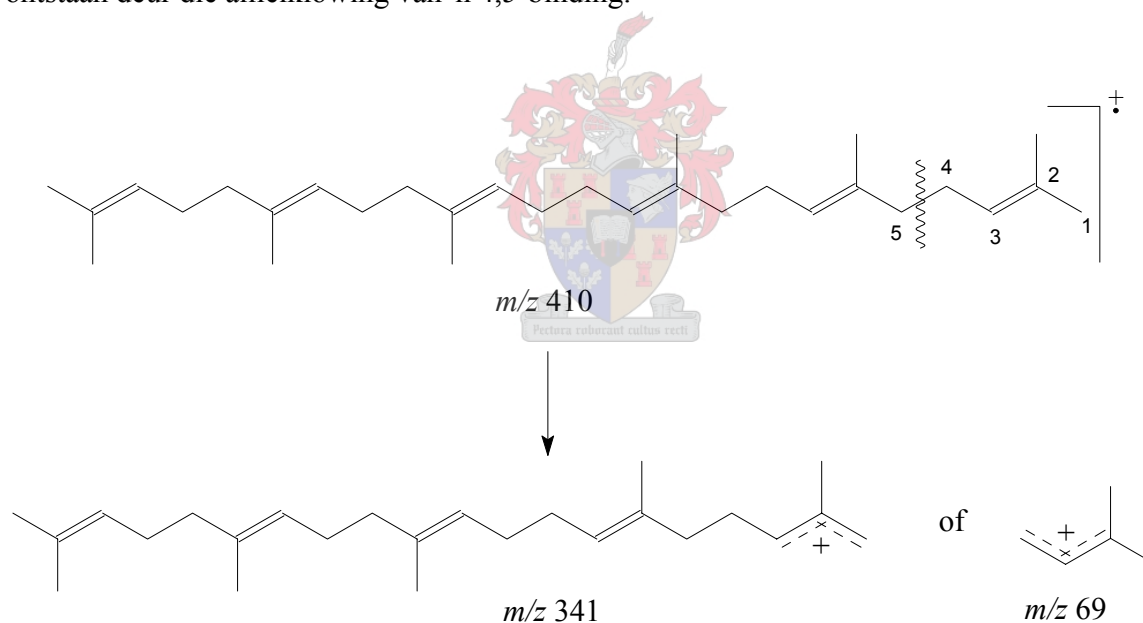


'n Verbinding met 'n soortgelyke spektrum is voorheen in 'n GC-MS-analise van die dorsale klierafskeiding van die springbok (*Antidorcas marsupialis*) gevind, en is op grond van onder andere die verbinding se  $^1\text{H}$  KMR spektrum as skwaleen geïdentifiseer.<sup>13</sup> Deur vergelyking van die betrokke massaspektrum met die EI-massaspektrum van skwaleen wat in die vorige studie geïdentifiseer is, is Komponent B5383 dus tentatief as skwaleen geïdentifiseer.



Skwaleen

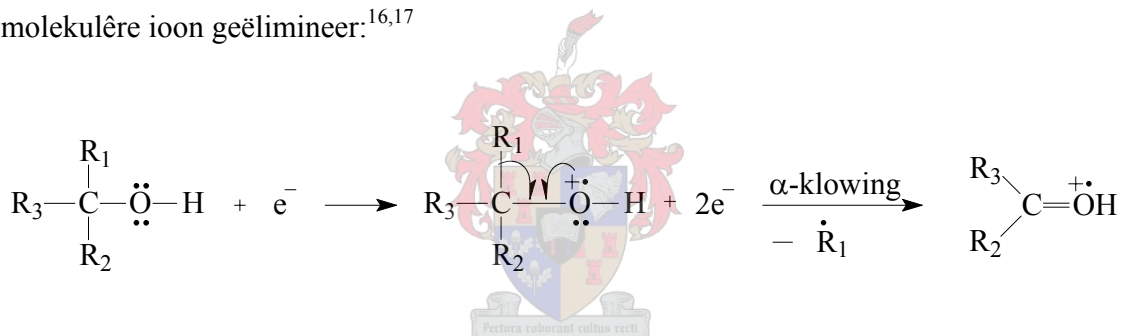
Die basispiek van hierdie komponent is by  $m/z$  69 in sy massaspektrum aanwesig, en ontstaan deur die allielklowing van 'n 4,5-binding.



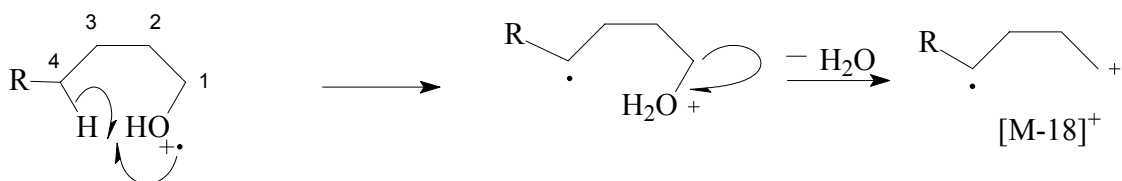
Hierdie klowing word bevorder aangesien die betrokke binding bi-allilies is.<sup>14</sup> Die lading kan egter ook op die ander fragment van die molekule gestabiliseer word om die  $[\text{M}-69]^+$  ion by  $m/z$  341 te lewer. Retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare skwaleen het hierdie identifikasie van Komponent B5383 bevestig.

### 2.1.3 Versadigde alifatiese alkohole

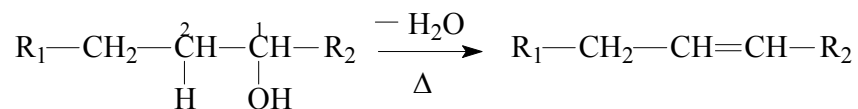
Die EI-massaspektra van komponente L701, L951, L1253, L1584 (Fig. T2.2a; Fig. 2.9), L3213 (Fig. T2.2b; Fig. 2.10), B3767 (Fig. T2.1b; Fig. 2.11), en L4324 (Fig. T2.2b; Fig. 2.12) in die TIC van die bodamp van die urine (Fig. T2.1b) en die lipiedfraksie (Fig. T2.2a en Fig. T2.2b) toon almal twee prominente reekse ione by  $m/z$  41, 55, 69, ... , en  $m/z$  43, 57, 71, ... . Die relatiewe intensiteit van die ione neem af met 'n toenemende  $m/z$  verhouding. Die  $m/z$  waardes van hierdie ione stem ooreen met die algemene formules  $C_nH_{2n-1}$  en  $C_nH_{2n+1}$ , onderskeidelik. Hierdie reekse word tipies waargeneem in die massaspektra van onvertakte 1-alkanole<sup>15</sup> en 1-alkene. Die molekulêre ione van primêre en sekondêre alkohole besit oor die algemeen baie lae intensiteite, en dié van tersiêre alkohole kan in die meeste gevalle nie waargeneem word nie. Die belangrikste algemene fragmentasiepatroon wat alkohole ondergaan, is  $\alpha$ -klowingsreaksies. In hierdie klowing word die grootste groep aan die  $\alpha$ -koolstofatoom meer gereedlik soos volg uit die molekulêre ioon geëlimineer.<sup>16,17</sup>



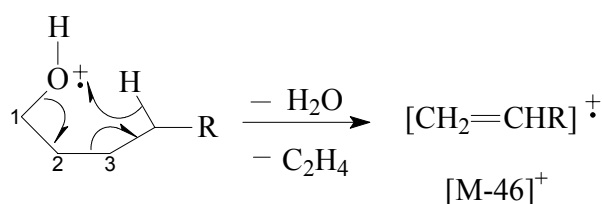
Die eliminasië van water uit die molekulêre ioon van alkohole het dikwels 'n prominente  $[M-18]^+$  ioon tot gevolg. Hierdie proses vind hoofsaaklik plaas deur 'n 1,4-eliminasië reaksie *via* die volgende sesledige sikliese oorgangsproduk:<sup>18</sup>



Die verlies van water vind ook gereedlik plaas deur 1,2-eliminasië tydens termiese dehidrasie, wat deur die warm inlaatsisteem van die GC-MS-koppelvlak en ioonbron bevorder kan word, voordat ionisasië plaasvind.<sup>17</sup>



'n Opeenvolgende eliminasië van water en etileen word ook waargeneem by alkohole wat vier of meer koolstofatome besit. Die vorming van 'n prominente  $[\text{M}-46]^+$  ioon kan dus skematies soos volg voorgestel word:<sup>16,17</sup>



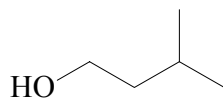
Komponent L1584 word hier as verteenwoordigend gebruik in die bespreking van hierdie homoloë reeks 1-alkanole se EI-massaspektra. In die massaspektrum van Komponent L1584 verskyn die  $[\text{M}-46]^+$  ioon by  $m/z$  98. Indien daar aanvaar word dat die ioon by  $m/z$  126 gevorm word deur die verlies van water, behoort die molekulêre massa van bogenoemde komponent 144 Da te wees, wat ooreenstem met die molekulêre massa van 1-nonanol. Die massaspektra van Komponente L701, L951, L1253, L3213, B3767 en L4324 vertoon dieselfde basiese struktuur as dié van Komponent L1584.

'n Reeks kommersieel beskikbare sintetiese 1-alkohole is gebruik vir retensiedyvergeliking waardeur die verskillende komponente as 1-heksanol (L701), 1-heptanol (L951), 1-oktanol (L1253), 1-nonanol (L1584), 1-tetradekanol (L3213), 1-heksadekanol (B3767) en 1-oktadekanol (L4324) geïdentifiseer is.

#### 2.1.4 Versadigde alifatiese vertakte alkohol

Die massaspektrum van Komponent B310 (Fig. T2.1a; Fig. 2.13) bevat 'n besonder prominente ioon by  $m/z$  31 wat tipies in die spektra van 1-alkanole voorkom. Daar kon dus aanvaar word dat hierdie verbinding 'n primêre alkohol is, en dat die ioon by  $m/z$  70 dus moontlik die  $[\text{M}-18]^+$  ioon in die spektrum kan wees. Die verbinding is dus tentatief as 'n 1-alkanol, en

verder op grond van die vergelyking van die komponent se massaspektrum met gepubliseerde data<sup>5</sup> as 3-metiel-1-butanol geïdentifiseer.



3-Metiel-1-butanol

Die basispiek in die EI-massaspektrum van dié komponent by  $m/z$  42 ontstaan deur die opeenvolgende eliminasië van water en etileen  $[M-46]^+$ . Soos vermoed, lei die verlies van 'n watermolekule tot die vorming van die ioon by  $m/z$  70. Die prominente ioon wat by  $m/z$  55 voorkom, is 15 atoommassa-eenhede verwyder van die  $m/z$  70 ioon, en word waarskynlik gevorm deur die verdere verlies van 'n  $\text{CH}_3$ -groep uit die  $[M-18]^+$  ioon. Die intensiteit van die betrokke ioon kan moontlik verklaar word deur die beskikbaarheid van twee metielgroepe vir hierdie fragmentasie. Die prominente ioon by  $m/z$  31 word gevorm deur die verlies van 'n isobutielgroep deur  $\alpha$ -klowing om 'n  $\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$  ioon te vorm.<sup>19</sup>

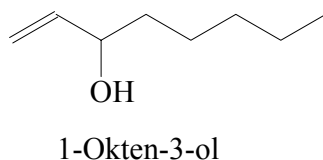


Deur retensietydvergelyking van Komponent B310 met sintetiese monsters, is sy identiteit as 3-metiel-1-butanol bevestig.

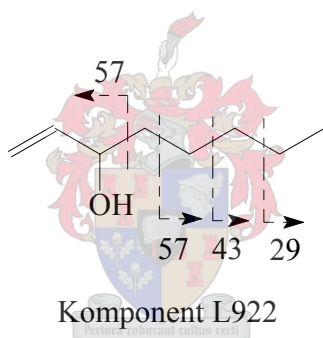
### 2.1.5 Onversadigde alifatiese alkohole

Die EI-massaspektrum van Komponent L922 (Fig. T2.2a; Fig. 2.14) wat voorkom in die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlouestof van die Bengaalse tier (Fig. T2.2a) is 'n voorbeeld van dié tipe spektrum wat moeilik is om aan 'n bepaalde verbindingsklas te koppel. 'n Gerekenariseerde vergelyking met gepubliseerde data<sup>5</sup> het ook nie besonder insiggewende resultate gelewer nie met 'n korrelasie-indeks wat so laag was dat dit normaalweg nie aanvaarbaar

sou gewees het nie. Die komponent is egter tentatief as 1-okten-3-ol geïdentifiseer, hoewel hierdie struktuur nie die hoogste posisie in die rangorde van voorgestelde strukture gehad het nie.



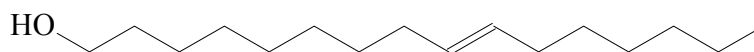
In die massaspektrum van Komponent L922 verskyn die basispiek by  $m/z$  57. Indien daar aanvaar word dat die ioon by  $m/z$  110 aan  $[M-H_2O]^+$  toegeskryf word en die ioon by  $m/z$  95 aan  $[M-CH_3-H_2O]^+$ , behoort Komponent L922 se molekulêre massa 128 Da te wees, dit wil sê die molekulêre massa van 1-okten-3-ol. Die vorming van die basispiek by  $m/z$  57, sowel as 'n paar ander prominente ione in die betrokke spektrum, kan soos volg skematies voorgestel word:



'n Reeks sintetiese alkohole is vir retensietydvergelyking gebruik en op grond van ooreenstemmende retensietye, is die identiteit van Komponent L922 as 3-okten-1-ol bevestig.

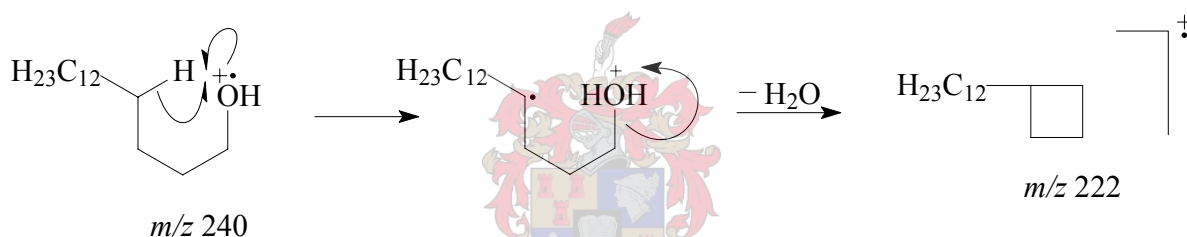
Die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier (Fig T2.2b) bevat ook Komponent L3841 (Fig. T2.2b; Fig. 2.15) met 'n basispiek by  $m/z$  82. Twee ander belangrike ione is in die betrokke EI-massaspektrum by  $m/z$  222 en  $m/z$  194 in die hoë massagebied aanwesig. Die ione is kenmerkend van langketting-alkohole, en die vorming van hierdie ione kan onderskeidelik toegeskryf word aan die eliminasië van 'n watermolekule uit die molekulêre ioon, en aan die eliminasië van 'n watermolekule gevolg deur die verlies van 'n etileenmolekule. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog<sup>5</sup> het 9-oktadeken-1-ol as struktuur vir Komponent L3841 voorgestel. Die ioon met die hoogste massa waarneembaar in die hoë massagebied van die EI-massaspektrum van Komponent L3841, is egter dié by  $m/z$  222, terwyl

die ioon by  $m/z$  250 die ioon met die hoogste massa in die massaspektrum van 9-oktadeken-1-ol is. Soos vroeër genoem is, kan die  $m/z$  222 ioon toegeskryf word aan 1,4-eliminasië van 'n watermolekule. Dus is Komponent L3841 tentatief geïdentifiseer as 9-heksadeken-1-ol wat 'n molekulêre massa van 240 Da het.

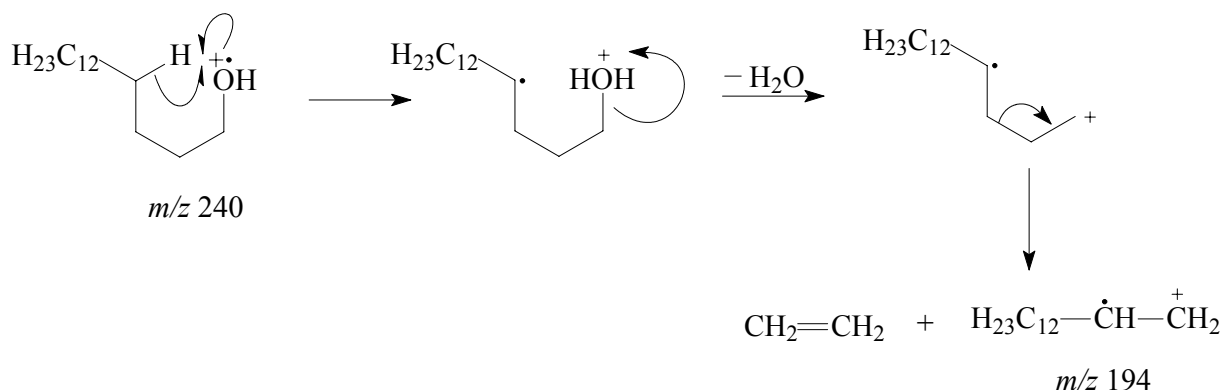


9-Heksadeken-1-ol

Daar is gevind dat slegs 10 % van die intensiteit van die  $m/z$  222 ioon bygedra word deur termiese 1,2-eliminasië van 'n watermolekule, met die balans gelewer deur 'n 1,4-eliminasië:<sup>20, 21, 22, 23, 24</sup>

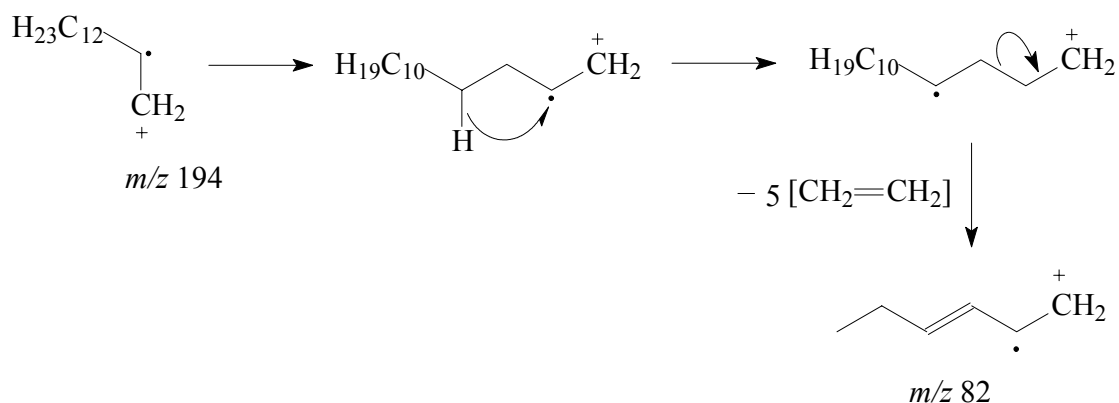


Die verlies van 'n etileenmolekule uit die  $m/z$  222 ioon om die  $[M-46]^+$  ioon by  $m/z$  194 te gee, kan vir Komponent L3841 soos volg gerasionaliseer word:<sup>24</sup>



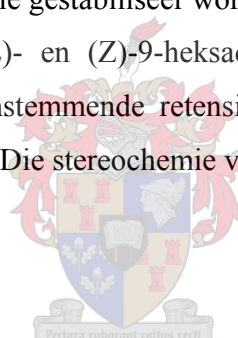
Die ioon by  $m/z$  82 (basispiek) kan moontlik toegeskryf word aan die vorming van 'n

$[M-H_2O-x(CH_2=CH_2)]^+$  ioon, wat in hierdie geval 'n  $[M-H_2O-5(CH_2=CH_2)]^+$  ioon sou wees, en wat deur 'n stapsgewyse verlies van etileenmolekules uit die  $m/z$  194 ioon gevorm word:



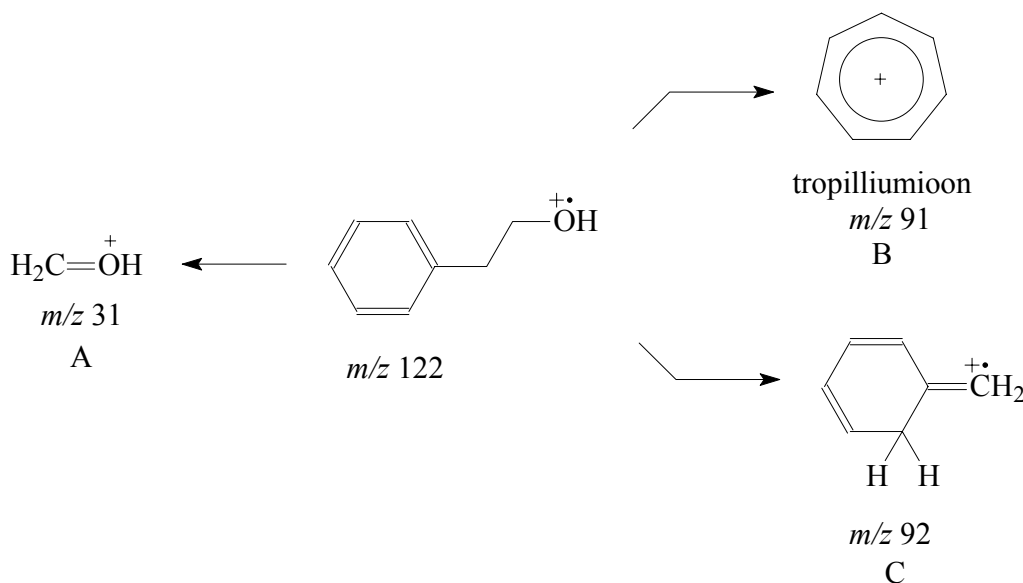
Die dryfkrag vir hierdie reaksie is die verlies van neutrale  $CH_2=CH_2$  molekules, sowel as dat die ioon by  $m/z$  82 optimaal deur resonansie gestabiliseer word.

'n Sintetiese mengsel van (E)- en (Z)-9-heksadeken-1-ol is gebruik vir retensietyd-vergelyking en op grond van ooreenstemmende retensietye, is die identiteit van Komponent L3841 as 9-heksadeken-1-ol bevestig. Die stereochemie van hierdie komponent is nog onbekend.



## 2.1.6 Aromatiese alkohole

Die massaspektrometriese fragmentasie van 2-fenieletanol volg drie hooffragmentasie-patrone.<sup>25</sup>





Kloring van die bensielbinding lei tot die alternatiewe vorming van 'n bensiliumioon (B) en in 'n mindere mate ook 'n oksoniumioon (A), terwyl 'n McLafferty-herrangskikking fragmentioon (C) lewer.

Die EI-massaspektrum van Komponent B2317 (Fig. T2.1b; Fig. 2.16) wat voorkom in die TIC van die bodamp van die Bengaalse tier se urine (Fig. T2.1b), het 'n paar prominente ione by  $m/z$  91 (basispiek) en  $m/z$  92, sowel as 'n ioon by  $m/z$  122 met 'n hoë intensiteit. Hierdie ione is kenmerkend van 2-fenieletanol. Sintetiese 2-fenieletanol is gebruik vir retensietydvergelyking en op grond van vergelyking met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup> sowel as ooreenstemmende retensietye is Komponent B2317 as 2-fenieletanol geïdentifiseer.

Die basispiek in die EI-massaspektrum van Komponent B2615 (Fig. T2.1a; Fig. 2.17) wat voorkom by  $m/z$  94, tesame met die algemene voorkoms van die spektrum, skep die indruk dat hierdie komponent aromaties en moontlik fenol mag wees.<sup>26</sup> Vergelyking met gepubliseerde spektra<sup>5</sup> bevestig bogenoemde aanname. Die molekulêre ioon by  $m/z$  94 word vergesel deur 'n  $[M-1]^+$  ioon van lae intensiteit, wat kenmerkend is van fenol.

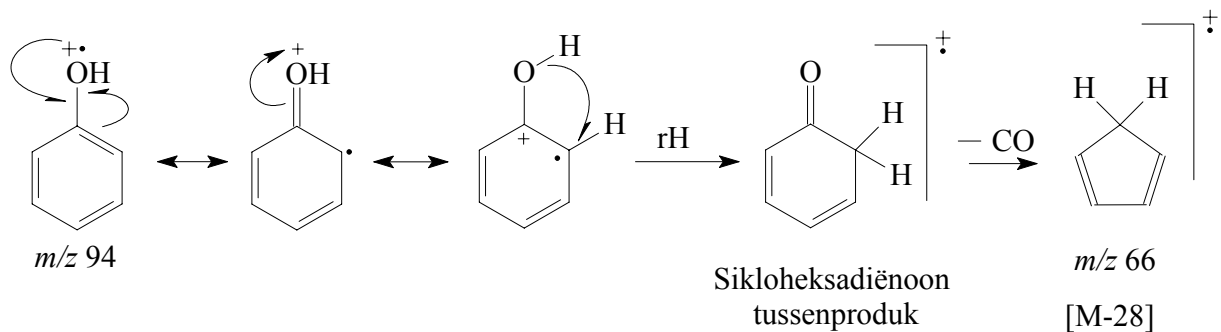


Fenol

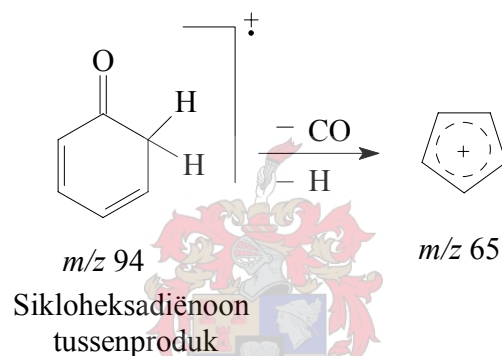
'n Belangrike fragment in die spektrum is egter die  $[M-28]^+$  ioon by  $m/z$  66. Deur gebruik te maak van akkurate massabepalingstegnieke sowel as deuteriummerking, is daar gedemonstreer dat hierdie  $m/z$  66 ioon ontstaan *via* 'n waterstofmigrasieëreaksie (aangedui as  $rH^\ddagger$ ) wat 'n sikloheksadien tussenproduk gee, gevolg deur die verlies van 'n CO-molekule.<sup>27</sup>

---

<sup>‡</sup>  $rH$  verwys na 'n waterstofherrangskikkings- of migrasieëreaksie.



Die verlies van 'n formielradikaal ( $\text{HCO}\cdot$ ) uit die molekulêre ion lewer die  $[\text{M}-29]^+$  ion met 'n hoë intensiteit.<sup>28</sup>

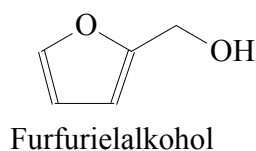


Op grond van bogenoemde oorwegings, sowel as retensietydvergelyking met die sintetiese verbinding, is bevestig dat Komponent B2615 wel fenol is.

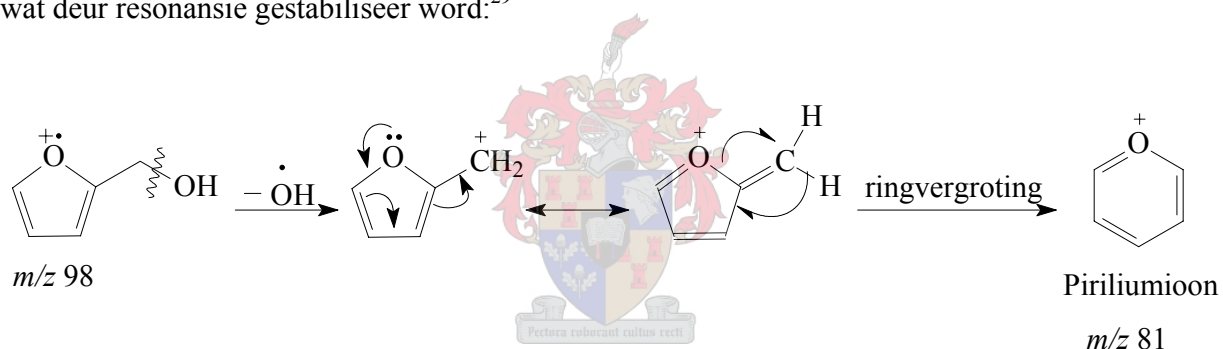
### 2.1.7 Furfurielalkohol

Die EI-massaspektrum van Komponent L1604 (Fig. T2.2a; Fig. 2.18) bevat prominente ione by  $m/z$  29, 39, 41, 53, 69, 70, 81, 97 en 98. Die interpretasie van hierdie spektrum is bemoeilik deur die aanwesigheid van ione by, onder andere,  $m/z$  109, 114, 123 en 138, wat later geblyk het nie tot die spektrum te behoort nie. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog<sup>5</sup> het egter 2-furaanmetanol, ook bekend as furfurielalkohol, met 'n massaspektrum waarin die eersgenoemde ione voorkom, as moontlike struktuur voorgestel. As die laasgenoemde paar ione buite berekening gelaat word, sou die massaspektrometriese data met hierdie struktuur versoenbaar wees.

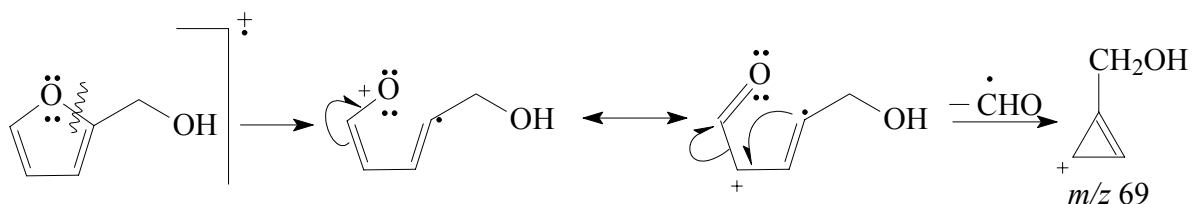
Die massaspektra van furaanverbindings het eienskappe wat tot 'n sekere mate met dié van aromatiese verbindings ooreenstem, soos byvoorbeeld die hoë stabiliteit van die verbindings se molekulêre ione. Soos in die geval van die meeste furane is die molekulêre ioon by  $m/z$  98 die basispiek in die spektrum van hierdie verbinding.



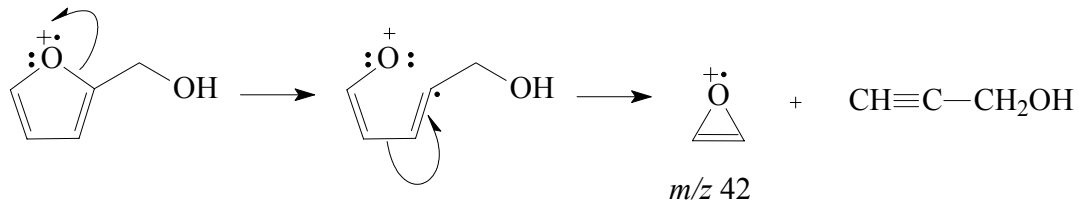
'n Verlies van 'n waterstofradikaal lewer die  $[M-1]^+$  ioon by  $m/z$  97, en verlies van 'n hidroksiegroep is verantwoordelik vir die vorming van die ioon by  $m/z$  81. Die dryfkrag vir hierdie fragmentasie reaksie is die vorming, deur ringvergroting, van die aromatiese piriliumioon, wat deur resonansie gestabiliseer word.<sup>29</sup>



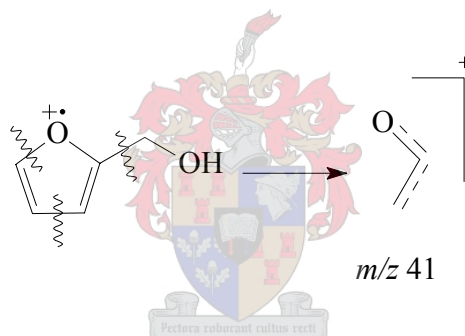
Die ioon by  $m/z$  70 word gevorm deur die eliminasië van 'n CO molekule. Hierdie feit word gestaaf deur die waarneming van 'n metastabiele ioon wat met hierdie reaksie gepaard gaan in 'n massaspektrum wat met 'n sektorinstrument met Nier-Johnson geometrie opgeneem is.<sup>30</sup> 'n Proses wat deur fragmentasie van die furaankern geïnisieer word, is verantwoordelik vir die vorming van die ioon by  $m/z$  69, en kan skematies soos volg geformuleer word:



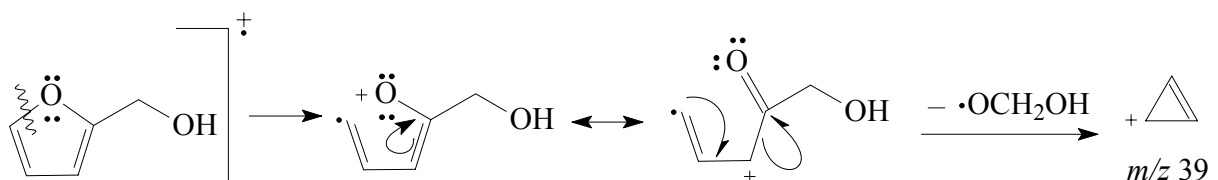
$\beta$ -Eliminasie van die hidroksiegroep, gevolg deur CO-eliminatie, lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  53  $[C_4H_5]^+$ . Budzikiewicz et al.<sup>31</sup> rasionaliseer vorming van die ioon by  $m/z$  42 in die massaspektrum van hierdie komponent soos volg:



Minstens twee moontlikhede bestaan vir die vorming van die ioon by  $m/z$  41. Dit kan moontlik gevorm word deur die verlies van 'n waterstofradikaal uit die ioon by  $m/z$  42, of dit is 'n  $[C_2HO]^+$  ioon wat soos volg ontstaan:<sup>32</sup>



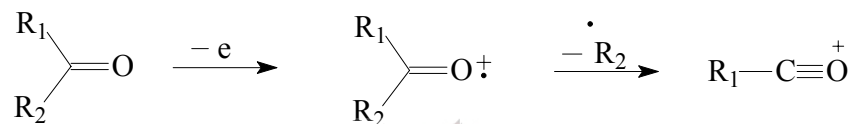
Die fragmentasie van heteroverbindings gaan dikwels gepaard met die eliminatie van die hetero-atoom in 'n neutrale fragment of verbinding.<sup>33</sup> Die aanwezigheid van 'n ioon by  $m/z$  39 in hierdie spektrum kan dus gerasionaliseer word soos hieronder geformuleer.<sup>29</sup> Die piek by  $m/z$  29 verteenwoordig die formielradikaal,  $[HCO]^+$ .



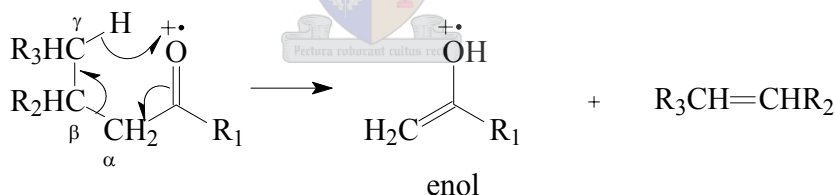
Die tentatiewe identifikasie van Komponent L1604 as furfurielalkohol op grond van inligting uit sy EI-massaspektrum, sowel as vergelyking met gepubliseerde spektra<sup>5</sup>, is bevestig deur retensietydvergeelyking met 'n kommersieel beskikbare sintetiese monster.

## 2.1.8 Versadigde alifatiese aldehiede

Verbindings wat karbonielgroepe besit volg twee hooffragmentasie-patrone. Die eerste is fragmentasie deur middel van klowing van die koolstof-koolstof binding wat  $\alpha$  ten opsigte van die karbonielgroep voorkom. Die lading bly behoue op die suurstofatoom en word gestabiliseer deur die vorming van 'n drievoudige-binding:

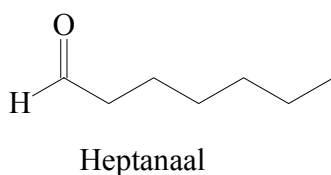


Die tweede fragmentasiepatroon is die oordrag van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom deur middel van 'n sesledige oorgangstoestand, gevolg deur  $\beta$ -klowing. Tydens hierdie proses, wat bekend staan as 'n McLafferty-herrangskikking, word 'n olefin sowel as 'n enol-ioon gevorm:<sup>34</sup>

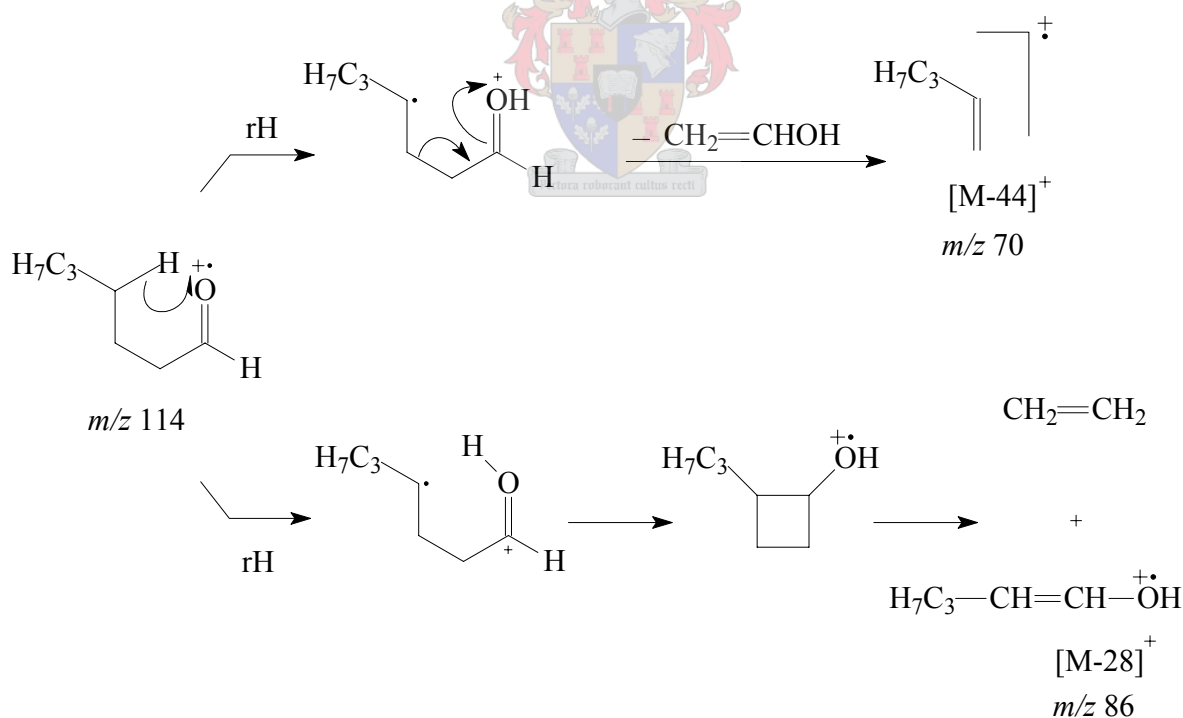


Die EI-massaspektra van Komponente L150, L258 (Fig. T2.2a; Fig. 2.19), L422 en L632 is met massaspektrometiese data<sup>5</sup> vergelyk, waarvolgens die komponente tentatief as versadigde alifatiese aldehiede geïdentifiseer is. In die spektra van die bogenoemde reeks komponente word  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  en  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$  ione waargeneem. Aldehiede met vier of meer koolstofatome en  $\gamma$ -waterstof vir oordrag na die karboniel-suurstof, ondergaan 'n McLafferty-herrangskikking. Die prominente ion wat by  $m/z$  44 in die massaspektra van aldehiede waargeneem word, is 'n enolradikaalkatoom wat volgens die bestaande skema ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ) gevorm word. Hierdie tipe ion is kenmerkend van  $\alpha$ -ongesubstitueerde aldehiede. Die basispieke van Komponente L150, L258, L422 en L632 is almal  $[\text{M}-44]^+$  ione wat toegeskryf word aan bogenoemde kenmerkende

McLafferty-herrangskikking, met die verskil dat die lading in hierdie gevalle dus op die alkeenfragment behoue bly.<sup>35</sup> Komponent L258 word as verteenwoordigend van hierdie groep aldehydverbindings beskou in die bespreking van die komponent se massaspektra. In die massaspektrum van Komponent L258 kom die ioon met die hoogste waarneembare massa by  $m/z$  114 voor. Aangesien heptanaal 'n molekulêre massa van 114 Da besit en op grond van die goeie ooreenstemming van sy massaspektrum met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup>, is Komponent L258 tentatief as heptanaal geïdentifiseer.



In die massaspektrum van hierdie verbinding kan die ioon by  $m/z$  96 toegeskryf word aan die verlies van 'n watermolekule. 'n Prominente ioon word by  $m/z$  86 waargeneem wat tipies in die massaspektra van langketting-aldehyde deur die eliminasië van etileen gevorm word.<sup>36</sup>

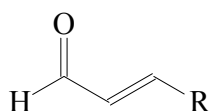


'n Reeks kommersieel beskikbare aldehydverbindings is gebruik vir retensietydvergeelyking, en daar is gevind dat Komponente L150, L258, L422 en L632

onderskeidelik heksanaal, heptanaal, oktanaal en nonanaal is. Die bogenoemde homoloë reeks geïdentifiseerde aldehyede is aanwesig in beide die lipiedfraksie en die bodamp van die urine van die Bengaalse tier.

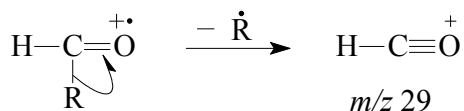
## 2.1.9 Onversadigde alifatiese aldehyede

Komponente L499 (Fig. T2.2a; Fig. 2.20), L740 (Fig. T2.2a; Fig. 2.21) en L1781 (Fig. T2.2a; Fig. 2.22) is tentatief as  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyede geïdentifiseer deur hulle massaspektra te vergelyk met gepubliseerde massaspektra.<sup>5</sup>

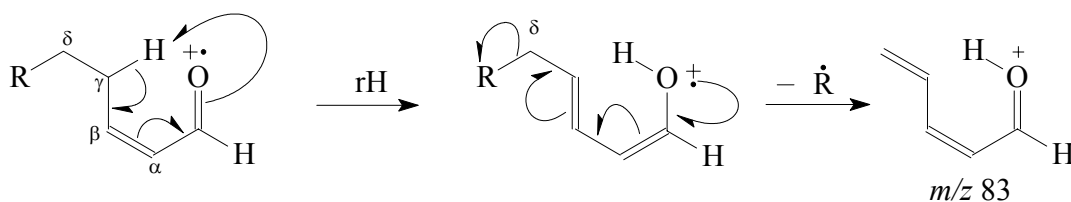


$\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyed

Die EI-massaspektra van bogenoemde komponente besit almal prominente ione by  $m/z$  41, 55, 57, 70, 83, 97. Verder het Komponente L740 en L1781 ione wat by  $m/z$  29 voorkom met hoë intensiteite. Al drie komponente het prominente  $[M-29]^+$  en  $[M-18]^+$  ione wat algemeen voorkom by alifatiese aldehyede. Die ioon by  $m/z$  29 word by aldehyede met lae molekulêre massas gevorm deur die klowing van die  $\alpha$ -binding.<sup>37</sup>



Die herrangskikking en die gelyktydige verlies van die  $\delta$ -alkiel groep uit die molekulêre ioon, is kenmerkend van die massaspektra van  $\alpha,\beta$ -onversadigde aldehyede en ketone. In die geval van Komponente L499, L740 en L1781 word hierdie ioon waargeneem by  $m/z$  83:<sup>38</sup>

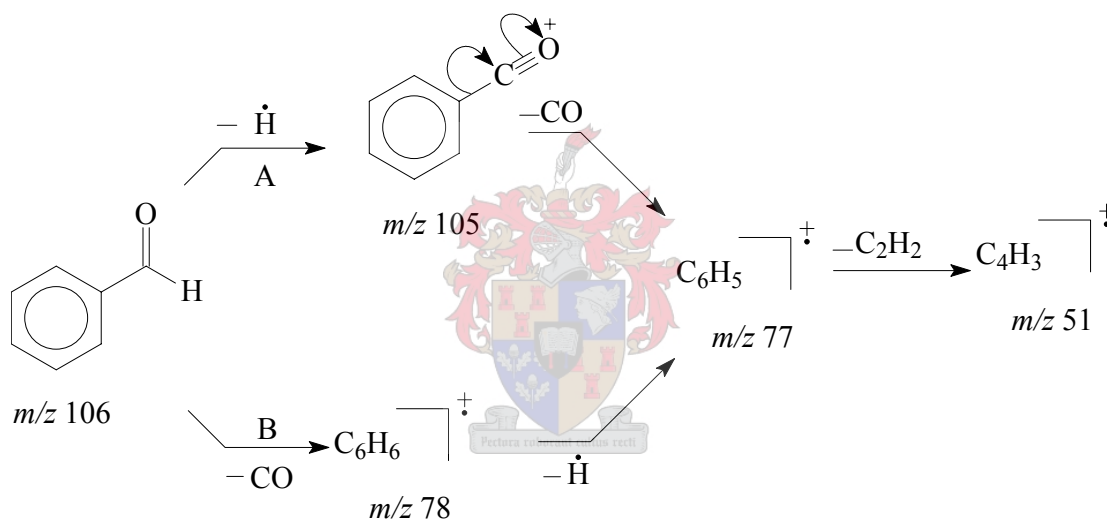




Retensiydvergeelyking met sintetiese standaarde het getoon dat die retensiyd van Komponent L499 ooreenstem met dié van (*Z*)-2-heptenaal, Komponent L740 se retensiyd ooreenstem met dié van (*E*)-2-oktenaal en dat Komponent L1781 (*Z*)-2-undekenaal is.

### 2.1.10 Aromatiese aldehied

Aromatiese aldehiedverbindings lewer molekulêre ione met hoë intensiteite. Verder gee die verlies van 'n waterstofatoom van die aldehied funksie 'n  $[M-1]^+$  ion met 'n vergelykbare intensiteit. Die volgende fragmentasiepatrone word gevolg:



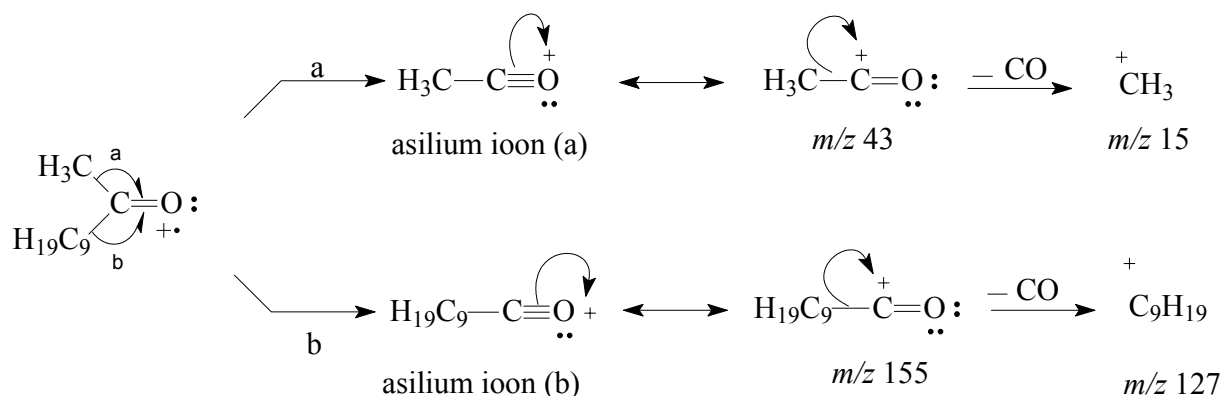
Roete A is die hoofragmentasieroete wat gevolg word.<sup>39</sup> In die EI-massaspektrum van Komponent B1040 (Fig. T2.1a; Fig. 2.23) in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a), word prominente ione waargeneem by  $m/z$  51, 77 (basispiek), 78, 105 en 106 (molekulêre ioon). Die ionpaar by  $m/z$  105 en  $m/z$  106 het omtrent dieselfde intensiteit, wat daarop dui dat Komponent B1040 moontlik bensaldehyd kan wees. Die vorming van die prominente ione teenwoordig in Komponent B1040 se spektrum word verduidelik in die bostaande skema. Op grond van hierdie inligting, sowel as retensiydvergeelyking met 'n sintetiese monster, is Komponent B1040 as bensaldehyd geïdentifiseer.

### 2.1.11 Versadigde alifatiese alkanone

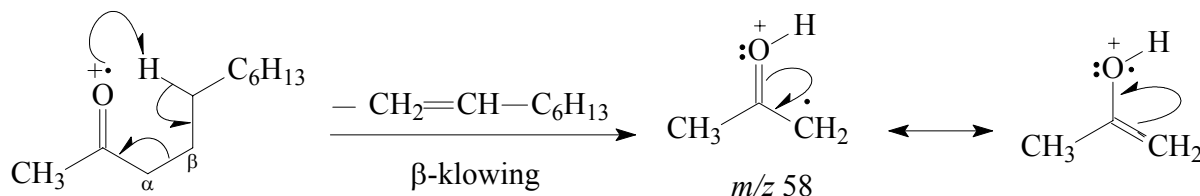
Soos in die geval van aldehyede, kan die hooffragmentasiepatrone van 2-alkanone die beste verklaar word deur aan te neem dat die lading van die molekulêre ioon op die karbonielgroep gelokaliseer is. Die klowing van die  $\alpha$ -bindings speel 'n belangriker rol by ketone as wat die geval by aldehyede is. Daar is gevind dat  $m/z$  43  $[\text{CH}_3\text{CHO}]^+$  die basispiek is by 'n reeks vertakte- en onvertakte metielketone, en dat die ioon by  $m/z$  57,  $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}]^+$ , die basispiek is in die spektra van etielketone.<sup>40</sup>

Die EI-massaspektra van Komponente B254 (Fig. T2.1a; Fig. 2.24), B439, B713, B1026, B1386 (Fig. T2.1a; Fig. 2.25) en L3368 (Fig. T2.2b; Fig. 2.26) wat voorkom in die TIC van die bodamp van die urine (Fig. T2.1a) sowel as in die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier (Fig. T2.2b), vertoon prominente ione by  $m/z$  43 (basispiek) en  $m/z$  58. Bogenoemde komponente het hoë intensiteit molekulêre ione by onderskeidelik  $m/z$  114,  $m/z$  128,  $m/z$  142,  $m/z$  156,  $m/z$  170 en  $m/z$  254, wat kenmerkend is van versadigde, onvertakte metielketone. Die komponente is tentatief geïdentifiseer as 2-heptanoon (B254), 2-oktanoon (B439), 2-nonanoon (B713), 2-dekanoon (B1026), 2-undekanoon (B1386) en 2-heptadekanoon (L3368).

Komponent B1386 word as verteenwoordigend van hierdie groep gebruik in die bespreking van versadigde, alifatiese metielketone se fragmentasiepatrone. In die massaspektrum van hierdie komponent vind klowing van die koolstof-koolstof binding  $\alpha$  ten opsigte van die karbonielgroep, soos volg plaas:



In die EI-massaspektrum van hierdie komponent lewer die vorming van 'n asiliumioon die basispiek by  $m/z$  43 en die ioon by  $m/z$  58 word gevorm deur 'n  $\beta$ -klowing wat deur middel van 'n McLafferty-herrangskikking plaasvind.<sup>41</sup>



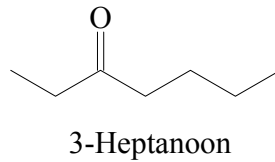
Soos reeds bespreek in §2.1.2, dra  $\gamma$ -klowing moontlik by tot die intensiteit van die prominente ioon by  $m/z$  71.<sup>12</sup> 'n Reeks sintetiese monsters is gebruik vir GC-retensiedyvergelyking en die metielketone is as 2-heptanoon (B254), 2-oktanoon (B439), 2-nonanoon (B713), 2-dekanoon (B1026), 2-undekanoon (B1386) en 2-heptadekanoon (L3368) geïdentifiseer.

Komponent L2039 (Fig. T2.2a; Fig. 2.27) is ook een van die reeks 2-alkanone, hoewel die algemene voorkoms van die EI-massaspektrum van hierdie komponent van dié van die ander 2-alkanone verskil wat betref die relatiewe intensiteite van die ione by  $m/z$  58 en  $m/z$  43. Retensiedyvergelyking met sintetiese 2-tridekanoon het dan ook die identifikasie van Komponent L2039 as 2-tridekanoon bevestig.

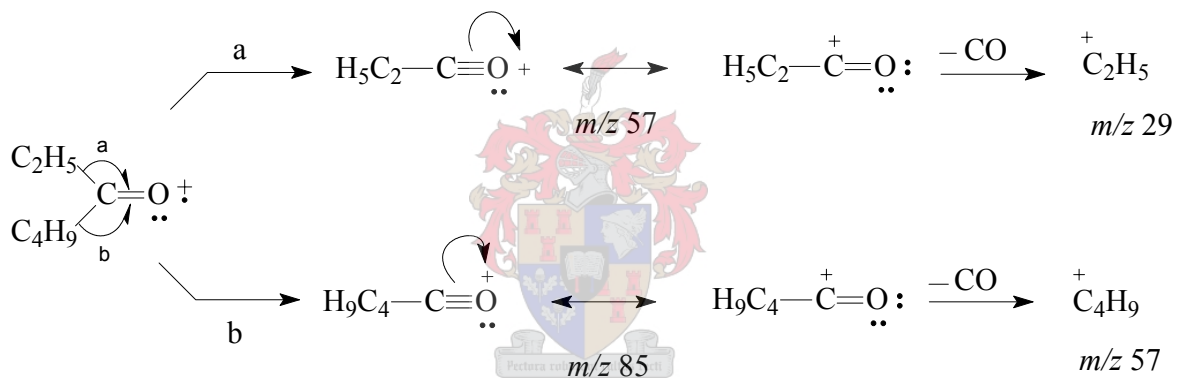
Die EI-massaspektrum van Komponent B2732 (Fig. T2.1a; Fig. 2.28) stem ooreen met die EI-massaspektrum van Komponent L2039 (Fig. T2.2a; Fig. 2.27). Die basispieke vir beide komponente kom by  $m/z$  58 voor, sowel as prominente ione by  $m/z$  43, 71 en 85. Op grond van die ooreenstemmende spektra, sowel as 'n voorstel deur 'n gerekenariseerde biblioteek,<sup>5</sup> is Komponent B2732 tentatief geïdentifiseer as 2-pentadekanoon. Die hipotese is bevestig deur retensiedyvergelyking met 'n reeks kommersieel beskikbare sintetiese 2-alkanone.

Soos reeds genoem, is die herrangskikking van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom gevolg deur  $\beta$ -klowing (McLafferty) 'n belangrike proses wat ione met ewe massas lewer, onderskeidelik by  $m/z$  58 en 72 in die spektra van 2- en 3-alkanone. Die aanwesigheid van die prominente ionpaar by  $m/z$  57 en 72 is 'n sterk aanduiding dat Komponent B213 (Fig. T2.1a; Fig. 2.29) 'n versadigde 3-alkanoon is. Aangesien die molekulêre ioon van hierdie komponent, net soos die geval was by Komponent B254, by  $m/z$  114 aanwesig is, is Komponent B213 tentatief as 3-heptanoon

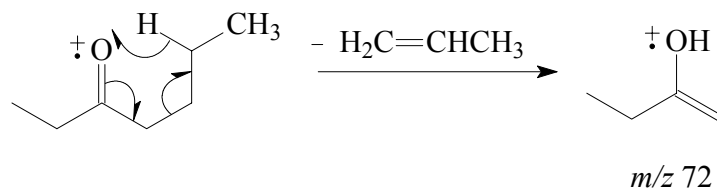
geïdentifiseer. Hierdie afleiding word ondersteun deur vergelyking van die betrokke massaspektrum met gepubliseerde massaspektrometriese data.<sup>5</sup>



Die twee prominente ione wat by  $m/z$  57 (basispiek) en  $m/z$  29 in die massaspektrum van Komponent B213 (Fig. T2.1a; Fig. 2.29) voorkom, kan verklaar word deur die klowing van die koolstof-koolstof binding  $\alpha$  ten opsigte van die karbonielgroep, om 'n resonansie-gestabiliseerde asiliumioon te vorm, waarna die asiliumioon 'n molekule CO verloor:<sup>40</sup>



Soos hierbo genoem, is 'n McLafferty-herrangskikking verantwoordelik vir die vorming van die prominente ion by  $m/z$  72:



Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese 3-heptanoon is uitgevoer, wat die identifikasie van Komponent B213 bevestig het.

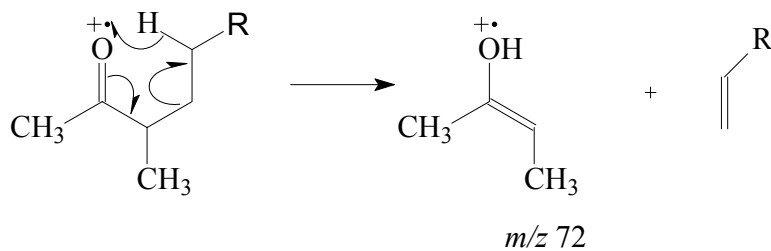
### 2.1.12 Versadigde vertakte alifatiese ketone

'n Homoloë reeks van komponente, B478 (Fig. T2.1a; Fig. 2.30), B754 (Fig. T2.1a; Fig. 2.31) en B1079 (Fig. T2.1a; Fig. 2.32), is in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a) aanwesig. Hulle massaspektra bevat almal 'n prominente ioon by  $m/z$  43 (basispiek) waaruit afgelei sou kon word dat hulle metielketone is,<sup>40</sup> terwyl die afwesigheid van 'n prominente ioon by  $m/z$  58 en die aanwesigheid van 'n prominente ioon by  $m/z$  72 weer daarop kon dui dat hulle 3-alkanone sou kon wees. Daar is egter gevind dat die retensietye van hierdie komponente nie met dié van sintetiese onvertakte 2- of 3-alkanone ooreengestem nie. Die genoemde massaspektrometriese data is egter ook met dié van 3-metiel-2-alkanone versoenbaar.<sup>5</sup>

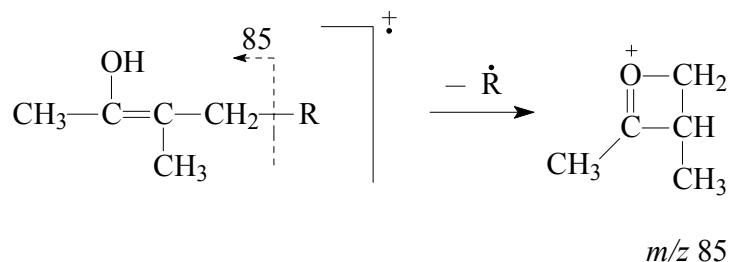
Hierdie komponente het almal duidelik waarneembare molekulêre ione by onderskeidelik  $m/z$  142 ( $C_9H_{18}O$ ), 156 ( $C_{10}H_{20}O$ ) en 170 ( $C_{11}H_{22}O$ ). Die vorming van die basispiek, volg die algemene  $\alpha$ -klowing fragmentasiepatroon wat by alle 2-alkanone waargeneem word:



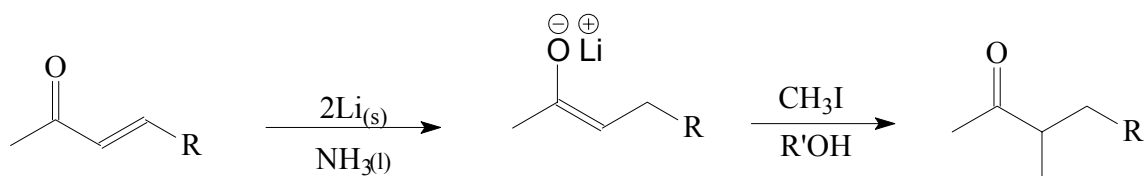
Die prominente ioon by  $m/z$  72 in die massaspektra van hierdie vier 3-metielvertakte-metielketone word soos volg deur 'n McLafferty-herrangskikking gevorm:



Nog 'n prominente ioon word in die betrokke massaspektra by  $m/z$  85 waargeneem en soos dit die geval was by die vorige homoloë reeks metielketone, dra  $\gamma$ -klowing moontlik hier ook by tot die intensiteit van hierdie ioon.<sup>12</sup>



3-Metiel-2-oktanoon en 3-metiel-2-nonanoon is volgens die onderstaande reaksieskema gesintetiseer (§ 3.4.1) en vir retensietydvergelyking gebruik:



R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> en C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>  
 R'OH = *t*-Butielakohol

Die reduksie-metileringsprotokol wat oorspronklik deur Stork et al.<sup>42</sup> ontwikkel is, verskaf 'n uitstekende metode om die  $\alpha$ -posisie van onsimmetriese ketone direk te alkileer. Hierdie metode behels:

- (1) die vorming van 'n spesifieke litiumenolaat van 'n onsimmetriese ketoon deur die ooreenstemmende  $\alpha,\beta$ -onversadigde ketoon te reduceer met twee ekwivalente litium in vloeibare ammoniak, en
- (2) die reaksie van hierdie enolaat met een ekwivalent van 'n alkileringsreagens in vloeibare ammoniak of in 'n ander oplosmiddelsistiem.

Die sukses van hierdie metode word bepaal deur die feit dat alkilering van spesifieke litiumenolate (eerder as ander metaalenolate) van onsimmetriese ketone met relatiewe reaktiewe alkileringsreagente in 'n verskeidenheid van oplosmiddels vinniger plaasvind as wat die ekwilibrium tussen struktureel-isomeriese enolate *via* protonoordrag-reaksies ingestel kan word.<sup>42</sup>

Wanneer die reaksie uitgevoer word met 'n ekwivalente hoeveelheid protondonor, gewoonlik *t*-butielalkohol, wat saam met die enoon by die oplossing van litium in vloeibare

ammoniak gevoeg word, word 'n beter opbrengs verkry en kan die suiwer produk maklik geïsoleer word deur eenvoudige distillasie van die reaksiemengsel. Die rol wat die protondonor speel om 'n meer volledige reduksie van die  $\beta$ -ongesubstitueerde enone te verseker, kon nog nie verklaar word nie. Een moontlikheid is dat dit keer dat die kompeterende syreaksies van die enoon met die litiumamied, wat die reduksieproses kan vertraag, plaasvind. Gekonjugeerde enolaatvorming, 1,2-, en 1,4-addisie, is moontlike reaksies van die enoon met die litiumamied wat die enoon sal omskakel na 'n spesie wat nie gereduseer kan word nie. Die protondonor kan moontlik hierdie reaksies keer deur die tempo van reduksie te verhoog, of deur met die litiumamied te reageer soos dit gevorm word. Daar is gevind dat poli-alkilering van die  $\alpha,\beta$ -onversadigde ketoon feitlik heeltemal geëlimineer word deur van een ekwivalente hoeveelheid water as 'n protondonor gebruik te maak eerder as *t*-butielalkohol. Deur van water in plaas van *t*-butielalkohol gebruik te maak, word litiumhidroksied wat 'n relatiewe swak basis is en dus nie so effektief as litium-*t*-butoksied is om enolisering van die alkileringsprodukte te promoveer nie, gevorm.<sup>43</sup>

Die rol wat die verskillende protondonors tydens die reduksieproses speel, word geïllustreer deur die resultate wat in die huidige navorsingsprojek behaal is met die sintese van die 3-metiel-2-ketone. In die sintese van 3-metiel-2-nonanoon is *t*-butielalkohol as protondonor gebruik, en 16 % poligealkileerde 2-nonanoon is as neweprodukte gevorm. Om te vergelyk, is water as protondonor gebruik in die sintese van 3-metiel-2-oktanoon en slegs 6 % poligealkileerde 2-oktanoone was in die produk aanwesig. Volgens GC-MS-analises het hierdie sinteses 3-metiel-2-oktanoon in 'n opbrengs van 52 % en 3-metiel-2-nonanoon in 'n opbrengs van 60 % gelewer. Die TIC van die mengsel van produkte wat in die sintese van 3-metiel-2-oktanoon verkry is, verskyn in Fig. 2.33 en die ketoon se EI-massaspektrum in Fig. 2.34 terwyl die ooreenstemmende inligting vir 3-metiel-2-nonanoon in onderskeidelik Fig. 2.35 en Fig. 2.36 gegee word.

Op grond van retensietydvergelyking met die gesintetiseerde 3-metiel-2-alkanone, sowel as inligting verkry uit die komponente se EI-massaspektra, is Komponente B478 en B754 as 3-metiel-2-oktanoon en 3-metiel-2-nonanoon onderskeidelik geïdentifiseer. Die onversadigde ketoon, 3-deken-2-oon, kon nie betyds vir die sintese van 3-metiel-2-dekanoon bekom word nie, maar volgens die massaspektrum van Komponent B1079 en die retensietydinkremente tussen

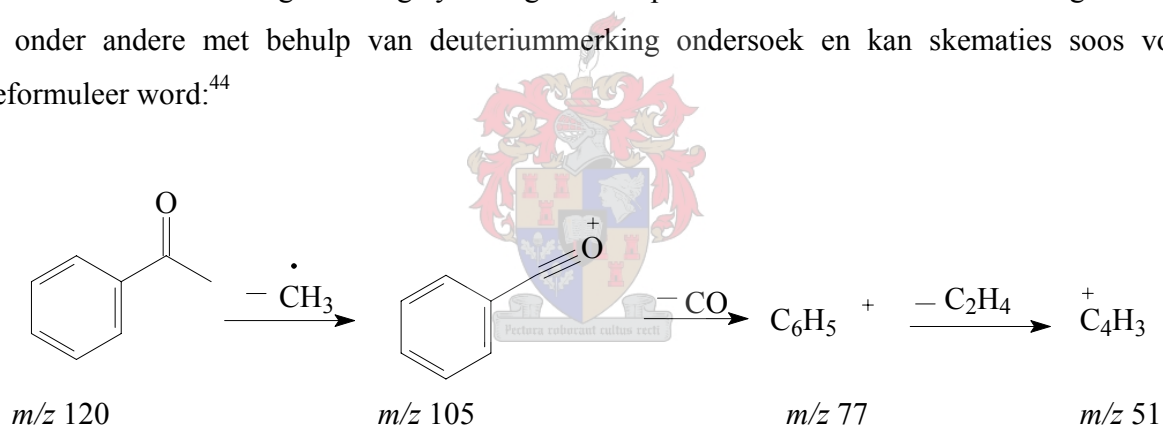


hierdie komponent en die ander 3-metiel-2-ketone, is Komponent B1079 as 3-metiel-2-dekanoon geïdentifiseer.

### 2.1.13 Aromatiese ketoon

Die mees opvallende kenmerke van die EI-massaspektrum van Komponent B1447 (Fig. T2.2a; Fig. 2.37), wat voorkom in die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.2a), is die baie prominente ione by  $m/z$  120, wat moontlik die molekulêre ioon van die verbinding kan wees, 'n ioon by  $m/z$  105, wat moontlik 'n  $[M-15]^+$  ioon kan wees en 'n ioon by  $m/z$  77, wat 'n  $[M-15-28]^+$  ioon kan wees, en dus waarskynlik deur die verlies van 'n CO-groep uit die ioon by  $m/z$  105 gevorm word. Hierdie komponent is dus klaarblyklik 'n aromatiese karbonielverbinding en is tentatief as asetofenoon geïdentifiseer.

Asetofenoon volg 'n soortgelyke fragmentasiepatroon as bensaldehyd. Die fragmentasie is onder andere met behulp van deuteriummerking ondersoek en kan skematies soos volg geformuleer word:<sup>44</sup>

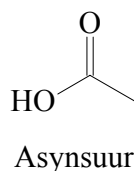


Die EI-massaspektrum van Komponent B1447 stem baie goed ooreen met dié van asetofenoon<sup>44</sup> en retensietydvergelyking met die kommersieel beskikbare ketoon het die teenwoordigheid van hierdie komponent in die reukmerkvlouistof van die Bengaalse tier bevestig.

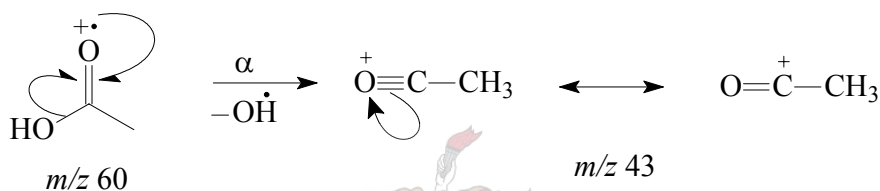
### 2.1.14 Versadigde alifatiese karboksiesure

In die EI-massaspektrum van Komponent L1011 (Fig. T2.2a; Fig. 2.38) kom daar prominente ione voor by  $m/z$  43 (basispiek),  $m/z$  45 en  $m/z$  60 (molekulêre ioon), wat tipies

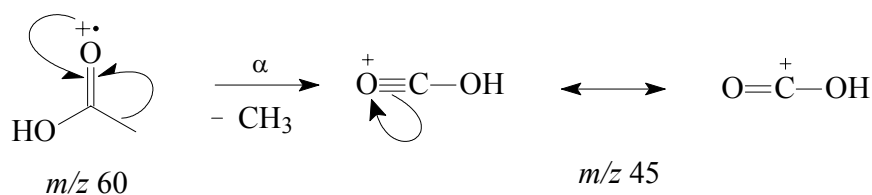
voorkom in die massaspektrum van asynsuur. Retensietydvergelyking met 'n reeks karboksiesuurverbindings het bevestig dat Komponent L1011 wel asynsuur is.



Die basispiek in asynsuur se EI-massaspektrum is afkomstig van 'n eenvoudige  $\alpha$ -klowings-reaksie:



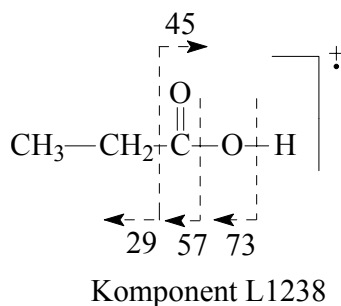
Die vorming van die prominente ioon by  $m/z$  45 blyk op die eerste oogopslag ook afkomstig te wees van 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie, soos dit die geval is by die vorming van die basispiek.<sup>45</sup>



Dit is egter nie die geval nie. Daar is bewys dat die ioon by  $m/z$  45 die molekulêre samestelling  $[\text{OC}_2\text{H}_5]^+$  besit, en dat dit nie 'n  $[\text{COOH}]^+$  fragment is nie. Die vormingsmeganisme vir die  $[\text{OC}_2\text{H}_5]^+$  ioon is tans nie bekend nie.<sup>46</sup>

Die EI-massaspektrum van Komponent L1238 (Fig. T2.2a; Fig. 2.39) het 'n prominente ioonpaar by  $m/z$  74 en 73. Hierdie ione is kenmerkend van propanoësuur en verteenwoordig die molekulêre ioon en die  $[\text{M}-1]^+$  ioon onderskeidelik.<sup>47</sup> Laasgenoemde ioon word gevorm deur die eliminasië van die karboksiesuurproton. Komponent L1238 se massaspektrum stem goed ooreen

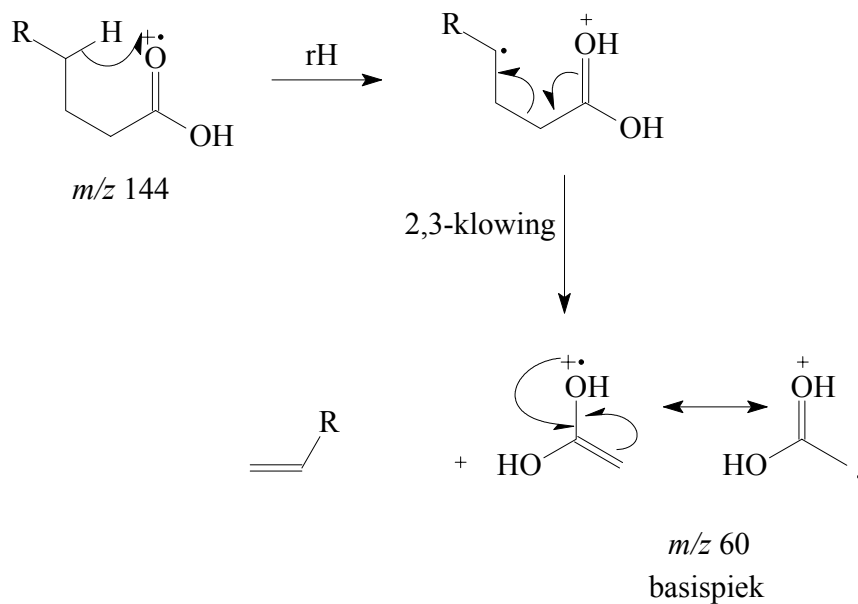
met die gepubliseerde massaspektrum<sup>5</sup> van propanoësuur en dié komponent is dus tentatief as sodanig geïdentifiseer. Die ioon wat by  $m/z$  57 in die betrokke spektrum voorkom, word gevorm deur 'n verlies van 'n hidroksielgroep deur  $\alpha$ -klowing. Hierdie en ander eenvoudige fragmentasiereaksies wat die molekulêre ioon kan ondergaan, kan skematies soos volg voorgestel word:



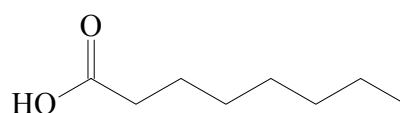
Die tentatiewe identifikasie van Komponent L1238 as propanoësuur is met behulp van retensietydvergelyking bevestig.

In die spektra van kortketting alifatiese karboksielsure is die belangrikste eienskap die basispiek wat by  $m/z$  60 vorm, mits daar 'n  $\gamma$ -waterstofatoom beskikbaar is vir oordrag tydens 'n McLafferty-herrangskikking. Hierdie sure het oor die algemeen redelik prominente molekulêre ione, waarvan die relatiewe intensiteit toeneem saam met toenemende molekulêre massa van onvertakte alifatiese sure wat meer as ses koolstofatome besit.<sup>48</sup>

Die EI-massaspektra van Komponente L1501, L1840, L2181, L2512, L2835 (Fig. T2.2a; Fig. 2.40) en L3148 in die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier (Fig. T2.2a en Fig. T2.2b) word gekarakteriseer deur die teenwoordigheid van 'n prominente ioon by  $m/z$  60, wat aandui dat al hierdie komponente nie  $\alpha$ -vertak kan wees nie.<sup>48</sup> Nadat 'n alifatiese onvertakte karboksielsuur deur elektronimpak in die massaspektrometer geïoniseer is, vind daar naamlik 'n McLafferty-herrangskikking plaas wat die volgende ioon gee:<sup>49</sup>



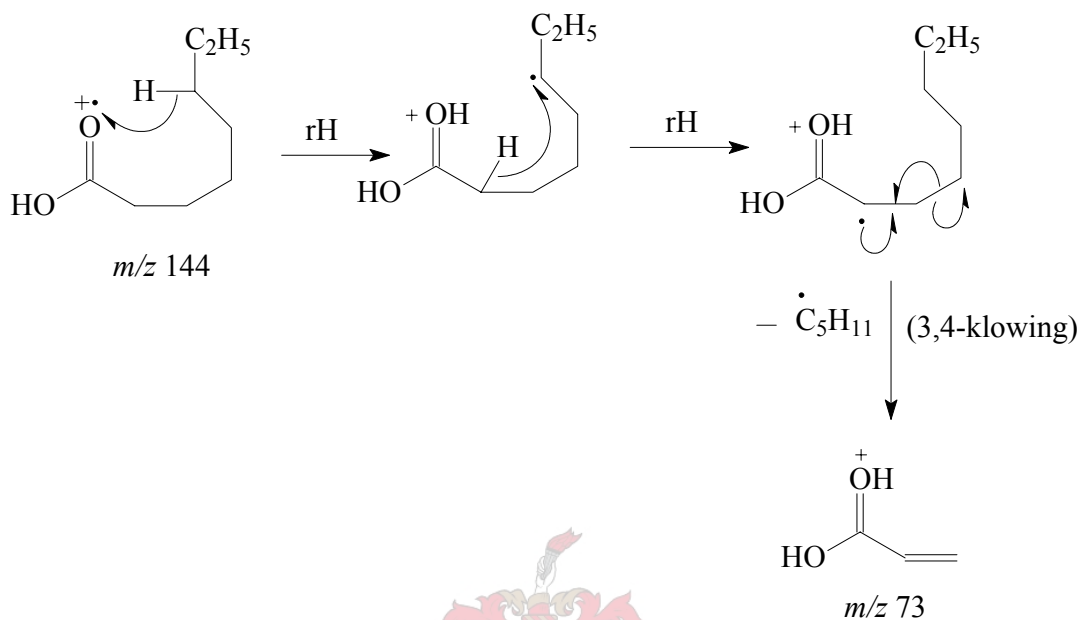
Die EI-massaspektrum van Komponent L2835 (Fig. T2.2b; Fig. 2.40) word gesien as verteenwoordigend van dié reeks alifatiese sure, en word in die bespreking van die sure se fragmentasiepatrone gebruik. Aangesien alifatiese sure wat meer as ses koolstofatome besit oor relatief prominente molekulêre ione beskik, is aanvaar dat die ioon by  $m/z$  144 die molekulêre ioon van hierdie komponent is, en hierdie aanname is bevestig deur middel van CIMS (Fig. 2.41). Die komponent is dus tentatief geïdentifiseer as oktanoësuur, met molekulêre formule  $C_8H_{16}O_2$ , of as 'n iso- of anti-isovertakte oktanoësuur.



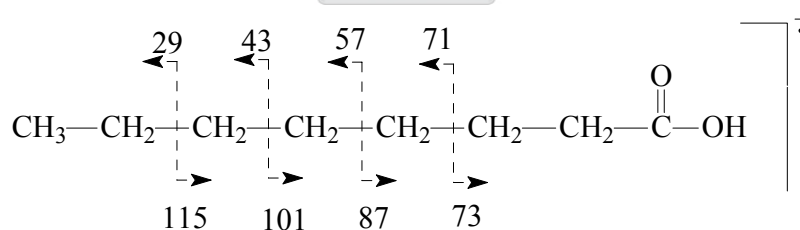
Oktanoësuur

Die basispiek in die betrokke massaspektrum by  $m/z$  60 word gevorm deur 'n McLafferty-herrangskikking soos hierbo geformuleer. Die ioon by  $m/z$  73 is nog 'n prominente ioon wat in die reeks kortketting alifatiese karboksiesure voorkom. Hierdie ioon word gevorm deur die oordrag van 'n waterstofatoom van C6 na die geïoniseerde suurstofatoom, gevolg deur waterstofoordrag van C2 na C6 waarna 3,4-klowing plaasvind. Die dryfkrag vir hierdie reaksie is

die hoë stabiliteit van die  $\alpha,\beta$ -onversadigde, geprotoneerde karbonielsisteem. Die [McLafferty+13]<sup>+</sup> ion wat vorm, vergesel gewoonlik die McLafferty-herrangskikking ion:<sup>50</sup>



Ander eenvoudige fragmentasiereaksies wat die molekulêre ion moontlik kan ondergaan, kan skematies soos volg voorgestel word:



#### Komponent L2835

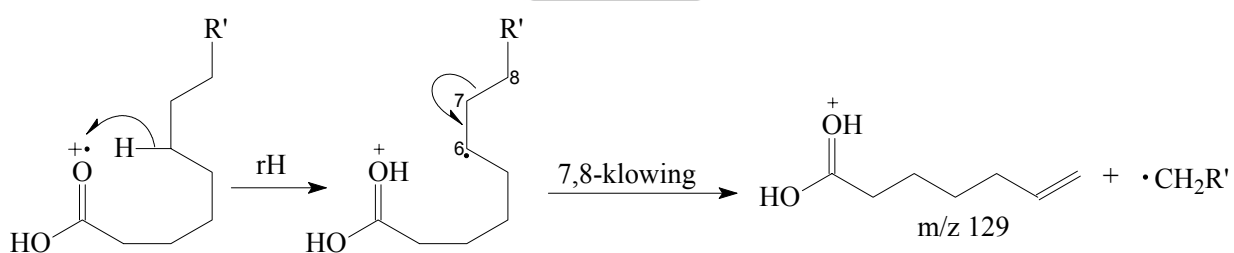
Daar is geen verduideliking tot dusver in die literatuur beskikbaar vir die teenwoordigheid van die relatief prominente ion by  $m/z$  41 in die spektrum van oktanoësuur nie. Hoë-resolusie massaspektrometrie het egter getoon dat die elementsamestelling van hierdie fragment  $C_3H_5$  is.<sup>47</sup>

Op grond van hul retensietye en inligting verkry uit die komponente se massaspektra, is Komponente L1501, L1840, L2181, L2512, L2835 en L3148 geïdentifiseer as onderskeidelik

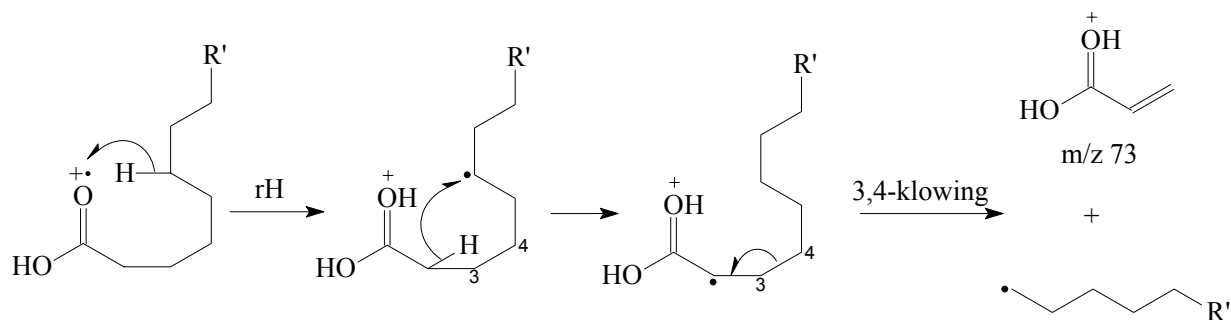
butanoësuur, pentanoësuur, heksanoësuur, heptanoësuur, oktanoësuur, en nonanoësuur, dit wil sê as die onvertakte karboksiësure.

Die EI-massaspektra van Komponente L3449, L3582, L4015 (Fig. T2.2b; Fig. 2.42), L4616 (Fig. T2.2b; Fig. 2.43), L4826 (Fig. T2.2b; Fig. 2.44), L5062 (Fig. T2.2b; Fig. 2.45) en B5450 (Fig. T2.1b; Fig. 2.46) het almal prominente ione by  $m/z$  60, 73, 115 en 129. In die massaspektra van Komponente L4616, L4826, L5062 en B5450 is 'n ioon by  $m/z$  185 met 'n hoë intensiteit ook waarneembaar. Hierdie bogenoemde ioon is kenmerkend van langketting alifatiese karboksiësure, en hierdie komponente is dus op grond van hulle massaspektra as sodanig geïdentifiseer. Soos reeds genoem in die geval van kortketting-karboksiësure, dui 'n ioon by  $m/z$  60 op 'n karboksiësuur wat nie  $\alpha$ -vertak is nie. Uit retensietydvergelyking met die sintetiese verbindings is vasgestel dat hierdie sure ook nie in ander posisies vertak kan wees nie.

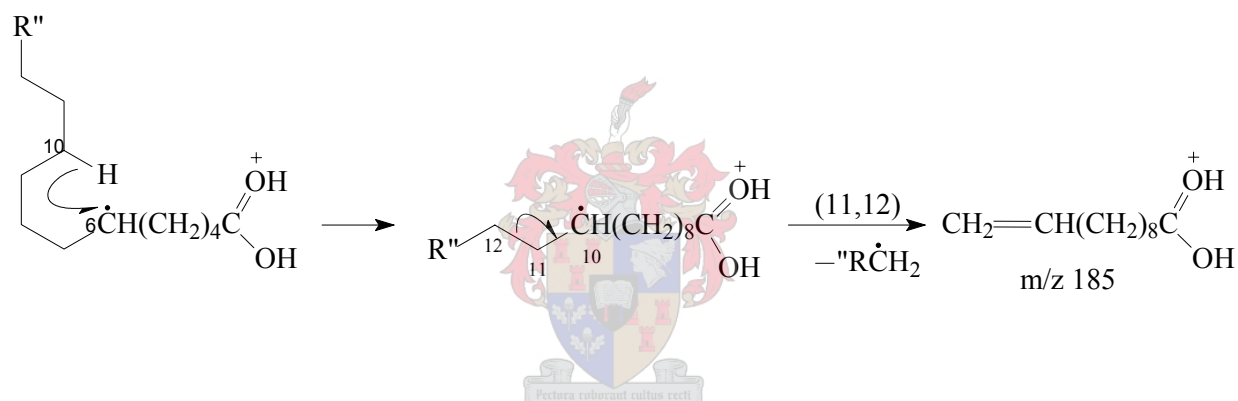
Langketting-vetsure lewer stabiele ione met die algemene formule  $[(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]^+$ , met  $n = 2, 6, 10, \dots$ . Prominente ione kom dus byvoorbeeld by  $m/z$  73, 115, 129 en 185 in hierdie spektra voor. In die geval van die ioon by  $m/z$  129 word 'n waterstofradikaal oorgedra van C6 na die geïoniseerde suurstof, waarna die 7,8-binding gekloof word om hierdie ioon by  $m/z$  129 te vorm. Hierdie ioon is meer prominent in die massaspektra van langketting-karboksiësure as die ander lede van die bogenoemde reeks ione.



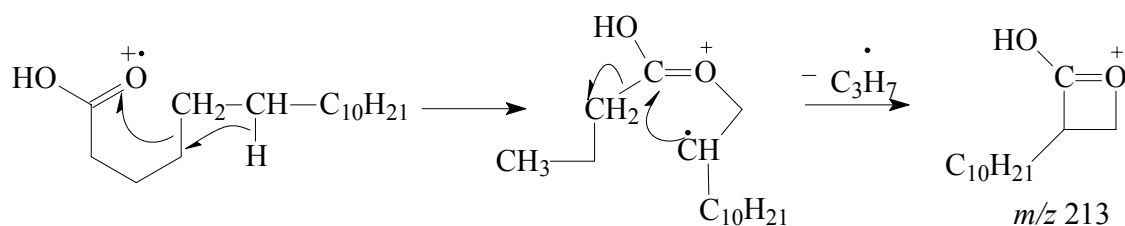
'n Ander alternatief is dat daar ná die genoemde waterstofradikaaloordrag 'n verdere waterstofradikaal oorgedra word van C2 na C6, waarna die 3,4-binding gekloof word om die ioon by  $m/z$  73 te vorm.<sup>51</sup>



Die ion wat voorkom in die EI-massaspektra van Komponente L4616, L4826, L5062 en B5450 by  $m/z$  185 word gevorm deur die klowing van die 11,12-binding, nadat 'n radikaal op C10 gevorm is:<sup>51</sup>



In hierdie spektra is die  $[\text{M}-43]^+$  ion ook prominent, byvoorbeeld by  $m/z$  213 in die massaspektrum van heksadekanoësuur. Hierdie ion word gevorm deur die eliminasië van C2, C3 en C4, saam met 'n addisionele waterstofatoom:<sup>51</sup>



Die aanwesigheid van 'n ion by  $m/z$  60 word algemeen aanvaar as 'n goeie aanduiding dat die betrokke verbinding 'n alifatiese karboksiesuur kan wees. Somtyds is hierdie ion relatief swak en die massaspektra van ander verbindings bevat ook soms 'n  $m/z$  60 ion. Die

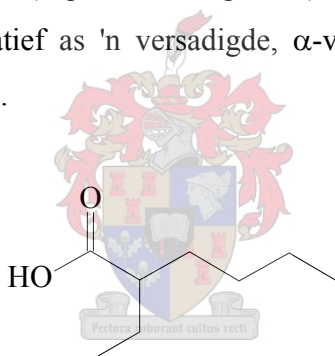


aanwesigheid van 'n prominente ioon by  $m/z$  129 is 'n meer betroubare aanduiding dat die verbinding 'n langketting-karboksielsuurverbinding kan wees. Prominente molekulêre ione is ook meestal in die massaspektra van die alifatiese karboksielsure sigbaar, sodat daar met inagneming van die  $[M-43]^+$  ioon afgelei kan word hoeveel koolstofatome die suur besit.

Komponente L3449, L3582, L4015, L4616, L4826, L5062 en B5450 is geïdentifiseer as onderskeidelik dekanooësuur, undekanoësuur, dodekanoësuur, tetradekanoësuur, pentadekanoësuur, heksadekanoësuur en oktadekanoësuur. Die identifikasie van die karboksielsure is met behulp van retensietydvergelyking bevestig.

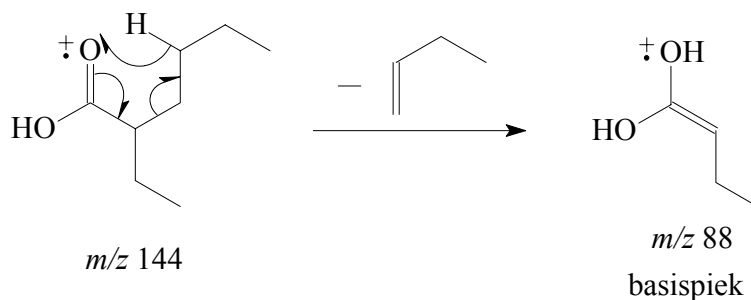
### 2.1.15 Versadigde vertakte alifatiese karboksielsure

Komponent B2492 wat voorkom in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier se EI-massaspektrum (Fig. T2.1a; Fig. 2.47) is met gepubliseerde data<sup>5</sup> vergelyk, waarvolgens die komponent tentatief as 'n versadigde,  $\alpha$ -vertakte karboksielsuur, naamlik 2-etielheksanoësuur, geïdentifiseer is.

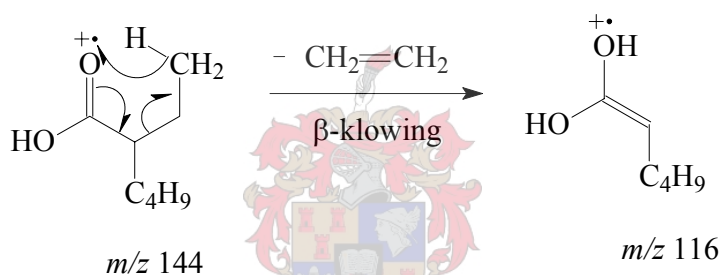


2-Etielheksanoësuur

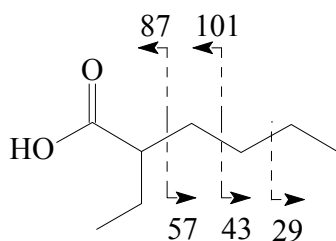
Die afwesigheid van 'n ioon by  $m/z$  60 bevestig hierdie aanname, aangesien 'n ioon by  $m/z$  60 in die massaspektra van langketting-karboksielsure dui op 'n karboksielsuur wat nie  $\alpha$ -vertak is nie.<sup>48</sup> Prominente ione wat in Komponent B2492 se spektrum voorkom is by  $m/z$  73,  $m/z$  88 (basispiek),  $m/z$  101  $[M-43]^+$  en by  $m/z$  116  $[M-28]^+$ . Alhoewel die ioon by  $m/z$  144 'n lae intensiteit besit (0.48 %), is aanvaar dat dit die molekulêre ioon is, wat ooreenstem met die molekulêre massa van 2-etielheksadekanoësuur. Komponent B2492 se basispiek word gevorm deur die oordrag van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom na die karboniel-suurstof, gevolg deur 'n McLafferty-herrangskikking:



Die prominente ioon by  $m/z$  73 is 15 atoommassa-eenhede verwyder van die ioon by  $m/z$  88, en kan moontlik gevorm word deur die verlies van 'n metielgroep uit die basispiek. Nog 'n belangrike ioon wat by  $m/z$  116 voorkom, word deur 'n ander McLafferty-herrangskikking wat ook kan plaasvind gevorm:



Ander eenvoudige fragmentasiereaksies wat die molekulêre ioon kan ondergaan, kan skematies soos volg voorgestel word:



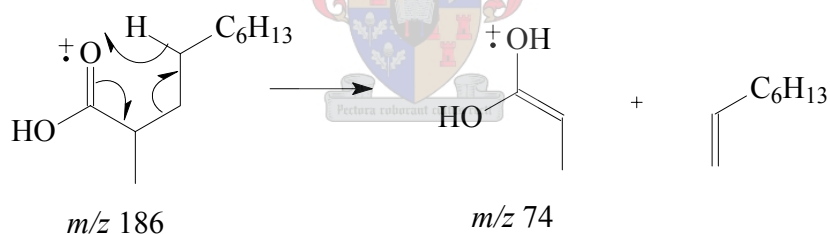
Komponent B2492

Op grond van retensietydvergeelyking met 'n beskikbare kommersiële standaard, sowel as die data verkry uit die massaspektrum, is Komponent B2492 as 2-etieselheksanoësuur geïdentifiseer.

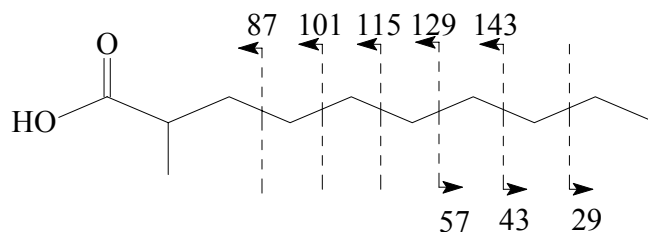
Drie komponente, B3174 (Fig. T2.1b; Fig. 2.48), B3468 (Fig. T2.1b; Fig. 2.49), en B3580 (Fig. T2.1b; Fig. 2.50), is in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1b) waargeneem. Op grond van die komponente se retensietye en massaspektra, is afgelei dat die komponente B3174, B3468, en B3580 waarskynlik tot dieselfde homoloë reeks behoort.

Die basispiek in elk van die betrokke EI-massaspektra verskyn by  $m/z$  74, en molekulêre ione by  $m/z$  172,  $m/z$  186 en  $m/z$  200 onderskeidelik. Ander prominente ione kom by  $m/z$  41 en  $m/z$  87 in die komponente se massaspektra voor. Metielesters sowel as  $\alpha$ -vertakte karboksiesure vertoon basispeke by  $m/z$  74. Die spektra van hierdie reeks komponente is met gepubliseerde data<sup>5</sup> vergelyk, waarvolgens die komponente tentatief as versadigde metielesters geïdentifiseer is. Retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare sintetiese metielesters het egter getoon dat die komponente nie metielesters kan wees nie. Die moontlikheid is toe ondersoek dat die reeks komponente  $\alpha$ -vertakte karboksiesure kan wees.

Die EI-massaspektrum van B3468 (Fig. T2.1b; Fig. 2.50) sal as verteenwoordigend van hierdie langketting homoloë reeks bespreek word. Die vorming van Komponent B3468 se basispiek by  $m/z$  74 word klaarblyklik deur die volgende McLafferty-herrangskikking gevorm:

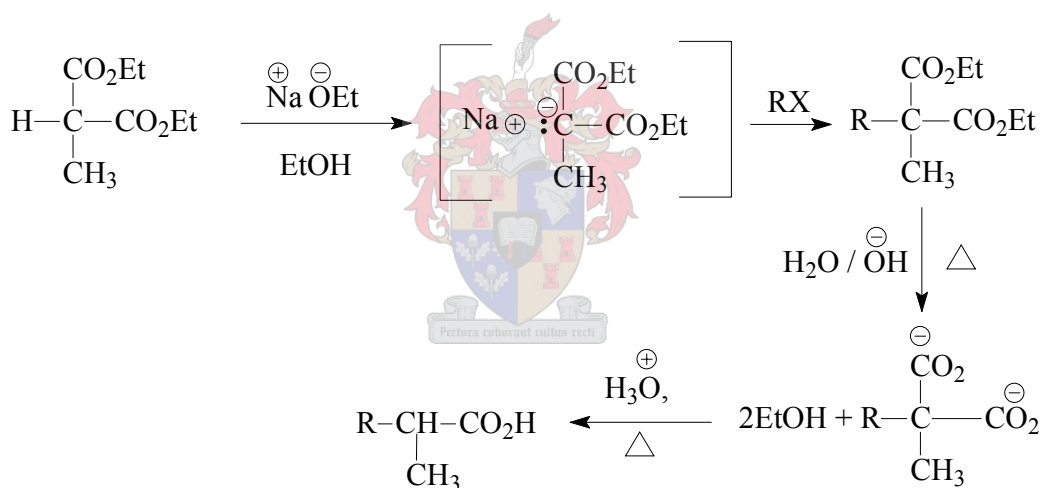


Die aanwesigheid van ander ione in die massaspektrum kan soos volg gerasionaliseer word:



Komponent B3468

'n Reeks  $\alpha$ -metiel karboksielsure is gesintetiseer volgens die onderstaande skema (§ 3.4.2) vir retensietydvergelyking. Wanneer 'n maloonsuurester met 'n ekwivalente hoeveelheid natriumetoksied behandel word, word 'n mononatriumproduk gevorm wat vir 'n wye verskeidenheid sintetiese doeleindes gebruik kan word. Die sisteem reageer maklik met alkielhaliede om 'n monoalkiel-gesubstitueerde maloonsuurester te gee. Die monogealkileerde maloonsuurester wat 'n verdere  $\alpha$ -waterstofatoom bevat, kan deur die herhaling van hierdie prosedure na 'n digealkileerde maloonsuurester omgesit word. As die regte alkileringsreagense gekies word, lewer hidrolise van die ester na die digealkileerde maloonsuur, gevolg deur termiese dekarboksilasie, 'n  $\alpha$ -gealkileerde karboksielsuur.<sup>52</sup> 'n Mengsel van 1-bromoheptaan, 1-bromoöktaan en 1-bromononaan is in die huidige ondersoek gebruik om diëtielmetielmalonaat te alkileer in die bereiding van 2-metielkarboksielsure vir vergelyking met die komponente wat hier onder bespreking is:



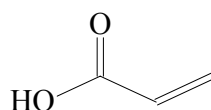
Die TIC van die mengsel 2-metielkarboksielsure verskyn in Fig. 2.51 en die EI-massaspektra van 2-metielnonanoësuur, 2-metieldekanoësuur en 2-metielundekanoësuur word onderskeidelik gegee in Fig. 2.52 tot Fig. 2.54. Daar is met behulp van GC-MS-analise bepaal dat 'n persentasie opbrengs van 23 % 2-metielnonanoësuur, 29 % 2-metieldekanoësuur en 40 % 2-metielundekanoësuur verkry is.

Die EI-massaspektra van Komponente B3174, B3468 en B3580 is identies aan dié van die gesintetiseerde  $\alpha$ -metiel-karboksielsure. Op grond van ooreenstemmende EI-massaspektra en

retensietye is hierdie homoloë reeks komponente as 2-metielnonanoësuur, 2-metieldekanoësuur en 2-metielundekanoësuur, onderskeidelik geïdentifiseer.

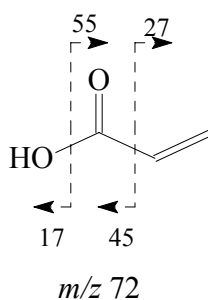
### 2.1.16 Onversadigde alifatiese karboksiësure

In die EI-massaspektrum van Komponent L1521 (Fig. T2.1a; Fig. 2.55) kom daar prominente ione voor by  $m/z$  27,  $m/z$  55 en  $m/z$  72 (basispiek). Deur vergelyking met gepubliseerde data<sup>5</sup> is Komponent L1521 tentatief as 2-propenoësuur (akriësuur) geïdentifiseer.



Akriësuur

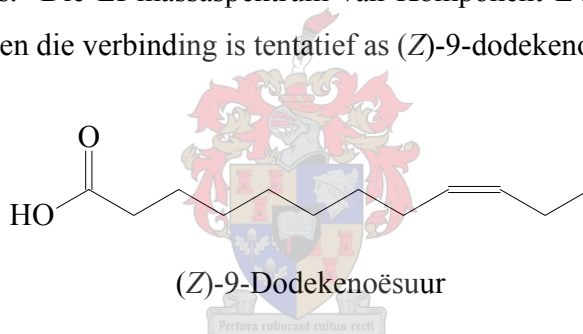
Die ioon met 'n hoë intensiteit wat by  $m/z$  72 voorkom, stem ooreen met die molekulêre massa van akriësuur. Die volgende prominente ioon by  $m/z$  55 is 17 atoommassa-eenhede verwyder van die basispiek en kan moontlik gevorm word deur die verlies van 'n hidroksielgroep uit die molekulêre ioon. Die ioon by  $m/z$  27 dui op die verlies van 'n  $\text{HCO}_2$ . Die vorming van die prominente ione kan skematies soos volg gerasionaliseer word:



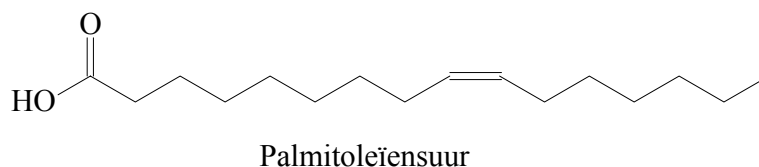
Komponent L1521

Op grond van die EI-massaspektrum van Komponent L1521, sowel as die retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare sintetiese akriësuur, is die tentatiewe identifikasie van hierdie verbinding as akriësuur bevestig.

Komponent L4095 se EI-massaspektrum (Fig. T2.2b; Fig. 2.56) toon 'n prominente ioon by  $m/z$  41 (basispiek), en 'n ioon by  $m/z$  198 met 'n lae intensiteit wat as uitgangspunt as die molekulêre ioon van die verbinding oorweeg is. Hierdie aanname is bevestig deur die bepaling van hierdie komponent se molekulêre massa as 198 Da deur gebruik te maak van CIMS (Fig. 2.57). Die ioon by  $m/z$  180 in die EI-massaspektrum van Komponent L4095 is dus 'n  $[M-H_2O]^+$  ioon. Die ioon met 'n lae intensiteit by  $m/z$  181 kan toegeskryf kan word aan die verlies van 'n OH-radikaal uit die molekulêre ioon, wat kenmerkend is van onversadigde karboksielsure.<sup>53</sup> Die tipiese karboksielsuurione by  $m/z$  60 en  $m/z$  73 kom wel voor, maar met 'n veel laer intensiteit as dié in die massaspektra van die versadigde karboksielsure. Aangesien dit bekend is dat onversadigde verbindings in GC-analises op polêre kolomme langer retensietye as hulle versadigde analoë het, bevestig die retensietyd van hierdie verbinding wat effens langer is as dié van dodekanoësuur (Komponent L4015, Fig. T2.2b; Fig. 2.42) dat die komponent 'n dodekanoësuur kan wees. Die EI-massaspektrum van Komponent L4095 is met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup> vergelyk, en die verbinding is tentatief as (Z)-9-dodekanoësuur geïdentifiseer.



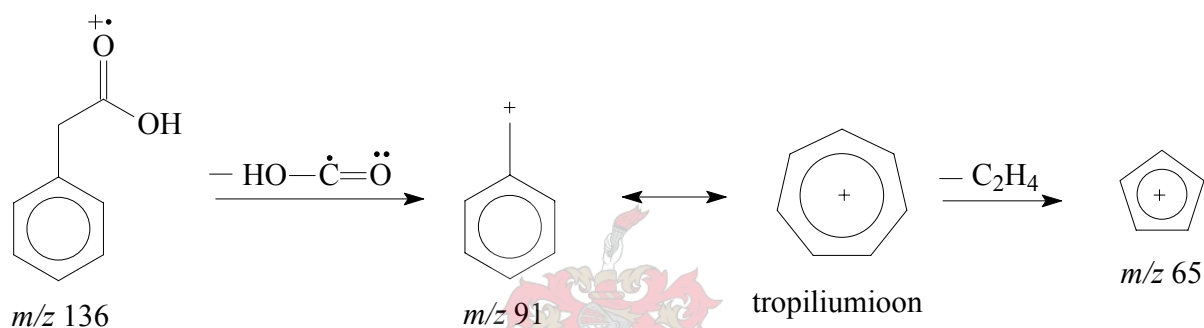
Retensietydvergelyking met kommersiële sintetiese (Z)-9-dodekanoësuur het hierdie identifikasie van Komponent L4095 bevestig. Op 'n soortgelyke wyse is Komponent L5121 (Fig. T2.2b; Fig. 2.58) geïdentifiseer as (Z)-9-heksadekanoësuur (palmitoleïensuur).



### 2.1.17 Aromatiese karboksielsuur

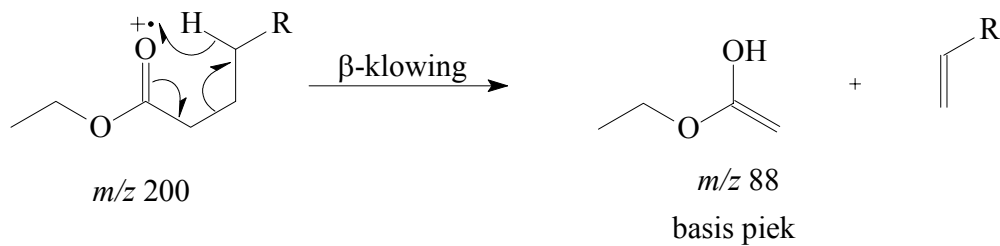
Die EI-massaspektrum van Komponent L4113 (Fig. T2.2b; Fig. 2.59) se basispiek kom by  $m/z$  91 voor, wat in die geval van aromatiese sisteme aan die vorming van 'n tropiliumioon

$[C_7H_7]^+$  toegeskryf word. Aangesien die molekulêre ion gewoonlik 'n baie hoë intensiteit besit in die spektra van aromatiese verbindings, is aanvaar dat hierdie komponent 'n aromatiese verbinding is en dat die basispiek by  $m/z$  136 die molekulêre ion van Komponent L4113 is. Die ione by  $m/z$  136 en  $m/z$  91 verskil met 45 atoommassa-eenhede, dus kan die  $m/z$  91 ion toegeskryf word aan die verlies van  $[COOH]^+$ . Gevolglik is afgelei dat Komponent L4113 moontlik benseenasynsuur kon wees en retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare sintetiese benseenasynsuur het hierdie vermoede bevestig. Die  $m/z$  65,  $m/z$  91 en  $m/z$  136 ione in Komponent L4113 se massaspektrum kan skematies soos volg gerasionaliseer word:

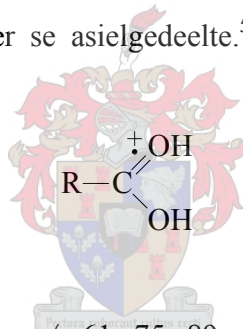


### 2.1.18 Versadigde alifatiese etielester

Die mees opvallende eienskap van die massaspektrum van Komponent B1551 (Fig T2.1a; Fig. 2.60) is die basispiek by  $m/z$  88 wat 'n groot gedeelte van die ionstroom dra en wat in hierdie geval, anders as in die spektrum van 2-etielheksanoesuur (Komponent H2492), nie van 'n baie prominente ion by  $m/z$  73 vergesel word nie. Hierdie situasie is kenmerkend van etielesters van die hoër karboksielsure. Alhoewel fragmentasie gereidelik by esters plaasvind, is dit tog moontlik om hulle molekulêre ione waar te neem. Daar is dus aanvaar dat die ion by  $m/z$  200 die molekulêre ion van die komponent is, in welke geval die ion by  $m/z$  88 soos volg deur 'n McLafferty-herrangskikking gevorm word. Hierdie tipe herrangskikking is die belangrikste  $\beta$ -klowingsreaksie wat esters ondergaan.

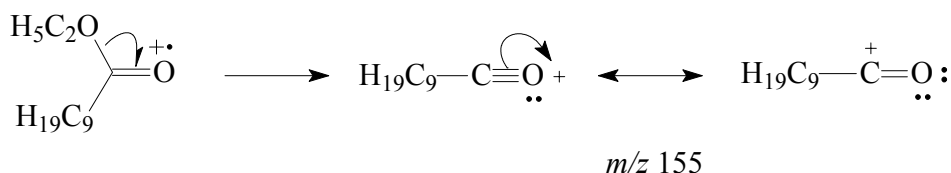


Die belangrikste  $\alpha$ -klowingsreaksie van esters is die verlies van die alkoksigrup om die ooreenstemmende asiliumioon  $[\text{RCO}]^+$  te vorm. Die asiliumioon is 'n goeie diagnostiese ioon in die massaspektra van esters. Nog 'n belangrike diagnostiese ioon in esters se massaspektra ontstaan deur die verlies van 'n alkielgroep uit die asielgedeelte van die ester om 'n  $[\text{R-O-C=O}]^+$  ioon te vorm.<sup>54</sup> Esters van langketting-alkohole kan verdere fragmentasie ondergaan waartydens die eliminasië van die alkielketting gepaard gaan met die oordrag van twee waterstofatome.<sup>55</sup> Tydens hierdie fragmentasie word die waterstofatome van die  $\beta$ - en  $\gamma$ -posisies oorgedra aan die karboniel suurstofatoom van die ester se asielgedeelte.<sup>56</sup> Hierdie herrangskikking lewer die volgende tipe fragmentioon:



Sodanige ione kom voor in die reeks  $m/z$  61, 75, 89, ... in die massaspektra van etielesters, propielesters, butielesters, ens. Hierdie ione kan ook 'n waterstofatoom verloor om  $[\text{RCOOH}]^+$  fragmentione te lewer.<sup>57</sup>

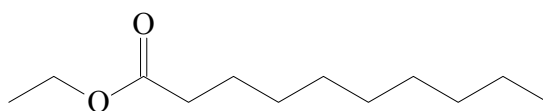
In die EI-massaspektrum van Komponent B1551 lewer 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie 'n asiliumioon by  $m/z$  155:



'n Ander fragmentasiepatroon wat die hoër esters kan ondergaan en wat ook in Komponent B1551 se EI-massaspektrum waargeneem word, lewer 'n minder prominente ioon by



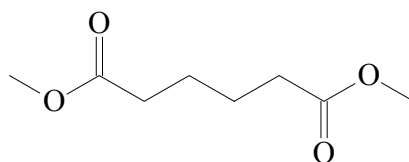
$m/z$  61. Die EI-massaspektrum van Komponent B1551 (Fig T2.1a; Fig. 2.60) is met gepubliseerde data<sup>5</sup> vergelyk en op grond van ooreenstemmende massaspektra, sowel as retensietydvergelyking met die sintetiese ester, is Komponent B1551 se identiteit as etieldekanoaat bevestig.



Etieldekanoaat

### 2.1.19 Diësters

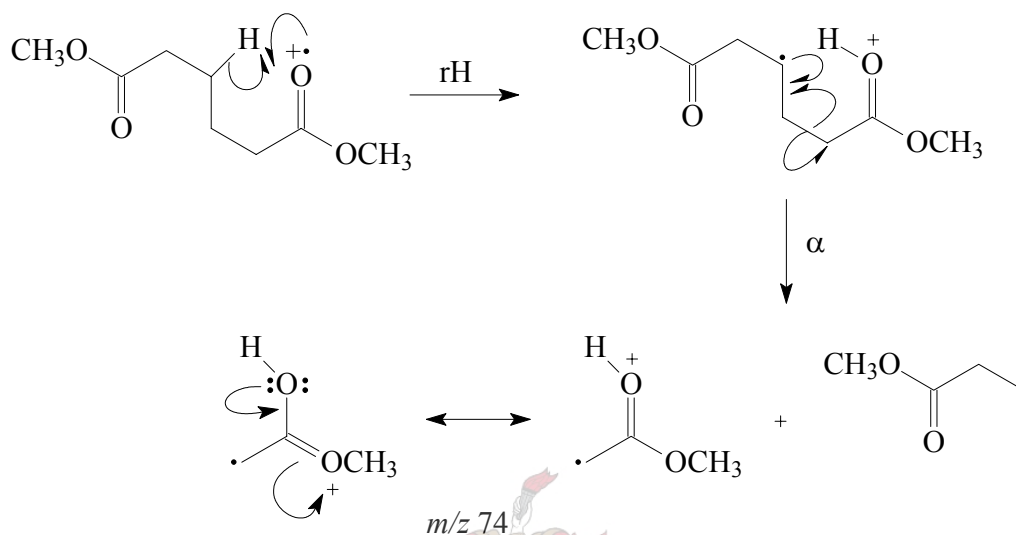
'n Homoloë reeks komponente B1348 (Fig. T2.1a; Fig. 2.61), B1689 (Fig. T2.1a; Fig. 2.62), en B2072 (Fig. T2.1a; Fig. 2.63), kom in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a) voor. Die massaspektra van hierdie verbindings besit nie besonder kenmerkende ione of ionprofile wat as uitgangspunt in die interpretering van die spektra gebruik kon word nie. Uit 'n vergelyking van hulle spektra met gepubliseerde data<sup>5</sup> was dit egter duidelik dat hulle waarskynlik die dimetielesters van dikarboksielsure is. Hierdie vermoede is bevestig deur 'n vergelyking van hulle massaspektra met gepubliseerde data.<sup>5</sup> Komponent B2072 (Fig. T2.1a; Fig. 2.63) word as verteenwoordigend van dié reeks komponente in die bespreking van hulle fragmentasiepatrone gebruik. Komponent B2072 se EI-massaspektrum is vergelyk met gepubliseerde massaspektra<sup>5</sup> en die verbinding is tentatief as dimetieladipaat geïdentifiseer.



Dimetieladipaat

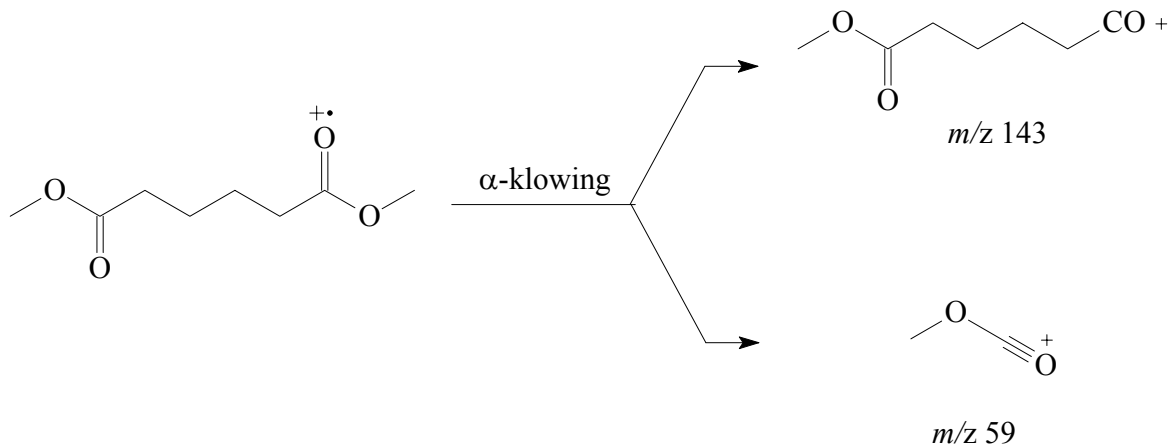
Die basispieke van die gewone reguitketting-metielesters wat tot die C<sub>6</sub> tot C<sub>26</sub> homoloë reeks behoort, ontstaan deur  $\beta$ -klowing en die oordrag van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom. Dit lei tot die

vorming van die volgende ion by  $m/z$  74 wat ook aanwesig is in die EI-massaspektra van dimetielesters wat 'n McLafferty-herrangskikking kan ondergaan, en wat soos volg uit byvoorbeeld dimetieladipaat gevorm word:<sup>58</sup>

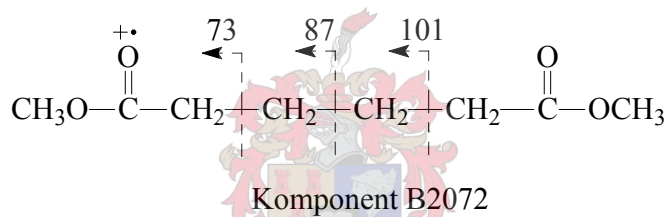


Slegs Komponent B1689 en Komponent B2072 ondergaan McLafferty-herrangskikkings, aangesien Komponent B1348 slegs 2 koolstofatome tussen die karbonielgroepe besit en dus nie 'n McLafferty-herrangskikking kan ondergaan nie. 'n Prominente ion word ook gewoonlik in die massaspektra van metielesters waargeneem by  $m/z$  87. Hierdie ion word gevorm tydens die migrasie van 'n  $\delta$ -waterstofatoom en 'n 1 $\rightarrow$ 4-waterstofverskuiwing, gevolg deur klowing tussen die  $\beta$ - en  $\gamma$ -koolstofatoom. By dimetielesters kom die basispiek egter by  $m/z$  59 voor. Ander ione met hoë intensiteite in die massaspektrum van Komponent B2072 word waargeneem by  $m/z$  143, 114, 101, sowel as 'n ion by  $m/z$  74 wat teen 'n laer intensiteit voorkom as wat by gewone metielesters gesien word.

Die vorming van Komponent B2072 se basispiek, en die vorming van 'n ion met 'n hoë intensiteit by  $m/z$  143, die  $[M-31]^+$  ion, kan soos volg in terme van  $\alpha$ -klowing verklaar word:

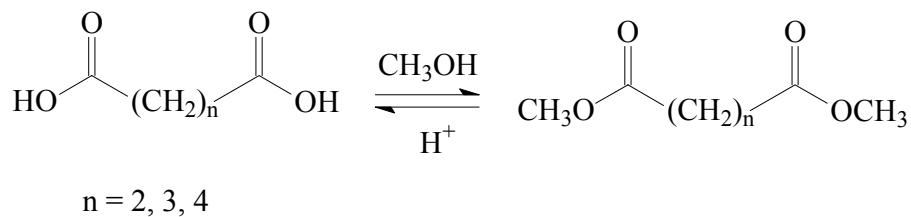


Die reeks ione by  $m/z$  72, 87, 101, ..., vorm deur fragmentasies soos hieronder voorgestel. In die geval van Komponent B2072, word die vorming van die ioon by  $m/z$  101 begunstig bo die ioon by  $m/z$  87.



Die prominente ioon by  $m/z$  114 kan soos volg gerasionaliseer word om 'n  $[M-(CO+HOCH_3)]^+$  ioon te vorm. Hierdie fragment kom ook voor in die spektra van gewone monometielesters en dit lyk asof die neiging om hierdie fragment te vorm groter is by dimetielesters as wat dit is by gewone mono-esters, waarskynlik omdat dimetielesters twee esterfunksionaliteite besit wat dus 'n groter waarskynlikheid vir die vorming van sekere fragmentasies bied as mono-esters.

'n Reeks diësters is volgens die onderstaande skema vir retensietydvergelyking gesintetiseer (§ 3.4.3) deur weereens 'n mengsel van die uitgangsure te gebruik om tyd te spaar:

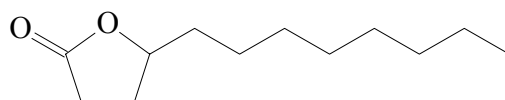


Die TIC van die diëstermengsel word gegee in Fig. 2.64 en die EI-massaspektra van dimetielsuksinaat, dimetielglutaraat en dimetieladipaat verskyn onderskeidelik in Fig. 2.65 tot Fig. 2.67. Met behulp van GC-MS-analise is bepaal dat 'n persentasie opbrengs van 15 % dimetielsuksinaat, 26 % dimetielglutaraat en 36 % dimetieladipaat verkry is.

Op grond van inligting verkry uit die komponente se EI-massaspektra en deur retensietydvergelyking is Komponente B1348, B1689 en B2072 as dimetielsuksinaat, dimetielglutaraat en dimetieladipaat onderskeidelik geïdentifiseer.

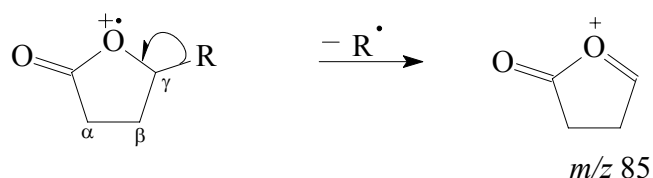
### 2.1.20 Versadigde $\gamma$ -Laktone

Die EI-massaspektra van Komponente B2281 (Fig. T2.1a; Fig. 2.68), B2624, B2965 (Fig. T2.1a; Fig. 2.69), B3288 (Fig. T2.1b; Fig. 2.70), B3611 (Fig. T2.1b; Fig. 2.71), B3898 (Fig. T2.1b; Fig. 2.73) en B4190 (Fig. T2.1b; Fig. 2.74) wat waargeneem is in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig. T2.1a en Fig. T2.1b) het 'n besonder intense basispiek by  $m/z$  85. Daar is van die veronderstelling uitgegaan dat hierdie komponente aan dieselfde homoloë reeks van verbindinge behoort. In teenstelling met die EI-massaspektra van verskeie ander verbindingstipes wat ook redelike intense ione by  $m/z$  85 bevat, word verreweg die grootste gedeelte van die totale ioonstroom deur die ioon by  $m/z$  85 in die massaspektra van die bogenoemde komponente gedra, 'n situasie wat tipies en feitlik uitsluitlik by  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone (alkan-4-oliede) aangetref word. Hierdie homoloë reeks komponente is tentatief as  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone geïdentifiseer deur vergelyking van die komponente se EI-massaspektra met gepubliseerde spektra.<sup>5</sup> Slegs 'n klein fraksie van die totale ioonstroom word gedra deur die molekulêre ioon wat in die spektra van hierdie verbindinge nie altyd sigbaar is nie.<sup>59</sup> Die molekulêre massa van een van hierdie komponente, Komponent B3611, kon egter deur CIMS (Fig. 2.72) as 200 Da bepaal word en hierdie komponent is tentatief as dodekan-4-olied geïdentifiseer.



Dodekan-4-olied

Die belangrikste ioon in die spektra van  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone vorm deur die verlies van die  $\gamma$ -substituent met behoud van die lading op die laktoonringfragment.<sup>60</sup>

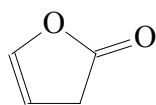


Ander belangrike ione van laktone afkomstig van  $\omega$ -hidroksiesure is tipies  $OE^+$  ioonfragmente, wat vorm deur die uitsplitsing van  $CO_2$ ,  $(CH_2O+CO)$ , of  $(CH_2CH_2+CO_2)$ .<sup>61</sup>

Omdat die massaspektra relatief min diagnostiese inligting bevat, is GC-retensietydvergelyking met die sintetiese verbindings die beste kriterium vir eenduidige identifikasie van hierdie verbindings, vanselfsprekend met inagnome van die massaspektrometriese data. Komponente B2281, B2624, B3288 en B3611 is op hierdie manier as oktan-4-olied, nonan-4-olied, undekan-4-olied en dodekan-4-olied geïdentifiseer. In die geval van Komponente B2965, B3898 en B4190 was daar nie kommersiële sintetiese  $\gamma$ -laktone beskikbaar vir retensietydvergelyking nie. Op grond van die retensietydinkremente waarmee hierdie  $\gamma$ -laktone in GC-MS analyses geëluëer is, kan egter afgelei word dat die laasgenoemde drie komponente ook aan die homologe reeks van  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone met onvertakte alkielsubstituente behoort.

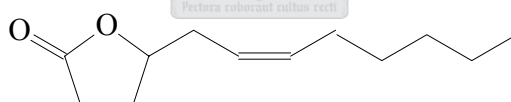
### 2.1.21 Onversadigde $\gamma$ -Laktone

Die EI-massaspektrum van Komponent L1801 (Fig. T2.2a; Fig. 2.75) is vergelyk met gepubliseerde spektra<sup>5</sup> en is daarvolgens tentatief as but-3-en-4-olied geïdentifiseer. Daar is drie prominente ione sigbaar in die massaspektrum: 'n ioon by  $m/z$  27, die basispiek by  $m/z$  55 en die molekulêre ioon by  $m/z$  84. Die vorming van die basispiek by  $m/z$  55 kan moontlik verklaar word deur die verlies van 'n  $[CHO]$  radikaal uit die molekulêre ioon. Kommersiële beskikbare sintetiese but-3-en-4-olied is gebruik vir retensietyd-vergelyking wat die identifikasie van Komponent L1801 as but-3-en-4-olied bevestig het:



But-3-en-4-olied

In die § 2.1.20 is van die aanwesigheid van 'n besonder prominente basispiek by  $m/z$  85 in die spektra van 'n reeks komponente afgelei dat die betrokke verbindings moontlik  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone kon wees. Die EI-massaspektrum van Komponent B3651 (Fig. T2.1b; Fig. 2.76) het 'n soortgelyke algemene voorkoms met 'n baie intense basispiek by  $m/z$  85. In teenstelling met die massaspektrum van dodeken-4-olied (Komponent B3611, Fig. T2.1b; Fig. 2.71) met 'n molekulêre ioon by  $m/z$  198, is die molekulêre ioon by  $m/z$  196 in die massaspektrum van hierdie komponent aanwesig, wat net op onversadiging in die  $\gamma$ -substituent, en nie in die laktoonring nie, kan dui. 'n Verbinding met 'n soortgelyke spektrum is voorheen in 'n GC-MS-analise van die interdigitale klierafskeiding van die bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*) gevind en is deur middel van KMR, GC-MS en vergelyking met 'n gesintetiseerde monster as (*Z*)-6-dodeken-4-olied geïdentifiseer.<sup>62</sup> Later is ook vasgestel dat die verbinding deur die bakterium *Planococcus citreus* in die interdigitale klierholte van die dier se voorpoot gesintetiseer word.<sup>63</sup> Die dubbelbinding in die verbinding se syketting besit *Z*-konfigurasie.<sup>64</sup>

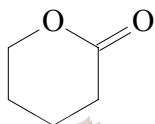


(*Z*)-6-Dodeken-4-olied

Dieselfde verbinding is tevore reeds in die tarsale haarbundel van die swartsterthert, *Odocoileus hemionus columbianus*, geïdentifiseer. In daardie geval is die verbinding deur die tarsale hare uit die dier se urine geëkstraheer.<sup>65</sup> Dit is dus interessant dat dié verbinding ook in die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier voorkom. Op grond van inligting verkry uit Komponent B3651 se EI-massaspektrum sowel as retensietydvergeelyking met 'n volledig gekarakteriseerde monster van die laktoon wat uit 'n vorige navorsingsprojek beskikbaar was, is Komponent B3651 as (*Z*)-6-dodeken-4-olied geïdentifiseer.

## 2.1.22 Versadigde $\delta$ -Laktone

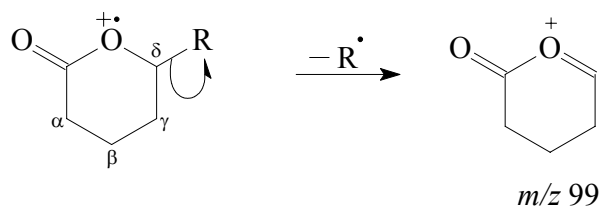
Komponent L1915 (Fig. T2.2a; Fig. 2.77) kom voor in die TIC van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier, en sy EI-massaspektrum toon 'n basispiek by  $m/z$  42, en 'n ioon met 'n hoë intensiteit by  $m/z$  100, wat moontlik die molekulêre ioon kan wees, asook prominente ione by  $m/z$  28, 56, 70 en 71. Die ioonpaar by  $m/z$  70 en 71 tesame met die prominente ioon by  $m/z$  42 is tipies van  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone. Die massaspektrum van hierdie komponent bevat nie die prominente ioon by  $m/z$  99 wat in die spektra van  $\delta$ -alkielgesubstitueerde  $\delta$ -laktone aanwesig is nie en dus is aanvaar dat die komponent die ongesubstitueerde  $\delta$ -laktoon pentan-5-olied ( $\delta$ -valerolaktoon) is.



$\delta$ -Valerolaktoon

Soos reeds in §2.1.20 genoem, is  $OE^+$  ioonfragmente, wat vorm deur die uitsplitsing van  $CO_2$ ,  $(CH_2O+CO)$ , of  $(CH_2CH_2+CO_2)$ , tipiese ioonfragmente in die massaspektra van laktone van  $\omega$ -hidroksiesure.<sup>61</sup> In die huidige geval verteenwoordig die basispiek by  $m/z$  42 die  $[M-58]^+$  ioon wat gevorm word deur die uitsplitsing van  $(CH_2O + CO)$  uit die molekulêre ioon. Die verlies van  $(CH_2CH_2 + CO_2)$  kan die prominente  $[M-72]^+$  ioon by  $m/z$  28 verklaar. Netso kan die verlies van 'n molekule  $CO_2$  uit die molekulêre ioon moontlik vir die vorming van die ioon met hoë intensiteit by  $m/z$  56 verantwoordelik wees. Kommersieel beskikbare sintetiese laktone is gebruik vir retensiedyvergeliking en Komponent L1915 is geïdentifiseer as pentan-5-olied.

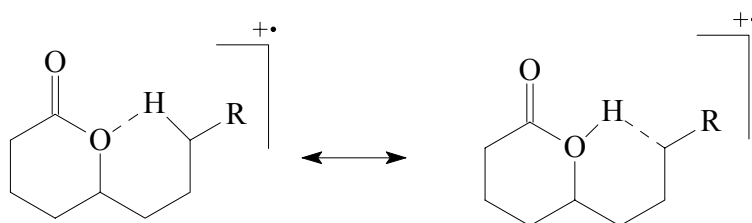
Die EI-massaspektra van Komponente B2415 (Fig. T2.1a; Fig. 2.78), B2757 (Fig. T2.1a; Fig. 2.80), B3092 (Fig. T2.1b; Fig. 2.81), B3408 (Fig. T2.1b; Fig. 2.82), B3725 (Fig. T2.1b; Fig. 2.83), B4017 (Fig. T2.1b; Fig. 2.85) en B4304 (Fig. T2.1b; Fig. 2.86) in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig T2.1a en Fig. T2.1b) vertoon die kenmerkend intense  $m/z$  99 ioon wat, soos hierbo genoem, tipies in die massaspektra van  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone voorkom. Die vorming van hierdie ioon kan skematies soos volg verduidelik word.<sup>66</sup>



Hierdie komponente het ooreenstemmende spektra en is klaarblyklik lede van 'n homoloë reeks van  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone.

Soos reeds genoem in afdeling §2.1.20, is laktone se molekulêre ione nie altyd sigbaar nie.<sup>59</sup> Dit is ook die geval by Komponent B2757, B3408 en B4017. Die molekulêre massa van Komponente B2415, B3725 en B4304 is egter met behulp van chemiese-ionisasie as 142, 198 en 226 Da onderskeidelik bepaal (Fig. 2.79, Fig. 2.84 en Fig. 2.87). Die ionpaar by  $m/z$  70 en 71, sowel as die ion by  $m/z$  42, kom tipies in die massaspektra van  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone voor. Hierdie ione kan waargeneem word in die EI-massaspektra van al die komponente in die homoloë reeks, en is waarskynlik koolwaterstofione. Die  $m/z$  70/71 ionpaar word moontlik gevorm deur die verlies van CHO en CO uit die ion by  $m/z$  99.<sup>59</sup>

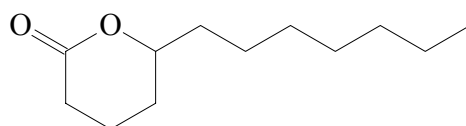
Die verlies van water wat aanleiding gee tot die  $[M-18]^+$  ion kom voor by  $\delta$ -laktone wat 'n  $\delta$ -substituent met 'n kettinglengte van drie of meer koolstofatome besit. Hierdie waterverlies vind waarskynlik plaas deur een of meer komplekse prosesse waarby 'n waterstofatoom van die  $\gamma$ -koolstofatoom van die  $\delta$ -substituent betrokke is. So 'n waterstofatoom is stries in 'n gunstige posisie om aan die vorming van 'n sikliese sesledige oorgangstoestand deel te neem.<sup>67</sup>



Hierdie  $[M-18]^+$  ion kom in die massaspektra van al die komponente van die homoloë reeks voor, behalwe in die geval van Komponente B2757 en B4017, wat moontlik in die betrokke geval die gevolg kan wees van die lae konsentrasie waarin hierdie komponente in die reukmerkvlouistof van die tier voorkom. Die molekulêre ione van hierdie komponente is ook nie



in hulle spektra waarneembaar nie. 'n Reeks kommersieel beskikbare  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone is gebruik vir retensietydvergelyking, en bogenoemde komponente is geïdentifiseer as oktan-5-olied (B2415), nonan-5-olied (B2757), dekan-5-olied (B3092), undekan-5-olied (B3408) en dodekan-5-olied (B3725).

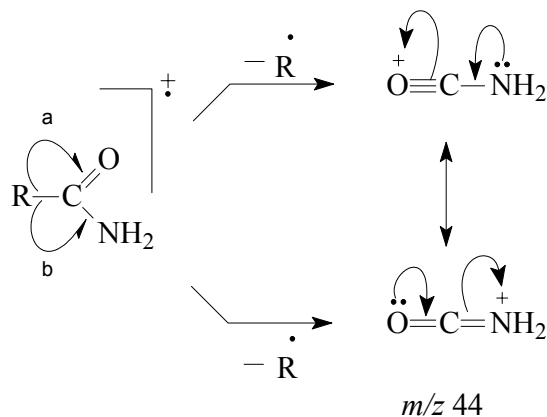


Dodekan-5-olied

Sintetiese  $\delta$ -laktone vir retensietydvergelyking met Komponente B4017 en B4304 is nie kommersieel beskikbaar nie. Die komponente se massaspektra is vergelyk met gepubliseerde data<sup>5</sup> en Komponente B4017 en B4304 is tentatief as tridekan-5-olied en tetradekan-5-olied geïdentifiseer. Indien die retensietydinkremente waarmee hierdie  $\delta$ -laktone in GC-MS analises geëlueer is, in ag geneem word, kan daar egter afgelei word dat die laasgenoemde twee komponente ook aan die homoloë reeks van  $\delta$ -gesubstitueerde  $\delta$ -laktone behoort.

### 2.1.23 Amiede

In die EI-massaspektra van Komponente L1945 (Fig. T2.2a; Fig. 2.88), L2000 (Fig. T2.2a; Fig. 2.89) en L2072 (Fig. T2.2a; Fig. 2.90) verskyn die ioon met die hoogste massa in die onderskeie komponente se spektra by  $m/z$  59,  $m/z$  45 en  $m/z$  73 onderskeidelik. As hierdie ione die molekulêre ione van die betrokke komponente is, moet aanvaar word dat die verbindings 'n onewe aantal stikstofatome bevat en dus eenvoudige alifatiese amiene of amiede moet wees.<sup>68</sup> Die massaspektra van hierdie komponente bevat ook 'n ioon by  $m/z$  44 wat in die geval van Komponent L2000 redelik swak is, maar in die ander twee spektra baie prominent is. In die massaspektra van die primêre amiede formamied, asetamied en propioonamied is die belangrikste ioon by  $m/z$  44, die produk van 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie. Ionisasie van amiede kan gerasionaliseer word as die verwydering van 'n alleenpaar elektrone van die suurstofatoom of die stikstofatoom, om 'n resonansgestabiliseerde ioon by  $m/z$  44 na  $\alpha$ -klowing te vorm.



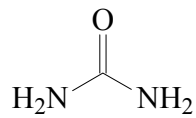
Eenvoudige  $\beta$ -klowing vind nie plaas nie, maar  $\gamma$ -klowingsreaksies vind met sommige amiede *via* die vorming van 'n vierlidringstruktuur plaas.<sup>69</sup>

Komponent L2000 se EI-massaspektrum vertoon slegs twee prominente ione by  $m/z$  45 (molekulêre ioon) en  $m/z$  29, kenmerkend van formamied se massaspektrum.

In die EI-massaspektrum van Komponent L1945 is daar weereens slegs twee prominente ione sigbaar, naamlik die molekulêre ioon by  $m/z$  59 en die ioon by  $m/z$  44 wat gevorm word deur die  $\alpha$ -klowingsreaksie hierbo geformuleer.

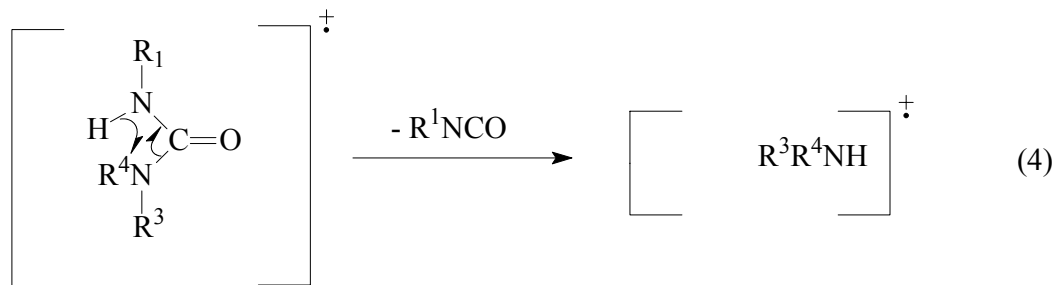
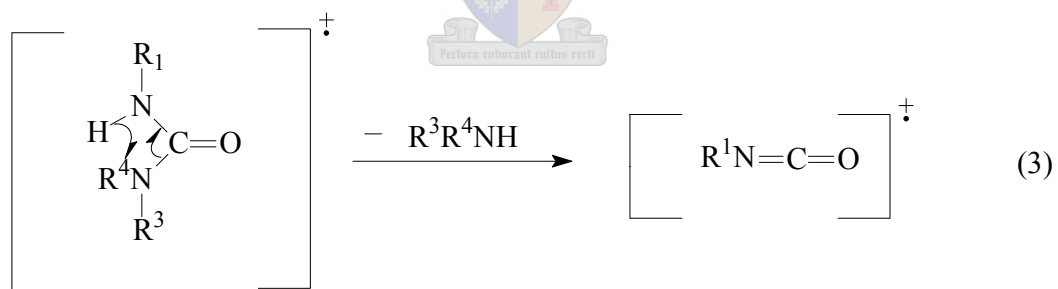
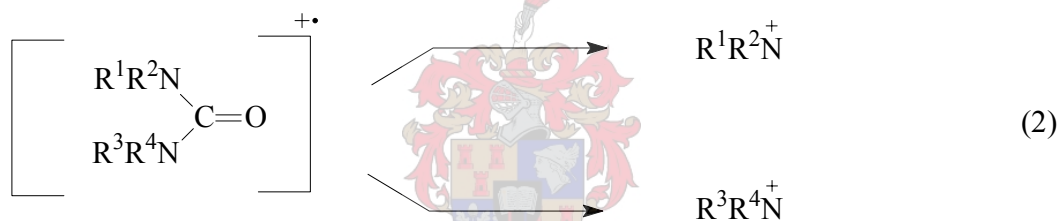
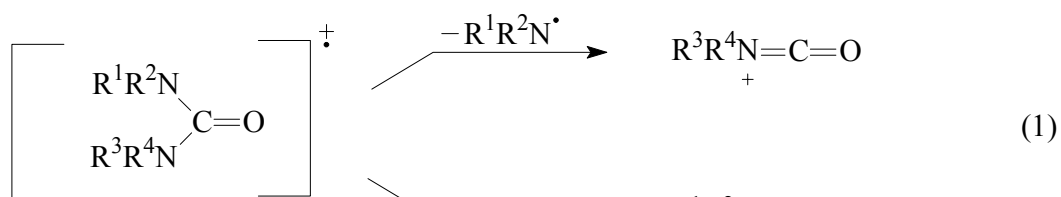
By Komponent L2072 kan drie belangrike ione waargeneem word by  $m/z$  29, 44, en 73. Dit is kenmerkend van propioonamied. 'n Reeks sintetiese amiede is vir retensietydvergelyking gebruik en Komponent L1945, L2000 en L2072 is as asetamied, formamied en propioonamied, onderskeidelik geïdentifiseer.

Die hoë retensietye van Komponente L2868 (Fig. T2.2a; Fig. 2.91) en L4593 (Fig. T2.2 b; Fig. 2.92) in teenstelling met die feit dat die twee komponente klaarblyklik lae (en ewe) molekulêre massas het, sou die identifikasie van hierdie twee komponente uitsluitlik op die interpretasie van hulle massaspektra bemoelijk. Dit is opvallend dat Komponent L4593 as 'n baie breë piek elueer, wat 'n aanduiding is dat hierdie verbinding besonder polêr is en waarskynlik basiese eienskappe besit, aangesien polêre verbindings met suurkarakter as skerp pieke geëlueer word van die fase AT1000 wat ook swak sureienskappe het. Daar is dus tot die slotsom gekom dat hierdie verbinding met 'n ewe getal stikstofatome, waarskynlik net 'n diamien of diamied en dus óf etileendiamien óf ureum kon wees.



Ureum

Die massaspektra vir ureum en sy metielafgeleide verbindings kan verklaar word deur vier hoofprosesse, (1) tot (4):<sup>70</sup>

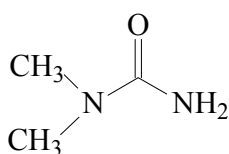


Metastabiele ione wat in 'n analise met 'n massaspektrometer met Nier-Johnson-geometrie waargeneem is, wys dat proses (3) sowel as proses (4) gedeeltelik geïnduseer word deur elektron impak, en nie slegs deur termolise nie.<sup>70</sup>

Komponent L4593 het twee prominente ione in sy EI-massaspektrum by  $m/z$  44 (basispiek) en by  $m/z$  60 (molekulêre ioon). Die vorming van die basispiek word verklaar deur proses (1) in die bostaande skema, met  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  en  $R^4$  almal waterstofatome. Die massaspektrum van die komponent stem ooreen met die gepubliseerde massaspektrum van ureum. Retensietydvergelyking met sintetiese ureum het die identiteit van Komponent L4593 as ureum bevestig.

Komponent L2868 het ook twee prominente ione in sy EI-massaspektrum by  $m/z$  44 (basispiek) en by  $m/z$  88 (molekulêre ioon). As daar aanvaar word dat laasgenoemde ioon die molekulêre ioon is, sou dit beteken dat die betrokke verbinding 'n hoër massa as ureum besit, maar met 'n baie laer retensietyd elueer, wat daarop dui dat die polariteit van hierdie verbinding laer moet wees as dié van ureum. Hieruit kan afgelei word dat die stikstofatoom(e) gealkileer moet wees. Die spektrum van hierdie verbinding stem ooreen met die gepubliseerde data vir 1,1-dimetiellureum. Indien aanvaar word dat Komponent L4593 wel 1,1-dimetiellureum is, kan die vorming van die basispiek van hierdie komponent verklaar word deur proses (1) in die bostaande skema, met  $R^1$  en  $R^2$  metielgroepe, en  $R^3$  en  $R^4$  waterstofatome.

'n Monster kommersieel beskikbare 1,1-dimetiellureum is gebruik vir retensietydvergelyking en die identiteit van Komponent L2868 is as 1,1-dimetiellureum bevestig.

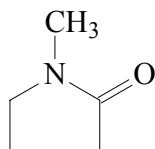


1,1-Dimetiellureum

## 2.1.24 Versadigde laktame

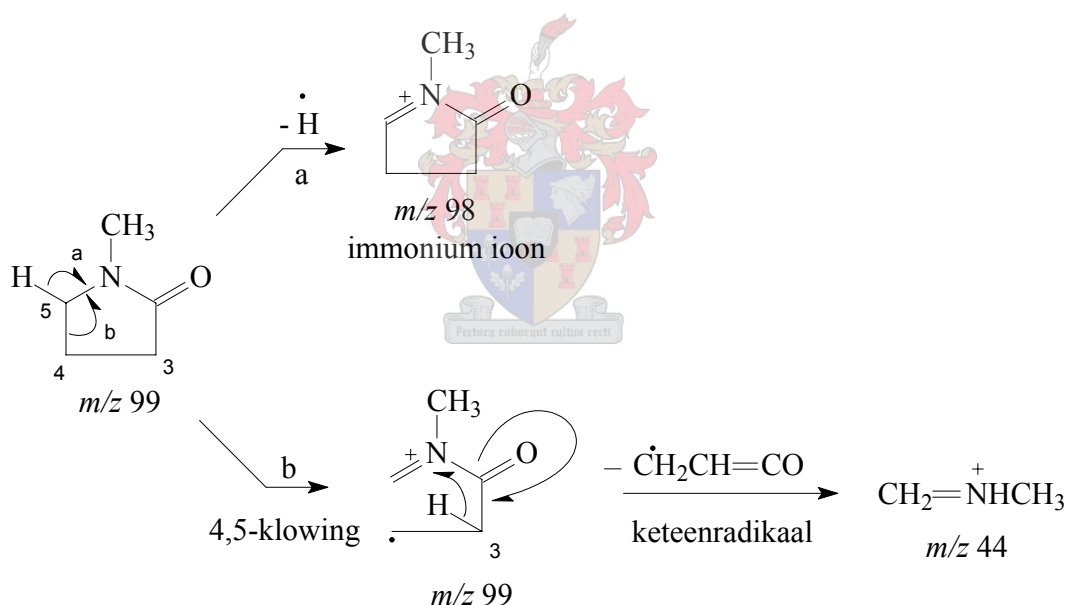
Die EI-massaspektrum van Komponent L1571 (Fig. T2.2a; Fig. 2.93) het 'n ioon by  $m/z$  99 wat ook die basispiek in die spektrum is. Indien die retensietyd van die komponent in aanmerking geneem word, kan aanvaar word dat die ioon moontlik die molekulêre ioon van die

betrokke komponent mag wees, in welke geval Komponent L1571 'n onewe aantal stikstofatome sou bevat.<sup>68</sup> Die massaspektrum van hierdie komponent bevat geen ione wat 'n aanduiding van die struktuur gee nie, maar volgens 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog,<sup>5</sup> sou dit moontlik die laktaam 1-metiel-2-pirrolidinoon kon wees.



1-Metiel-2-pirrolidinoon

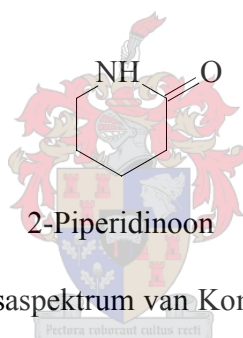
As aanvaar word dat Komponent L1571 1-metiel-2-pirrolidinoon is, kan die vorming van die ione by  $m/z$  98 en  $m/z$  44 in die betrokke massaspektrum volgens Budzikiewicz et al.<sup>71</sup> soos volg verklaar word:



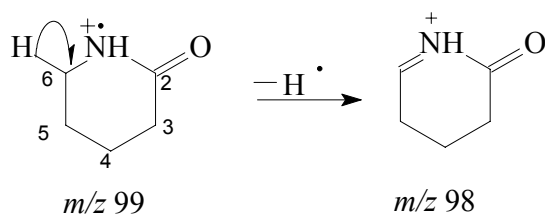
Die molekulêre ioon (basispiek) kom voor saam met 'n prominente  $[M-1]^+$  ioon. Hierdie ioon by  $m/z$  98 ontstaan deur die eliminasië van 'n waterstofatoom van C5 om 'n immoniumioon te vorm (roete a). Die vorming van die ioon by  $m/z$  44 kan gerasionaliseer word deur die aanvanklike  $\alpha$ -klowing van die C4-C5 binding, gevolg deur oordrag van 'n waterstofatoom van C3 en 'n stikstof-koolstof bindingsklowing (roete b), om 'n resonansgestabiliseerde keteenradikaal te vorm.<sup>71</sup> Volgens Budzikiewicz<sup>71</sup> is die ione by  $m/z$  41 en  $m/z$  42

koolwaterstofs spesies, en gaan die vorming van hierdie ione gepaard met die eliminasië van onderskeidelik  $\text{NH}_2\text{CO}\cdot$  en  $\text{HN}=\text{C}=\text{O}$ . Retensietydvergelyking met die kommersieel beskikbare laktaam het Komponent L1571 se identiteit as 1-metiel-2-pirrolidinoon bevestig.

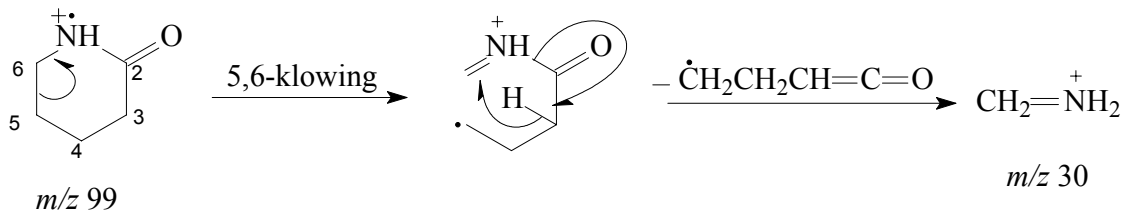
In die EI-massaspektrum van Komponent L2931 (Fig. T2.2a; Fig. 2.94) met 'n basispiek by  $m/z$  99, wat ook as molekulêre ioon aanvaar is, kom sommige van die ione wat in die spektrum van 1-metiel-2-pirrolidinoon aanwesig is, ook voor. Die logiese afleiding sou wees dat hierdie verbinding dieselfde molekulêre formule, maar 'n verskillende ringstruktuur besit, en dus moontlik die laktaam 2-piperidinoon kan wees. Die baie groot verskil in die retensietye van hierdie twee verbindings sou, soos in die geval van ureum en 1,1-dimetielureum, verklaar kon word in terme van die groot verskil in hulle polariteit, aangesien die stikstofatoom in die een verbinding gealkileer is, en in 2-piperidinoon nie. Met AT1000 as stasionêre fase kan so 'n groot retensietydsverskil ook hier verwag word.



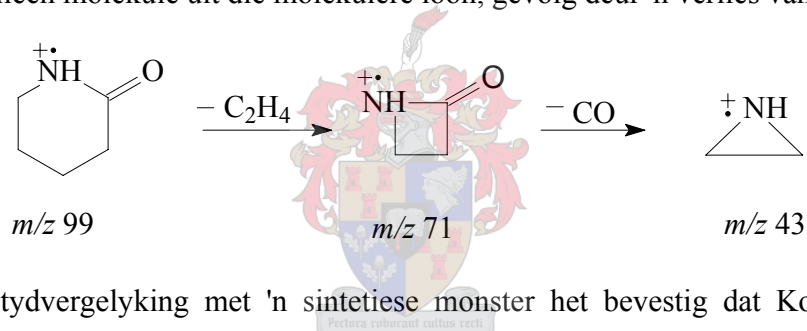
Die ioon by  $m/z$  99 in die massaspektrum van Komponent L2931 is volgens 'n GC-CIMS analise (Fig. 2.95) die molekulêre ioon van hierdie komponent. Hierdie ioon word vergesel met 'n ietwat minder intensiewe (20 %)  $[\text{M}-1]^+$  ioon wat gevorm sou kan word deur die eliminasië van 'n waterstofatoom van die C6 posisie om 'n immoniumioon te vorm:<sup>71</sup>



Die vorming van die ioon wat voorkom by  $m/z$  30 word gerasionaliseer deur die aanvanklike  $\alpha$ -klowing van die C5-C6 binding, gevolg deur oordrag van 'n waterstofatoom van C3 en 'n stikstof-koolstof-bindingsklowing:<sup>71</sup>



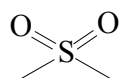
Die ione by  $m/z$  55  $[C_4H_7]^+$  en  $m/z$  56  $[C_4H_8]^+$  kan toegeskryf word aan die molekulêre ioon wat onderskeidelik  $[NH_2CO]^\cdot$  (44 atoommassa-eenhede), en HNCO (43 atoommassa-eenhede) verloor, en die ione by  $m/z$  41 en  $m/z$  42 verteenwoordig die fragmente wat vorm deur 'n verlies van  $CH_2$  uit die voorafgenoemde ione. Aangesien daar verskillende moontlikhede bestaan vir die vorming van die  $[M-29]^+$  ioon by  $m/z$  70, kan die teenwoordigheid van hierdie ioon in die massaspektrum, in die afwesigheid van konkrete bewyse, nie verduidelik word nie. Die vorming van twee verdere ione wat by  $m/z$  71 en  $m/z$  43 waargeneem word, kan verduidelik word deur die verlies van 'n etileen molekule uit die molekulêre ioon, gevolg deur 'n verlies van CO:<sup>72</sup>



Retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster het bevestig dat Komponent L2931 inderdaad 2-piperidinoon is.

### 2.1.25 Dimetielsulfoen

Die EI-massaspektrum van Komponent L2280 (Fig. T2.2a; Fig. 2.96) vertoon twee prominente ione by  $m/z$  79 (basispiek) en  $m/z$  94 en daar is deur chemiese-ionisasie vasgestel dat Komponent L2280 se molekulêre massa 94 Da is (Fig. 2.97), wat ooreenstem met die molekulêre massa van dimetielsulfoen. Die kombinasie van hierdie twee ione is kenmerkend van dimetielsulfoen. Retensietydvergelyking met die sintetiese verbinding het bevestig dat Komponent L2280 dimetielsulfoen is.



Komponent L2280

**Tabel 2.1: Verbindings geïdentifiseer in die reukmerkvlouistof van die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris***

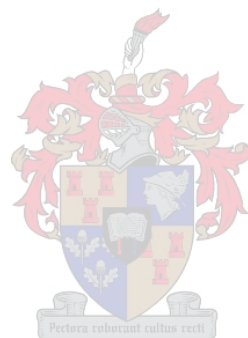
Bespreek in §	Verbinding	EI-Massa-spektrum Fig. No.	CI-Massa-spektrum Fig. No.	EI-Massa-spektrum van gesintetiseerde verbindings Fig.No.	Komponent gevind in:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.1	Dekaan				B108			a,b,c
2.1.1	Undekaan	2.4			B188			a,b,c
2.1.1	Tetradekaan				B916			a,b,c
2.1.2	Geranielasetoon	2.5			B2191	E2196	L2152	a,b,c
2.1.2	Nerolidol	2.6			B2800			a,b,c
2.1.2	Heksahidrofarnesiel-asetoon	2.7					L3093	a,b,c
2.1.2	Skwaleen	2.8			B5383	E5392	L5606	a,b,c
2.1.3	1-Heksanol					E629	L701	a,b,c
2.1.3	1-Heptanol					E929	L951	a,b,c
2.1.3	1-Oktanool				B1266		L1253	a,b,c
2.1.3	1-Nonanol	2.9			B1611		L1584	a,b,c
2.1.3	1-Tetradekanol	2.10			B3204		L3213	a,b,c
2.1.3	1-Heksadekanol	2.11			B3767		L3795	a,b,c
2.1.3	1-Oktadekanol	2.12					L4324	a,b,c
2.1.4	3-Metiel-1-butanol	2.13			B310	E319		a,b,c
2.1.5	1-Okten-3-ol	2.14					L922	a,b,c
2.1.5	9-Heksadeken-1-ol	2.15					L3841	a,b,f





**Tabel 2.1. Vervolg.**

Bespreek in §	Verbinding	EI-Massa-spektrum Fig. No.	CI-Massa-spektrum Fig. No.	EI-Massa-spektrum van gesintetiseerde verbindings Fig.No.	Komponente gevind in:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.6	2-Fenieletanol	2.16			B2317	E2308		a,b,c
2.1.6	Fenol	2.17			B2615	E2612		a,b,c
2.1.7	Furfurielalkohol	2.18					L1604	a,b,c
2.1.8	Heksanaal						L150	a,b,c
2.1.8	Heptanaal	2.19					L258	a,b,c
2.1.8	Oktanaal				B448		L422	a,b,c
2.1.8	Nonanaal				B723		L632	a,b,c
2.1.9	(Z)-2-Heptenaal	2.20					L499	a,b,c
2.1.9	(E)-2-Oktenaal	2.21					L740	a,b,c
2.1.9	(Z)-2-Undekenaal	2.22					L1781	a,b,c
2.1.10	Bensaldehyd	2.23			B1040	E1052		a,b,c
2.1.11	2-Heptanoon	2.24			B254	E286		a,b,c
2.1.11	2-Oktaan				B439			a,b,c
2.1.11	2-Nonanoon				B713	E726	L645	a,b,c
2.1.11	2-Dekanoon				B1026		L945	a,b,c
2.1.11	2-Undekanoon	2.25			B1386	E1382		a,b,c
2.1.11	2-Tridekanoon	2.27					L2039	a,b,c



**Tabel 2.1. Vervolg.**

Besprek in §	Verbinding	EI-Massa- spektrum Fig. No.	CI-Massa- spektrum Fig. No.	EI-Massa- spektrum van gesintetiseerde verbinding Fig.No.	Komponente Gevind In:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.11	2-Pentadekanoon	2.28			B2732		L2732	a,b,c
2.1.11	2-Heptadekanoon	2.26					L3368	a,b,c
2.1.11	3-Heptanoon	2.29			B213			a,b,c
2.1.12	3-Metiel-2-oktanoon	2.30		2.34	B478			a,b
2.1.12	3-Metiel-2-nonanoon	2.31		2.36	B754			a,b
2.1.12	3-Metiel-2-dekanoon	2.32			B1079			a,g
2.1.13	Asetofenoon	2.37			B1447	E1453		a,b,c
2.1.14	Asynsuur	2.38				E877	L1011	a,b,c
2.1.14	Propanoësuur	2.39					L1238	a,b,c
2.1.14	Butanoësuur						L1501	a,b,c
2.1.14	Pentanoësuur						L1840	a,b,c
2.1.14	Heksanoësuur				B2158	E2153	L2181	a,b,c
2.1.14	Heptanoësuur					E2489	L2512	a,b,c
2.1.14	Oktanoësuur	2.40	2.41		B2816	E2816	L2835	a,b,c,d
2.1.14	Nonanoësuur				B3124	E3123	L3148	a,b,c
2.1.14	Dekanoësuur				B3423	E3423	L3449	a,b,c
2.1.14	Undekanoësuur				B3557		L3582	a,b,c

**Tabel 2.1. Vervolg.**

Besprek in §	Verbinding	EI-Massa- spektrum Fig. No.	CI-Massa- spektrum Fig. No.	EI-Massa- spektrum van gesintetiseerde verbinding Fig.No.	Komponente Gevind In:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.14	Dodekanoësuur	2.42			B3983	E3983	L4015	a,b,c
2.1.14	Tetradekanoësuur	2.43			B4506	E4505	L4616	a,b,c
2.1.14	Pentadekanoësuur	2.44			B4725	E4752	L4826	a,b,c
2.1.14	Heksadekanoësuur	2.45			B4992	E4993	L5062	a,b,c
2.1.14	Oktadekanoësuur	2.46			B5450	E5448		a,b,c
2.1.15	2-Etielheksanoësuur	2.47			B2492			a,b,c
2.1.15	2-Metielnonanoësuur	2.48		2.52	B3174	E3175		a,b
2.1.15	2-Metieldekanoësuur	2.49		2.53	B3468	E3467		a,b
2.1.15	2-Metielundekanoësuur	2.50		2.54	B3580			a,b
2.1.16	2-Propenoësuur	2.55					L1521	a,b,c
2.1.16	(Z)-9-Dodekenoësuur	2.56	2.57		B4062	E4060	L4095	a,b,c,d
2.1.16	(Z)-9-Heksadekenoësuur	2.58			B5055	E5056	L5121	a,b,c
2.1.17	Benseenasynsuur	2.59			B4083		L4113	a,b,c
2.1.18	Etieldekanoaat	2.60			B1551			a,b,c
2.1.19	Dimetielsuksinaat	2.61		2.65	B1348			a,b,c
2.1.19	Dimetielglutaraat	2.62		2.66	B1689			a,b,c
2.1.19	Dimetieladipaat	2.63		2.67	B2072			a,b,c



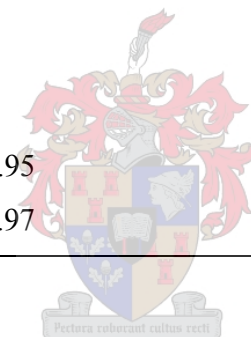
**Tabel 2.1. Vervolg.**

Bespreek in §	Verbinding	EI-Massa- spektrum Fig. No.	CI-Massa- spektrum Fig. No.	EI-Massa- spektrum van gesintetiseerde verbindingen Fig.No.	Komponente gevind in:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.20	Oktan-4-olied	2.68			B2281			a,b,c
2.1.20	Nonan-4-olied				B2624	E2626		a,b,c
2.1.20	Dekan-4-olied	2.69			B2965	E2966	L2970	a,c,g
2.1.20	Undekan-4-olied	2.70			B3288			a,b,c
2.1.20	Dodekan-4-olied	2.71	2.72		B3611	E3603	L3628	a,b,c,d
2.1.20	Tridekan-4-olied	2.73			B3898			a,c,g
2.1.20	Tetradekan-4-olied	2.74			B4190	E4191	L4222	a,c,g
2.1.21	But-3-en-4-olied	2.75					L1801	a,b,c
2.1.21	(Z)-6-Dodeken-4-olied	2.76			B3651	E3646	L3668	a,b,c
2.1.22	Pentan-5-olied	2.77				E1885	L1915	a,b,c
2.1.22	Oktan-5-olied	2.78	2.79		B2415	E2416		a,b,c,d
2.1.22	Nonan-5-olied	2.80			B2757	E2761		a,b,c
2.1.22	Dekan-5-olied	2.81			B3092	E3088	L3105	a,b,c
2.1.22	Undekan-5-olied	2.82			B3408			a,b,c
2.1.22	Dodekan-5-olied	2.83	2.84		B3725	E3719	L3748	a,b,c,d
2.1.22	Tridekan-5-olied	2.85			B4017			a,c,g
2.1.22	Tetradekan-5-olied	2.86	2.87		B4304	E4304	L4304	a,c,d,g

**Tabel 2.1. Vervolg.**

Bespreek in §	Verbinding	EI-Massa- spektrum Fig. No.	CI-Massa- spektrum Fig. No.	EI-Massa- spektrum van gesintetiseerde verbindings Fig.No.	Komponente gevind in:			Identifikasie metode
					Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.23	Asetamied	2.88					L1945	a,b,c
2.1.23	Formamied	2.89					L2000	a,b,c
2.1.23	Propioonamied	2.90					L2072	a,b,c
2.1.23	1,1-Dimetielureum	2.91					L2868	a,b,c
2.1.23	Ureum	2.92					L4593	a,b,c
2.1.24	1-Metiel-2-pirrolidinoon	2.93					L1571	a,b,c
2.1.24	2-Piperidinoon	2.94	2.95		B2895	E2888	L2931	a,b,c,d
2.1.25	Dimetielsulfoon	2.96	2.97		B2259	E2265	L2280	a,b,c,d

- a: Lae-resolusie EI-massaspektrometrie  
b: Retensiydvergelyking  
c: Gepubliseerde data  
d: Chemiese-ionisasie (CH<sub>4</sub>) massaspektrometrie  
e: Posisie van dubbelbinding onbekend  
f: *E/Z*-Isomerie onseker  
g: Volgens retensiydinkrement



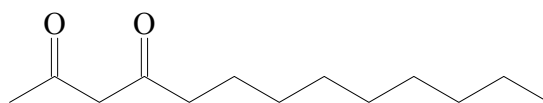
## 2.1.26 Onvolledig geïdentifiseerde verbindings

Sommige van die komponente in die reukmerkvlouistof van die Bengaalse tier het ongeïdentifiseer gebly (Tabel 2.2). Verskeie faktore het hiertoe bygedra, onder andere die besonder lae konsentrasies van die verbindings in die reukmerkvlouistof van die Bengaalse tier, onsuiverhede wat saam met die verbindings in die GC-MS analyses geëluër het, onvolledige massaspektrometriese verwysingsdata in die literatuur en die gebrek aan sintetiese materiaal vir retensiedyvergelings. Sommige van die onvolledig geïdentifiseerde komponente word hier kortliks bespreek.

Komponent L4364 (Fig. T2.2b; Fig. 2.98) se EI-massaspektrum is vergelyk met gepubliseerde data<sup>5</sup> en die komponent is tentatief as (*E*)- of (*Z*)-9-oktadeken-1-ol geïdentifiseer. Hierdie komponent se massaspektrum stem besonder goed ooreen met dié van Komponent L3841 (Fig. T2.2b; Fig. 2.15), wat reeds geïdentifiseer is as 9-heksadeken-1-ol. Prominente ione kom in die komponent se massaspektrum voor by  $m/z$  250 en  $m/z$  222, wat onderskeidelik die  $[M-18]^+$  en die  $[M-46]^+$  ione is en wat kenmerkend is van langketting onversadigde alkohole. Komponent L4364 is dus moontlik (*E*)- of (*Z*)-9-oktadeken-1-ol.

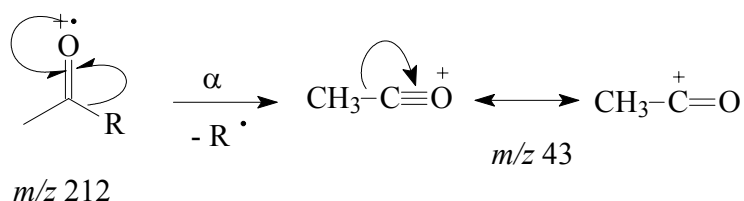
Komponent L4446 (Fig. T2.2b; Fig. 2.99) se EI-massaspektrum is vergelyk met gepubliseerde data<sup>5</sup> en hierdie komponent is tentatief geïdentifiseer as 9,12-oktadekadiën-1-ol. Die ioon met die hoogste massa by  $m/z$  266 in Komponent L4446 se massaspektrum stem ooreen met die molekulêre massa van 9,12-oktadekadiën-1-ol. Die  $[M-18]^+$  ioon word waargeneem by  $m/z$  248. Dus kan aanvaar word dat Komponent L4446 moontlik 9,12-oktadekadiën-1-ol kan wees. Die stereochemie van hierdie tentatief geïdentifiseerde verbinding is onbekend.

Die EI-massaspektrum van Komponent B2641 (Fig. T2.1a; Fig. 2.100) het vier ione wat van belang is, naamlik  $m/z$  43 (basispiek),  $m/z$  85,  $m/z$  100 en  $m/z$  212 (molekulêre ioon). Die komponent se massaspektrum dui daarop dat dit moontlik 'n diketoon mag wees. Op grond van 'n vergelyking van Komponent B2641 se EI-massaspektrum met gepubliseerde spektra<sup>5</sup> is hierdie verbinding tentatief as tridekaan-2,4-dioon geïdentifiseer.

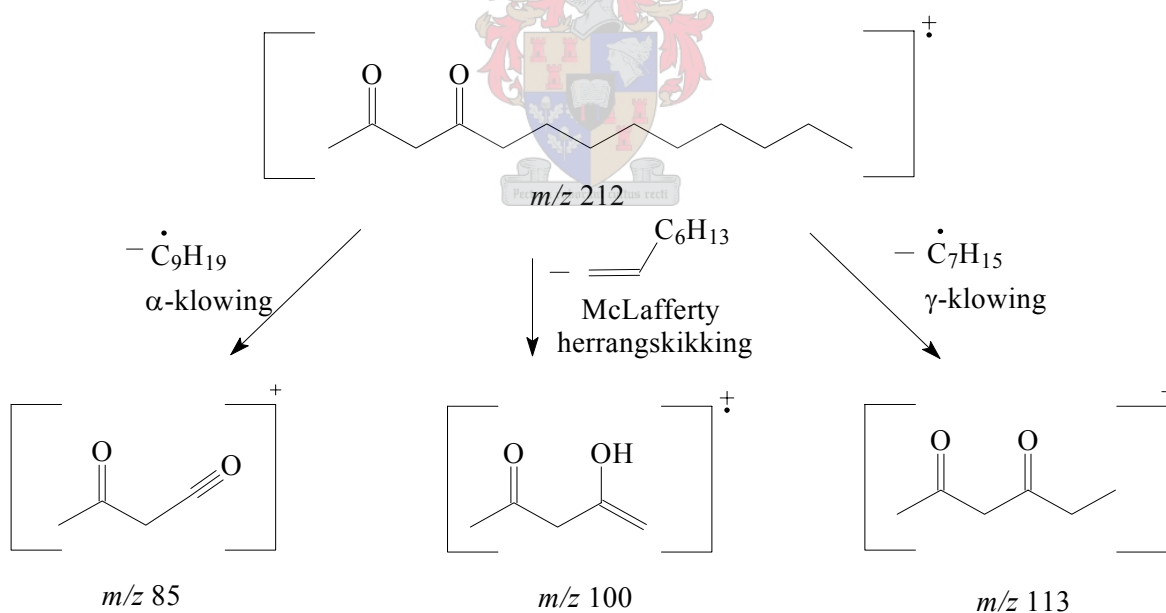


Tridekaan-2,4-dioon

Diketone fragmenteer hoofsaaklik tussen die karbonielgroepe om asiliumione te vorm, en die basispiek van Komponent B2641 kan verklaar word in terme van so 'n asiliumioonvorming:

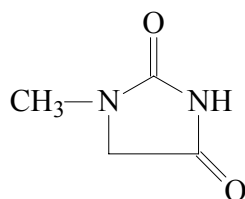


Die vorming van die ioon by  $m/z\ 85$  kan verklaar word deur nog 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie by C4 en die verlies van 'n nonielgroep.  $\gamma$ -Klowing dra moontlik by tot die intensiteit van die prominente ioon by  $m/z\ 113$ . Die dryfkrag vir hierdie fragmentasiepatroon is waarskynlik die klowing van die allielbinding wat lei tot die vorming van 'n enol, of die vorming van 'n sikliese oksonium ioon na die binding gebreek het.<sup>73</sup> Die intensiewe ioon by  $m/z\ 100$  kan toegeskryf word aan 'n McLafferty-herrangskikkingsreaksie. Die verskillende fragmentasies sowel as die McLafferty-herrangskikking kan skematies vir hierdie verbinding geïllustreer word:



Op grond van hierdie oorwegings is Komponent B2641 tentatief as tridekaan-2,4-dioon geïdentifiseer.

In die EI-massaspektrum van Komponent B4423 (Fig. T2.1b; Fig. 2.101) is daar twee prominente ione wat van belang is, naamlik dié by  $m/z$  42 (basispiek) en  $m/z$  114. Deur gebruik te maak van CIMS is vasgestel dat Komponent B4423 se molekulêre massa 114 Da is (Fig. 2.102). Die komponent se massaspektrum is vergelyk met gepubliseerde spektra<sup>5</sup> waarvolgens dit tentatief geïdentifiseer is as 1-metiel-imidasolidien-2,4-dioon.



1-Metiel-imidasolidien-2,4-dioon

Komponent B4437 (Fig. T2.1b; Fig. 2.103) kom in die TIC van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier (Fig T2.1b) voor met 'n basispiek by  $m/z$  30. Ander belangrike ione in die betrokke massaspektrum is die ioon by  $m/z$  44, 'n ioonpaar by  $m/z$  73 en 74 en  $m/z$  130. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog<sup>5</sup> het butielureum as die struktuur vir Komponent B4437 voorgestel. Alhoewel die massaspektrum van Komponent B4437 en die gepubliseerde spektrum van butielureum<sup>5</sup> baie goed ooreenstem, is die ioon met die hoogste waarneembare massa in die hoë massagebied van die EI-massaspektrum van Komponent B4437 egter die ioon by  $m/z$  130, terwyl die ioon by  $m/z$  116 die ioon met die hoogste massa in die massaspektrum van butielureum is. Komponent B4437 is dus tentatief as pentielureum geïdentifiseer.

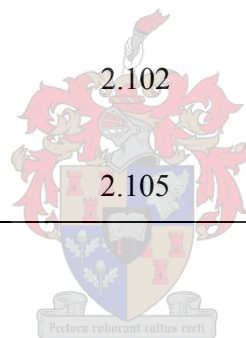
Komponent E5544 (Fig. T2.3b; Fig. 2.104) is een van die onsuiverhede teenwoordig in die urine-ekstrak van die Bengaalse tier. Die molekulêre massa van Komponent E5544 is vasgestel as 390 Da deur gebruik te maak van chemiese-ionisasie (Fig. 2.105), wat ooreenstem met die molekulêre massa van *n*-oktielftalaat. Die komponent is tentatief geïdentifiseer as *n*-oktielftalaat deur vergelyking van die komponent se EI-massaspektrum met gepubliseerde spektra<sup>5</sup>. Dit is insiggewend dat hierdie tipe verbinding wat as plastiseermiddel in baie plastiekprodukte gebruik word, reeds in feitlik alle natuurprodukte wat deur LECUS ondersoek is, as kontaminante aangetref word.



**Tabel 2.2: Onvolledig geïdentifiseerde verbindings en onsuiverhede teenwoordig in die reukmerkvlouestof van die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris***

Bespreek in §	Verbinding	EI-Massa- spektrum Fig. No.	CI-Massa- spektrum Fig. No.	Komponent Gevind In:			Identifikasie metode
				Urine (Bodamp)	Urine (Ekstrak)	Lipied	
2.1.26	9-Oktadeken-1-ol	2.98				L4364	a,c,e,f
2.1.26	9,12-Oktadekadiën-1-ol	2.99		B4446		L4446	a,c,e,f
2.1.26	Tridekaan-2,4-dioon	2.100		B2641			a,c
2.126	1-Metiel-imidasolidien-2,4-dioon	2.101	2.102	B4423	E4421	L4507	a,c,d
2.1.26	Pentielureum	2.103		B4437		L4536	
2.1.26	<i>n</i> -Oktielftalaat	2.104	2.105		E5544		a,c,d

- a: Lae-resolusie EI-massaspektrometrie  
c: Gepubliseerde data  
d: Chemiese-ionisasie (CH<sub>4</sub>) massaspektrometrie  
e: Posisie van dubbelbinding onbekend  
f: *E/Z*-Isomerie onseker



## 2.1.27 Ongeïdentifiseerde verbindings

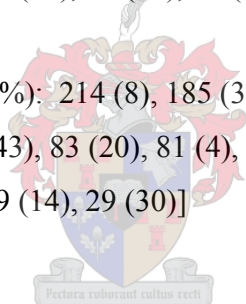
Daar is 'n verdere vyf komponente wat in redelike hoë relatiewe konsentrasies in die Bengaalse tier se reukmerkvlloeistof aanwesig is, maar wat by gebrek aan insiggewende inligting in die verbindings se massaspektra nie eenduidig geïdentifiseer kon word in hierdie studie nie. Die betrokke massaspektrometriese data word hier gegee:

*Komponent E2452* [MS  $m/z$  (%): 110 (100), 109 (49), 81 (44), 66 (6), 54 (56), 52 (17), 42 (11), 40 (15), 28 (29)];

*Komponent B3316 (E3316)* [MS  $m/z$  (%): 186 (1), 150 (2), 143 (12), 126 (4), 115 (9), 113 (9), 110 (32), 97 (24), 95 (5), 87 (42), 83 (5), 75 (3), 74 (100), 71 (15), 69 (22), 57 (16), 55 (47), 53 (6), 45 (18), 43 (62), 41 (63), 39 (20), 29 (30), 27 (26)];

*Komponent B3833 (E3831, L3864)* [MS  $m/z$  (%): 200 (5), 171 (3), 143 (33), 141 (30), 138 (2), 129 (2), 124 (2), 112 (2), 111 (2), 101 (14), 99 (13), 98 (4), 97 (6), 87 (4), 85 (47), 83 (19), 79 (4), 73 (77), 71 (47), 69 (23), 67 (8), 60 (27), 57 (69), 55 (80), 53 (11), 51 (2), 43 (97), 41 (100), 39 (30), 29 (74), 27 (43)]; en

*Komponent L4131 (E4131)* [MS  $m/z$  (%): 214 (8), 185 (3), 157 (31), 155 (27), 143 (3), 129 (2), 113 (7), 101 (16), 99 (18), 97 (9), 85 (43), 83 (20), 81 (4), 73 (81), 71 (39), 69 (20), 67 (5), 60 (19), 57 (56), 55 (44), 53 (5), 45 (9), 39 (14), 29 (30)]



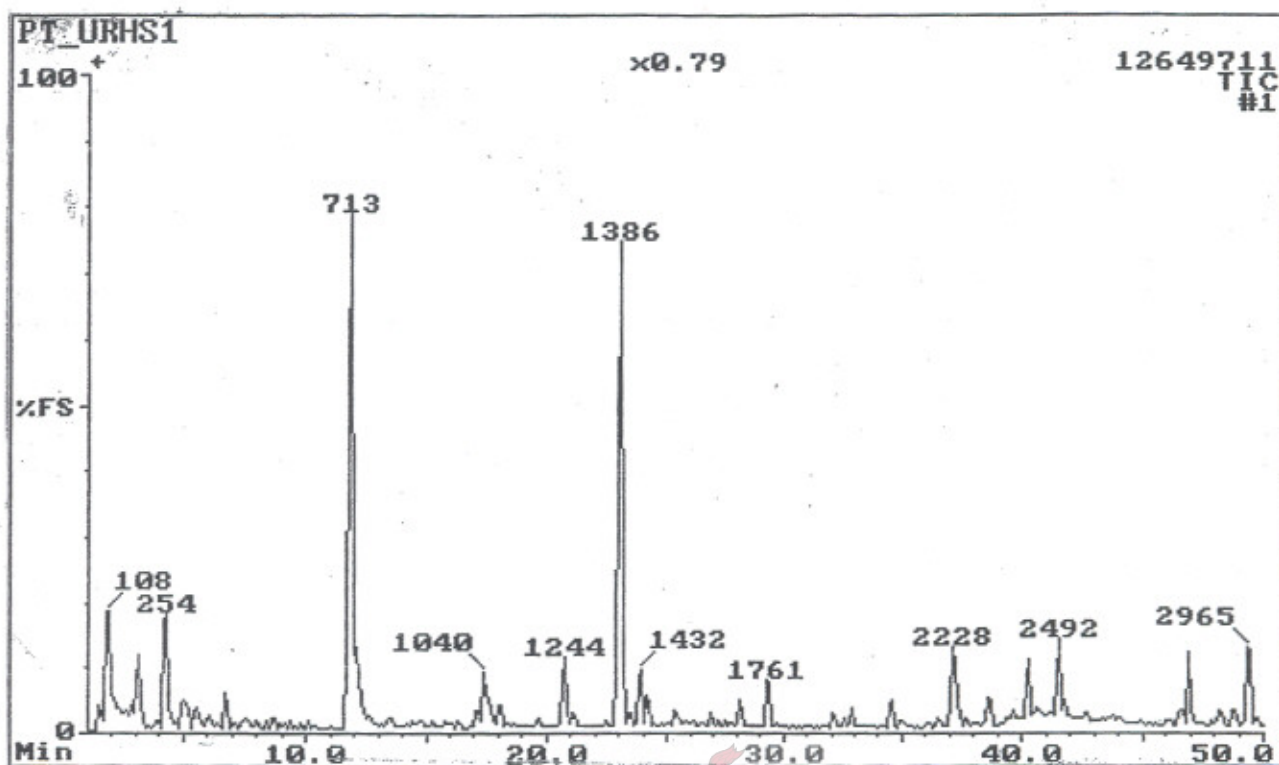


Fig. T2.1a: Totale ionstroomchromatogram (TIC) van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier. Die tweede deel van die TIC verskyn in Fig. T2.1b.

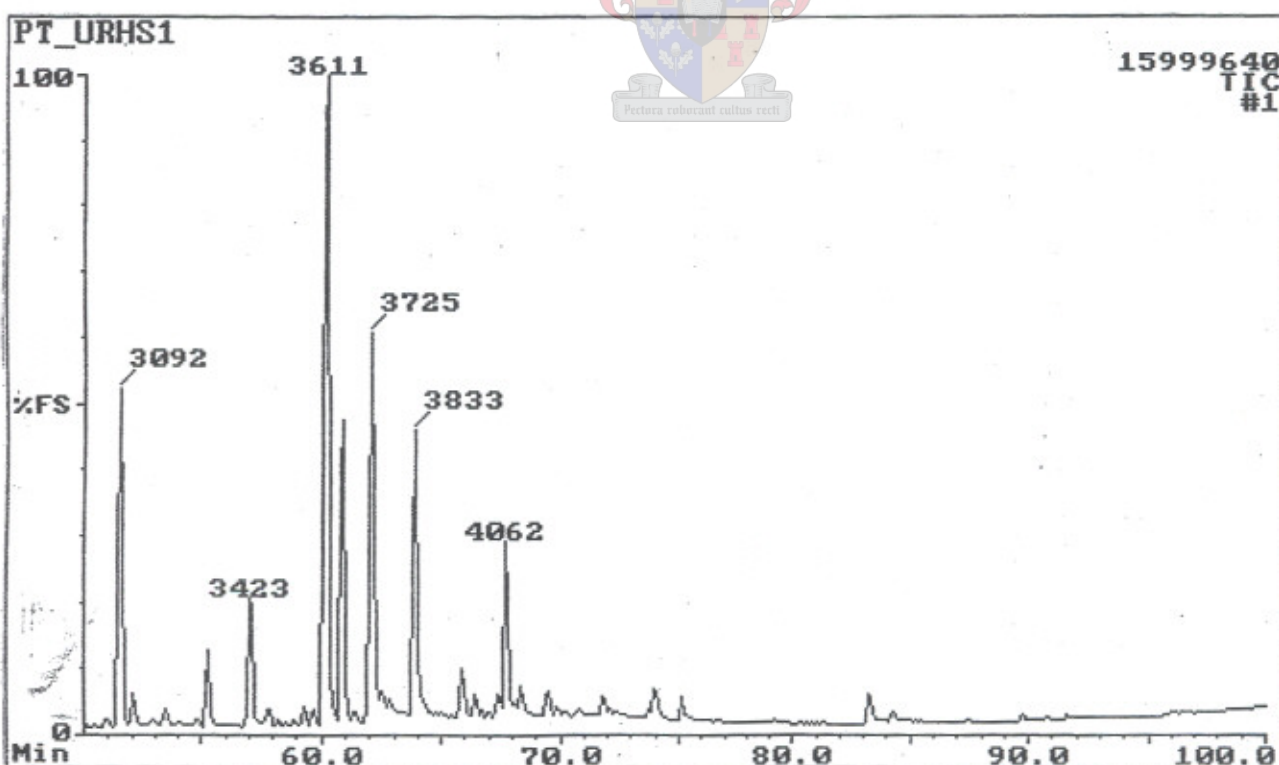


Fig. T2.1b: TIC (vervolg) van die bodamp van die urine van die Bengaalse tier. Die analitiese kondisies word in § 4.3.1.2 gegee.

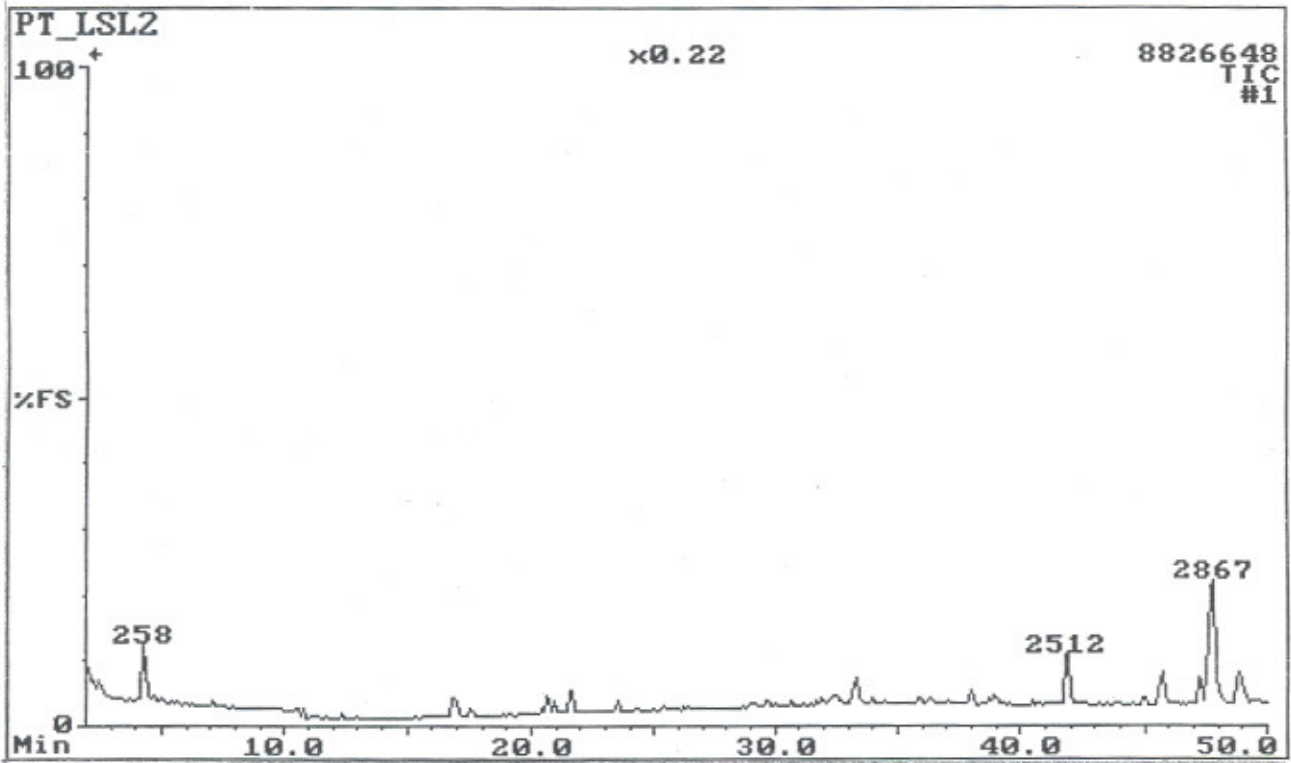


Fig. T2.2a: TIC van die lipiede van vlugtige komponente van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier.

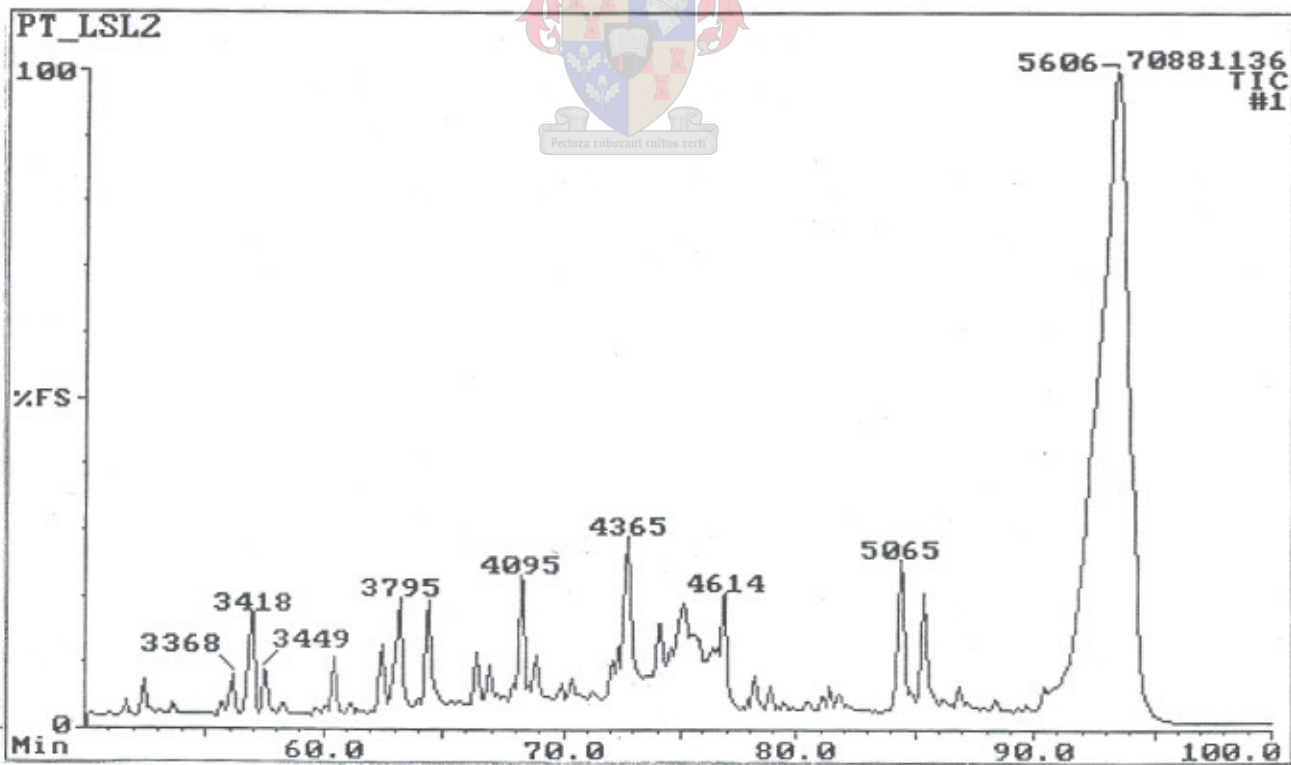


Fig. T2.2b: TIC (vervolg) van vlugtige komponente van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier.

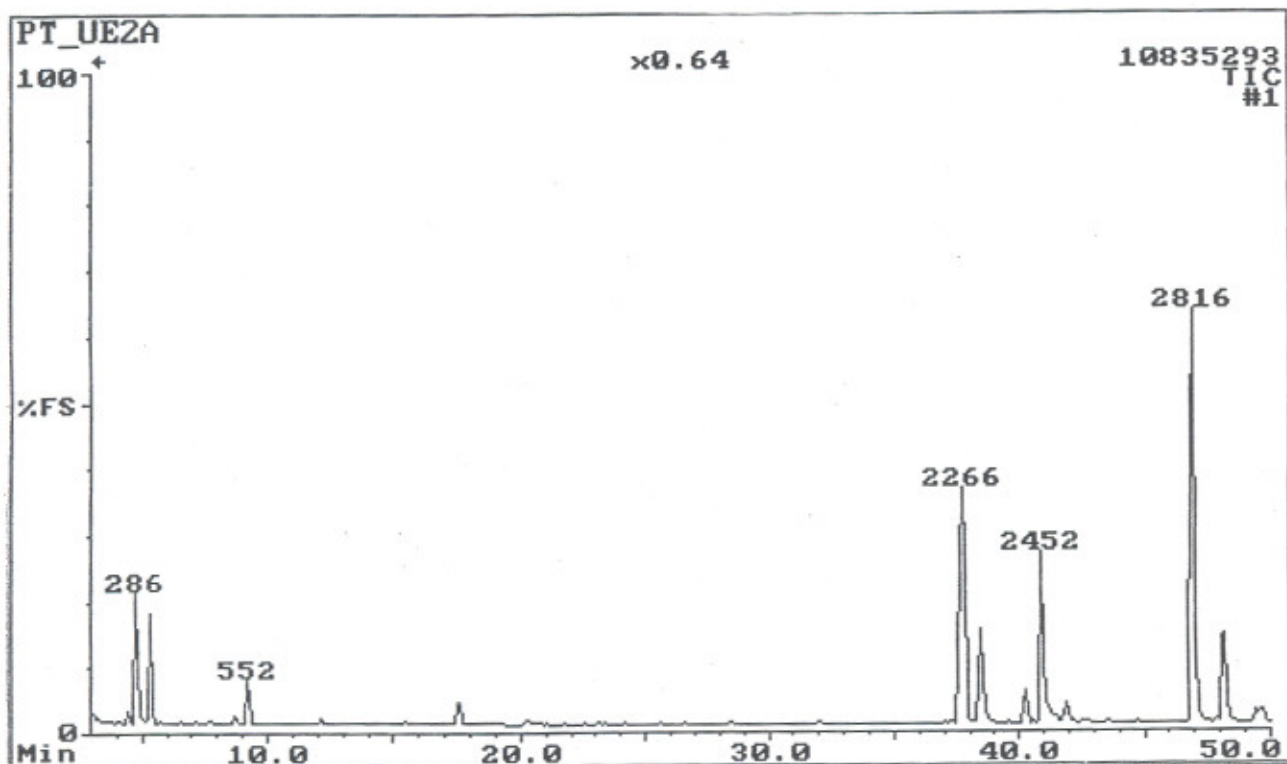


Fig. T2.3a: TIC van die dichlorometaan (DCM)-ekstrak van die urine van die Bengaalse tier.

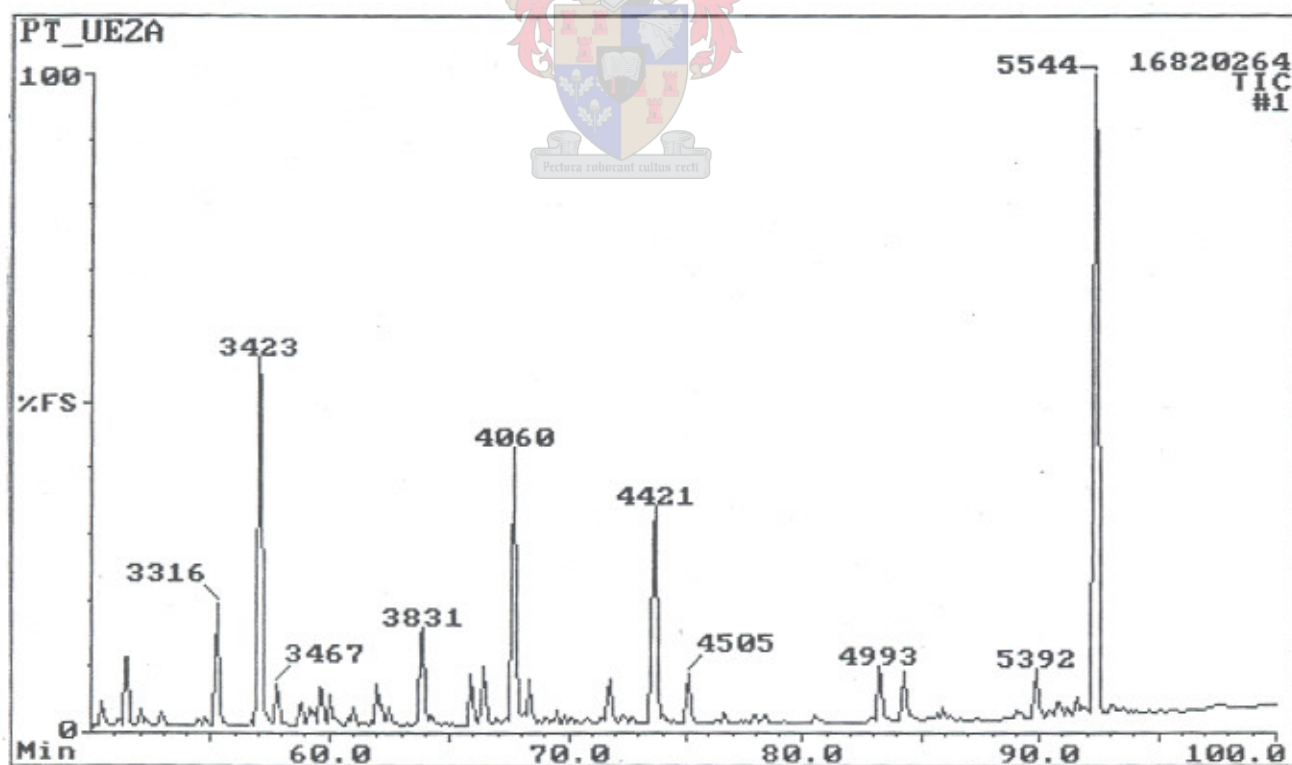


Fig. T2.3b: TIC (vervolg) van die DCM-ekstrak van die urine van die Bengaalse tier.



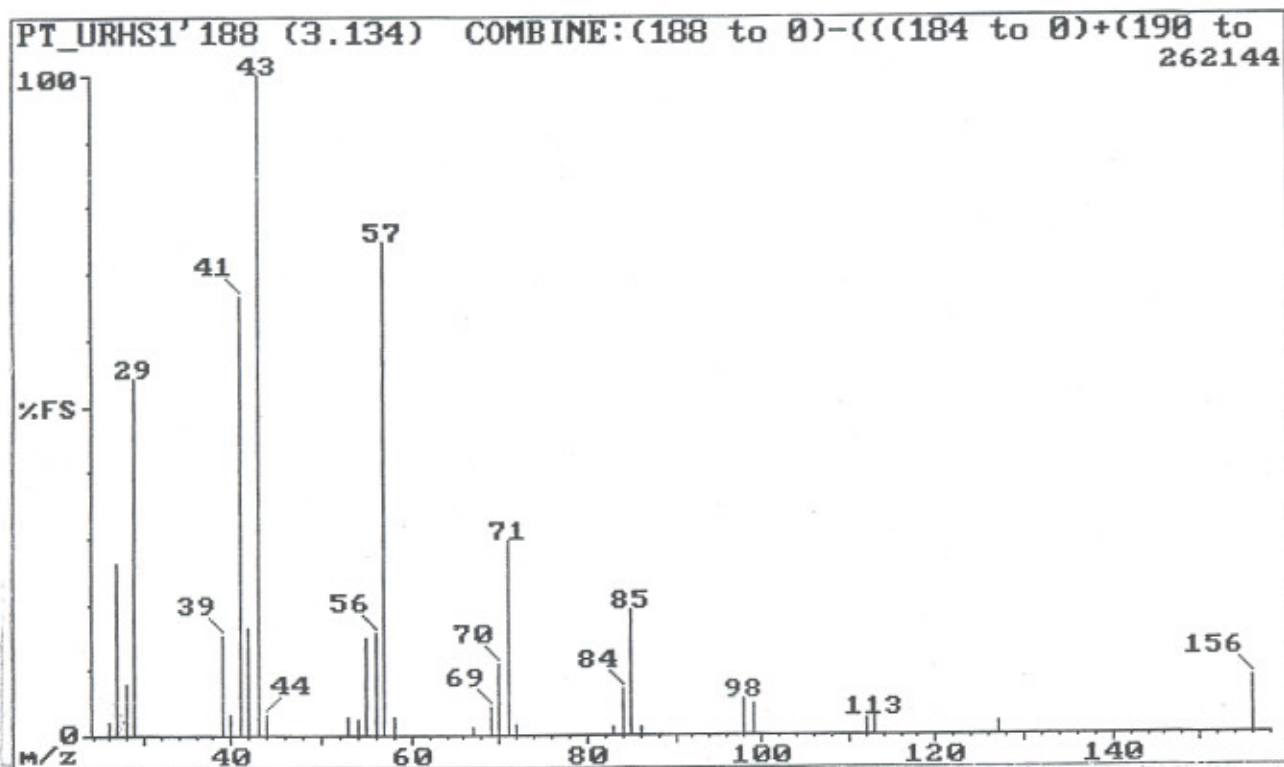


Fig. 2.4: EI-massaspektrum van Komponent B188 [undekaan].

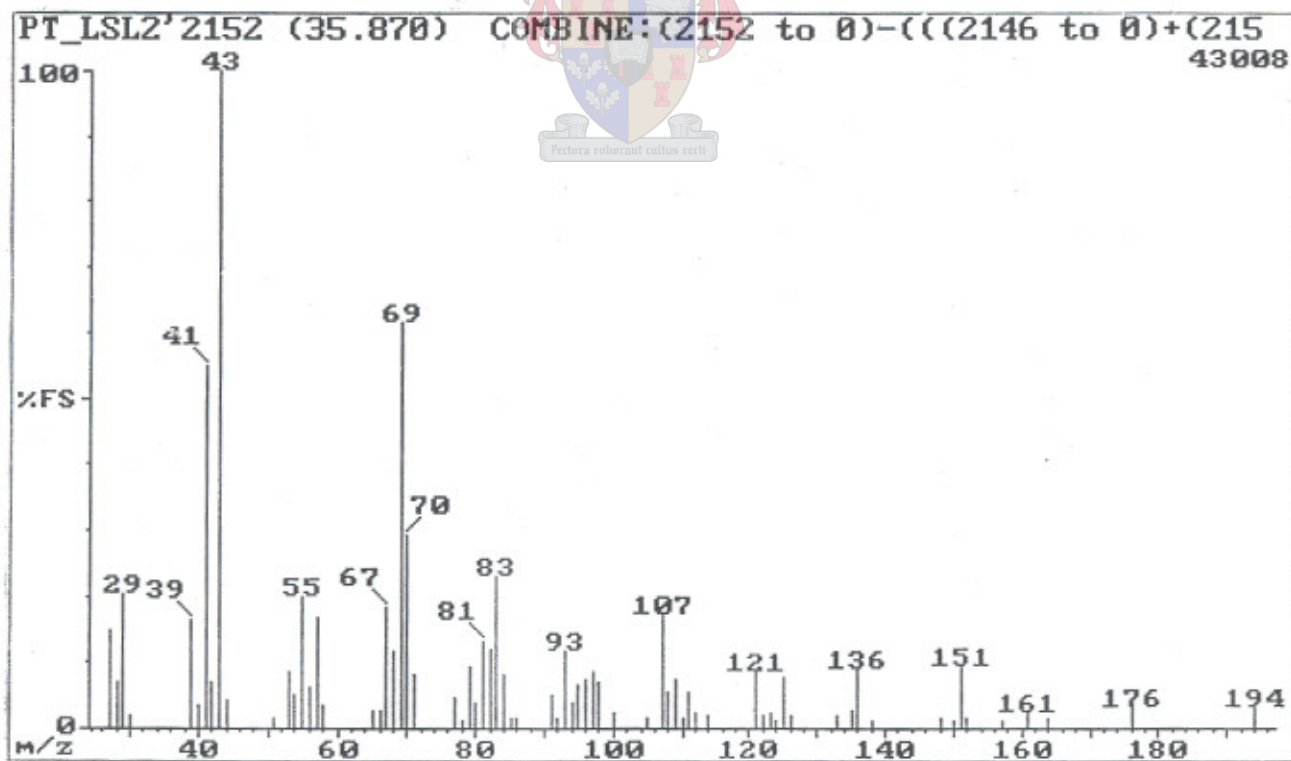


Fig. 2.5: EI-massaspektrum van Komponent L2152 [geranielasetoon].

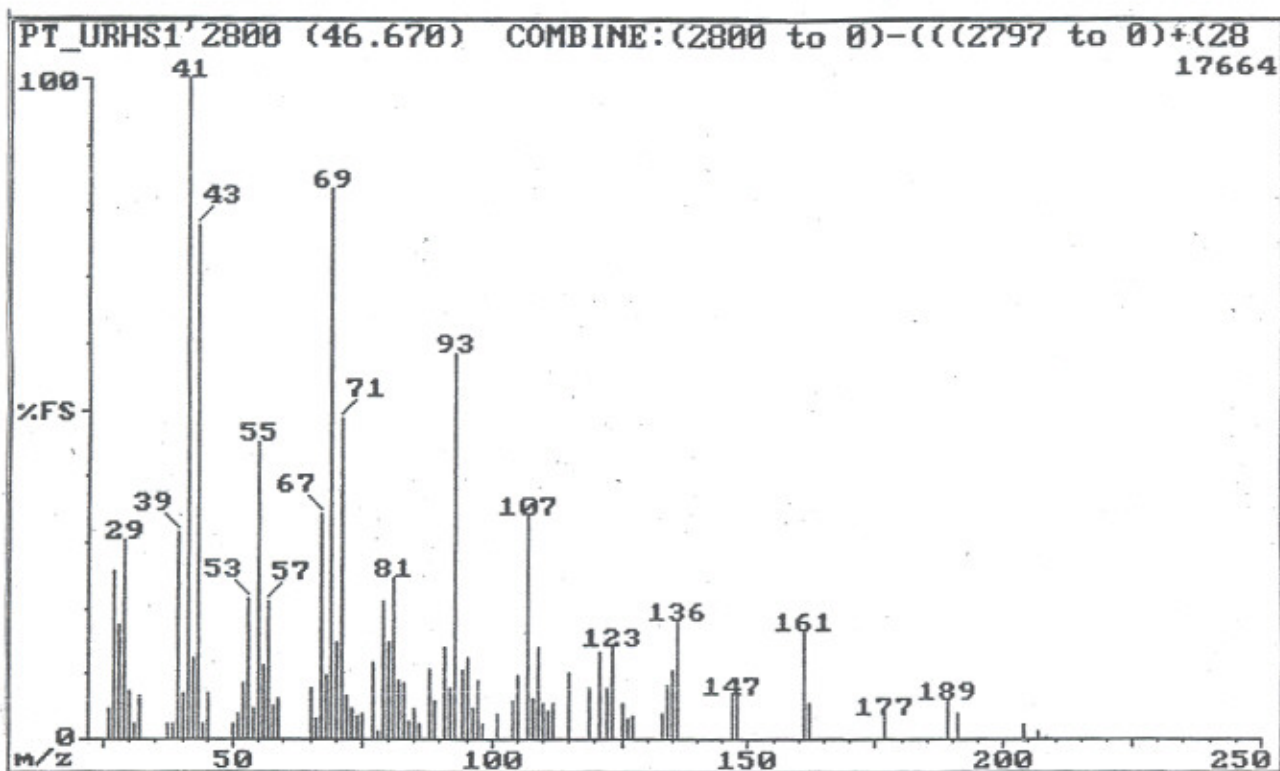


Fig. 2.6: EI-masspektrum van Komponent B2800 [nerolidol].

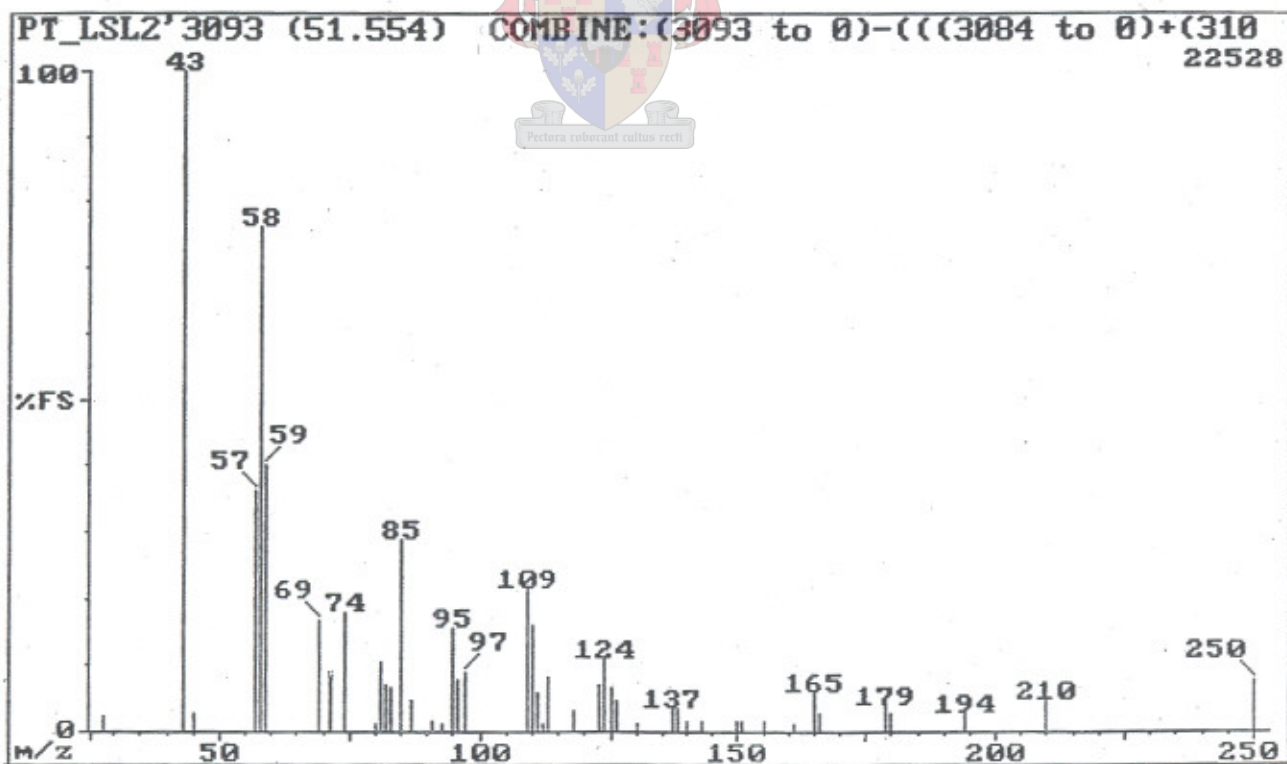


Fig. 2.7: EI-masspektrum van Komponent L3093 [heksahydrofarnesielasetoon].

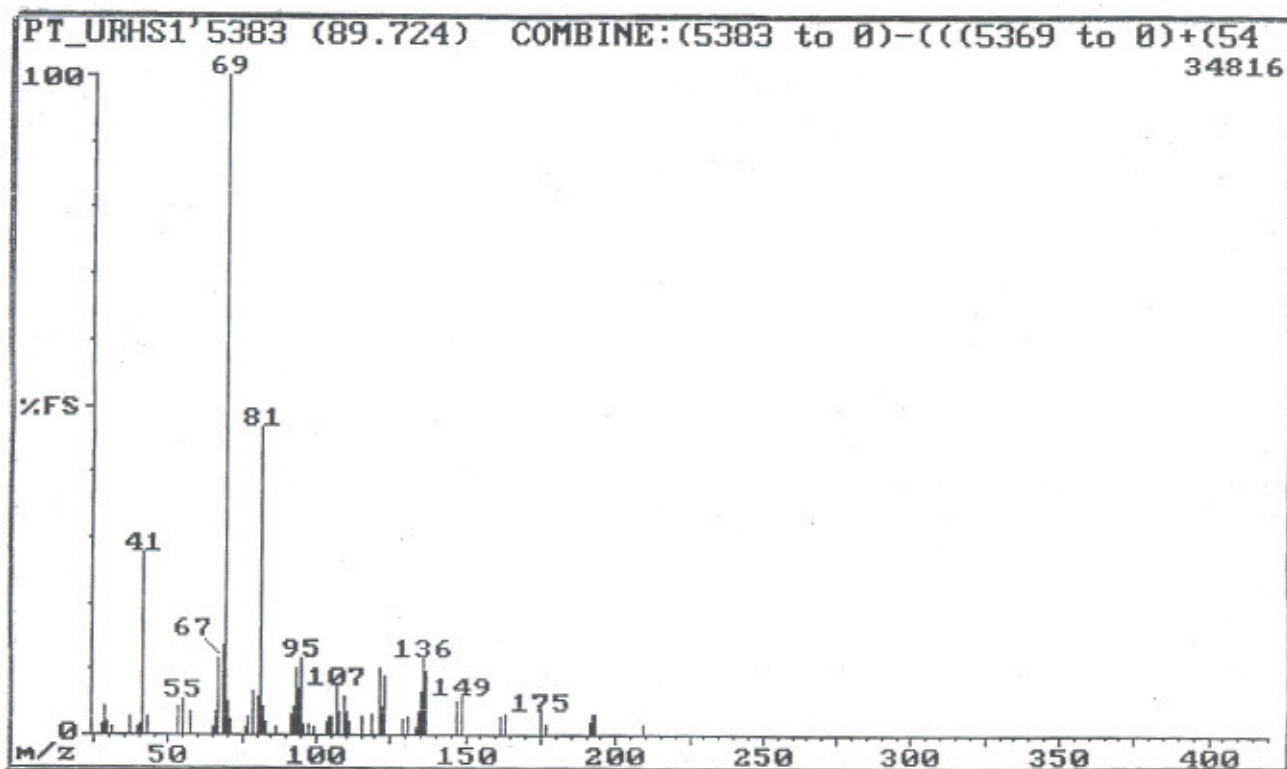


Fig. 2.8: EI-massaspektrum van Komponent B5383 [skwaleen].

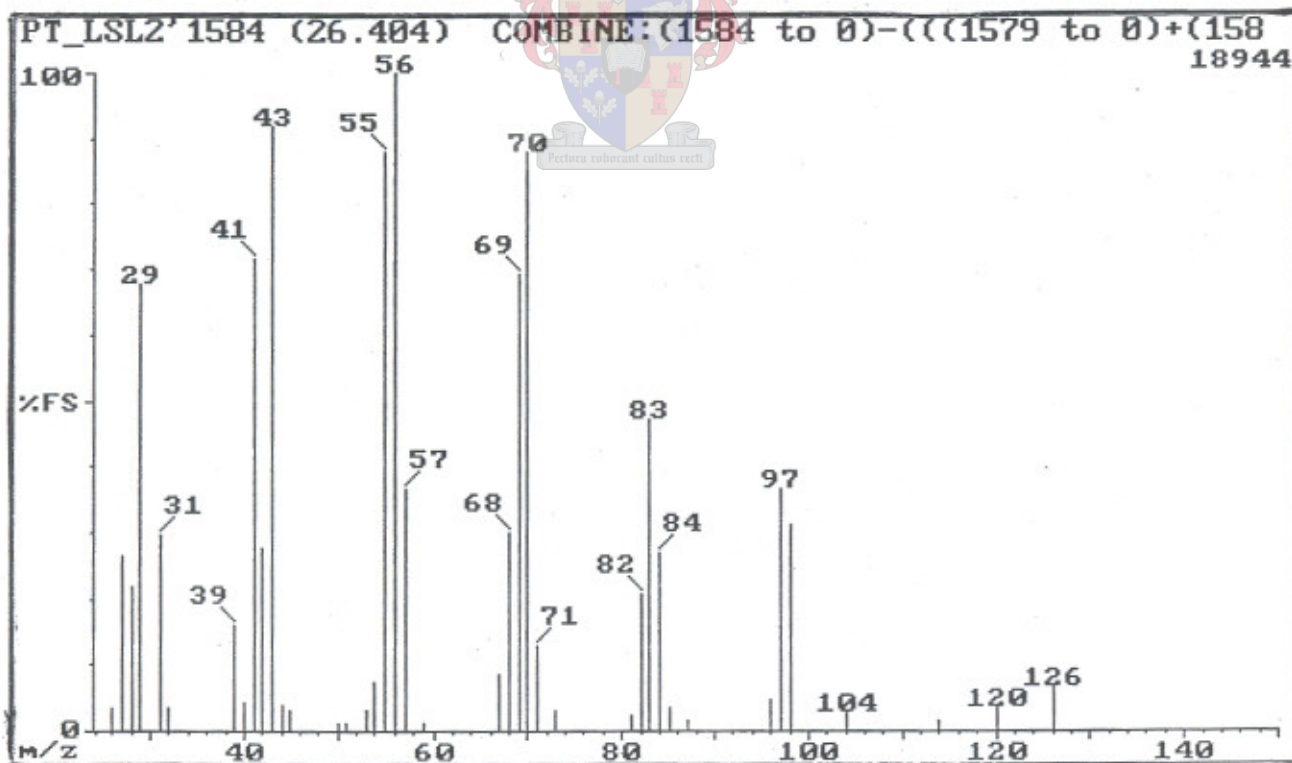


Fig. 2.9: EI-massaspektrum van Komponent L1584 [1-nonanol].



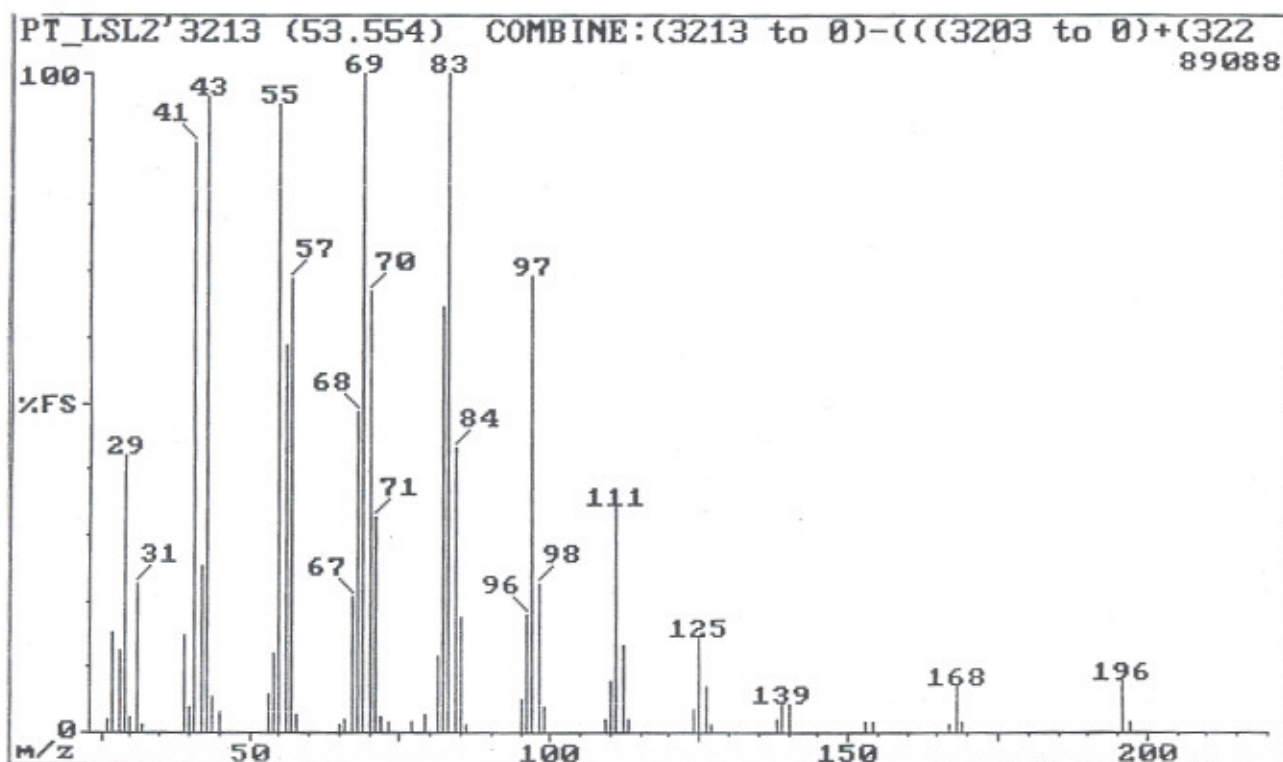


Fig. 2.10: EI-masspektrum van Komponent L3213 [1-tetradekanol].

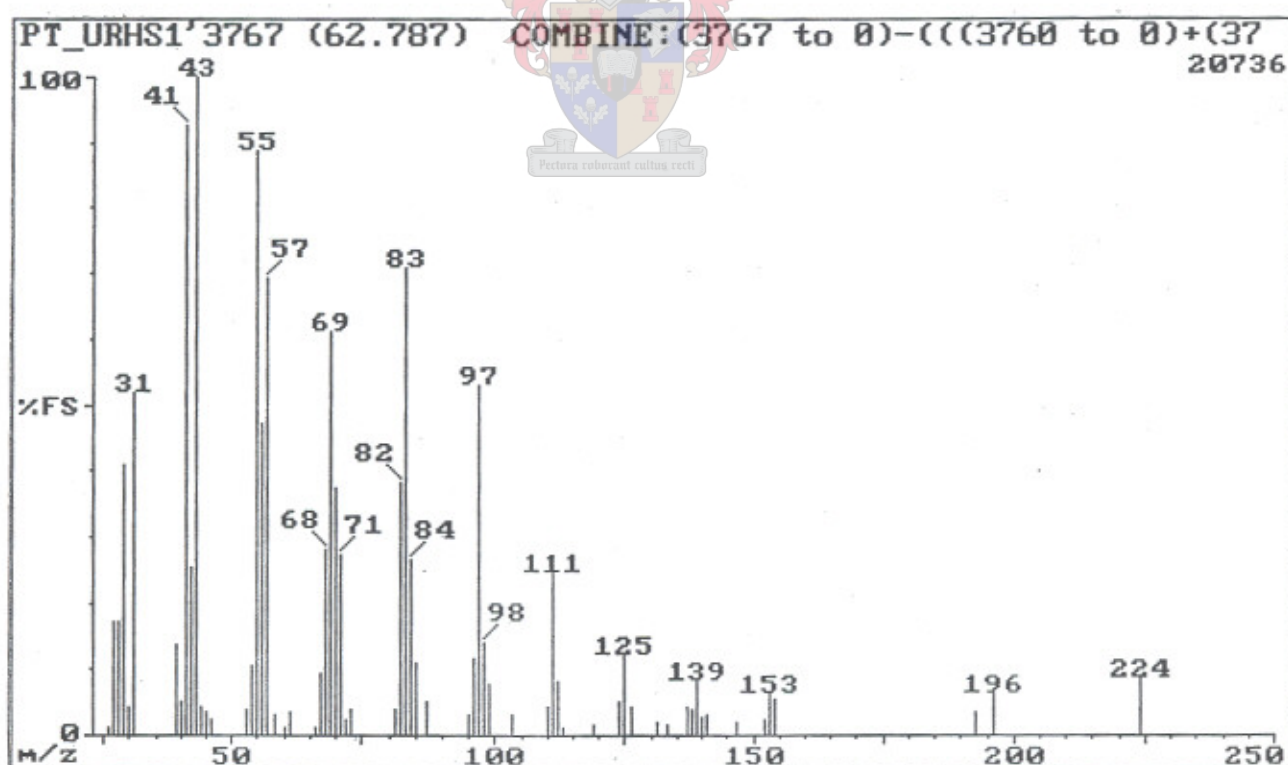


Fig. 2.11: EI-masspektrum van Komponent B3767 [1-heksadekanol].

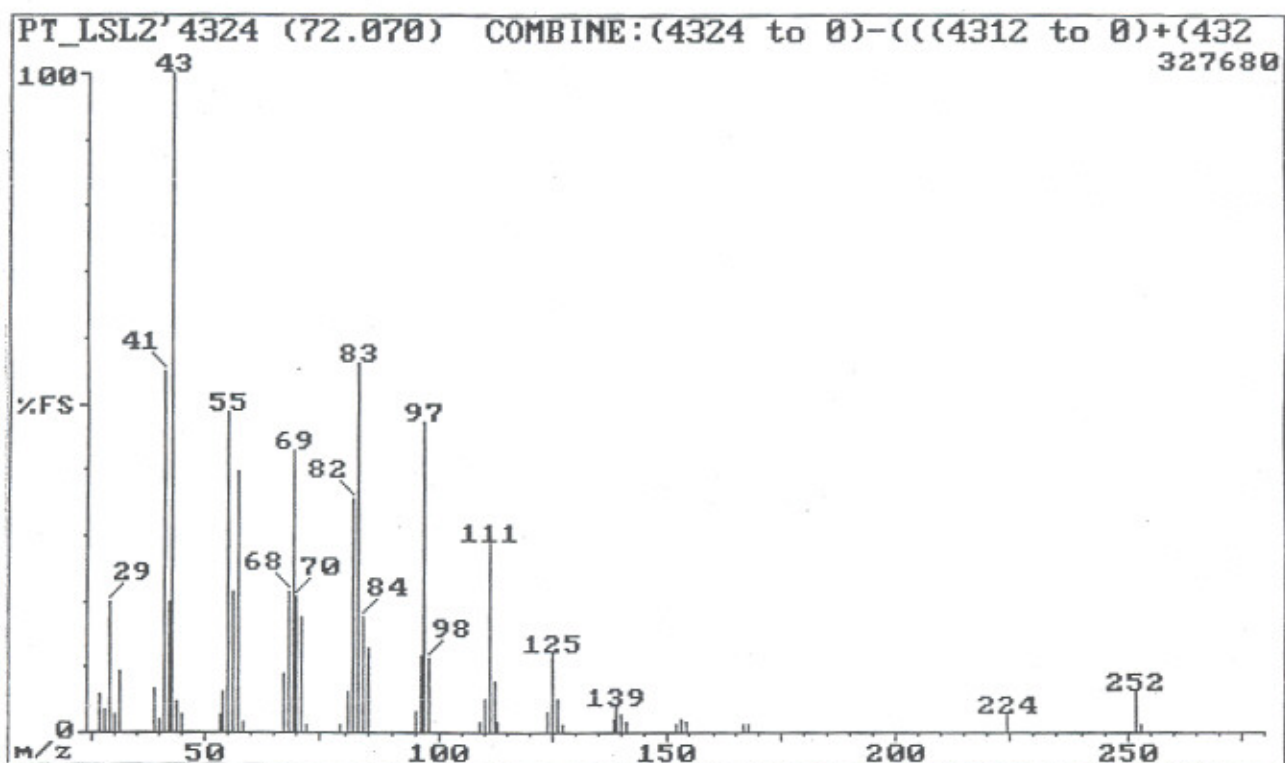


Fig. 2.12: EI-massaspektrum van Komponent L4324 [1-oktadecanol].

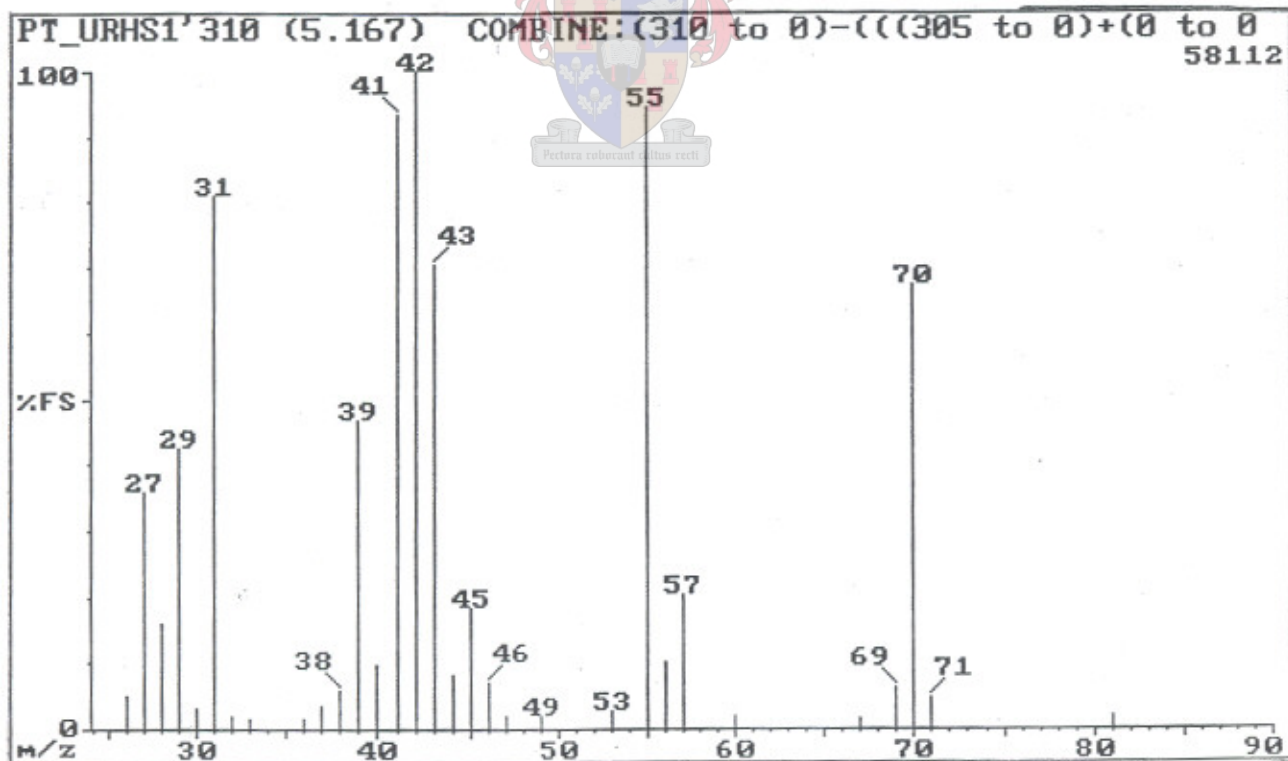


Fig. 2.13: EI-massaspektrum van Komponent B310 [3-metiel-1-butanol].

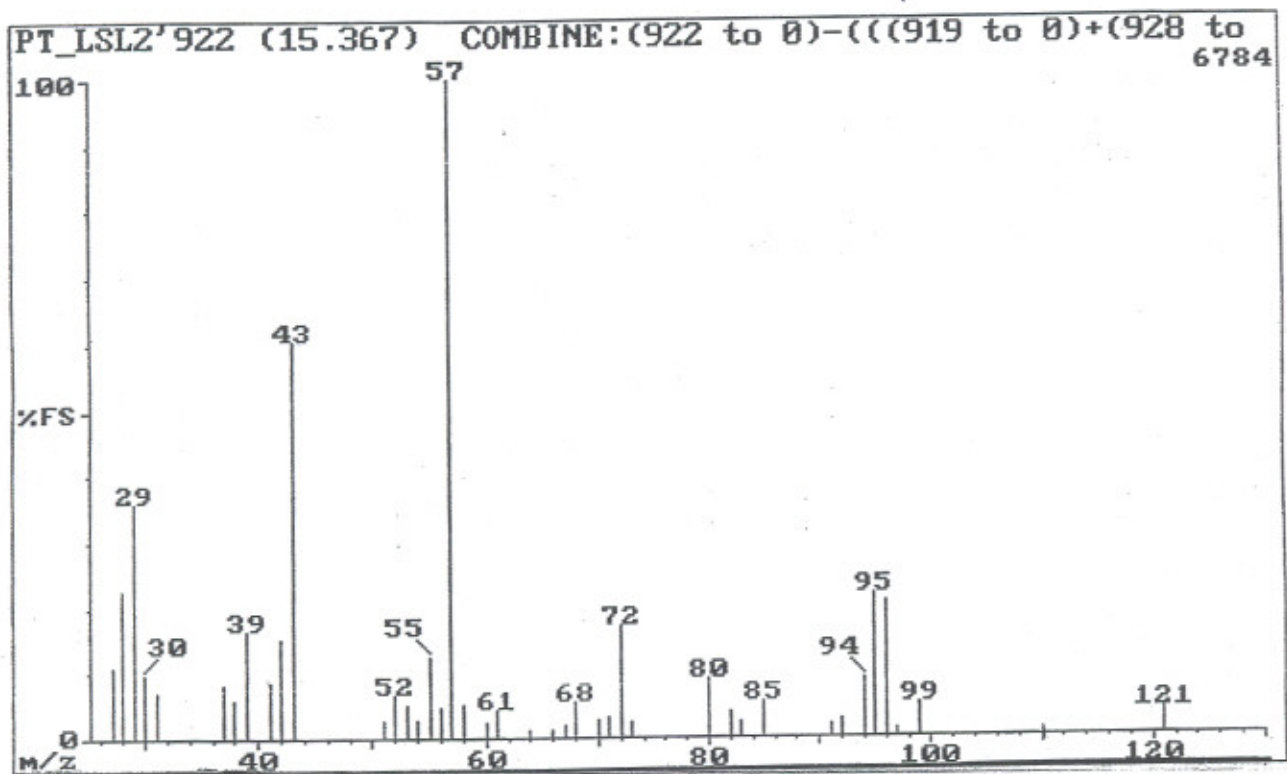


Fig. 2.14: EI-massaspektrum van Komponent L922 [1-okten-3-ol].

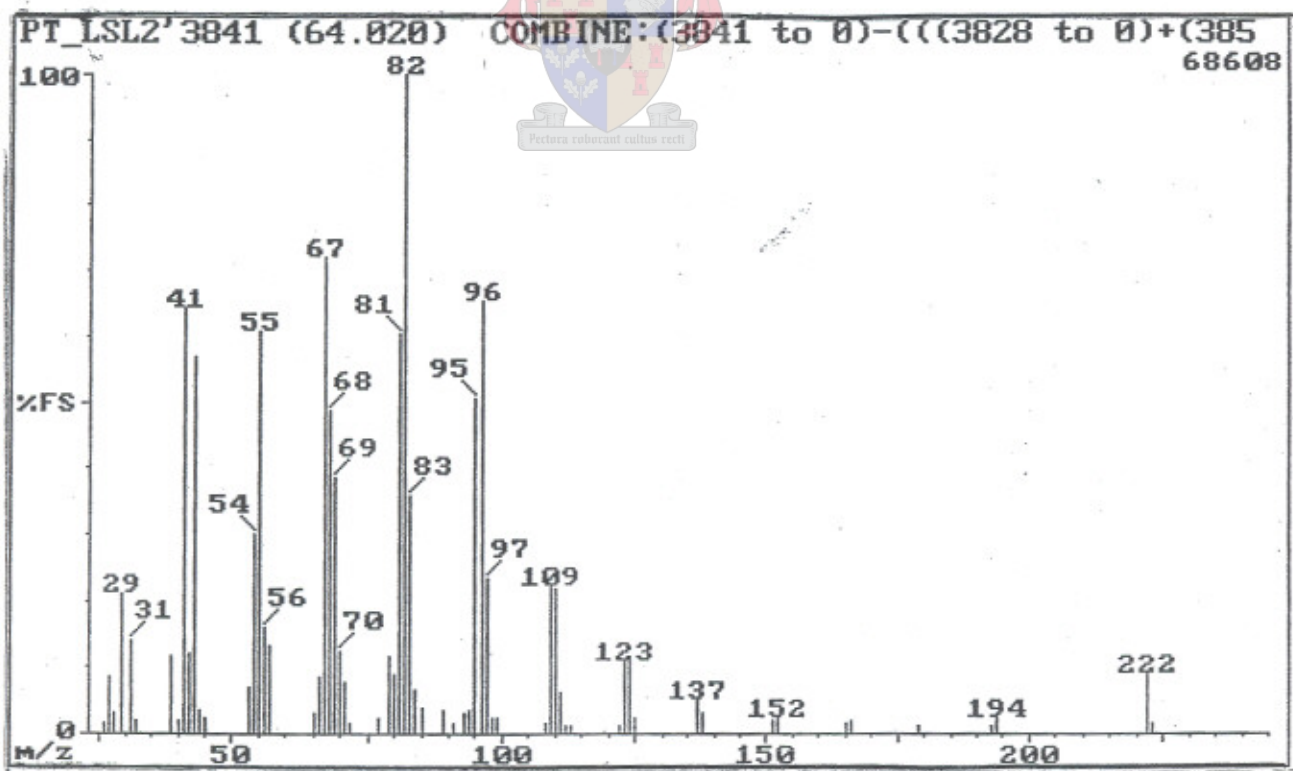


Fig. 2.15: EI-massaspektrum van Komponent L3841 [9-heksadeken-1-ol].

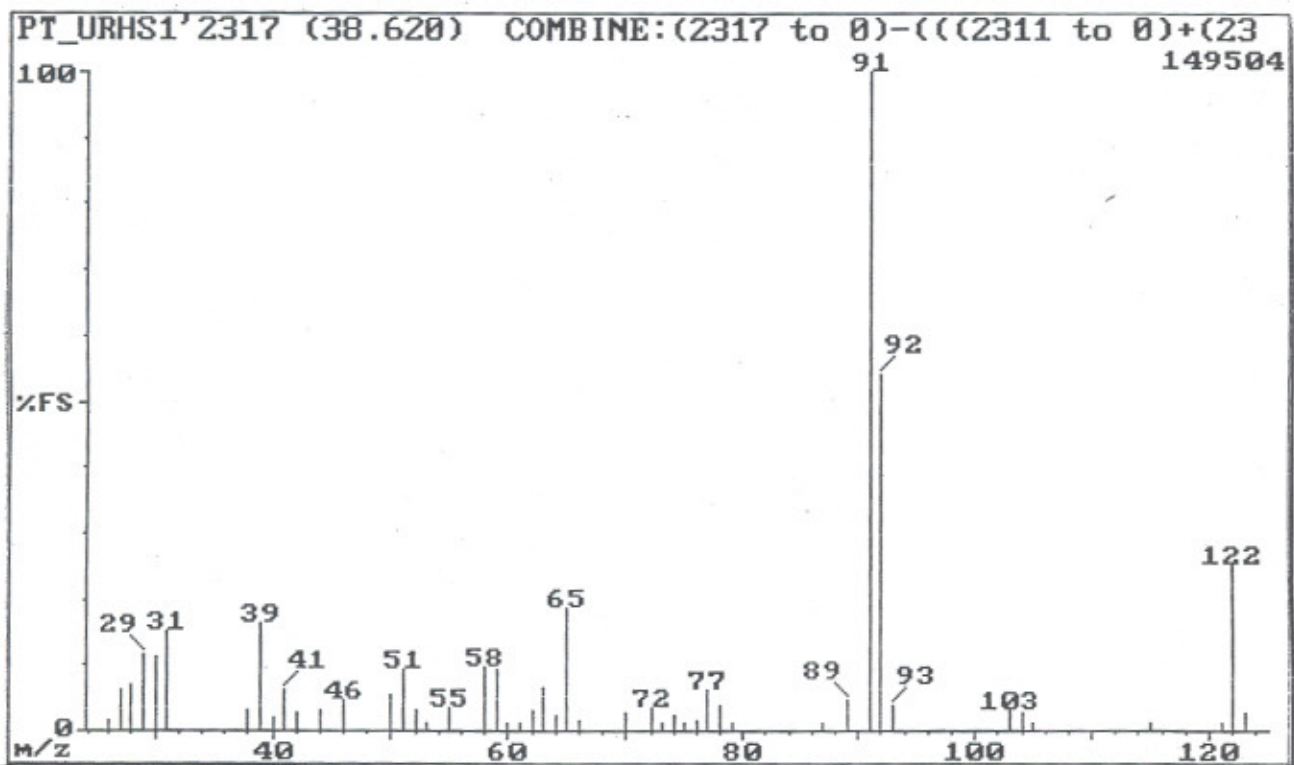


Fig. 2.16: EI-massaspektrum van Komponent B2317 [2-fenietanol].

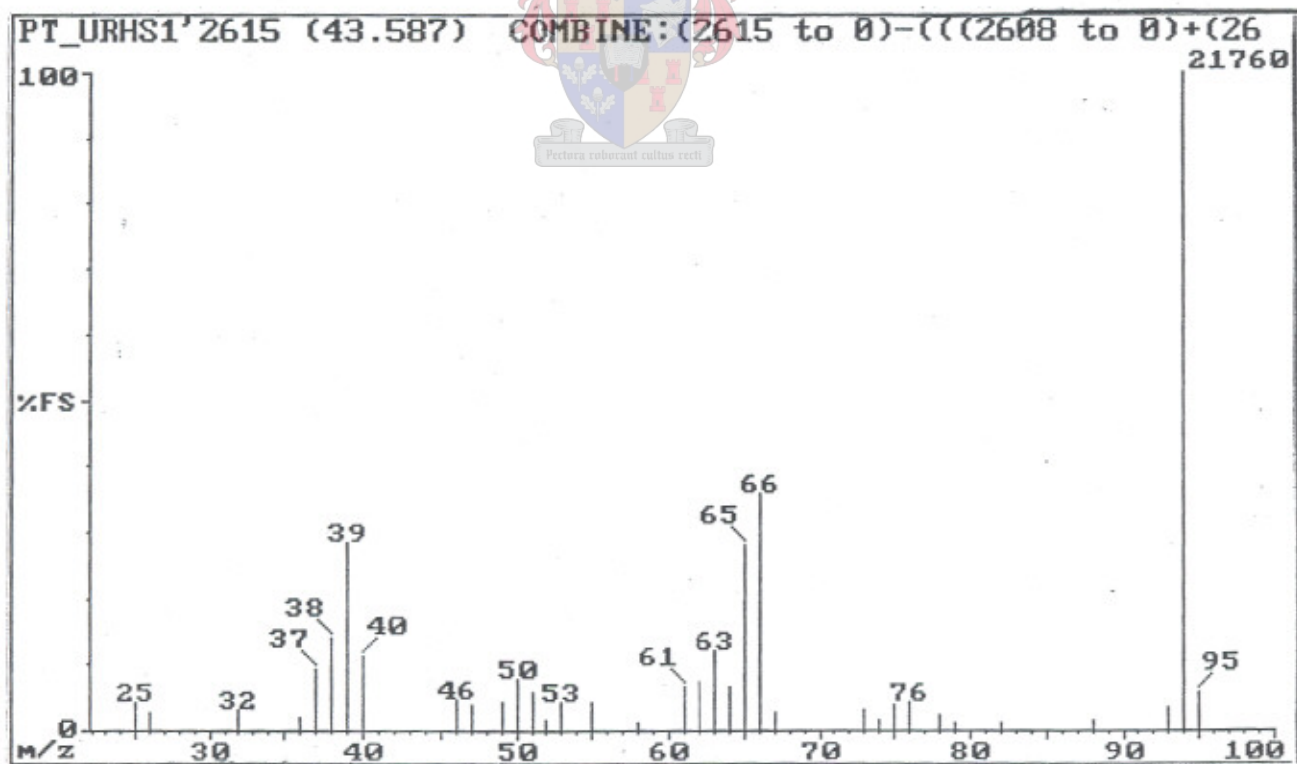


Fig. 2.17: EI-massaspektrum van Komponent B2615 [fenol].



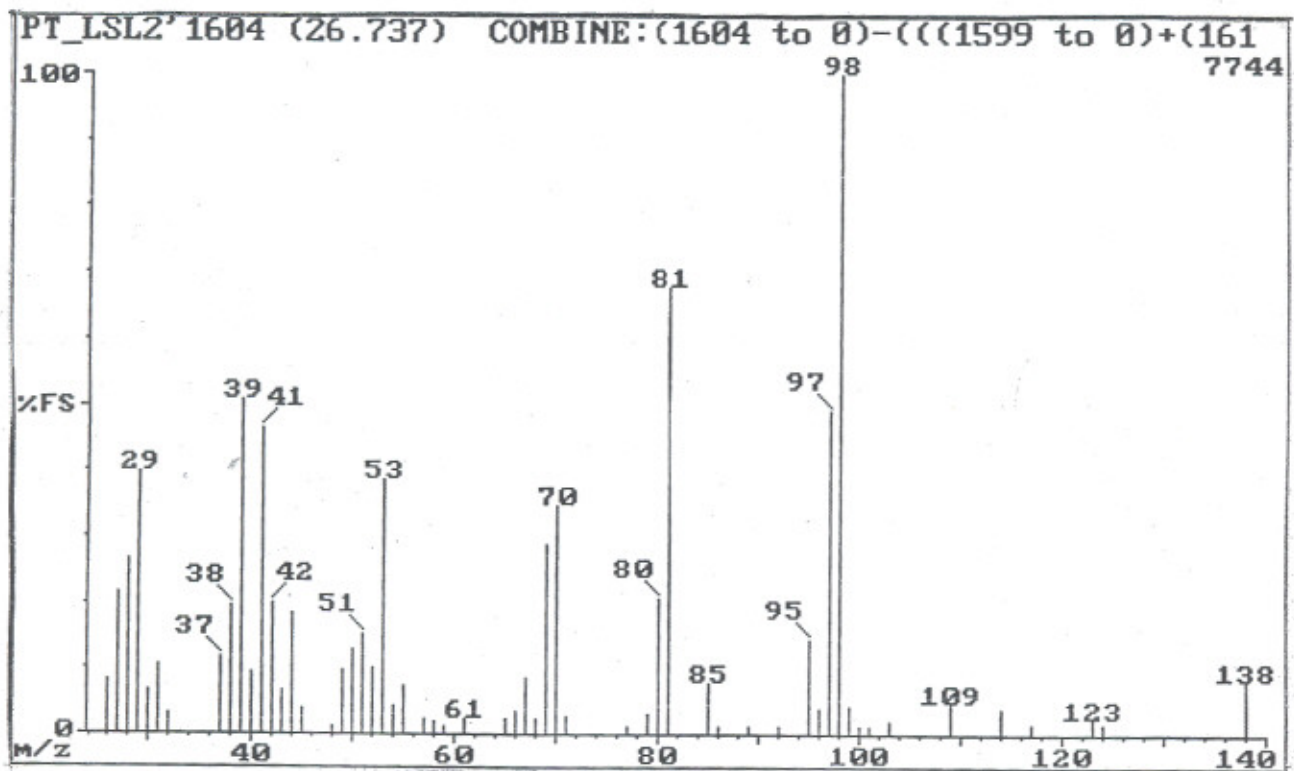


Fig. 2.18: EI-massaspektrum van Komponent L1604 [furfurielalkohol].

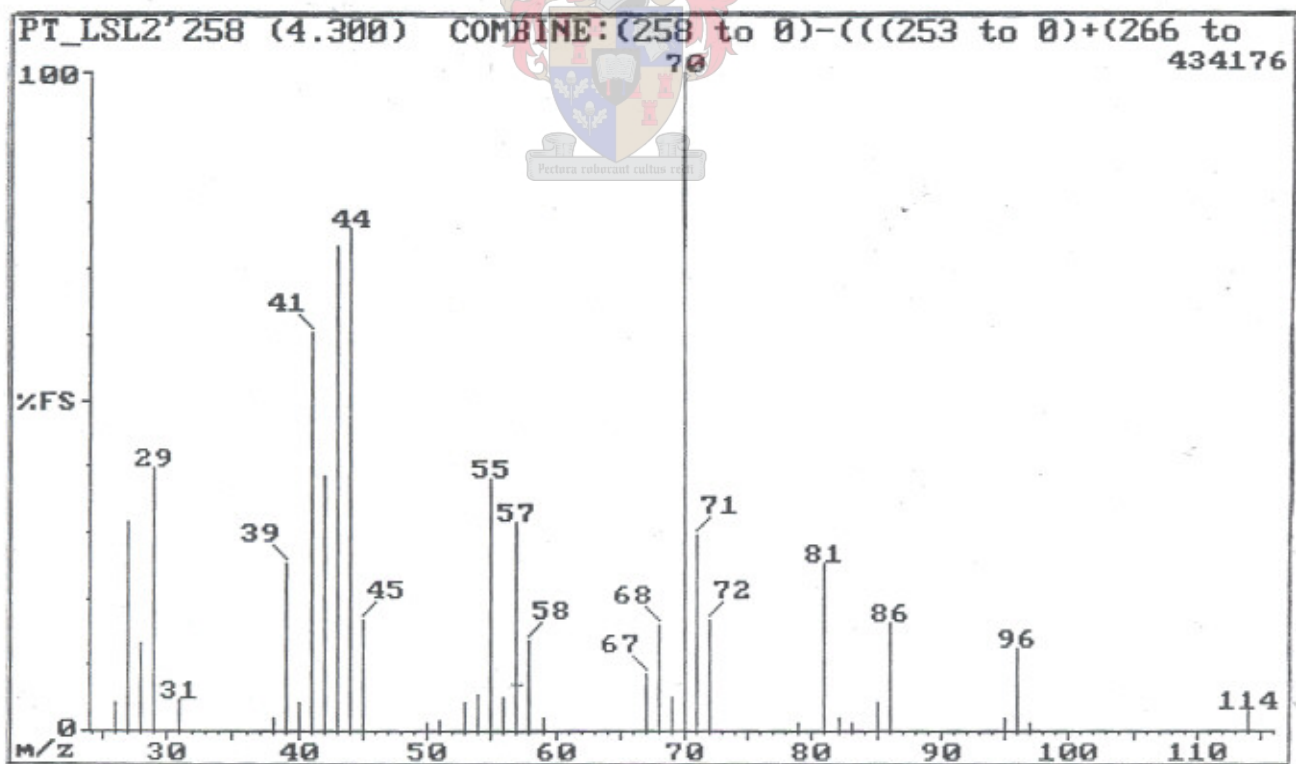


Fig. 2.19: EI-massaspektrum van Komponent L258 [heptanaal].

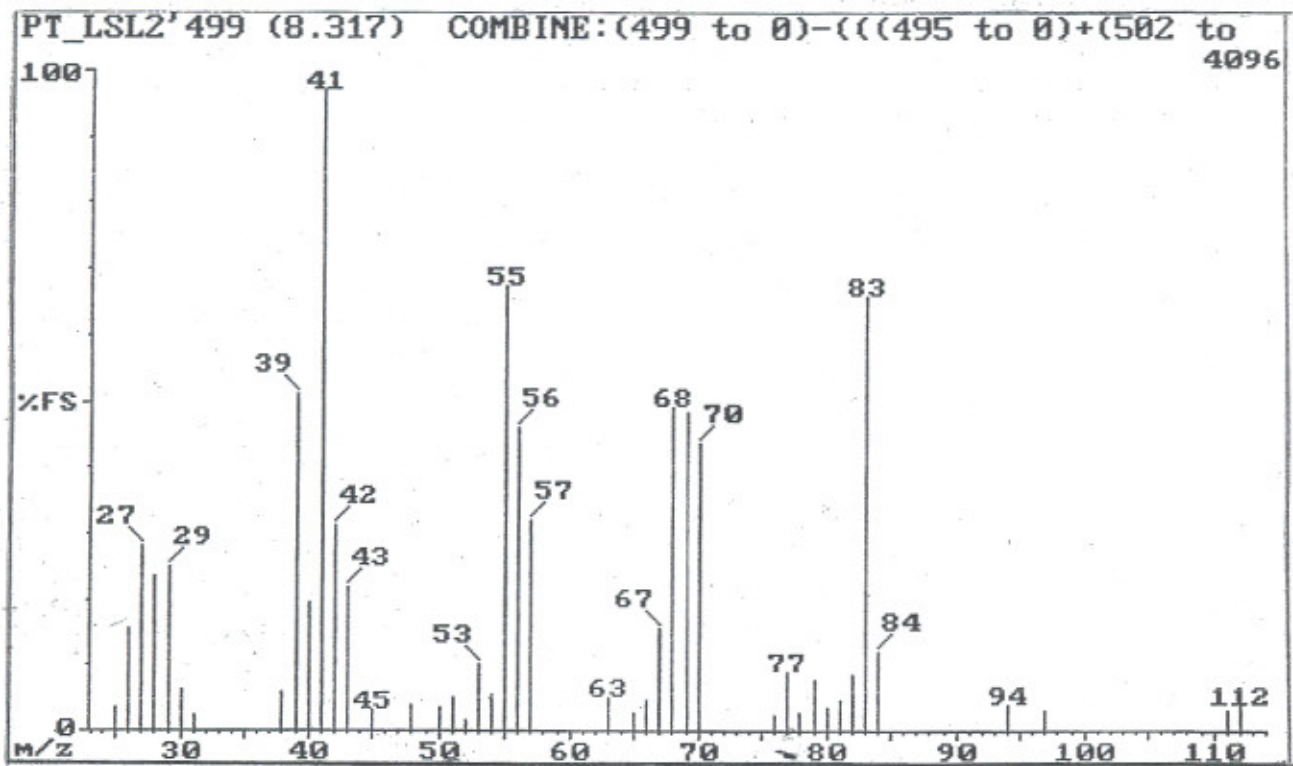


Fig. 2.20: EI-massaspektrum van Komponent L499 [(Z)-2-heptenaal].

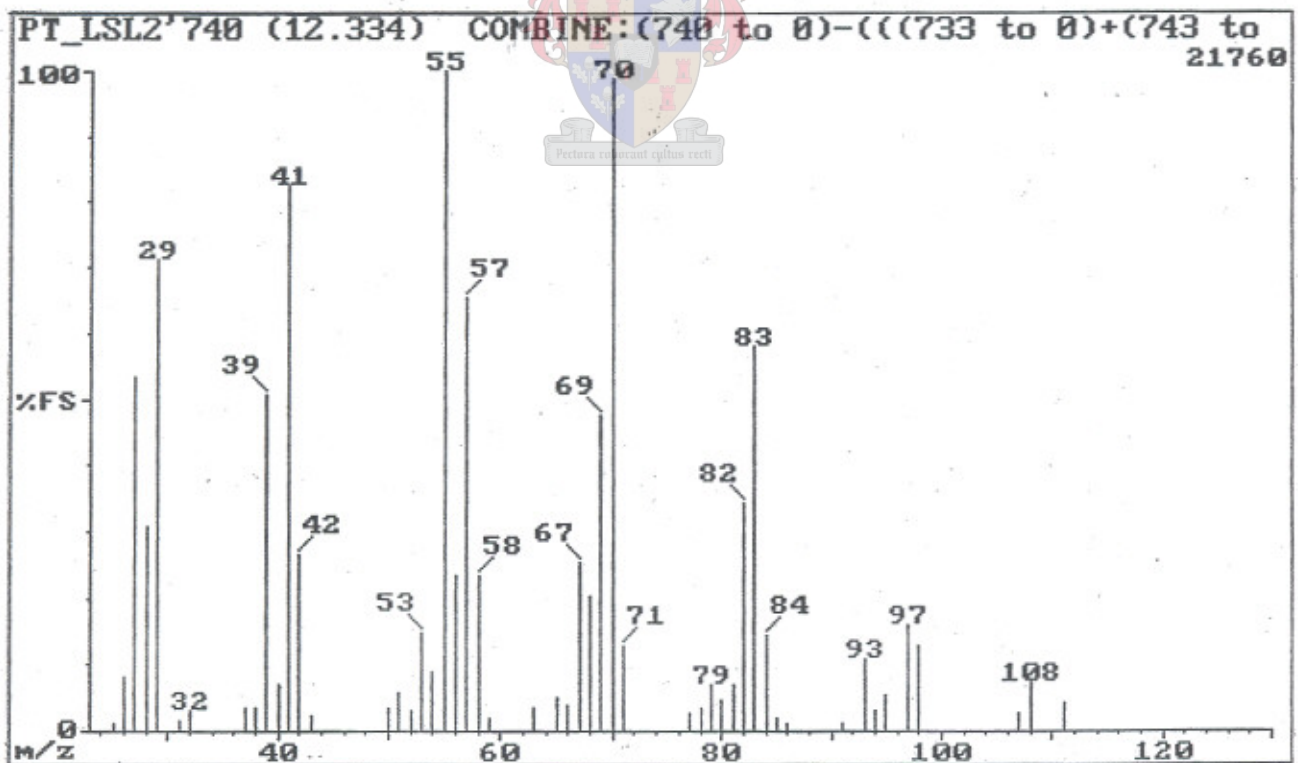


Fig. 2.21: EI-massaspektrum van Komponent L740 [(E)-2-oktenaal].

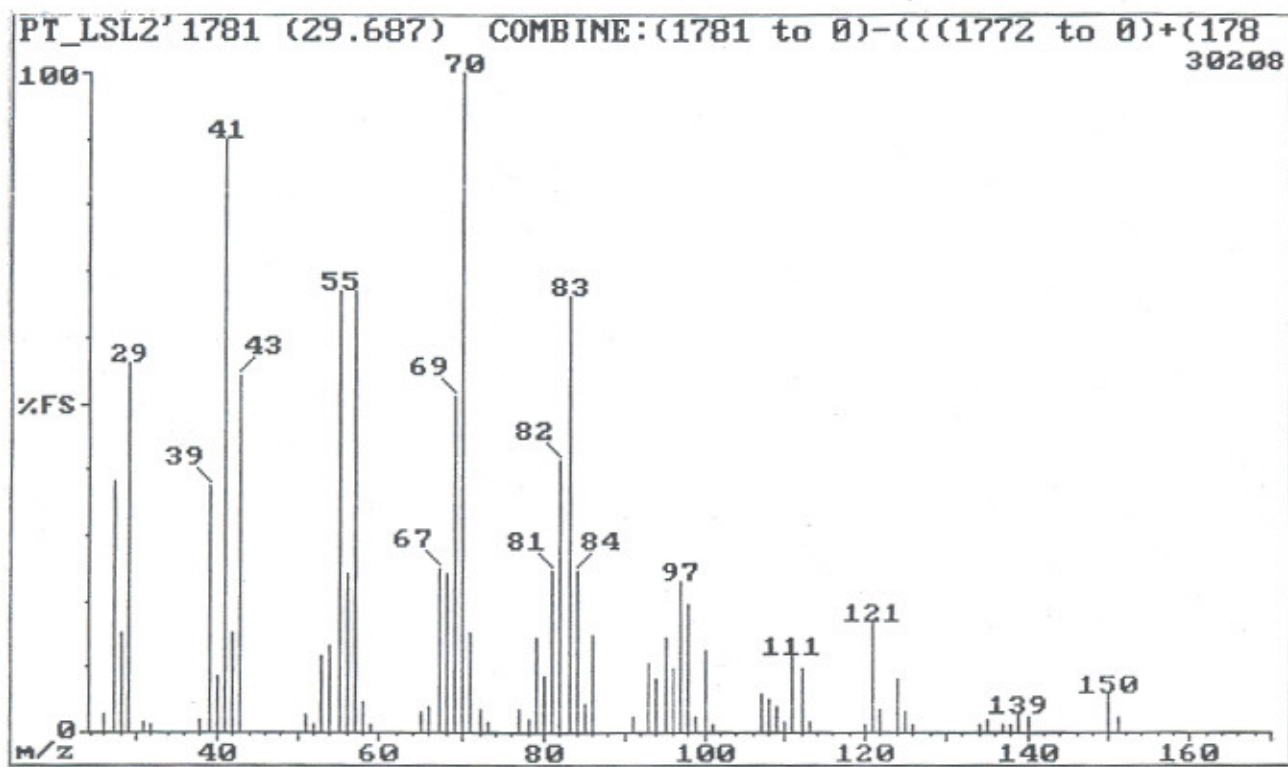


Fig. 2.22: EI-massaspektrum van Komponent L1781 [(Z)-2-undekenaal].

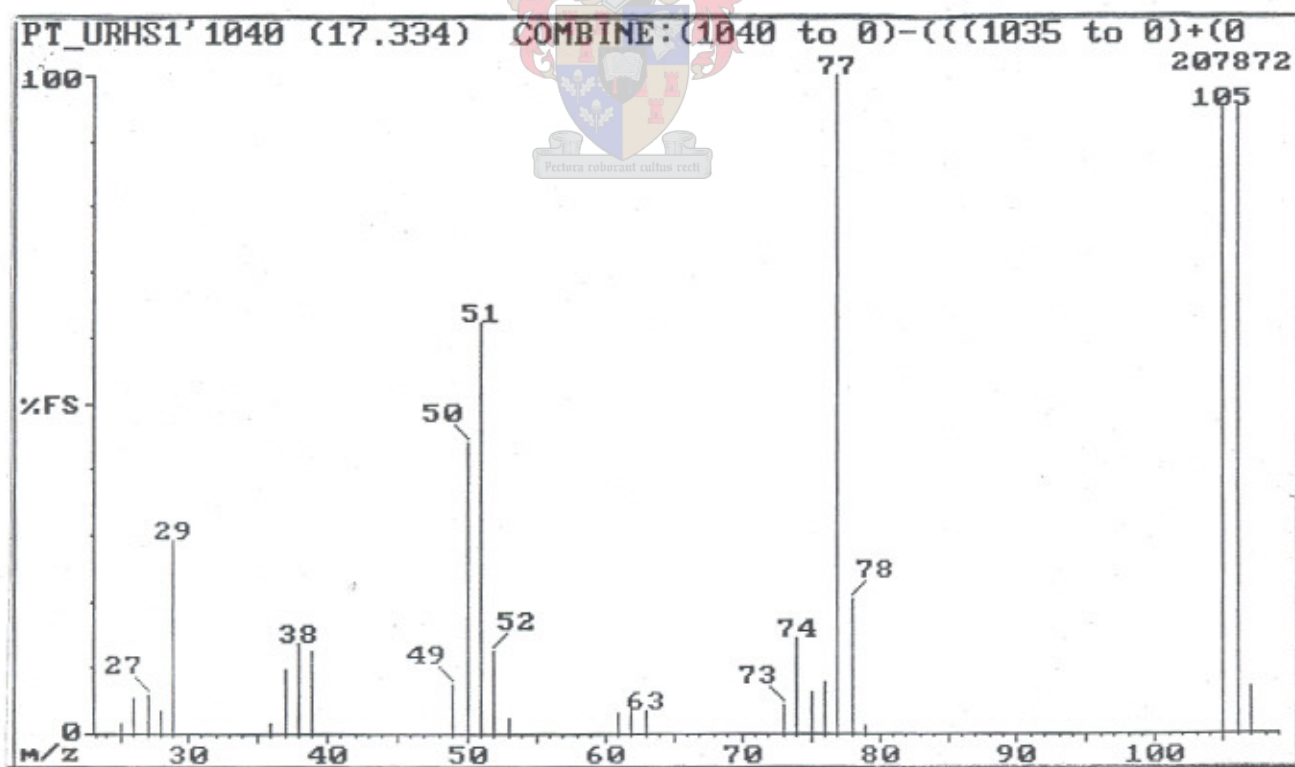


Fig. 2.23: EI-massaspektrum van Komponent B1040 [bensaldehyd].

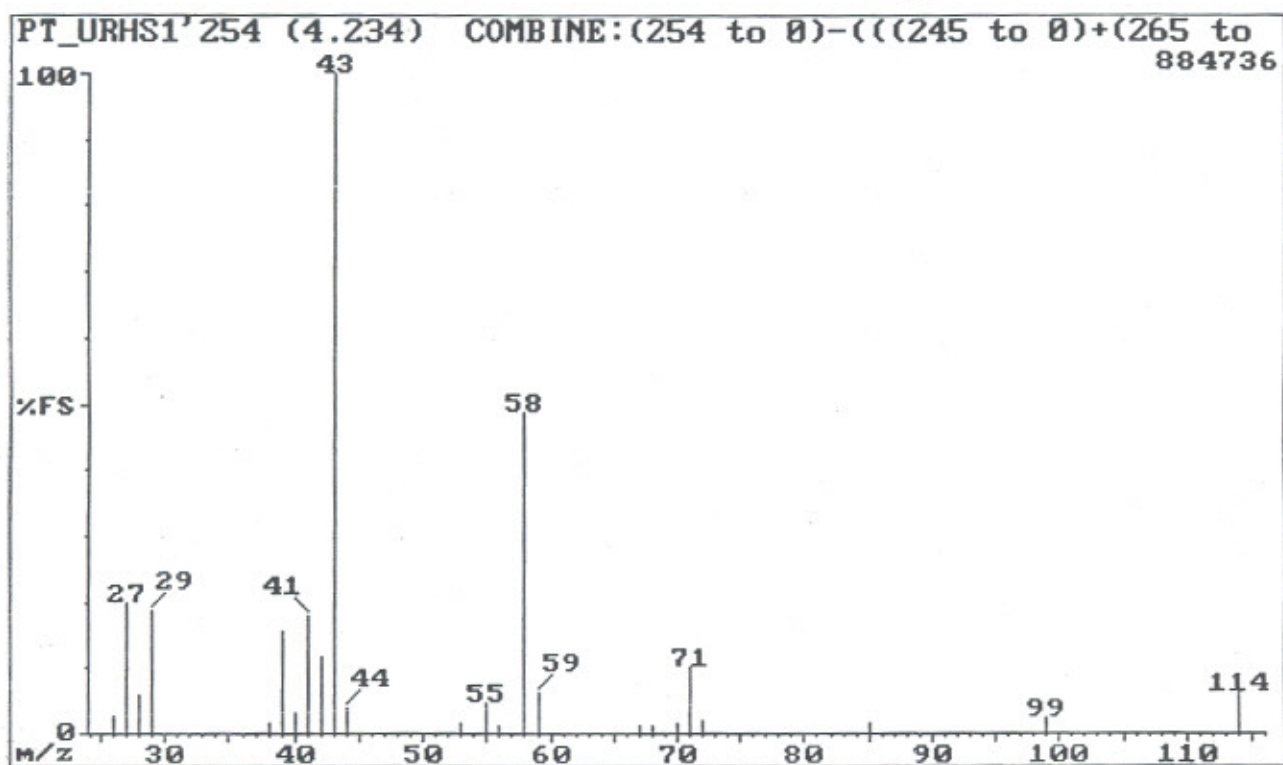


Fig. 2.24: EI-massaspektrum van Komponent B254 [2-heptanoon].

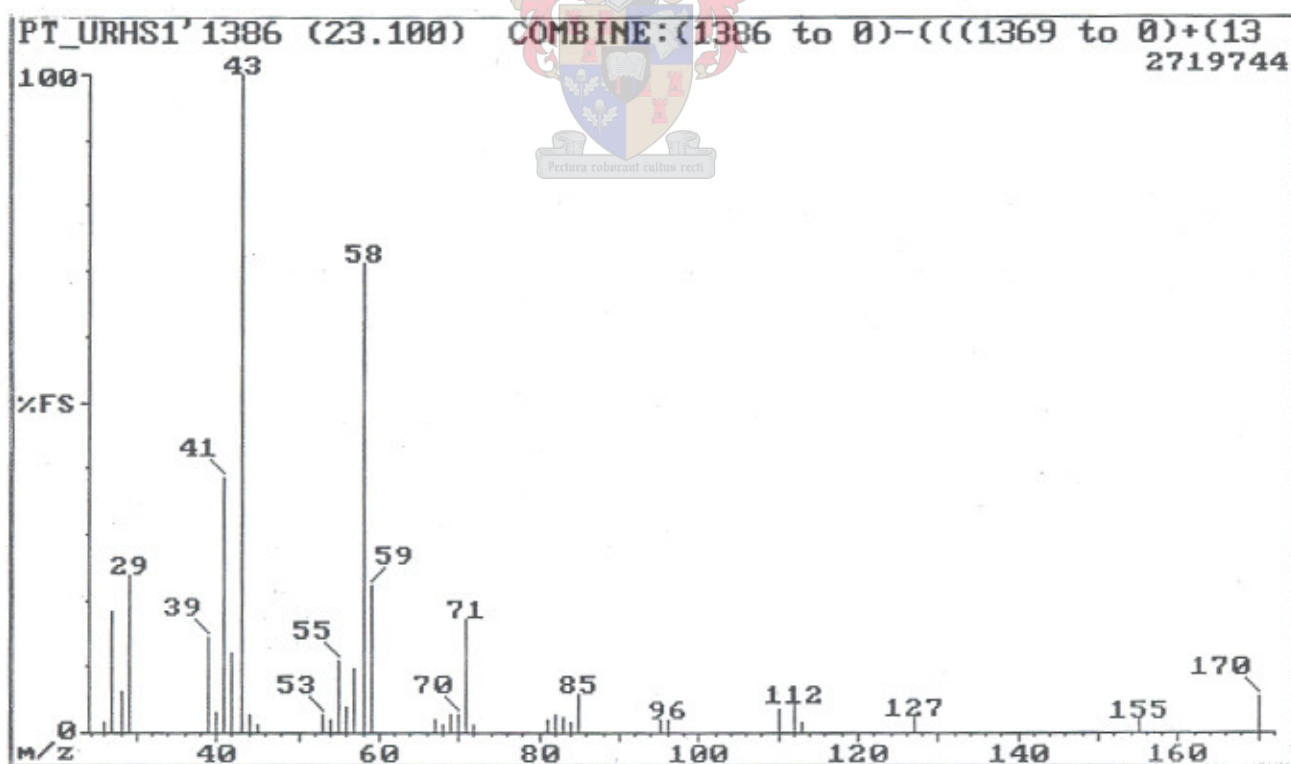


Fig. 2.25: EI-massaspektrum van Komponent B1386 [2-undekanoon].



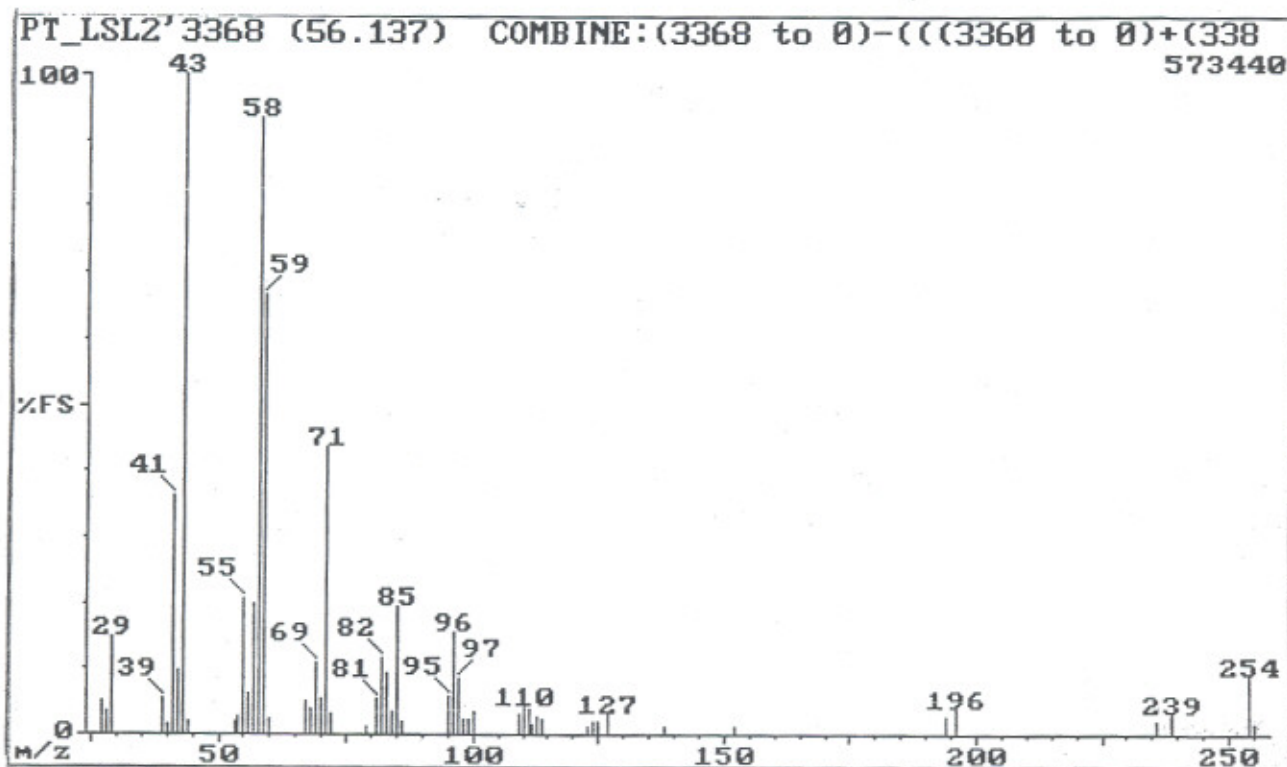


Fig. 2.26: EI-massaspektrum van Komponent L3368 [2-heptadekanoon].

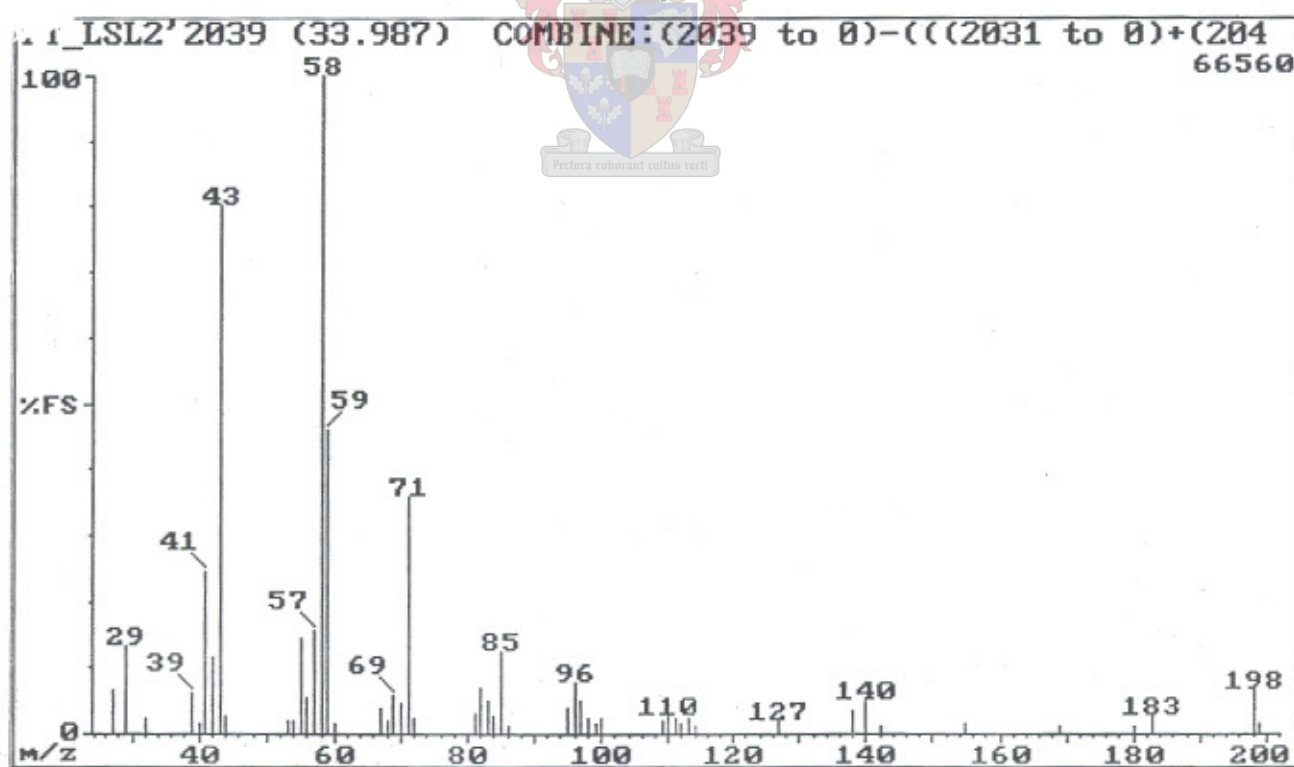


Fig. 2.27: EI-massaspektrum van Komponent L2039 [2-tridekanone].

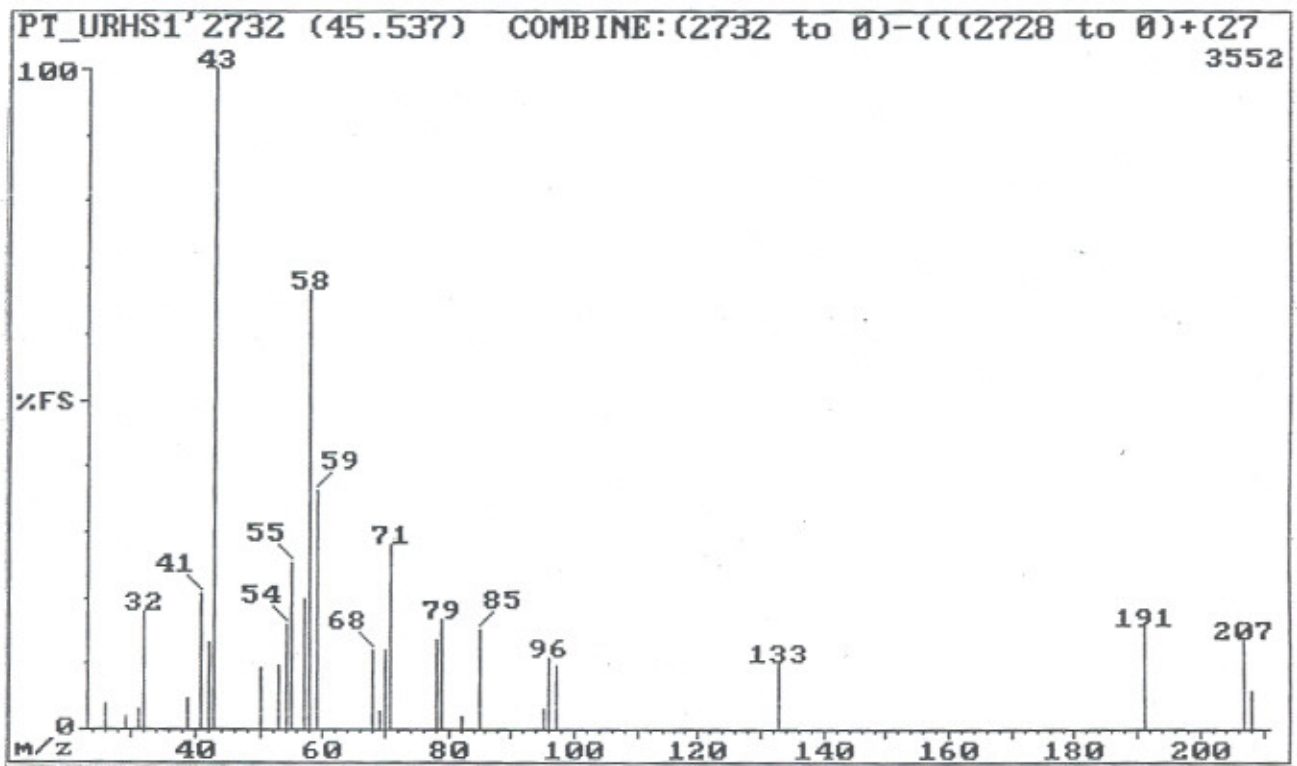


Fig. 2.28: EI-massaspektrum van Komponent B2732 [2-pentadecanoon].

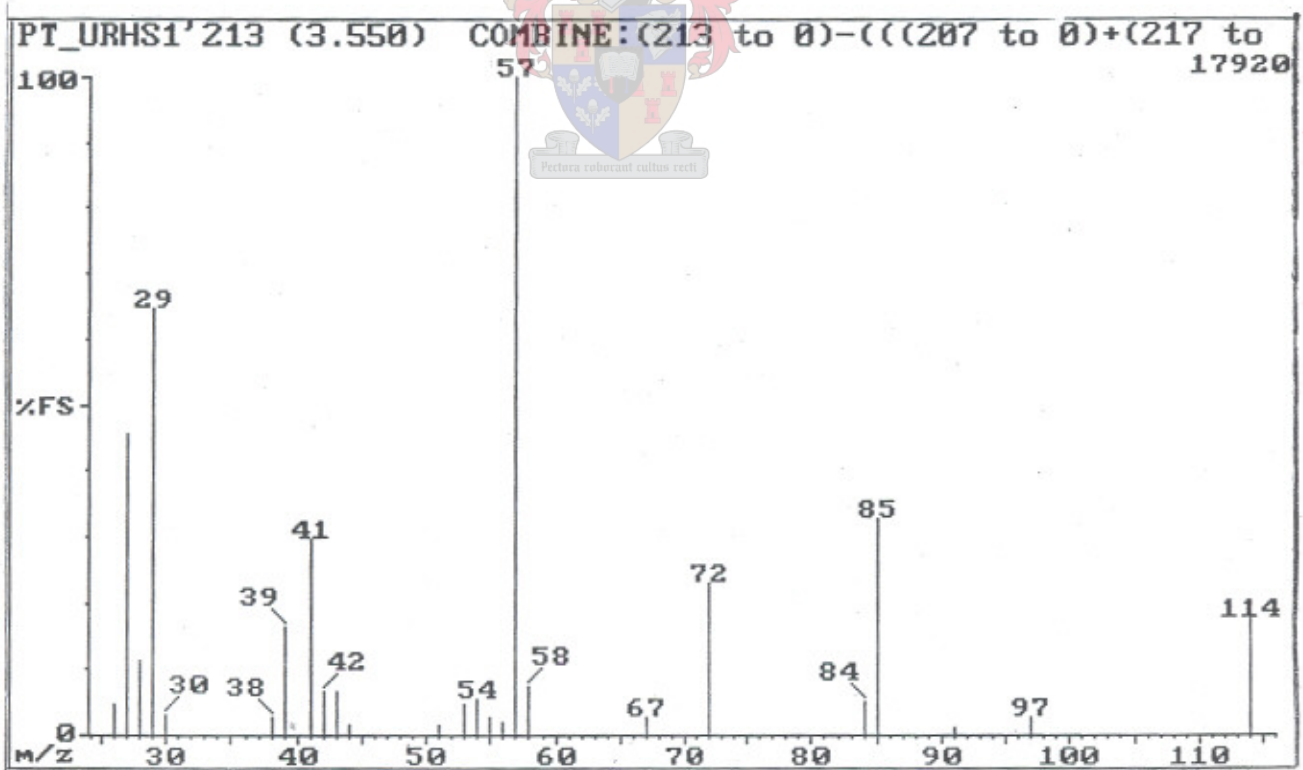


Fig. 2.29: EI-massaspektrum van Komponent B213 [3-heptanoon].

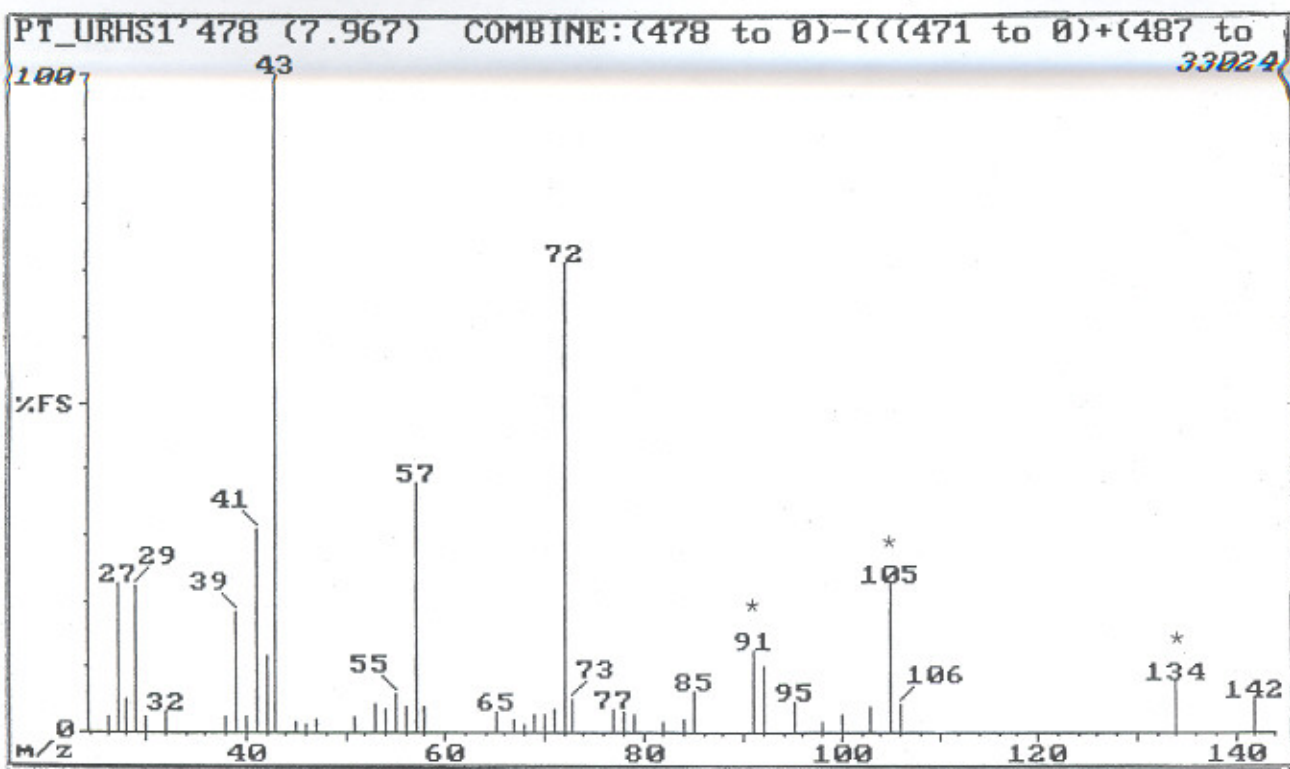


Fig. 2.30: EI-massaspektrum van Komponent B478 [3-metiel-2-oktanoon].

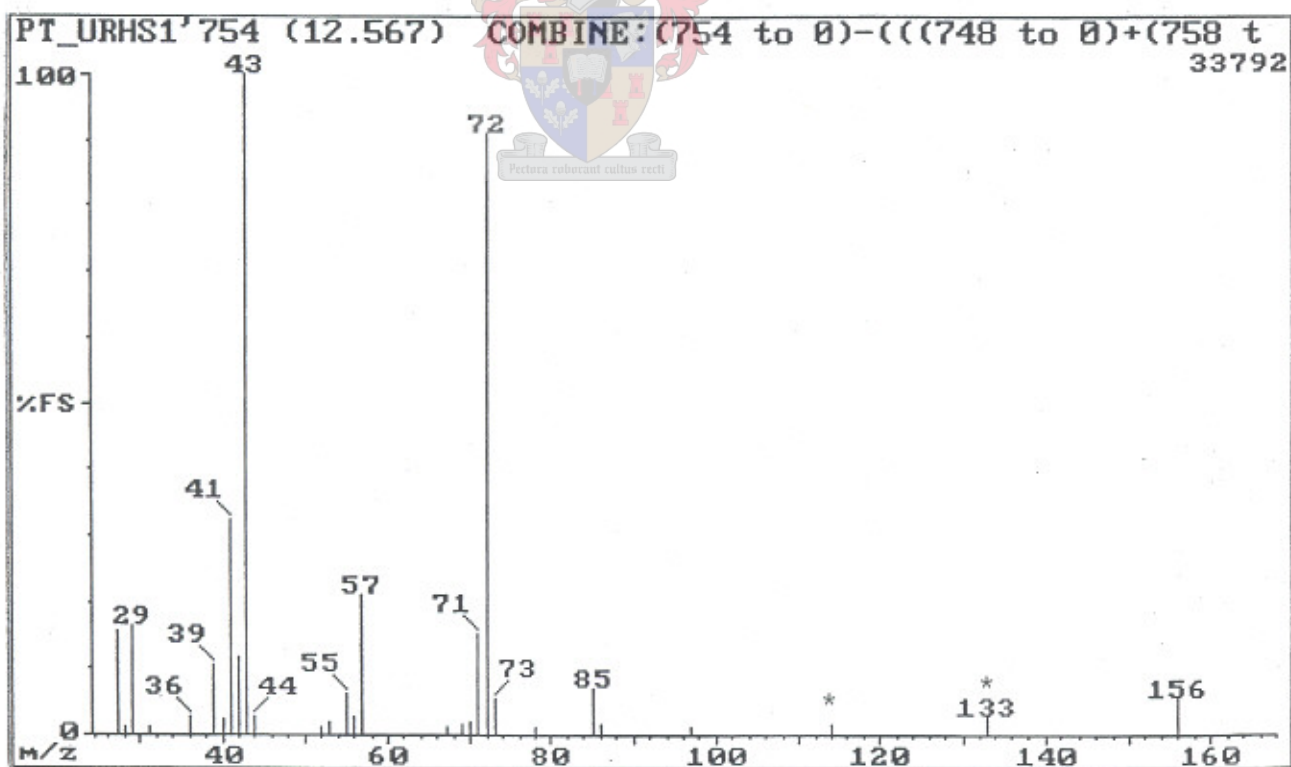


Fig. 2.31: EI-massaspektrum van Komponent B754 [3-metiel-2-nonanoon].

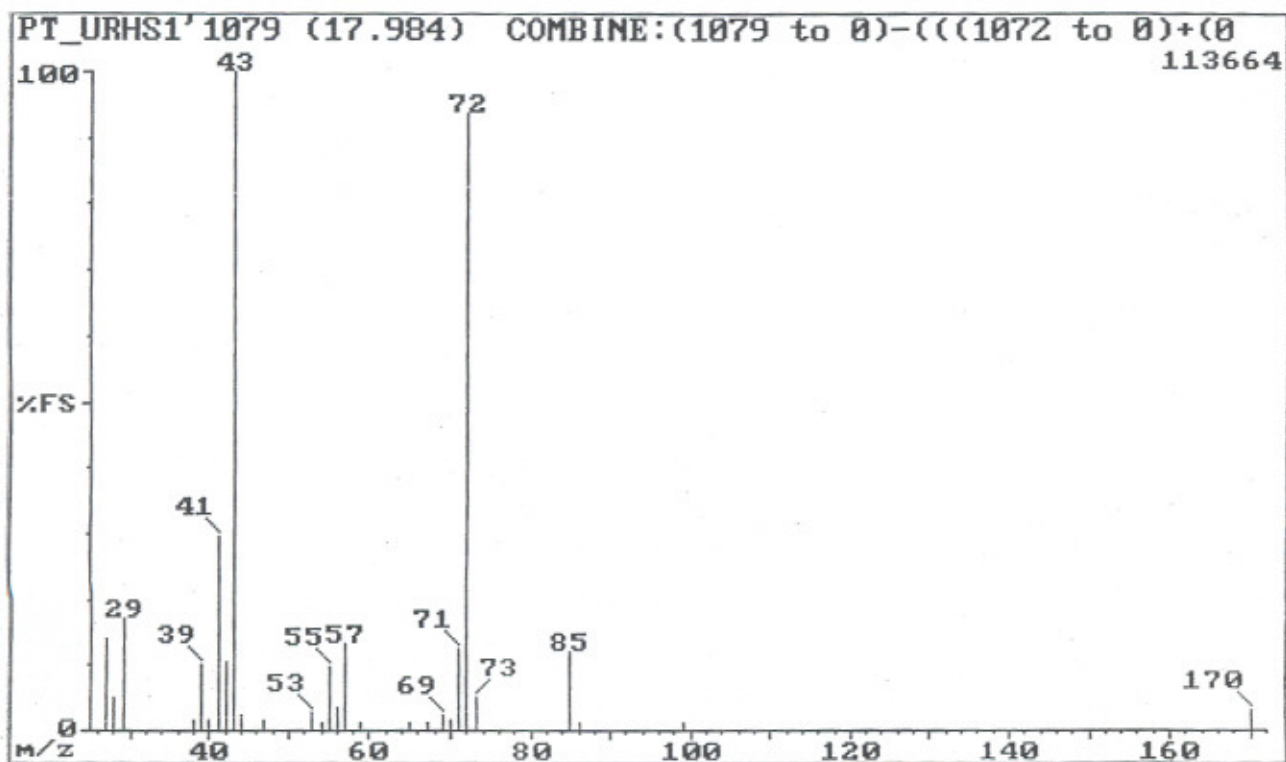


Fig. 2.32: EI-massaspektrum van Komponent B1079 [3-metiel-2-dekanon].

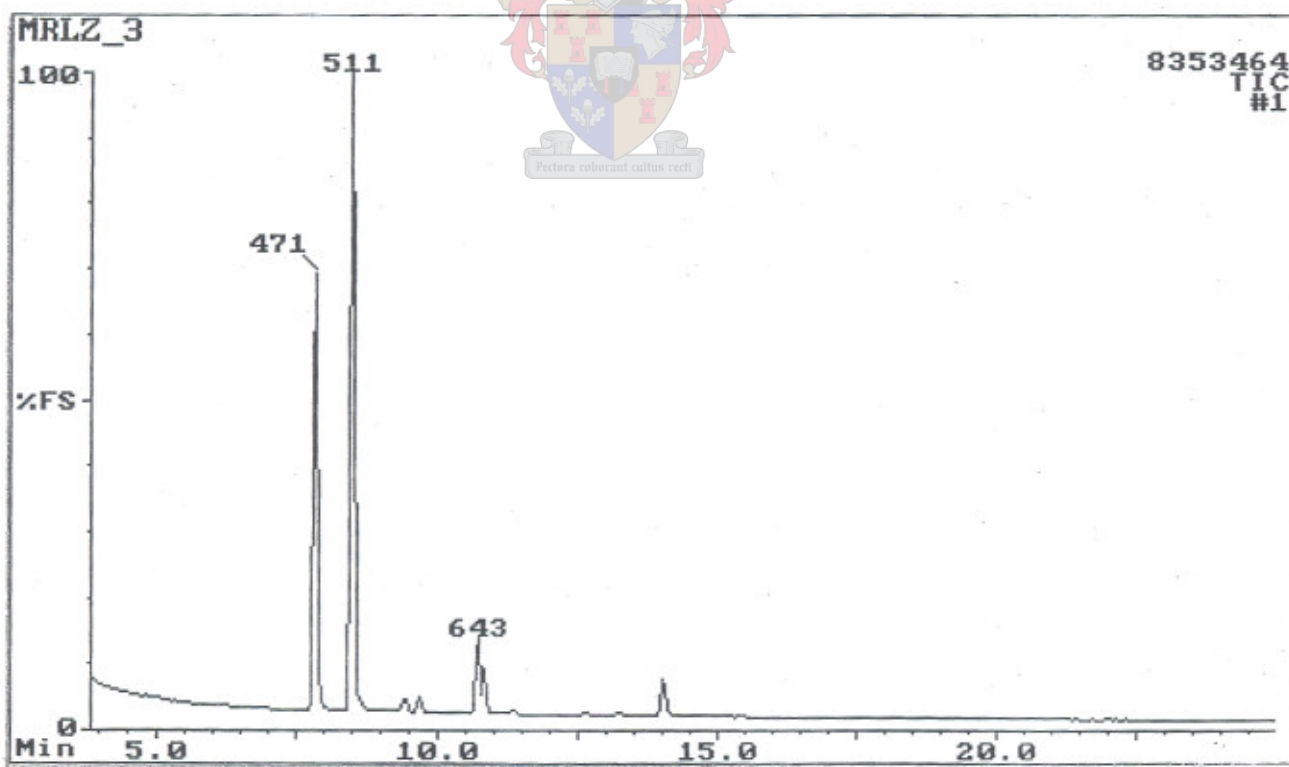


Fig. 2.33: TIC van gesintetiseerde 3-metiel-2-oktanoon.



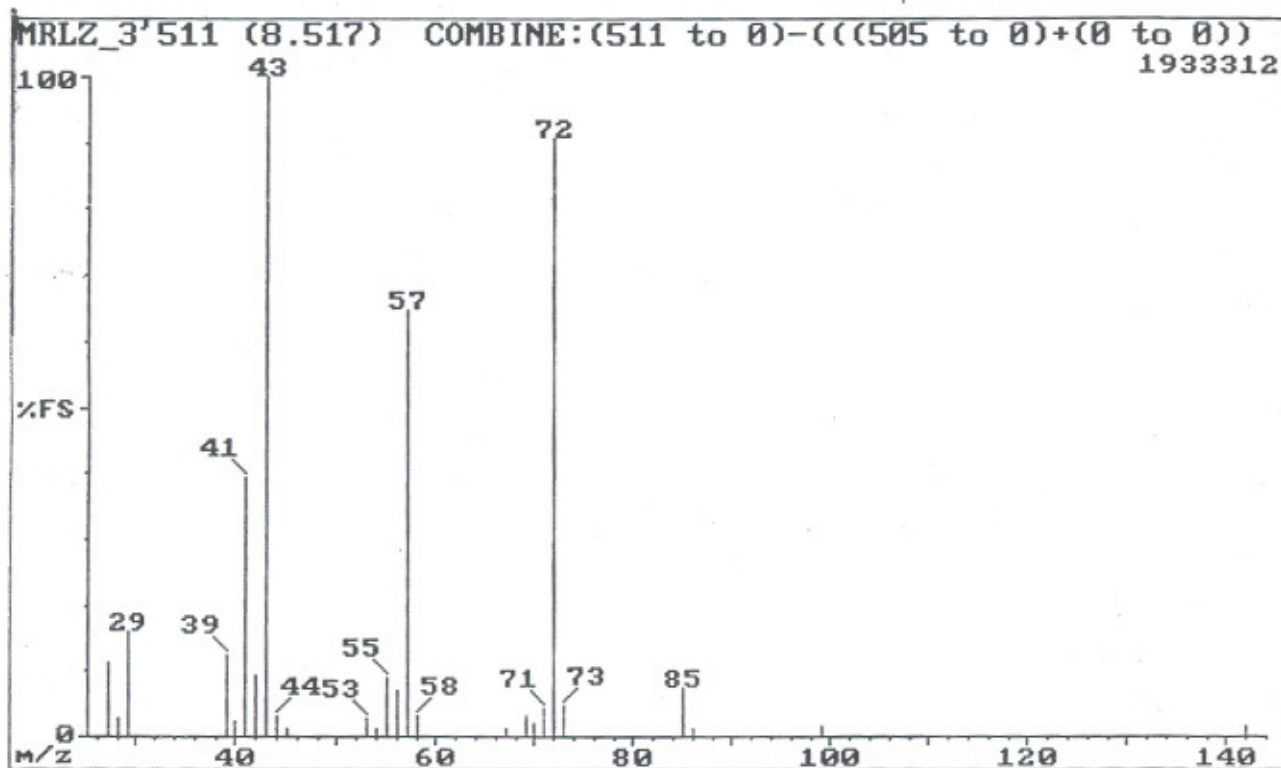


Fig. 2.34: EI-massaspektrum van gesintetiseerde 3-metiel-2-oktanoon.

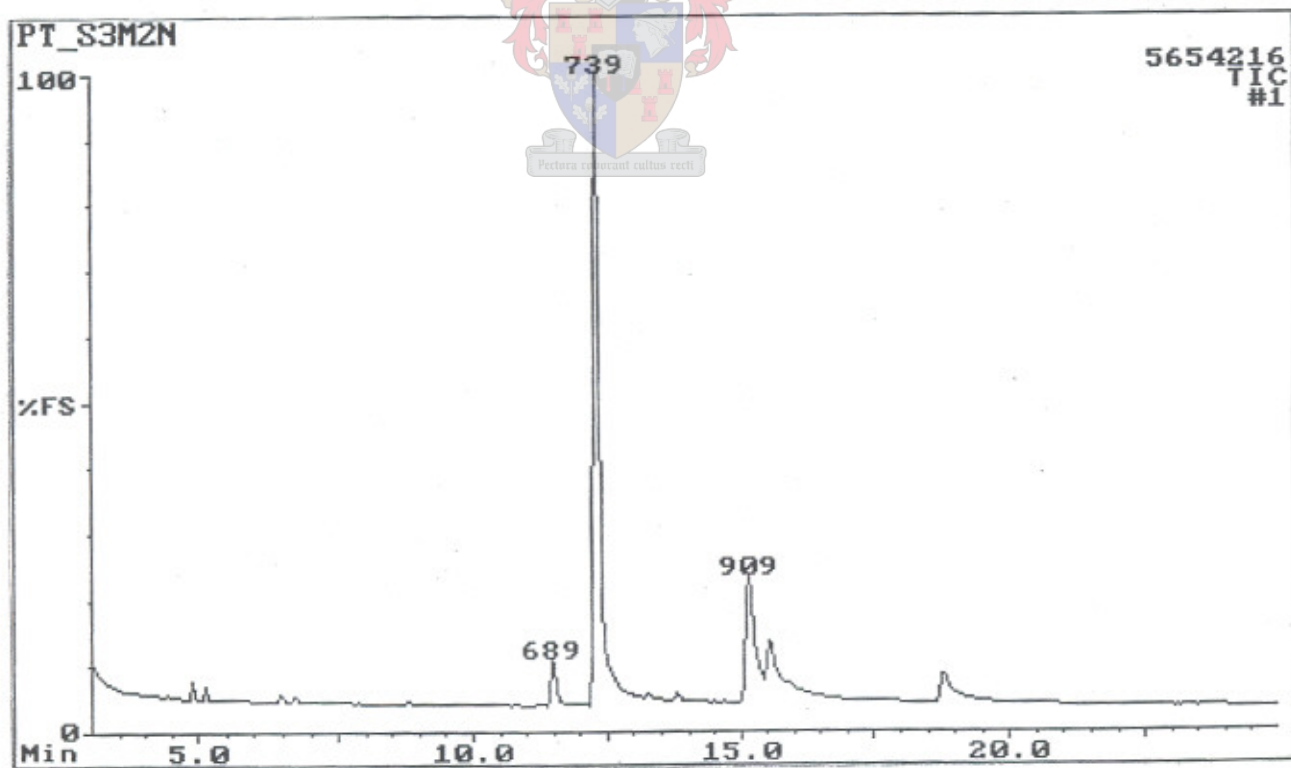


Fig. 2.35: TIC van gesintetiseerde 3-metiel-2-nonanoon.

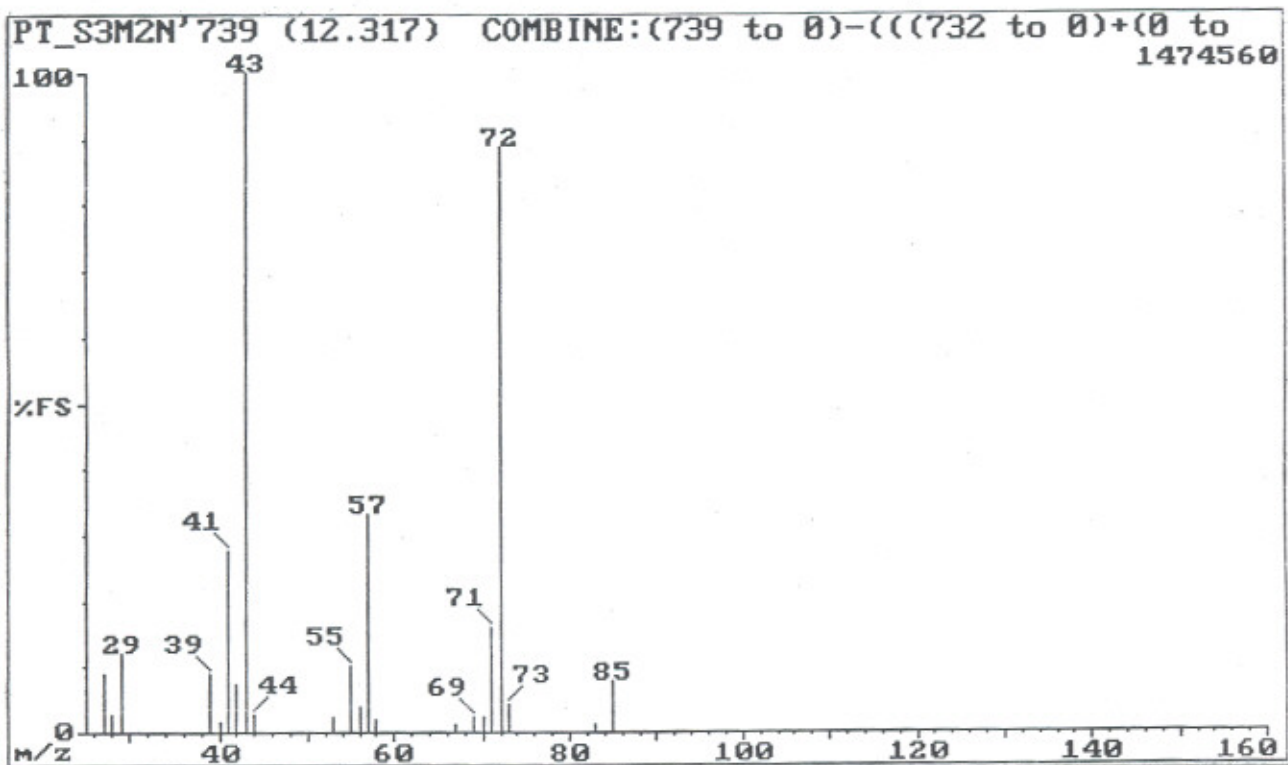


Fig. 2.36: EI-massaspektrum van gesintetiseerde 3-metiel-2-nonanon.

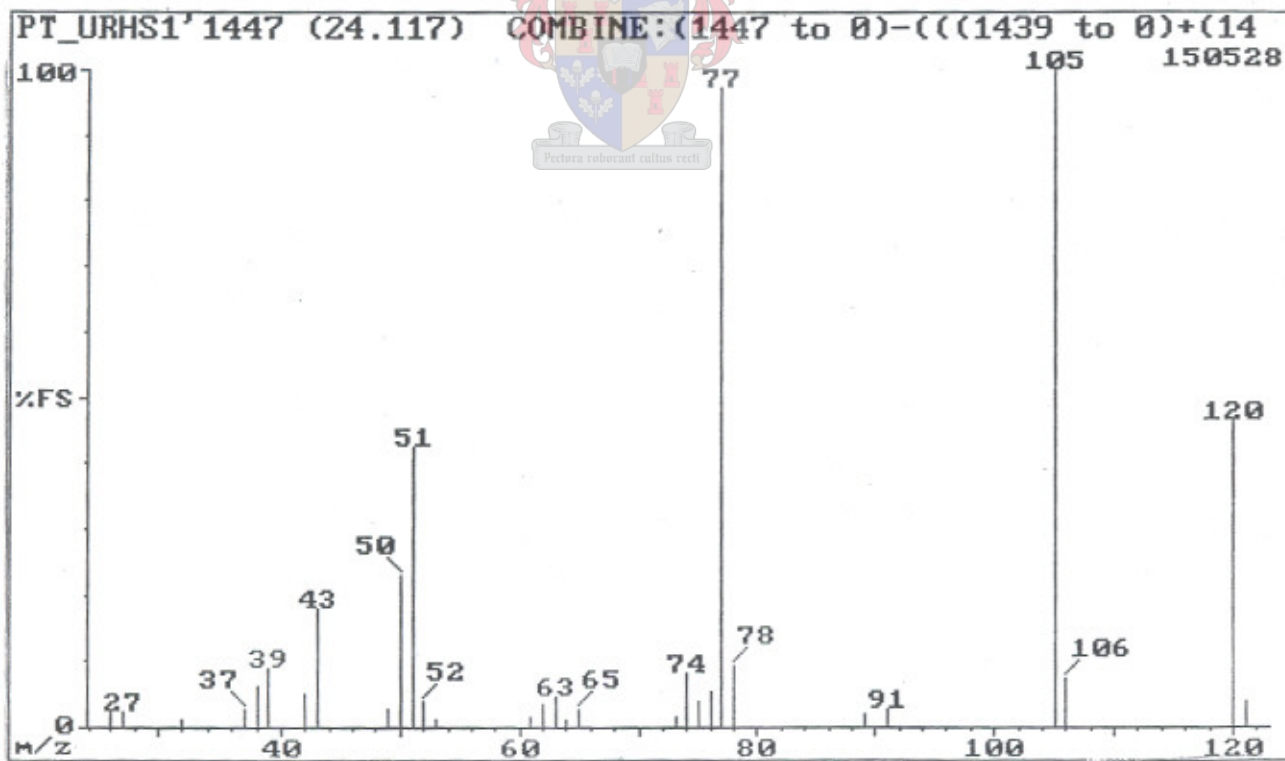


Fig. 2.37: EI-massaspektrum van Komponent B1447 [asetofenoon].

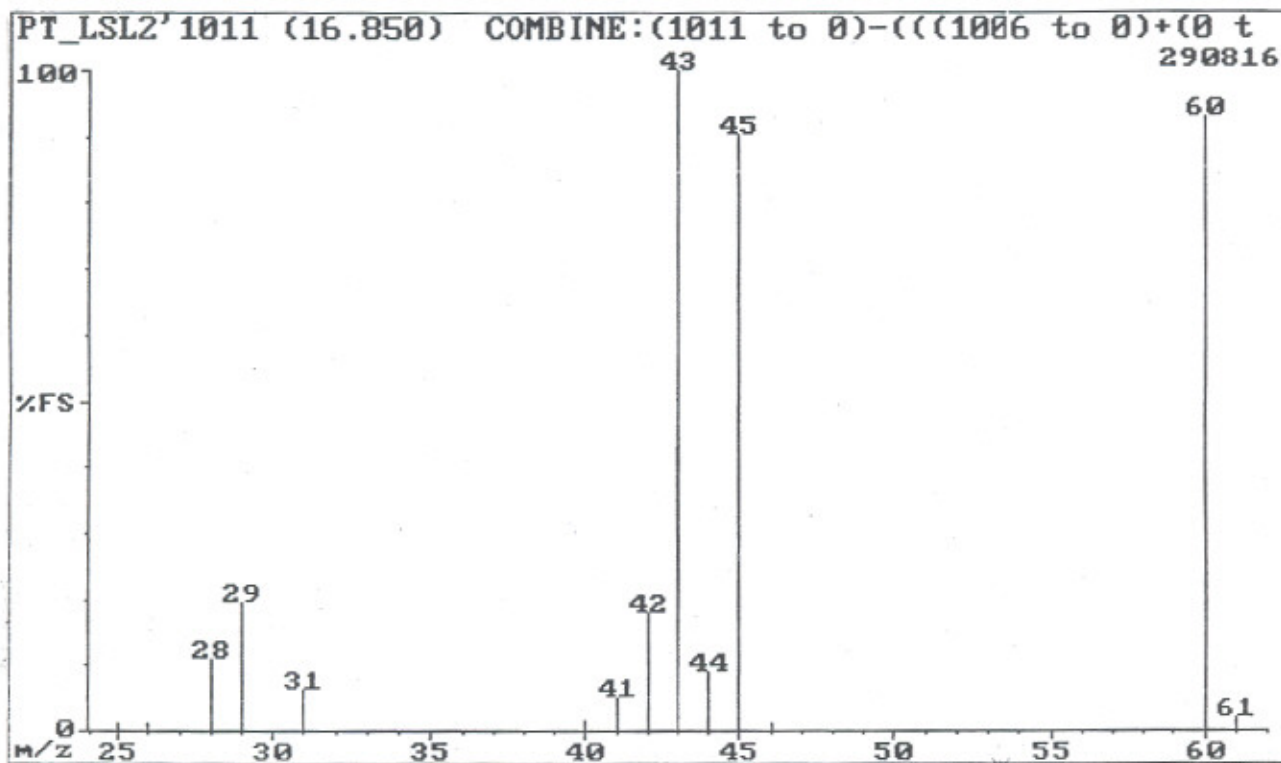


Fig. 2.38: EI-massaspektrum van Komponent L1011 [asynsuur].

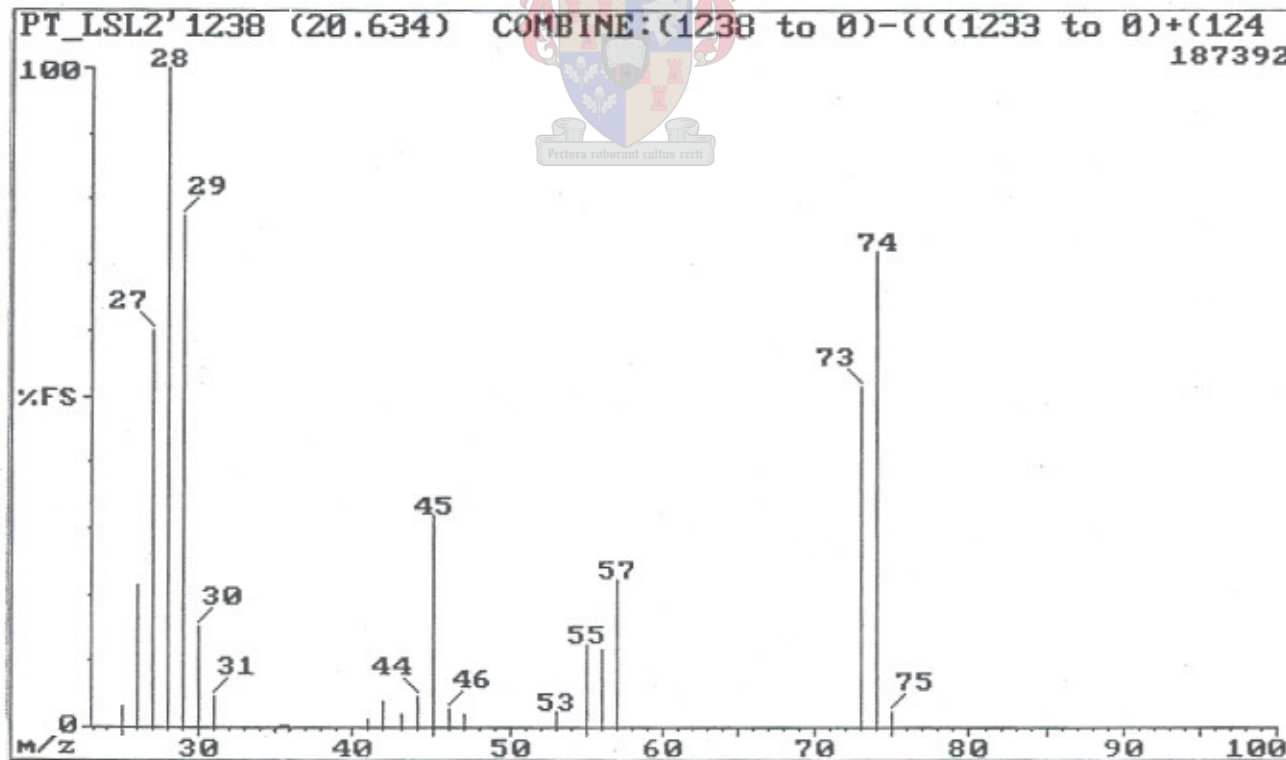


Fig. 2.39: EI-massaspektrum van Komponent L1238 [propanoësuur].

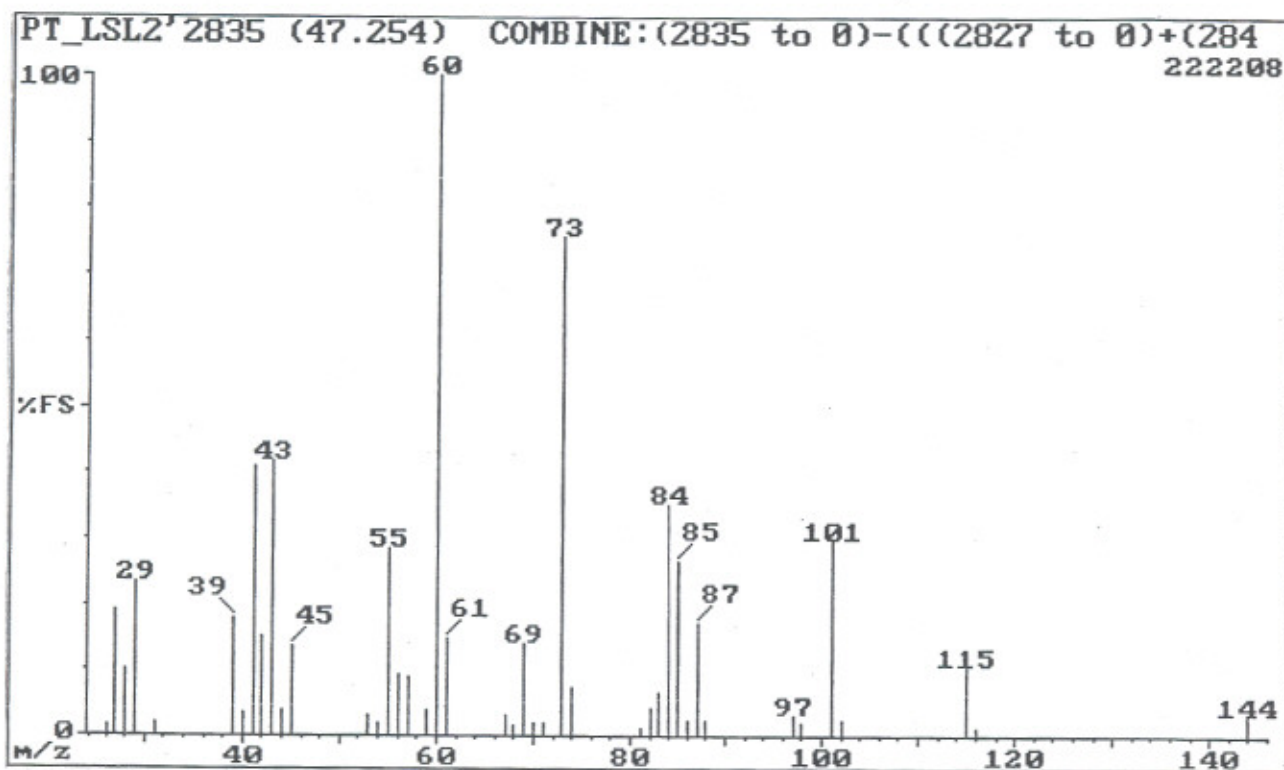


Fig. 2.40: EI-massaspektrum van Komponent L2835 [oktanoësuur].

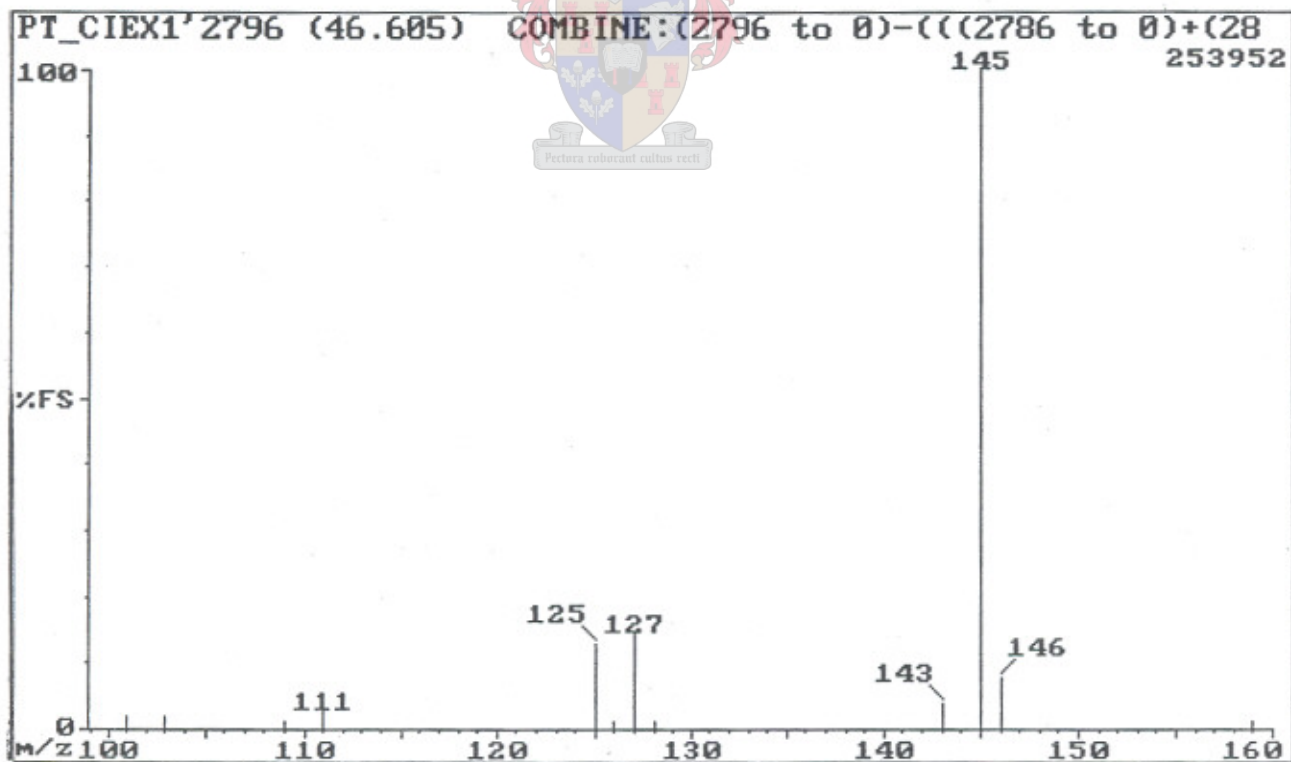


Fig. 2.41: CI-massaspektrum van Komponent CE2796 [oktanoësuur].



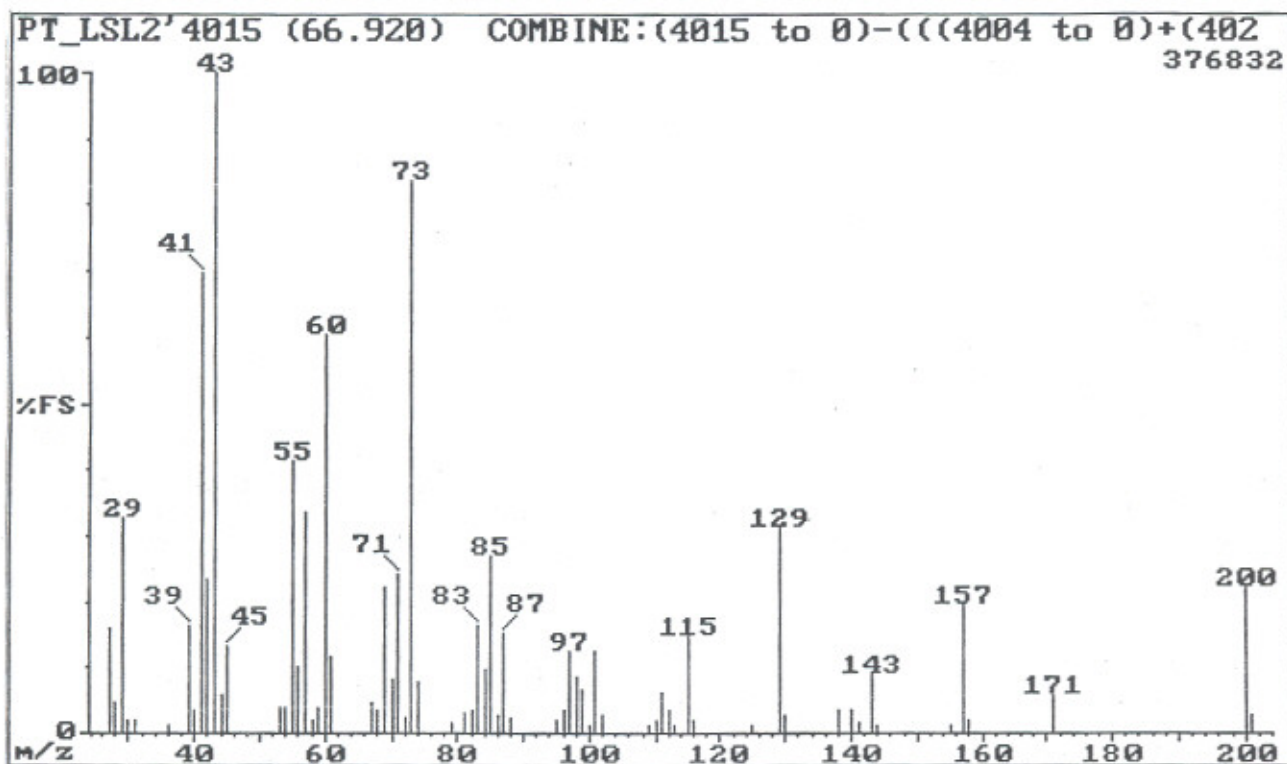


Fig. 2.42: EI-massaspektrum van Komponent L4015 [dodekanoësuur].

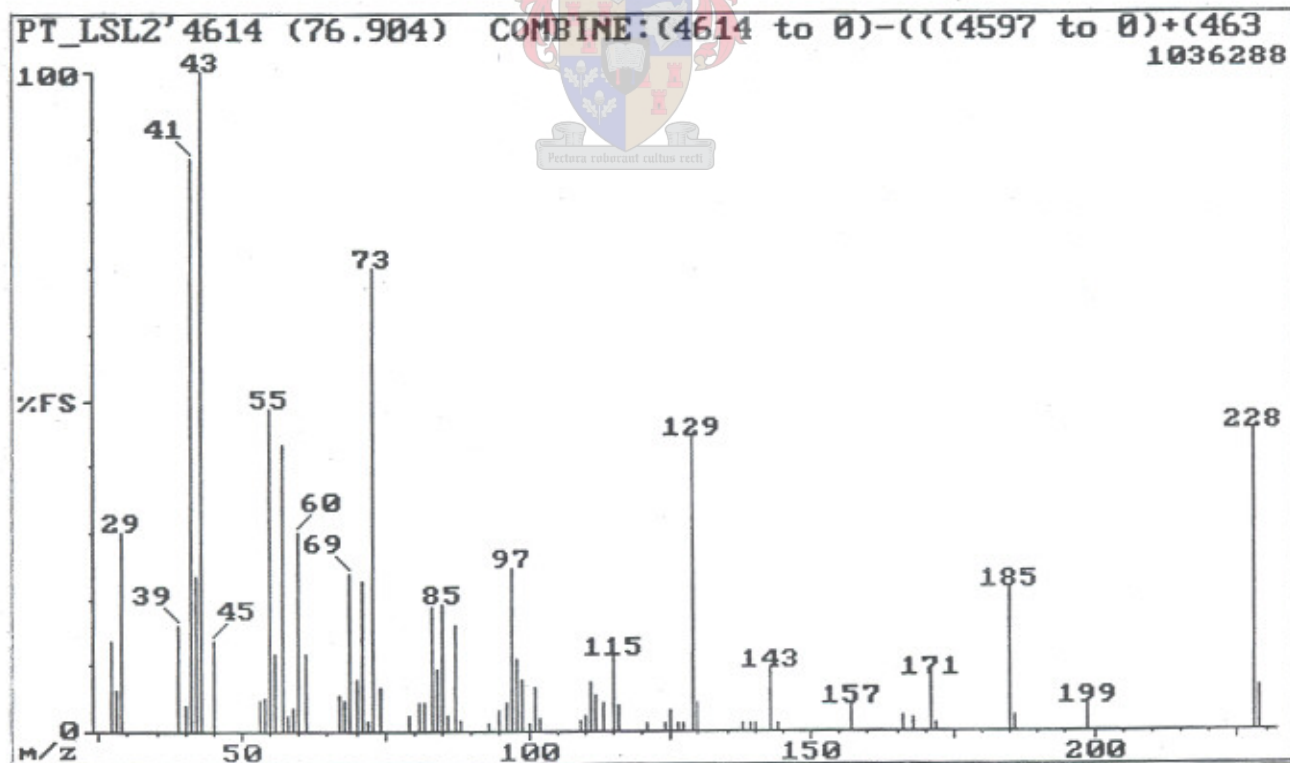


Fig. 2.43: EI-massaspektrum van Komponent L4614 [tetradekanoësuur].

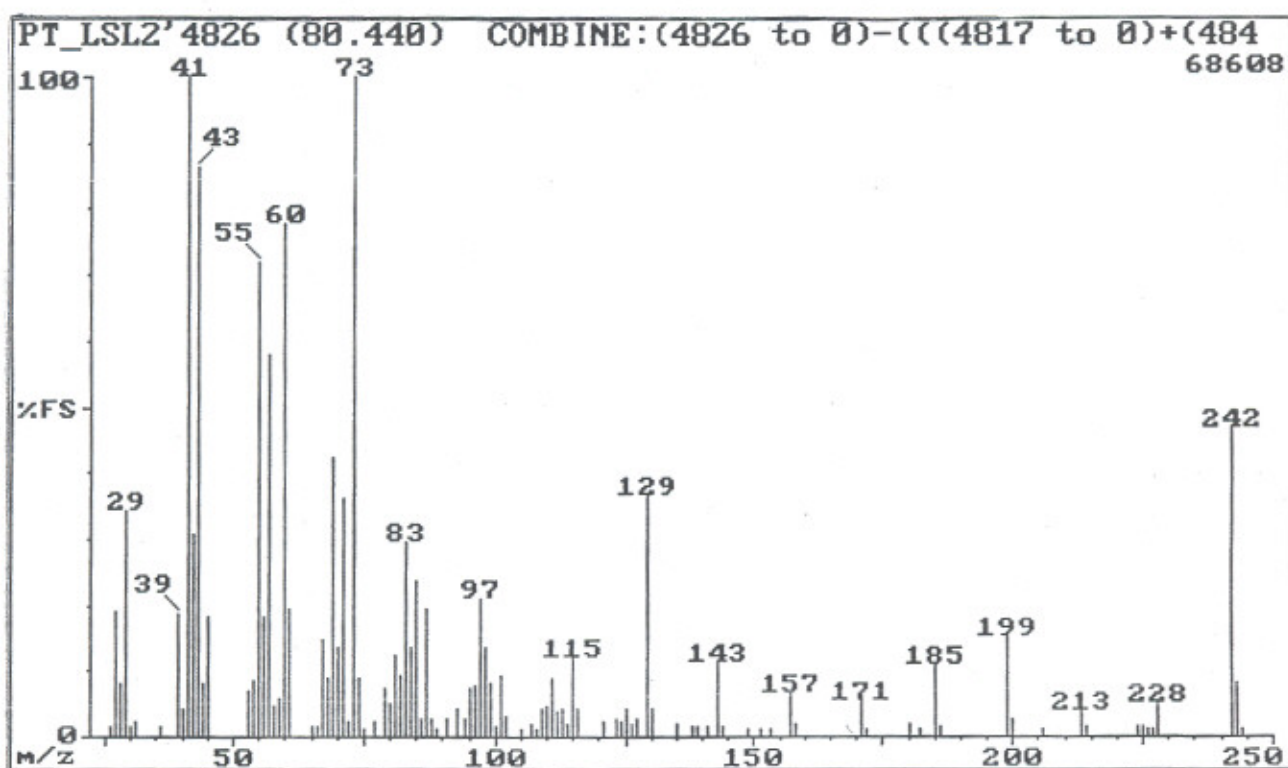


Fig. 2.44: EI-massaspektrum van Komponent L4826 [pentadekanoësuur].

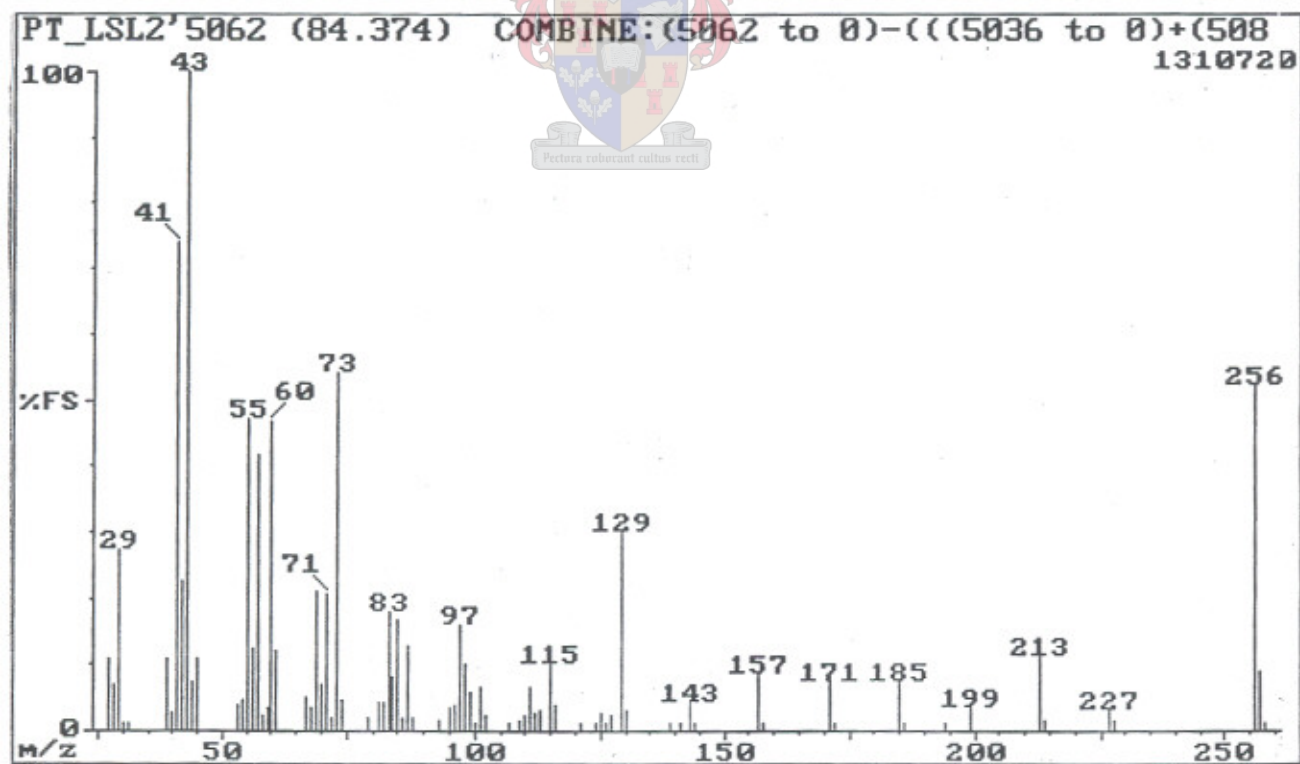


Fig. 2.45: EI-massaspektrum van Komponent L5062 [heksadekanoësuur].

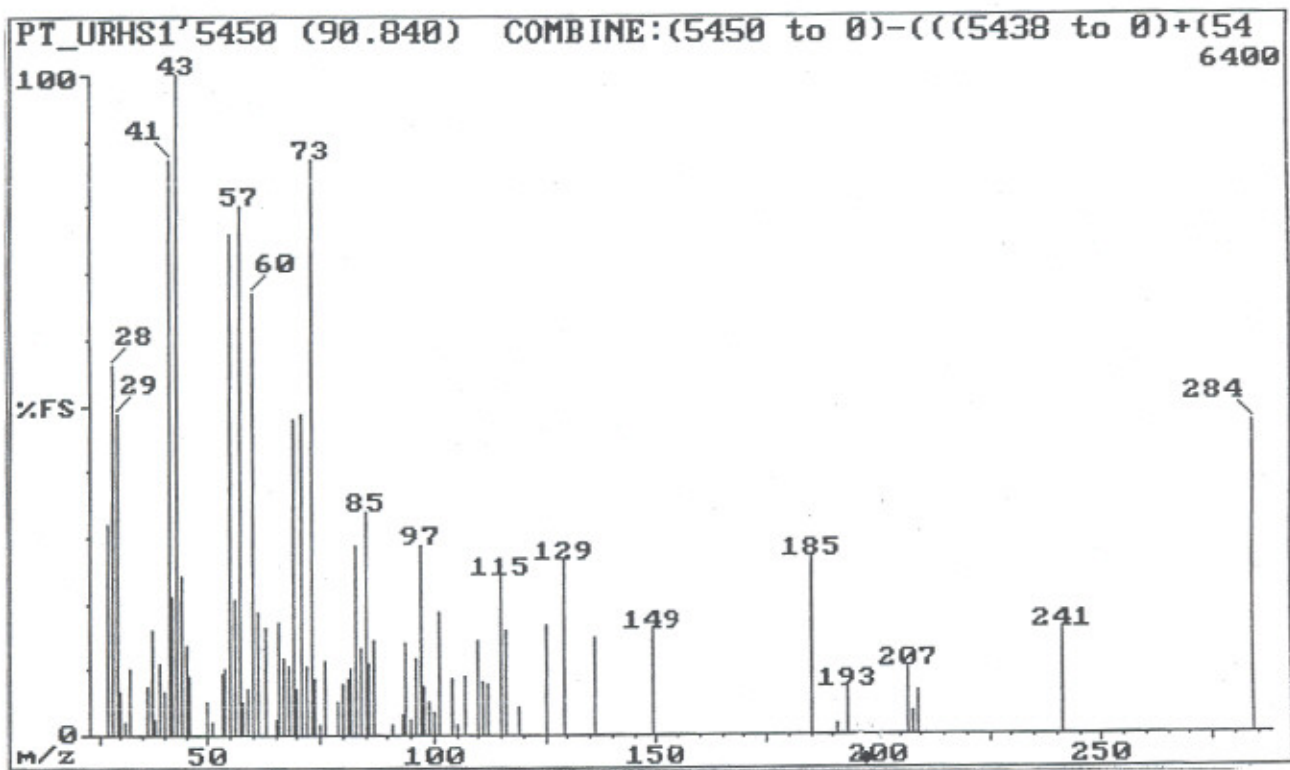


Fig. 2.46: EI-massaspektrum van Komponent B5450 [oktadekanoësuur].

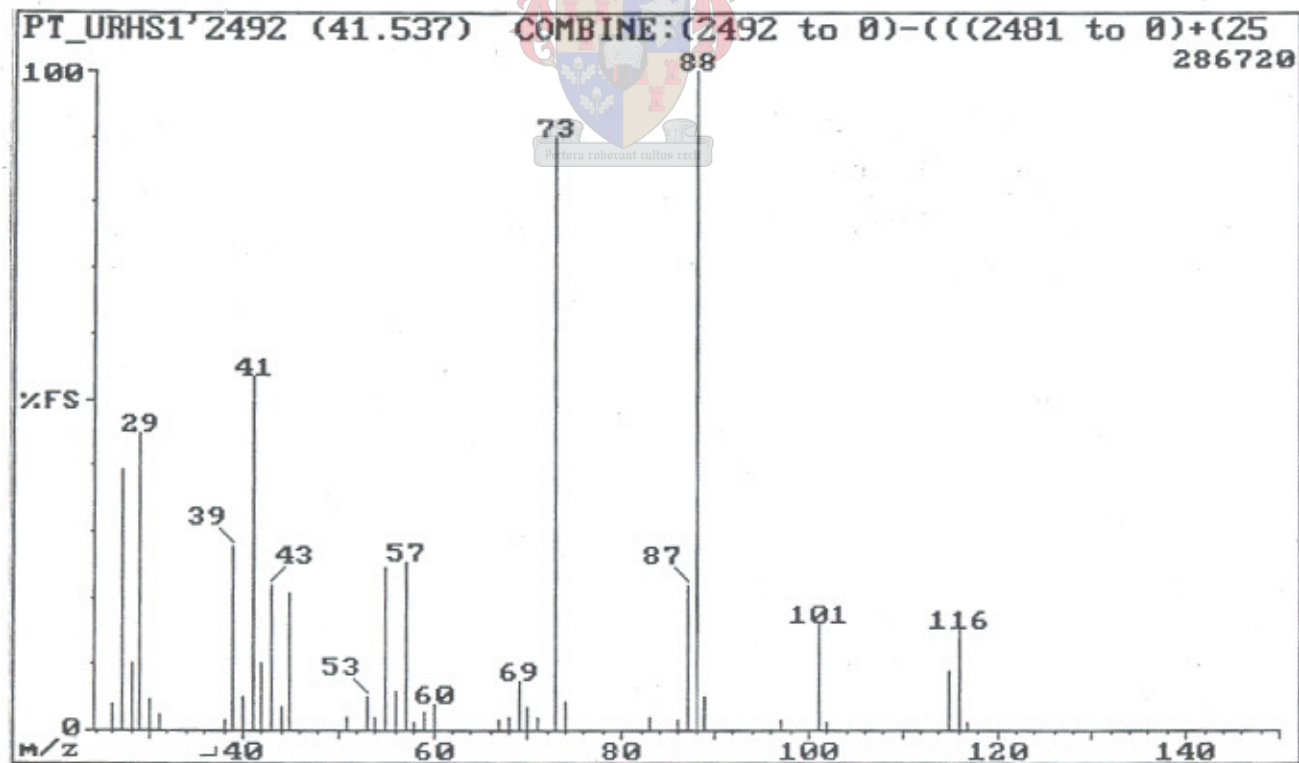


Fig. 2.47: EI-massaspektrum van Komponent B2492 [2-etielheksanoësuur].

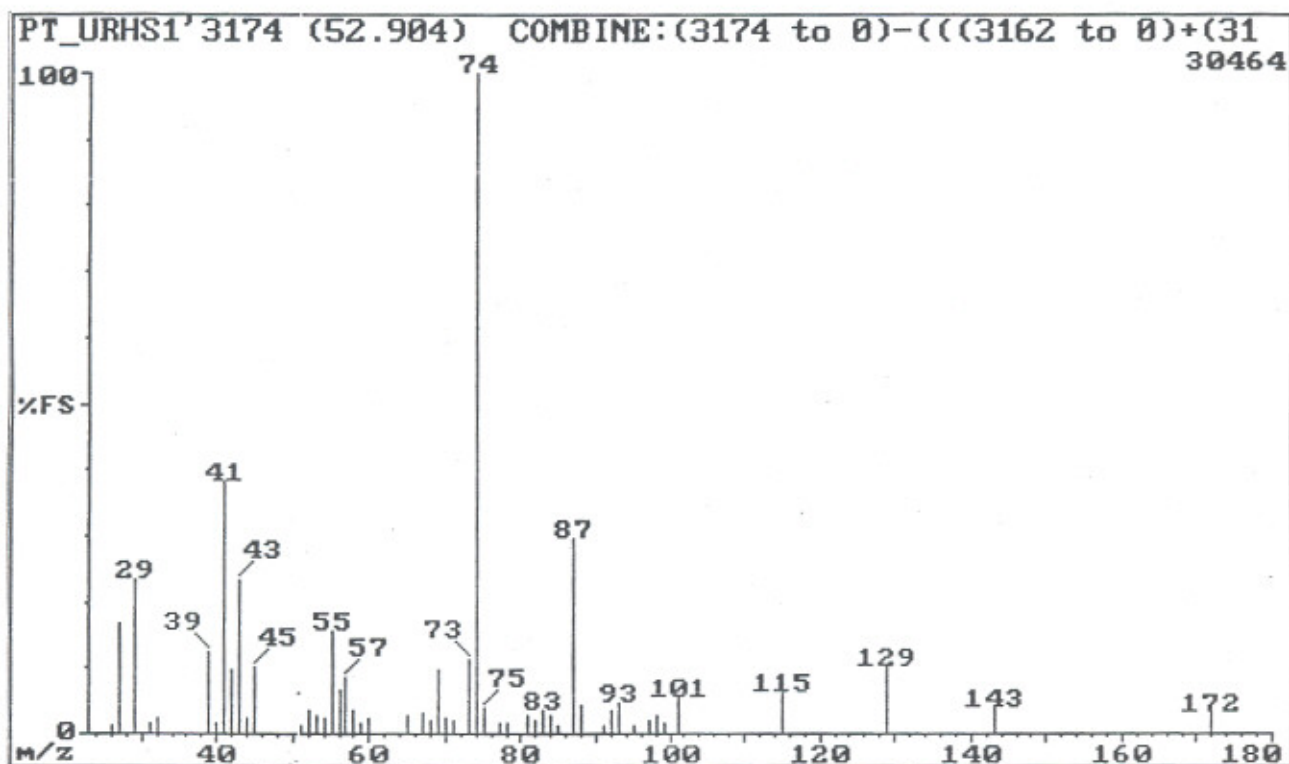


Fig. 2.48: EI-massaspektrum van Komponent B3174 [2-metielnonanoësuur].

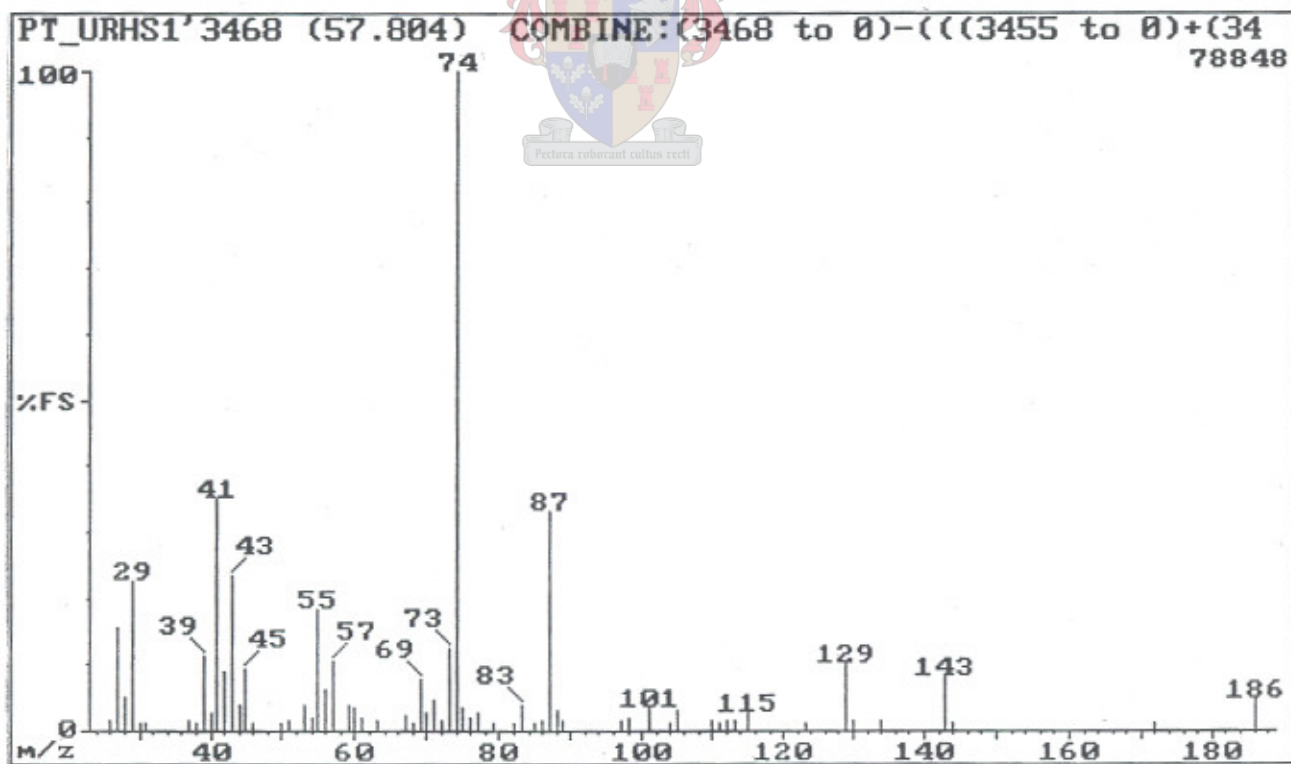


Fig. 2.49: EI-massaspektrum van Komponent B3468 [2-metieldekanoësuur].



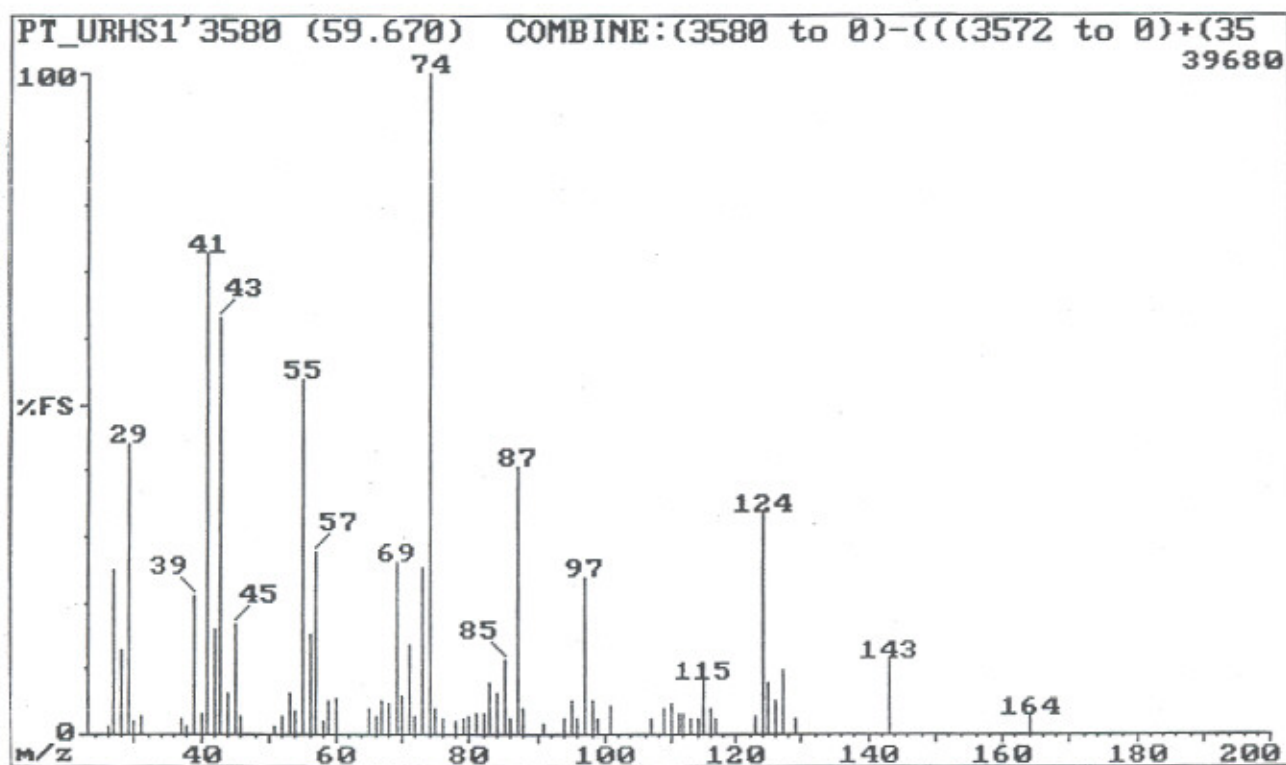


Fig. 2.50: EI-massaspektrum van Komponent B3580 [2-metielundekanoësuur].

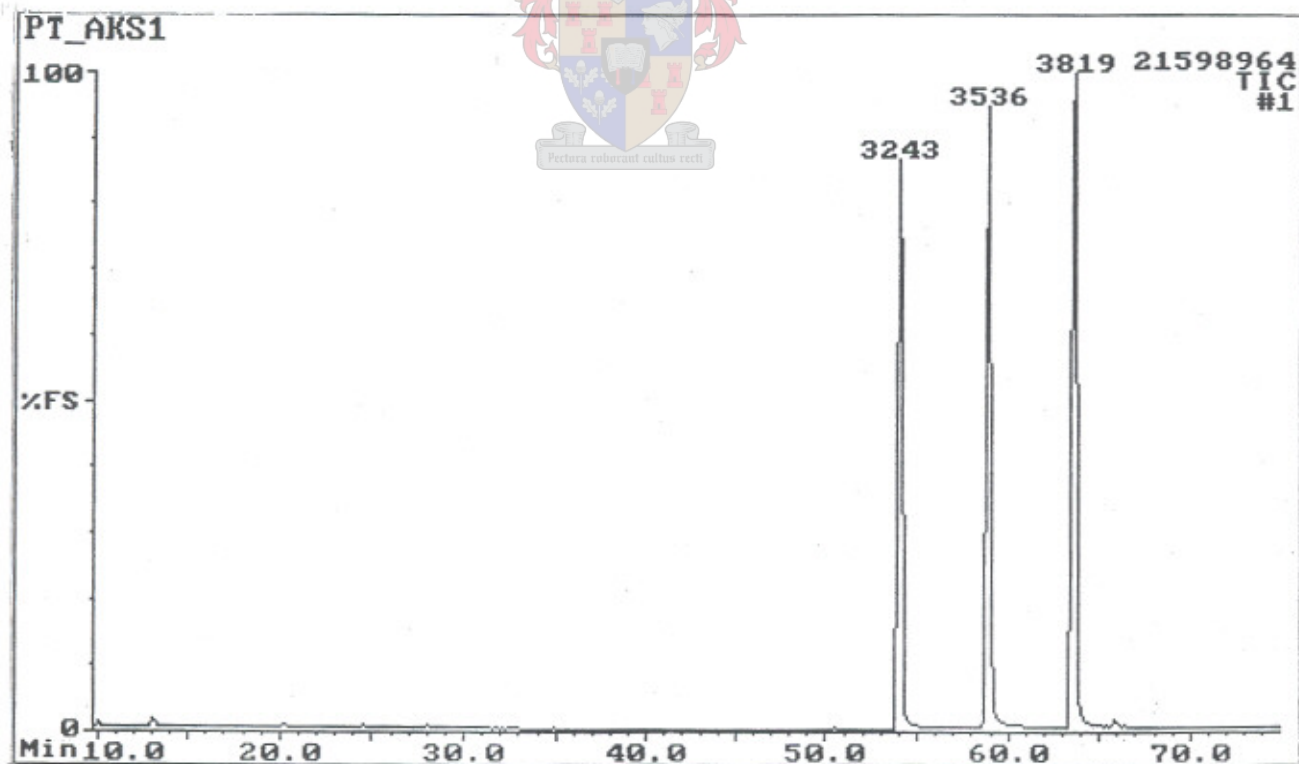


Fig. 2.51: TIC van gesintetiseerde  $\alpha$ -metielkarboksieure.

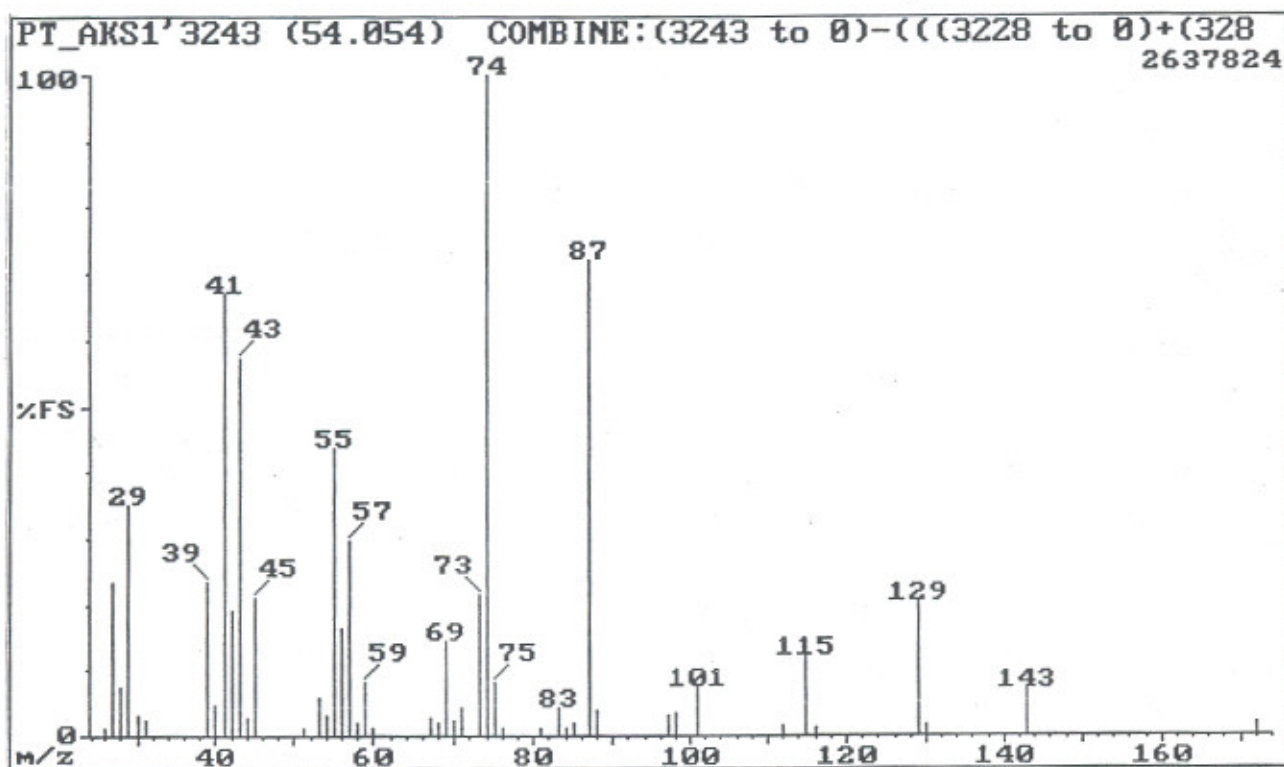


Fig. 2.52: EI-massaspektrum van gesintetiseerde 2-metielnonanoësuur.

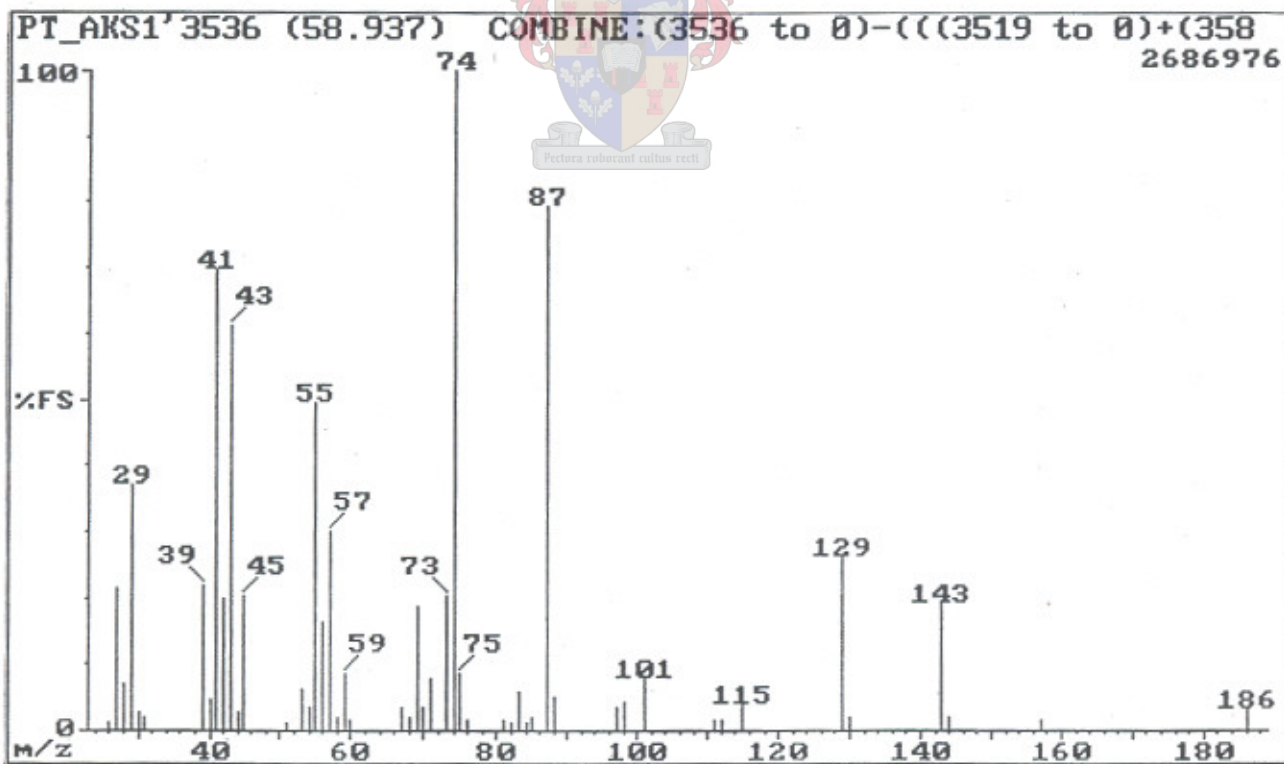


Fig. 2.53: EI-massaspektrum van gesintetiseerde 2-metieldekanoësuur.

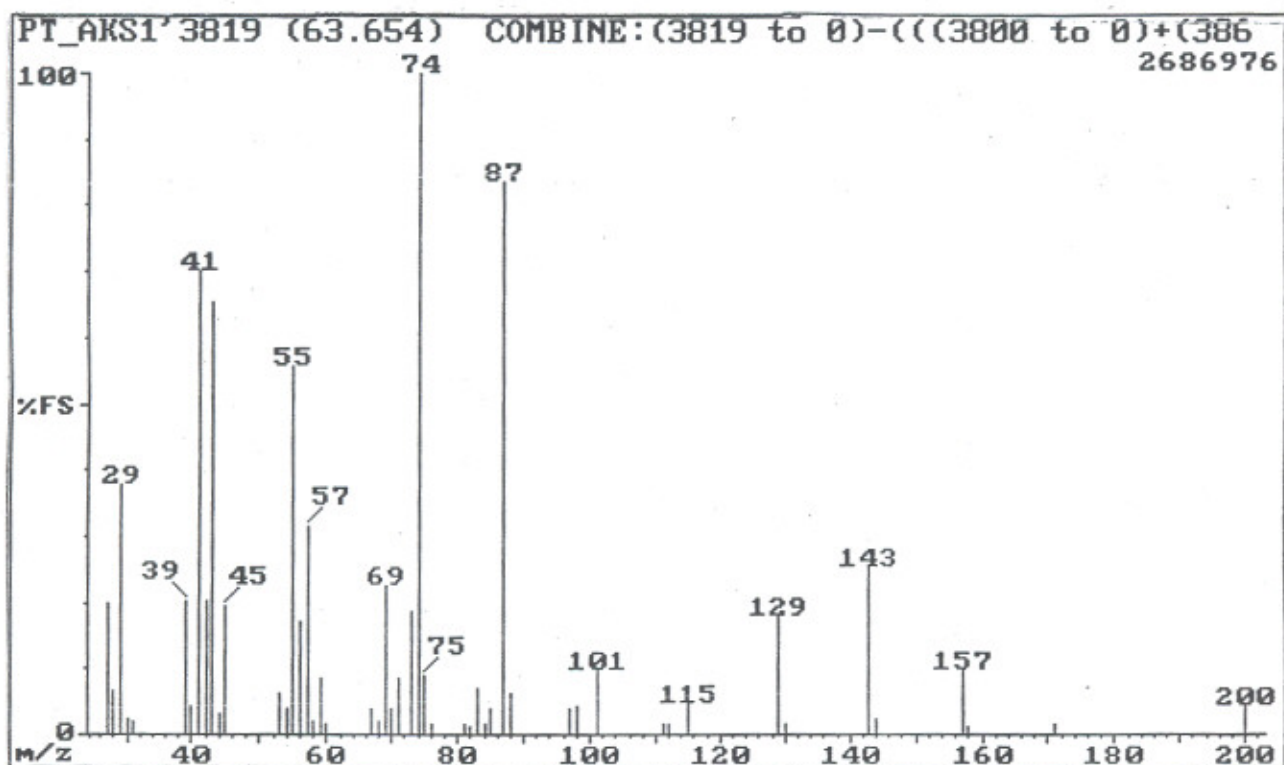


Fig. 2.54: EI-massaspektrum van gesintetiseerde 2-metielundekanoësuur.

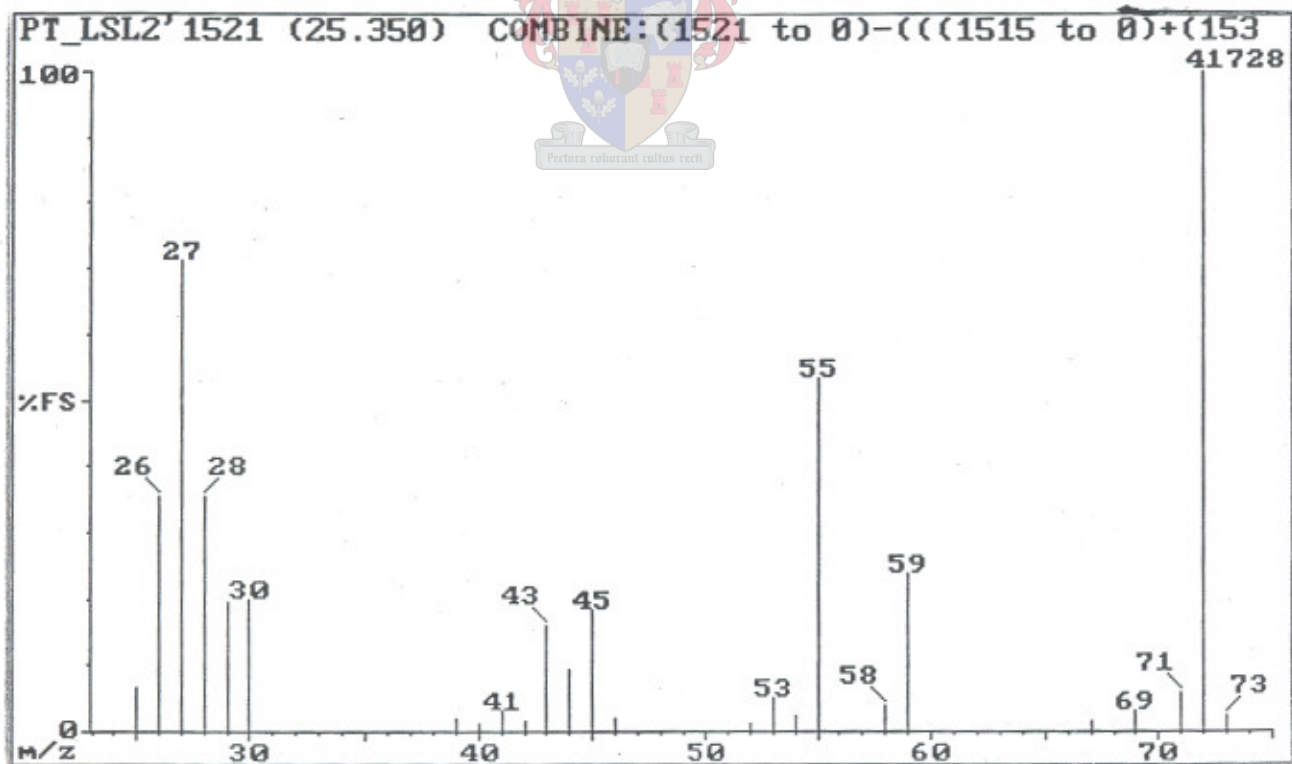


Fig. 2.55: EI-massaspektrum van Komponent L1521 [2-propenoësuur].

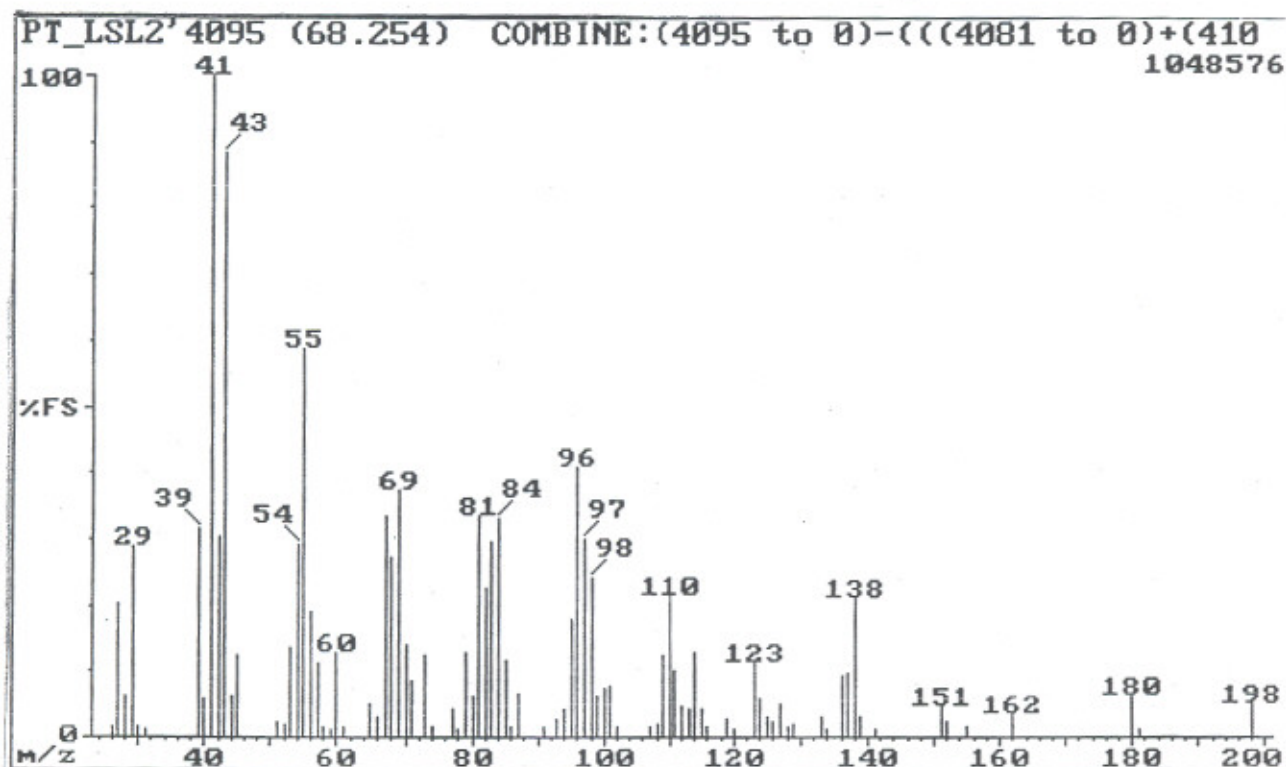


Fig. 2.56: EI-massaspektrum van Komponent L4095 [(Z)-9-dodekenoësuur].

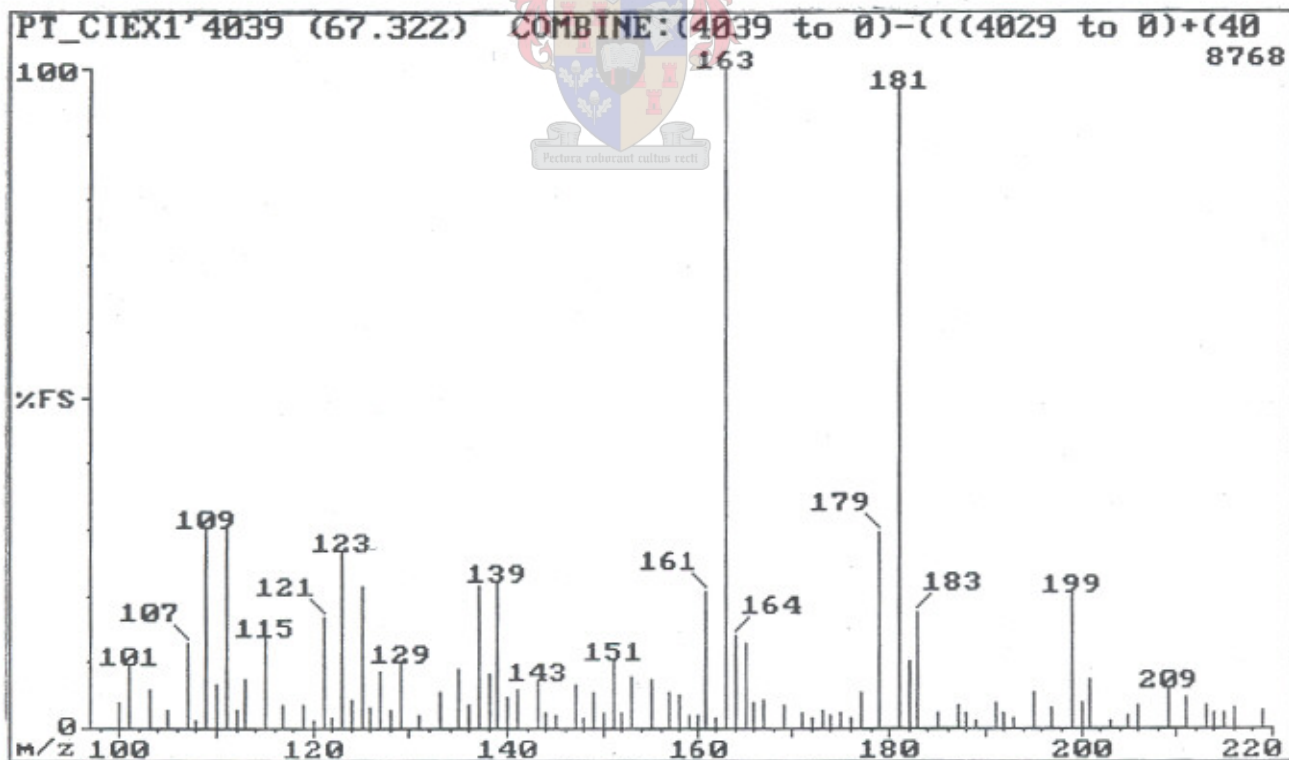


Fig. 2.57: CI-massaspektrum van Komponent CE4039 [(Z)-9-dodekenoësuur].



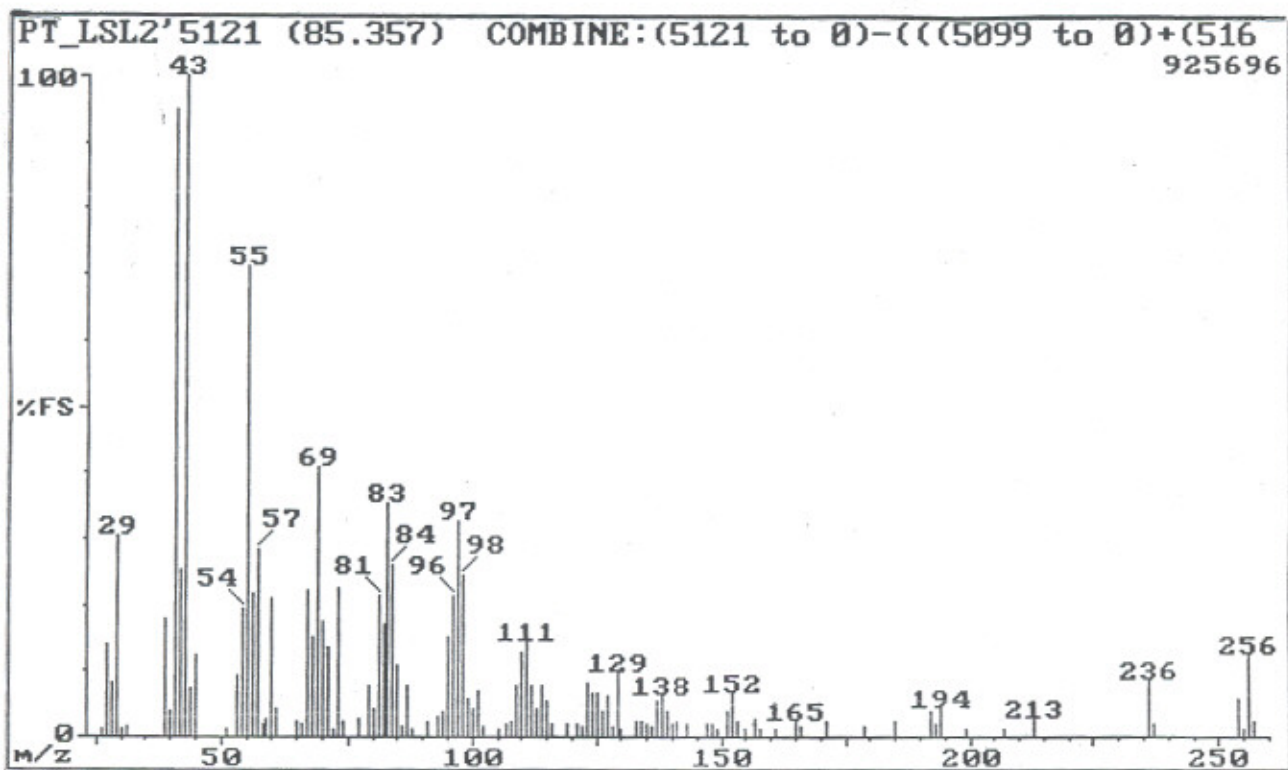


Fig. 2.58: EI-massaspektrum van Komponent L5121 [(Z)-9-heksadekenoësuur].

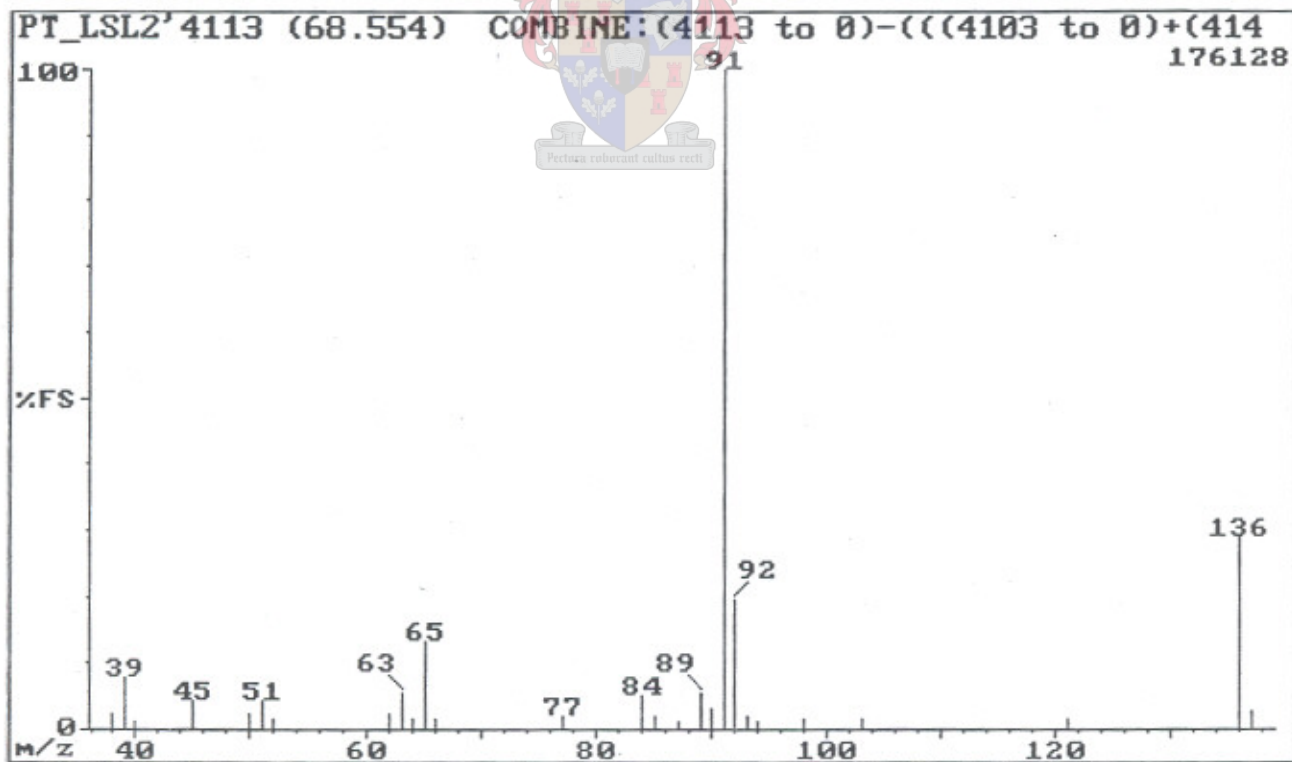


Fig. 2.59: EI-massaspektrum van Komponent L4113 [benseenasynsuur].

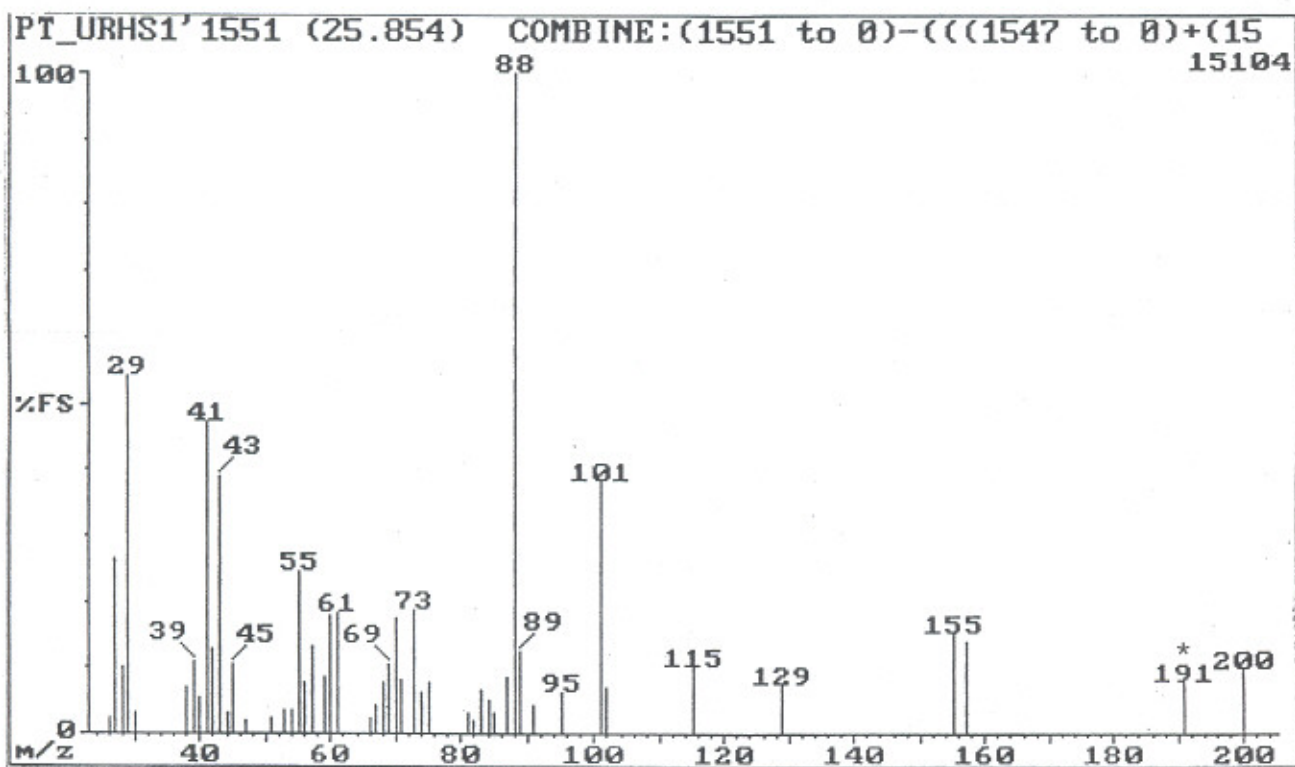


Fig. 2.60: EI-massaspektrum van Komponent B1551 [etieldekanoaat].

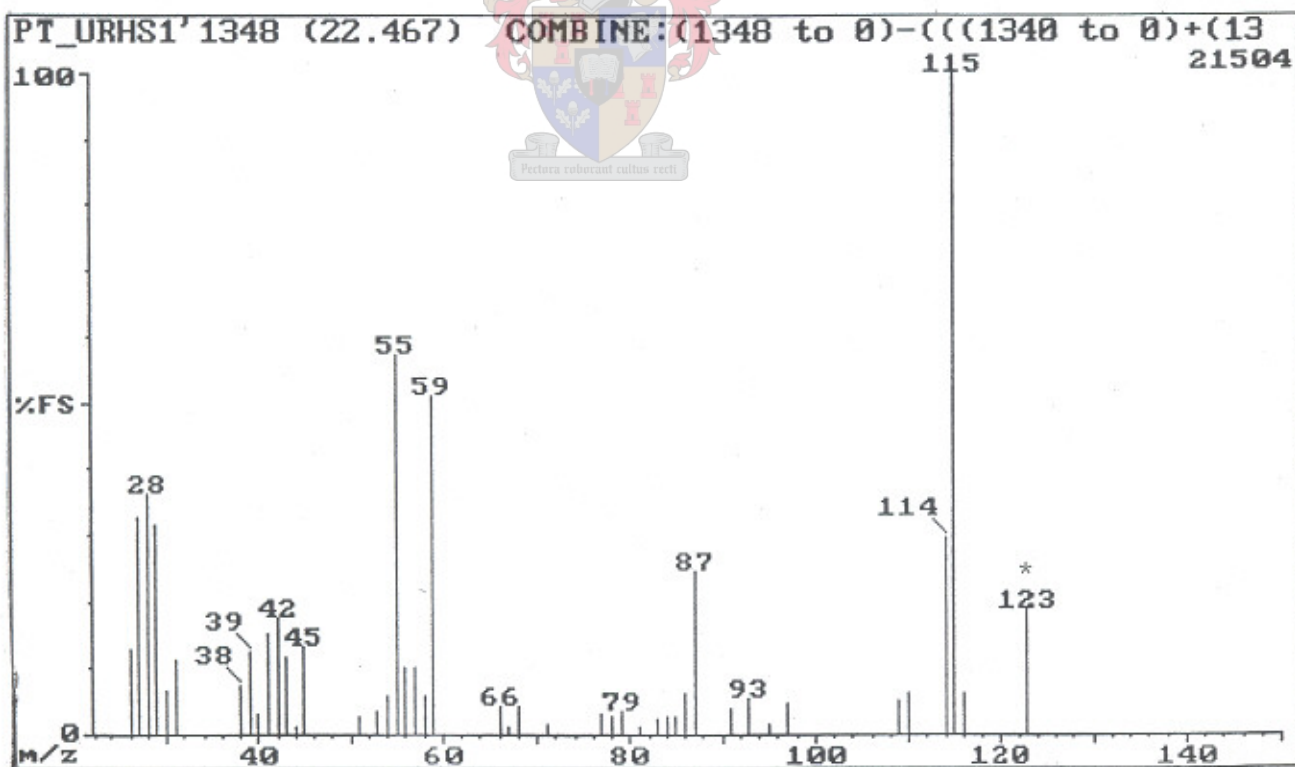


Fig. 2.61: EI-massaspektrum van Komponent B1348 [dimetielsuksinaat].

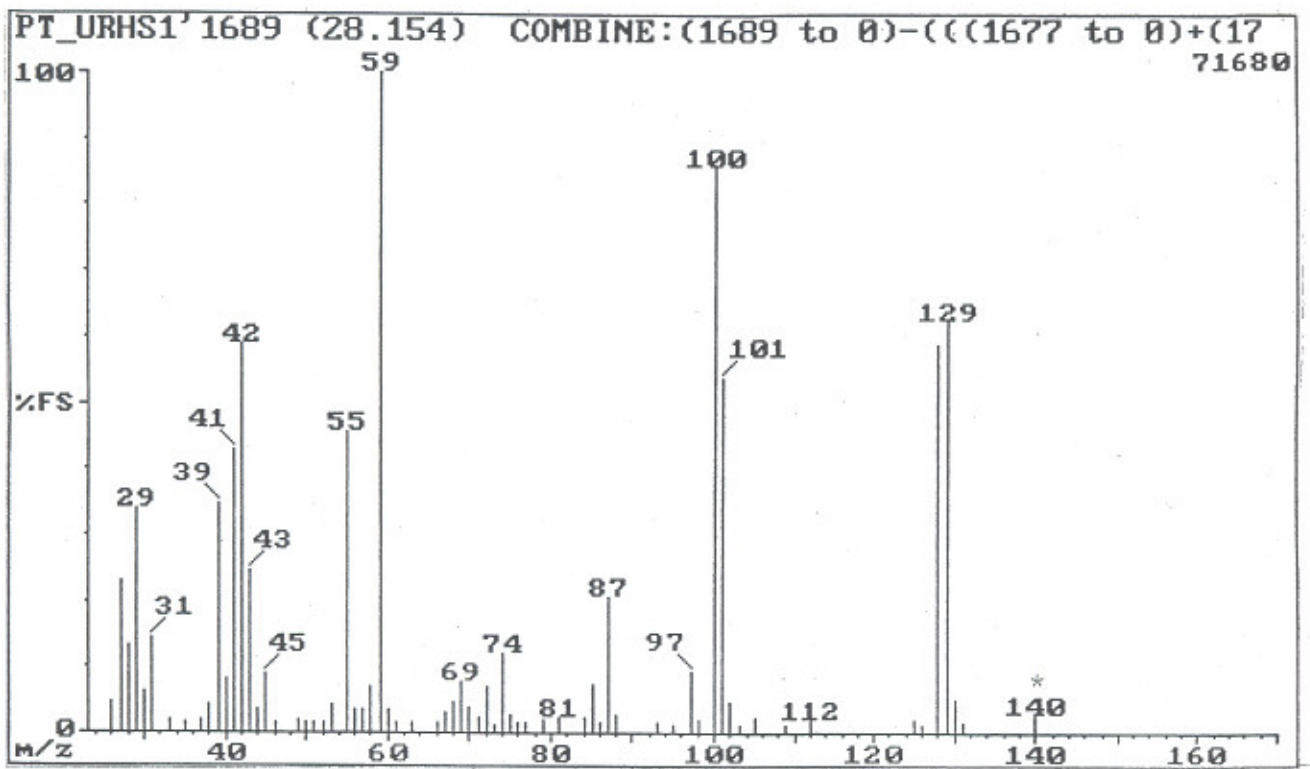


Fig. 2.62: EI-massaspektrum van Komponent B1689 [dimetielglutaraat].

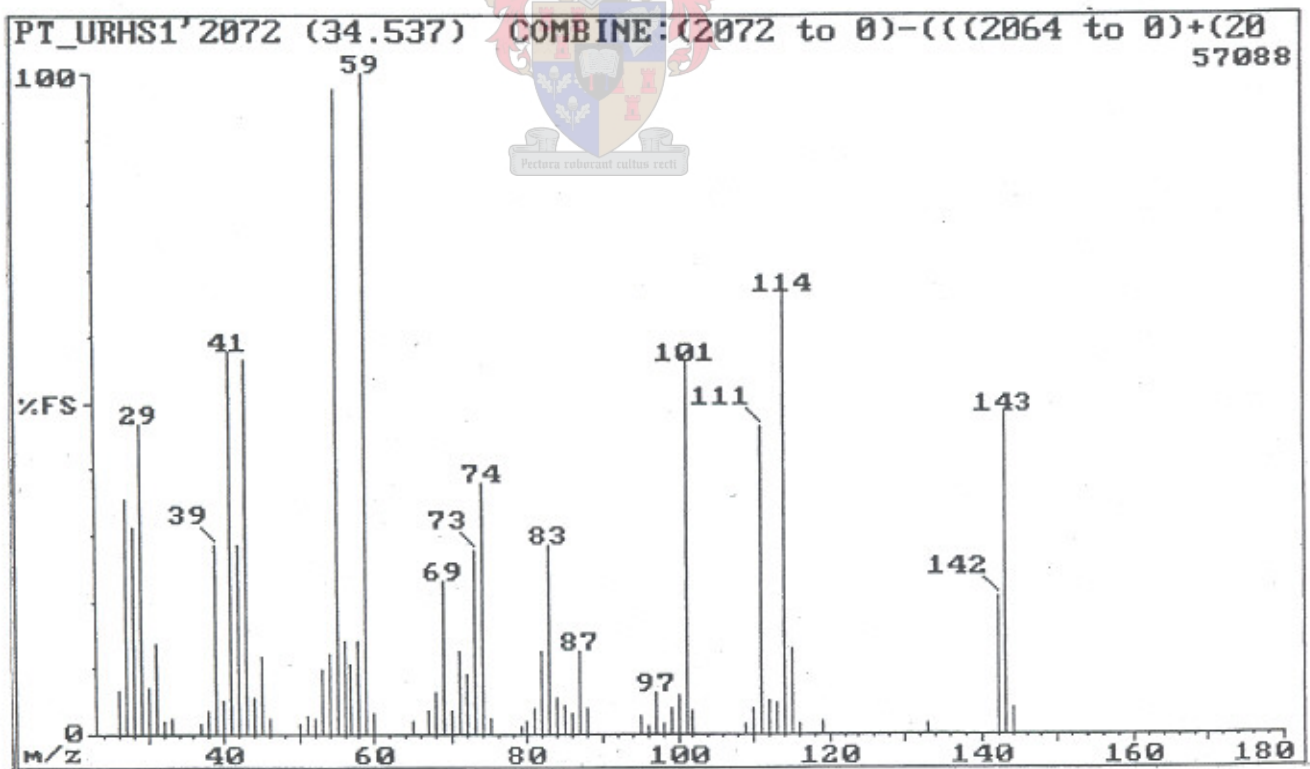


Fig. 2.63: EI-massaspektrum van Komponent B2072 [dimetieladipaat].

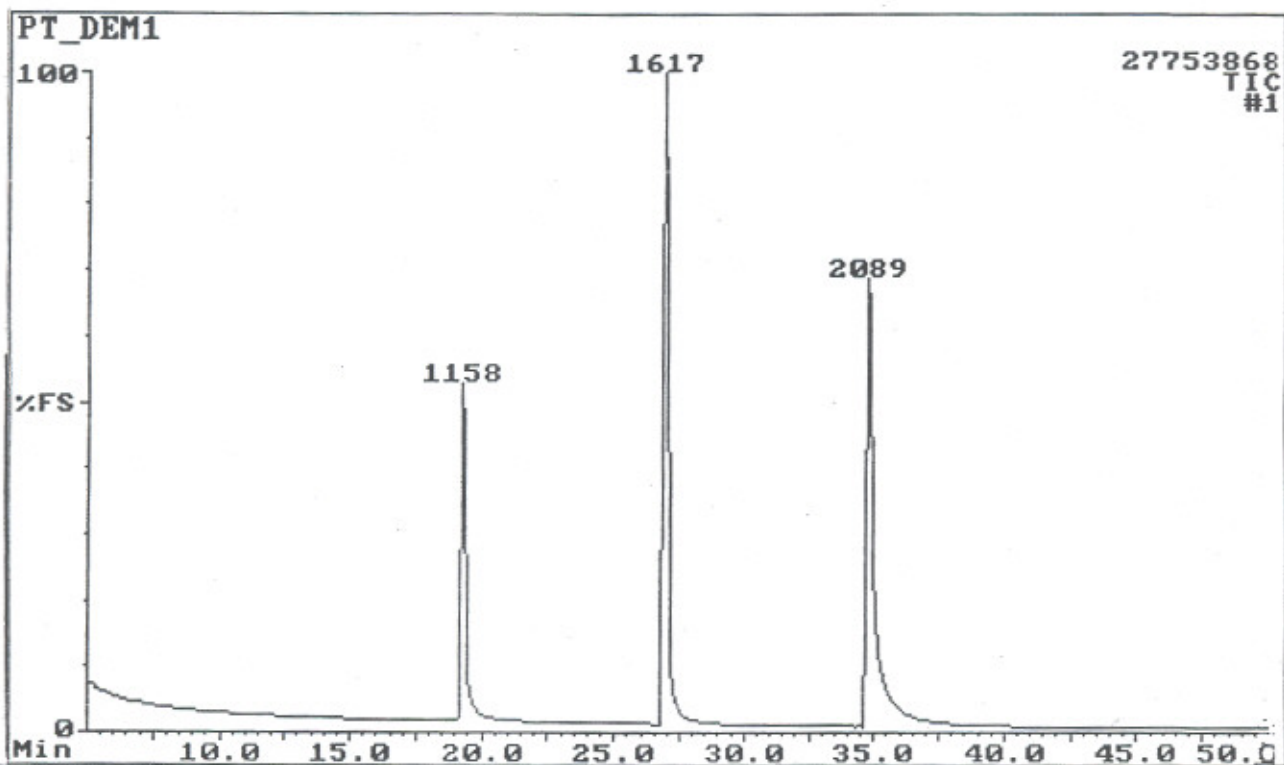


Fig. 2.64: TIC van gesintetiseerde dimetielesters.

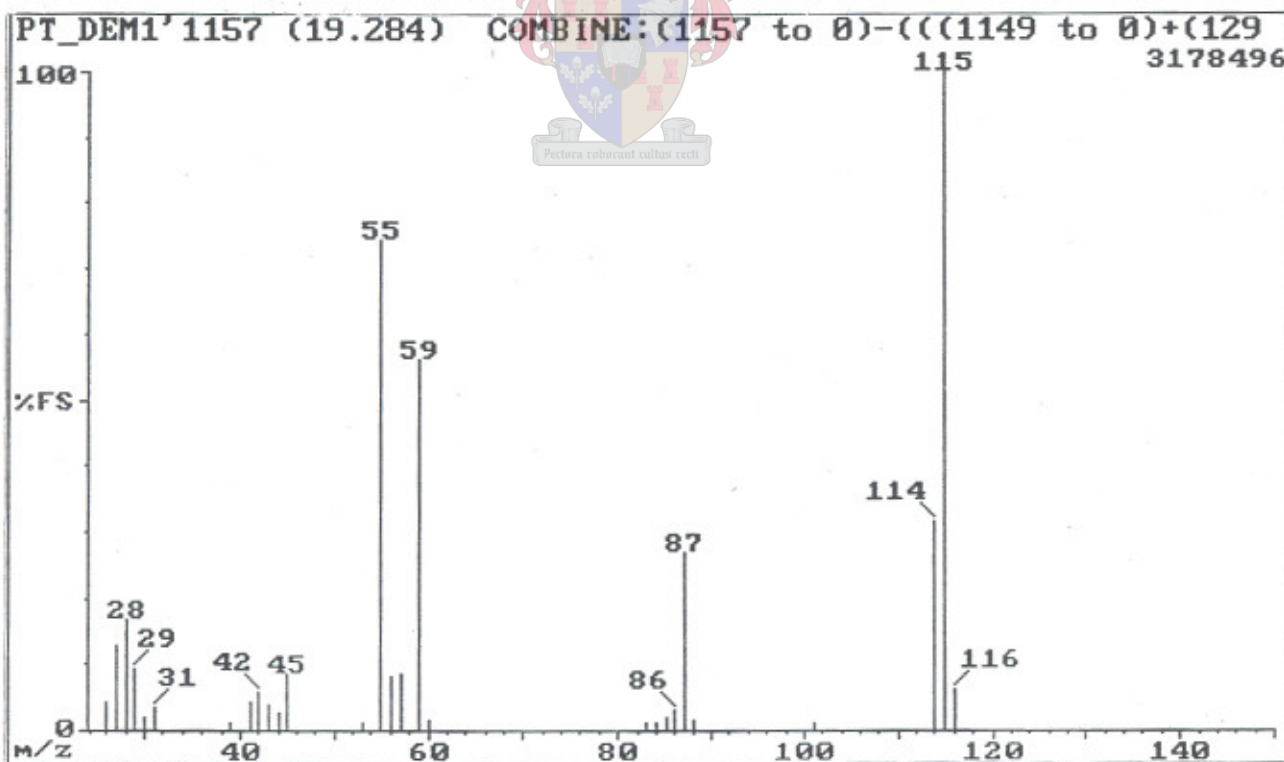


Fig. 2.65: EI-massaspektrum van gesintetiseerde dimetielsuksinaat.



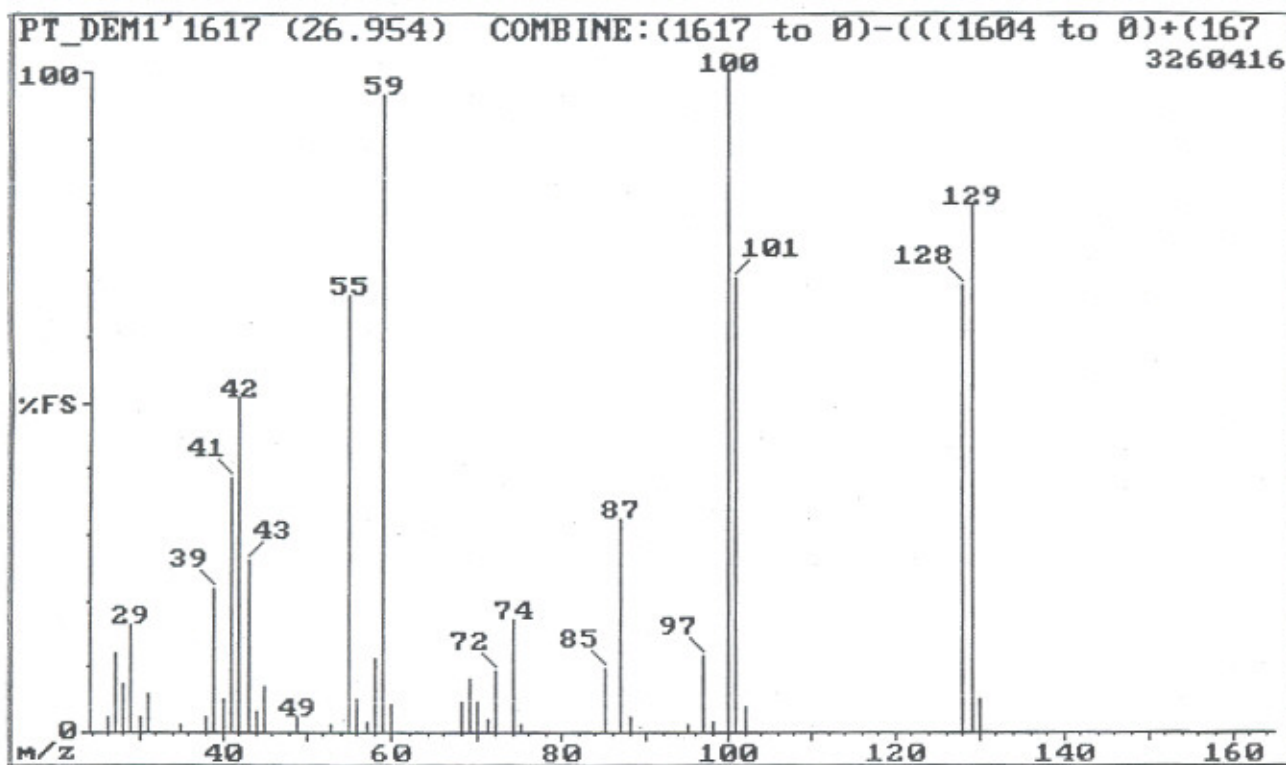


Fig. 2.66: EI-massaspektrum van gesintetiseerde dimetielglutaraat.

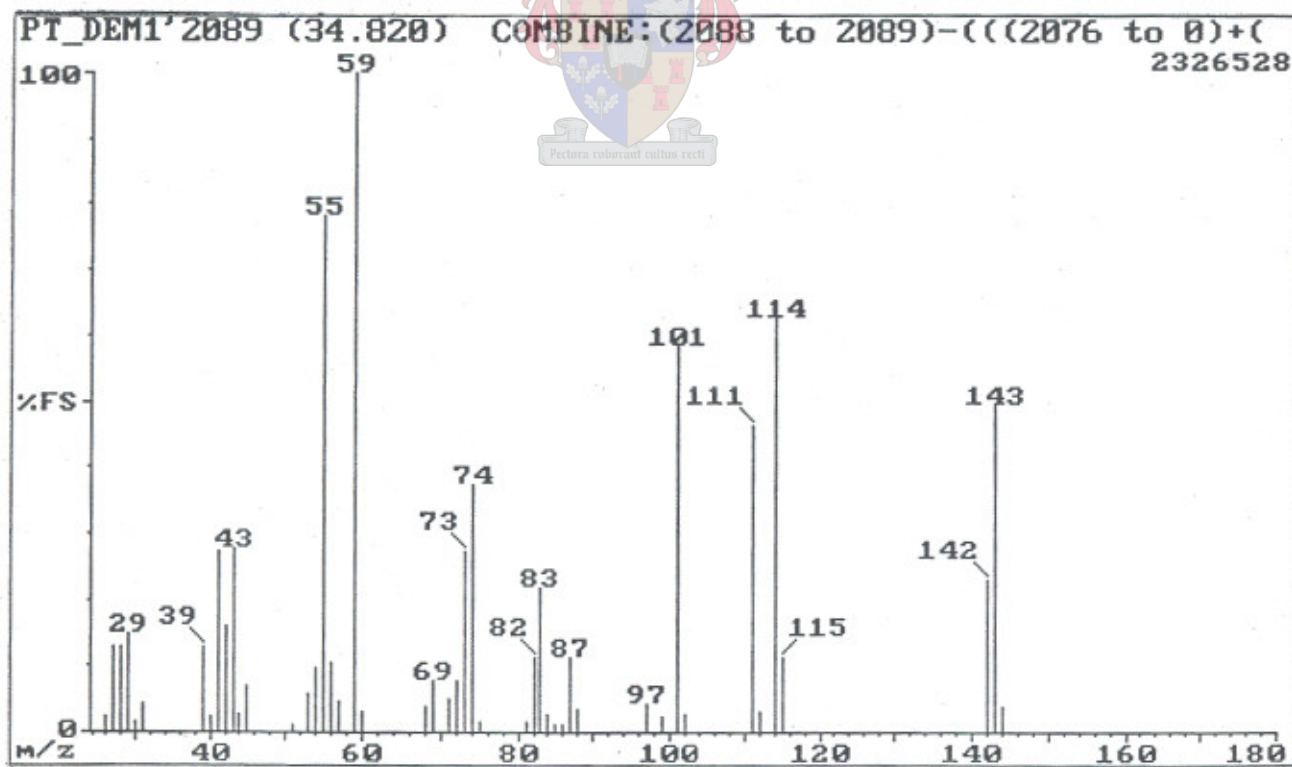


Fig. 2.67: EI-massaspektrum van gesintetiseerde dimetieladipaat.

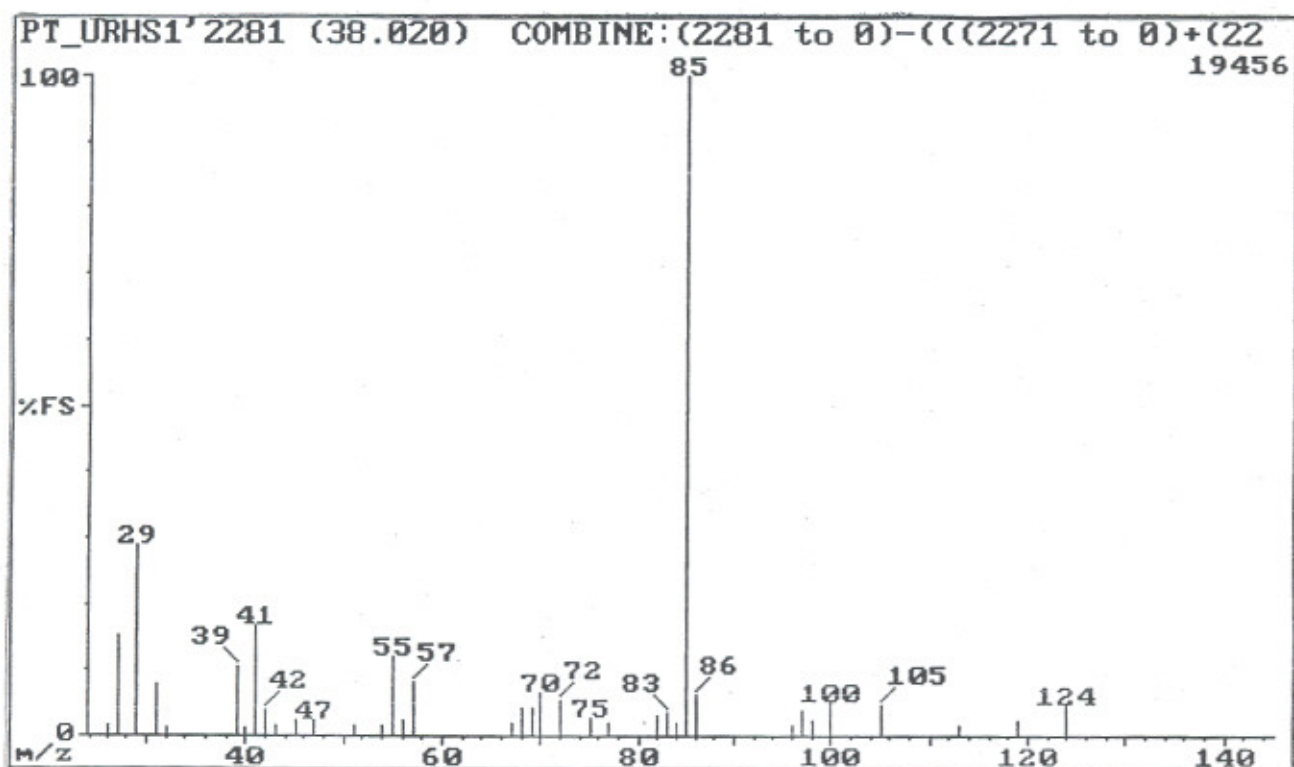


Fig. 2.68: EI-massaspektrum van Komponent B2281 [oktan-4-olied].

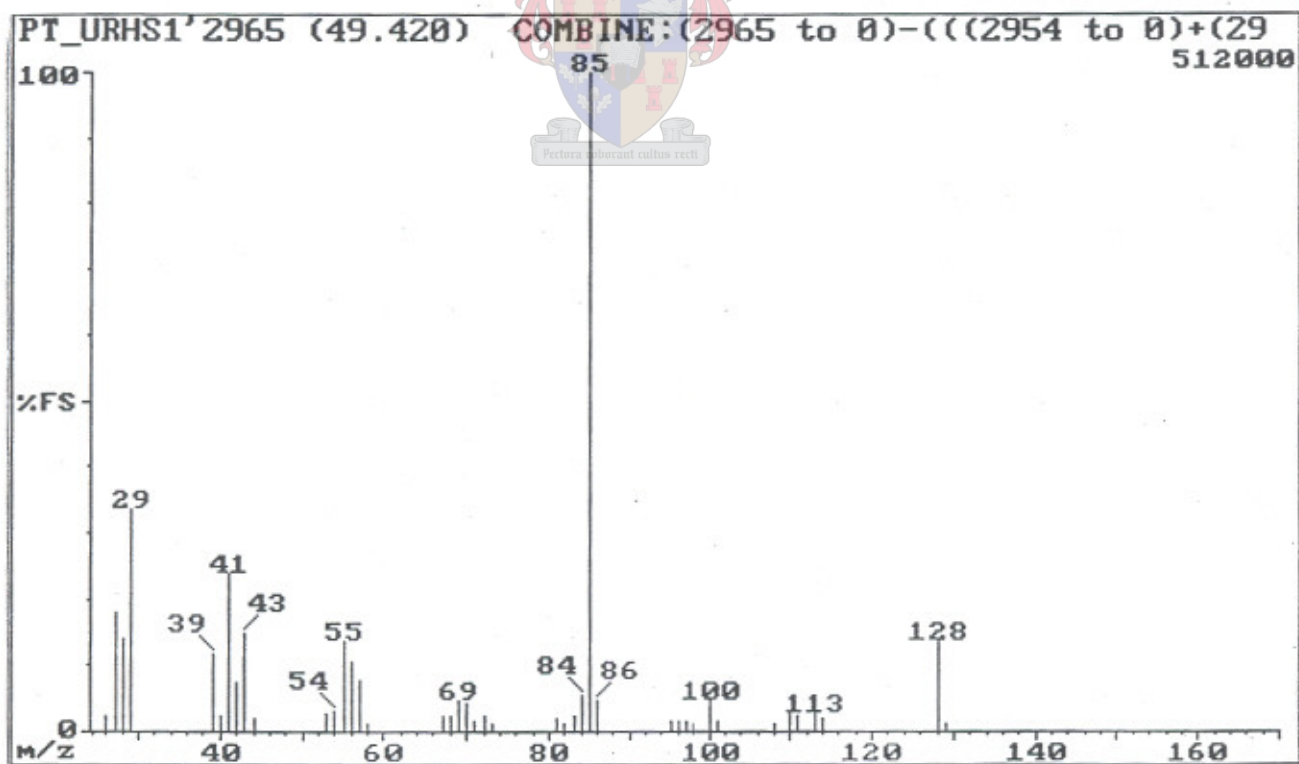


Fig. 2.69: EI-massaspektrum van Komponent B2965 [dekan-4-olied].

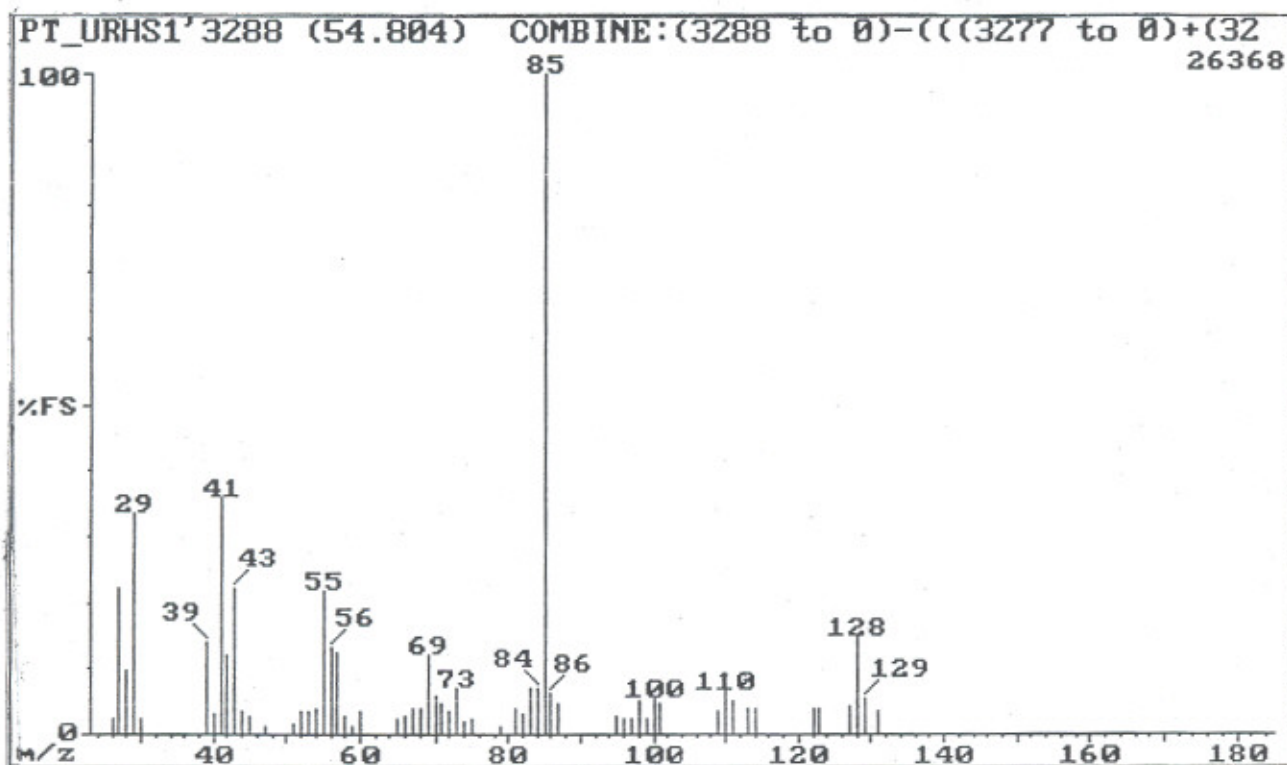


Fig. 2.70: EI-massaspektrum van Komponent B3288 [undekan-4-olied].

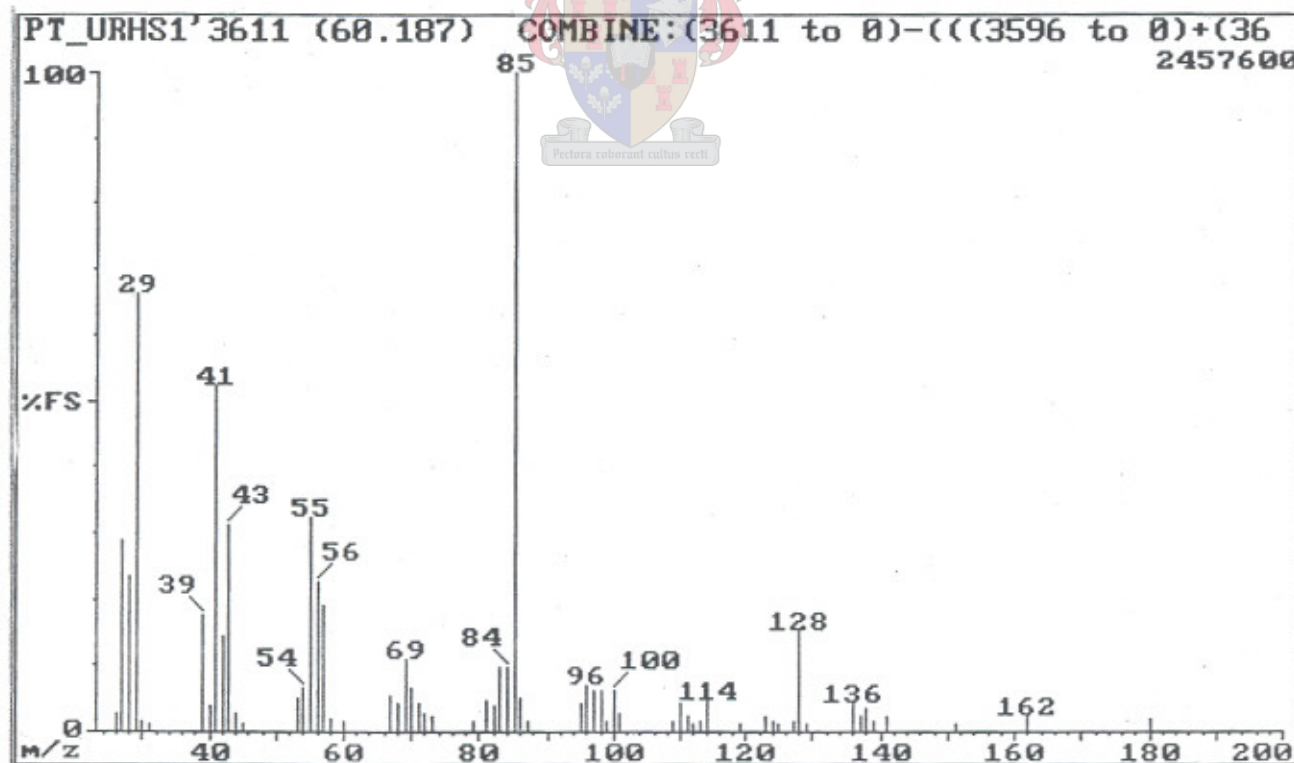


Fig. 2.71: EI-massaspektrum van Komponent B3611 [dodekan-4-olied].



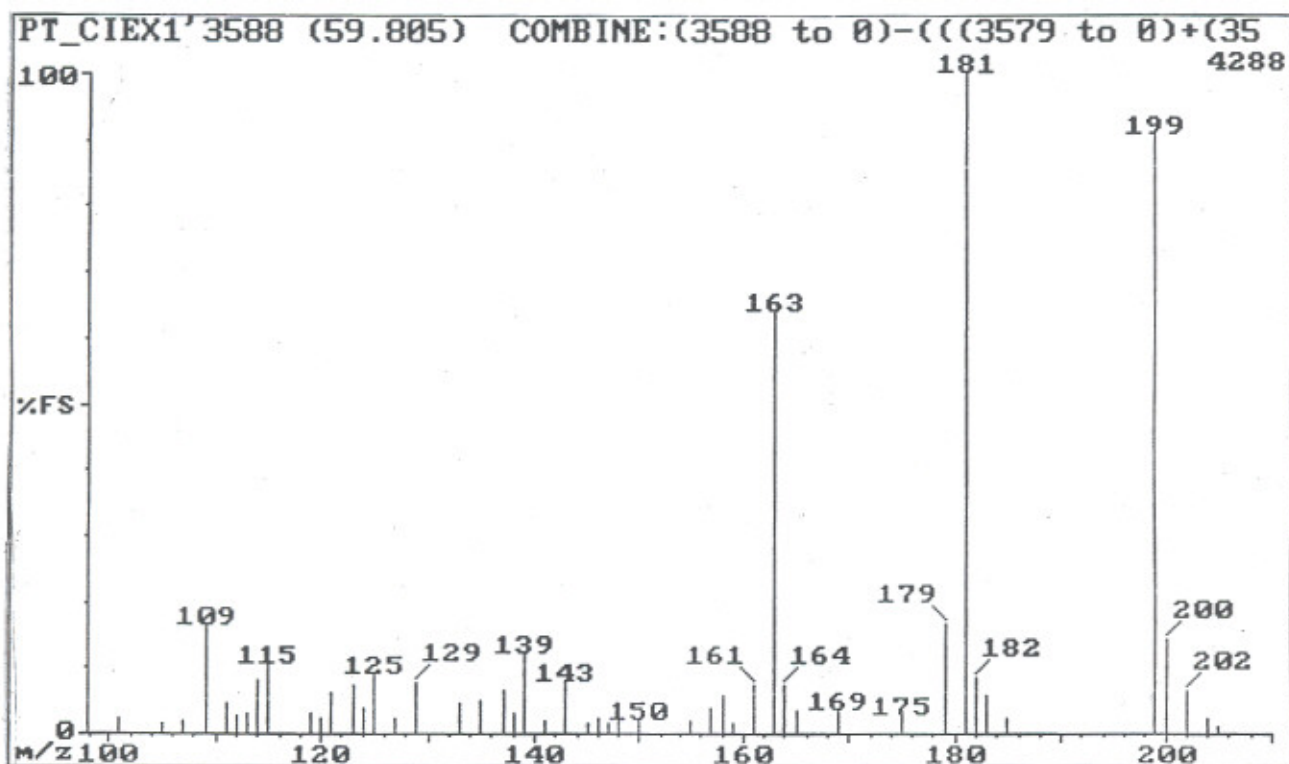


Fig. 2.72: CI-masspektrum van Komponent CE3588 [dodekan-4-olied].

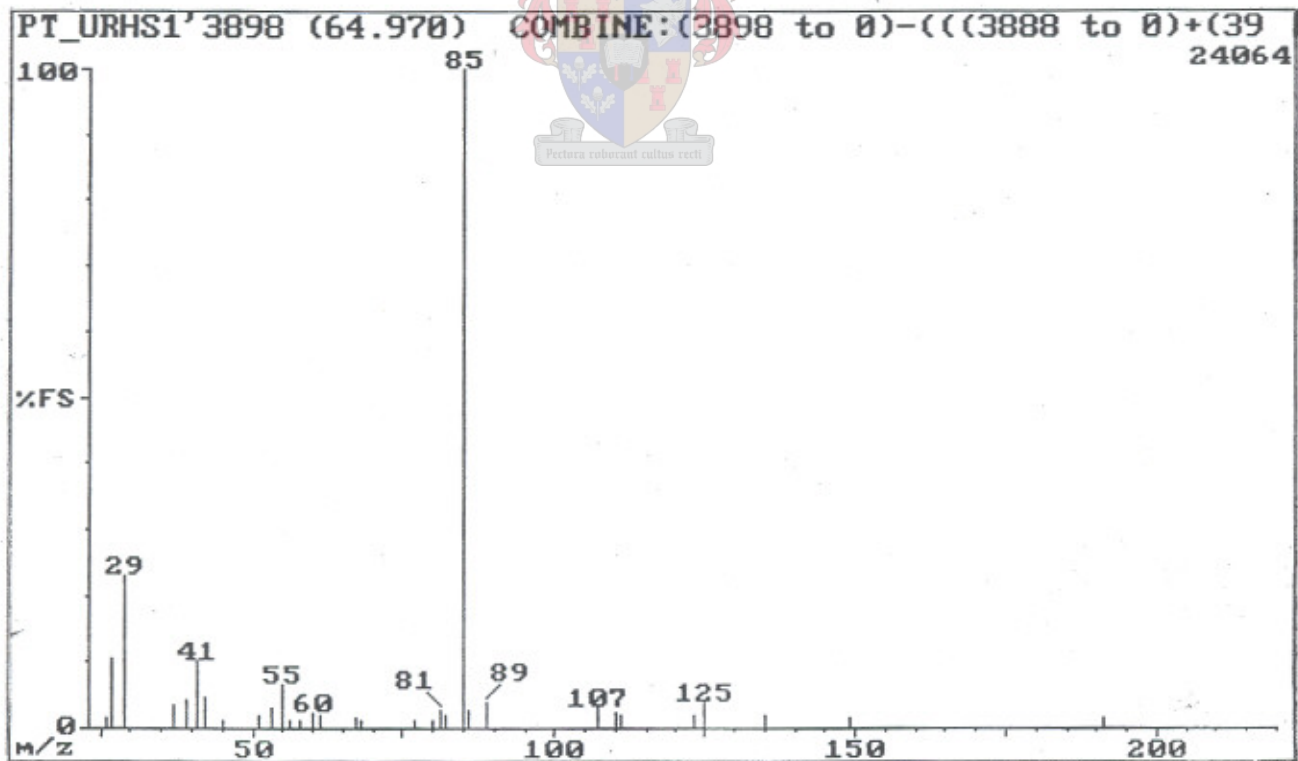


Fig. 2.73: EI-masspektrum van Komponent B3898 [tridekan-4-olied].

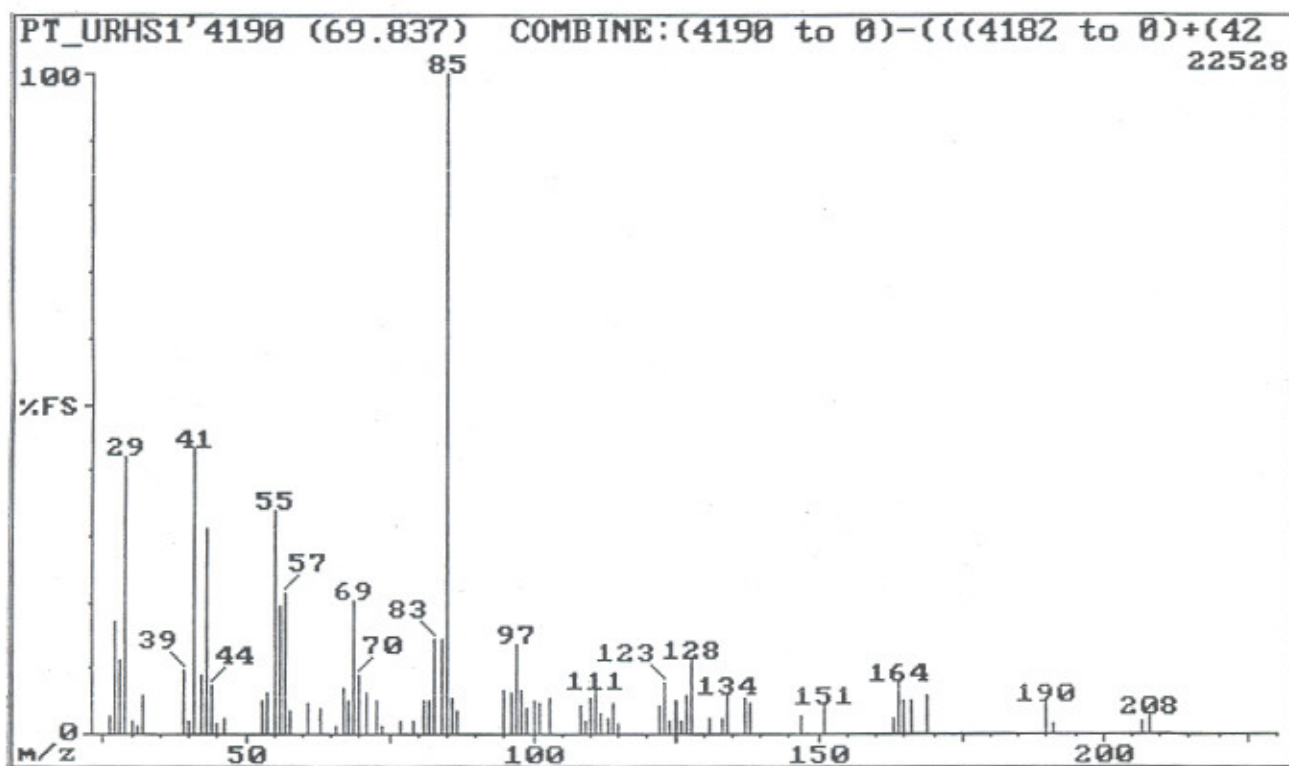


Fig. 2.74: EI-massaspektrum van Komponent B4190 [tetradekan-4-olied].

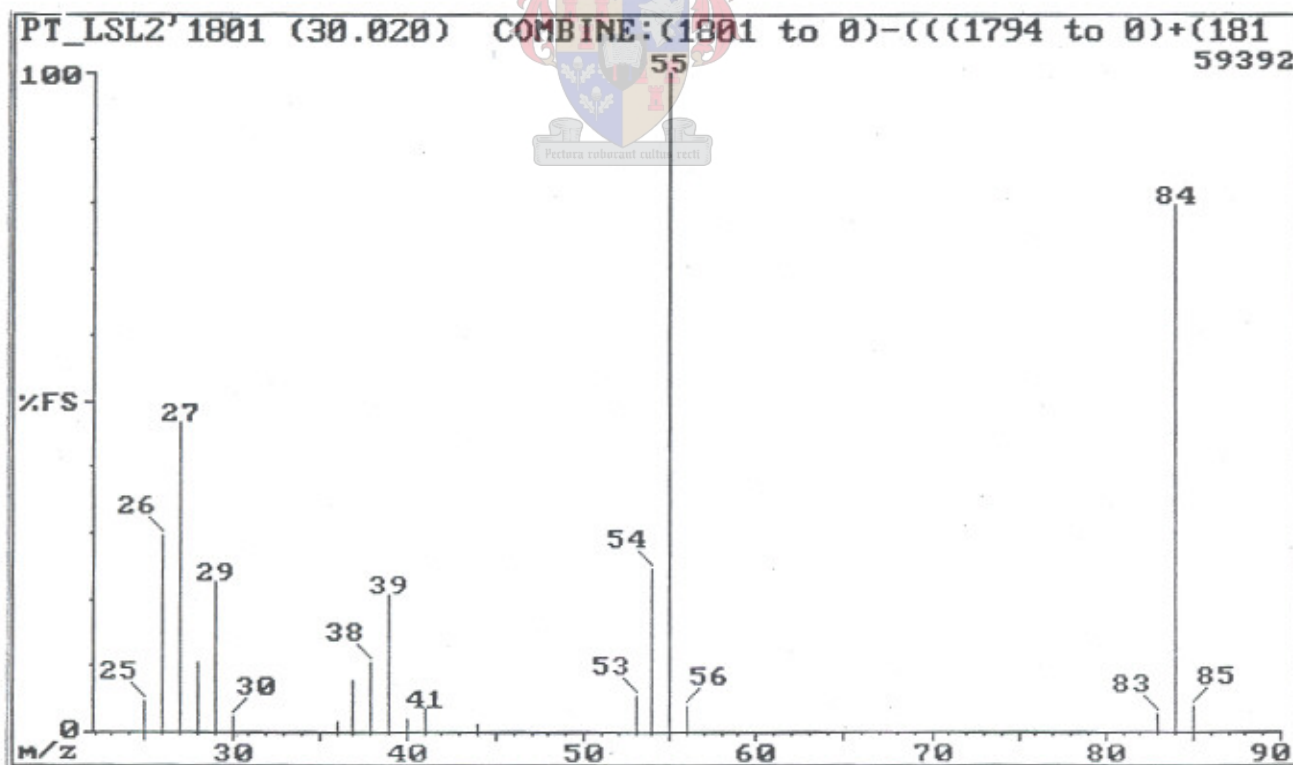


Fig. 2.75: EI-massaspektrum van Komponent L1801 [but-3-en-4-olied].

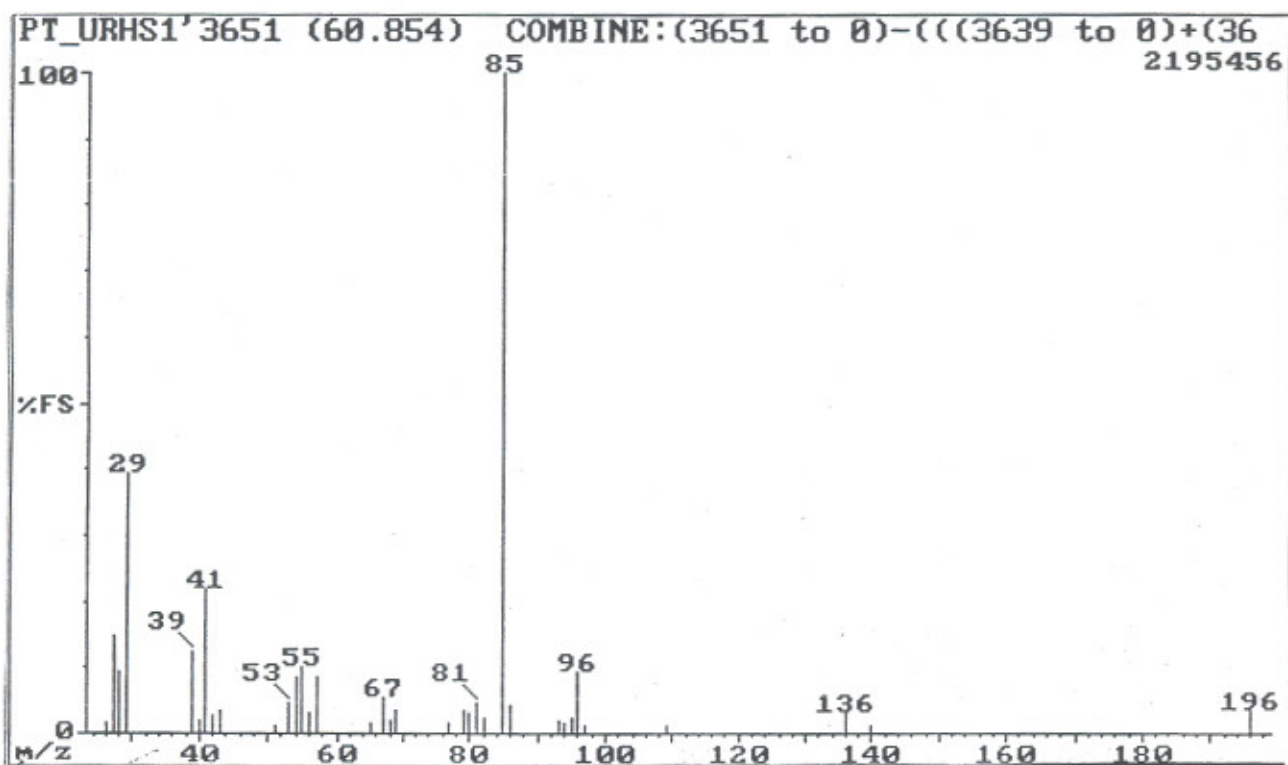


Fig. 2.76: EI-massaspektrum van Komponent B3651 [(Z)-6-dodeken-4-olied].

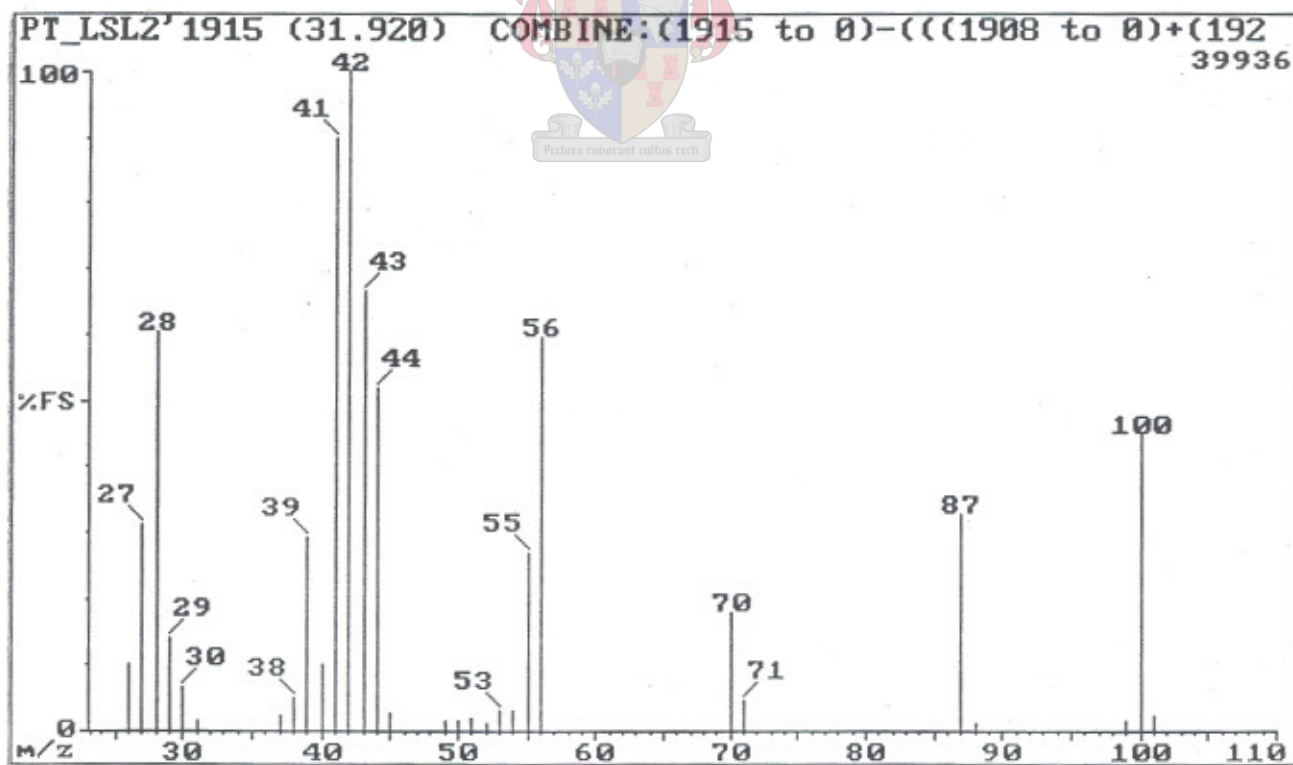


Fig. 2.77: EI-massaspektrum van Komponent L1915 [pentan-5-olied].

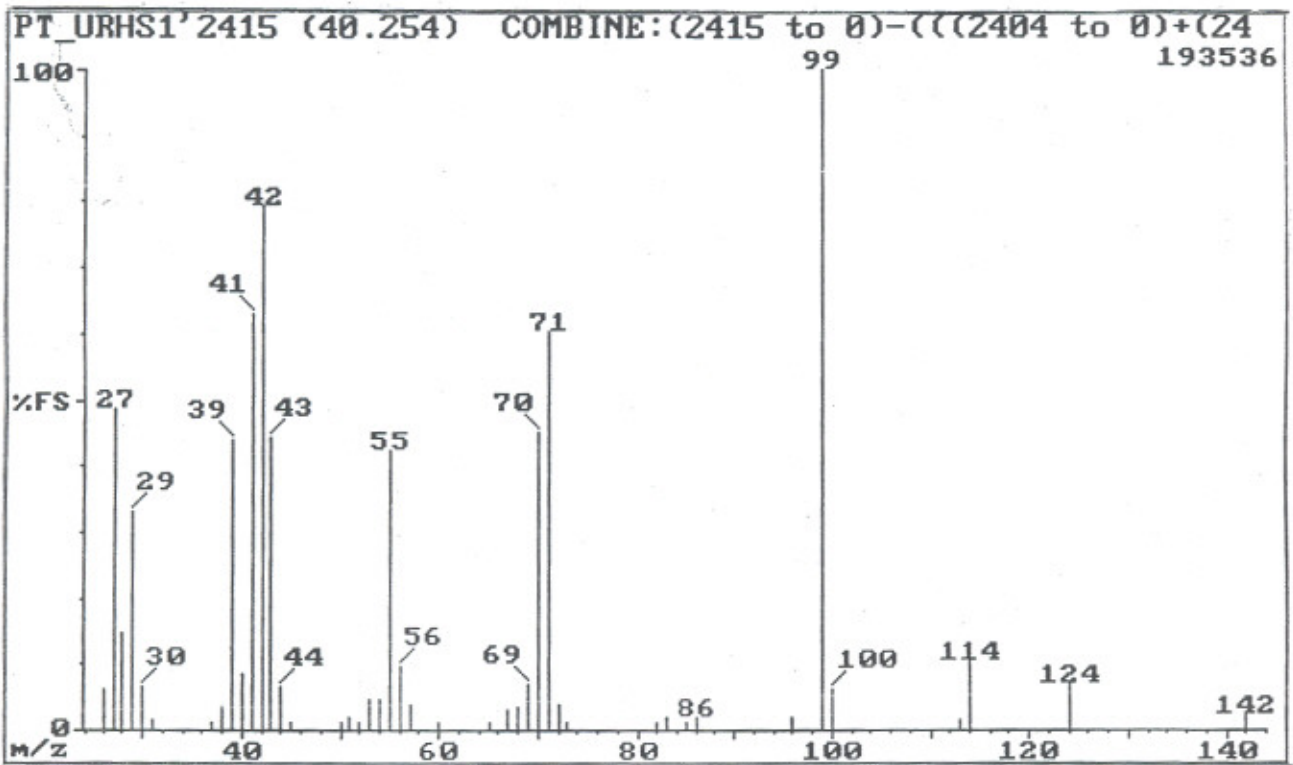


Fig. 2.78: EI-massaspektrum van Komponent B2415 [oktan-5-olied].

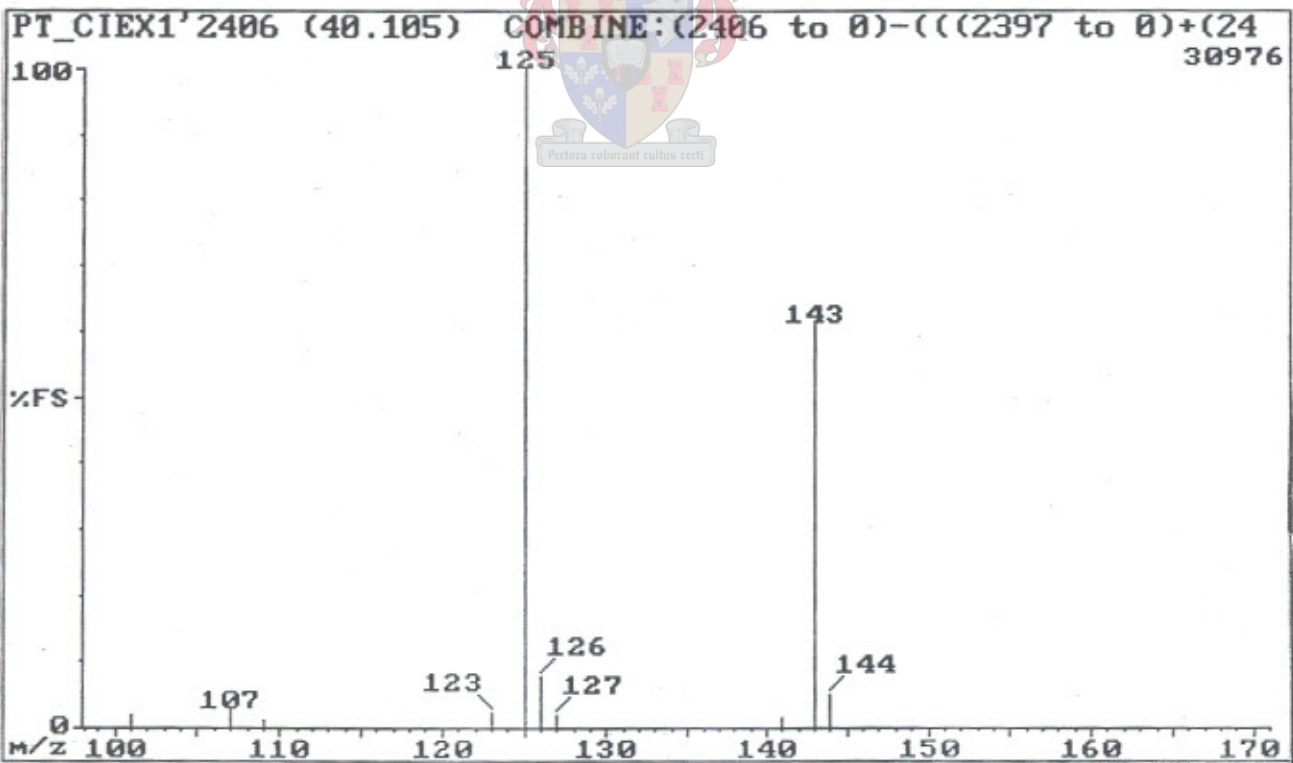


Fig. 2.79: CI-massaspektrum van Komponent CE2406 [oktan-5-olied].



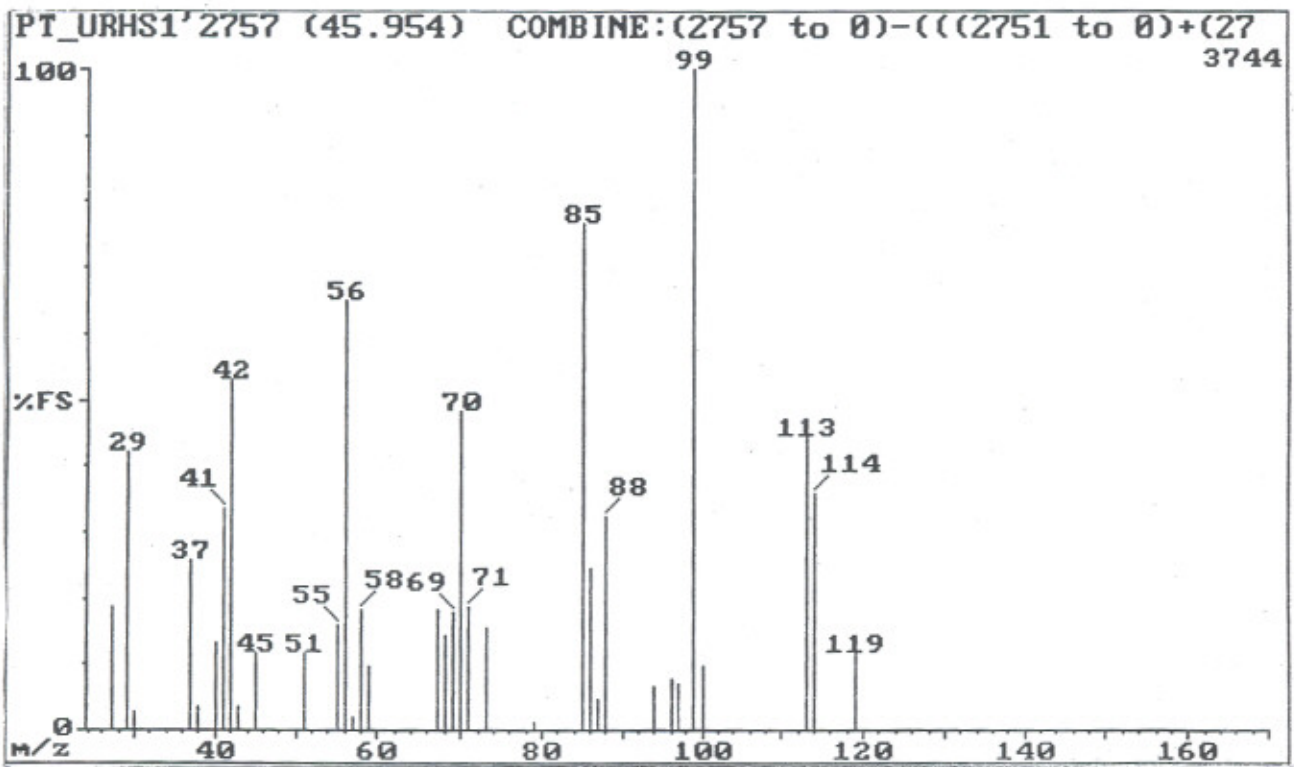


Fig. 2.80: EI-massaspektrum van Komponent B2757 [nonan-5-olied].

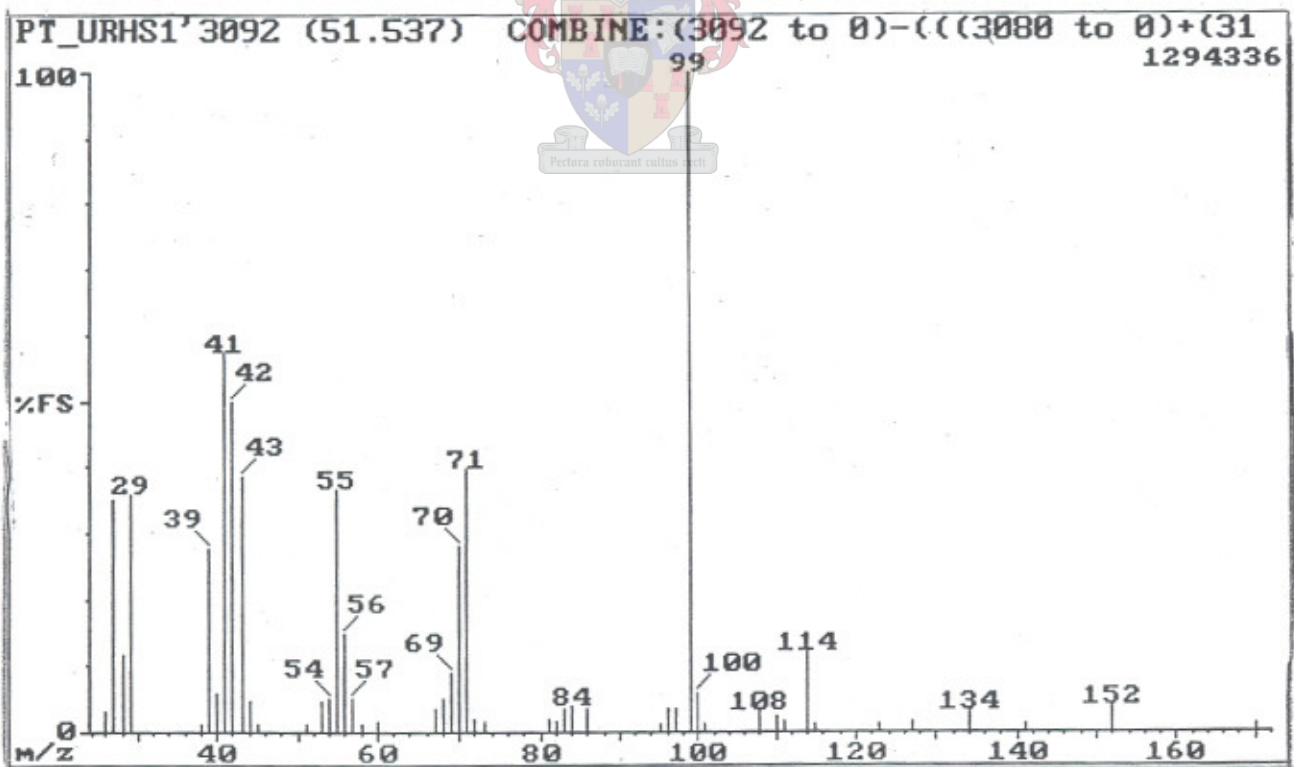


Fig. 2.81: EI-massaspektrum van Komponent B3092 [dekan-5-olied].

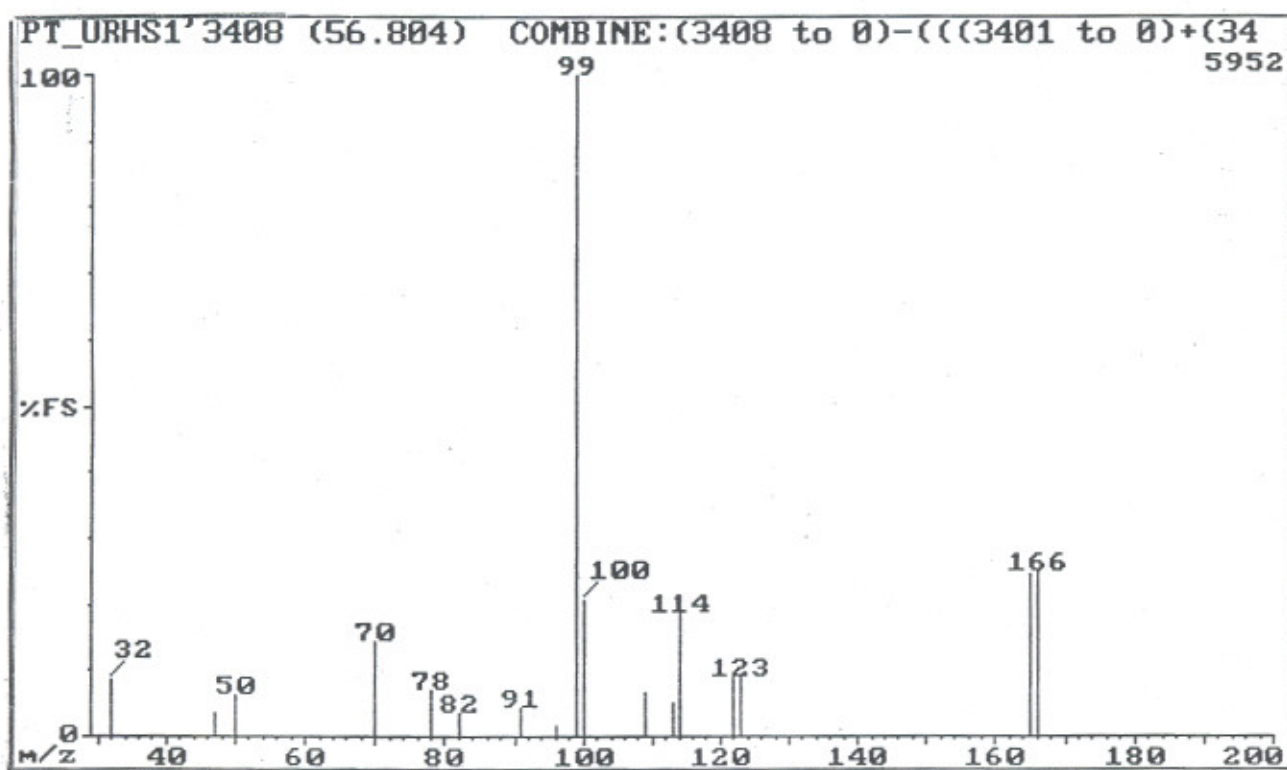


Fig. 2.82: EI-massaspektrum van Komponent B3408 [undekan-5-olied].

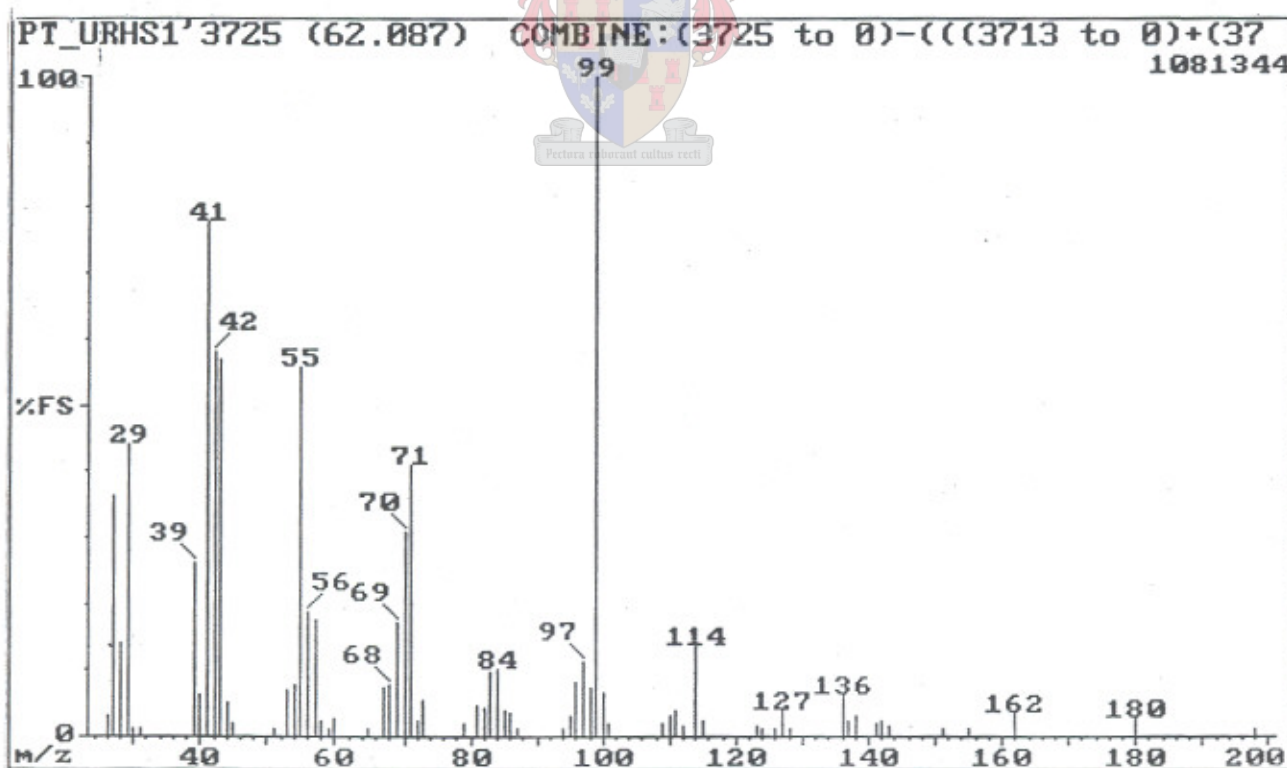


Fig. 2.83: EI-massaspektrum van Komponent B3725 [dodekan-5-olied].

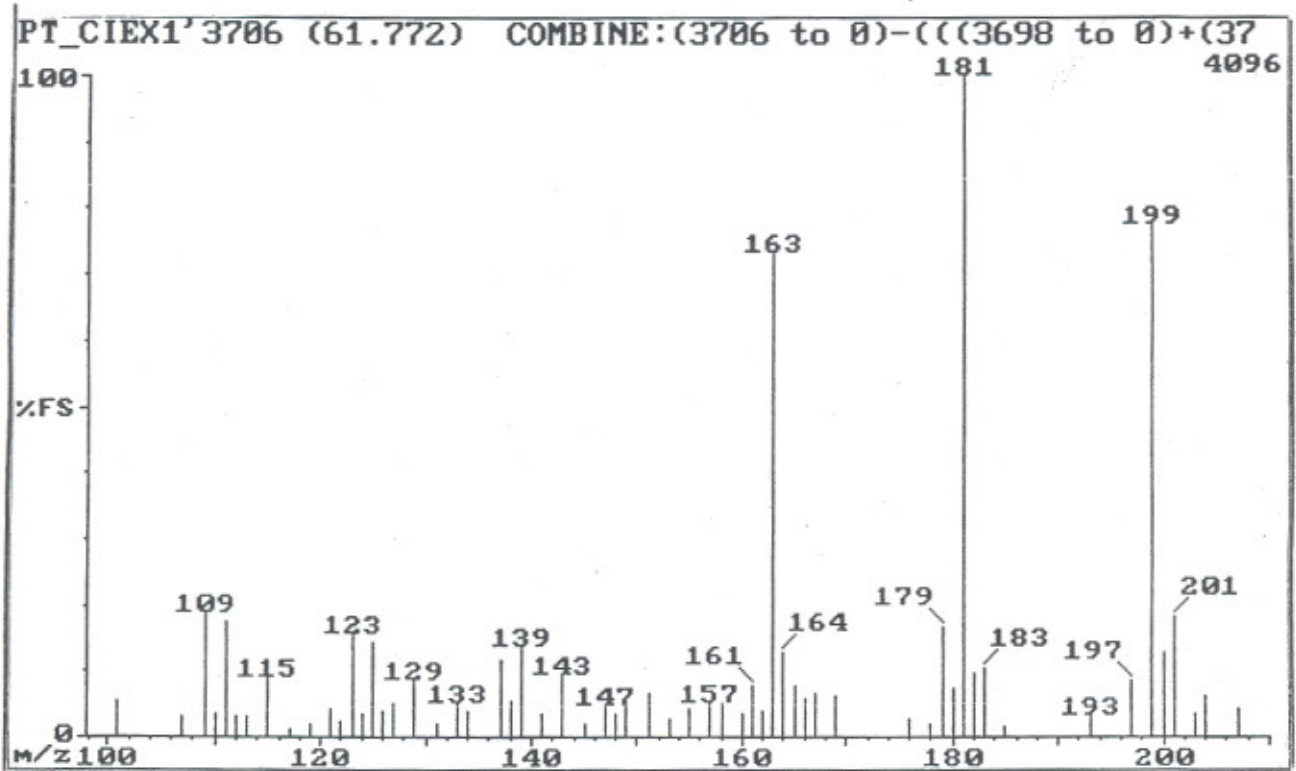


Fig. 2.84: EI-massaspektrum van Komponent CE3706 [dodekan-5-olied].

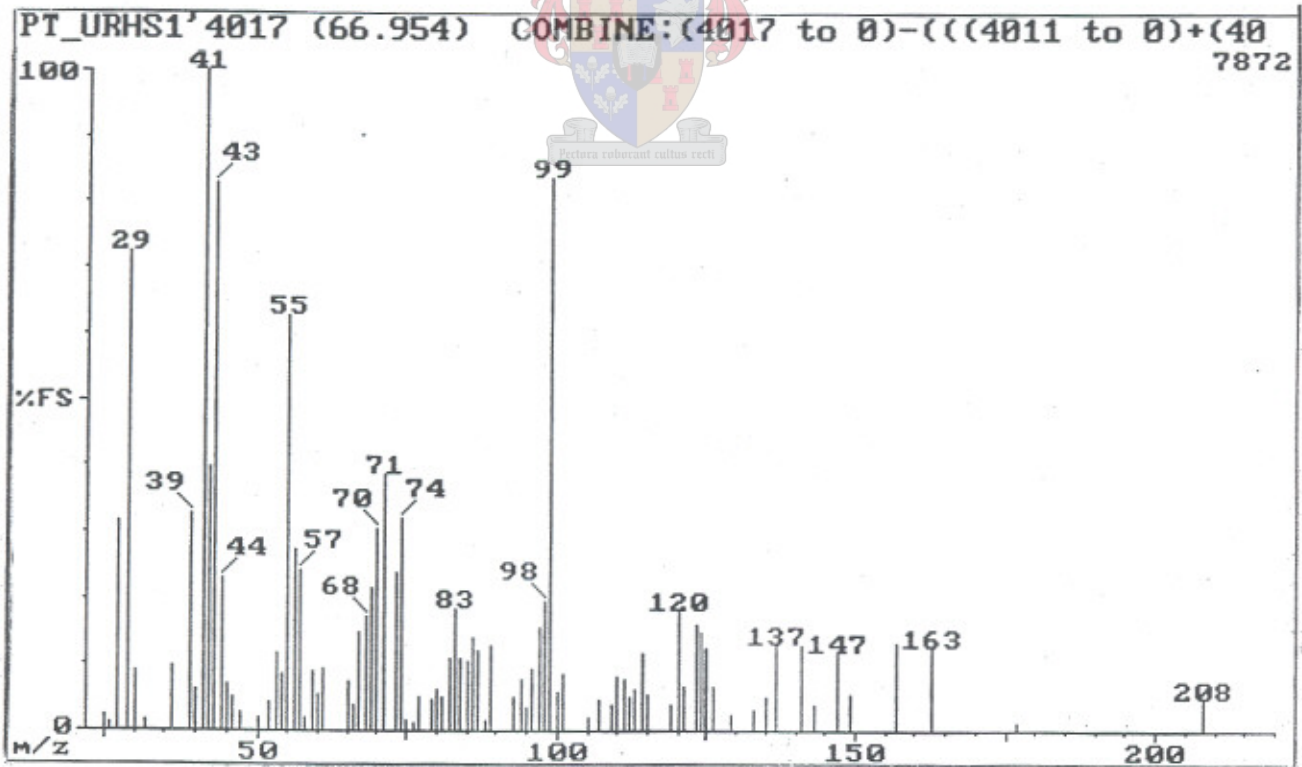


Fig. 2.85: EI-massaspektrum van Komponent B4107 [tridekan-5-olied].



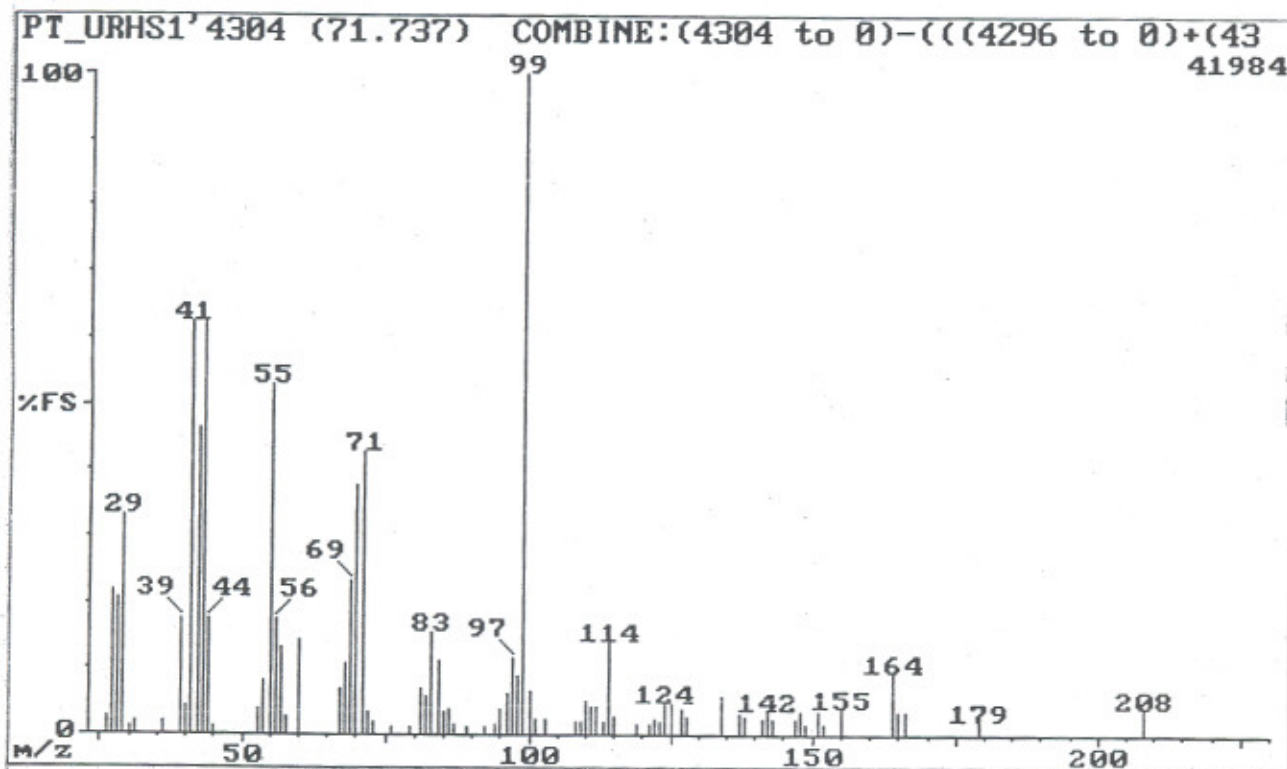


Fig. 2.86: EI-massaspektrum van Komponent B4304 [tetradekan-5-olied].

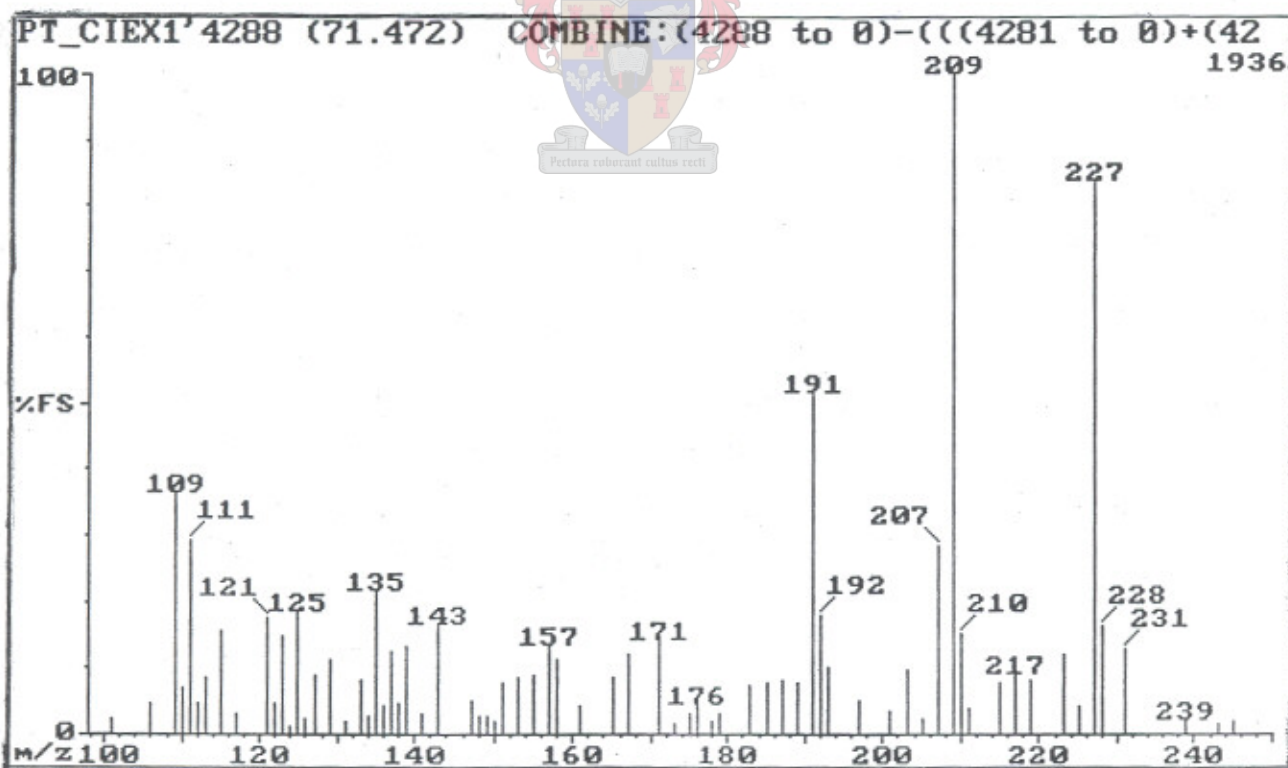


Fig. 2.87: CI-massaspektrum van Komponent CE4288 [tetradekan-5-olied].

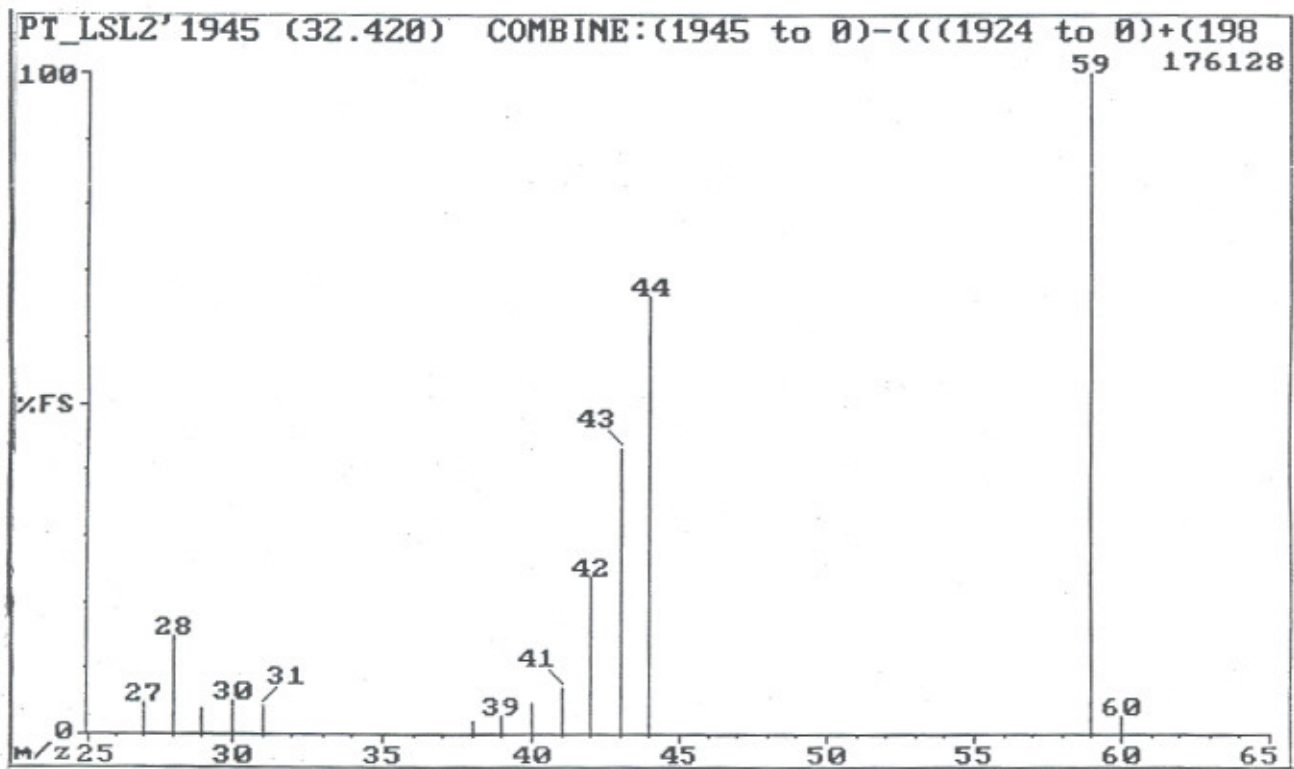


Fig. 2.88: EI-massaspektrum van Komponent L1945 [asetamied].

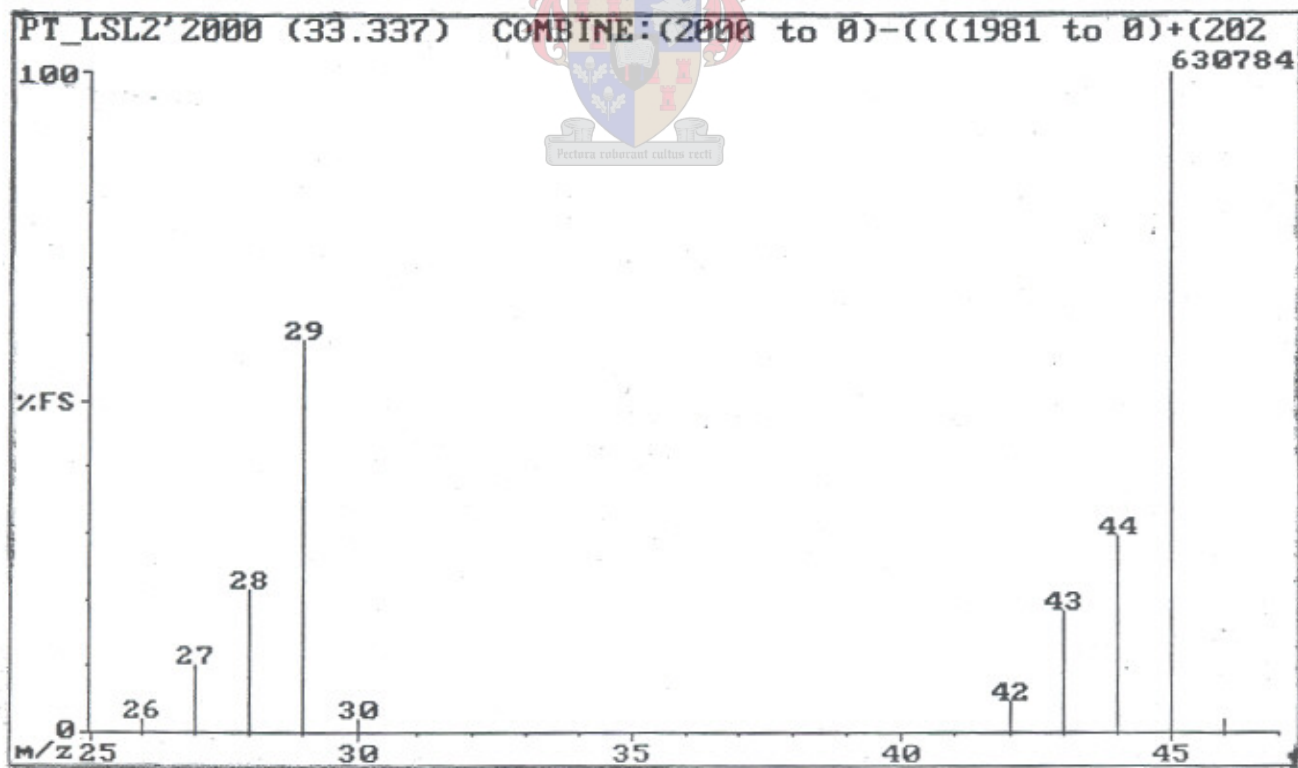


Fig. 2.89: EI-massaspektrum van Komponent L2000 [formamied].

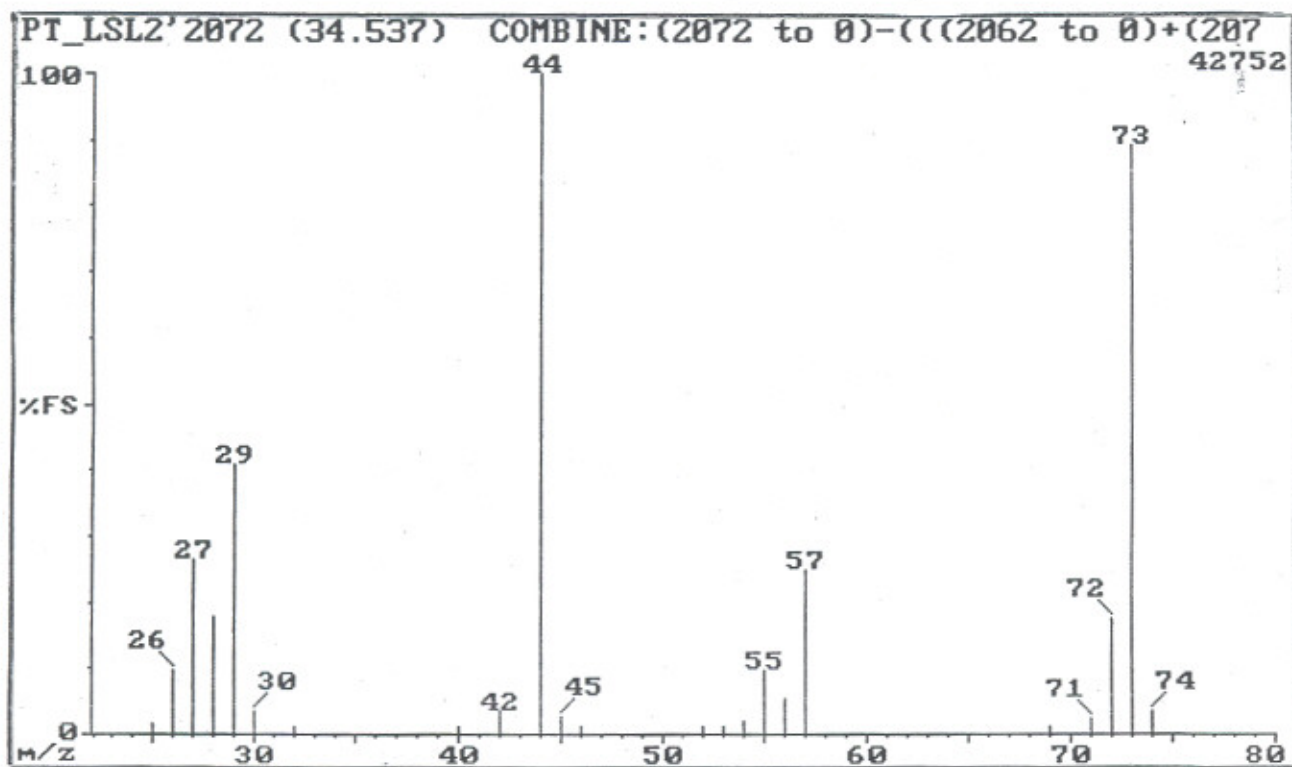


Fig. 2.90: EI-massaspektrum van Komponent L2072 [propionamied].

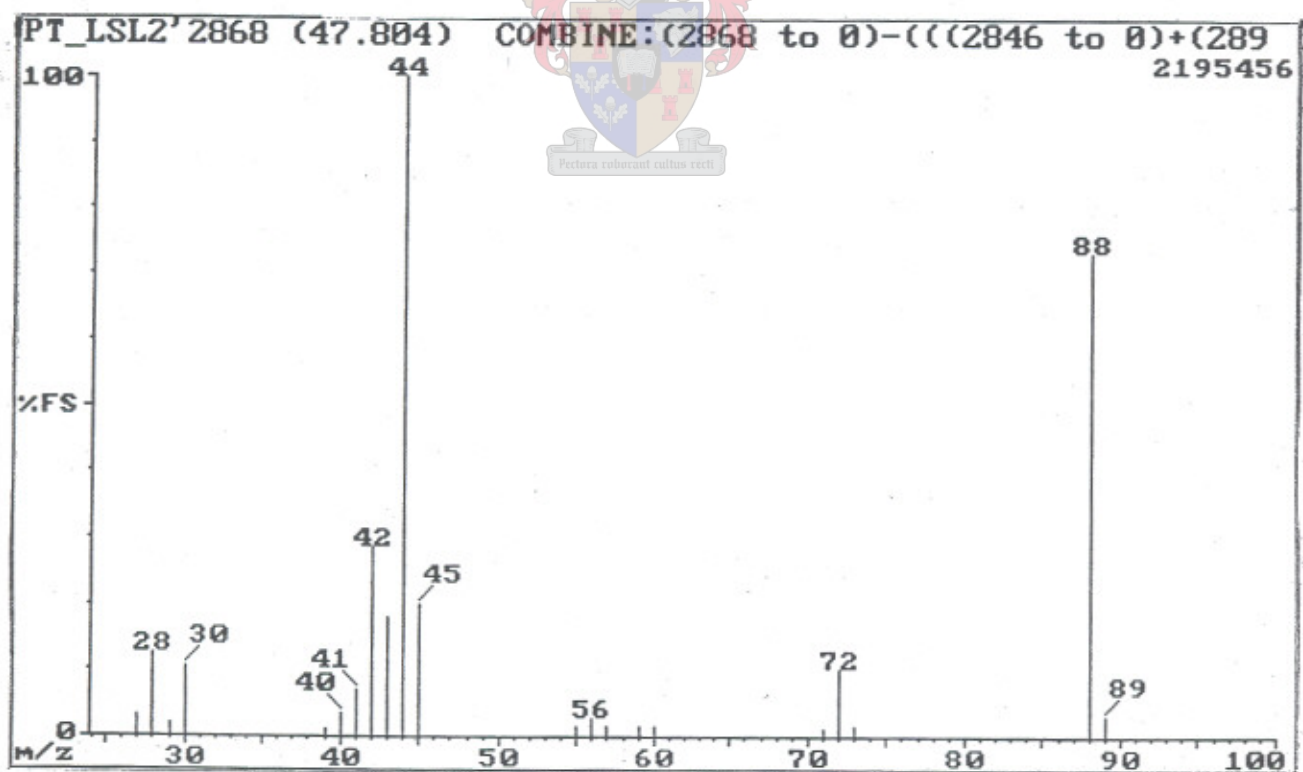


Fig. 2.91: EI-massaspektrum van Komponent L2868 [1,1-dimetiellureum].

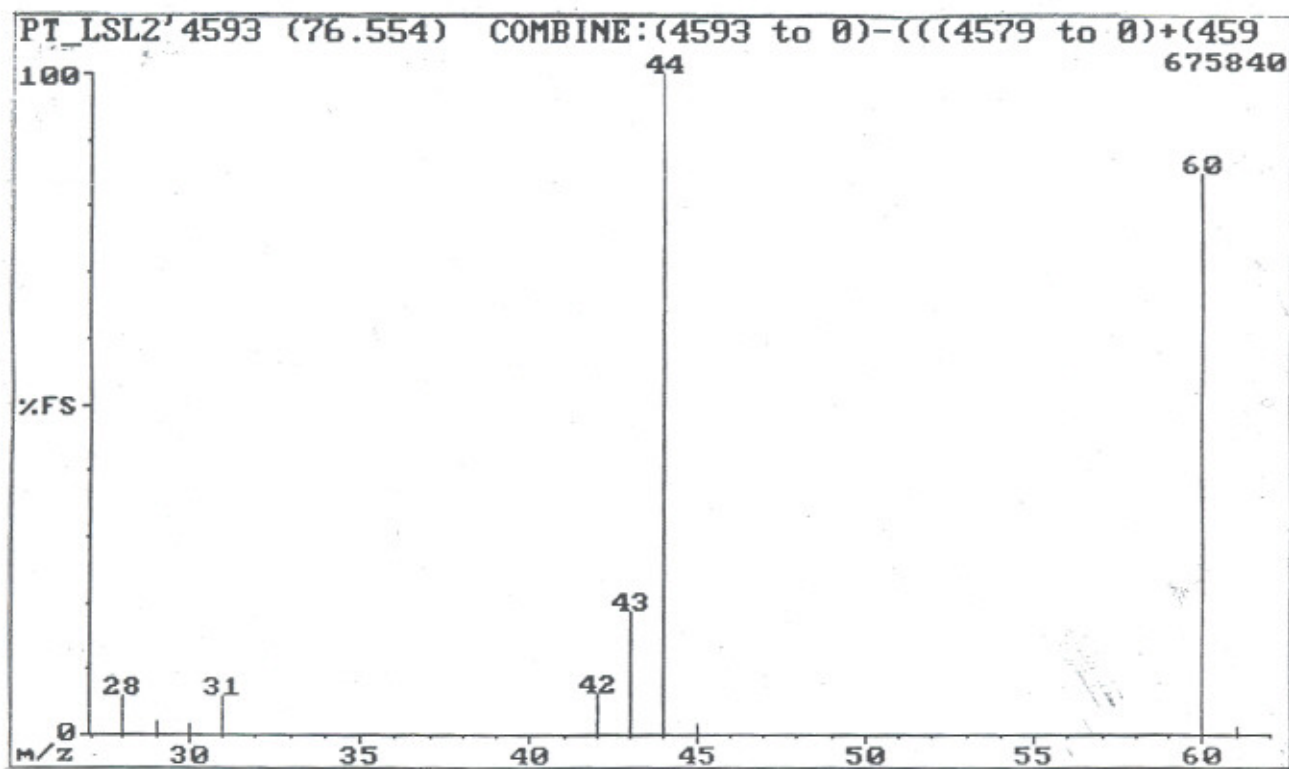


Fig. 2.92: EI-massaspektrum van Komponent L4593 [ureum].

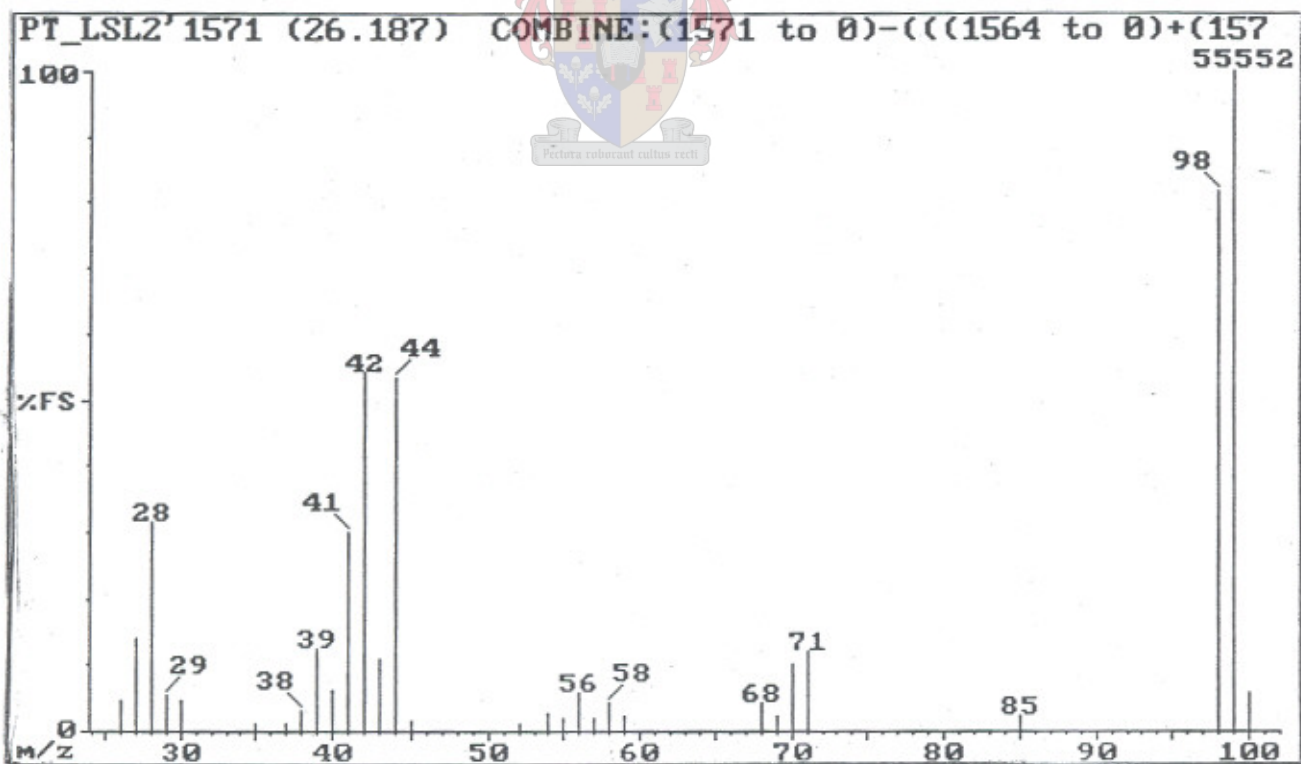


Fig. 2.93: EI-massaspektrum van Komponent L1571 [1-metiel-2-pirrolidinoon].



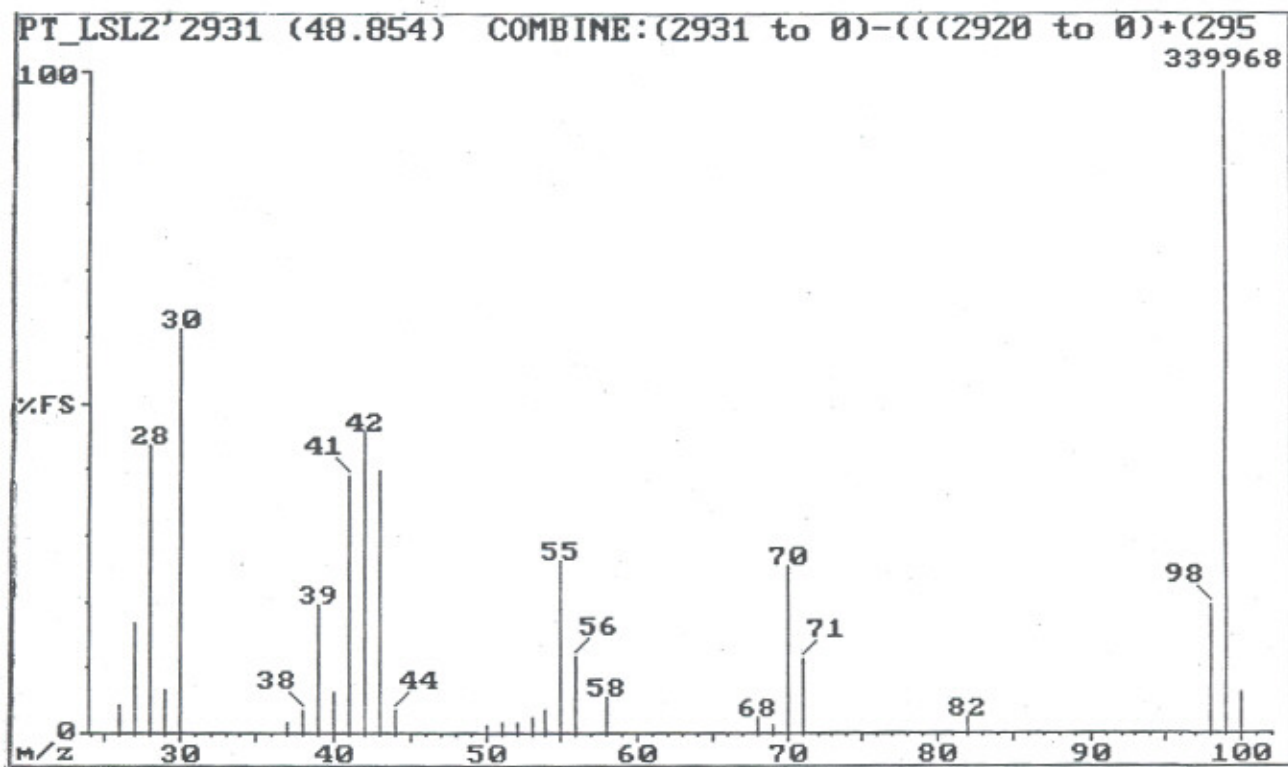


Fig. 2.94: EI-masspektrum van Komponent L2931 [2-piperidinoon].

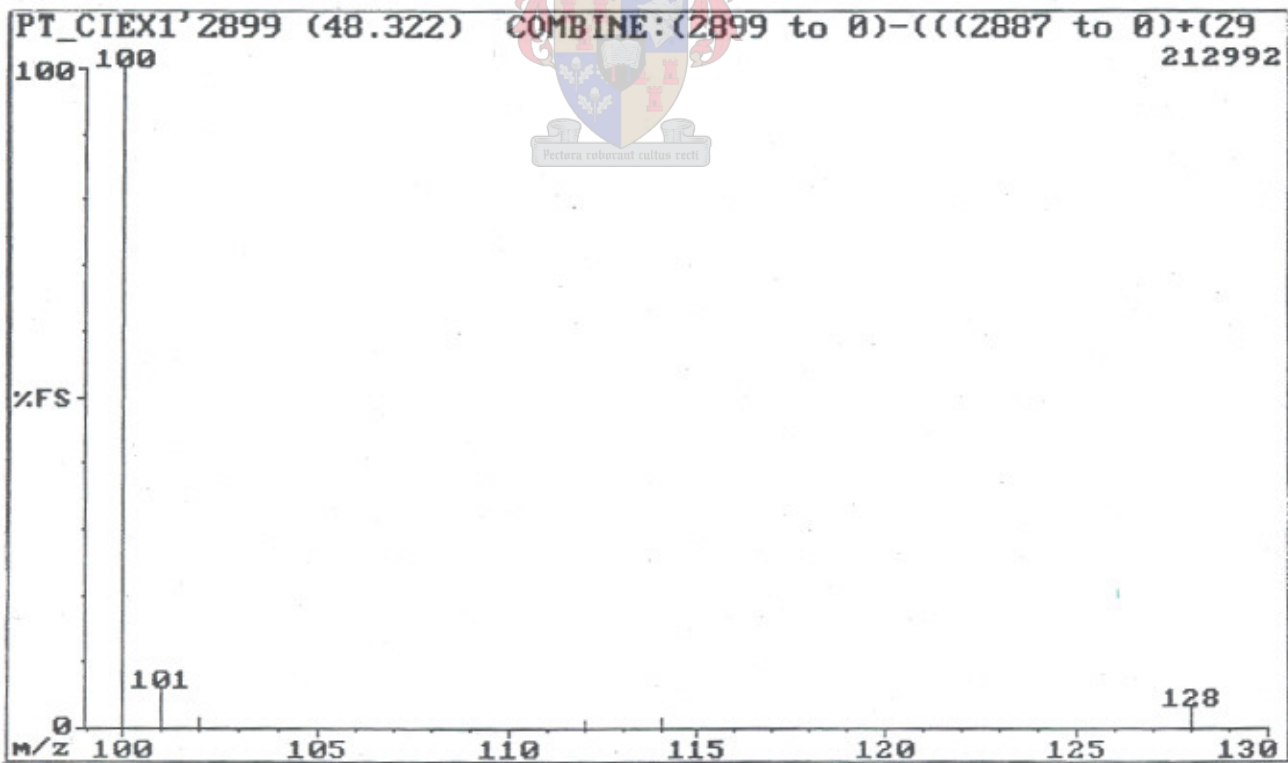


Fig. 2.95: CI-masspektrum van Komponent CE2899 [2-piperidinoon].

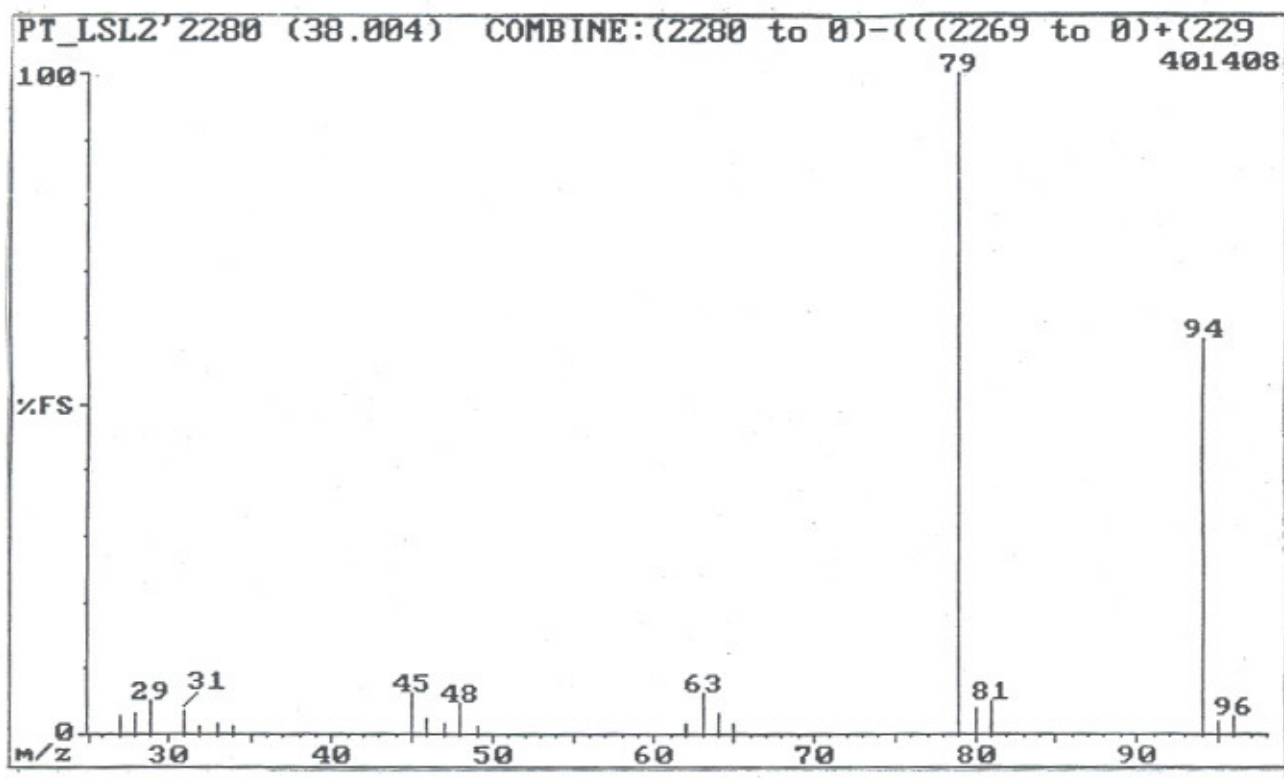


Fig. 2.96: EI-massaspektrum van Komponent L2280 [dimetielsulfoon].

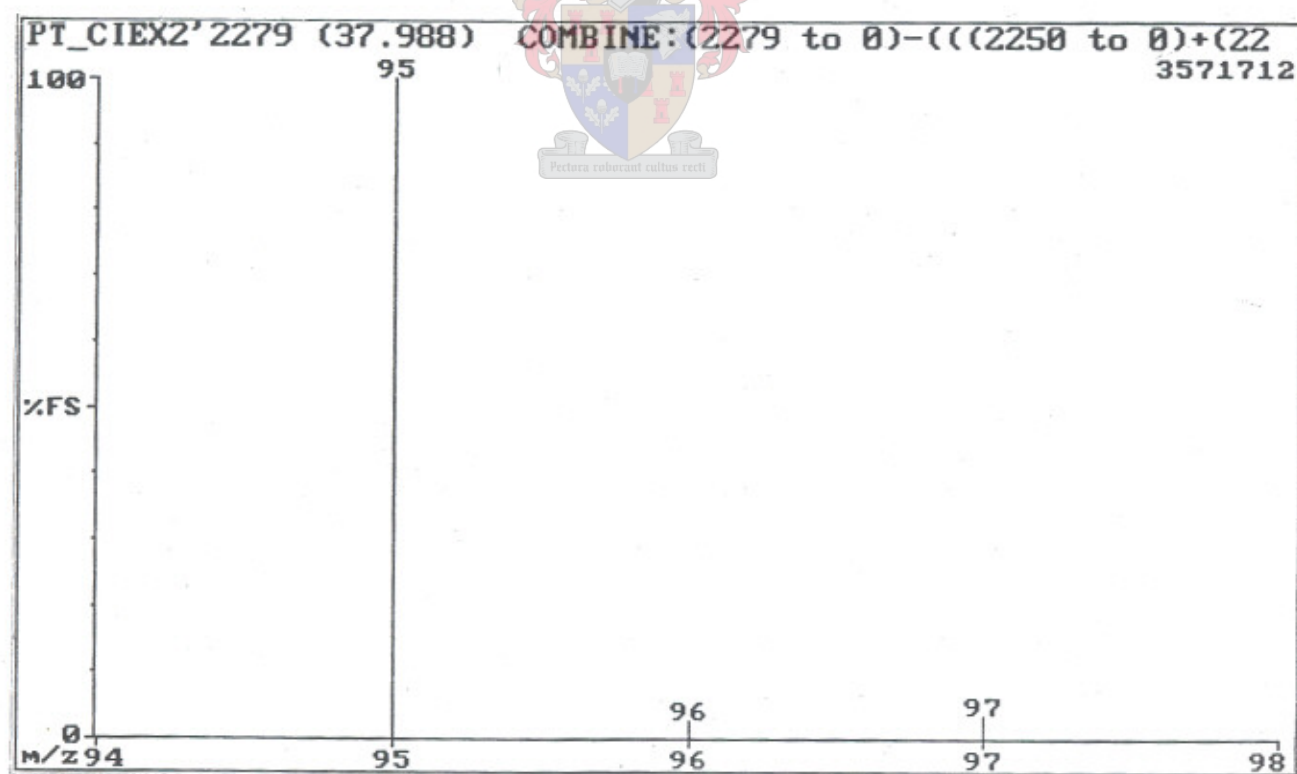


Fig. 2.97: CI-massaspektrum van Komponent CE2279 [dimetielsulfoon].



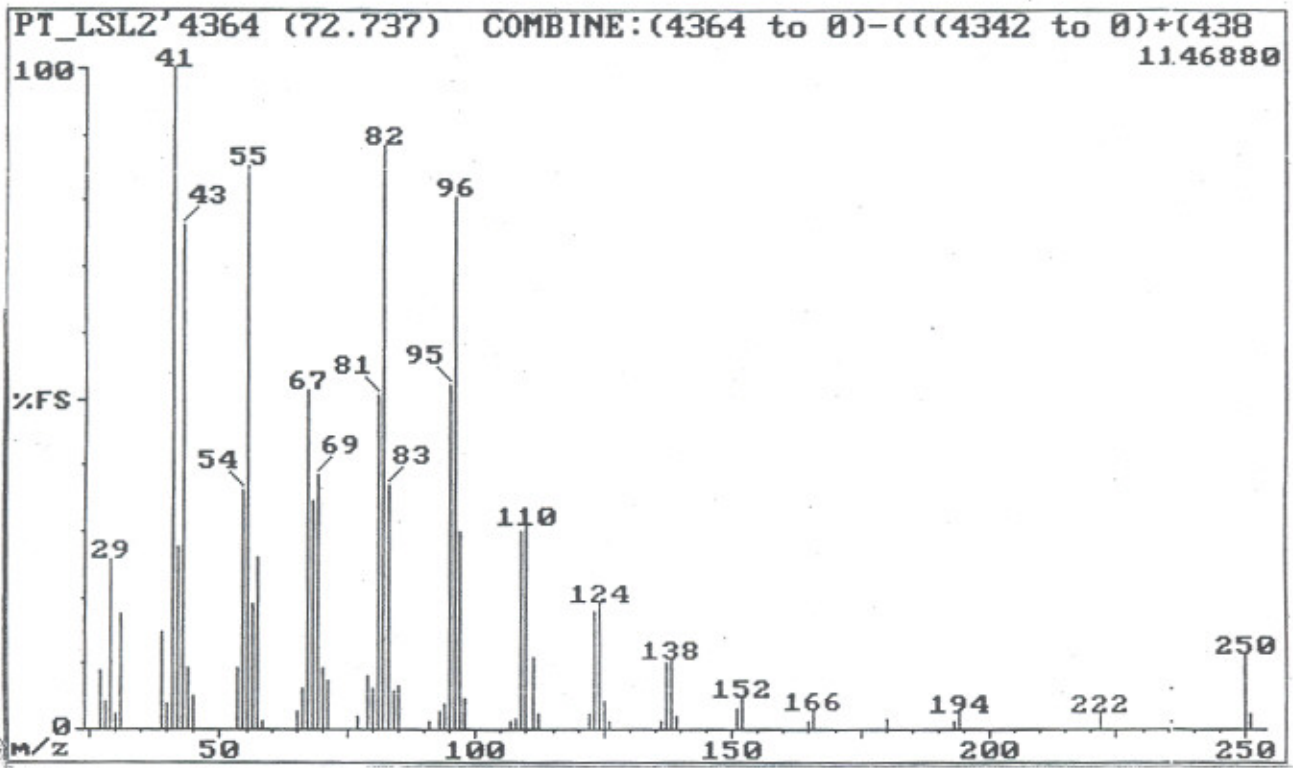


Fig. 2.98: EI-massaspektrum van Komponent L4364 [9-oktadeken-1-ol].

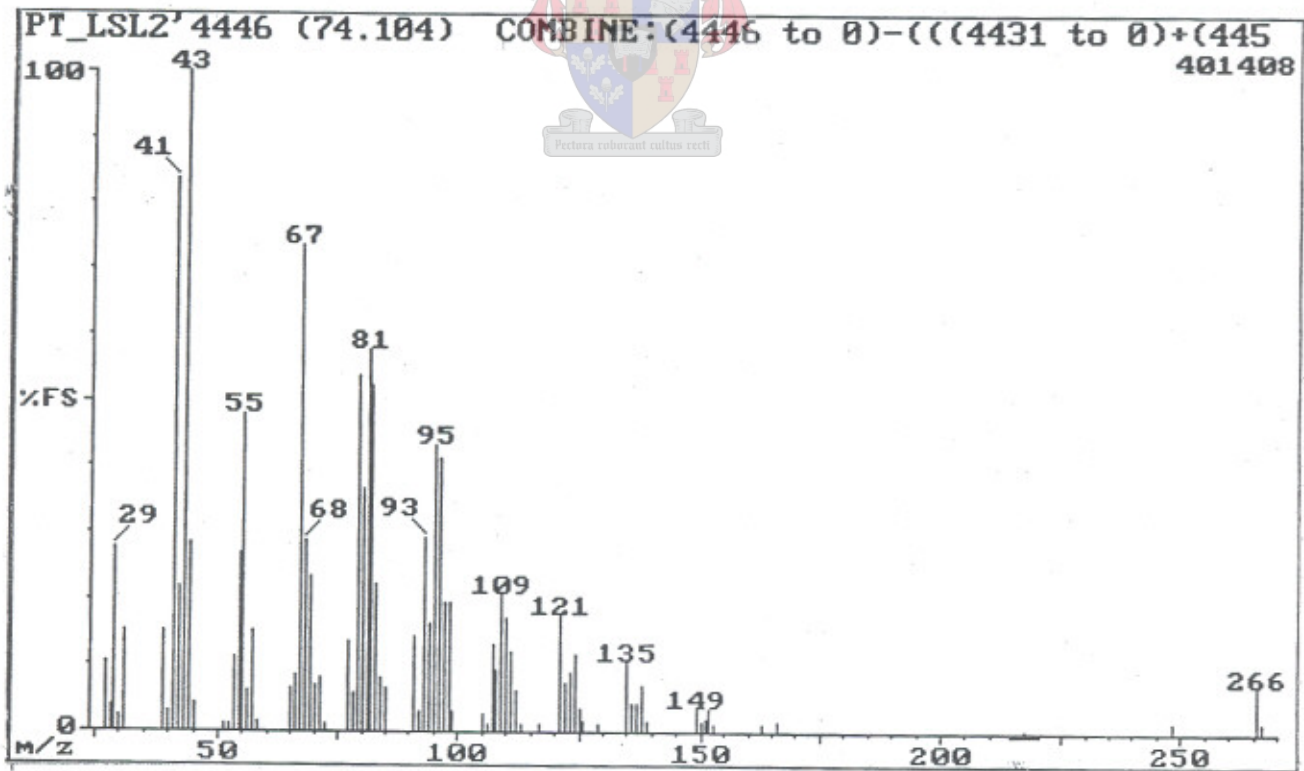


Fig. 2.99: EI-massaspektrum van Komponent L4446 [9,12-oktadekadien-1-ol].

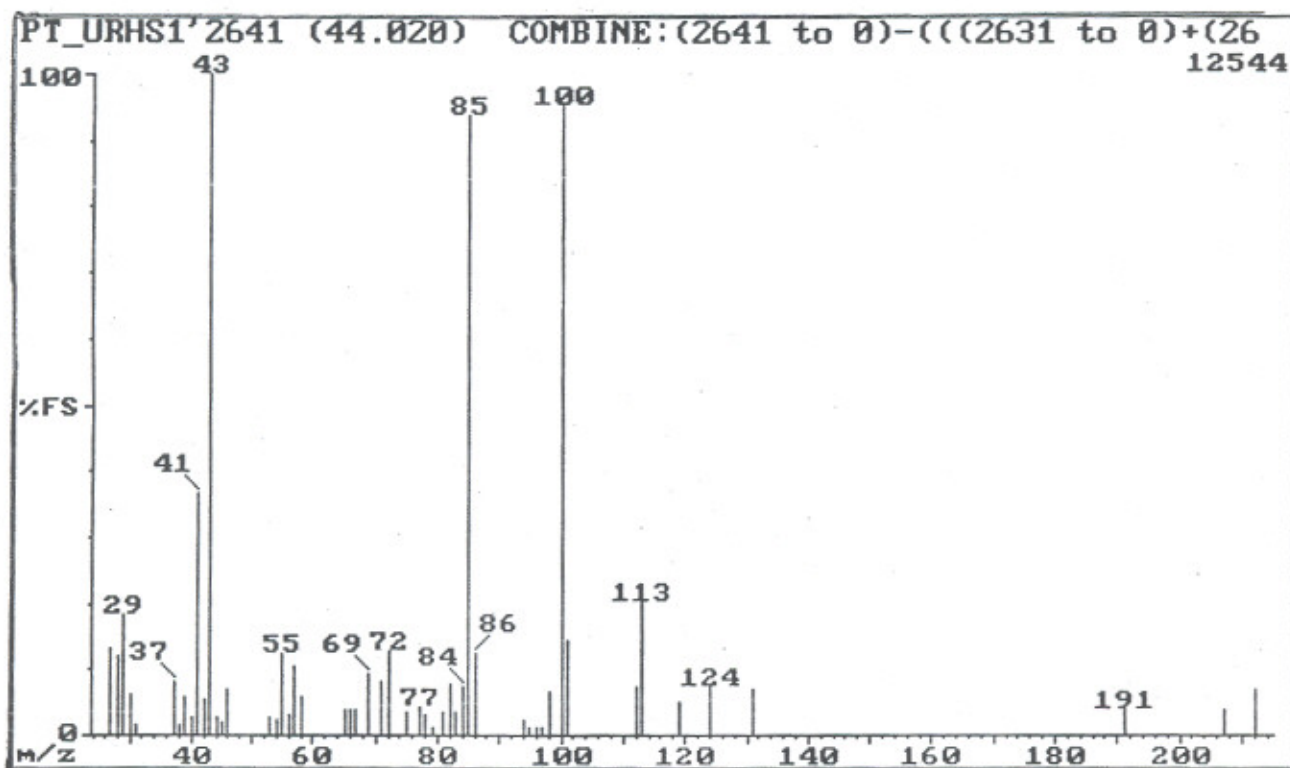


Fig. 2.100: EI-massaspektrum van Komponent B2641 [2,4-tridekadien].

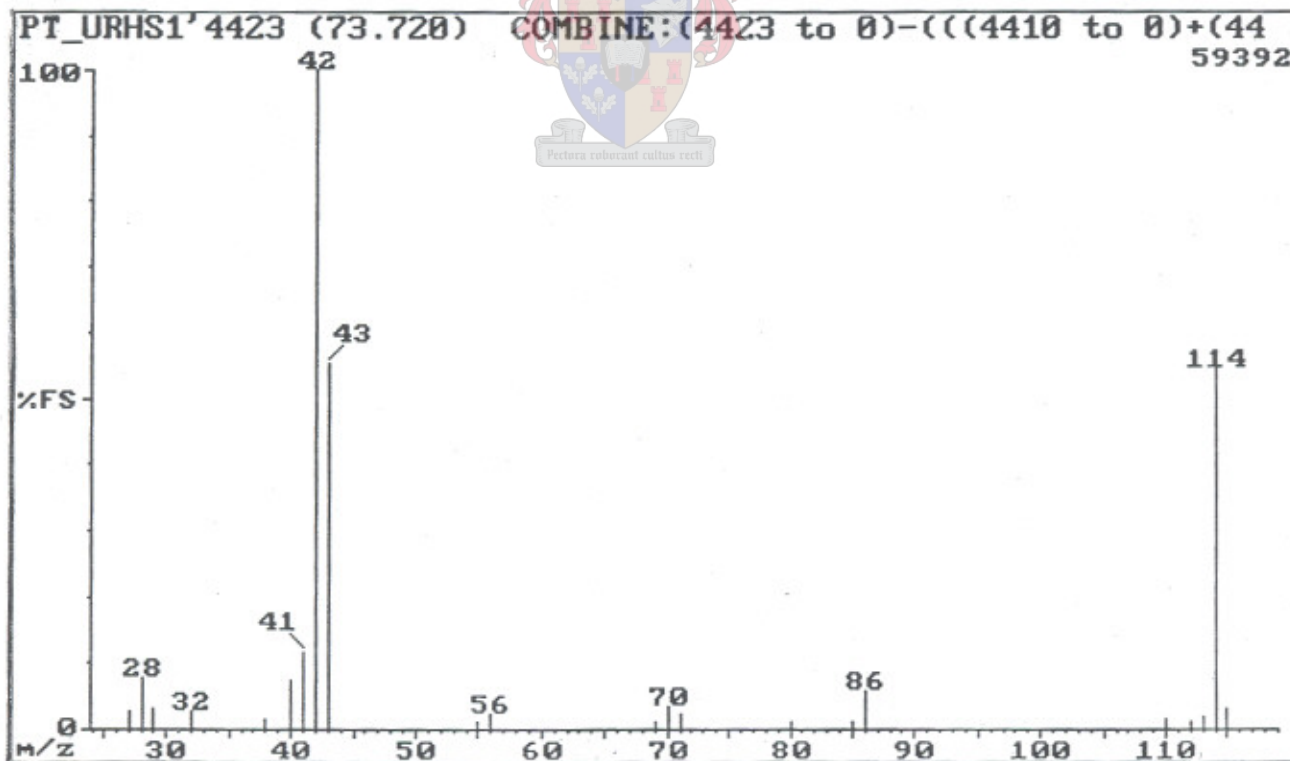


Fig. 2.101: EI-massaspektrum van Komponent B4423 [1-metiel-imidasolidien-2,4-dioon].

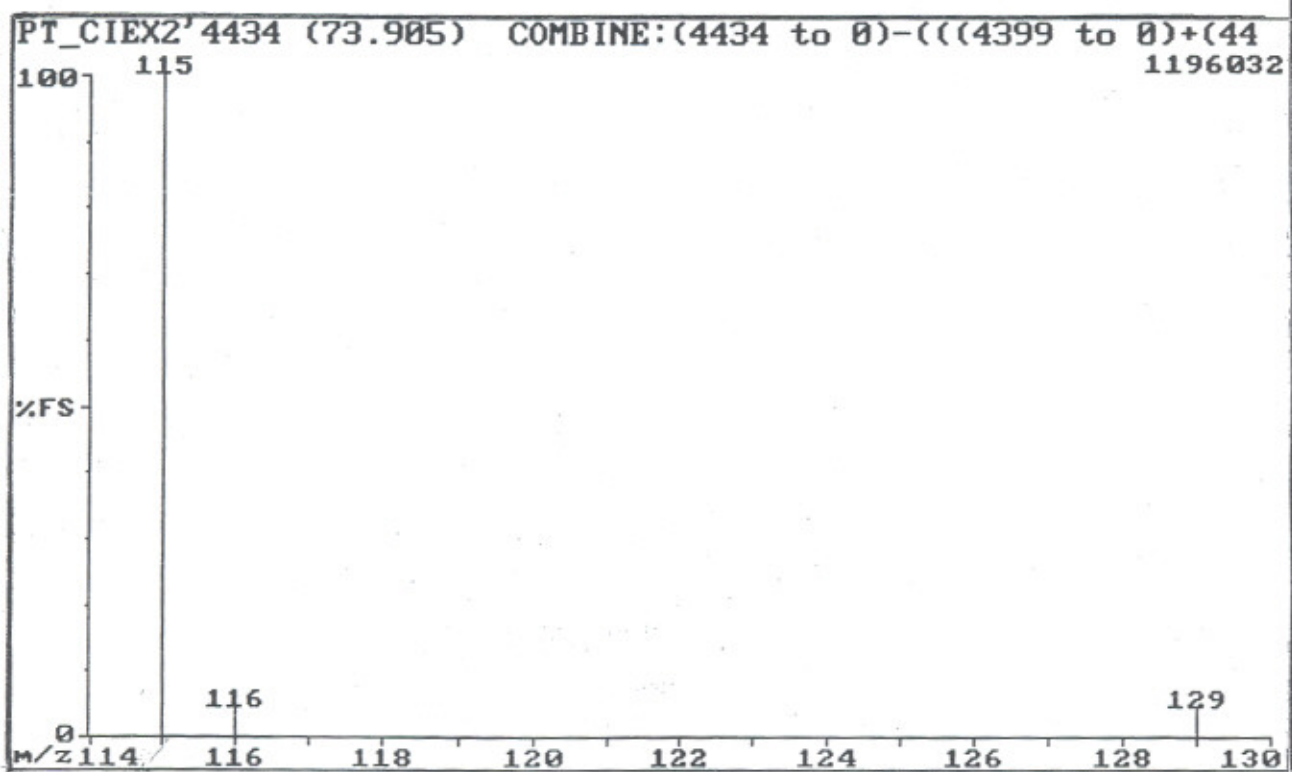


Fig. 2.102: CI-massaspektrum van Komponent CE4434 [1-metiel-imidasolidien-2,4-dioon].

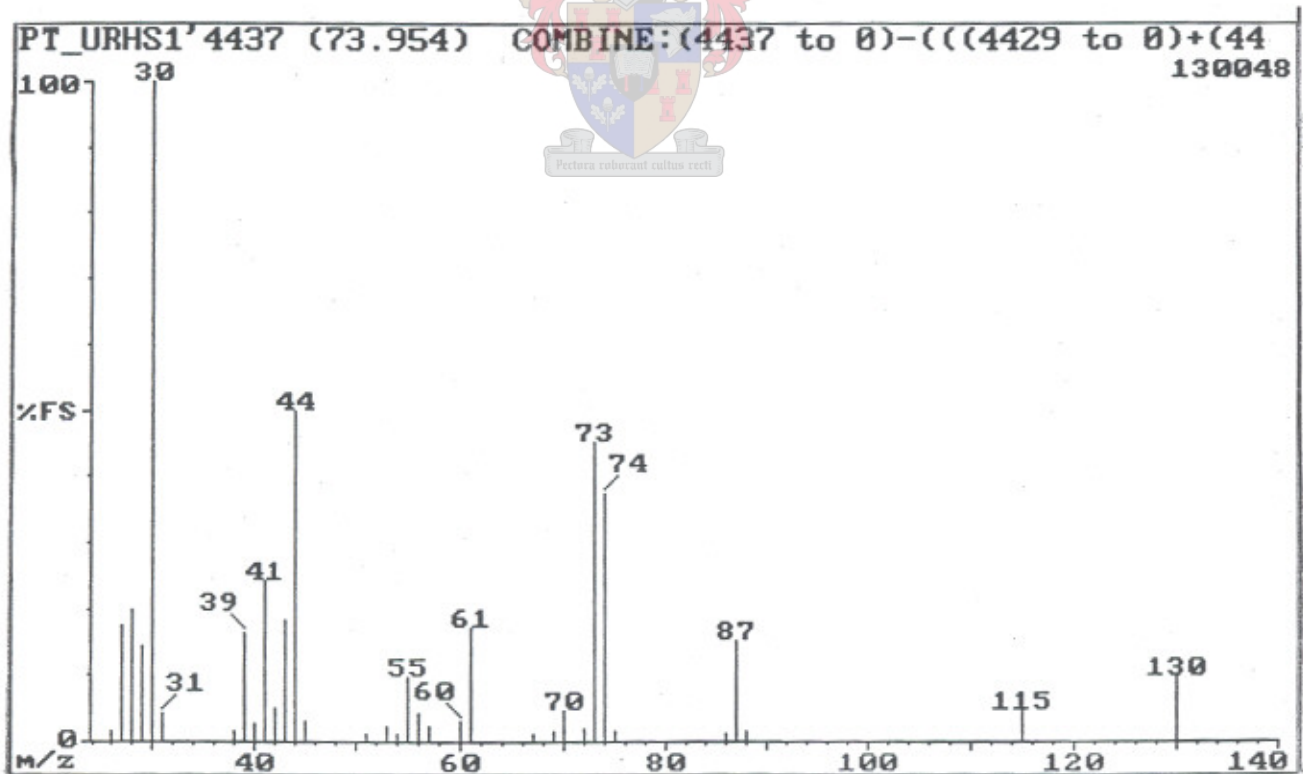


Fig. 2.103: EI-massaspektrum van Komponent B4437 [pentielureum].

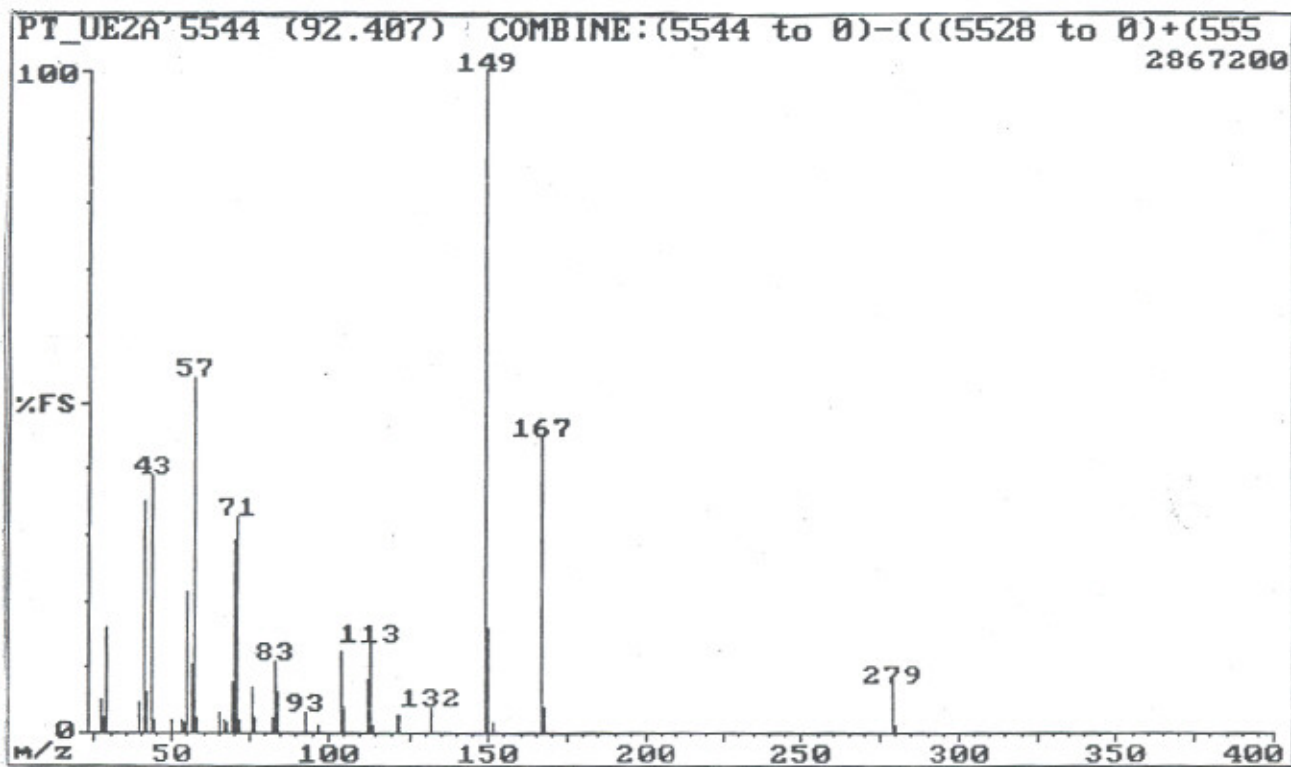


Fig. 2.104: EI-massaspektrum van Komponent E5544 [*n*-oktielftalaat].

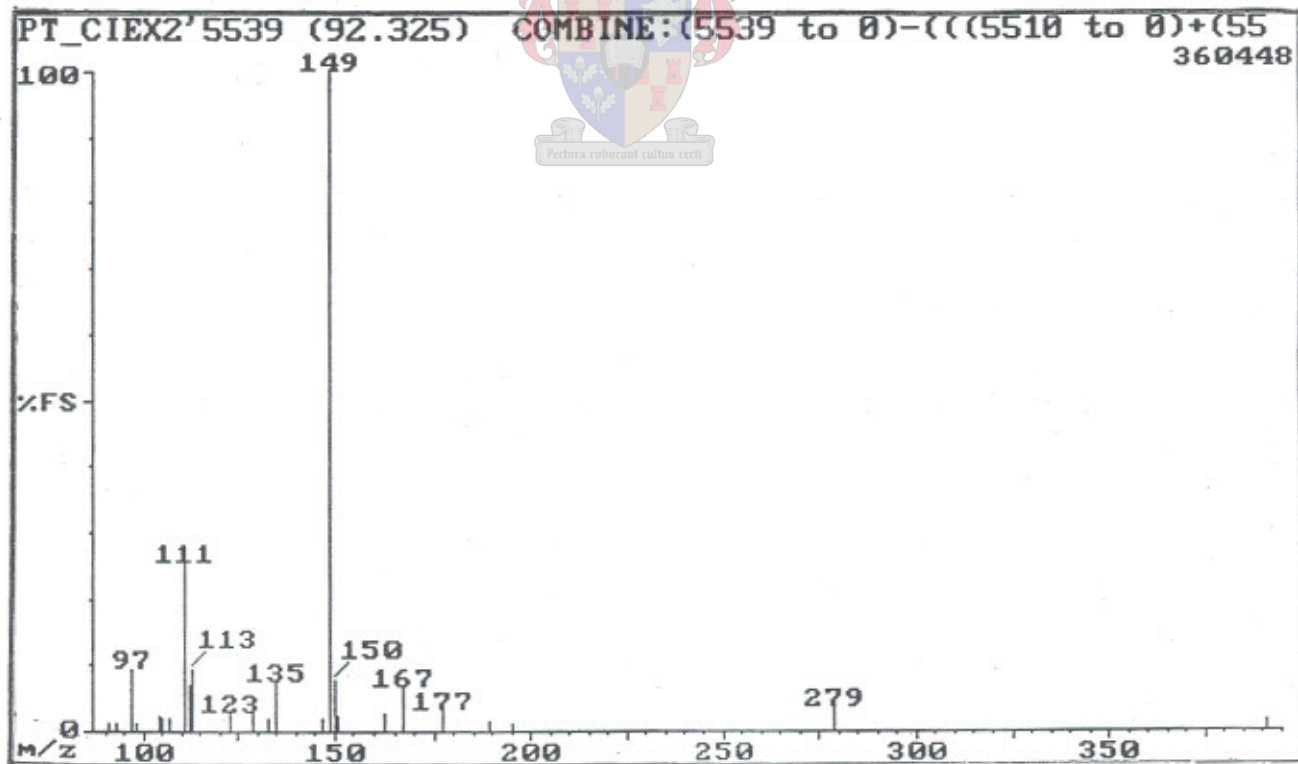


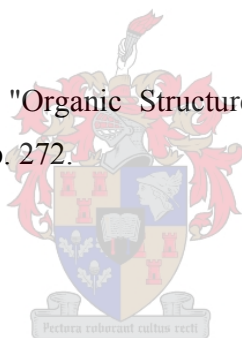
Fig. 2.105: CI-massaspektrum van Komponent CE5525 [*n*-oktielftalaat].

## Verwysings: Hoofstuk 2

1. M. Poddar-Sarkar, R.L. Brahmachary en J. Dutta, "Scent Marking in the Tiger", *Adv. Biosci.* **93**:339-344(1994).
2. M. Biedermann, K. Fiselier en K. Grob, "Injector-internal thermal desorption from edible oils. Part 1: Visual experiments on sample desorption on the liner wall", *J. Sep. Sci.* **28**:1550-1557(2005).
3. M.E. Rose en R.A.W. Johnstone, "Mass spectrometry for chemists and biochemists", Cambridge University Press, Londen, 1982, pp. 203-204.
4. F.W. McLafferty en F. Turecek, "Interpretation of Mass Spectra", 4<sup>de</sup> Uitgawe, University Science Books, California, 1993, p. 226.
5. Gerekenariseerde NBS Biblioteek.
6. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc., San Francisco, 1967, p. 134.
7. Verwysing 4, p. 250.
8. Verwysing 4, p. 251.
9. J.R. Dias, Y.M. Sheikh en C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **94**:473(1972).
10. R.M. Silverstein, G.C. Bassler en T.C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991, p. 24.
11. Verwysing 6, p. 96.



12. Verwysing 6, p. 138.
13. M. le Roux, "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Samestelling van Eksokriene Klierafskeidings van die Bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*), Springbok (*Antidorcas marsupialis*) en Grysbok (*Raphicerus melanotis*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch, 1980, p. 62.
14. Verwysing 4, p. 247.
15. F.W. McLaffery, "Interpretation of Mass Spectra", W.A. Benjamin, Londen (1973), p. 113-116.
16. Verwysing 6, pp. 94-102.
17. D.J. Pasto en C.R. Johnson, "Organic Structure Determination", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1969, p. 272.
18. Verwysing 6, p. 99.
19. D.L. Pavia, G.M. Lampman en G.S. Kriz, "Introduction to Spectroscopy. A guide for students of organic chemistry", 3<sup>de</sup> Uitgawe, Brooks/Cole, Thomson Learning, Londen, 2001, p. 417.
20. W. Benz en K. Biemann, *J. Am. Chem. Soc.* **86**:2375(1964).
21. S. Meyerson en L.C. Leitch, *J. Am. Chem. Soc.* **86**:2555(1964).
22. C.G. Macdonald, J.S. Shannon, en G. Sugowdz, *Tetrahedron Lett.* 807(1963)
23. W.H. McFadden, D.R. Black, en J.W. Corse, *J. Phys.Chem.***67**:1517(1963).





24. Verwysing 15, p. 63.

25. Verwysing 6, p. 125.

26. T. Aczel en H.E. Lumpkin, *Anal. Chem.* **32**:1819(1960).

27. J.H. Beynon, G.R. Lester en A.E. Williams, *J. Chem. Phys.* **63**:1861(1959).

28. Verwysing 19, p. 421.

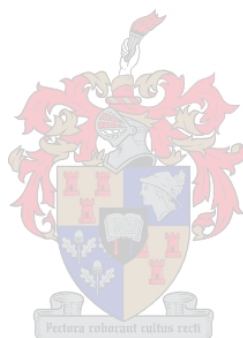
29. Verwysing 6, pp. 616-618.

30. Verwysing 6, p. 623.

31. Verwysing 6, p. 625.

32. Verwysing 6, p. 615.

33. Verwysing 1, p. 232.



34. Verwysing 6, pp. 129-131.

35. Verwysing 6, pp. 130-134.

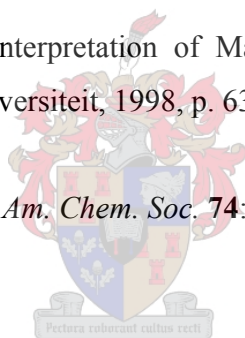
36. Verwysing 4, p. 204.

37. Verwysing 6, p. 130.

38. Verwysing 4, pp. 250 en 145-146.

39. Verwysing 6, p. 162.

40. Verwysing 6, p. 134.
41. Verwysing 6, pp. 135-138.
42. G. Stork, P. Rosen, N. Goldman, R.V. Coombs en J. Tsuji, *J. Am. Chem. Soc.* **87**:275(1965).
43. H.A. Smith, B.J.L. Huff, W.J. Powers en D. Caine, *J. Org. Chem.* **32**:2851(1967).
44. Verwysing 6, p. 163.
45. Verwysing 17, p. 280.
46. G. Holzer en W. Bertsch, "Interpretation of Mass Spectra: Course Manual", Kurses aangebied by Stellenbosch Universiteit, 1998, p. 63.
47. G.P. Happ en D.W. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **74**:4404(1952).
48. Verwysing 6, p. 214.
49. A. Maccoll, *Org. Mass. Spectrom.* **23**:381(1988).
50. G. Spiteller, "Interpretation of Mass Spectra Obtained from Natural Sources, Especially those of Aliphatic Compounds", Kurses aangebied by Stellenbosch Universiteit, 1994, p. 24.
51. Verwysing 6, pp. 215 en 179-180.
52. A.I. Vogel, "A Text-Book of Practical Organic Chemistry", Derde Uitgawe, Longmans, Green and Co. Ltd., Londen, Eksp. III, 154, pp. 485-486 (1956).



53. Verwysing 15, p. 142.

54. Verwysing 19, pp. 428-430.

55. Verwysing 10, p. 27-28.

56. Verwysing 6, pp. 184-186.

57. Verwysing 19, p. 430.

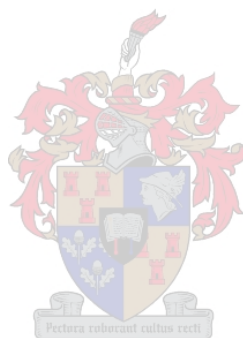
58. Verwysing 4, p. 254.

59. Verwysing 6, pp. 205-206.

60. Verwysing 4, p. 261.

61. Verwysing 4, p. 261.

62. Verwysing 13, pp. 29-32.



63. B.V. Burger, A.E. Nell, H.S.C. Spies, M. le Roux, R.C. Bigalke en P.A.J. Brand, *J. Chem. Ecol.* **25**:2057(1999).

64. B.V. Burger, "Mammalian Pheromones", *Top. Curr. Chem.* **240**:231-278(2005).

65. D. Müller-Schwarze, N.J. Volkman, K.F. Zemanek, *J. Ultrastruct. Res.* **59**:223(1977).

66. Verwysing 6, p. 206.

67. W.H. McFadden, E.A. Day en M.J. Diamond, *Anal. Chem.* **37**:89-92(1965).

68. Verwysing 15, p. 33.

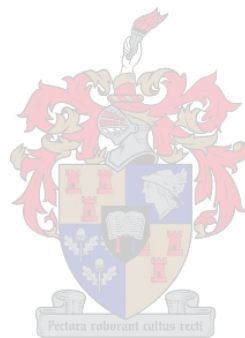
69. Verwysing 6, p. 336.

70. Verwysing 6, pp. 504-505.

71. Verwysing 6, pp. 353-355.

72. Verwysing 6, pp. 355-356.

73. Verwysing 6, pp. 134-138.



## HOOFSTUK 3

### RESULTATE EN BESPREKING

Die Tygerberg Dieretuin buite Stellenbosch het een paar Bengaalse tiere beskikbaar gestel vir die studie van die chemiese samestelling van die reukmerkvlloeistof van hierdie diere. Direkte kontak met die diere was om veiligheidsredes nie toegelaat nie en die reukmerkvlloeistof kon dus nie direk in 'n geskikte houër, soos byvoorbeeld 'n groot glasbeker, opgevang word nie. 'n Taamlike groot aluminiumplaat (Hoofstuk 4) wat die kans sou verbeter dat die vlloeistofstraal die plaat sou tref, is dus aan die buitekant van die tiere se hok vasgemaak om reukmerkmonsters te versamel (Fig. 4.3 en Fig. 4.4). Geurstowwe is aan die rugkant van die plaat aangebring om merkingsgedrag by die tier te indueer. Onder andere is dimetieldisulfied en 'n sintetiese mengsel van die verbindings wat reeds tydens 'n vroeë stadium van die huidige studie in die urine van die Bengaalse tier geïdentifiseer is, gebruik. Goeie resultate is ook behaal met die parfuim, *Elle* van *Paco Rabonne*, wat gebruik is na aanleiding van die resultate van eksperimente wat deur wetenskaplikes van die "Wildlife Conservation Society" (WCS) met diere in die Bronx Dieretuin in New York, gedoen is (kyk § 1.4.8.1). Die metode was egter nie sonder tekortkominge nie. Die onderskeie geurstowwe het wel geredelik reukmerkgedrag by die tier ontlok, maar hy het nadat hy aan die plaat geruik het, meestal die merkvlloeistof begin spuit voordat hy in 'n posisie was om die plaat vol te tref. Daar bestaan ook 'n mate van onsekerheid oor die presiese kwantitatiewe samestelling van die merkingsvlloeistof omdat die lipiedfraksie met sy hoër viskositeit moontlik nie so volledig van die oppervlakte van die plaat afgehoop het as die urine nie.

'n Sigbare lipiedlaag was nogtans aanwesig in al die monsters van die reukmerkvlloeistof wat versamel is. Daar is besluit om, benewens die chemiese karakterisering van die vlugtige organiese komponente van die reukmerkvlloeistof, ook vas te stel hoe die verskillende verbindings in die merkingsvlloeistof tussen die urine en die lipiedfraksie verdeel is, in 'n poging om bevestiging te verkry vir die hipotese dat die lipied as 'n fikseermiddel vir die semioverbindings in die urine kan dien, wat dit vir die tier moontlik sou maak om sy aanwesigheid in sy territorium vir 'n langer periode te adverteer. Daar is geargumenteer dat as daar gevind sou word dat die klein volume lipiedmengsel 'n groter hoeveelheid van die vlugtige

organiese komponente van die merkvloeistof bevat as die veel groter volume urine, dit sou beteken dat die lipiedfraksie 'n groter affiniteit vir hierdie verbindings het as die urine en die verbindings dus stadiger uit die lipiedfraksie vrygestel sal word as uit die urine, terwyl terselfdertyd in gedagte gehou moet word dat die urine natuurlik ook vinniger sal verdamp as die lipiede en dus in elk geval nie 'n besonder effektiewe langtermyn-vrystellingsmedium kan wees nie. Dit sou ook interessant wees om uit te vind of die verdeling van sekere vlugtige verbindingstipes tussen die lipiedfraksie en die urine verskil van dié van ander verbindingstipes. Om antwoorde op hierdie vrae te vind, was dit nodig om die lipiedfraksie en die urine afsonderlik te analiseer vir die aanwesige vlugtige organiese verbindings.

Die lipiedlaag is met behulp van sentrifugering van die urine geskei, waarna die lipiedfraksie aan langdurige sentrifugering onderwerp is totdat dit oorgegaan het in 'n homogene olielagie soos beskryf in Hoofstuk 4. Die vlugtige organiese komponente van die urine is met behulp van die SEP-tegniek uit die bodamp van die urine gekonsentreer en met behulp van GC-MS ondersoek, terwyl 'n DCM-ekstrak van die urine ook aan konvensionele GC-MS-analise asook aan kwantitatiewe GC-analise onderwerp is. Die vlugtige komponente van die olielaag (lipiedfraksie) is ook met behulp van GC-MS gekarakteriseer en met GC gekwantifiseer.

### **3.1 Analise van 'n DCM-Ekstrak van die Urine**

Urine bevat normaalweg klein hoeveelhede organiese verbindings met polariteite wat varieer van apolêre koolwaterstowwe tot hoogspolêre verbindings soos amiene, amiede en karboksiesure. Daar bestaan nie 'n ideale oplosmiddel waarmee hierdie verbindings in 'n paar ekstraksiesiklusse kwantitatief uit die urine geëkstraheer sou kon word nie. Omdat organiese verbindings in baie lae konsentrasies in die urine aanwesig is, en ekstrakte dus vir verdere analitiese werk gekonsentreer sou moes word, het die moontlikheid bestaan dat onsuiverhede in die oplosmiddel(s) wat vir ekstraksie gebruik word, ook gekonsentreer sou word en verkeerdelik as komponente van die urine geïdentifiseer sou kon word. Kommersieel beskikbare oplosmiddels wat vir insekdoder-analises gebruik word, mag wel duur wees, maar is die beste kwaliteit om vir ekstraksies te gebruik. DCM is 'n redelike polêre oplosmiddel met 'n lae kookpunt wat in 'n baie hoë suiwerheid vir semiochemiese analise beskikbaar is. Hierdie oplosmiddel is gebruik om die vlugtige organiese komponente uit die Bengaalse tier se urine te



ekstraheer. DCM is egter nie 'n ideale oplosmiddel vir die ekstraksie van polêre komponente nie,<sup>1</sup> en selfs na 15 ekstraksiesiklusse was daar nog steeds organiese verbindings wat nie volledig uit die tier se urine verwyder kon word nie. Die wenslikheid van kwantitatiewe ekstraksie is opgeweeg teen die groter verlies aan die geëkstraheerde materiaal wat deur die afdamping van 'n groter volume oplosmiddel meegebring sou word, en daar is besluit om te volstaan met 15 ekstraksiesiklusse. Die gekombineerde ekstrakte is toegelaat om stadig in 'n stikstofatmosfeer by kamertemperatuur in te damp.<sup>2</sup> Die resulterende konsentraat is onderwerp aan GC-MS-analise, waarvoor die monster op die konvensionele manier in 'n Grob “split/splitless” inlaat ingespuut is.

### 3.2 Bodamp-analise van die Urine

Hoewel ekstraksie gevolg deur die indamping of konsentrasie van die ekstrakte as die perfekte monsterverrykingsmetode vir monstervoorbereiding in die geval van die bepaling van nie-vlugtige organiese analiete in 'n anorganiese substraat beskou kan word, is dit in die geval van die bepaling van vlugtige organiese analiete meestal nie ideaal nie omdat dié metode teen die vlugtiger analiete diskrimineer.

In plaas van 'n vlugtige ekstraheermiddel kan daar egter ook van 'n nie-vlugtige ekstraheermiddel gebruik gemaak word. Organiese analiete kan byvoorbeeld direk uit 'n vloeistof met behulp van 'n semi-soliede, apolêre medium (rubber) geëkstraheer (gesorbeer) en dus verryk word. Die nadeel van hierdie metode is dat massaoordrag in 'n vloeistof stadig is. Verder is die vlugtige, kort-ketting verbindings meestal ook meer polêr as die hoër analoë, sodat hierdie metode weereens teen die vlugtige analiete diskrimineer.

In teenstelling met die verryking van analiete deur sorpsie direk uit 'n vloeibare substraat, is die verryking van vlugtige organiese verbindings uit die bodamp van 'n waterige substraat besonder effektief. Die sogenaamde bodamp-analise van vlugtige organiese verbindings wat berus op die ekstraksie of verryking van vlugtige analiete uit die bodamp van vloeistowwe of selfs vastestowwe, is 'n elegante metode wat met groot sukses gebruik kan word om verbindings wat in lae konsentrasies in 'n groot verskeidenheid van monsters, van urine tot plant- en diereweefsel aanwesig is, te konsentreer en te analiseer. Metodes vir die verryking van vlugtige organiese verbindings deur van sorpsie in buise wat polimeriese absorbeermiddels of adsorbeermiddels soos geaktiveerde koolstof bevat, asook die verryking van die vlugtige

verbindinge in kapillêre buisies waarvan die binnewande met, onder andere, geaktiveerde koolstofpartikels, 'n dun laag stasionêre fase, of met 145 µm PDMS-rubber bedek is, is baie doeltreffend, maar word om verskillende redes nie algemeen gebruik nie.

Soliede-fase mikro-ekstraksie (SPME)<sup>3</sup> het oor die afgelope dekade groot populariteit verwerf vir die verryking van vlugtige organiese verbindinge in bodamp-analise, asook vir die verryking (ekstraksie) van minder vlugtige verbindinge direk uit waterige media. Alhoewel die tegniek baie effektief toegepas word in verskeie dissiplines, is dit nie baie sensitief nie en word spoorhoeveelhede vlugtige verbindinge dikwels nie waargeneem nie omdat die kwantitatiewe verhouding van die klein volume van die SPME-vesel tot die groot volume substraat waaruit die vlugtige verbindinge verryk moet word, meestal ongunstig vir effektiewe verryking is. Indien die komponente wat ondersoek word in baie lae konsentrasies in 'n waterige medium of in 'n wasagtige- of proteïenmatriks voorkom, kan die verrykingsfaktor wat deur SPME verkry word, baie laag wees.<sup>1</sup> Die tegniek word dus ook nie algemeen gebruik vir bodamp-analises van vlugtige semiochemiese verbindinge nie, maar dit kan egter met groot sukses gebruik word vir, byvoorbeeld, die monitering van die tempo waarteen vlugtige verbindinge uit 'n territoriale reukmerk vrygestel word, mits die reukmerk voldoende hoeveelhede van die vlugtige semioverbindinge vrystel.<sup>4</sup> In kwantitatiewe werk moet die tegniek ook met omsigtigheid gebruik word. Veral indien die relatiewe kwantitatiewe verhouding van die vlugtige komponente in monsters met verskillende substraatsamestellings (verskillende water- en lipiedinhoud) vergelyk moet word, is SPME nie 'n aanvaarbare kwantitatiewe tegniek nie. Baltussen *et al.*<sup>5</sup> het 'n tegniek ontwikkel om SPME se gebrek aan sensitiwiteit te oorbrug, naamlik die sogenaamde "stir bar sorptive extraction" (SBSE) tegniek. SBSE behels die verryking van vlugtige organiese verbindinge uit vloeistof- of gasmonsters deur in 'n PDMS-laag wat 'n magneetroerder bedek.<sup>4</sup> Hierdie tegniek het 'n baie groter verrykingskapasiteit as SPME. Pettersson *et al.*<sup>6</sup> het die "high-capacity sorption probe enrichment" (HCSP) metode ontwikkel waar 'n stafie se punt met 'n laag PDMS bedek word en die stafie vir monsterverryking gebruik word. Hierdie tegniek het ook 'n groter verrykingskapasiteit as SPME. Die nadeel van HCSP en SBSE is dat die gebruik van beide hierdie tegnieke komplekse en duur desorpsie- en kriofokusseringsapparaat vereis.

Die hoëkapasiteit-monsterverrykingstegniek met behulp van die SEP-tegniek<sup>7</sup> is vir die bodamp-analise van die urine van die Bengaalse tier gebruik. Die SEP is 'n glas- of metaalstafie waarvan die punt van die stafie met 'n PDMS-laag bedek is. Die SEP word aan die bodamp van

die monster wat ondersoek word, blootgestel en na 'n geskikte tydsverloop in die inlaat van die GC geplaas om die versamelde monster vir GC analise te desorbeer. Geen addisionele desorpsie- of kriofokusseringsapparaat word benodig nie. Die SEP-tegniek is 'n verrykingsmetode wat eenvoudig is, maar terselfdertyd ook veelsydig en baie sensitief is en wat ideaal geskik bevind is vir die analise van die bodamp van urinemonsters. In die navorsing op die urine van die Bengaalse tier het hierdie tegniek meer bevredigende resultate gelever as die analise van 'n ekstrak van die urine.

### **3.3 Analise van die Vlugtige Organiese Komponente van die Lipiedfraksie**

Die identifikasie en kwantifisering van die vlugtige organiese komponente van die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof was nie eenvoudig nie. Die SEP-tegniek kon nie vir hierdie doel gebruik word nie aangesien 'n bevredigende verryking van die vlugtige materiaal in die lig van die ongunstige verhouding van die relatief klein volume PDMS-rubber van die SEP tot die groter volume lipiedmateriaal, nie verwag kan word nie. Daar is pogings aangewend om die verlangde inligting te verkry deur die lipiede in DCM op te los en 'n monster van die oplossing vir GC- en GC-MS-analises te gebruik. Hierdie metode het egter baie swak TIC's gelever en kon dus nie vir hierdie doel gebruik word nie.

'n Goeie metode om 'n maksimum hoeveelheid materiaal vir gaschromatografiese analise op 'n kolom aan te bring, is egter om die materiaal in die inlaat, of selfs direk in die kolom, te plaas sonder om dit in 'n oplosmiddel op te los. So 'n metode om die vlugtige komponente van 'n swaar oliesubstraat te analiseer, is onlangs deur Grob<sup>8</sup> beskryf. Die metode berus daarop dat die mengsel van nie-vlugtige lipiede as oplosmiddel vir die vlugtige verbindings dien. In plaas daarvan dat die oplosmiddel soos in konvensionele gaschromatografiese analises deur die kolom beweeg en voor die analiete elueer, bly die swaar lipied in die inlaat van die instrument agter. Grob<sup>8</sup> het die sukses van hierdie metode gedemonstreer in analises van eetbare olies, maar hierdie metode kan ook vir enige ander materiaal gebruik word. 'n Voorbeeld hiervan is die desorpsie van insekferomone direk uit die klierweefsel deur die klier in die binnebuis van die gaschromatograaf se inlaat te plaas en tot by 'n geskikte temperatuur te verhit,<sup>9</sup> asook die desorpsie van vlugtige komponente uit die eksokriene afskeidings van groter diere.<sup>10</sup> Hierdie

metodes moet met groot omsigtigheid gebruik word omdat die gaschromatografiese kolom sulke behandeling nie lank sal oorleef as daar van die swaar olie in die kolom beland nie. Aangesien die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier se rol as fikseermiddel ondersoek is, is hierdie metode ideaal om die kwantiteite van die verbindings teenwoordig in die lipiedlaag te vergelyk met die kwantiteite van die verbindings teenwoordig in die urine. Die metode is ook baie effektief omdat daar 'n redelike groot hoeveelheid suiwer monstermateriaal vir analise toegedien kon word. 'n Sterk TIC met massaspektra wat vir verdere interpretasie gebruik kon word, is verkry.

In gevalle waar die GC-kolom vir 'n langer periode isotermies by die eindtemperatuur (280°C) van die temperatuurprogram gehou is, is van die lipiede van die lipiedfraksie ook geëluëer. Een van hierdie lipiede was skwaleen. Hierdie lipied is nie deur Poddar-Sarkar<sup>11</sup> in die lipiedfraksie gevind nie. Volgens hierdie outeur bestaan die lipiedfraksie uit cholesterolesters, wasagtige esters, trigliseried, vrye vetsure, digliseried, monogliseried, vrye sterol en fosfolipied. Hierdie komponente is deur hierdie outeur op dieselfde wyse as in vorige studies deur Brahmachary, Dutta en Poddar-Sarkar<sup>12</sup> geïdentifiseer deur van dunlaagchromatografie gebruik te maak, wat nie die beste metode vir die chemiese karakterisering van 'n komplekse mengsel soos die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof van die tier is nie. Dit sal dus van belang wees om in opvolging van die huidige ondersoek die lipiede te ondersoek deur van hoë-temperatuur kolomme in GC-MS analyses en van ESMS gebruik te maak.

### **3.4 Kwalitatiewe Samestelling van die Reukmerkvlloeistof**

Die meeste van die vlugtige organiese komponente van die urine is met behulp van die bodamp-analitiese metode hierbo beskryf, geïdentifiseer. Die TIC van 'n tipiese GC-MS analise van materiaal wat met die SEP-tegniek uit die bodamp van die urine verryk is, verskyn in Fig. T2.1a en Fig. T2.1b, en die eenduidig geïdentifiseerde verbindings word in Tabel 2.1 gelys. Die grootste meerderheid van hierdie verbindings, of dan ten minste die grootste meerderheid van die verbindingstipes wat in die tabel verteenwoordig word, is reeds in die uit- of afskeidings van talle ander soogdierspesies gevind.<sup>1</sup> Karboksielsure kom byvoorbeeld algemeen voor in soogdier uit- en afskeidings. Die urine van die Bengaalse tier bevat egter 'n besonder groot aantal karboksielsure. Die aanwesigheid van 'n aantal dimetielesters van dikarboksielsure en 'n paar

amiede is egter nog nie tevore in soogdierafskeidings in die literatuur gerapporteer nie. Verskeie ander karboksielsuur-derivate, soos byvoorbeeld verskillende tipes laktone en laktame, is ook in die urine aanwesig. Die besonder groot getal laktone in die urine is veral opvallend, hoewel sommige van hulle in baie klein hoeveelhede aanwesig is.

Die verbindings wat in die bodamp en die ekstrak van die urine en in die lipiedfraksie geïdentifiseer is, word in Tabel 2.1 saamgevat. 'n Relatief klein getal komponente van die reukmerkvlloeistof kon nie eenduidig geïdentifiseer word nie, hoofsaaklik omdat die sintetiese verbindings wat vir retensietydvergelyking nodig is, nie in die handel beskikbaar is nie, of omdat die tyd ontbreek het om hierdie verbindings betyds vir retensietydvergelyking te sintetiseer. Hierdie verbindings verskyn afsonderlik in Tabel 2.2. Slegs vyf van die komponente wat in redelik beduidende konsentrasies in die reukmerkvlloeistof aanwesig is, kon nie geïdentifiseer of selfs volgens verbindingsklas getipeer word nie.

Dit is riskant om afleidings aangaande die relatiewe affiniteit van die urine en die lipiedfraksie vir verbindings en verbindingstipes te maak op grond van 'n redelik beperkte volume analitiese data. Dit is ook moontlik dat sekere verbindings in een of meer van die analyses nie waargeneem is nie as gevolg van die lae konsentrasie waarin hulle in die betrokke substraat aanwesig was, of as gevolg van oorvleueling van klein pieke deur groot naasliggende pieke. Daar kan egter met 'n redelike mate van sekerheid afgelei word dat die laer lede van die homoloë reekse van aldehyede, karboksielsure, asook die drie amiede formamied, asetamied en propioonamied in baie hoër konsentrasies of selfs uitsluitlik in die lipiedfraksie voorkom. Dit lyk dus of die lipiedfraksie hoofsaaklik as fikseermiddel vir hierdie tipe verbindings aangewend word. Hier moet daarop gewys word dat die SEP-tegniek besonder sensitief vir die bepaling van die laer homoloë is, sodat die feit dat hierdie verbindings in analyses van die urine nie waargeneem kon word nie, nie aan 'n gebrek aan sensitiwiteit toegeskryf kan word nie. In hierdie verband moet ook kennis geneem word van die resultate van die kwantitatiewe vergelyking van die organiese komponente van die twee fases van die reukmerkvlloeistof wat in § 3.5 bespreek word.

### 3.5 Kwantitatiewe Analise van die Reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier

In Hoofstuk 1 is daarvan melding gemaak dat Bengaalse tiere van chemiese kommunikasie gebruik maak om te onderskei tussen die diere se geslag, vir kommunikasie tussen die verskillende geslagte om voortplanting te bewerkstellig en om individue se territoriale gebiede af te baken en in stand te hou. 'n Reukmerkvlloeistof wat uit 'n mengsel van urine en lipiede bestaan (Fig. 4.4) word gebruik as die vernaamste vorm van semiochemiese kommunikasie in Bengaalse tiere. Die habitat waarin die Bengaalse tier natuurlik voorkom, skep unieke uitdagings aan die gebruik van semiochemiese boodskappe. Die sein moet vir lang periodes aktief wees in warm, vogtige toestande en gedurende periodes van langdurige reën. Dus is dit vir die tier noodsaaklik om van 'n fikseermiddel gebruik te maak om die leeftyd van die sein te verleng deur die degradasie van die sein te help teenwerk. Brahmachary en Dutta<sup>13</sup> het opgemerk dat die aroma steeds waargeneem kan word as die tier se reukmerkvlloeistof op blare van *Mangifera indica* gesproei word en oornag onder lopende water geplaas word. Brahmachary het ook gevind dat die aroma vinnig verlore gaan indien die vlugtige verbindings deur middel van stoomdistillasie van die lipiedfraksie geskei word. Daar is dus besluit om in die huidige ondersoek nie bloot die reukmerkafskieding van die Bengaalse tier chemies te karakteriseer nie, maar om ook die kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille in die samestelling van vlugtige komponente van die lipiedfase en die urine te ondersoek en met mekaar te vergelyk om te bepaal of die lipiede wel 'n noemenswaardige affiniteit vir die meer vlugtige komponente van die afskieding het; dus of die urine, en/of die lipiede dus wel 'n fikserende rol kan speel. Verder sou dit interessant wees om vas te stel of sekere verbindings in hoër konsentrasies in die lipiedfraksie as die urine aanwesig is.

Die SEP-tegniek is nie vir kwantitatiewe analyses gebruik nie omdat hierdie tegniek 'n skewe beeld van die kwantitatiewe samestelling van die urine sou gee as gevolg daarvan dat die vlugtige komponente in hoër konsentrasies in die bodamp aanwesig is as die minder vlugtige komponente. Omdat GC-MS data nie vir kwantitatiewe doeleindes gebruik behoort te word nie, is data wat deur GC-analise van 'n ekstrak van die urine en van die lipiedfraksie verkry is, hiervoor gebruik. 'n Oplossing van 2-alkanone ( $C_7$  tot  $C_{17}$ ) is as eksterne standaard vir die kwantifisering van die verbindings in die urine-ekstrak en in die lipiedfraksie gebruik.



Daar is reeds daarop gewys dat dit moeilik was om die reukmerkvlloeistof kwantitatief en met behoud van die kwantitatiewe verhouding van die lipiedfraksie tot die urine op te vang. Die urine en die lipiedfraksie is van mekaar geskei deur sentrifugering van die reukmerkvlloeistof wat wel versamel kon word. Die lipiede was aanvanklik effens grysgekleurde, ondeursigtige materiaal, maar het met sentrifugering oorgegaan in 'n helder, effens gelerige olie. Deur die olie en die urine afsonderlik te weeg is vasgestel dat die reukmerkvlloeistof die lipied (olie) in 'n konsentrasie van 8.19 mg/ml bevat. Dit is 'n hoër konsentrasie as die *ca.* 1–2 mg/ml wat Poddar-Sarkar<sup>10</sup> gevind het. In ander bepalinge is egter weer veel laer konsentrasies lipiede in die reukmerkvlloeistof gevind.

Hierdie verskillende resultate kan aan 'n verskeidenheid van redes toegeskryf word, onder andere aan die hoeveelheid vlloeistof wat die dier ingeneem het, die diere se daaglikse dieet, asook die gesondheid van die diere wat in die studie gebruik is. Dit is dus nie in hierdie stadium moontlik om tot 'n finale slotsom oor die gemiddelde hoeveelheid lipiede per volume urine te kom nie. Dit is egter duidelik dat die tier 'n sekere hoeveelheid van sy metaboliese energie inboet deur die afskeiding te produseer. Die belangrike rol wat die lipiede as fikseermiddel speel regverdig egter waarskynlik die energie-inset.

Lipiede word deur baie ander diere as fikseermiddels gebruik vir die langdurige vrystelling van vlugtige molekules. Een van die primitiefste soogdiere, *Tupaia belangeri*,<sup>14</sup> asook die groen likkewaan, *Iguana iguana*,<sup>15</sup> en al die miskruiers in die genus *Kheper*<sup>16</sup>, maak van hierdie metode gebruik. In die klein klipspringer, *Oreotragus oreotragus*, is die energie-inset vir die produksie van 'n fikseermiddel in verhouding waarskynlik nog hoër as by die tier. Hierdie klein antilooop handhaaf die afskeiding van 'n mengsel van proteïene vir hierdie doel teen *ca.* 300 mg/uur.<sup>3</sup>

Dit is nie bekend watter komponente semiochemies aktief is nie en dit is ook nie bekend hoe sensitief die Bengaalse tier se olfaktoriese sisteem is vir die verskille in die relatiewe konsentrasies van die komponente in die reukmerkvlloeistof nie. Die moontlikheid bestaan dus dat diere klein verskille in sekere komponente kan waarneem en dat die verbindings wat in hierdie ondersoek geïdentifiseer en gekwantifiseer kon word, nie noodwendig die enigste komponente is wat vir chemiese kommunikasie gebruik word nie.

In Afdeling 3.4 is op grond van kwalitatiewe data waartydens die relatiewe konsentrasies van die komponente nie in aanmerking geneem is nie, tot die slotsom gekom dat hoofsaaklik die laer homoloë van 'n paar verbindingstipes in hoër konsentrasies of uitsluitlik in die lipiedfraksie aanwesig is. Dit is egter moontlik dat daar deur deeglike oorweging van die beskikbare kwantitatiewe data tot 'n ander gevolgtrekking gekom sou kon word. Daar is dus besluit om die lipiedfraksie en die urinefraksie van reukmerkvlloeistof wat by een bepaalde geleentheid versamel se kwantitatiewe samestelling ten opsigte van die aanwesige vlugtige organiese verbindinge met mekaar te vergelyk. Dit was moeilik om hierdie doelwit te bereik omdat die vlugtige organiese verbindinge as 'n komplekse mengsel in uiters lae konsentrasies in die reukmerkvlloeistof aanwesig is. Verder verskil die TIC's en die gaschromatogramme wat in kwantitatiewe analises verkry is van mekaar wat betref die relatiewe groottes van die pieke van die mindere komponente. Kwantitatiewe data wat deur middel van massaspektrometriese analise verkry word is nie betroubaar nie. Omdat GC-analises feitlik geen kwalitatiewe inligting bevat nie het daar dus onsekerheid bestaan oor die identiteit van sommige van die mindere komponente. As gevolg van hierdie onsekerheid oor die identiteit van sekere komponente wat in die GC-analises waargeneem is, is slegs die komponente wat bo alle twyfel in die kwantitatiewe GC-analises geïdentifiseer kon word (44 verbindinge) in hierdie vergelyking in berekening gebring. Dit het daarop neergekom dat komponente wat in kwantiteite minder as 0.0702 µg in die totale urinefraksie of die totale lipiedfraksie aanwesig was, nie in aanmerking geneem kon word nie.

Sowat 72 % (afgeronde syfers) van die totale hoeveelheid vlugtige organiese komponente van die ekstrak van die urine van die Bengaalse tier bestaan uit die vier komponente, dimetielsulfoon (E2265) (41 %), dekanooësuur (E3423) (12 %), oktanoësuur (E2816) (11 %) en (Z)-9-dodekanoësuur (E4060) (8 %). Die lipiedfraksie (olielagie) bestaan vir 68 % uit sewe komponente, naamlik tetradekanoësuur (L4616) (14 %), 9-oktadeken-1-ol (L4364) (13 %), heksadekanoësuur (L5062) (12 %), (Z)-9-dodekanoësuur (L4095) (8 %), (Z)-9-heksadekanoësuur (L5121) (8 %), 1-heksadekanol (L3795) (7 %) en oktadekanoësuur (B5450) (7 %). Skwaleen kom ook in die lipiedfraksie van die Bengaalse tier voor en is reeds in verskeie eksokriene afskeidings van soogdiere gevind<sup>17,18</sup>, waar dit waarskynlik ook as 'n fikseermiddel optree.

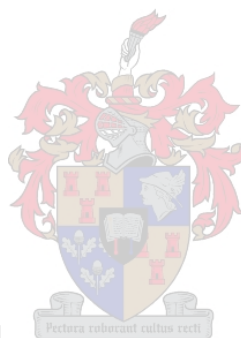
Die betrokke data word in Tabel 3.1 saamgevat. Skwaleen word nie as deel van die vlugtige komponente in die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier beskou nie, en verskyn dus nie in hierdie tabel nie.

’n Grafiese voorstelling word in Fig. 3.1 en Fig. 3.2 gegee. Uit hierdie data is dit duidelik dat die kwantitatiewe data ’n glad ander beeld gee as die indruk wat die oppervlakkige beoordeling van die kwalitatiewe data geskep het. Feitlik al die komponente van die reukmerkvlloeistof is in hoër konsentrasies in die lipiedfraksie aanwesig as in die urine. Hieruit moet noodwendig afgelei word dat die lipiedfraksie van die reukmerkvlloeistof die medium is wat die semiochemiese boodskap oordra en dat die urine self nie so ’n belangrike rol speel nie, wat eintlik vanselfsprekend is. Normaalweg sal die urine vinnig verdamp of in die grond intrek, wat tot gevolg het dat die leeftyd van ’n territoriale merk bepaal sou word deur die geartheid van die voorwerp wat gemerk word. Deur die gebruik van ’n draermateriaal wat nie vinnig verdamp of in die voorwerp wat gemerk word intrek nie, het die tier meer kontrole oor die lewensduur van so ’n semiochemiese boodskap.

**Tabel 3.1: Massas ( $\mu\text{g}$ ) van die geïdentifiseerde verbindings in die twee fases van die reukmerkvlloeistof van die Bengaalse tier, *Panthera tigris tigris***

Verbindings	Urine ( $\mu\text{g}$ )	Lipiedfase ( $\mu\text{g}$ )
1. Heptanaal		4.7
2. 2-Heptanoon	2.2	0.7
3. 3-Metiel-1-butanol	3.5	
4. 2-Nonanoon	0.3	1.3
5. Nonanaal		12.5
6. ( <i>E</i> )-2-Oktenaal		0.6
7. Bensaldehyd	1.4	
8. 2-Undekanoon		2.5
9. Asetofenoon	0.1	
10. Pentanoësuur		1.1
11. Pentan-5-olied	0.1	
12. Heksanoësuur	0.2	
13. Dimetielsulfoon	75.6	
14. 2-Fenieletanol	5.7	
15. Heptanoësuur		5.9
16. Fenol	0.2	
17. 2-Pentadekanoon		3.0
18. Oktanoësuur	21.1	5.7

<b>Tabel 3.1. Vervolg</b>			
<b>Verbindings</b>	<b>Urine-ekstrak (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Olifase (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	
19.	2-Piperidinoon	5.4	
20.	Dekan-5-olied	1.3	6.5
21.	Nonanoësuur	0.4	16.5
22.	2-Metielnonanoësuur	1.1	2.1
23.	1-Tetradekanol		7.5
24.	2-Heptadekanoon		4.1
25.	Dekanoësuur	22.0	28.5
26.	2-Metieldekanoësuur	3.0	5.1
27.	2-Metielundekanoësuur		4.5
28.	Dodekan-4-olied	1.5	31.2
29.	(Z)-6-Dodeken-4-olied	0.5	4.8
30.	Dodekan-5-olied	1.9	27.9
31.	1-Heksadekanol		58.1
32.	9-Heksadeken-1-ol		2.6
33.	Dodekanoësuur	3.7	15.9
34.	(Z)-9-Dodekenoësuur	14.2	63.5
35.	Tetradekan-4-olied		8.0
36.	1-Oktadekanol		10.0
37.	Tetradekan-5-olied	1.9	14.1
38.	9-Oktadeken-1-ol		105.9
39.	9,12-Oktadekadiën-1ol		31.1
40.	1-Metiel-2,4-imidasolidiendioon	7.5	
41.	Tetradekanoësuur	3.9	113.2
42.	Heksadekanoësuur	3.8	99.4
43.	(Z)-9-Heksadekenoësuur	3.1	60.8
44.	Oktadekanoësuur		56.5



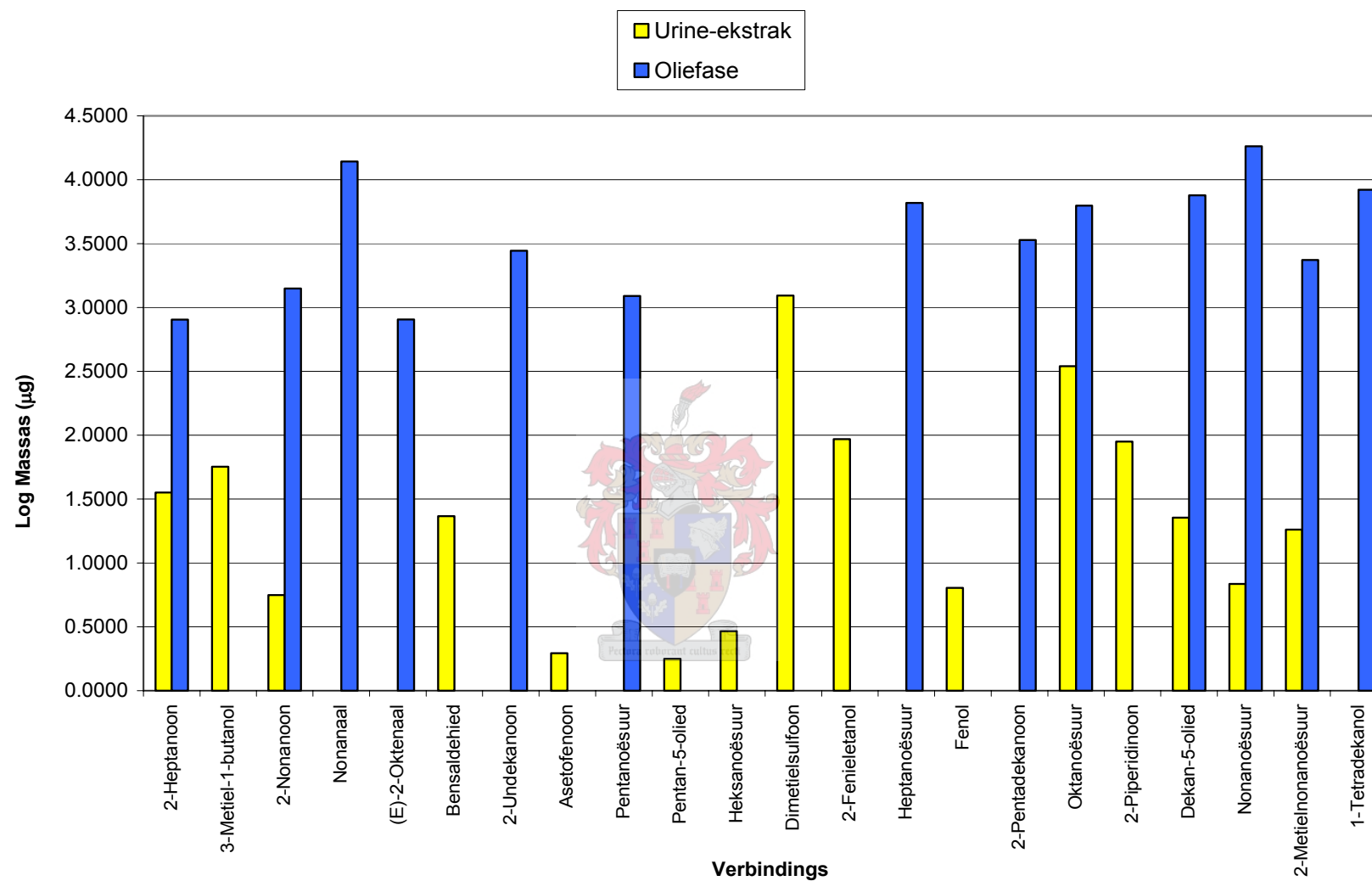


Fig. 3.1: Vergelykende voorstelling van die kwantitatiewe samestelling van die vlugtige organiese komponente (Deel 1).

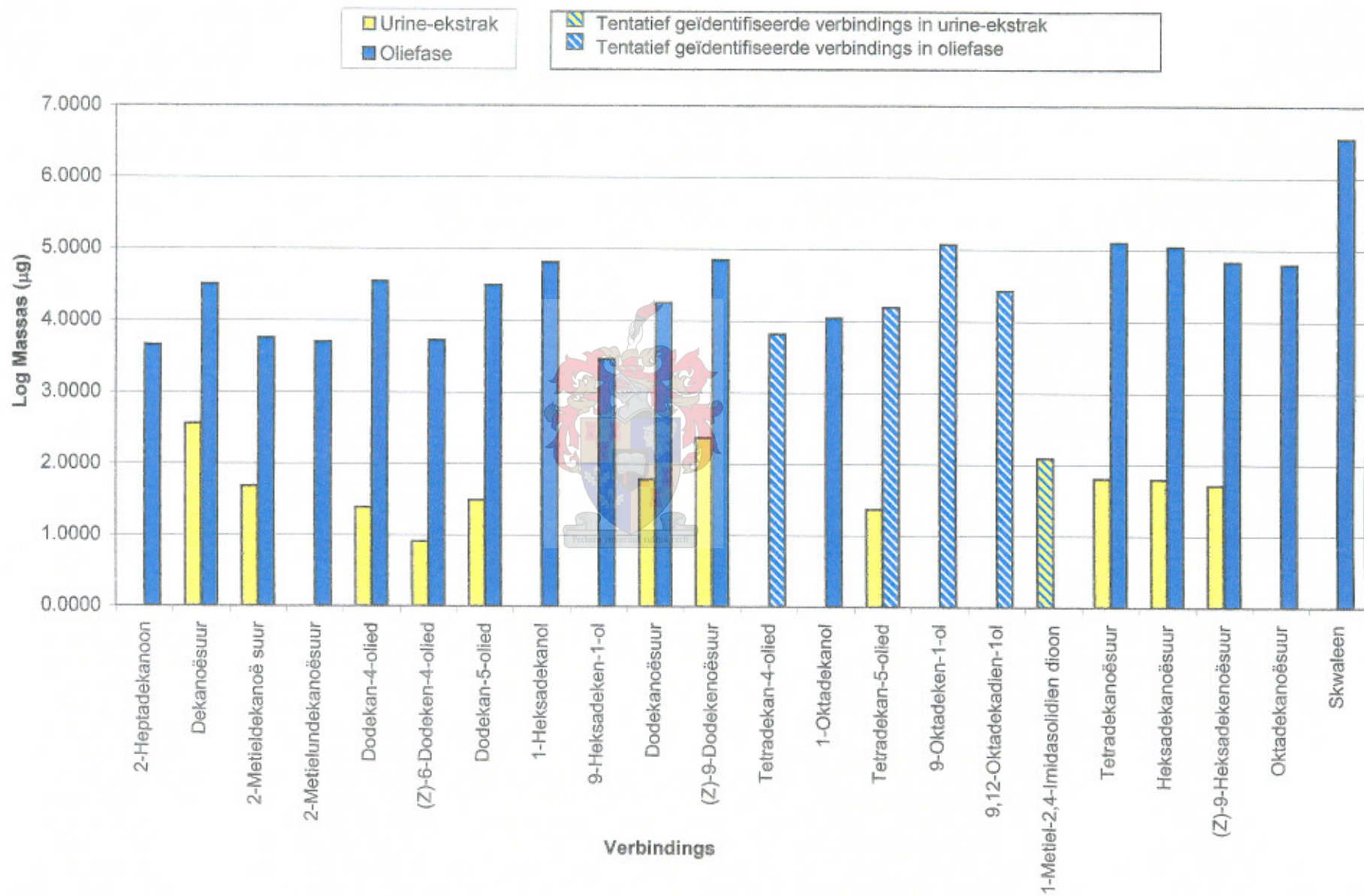


Fig. 3.2: Vergelykende voorstelling van die kwantitatiewe samestelling van die vlugtige organiese komponente (Deel 2).

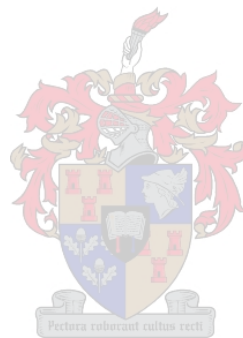


## Verwysings: Hoofstuk 3

1. B.V. Burger, "Mammalian Pheromones", *Top. Curr. Chem.* **240**:231-278(2005).
2. B. Reiter, B.V. Burger en J. Dry, "Mammalian exocrine secretions XVIII. Chemical characterization of interdigital secretion of red hartebeest, *Alcelaphus buselaphus*", *J. Chem. Ecol.* **29**:2235-2252(2003).
3. C.L. Arthur en J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.* **62**:2145-2148(1990).
4. B.V. Burger, T-P. Yang, M. le Roux, W.F. Brandt, A.J. Cox en P.F. Hart, "Mammalian exocrine secretions XI. Constituents of the preorbital secretion of klipspringer, *Oreotragus oreotragus*", *J. Chem. Ecol.* **23**:2383(1997).
5. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, en C.A. Cramers, "Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles", *J. Microcol. Sep.* **11**:737-747(1999).
6. J. Pettersson, A. Kloskowski, C. Zaniol, en J. Roeraade, "Ultra thick film open tubular traps with an increased inner diameter", *J. Chromatogr. A.* **1033**:339(2004).
7. B.V. Burger, Sample enrichment probe and method, SA Patent 2003/4696 (2003).
8. M. Biedermann, K. Fiselier en K. Grob, "Injector-internal thermal desorption from edible oils. Part 1: Visual experiments on sample desorption on the liner wall", *J. Sep. Sci.* **28**:1550-1557(2005).
9. B.V. Burger, Z. Munro, D. Smith, U. Schmidt, C.-L. Wu en F.-C. Tien, "Sample introduction in gas chromatography: simple method for the solventless introduction of crude samples of biological origin", *J. Chromatogr.* **518**:207-214(1990).

10. B.V. Burger, D. Smit, H.S.C. Spies, C. Schmidt, U. Schmidt en A.Y. Telitsina, "Mammalian exocrine secretions XVI. Constituents of secretion of supplementary sacculi of dwarf hamster, *Phodopus sungorus sungorus*", *J. Chem. Ecol.* **27**:1277-1288(2001).
11. M. Poddar-Sarkar, "The fixative lipid of tiger pheromone", *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **15**:89-101(1996).
12. M. Poddar-Sarkar, R.L. Brahmachary en J. Dutta, "Scent Marking in the Tiger", in "Advances in the Biosciences. Chemical Signals in Vertebrates VII", **93**, R. Apfelbach (red.), Elsevier Science Ltd, Engeland, 1994, pp. 339-344.
13. R.L. Brahmachary en J. Dutta, "Chemical communication in the tiger and the leopard", In: "Tigers of the World", R.L. Tilson en U.S. Seal (red.), Noyes Publication, USA, pp. 296-302.
14. F.V. Stralendorff, "Partial chemical characteristic of urinary signalling pheromone in tree shrews, *Tupaia belangeri*", *J. Chem. Ecol.* **13**:655-697(1987).
15. A.C. Alberts, T.R. Sharp, D.I. Werner en P.J. Weldon, "Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green iguanas (*Iguana iguana*), *J. Chem. Ecol.* **18**:703-712(1992).
16. B.V. Burger, Z. Munro en W.F. Brandt, "Pheromones of the Scarabaeinae II. Composition of the pheromone disseminating carrier material secreted by male dung beetles of the genus *Kheper*", *Z. Naturforsch* **45c** :863-872(1990).
17. M. le Roux, "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Samestelling van Eksokriene Klierafskeidings van die Bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*), Springbok (*Antidorcas marsupialis*) en Grysbok (*Raphicerus melanotis*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1980), p. 62.

18. W.F. Wood, G.A. Drago, M.J. Richard en J.W. Drago, "Long-chain fatty acids in the anal gland of the red panda, *Ailurus fulgens*", *Biochem. Syst. Ecol.* **31**:1057-1060(2003).



## HOOFSTUK 4

### EKSPERIMENTEEL

#### 4.1 Algemeen

Alle Pyrex-glasapparaat wat vir die hantering van biologiese materiaal gebruik is, is vooraf deeglik gewas met seep en water, gespoel met gedistilleerde water, asetoon en DCM, en gedroog in 'n muffeloond by 400°C om enige spore van organiese materiaal te verwyder. DCM (Riedel de Haën, Pesticide Analysis Grade) is gebruik vir alle ekstraksies. Spuitnaalde is skoongemaak deur DCM onder vakuüm daardeur te suig. Die suierstafies en die buitekant van die naalde is deeglik met die DCM afgespoel. Die aluminiumplate wat vir die versameling van biologiese materiaal gebruik is, is vooraf deeglik met oplosbare seep en water gewas, agtereenvolgens afgespoel met gedistilleerde water en metanol (PAL Chemicals, Analytical Reagent Grade), en gedroog in 'n lugoond by 200°C.

#### 4.2 Versameling van Materiaal en Monstervoorbereiding

Die urine van 'n Bengaalse tiermannetjie is by die Tygerberg Dieretuin buite Stellenbosch versamel. 'n Aluminiumplaat (2 mm dikte) met 'n versamelingsgeut en -bottel aan die onderkant is aan die buitekant van die dier se hok vasgemaak met die versamelingsgeut in die rigting van die hok (Fig. 4.1 tot Fig. 4.3). Geurstowwe is aan die agterkant van die plaat aangebring om merkingsgedrag by die tier te ontlok. Vir hierdie doel is onder andere dimetioldisulfied en 'n sintetiese mengsel van die verbindings wat vroeër tydens die huidige studie in die urine van die Bengaalse tier geïdentifiseer is, gebruik. Goeie resultate is ook behaal met die parfuim, *Elle* (*Paco Rabonne*) wat gebruik is na aanleiding van die resultate van eksperimente wat deur wetenskaplikes van die "Wildlife Conservations Society" (WCS) met diere in die Bronx Dieretuin in New York, gedoen is (kyk § 1.4.8.1).



Fig. 4.1: Apparaat gebruik om urine te versamel.



Fig.4.2: Bengaalse tier onderzoek urineversamelings-apparaat.



Fig. 4.3: Bengaalse tiermannetje probeer skuur teen urineversamelingsapparaat.



Die parfuum het baie goeie resultate gelewer, en die tier het feitlik onmiddellik 'n groot urinemonster verskaf. Die versamelde urine is gestoor by  $-30^{\circ}\text{C}$  totdat analyses uitgevoer kon word.

Die Bengaalse tier se reukmerkvlloeistof bestaan uit twee fases, naamlik urine en 'n lipiedfase (Fig. 4.4). Die twee fases is met behulp van sentrifugering van mekaar geskei. Die ondeursigtige, melkerige lipiedlaag is aan langdurige sentrifugering onderwerp waartydens die emulsie oorgegaan het in 'n homogene olielagie wat vir GC en GC-MS analyses gebruik is.



Fig. 4.4: Redelike klein urinemonster van die Bengaalse tier.

Die organiese materiaal opgelos in die urine is 15 maal met 3 ml DCM geëkstraheer. Tydens die eerste aantal ekstraksies het 'n emulsielaag tussen die boonste urinelaag en die onderliggende oplosmiddel gevorm. Hierdie emulsie wat die voorkoms van 'n redelike soliede en ondeurdringbare membraan gehad het, is voorlopig aan die denaturering van proteïene in die urine toegeskryf en vir verdere ondersoek deur sentrifugering geïsoleer.

Om die DCM-ekstrak van die urine in te damp is dit in 'n 50 ml glasbotteltjie in 'n 500 ml glasbeker geplaas en die glasbeker is met aluminiumfoelie bedek. 'n Redelike sterk stroom suiwer stikstof is in die beker ingelei om die DCM-dampe te verwyder. Die stikstof is nie direk op die inhoud van die botteltjie gerig nie. Namate die indampproses gevorder het, is die ekstrak na kleiner Reacti Vials oorgeplaas. Die ekstrak is tot 'n uiteindelijke volume van  $\pm 10 \mu\text{l}$  ingedamp. Hierdie proses het sowat 15 uur in beslag geneem.



## 4.3 Analitiese Metodes

### 4.3.1 Instrumentasie

#### 4.3.1.1 Gaschromatografiese analises

Kwantitatiewe bepaling is uitgevoer met 'n Carlo Erba HRGC gaschromatograaf wat toegerus is met 'n vlamionisasiedetektor (FID) en 'n Grob “split/splitless” inlaat. Die gaschromatograaf is gekoppel aan 'n rekenaar met integrasie-sagteware (DELTA Chromatography Data System Version 5.0). 'n Glaskolom (30 m x 0.25 mm; # FS75) wat vir GC-analises gebruik is, is deur die Laboratorium vir Ekologiese Chemie belaag met die stasionêre fase AT1000 teen 'n laagdikte van 0.25  $\mu\text{m}$ . Alle kwantitatiewe analises is gedoen met waterstof as draergas teen 'n liniêre vloeisnelheid van 50 cm/s, gemeet by 'n kolomtemperatuur van 40°C. Die vlamionisasiedetektor is by 'n temperatuur van 280°C gehou. Die monsters is ingespuut by 'n inlaattemperatuur van 220°C, verkieslik by 'n kolomtemperatuur laer as 30°C. Die kolomtemperatuur is ballisties verhoog tot 40°C, waarna 'n temperatuurprogram van 40°C tot 250°C teen 2.0°C per minuut, gebruik is. Die finale temperatuur is vir 20 minute isotermies by 250°C gehou.

#### 4.3.1.2 Gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS)

Gaschromatografiese skeiding gekombineer met lae-resolusie-elektronimpak-massaspektrometrie (GC-LREIMS) is uitgevoer op 'n Carlo Erba QMD 1000 GC-MS-instrument. Elektron-impak (EI) massaspektra is opgeneem by 70 eV oor 'n massagebied van 25 tot 350 Dalton. Helium is as draergas gebruik teen 'n liniêre vloeisnelheid van 28.6 cm/s (kolomtemperatuur 40°C). 'n Inlaattemperatuur van 220°C, tussenvlaktemperatuur van 250°C en ionbrontemperatuur van 180°C is gebruik. Dieselfde kolom as wat in die GC-analises gebruik is, is ook vir die GC-MS analises gebruik. Die druk in die ionbronkamer was ongeveer  $2 \times 10^{-5}$  mbar by 'n kolomtemperatuur van 40°C, en het afgeneem tot ca.  $1 \times 10^{-5}$  mbar teen die einde van die temperatuurprogram, by 'n kolomtemperatuur van 250°C. 'n Aftastempo van 0.9 s/spektrum met 'n interval van 0.1 s tussen spektra is gehandhaaf.

CIMS met metaan as reaktantgas is ook uitgevoer op die Carlo Erba QMD 1000 GC-MS-instrument. Die interfasetemperatuur was 220°C, en die spektra is opgeneem by 70 eV met 'n

ioonbrontemperatuur van 180°C. Die druk in die ionbronkamer is met behulp van die inlaat metaangas tussen  $10^{-4}$  en  $2 \times 10^{-4}$  Torr ingestel ten einde plasma-ione van gelyke intensiteit by  $m/z$  17 en  $m/z$  29 te kry. Dieselfde kondisies en kolomme as wat in die GC-EIMS-analises gebruik is, is ook vir die GC-CIMS analises gebruik.

Retensietydvergelyking van natuurlike en sintetiese verbindings is ook met behulp van GC-MS gedoen en hierdie tegniek is ook gebruik om die verloop en produkte van die sinteses van verwysingsverbindings te monitor en te karakteriseer.

## 4.3.2 Monsterneming en inlaatmetodes

### 4.3.2.1 Konvensionele monsterinlaat

Kwantiteite van 1  $\mu$ l van die ekstrak van die urine van die tier is met inlaatstroomverdeling ("split") in die Grob "split/splitless" inlaat van die GC- en GC-MS-instrumente ingespuut by 'n inlaatteratuur van 220°C. 'n Uitlaatverdelervloei van 10 ml en 'n septumspoelvloei van 1 ml/min is gebruik.

### 4.3.2.2 Monsterneming met behulp van die SEP-tegniek

Vir bodamp-analise is die urine van die Bengaalse tier geplaas in 'n 100 ml glasbottel waarvan die skroefkop dieselfde skroefdraad as die inlaatsisteem van die GC besit. 'n Metaalstafie met 'n deursnit van 1.5 mm met 'n PDMS-lagie (28.20 mg) wat die punt van die stafie vir 'n lengte van 15 mm bedek, is in die bodamp van die urine geplaas. Hierdie stafie word 'n monsterverrykingsstafie ("sample enrichment probe" of SEP) genoem (Fig. 4.5 en Fig. 4.6).<sup>1</sup> Die monster is vir 20 uur verryk by 40°C waartydens die vlugtige verbindings in die urine in die PDMS-lagie gesorbeer is. Die gesorbeerde vlugtige verbindings is aansluitend by 'n inlaatteratuur van 220°C vir 150 sekondes uit die PDMS-rubber van die SEP gedesorbeer vir analise met behulp van die kolomme en gaschromatografiese parameters soos hierbo beskryf.



Fig. 4.5: Monsterverrykingstafie (SEP).



Fig. 4.6: Monsterverryking m.b.v. SEP.

#### 4.3.2.3 Inlaat-interne termiese desorpsie

Die vlugtige organiese verbindings in die lipiedfase van die reukmerkvlloeistof van die tier is geanaliseer deur die olie (§ 3.2) as sodanig, dus sonder verdunning met 'n oplosmiddel, aan GC- en GC-MS-analise te onderwerp volgens 'n metode wat onlangs deur Grob<sup>2</sup> beskryf is. Die metode berus daarop dat die mengsel van nie-vlugtige lipiede as oplosmiddel vir die vlugtige verbindings dien. Die lipied bly dus in die inlaat van die instrument agter. Om te verhoed dat die olie teen die binnewand van die inlaathuls afloop en vir die analise verlore gaan wanneer dit die bodem van die inlaat bereik, is daar 'n klein pluisie gesilieerde glaswol in die glashuls geplaas.

#### 4.3.2.4 Kwantitatiewe analise

Vir die kwantitatiewe analyses van die DCM-ekstrak van die urine is 1  $\mu\text{l}$  ekstrak per analise gebruik. 'n Oplossing van 2-alkanone ( $C_7$  tot  $C_{17}$ ) is as eksterne standaard vir die kwantifisering van die verbindings in die DCM-ekstrak, en waterstof as draergas teen 'n liniêre vloeispoed van 57.80 cm/s gebruik. Verskillende metodes is vir die kwantitatiewe analise van die vlugtige organiese komponente van die lipiedfase aangewend. Die beste resultate is behaal deur 3.28  $\mu\text{g}$  van die onverdunde olie sonder inlaatverdeling in te spuit. Vir hierdie analises is ook 'n klein pluisie gesilieerde glaswol in die glasvoering van die inlaat gebruik. In hierdie reeks analises was die liniêre vloeispoed van die draergas (waterstof) 57.92 cm/s.

#### 4.3.2.5 Analises van gesintetiseerde standaard en retensietydvergelyking

GC-analise is gebruik om die sintese van verwysingsverbindings te monitor, en om die GC-MS-identifikasie van die verbindings in die urine van die Bengaalse tier te bevestig deur middel van retensietydvergelykings met kommersieel beskikbare sintetiese verbindings. Gesintetiseerde en kommersiële verbindings is individueel of as mengsels met konsentrasies soortgelyk aan die konsentrasies waarin hulle in die urine-ekstrak en lipiedmonsters voorkom, in DCM as oplosmiddel opgemaak. Om die gaschromatografiese retensietye van die verbindings in die ekstrak- en lipiedmonsters met dié van die gesintetiseerde- of kommersiële verbindings te vergelyk, is die bogenoemde oplossings onder dieselfde kondisies as die ekstrak- of lipiedmonsters aan GC-analise onderwerp. Indien die retensietye ooreengestem het, is die oplossings van die sintetiese verbindings saam met die ekstrak ingespuut, om deur waarneming van 'n toename in die piekhoogte en/of piekoppervlakte van die betrokke piek te bevestig dat die verbinding korrek geïdentifiseer is.

### 4.4 Sintese van Verwysingsverbindings

Al die uitgangstowwe en oplosmiddels wat in die sinteses gebruik is, is verkry van Aldrich Chemical Co., Merck, Saarchem, NT Laboratories of B.D.H. Chemicals Ltd. Verbindings wat benodig is vir die bevestiging van die strukture van die vlugtige organiese komponente van urine van die Bengaalse tier wat nie kommersieel beskikbaar was nie, is gesintetiseer uit kommersieel beskikbare uitgangstowwe vir die vergelyking van hulle massaspektra en retensietye met dié van natuurlike komponente van die reukmerkvlloeistof van die tier.

#### 4.4.1 Bereiding van 3-metiel-2-ketone

3-Metiel-2-oktanoon en 3-metiel-2-nonanoon is deur reduksie-metilering van  $\alpha,\beta$ -onversadigde ketone gesintetiseer soos beskryf deur Smith en Huff.<sup>3</sup> Die  $\alpha,\beta$ -onversadigde 3-nonen-2-oon is, byvoorbeeld, omgesit in die ooreenstemmende litiumenolaat deur litium (0.50 g;  $7.14 \times 10^{-2}$  mol) in klein stukkie by vloeibare  $\text{NH}_3$  (150 ml) te voeg en die mengsel vir 15 minute te roer. 'n Mengsel van 3-nonen-2-oon (5.00 g;  $3.57 \times 10^{-2}$  mol), opgelos in watervrye

eter (25 g) en *t*-butielalkohol (2.64 g;  $3.57 \times 10^{-2}$  mol), is drupsgewys by die litiumenolaat oor 'n tydperk van 30 minute gevoeg. Die mengsel is vir 30 minute geroer waarna dit met 'n gelyke volume watervrye eter verdun is. Vir die alkileringsstap is 'n oormaat metieljodied (15.20 g; 0.11 mol) opgelos in watervrye eter oor 'n tydperk van 40 minute drupsgewys by die reaksiemengsel gevoeg. Nadat die mengsel vir 'n addisionele tydperk van 30 minute geroer is, is die vloeibare ammoniak toegelaat om af te damp. Die mengsel is agtereenvolgens met verdunde fosforsuur en herhaaldelik met water tot 'n neutrale pH gewas, op watervrye magnesiumsulfaat gedroog en gefiltreer. Die watervrye eter is met behulp van rotasieverdamping onder verlaagde druk afgedamp om 'n produk (5.73 g) te lewer wat volgens GC-MS-analise 16 % poli-gealkileerde byprodukte, 26 % ander onsuierhede en 58 % 3-metiel-2-nonanoon bevat het. Hierdie sintese het dus die verlangde produk in opbrengs van 60 % gelewer.

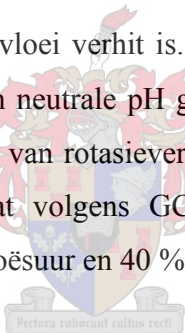
3-Okten-2-oon is volgens dieselfde metode omgesit in die ooreenstemmende litiumenolaat, waarna die enoon gereduseer is na 3-metiel-2-oktanoon, maar in hierdie geval is een ekwivalente hoeveelheid water (0.72 g) as protondonor gebruik in plaas van *t*-butielalkohol, wat die vorming van 'n kleiner persentasie (6 %) poli-gealkileerde byprodukte tot gevolg gehad het. 'n Produk van 5.82 g is verkry, wat volgens GC-MS-analise 49 % onsuierhede en 51 % 3-metiel-2-oktanoon bevat het. 'n Persentasie opbrengs van 52 % is dus verkry.

#### 4.4.2 Bereiding van $\alpha$ -metielkarboksiesure

2-Metielnonanoësuur, 2-metieldekanoësuur en 2-metielundekanoësuur is gesintetiseer deur geskikte vertakte maloonsuuresters uit diëtielmetielmalonaat te sintetiseer,<sup>4</sup> die esters na die ooreenstemmende di-gealkileerde maloonsure te hidroliseer en hierdie sure na die verlangde 2-metielkarboksiesure te dekarboksileer. Om tyd te bespaar is die sintese met 'n mengsel van die uitgangstowwe 1-bromoheptaan, 1-bromoöktaan en 1-bromononaan uitgevoer. 'n Oplossing van natriumetoksied is voorberei van skoon natrium (2.53 g; 0.11 mol) en watervrye etanol (17.00 ml; 0.292 mol) in 'n 500 ml 3-nek rondbolfles toegerus met 'n skeitregter en 'n koeler. Nadat al die natrium met die etanol gereageer het en die temperatuur van die reaksiemengsel tot 50°C gedaal het, is diëtielmetielmalonaat (17.64 g; 0.10 mol) met behulp van 'n skeitregter by die etoksied gedrup. 'n Mengsel van 1-bromoheptaan (6.60 g;  $3.69 \times 10^{-2}$  mol), 1-bromoöktaan (7.10 g;  $3.68 \times 10^{-2}$  mol) en 1-bromononaan (7.60 g;  $3.67 \times 10^{-2}$  mol) is stadig oor 'n tydskuur

van sestig minute by die helder oplossing gedrup terwyl die reaksiemengsel geroer is. 'n Heftige reaksie het dadelik begin. Die reaksiemengsel is vervolgens vir twee uur onder terugvloei verhit tot die mengsel 'n neutrale pH bereik het. Die alkohol is afgedistilleer en water (600 ml) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna die boonste laag van die gevormde di-gealkileerde maloonsuurester geskei is. Die ruproduk is op watervrye magnesiumsulfaat gedroog.

Die mengsel van di-gealkileerde maloonsuuresters is vervolgens gehidroliseer na die ooreenstemmende di-gesubstitueerde maloonsure<sup>5</sup> 'n Warm oplossing van kalsiumhidroksied (20.00 g; 0.32 mol) in water (40 ml) is geplaas in 'n 3-nek rondebolfles toegerus met 'n skeitregter en 'n terugvloeiakoeler. Die maloonsuuresters is stadig by die kalsiumhidroksiedoplossing gedrup en 'n heftige reaksie het onmiddellik plaasgevind. Die reaksiemengsel is vir drie uur onder terugvloei verhit om die hidrolise-reaksie te voltooi. Die mengsel is met water verdun en met chloroform geëkstraheer om die alkohol en alle onverseepbare verbindings te verwyder, waarna die reaksiemengsel met fosforsuur aangesuur is en die mengsel vir vier uur onder terugvloei verhit is. Die gevormde  $\alpha$ -metielkarboksielsure is met DCM geëkstraheer, met water tot 'n neutrale pH gewas en op watervrye magnesiumsulfaat gedroog. Die chloroform is met behulp van rotasieverdamping onder verlaagde druk afgedamp om 'n produk (20.50 g) te lewer wat volgens GC-analise 9 % onsuiverhede, 23 % 2-metielnonanoësuur, 29 % 2-metieldekanoësuur en 40 % 2-metielundekanoësuur bevat het.

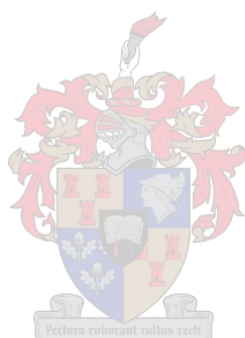


#### 4.4.3 Bereiding van diësters

Dimetielsuksinaat, dimetielglutaraat en dimetieladipaat is deur die suurgekataliseerde verestering uit die ooreenkomstige dikarboksielsure berei.<sup>6</sup> By 'n oplossing van suksiensuur (10.00 g;  $8.48 \times 10^{-2}$  mol), glutaarsuur (10.00 g;  $7.58 \times 10^{-2}$  mol) en adapiensuur (10.00g;  $6.85 \times 10^{-2}$  mol) in 'n mengsel van metanol (30.00 ml; 0.94 mol) en natriumgedroogde benseen (75.00 ml; 0.84 mol) is gekonsentreerde  $H_2SO_4$  (12.00 g; 0.12 mol) gevoeg. Die mengsel is vir ses uur onder terugvloei verhit waarna 'n oormaat water (400 ml) by die reaksiemengsel gevoeg en die benseenlaag wat die produk bevat het, van die waterlaag afgeskei is. Die waterlaag is met eter geëkstraheer, hierdie ekstrak met die vorige benseenekstrak gekombineer en die gekombineerde ekstrakte met natriumbikarbonaat suurvry gewas en verder op die gewone manier opgewerk om



die verlangde mengsel van dimetielesters te lewer (21.71 g) wat volgens GC-MS-analise 23 % onsuiverhede, 15 % dimetielsuksinaat, 26 % dimetielglutaraat en 36 % dimetieladipaat bevat het.



## Verwysings: Hoofstuk 4

1. B.V. Burger, Sample enrichment probe and method, SA Patent 2003/4696 (2003).
2. M. Biedermann, K. Fiselier en K. Grob, "Injector-internal thermal desorption from edible oils. Part 1: Visual experiments on sample desorption on the liner wall", *J. Sep. Sci.* **28**:1550-1557(2005)
3. H.A. Smith, B.J.L. Huff, W.J. Powers en D. Caine, "The Reduction-Methylation of Cyclohexenone Derivatives", *J. Org. Chem.* **32**:2851-2856(1967).
4. A.I. Vogel, "A Text-Book of Practical Organic Chemistry", Derde Uitgawe, Longmans, Green en Co. Ltd., Londen, Eksp. III, 154, pp. 485-486 (1956).
5. Verwysing 4, p. 486.
6. Verwysing 4, p. 386.

