

'n ONDERSOEK NA DIE SAMESTELLING EN BELANG VAN
ACHYRANTHES ASPERA L. AS GENEESKRAGTIGE PLANT

'n Verhandeling ingelewer vir
die graad

MAGISTER SCIENTIAE
(FARMASIE)

aan

DIE POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR C.H.O.

Deur

J.H. VAN DER WALT B.Sc., B.Sc.-Honns. (Farmasie)

OKTOBER 1960

INHOUDSOPGAVE:-BLADSY.

INLEIDING.....	1
Naam en gebruike.....	2
LITERATUURCORSIG.....	3
Verspreiding van <i>Achyranthes aspera</i> oor die wêreld	4
Gebruike van <i>Achyranthes aspera</i> oor die wêreld....	5
Samestelling.....	7
FARMAKOOGNOSTIESE ONDERSOEK.....	10
Bou van die stingel.....	11
Bou van die blaar.....	13
MATERIAAL EN BEWERKING.....	14
ANORGANIESE ANALISE.....	15
Voggehalte van die poeier.....	15
VOORLOPIGE TOETSE OP MOONTLIK AANWESIGE ANORGA- NIESE ELEMENTE.....	16
A. Katione.....	16
B. Anione.....	20
KWANTITATIEWE BEPALING VAN ANORGANIESE VERBIN- DINGS.....	26
1. Kalium- en silikaatbepaling op die as.....	26
2. Kalium- en natriumbepaling op die as.....	29
3. Kalium- en natriumbepaling op 'n kristallyne ekstraksieres.....	31
4. Chloriedbepaling op die as.....	33
5. Chloriedbepaling op die kristallyne ekstraksie- res.....	33
6. Nitraatbepaling op die kristallyne ekstraksie- res.....	34

II

7. Kalsium- en magnesiumbepaling op die as.....	36
ONDERSOEK NA DIE ORGANIESE SAMESTELLING.....	39
METODES VAN EKSTRAKSIE EN DIE SUIWERING VAN DIE EKSTRAKTE.....	39
1. Perkolasie met water.....	40
2. Soxhletekstraksie met organiese vloeistowwe.....	40
3. Masserasie met verskillende konsentrasies van alkohol.....	41
4. Bereiding van 'n infuus.....	41
Opheldering van die ekstrakte en verwydering van die anorganiese verbindings.....	41
1. Aktiewe koolstof.....	42
2. Basiese loodasetaat.....	42
3. Aluminiumoksied.....	42
4. Kieselguhr.....	43
5. Kwantitatiewe papierchromatografie.....	43
6. Fullersaarde.....	44
Metodes wat aangewend is vir die verwydering van die soute wat teenwoordig is.....	45
Loonuitruiling.....	45
Aanwending van organiese vloeistowwe.....	47
CHROMATOGRAFIE.....	48
Papierchromatografie.....	48
Die meganisme van papierchromatografie.....	49
Faktore wat 'n rol by papierchromatografie speel....	50
1. Ewewig.....	50
2. Temperatuur.....	50
3. Die papier.....	51
4. Afstand van die vlekke van mekaar.....	51
METODE.....	52

III

1. Chromatografiebakke.....	52
2. Aanbring van die vlekke.....	52
3. Ontwikkeling.....	53
4. Sigbaarmaking van die vlekke.....	53
5. Hoeveelhede wat aantoonbaar is	54
1. SAPONIENE.....	54
2. STEROÏEDE.....	58
1. Kleurreaksies.....	59
2. Papierchromatografie.....	60
3. TRITERPENE.....	61
4. GLIKOSIEDE.....	62
(a) Adsorpsie aan koolstof.....	63
(b) Loodasetaatmetode van Herissey.....	64
5. SUIKERS.....	66
Bereiding van die ekstrak.....	67
Sigbaarmaking van die vlekke.....	68
6. ASKORBIENSUUR EN ANDER ORGANIESE SURE.....	72
(a) Askorbiensuur.....	72
(b) Organiese sure.....	73
(c) Looisure.....	77
7. FLAVONE.....	77
Ekstraksie van die plantmateriaal.....	78
(a) Ekstraksie met water.....	78
(b) Ekstraksie met metanol.....	79
(c) Ekstraksie met eter.....	79
Kleurreaksies op flavonofede verbinding.....	79
8. ALKALOÏEDE.....	81
GEVOLGTREKKINGS.....	84
OPSOMMING.....	85
BIBLIOGRAFIE.....	87

'n ONDERSOEK NA DIE SAMESTELLING EN BELANG VAN ACHYRAN-
THES ASPERA L. AS GENEESKRAGTIGE PLANT.

INLEIDING:-

Die gebruik van plante en plantprodukte as geneesmiddels dateer vanaf die vroegste dae van die menslike beskawing. Die natuur, en veral die planteryk was nog altyd vir die mens 'n ryk bron van geneesmiddels. Selfs in die moderne tyd word steeds nuwe ontdekkings gemaak op hierdie gebied - bv. die alkaloiiede uit *Rauwolfia serpentina*, ens.

In Suid-Afrika word nog algemeen natuurlike geneesmiddels gebruik, veral deur die naturelle en plattelandse bevolking. Enkele voorbeelde van plantaardige geneesmiddels wat nog dikwels gebruik word is boegoe, aalwyn, valderjan en dagga. Die groot aantal van sulke middels wat deur die twee bevolkingsgroepe aangewend word by die genesing van siektes skep 'n wye veld van ondersoek waarvan tot dusver nog weinig gedoen is. Baanbrekerswerk is egter op hierdie gebied verrig deur mense soos Watt en Breyer-Brandwijk¹⁾ en Steyn.²⁾

Tydens 'n reis deur Swaziland is my aandag gevestig op 'n plant wat in daardie omstreke dikwels aangewend word vir die genesing van sere. Op navraag het geblyk dat hierdie plant ook in Soeloeland, Basoetoeland en Noord-Transvaal bekend is en by naturelle hoogaangeskrewe staan as geneesmiddel.

Dit wou dus voorkom asof hierdie plant in Suid-Afrika alge-

1) J.M. Watt en M.G. Breyer-Brandwijk: The medicinal and poisonous plants of Southern Africa (1932) p. 43 XXXI Amarantaceae.

2) D.G. Steyn: Vergiftiging van mens en dier. - J.L. van Schaik, Pretoria, 1949.

meen bekend is en as gevolg van sy beweerde goeie werking is besluit om dit die onderwerp van 'n plantanalitiese ondersoek te maak. Hierdie ondersoek is daarop gerig om vas te stel of daar bestanddele in genoegsame hoeveelhede in hierdie plant voorkom wat 'n bepaalde genesende uitwerking kan hê.

By identifikasie het geblyk dat die plant Achyranthes aspera Linn. is en volop in die omgewing van Potchefstroom aangetref word. Die identifikasie is deur die Nasionale Herbarium te Pretoria bevestig. Die materiaal wat gebruik is vir die ondersoek is afkomstig van die plaas Kubuta in die distrik Hlatikulu in Swaziland. As gevolg van goeie klimaatomstandighede groei die plant in daardie omgewing besonder geil.

NAME EN GEBRUIKE:

Achyranthes aspera kom nie alleen in Suid-Afrika voor nie, maar is versprei oor die hele Afrika.³⁾ Die plant staan onder 'n groot aantal naturellenamen¹⁾ bekend, na gelang van die streek waarin dit voorkom en word vir 'n groot verskeidenheid van aandoeninge gebruik.

Voorbeelde van die verskillende name is soos volg: Soeloe: "isi-Nama"; Chuana en Kwen: "Moxato"; Suto: "bohombobolelele", "mokxo-athakxala", "lenamo" en "bohomane". Daar bestaan sover bekend nie 'n Afrikaanse volksnaam vir hierdie plant nie.

Achyranthes aspera word o.a. vir die volgende aandoeninge voorgeskryf: die Soeloes gebruik 'n aftreksel van die wortels as 'n vomeermiddel in die geval van pyne in die bors. Die Krenas en Chuanas kook die plant en asem die dampe in. Hulle gebruik dit

3) A. Cavaco: Boletim Da Sociedade Broteriana 32 (2a)(1958) p. 301 - 327.

ook in 'n warm bad vir kouekoors. Die Swazis en naturellestamme van Noord-Transvaal gebruik die aftreksel en gekookte blare by die behandeling van sere.

LITERATUURCORSIG:

Daar is in die literatuur betreklik min te vind oor die samestelling en werking van Achyranthes aspera.

Bou van die plant:

Uit plantkundige oogpunt beskou is Achyranthes aspera interessant vanweë sy besondere anatomiese bou.⁴⁾ Net soos ander species van Achyranthes vertoon dit anomaliëe in dik-tegroei, en kom hier twee kollaterale vaatbondels voor wat op kenmerkende wyse deur die lengte van die stam variëer.

Joshi^{5,6)} het die verloop van hierdie twee kollaterale vaatbondels uitvoerig bestudeer en tot die gevolgtrekking gekom dat by sommige plante die twee bondels vry verloop in die internodië terwyl by plante uit 'n ander landstreek die twee bondels versmelt is. Op grond van sy waarnemings besluit hy dat die toestand waar die bondels vry verloop die primitiefste is en die landstreke waar hierdie plante voorkom sou dan die ouer tuiste van die plante wees. Gebaseer op hierdie gevolgtrekking blyk dit dan dat in Indië die oorsprong van die plant Calcutta en Bombay d.w.s die tropiese gebiede is en vandaar het die plant dan na die subtropiese gebiede versprei.

4) C.R. Metcalfe en L. Chalk: The Dicotyledons Vol: II (1950) p. 1067 - 1074. (The Clarendon Press, Oxford, 1950)

5) A.C. Joshi: Journ. Ind. Bot. Soc. X (1931) 265 - 292.

6) A.C. Joshi: New Phytologist 33 (1) (1934) p. 53 - 57.

Dastur⁷⁾ het die verloop van die vaatbondels noukeurig ondersoek en tot die gevolgtrekking gekom dat Achyranthes aspera uniek is wat die verloop van sy vaatbondels betref. Volgens hierdie ondersoeker kom daar 'n geslote ring van vaatbondels voor en binne-in hierdie ring word twee oorstane vaatbondels aangetref. Hierdie twee vaatbondels behou hulle posisie vir die verloop van een lit, maar in die volgende lit is die posisie van die vaatbondels verander, sodat hulle nou loodreg teenoor die vorige posisie staan. 'n Verklaring vir hierdie verandering is volgens Dastur dat die vaatbondels nou verbind is aan die vaatbondels wat uit die stam na die blare gaan. Die blare wat uit die knoop ontstaan (of die syntakke) staan 90° teenoor mekaar by elke agtereenvolgende knoop, en as gevolg van die verandering in posisie van die blare, vind daar 'n ooreenstemmende verandering van die posisie van die twee vaatbondels plaas.

Verspreiding van *Achyranthes aspera* oor die wêreld:

As die literatuur oor die Amarantaceae en Achyranthes in die besonder nagegaan word, val dit op hoe besonder wydversprei hierdie plant voorkom. Onderzoekers wat opnames gemaak het van die plantegroei uit verskillende dele van die wêreld, het in die grootste gedeelte van die tropiese en subtropiese wêreld spesies van Achyranthes aangetref. Veral in die lande van die Ooste word veel waarde aan die plant geheg^{8,9)} en word soms selfs bonatuurlike eienskappe daaraan toegeskryf.

Cavaco³⁾ beskryf in 'n oorsigsartikel die verspreiding van die Achyranthes in Afrika en hy stel 'n hele nuwe indeling van die

7) R.H. Dastur: Annals of Bot. 39 (1925) p. 539 - 545.

8) E. Guisumbing: Medicinal plants of the Philippines. Technical Bulletin 16 (1951) p. 263 - 265. (Manila Bureau of Printing). '51.

9) K.M. Nadkarni: Indian Materia Medica III ed. Vol: I p. 21 - 22

Achyranthes species voor aangesien so baie variëteite dwarsoor Afrika aangetref word.

Wehmer,¹⁰⁾ wat 'n sistematiese indeling gee van die meeste ondersoekte plante, dui aan dat Achyranthes aspera in Oos-Indië, Egipte en Australië voorkom. In 'n beskrywing van die flora van Yucatan in Suid-Amerika beskryf Stanley¹¹⁾ 'n groot aantal van die inheemse plante met in sommige gevalle ook 'n kort beskrywing van die gebruike. Daar word o.a. ook 'n beskrywing van Achyranthes aspera gegee - egter sonder aanduiding van sy gebruike.

Suessenguth¹²⁾ beskryf 'n nuwe variëteit van Achyranthes aspera, nl. A. aspera var. Nigro-olivaceae wat in Tanganjika gevind is. In Indië en die Filippyne kom die plant volop voor, soos blyk uit die werke van Quisumbing,⁸⁾ Nadkarni,⁹⁾ Prasad Mata en Dance,¹³⁾ Kirtikar en Basu.¹⁴⁾

Gebruike van Achyranthes aspera oor die wêreld:

So algemeen as wat die plant voorkom, so algemeen is die gebruik daarvan. Soos vroë-er genoem is die plant in Suid-Afrika geen onbekende in die volks-geneeskunde nie. Dit is in 1932 reeds deur Watt en Breyer-Brand-wijk¹⁾ as sulks beskrywe. Dit word egter in ander dele van die wê-reld ook aangewend as geneesmiddel en veral interessant is die

-
- 10) C. Wehmer: Die Pflanzenstoffe BdI (Jena, Gustav Fischer).
11) Paul C. Stanley: Field Mus. Hist. Publ. Bot. Ser. 3(3)(1930) p. 157 - 492 (p. 254).
12) K. Suessenguth: Fedde Rep. Spec. (Nov. 51)(1942) p. 194 - 208.
13) Prasad Mata en G.V. Dance: Royal Inst. Sci. Bombay, India. Indian Forest Leaflet. 95. (1947) p. 1 - 27.
14) K.R. Kirtikar en B.D. Basu: Indian Medicinal Plants, Part II (1918) p. 1061.

ooreenkoms in die aandoeninge waarvoor dit in totaal verskillende dele van die wêreld gebruik word.

E. Quisumbing⁸⁾ in sy boek oor die geneeskragtige plante van die Filippyne wy heelwat aandag aan die plant. In hierdie gebied staan die plant onder 'n hele paar name bekend, soos „Angud“, „hangod“, „Dokot-dokot“, „tibai“, „lopo-lopo“, „saramo“, terwyl die Engelse naam aangegee word as „prickly chaff flower.“ Dit word in die Filippyne as 'n diuretikum gebruik, terwyl die as, gemeng met heuning, vir hoes gebruik word.

Kirtikar en Basu¹⁵⁾ skryf aan die plant emetiese eienskappe toe (vergelyk gebruik by Soeloes). Dalziel¹⁶⁾ dui aan dat die wortels met water gemassereer vir skerpioensteke aangewend word om die pyn te verlig. Volgens Nadkarni⁹⁾ word die plant in Indië vir 'n nog groter verskeidenheid van aandoeninge aangewend. In Indië staan die plant onder 'n groot aantal name bekend, soos „Aghata“, „apa-marga“, „apang“, „safed aghedo“, „kutri“, ens. Dit kom versprei oor Indië voor en die dele wat gebruik word is die plant, blare, sade en wortels. Dit word gebruik in die vorm van 'n aftreksel of infuus van die blare, poeier van die wortel, as, pastas, ens. Die aftreksel van die blare word hier ook as 'n diuretikum gebruik. Verder word dit gebruik by diarrhee, aanbeie, hoes, as koorsmiddel, aanwendmiddel vir insektebyt- en steekwonde. Saam met opium word dit op sifilitiese sere gebruik. Verdere gebruike is as teengif by slangbyt en as saamtremiddel. Die plantekstrak in groot hoeveelhede kan aborsie veroorsaak en die wortel, vasgebind in die hare van 'n swanger vrou, sal die geboorte versnel.

15) K.R. Kirtikar en B.D. Basu: Indian Medicinal Plants. Part II (1918) p. 1065

16) J.M. Dalziel: The useful plants of West Tropical Africa. (London, 1937) p. 34.

Die as word saam met ander bestanddele gebruik vir geraas in die ore, of om 'n bloeiende neus te genees.

'n Tipiese voorbeeld van 'n voorskrif waarin Achyranthes aspera gebruik word is die volgende:⁹⁾

"Take of sesamum oil four seers, alkaline water prepared from the ashes of Achyranthes aspera sixteen seers, ashes from the plant one seer and boil them together in the usual way."

Achyranthes aspera speel dus 'n belangrike rol in die volks-geneeskunde van verskeie lande, so versprei as Indië, die Filip-pynse eilande, Suid-Amerika, Wes-Afrika, Suid-Afrika, ens.

Samestelling:

Daar is oor die chemiese samestelling van die plant heel min bekend en die ondersoek is meestal beperk tot die anorganiese asres.^{13, 17, 18)} Wat veral opval is die baie hoë kalium-gehalte van die as.

Warden^{17, 18)} het sover bekend in 1891 die eerste ondersoek gedoen op die as van Achyranthes aspera. Hy het die stingels, blare en wortels apart ondersoek en die volgende asreste gevind:

Blare	:	24.3%
Stingels	:	8.7%
Wortels	:	8.9%

Na ontleding van die as kon hy bewys dat kalium die grootste gedeelte van die as uitmaak en dat ander anorganiese elemente in baie kleiner hoeveelhede voorkom.

Die feit dat Achyranthes aspera 'n indrukwekkende hoeveelheid kalium bevat, het aanleiding gegee tot 'n ondersoek deur

17) C.J.H. Warden: Chem. News 64 (1891) 161.

18) W. Dymock, C.J.H. Warden en D. Hooper: Pharmacographia Indica. Vol. III (1893) p. 135.

Prasad Mata en Dance¹³⁾ na die moontlikheid van grootskaalse winning van kalium uit hierdie plant. Hulle ondersoek die as van die hele plant en verkry die volgende resultate:

As%	= 8.36 %
K ₂ O op plant	= 2.32 %
K ₂ O op as	= 27.74 %
Totale % oplosbare stowwe	= 41.63 %
Totale % K ₂ CO ₃	= 35.86 %
Totale % KCl	= 2.78 %
Totale % K ₂ SO ₄	= 2.99 %
Totale % vög	= 12.10. %

'n Groot oorwig van kalium ten opsigte van ander metale word ook hier aangetoon. Volgens hierdie ondersoekers kom natrium slegs in klein hoeveelhede voor en is die belangrikste suurradi-kale CO₃²⁻, Cl⁻ en SO₄²⁻ met klein hoeveelhede silikaat en PO₄³⁻.

In die werk van Wehmer,¹⁰⁾ Quisumbing⁸⁾ en Nadkerni⁹⁾ word ook melding gemaak van groot hoeveelhede kalium wat in die plant of in die as voorkom.

Wat die organiese bestanddele betref is baie min bekend en word slegs enkele gegewens in die literatuur aangetref. Volgens E. Quisumbing⁸⁾ is daar „geen alkaloiede of enige ander bestand-deel van belang nie.”

In 'n verwante spesie naamlik Achyranthes aspera var. biden-tata is daar wel 'n saponien in die blare en sade aanwesig,^{19,20,21, 22)} maar daar is geen verwysing na Achyranthes aspera nie. Dhar en

-
- 19) M. Honda en T. Sasaki: 27th Session of the Kinki Gynecological Society in Osaka, March 26, '33. Jap. J. of Obstetrics and gynecology (1934) p. 76 - 77.
- 20) M.L. Dhar en R. Gopalachari: J. Sci. and Indust. Res.(India) IIB (5)(1952) p. 209.
- 21) J. Gedeon: Arch.Pharm. U. Ber. Deutsch. Pharm.Ges. 288(60)'55. p. 417 - 418.
- 22) B.E. Read en Liu Ju-Ch'iang: Plantas Medicinalis Sinensis Peking (1927) p. 177.

Gopalachari²⁰⁾ kon in 'n alkoholiese ekstrak van die sade van die var. bidentata 2% saponien aantoon. Die smeltpunt van die saponien word gegee as $305 - 306^{\circ}$ en 'n empiriese formule van $C_{29}H_{46}O$ word vermeld. Die petroleumekstrak van die sade lewer 'n koolwaterstof met 'n smeltpunt van $64 - 65^{\circ}$ en 'n empiriese formule van $C_{31}H_{64}$. Gedeon²¹⁾ en later Gedeon en F.A. Kincl²³⁾ ondersoek die saponien wat uit Achyranthes bidentata verkry word. Hulle aanvaar Achyranthes bidentata as 'n afsonderlike spesie en nie as 'n variëteit van Achyranthes aspera nie. Op grond van die suureienskappe van die saponien en ander reaksies besluit Gedeon dat dit 'n triterpeen-sapogenien is met 'n molekulêre formule van $C_{30}H_{48}O_3$. Hierdie resultaat is in teenstelling met die gegewens van Dhar en Gopalachari²⁰⁾ wat op grond van kleur-reaksies verklaar dat die sapogenien 'n monoksiesteroïed-sapogenien is.

Gedeon en Kincl²³⁾ beskryf die metode van ekstraksie en suiwering volledig. Die saponien word gehidroliseer en die sapogenien geëkstraheer met alkohol. Uit suiwer alkohol word lang wit naalde gekry met 'n smeltpunt van $300 - 302^{\circ}$. Die molekulêre gewig bepaal volgens Rast se metode is 423 en $\alpha_D = 76^{\circ}$ (in chloroform). Read²⁴⁾ maak ook melding van 'n saponien wat in die blare en sade van Achyranthes bidentata voorkom.

Honda en Sasaki¹⁹⁾ beskryf 'n ondersoek wat deur hulle gedoen is oor die werking van die saponien uit Achyranthes bidentata in kombinasie met ander geneesmiddels. Vir hulle ondersoek

23) J. Gedeon en F.A. Kincl: Arch. Pharm. U. Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 289 (61)(1956) p. 162 - 165.

24) B.E. Read: Chinese Medicinal Plants from the Pen Ts'ao Kang Mu, A.D. 1596. 3d Ed. (1930) p. 177

maak hulle gebruik van 'n ekstrak van die wortels van die plant. Die aktiewe bestanddele is gesuiwer en die molekulêre formule bepaal, wat ooreenkom met $C_{33}H_{44}O_{11}$ of $C_{27}H_{38}O_{10}$. Die molekulêre gewig word aangegee as 579.5 of as 'n monobasiese suur as 518. Die saponien in hierdie plant is dus nie beperk slegs tot die sade nie, maar kom ook in die wortel voor.

In die familie van die *Amarantaceae* kom daar verskillende plante voor wat aantoonbare konsentrasies van vitamien C bevat.^{25,26)} Geen publikasie tot dusver maak egter enige melding van die teenwoordigheid van vitamien C by *Achyranthes aspera* nie.

In die geheel beskou is die beskikbare gegewens oor die chemiese en veral die organiese samestelling van *Achyranthes aspera* maar karig. Al wat opval is die hoë kaliumgehalte en die vraag ontstaan in hoeverre dit verantwoordelik gehou kan word vir die beweerde geneeskragtige werking van die plant.

FARMAKOLOGISTIESE ONDERSOEK:

Achyranthes aspera (Linn.Sp.Pl. ed(i)(204)²⁷⁾ is 'n regop harige vertakte kruid, 0.5-1.0m hoog.; takke tereet of onduidelik vierkantig, gegroef. Die blare is enkelvoudig, kruisgewys teenoorstaande sonder steunblare, ellipties of omgekeerd eiervormig, stomp of amperskerp, sagharig op albei vlakke, 3-6cm lank, 2-4.5 cm breed, veernerwig; blaarsteel gewoon, 0.5-2.0cm lank; are in blomstadium 4-9 cm lank, in vrugstadium verleng tot 50 cm; skutblare 3.5 cm lank, breed eiervormig, spitspuntig, genaald,

-
- 25) A.J. Hermano en Gavino Sepulveda, Jnr: Philippine Journ. Sci. 53 4 (1934) p. 379 - 390.
26) Mituda Hisateru: J. Agr. Chem. Soc. Japan 14 (1938) p. 1228 - 1236.
27) W.T. Thiselton-Dyer: Flora Capensis Vol: V. Sect. I. p. 428 - 429. (Lovell Reeve & Co. Ltd., London, 1912).

vliesagtig, blywend, skutblaartjies so lank soos die skutblare, breed, eiervormig, stekelpuntig, word hard en val af in die vrugstadium. Blondeksegmente ampergelyk, 0.4-0.6cm lank, eiervormig, langwerpig, skerp, vliesagtig en wit op die rande. Meeldrade 5, staminodia vierkantig, uitgerafel; vrugbeginsel neergedruk, omgekeerd-eiervormig, gekorrel by die bo-punt; blasie langwerpig, afgestomp, dun-vliesagtig, ongeveer 2 mm lank, ingesluit in die hardgeworde blywende blondek en skutblaartjies, glad, bruin; saad ellipsvormig; embrio gekrom. (AFBEELDING I.)

Bou van die stingel:

Soos reeds genoem besit Achyranthes aspera 'n kenmerkende en unieke anatomiese bou van die stingel. Identifikasie word deur hierdie abnormale anatomie vergemaklik en om die kenmerkende struktuur van die stingel aan te toon, is mikroskopiese snitte gemaak en gefotografeer. Die snitte is met Eau de Javelle opgehelder en gekleur met Genevese oplossing. Vir die fotografie is die snitte ingebed in gliserienjellie en met 'n voorwerpglasie afgedek. Op meegaande fotos kan die abnormale diktegroei en die kollaterale vaatbondels binne die geslote ring van vaatbondels duidelik gesien word. Die stingel is in die jong stadium rond en sag, maar sodra sekondêre diktegroei plaasgevind het word die stingel meer vierkantig en gerib. Die volgende weefsels kan in die stingel onderskei word:-

1. Epidermis.
2. Korteks.
3. Sentrale silinder.

1. Epidermis:

Die epidermis is 'n enkele laag reëlmatige selle wat



AFBEELDING NO. 1.

met 'n dun kutikula bedek is en waarin enkele stomata voorkom. Op die epidermis kom heelwat hare voor van 'n kenmerkende vorm wat twee tot viersellig, gewoonlik tweesellig is. Die lengte van die hare wissel tussen 30 en 100 μ .

2. Korteks:

Direk onder die epidermis word 'n laag selle met verdikte wande aangetref wat hoofsaaklik kollenchiem is. In hierdie kollenchiem word kristalle van Ca-oksalaat aangetref. Die laag word deur die sekondêre diktegroei op reëlmatige afstande uitgestoot of selfs verbreek, waardeur 'n golwende voorkoms verkry word.

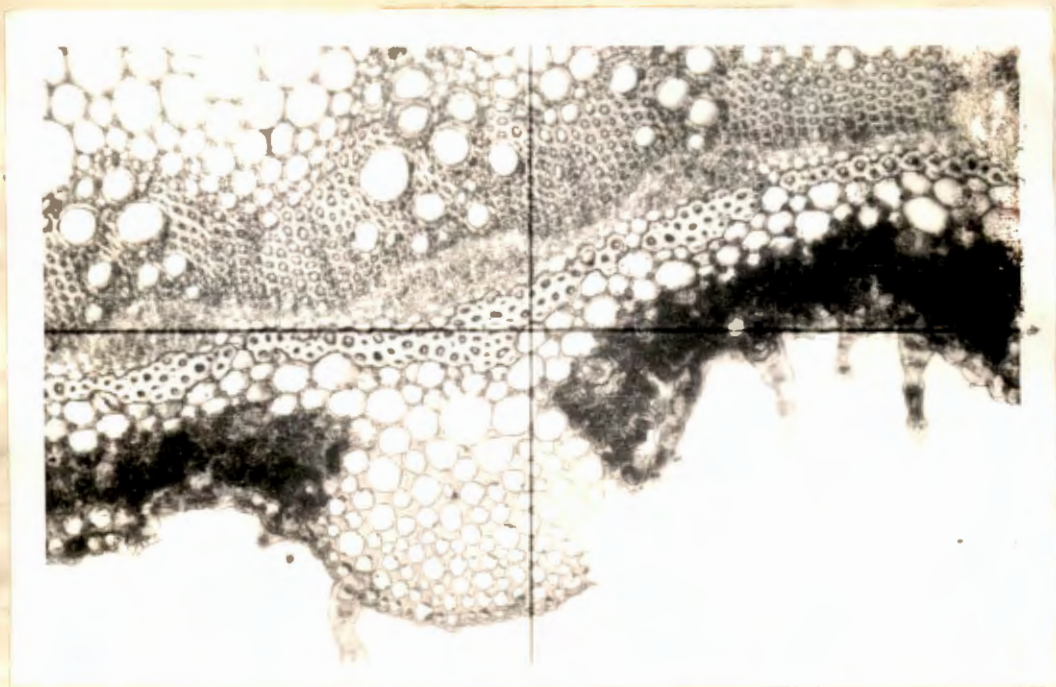
Op die kollenchiem volg 'n laag kleurlose parenchiem wat uit groterige dunwandige selle bestaan. Hierdie sellae kan duidelik in AFBEELDING 2 gesien word. Alhoewel daar sekondêre diktegroei optree in ouer stingels, kan geen kurkkambium met kurkselle aangetoon word nie. Die sekondêre diktegroei bestaan uit verhoue vaatbondelweefsel wat ingebed lê in die parenchiem.

3. Sentrale silinder:

Die sentrale silinder is die gedeelte van die stingel wat deur die aaneengeslote ring van vaatbondels ingesluit word en bestaan uit vaatbondelweefsel en murgparenchiem. Die vaatbondel-elemente is goed herkenbaar en word die verhoue vesels in die parenchiem van die skors beskou as 'n deel van die vaatbondelweefsel, aangesien dit uit die kambiumringe na buite ontstaan. Die vaatbondels is nie ingesluit in 'n vaatbondelskede nie, maar die selle in die bondel self is verdik.

Die murgparenchiem bestaan uit min of meer ronde groot dun-

ABBEIDING NO. 2.



wandige parenchiemselle. Die selle in die middel van die murg is groter as die selle verder na die periferie toe en intersellulêre ruimtes kom voor. In die murg word die twee groot kollaterale vaatbondels wat die blare voorsien aangetref.

Bou van die Blaar:

As 'n deursnit deur die blaar gemaak word, kan die volgende dele onderskei word (AFBEELDING 3):-

- | | |
|---------------------------|-----------|
| 1. Bo- en onderepidermis. | |
| 2. Palisadeweefsel.) | Bladmoes. |
| 3. Sponsparenchiem.) | |
| 4. Vaatweefsel. | |
| 5. Kristalle. | |
| 6. Hare. | |

1. Epidermis:

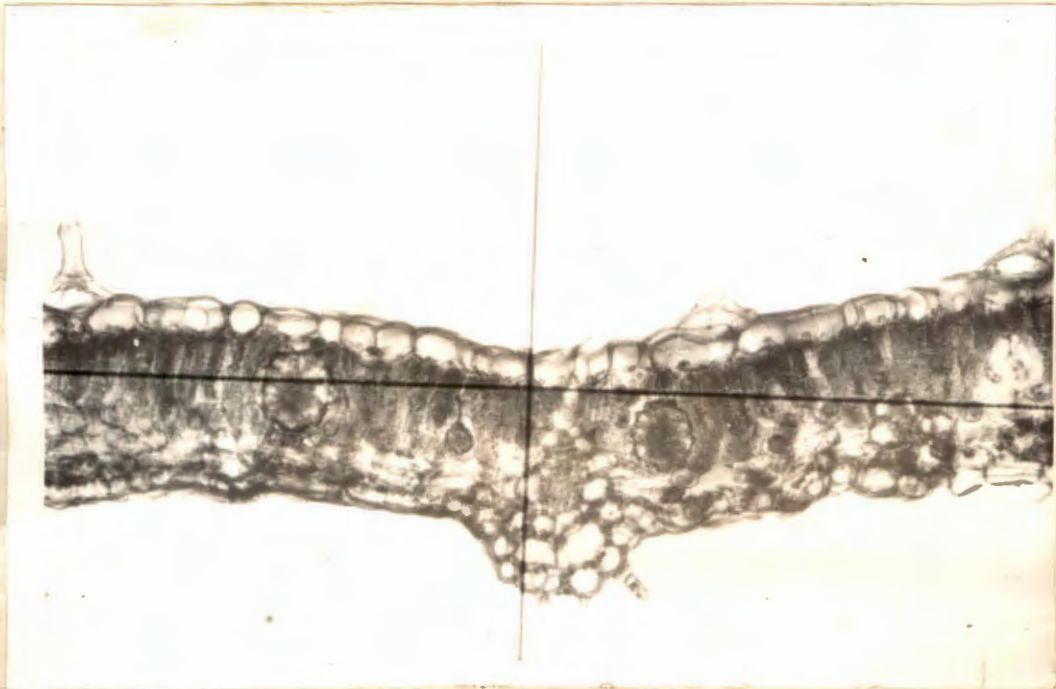
Die bo-epidermis bestaan uit 'n enkele laag van selle waaroor 'n dun kutikula versprei is terwyl op beide die bo- en onderepidermis hare van kenmerkende vorm voorkom (Sien AFBEELDING 4). Die selle van die epidermis is poligonaal gegolf en ongeveer ewegroot op beide die boonste en onderste epidermis. Huidmondjies kom aan die onderkant van die blaar voor.

2. Palisadeweefsel:

Onder die bo-epidermis word 'n laag palisadeweefsel aangetref wat uit twee lae dunwandige langwerpige selle bestaan met lugruimtes tussenin. Die palisadeweefsel grens aan die sponsparenchiem maar word hier en daar deur vaatbondelweefsel en groot kleurlose selle onderbreek.

3. Sponsparenchiem:

Hierdie laag van die bladmoes bestaan uit 'n paar lae dunwandige parenchiemselle wat baie los gerangskik is en gevolglik baie lugruimtes besit. Hierdie laag strek tot teen die



AFBEELDING NO. 3.

onderste epidermis en hierin kom baie chlorofiel voor.

4. Die vaatbondels:

Die vaatbondels is almal afkomstig uit die hoofaar, wat 'n voortsetting is van die stingelvaatbondel. Deur herhaalde vertakkinge word die netwerk van vate deur die blaar versprei. Die vaatbondels verloop tussen die palisadeweefsel en sponsparenchiem en is omring deur 'n laag dunwandige selle.

5. Kristalle:

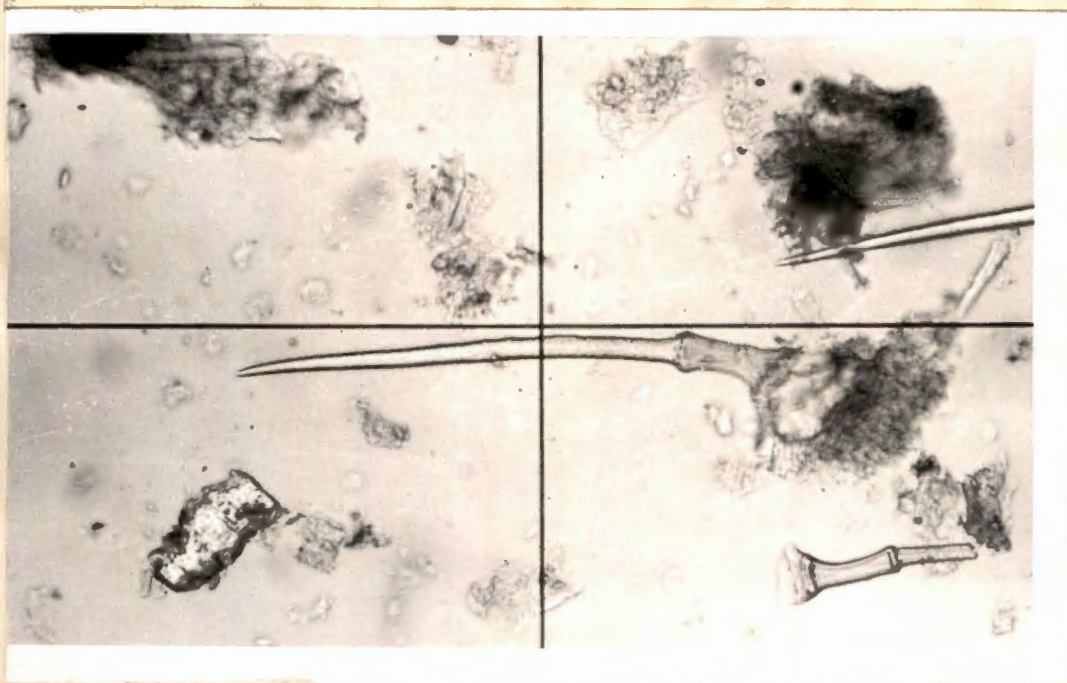
Baie groot kristalsterre van Ca-oksalaat (Grootte variëer tussen 20 - 70 μ) kom in die blaar voor, waarskynlik in spesiale selle meestal tussen die palisade en sponsparenchiem. Kristalle kom ook in die xileem van die vaatbondels voor.

6. Hare:

Die hare vertoon 'n konstantheid van vorm wat hulle baie kenmerkend maak. Hulle besit 'n baie groot basis wat op dwarsdeursnit die epidermis heeltemal skyn weg te druk. Die hare is meestal tweesellig, eenryg; soms een- en driesellig met verdikte litte en 'n duidelike lumen. Die laaste lit is lank en vertoon gestippeld. In die poeier van die blaar kan al die samestellende dele duidelik onderskei word. (AFBEELDING 4).

MATERIAAL EN BEWERKING.

Die materiaal vir die ondersoek is afkomstig van die plaas Kubuta in die distrik Hlatikulu, Swaziland, en is versamel in die somer tydens die bloei en vrugvorming. Sommige van die plante was al uitgeblom en die vrugte na aan ryp. Nadat die plante geoes was is dit in die skaduwee gedroog en deur 'n kruisslagmeule gemaal. Hierdie lugdroë poeier is ligbruin van kleur en word in



AFBEELDING NO. 4.

goed verseëelde bottels bewaar.

ANORGANIESE ANALISE.

Om te verseker dat alle resultate op dieselfde basis beoordeel word is dit nodig dat die voggehalte van die poeier bepaal word.

'n Monster word in 'n voorafgedroogde en geweegde weegfles afgeweeg en in 'n vakuum-dessikator oor fosforpentoksied geplaas. Na verwydering van die lug met behulp van 'n waterstraalpomp word die poeier vir twee uur op 60°C gedroog en na afkoeling vinnig geweeg. Die droogproses word herhaal totdat 'n konstante gewig verkry word.

Die voggehalte van die poeier:-

MONSTER	GEWIG	KONSTANTE GEWIG NA DROGING	VOGGEHALTE %	GEMIDDELDE
1	4.0022 g	3.6730 g	8.19 %	8.20 %
2	3.8994 g	3.5786 g	8.21 %	
3	3.9534 g	3.6292 g	8.20 %	

Uit die literatuur^{12,16,17)} blyk dit dat die anorganiese bestanddeel wat in die grootste hoeveelheid voorkom kalium is, saam met variërende hoeveelhede van ander elemente. Dit is van belang om vas te stel in hoeverre die anorganiese samestelling van die gebruikte plantmateriaal ooreenkom met dié van plante uit ander dele van die wêreld.

Ekstraksie van die poeier met verskillende vloeistowwe lewer betreklik groot hoeveelhede kristalle wat hoofsaaklik uit anorganiese verbindings bestaan. Om 'n volledige indruk te kry van die anorganiese samestelling word bepalinge op sowel die plant self as op die kristalle gedoen.

VOORLOPIGE TOETSE OP MOONTLIK
AANWESIGE ANORGANIESE ELEMENTE.

A. KATIONE:

Om vir die katione te toets moet 'n gedeelte van die poeier eers veras word en op hierdie as word die toetse dan uitgevoer. Dit word soos volg gedoen:-

'n Hoeveelheid van die poeier word met gekonsentreerde swawelsuur versigtig veras en verhit by 'n temperatuur nie hoër as 600°C nie totdat 'n wit asres oorbly. Vir die uitvoering van die kwalitatiewe toetse word telkens 5g van die poeier veras en die as in die kleinste hoeveelheid van die oplosmiddel opgelos.

1. Natrium:- (a) Vir die aantoning van natrium word gebruik gemaak van die feit dat natriumsinkuranielasetaat onoplosbaar is. Die reaksie word uitgevoer op 'n voorwerpglasie teen 'n donker agtergrond. 'n Druppel van die oplossing wat getoets moet word en 'n druppel van die sinkuranielasetaatreagens word toegelaat om inmekaar te vloei. 'n Geel reerslag van natriumsinkuranielasetaat ontstaan. Die grenskonsentrasie van natrium is 1:5000. Dit is egter belangrik om te sorg dat alle K^{+} verwyder is, omdat oormaat van hierdie element die reaksie steur. Dit kan verwyder word deur die toevoeging van HClO_4 .

(b) Die vlamtoets:- 'n Klein gedeelte van die as op 'n platinadraadjie word bevochtig met HCl en in 'n vlam gebring. Die intensiewe geel vlam is kenmerkend van natrium. Die gevoeligheid van hierdie vlamtoets is baie groot en albei hierdie toetse gee positiewe resultate.

2. Kalium:- (a) Die onoplosbare verbinding wat kalium met natriumkobaltinitriet vorm word gebruik om die aanwesigheid van hierdie element te bepaal. NH_4^+ gee egter in die meeste gevalle dieselfde reaksies as kalium, maar kan in die as nie meer aanwesig wees nie.

'n Druppel van 'n oplossing van die as en 'n druppel van die natriumkobaltinitrietreagens word met mekaar verbind op 'n voorwerpglasie. 'n Geel neerslag van $\text{K}_2\text{NaCo}(\text{NO}_2)_6$ ontstaan. Die gevoeligheid van die reaksie is groot - 1:100,000, maar as Na^+ teenwoordig is, neem die gevoeligheid af.

(b) Volgens Wittig²⁸⁾ gee kaliumsoute 'n wit amorf neerslag met natriumtetrafenielboraat $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{BNa}$. Op 'n voorwerpglasie word die twee druppels met mekaar verbind en 'n wit neerslag ontstaan. Hierdie reaksie is redelik gevoelig (1:50,000) maar NH_4^+ gee dieselfde reaksie en moet dus nie teenwoordig wees nie. Rb en Cs gee ook dieselfde reaksie, maar is nie in hierdie materiaal aanwesig nie.

Albei hierdie toetse is sterk positief.

3. Aluminium:- (a) Mikroskopies kan aluminium aangetoon word as die Al-Cs-Aluin, wat as kleurlose duidelikgevormde seshoekige

28) C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatiewe Chemiese Analyse (1956) p. 103. (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij. Amsterdam. 1956.)

kristalle kristalliseer.

'n Druppel van die asres-oplossing wat slegs effens suur mag wees word gemeng met 'n klein druppeltjie van 'n gekonsentreerde CsHSO_4 oplossing en toegelaat om in te damp op 'n warm plek. By indamping ontstaan die kleurlose kristalle. Die reaksie is gevoelig en eenvoudig, dog driewaardige yster en chroom gee dieselfde reaksie. Daar kan egter onderskei word deur die kristalle eenmaal met water te was en dan NH_4OH by te voeg. Die kristalle van aluminium gee 'n wit neerslag, terwyl die ander bruin of grys-groen word.

(b) 'n Gevoelige kleurreaksie (1:100,000) is die reaksie met Alizarien-S. Op 'n stukkie filtreerpapier word 'n druppel van die oplossing gebring en daarna 'n druppel van die Alizarien-S reagens. Die vlek word bo 'n oop bottel ammonia gehou en 'n persrooi kleur ontstaan. Nou word die filtreerpapier in 'n horlosieglass behandel met ca 0.2N asynsuur. By aanwesigheid van aluminium bly dan 'n rooibruin vlek agter. As daar geen aluminium teenwoordig is nie, word die vlek geel.

Hierdie reaksie is nie selektief nie en word veral deur driewaardige yster versteur a.g.v. die eie kleur. Yster moet dus eers verwyder word voordat die toets gedoen kan word.

Met albei die toetse is negatiewe resultate verkry.

4. Magnesium:- (a) Mikroskopies kan magnesium aangetoon word as $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. By 'n druppel van die oplossing word eers 'n druppel van NH_4Cl oplossing en dan 'n druppel NH_4OH gevoeg en daarna 'n korreltjie Na_2HPO_4 . Kristalle ontstaan in die vorm van vere wat dikwels X-vormig gekruis lê. By baie stadige kristallisatie

ontstaan soms klein skerpgetekende prismatiese kristalle. Lithium gee 'n identiese reaksie en indien dit teenwoordig is, moet dit eers verwyder word. Kalsium kan verhinder word om neer te slaan as Ca-fosfaat deur toevoeging van sitroensuur. Barium en Strontium kan as die sulfate verwyder word.

(b) 'n Kleurreaksie wat berus op die vorming van 'n blou kleur met chinalizarien (1, 2, 5, 8 - tetrahidroksie-antrachinon) kan soos volg uitgevoer word: 'n Druppel van die oplossing wat ondersoek word, word op 'n druppelplaat geplaas en 'n druppel van die reagens (0.05% in NaOH) toegevoeg. Die pers kleur van die alkaliese reagens word helderblou by aanwesigheid van magnesium. As broomwater toegevoeg word, verdwyn die blou kleur. Driewaardige yster en ammoniak steur die reaksie en moet dus verwyder word. Cadmium en Lanthanum gee dieselfde reaksie, maar kom nie voor nie. Die reaksie is gevoelig - 1:300,000.

Albei hierdie reaksies gee 'n twyfelagtige of swakpositiewe resultaat.

5. Kalsium:- Om te toets vir Ca, word 5g poeier veras sonder die toevoeging van swawelsuur en opgelos in Scotsuur.

(a) Mikrochemies kan kalsium m.b.v. die reaksie van Behrens-Kley ²⁹⁾ aangetoon word. Dit is feitlik die enigste tipiese mikroskopiese identiteitsreaksie op kalsium.

'n Druppel van die oplossing word op 'n voorwerpglasie droog-gedamp. Die neerslag word opgeneem in 'n druppel water en 'n spoor $2N H_2SO_4$ toegevoeg. Na verwarming tot randkristallisatie net begin

29) C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatiewe Chemiese Analyse (1956) p. 100 (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam, 1956.)

optree, ontstaan lang naalde van $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, wat dikwels in bondels verenig is. Soms ontstaan ook prisma's met skewe vlakke. Die reaksie is gevoelig - 1:300,000 vir 'n suiwer kalsium-oplossing. Groot hoeveelhede Sr, Ba en Mg verminder die gevoeligheid.

(b) As kleurreaksie kan die Murexido-toets van Beilstein³⁰⁾ gebruik word.

'n Baie klein hoeveelheid van murexide word in een druppel 2N KOH en 'n paar druppels water opgelos. 'n Blouers oplossing word verkry wat nie houdbaar is nie. Word hierby 'n oplossing gevoeg wat kalsium bevat dan verander die kleur na oranje-rooi. Word daar nou 'n korreltjie kompleks (etieleendiamientetra-asynsuur) bygesit, word die kalsium-ione stewig in 'n kompleks gebind en ontstaan die persblou kleur weer. Die reaksie is ook gevoelig, 1:250,000 maar nie selektief nie.

Beide hierdie toetse gee swak positiewe resultate.

6. Ander elemente: Verskillende toetse is uitgevoer om die teenwoordigheid van yster, mangaan, kobalt, lithium, ens. te probeer aantoon, maar alle toetse het negatiewe resultate gelewer wat daarop dui dat hierdie elemente afwesig is of in hoeveelhede voorkom wat nie met die gewone metodes aantoonbaar is nie.

B. ANIONE:

Om te probeer vasstel in watter verbindings die elemente voorkom word toetse uitgevoer op die mees algemeen voorkomende

30) C.J. van Nieuwenberg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatiewe Chemiese Analyse (1956) p. 100, (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1956)

anione.

Vyf gram van die poeier word met Na_2CO_3 en K_2CO_3 versigtig veras en gesmelt. Die res word uitgekook met water en hierdie ekstrak gebruik vir die aantoning van die anione. Vir sommige anione is gebruik gemaak van die kristalle wat by ekstraksie verkry is.

1. Halide:- Aangesien chloried algemeen in plante voorkom word op die halides in die algemeen en op chloried in die besonder getoets:

(a) Na aansuring met HNO_3 word 'n silwernitraat-oplossing toegevoeg. 'n Wit neerslag ontstaan wat weer oplos in oormaat NH_4OH .

(b) Die aanwesigheid van chloried kan bevestig word deur 'n druppel van die ammoniakaliese oplossing wat onder (a) verkry is op 'n voorwerpglasie te laat indamp op 'n warm plek. Die ammonia verdwyn uit die oplossing en die AgCl kristalliseer weer in goedgevormde tetraeders, octaeders en kubi wat baie kenmerkend is.

Hierdie toetse gee beide 'n duidelik positiewe resultaat. Bromied en Jodied kom nie in aantoonbare konsentrasies voor nie.

2. Sulfaat:- Sulfate kom ook algemeen in plante voor en die volgende toetse word aangewend:-

(a) Neerslag as $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 'n Korreltjie kalsiumasetaat word opgelos in 'n druppel water en 'n druppel van die met HCl aangesuurde oplossing wat ondersoek moet word toegevoeg. Verwarm versigtig totdat kristallisasie om die randte begin optree. Lang naalde van $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ontstaan, dikwels in bundels verenig.

Prismas met skewe eindvlakke kom ook voor.

(b) Die bekende toets vir sulfaat m.b.v. BaCl_2 kan soos volg uitgevoer word:- Omdat silikaat ook teenwoordig kan wees, moet onderskei kan word tussen sulfaat en silikaat wat albei in suur omgewing met BaCl_2 neerslaan.

'n Klein hoeveelheid van die oplossing word aangesuur met soutsuur en 'n gelyke volume 1% KMnO_4 oplossing toegevoeg. 'n Paar druppels van die BaCl_2 word bygevoeg en die neerslag afgesentrifugeer. Die kristalle word met water gewas. Die KMnO_4 vorm met die BaSO_4 mengkristalle wat ligpers tot swart vertoon. Hierdie kristalle word ook nie ontkleur deur waterstofperoksied of oksaalsuur nie. Die BaSiF_6 gee nie hierdie reaksie nie en kan dus onderskei word van BaSO_4 . Die reaksie is betreklik gevoelig (1:20,000).

Die reaksies lewer geen positiewe resultaat nie, maar is soms twyfelagtig. Sulfaat kon dus nie in goed aantoonbare hoeveelhede voor nie.

3. Silikaat:- Vir die aantoning van silikaat word die volgende toetse uitgevoer:-

(a) Deur verwarming van die as met H_2SO_4 en HF gaan die silikaat oor in 'n vlugtige silikaat (SiF_4) vorm, wat afgedamp kan word.

In 'n klein platinakroesie word 'n gedeelte van die as geplaas. Voeg 'n klein hoeveelheid NaF by en bevochtig met gekonsentreerde swawelsuur. Verhit saggies terwyl 'n plastiese voorwerp glasie met 'n druppel van 'n 1% NaCl oplossing oor die kroesie gehou word, sodat die dampe met die druppel in aanraking kom.

In die druppel ontstaan 'n troebeling van Na_2SiF_6 wat in die vorm van rosette en seshoekige plaatjies met 'n ligpienk kleur neerslaan. Hierdie reaksie is spesifiek, maar word versteur deur 'n groot oormaat boorsuur. Die reaksie is gevoelig dog dit kos 'n bietjie oefening om goeie resultate te kry.

(b) Silikaat kan ook aangetoon word as 'n blou reduksie-produk van silikomolibdeensuur.

Die SiF_4 wat ontstaan by verhitting van die as met sterk swawelsuur en NaF word opgevang in 'n druppel varsbereide NaOH en met baie verdunde NaOH oorgespoel in 'n mikrokroesie. Aan hierdie oplossing word twee druppels van 'n varsbereide 10% $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ oplossing toegevoeg en die mengsel swak suur gemaak met 4N asynsuur. Hierby word drie druppels van 'n varsbereide 5% oplossing van SnCl_2 gevoeg en net genoeg NaOH om die SnCl_2 as stanniet in oplossing te bring. Indien silikaat teenwoordig is, ontstaan reeds in die asynsuuroplossing 'n geel kleur van die silikomolibdeensuur. Met die SnCl_2 tree dan reduksie tot 'n blou driewaardige molibdeenverbinding op. Net soos in die geval van fosfomolibdeensuur word die silikomolibdeensuur makliker gereduseer as die molibdeensuur self en in hierdie geval in alkaliese omgewing deur die SnCl_2 . Fosfate en arsenate gee 'n soortgelyke reaksie, maar word nie vervluchtig deur H_2SO_4 en HF soos silikaat nie.

Hierdie reaksies is positief en daar is dus silikaat aanwesig. Die moontlikheid dat die silikaat in die vorm van sand op die blare en takke teenwoordig is is baie sterk.

4. Nitraat en nitriet:- Aangesien nitraat dikwels in plante aange-

tref word en sekere reaksies op die kristallyne res wat verkry word na ekstraksie van die plantepoeier met verskillende oplosmiddels die moontlikheid van nitraat aangedui het, word die volgende toetse uitgevoer:-

10g Droë poeier word met kokende water gemassereer vir 30 minute en die poeier afgefiltreer. Nadat die oplossing met aktiewe koolstof behandel is, word dit drooggedamp.

Bruinring toets:- 'n Gedeelte van die kristalle word opgeneem in 1 ml sterk swawelsuur en bo-op die swawelsuur word nou versigtig 'n varsbereide oplossing van ferrosulfaat gebring. By die kontakvlak ontstaan 'n bruin ring indien daar 'n nitraat of nitriet teenwoordig is. Hierdie toets is positief en selektief. Om nou vas te stel of nitraat en/of nitriet voorkom, word die volgende toetse uitgevoer.

Toets vir nitriet:- Die baie gevoelige toets (1:5,000,000) wat berus op die vorming van 'n diasoverbinding word aangewend volgens die metode van Griess.³¹⁾ 'n Paar korrels van 'n mengsel van sulfanielsuur en α -naftielamine word op 'n druppelplaat opgelos in 4N asynsuur en hieraan word 'n klein druppel van die oplossing wat getoets moet word toegevoeg. Die ontstaan van 'n pienkrooi kleur dui op die aanwesigheid van nitriet.

Hierdie toets moet uitgevoer word op die kristalle self en nie op 'n verassingsres nie, aangesien by verassing en smelting met die karbonaatsmengsel 'n reduksie van NO_3 na NO_2 kan optree.

31) C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten:- Kwalitatiewe Chemiese Analyse (1956) p. 118 (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1956.)

Selfs met hierdie gevoelige toets kon geen nitriet in die plant aangetoon word nie.

Toets vir nitraat:- Om die aanwesigheid van nitraat te bevestig word soos volg getoets:-

'n Gedeelte van die Kristallyne ekstraksieres word met sinkstof en 6N asynsuur behandel. Hierdeur vind reduksie van nitraat tot nitriet plaas en die nitriet kan soos hierbo beskryf aangetoon word. Hierdie toets is positief en kan dus aangeneem word dat nitraat in die plant aangetref word, maar dat nitriet nie 'n aantoonbare hoeveelhede voorkom nie.

5. Karbonate:- Karbonate kom algemeen in plante voor en sou dus ook in Achyranthes aspera verwag kon word.

(a) 'n Hoeveelheid van die kristalle soos berei onder die toets vir nitraat word in 'n mikrokroesie met verdunde swawelsuur en 'n spoor $K_2Cr_2O_7$ (om die vorming van SO_2 te voorkom) verhit. Oor die kroesie word 'n dekglasie geplaas waaraan 'n druppel van 'n $NaHCO_3$ oplossing hang wat met 'n spoor fenolftaleien en die kleinste hoeveelheid $NaOH$ net rooi gekleur is. Indien daar kooldsuurgas afkom word die druppel ontkleur.

(b) In plaas van 'n bikarbonaatoplossing, kan die kooldsuurgas ook opgevang word in 'n druppel van 'n strontiumasetaat en natriumasetaatoplossing. Daar ontstaan dan 'n neerslag van strontiumkarbonaat, wat onder die mikroskoop waargeneem kan word as sferoliete en afsonderlike naaldjies.

Hierdie toetse is positief en daar kom dus karbonaat in die plant voor.

5. Sianide, fosfate, fluoride:- 'n Aantal toetse is uitgevoer

om vas te stel of bogenoemde anione in die plant voorkom. Alle toetse wat uitgevoer is het egter negatiewe resultate gegee, sodat aangeneem kan word dat hierdie anione nie in beduidende hoeveelhede voorkom nie.

Uit die reaksies wat uitgevoer is kan die volgende anorganiese samestelling van Achyranthes aspera aan die hand gedoen word:-

Kalium	Chloried
Natrium	Silikaat
Kalsium	Nitraat
Magnesium	Karbonaat

KWANTITATIEWE BEPALING VAN ANORGANIESE VERBINDINGS:

Om 'n indruk te kry van die konsentrasie van anorganiese bestanddele wat voorkom word die volgende bepalings kwantitatief uitgevoer:-

1. Kalium-en silikaatbepaling op die As.
2. Kalium-en natriumbepaling op die As.
3. Kalium-en natriumbepaling op die kristallyne ekstraksieres.
4. Chloriedbepaling op die As.
5. Chloriedbepaling op die kristallyne res.
6. Nitraatbepaling op die kristallyne res.

1. Kalium- en silikaatbepaling op die as:-

Verskillende metodes,

gravimetries sowel as titrimetries kan aangewend word om die kaliumgehalte te bepaal. By hierdie ondersoek word die sogenaamde

„Kalignost" metode^{32,33,34)} gebruik. Dit is 'n gravimetriese metode wat berus op die vorming van 'n onoplosbare kompleks van kalium met natriumtetrafenielboraat - $\text{KB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$. Die neerslag wat ontstaan wanneer 'n kaliumhoudende oplossing met 'n oplossing van kalignost gemeng word kan afgefiltreer en gedroog en geweeg word. Uit die gewig van die neerslag kan die kaliumgehalte dan maklik bereken word. Die metode besit een groot voordeel en dit is dat natrium nie die bepaling steur nie. Die metode soos deur Kingsley et al³⁴⁾ uitgewerk is eenvoudig en doeltreffend en word vir hierdie bepaling gevolg.

Uitvoering van die bepaling:-

'n Hoeveelheid van die oplossing wat tussen 20 en 40 mg kalium bevat word tot 100 ml verdun met water. Twee ml van 'n mengsel van gelyke volumes ysasyn en water en 25 ml van 'n varsbereide kalignostoplossing word onder roering toegevoeg en nadat die mengsel vir 1 uur gelaat is word die neerslag deur 'n noukeuriggeweegde Gooch-kroesie of glasfilter afgefiltreer. Die neerslag word driemaal gewas met 5 ml van die Kalignost wasoplossing en vir twee uur gedroog by 110°C . Na weging kan die kaliumgehalte van die neerslag bereken word.

(a) Bereiding van die Natriumtetrafenielboraatoplossing:- 1.2g Natriumtetrafenielboraat (Kalignost) word opgelos in 100 ml gedistilleerde water en met 0.5 g Alkalivrye Al_2O_3 opgeskud vir 5 minute en gefiltreer. Hierdie oplossing is nie houdbaar nie en

32) H.W. Berkhout en G.H. Jongen: Chem. Weekbl. 51 (1955) p. 607 - 608.

33) R.M. Engelbrecht en F.A. McCoy: Anal. Chem. 28 (1956) p. 1772 - 1773.

34) W.K. Kingsley, G.E. Wolf en W.E. Wolfram: Anal. Chem. 29 (1957) p. 939 - 941.

moet elke dag vars berei word. Om die wasoplossing te maak, word 10ml van bogenoemde oplossing tot 100ml verdun.

(b) Verassing van die grondstof:- Volgens Prasad Mata en Dance¹³⁾ bevat Achyranthes aspera 2.32% kalium as K_2O . Redelikerwys kan dus aangeneem word dat 1 g. poeier tussen 20 en 40 mg kalium bevat. Die noukeuriggeweegde poeier word in 'n platina kroes bevochtig met sterk swawelsuur en versigtig veras. Die proses word herhaal totdat 'n wit asres verkry word, maar die temperatuur waarby verassing plaasvind moet nie hoër wees as $600^{\circ}C$ nie, anders bestaan die gevaar dat van die alkalimetaalverbindinge kan vervlugtig.

(c) Bepaling van silikaat:- Op die asres soos onder (b) verkry word ook die silikaatbepaling uitgevoer. Hierdie bepaling berus op die vorming van die vlugtige SiF_4 wanneer 'n silikaathoudende verbinding met H_2SO_4 en HF verwarm word.

Die wit asres word bevochtig met gekonsentreerde swawelsuur en HF en drooggedamp in 'n lugstroom. Hierdie proses word herhaal totdat 'n konstante gewig verkry word. Die vermindering in gewig hou verband met die silikaatgehalte van die grondstof.

(d) Bepaling van die kalium:- Die oorblywende asres na verwydering van die silikaat word opgelos in warm water. Die kroesie word deeglik uitgespoel met warm water, die oplossing gefiltreer en opgemaak tot 100 ml. Die bepaling word nou uitgevoer soos beskryf.

Die resultate kan soos volg in tabelvorm weergegee word:

MON- STER	GEWIG	GEWIG ASRES	GEWIG NA HF	GEWIG NEERSLAG	%KALIUM OP AS	%KALIUM OP POEIER	% Si OP AS	%Si OP POEIER
1	0.9259g	0.1407g	0.1360g	0.3055g	23.72	3.60	3.34	0.51
2	0.9669g	0.1518g	0.1469g	0.3173g	22.82	3.58	3.21	0.50
3	0.9867g	0.1546g	0.1497g	0.3232g	22.84	3.58	3.20	0.50

Gemiddelde kaliumgehalte op as = 23.13%
 Gemiddelde kaliumgehalte op poeier = 3.58%
 Gemiddelde silikagehalte op as = 3.25%
 Gemiddelde silikagehalte op poeier = 0.50%

Hierdie resultate toon ooreenkomst met dié van ander onder-
 soekers.^{13,17,18)} As gevolg van verskillende faktore soos omge-
 wing, klimaat, ouderdom van die plant, ens. is dit moontlik dat
 aansienlike variasie in die samestelling en konsentrasie van ver-
 bindings in die plant kan optree.

2. Kalium-en natriumbepaling op die as:-

Die gesamentlike bepaling van die kalium- en natriumgehalte
 word op dieselfde wyse uitgevoer as die vorige bepaling, met dié
 verskil dat nadat verassing van die plantpoeier voltooi is, die
 kalium en die natrium in die asres volgens die metode van Smith³⁵⁾
 omgesit word in KCl en NaCl. Nadat die kaliumgehalte van hierdie
 mengsel met behulp van die kalignostmetode soos deur Kingsley
 et al³⁴⁾ ontwikkel bepaal is, kan die natriumgehalte bereken word.

Die verassing van die grondstof word uitgevoer soos onder (b),
 in die vorige bepaling beskryf. Die asres wat verkry is word nou
 volgens die metode van Smith³⁵⁾ soos volg behandel:-

35) A.I. Vogel: A textbook of Quantitative Inorganic Analysis
 (1951) p. 590 - 591 (Longmans, Green and Co., London 1951).

Die as word met 'n gelyke gewig NH_4Cl (pro analise) deeglik in 'n agaatmortier gemeng en daarna word agtmaal die gewig CaCO_3 (pro analise) toegevoeg. Hierdie mengsel word versigtig, maar deeglik in die agaatmortier wat op 'n stuk glansende papier geplaat is, sodat enige poeier wat uitval weer teruggegooi kan word, gemeng. Die poeier word kwantitatief oorgebring in 'n platina-kroesie en versigtig verhit totdat geen dampe van ammonia meer afkom nie en daarna vir nog een uur. Die res word 5 tot 6 maal met gedistilleerde water uitgekook om alle KCl en NaCl te verwyder.

Ammoniumhidroksied (pro analise) word toegevoeg totdat die oplossing alkalies is en daarna 'n oplossing van $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ om al die kalsium neer te slaan. Filtreer die neerslag af en los weer in soutsuur op. Die kalsium word weer soos hierbo beskryf neergeslaan en afgefiltreer en die filtraat by die vorige filtraat gevoeg en op 'n waterbad drooggedamp. Die res word versigtig verhit om alle ammoniumsoute te verwyder, waarna dit in water opgelos en 'n paar druppels BaCl_2 oplossing toegevoeg word om enige sulfaat te verwyder. 'n Paar druppels ammoniumoksalaat en 'n paar druppels $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ oplossing word narekaar bygevoeg om die laaste spore kalsium en oornag barium onderskeidelik te verwyder. Die mengsel word oornag gelaat waarna die neerslag afgefiltreer en die filtraat drooggedamp en die droogres versigtig verhit word tot dit net om die randte wil begin smelt. Koel vir 25 minute in 'n dessikator af en weeg vinnig. Die gewig is die gesamentlike gewig van KCl en NaCl . Om die kaliumgehalte van hierdie mengsel te bepaal word die reeds beskryfte metode van Kingsley et al ³⁴⁾ gevolg en uit die kaliumgehalte kan die ander gegewens bereken word.

MONSTER	GEWIG	GEWIG $\text{KB}(6_6\text{H}_5)_4$	GEWIG KCl en NaCl	% KALIUM OP POEIER	%NATRIUM POEIER
1	0.9209g	0.2923g	0.0947g	3.46	1.40
2	0.9217g	0.2912g	0.0985g	3.37	1.61
3	0.9313g	0.2964g	0.0995g	3.49	1.46

Gemiddelde kaliumberhalte = 3.44%

Gemiddelde natriumberhalte = 1.49%

3. Kalium- en natriumberpaling op 'n kristallyne ekstraksieres:-

Tydens ekstraksies vir die ondersoek na die organiese samestelling van die plant is telkens 'n betreklike groot hoeveelheid van 'n kristallyne neerslag gekry wat positiewe resultate gee op toetse vir kalium, natrium, chloriede en nitrate.

Wanneer die poeier geëkstraheer word volgens die metode soos deur Mink³⁶⁾ beskrywe word die grootste hoeveelheid kristalle gekry. Hierdie metode is soos volg:-

'n Hoeveelheid poeier word vir 8 uur lank met chloroform geëkstraheer en daarna vir 16 uur lank met metanol. Die donkergroen oplossing word oornag in die yskas gelaat en die ontstane neerslag afgefiltreer. Hierna word aktiewe koolstof aan die oplossing toegevoeg, vir 15 minute geskud en afgefiltreer. 'n Bruingeel oplossing word so verkry.

Die metanol word onder verminderde druk afgedistilleer. By vermindering van die volume tree kristallisasie op en die kristalle

36) C.J. Mink: De Hemolytische activiteit van *Hydrocotyle vulgaris* L. p. 10 - 22. (Excelsior Uitgeverij 's Gravenhage 1957).

word afgefiltreer en met 'n klein hoeveelheid koue metanol gewas. As die moederloog nou ingedamp word, ontstaan 'n taai stroop wat by behandeling met koue metanol nog 'n neerslag gee wat afgefiltreer en gewas word.

Al die neerslae word bymekaar gevoeg en weereens gewas met koue metanol. Die produk is 'n rooikleurige kristallyne massa wat oor P_2O_5 gedroog en geweeg word. Om vas te stel watter persentasie verbrandbare materiaal teenwoordig is, word van die kristalle veras en die gewigsverlies bepaal:-

MONSTER	GEWIG POEIER	GEWIG KRISTALLE VERKRY	% KRISTALLE CP DROË POEIER	GEWIG KRISTALLE TE VERAS	VERLIES	% VERBRAND-BARE STOF
1	119.34g	2.6023g	2.18	22.0mg	1.5mg	6.82
2	117.87g	2.5960g	2.20	24.3mg	1.6mg	6.71
3	117.91g	2.5964g	2.22	31.4mg	2.1mg	6.86

Gemiddelde gewigsverlies = 6.76%

Die kristalle wat deur die metanolekstraksie verkry word, bestaan dus hoofsaaklik uit anorganiese materiaal.

Die gesamentlike bepaling van kalium en natrium in hierdie kristalle is volgens die metode van Smith³⁵⁾ en n.b.v. die kalig-nostmetode van Kingsley et al³⁴⁾ presies soos onder No. 1 en 2 beskryf. uitgevoer.

Die volgende resultate is verkry:-

MONSTER	GEWIG	GEWIG AS CHLORIED	KALIUM GEHALTE %	NATRIUM GEHALTE %
1	0.4991g	0.3519g	36.01	12.30
2	0.5013g	0.3529g	36.05	12.31
3	0.5261g	0.3694g	36.00	12.28

Gemiddelde kaliumgehalte = 36.02%

Gemiddelde natriumgehalte = 12.29%

4. Chloriedbepaling op die as:-

Bepaling van die chloriedgehalte geskied titrimetries volgens die Volhardmetode soos beskryf in die Britse Farmakopee.³⁷⁾

Vooraf word 'n bepaalde gewig van die droë poeier met 3 maal sy gewig K_2CO_3 en Na_2CO_3 in 'n platinakroesie gemeng en versigtig verhit totdat die verassing voltooi is en daarna word die mengsel net gesmelt en dan afgekoel. Die massa word opgelos in water, aangesuur met HNO_3 en nadat 'n klein hoeveelheid nitrobenseen toegevoeg is, behandel met 'n 0.1N silvernitraatoplossing. Die oormaat silvernitraat word bepaal deur te titreer met ammoniumtiosianaat en uit die resultaat kan die chloriedgehalte bereken word.

Resultate:-

MONSTER	GEWIG DROË POEIER	% CHLORIED OP DROË POEIER	GEMIDDELTE % CHLORIED
1	923.9mg	0.81	0.81
2	925.1mg	0.80	
3	917.4mg	0.81	

5. Chloriedbepaling op die kristallyne ekstraksieres:-

Hierdie bepaling word uitgevoer op die kristalle wat verkry is nadat die ekstraksie volgens Mink³⁶⁾ soos onder No. 3 beskryf uitgevoer is. Die bepaling word uitgevoer sonder voorafgaande verassing van die kristalle, volgens die metode van die Britse Farmakopee³⁷⁾ soos hierbo beskryf.

37) Britse Farmakopee: (1958) p. 148.

Resultate:-

MONSTER	GEWIG	% CHLORIED OP KRISTALLYNE EKSTRAKSIERES	GEMIDDELDE % CHLO- RIED OP KRISTALLYNE EKSTRAKSIERES
1	27.5mg	10.97	10.93
2	26.5mg	10.90	
3	27.2mg	10.92	

6. Nitraatbepaling op die kristallyle ekstraksieres:-

Die metode van Johnson en Ulrich soos beskryf deur Paech en Tracey³⁸⁾ word gebruik vir hierdie bepaling.

Nitrate vorm gekleurde verbindings met 'n hele aantal organiese stowwe soos brucine, difenielamine, fenoldisulfonsuur, ens. en baie van hierdie reaksies is aangewend vir die bepaling van nitraat. Die metode van Johnson en Ulrich berus op die vorming van 'n geelgekleurde ammoniumsout van 1:2:4-nitrofenoldisulfonsuur. Die intensiteit van die geel kleur kan visueel teen 'n standaardreeks vergelyk word of m.b.v. 'n kolorimeter bepaal word en die konsentrasie van nitraat bereken word. Chloried en organiese materiaal steur by hierdie bepaling en moet dus vooraf verwyder word. Die bepaling geskied soos volg:-

'n Hoeveelheid van die oplossing wat ondersoek word word in 'n beker vinnig gemeng met 'n oplossing van silwersulfaat. Direk hierna word natriumfosfaat toegevoeg om die oormaat silwer neer te slaan. Die mengsel word vir twee uur gelaat en daarna gefiltreer.

38) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. I (1955) p. 481 - 483. (Springer verlag, Berlin, 1955).

'n Gedeelte van die filtraat word gemeng met kopersulfaat en 'n mengsel van kalsiumhidroksied en magnesiunkarbonaat toegevoeg. Na een uur word die neerslag afgesentrifugeer. 'n Gedeelte van die helder vloeistof word drooggedamp en ra afkoeling met fenoldisulfonsuur bevochtig. Nadat die residu in water opgelos is, word oormaat 50% NH_4OH bygevoeg, opgemaak tot 'n bepaalde volume en die ligabsorpsie gemeet. Die standaardreeks word gemaak deur verskillende hoeveelhede van 'n standaard nitraatoplossing op dieselfde manier te behandel.

Vir hierdie bepaling is 'n Engel-Kipp kolorimeter met filter No. 45 gebruik en met behulp van die standaardreeks word 'n yk-kurve opgestel. By die konsentrasies wat gebruik is, voldoen hierdie grafiek aan die wet van Beer. (GRAFIEK I.)

(a) Bereiding van die standaardoplossing:- 0.5055g KNO_3 (p.a.) word afgeweeg, opgelos in gedistilleerde water en verdun tot presies een liter. In hierdie oplossing bevat elke ml. 0.07mg stikstof as NO_3 .

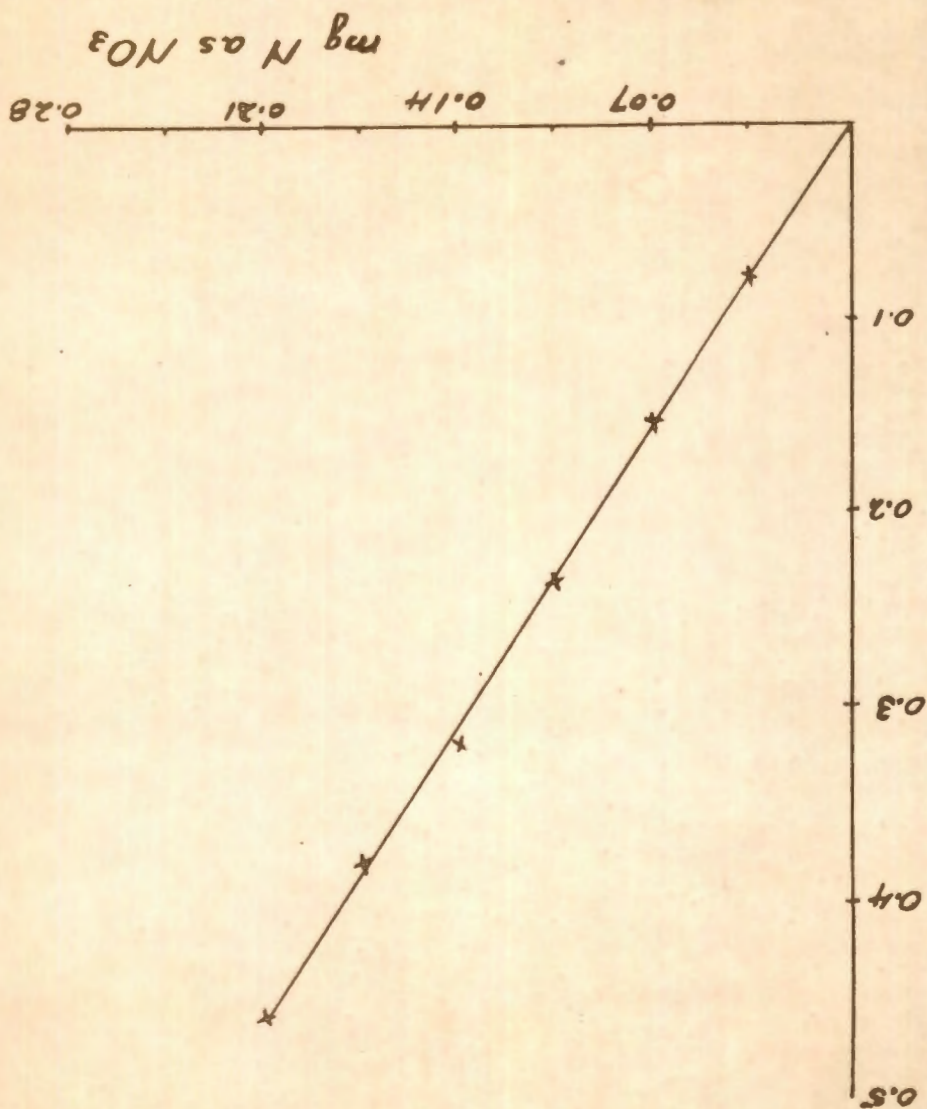
Die standaardreeks is berei deur 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 en 0 ml te neem en soos hierbo beskryf te behandel.

(b) Bereiding van die oplossing wat ondersoek word:- Ongeveer 100.0mg van die kristalle word noukeurig afgeweeg en opgelos tot presies 100ml met gedistilleerde water. In hierdie oplossing is 1ml = 1mg.

10ml van hierdie oplossing is telkens gebruik vir die bepaling.

Die volgende resultate word verkry:-

GRAFIEK 1



Ykkurve:-

STANDAARD	E
0.5	0.076
1.0	0.153
1.5	0.234
2.0	0.320
2.5	0.380
3.0	0.460

Nitraatbepaling:-

MONSTER	E	AANTAL mg STIKSTOF	% N as NO ₃
1	0.312	1.425	14.25
2	0.314	1.427	14.27
3	0.312	1.425	14.25

GEMIDDELDE STIKSTOFGEHALTE VAN DIE
KRISTALLE : 14.26%

Uit hierdie gegewens blyk dit dat daar 'n betreklik hoë persentasie NO₃ teenwoordig is.

7. Kalsium- en Magnesiumbepaling op die as:-

'n Baie gerieflike metode vir die bepaling van hierdie ione is om gebruik te maak van 'n kompleksometriese titrasiemetode waardeur die twee bepalinge gekombineer kan word. As kompleksvormende verbinding word dinatriumetileendiamientetra-asynsuur gebruik en die Ca²⁺ in die oplossing teen murexide indikator by 'n pH van hoër as 12 getitreer terwyl die Mg²⁺ ione teen Eriochroomswart T indikator by 'n pH van tussen 8 en 11 getitreer word. Vir die uitvoering van hierdie bepaling word die metode van Schilz en Krynauw³⁹⁾ gebruik. Aangesien daar in die plant nie fosfate in noemenswaardige hoeveelhede voorkom nie, is dit nie nodig om die suiwering met behulp van ioonuitruilers uit te voer nie.

Reagense: (a) E.D.T.A.-oplossing: Los 4 gram dinatriumetileen-

39) W.E. Schilz en G.N. Krynauw: Anal. Chem 28 (1956)
p. 1759 - 1761.

diamientetra-asetaat in water op, voeg 0.2g magnesiumchloried-kristalle toe en vul aan tot een liter. Laat die oplossing oornag staan en filtreer dan.

(b) Standaard CaCl_2 -oplossing: Een gram kalsiumkarbonaat wat vir 3 uur by 105^0 gedroog is word in die kleinste hoeveelheid verdunde soutsuur opgelos en aangevul tot presies een liter met gedistilleerde water.

(c) Murexide indikator: In 'n mortier word 0.1g ammoniumpurpuraat fyngemaak en deeglik vermeng met 100g droë natriumchloried (pro analyse).

(d) Eriochroomswart T indikator: Los 0.5g Eriochroom swart F241 en 4.5g hidroksielamienhydrochloried in 100ml etanol (95%) op.

(e) Ammonia-Ammoniumchloried buffer: Voeg 67.5g ammoniumchloried by 570ml sterk ammoniumhidroksied en verdun tot een liter.

Metode:

Die E.D.T.A.-oplossing word op beide murexide en Eriochroomswart T gestandardiseer met behulp van die standaard kalsiumchloriedoplossing.

Verassing van 'n geskikte gewig van die plantpoeier word met behulp van waterstofperoksied en salpetersuur in 'n platina-kroesie uitgevoer. Die as word opgelos met behulp van soutsuur en drooggedamp en die res opgeneem in presies 50ml water.

Bepaling van die kalsium: Los 0.2g hidroksielamienhydrochloried in 10ml van hierdie oplossing op en voeg dan 0.25g KCN, 1 ml 4N NaOH en 0.15g murexide indikator by. Titreer met die E.D.T.A.-oplossing totdat die kleur van ligroos na rooipers omslaan. Gebruik 'n

blanko om die kleuromslag te bepaal.

$$\text{Ca}^{2+} (\text{mg per } 100\text{g}) = \frac{\text{Xn} \times 20.04 \times 1000 \times 100 \times 5}{\text{M}}$$

x = aantal ekwivalente per ml E.D.T.A.-oplossing.

n = titer (ml).

M = Gewig poeier.

Bepaling van Magnesium:

Los 0.2g hidroksielamienhydrochloried in 10ml van die oplossing op en voeg dan 0.25 g KCN, 1 ml van die ammonia-ammoniumchloried-buffer en ses druppels Eriochroomswart T by. Titreer met E.D.T.A.-oplossing totdat die kleur van pers na 'n helder blou omslaan.

$$\text{Mg}^{2+} (\text{mg per } 100\text{g}) = \frac{(\text{yM} - \text{xn}) 12.16 \times 1000 \times 100 \times 5}{\text{M}}$$

y = aantal ekwivalente per ml E.D.T.A.
(Eriochroomswart T as indikator.)

m = $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ titer (ml).

x = aantal ekwivalente per ml E.D.T.A.
(Murexide as indikator).

n = Ca^{2+} titer (ml).

M = Gewig poeier.

Resultaat:

MONSTER	GEWIG POEIER	Ca^{2+}	Mg^{2+}	% Ca^{2+}	% Mg^{2+}
1	2.5004	523.5mg	336.6mg	0.52%	0.34%
2	2.5049	527.4mg	311.2mg	0.53%	0.31%

Gemiddelde kalsiumgehalte op droë stof = 0.53%

Gemiddelde magnesiumgehalte op droë stof = 0.32%

ONDERSOEK NA DIE ORGANIESE SAMESTELLING:

Op grond van die gegewens uit die literatuur verkry en die beweerde werking van ekstrakte van Achyranthes aspera word die materiaal ondersoek vir die aanwesigheid van verskillende groepe van verbindings wat moontlik die werking sou kon veroorsaak. Die ondersoek word in hoofsaak gerig op die volgende verbindings:-

1. Saponiene.
2. Steroïede.
3. Triterpene.
4. Glikosiede.
5. Suikers.
6. Askorbiensuur, looisuur en ander organiese sure.
7. Flavone.
8. Alkaliede.

Voordat oorgegaan word tot die bespreking van die analise word kortliks die metodes wat by die ondersoek gebruik is in die algemeen bespreek. Vir elke individuele groep verbinding is hierdie metodes dan aangewend en gewysig soos die omstandighede dit vereis.

METODES VAN EKSTRAKSIE EN DIE SUIWERING VAN DIE EKSTRAKTE:

Ekstraksiemetodes:-

Aangesien vir 'n wye verskeidenheid van verbindings met wyd uiteenlopende fisiese eienskappe getoets word, is dit noodsaaklik om verskillende ekstraksiemetodes te gebruik om aan te pas by die tipe van verbinding waarna gesoek word. Daar is hoofsaaklik van die volgende vier metodes gebruik gemaak:-

1. Perkolasie met water.
 2. Soxhletekstraksie met organiese vloeistowwe.
 3. Masserasie met verskillende konsentrasies alkohol.
 4. Bereiding van 'n infuus.
-

1. Perkolاسie met water:-

Die poeier word bevogtig met water, vir 4 uur gelaat en dan in 'n perkulator gepak. Glasperkolatore word gebruik met 'n kapasiteit van ca.80g. Die poeier word so uniform as moontlik ingepak en met 'n skyf filtreerpapier bedek. Bo-op die filtreerpapier word 'n lagie skoon sand gestrooi. Perkolاسie vind plaas teen 'n tempo van ongeveer 30 druppels per minuut en word volgehou totdat die perkolaat kleurloos deurloop. Perkolate wat so verkry word is donkergroen van kleur met 'n sterk donkerrooi fluoressensie. Hierdie metode van ekstraksie word gevolg om die effek van hitte op moontlik aanwesige stowwe sover moontlik te beperk en word veral aangewend vir die ondersoek na suikers, glikosiede, looisure en askorbiensuur.

Die perkolaat word teen verminderde druk en lae temperatuur ingedamp en verdere ekstraksiemetodes toegepas wat vir die onderskeie verbindings waarna gesoek word, noodsaaklik is.

2. Soxhlet ekstraksie met organiese vloeistowwe:-

Die poeier word in die houer van 'n soxhletapparaat gepak en 'n stukkie watte bo-op geplaas om dit vas te hou. Om soveel as moontlik van die plantkleurstowwe en vette te verwyder word eers vir 'n geskikte periode met petroleumeter of chloroform geëkstraheer. 'n Donkergroen vetagtige residu word verkry na afdamp van die oplosmiddel en hierdie residu word bewaar vir latere ondersoek.

Nadat die geëkstraheerde poeier goed gedroog is, word met suiwer metanol of ander organiese vloeistof geëkstraheer vir 'n verdere 10 - 16 uur. 'n Bruin tot groen gekleurde oplossing word

verkry wat ingedamp word onder verminderde druk en temperatuur. Hierdie metode word hoofsaaklik aangewend vir die ondersoek na saponiene, steroïede, alkaloïede en triterpene.

3. Masserasie met verskillende konsentrasies van alkohol:-

Konsentrasies van 20%, 50% en 80% etanol in water word hoofsaaklik aangewend. Die poeier word met die warm oplosmiddel gemeng en vir 24 tot 48 uur gelaat om te massereer. Die ekstrak word deur middel van filtrasie en persing verwyder en 'n bruin-groen gekleurde oplossing word verkry wat deur verdere behandeling opgehelder en ingedamp kan word. Hierdie metode word hoofsaaklik aangewend vir die ondersoek na suikers, glikosiede, locisure, flavone, alkaloïede, ens.

4. Bereiding van 'n infuus:-

Aangesien die gebruike van die plant meestal op die bereiding van 'n infuus berus, word dieselfde metode ook in hierdie ondersoek toegepas. 'n Gedeelte van die plantpoeier word in 'n houer geplaas en kookwater daarop gegooi. 'n Bruin ekstrak word na persing en filtrasie verkry. Hierdie metode word hoofsaaklik gebruik by die ondersoek na suikers en ander wateroplosbare verbindings.

Opheldering van die ekstrakte en verwydering van die anorganiese verbindings.

As gevolg van die baie hoë soutgehalte van Achyranthes aspera word die ondersoek na organiese bestanddele baie bemoeilik. Dit is gevind haas onmoontlik te wees om die anorganiese verbindings te verwyder sonder dat 'n groot gedeelte van die organiese verbindings ook uit die ekstrak verdwyn.

'n Verdere probleem was die groot hoeveelheid plantkleur-

stowwe wat geëkstraheer word. Verskeie metodes is aangewend om van die kleurstowwe en anorganiese verbindings ontslae te raak.

1. Aktiewe koolstof.

Die ekstrak word behandel met geaktiveerde koolstof (Merck) in 'n verhouding van 1g/20ml ekstrak. Na 15 minute word die koolstof afgefiltreer. Met hierdie metode word 'n aansienlike hoeveelheid van die plantkleurstowwe verwyder, maar 'n geelbruin gekleurde oplossing word gekry wat by indamping donkerbruin word. Hierdie kleur word nie deur koolstof verwyder nie.

2. Basiese loodasetaat.

Wanneer die ekstrak behandel word met cormaat basiese loodasetaat ontstaan 'n digte neerslag. Na filtrasie is die oplossing feitlik geheel en al kleurloos, maar by indamping tot 'n klein volume ontstaan 'n liggeel gekleurde oplossing. Die cormaat lood kan verwyder word met H_2S . Die nadeel van die loodasetaatmetode is egter dat nie alleen die plantkleurstowwe verwyder word nie, maar ook ander organiese verbindings wat belangrik mag wees. Hierdie metode kan dus alleen gevolg word wanneer na stowwe gesoek word wat nie met basiese loodasetaat sal neerslaan nie. Die algehele verwydering van die lood kan ook probleme oplewer, veral as met 'n neutrale oplossing gewerk word.

3. Aluminiumoksied.

Aluminiumoksied volgens Brockmann word in die vorm van 'n kolom aangewend. Die oplossing wat ontkleur moet word, word op die kolom aangebring en met 'n geskikte vloeistof ge-elueer.

Die eluaat is feitlik kleurloos. By indamping tot 'n klein volume is die oplossing egter weer bruingekleurd en hierdie kleur word nie deur aktiewe koolstof verwyder nie. By nadere ondersoek

het geblyk dat 'n relatief groot hoeveelheid vaste stof aan die aluminiumoksied geadsorbeer is, wat na elusie met warm water en opheldering met koolstof as vuilwit kristalle teruggekry kon word. Verbrandingsanalise⁴⁰⁾ het getoon dat hierdie kristalle anorganies van aard is. 'n Nadeel is dat klein hoeveelhede aluminiumoksied in die eluaat opgemerk word wat nie deur filtrasie verwyder kon word nie. Die aluminiumoksied is dus nie 'n baie geskikte middel vir ontkleuring van hierdie ekstrakte nie.

4. Kieselguhr.

Kieselguhr gee in die betrokke gevalle 'n baie geringe kleurvermindering van die ekstrakte en is as sodanig feitlik nutteloos. Dit is egter baie geskik as filtermassa by die aanwending van koolstof as adsorbsiemiddel by die ondersoek van glikosiede⁴¹⁾ en suikers.

5. Kwantitatiewe papierchromatografie.

Hierdie metode word beide vir ontkleuring sowel as verwydering van die soute aangewend. Vir die uitvoering van hierdie metode word 'n baie dik chromatografiepapier (sg. Whatman „seedtest" paper) gebruik. Op 'n geskikte afstand van die onderpunt van die papier word 1 - 2 ml van die oplossing wat gesuiwer moet word in die vorm van 'n streep aangebring. Die papier word in 'n chromatografiebak geplaas en nadat minstens 24 uur toegelaat is vir ewewig om in te tree word volgens die opstygende metode gechromatografeer.

40) N.D. Cheronis en J.B. Entrikin: Semimicro Qualitative Organic Analysis (2nd Ed.) p. 169 - 171. (Interscience Publishers Inc., New York).

41) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd.II p. 310 (Springer-Verlag, Berlin, 1955).

Op die papier ontstaan bande met verskillende R_F -waardes wat uitgesny kan word en die aanwesige stowwe kan dan m.b.v. elusie of ekstraksie van die papier verwyder word. Baie van die bande is slegs onder U.V. lig sigbaar.

Hierdie metode vind veral toepassing by die finale skeiding van organiese verbindings, aangesien die groot hoeveelheid elektroliet en kleurstowwe wat in die oorspronklike oplossing teenwoordig is, geneig is om 'n uniforme verspreiding van kleurstowwe oor die chromatogram te gee of oormatige stertvorming te veroorsaak. Waar egter 'n mengsel verkry is van min of meer suiwer stowwe, is hierdie metode 'n baie elegante manier om skeiding van hoeveelhede van tot 1 gm te bewerkstellig. Sigbaarmaking van bande op die chromatogram kan op twee maniere geskied:

1. Onmiddellik nadat die chromatogram uit die bak gehaal en nog vogtig is, word dit op 'n stuk chromatografiese papier neergelê en 'n afdruk gemaak. Na droging kan hierdie afdruk dan met kleurreagense behandel word en die bande op die egte chromatogram afgemerkt word.

2. Na droging word 'n 1 cm breë strokie van die chromatogram afgesny en met die reagense behandel. Op hierdie strokie ontstaan dan die bande, wat weer op die res van die chromatogram afgemerkt kan word. Die verskillende bande kan uitgesny en verder behandel word.

6. Fullersaarde.

'n Posing word aangewend om fullersaarde te gebruik vir die ontkleuring van die ekstrakte, maar net soos in die geval van die kieselguhr is die resultate swak. Dit kan ook beter aangewend word as filtermassa, om die snelheid van filtrasie te bevorder.

Metodes wat aangewend is vir die verwydering van die soute wat teenwoordig is.

Soos reeds gemeld is die papierchromatografie sonder noemenswaardige sukses vir hierdie doel aangewend. Ander metodes wat gevolg kan word, sluit ioonuitruiling en die aanwending van organiese vloeistowwe waarin die soute nie of baie sleg oplos in.

Ioonuitruiling:

Ioonuitruiling geskied met behulp van ioonuitruilingsharse, wat vir die eerste maal in 1935 deur Adams en Holmes⁴²⁾ berei is. Die hars wat deur hulle berei is was 'n kondensasieprodukt van fenolsulfonsuur met formaldehyd en die SO_3H -groep in hierdie verbinding was verantwoordelik vir die werking. Na hierdie sintese is 'n groot reeks van sintetiese harse berei, beide met katioonaktiewe sowel as anioonaktiewe groepe. Hierdie aktiewe groepe wissel van sulfongroepe, aminogroepe, karboksiel-, hidroksi- en ammoniumgroepe. Daar word 'n onderskeid gemaak tussen sterk en swak uitruilharse, op grond van die mate van ionisasie wat in die aktiewe groepe optree. Harse met sterk gefoniseerde groepe soos SO_3H en NR_3 word sterk uitruilharse genoem en harse met gedeeltelik gefoniseerde groepe soos COOH en OH word swak uitruilharse genoem. Die eienskappe van die harse (Merck, tipe I, II, III, IV) wat in hierdie ondersoek gebruik is, kan tabellaries soos volg weergegee word.

42) B.A. Adams en E.L. Holmes: J. Soc. Chem. Ind. 54 (1935)
p. 1.

HARS.	I	II	III	IV
TIPE	STERK SUUR KATIOON UITRUI- LER	SWAK BASIE- SE ANIOON UITRUILER	STERK BASIE- SE ANIOON UITRUILER	SWAK SUUR KATIOON UITRUILER
Aktiewe groep	Sulfonsuur	Amine	Kwaternêre Ammonium groep	Karboksiel groep
Korrel- grootte	0.4 - 0.6mm	0.4 - 0.5mm	0.35-0.6mm	0.3 - 0.5mm
PH gebied	4-14	0 - 7	1-12	6 - 14
Uitruil kapasiteit	ca. 4.5 Mekw/g	ca.5 Mekw/g	ca. 3 Mekw/g	ca. 10 Mekw/g
% Vog	45 - 55	45 - 55	50-60	40 - 50

As gevolg van die manier waarop die harse gevorm word, is hulle heeltemal poreus en vind die reaksie nie net op die oppervlakte plaas nie, maar deur die hele struktuur en as gevolg hiervan vind die ionuitruiling vinnig plaas en kan 'n betreklike hoë elusiesnelheid gehandhaaf word. Die kolomme wat gebruik is tydens die ondersoek bestaan uit glasbuis 30 cm x 20 mm, wat aan die onderent voorsien is van 'n sinterglasskyfie en 'n kraan waardeur die vloei van die eluaat gereguleer kan word.

Die harsbed word soos volg berei:-

Die hars word gemeng met water en die mengsel in die kolom gegiet tot die gewenste lengte verkry is. Hierna word met gedistilleerde water gewas totdat die eluaat kleurloos is. Om nou die hars in sy aktiewe vorm te kry

word 'n oplossing van HCl of NaOH, na gelang van die tipe van hars, deur die kolom gestuur. Die hoeveelheid van die aktiverende oplossing is verskillend vir die verskillende harse en word deur vervaardigers aangegee, of kan eksperimenteel bepaal word. Na aktivering word die kolom weereens met gedistilleerdewater gewas totdat die reaksie van die eluaat neutraal is op lakmoes.

Nadat die kolom op hierdie wyse voorberei is, word die oplossing wat ondersoek word op die kolom gebring en dan teen 'n tempo van ongeveer 5 ml/min ge-elueer met klein hoeveelhede gedistilleerde water. Verskillende fraksies van die eluaat word opgevang en getoets vir die aanwesigheid van soute.

Van die kombinasies wat gebruik is het soos verwag kon word, die kombinasie: sterk suur en sterk basiese uitruilers goeie resultate gegee en is algehele verwydering van soute verkry. Soos uit die tabel gesien kan word is die kapasiteit van die harse egter nie baie groot nie, met die gevolg dat groot kolomme gebruik moet word vir die verwydering van die hoë konsentrasie van soute. Dit blyk ook dat hierdie harse bykans alle vaste stowwe uit die oplossing terughou en dat baie min deur elusie teruggewin word.

Aanwending van organiese vloeistowwe:

Verskillende organiese oplosmiddels is aangewend by die ekstraksie van die plantmateriaal in 'n poging om die ekstraksie van anorganiese verbindings tot 'n minimum te beperk. Die metode was egter nie baie suksesvol nie, aangesien die soute by herhaalde ekstraksie in 'n soxhletapparaat tog dermate geëkstraheer word dat hulle steur by verdere bepalings. In die meeste van die oplosmiddels wat gebruik kon word vir die doel het veral die kalium-

soute tog nog 'n aanmerklike oplosbaarheid gehad, bv. ekstraksie met suiwer metanol gee by indamping nog 'n aansienlike anorganiese res. Ekstraksie met etielasetaat daarenteen, ekstraheer nie noemenswaardige hoeveelhede anorganiese verbindings nie, maar ook baie min organiese materiaal in hierdie spesifieke geval. Petroleumeter en Chloroform het ook geen anorganiese verbindings geëkstraheer nie, maar slegs die vette en 'n gedeelte van die kleurstowwe.

Met spesifieke ekstraksiemetodes vir bepaalde tipes van verbindings is egter meer sukses behaal. Hierdie metodes sal onder die verskillende verbindings volledig bespreek word.

CHROMATOGRAFIE:

By die ondersoek na die verskillende verbindings is op groot skaal van papierchromatografie sowel as van kolomchromatografie gebruik gemaak, nie alleen omdat dit 'n skeiding van moontlike aanwesige verbindings kan bewerkstellig nie, maar ook omdat dit die organiese verbindings en anorganiese soute kan skei.

Papierchromatografie:

Papierchromatografie is 'n mikrometode vir die kwalitatiewe en ook kwantitatiewe analise van mengsels van verbindings waar die hoeveelhede van aanwesige stowwe beperk kan wees tot enkele mikrogramme. Die groot voordeel van hierdie metode is dat skeiding en identifisering van 'n groot aantal naverwante verbindings soos bv. aminosure of suikers met eenvoudige middels en 'n minimum van arbeid en tyd bewerkstellig kan word. Dit is dus 'n ideale metode vir die ondersoek van plantekstrakte, plantsappe, grondekstrakte, hidrolisate van eiwitte, ens.

Die publikasies oor papierchromatografie tel reeds in die duisende, ten spyte van die feit dat daar maar eers in 1944 deur Consden, Gordon en Martin⁴³⁾ 'n bruikbare metode ontwikkel is.

Die meganisme van papierchromatografie:

Volgens Hermans⁴⁴⁾ absorbeer filtreerpapier ca 22% water uit 'n atmosfeer versadig met waterdamp en volgens Consden, Gordon en Martin⁴⁵⁾ dien hierdie geabsorbeerde water as die stasionêre fase tydens 'n chromatografiese skeidingsproses. Die skeiding word bewerkstellig deur die verdeling van die verbinding tussen die stasionêre waterfase en die bewegende organiese fase. Die sukses van die skeiding hang dus slegs van die verdelingskoëffisiënt af, wat die verhouding van die relatiewe oplosbaarheid van die verbinding in die twee fases is. Die snelheid waarmee 'n verbinding oor die papier beweeg of die afstand wat dit afgelê het, word betrek op die afstand wat die vloeistoffront beweeg het en word die R_F -waarde genoem ("Retention factor" volgens Consden, Gordon en Martin, 1944).

$$R_F = \frac{\text{Afstand waaroor vlek verplaas is}}{\text{Afstand waaroor vloeistoffront verplaas is.}}$$

Aangesien hierdie R_F -waarde op 'n gegewe papier slegs afhanklik is van die verdelingskoëffisiënt is dit net so 'n spesifieke konstante as kookpunt of smeltpunt en dit besit die voordeel dat dit nie so afhanklik van onsuiverhede is soos ander fisiese konstan-

43) R. Consden, A.H. Gordon en A.J.P. Martin; Biochem. J. 38 (1944) 224-232.

44) P.H. Hermans: Physics and Chemistry of Cellulose Fibres. p. 543. (Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1949).

45) R. Consden, A.H. Gordon en A.J.P. Martin; Biochem J. 38 (1944) p. 224.

tes nie. Dit val nie binne die bestek van hierdie verhandeling om dieper op die teoretiese aspek van chromatografie in te gaan nie en sal slegs enkele metodes en faktore wat 'n rol speel by die korrekte uitvoering van die metode beskryf word.

Papierchromatografie kan op verskillende maniere aangewend word nl. opstygend, afdalend, sirkelchromatografie, tweedimensionele chromatografie, ens. In hierdie ondersoek word gebruik gemaak van afdalende en stygerde chromatografie. Die stygende chromatografie is die eenvoudigste om uit te voer en soos die naam aandui word die papier in die loopvloeistof gehang en die vloeistof deur kapillêre krag omhoog getrek. Met hierdie metode kan gewoonlik nie langer chromatogramme as ca 30cm gemaak word nie, aangesien die swaartekrag op hierdie hoogte in ewewig met die kapillêre krag is. Met die afdalende metode kan chromatogramme van feitlik enige lengte gemaak word.

Faktore wat 'n rol by papierchromatografie speel:

1. Ewewig. Gewoonlik word ontwikkelvloeistowwe soos fenol en butanol versadig met water en die waterryke fase in 'n bakkie in die chromatografiebak geplaas om te verhoed dat water tydens die ontwikkeling uit die loopvloeistof verdamp. Dit is noodsaaklik dat die atmosfeer van die bak in ewewig gebring word met hierdie waterryke vloeistof en gewoonlik word 24 uur toege-
laat vir hierdie proses. As die bak baie groot is, kan filtreerpapier in die vloeistof gehang en teen die wande geplak word.

2. Temperatuur: Consen et al⁴⁵⁾ het bewys dat temperatuurskommelinge hoofsaaklik die waterkonsentrasie van organiese

loopvloeistowwe beïnvloed. By sommige vloeistowwe het variasie in temperatuur (bv. fenol) min invloed, maar by ander (bv. collidine) ontstaan aansienlike afwykings. Dit is dus gewens om die temperatuur so konstant as moontlik te hou om afwykings van die R_F -waardes te voorkom.

3. Die Papier: Dit is belangrik om vir 'n bepaalde ondersoek die regte tipe van papier te gebruik. Die mees algemeengebruikte papiere is Whatman No. 1, wat ook tydens hierdie ondersoek aangewend is, Whatman No. 3 en 4, en Schleicher en Schull (SS) 589 en 595.

4. Afstand van die vlekke van mekaar: Die mengsels wat op die papiere gebring word vir chromatografiese skeiding, moet sover as moontlik van mekaar geplaas word sodat die vlekke mekaar nie sal beïnvloed tydens die ontwikkeling van die chromatogram nie. Aangesien die vloeistoffront naby die randte van die papier beïnvloed word deur kragte wat nie in die middel aanwesig is nie, moet mengsels ook nie te naby aan die kante geplaas word nie. Vir algemene gebruik word aanbeveel dat die vlekke nie nader as 2.0 - 2.5cm aanmekaar geleë moet wees nie.

Nadat hy 'n studie van die faktore wat die reproduseerbaarheid van 'n chromatogram beïnvloed gemaak het, beveel Bate-Smith⁴⁶⁾ die volgende aan:-

- (a) Die temperatuur moet binne $\pm 0.5^\circ$ konstant gehou word.
- (b) Die looptyd moet konstant gehou word.
- (c) Die papier moet vir 24 uur in die bak gelaat word, sodat ewewig kan intree tussen die papier en die atmosfeer in die bak.

46) E.C. Bate-Smith: Partition Chromatography Biochemical Society Symposia 3 (1950) p. 62.

- (d) Dieselfde reeks papier moet vir al die chromatogramme gebruik word.
- (e) 'n Kontrolevlek moet op elke chromatogram geplaas word. As die R_F -waarde met meer as ± 0.02 van die standaard afwyk, moet vars loopvloeistowwe gebruik word.
- (f) As loopvloeistowwe gebruik word wat veranderinge ondergaan soos bv. esterifikasie, moet hulle vir drie dae by die werkstemperatuur gelaat word voordat hulle gebruik word.

METODE:

1. Chromatografiebakke:

Dieselfde bakke kan vir stygende sowel as dalende chromatografie gebruik word. Vir die ondersoek is gebruik gemaak van bakke waarin chromatogramme met 'n lengte tot 40cm gemaak kan word. Vir dalende chromatogramme word gebruik gemaak van 'n glastrog wat deur 'n spesiale houer bo in die bak vasgehou word.

2. Aanbring van die vlekke:

Die vlekke word m.b.v. 'n mikropipet op die papier aangebring. Daar bestaan 'n groot verskeidenheid van pipette wat vir hierdie doel gebruik kan word, o.a. 'n bloedsuikerpipet of mikrometerskroefpipet. Die pipette wat tydens hierdie ondersoek gebruik is, is eenvoudige selfbereide pipetjies wat ge-yk is. Twee pipette is gebruik, een wat ge-yk is op 3 ~~ml~~ en een wat ge-yk is op 6 ~~ml~~ en hulle bestaan uit 'n kapillêre buisie wat afgeslyp is om die regte volume te lewer en in 'n glashouer gemonteer is.

Die vloeistof word op die papier aangebring in die vorm van

'n vlekke met 'n deursnit van ca 4mm of in die vorm van 'n dun strepie. Indien die volume sodanig is dat dit 'n vlek sal gee wat te groot is, moet 'n klein hoeveelheid uit die pipetjie opgeplaas en eers gedroog word voordat 'n volgende hoeveelheid bykom. Op hierdie manier bly die vlekke klein en word 'n duidelike chromatogram verkry.

3. Ontwikkeling:

Nadat die vlekke op die papier aangebring is, word dit in die chromatografiebak gehang. Onder in die bak word 'n hoeveelheid van die waterige fase geplaas en die bak van die lug afgesëel deur 'n geslypte glasplaat. Minstens 24 uur moet toegelaat word vir ewig om in te tree. Hierna word die papier in die loopvloeistof geplaas en by konstante temperatuur gelaat om te ontwikkel.

As die chromatogram 'n geskikte lengte bereik het, word dit uitgehaal en die front dadelik gemerk en dan gedroog. Droging kan na gelang van omstandighede in 'n oond of in die lug plaasvind.

4. Sigbaarmaking van die vlekke:

Die sigbaarmaking van die vlekke kan op verskillende maniere gedoen word en berus hoofsaaklik op twee beginsels, nl. die gebruik van gevoelige kleurreaksies waardeur die vlekke sigbaar gemaak word, of die gebruik van reagent wat met die verbindings op die chromatogram reageer om vlekke te gee wat onder U.V. lig sigbaar word. Die sigbaarheid onder U.V. lig kan die gevolg wees van fluoressensie of die absorpsie van die U.V. strale.

Die reagent wat gebruik word kan op verskillende maniere op die papier aangebring word bv. deur verwing, sproeiing, deursyging,

damp, ens. Die mees algemene metode is egter om die reagens in die vorm van 'n mis m.b.v. 'n verstuiwer oor die papier te sproei. Na droging of verdere behandeling ontstaan die vlekke en kan die R_F -waardes bepaal word.

5. Hoeveelhede wat aantoonbaar is:

Die minimum hoeveelhede wat aangetoon kan word, word bepaal deur die gevoeligheid van die reaksie wat gebruik word om die vlek sigbaar te maak. Die variasie in gevoeligheid is aansienlik, soos uit die volgende voorbeelde sal blyk:

By die sigbaarmaking van monosaccharides word silwernitrat as algemene en naftoresorcinol as spesifieke reagens gebruik. Met die silwernitrat kan hoeveelhede van $2\mu\text{g}$ aangetoon word, terwyl met die naftoresorcinol die gevoeligheid ca $30\mu\text{g}$ is. In die geval van organiese sure word oor die algemeen $40 - 100\mu\text{g}$ gebruik om duidelike chromatogramme te kry. By die terpene is veral groot variasie aangetoon, bv. p - simeen, pulegon en kaneel-aldehyd onder U.V. lig. Die minimum konsentrasie wat nog waar-geneem kan word is $143\mu\text{g}$, $3.3\mu\text{g}$ en $9\mu\text{g}$ onderskeidelik.

Wanneer die chromatografiese skeiding uitgevoer word, moet daar met bg. feit rekening gehou word, anders mag dit voorkom dat 'n verbinding wat wel teenwoordig is, nie aangetoon word nie.

Die aanpassing van die tegniek soos dit hierbo beskryf is, sal vir elke betrokke geval aangedui word.

1. SAPONIENE:-

Daar word verskillende male^{19,20,21,22,23,24)} melding gemaak van 'n saponien wat in 'n naverwante spesi van Achyranthes voorkom. Dit is dus voor die handliggend om vas te stel of daar

in Achyranthes aspera ook 'n saponien voorkom.

Saponien besit die eienskap dat dit bloed kan hemoliseer en van hierdie eienskap word gebruik gemaak om te toets vir die aanwesigheid daarvan. Vir hierdie bepaling word gebruik gemaak van die metode soos deur Mink³⁶⁾ beskrywe. In hierdie metode word die hemolise vergelyk met hemolise veroorsaak deur 'n standaard, berei van 'n saponien met bekende hemolitiese indeks.

As 'n maat van die hemolitiese aktiwiteit van 'n bepaalde plantekstrak word die hemolitiese indeks (H.I.) bepaal. Die H.I. kan gedefiniëer word as die aantal ml 1% bloedoplossing wat der lg saponienhoudende materiaal gehemoliseer word. Om foute as gevolg van variasie in die bloedmonsters uit te skakel, word van 'n standaard saponien gebruik gemaak. In hierdie geval het die standaard saponien (Merck) 'n hemolitiese indeks van 24,000.

Dit is belangrik dat alle saponiene uit die plantmateriaal verwyder is voordat die bepaling uitgevoer word. Om dit te verseker, word van verskillende ekstraksievloeistowwe gebruik gemaak en die ekstrakte op verskillende maniere berei.

(a) Bereiding van die standaardreeks:

(0.2% Saponienoplossing).

200mg saponien (Merck) word opgelos in 100ml bufferoplossing (pH = 7.4). Een ml van hierdie oplossing word verdun met 9ml buffer en die oplossing verder as standaard gebruik. Op hierdie wyse berei, word 'n 0.2% saponienoplossing verkry.

(b) Bereiding van die Bufferoplossing:

(Runge se fosfaatbuffer, pH = 7.4)

In 'n 1 liter maatfles word agtereenvolgens 3.95g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.76g KH_2PO_4 en 7.2g NaCl in vars gekookte gedistilleerde water opgelos en opgemaak tot een liter. Hierdie

oplossing is isohidries en isotonies met osbloed.

(c) Bereiding van 'n 2% osbloedverduunning:

By die bereiding van die bloedverduunning, moet sorg gedra word dat alle apparaat wat gebruik word steriel is en stolling van die bloed word met Na-sitraat verhoed. Tien sekondes nadat 'n os gedood en die Arteria carotis afgesny is, word 'n gedeelte van die bloed in 'n fles opgevang. Met behulp van 'n steriele pipet word 18ml van die bloed by 2ml van 'n steriele 3.65% Na-sitraatoplossing gevoeg en gemeng. Hierdie oplossing kan vir hoogstens 8 dae in 'n yskas bewaar word.

Met 'n steriele pipet word nou 1ml van die bloed in 'n 50ml erlenmeier gepipetteer en 44ml van die bufferoplossing toegevoeg. Hierdie 2% bloedverduunning moet vir elke bepaling vars berei word.

(d) Bereiding van die plantekstrak:

Volgens Mink⁴⁷⁾ kan die plantmateriaal totaal uitgeput word d.m.v. soxhlet-ekstraksie met metanol. Die volgende metode lewer die beste resultate:-

Een gram van die plantpoeier word eers vir 6 uur lank met chloroform geëkstraheer en daarna vir 8 uur met metanol. Die metanolekstrak word verdun tot 50ml met metanol en hiervan word 10ml by 'n temperatuur laer as 80°C ingedamp. Die droogres word opgeneem in 10ml bufferoplossing. Sodoende word 'n 2% plantekstrak verkry en die hemolitiese aktiwiteit van hierdie ekstrak word vergelyk met die standaard.

(e) Metode:

Sewe met chroomswawelsuur gereinigde proefbuisse van feitlik

47) C.J. Mink: De Hemolytische aktiwiteit van *Hydrocotyle vulgaris* L. p. 25 - 26. (Excelsior Uitgeverij 's Gravenhage 1957).

gelyke diameter word van een tot sewe genummer. In elke buis vanaf No. 2 tot 7 word 1ml van die buffer geplaas en in buis No.1 word 1ml van die gebufferde ekstrak geplaas. In buis No. 2 word 1ml van die gebufferde ekstrak bygevoeg, deeglik gemeng en 0.5ml hiervan oorgeplaas in No. 3 ens. tot by No. 7. Na menging word 0.5ml uit buis No. 7 verwyder en weggegooi.

Op presies dieselfde manier word nou 'n standaardreeks berei met behulp van die saponienoplossing. Op hierdie wyse ontstaan 'n reeks waarvan die konsentrasie telkens met 'n faktor van 1/3 verminder. Aan elke buis word 1ml van die 2% bloedverdunning toegevoeg en na 15 min. versigtig geskud. Die lesings word na 4, 12, 24 en 36 uur geneem en die mate van hemolise bepaal. By die aflees word nagegaan watter buis nog net volledige hemolise vertoon - d.w.s. die buis waar daar nog net geen heel rooibloedliggaampies op die bodem van die buis opgemerk word nie.

Die resultate van die proef kan soos volg opgesom word:-

NO. VAN BUISE.

TYD. UUR	1		2		3		4		5		6		7	
	STD.	ON.	STD.	ON.	STD.	ON.	STD.	ON.	STD.	ON.	STD.	ON.	STD.	ON.
4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

STD. = Standaard saponienoplossing.
 ON. = Plantekstrak.
 + = Hemolise.
 - = Geen hemolise.

Soos uit die tabel afgelees kan word, tree daar in die geval van die plantekstrak geen hemolise op nie, behalwe na 36 uur. In hierdie geval is die hemolise ook nie duidelik nie en tree dit slegs by die onverdunde oplossing op.

As gevolg van hierdie waarneming word die proef berhaal, maar hierdie keer word 10g plantpoeier gebruik i.p.v. 1g, om vas te stel of die saponiene moontlik in klein hoeveelhede teenwoordig is. Presies dieselfde resultate word egter behaal en dit blyk in hierdie geval dat daar nie hemolise na 36 uur optree nie, maar slegs verandering in die kleur van die bloed.

Uit bg. feite blyk dit dat daar geen saponiene in aantoonbare hoeveelhede in Achyranthes aspera voorkom nie, selfs nie eers as 'n 20% plantekstrak gebruik word nie. In die standaardreeks vind hemolise nog plaas in buis No. 3 en na 24 uur ook nog in buis No. 4, wat 11.1 μ g saponien bevat. Die konsentrasie aan moontlike saponiene in die plantekstrak is dus laer as 0.005%.

2. STEROÏEDE:

Gedagtig aan die feit dat sterofiede in baie plante voorkom en verwantskappe vertoon met sekere tipes van saponiene, word 'n aantal toetse uitgevoer om vas te stel of daar enige sterofiedagtige verbinding teenwoordig is in ekstrakte van hierdie plantmateriaal.

Bereiding van die ekstrakte:

Honderd gram van die poeier word in soxhletapparate gepak en vir 8 uur lank met chloroform geëksraheer. Die poeier word gedroog en dan vir 12 uur met metanol geëksraheer. Die chloroformekstrak word versigtig drooggedamp en die donkergroen res bewaar sodat toetse daarop uitgevoer kan word.

Die metanolekstrak word met 5 - 8g aktiewe koolstof behandel, vir 15 minute gelaat terwyl dikwels geroer word en dan gefiltreer. Die geelbruin gekleurde oplossing word onder verminderde druk en temperatuur ingedamp tot 20ml (1ml = 5g poeier). Die oplossing word oornag in die yskas gelaat en die kristalle wat ontstaan aigefiltreer. Die oplossing word verdun met koue metanol tot 100ml, weer met aktiewe koolstof behandel en weer ingedamp, hierdie keer tot 10ml. Die kristalle wat so ontstaan, word aigefiltreer en by die vorige gevoeg. Die oplossing wat verkry word is bruin van kleur en word gebruik vir die kleurreaksies sowel as vir die papierchromatografie. Die reaksie word uitgevoer op:-

- (i) die chloroform res,
- (ii) die kristallyne res en
- (iii) die metanolekstrak.

1. Kleurreaksies:

Verskillende van die reaksies wat uitgevoer is gee ook positiewe resultate indien triterpene teenwoordig is.

(a) Reaksie van Salkowski: 'n Paar mg van die kristalle of van die metanolekstrak wat drooggedamp is, word met gekonsentreerde swawelsuur behandel. 'n Geel kleur ontstaan as stereoïede teenwoordig is.

(b) Reaksie van Liebermann-Burchard: 'n Paar mg van die stof word opgelos in 1 ml warm asynsuuranhidried en een druppel gekons. swawelsuur toegevoeg. 'n Groenkleuring ontstaan onmiddellik, of geleidelik deur rooi en blou na groen.

(c) Reaksie van Tschugajew: 'n Oplossing van die stof in chloroform word met asetiellchloried behandel en dan met SnCl_2 gekook. 'n Rooi kleur met groengeel fluoressensie ontstaan.

Hierdie kleurreaksies gee almal negatiewe of afwykende resultate en om groter sekerheid te kry, word gebruik gemaak van papierchromatografie.

2. Papierchromatografie:

Hoeveelhede wat wissel van 10 - 100 μ g word op die papier aangebring met behulp van 'n mikropipet. Net soos by die kleurreaksies word chromatogramme gemaak van aldie die fraksies wat tydens die ekstraksieproses verkry is.

Ontwikkelvloeistof en papier: Vir hierdie doel word 30 - 40cm breë stroke Whatman No. 1 papier gebruik en afdalende chromatogramme gemaak.

Die volgende mengsel het geskik geblyk te wees vir die papierchromatografie van steroïede: 500ml Tolueen, 500ml petroleumeter, 700ml metanol en 300ml water. In hierdie sisteem tree die waterige metanol as die stasionêre fase op en word chromatogramme met 'n lengte van 30 - 35cm in ca 10 uur verkry.

Sigbaarmaking van die vlekke: Nadat die chromatogramme gedroog is by kamertemperatuur, word hulle deur 'n 15% fosforsuur-oplossing getrek en vir 20 minute by 90°C gedroog. Die fosforsuur reageer met die steroïedkern om fluoresserende verbindings te gee wat onder U.V. lig sigbaar is. Hierdie is 'n algemene metode en kan 'n groot aantal steroïedverbindinge so aangetoon word. Die gevoeligheid van die reaksie lê tussen 1 en 10 μ g.

Nie een van die chromatogramme het positiewe resultate gegee nie en het slegs bruin strepe op die met fosforsuur behandelde chromatogramme ontstaan. Alle resultate dui op die afwesigheid van steroïede in beduidende hoeveelhede, soos uit die gevoeligheid van die reaksies afgelei kan word.

3. TRITERPENE:-

Hierdie verbindings is ook nou verwant aan sommige tipes van saponiene en word die plant dus ook ondersoek na die aanwesigheid van triterpene. Meeste van die toetse wat vir die aantoning van sterofiede gebruik is, gee ook positiewe resultate vir triterpene.

Die volgende spesifieke toetse word verder aangewend:-

(a) Reaksie van Hirschsohn:- 'n Klein hoeveelheid van 'n triterpeen met trichloorasynsuur verwarm gee 'n geel tot rooi kleur.

(b) Reaksie van Kahlenberg:- 'n Klein (ca 1%) hoeveelheid opgelos in chloroform gemeng met 5ml van 'n reagens bestaande uit 80ml antimoonpentachloried + 80ml chloroform en na 5 minute met 10ml chloroform verdun, gee 'n pers tot blou kleur.

Net soos in die geval van die sterofiede word die toetse uitgevoer op aldie die fraksies wat verkry word met metanolekstraksie. In hierdie geval word egter ook nog op die plant self 'n toets uitgevoer volgens die metode van Kariyone en Hashimoto,⁴⁸⁾ wat soos volg lui:

Een druppel asynsuuranhidried word op 'n blaar geplaas en die druppel van onder met 'n mikrobrander vir 'n paar sekondes warm gemaak, totdat die kutikulêre bestanddele oplos. Die oplossing word in 'n kapillêre buisie opgesuig en 'n druppel gekonsentreerde swawelsuur agterna opgesuig. Indien daar 'n triterpeen teenwoordig is, tree rooikleuring in die grensvlak op. (Liebermann-Burchard reaksie). Reaksies soos die reaksie van

48) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse Bd. III p. 66. (Springer Verlag, Berlin 1955)

Hirschsohn en die metode van Kariyone en Hashimoto⁴⁸⁾ is baie gevoelig en word aangewend vir die aantoning van mikrohoeveelhede. Triterpene kom dus nie in beduidende hoeveelhede in Achyranthes aspera voor nie.

4. GLIKOSIEDE:-

Glikosiede is in die meeste gevalle labiele verbindings en kan ontleding baie maklik teweeggebring word deur verskillende omstandighede, bv. glikosiede word maklik gehidroliseer deur ensieme (glikosidases) wat in die plant voorkom. Indien die moontlikheid bestaan dat 'n glikosied deur so 'n ensiem of enige ander faktor tydens droging of ekstraksie vernietig kan word, moet spesiale voorsorgmaatreëls getref word om dit te verhoed. Uit die feit dat ekstrakte van Achyranthes aspera van die gedroogde sowel as die vars materiaal gemaak word en blykbaar ewe goed werk, kan afgelei word dat indien 'n glikosied teenwoordig is, dit betreklik stabiel moet wees.

Die aanwesigheid van 'n glikosied kan op twee maniere aangetoon word, nl. deur aantoning van die suiker wat na hidrolise ontstaan, of deur gebruik te maak van een of ander spesifieke eienskap wat deur die aglikon bepaal word, soos bv. fluoressensie of 'n kleurreaksie.

As algemene metode vir die ekstraksie van glikosiede word die vermoë van koolstof om die verbindings uit 'n waterige oplossing te adsorbeer gebruik.⁴⁹⁾ Saccharides darenteen, word sleg geadsorbeer en kan uitgewas word. Na adsorpsie kan die glikosiede weer met behulp van organiese oplosmiddels ge-elueer word

49) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse Bd.II. p. 301. (Springer Verlag, Berlin 1955.)

en verder chromatografies of spektrofotometries ondersoek word.

'n Eenvoudige metode van glikosiedekstraksie wat dikwels goeie resultate gee is die metode van Herissey⁵⁰⁾ wat as begin-sel het die neerslag van die nie-glikosiede met loodasetaat en die ekstraksie van die glikosiede self met etielasetaat.

(a) Adsorpsie aan koolstof: Een kg van die poeier word met 3 l kookwater gemeng en vir drie uur gelaat terwyl dikwels geroer word. Die massa word in 'n tinktuurpers gepak en die vloeistof uitgepers. Die donkergroen oplossing word deur kieselguhr gefiltreer en die filtraat met aktiewe koolstof (Merck) in 'n verhouding van 2 - 4 g per 100 g van die poeier gemeng. Die koolstof word vooraf met 'n bietjie water gekook om lug te verwyder. Nadat die mengsel vir 20 minute gestaan het, word net soveel kieselguhr as koolstof bygevoeg en deur 'n Buchnertregter gefiltreer. Die filtraat word nou met 12g uitgekookte koolstof per 100 g droë materiaal behandel en vir 20 minute gelaat terwyl dikwels geroer word. Na toevoeging van 'n oormaat Kieselguhr (minstens tweemaal meer as koolstof) word die mengsel deur 'n dubbele laag filtreerpapier gefiltreer en die neerslag goed met water gewas om te verseker dat die stowwe wat nie geadsorbeer is nie, verwyder word. Na droging van die neerslag word dit fyngemaak en met 50% etanol geëkstraheer. Verskillende hoeveelhede vars etanol word gebruik om volledige ekstraksie te bewerkstellig. Die etanolekstrak word onder verminderde druk en temperatuur tot 'n dun stroop ingedamp en met twee volumes metanol behandel. Die neerslag wat ontstaan word afgefiltreer en die helder filtraat weer ingedamp onder verminderde druk en later op 'n waterbad tot-

50) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse Bd. II. p. 309. (Springer Verlag, Berlin 1955).

dat kristallisatie optree.

Geen kristallisatie tree in hierdie geval op nie en slegs 'n klein hoeveelheid taai stroop bly oor wat selfs oor P_2O_5 gedroog nog taai bly. Vir die toetse wat uitgevoer is op hierdie res, word dit eers verdun tot 10ml, sodat 1ml=100g poeier.

(b) Loodasetaatmetode van Herissey:⁵⁰⁾ Hierdie metode besit die voordeel dat dit nie gebruik maak van sterk reagentiese of filtratie nie. 'n Nadeel is egter dat groot hoeveelhede etielasetaat nodig is vir die ekstraksie.

Vyfhonderd gram van die poeier word vir 'n kort rukkie met 2 l 80% etanol gekook en die ekstrakt d.m.v. 'n tinktuurpers uitgepers. Die groenbruin gekleurde oplossing word na filtratie onder verminderde druk en temperatuur saam met 'n klein hoeveelheid $CaCO_3$ ingedamp totdat 'n volume verkry word waar 100ml = 100g vars plantmateriaal of 50g droë poeier. 'n 20% Loodasetaatoplossing word versigtig by die oplossing gevoeg totdat net geen neerslag meer ontstaan nie en daarna word nog 1/10 van die reeds toegevoegde loodasetaatoplossing bygevoeg. Die mengsel word in 'n mortier deeglik gemeng met anhidriese Na_2SO_4 in 'n verhouding van 1g Na_2SO_4 /1ml van die ekstrakt en daarna met gepresipiteerde $CaCO_3$ in 'n verhouding van 0.25g vir elke 0.5 - 1.0g toegevoegde Na_2SO_4 . Nadat die mengsel vir 'n tydlank gestaan het, vorm dit 'n jellie-agtige massa wat op 'n porseleinteël oorgesprei en gedroog word. Indien dit nodig is kan die massa in die finale stadium van droging in 'n oond verhit word tot 'n temperatuur nie hoër as $35^{\circ}C$ nie. Die gedroogde massa word in 'n mortier fyngegraad en met etielasetaat gemeng. Die ekstraksie met etielasetaat word 'n paar keer herhaal en na filtratie word die ekstrakt

ingedamp. Geen kristallisatie tree op nie en slegs 'n klein droogres word verkry.

Die reste van beide ekstraksieprosesse word met behulp van die papierchromatografie ondersoek, voor en na verhitting met soutsuur. Afdalende chromatogramme met lengtes van 30 - 35cm is gemaak en hoeveelhede van 3 - 6 μ l is ondersoek. Ontwikkeltye variëer tussen 10 - 16 uur, na gelang van die ontwikkelvloeistof wat aangewend is.

Ontwikkelvloeistowwe:-

1. Butanol : Asynsuur : water	4:1:5
2. Chloroform:Metanol : water	5:5:1
3. Tolueen : Petroleumeter : Metanol : water	5:5:7:3

Whatman No. 1 papier word deurgaans gebruik.

Die ekstraksiereste word verdeel en een gedeelte met HCl behandel vir 1 uur, daarna drooggedamp en die res opgeneem in 'n klein hoeveelheid water of alkohol. Van beide die met HCl behandelde sowel as onbehandelde oplossings word 3 - 6 μ l hoeveelhede op die papier aangebring en die papiere toegelaat om vir 24 uur in die afgeslote bakke te hang voordat ontwikkeling begin is.

Sigbaarmaking van die vlekke:- Die volgende reagentse word aangewend om die vlekke sigbaar te maak:-

1. Trichloorasynsuur: Met hierdie reagens word by stercoïedglikosiede fluoresserende vlekke onder U.V. lig waargeneem.

2. Fosforsuur: Die chromatogramme word deur 'n 15% fosforsuuroplossing getrek en daarna by temperatuur van 90°C gedroog. Hierdie metode is ook 'n algemene metode vir stercoïedglikosiede.

3. Naftoresorcinol: 100mg naftoresorcinol word opgelos in

80ml etanol en 20ml 2N HCl. Hierdie is 'n spesifieke suiker-reagens wat ook 'n aanduiding gee van die tipe van suiker wat teenwoordig is. Die reagens word m.b.v. 'n verstuiwer oor die chromatogram gesproei en vir 10 minute by 75°C gedroog. Daar ontstaan vlekke van verskillende kleure vir verskillende tipes van suikers.

4. 'n Algemene metode wat nie spesifiek is nie, maar wat in samewerking met ander reagentse nuttig kan wees is 'n 1% KMnO_4 -oplossing wat 2% Na_2CO_3 bevat. Die reagens word ook oor die papier gesproei en dan effens verwarm. By die aanwesigheid van oksideerbare verbindings ontstaan daar wit of ligbruin vlekke op 'n pers agtergrond. Hierdie reagens is gevoelig tot 'n konsentrasie van 2 μg oksideerbare verbinding.

Al bg. reagentse het negatiewe resultate gelever. Daar kan dus met veiligheid aangeneem word dat geen glikosied teenwoordig is nie, of slegs in konsentrasies kleiner as 1:1,000,000.

5. SUIKERS: Suikers kom in haas alle plantweefsels in klein hoeveelhede voor en tydens die voorgaande ondersoek het dit geblyk dat hier ook suikers waargeneem kon word. Aangesien suikers oor die algemeen nie van besondere betekenis is vir die genesing van sere of insektebyte nie, word slegs vir die doel van volledigheid 'n ondersoek gedoen na hierdie groot groep van verbindings, eerstens om vas te stel of daar enige suiker is wat in besonder groot hoeveelhede voorkom en tweedens watter tipes van suikers onderskei kan word.

Die gerieflikste en doeltreffendste manier om die suikers te ondersoek is met behulp van die papierchromatografie. Aangesien met waterige en alkoholiese ekstrakte gewerk word, moet die groot

hoeveelhede soute wat geëkstraheer word in ag geneem word. Die soute kan tot 'n groot mate verwyder word deur ioonuitruiling of kolomchromatografie.

Bereiding van die ekstrak:-

Vyftig gram van die droë poeier word tweemaal met 80% etanol (300ml) vir 15 minute lank onder terugvloeiing gekook en die ekstrak met aktiewe koolstof behandel. 'n Geelgekleurde oplossing ontstaan wat by verlaagde druk en temperatuur gedistilleer word tot 'n volume van minder as 100ml. Die oplossing word weer met koolstof ontkleur en die helder filtraat opgemaak tot presies 100ml. Hierdie oplossing word in 5 porsies van 20ml elk verdeel en die porsies soos volg behandel:-

1. Twee glaskolomme van 10cm x 12mm (binnemate) elk word gevul met uitruilhars - die een kolom met 'n sterk anioonuitruilhars (Merck III) en die ander met 'n sterk kationuitruilhars (Merck I). Nadat die kolomme op die voorgeskrewe manier voorberei is word die 20ml vloeistof op die kolom gebring en ge-elueer. Die kleurlose oplossing word ingedamp tot 5ml (2g = 1 ml). Van hierdie oplossing word gebruik om chromatogramme te maak.
 2. 20ml word sonder enige verdere behandeling gebruik om chromatogramme te maak.
 3. Een porsie word versigtig ingedamp tot 5ml (1ml = 2g) en gebruik vir die bereiding van chromatogramme.
 4. Die volgende gedeelte word met 4 ml 32% HCl behandel en vir 1 uur op 'n waterbad gehidroliseer. Die soutsuur word deur versigtige verdamping verwyder en die res in water opgelos en deur die ioonuitruilers gestuur. Die oplossing word ingedamp tot
-

5ml en is ligbruin van kleur.

5. Die laaste gedeelte word net soos in No. 4 hierbo behandel, maar die oplossing word nie deur die ioonuitruilers gestuur nie en word na indamping tot 5ml sonder verdere behandeling gebruik om chromatogramme te maak (1ml = 2g).

Whatman No. 1 papier word gebruik saam met die volgende ontwikkelvloeistof:-

Butanol	:	3
Piridien	:	2
Water	:	1.5

Die verskillende oplossings word in hoeveelhede van 3 μ l op die papierstroke gebring. Saam met die oplossing word ook 'n aantal bekende suikers gechromatografeer om as standaarde te dien - o.m. fruktose, laktose, xylose, arabinose, sorbose, glukose, maltose, rhamnose, raffinose, mannose en glukuronsuur. Die konsentrasie van die standaarde is almal 10 μ g/ μ l. Chromatogramme van 25 - 35cm is gemaak en die ontwikkeltyd wissel van 10 - 12 uur.

Sigbaarmaking van die vlekke:-

1. <u>Naftoresorcinolreagens:</u>	Naftoresorcinol	-	100 mg
	2N HCl	-	20 ml
	Etanol ad	-	100 ml

Die chromatogramme word besproei met hierdie reagens en daarna vir 10 minute by 75°C gedroog. Verskillende kleure ontstaan by die verskillende tipes van suikers.⁵¹⁾

2. <u>Anilienftalaatreagens:</u> ⁵²⁾	Ftaalsuur	-	1.66g
	Anilien	-	0.93g
	Butanol vers. met water	-	100ml

51) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse Bd. II. p.11 (Springer Verlag Berlin 1955).

52) F. Craner: Papier Chromatographie, p. 117. (Verlag Chemie, Weinheim 1958).

Die reagens word oor die chromatogram gesproei en vir 10 minute by 105°C gedroog. Die suikers word aangedui deur rooi-bruin tot geelbruin vlekke. Hierdie reagens is gevoelig tot 'n konsentrasie van 5~~4~~g.

3. Een ml van 'n versadigde waterige oplossing van silwer-nitrat word gemeng met 20ml aseton en dan net genoeg druppels water bygevoeg om die neerslag op te los. Die droë chromatogram word met hierdie oplossing bestuif en vir 'n uur in die dampe van ammonia gehang en daarna vir 5 - 7 minute by 80°C verhit. Na droging word die papier met 10% natriumsulfaat gewas om die oormaat silwer te verwyder, daarna met water en dan gedroog. Hierdie reagens is gevoelig tot 2~~4~~g suikers en lig- tot donker-bruin vlekke ontstaan op 'n ligte agtergrond.

Nadat die chromatogramme met die verskillende reagens behandel is word die volgende resultate verkry:-

PORSIE	NAFTORESORCINOL	ANILIENFTALAAT	SILWERNITRAAT	U.V. LIG.
1	-	-	+	-
2	+ swak	-	+	-
3	+ 5vlekke	+	+ 6vlekke	-
4	-	-	-	-
5	-	-	+	+

Uit bg. tabel blyk dit dat daar wel suikers teenwoordig is, maar in klein hoeveelhede. By die porsie wat sonder behandeling ingedamp is kon 5 vlekke waargeneem word as met naftoresorcinol besproei word en 6 as met die silwernitrat behandel is. Met die

anilienftalaat kon slegs een vlek effens aangetoon word. Die vlekke van die standaardreeks het baie duidelik sigbaar geword met anilienftalaat en naftoresorcinol. Die standarde se R_F -waardes kom nie ooreen met enige van die waargenome vlekke nie. Die moontlikheid dat die onbekende vlekke di- of trisaccharides is, is nie uitgesluit nie.

Onder U.V.-bestraling word by fraksie 5 'n duidelike vlek gekry wat nadere ondersoek wenslik gemaak het. 500g Poeier word nou met 80% etanol geëkstraheer en behandel soos in die eerste geval. Die volume word weer verminder tot 100ml (m.a.w. 1ml = 5g) en soos volg te werk gegaan.

A. I. Neem die helfte van die oplossing en damp in tot 10ml en ontkleur met koolstof. Damp verder in tot 5ml (1ml = 50g) en gebruik hierdie ekstrak vir die chromatogramme.

II. Hidroliseer 'n gedeelte van bg. oplossing met soutsuur en gebruik die van HCl-bevryde oplossing vir chromatogramme.

By sigbaarmaking blyk daar 5 vlekke sigbaar te wees in die onghidroliseerde gedeelte. In die gehidroliseerde gedeelte kon slegs een vlek aangetoon word wat onder U.V. lig baie duidelik sigbaar was. Om te probeer vasstel wat die vlek is wat so duidelik word onder U.V. lig word die res van die oplossing op Whatmat No. 17 „seedtest paper” gebring in die vorm van 'n streep 2cm van die onderpunt af en met butanol-piridien-water ontwikkel. Onder die U.V. lig word drie bande sigbaar, waarvan die duidelikste ooreenkom met die vlek op die chromatogram.

Hierdie bande word uitgesny en in 'n soxhletapparaat met etanol geëkstraheer totdat daar nie meer onder U.V. lig aanduiding van 'n verbinding op die papier is nie. Die volume word

opgemaak na 100ml en die oplossing met behulp van 'n Beckman spektrofotometer ondersoek. Die absorpsiespektrum van die oplossing tussen 3500Å en 2200Å word bepaal . Om die invloed van steurende verbindings uit te skakel word die absorpsiespektra van die volgende oplossings ook bepaal:-

1. 5ml Piridien in water tot 100ml.
2. 5ml Piridien + 5ml 6N NH_4OH in water tot 100ml.
3. 5ml Piridien + 0.5gm KCl^4 + 0.5g KNO_3 in water tot 100ml.

By elkeen van die oplossings word totale uitdowing van die U.V. lig vanaf 2700 - 2950Å opgemerk en dit wil dus voorkom asof die vlek veroorsaak kon gewees het deur die piridien in die ontwikkelvloeistof.

B. Om vas te stel of dit so is word die ander helfte van die ekstrak op identiese wyse as onder A behandel en weereens chromatogramme gemaak, maar die ontwikkelvloeistof word vervang met butanol : asynsuur : water (4:1:5). Na toepassing van dieselfde metodes om die vlekke sigbaar te maak blyk dit weer dat 5 vlekke duidelik aangetoon kan word by die ongehidroliseerde gedeelte, maar by die gehidroliseerde gedeelte slegs een vlek. In hierdie chromatogram kon egter geen vlek onder die U.V. lig waargeneem word nie en dit is dus waarskynlik dat die vlek veroorsaak is deur die piridien in die ontwikkelvloeistof.

Dit blyk ook uit hierdie chromatogramme dat die suikers in die vorm van di- of trisaccharides teenwoordig is wat gesplits kan word tot een gemeenskaplike suiker. Die struktuur en samestelling van die verskillende saccharides is nie verder ondersoek nie, aangesien hulle konsentrasies taanlik laag is nl. in die

orde van 1:5,000 - 10,000.

6. ASKORBIENSUUR EN ANDER ORGANIESE SURE:

(a) Askorbiensuur:- Aangesien daar in verwante plantsoor-
te^{25,26} askorbiensuur voorkom, is dit redelik om ook hierdie
plant na die aanwesigheid van vitamien C te ondersoek en die
eenvoudigste manier waarop dit gedoen kan word, is met behulp
van papierchromatografie.

Die reaktiwiteit van askorbiensuur vereis spesiale voorsorg
by die ondersoek en aangesien slegs droë materiaal voorhande is,
bestaan die moontlikheid dat enige askorbiensuur wat teenwoordig
mag wees reeds ontleed kan wees. Met behulp van die chromato-
grafiese skeiding kan egter ook die ontledingsprodukte van
askorbiensuur aangetoon word, indien hulle teenwoordig is.

Metode:

Dieselfde ekstrak wat gebruik is vir die ondersoek na
suikers word ook gebruik vir die ondersoek na askorbiensuur en
ander organiese sure. Whatman No. 1 papier word gebruik om
stygende chromatogramme⁵³⁾ te maak met behulp van 'n ontwikkel-
vloeistof bestaande uit butanol : asynsuur : water (5:1:4).

'n Klein hoeveelheid Na_2S word by die ontwikkelvloeistof gevoeg so-
dat die ontwikkeling van die chromatogram in 'n atmosfeer van
 H_2S plaasvind, om die reduserende verbindings te stabiliseer.
Na 'n looptyd van 4 - 6 uur word die chromatogram vir 15 minute
in 'n lugstroom gedroog en besproei met reagentiese om die vlekke
sigbaar te maak. Die volgende reagentiese word gebruik:-

1. 1% Silvernitraatoplossing in gedistilleerde water.

53) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzen-
analyse. Bd.II. p. 96 - 97. (Springer Verlag, Berlin 1955).

2. 0.00IN 2,6-dichlorofenolindofenol.

Met die silwarnitraatreagens ontstaan swartbruin vlekke van gereduseerde silwer en met die 2,6-dichlorofenolindofenol ontstaan feitlik oombliklik wit vlekke teen 'n gekleurde agtergrond. Askorbiensuur kan op grond van sy R_F -waarde onderskei word van ander reduserende verbindings soos iso-askorbiensuur, reduktion en dehidro-askorbiensuur.

VERBINDING	R_F -WAARDE IN
	BUT : KAc. : H_2O 5 : 1 : 4
Askorbiensuur	0.37
Iso-askorbiensuur	0.38
Dehidro-askorbiensuur	0.41
Redukton	0.63

Geen positiewe resultate kon verkry word nie, tenspyte van die feit dat beide reagentse baie gevoelig is. Om egter die resultaat bo alle twyfel te bevestig word 50g poeier met 150ml 80% etanol geëkstraheer en so vinnig as moontlik ingedamp tot 5ml. Chromatografiese ondersoek van hierdie ekstrak het ook negatiewe resultate gelewer. Askorbiensuur kom dus nie in aanmerkbare hoeveelhede in Achyranthes aspera voor nie.

(b) Organiese sure: Net soos suikers kom organiese sure baie dikwels in plantweefsels beide in vry en gebonde vorm voor, soos bv. Ca-oksalaat. Dit sou interessant wees om vas te stel watter sure by Achyranthes aspera in aantoonbare hoeveelhede voorkom.

Bereiding van die ekstrak: ⁵⁴⁾

Vyftig gram poeier word in 'n beker geplaas, 150ml water toegevoeg en vir een uur gekook terwyl die water wat verdamp telkens aangevul word. Na afkoeling word die volume aangevul tot 250ml. 200ml van hierdie ekstrak word ingedamp tot ongeveer 60ml en 2ml N HNO_3 by die warm oplossing gevoeg. Alkohol (95%) word toegevoeg tot 'n volume van presies 250ml.

Gebruik 10ml van hierdie oplossing en titreer met 0.1N NaOH teen fenolftalefen. Slegs twee druppels is nodig om die indikator te laat omslaan wat dus beteken dat daar feitlik geen vry suur in die ekstrak aanwesig is nie.

Dit kan egter voorkom dat die sure in gebonde toestand in die plant voorkom en om dit vas te stel word die volgende ekstraksiemethode toegepas:-

Tien gram poeier word in 'n geglasuurde bakkie met 30ml 3N H_2SO_4 deeglik gemeng. Na 30 minute word 100g anhidriese Na_2SO_4 oor die mengsel gestrooi, deeglik gemeng en oornag in 'n oond by 35°C gedroog. As die mengsel nog nie goed droog is nie, word 'n verdere hoeveelheid Na_2SO_4 bygevoeg en weer gedroog. Die droë massa word in 'n soxhletapparaat met varsge-distilleerde eter geëkstraheer vir 24 uur, waarna die massa weer fyn gemaal en vir 'n verdere 24 uur geëkstraheer word.

Die helfte van die eter word afgedistilleer en dan word 20ml water toegevoeg en goed geskud. Die eter word nou heeltemal afgedamp en die oplossing tot 50ml verdun (5ml = 1g). 10ml van hierdie oplossing word met 0.1N NaOH getitreer om 'n indruk te

54) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd.II. p. 480 - 483. (Springer Verlag, Berlin 1955).

kry van die suurgehalte. 0.05ml NaOH is nodig vir die omslag van die indikator, wat aandui dat die suurgehalte baie gering is.

Terwyl hierdie prosesse aan die gang is, word chromatogramme gemaak. Die ekstrak word eers ingedamp sodat 1ml = 5g droë poeier. Whatman No. 1 papier word gebruik om afdalende chromatogramme in 'n loopvloeistof bestaande uit amielalkohol : 5M Niere-suur (1:1) te maak. Na 'n ontwikkeltyd van 8 - 10 uur word chromatogramme met 'n lengte van 30 - 35cm verkry. Nadat die chromatogramme baie goed gedroog is, kan 'n verskeidenheid van reagentse aangewend word om die vlekke sigbaar te maak, maar vir die huidige ondersoek word die metode van Buch et al⁵⁵⁾ gebruik, waardeur enige aanwesige suur aangetoon en dikwels geïdentifiseer kan word.

Reagentse:-

1. Ammoniakaliese silwernitraat: Gelyke volumes 0.1M AgNO_3 en 0.1N NH_4OH word direk voor gebruik gemeng. Die chromatogram word besproei en by kamertemperatuur gedroog, buite bereik van direkte sonlig. Die chromatogram word in daglig en U.V. lig ondersoek wanneer die agtergrond liggeelbruin geword het, gewoonlik na 4 uur.

2. Asynsuuranhidried-piridien: 10% ($\frac{v}{v}$) asynsuuranhidried word met piridien gemeng en die chromatogramme na besproeiing op 100°C verhit vir 5 minute. Die chromatogram word in daglig bekyk onmiddellik na die verhitting en in U.V. lig na 20 uur.

3. Ammoniumvanadaat: 'n Versadigde oplossing van ammoniumvanadaat. Die chromatogram word besproei en in daglig bekyk terwyl dit nog nat is. Na 20 uur word dit onder U.V. lig bekyk.

55) M.L. Buch, R. Montgomery en W.L. Porter: Anal. Chem. 24 (1952) p. 489.

4. Ceri-ammoniumnitraat: 'n 2% ($\frac{g}{g}$) oplossing in 1N HNO_3 . Die chromatogram word 10 minute na besproeiing in die daglig bekyk en n. 20 uur onder U.V. lig.

Die resultate wat verkry word kan vergelyk word met die tabel deur Buch et al⁵⁵⁾ opgestel. Alhoewel die AgNO_3 gevoelig is word aanbeveel dat vir goed kontroleerbare resultate met alvier die reagentse die chromatogramme 120 - 150 μg van elke suur moet bevat.

Negatiewe resultate word met alvier die reagentse verkry, maar aangesien die konsentrasies betreklik hoog moet wees om goeie positiewe resultate te verkry, word van die chromatogramme ook op die volgende manier besproei:-

Die papier word eerstens met 'n 1% deksrose-oplossing besproei en gedroog en daarna met 'n mengsel van gelyke volumes 0.1M AgNO_3 en 0.1N NH_4OH . Verhit totdat die agtergrond ligbruin word. Die suurvlekke bly as gevolg van neutralisasie van die ammonia kleurloos. Met behulp van hierdie metode kan sure in 'n konsentrasie van 20 μg en meer aangetoon word. Hierdie reaksie gee ook negatiewe resultate, selfs as die konsentrasie van die ekstrak vyfmaal verhoog word en daar moet dus aangeneem word dat sure indien wel in hoeveelhede kleiner as 1:10,000 voorkom.

Aangesien daar egter wel Ca-oksalaat in die plant voorkom, word nog verder 'n kwantitatiewe chemiese bepaling uitgevoer om die konsentrasie van die oksalaat te probeer vasstel. Die resultate van hierdie bepaling het die bevindings met die chromatogram bevestig, nl. dat die suur in 'n konsentrasie laer as 1:10,00 teenwoordig moet wees.

(c) Looisure: Gelyktydig met die toetse vir ander organiese sure word ook addisionele toetse uitgevoer om vas te stel of daar moontlik looisure teenwoordig is.

1. 'n Paar druppels van 'n verdunde FeCl_3 -oplossing word by die met aktiewe koolstof ontkleurde ekstrak gevoeg. Geen blou of pers verkleuring word waargeneem nie.

2. By die ekstrak word 'n 0.5% gelatienoplossing gevoeg. Geen neerslag ontstaan nie.

3. By een ml van die ontkleurde ekstrak word 'n gelyke volume ammoniakaliese α - α' -dipiridien-ystersulfaatoplossing gevoeg en gekook. Hierna word asynsuur bygevoeg totdat die reuk van ammonia verdwyn en weer tot op kookpunt verhit. Indien looi-stowwe teenwoordig is, ontstaan 'n vlokkerige pers neerslag. Hierdie toets is gevoelig tot 'n konsentrasie van 1:125,000. Die uitslag is egter negatief.

4. Chromatogramme van Whatman No. 1 papier word met behulp van butanol : asynsuur : water (4:1:5) as ontwikkelvloeistof gemaak. Na droging kan die papier besproei word met 'n FeCl_3 -oplossing waardeur so min as 1 μg looisuur aangetoon kan word. Die chromatogramme kan ook in ammoniadamp gehang en onder U.V. lig bekyk word. In lg. geval kan hoeveelhede van 10 μg aangetoon word. Die uitslag was ook in hierdie geval negatief en kan dus aangeneem word dat looisure ontbreek of in onbelangrike hoeveelhede in Achranthes aspera voorkom.

7. FLAVONE:

Die flavone⁵⁶⁾ of flavonoïede pigmente is verbindings wat dwarsdeur die planteryk voorkom en in varieërende hoeveelhede in

56) K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Bd.III p. 450 et seq. (Springer Verlag, Berlin 1955).

feitlik elke plant aangetref word. Hierdie verbindings is versprei deur die hele plant maar word veral in die gekleurde gedeeltes soos die blomme gekonsentreer. Die verbindings word ook in mikro-organismes en insekte aangetref, maar hulle biologiese rol is nog tot 'n groot mate onduidelik. Sommige ondersoekers meen dat hulle in verband staan met belangrike funksies soos geslagtelike voortplanting en oksidasie-reduksie prosesse. By die ondersoek van die flavonofiede is die papierchromatografie 'n belangrike hulpmiddel, alhoewel dit eintlik maar eers in die laaste jare ontwikkel is.

Ekstraksie van die plantmateriaal:

Die verbindings wat meeste in plante aangetref word, is anthocyanine, flavone, chalcone en aurone wat hoofsaaklik as glikosiede voorkom. In die ondersoek na glikosiede is geen belangrike resultate behaal nie, maar 'n poging word aangewend om vir hierdie reeks van verbindings 'n duideliker uitslag te kry. Daar is nie 'n enkele ekstraksieproses wat geskik is vir alle tipes van flavonofiede nie en moet verskillende metodes dus gebruik word.

(a) Ekstraksie met water: Vyftig gram poeier word met 150ml water gekook vir een uur, terwyl die water wat verdamp telkens aangevul word. Na filtrasie word die ekstrak ingedamp tot 50ml en met 95% alkohol verdun tot 250ml en die neerslag afgefiltreer, waarna die oplossing met aktiewe koolstof behandel word. Die ligbruin gekleurde oplossing word onder verminderde druk en temperatuur ingedamp tot 100ml, sodat 2ml = 1 g. Vir chromatografiese doeleindes word die ekstrak verder ingedamp sodat 1ml = 5g poeier.

(b) Ekstraksie met metanol: Vyftig gram droë poeier word in 'n soxhletapparaat gepak en vir 6 uur met petroleumeter geëkstraheer. Na droging van die poeier word met metanol geëkstraheer vir 16 uur. Die donkergroen oplossing word met aktiewe koolstof behandel en ingedamp, sodat 2ml = 1g. Vir chromatografiese doeleindes word die oplossing verder ingedamp totdat 1ml = 5g.

(c) Ekstraksie met eter: Vyftig gram droë poeier word op dieselfde wyse as onder (b) behandel, maar met eter i.p.v. metanol geëkstraheer vir 'n periode van 20 uur. Die bruingroen gekleurde ekstrakt word ingedamp tot ca die helfte van die volume en dan gemeng met 100ml water. Die eter word verder afgedistilleer en die oplossing ingedamp totdat 2ml = 1g en ook 'n gedeelte 1ml = 5g is.

Kleurreaksies op flavonoïede verbindings:

'n Groot verskeidenheid van reaksies kan gebruik word om hierdie verbindings te identifiseer.

1. 'n Waterige 1% FeCl_3 -oplossing is 'n algemene reagens wat kleure gee met polihidroksie-flavonoïede. Die kleure wissel van groen tot swart, maar die reaksie is nie spesifiek nie.

2. Neutrale en basiese loodasetaat gee kenmerkend gekleurde neerslae met baie verbindings. Hierdie reaksie word ook gebruik vir die sigbaarmaking van vlekke op chromatogramme. Neutrale loodasetaat vorm neerslae met verbindings wat 'n o-dihidroksie-groepering besit, of 'n kombinasie van hierdie met o-hidroksie-karboniel of 3-hidroksiechromon-strukture. Basiese loodasetaat sal gekleurde neerslae met polifenoliese flavonoïede gee en die kleure wissel van geel na rooi.

3. Kenmerkende kleurveranderings tree op as polihidroksie-

flavonoïede in alkali opgelos word.

4. Antimoonpentachloried gee karakteristieke gekleurde verbindings met flavonoïede, soortgelyk aan die kleure wat ontstaan wanneer die verbindings in sterk suur opgelos word.

5. 'n Baie nuttige reaksie is die reduksie deur 'n magnesium-soutsuur-mengsel soos deur Shinoda⁵⁷⁾ ontwikkel. 'n Stukkie magnesiumlint word in 'n paar ml van die ekstrak gegooi en dan met alkoholiese soutsuur-oplossing behandel. Binne enkele minute ontstaan dan kleure wat tussen pienk, rooi, blou, groen en geel kan wissel.

Al bg. toetse is uitgevoer, maar sonder noemenswaardige sukses. Chromatogramme is op Whatman No. 1 papier gemaak en afdalend ontwikkel met behulp van butanol : asynsuur : water (4:1:5) as loopvloeistof. Hierdie loopvloeistof is baie geskik vir flavonoïede en skerpgetekende vlekke met 'n minimum van stertvorming word gewoonlik verkry.

Die volgende reagentse vir sigbaarmaking van die vlekke word gebruik:-

1. 'n 1% FeCl_3 -oplossing in 50% etanol word oor die papier gesproei en gedroog.

2. 'n 2% Loodasetaat-oplossing word oor die papier gesproei en gedroog.

3. As die chromatogramme met 'n Na_2CO_3 -oplossing besproei word, kan merkbare veranderings in die kleure van die vlekke optree of nuwe vlekke ontstaan.

4. Ondersoek onder U.V. lig:- Onder U.V. lig ontstaan vlekke wat karakteristiek is van 'n bepaalde tipe verbinding. Die U.V.

57) J. Shinoda: J. Pharm. Soc. Japan. 48 (1928) p. 214 - 220.

Metode kan uitgebrei word deur die chromatogram in ammoniadampe te hou en dan onder U.V. lig te bekyk. Afgesien van enige vlekke wat in gewone lig sigbaar word, kan ook veranderings in die fluoresserende vlekke optree of nuwe vlekke ontstaan.

'n Geskikte prosedure om lg. reaksie aan te wend is soos volg:-

- (a) Onderzoek die chromatogram in gewone lig en merk sigbare vlekke en teken die kleure aan.
- (b) Herhaal die ondersoek onder U.V. lig.
- (c) Terwyl die chromatogram onder U.V. lig bekyk word, laat dit in die damp van ammonia hang en teken die kleurveranderings wat optree of die ontstaan van nuwe vlekke aan.
- (d) Onderzoek onmiddellik hierna die chromatogram weer in die daglig en teken die verandering van kleure of ontstaan van nuwe vlekke aan.

Hierdie ondersoek het weinig resultate gelewer en kan aangenem word dat daar in die droë materiaal geen buitengewone hoeveelhede flavonoïede verbindings voorkom nie. Die gevoeligheid van die toetse is betreklik hoog - veral onder U.V. lig, maar geen duidelike resultate is behaal nie.

8. ALKALOÏEDE:

In die literatuur kan geen verwysing na die aanwesigheid van 'n alkaloid in hierdie of na-verwante plante gevind word nie. Om die afwesigheid van alkaloid in Achranthes aspera te bevestig word soos volg tewerk gegaan:-

- (a) Tweehonderd gram poeier word in 'n soxhletapparaat gepak en vir 6 uur met petroleumeter geëkstraheer en daarna vir 20 uur met 90% etanol. Die donkergroen gekleurde oplossing word
-

onder verminderde druk ingedamp totdat dit droog is en die res met 100ml 0.1N HCl gemeng. Die neerslag word afgefiltreer en 'n bruinerige oplossing word gekry. Hierdie oplossing word alkalies gemaak met Na_2CO_3 en 5 maal met eter geëkstraheer. 'n Feitlik kleurlose oplossing word verkry. Die eter word versigtig afgedamp en die klein effens gekleurde res word in 10ml 0.1N HCl opgeneem (1ml = 20g).

(b) Honderd gram poeier word met warm 10% Na_2CO_3 -oplossing behandel en vir 'n halfuur gelaat. Die ekstrak word afgefiltreer en die massa deeglik gedroog en in 'n soxhletapparaat met Chloroform geëkstraheer. 'n Donkergroen gekleurde oplossing word verkry wat na indamping tot ca 100ml met verdunde soutsuur-oplossing geëkstraheer word. Nadat die ekstraksie 5 maal herhaal is, word die oplossing alkalies gemaak en weer met chloroform uitgeskud. Die oplossing word drooggedamp en die res opgeneem in 5ml 0.1N HCl (1ml = 20g).

Hierdie oplossings word soos volg getoets:-

1. Dragendorff se reagens: 'n Paar druppels Dragendorff se reagens word by 'n gedeelte van die oplossing gevoeg. 'n Bruin neerslag toon die aanwesigheid van 'n alkalofied.
 2. Mayer se reagens: 'n Paar druppels by van die oplossing gee in die geval van alkalofiede 'n neerslag. Met behulp van hierdie reagens kan alkalofiede in baie verdunde oplossings aangetoon word.
 3. Ammoniumreineekaats: Hierdie verbinding vorm 'n pienk vlokke-rige neerslag met meeste alkalofiede.
 4. Jodoplatinaatreagens: Gee donker neerslae met alkalofiede. Hierdie reagens is gevoelig en kan aangewend word vir die aan-
-

toning van vlekke op chromatogramme.

Bogenoemde reagense vorm almal karakteristieke kristalle met verskillende verbindings en kan mikrochemies aangewend word vir die identifikasie van 'n groot aantal alkalofede.

Al hierdie toetse gee negatiewe resultate wat daarop dui dat geen alkalofede teenwoordig is nie. Om egter alle moontlikhede uit te sluit, word die volgende chromatografiese metode aangewend:-⁵⁸⁾

Stroke Whatman No. 1 papier word deur 'n $\frac{1}{2}$ M KCl-oplossing getrek sodat dit deeglik nat word en dan tussen 2 velle filtreerpapier drooggedruk en gelaat om droog te word. Op hierdie papier word 3 μ l en 6 μ l van elke oplossing geplaas saam met 'n oplossing van Strychnine (20 μ g/ μ l) om as kontrole te dien. Die stroke word met behulp van butanol-gekonsentreerde HCl (98:2) versadig met water afdalend ontwikkel tot 'n lengte van 30 - 35cm.

Sigbaarmaking van die vlekke:

Reagens van Dragendorff:-

Oplossing A: 850mg Bismuth-subnitraat, 40ml water en 10ml ysasyn.

Oplossing B: 8g Kaliumjodied in 20ml water.

Meng oplossings A en B en bewaar in 'n donker plek. Voor gebruik word 10ml van die reagens met 20ml ysasyn en 100ml water gemeng en oor die chromatogram gesproei. Na droging is donkergekleurde vlekke sigbaar waar daar alkalofede is.

Net soos by die ander toetse word negatiewe resultate met hierdie metode verkry, behalwe by die Strychnine, waar 'n duidelike vlek ontstaan. Daar kan dus aangeneem word dat alkalofede nie in Achyranthes aspera voorkom nie.

58) R. Munier, M. Macheboeuf en N. Cherrier: Bull. Soc. Chim. Biol. 34 (1952) p. 204.

GEVOLGTREKKINGS.

Uit hierdie ondersoek van Achyranthes aspera word die volgende afleidings gemaak:-

1. Daar kom groot hoeveelhede kalium en ook natrium in die poeier wat van die bo-grondse dele van die plant berei is voor en hierdie elemente is hoofsaaklik aan chloried en nitraat in anorganiese vorm gebind.
2. Daar kom vir sover vasgestel kon word geen organiese verbinding of groep van organiese verbindings voor wat spesifiek verantwoordelik gehou kan word vir die beweerde werking van die plant nie.
3. Deur papierchromatografie kon vyf suikers aangetoon word wat na splitsing met soutsuur een gemeenskaplike suiker gee.
4. Die werking wat aan Achyranthes aspera toegeskryf word is waarskynlik te wyte aan die hoë konsentrasie anorganiese soute, wat op wonde 'n reinigende en trekkende effek kan hê en as dit inwendig geneem word 'n mate van diurese veroorsaak. Volgens Chopra⁵⁹⁾ het die ekstrak van Achyranthes aspera hoegenaamd geen effek teen slangbyt of skerpioensteek nie en sal die toegeskrewe werking dus hoofsaaklik bygeloof of oorlewering wees.

59) R.N. Chopra: Indigenous Drugs of India. p. 493, 607, 609. (U.N. Dhur & Sons Private Ltd., Calcutta 1958).

OPSOMMING:

In die volksgeneeskunde van Suid-Afrika word talle plante aangetref wat deur die natuurlele sowel as 'n groot gedeelte van veral die plattelandse bevolking gebruik word. Een van hierdie plante is Achyranthes aspera en die ondersoek na sy samestelling is die onderwerp van hierdie verhandeling.

In die inleiding word 'n oorsig gegee oor die name en gebruike van hierdie plant in Suid-Afrika terwyl die verspreiding en gebruike oor die wêreld in die literatuuroorsig behandel word. Volgens die beskikbare gegewens is betreklik min oor die samestelling van Achyranthes aspera bekend en word hoofsaaklik inligting verstrekk oor die anorganiese samestelling.

In die Farmakognostiese ondersoek kon die kenmerkende abnormale sekondêre verdikking in die stingel van Achyranthes aspera duidelik waargeneem word, sowel as die groot kristalle van Ca-oksalaat en die hare, wat karakteristiek is.

In die gedeelte oor die anorganiese analise word die kwalitatiewe sowel as kwantitatiewe bepalinge beskrywe wat uitgevoer is en is vasgestel dat die as van Achyranthes aspera 'n baie hoë konsentrasie kalium bevat, nl. 23.13%. Ander elemente wat ook in betreklik groot hoeveelhede voorkom is natrium, magnesium en kalsium.

In die gedeelte oor die ondersoek na die organiese samestelling word eerstens 'n oorsig gegee oor die metodes wat gevolg is om die ekstrakte te berei en te ontleed en daarna word metodes beskryf om die plant te ondersoek op die aanwesigheid van saponiene, sterofiede, triterpene, glikosiede, suikers, askorbien-

suur, looisuur en ander organiese sure, flavone en alkaloiëde.

Na voltooiing van die ondersoek word die gevolgtrekking gemaak dat daar geen organiese bestanddeel voorkom wat verantwoordelik gehou kan word vir die beweerde werking nie; en dat enige werking hoofsaaklik aan die hoë konsentrasie kalium- en natriumsoute toegeskryf moet word.

BIBLIOGRAFIE.

1. J.M. Watt en M.G. Breyer-Brandwijk:
The Medicinal and Poisonous Plants of Southern Africa
(1932) p. 43. XXXI Amarantaceae.
 2. D.G. Steyn: Vergifting van Mens en Dier - (J.L. van
Schaik, Pretoria, 1949).
 3. A. Cavaco: Boletim Da Sociedade Broteriana 32 (2a)
(1958) p. 301 - 327.
 4. C.R. Metcalfe en L. Chalk: Anatomy of the Dicotyledons
Vol: II p. 1067 - 1074. (The Clarendon Press, Oxford,
1950.)
 5. A.C. Joshi: Journ. Ind. Bot. Soc. X (1931). p. 265 - 292.
 6. A.C. Joshi: New Phytologist. 33(1) (1934) p. 53 - 57.
 7. R.H. Dastur: Annals of Bot. 39 (1925). p. 539 - 545.
 8. E. Quisumbing: Medicinal Plants of the Philippines.
Technical Bulletin 16 (1951) p. 263 - 265. (Manila
Bureau of Printing, 1951).
 9. K.M. Nadkarni: Indian Materia Medica III ed. Vol : I
p. 21 - 22. (Popular Book Depot, Bombay, 1954.)
 10. C. Wehmer: Die Pflanzenstoffe Bd. I. (Jena, Gustav
Fischer).
 11. Paul C. Stanley: Field Mus. Hist. Publ. Bot. Ser. 3(3)
(1930) p. 157 - 492 (p.254).
 12. K. Suessenguth: Fedde Rep. Spec. (Nev. 51) (1942)
p. 194 - 208.
 13. Prasad Mata en G.V. Dance: Royal Inst. Sci. Bombay,
India. Indian Forest Leaflet. 95. (1947) p. 1 - 27.
-

14. K.R. Kirtikar en B.D. Basu: Indian Medicinal Plants
Part II (1918) p. 1061.
 15. K.R. Kirtikar en B.D. Basu: Indian Medicinal Plants
Part II (1918) p. 1065.
 16. J.M. Dalziel: The Useful Plants of West Tropical Africa.
p. 34. (London 1937).
 17. C.J.H. Warden: Chem. News 64 (1891) p. 161.
 18. W. Dymock, C.J.H. Warden en D. Hooper: Pharmacographia
Indica Vol : III (1893) p. 135.
 19. M. Honda en T. Sasaki: 27th Session of the Kinki
Gynecological Society in Osaka, March 26, 1933.
Jap. J. of Obstetrics and Gynecology (1934). p. 76 - 77.
 20. M.L. Dhar en R. Gopalachari: J. Sci. and Indust. Res.
(India) IIB (5) (1952). p. 209.
 21. J. Gedeon: Arch. Pharm. u Ber. Deutsch. Pharm. Ges.
288(60) (1955). p. 417 - 418.
 22. B.E. Read en Liu Ju-Ch'iang: Plantas Medicinalis
Sinensis, Peking (1927). p. 177.
 23. J. Gedeon en F.A. Kincl: Arch. Pharm. u Ber. Deutsch.
Pharm. Ges. 289 (61) (1956). p. 162 - 165.
 24. B.E. Read: Chinese Medicinal Plants from the Pen
Ts'ao Kang Mu, A.D. 1596. 3rd Ed. (1930). p. 177.
 25. A.J. Hermans en Gavino Sepulveda, Jnr: Philippine
Journ. Sci. 53 4 (1934). p. 379 - 390.
 26. Mituda Hisateru: J. Agr. Chem. Soc. Japan 14
(1938) p. 1228 - 1236.
 27. W.J. Thiselton-Dyer: Flora Capensis Vol. V Sect. I
p. 428 - 429. (Lovell Reeve & Co., Ltd.,
London, 1912.)
-

28. C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatieve Chemische Analyse (1956) p. 103. (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam. 1956.)
29. C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatieve Chemische Analyse (1956) p. 100 (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam, 1956.)
30. C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatieve Chemische Analyse (1956) p. 100, (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1956).
31. C.J. van Nieuwenburg en J.W.L. van Ligten: Kwalitatieve Chemische Analyse (1956) p. 118 (D.B. Centen's Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1956).
32. H.W. Berkhout en G.H. Jongen: Chem. Weekbl. 51 (1955). p. 607 - 608.
33. R.M. Engelbrecht en F.A. McCoy: Anal. Chem. 28 (1956). p. 1772 - 1773.
34. W.K. Kingsley, G.E. Wolf en W.E. Wolfram: Anal. Chem. 29 (1957). p. 939 - 941.
35. A.I. Vogel: A textbook of Quantitative Inorganic Analysis (1951) p. 590 - 591. (Longmans, Green and Co., London, 1951).
36. C.J. Mink: De Hemolytische activiteit van Hydrocotyle vulgaris L. p. 10 - 22. (Excelsior Uitgeverij, 's Gravenhage, 1957.)
37. Britse Farmakopee: (1958) p. 148.
38. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. I p. 481 - 483. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
39. W.E. Schilz en G.N. Krynauw: Anal. Chem. 28 (1956) p. 1759 - 1761.
-

40. N.D. Cheronis en J.B. Entrikin: Semimicro Qualitative Organic Analysis (2nd Ed.) p. 169 - 171. (Interscience Publishers Inc., New York).
 41. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II p. 310. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
 42. B.A. Adams en E.L. Holmes: J. Soc. Chem. Ind. 54 (1935) p. 1.
 43. R. Consden, A.H. Gordon en A.J.P. Martin: Biochem. J. 38 (1944) p. 224 - 232.
 44. P.H. Hermans: Physics and Chemistry of Cellulose Fibres. p. 543. (Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1949).
 45. R. Consden, A.H. Gordon en A.J.P. Martin: Biochem. J. 38 (1944) p. 224.
 46. E.C. Bate-Smith: Partition Chromatography, Biochemical Society Symposia 3 (1950) p. 62.
 47. C.J. Mink: De Hemolytische activiteit van Hydrocotyle vulgaris L. p. 25 - 26. (Excelsior Uitgeverij, 's Gravenhage, 1957).
 48. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. III p. 66. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
 49. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II p. 301. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
 50. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II p. 309. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
 51. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II p. 11 (Springer Verlag, Berlin, 1955).
-

52. F. Cramer: Papier Chromatographie, p. 117. (Verlag Chemie, Weinheim, 1958)
53. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II. p. 96 - 97. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
54. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II. p. 480 - 483. (Springer Verlag, Berlin, 1955).
55. M.L. Buch, R. Montgomery en W.L. Porter: Anal. Chem. 24 (1952) p. 489.
56. K. Paech en M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. III. p. 450 et seq. (Springer Verlag, Berlin, 1955.)
57. J. Shinoda: J. Pharm. Soc. Japan. 48 (1928). p. 214 - 220.
58. R. Munier, M. Macheboeuf en N. Cherrier: Bull. Soc. Chim. Biol. 34 (1952). p. 204.
59. R.N. Chopra: Indigenous Drugs of India. p. 493, 607, 609. (U.N. Dhur and Sons Private Ltd., Calcutta, 1958.)
-