

FLUORASETAAT-, AMINOSUUR- EN ORGANIESE SUURMETABOLISME
VAN GIFBLAAR (DICHAPETALUM CYMOSUM ENGL.)

deur Jacobus Nicolaas Eloff

Proefskrif ingehandig ter gedeeltelike nakoming
van die vereistes vir die graad Doctor Scientiae
aan die Potchefstroomse Universiteit vir C.H.O.

Pretoria
Januarie 1968

Hierdie werk is m.b.v. finansiële bystand van die
Departement Landbou-Tegniese Dienste aan die
Margaretha Mes Instituut vir Plantfisiologie en
-biochemie van die Universiteit van Pretoria verrig.

AFKORTINGS GEBRUIK

AA	asetamied
ATP	adenosientrifosfaat
BAW	n-butanol : asynsuur : water (9 : 1 : 2.9)
BMW	sek-butanol : mieresuur : water (6 : 1 : 2)
EtFAc	etielfluorasetaat
EtFSS	etielfluoorsitroensuur
FAc	natriumfluorasetaat
FAD	flavien adenien dinukleotied
FP	fluorpiruvaat
FSS	fluorsitraat
KBV	kleinste betekenisvolle verskil
K_m	Michaelis-Menten konstante
KoASH	koënsiem A
MeAc	metielasetaat
MeBrAc	metielbroomasetaat
MeFAc	metielfluorasetaat
MCW	metanol : chloroform : water (12 : 5 : 3)
NAD^+	nikotienamied adenien dinukleotied
$NH_4 FAc$	ammoniumfluorasetaat
NMA	N-metiel-L-alanien
NMS	N-metiel-L-serien
PAW	Propanol : ammonia : water (6 : 3 : 1)
SS	sitroensuur
t.p.m.	tellings per minuut

DIE FLUORASETAAT-, AMINOSUUR- EN ORGANIESE SUURMETABOLISME VAN GIFBLAAR (DICHAPETALUM CYMOSUM ENGL.)

"... the mystery remains why D. cymosum and A. georginae, which make fluoroacetate are not poisoned by their own product" - Treble, Lamport & Stevens(106).

I. Agtergrond tot Fluorasetaatmetabolisme	1
II. Eksperimentele metodes	11
III. Respirasieproewe met Gifblaar	20
A. Die invloed van fluorasetaat op respirasie	21
B. Metabolisme van fluorasetaat	30
C. Bespreking	38
IV. Stikstofmetabolisme van Gifblaar	39
A. Isolering en identifisering van onbekende aminosure	40
B. Die biosintese van NMA en NMS	60
C. Bespreking	63
V. Organiese suurmtebolisme van Gifblaar	65
A. Funksionering van die Kressklus	66
B. Die mikroskaal-sintese van fluorasetaat-2- ¹⁴ C	68
C. Die fluorasetaat-2- ¹⁴ C-metabolisme van Gifblaar	76
D. Bespreking	82
Samevatting	85
Dankbetuigings	90
Abstract	91
Literatuurverwysings	92

Hoofstuk I

AGTERGROND TOT FLUORASETAATMETABOLISME

"... dass in den Versuchen mit Geweben die als solche wahrscheinlich gänzlich ungiftige Fluoresigsäure erst in das eigentliche Enzymgift umgewandelt wird ... glaube ich mit Bestimmtheit sagen zu können, dass es sich bei diesem um eine Fluorcitronensäure (oder Isocitronensäure) handelt ..." - Martius (65).

1. Inleiding 2
2. Beskrywing van Gifblaar 2
3. Die metabolisme van Fluorasetaat 5
4. Doelstellings van die ondersoek 9

1. Inleiding

Gedurende die Tweede Wêreldoorlog het Poolse skeikundiges wat na Engeland gevlug het, die giftige eienskappe van metielfluorasetaat ($\text{CH}_2\text{FCOOCH}_3$) (MeFAc) onder die aandag van Saunders en sy groep navorsers gebring⁽⁶⁰⁾. Hierdie groep was besig met navorsing op gifgasse met die oog op hulle moontlike gebruik tydens oorlogvoering en het aktief op die fluoorfosfonaat-verbindinge (bevat =POF-groepering) gewerk. Hierna het Saunders en sy medewerkers en ook 'n groep in Amerika onder leiding van Chenoweth verskillende chemiese en fisiologiese aspekte van verbindinge wat die $-\text{CH}_2\text{F}$ -groepering bevat, ondersoek. Geeneen van hierdie verbindinge is sover bekend in oorlogvoering gebruik nie⁽⁴¹⁾. 'n Uitvloeisel van die werk was egter dat fluorasetaat (FAc) („compound 1080”) 'n groot toepassing as rottegif gekry het⁽⁴⁷⁾.

Teen ongeveer dieselfde tyd het Marais die werk van Rimington⁽⁹³⁾, wat probeer het om die toksien uit Gifblaar (Dichapetalum cymosum (Hook.) Engl.), 'n giftige Suid-Afrikaanse plant, te isoleer, voortgesit en gevind dat FAc die aktiewe bestanddeel is⁽⁶³⁾. Dit was die eerste organiese fluoorverbinding wat in lewende organismes aangetref is. Later is organiese fluoorverbindinge ook in 'n aantal ander plantsoorte aangetref. Die aktiewe bestanddele in Dichapetalum toxicarium, 'n plant wat in Wes-Afrika voorkom, is fluooroleïensuur⁽⁸³⁾ en fluoorpalmitiensuur⁽¹¹⁰⁾. Daar is aanduidings dat ander spesies van Dichapetalum ook giftig is en dus heelwaarskynlik ook FAc of 'n fluoorvetsuur bevat^(74, 113). FAc is ook in Palicourea marcgravii⁽²⁵⁾ en in Acacia georginae⁽⁷⁵⁾, sowel as in 22 uit 28 van die 34 Gastrolobium- en Oxylobium-spesies wat in Australië ondersoek is, gevind^(61, *).

2. Beskrywing van Gifblaar

Gifblaar, Dichapetalum cymosum (Hook.) Engl. (= Chailletia cymosa (Hook.) Engl.) is die enigste lid van 'n klein tropiese familie, die Dichape-

* APLIN, T.E.H. (1967) persoonlike mededeling.

talaceae wat in Suid-Afrika voorkom. Die genus Dichapetalum is verreweg die grootste en bestaan uit 75 spesies wat slegs in die trope van die ou en die nuwe wêreld voorkom⁽⁷²⁾. Die meeste plante is groot bome, struik of klimplante. Gifblaar is die enigste een wat, heelwaarskynlik in aanpassing by xerofitiese toestande, 'n onderaardse struik is. Omdat net die eindpunte van die sekondêr-vertakte stingel bokant die grond uitsteek, het die plant 'n kruidagtige voorkoms soos deur plaat 1 geïllustreer word.

Die ondergrondse orgaan wat 'n paar voet onder die grond veelvuldig vertak, is al tot 93 voet diep in die grond aangetref⁽⁵⁶⁾. Hierdie orgaan is aanvanklik as 'n stingel beskou, maar latere ondersoeke het aangedui dat dit die tipiese anatomie van 'n sekondêr-verdikte wortel openbaar⁽⁶⁹⁾.

Gifblaar kom dikwels saam met Grysappel (Parinarium capense) (kyk plaat 2) en Goorappel (Pachystigma zeyheri) voor en word dikwels met hierse plante verwar. Die plant kom hoofsaaklik in die Transvaal voor en wel noord van Mafeking-Lichtenburg-Pretoria-Middelburg, oos van Mafeking en wes van Middelburg-Pietersburg⁽⁷²⁾. Gifblaar is ook al in Suidwes-Afrika, Botswana en Zoeloeland aangetref*. Dit wil voorkom asof droë gebiede en hoogtes hoër as 4,500 vt die verspreiding van Gifblaar beperk⁽⁷²⁾.

Gifblaar is gewoonlik die eerste plant wat in die laat winter bot, en dikwels word in Augustus alreeds jong blaartjies in die veld aangetref. Dit is veral in hierdie tyd, wanneer die res van die veld nog dor is, dat Gifblaar op sy giftigste vir die vee is. Dit is al beweer dat twee tot drie jong blare 'n os kan doodmaak⁽⁹⁹⁾. Steyn⁽¹⁰⁴⁾ het bevind dat waar drie onse jong blare 'n os kan doodmaak, vier pond ou blare geen invloed op die diere het nie. Dit het ook geblyk dat daar twee tye van die jaar is wanneer die blare baie meer giftig is as gedurende die res van die jaar. Albei hierdie periodes val saam met die botperiode van die plante. Dit wil dus voorkom asof jong blare 'n baie hoër FAc-inhoud as ou blare het. Hierdie veronderstelling is deur

* VAHRMEYER, J. (1967) persoonlike mededeling.



Plaat 1 Die voorkoms van Gifblaar in die veld.



Plaat 2 Die voorkoms van Grysappel (Parinarium capense) in die veld.
(Gifblaar in die agtergrond.)

Badenhuizen & Slinger⁽³⁾ en deur Melamed⁽⁶⁸⁾ tentatief bevestig. Louw⁽⁵⁸⁾ en later ook Von Sydow⁽¹⁰⁸⁾ het aangedui dat die „organiese fluoorinhoud” (verskil tussen anorganiese en totale fluoorinhoud) van jong blaartjies baie hoër is as dié van ou blare. Von Sydow⁽¹⁰⁹⁾ het m.b.v. gaschromatografie ondubbelsinnig aangedui dat jong blaartjies 'n baie hoër FAc-inhoud as ou blare het.

Die feit dat Gifblaar so 'n uitgebreide ondergrondse stelsel het, maak die uitroeiing van die plant baie moeilik. Verskillende gifstowwe is al aangewend, maar aangesien hulle blykbaar nie volledig in die plant vervoer word nie; sterf net 'n deel van die plant af en dit moet 'n paar keer behandel word voordat dit heeltemal dood is. Leemann⁽⁵⁵⁾ het 'n metode beskryf waardeur die plant wel uitgeroei kan word. Dit kom daarop neer dat die hoofstam onder die grond geringuleer word en met 'n mengsel van kopersulfaat, kalsiumchloried en grond (2:1:2) behandel word. Pogings om die plant meganies uit te roei, slaag gewoonlik nie omdat die stukke wat afbreek, dikwels wortel skiet en aanleiding gee tot nuwe plante.

Gifblaar vorm in die meeste jare 'n groot aantal welriekende witterige blommetjies (plaat 3), maar om een of ander rede vorm baie min vrugte (plaat 4). Mogg⁽⁷²⁾ kon byvoorbeeld in 'n tydperk van waarneming wat oor twaalf jaar gestrek het, slegs drie volwasse vrugte vind. Moeilikeid word ook ondervind om die saad te laat ontkiem. Dit is nie maklik om stiggies van Gifblaar aan die groei te kry nie. Alhoewel die stiggies geredelik blare vorm, vind wortelvorming eers na 'n lang tyd plaas.

Ander navorsers stel baie belang in die metabolisme van Gifblaar en baie navrae vir Gifblaarsaad en -stiggies is al ontvang. Die feit dat Gifblaarsaad so moeilik bekombaar is en dat dit baie moeilik is om stiggies aan die groei te kry is seker die belangrikste redes waarom die FAc-metabolisme van Gifblaar nog nie oorsee uitgepluis is nie. R.J. Hall meld dan ook in 'n brief aan prof. N. Grobbelaar die volgende: „I can assure you that the subject upon which you have embarked is quite one of the most fascinating in the whole field of plant biochemistry.”



Plaat 3 Die bloeisels van Gifblaar.



Plaat 4 Die vrugte van Gifblaar.

3. Die metabolisme van FAc

Die toksisiteit van FAc verskil baie van organisme tot organisme. Die LD₅₀ (d.w.s. dosis wat aanleiding gee tot sterfte van 50% van die organismes) in mg per kilogram liggaamsgewig is vir honde 0.06-0.15, vir skaape 0.25-0.50, vir mense 2-5 en vir die brulpadda 1500⁽⁴¹⁾. Oor die algemeen word die dood veroorsaak deur (a) 'n invloed op die sentrale senuweestelsel waardeur stuiptrekkings veroorsaak word, gevolg deur staking van die asemhaling (bv. by die hond) of (b) deur geleidelike hartversaking of ventrikulêre fibrillering (bv. by die haas) of (c) deur 'n toenemende invloed op die sentrale senuweestelsel met asemhaling- of hartversaking as die oorsaak van die dood (bv. by die mens).

Biochemici van oor die hele wêreld het baie belang gestel in die meganisme van FAc-vergiftiging. Dit het gou duidelik geword dat die invloed van FAc nie aan fluoriedvergiftiging toegeskryf kan word nie. Die C-F-binding is baie stabiel en weerstaan selfs hidrolise deur warm gekonsentreerde swawelsuur⁽⁴²⁾. Alle verbindings wat deur die organisme tot FAc afgebreek word, soos bv. omega-fluoorvetsure met 'n ewe getal koolstofatome, is toksies. Omega-fluoorvetsure met 'n onewe getal koolstofatome (afgebreek na fluoorpropioonsuur en moontlik fluoormieresuur) vertoon 'n baie laer toksisiteit^(79,95). Uit hierdie en ander resultate is afgelei dat die aktiwiteit toegeskryf moet word aan die $\begin{array}{c} | \\ -\text{C}-\text{C}-\text{F} \\ | \end{array}$ -groepering. Die invloed van FAc is in vitro op 'n groot aantal geïsoleerde ensieme bepaal (o.a. isositroensuurdehidrogenase, fumarase, appelsuurdehidrogenase, akonitase, sitochroomoksidase, pirodruiwesuurdehidrogenase, enolase), maar in geen geval kon enige remming aangedui word nie^(6,18,57). Bartlett & Barron⁽⁶⁾ het gevind dat piruvaatmetabolisme sterk deur FAc gerem word en het gepostuleer dat FAc die „aktivering van asetaat" d.w.s. omsetting na asetielkoënsiem A inhibeer.

Kalnitsky⁽⁴⁸⁾ het eerste die belangrike waarneming dat FAc-toediening tot 'n verhoging in sitraatkonsentrasie lei, gemaak. Hierdie ophoping

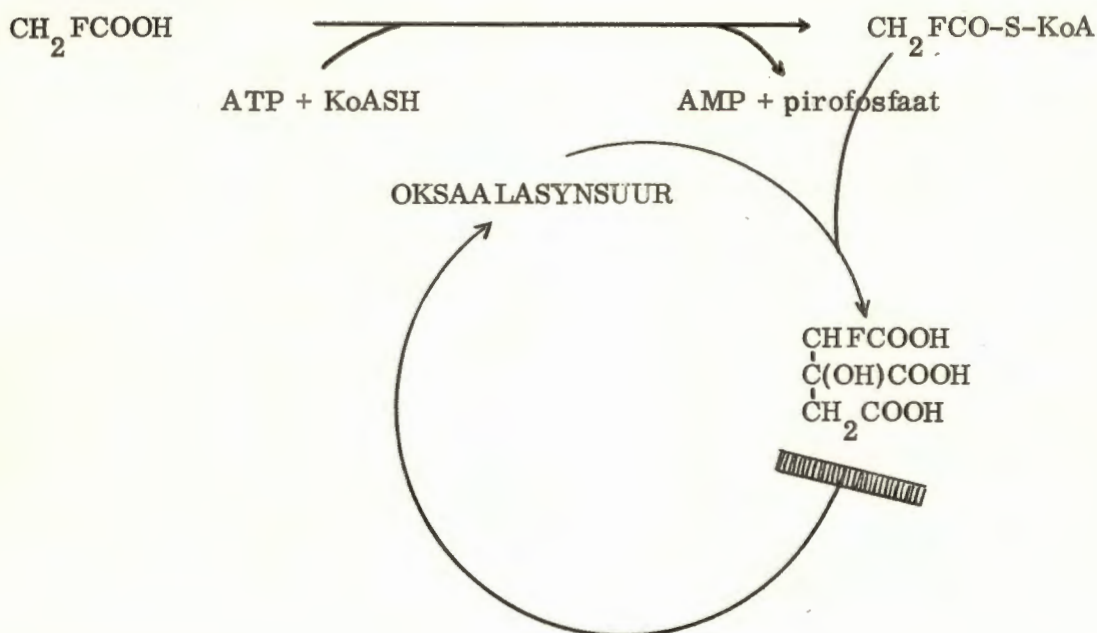
van sitraat is hierna beide in vivo en in vitro deur 'n hele aantal ander navor=
sers bevestig^(49, 57). Martius⁽⁶⁵⁾ en Liebeck & Peters⁽⁵⁷⁾ het onafhanklik
van mekaar voorgestel dat FAc omgesit word na fluoorsitroensuur (FSS) en
dat hierdie verbinding die remstof is.

Elliott & Kalnitsky⁽²⁸⁾ kon aandui dat die remstof met sitraat kom=
peteer vir die betrokke ensiem. Hulle het ook bevind dat die remstof fluoor
bevat, maar hierdie bevinding is later gekritiseer⁽⁸⁸⁾. Buffa, Peters &
Wakelin⁽²⁰⁾ het aangedui dat die inhibeerder dieselfde chromatografiese be=
weeglikheid as die trikarboksielsuurfraksie besit.

Die inhibeerder is hierna uit 'n marmotnierpreparaat geïsoleer⁽⁸⁸⁾
en m.b.v. spektroskopiese analise kon ondubbelsinnig vasgestel word dat die
inhibeerder wel fluoor bevat⁽³²⁾. Fluoorsitroensuur is hierna deur Rivett⁽⁹⁴⁾
gesintetiseer en m.b.v. infrarooispektroskopie en ensiemstudies is dit be=
wys dat die inhibeerder fluoorsitroensuur is⁽⁸⁹⁾ en dat fluoorsitroensuur
akonitase kompetierend rem⁽⁷³⁾.

Verdere studies het aangedui dat die kondenseringsensiem (sitroen=
suursintetase) ook tydens FAc-vergiftiging geïnhibeer word⁽²¹⁾. Brady⁽¹⁸⁾
kon aandui dat die omsetting van asetielkoënsiem-A na sitroensuur kompe=
terend geïnhibeer word deur chemies-gesintetiseerde fluoorasetielkoënsiem
A. Hierdie effek is egter sekondêr t.o.v. die effek op akonitase anders sou
die sitroensuurophoping nie plaasvind nie.

Die biochemiese invloed van FAc kan na aanleiding hiervan soos volg
voorgestel word:



Daar is getuigenis dat FAc nie net tot FSS nie, maar ook tot ander verbindings omgesit word. In rotlewerskyfies het monofluorasetoon gevorm⁽⁷¹⁾, terwyl ten minste sewe metaboliete in die intakte rot uit fluorasynsuur-2-¹⁴C gevorm het⁽³⁰⁾. Daar is ook bevind dat FAc in die nie-verseepbare lipiede van rotlewer ingebou is⁽⁹⁰⁾, terwyl fluoorvetsure blykbaar uit FAc vorm by Dichapetalum toxicarium^(83, 110).

'n Aansienlike hoeveelheid werk is op die invloed van FAc op laer organismes gedoen, onder andere op suurdeeg⁽¹⁾ en ander swamme⁽²⁷⁾, op bakterieë⁽⁴⁹⁾, op alge⁽⁵⁰⁾ en ook op nematodes⁽⁶⁶⁾. In alle gevalle is die metabolisme deur FAc gerem, maar dit lyk nie asof FSS in alle gevalle gevorm is nie.

Goldman⁽³³⁾ het 'n pseudomonad uit grond geïsoleer wat FAc kon omskakel na glikolaat

d.w.s.



Die ensiem fluorasetaatfluoorhidrolase, wat die reaksie kataliseer, het 'n K_m van 2.3×10^{-3} M en die pH optimum is 9.3. Daar is ook aangedui dat

die hidroksielgroep van water afkomstig is en dat die reaksie nie omkeerbaar is nie⁽³⁴⁾.

Alhoewel 'n groot hoeveelheid werk op die invloed van fluoried op plantmetabolisme gedoen is^(115, 116, 117) is relatief min werk op die FAc-metabolisme van plante gedoen. Daar is bevind dat FAc die respirasie van plantweefsel inhibeer^(5, 15, 16, 36, 38, 44) en dat saadontkieming en die ontwikkeling van saailinge ook sterk gerem word⁽⁶⁾.

Oor die algemeen is plante baie minder sensitief vir FAc-vergiftiging as diere. Treble, Lamport & Peters⁽¹⁰⁶⁾ kon bv. aandui dat plantakonitase in vitro 2, 000 keer minder sensitief vir FSS as dierakonitase is. Dit het daartoe gelei dat FAc as sistemiese insekdoder op plante uitgetoets is⁽²³⁾. Groot welslae is behaal, maar a.g.v. die stabiliteit van FAc en die hoë toksisiteit vir soogdiere is FAc te gevaarlik om in die praktyk toe te pas.

Alhoewel sekere plante groot hoeveelhede fluoried opneem, kon geen sintese van organiese fluoorverbindinge by gras wat met 'n fluoriedoplossing natgegooi is, gevind word nie⁽⁸⁵⁾. Plante wat saam met Gifblaar groei (Parinarium capense en Dodonaea viscosa) het ook geen FAc bevat nie⁽¹⁰⁹⁾. Peters & Shorthouse⁽⁸⁶⁾ het egter aan die ander kant bevind dat 'n groot verskeidenheid plante in staat is om KF gedeeltelik na 'n vlugtige fluoorverbinding om te sit.

Pogings van Melamed⁽⁶⁸⁾ om die biosintese van FAc in Gifblaar na te gaan, het nie geslaag nie, hoofsaaklik omdat geen geskikte metodes vir die bepaling van fluoried in Gifblaar gevind kon word nie. Louw⁽⁵⁸⁾ en later ook Von Sydow⁽¹⁰⁸⁾ het die metode vir die bepaling van fluoried sodanig ontwikkel dat dit tans herhaalbare resultate lewer. In ongepubliseerde voorlopige proewe het Louw⁽⁵⁸⁾ gevind dat die anorganiese fluoriedkonsentrasie toeneem het na toediening van FAc aan sowel Gifblaar as Acacia georginae. Dit wil dus voorkom asof FAc in albei gevalle verder gemetaboliseer word. Peters, Murray & Shorthouse⁽⁸⁴⁾ het gevind dat die organiese fluorkonsentrasie van A. georginae saailinge toeneem het met NaF-toediening. Daar is later

gaschromatografies vasgestel dat 'n homogenaat van A. georginae saailinge FAc in die teenwoordigheid van KF, MnCl_2 , natriumpiruvaat, ATP en KH_2PO_4 gesintetiseer het⁽⁸⁷⁾.

Tot dusver is geen werk op die metabolisme van Gifblaar gedoen nie, behalwe dié van Balinsky & Schneiderman⁽⁴⁾ wat aanduidings gekry het dat 7u sneë van jong blare sitraat, isositraat, suksinaat en malaat kan oksideer.

4. Doelstelling van die ondersoek

Uit die voorafgaande literatuuroorsig is dit duidelik dat daar nog min werk op die metabolisme van Gifblaar gedoen is. Die volgende vrae doen hulleself voor:

1. Waarom is die FAc-konsentrasie in ou blare soveel laer as dié in jong blare? Word die FAc dalk uit die ouer blare vervoer na die ondergrondse stelsel; word die FAc moontlik deur reën uit die ouer blare geëluëer; of kan dit wees dat FAc dalk deur die ouerwordende blare gemetaboliseer word, en, indien wel, hoe vind die metabolisme plaas?
2. Waarom word Gifblaar nie deur die hoë FAc-konsentrasie ($\pm 0.01 \text{ M}$ in die totale selvloeistof van baie jong blaartjies) vergiftig nie? Moontlike verklarings mag wees dat:

(a) Gifblaar 'n „abnormale” metabolisme besit deur bv. (i) oor geen Krebssiklus te beskik nie, (ii) oor ensieme beskik wat óf nie gevoelig is vir fluoorbevattende metaboliëte nie (sodat HF bv. in plaas van waterstof op 'n sekere stadium uitgeskei word) óf in staat is om tussen fluoorbevattende en „normale” metaboliëte te onderskei.

(b) Die FAc mag moontlik ruimtelik van die ensiemstelsels in die sel geskei wees deur bv. in 'n vakuool gelokaliseer te wees. So mag FAc bv. na analogie van argumente vir die alkaloïede 'n „metaboliese eindproduk” wees. Die feit dat hoe jonger die blaar, hoe hoër die FAc-konsentrasie is, gekoppel met die feit dat hoe jonger die blaar hoe kleiner die vakuoolvolume

is, spreek teen hierdie argument. Verder is die FAc-konsentrasie in die groeipunt van die risoom die hoogste en hierdie meristimatiesselle besit geen of slegs 'n baie klein vakuoolvolume.

3. Wat is die meganisme vir die biosintese van FAc? Die aangewese wyse vir die vasstelling van die biosintese van FAc is om radioaktiewe fluoried aan Gifblaar toe te dien en dan die aktiwiteit te volg. Ongelukkig is die halfleeftyd van ^{18}F baie kort (122 minute) sodat dit nie 'n praktiese uitvoerbare projek is nie. 'n Ander benadering is om die verbinding waarmee fluoor of fluoried reageer om FAc te vorm (bv. asetaat, glikolaat, glisien of sianosynsuur) in 'n radioaktiewe vorm toe te dien en na te gaan of FAc gemerk is.

4. Is fluoor 'n essensiële element vir die normale groei van Gifblaar? Om hierdie projek aan te pak word 'n groot aantal sade benodig. Aangesien saad nie beskikbaar is nie, mag die probleem moontlik omseil word deur van die weefselkultuurtegniek, soos deur Steward^(100, 101, 102) ontwikkel, gebruik te maak.

In hierdie ondersoek is 'n poging aangewend om op die eerste twee vrae antwoorde te verkry en derhalwe is besluit om verskillende fasette van die metabolisme van Gifblaar na te gaan, veral met die toepassing van respirasietegnieke en radioaktiewe metaboliete.

Hoofstuk II

EKSPERIMENTELE METODES

"... every stride towards the solving of an important biological problem has been, and will have to be, prepared by the forging of the appropriate method" - Paech & Tracey⁽⁷⁶⁾.

1. Respirasiebepalings m.b.v. 'n Warburgrespirometer 12
2. Ekstraheermetodes 12
3. Skeiding van ekstrakte in fraksies 14
4. Bepaling van fluoried 15
5. Bepaling van sitroensuur 16
6. Chromatografie 17
7. Werk met ¹⁴C-verbindings 18

In hierdie afdeling word slegs metodes wat meer as een keer toegepas is, kortliks beskryf. Metodes wat slegs een keer toegepas is, soos bv. die sintese van $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$, is by die betrokke afdeling beskryf.

1. Respirasiebepalings m.b.v. 'n Warburgrespirometer

Volwasse blare van Gifblaar of kontroleplante wat ongeveer 8-9 uur in die oggend gepluk is, is uitgesoek om voldoende (ten minste tien) min of meer eenvormige blare te verkry en hierna is twaalf knipsels elk met 'n deursnee van 8 mm uit elke blaar geneem en in twaalf petribakkies met gedistilleerde water geplaas. Die bakkies is stadig heen en weer geskud m.b.v. 'n horisontale skudapparaat om sodoende beskadigde selmateriaal te verwyder. Die blaarknipsels is drooggeklad en tien blaarknipsels (volume ± 0.2 ml) is in 13 ml Warburgflessies (B. Braun Melsungen Apparatebau, tipe 3045) op drie ml fosfaatbuffer wat die toetsbestanddele bevat, geplaas. In die binneste kompartement is 0.2 ml 10% KOH-oplossing geplaas. Die flessies is aan die manometers (tipe 20105) gekoppel en in die donker gelaat om gaswisseling a.g.v. fotosintese uit te skakel. Die manometers is in 'n termostatische waterbad (Model V116) by 30°C ($\pm 0.01^{\circ}\text{C}$) met 'n amplitude van 2 cm en 'n frekwensie van 80 skommeling per minuut geskud. Na 'n ewilibreertyd van 15 minute, is die manometerlesings elke 15 minute m.b.v. 'n swak groen lamp afgelees, totdat die tydsduur van die eksperiment verstryk het. Hierna is die blaarknipsels afgewas en is die droëgewig en die stikstofinhoud volgens die mikro-Kjeldahlmetode bepaal⁽⁴³⁾. Deur van die fleskonstantes wat vooraf bepaal is⁽¹⁰⁷⁾, gebruik te maak, kon die suurstofvolume opgeneem per tyds-eenheid as mikroliter bereken word. Elke manometerlesing is gekorrigeer vir veranderinge in temperatuur en lugdruk m.b.v. 'n termobarometer.

2. Ekstraheermetodes

Die metaboliëte aanwesig in verskillende organe van Gifblaar en kontroleplante is op twee wyses geëkstraheer.

(a) Met 70% Etanol

Gewoonlik is 'n groot oormaat 70% etanol by fynversnipperde blaarweefsel gevoeg en die blaarweefsel is m.b.v. 'n Ultra-turrax homogeniseerder fyngemaak. Om te sorg dat die temperatuur nie te hoog styg nie, is die etanol vooraf afgekoel en die homogeniseerder is nie vir langer as vyf sekondes aaneenlopend aangeskakel nie. Die vesels is van die ekstrak geskei m.b.v. sentrifugering, en, waar 'n kwantitatiewe ekstrahering nodig was, is die proses nog drie keer herhaal. Die gesamentlike etanolekstrak is hierna in 'n Büchi-rolflesapparaat onder vakuum ingedamp na 'n klein waterige volume. Aangesien die vloeistof wat afgedamp word, se kookpunt slegs afhanklik is van die druk in die apparaat, is die temperatuur buite die fles gewoonlik by 70–80°C gehou, wat tot vinniger verdamping van die vloeistof lei. Sorg is gedra dat die oplossing nooit droogdamp nie. In gevalle waar al die oplosmiddel verwyder moes word, is die laaste paar ml by 'n temperatuur van 40°C verwyder. Die fles se inhoud is hierna kwantitatief met water in 'n skeitregter gewas en die lipiede is uit hierdie ekstrak verwyder deur herhaaldelik met chloroform op te skud totdat die chloroform nie meer groen was nie.

(b) Met metanol/chloroform/water (12:5:3) (MCW)

Nadat bewys is dat hierdie oplosstelsel baie meer doeltreffend as 70% etanol is⁽¹⁰⁾, ten minste wat die ekstrahering van aminosure betref, is in hierdie studie verder net van hierdie ekstraheermetode gebruik gemaak.

Weefsel met 'n vars gewig van 0.5–2 g is met 'n skêr stukkend geknip en in 20 ml MCW laat val, waarna die weefsel met 'n homogeniseerder, soos hierbo beskryf, fyngemaak is. Die mengsel is teen 500 x swaartekrag uitgeswaai vir 10 minute en nadat die ekstrak afgegiet is, is 20 ml MCW weer bygevoeg en die mengsel is vir 5 minute in 'n horisontale skudmasjien geskud. Die proses is herhaal en die gesamentlike MCW-ekstrakte is bewaar, waarna die proses nog twee keer met 70% etanol herhaal is. By die gesamentlike MCW-ekstrak is 10 ml chloroform en 15 ml water gevoeg en na deeglike vermenging, is die twee fases d.m.v. sentrifugering geskei. Die waterige fase

is met die etanolekstrak gekombineer en die chloroformfase is as die lipied=fraksie bewaar.

In gevalle waar minder weefsel gebruik is, is die hoeveelheid MCW ook verlaag. Indien die vesels na die derde MCW-ekstrahering nog groen was, is die proses weer eens herhaal en is die volume water en chloroform aan die einde bygevoeg dienooreenkomstig verhoog. In die gevalle waar die verspreiding van radioaktiwiteit in die verskillende fraksies nagegaan is, is die waterige fase nog twee keer met chloroform en die chloroformfase nog twee keer met water geëkstraheer.

3. Skeiding van ekstrakte in fraksies

Die basiese metode wat hier gebruik is, berus op die tegniek soos beskryf deur Boardman⁽¹⁴⁾.

In een reeks eksperimente was dit nodig om die aromatiese en polifenoliese verbindings vooraf te verwyder. Die ekstrak is gevolglik deur 'n klein kolommetjie aktiewe koolstof gestuur. (Die koolstof is vooraf vir 'n uur met 5% asynsuur opgeskud en is daarna goed met water gewas.) Aromatiese en polifenoliese verbindings word op die koolstof geadsorbeer en kan verplaas word met warm 95% etanol.

In die meeste gevalle is 'n enkele blaas wat 'n sekere behandeling ontvang het, geëkstraheer, en in hierdie gevalle is die volgende opstelling vir die fraksionering gebruik. Klein kolommetjies met 'n binnedeursnee van 8mm en 'n hoogte van 10-15 cm is uit Pyrex-glasbuisie getrek. Nadat 'n proppe fyn glaswol onder in die kolommetjies gedruk is, is een groep kolommetjies tot 'n hoogte van 2-3 cm met Dowex 50 X-4-hars in die H^+ -vorm gevul, terwyl die res met Dowex 1 X-8 in die formiaatvorm tot 'n hoogte van 6-8 cm gevul is. Aan die onderpunt van die Dowex 50-kolom is 'n deurboorde rubberproppe geplaas wat bo-op die Dowex 1-kolom inpas. Die twee kolommetjies is d.m.v. die rubberproppe gekoppel, en m.b.v. 'n rubberbuisie, met 'n deurboorde rubberproppe wat bo-op die Dowex 50-kolom pas aan die een

punt, is water uit 'n houer d.m.v. hewelwerking deur die twee kolommetjies gestuur. Daar is gesorg dat die kolommetjies nie in enige stadium droog word nie. Albei die kolommetjies is goed met gedistilleerde water gewas, en die monster is op die Dowex 50-kolom geplaas. Nadat die laaste gedeelte van die monster net weggesak het, is die kolom goed met gedistilleerde water gewas.

Die eluaat van die Dowex 1-kolom het die ongelaaide verbindings waaronder die koolhidrate die belangrikste groep uitmaak, bevat. Op die Dowex 50-kolom is die kationiese verbindings, waaronder die belangrikste groepe die aminosure en die stikstofbasië is, geadsorbeer.

Hierdie verbindings is met ongeveer 50 ml 1 N NH_4OH verplaas. Op die Dowex 1-kolom is die anioniese verbindings geadsorbeer. Hierdie verbindings, waaronder die organiese sure voorkom, is met 8 N mieresuur (+ 50-70 ml) geëluëer.

4. Bepaling van fluoried

Fluoriedbepalings is op monsters wat geen remstowwe van die latere kleurreaksie bevat nie, uitgevoer, en gevolglik was dit nie nodig om die fluoried eers d.m.v. Conway-mikrodifusie⁽²²⁾ te suiwer nie.

Die fluoorkonsentrasie is gebruik as 'n maatstaf van die hoeveelheid FAc wat daar in sekere oplossings teenwoordig was. 'n Geskikte deelvolumen van die FAc-oplossing is op 'n stukkie swart filtreerpapier (Whatman No. 29) geplaas. Die filtreerpapier is in 'n suurstofge vulde Thomas-Ogg-suurstofverbrandingsfles oor 4 ml verdunde NaOH (0.05 N) gehang. Hierna is die filtreerpapier veras deur 'n bundel infrarooilig op die swart papiertjie wat in die fles hang, te fokus. Nadat die anorganiese fluoried wat a.g.v. die verassing gevorm het, in die NaOH opgelos het, is die fluoriedinhoud van hierdie oplossing kolorimetries d.m.v. die metode van Johnson & Leonard⁽⁴⁶⁾ bepaal.

5. Bepaling van Sitroensuur (SS)

Die SS-konsentrasie is volgens die metode van McArdle⁽⁵⁹⁾ bepaal. Die bepaling berus op die oksidasie van sitroensuur na asetoondikarboksielsuur deur natriumvanadaat in die teenwoordigheid van swawelsuur. Met 'n kaliumbromied/kaliumbromaat-mengsel is die asetoondikarboksielsuur na pentabroomasetoon omgeskakel. Nadat die oormaat broom en suur verwyder is, en die pentabroomasetoon met petroleumeter geëkstraheer is, is 'n natriumsulfiet-tioureum-boraks-oplossing by die petroleumeterrekstrak gevoeg en die kleurintensiteit is by 435 en 500 m μ gelees. Beide glukose en asetoasetaat gee 'n sterk kleur by 435 m μ , maar 'n weglaatbaar-swak kleur by 500 m μ .

Voorlopige bepalinge op suiwer SS was bevredigend, maar toe die metode op ontvette Gifblaarekstrakte toegepas is, is wisselvallige en hoë waardes verkry. Vervolgens is die ekstrakte in kationiese, anioniese en ongelaaide fraksies geskei, en SS is op die anioniese fraksie bepaal, maar die SS-waardes was nog onrealisties hoog.

Volgens Weil-Malherbe & Bone⁽¹¹⁴⁾ kan verbindings soos salisielsuur en ander aromatiese verbindings ook die bepaling van SS belemmer. Die invloed van hierdie verbindings kan volgens hulle uitgeskakel word deur die ekstrak vooraf te bromeer. Voorafgaande bromering is op Gifblaarekstrakte toegepas en dit het tot 'n verlaging in die SS-waarde gelei. Daar is egter probleme by die voorafbromering ondervind en 'n ander metode om die belemmerende verbindings te verwyder, is toegepas. Om die aromatiese verbindings te verwyder, is die ekstrak eers deur 'n klein kolommetjie suurgewas te aktiewe koolstof gestuur. Die eluaat is hierna, soos reeds beskryf, in kationiese, anioniese en ongelaaide fraksies verdeel. Toe die SS-konsentrasie hierna in die anioniese fraksie bepaal is, is realistiese en herhaalbare waardes verkry.

6. Chromatografie

Beide dalende en stygende papierchromatografie is in 'n temperatuurge=
kontroleerde kamer (27°C) toegepas. In die geval van stygende chromato=
grafie is van 44 cm hoë silindervormige houers met 'n deursnee van 21 cm
wat met 'n Perspex-deksel dig afgesluit is, gebruik gemaak. Die chromato=
grafiepapier (Whatman No. 1 of 3) is silindervormig vasgekram en in die
chromatografiehouer regop laat staan. Hierdie stelsel is gebruik vir die
chromatografie van organiese sure met etielasetaat:mieresuur:water (10:2:3)
(EMW) as loopvloeistof⁽⁴⁵⁾.

Vir die dalende chromatografie is glastenks (30 x 70 x 70 cm) wat met
glasdeksels (verseël met rubberstroke) afgesluit is, gebruik. Die opstelling
van die trôe en die wyse waarop die papier vasgehou is, is soos elders be=
skryf is⁽¹³⁾. Whatman No. 1 en 3 papier (57 x 46 cm) is gebruik. In sekere
gevalle is ook kleiner chromatogramme (28 x 23 cm) gemaak deur van kleiner
kabinette (50 x 30 x 37 cm) gebruik te maak.

Vir aminosure is die volgende twee stelsels gebruik; butanol:asynsuur:
water (90:10:29) (BAW) en waterversadigde fenol, vir koolhidrate; butanol:
asynsuur:water (10:1:3) en vir organiese sure; propanol:ammonia:water
(6:3:1) (PAW) en sekondêre butanol:mieresuur:water (6:1:2) (BMW).

Die chromatogramme is in 'n dampkas by 27°C gedroog en met die
betrokke kleurreagens gespuit waarna die kleurontwikkeling in geventileerde
termostaties gekontroleerde oonde plaasgevind het. Die volgende kleurrea=
gense is gebruik:

Aminosure⁽²⁶⁾: Gespuit met 0.25% ninhidrien opgelos in 5% metanoliese
2, 4, 6-kollidien. Verhit by 80°C vir 10-20 minute.

Koolhidrate: (i) Gespuit met 0.93 g anilien en 1.6 g ftalsuur wat in 100 ml
waterversadigde butanol opgelos is waarna vir 10 minute by $105-110^{\circ}\text{C}$ ver=
hit is⁽⁷⁷⁾.

(ii) Gespuit met 0.5 g orsinol en 15 g trichloorasynsuur opgelos in 100 ml waterversadigde butanol en 20-40 minute verhit by $105-110^{\circ}\text{C}$ ⁽⁹⁾.

(iii) Gespuit met 'n mengsel van 0.15 g difenielamien wat in 20 ml etielasetaat opgelos is waarby nog 0.8 ml anilien, 80 ml etielasetaat en 11 ml 80% (g/v) fosforsuur gevoeg is en hierna vir 5-10 minute by $95-100^{\circ}\text{C}$ verhit⁽⁵²⁾.

Organiese sure: (i) Gespuit met 2 g glukose en 2 ml anilien wat in 20 ml water opgelos is en met 20 ml etanol en 60 ml butanol gemeng is waarna vir 5-10 minute by 130°C verhit⁽⁷⁰⁾ is.

(ii) Gespuit met 0.03 g metielrooi wat in 100 ml bufferoplossing (30 ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (19.07 g/l) + 70 ml H_3BO_4 (12.37 g/l)) opgelos is⁽⁵³⁾.

7. Werk met ^{14}C -verbindinge

Die betrokke aktiewe verbinding is met 'n mikropipet (5, 10 of 20 mikroliter) op die blare gestryk sodat dit so 'n groot oppervlak as moontlik bedek het. In die geval waar baie jong blaartjies gebruik is, is die wasagtige bedekking met die punt van die mikropipet oor 'n redelike groot oppervlakte van die blaartjie afgekrap. Na verloop van die verlangde tyd is die blaartjie afgeknip en in 15 ml MCW by -80°C geplaas.

Na ekstrahering en fraksionering soos elders beskryf, is die oplossing drooggedamp en opgemaak na 0.5 ml. Twintig mikroliter van elke fraksie is hierna op 'n koperplanchet geplaas en die aktiwiteit is m.b.v. 'n Tracerlab Geiger-Müller-apparaat bepaal.

Die verskillende fraksies is gechromatografeer soos elders bespreek, en die verspreiding van die aktiwiteit is op twee wyses bepaal. In die eerste plek is radio-outogramme gemaak deur Kodak Kodirex X-straal-film in 'n donkerkamer (met fotografies-veilige rooi beligting) aan die chromatogram vas te heg. Na verloop van 'n sekere tyd (gewoonlik 1-2 weke) is die films

afgehaal, aan spesiale houers vasgeheg en vir 3-6 minute in die donker in Kodak X-straal-ontwikkelaar ontwikkel, waarna dit vir 10-30 minute in Kodak X-straal-fikseerder gefikseer is. Die films is vir 'n uur in lopende kraanwater gewas, en is hierna gedroog. Met die merke van die krammetjies as rigsnoer is die film weer op die chromatogram, wat ondertussen met 'n kleurreagens behandel is, vasgeheg. Hierdie metode is veral op twee-dimensionele chromatogramme van belang.

Die lokalisering van die aktiwiteit in eendimensionele chromatogramme het in sekere gevalle m.b.v. 'n skerm geskied. Die skerm wat van dik bladaluminium gemaak is, het oor die Geiger-Müller telbuis gepas, en het 'n opening van $3 \times 1\frac{1}{2}$ cm voor die Geiger-Müller venster gehad. Die chromatogram is onder ultravioletlig beskou en gewoonlik kon duidelik gesien word waar die gechromatografeerde verbinding beweeg het. Die middellyn hiervan is met 'n potloodstreep aangedui. Die tyd nodig vir 320 tellings is vir elke cm vanaf die oorsprong tot by die front bepaal deur die Geiger-Müller telbuis met die bladaluminiumopening dwars gedraai vir 1 cm op 'n keer regoor die potloodlyn aan te skuif. Hieruit kon die tellings per minuut teenoor die afstand vanaf die oorsprong gepunteer word.

Hoofstuk III

RESPIRASIEPROEWE MET GIFBLAAR

"In some plant tissues also fluoroacetate is able to bring about inhibition of oxygen uptake" - Beevers⁽⁷⁾.

A. Die invloed van FAc op respirasie 21

1. Inleiding 21

2. Respirasie in die teenwoordigheid van FAc 22

3. Respirasie in die teenwoordigheid van MeFAc en MeAc 27

B. Die metabolisme van FAc 30

C. Bespreking 38

A. Die invloed van FAc op respirasie

1. Inleiding

Om uit te vind of Gifblaar in staat is om FAc te metaboliseer, kan van respirasiebepalings gebruik gemaak word. Aangesien suurstof die finale oksideermiddel in aerobiese metaboliese stelsels is, kan die suurstofopname van weefsels gebruik word om 'n aanduiding te kry van die metaboliese aktiwiteit van die betrokke weefsel. 'n Vergelyking van die suurstofopname van 'n organisme met en sonder toediening van 'n sekere verbinding kan bv. 'n aanduiding gee of die verbinding as 'n substraat of as 'n remstof van respirasie optree. Daar is reeds voorheen aangedui dat FAc die suurstofopname van aartappelknolskyfies^(5, 36), Avena koleoptielsegmente^(15, 16), garswortels⁽⁴⁴⁾ en koringkiemlinge⁽³⁸⁾ rem. Dit is dus interessant om na te gaan of FAc ook die suurstofopname van Gifblaar rem. Om die suurstofopname te bepaal, is van die Warburg-tegniek, soos beskryf in hoofstuk II, gebruik gemaak.

Vir die toepassing van die Warburg-tegniek is dit belangrik dat die materiaal hom tot verteenwoordigende monsterneming moet leen. Aangesien dit nie prakties moontlik is om Gifblaarblare te kry wat presies ewe groot is en in dieselfde fisiologiese toestand verkeer nie en omdat die blare in elk geval te groot is om in die Warburgflessies te kom, is blaarknipsels i.p.v. heel blare gebruik.

In 'n reeks voorlopige proewe om die invloed van FAc op die respirasie van Gifblaar te bepaal, is 'n groot mate van variasie aangetref. Desnieteenstaande was daar wel aanduidings dat FAc die respirasie van Gifblaar stimuleer. Aangesien daar op daardie stadium net ses Warburg-manometers beskikbaar was, en gevolglik nie voldoende herhalings ingesluit kon word nie, is die saak voorlopig daar gelaat.

Later is nog 12 manometers aangekoop en dr. B. von Sydow, wat toe pas uit Göttingen as gasnavorser hier aangekom het, het, sonder dat hy van

my vroeëre pogings bewus was, besluit om die eksperimente met die tegniese bystand van mev. M.C. van Beijma oor 'n wyer FAc-konsentrasiegebied te herhaal en om ook later verskillende kontroleplantsoorte* in te sluit. Uit sy resultate het hy afgelei dat daar geen betekenisvolle verskille tussen die invloed van verskillende FAc-konsentrasies op die suurstofopname van Gifblaar bestaan nie⁽¹⁰⁸⁾. Hy het goedgegunstiglik sy syfers tot my beskikking gestel en ek het gevind dat sy verwerkings net op die suurstofopname na twee uur gebaseer is en dat hy nie die lesings wat vooraf geneem is, in berekening gebring het nie. Ek het die resultate op 'n ander wyse verwerk, waarmee dr. Von Sydow hom nie vereenselwig nie, en hieruit het dit geblyk dat FAc wel die respirasie van Gifblaar stimuleer. (In 'n finale verslag⁽¹⁰⁹⁾ het dr. Von Sydow ook die betrokke resultate op 'n ander wyse as in die eerste verslag⁽¹⁰⁸⁾ verwerk en geïnterpreteer.)

Die resultate wat op bogenoemde wyse van dr. Von Sydow verkry is, is in figure 1, 2, 3 en 4 aangedui. Die resultate wat in figure 5 en 6 weergegee is, is in samewerking met dr. Von Sydow verkry, terwyl al die verwerkings, bespreking en gevolgtrekkings en die resultate wat in figure 7 en 8 aangedui word, my eie werk is. Terwille van die kontinuïteit word al die resultate hier weergegee.

2. Respirasie in die teenwoordigheid van FAc

Om uit te vind watter konsentrasie FAc die grootste effek op die respirasie van Gifblaar het, is die invloed van vyf verskillende FAc-konsentrasies bepaal. In elke eksperiment is duplikaat monsters blaarknipsels aan die volgende konsentrasies FAc in 0.03 M KH_2PO_4 -buffer (pH = 4.5) blootgestel: geen FAc (kontrole), 0.0005 M, 0.0025 M, 0.005 M, 0.025 M en 0.05 M FAc. Die blaarskyfies is vooraf vir drie uur onder gekontroleerde toestande op bogenoemde oplossings op 'n skudtafel laat dryf.** Hierna is die suurstof=

*D.w.s. plante wat nie FAc bevat nie, en dus, wat hierdie aspek betref, as kontrole kan dien.

**Later is bevind dat ooreenstemmende resultate behaal word indien die drie uur voorafbehandeling weggelaat word.

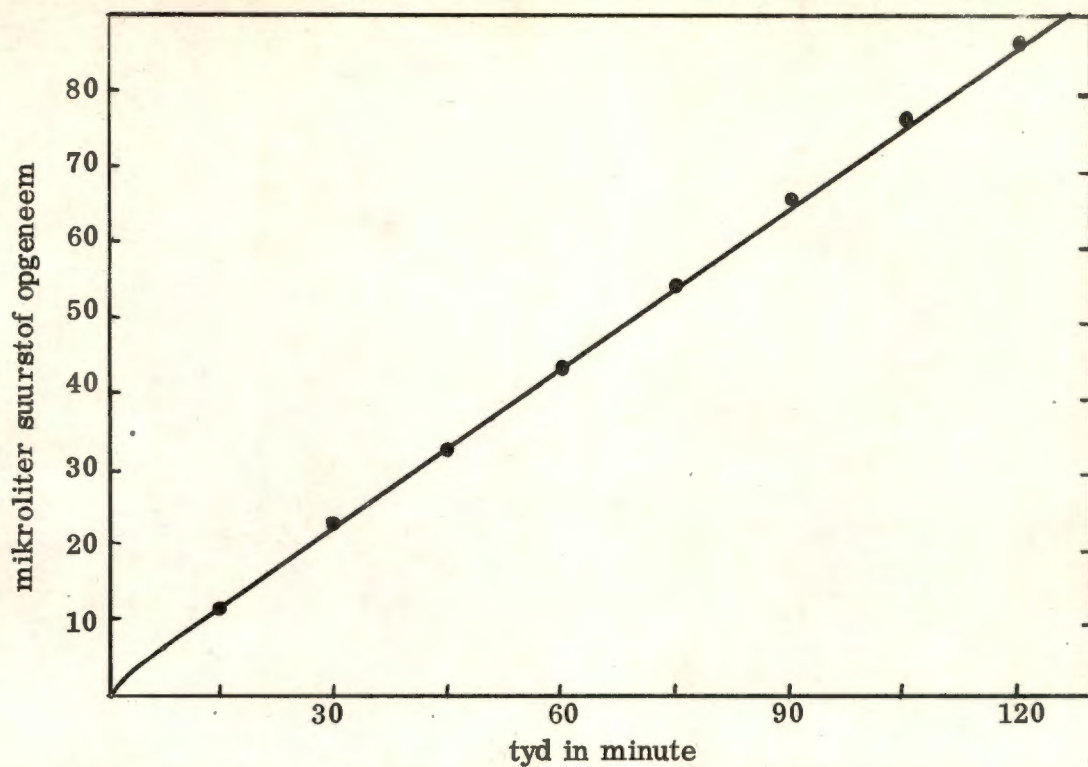
opname van die verskillende blaarskyfies (nog steeds op die verskillende FAc-oplossings) met tussenposes van 15 minute oor 'n totale proeftydperk van twee uur bepaal. Die suurstofopname is bereken in terme van mikroliter suurstof opgeneem per mg stikstof in die monster.

Omdat 'n groot mate van variasie aangetref is, (variabiliteitskoëffisiënt vir kontroles = 38%) is die eksperiment ses keer herhaal. Hierdie variasie het nie net tussen herhalings van die eksperiment nie, maar ook tussen duplikaatbehandelings in elke eksperiment voorgekom, maar in laasgenoemde geval is die variabiliteitskoëffisiënt vir die kontroles baie laer (5.8%). Dit dui daarop dat die variasie nie hoofsaaklik aan inherente variabiliteit van die materiaal op 'n gegewe oomblik toe te skryf is nie, maar eerder aan die invloed van omgewingstoestande in die veld of endogene prosesse op die fisiologiese toestand van die materiaal.

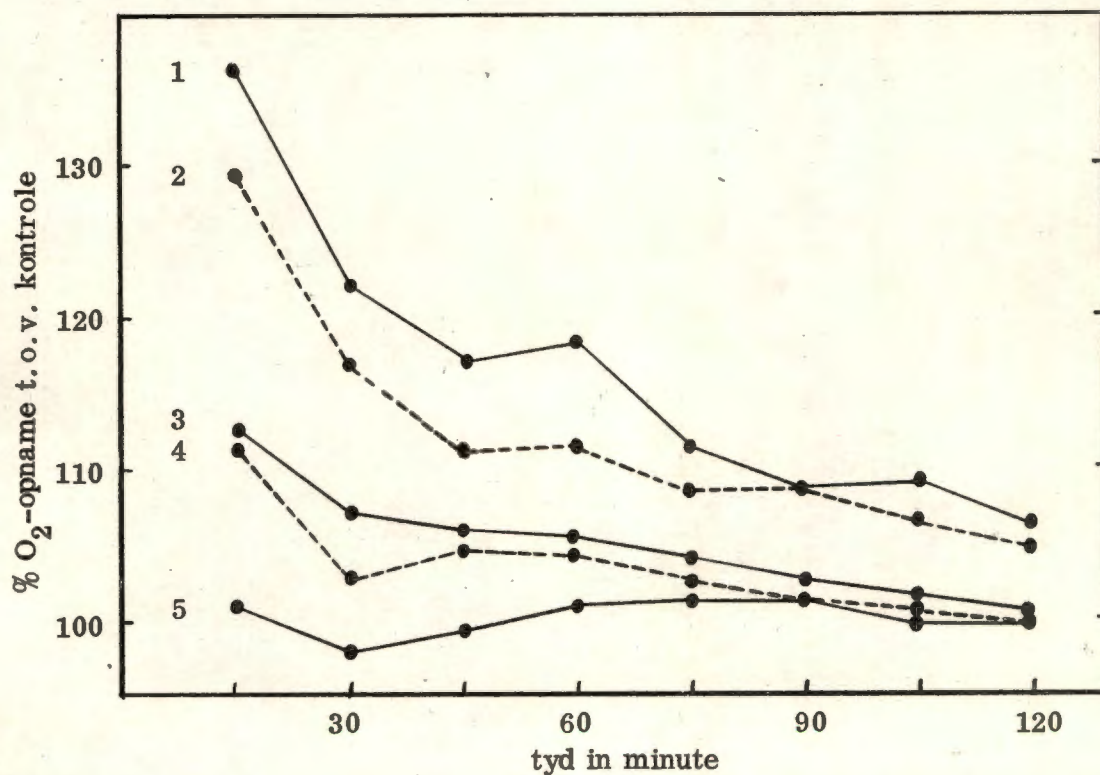
Die gemiddelde suurstofopname van die kontroles was na twee uur 87.1 mikroliter suurstof per mg stikstof met 'n standaardafwyking van 31.5. Die kontrolebehandelings het 'n baie gelykmatige tempo van suurstofopname oor die hele tydsduur van die eksperiment geopenbaar soos aangedui in figuur 1, waar die gemiddelde suurstofopname teenoor tyd gepunteer is.

Deur telkens die suurstofopname van die kontrole as interne maatstaf te gebruik, kan die invloed van die variërende faktore op die resultate dus uitgeskakel word. Vir verdere verwerking van die resultate is die gemiddelde van die twee duplikate as uitgangspunt gebruik en hieruit is die suurstofopname as 'n persentasie van die kontrole (= 100%) telkens bereken om al die resultate op 'n vergelykbare basis te kry.

Die gemiddelde waardes vir die ses eksperimente is in figuur 2 aangedui. Deur figuur 1 in berekening te bring, kan die gemiddelde suurstofopname vir die verskillende gevalle bereken word. Alhoewel die resultate 'n baie duidelike neiging openbaar naamlik dat hoe hoër die FAc-konsentrasie is, hoe meer word suurstofopname gestimuleer en dat die stimulering aanvanklik hoër is as later, moes 'n variansieanalise uitgevoer word om uit te vind of die ver-



Figuur 1 Die gemiddelde suurstofopname van kontrolebehandelings van Gifblaarskyfies.



Figuur 2 Die invloed van verskillende konsentrasies FAc op die persentasiesuurstofopname (kontrole = 100%) van Gifblaarskyfies. (1 = 0.05 M, 2 = 0.025 M, 3 = 0.005 M, 4 = 0.0025 M, 5 = 0.0005 M FAc.)

skille betekenisvol is al dan nie. Die gemiddelde persentasie-suurstofopname (kontrole = 100%) vir die duplikaatbehandelings van elke eksperiment is as uitgangsyfer vir die variansieanalise gebruik.

Bron van Variansie	Vryheids= grade	Som van kwadrate	Gemiddelde kwadraat	F
Behandelings	39	15912.70	408.02	6.42**
Konsentrasies	4	8518.48	2129.62	33.51**
Tye	7	4773.08	6818.69	10.73**
Wisselwerkings	28	2636.84	94.14	1.48
Herhalings	5	16962.43	3392.40	53.38**
Fout	195	12392.00	63.55	
Totaal	239	45267.13		

Tabel 1 Variansieanalise van die invloed van vyf konsentrasies FAc op persentasiesuurstofopname by Gifblaar.

Uit tabel 1 is dit duidelik dat daar hoogsbetekenisvolle verskille tussen tye en konsentrasies bestaan. Die gemiddelde invloed van FAc-konsentrasie vir al die verskillende tye sowel as die KBV (kleinste betekenisvolle verskil) volgens die metode van Scheffé⁽⁹⁸⁾ bereken, word in figuur 3 aangedui. Dit is duidelik dat die twee hoogste konsentrasies FAc tot 'n hoogsbetekenisvolle hoër suurstofopname as die kontrole en die laagste FAc-konsentrasie gelei het.

Omdat die resultate streng gesproke nie heeltemal onafhanklik van mekaar is nie, mag daar vanuit 'n biometriese oogpunt beswaar teen bogenoemde analise van die resultate ingebring word. Vervolgens is die resultate op aanbeveling van dr. S.G. Reinach (Hoof, Dept. Biometrie, U.P.) op 'n ander wyse ontleed. Dieselfde uitgangsyfers as voorheen (persentasiesuurstofopname t.o.v. kontrole) is gebruik en vir elke herhaling van die verskillende konsentrasies is die oppervlakte onder die kromme bereken volgens die metode van Simpson⁽³⁵⁾. (Kyk tabel 2) Hierdeur is die invloed van tyd uitgeskakel.

Die waardes is ontleed volgens die metode van Friedman soos beskryf in Siegel⁽⁹⁷⁾. Die meervoudige betroubaarheidsinterval, soos afgelei deur Reinach⁽⁹²⁾, is bereken en m.b.v. die waarde is gevind dat die hoogste en laagste konsentrasie FAc behandelings op die 5% peil verskil. D.w.s. die hoogste konsentrasie FAc het 'n betekenisvolle hoër suurstofopname as die laagste konsentrasie FAc veroorsaak.

Herha= lings	0.05 M FAc	0.025 M FAc	0.005 M FAc	0.0025 M FAc	0.0005 M FAc
1	(753) 2	(788) 1	(710) 3	(688) 5	(697) 4
2	(726) 5	(761) 3	(776) 2	(727) 4	(815) 1
3	(658) 5	(750) 4	(804) 3	(859) 2	(950) 1
4	(650) 3	(641) 5	(646) 4	(737) 1	(655) 2
5	(764) 5	(869) 3	(797) 4	(869) 2	(901) 1
6	(571) 5	(661) 4	(691) 3	(783) 2	(843) 1
R_1	25	20	19	16	10

Tabel 2 Die oppervlakte onder die krommes verteenwoordig in figuur 2 (kontrolle telkens = 700) en ooreenstemmende rangnommers volgens Friedman⁽⁹⁷⁾ $KBV_R = 14.8$.

Daar is gevind dat 'n lae anorganiese fluoriedkonsentrasie in sekere gevalle tot stimulerings van respirasie by plante gelei het^(37,81). Dit mag dus wees dat die invloed van FAc op Gifblaarrespirasie deur kontaminerende fluoried in die FAc veroorsaak word. Om die stimulerings wat in die vorige proewe verkry is, te bevestig en om bogenoemde moontlikheid te ondersoek, is eksperimente waar die invloed van FAc op die respirasie van Gifblaar en drie kontroleplantsoorte vergelyk word, uitgevoer.

As kontroleplantsoorte is Parinarium capense (Grysappel), Ochna pulchra (Lekkerbreek) en Dodonaea viscosa uitgekies omdat hulle so algemeen saam met Gifblaar voorkom. Dieselfde tegnieke as voorheen is toegepas, maar benewens die kontrolebehandeling, is net twee konsentrasies FAc, nl. 0.05 M en 0.0005 M (in 0.03 M KH_2PO_4), gebruik. In elke proef is Gifblaar

met een van die drie kontroleplante vergelyk. Hier is weer eens duplikate van elke behandeling toegepas en die gemiddelde is gebruik vir verdere verwerkings. Met elkeen van die kontroleplante is die proef drie keer herhaal sodat vir Gifblaar elke punt in figuur 4 die gemiddelde van agtien verwerkte replikate verteenwoordig. Vir die kontroleplante verteenwoordig elke punt die resultaat wat op ses lesings gebaseer is.

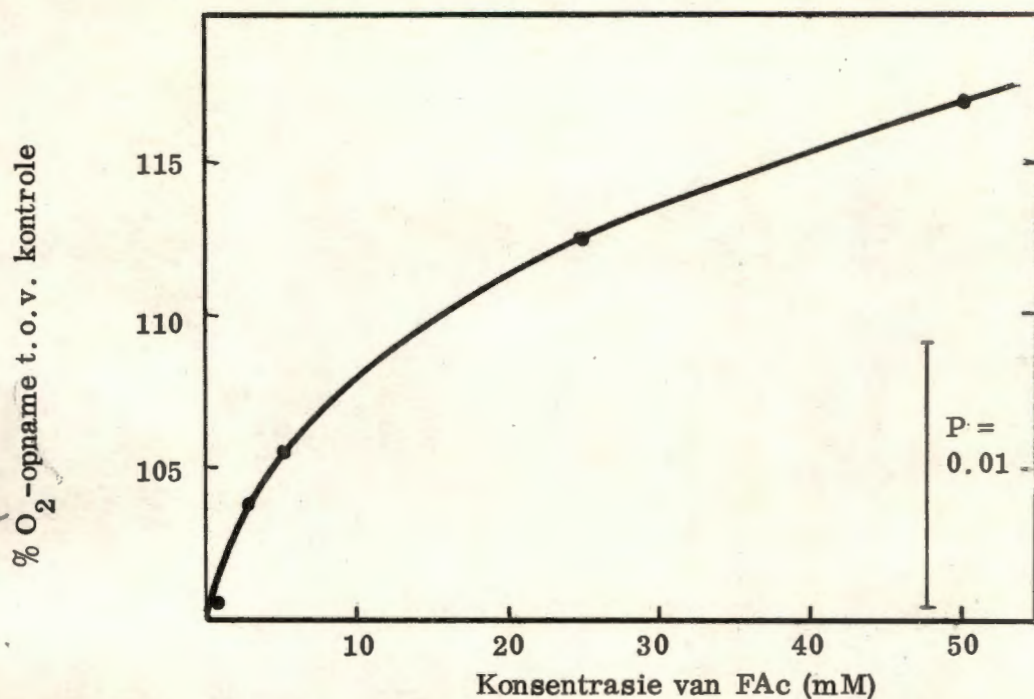
Uit figuur 4 is dit duidelik dat die respirasie van aldie die kontroleplantsoorte deur die hoë konsentrasie FAc geïnhibeer is. Dit wil voorkom asof Grysappel (*P. capense*) meer gevoelig as *D. viscosa* en minder gevoelig as *O. pulchra* vir FAc is. In tabel 3 word die gemiddelde persentasiesuurstofopname van die behandelings en die suurstofopname van die kontrolebehandelings aangegee.

	0.0005 M FAc	0.05 M FAc	Gemiddeld	Kontrole* respirasie	Standaard afwyking	Variab= koëff.
Gifblaar	108.9	122.3	115.6	69.2	26.9	38.9
<i>D. viscosa</i>	107.5	75.7	91.5	51.3	6.3	12.3
Grysappel	92.2	62.3	77.6	132.8	9.9	7.5
<i>O. pulchra</i>	76.4	54.5	65.5	56.2	26.4	46.9

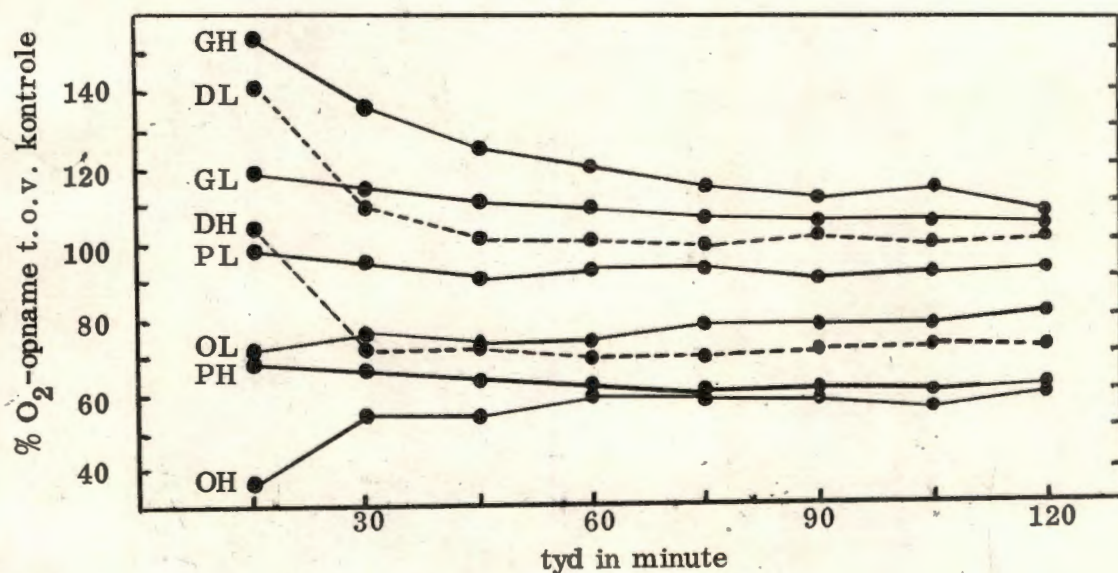
Tabel 3 Die gemiddelde persentasiesuurstofopname (kontrole = 100%) van Gifblaar en kontroleplantsoorte.

* μ liter suurstof opgeneem per mg N in twee uur.

Dit is duidelik dat die respirasie van Gifblaar met 'n verhoging in die FAc-konsentrasie toeneem terwyl die respirasie van aldie die kontroleplantsoorte afneem met 'n verhoging in FAc-konsentrasie. Die toename in respirasietempo van Gifblaar kan dus waarskynlik nie aan kontaminerende anorganiese fluoried toegeskryf word nie, anders sou die respirasie van die kontroleplantsoorte ook toeneem het tensy FAc die respirasie van die kontroleplantsoorte meer rem as wat fluoried dit stimuleer. Uit die resultate in tabel 3 weergegee wil dit voorkom asof Grysappel die geskikste kontroleplant van die drie is omdat dit baie minder variasie as *O. pulchra* getoon het en omdat dit 'n



Figuur 3 Die invloed van FAc-konsentrasie op die persentasiesuur=stofopname (kontrole = 100%) van Gifblaarblaarskyfies. (Gemiddelde van al die verskillende tye)



Figuur 4 Die invloed van FAc op die persentasiesuurstofopname (kontrole = 100%) van die blaarskyfies van Gifblaar en drie kontroleplante. (G = Gifblaar, P = Grysappel, O = Ochna pulchra, D = Dodonaea viscosa, H = 0.05 M en L = 0.0005 M FAc)

groter effek as D. viscosa t.o.v. FAc openbaar het. Verder is dit ook die een wat morfologies die meeste met Gifblaar ooreenstem. In verdere proewe is Grysappel dus telkens as kontroleplant gebruik.

3. Respirasie in die teenwoordigheid van MeFAc en MeAc

Die stimulerings van die respirasie van Gifblaar deur FAc was baie wisselvallig en relatief laag. Pogings om 'n verhoogde effek te verkry deur die blaarskyfies vooraf in vakuum met die oplossing te infiltreer het nie tot 'n groter effek gelei nie. Eweneens het pogings om die blaar vooraf in 'n mate te verhonger deur dit in die donker te hou totdat die reserwevoedingstowwe eers opgebruik is, ook nie tot 'n noemenswaardig hoër stimulerings gelei nie. 'n Interessante waarneming naamlik dat Gifblaar blykbaar nie stysel bevat nie, is tydens hierdie ondersoek gemaak.

Aangesien molekule oor die algemeen baie makliker as ione deur plantselle opgeneem word⁽³¹⁾, kan verwag word dat die pH van die toetsoplossing 'n invloed sal uitoefen op die opname van FAc. Omdat die sout van sterk sure volledig ioniseer in water, sal die opname van FAc van die ionisasiekonstante van fluoorasynsuur en van die pH afhanklik wees.

D.w.s.



Die ionisasiekonstante van fluoorasynsuur is ongeveer 2.2×10^{-3} (42)

(m.a.w. $\text{pK} = 2.7$). In die Henderson-Hasselbalch-vergelyking word die invloed van pH op die verhouding van gedissosieerde tot ongedissosieerde suur weergegee.

Vir fluoorasynsuur dus:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{CH}_2\text{FCOO}^-}{\text{CH}_2\text{FCOOH}}$$

daarom $\text{pH} - 2.7 = \log \frac{\text{CH}_2\text{FCOO}^-}{\text{CH}_2\text{FCOOH}}$

By 'n pH van 2.7 sal daar dus ewe veel fluorasetaatone en fluorasynsuurmolekule teenwoordig wees. By die pH waarby die vorige reeks eksperimente uitgevoer is, naamlik 4.5, is daar dus ongeveer 'n honderd keer meer fluorasetaatone as fluorasynsuurmolekule teenwoordig. Aldous & Rozee⁽¹⁾ kon dan ook aantoon dat die toksiese effek van FAc op suurdeegselle sterk afhanklik is van die pH.

Indien die pH van die oplossing waarin die FAc toegedien word, dus baie verlaag word, sal 'n veel groter gedeelte van die FAc in die ongedissosieerde vorm wees en kan verwag word dat dit makliker opgeneem sal word. 'n Verlaging van die pH mag egter tot belangrike neweverskynsels a.g.v. ensieminhivering of ander effekte lei, en gevolglik is die invloed van pH nie nagegaan nie.

'n Ander moontlikheid om die opnameprobleem te omseil is om 'n derivaat van FAc toe te dien wat nie sal ioniseer nie en wat in vivo maklik omgesit behoort te word na FAc. Die keuse het op metielfluorasetaat (MeFAc) geval. Hierdie verbinding ioniseer nie omdat hier net kovalente bindings betrokke is. Aangesien esters oor die algemeen maklik opgeneem word en in vivo maklik afgebreek word na die vry suur, behoort dit geskik te wees.

Bergmann & Blank⁽⁸⁾ het 'n metode beskryf vir die sintese van etielfluorasetaat (EtFAc) wat berus op die fluorering van etielchloorasetaat met KF wat in asetamied opgelos is. Dieselfde metode, met die onderskeid dat metielbroomasetaat as uitgangstof gebruik is, is aangewend vir die sintese van MeFAc.

Aangesien MeFAc maklik gehidroliseer word na fluorasynsuur in die teenwoordigheid van 'n hoë waterstofioonkonsentrasie, is daar met hierdie reeks proewe 'n $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -buffer (30 ml 0.067 M KH_2PO_4 + 70 ml 0.067 M Na_2HPO_4) van pH 6.4 gebruik, en die suurstofopname is direk na toediening begin meet. 'n Aantal eksperimente is vervolgens op Gifblaar en Grysappel uitgevoer en die suurstofopname is bepaal in die teenwoordigheid van $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -buffer, 0.025 M MeFAc in die buffer en 0.00025 M

MeFAC in die buffer. Die resultate is op dieselfde wyse as voorheen verwerk, en word in figuur 5 weergegee.

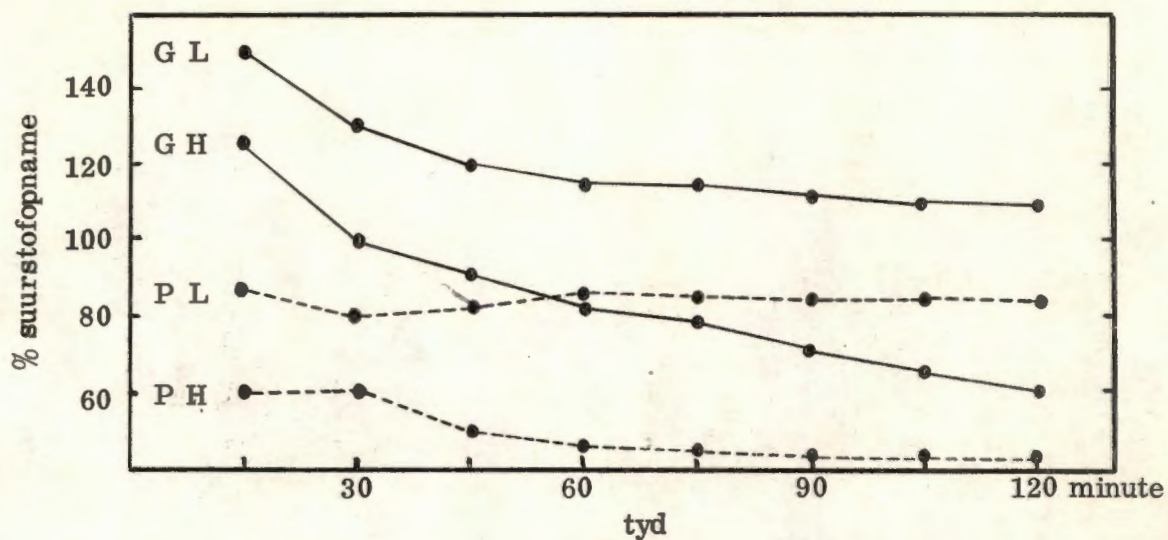
Uit figuur 5 is dit duidelik dat wat die lae konsentrasie betref dieselfde neiging as voorheen aangetref is. Waar die gemiddelde persentasiestimulering van die respirasie met toediening van 0.0005 M FAc 8.9% is, is die gemiddelde persentasiestimulering met die toediening van 0.00025 M MeFAC 21%. Dit mag dus wees dat die laer stimulering in die geval van FAc-toediening aan swakker opname toegeskryf kan word. Aangesien hierdie prepraat geen anorganiese fluoried behoort te bevat nie, dui dit daarop dat die toename in respirasietempo waar FAc toegedien is, nie slegs aan fluoried toegeskryf kan word nie. By Grysappel is dieselfde effek as voorheen verkry. Die hoër konsentrasie MeFAC het naamlik 'n sterker remmende invloed uitgeoefen as die laer konsentrasie, verder was die effek in albei gevalle groter as dié verkry met FAc.

Die hoë konsentrasie MeFAC het aanvanklik ook die respirasie van Gifblaar gestimuleer, maar na 'n kort tydjie is die respirasie gerem. 'n Moontlike verklaring vir hierdie waarneming is dat die MeFAC in vivo na fluoorasynsuur en metanol gehidroliseer word en dat die konsentrasie metanol so hoog is dat dit 'n toksiese invloed uitoefen.

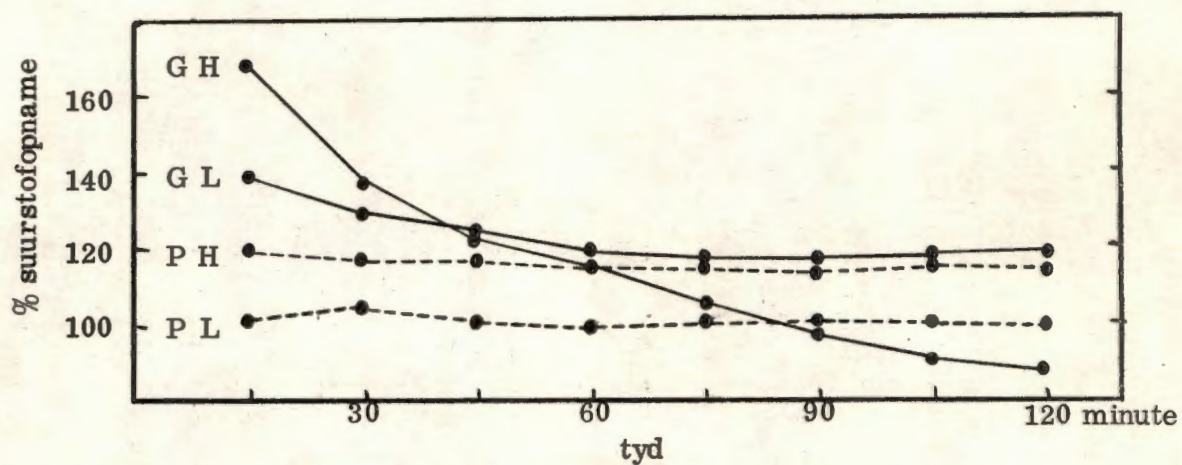
Om hierdie moontlikheid te ondersoek is 'n ooreenstemmende reeks eksperimente met metielasetaat (MeAc) i.p.v. MeFAC uitgevoer. Die resultate word in figuur 6 weergegee.

Dit is duidelik dat dieselfde effek alhoewel vertraag, by Gifblaar met 0.025 M MeAc as met 0.025 M MeFAC aangetref is. Aangesien ooreenstemmende konsentrasies natriumasetaat (NaAc) in voorafgaande proewe geen remmende (of noemenswaardige stimulerende) effek t.o.v. die respirasie van Gifblaar openbaar het nie, wil dit voorkom asof die remming hier grotendeels aan die hand van in vivo metanolvorming verklaar kan word.

Dit is interessant dat Grysappel baie minder deur die gepostuleerde



Figuur 5 Die invloed van MeFAc ($L = 0.00025$ en $H = 0.025$ M) op die persentasiesuurstofopname (kontrolle = 100%) van blaarskyfies van Gifblaar (G) en Grysappel (P).



Figuur 6 Die invloed van MeAc ($L = 0.00025$ M en $H = 0.025$ M) op die persentasiesuurstofopname (kontrolle = 100%) van blaarskyfies van Gifblaar (G) en Grysappel (P).

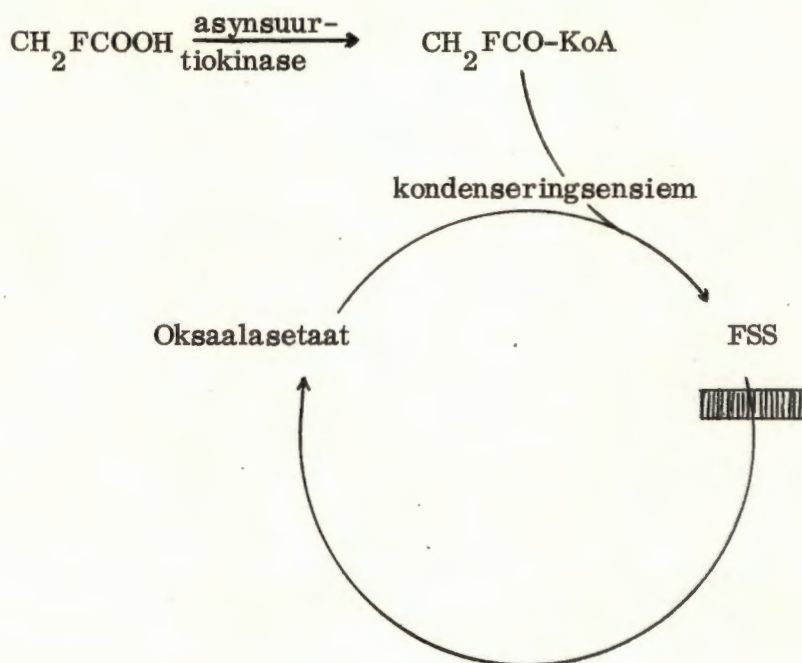
in vivo vrygestelde metanol beïnvloed word as Gifblaar. Moontlik vind die hidrolise van MeAc stadiger in Grysappel plaas of word die metanol vinnig na 'n nie-toksiese verbinding gemetaboliseer.

Indien figure 5 en 6 vergelyk word, is dit duidelik dat die inhibering van die respirasie by Grysappel aan die organies gebonde fluoor d.w.s. aan FAc toegeskryf moet word. Uit die vergelyking is dit ook duidelik dat daar in hierdie opsig 'n basiese verskil tussen Gifblaar en Grysappel bestaan en dat Gifblaar in staat is om FAc te metaboliseer terwyl FAc die metabolisme van Grysappel onderdruk.

In al die gevalle waar FAc of 'n derivaat hiervan as substraat vir die respirasie van Gifblaar gebruik is, is gevind dat die invloed van FAc op die suurstofopname met tyd afgeneem het. Dit is in teenstelling met wat gewoonlik verkry word naamlik dat die effek binne perke groter word met tydsverloop. Dit mag wees dat FAc aanvanklik die respirasie stimuleer, maar dat hierdie stimulering gepaard gaan met 'n proses wat die verdere opname van FAc beïnvloed. Daar is gevind dat die toksiese effek van FAc op lewersneë afhanklik is van die suurstofkonsentrasie van die atmosfeer⁽⁶⁾. Dit mag dus wees dat die invloed wat FAc op die respirasie van Gifblaar uitoefen ook afhanklik is van die suurstofspanning en dat selfs met die min suurstof wat opgeneem word deur die blaarskiefies, die suurstofkonsentrasie die beperkende faktor word wat die invloed van FAc op Gifblaarrespirasie betref. Voorlopige proewe wat uitgevoer is, het nie hierdie teorie bevestig nie. Aangesien daar so 'n groot aantal herhalings nodig is a.g.v. die variabiliteit van Gifblaarweefsel, is hierdie aspek voorlopig daar gelaat.

B. Die metabolisme van FAc

Die meganisme van FAc-omsetting in diere kan skematies soos volg voorgestel word:



By hoër plante is nog baie min werk op die metabolisme van FAc ver= rig. Dit is alreeds aangedui dat FAc die respirasie van Gifblaar stimuleer. Indien Gifblaar oor 'n normale Krebs siklus beskik, bestaan een van die volgen= de moontlikhede:

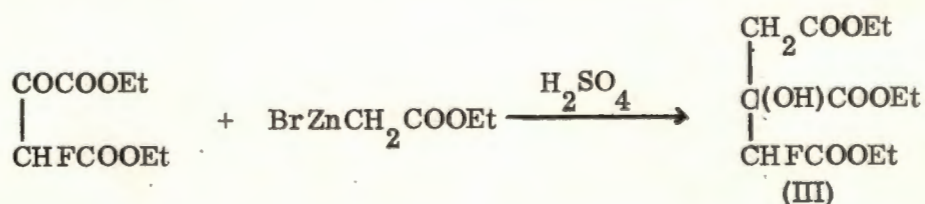
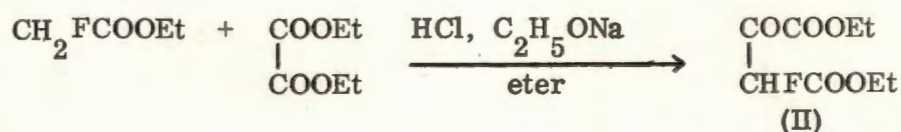
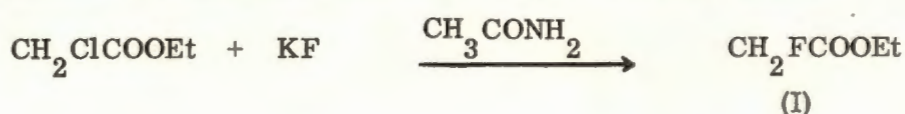
1. FAc word omgesit na FSS en Gifblaar-akonitase is nie sensitief vir FSS nie. M.a.w. FAc word deur die Krebs siklus gemetaboliseer heelwaar= skynlik met een of ander stap waar fluoor in die vorm van anorganiese fluoried vrygestel word.
2. Die omsetting van FAc-KoA na FSS vind nie plaas nie omdat die kon= denseringsensiem kan onderskei tussen FAc-KoA en Ac-KoA.
3. Die omskakeling van FAc na FAc-KoA word in Gifblaar geblokkeer omdat Gifblaar-asynsuurtiokinase kan onderskei tussen FAc en asynsuur of omdat die ensiem nie in Gifblaar teenwoordig is nie.

Indien een van laasgenoemde twee gevalle geld, moet die metabolisme van FAc dus langs 'n ander weg plaasvind.

Om uit te vind watter van bogenoemde moontlikhede die waarskynlikste is, is respirasiestudies van Gifblaar in die teenwoordigheid van FSS aangepak.

In al die proewe is Grysappel as kontroleplant gebruik. Dieselfde tegnieke as voorheen is aangewend.

Die triëtiëlester van fluoorsitroensuur (EtFSS) is d.m.v. 'n Reformatsky-tipe reaksie volgens die metode van Rivett⁽⁹⁴⁾ gesintetiseer. Etiëlfluorasetaat (I) is berei deur etiëlchlorasetaat met KF opgelos in asetamied te fluoreer volgens die metode van Bergmann & Blank⁽⁸⁾. Uit etiëlfluorasetaat en etiëloksalaat is etieletoksaliëlfluorasetaat (II) gesintetiseer. In die teenwoordigheid van Zn is etiëlbroomasetaat met etieletoksaliëlfluorasetaat gekondenseer om triëtiëlfluoorsitroensuur (III) te lewer, d.w.s.



Etiëlfluoorsitroensuur het min of meer geen invloed op die respirasie van Gifblaar of Grysappel gehad nie. In die literatuur is hierna gevind dat EtFSS nie toksies vir diere is⁽⁸⁰⁾. Aangesien daar baie praktiese probleme by die hidrolise van EtFSS betrokke is ('n soutsuur-hidrolisaat van EtFSS kan bv. m.b.v. suilchromatografie in 12 verbindings geskei word)⁽¹¹²⁾, en bariumfluoorsitroensuur (BaFSS) intussen kommersieel beskikbaar geword het (Calbiochem), is BaFSS in verdere proewe gebruik.

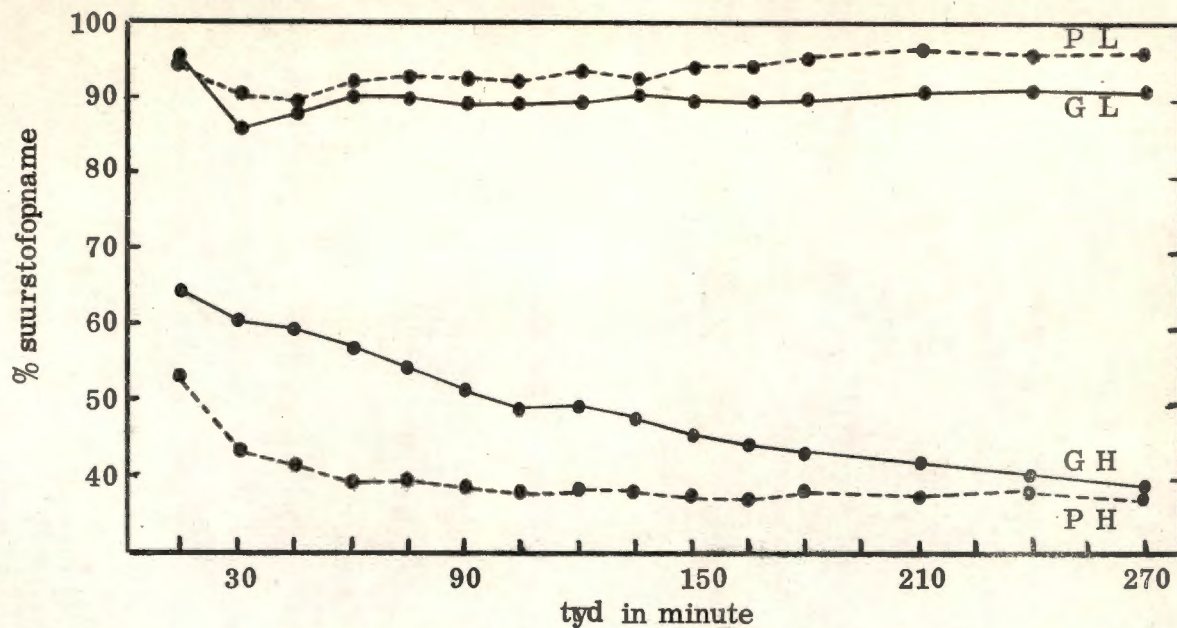
Dieselfde tegnieke as voorheen is gebruik en die invloed van twee konsentrasies BaFSS (0.01 M en 0.0001 M) is op die suurstofopname van Gifblaar

en Grysappel bepaal. Omdat die BaFSS nie goed in die buffer ($0.3 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$) opgelos het nie, is 'n paar druppels gekonsentreerde soutsuur bygevoeg totdat die BaFSS opgelos het. Die pH is weer na 4.3 herstel deur 'n paar druppels 50% KOH by te voeg. Die proef is twee keer herhaal telkens met vier replikate sodat elke punt in figuur 7 die gemiddelde van 8 bepalinge voorstel.

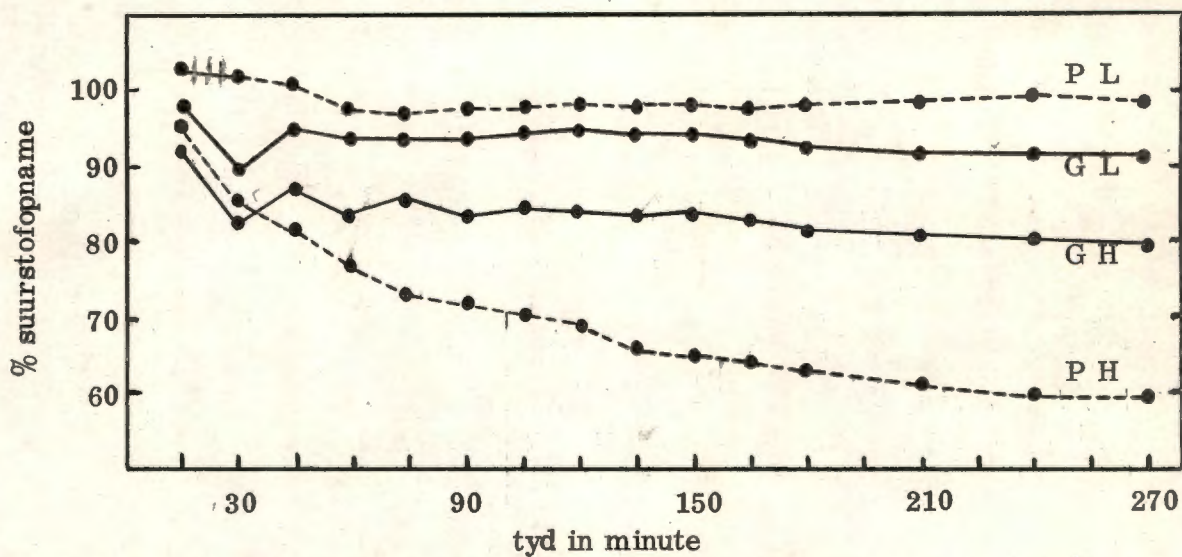
Uit figuur 7 is dit duidelik dat BaFSS die respirasie van beide Gifblaar en Grysappel sterk gehhibeer het. Dit wil dus voorkom asof Gifblaar ook oor 'n Kresbssiklus wat gevoelig vir FSS is, beskik, en dat die plant blykbaar nie FAc na FSS kan omsit nie. Dit kom dus daarop neer dat Gifblaar nie oor die nodige ensieme (asynsuurtiokinase en/of sitroensuursintetase beskik nie, of andersins dat een van hierdie twee ensieme verskil van die wat in ander organismes (en in Grysappel) aangetref word, insoverre die ensiem kan onderskei tussen fluoorbevattende en „normale” metaboliete.

Om uit te vind of die blokkering vir die vorming van FSS uit FAc by Gifblaar voor of na die vorming van fluoorasetielkoënsiem A (FAc-KoA) plaasvind, sou respirasiestudies in die teenwoordigheid van FAc-KoA ideaal wees. Ongelukkig is hierdie verbinding nie in die handel beskikbaar nie. Brady⁽¹⁸⁾ en Marcus & Elliott⁽⁶⁴⁾ het wel 'n metode vir die chemiese sintese van hierdie verbinding beskryf, maar aangesien FAc-KoA baie onstabiel is, is besluit om die saak van 'n ander kant te benader. Fluoorpirodruiwesuur (FP) is wel kommersieel beskikbaar. Indien FP in vivo omgeskakel word na FAc-KoA en die blokkering van die omsetting van FAc na FSS lê by Gifblaar voor die vorming van FAc-KoA, dan sal FP na FSS omgeskakel word met 'n gevolglike inhibering van die respirasie. Vervolgens is dieselfde eksperiment as hierbo met FP (0.01 M en 0.0001 M) i.p.v. FSS op Gifblaar en Grysappel uitgevoer. Die resultate word in figuur 8 aangedui.

Uit figuur 8 is dit duidelik dat FP 'n baie sterk onderdrukkende invloed op die suurstofopname van Grysappel en 'n minder sterk onderdrukkende invloed (by die hoë konsentrasie) op Gifblaar het. Volgens bogenoemde argument wil dit dus voorkom asof die omsetting van FAc na FSS by Gifblaar blokkeer word voordat FAc-KoA gevorm het. D.w.s. asynsuurtiokinase is of afwesig, of dit



Figuur 7 Die invloed van FSS (L = 0.0001 en H = 0.01 M) op die persentasie= suurstofopname (kontrole = 100%) van blaarskyfies van Gifblaar (G) en Grysappel (P).



Figuur 8 Die invloed van FP (L = 0.0001 en H = 0.01 M) op die persentasie= suurstofopname (kontrole = 100%) van blaarskyfies van Gifblaar (G) en Grysappel (P).

kan onderskei tussen FAc en asynsuur.

Om bogenoemde resultate te bevestig is besluit om ook die sitroen= suurkonsentrasie van beide Gifblaar en Grysappel voor en na verskillende be= handelings te bepaal. 'n Opvallende kenmerk van FSS-vergiftiging is dat sitroensuur (SS) ophoop. Sitroensuurophoping waar FAc en/of FP toegedien is, sal dus daarop dui dat die betrokke verbinding omgesit is na FSS.

Blaarskyfies met 'n deursnee van 8 mm is uit volwasse blare van Gifblaar en Grysappel geknip en is in vier petribakkies wat elk een van die volgende oplossings bevat, geplaas: buffer ($0.3 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$), 0.05 M FAc in die buffer, 0.01 M FP in die buffer, 0.01 M FSS in die buffer. Daar is gesorg dat elke petribakkie dieselfde aantal knipsels van dieselfde blaar bevat. Die totale aantal knipsels per petribakkie was 80 en dit het 350 mg droë gewig Gifblaar- en 450 mg droë gewig Grysappelweefsel verteenwoordig. Hierna is die bakkies op 'n horisontale skudmasjien geplaas en vir 5 uur lank stadig geskud. Na 5 uur is die knipsels met water afgespoel, drooggeklad en die SS-konsentrasie van die knipsels is bepaal.

Die metode vir die bepaling van SS en die wysigings wat aangebring is om die metode op Gifblaar toepasbaar te maak, is in hoofstuk II saamgevat. Die finale metode kom daarop neer dat 'n MCW-ekstrak van Gifblaar in lipied, aromatiese, kationiese, anioniese en ongelaaië fraksies geskei word deur die ekstrak met chloroform te ekstraheer en die ingedampde ekstrak deur kolom= me van geaktiveerde koolstof, Dowex-50 (H^+ -vorm) en Dowex-1 (formiaat= vorm) te stuur. Die anioniese fraksie is verkry deur die Dowex-1 met 8 N mieresuur te elueer. Die eluaat is op 'n waterbad drooggedamp om die oor= maat mieresuur te verwyder en die SS-konsentrasie is in 'n deelvolum hier= van volgens die metode van McArdle bepaal⁽⁵⁹⁾. Die metode berus op die oksidasie en bromering van SS na pentabroomasetoon wat na 'n kleurreaksie kolorimetries bepaal word. Volgens Peters⁽⁸²⁾ gee FSS geen positiewe waar= de met hierdie metode nie.

Behan= deling	Bepaal by 435 mμ		Bepaal by 500 mμ	
	μg SS in 100 mg droë gewig	μg SS per 10 mg N	μg SS in 100 mg droë gewig	μg SS per 10 mg N
K	162	651	129	518
FAc	162	651	129	518
FP	174	699	144	578
FSS	240	964	237	952
K	246	946	240	923
FAc	309	1188	303	1165
FP	194	746	188	723
FSS	269	1034	260	1000
K	338	1358	305	1250
FAc	308	1262	281	1152
FP	283	1160	250	1025
FSS	525	2152	501	2053
K	341	1398	320	1311
FAc	305	1250	286	1172
FP	261	1070	225	922
FSS	330	1352	275	1127
K	235	876	201	750
FAc	236	880	204	761
FP	195	728	166	619
K	217	810	181	675
FAc	206	769	170	634
FP	257	960	221	825

Tabel 4 Sitroensuurkonsentrasie in Gifblaarknipsels na verskillende behandelings. (FAc = 0.05 M, FP en FSS = 0.01 M, K = 0.3 M KH_2PO_4 .)

Behan= deling	Bepaal by 435 mμ		Bepaal by 500 mμ	
	μg SS in 100 mg droë gewig	μg SS per 10 mg N	μg SS in 100 mg droë gewig	μg SS per 10 mg N
K	58	308	49	258
FAc	115	603	103	541
FP	37	197	30	160
FSS	131	689	136	714
K	19	108	19	108
FAc	122	687	120	675
FP	62	349	47	265
FSS	71	398	69	386
K	70	366	52	275
FAc	107	561	94	492
FP	66	343	57	298
FSS	164	859	179	939

Tabel 5 Sitroensuurkonsentrasie in Grysappelknipsels na verskillende behandelings. (FAc = 0.05 M, FP en FSS = 0.01M, K = 0.3 M KH_2PO_4 .)

Uit die resultate in tabel 4 en 5 is dit duidelik dat daar 'n groot mate van variasie tussen die kontrolewaardes van die verskillende proewe voorkom. Dit mag moontlik toegeskryf word aan die teenwoordigheid van verskillende SS-poele a.g.v. omgewings en/of endogene faktore in die plant. Die gemiddelde SS-konsentrasie in Gifblaar is 905 μg/10 mg N en 214 μg/10 mg N by Grysappel. Die SS-konsentrasie by 500 mμ gemeet was altyd laer as die by 435 mμ gemeet. Daar was dus verbindings soos asetoasetaat, wat in die anioniese fraksie voorkom en wat ook 'n positiewe reaksie met die bepalingmetode gee, teenwoordig.

Dit is duidelik dat daar oor die algemeen geen noemenswaardige verhoging in die SS-konsentrasie voorgekom het waar FAc-en FP aan Gifblaar en FP aan Grysappel toegedien is nie. Na toediening van FAc en FSS aan Grysappel is 'n sterk verhoging in die SS-konsentrasie aangetref. Na die toediening van FSS aan Gifblaar is in die meeste gevalle ook 'n verhoging van

die SS-konsentrasie aangetref.

Die vraag ontstaan of die SS-toename in die behandelings waar FSS toegedien is, aan FSS wat opgeneem is, maar tot geen SS-ophoping aanleiding gee nie, toegeskryf kan word. Alhoewel Peters⁽⁸²⁾ beweer dat FSS geen positiewe reaksie met hierdie analitiese bepalingsmetode lewer nie, is hier gevind dat 100 µg FSS dieselfde kleurintensiteit as 26 µg SS gegee het. Dit is desnieteenstaande sterk te betwyfel of die toename in SS-konsentrasie net aan FSS wat opgeneem is, toegeskryf kan word.

Dit is duidelik dat die remming van die respirasie gepaard gegaan het met 'n toename van SS waar FAc en FSS aan Grysappel, en FSS aan Gifblaar toegedien is. Hieruit blyk die volgende: (a) Dat Gifblaar nie FSS uit FAc kan sintetiseer nie, (b) dat Grysappel FAc net soos dierweefsel na FSS omskakel en (c) dat beide Grysappel en Gifblaar oor 'n aktiewe Krebs-siklus beskik.

Die interessantste aspek van die resultate is dat alhoewel respirasie sterk deur FP gerem is, die toediening van FP aan albei die plante oor die algemeen nie tot 'n verhoging in die SS-konsentrasie gelei het nie. Daar is intendeel 'n neiging dat die toediening van FP aan Gifblaar tot 'n verlaging in die SS-konsentrasie lei.

Dit dui daarop dat een of ander stap wat met die vorming van SS of een van sy voorgangers te doen het, gerem word, of dat verdere omsetting van SS gestimuleer word. Die eerste moontlikheid is die waarskynlikste omdat daar so 'n sterk remming van die respirasie deur toediening van FP gevind is. Dit mag dus wees dat FP die piruvaatoksidasie-ensiemstelsel inhibeer. Hierdie postulaat mag ondersoek word deur die invloed van FP in die aanwesigheid van FAc-KoA op SS-toename te toets. 'n Ander alternatief is om die invloed van FP op $^{14}\text{CO}_2$ -vrystelling uit piruvaat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ na te gaan.

Omdat in nie een van die twee plante FP na FSS omgesit is nie, blyk dit dat die vroeëre aanname, dat Gifblaar nie FAc na FAc-KoA omsit nie, nie noodwendig geldig is nie. Dit mag wees dat Gifblaar nie FAc-KoA na FSS

kan omskakel nie. Dit lyk eerder asof die laaste moontlikheid die waarskynlikste is. In 'n verwante spesie, nl. D. toxicarium, is omega-fluooroleïensuur en omega-fluoorpalmitiensuur aangetref. Hierdie verbindings is heel waarskynlik uit fluoormaloniëlkoënsiem A via FAc-KoA vanaf FAc gevorm. Proewe met die toediening van FAc-2-¹⁴C mag moontlik help om hierdie probleem op te los. (Kyk hoofstuk V.)

C. Bespreking

Uit die werk in hierdie hoofstuk weergegee blyk dit dat Gifblaar in staat is om FAc te metaboliseer. Dit verklaar ten minste gedeeltelik waarom ou blare van Gifblaar soveel minder FAc as jong blare bevat. In al die ander plante wat getoets is, het FAc tot 'n remming van respirasie gelei.

M.b.v. MeFAc is 'n veel groter effek op die respirasie van beide Gifblaar en Grysappel verkry, wat daarop dui dat die opname van die FAc die invloed daarvan op respirasie beperk. Grysappel was baie minder sensitief as Gifblaar teenoor wat as in vivo vrygestelde metanol beskou is.

Die feit dat FSS die respirasie van Gifblaar en Grysappel onderdruk het en dat FSS in albei gevalle tot 'n verhoging in die SS-konsentrasie gelei het, dui daarop dat die Kressiklus in albei plante voorkom. Omdat FP met beide Gifblaar en Grysappel die respirasie sterk gerem het sonder 'n gepaardgaande SS-ophoping, is gepostuleer dat FP die piruvaatoksidasie ensiemstelsel inhibeer. Dit het later onder die aandag gekom dat Traub & Ginzburg⁽¹⁰⁵⁾ in werk wat op soogdierweefsel gedoen is, bevind het dat FP inderdaad piruvaatoksidasie inhibeer. Hierdie effek van FP is vir sover bekend, nog nooit op plante geïllustreer nie. Dit dien ~~dat~~ dan ook as 'n verdere bewys dat Gifblaar, wat piruvaatmetabolisme betref, met ander organismes ooreenstem.

Hoofstuk IV

DIE STIKSTOFMETABOLISME VAN /GIFBLAAR

„Plants containing fluoroacetic acid ... would be likely sources for fluorine containing amino acids"
- Meister⁽⁶⁷⁾.

A. Die isolering en identifisering van die onbekende aminosure 40

1. Ontdekking van X en Z 40
2. Voorafgaande werk op X en Z 41
3. Bepaling van die stabiliteit van X en Z 42
4. Isolering van X en Z 43
5. Struktuurbepaling van X 46
6. Struktuurbepaling van Z 50
7. Bepaling van die konsentrasie van NMA (X) en NMS (Z) in verskillende organe van Gifblaar 55
8. Toksisiteit van NMA en NMS 58
9. Voorkoms van NMA en NMS in proteïene 59
10. Voorkoms van NMA en NMS in ander plante 59

B. Die biosintese van NMA en NMS 60

C. Bespreking 63

A. Isolering en identifisering van onbekende aminosure

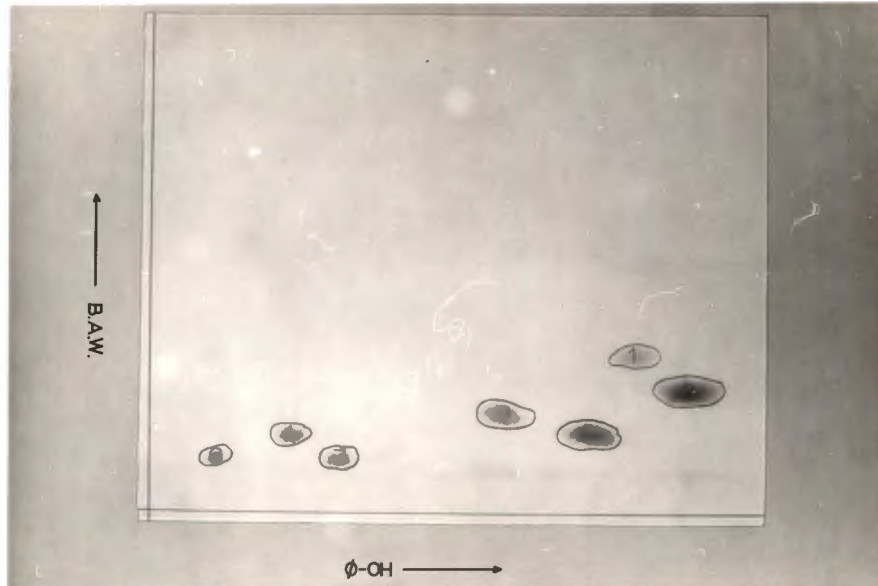
1. Ontdekking van X en Z

Die voorafgaande respirasieproewe dui daarop dat fluoorasetaat deur Gifblaar gemetaboliseer word. Om uit te vind of daar beduidende verskille in die samestelling van die belangrikste metaboliëte (organiese sure, aminosure en koolhidrate) na fluoorasetaattoediening ontstaan, is die volgende eksperiment uitgevoer:

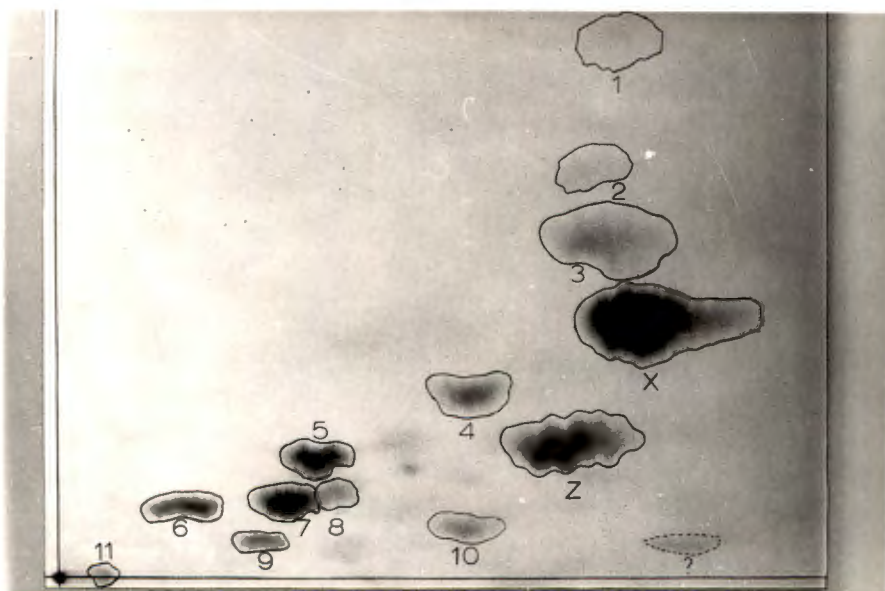
Volwasse blare van Gifblaar (0.05 g in die vorm van skyfies met 'n deursnee van 8 mm) is op oplossings van 0.1 M KH_2PO_4 met 'n pH van 4.5 (B), 0.05 M FAc in 0.1 M KH_2PO_4 (H), 0.005 M FAc in 0.1 M KH_2PO_4 (L) en water onderskeidelik in lig by 20°C vir vier uur laat dryf. Die skyfies is afgespoel, met 70% etanol geëkstraheer en in lipied, kationiese (en amfotêre), anioniese en nie-ioniese fraksies verdeel soos in hoofstuk II bespreek.

Geskikte deelvolumes van die verskillende fraksies is hierna op papier gechromatografeer en vergelyk. Die aminosure is tweedimensioneel dalend gechromatografeer (Fenol, BAW), die organiese sure eendimensioneel dalend (PAW) en die koolhidrate ook eendimensioneel dalend (BAW). Geen verskille kon tussen die verskillende behandelings aangedui word nie. Dit was opvallend dat die posisie van die twee aminosure wat in die hoogste konsentrasie voorkom, nie ooreenstem met die posisie van aminosure wat algemeen in plante voorkom nie. (Sien plaat 5.)

Die twee aminosure wat hierna X en Z genoem word, het 'n buitengewone rooibruin kleur met ninhidrien-kollidien (0.25% ninhidrien in 5% meta-noliese 2,4,6-kollidien) gelewer en het die volgende R_f waardes gehad: (Die standaardafwyking is na agt herhalings bereken.)



Plaat 5 'n Tweedimensionele chromatogram van die vrye aminosure teenwoordig in volwasse blare (2 mg droë gewig) van Gifblaar. (1 = δ -aminobottersuur, 2 = X, 3 = alanien, 4 = glutamiensuur, 5 = Z, 6 = aspartiensuur, 7 = serien).



Plaat 6 'n Tweedimensionele chromatogram van die vrye aminosure teenwoordig in baie jong blare (3 mg droë gewig) van Gifblaar, wat vertikaal met BAW en horisontaal met waterversadigde fenol ontwikkel is. (1 = leusien/isoleusien, 2 = valien, 3 = δ -aminobottersuur, 4 = alanien, 5 = glutamiensuur, 6 = aspartiensuur, 7 = serien, 8 = glisien, 9 = asparagien, 10 = glutamien, 11 = sisteïensuur).

Verbindings	R _f in fenol	R _f in BAW	R _{al} [*] in BAW
X	0.87 (SA 0.02)	0.083 (SA 0.002)	0.76 (SA 0.02)
Z	0.73 (SA 0.02)	0.147 (SA 0.007)	1.36 (SA 0.06)

* Posisie relatief tot alanien.

Ander organe van Gifblaar is ook ondersoek en in elke geval (bloeisels, perikarp, saad, risoompunt) was X en Z dominante aminosure. Dit het voorgekom asof jong blare 'n hoër konsentrasie X en Z as ou blare bevat het. Aan gesien hierdie aminosure wyd verspreid en in so 'n hoë konsentrasie in die plant voorkom, is hulle heelwaarskynlik van metaboliese belang en gevolglik is besluit om 'n poging aan te wend om die struktuur van hierdie twee verbindings op te klaar.

2. Voorafgaande werk op X en Z

Om vas te stel of die twee onbekende verbindings moontlik seldsame aminosure is wat alreeds voorheen in plante aangetref is, is aminosuurkaarte waarop die posisies van 'n groot aantal bekende aminosure aangedui is, geraadpleeg⁽¹⁰³⁾. Die relatiewe posisie t.o.v. bekende aminosure is 'n baie beter maatstaf van die identiteit van 'n aminosuur as die blote R_f waarde. Dit is dus wenslik om die identiteit van die ander aminosure wat saam met X en Z voorkom te bepaal.

'n Aantal tweedimensionele chromatogramme is gemaak soos voorheen beskryf. Daar is telkens aminosure ekwivalent aan dié teenwoordig in 1 mg (droë gewig) volwasse blare ($\pm$ 20 μ g N) saam met 10 μ g van een van die vermoedelik aanwesige aminosure gechromatografeer. Die aanwesigheid van aspartiensuur, glutamiensuur, serien, γ -aminobottersuur en alanien onder die vrye aminosure van volwasse blare is hierdeur bevestig.

Op grond van relatiewe posisie en kleur met ninhidrien-kollidien kon Z moontlik sarkosien en X moontlik pipekoliensuur wees. Chromatografie

met die toevoeging van sarkosien en pipekoliensuur het hierdie moontlikhede uitgeskakel. (Kyk later figuur 14).

3. Bepaling van die stabiliteit van X en Z

Om die moontlikheid dat X en/of Z moontlik peptiede mag wees, te ondersoek, en om 'n aanduiding te kry van die stabiliteit van X en Z is suur en alkaliese hidrolise op X en Z uitgevoer.

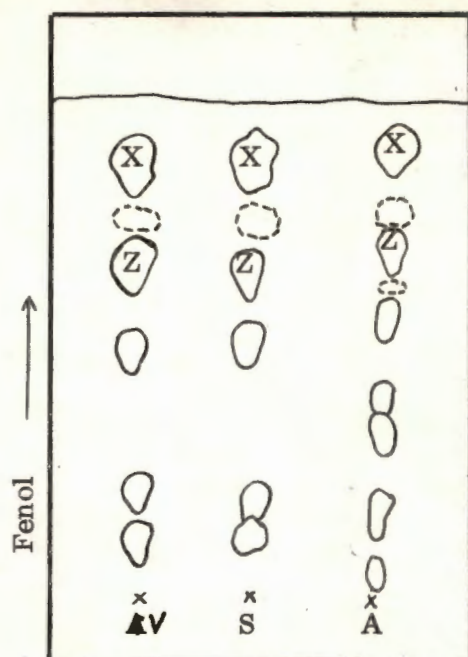
Suur hidrolise:

Die aminosuurfraksie uit 0.5 g droë gewig volwasse blare verkry, is opgelos in 1 ml water en in 'n 10 cm lange buisie (binnedeursnee 8 mm) waarvan die onderpunt toegesmelt is, geplaas waarna 1 ml gekonsentreerde soutsuur (11.3 N) bygevoeg is. Die buisie is aan die bopunt toegesmelt en by 100°C vir 24 uur gehou. Die buisie is vervolgens gebreek en met water uitgewas waarna die humien afgesentrifugeer is. Om al die soutsuur te verwyder, is die ekstrak onder vakuum drooggedamp (< 40°C) en 4 ml water is bygevoeg waarna die proses nog drie keer herhaal is. Die residu is in 'n klein volume water opgelos en 'n geskikte deelvolumen is met fenol gechromatografeer.

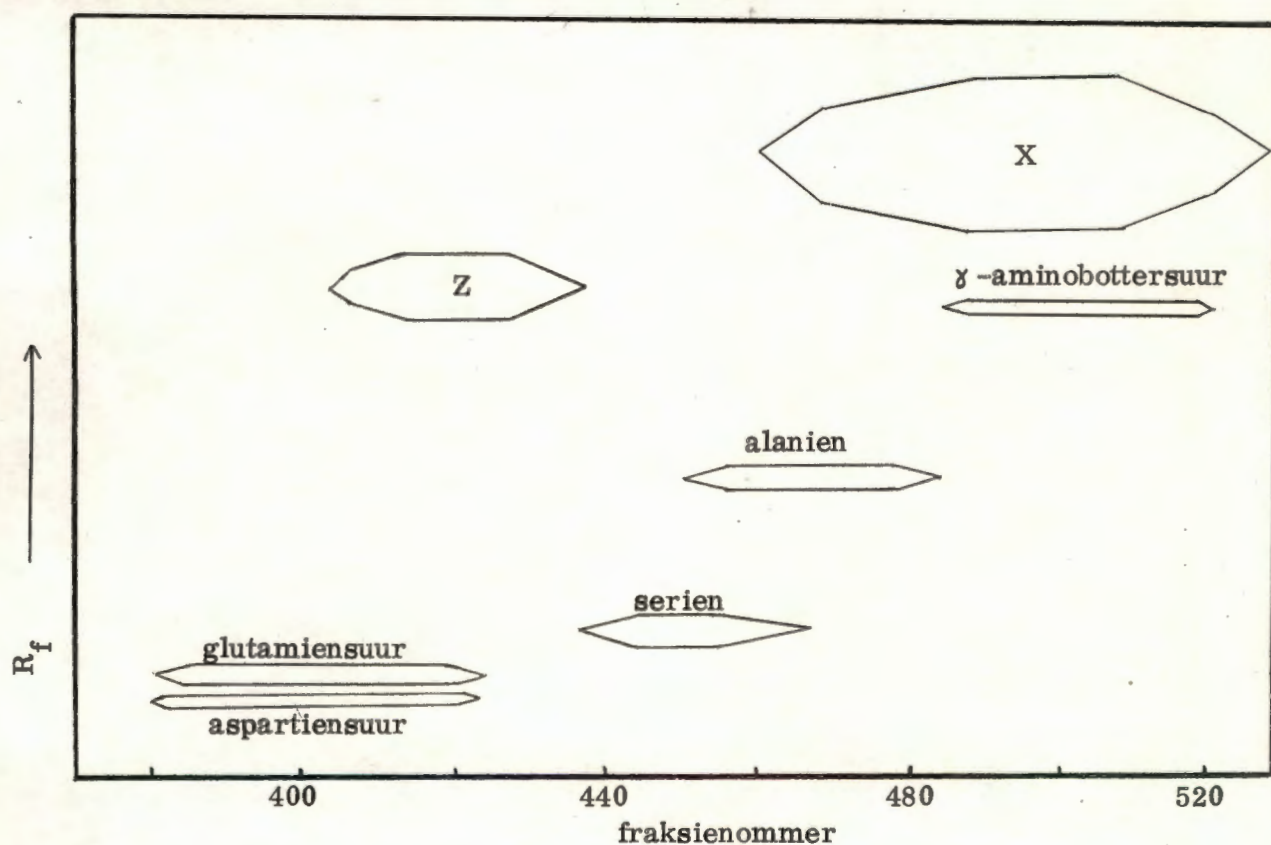
Alkaliese hidrolise:

By 1 ml van dieselfde aminosuurekstrak as hierbo is 1 ml versadigde bariumhidroksiedoplossing gevoeg en die mengsel is in dieselfde tipe buisie as hierbo geplaas. Die buisie is aan die bopunt toegesmelt en vir 16 uur by 100°C gehou. Nadat die buisie gebreek, met water uitgewas en die humien afgesentrifugeer is, is die bariumhidroksied omgesit na bariumsulfaat deur die pH van die oplossing met 1 N swawelsuur na ongeveer 5 te verlaag. Hierina is 0.5 g bariumkarbonaat bygevoeg om die oormaat swawelsuur om te sit na bariumsulfaat. Die onoplosbare presipitaat (BaSO_4 en BaCO_3) is afgesentrifugeer en die mengsel is onder vakuum ingedamp na 'n klein volume waarvan 'n deelvolumen gebruik is vir chromatografie soos hierbo.

Soos in figuur 9 gesien kan word, is X en Z nie deur die suur of alka-



Figuur 9 Lyndiagram van 'n chromatogram van vrye aminosure uit volwasse blare van Gifblaar voor (V) en na hidrolise met alkalie (A) en suur (S).



Figuur 10 'n Skematiese voorstelling van die fraksionering van vrye aminosure uit volwasse blare van Gifblaar op 'n Dowex 50-X4 kolom wat met soutsuur (0.075-2 N) geëluëer is.

liese hidrolise afgebreek nie. In die geval van die alkaliese hidrolise het daar aminosure in die omgewing van alanien ontstaan. Dit kan moontlik toegeskryf word aan die hidrolise van peptiede wat in klein hoeveelhede teenwoordig was.

4. Isolering van X en Z

'n Aantal voorlopige proewe is op 'n klein skaal uitgevoer en hieruit is 'n bevredigende tegniek vir die isolering van X en Z verkry. Dit is reeds vroeg opgemerk dat baie jong blare 'n veel hoër konsentrasie van X en Z op droë gewigbasis bevat as ouer blare. In die geval van ouer blare is daar net vyf aminosure wat in 'n redelike hoë konsentrasie saam met X en Z voorkom, terwyl daar in die geval van baie jong blare ten minste twaalf ander aminosure in 'n redelike hoë konsentrasie voorkom, soos aangedui op plaat 6. Gevolglik is besluit om X en Z uit volwasse blare te ekstraheer.

Driehonderd gram (vars gewig) volwasse blare van Gifblaar is gewas en met 'n skêr versnipper, waarna 1.5 liter 95% etanol (temperatuur -15°C) bygevoeg is om 'n finale konsentrasie van ongeveer 70% etanol te gee. (Die blare het 29% water bevat.) Die mengsel is met 'n „Ultra-turrax“-homogeniseerder fyngemaak terwyl voorsorg getref is dat die temperatuur nie bokant 25°C styg nie. Voorlopige proewe het aangedui dat 'n groter verskeidenheid aminosure by hoër temperature geëkstraheer word, moontlik a.g.v. die ontbinding van hitte-labiele peptiede wat andersins deur die 70% etanol gedenaatureer sou word.

Die blaarreste is van die ekstrak verwyder deurdat die ekstrak deur 'n driedubbele laag kaasdoek gedruk is. Die residu is nog twee keer met 1.5 liter 70% etanol geëkstraheer waarna die gesamentlike ekstrak gefiltreer en onder vakuum na 'n klein volume ingedamp is. Die ekstrak is in 'n skeitregter met chloroform geëkstraheer om lipiede te verwyder en die proses is herhaal totdat die chloroformekstrak kleurloos was.

Vir 'n voorlopige skeiding is die metode van Hirs, Moore & Stein⁽⁴⁰⁾

gebruik wat daarop neerkom dat die aminosure op 'n kationuitruiler (Dowex 50-X4) geadsorbeer word terwyl die anioniese (hoofsaaklik organiese sure) en nie-ioniese (hoofsaaklik koolhidrate) fraksies met water geëlueer word. Deur die aminosure met soutsuur, waarvan die konsentrasie van 1 N na 4 N verhoog word, te elueer, kan 'n skeiding van sekere aminosure bewerkstellig word.

Om 'n aanduiding te kry van die hoeveelheid hars wat benodig word om al die katione in die ekstrak te adsorbeer is 'n klein deelvolumen van die ekstrak deur 'n kolommetjie Dowex 50-X4 (H^+ -vorm) gestuur en goed met water gewas. Aangesien die waterstofione op die hars deur die katione in die ekstrak verplaas word, kan die kationinhoud van die ekstrak bereken word deur die eluaat met natriumhidroksied te titreer⁽¹⁴⁾. Hierdie titrasie sal ook die organiese sure insluit wat vry in die ekstrak voorkom, maar in vergelyking met die totale aantal katione teenwoordig behoort hierdie faktor in die meeste ekstrakte nie 'n groot rol te speel nie. Daar is bevind dat volwasse blare van Gifblaar 1.6 milli-ekwivalente katione per gram droë gewig bevat. Aangesien Dowex 50-X4 'n uitruilkapasiteit van 1.3 milli-ekwivalente per ml hars bevat, sal 261 ml hars nodig wees om al die katione teenwoordig in 213 g (droë gewig) Gifblaar blare te adsorbeer. Omdat die Dowex 50-X4 kolom gebruik sou word vir fraksionering is 'n groot oormaat hars gebruik. Die kolom wat gebruik is was 80 cm hoog met 'n deursnee van $7\frac{1}{2}$ cm.

Uit voorafgaande eksperimente was dit duidelik dat die onbekende aminosure vroeg van die kolom geëlueer word. Gevolglik is met 'n lae konsentrasie (0.075 N) soutsuur begin. Elke 15 minute is 'n nuwe fraksie (± 20 ml) m.b.v. 'n fraksieversamelaar opgevang.

Elke fraksie is getoets vir aminosure deur 'n druppel eluaat op Whatman No. 1 papier te plaas en met ninhidrien te behandel. As gevolg van die lae pH het die ninhidrien egter nie reageer nie. 'n Poging is aangewend om die soutsuur te verwyder deur dit met 'n warm lugstroom af te damp. Die eluaatkolle het egter swart geword a.g.v. 'n chemiese reaksie van die sout=

suur met die papier. Pogings om die soutsuur te verwyder deur dit oor ammoniumhidroksieddampe te hou het ook nie heeltemal bevredigende resultate gelewer nie aangesien die gevormde ammoniumchloried (of die ammonia wat op die papier geadsorbeer is) 'n swak positiewe reaksie met ninhidrien gee. Die volgende prosedure het bevredigende resultate gelewer: Uit elke proefbuis is 'n druppel eluaat op Whatman 1 papier geplaas en die kolle is met 'n koue lugstroom drooggeblaas. Die papier is hierna met 'n gebufferde ninhidrien oplossing (0.2% in 0.5 M sitroensuur/natriumhidroksied, pH = 5.6) gespuit, met koue lug drooggeblaas, weer met die gebufferde ninhidrienoplossing gespuit en in 'n oond by 80°C vir 15-30 minute gelaat.

Toe daar na 140 fraksies nog geen aminosure geëluëer is nie, is die konsentrasie van die soutsuur na 1 N verhoog. Na 'n nog verdere 150 fraksies is die konsentrasie van die soutsuur na 2 N verhoog. Vanaf fraksie 380 tot 526 is aminosure geëluëer. 'n Monster uit elke tweede fraksie is vervolgens gechromatografeer op Whatman 1 papier met fenol as elueermiddel. In figuur 10 word 'n skematiese voorstelling van die fraksionering wat verkry is weergegee. Dit is duidelik dat fraksies 404 - 435 Z saam met 'n klein hoeveelheid glutamiensuur en aspartiënsuur bevat, terwyl daar in fraksies 468 - 520 behalwe X ook nog alanien en γ -aminobottersuur voorkom. Die dikte van die dwarsbalke gee 'n aanduiding van die kleurintensiteit en grootte van die betrokke aminosuurkol.

Die suiwering van Z

Fraksies 404 - 435 is onder vakuum drooggedamp, in water opgelos en weer eens drooggedamp om die oormaat soutsuur te verwyder. Die residu is in 100 ml 0.2 N asynsuur opgelos en op 'n 20 x 7 cm kolom van Dowex 1-X8 hars in die asetaatvorm geplaas⁽⁷⁸⁾. Die kolom is met 0.5 N asynsuur deurgewas waardeur Z van die twee ander aminosure geskei is. Aspartiënsuur en glutamiensuur word baie later as Z verplaas. Z is dus heelwaarskynlik nie 'n suur aminosuur nie.

Die fraksies waarin Z voorkom, is onder vakuum ingedamp en nadat

verskillende stelsels uitgetoets is, is bevredigende kristallisering verkry deur die residu in warm metanol op te los en warm asetoon by te voeg totdat 'n permanente vertroebeling net ontstaan. By afkoeling het Z in die vorm van fyn wit kristalletjies gekristalliseer.

Die suiwering van X

Om X van alanien en γ -aminobottersuur te skei is die metode van Hirs, Moore & Stein⁽³⁹⁾ gebruik. Fraksies 468 - 520 is onder vakuum ingedamp na 'n klein volume wat op 'n Dowex 50-X8 (NH_4^+ -vorm) kolom geplaas is. Die aminosure is met 'n oplossing (pH 3.1) van ammoniumformiaat in 40% etanol geëluëer. Elke 15 minute is 'n nuwe fraksie van ongeveer 20 ml opgevang. Omdat die ammoniumformiaat 'n swak positiewe toets met ninhidrien gee, is besluit om dit te verwyder voordat toetse op die fraksies uitgevoer word. Pogings om die ammoniumformiaat vanaf Whatman No. 1 papier te verwyder deur dit onder hoë vakuum af te sublimeer was onsuksesvol, heelwaarskynlik omdat die ammoniumformiaat sterk deur die papier geadsorbeer word. Bevredigende resultate is verkry deur waterversadigde fenol oor die kolle te laat loop en die papier in 'n koue lugstroom te droog. Hierdeur is die kleur wat die ammoniumformiaat met ninhidrien gee, uitgeskakel. Die fraksies wat aminosure bevat is hierna met fenol op Whatman No. 1 papier gechromatografeer. Fraksies 118 - 123 het net X bevat. Ammoniumformiaat is uit fraksies 118 - 123 verwyder deur dit onder vakuum in 'n kouevingerapparaat by 40°C te sublimeer.

X is uit die residu verkry deur dit uit metanol met asetoon te kristalliseer. Na herhaaldelike kristallisering is X gesuiwer deur dit by $75 - 100^\circ\text{C}$ onder 'n druk van 0.01 mm kwik te sublimeer.

5. Struktuurbeplanning van X

Aangesien een van die eerste stappe in die identifisering van 'n onbekende verbinding die bepaling van die elementêre samestelling is, is X na die Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium geneem waar mnr. K.P.

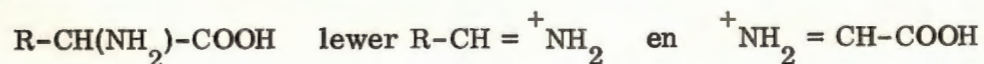
Kunz 'n elementêre analise uitgevoer het.

X het bestaan uit 46.16% koolstof, 8.34% waterstof, 13.41% stikstof en (deur verskil) 32.09% suurstof. Hieruit is gevind dat die relatiewe verhouding van C:H:O:N 3.84:8.28:0.957:2.005 of, deur met 'n konstante faktor te vermenigvuldig, 4.0:8.6:1.0:2.1 is. Dit wil dus voorkom asof die empiriese formule van X $C_4H_9NO_2$ is. Die elementêre samestelling bereken vir $(C_4H_9NO_2)_n$ is 46.58% koolstof, 8.80% waterstof, 13.58% stikstof en 31.03% suurstof wat goed ooreenstem met die waardes verkry vir X.

As gevolg van hulle Zwitterioon-geaardheid het aminosure baie hoë smeltpunte en gaan die smeltproses gewoonlik gepaard met ontbinding. In die geval van X is dit reeds aangedui dat die verbinding gesublimeer kan word. Dit is dus nie nodig om 'n vlugtige derivaat van X te berei om 'n massaspektrometriese analise uit te voer nie.

Die massaspektrum van X is in 'n A.E.I. MS-9 apparaat by 'n inlaattemperatuur van $110^{\circ}C$ deur dr. S.H. Eggers verkry (Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium, W.N.N.R., Pretoria). In 'n massaspektrometer word die monster in dampvorm deur elektrone gebombardeer, wat daartoe lei dat die monster in 'n groot aantal positief-gelaaide brokstukke gesplyt word. Hoe beter 'n sekere brokstuk gestabiliseer is, hoe groter is die persentasie van die totale aantal positief-gelaaide deeltjies wat in daardie vorm sal voorkom. Die resultate word in 'n massaspektum weergegee waarin die relatiewe voorkoms van brokstukke met verskillende massas (streng gesproke massa/lading, maar die lading is in die praktyk gewoonlik een) aangedui word.

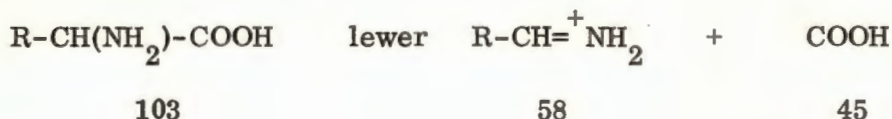
Aangesien stikstof a.g.v. ongepaarde elektrone 'n positiewe lading kan aanneem, is die belangrikste posisies van splyting vir aminosure 'n koolstof-koolstof-band in die alfa posisie vanaf die stikstof-atoom. Die positiewe lading is dan op die stikstof atoom gesetel. D.w.s.



Alfa-aminosure wat nie op die karboksielsuurgroep of stikstofatoom gesubstitueer is nie, sal dus 'n sterk piek by m/e 74 ($^+ \text{NH}_2 = \text{CH} - \text{COOH}$) hê. Soos in figuur 11 aangedui, het X nie 'n piek by m/e 74 nie. X is dus óf gesubstitueer op die karboksielsuurgroep óf op die aminogroep óf dit is nie 'n alfa-aminosuur nie.

Die piek by m/e 103 moet toegeskryf word aan die molekulêre-ioon wat verkry word deur een elektron uit die molekulêre struktuur te verwyder. Die swak piek by m/e 104 is 'n sterk bewys dat m/e 103 die molekulêre-ioon verteenwoordig en word verklaar deur die bydrae van die natuurlike isotopiese koolstof (^{13}C), wat ongeveer 1.1% van natuurlike koolstof uitmaak⁽¹¹⁾. Die piek by m/e 103 dui dus aan dat n in die voorwaardelike formule, $(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2)_n$ een moet wees.

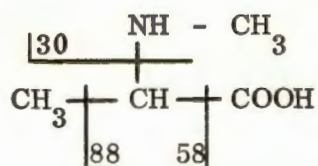
Aangesien daar 'n baie sterk piek by m/e 58 voorkom, kan X nie op die karboksielsuurgroep gesubstitueer wees nie.



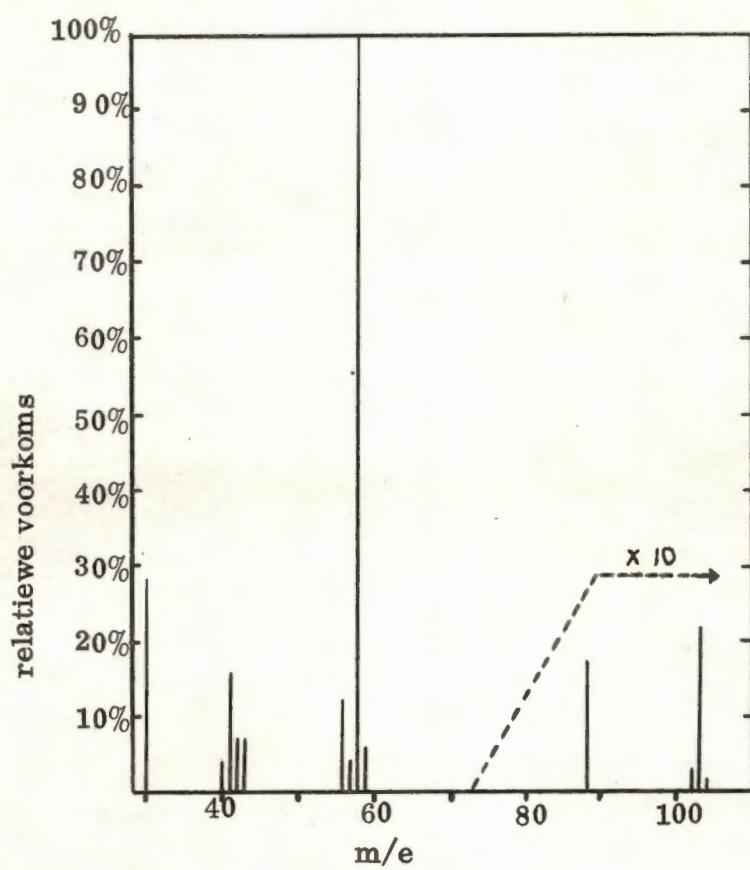
Die feit dat die basispiek by m/e 58 voorkom, dui aan dat X 'n alfa-aminosuur moet wees. Ook die feit dat slegs 'n baie swak piek by m/e 88 ($^+ \text{NH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) en geen piek by m/e 102 ($^+ \text{NH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) voorkom nie, dui aan dat X nie 'n beta- of gamma-aminosuur is nie.

Die enigste verklaring is dus dat X 'n N-gesubstitueerde aminosuur moet wees. Die piek by m/e 30 kan net toegeskryf word aan $^+ \text{NH}-\text{CH}_3$ of $^+ \text{NH}_2 = \text{CH}_2$ wat daarop dui dat X 'n N-metielaminosuur moet wees.

Met die voorafgaande in gedagte, kan daar net een struktuur vir X geskryf word naamlik N-metielalanien (NMA).



M.G. = 103



Figuur 11 Die massaspektrum van X.

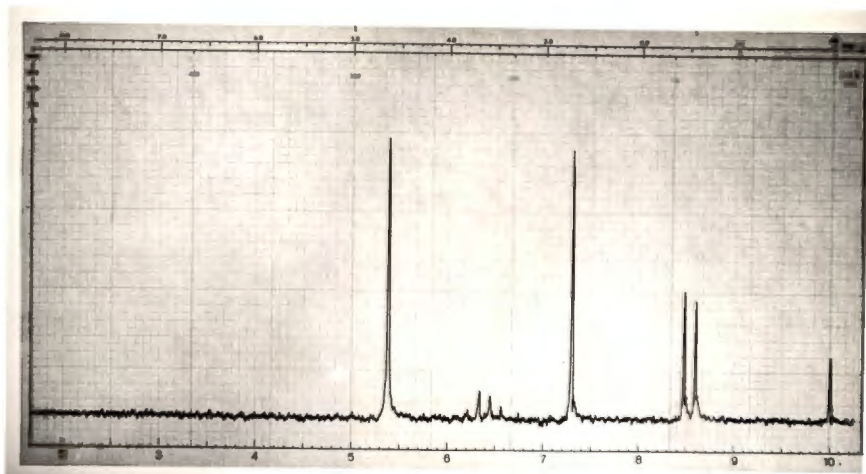
Hierdie struktuur word ook deur die volgende ondersteun:

1. 'n Kernmagnetieseresonansspektrum van X is deur dr. K.G.H. Pachler van die Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium getrek, en dit het die struktuur van N-metielalanien bevestig. (Sien plaat 7). 'n Varian A60-aparaat (60 megasiklusse/sekonde) is gebruik met tetrametielsilaan ($\mathcal{T} = 10.0$) as interne standaard. Die enkelpeik by Tau 5.4 verteenwoordig die karboksiel-, water- en moontlik imienprotone. Die een-protonkwartet gesentreer by Tau 6.36 is waarskynlik toe te skryf aan 'n C-H proton, terwyl die drie-proton-enkelpeik by Tau 7.3 en die drie-proton-dubbelpiek by Tau 8.53 op die N-CH_3 - en C-CH_3 -groepe respektiewelik dui.
2. Die kleur van X met ninhidrien-kollidien is dieselfde seldsame rooi-bruin kleur as wat met sarkosien (N-metielglisien) aangetref word.
3. Die relatiewe posisie van X t.o.v. alanien is dieselfde as dié van sarkosien t.o.v. glisien. (Sien figuur 14 later.)

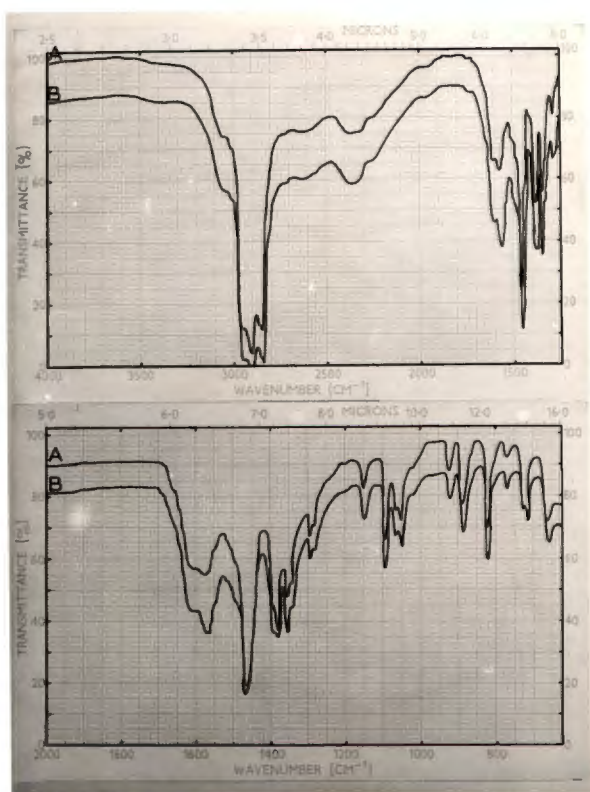
NMA is sover vasgestel kan word, nog nooit voorheen in plante aangetref nie. Dit is wel gevind as 'n deel van Aktinomisien Z, 'n antibiotiese stof wat deur Actinomyces fradiae gevorm word⁽¹⁷⁾. 'n Sintese van NMA is onlangs beskryf⁽⁹¹⁾, en dr. Peter Quitt het goedgegunstiglik 'n monster beskikbaar gestel vir vergelyking met X.

Soos in plaat 8 aangedui, het X en N-metiel-L-alanien identiese absorpsiespektra in die infrarooigebied gehad. 'n Perkin-Elmer 237-apparaat is gebruik. X en N-metiel-L-alanien kon nie van mekaar geskei word deur met drie verskillende elueermiddels (waterversadigde fenol, BAW en PAW) te chromatografeer nie.

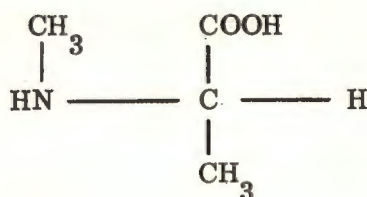
Ten slotte is die spesifieke optiese rotasie van X bepaal. Die waarde wat verkry is, nl. $+5.3^{\circ}$ ($c = 0.003$ in water) stem baie goed ooreen met dié ($+5.2^{\circ}$) wat in die literatuur aangeteken is⁽⁹¹⁾. Die struktuur van X is dus ondubbelsinnig die volgende:



Plaat 7 Die kernmagnetiese resonansspektrum van X



Plaat 8 Die infrarooispektrum van nujol pastas van X (A) en N-metiel-L-alanien (B).



N-metiel-L-alanien

6. Struktuurbeplating van Z

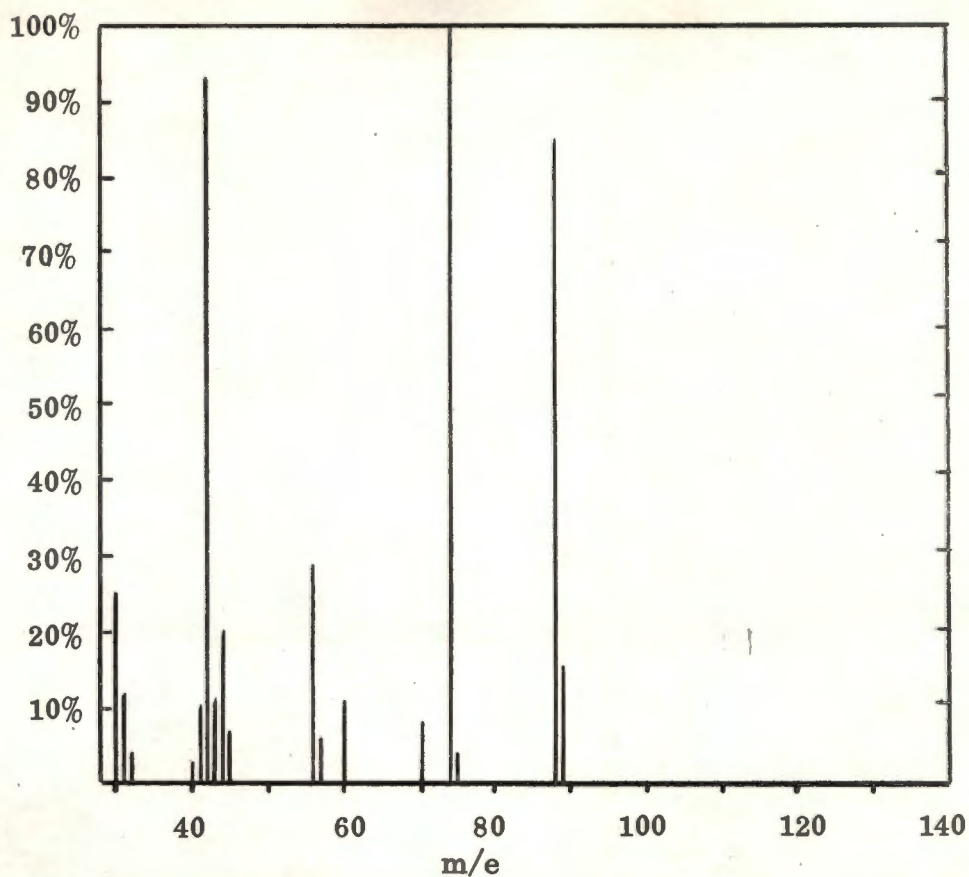
Omdat die kristalle van Z taamlik higroskopies was en omdat Z nie wou sublimeer nie, maar by ongeveer 190°C ontbind het, is baie meer probleme met die suiwering van Z as met die suiwering van X ondervind. 'n Analise het aangedui dat Z 7.47% as bevat. Hierdie as kan slegs toegeskryf word aan 'n kation wat aan die karboksielsuurgroep gebind is.

Op asvrye basis bereken, is die persentasiesamestelling van Z 40.51% koolstof, 7.45% waterstof, 12.49% stikstof en (deur verskil) 39.55% suurstof. Die relatiewe aantal atome is dus 4.02 koolstof, 8.81 waterstof, 1.06 stikstof en 2.95 suurstof. Dit wil dus voorkom asof die empiriese formule van Z $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$ is. Die elementêre samestelling bereken vir $(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3)_n$ is 40.33% koolstof, 7.62% waterstof, 11.76% stikstof en 40.30% suurstof wat goed ooreenstem met die waardes verkry vir Z.

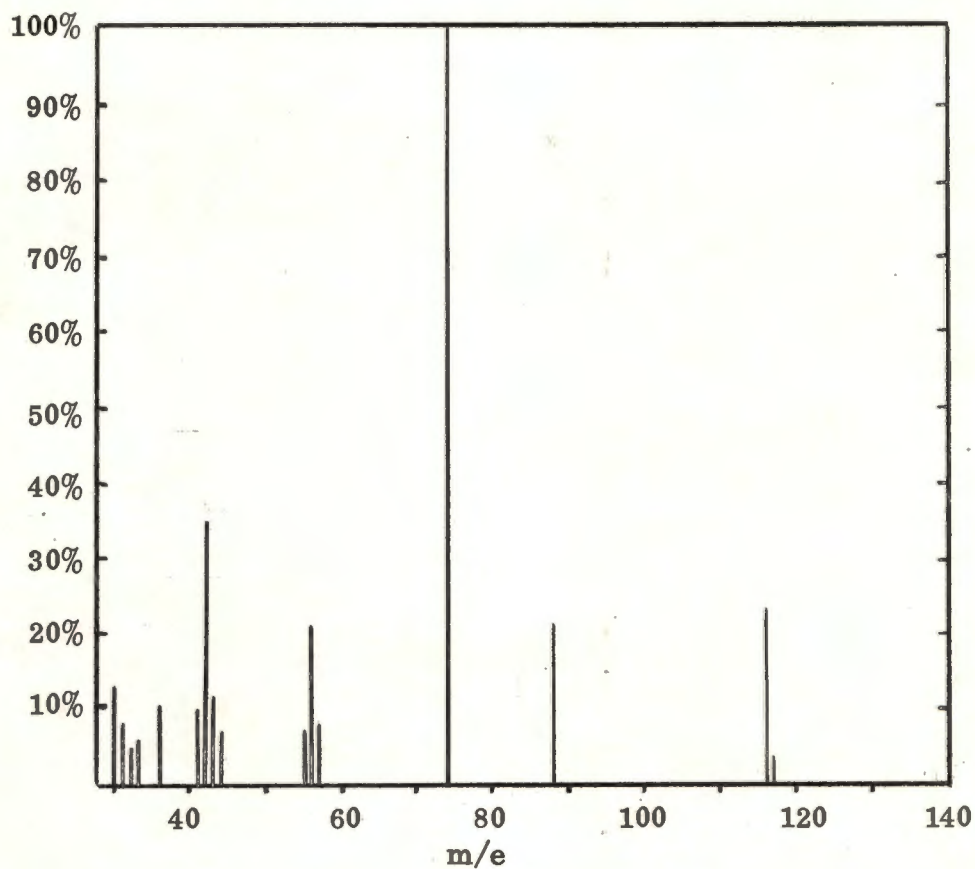
Alhoewel Z nie wou sublimeer nie, kon 'n bruikbare massaspektrum van Z tog verkry word (kyk figuur 12) deur by 'n relatief hoë inlaatempera=tuur (190°C) te werk.

Soos reeds aangedui, lewer alfa-aminosure wat ongesubstitueer is op die karboksielsuur- en amiengroep 'n sterk piek by m/e 74 a.g.v. die $^+\text{NH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ -ioon. 'n Sterk piek by m/e 74 is wel gevind wat dus aandui dat Z 'n ongesubstitueerde aminosuur is.

'n Swak piek by m/e 119 kan heelwaarskynlik aan die molekulêre-ioonpiek toegeskryf word aangesien geen pieke by hoër m/e waardes gevind is nie. In die voorwaardelike formule $(\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3)_n$ moet n dus een wees. Die infrarooispektrum van Z (sien later) het 'n absorpsieband by 3μ gehad,

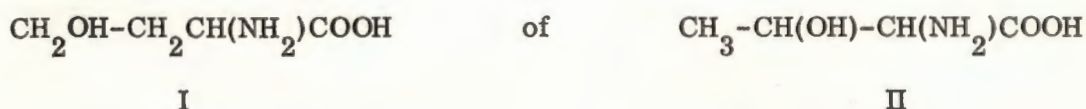


Figuur 12 Die massaspektrum van Z.



Figuur 13 Die massaspektrum van die etielester van Z.

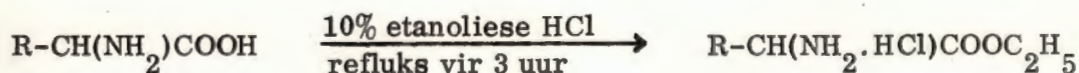
wat aandui dat die derde suurstof 'n hidroksiel- en nie 'n eter-funksie is nie. Die struktuur van Z kan dus uit bogenoemde slegs wees:



Die massaspektrum van Z is meer kompleks as dié van X omdat hier twee heteroatome (N en O) voorkom waarop die positiewe lading gestabiliseer kan word. Struktuur II kan uitgeskakel word omdat die piek by m/e 88 (d.i. 119-31, $\text{CH}_2\text{OH} = 31$) nie hiermee gerym kan word nie. Die tweede grootste piek (by m/e 42) kan in die geval van struktuur I deur die volgende ioon verklaar word: $\text{CH}_2=\text{C}^+\text{NH}_2$. Die pieke by m/e 56 en 89 kan egter nie bevredigend aan die hand van struktuur I verklaar word nie, en die piek by m/e 45 ($\text{CH}_3-\text{CH}=\text{C}^+\text{OH}$ of $\text{O}=\text{C}^+\text{OH}$) behoort baie sterker te wees.

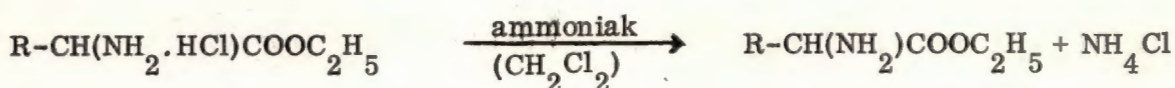
Omdat a.g.v. die lae vlugtigheid van Z by so 'n hoë inlaattemperatuur gewerk moes word, kon sekere artefakte moontlik gevorm het. Om hierdie moontlikheid uit te skakel en om bevestigende getuienis vir struktuur I te verkry, is die etielester van Z volgens die metode van Biemann & Vetter⁽¹²⁾ berei.

Die metode berus op die volgende omsetting:



Vir 'n kwantitatiewe omsetting van die aminosuur na die ester behoort die reagentse heeltemal anhidries te wees. Aangesien droë soutsuurgas nie beskikbaar was nie, en daar nie in 'n kwantitatiewe omsetting belanggestel is nie, is 'n gekonsentreerde soutsuuroplossing met anhidriese alkohol gemeng. Om die hidrochloried na die vry ester om te skakel sonder om die esterbinding te hidroliseer, is die produk in 'n vakuundesikkator gedroog, in dichloromeetaan (CH_2Cl_2) opgelos en droë ammoniakgas is vir 'n paar minute deur die oplossing geborrel. Die ammoniumchloried wat vorm, is onoplosbaar in

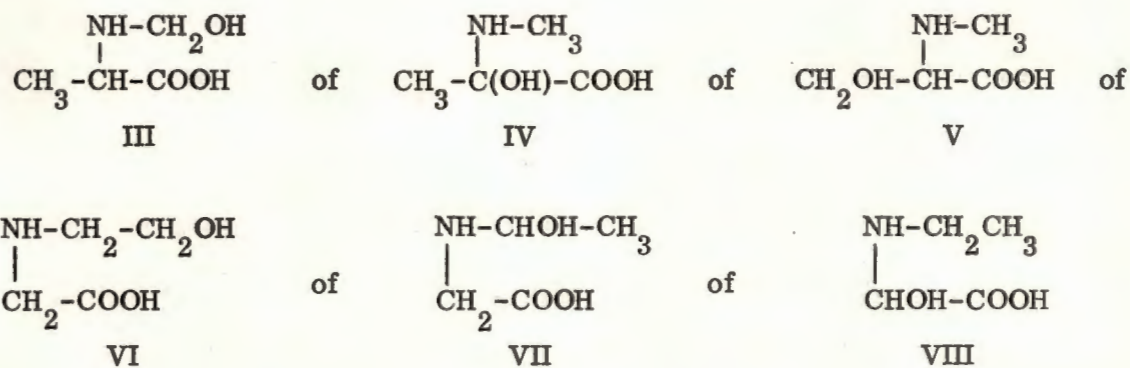
dichlorometaan en is deur filtrering verwyder. D.w.s.



Die etielester van Z het by 'n inlaatteratuur van 80°C alreeds 'n goeie spektrum gegee soos in figuur 13 aangedui word. Aangesien in figuur 13 geen piek by m/e 102 ($^+\text{NH}_2=\text{CH-COOC}_2\text{H}_5$) aangetref word nie, is Z dus nie 'n alfa-aminosuur wat ongesubstitueer op die aminogroep is nie, en struktuur I moet uitgeskakel word. Die piek by m/e 74 in figuur 12 moet dus nie aan 'n $^+\text{NH}_2=\text{CH-COOH}$ -ioon toegeskryf word nie.

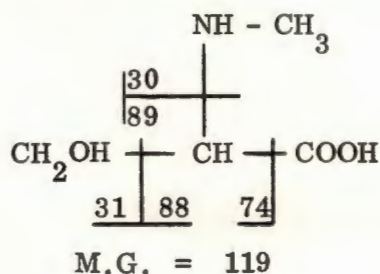
Uit die aard van die saak is dit duidelik dat Z nie 'n karboksielsuur-gesubstitueerde aminosuur kan wees nie, andersins sou die sintese van die etielester nie geslaag het nie en sou Z baie meer vlugtig gewees het en ook beslis nie ontbind het by die smeltpunt nie. Z moet dus 'n beta- of gamma-aminosuur wees of andersins 'n alfa-aminosuur wat op die amingroep gesubstitueer is. Aangesien die basispieke in figure 12 en 13 by m/e 74 voorkom d.w.s. by M - 45 (COOH = 45) (figuur 12) en by M - 73 (COOC₂H₅ = 73) (figuur 13) en nie by M - 59 (CH₂-COOH = 59) ens. nie, moet Z 'n alfa-aminosuur wees.

Z moet dus 'n N-gesubstitueerde aminosuur wees en wel een van die volgende:

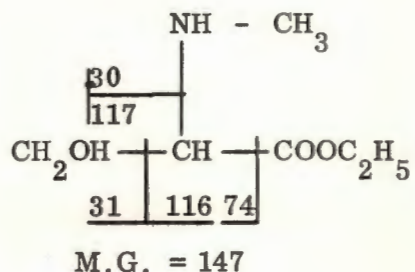


Die etielester van IV, VII en VIII kan nie tot 'n sterk piek by m/e 116

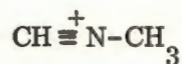
(d.w.s. $M - 31$, $\text{CH}_2\text{OH} = 31$) aanleiding gee nie, en word derhalwe uitgeskakel. Strukture III en VI kan ook uitgeskakel word omdat pieke by m/e 30 en by m/e 89 (figuur 12) nie daaruit verklaar kan word nie. Die struktuur van Z moet dus V wees, d.w.s. N-metielserien. Al die pieke kan bevredigend aan die hand van struktuur V verklaar word, nl.



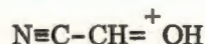
en



of



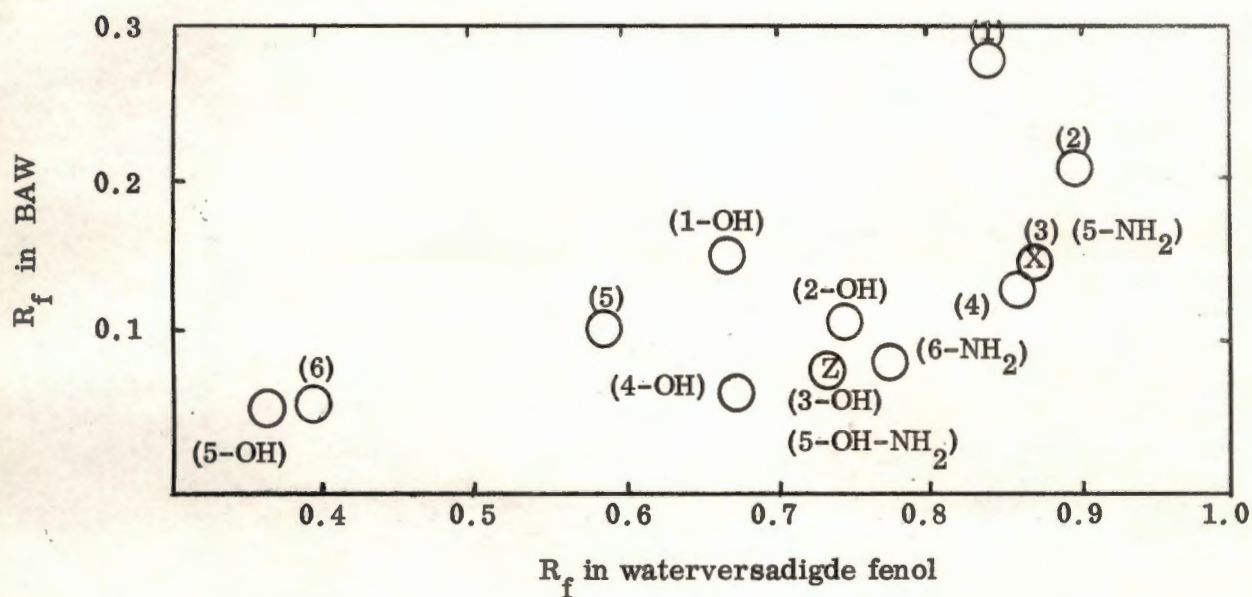
of



Die baie swak molekulêre ionpiek kan toegeskryf word aan die feit dat Z 'n hidroksielgroep bevat. Aangesien die suurstofatoom ook 'n positiewe lading kan aanneem, is daar so baie relatief-stabiele brokstukke dat die molekulêre ionpiek baie swak is⁽¹¹⁾.

'n Kernmagnetiese resonansspektrum van Z het die struktuur van Z as N-metielserien (NMS) bevestig. Die enkelpiek by Tau 5.4 verteenwoordig die karboksiel, water en waarskynlik imienprotone. Die pieke a.g.v. die hidroksielproton en die metileenprotone is gesentreer by Tau 6.05. Die C-H proton se pieke is gesentreer by Tau 6.34 en die drie-protonpiek a.g.v. die N-CH₃-groepering by Tau 7.25. (Sien plaat 9.)

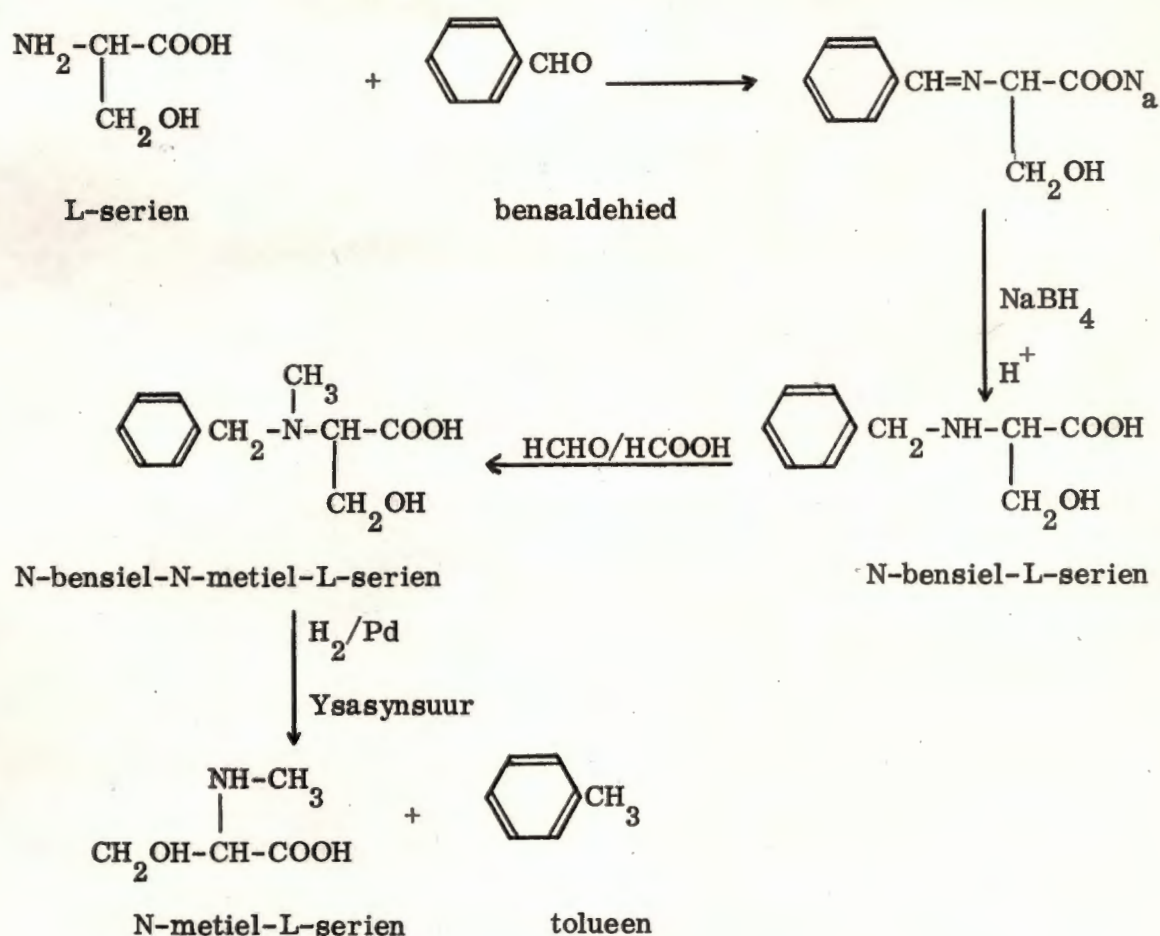
'n Verdere bevestiging van die struktuur van Z word verkry uit die feit dat Z dieselfde seldsame rooibruin kleur met ninhidrien-kollidien oplewer as sarkosien (N-metielglisien) en N-metielalanien. Ook is die posisie van Z relatief tot ander aminosure op 'n chromatogram presies die verwagte. (Sien figuur 14.) In die eerste plek is die posisie van NMA tot Z dieselfde as die van die verskillende aminosure tot hulle hidroksiederivate. (Bv. proliefhidroksieprolien, fenielalanien-tirosien, alanien-serien, pipekoliensuur-hidrok=



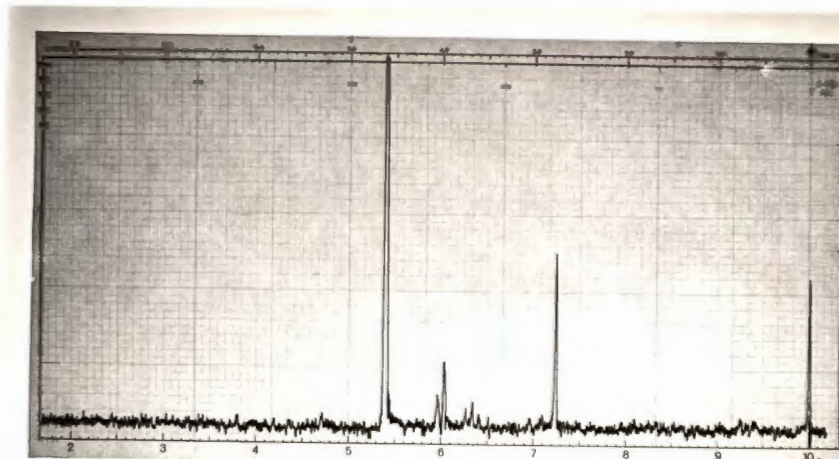
Figuur 14 Posities van verskillende aminosure op 'n tweedimensionele chromatogram. 1 = fenielalanien, 1-OH = tirosien, 2 = pipekoliensuur, 2-OH = hidroksiepipekoliensuur, 3 (= 5-NH₂) = NMA (X), 3-OH (= 5-OH-NH₂) = NMS (Z), 4 = prolien, 4-OH = hidroksieprolien, 5 = alanien, 5-OH = serien, 6 = glisien, 6-NH₂ = sarkosien.

siepipekoliensuur⁽¹⁰³⁾). Tweedens is die posisie van Z tot serien dieselfde as dié van NMA tot alanien en dié van sarkosien tot glisien.

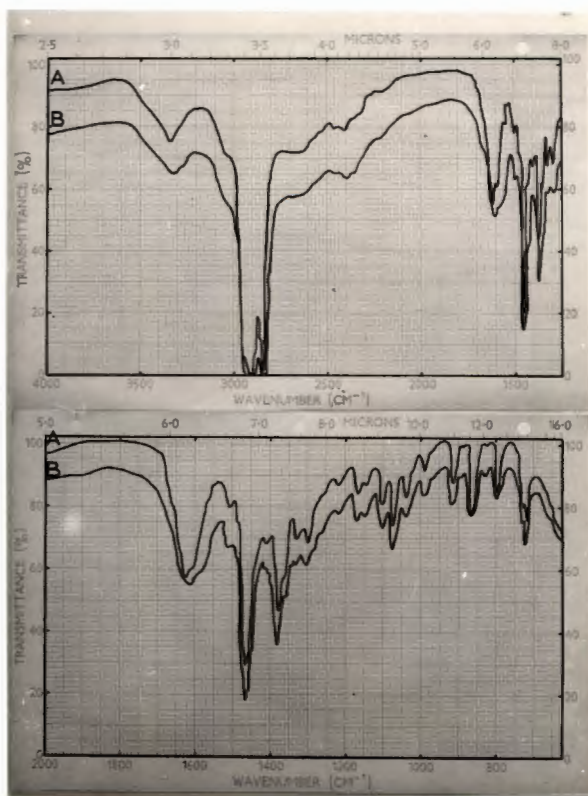
N-metielserien is sover vasgestel kan word nog nooit voorheen in plan=te aangetref nie, maar net soos NMA maak dit 'n deel uit van Aktinomisien Z, 'n antibiotiese stof gevorm deur Actinomyces fradiae. Die finale stap in 'n struktuurbewys is gewoonlik 'n vergelyking met 'n ondubbelsinnig gesintetiseerde verbinding. Aangesien N-metielserien nie elders verkry kon word nie, is die verbinding volgens die metode van Quitt, et al⁽⁹¹⁾ gesintetiseer. Die sintese berus op die volgende omsettings:



Aangesien die finale kristallisering moeilik plaasgevind het, en die kristalle higroskopies was, is besluit om die NMS te suiwer deur dit eers op 'n Dowex 50-X4 kolom te adsorbeer en nadat die kolom goed met water gewas



Plaat 9 Die kernmagnetiese resonansspektrum van Z.

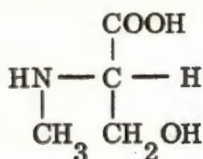


Plaat 10 Die infrarooispektra van nujol pastas van Z (A) en N-metiel-L-serien (B).

is, met 0.1 N ammoniumhidroksied te elueer. Hierna het die kristallisering makliker plaasgevind en was die kristalle nie meer higroskopies nie.

Z en NMS het identiese absorpsiespektra in die infrarooi gebied gehad soos aangedui word in plaat 10.

Ten slotte is die spesifieke optiese rotasie van Z opgelos in 6 N sout= suur ook bepaal. Daar was te min van Z oor om 'n noukeurige bepaling van die spesifieke optiese rotasie moontlik te maak, maar uit die resultaat was dit duidelik dat Z die L-isomeer van NMS is. Die struktuur van Z is dus die volgende:



N-metiel-L-serien.

7. Bepaling van die konsentrasie van NMA (X) en NMS (Z) in verskillende organe van Gifblaar

Uit vorige eksperimente het dit alreeds geblyk dat jong blare 'n hoër konsentrasie NMA as ou blare bevat. Die konsentrasie van NMA en NMS is vervolgens in verskillende dele van Gifblaar nagegaan. Aangesien NMA en NMS, indien die konsentrasie nie te hoog is nie, goed van die ander aminosure in 'n eendimensionele stelsel met fenol as elueermiddel skei, is van hierdie metode gebruik gemaak. Indien die aminosure in 'n ekstrak en in standaard monsters in ewe groot volumes op dieselfde papier geplaas word en onder dieselfde toestande gechromatografeer en met ninhidrien behandel word, kan die grootte van die kol en die intensiteit van die kleur van die aminosure in die verskillende standaarde met dié van die betrokke aminosuur in die ekstrak vergelyk word, om 'n aanduiding van die konsentrasie van die aminosuur te verkry ⁽¹³⁾.

Verskillende dele van Gifblaar (blare van verskillende ouderdom, bloei=sels, perikarp, saad en die eindpunte van groeiende risome) is gevriesdroog

en daarna volledig met MCW geëkstraheer. Nadat die ekstrakte ontvet is, is die aminosuurfraksie m.b.v. Dowex 50 hars geïsoleer. Die aminosure is hierna drooggedamp (onder 40°C) en in 'n klein volume water opgelos. Verskillende verdunnings van NMA, NMS en die ekstrakte is in 5 mikroliter hoeveelhede op Whatman No. 1 papier geplaas en dalend met fenol gechromatografeer. Die chromatogramme is oornag in 'n koue lugstroom gedroog totdat geen fenolreuk meer waarneembaar was nie en is hierna met ninhidrien-kolliedien gespuut en ontwikkel.

Uit die grootte en intensiteit van die kolle van verskillende standaarde en monsters kon 'n aanduiding verkry word van die konsentrasie van die betrokke aminosuur. Herhalings is oor nouer konsentrasiegebiede gemaak en die konsentrasie van die aminosure kon hierdeur met 'n akkuraatheid van beter as 10% vasgestel word. Deur die verskillende verdunnings in berekening te bring, kon die persentasie wat die betrokke aminosuur van die droë gewig uitmaak, bereken word. (Sien tabel 6).

Monster	%NMA	%NMS	%N	NMA*	NMS*
Baie jong blare (nog nie oopgevou)	5.6	0.80	3.60	21.1	2.6
Jong blare (nog nie gelignifiseer)	2.0	0.45	2.76	9.9	1.9
Volwasse blare (einde groeiseisoen)	1.1	0.38	2.20	6.8	2.0
Ou blare (vorige groeiseisoen)	0.3	0.25	1.53	2.9	1.9
Punt van risoom	3.7	1.5	2.23	22.6	7.9
Bloeisels	3.5	1.3	2.62	18.2	5.8
Perikarp	4.3	0.8	2.20	26.6	4.3
Saad	1.8	0.1	1.90	12.9	0.6

Tabel 6 Die NMA-, NMS- en stikstofinhoud (gebaseer op droë gewig) van verskillende dele van Gifblaar en *die persentasie van die totale stikstof wat toegeskryf kan word aan NMA en NMS in verskillende dele van Gifblaar.

Aangesien die stikstofinhoud van jong blare altyd hoër is as dié van ou blare, is dit belangrik om te weet of die hoër NMA-inhoud in jong blare net toe te skryf is aan die hoër stikstofgehalte. Die stikstofinhoud van die ver-

skillende monsters is derhalwe bepaal en in tabel 6 word die aminosuurstikstof as persentasie van die totale stikstof weergegee.

Uit die resultate in tabel 6 is dit duidelik dat hoe jonger die blare is, hoe hoër is die konsentrasie van NMA en NMS. Dit is bekend dat jonger blare baie meer toksies is as ouer blare, d.w.s. jonger blare bevat 'n baie hoër FAc-inhoud as ou blare. Dit is dus insiggewend om ook 'n aanduiding van die FAc-inhoud van die ander monsters na te gaan om te sien of daar 'n verband tussen die konsentrasie van NMA en NMS en die konsentrasie van FAc bestaan.

Vervolgens is die totale en anorganiese fluoriedinhoud van die monsters deur dr. B. von Sydow bepaal. Hieruit is die organiese fluoorinhoud van die monsters, wat sover bekend, slegs aan FAc toegeskryf kan word, bereken. (Kyk tabel 7).

Monster	Totale F	Anorg. F	Org. F
Baie jong blare	210.9	1.7	209.1
Volwasse blare	13.2	0.9	12.3
Ou blare	16.4	4.6	11.8
Risoompunte	333.1	3.4	329.7
Bloeisels	69.3	2.1	67.2
Perikarp	12.7	1.8	10.9
Saad	93.4	1.1	92.3

Tabel 7 Die fluoorinhoud van verskillende dele van Gifblaar uitgedruk in terme van mikrogram F per 10 mg stikstof.

Die organiese fluoorwaardes is omgerek (vermenigvuldig met 87.04/19) om die „FAc-inhoud" in die verskillende organe te gee. Alhoewel die plant al redelik goed ondersoek is, kon daar tot dusver nog geen ander fluoorbevattende verbindings opgespoor word nie. Die „FAc-inhoud" kan dus heelwaarskynlik in 'n baie groot mate aan FAc toegeskryf word. (Kyk tabel 8).

Monster	Totale F	Anorg. F	Org. F	%FAC
Baie jong blare	756.0	6.2	749.8	0.31
Volwasse blare	29.0	2.1	26.9	0.01
Ou blare	25.0	7.0	18.0	0.01
Risoompunte	740.0	6.5	733.5	0.30
Bloeisels	182.0	5.5	176.5	0.07
Perikarp	28.0	4.0	24.0	0.01
Saad	178.0	2.0	176.0	0.07

Tabel 8 Die persentasie FAC gebaseer op droë gewig en die fluoorinhoud in dele per miljoen (μg F per g droë gewig) van verskillende dele van Gifblaar.

Uit die voorafgaande tabelle is dit duidelik dat daar 'n redelike goeie korrelasie tussen die FAC-inhoud en NMA- en NMS-konsentrasie in die blare, risoompunte en bloeisels bestaan. Wat die perikarp en saad betref, pas die resultate egter nie by die voorafgaande patroon in nie.

Dit is interessant dat op stikstofbasis die risoompunte die hoogste FAC-inhoud gehad het. Dit wil dus voorkom asof FAC in hierdie organe gesintetiseer en in die blare afgebreek of vanuit die blare uitgeloog of vervoer word. Dit wil ook voorkom asof NMA en veral NMS in die risoom gesintetiseer word.

8. Die toksisiteit van NMA en NMS

Soos reeds opgemerk bevat organe soos jong blare wat baie giftig is, baie meer NMA en NMS as die minder giftige ouer blare. Dit is bo twyfel bewys dat die toksien in Gifblaar FAC is, maar dit is nie onmoontlik dat die twee aminosure ook giftig kan wees nie.

Dr. T.W. Naudé van Onderstepoort het goedgegunstiglik ingewillig om die toksisiteit van die twee aminosure op muise uit te toets. 'n Baie groot dosis (1000 mg aminosuur per kilogram muisgewig) is deur onderhuidse inspuiting aan twee pare albino wistar-muise (jong gespeende mannetjies waarvan die gewigte gewissel het tussen 14 en 21 g) toegedien. Nie een van die

muise het enige simptome van vergiftiging getoon nie en by post mortem 9 dae na die toediening is ook geen patologiese veranderings opgemerk nie.

9. Die voorkoms van NMA en NMS in proteïene

Aangesien NMA en NMS so 'n groot deel van die vrye aminosuurfraksie uitmaak, is dit interessant om na te gaan of die twee aminosure ook in die proteïene van Gifblaar voorkom.

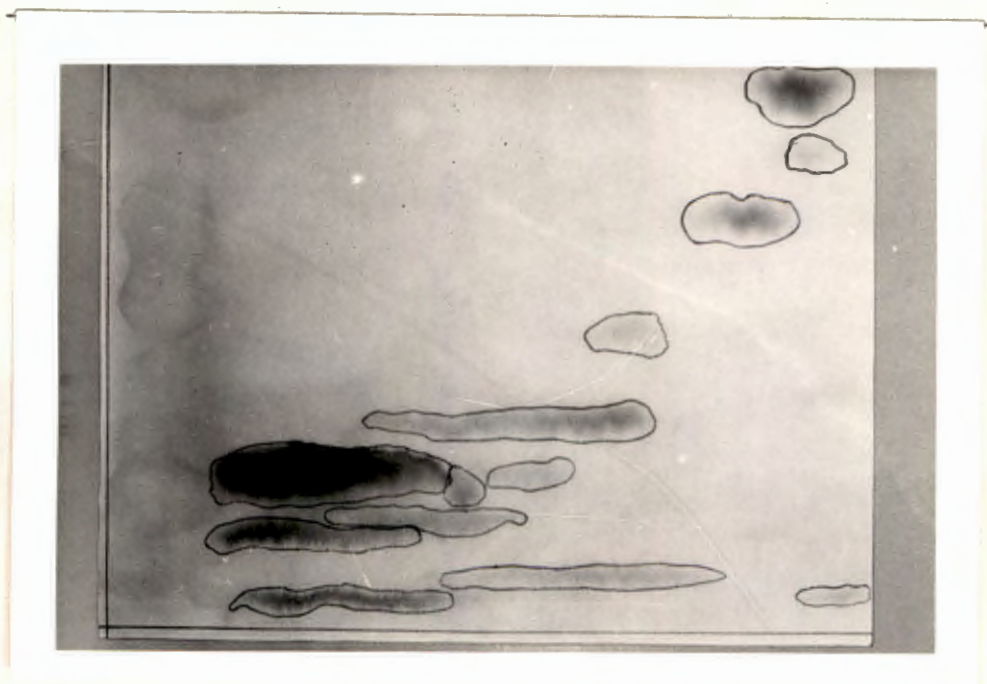
Die vrye aminosure is so volledig moontlik uit gevriesdroogde monsters van Gifblaar blare, bloeisels, saad en perikarp geëkstraheer. Die „vesels“ is hierna met 6 N soutsuur vir 24 uur by 100°C gehidroliseer soos beskryf onder „Bepaling van die stabiliteit van X en Z“. As kontrole is jong blare waarvan die vrye aminosure nie vooraf verwyder is nie, ook gehidroliseer. Al die hidrolisate is hierna tweedimensioneel gechromatografeer soos gewoonlik.

In nie een van die gevalle, behalwe vir die kontrole, kon NMA of NMS aangedui word op die chromatogramme van die hidrolisate nie. Die twee aminosure kom dus blykbaar nie voor in die proteïene van Gifblaar nie. Soos op plaat 11 aangedui, is daar in die geval van die bloeiselhidrolisaat 'n aminosuur opgemerk wat nie een van dié is wat algemeen in proteïene voorkom nie. Hierdie aminosuur was ook die een teenwoordig in die hoogste konsentrasie.

10. Die voorkoms van NMA en NMS in ander plante

Soos alreeds genoem, is NMA en NMS sover bekend nog nooit voorheen in hoër plante aangetref nie. Dit is egter interessant om na te gaan of hierdie aminosure moontlik ook in plante wat saam met Gifblaar groei, gevind kan word. Die blare van Parinarium capense (Grysappel) wat in baie opsigte ooreenstem met Gifblaar is gevolglik soos reeds beskryf vir aminosure ondersoek. Uit die chromatogram in plaat 12 uitgebeeld is dit duidelik dat Grysappel nie NMS of NMA bevat nie.

Aangesien vroeëre resultate aandui dat daar moontlik 'n verband be-



Plaat 11 Chromatogram van 'n proteïenhidrolisaat van Gifblaarbloeisels waarvan die vrye aminosure vooraf verwyder is. Horisontaal met waterversadigde fenol en vertikaal met BAW ontwikkel.

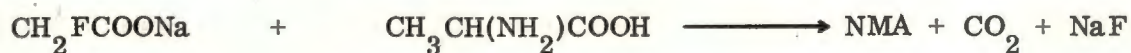
staan tussen die metabolisme van FAc en dié van NMA en NMS is besluit om die aminosure van 'n ander plant wat ook FAc bevat, naamlik Acacia georginae⁽⁷⁵⁾, te ondersoek. Die fillodes van die plant is soos reeds beskryf, geëkstraheer en die kationiese fraksie is tweedimensioneel gechromatografeer. Uit die resultate (plaat 13) is dit duidelik dat A. georginae nie NMA en NMS in opspoorbare hoeveelhede bevat nie. Dit wil dus voorkom asof die metabolisme van NMA en NMS nie noodwendig met dié van FAc gekoppel is nie.

B. Die Biosintese van NMA en NMS

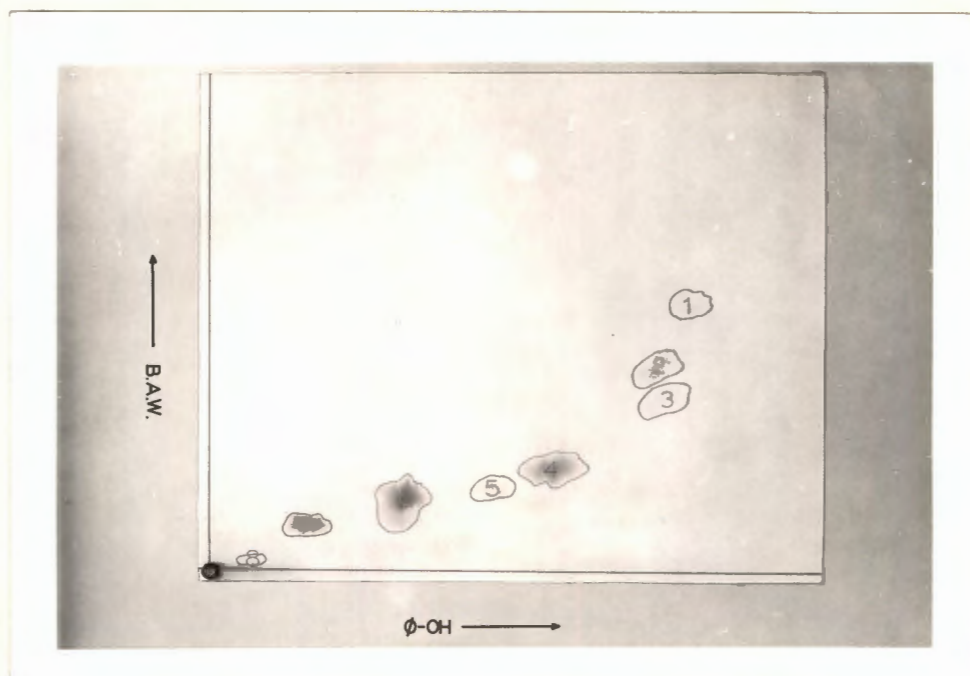
Die feit dat NMA en NMS in sulke groot hoeveelhede in Gifblaar voorkom, dui daarop dat hierdie verbindings een of ander belangrike metaboliese rol vertolk. Omdat hierdie twee aminosure meer as 30% van die totale stikstof in die risoompunt verteenwoordig (tabel 6), mag hulle betrokke wees by die berging en/of vervoer van stikstof in die plant⁽²⁹⁾.

In 'n hele aantal gevalle is gevind dat 'n hoë NMA- en NMS-konsentrasie met 'n hoë FAc-konsentrasie gepaard gaan (tabelle 6 en 8). Dit mag dus wees dat 'n hoë FAc-konsentrasie aanleiding gee tot die sintese van hierdie aminosure, of andersom dat 'n hoë konsentrasie van hierdie aminosure tot die vorming van FAc lei. Dit is dus belangrik om meer i.v.m. die metabolisme van NMA en NMS te wete te kom.

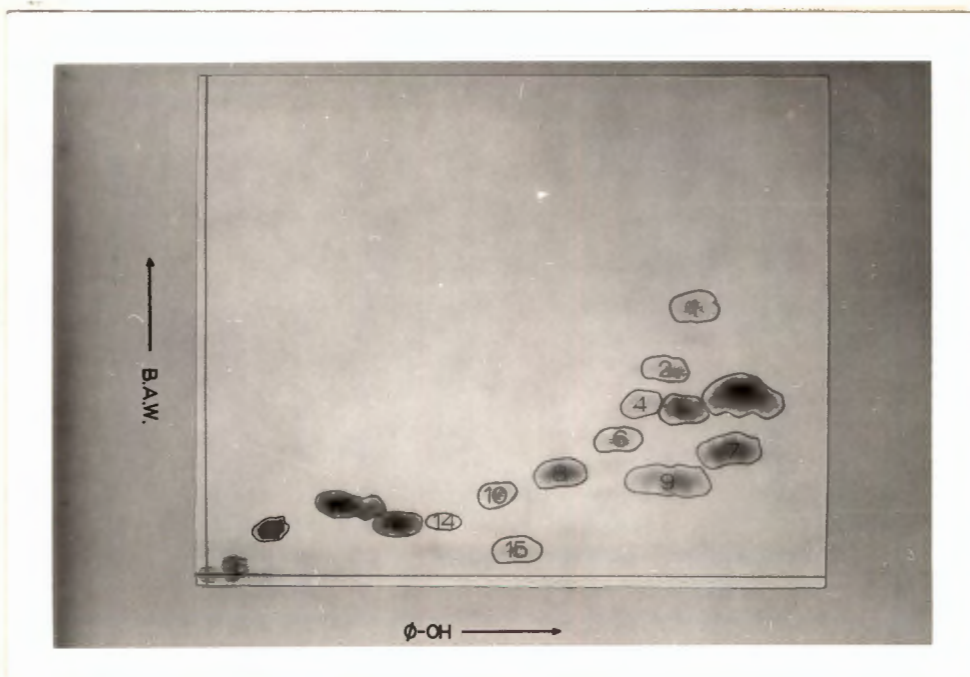
Die biosintese van nuutontdekte aminosure is gewoonlik een van die eerste aspekte wat ondersoek word. Gevolglik is pogings aangewend om die biosintese van hierdie twee verbindings na te gaan. Die voor-die-hand-liggendste sintese van NMA en NMS sal 'n een-stap metilering van alanien of serien deur 'n metileringsreagens soos metionien of hidroksimetieltetrahydrofolien⁽²⁴⁾ wees. Dit mag selfs ook wees dat FAc op die volgende wyse die skenker van die metielgroep kan wees:



Latere proewe (hoofstuk V) het hierdie moontlikheid uitgeskakel.

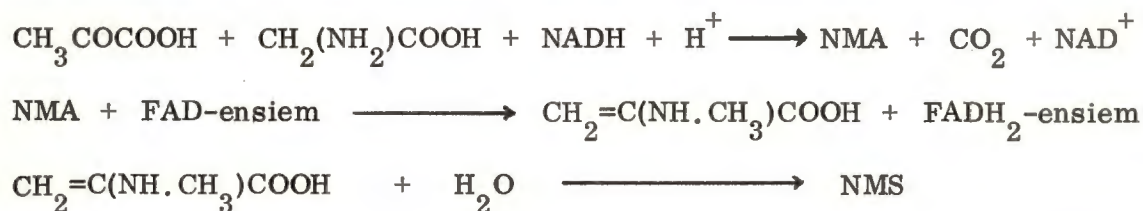


Plaat 12 Chromatogram van die vrye aminosure teenwoordig in blare (18 mg droë gewig) van Grysappel.



Plaat 13 Chromatogram van die vrye aminosure aanwesig in fillodes (25 mg droë gewig) van Acacia georginae.

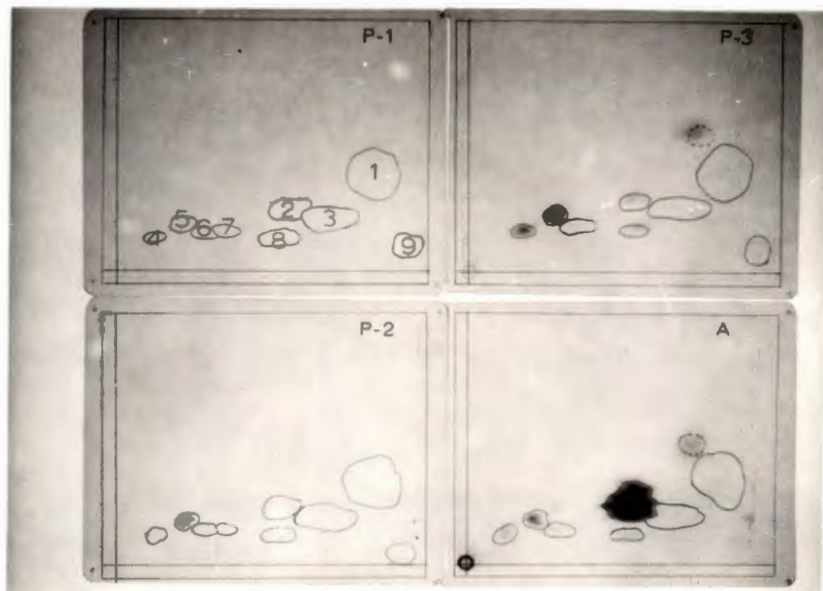
Met die oog daarop dat 'n groot aantal aminosure uit ketosure ontstaan, het prof. F.C. Steward (Cornell Universiteit, V.S.A.) tydens sy besoek alhier die volgende skema voorgestel:



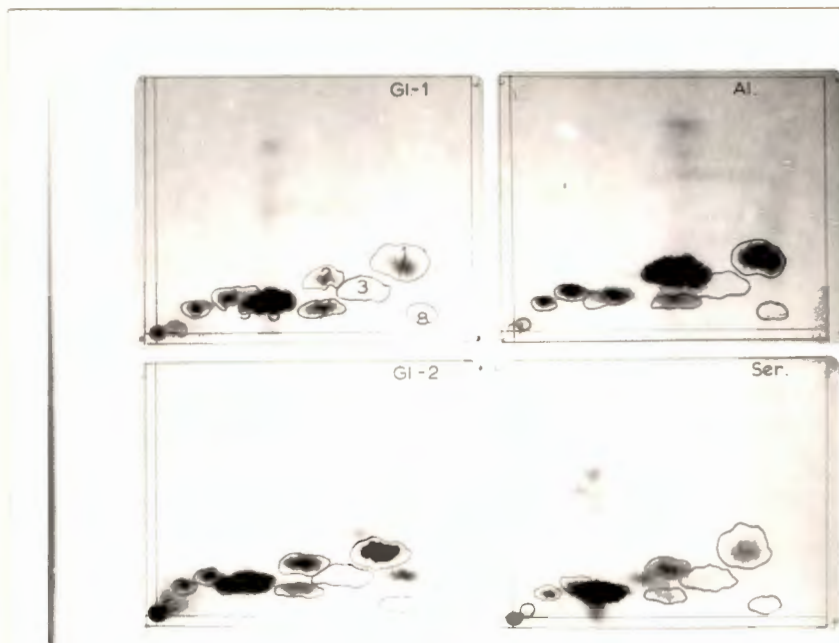
Om bogenoemde moontlikhede te ondersoek, is voereksperimente met die volgende gemerkte verbindings uitgevoer: piruvaat-1- ^{14}C , (1)(P-1), piruvaat-2- ^{14}C (2)(P-2), piruvaat-3- ^{14}C (3)(P-3), glisien-1- ^{14}C (4)(G-1), glisien-2- ^{14}C (5)(G-2), alanien- ^{14}C (6)(A) en serien- ^{14}C (7)(S).

Uit tabel 6 wil dit voorkom asof hierdie verbindings in die risoompunt gesintetiseer word en in ouerwordende blare afgebreek word. Vir die eerste eksperiment is die jongste beskikbare blaartjies ($\pm$ twee weke oud) dus gebruik. Twee uur nadat 2.5 mikrocurie van een van die sewe verbindings op sewe genommerde, min of meer identiese blaartjies geplaas is, is die blaartjies afgeknip, gevries, geëkstraheer en gefraksioneer soos in hoofstuk II aangedui. 'n Geskikte deelvolumen van die aminosuurfraksie is tweedimensioneel op Whatman No. 1 papier gechromatografeer. In nie een van die gevalle was die NMS of NMA in die volume wat gechromatografeer is voldoende radioaktief om binne twee weke 'n positiewe reaksie op die radio-outogram te toon nie. Nadat die film vir 4 weke blootgestel is, is 'n baie swak kol by die NMA posisie aangetref in die geval waar piruvaat-3- ^{14}C toegedien is. In tabel 9 word die relatiewe aktiwiteite van die verskillende aminosure op die onderskeie chromatogramme weergegee. (Kyk ook plaat 14).

Die resultate wat met P-1, P-2 en P-3 behaal is, het belangrike implikasies wat in hoofstuk V volledig bespreek word. Verder is dit interessant dat glutamiensuur in al die gevalle radioaktief was. Dit wil ook voorkom asof glisien omgesit word na serien, maar serien word nie omgesit na glisien nie, en dat serien omgesit word na alanien, maar alanien word nie omgesit na se-



Plaat 14 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike chromatogramme geplaas) van die vrye aminosure in baie jong blare van Gifblaar nadat piruvaat-1- ^{14}C (P-1), -2- ^{14}C (P-2), -3- ^{14}C (P-3) en alanien- ^{14}C toegedien is. (1 = NMA, 2 = alanien, 3 = NMS, 4 = aspartiensuur, 5 = glutamiensuur, 6 = serien, 7 = glisien, 8 = glutamien, 9 = ?).



Plaat 15 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike chromatogramme geplaas) van die vrye aminosure in ou blare van Gifblaar nadat glisien-1- ^{14}C (G1-1), -2- ^{14}C (G1-2), alanien- ^{14}C (A1) en serien- ^{14}C (Ser) toegedien is. (1 = NMA, 2 = alanien, 3 = NMS, 4 = glutamiensuur, 5 = serien, 6 = glisien, 7 = glutamien, 8 = ?, 9 = aspartiensuur, 10 = sisteïensuur).

rien toe nie.

	1 P-1	2 P-2	3 P-3	4 G-1	5 G-2	6 A	7 S
Aspartiensuur	-	+	++	-	+	+	-
Glutamiensuur	+	++	++++	++	++	++	+
Serien	-	-	-	++	++	-	b.st.
Glisien	-	-	-	+++	+++	-	-
Glutamien	-	-	++	+	-	+	-
Alanien	-	-	++	+	-	b.st.	+++
NMS	-	-	-	-	-	-	-
γ -aminobotters.	-	-	+++	-	-	+	-
NMA	-	-	-	-	-	-	-
Onbekendes	-	-	-	+++	++++	+	++++

Tabel 9. Verspreiding van aktiwiteit in die aminosuurfraksie na toediening van gemerkte verbindings aan baie jong blare van Gifblaar. (+ = net sigbaar, ++ = maklik sigbaar, +++ = sterk kol, ++++ = baie sterk kol, b.st. = baie sterk aktiwiteit a.g.v. oorgelewerde aktiewe verbinding toegedien.)

Fowden⁽²⁹⁾ merk die volgende i.v.m. nie-proteïen-aminosure op:

„Generally, the study of the biosynthesis is rendered difficult by the slow turnover rates found for many of these compounds in plants". Verder bevat jong blaartjies so 'n groot hoeveelheid NMA en NMS dat die bietjie radioaktiewe verbinding wat moontlik vorm, baie verdun word deur die ongemerkte verbinding. In die volgende eksperiment is gevolglik besluit om ou blare te gebruik, om meer radioaktiwiteit (10 mikrocurie) toe te dien en om 'n langer tydverloop (5 uur) toe te laat. Die resultate word weergegee in tabel 10 en in plaat 15.

Uit tabel 10 en plaat 15 is dit duidelik dat NMA die sterkste gemerkte verbinding is wat uit alanien gevorm het. In al die gevalle is radioaktiewe NMA gevorm. In elke geval was daar ook gemerkte alanien teenwoordig. Dit wil dus voorkom asof NMA direk uit alanien gevorm word. Die feit dat radioaktiewe NMA ook gevorm het in die geval waar glisien-1-¹⁴C toegedien is, bewys ondubbelsinnig dat NMA nie uit pirodruiwesuur en glisien vorm volgens die skema hierbo aangedui nie. (Volgens die skema dekarboliseer C-1

van glisien tydens die vorming van NMA).

	1 P-1	2 P-2	3 P-3	4 G-1	5 G-2	6 A	7 S
Aspartiensuur	+	+++	++	++	++	++	++
Glutamiensuur	+	+++	+++	++	++	+++	++
Serien	-	-	-	+++	+++	+	b. st.
Glisien	-	-	-	b. st.	b. st.	+++	+++
Glutamien	-	+++	+++	++	++	++	+
Alanien	++	++	++	++	++	b. st.	++
NMS	-	-	-	-	-	-	+
γ -aminobotters.	-	-	-	-	+	-	-
NMA	+++	++++	++++	+++	+++	+++++	++
Onbekendes	+	-	-	++	++	++	+++

Tabel 10 Verspreiding van aktiwiteit in die aminosuurfraksie nadat verskillende gemerkte verbindings aan ou blare van Gifblaar toegedien is. (Kyk plaat 15).

Net in een geval, naamlik waar serien- ^{14}C toegedien is, is enige teken van radioaktiewe NMS aangetref. Aangesien geen radioaktiewe NMS gevorm is waar die konsentrasie radioaktiewe NMA baie hoog was nie, wil dit voorkom asof NMS deur metilering direk uit serien gevorm word en dat NMS nie uit NMA d.m.v. dehidrogenering en hidrering vorm, soos in die skema hierbo aangedui nie.

Verdere werk wat op hierdie tema uitgevoer kan word, behels onder meer die bepaling van die skenker van die metielgroep, die verdere metabolisme van NMA en NMS, en om die biosintese in vitro na te gaan waarna die betrokke ensiem geïsoleer en gekarakteriseer kan word. Op hierdie stadium is hierdie aspekte van die werk egter agterweë gelaat.

C. Bespreking

Die feit dat Gifblaar, benewens FAc, in alle organe wat ondersoek is ook nog 'n baie hoë konsentrasie NMA en NMS bevat, dui daarop dat hierdie

aminosure moontlik op een of ander wyse gekoppel is aan die FAc-metabolisme van Gifblaar. Aangesien 'n hoë FAc-konsentrasie in 'n hele aantal organe gepaard gaan met 'n hoë NMS- en NMA-konsentrasie, mag dit wees dat 'n hoë konsentrasie NMA en/of NMS lei tot die sintese van FAc of andersins mag 'n hoë FAc-konsentrasie lei tot die sintese van NMA en/of NMS. Derdens mag aldrie hierdie verbindings produkte van dieselfde of gekoppelde biochemiese prosesse wees. Omdat geeneen van hierdie twee aminosure in 'n ander plant wat ook FAc bevat (Acacia georginae) voorkom nie, mag bogenoemde afleidings verkeerd wees. Dit sal baie interessant wees om na te gaan of hierdie verbindings en FAc ook in ander lede van die Dichapetalaceae voorkom. Dit mag ook die moeite loon om ander spesies wat FAc bevat, soos bv. verskeie Oxylobium- en Gastrolobium-spesies te ondersoek vir hierdie twee aminosure.

Dit is opvallend dat Gifblaar 'n baie hoë konsentrasie vrye aminosure in vergelyking met Grysappel en A. georginae het. (Vergelyk plate 6, 12 en 13). Verder is NMA en NMS beslis die dominante aminosure in die vrye aminosuurfraksie. In die groeipunt van die risoom verteenwoordig die stikstof aanwesig in NMA 22% van die totale stikstofinhoud van die weefsel. Dit is dus moontlik dat NMA en NMS 'n rol speel by die berging en/of vervoer van stikstof in die plant.

Dit is ook interessant dat hierdie twee aminosure nie toksies vir muise is nie, en dat dit ook nie in die proteïene van Gifblaar voorkom nie.

Dit is bewys dat hierdie twee aminosure nie bloot inerte eindprodukte van metabolisme is nie, aangesien hoë konsentrasies gemerkte NMA in oublare uit 'n hele aantal radioaktiewe verbindings (alanien, glisien, serien en piruvaat) gevorm is. Jong blare beskik blykbaar nie in so 'n groot mate oor die vermoë om NMA te sintetiseer nie, maar dit mag moontlik 'n ewewigsverskynsel wees omdat jong blare so 'n hoë konsentrasie NMA bevat. Alle beskikbare getuienis dui daarop dat NMA deur metilering uit alanien gevorm word. NMS word heelwaarskynlik deur 'n metilering van serien gevorm.

Hoofstuk V

DIE ORGANIESE SUURMETABOLISME VAN GIFBLAAR

„The results indicate the existence of several pathways of fluoroacetate metabolism (in the intact rat) hitherto not extensively investigated" - Gal, Drewes, Taylor⁽³⁰⁾.

- A. Funksionering van die Kressiklus 66
- B. Die mikroskaal-sintese van FAc-2-¹⁴C 69
- C. Die FAc-2-¹⁴C metabolisme van Gifblaar 76
- D. Bespreking 82

A. Funksionering van die Krebssiklus

Dit is reeds aangedui dat Gifblaar in staat is om FAc te metaboliseer en dat die metabolisme heelwaarskynlik nie deur die Krebssiklus gaan nie. In die verband is dit van belang om vas te stel of Gifblaar wel 'n aktiewe Krebssiklus bevat. Proewe met die toediening van natriumpiruvaat-1-¹⁴C, -2-¹⁴C en -3-¹⁴C sowel as met sitroensuur 1,5-¹⁴C is gevolglik uitgevoer.

Indien piruvaat deur die Krebssiklus gemetaboliseer word, sal die lotgevalle van die drie koolstofatome van mekaar verskil. Die karboksiesuur=koolstofatoom (C-1) sal baie gou as koolsuurgas vrygestel word tydens die omsetting na asetielkoënsiem A. Die koolstofatoom afkomstig vanaf die keeton-groepering (C-2) sal ten minste een rondte van die Krebssiklus moet deurgaen voordat dit as koolsuurgas vrygestel word; en die metielkoolstofatoom sal ten minste twee rondtes van die Krebssiklus moet deurgaen voordat dit as koolsuurgas vrygestel word. Gevolglik sal die koolsuurgas afkomstig van C-3 stadiger vrykom as dié van C-2 terwyl dié afkomstig van C-1 baie vinnig vrygestel word. Aangesien die tussenprodukte van die Krebssiklus aan syreaksies kan deelneem, soos bv. die vorming van glutamiensuur uit alfa-ketoglutaarsuur en die vorming van aspartiensuur uit oksaalasynsuur, behoort 'n groter deel van C-3 as van C-2 in aspartiensuur en glutamiensuur (en produkte hiervan) ingebou te word indien die Krebssiklus funksioneer. Gevolglik behoort daar dan in die geval waar piruvaat -3-¹⁴C toegedien is 'n groter aktiwiteit in die aminosuurfraksie te wees as waar piruvaat-2-¹⁴C toegedien is. Indien piruvaat uitsluitlik deur die Krebssiklus gemetaboliseer word, behoort daar in die geval waar piruvaat-1-¹⁴C toegedien is, geen aktiwiteit in die aminosuurfraksie te wees nie. Dit moet egter in gedagte gehou word dat gemerkte alanien ook uit piruvaat-1-¹⁴C kan vorm.

Sitroensuur 1,5-¹⁴C en piruvaat-1-¹⁴C, -2-¹⁴C en -3-¹⁴C is aan jong (volgroeid, maar nog sag) en ou blare van Gifblaar in die veld toegedien. Vyf mikrocurie (10 mikroliter) van een van bogenoemde verbindings is op naastenby identiese genommerde blare gesmeer soos reeds beskryf. Die blare is na

drie uur afgeknip, in MCW by -80°C gedompel, gehomogeniseer, geëkstraheer en gefraksioneer waarna die aktiwiteit in die verskillende fraksies bepaal is soos in hoofstuk II aangedui. (Kyk tabel 11).

	Lipiede	Koolhidrate	Org. sure	Aminosure
P-1 01	0.13	2.97	94.78	2.12
P-2 02	0.40	2.08	93.41	4.10
P-3 03	2.41	3.42	88.14	6.00
SS 04	1.39	2.28	91.19	5.14
P-1 J1	0.68	6.05	89.65	3.63
P-2 J2	1.54	4.54	90.72	3.21
P-3 J3	5.81	5.17	85.67	3.35
SS J4	0.92	0.45	97.12	1.51

Tabel 11 Die persentasie van die totale aktiwiteit wat herwin is teenwoordig in verskillende fraksies nadat piruvaat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ (P-1), piruvaat- $2\text{-}^{14}\text{C}$ (P-2), piruvaat- $3\text{-}^{14}\text{C}$ (P-3) en sitroensuur $1,5\text{-}^{14}\text{C}$ (SS) aan ou (O) en jong (J) blare van Gifblaar toegedien is.

Die organiese sure is eendimensioneel (PAW en EMW) en die aminosure tweedimensioneel (BAW en fenol) gechromatografeer, waarna radio-outogramme gemaak is.

'n Groot aantal radioaktiewe verbindings is aangetref (± 10 by die PAW chromatogram en ± 8 by die EMW chromatogram). Die konsentrasie van die meeste van hierdie verbindings was nie hoog genoeg om 'n positiewe toets met die kleurreagens (anilien-glukose) te gee nie. Daar was nie opvallende kwalitatiewe verskille tussen die verskillende behandelings nie. In alle gevalle is daar radioaktiwiteit op die posisie van appelsuur en sitroensuur aangetref.

Dit is baie interessant dat daar in elke geval, behalwe waar piruvaat- $2\text{-}^{14}\text{C}$ aan ou blare en sitroensuur- $1,5\text{-}^{14}\text{C}$ aan jong blare toegedien is, 'n redelike sterk aktiwiteit op die posisie van FAc in albei (PAW en EMW) chromatogramme aangetref is. Dit mag dus wees dat FAc onder sekere omstandighede uit pirodruiwesuur en sitroensuur gevorm kan word. Aangesien die radioaktiewe „FAc" uit piruvaat- 1- , 2- en $3\text{-}^{14}\text{C}$ gevorm het, is dit nie net

'n geval van dekarboksilering en dan fluorering van piruvaat nie. FAc vorm dus heelwaarskynlik uit een of ander produk van piruvaat-metabolisme. Aangesien hierdie resultate eers op 'n laat stadium van die ondersoek behaal is, is die saak, alhoewel dit baie interessant en belangrik is, voorlopig agterweë gelaat.

Uit die radio-outogramme van die aminosure tree daar 'n paar belangrike aspekte na vore. Die relatiewe aktiwiteit van die aminosure word in tabel 12 weergegee.

	01 P-1	02 P-2	03 P-3	04 SS	J1 P-1	J2 P-2	J3 P-3	J4 SS
Aspartiensuur	+	+++	++	++	-	++	+	-
Glutamiensuur	+	+++	+++	++++	+	+++	+++	++++
Glutamien	-	++	+	+	-	-	+	++
Alanien	++	++	++	++	-	-	+	-
NMA	++	+	+++	+++	-	-	+	-
Onbekendes	+	++	-	-	+++	-	-	-

Tabel 12 Verspreiding van aktiwiteit in die aminosuurfraksie nadat piruvaat-1- ^{14}C (P-1), piruvaat-2- ^{14}C (P-2), piruvaat-3- ^{14}C (P-3) en sitroensuur-1,5- ^{14}C (SS) aan jong (J) en ou (O) blare van Gifblaar toegedien is.

Uit die resultate is dit duidelik dat NMA- ^{14}C in elke geval by die ou blare gevorm het. In die geval van jong blare het NMA- ^{14}C net gevorm waar piruvaat-3- ^{14}C toegedien is.

By al die behandelings is glutamiensuur- ^{14}C gevorm. Dit is verstaanbaar dat glutamiensuur die eerste gemerkte aminosuur sal wees indien piruvaat deur die Kriebssiklus na alfa-ketoglutaarsuur gemetaboliseer word omdat die omsetting van piruvaat na alanien d.m.v. alaniendehidrogenase blykbaar nie aktief in plantweefsels plaasvind nie⁽²⁴⁾. Die vorming van alanien- ^{14}C vind heelwaarskynlik plaas deur transaminasie tussen glutamiensuur en piruvaat- ^{14}C aangesien hierdie ensiemstelsel baie aktief is in plante⁽²⁴⁾.

Dit is nie moontlik om volgens konvensionele biochemiese roetes te

verklaar hoe glutamiensuur- ^{14}C uit piruvaat- ^{14}C vorm sonder dat alanien eers radioaktief is nie. Dit kan nie via asetielkoënsiem A, sitroensuur, isositroensuur en alfa-ketoglutaarsuur plaasvind nie, omdat C-1 van piruvaat dekarboksileer tydens die vorming van asetielkoënsiem A daaruit. Dit kan ook nie via appelsuur of oksaalasetaat en dan soos hierbo deur die Krebs-siklus uit alfa-ketoglutaarsuur vorm nie omdat die koolsuurgas wat vrykom net voor die vorming van alfa-ketoglutaarsuur in hierdie geval van C-1 van pirodruiwesuur afkomstig is.

Indien sitroensuur- ^{14}C slegs deur die Krebs-siklus gemetaboliseer word, sal aspartiensuur baie minder radioaktief as glutamiensuur wees, omdat radioaktiewe koolsuurgas tydens die vorming van suksinielkoënsiem A uit alfa-ketoglutaarsuur vrygestel word. Dit is dan ook inderdaad gevind dat aspartiensuur baie minder aktief as glutamiensuur is. Alanien word heelwaarskynlik via appelsuur en piruvaat uit sitroensuur gevorm, terwyl NMA, soos reeds aangedui, uit alanien ontstaan. Die merkpatroon dui dus daarop dat die Krebs-siklus wel 'n aktiewe rol speel in die metabolisme van Gifblaar.

By ou blare is daar orals alanien- ^{14}C gevorm, terwyl by jong blare net in een geval 'n geringe mate van alanien- ^{14}C gevorm is. 'n Aanvaarbare verklaring is dat piruvaat by jong blare vinniger deur die Krebs-siklus wegge-metaboliseer word, terwyl die Krebs-siklus by ou blare blykbaar 'n minder belangrike rol speel en piruvaat- ^{14}C ondergaan dus 'n syreaksie met glutamiensuur om alanien- ^{14}C en NMA- ^{14}C te vorm.

Indien die resultate wat met baie jong blare behaal is in hoofstuk IV (sien plaat 14) beskou word, is dit duidelik dat die Krebs-siklus volgens voorgenoemde argumente, hier 'n nog groter rol speel as met jong blare. Hierdie resultate is in ooreenstemming met dié van ander werkers wat gevind het dat die Krebs-siklus 'n minder belangrike rol vervul na mate plante ouer word⁽⁷⁾.

B. Die mikroskaal-sintese van FAc-2- ^{14}C

Die respirasieproewe het aangedui dat FAc wel deur Gifblaar gemeta-

boliseer word, en dat die metabolisme blykbaar nie via die Krebssiklus plaasvind nie. Om hierdie resultate te bevestig ^{en} ~~het~~ om te probeer nagaan langs watter weg FAc wel gemetaboliseer word, is voereksperimente met radioaktiewe FAc van groot belang. Omdat die halfleeftyd van die isotope van fluoor so kort is, ($^{17}\text{F} = 66 \text{ s}$, $^{18}\text{F} = 112 \text{ m}$, $^{20}\text{F} = 11 \text{ s}$, $^{21}\text{F} = 5 \text{ s}$ ⁽⁵⁴⁾), kan fluoorgemerkte FAc nie maklik gebruik word nie. Die beste alternatief is om koolstofgemerkte FAc toe te dien. Aangesien hierdie verbinding nie in die handel verkrygbaar is nie, is pogings om FAc uit radioaktiewe voor-
gangers te sintetiseer, aangewend.

Saunders & Worthy ⁽⁹⁶⁾ het 'n metode beskryf vir die sintese van FAc- $2-^{14}\text{C}$ wat berus op die fluorering van metielbroomasetaat- $2-^{14}\text{C}$ met kaliumfluoried (KF) onder anhidriese toestande in 'n roterende, verseëde outoklaaf by 200°C vir $3\frac{1}{2}$ uur lank. Alhoewel die metode in hulle hande 37-50% van die teoreties-moontlike hoeveelheid gelewer het, kon daar nooit opbrengste van hoër as 20% in ons laboratorium verkry word nie. Die lae opbrengste mag toegeskryf word aan die feit dat die outoklaaf moontlik nie heeltemal anhidries afgesluit kon word nie.

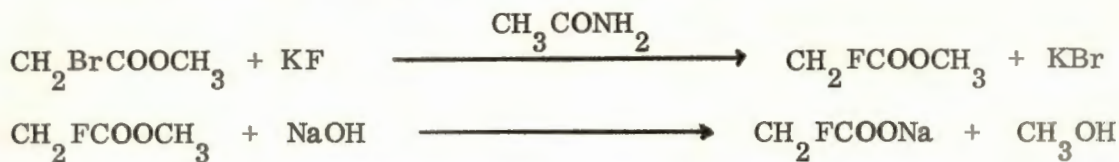
Behalwe vir die feit dat hierdie metode spesiale apparaat benodig, het dit die tekortkoming dat 11% van die metielbroomasetaat (MeBrAc) na $3\frac{1}{2}$ uur verhitting by 220°C ontbind het. Dit lewer nie alleen laer opbrengste nie, maar lei moontlik ook tot kontaminering van die eindproduk met ontbindings-
produkte.

Deur etielchloroasetaat met KF opgelos in gesmelte asetamied (AA) te fluoreer, kon Bergmann & Blank ⁽⁸⁾ etielfluoroasetaat met opbrengste van 60-63% berei. Omdat broom 'n beter verlatende groep vir die nukleofiele aanval van fluoor is, en omdat metielbroomasetaat- $2-^{14}\text{C}$ kommersieel ver-
krygbaar is, is hierdie verbinding as uitgangstof gebruik.

In die metode van Bergmann & Blank ⁽⁸⁾ is makrohoeveelhede etiel-
chloroasetaat met verpoeierde anhidriese kaliumfluoried/asetamied (1:1, g:g) gemeng en na verhitting is die produkte m.b.v. fraksionele distillasie geskei.

Uit die aard van die saak is dit nie moontlik om dieselfde prosedure op 'n mikroskaal toe te pas nie. 'n Mikrometode wat gebaseer is op die reaksie in 'n verseëelde buis is gevolglik ontwikkel.

Die sintese berus op die volgende reaksies:



Om die optimale toestande vir die sintese van FAc te vind, is die invloed van temperatuur, tydsduur van reaksie en die verhouding van KF/AA tot MeBrAc op die omsetting na MeFAc bepaal.

'n Mengsel van gelyke dele anhidriese kaliumfluoried en vars gedistilleerde asetamied is fyngemaal en oor magnesiumperchloraat in 'n desikator geberg. 'n Pyrex-glasbuisie van 10 cm x 3 cm wat aan die een kant toegesmelt is, is ongeveer 3 cm vanaf die oop punt vernou, en 'n bekende gewig KF/AA is ingevoeg. Nadat die gevulde buisie oornag oor magnesiumperchloraat gedroog is, is dit vinnig met 'n rubber ampullepropie afgesluit. M.b.v. 'n mikrosputjie is die voorafbepaalde hoeveelheid MeBrAc (50-150 mg) bygevoeg. 'n Dun insputnaaldjie is hierna deur die ampullepropie gedruk en terwyl die basis met droë ys afgekoel is, is die buisie met 'n klein vlammetjie verseël. Hierna is die verseëelde buisie in 'n termostaties-beheerde oond vir die voorafbepaalde tyd en temperatuur verhit.

In die voorlopige eksperimente wat daarop gemik was om die optimale reaksietoestande te bepaal, is die glasbuisie wat die reaksieprodukte bevat, in 'n vysel wat petroleumeter (kookpunt 40-60°C) bevat, fyngemaal. Die inhoud van die vysel is kwantitatief na 'n Erlenmeyerfles oorgebring en vir 30 minute met ± 60 ml petroleumeter opgeskud om die MeFAc te skei van die onoplosbare KF. Die gefiltreerde ekstrak is hierna met natriumhidroksied alkalies gemaak waardeur MeFAc na FAc omgeskakel is. Die petroleumeter is by 40°C afgedamp waarna die FAc in 'n bekende hoeveelheid water opgelos

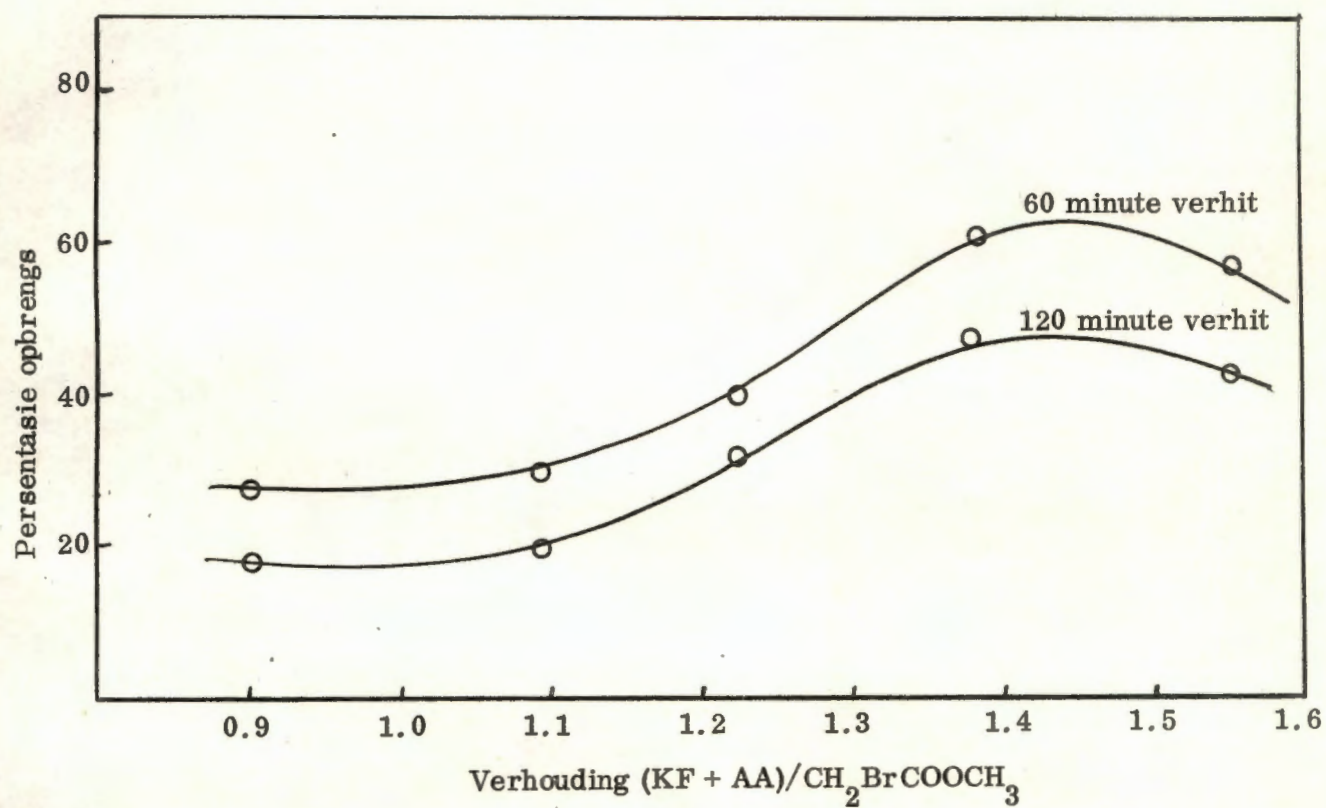
is. Die fluoriedinhoud van die oplossing is bepaal soos beskryf in hoofstuk II. Ekwivalente hoeveelhede KF is ook met petroleumeter geëkstraheer en die fluoriedinhoud van die ekstrakte (gewoonlik baie laag) is as kontrole gebruik.

Deur die eksperiment te herhaal met verskillende temperature en tydskure van verhitting en met verskillende MeBrAc tot KF + AA verhoudings, is die optimale toestande bepaal. Dit is gevind dat verhitting van 'n 1:1.4 mengsel van MeBrAc tot KF + AA (g:g) vir 30 minute by 100°C die hoogste opbrengste ($\pm 65\%$) lewer. In figuur 15 word twee stelling resultate weergegee.

Vir die sintese van radioaktiewe MeFAc onder optimale toestande is enkele wysigings op die voorafgaande prosedure toegepas. In 'n voorlopige sintese waar hierdie gewysigde metode toegepas is met nie-radioaktiewe MeBrAc as uitgangstof is gevind dat 64% van die MeBrAc omgesit is na MeFAc. Dit is m.b.v. infrarooispektroskopie vasgestel dat die FAc wat gesintetiseer is, meer as 95% suiwer was. Die spektrum van die gesintetiseerde FAc het meer ooreengestem met 'n standaard spektrum as selfs kommersiële FAc (Fluka) wat as ten minste 98% suiwer gespesifiseer is. Die verskille tussen die spektra van die gesintetiseerde FAc en die standaard spektrum kan toegeskryf word aan BrAc wat blykbaar in klein hoeveelhede teenwoordig was.

As uitgangstof vir die sintese van $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ is 3.0 millicurie $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ van „The Radiochemical Centre" (Amersham) gekoop. Hierdie verbinding het 'n spesifieke aktiwiteit van 4.74 mc/mM gehad, en was radiochemies 95% suiwer.

Die afgekoelde flessie waarin die $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ ontvang is, is gebreek en in 'n effens groter droë Pyrexbuis wat aan die een punt toegesmelt was, geplaas. Die voorafberekende gewig KF/AA is in 'n gewysigde tregtertjie afgeweeg, in die tregtertjie gedroog en vinnig oorgebring na die $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ in die binneste buisie soos in figuur 16 aangedui. Die groot buis met die reagense is hierna toegesmelt terwyl die onderpunt in droë ys

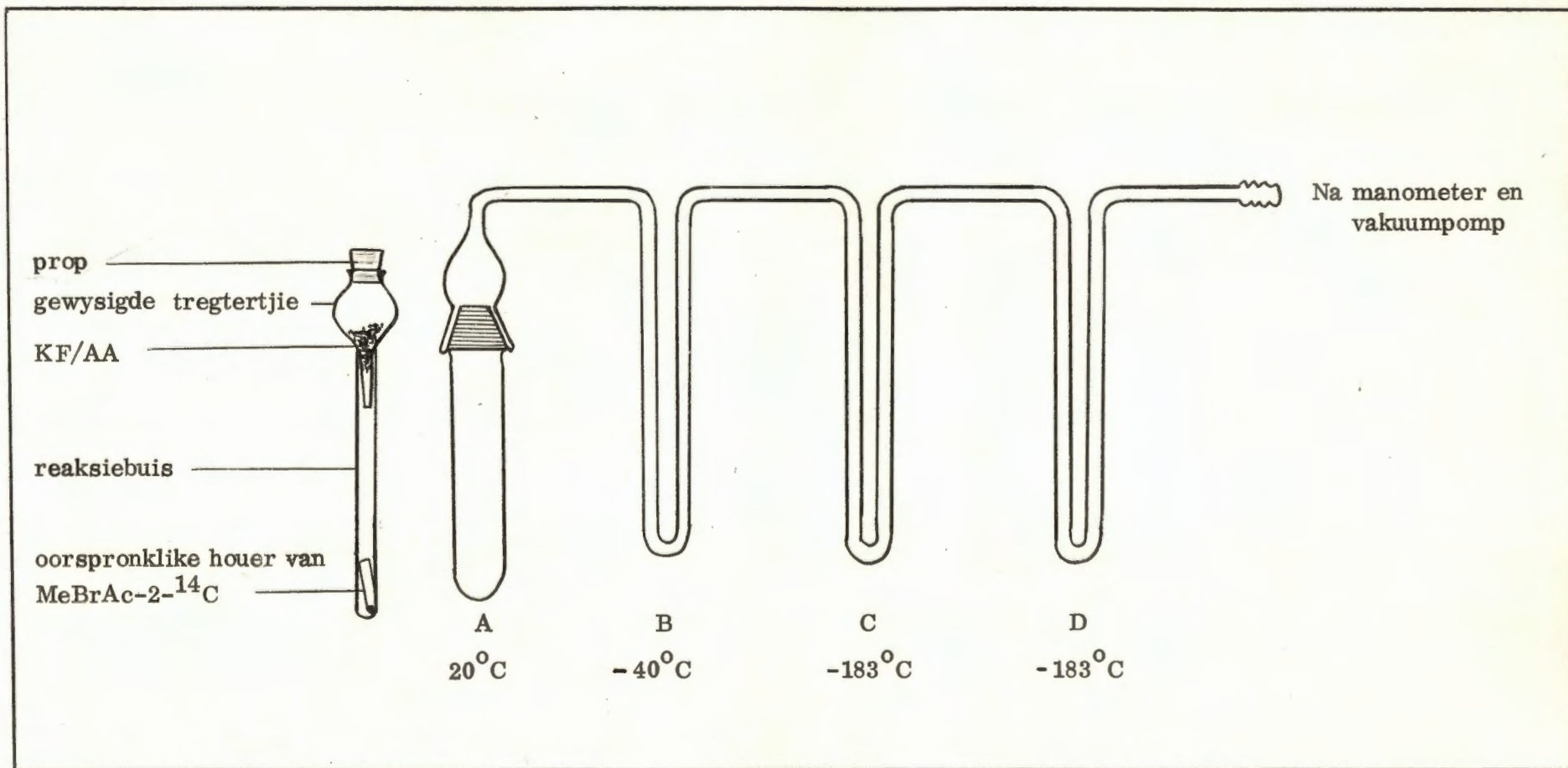


Figuur 15 Die invloed van die verhouding van KF + AA tot MeBrAc op die opbrengs van MeFAc by twee tydsdure van verhitting.

gehou is, waarna dit vir 30 minute by 100°C in 'n oond verhit is. Die reaksiebuis is in 'n groter, sterk proefbuis (A in figuur 16) wat van 'n geslypte prop voorsien is, geplaas en geskud totdat die uitgetrekte punt afgebreek het en die inhoud in proefbuis A uitgestort het. Nadat die onderpunt van proefbuis A in droë ys afgekoel is, is die proefbuis verbind aan die fraksioneerbuis soos in figuur 16 aangetoon.

Vir die skeiding van die $\text{MeFAC-2-}^{14}\text{C}$ van die ander reaksieprodukte is 'n mikrovakuumdistillasieprosedure wat basies dieselfde, alhoewel baie eenvoudiger, is as die wat Saunders & Worthy⁽⁹⁶⁾ gebruik het, aangewend. Terwyl proefbuis A nog steeds by -80°C gehou is, is die fraksioneerapparaat na 0.05 mm kwik geëvakueer. Die verskillende dele van die fraksioneerapparaat is nou afgekoel na die temperature aangedui in figuur 16 en hierna is proefbuis A toegelaat om oor 'n tydperk van 5 uur na 20°C te verwarm om 'n effektiewe fraksionering van die dampe tussen B en C te bewerkstellig. By 'n druk van 0.05 mm kwik kook asetamied by 21°C , MeBrAc by -25°C en MeFAC by ongeveer -45°C . Kaliumfluoried en kaliumbromied smelt onder atmosferiese druk eers by 880°C en 730°C respektiewelik en sal gevolglik in buis A agterbly.

Nadat die fraksionering voltooi is, is die horisontale gedeelte van die fraksioneerbuis tussen A en B, B en C, en C en D afgesmelt met 'n klein saamgepersde lug-butaan vlammetjie, terwyl die onderste gedeeltes van die buise in droë ys gehou is. 'n Klein druppeltjie $\text{MeFAC-2-}^{14}\text{C}$ kon onder in deel C van die fraksioneerbuis gesien word. Nadat deel C goed gedroog is aan die buitekant, is dit geweeg, afgekoel en m.b.v. 'n glasmes aan albei kante oopgemaak. Die $\text{MeFAC-2-}^{14}\text{C}$ is met 'n klein oormaat verdunde natriumhidroksied (bereken op 'n opbrengs van 64%) uitgewas, gevolg deur ongeveer 4 ml water. Die oplossing is in 'n vrieskas by -20°C bewaar. Deur die droë, leë gedeeltes van C te weeg, is bereken dat 58% van die $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ omgesit is na $\text{MeFAC-2-}^{14}\text{C}$.



Figuur 16 Die apparaat gebruik vir die sintese van MeFAc-2-¹⁴C en vir die fraksionering van die reaksieprodukte.

3. Die suiwerheid van die gesintetiseerde FAc-2-¹⁴C

Om die suiwerheid van die FAc-2-¹⁴C na te gaan is van dalende papierchromatografie gebruik gemaak. Beide 'n suur (EMW) en alkaliese (PAW) stelsel is aangewend. Dit het geblyk dat 'n groot deel van die radioaktiwiteit onder suur toestande vervlugtig, en gevolglik is net die alkaliese stelsel verder gebruik.

Die FAc-2-¹⁴C-preparaat is saam met verskillende standaard gechromatografeer en 'n outoradiogram is van die chromatogram gemaak. (Kyk plaat 16). Dit het geblyk dat FAc-2-¹⁴C in vier radioaktiewe komponente ($R_f = 0.57, 0.49, 0.35, 0.25$) geskei is en dat die komponent met die hoogste aktiwiteit dieselfde R_f as FAc gehad het.

Die vraag ontstaan nou of daar werklik vier verskillende verbindings in die preparaat aanwesig is, en of twee of meer van hierdie verbindings ewewigsvorms van dieselfde verbinding is. In hierdie verband is die volgende stelling van belang: „When chromatographing salts or organic compounds one may often find that they split into acids and bases which travel independently of each other”⁽¹⁹⁾. (Kyk ook verwysing⁽⁵¹⁾). Natriumfluorasetaat kan dus in 'n ammonia-bevattende oplosmiddel twee kolle nl. fluorasynsuur (of natriumfluorasetaat) en ammoniumfluorasetaat lewer.

Om hierdie moontlikheid te ondersoek, is 'n groot hoeveelheid FAc in die vorm van 'n streep op Whatman No. 3 papier gechromatografeer. 'n Vertikale strook is uitgeknipt en met anilien-glukose behandel. Daar is bevind dat hier ook twee verbindings voorkom wat 'n positiewe reaksie met die kleur-reagens gee. ($A R_f = 0.75, B R_f = 0.33$) Met die vertikale strook as gids is die papier wat A en B bevat uitgeknipt en met water geëluëer. Toe hierdie twee verbindings later in dieselfde stelsel (PAW) gechromatografeer is, is gevind dat A ook tot B oorsprong gee en dat B ook tot A oorsprong gee.

Dieselfde prosedure is met FAc-2-¹⁴C herhaal en daar is bevind dat komponent 1 (dieselfde R_f as A) en komponent 3 (dieselfde R_f as B) ook ewe-

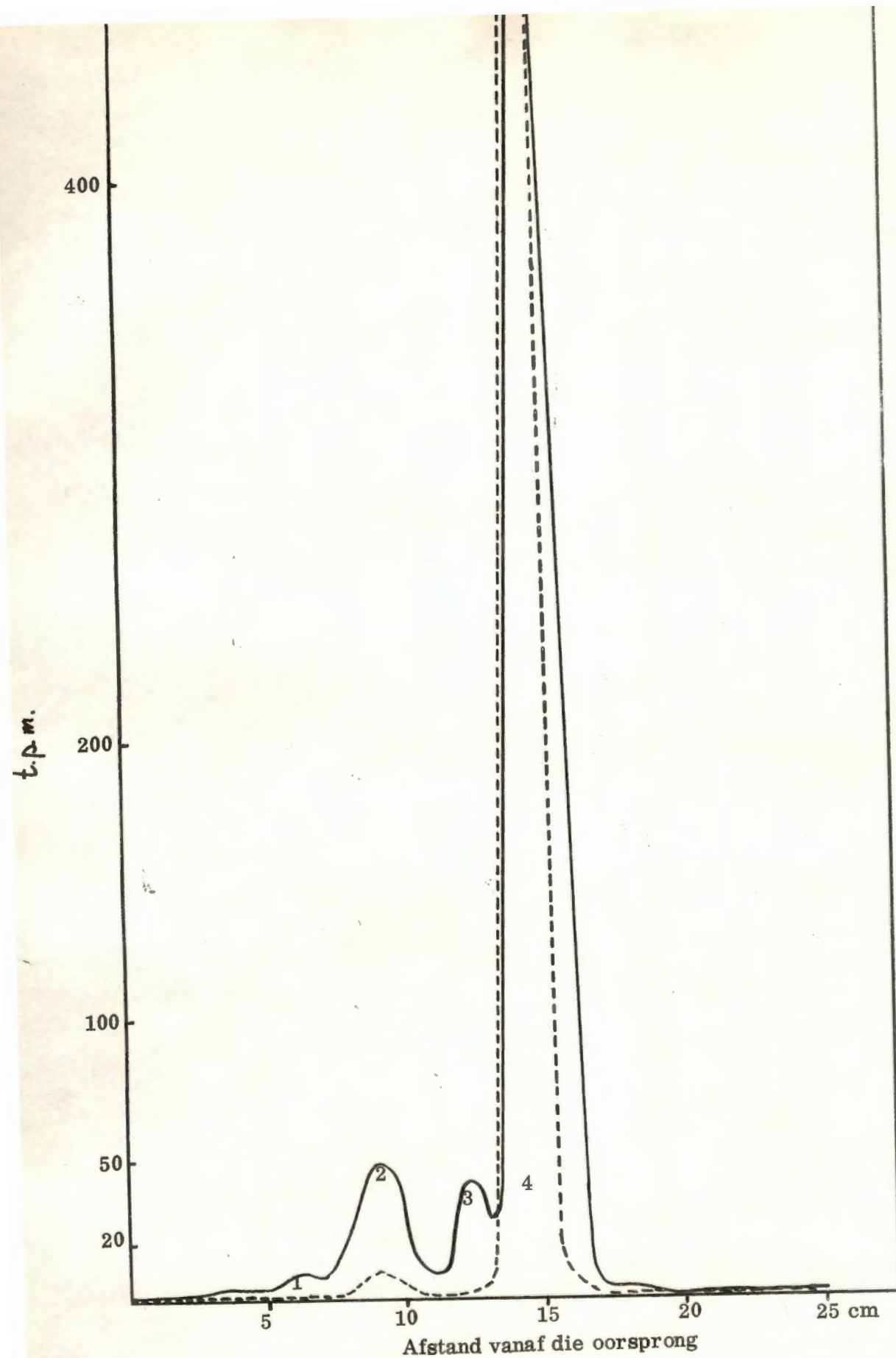
wigsvorms van mekaar is. Dit is ook bevind dat komponent 2 dieselfde R_f as glikolsuur het.

Om uit te vind wat die hydrae van die verskillende komponente tot die totale radioaktiwiteit is, is 2 mikroliter (± 0.6 mikrocurie) van die $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ -oplossing met PAW op Whatman No. 3 papier dalend gechromatografeer. M.b.v. 'n bladaluminiumskerm en 'n Geiger-Müller telbuis is die tyd benoedig vir 320 tellings vir elke cm vanaf die oorsprong tot by die front van die chromatogram bepaal soos in hoofstuk II uiteengesit. Hieruit kon die impulse per minuut teenoor die afstand vanaf die oorsprong gepunteer word soos in figuur 17 aangedui. Dit is duidelik dat die twee komponente van FAC (1 en 3) vir die grootste gedeelte van die aktiwiteit verantwoordelik is. Deur die oppervlaktes onder die kromme te bepaal blyk dit dat FAC 94% ($86.6 + 7.4\%$), Glikolsuur 4.4% en die onbekende verbinding 1.6% van die totale aktiwiteit uitmaak.

Indien in ag geneem word dat die uitgangsprодук 95% suiwer was, is die 94% suiwerheid van die FAC heeltemal bevredigend.

Omdat die glikolsuur- ^{14}C ook gemetaboliseer kan word, mag dit in sekere gevalle belangrik wees om $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ in 'n suiwer vorm te hê. Aangesien die $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ so 'n hoë spesifieke aktiwiteit het (4.74 mc/mM), kan 'n mikrofraksioneermetode gebruik word. Die eenvoudigste metode is m.b.v. preparatiewe papierchromatografie.

'n Groot hoeveelheid ($\pm 1 \text{ ml}$) $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ is in die vorm van 'n streep op deeglik-gewaste Whatman No. 3 papier geplaas en is dalend met PAW gechromatografeer. M.b.v. 'n radio-outogram wat van die chromatogram gemaak is, is die posisie van die verskillende komponente presies aangedui. Die deel van die chromatogram wat net NH_4FAC (komponent 1) bevat, is uitgeknipt en onder 'n klokglas geëlueer deur met water afwaarts te „chromatografeer“. Die eluaat is by 'n lae temperatuur na $\pm \frac{1}{2} \text{ ml}$ ingedamp en hierdie oplossing is as „ $\text{NH}_4\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ “ gebruik in verdere proewe. In figuur 17 word die verspreiding van die aktiwiteit in 'n PAW-chromatogram van



Figuur 17 Die radioaktiwiteit op verskillende afstande vanaf die oorsprong van 'n PAW chromatogram van $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ (—) en $\text{NH}_4\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ (----). (Kyk plaat 16).

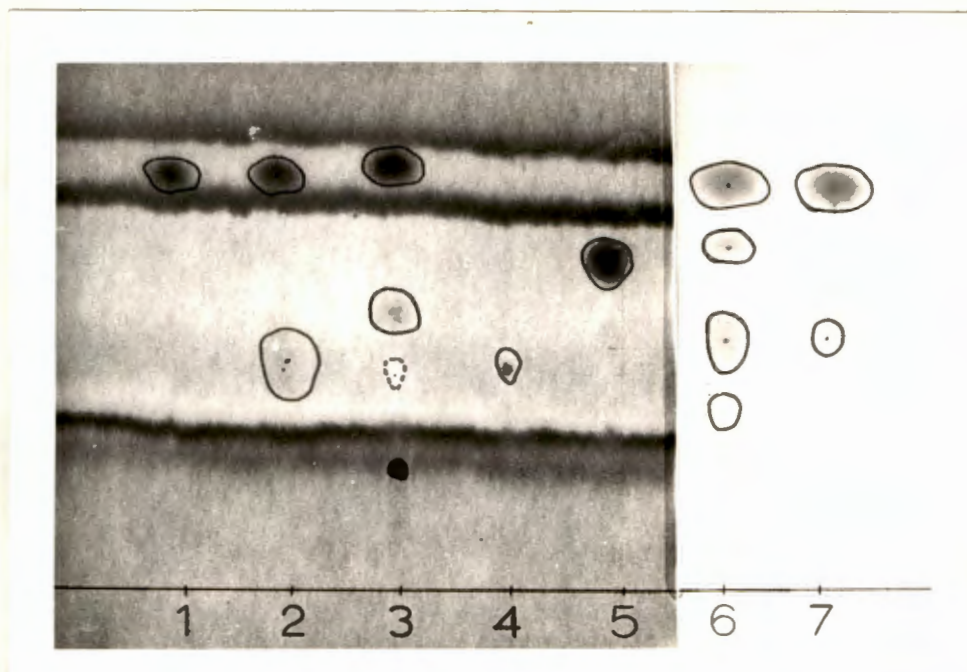
$\text{NH}_4\text{FAc}-2-^{14}\text{C}$ ook aangedui. Dit is duidelik dat die preparaat alreeds 'n klein hoeveelheid (2.4%) van die ewewigsvorm van $\text{NH}_4\text{FAc}-2-^{14}\text{C}$ bevat en dat geen radioaktiewe glikol-suur of „komponent 4” teenwoordig is nie. (Kyk ook plaat 16).

Nadat die metode uitgewerk is, is gevind dat Gal, Drewes & Taylor⁽³⁰⁾ ook 'n verbetering van die metode van Saunders & Worthy⁽⁹⁶⁾ wat gebaseer is op die metode van Bergmann & Blank⁽⁸⁾, uitgewerk het. Hulle het die makrometode van Bergmann & Blank direk op 'n semimikrometode toegepas, deur 3 millicurie $\text{EtClAc}-2-^{14}\text{C}$ met 1.4 gm EtClAc te meng, maar hulle kon slegs 'n opbrengs van 25% verkry. Behalwe vir die feit dat hulle produk 'n 18 keer laer spesifieke aktiwiteit as my produk gehad het, was daar 'n veel groter persentasie onsuiverhede aangetref wat heelwaarskynlik 'n gevolg van die meer-drastiese toestande is. Die outeurs vermeld ook die volgende: „Attempts to exchange the bromoester with KF under the conditions used for the chloroester were unsuccessful”. Dit is reeds genoem dat broom teoreties makliker as chloor deur fluoor verplaas word. Indien geskikte toestande dus toegepas word, is dit duidelik dat met MeBrAc as uitgangsprодук 'n hoër opbrengs verkry sal word as met MeClAc .

Nadat hierdie werk afgehandel is, het 'n artikel van Ward & Huskisson⁽¹¹¹⁾ verskyn waarin die metode van Gal, et al⁽³⁰⁾ krities ondersoek en verbeter is. Net soos hierbo is dit ook deur hulle bevind dat radioaktiewe suksinaat nie 'n onsuiverheid in die reaksieproduk uitmaak soos deur Gal, et al⁽³⁰⁾ gerapporteer is nie. (Die verbinding wat deur Gal, et al⁽³⁰⁾ as suksiensuur beskou is, is moontlik die ewewigsverbinding van FAc). Die metode van Ward & Huskisson⁽¹¹¹⁾ het 'n effens hoër (68% teen 65%) opbrengs as die hierbo-uitgewerkte metode gehad, maar dit vereis duur en gespesialiseerde apparaat, soos bv. 'n preparatiewe gaschromatograaf.

C. Die fluoorasetaat -2- ^{14}C -metabolisme van Gifblaar

Soos reeds aangedui is, het Louw⁽⁵⁸⁾ bevind dat die anorganiese



Plaat 16 PAW-chromatogram van organiese sure. 1-5 met anilien-glukosê behandel, 6+7 radio-outogram. (1 = NH_4FAc , 2 = FAc , 3 = BrAc , 4 = suksiensuur, 5 = glikolsuur, 6 = $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$, 7 = $\text{NH}_4\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$).

fluorinhoud van Gifblaar blare verhoog indien die blare van FAc voorsien word. Dit wil dus voorkom asof Gifblaar anorganiese fluoried kan vrystel uit FAc. Indien dit gebeur, kan die res van die molekule verder „normale” metabolisme ondergaan. Deur FAc-2-¹⁴C toe te dien kan nagegaan word of bogenoemde wel gebeur en kan dit definitief bewys word of Gifblaar FAc metaboliseer of nie.

'n Groot aantal voorlopige proewe is uitgevoer om vas te stel wat die wyse van toediening en tydsduur van blootstelling se invloed op die verspreiding van die radioaktiwiteit in die verskillende metaboliëte is.

Ten eerste is jong en ou blare gepluk en in die een geval is die radioaktiewe FAc op die blare gestryk, terwyl die blare toegelaat is om in die tweede geval die FAc-2-¹⁴C via die blaarsteeltjie op te neem. Die blaartjies is verwerk soos in hoofstuk II beskryf. Daar was radioaktiewe verbindings teenwoordig in al die verskillende fraksies. D.m.v. chromatografie en radio-outografie is vasgestel dat die radioaktiwiteit in 'n aantal onbekende organiese sure, in een onbekende koolhidraat en in twee onbekende aminosure geleë was. Dit het hieruit alreeds voorgekom asof FAc-2-¹⁴C wel gemetaboliseer word.

Omdat dit onprakties is om elke blaartjie dop te hou totdat al die aktiwiteit deur die blaarsteeltjie opgeneem is, sonder dat dit droog word, is die onderpunt van 'n takkie met 4 blare, wat onder water afgeknip is, in 'n groot hoeveelheid FAc-2-¹⁴C geplaas en die blare aan die bopunt is na verskillende tye afgeknip. Hierdie blare is ook geanaliseer soos die ander, maar dit is gevind dat daar baie min aktiwiteit in die verskillende fraksies teenwoordig is. Die FAc is dus blykbaar nie doeltreffend vervoer na die blare toe nie.

Die grootste beswaar teen bogenoemde metodiek is dat die metabolisme van die afgeknippte blaar moontlik verskil van dié van die blaar wat nog aan die plant geheg is. Dit is bv. gevind dat die aminosuursamestelling van bogenoemde blare verskil van dié van varsgeplukte blare.

Vervolgens is besluit om FAc-2-¹⁴C eerder aan lewende plante in die veld toe te dien en 6 mikrocurie is oor die oppervlakte van 'n volwasse blaar gestryk. Die blare is na verloop van die volgende tye afgeknip, in MCW by -80°C geplaas en later verwerk soos reeds beskryf: 0 m, 1 m, 2½ m, 6 m, 10 m, 15 m, 23 m, 30 m, 45 m, 90 m, 3 uur, 6 uur, 10 uur, 15 uur, 25 uur, 41 uur. Die organiese sure is in PAW en EMW gechromatografeer en autoradiogramme is hierna gemaak. Daar was 5-6 radioaktiewe verbindings teenwoordig in al die behandelings, maar nie een van die verbindings wat met anilien-glukose reageer het, was radioaktief nie. Die radioaktiwiteit op die FAc posisie het algaande verminder totdat daar na 10 uur slegs 'n baie klein aktiwiteit bespeur is. Dit wil dus voorkom asof die FAc weggemetaboliseer is, of uit die blaar vervoer is. Onder die aminosure was daar twee wat na 45 minute blootstelling gemerk was. Nie een van hierdie twee was in 'n groot genoeg hoeveelheid teenwoordig om met ninhidrien 'n kleur te gee nie. Hulle het net onderkant aspartiensuur en glutamiensuur op 'n fenol-chromatogram verskyn. Na 'n blootstelling van 10 minute was daar 'n koolhidraat (X) wat positief met anilien-glukose reageer het, gemerk.

Hieruit wil dit voorkom asof FAc wel gemetaboliseer word en wel via twee onbekende aminosure en 'n onbekende koolhidraat.

Omdat daar in die vorige eksperiment ook met die kontrolebehandeling so 'n groot aantal radioaktiewe verbindings uit FAc-2-¹⁴C in die organiese suurfraksie gevorm is, is besluit om ook met NH₄FAc-2-¹⁴C proewe uit te voer. 'n Aantal voereksperimente is met NH₄FAc-2-¹⁴C uitgevoer en dit het geblyk dat daar nou minder radioaktiewe organiese sure aanwesig was en dat dieselfde koolhidraat as voorheen gemerk was. By die aminosuurfraksie was glisien sterk radioaktief. Aangesien glisien-¹⁴C ook by die kortste behandeling (1 minuut) ontstaan het, het die vermoede ontstaan dat NH₄FAc-2-¹⁴C chemies omgesit word na glisien-¹⁴C tydens die prosedure.

D.w.s.

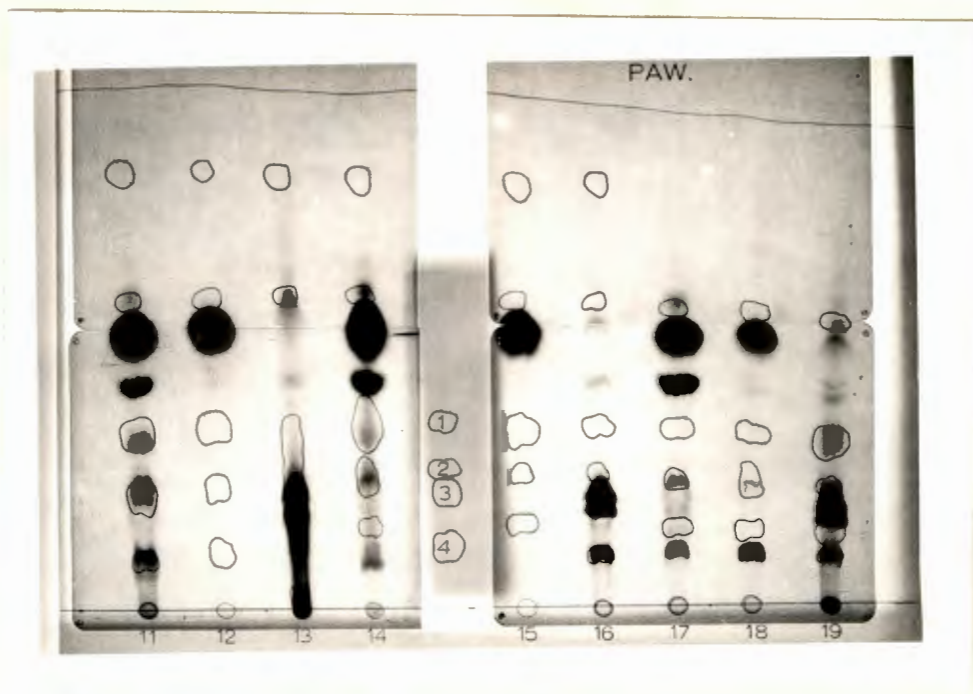


Toe proewe met doodgestoomde blare uitgevoer is, is dit inderdaad bevind dat gemerkte glisien ontstaan het in die geval waar $\text{NH}_4\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ op die blaar gesmeer is. Die selbestanddele van Gifblaar bevat dus moontlik een of ander verbinding wat die omsetting van NH_4FAc na glisien kataliseer of anders is dit een of ander stap van die prosedure, moontlik die adsorpsie aan die Dowex 50 hars, wat die omsetting bewerkstellig.

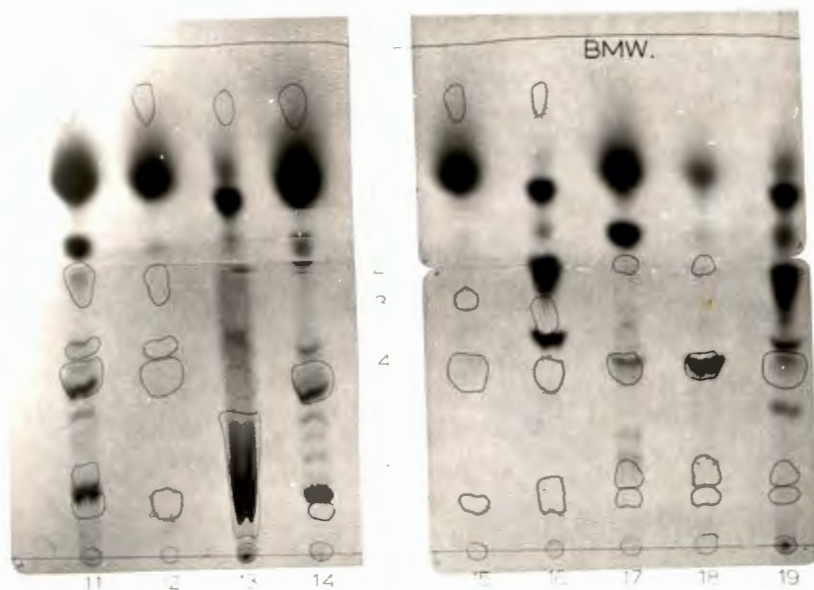
In 'n laaste proef, die resultate waarvan volledig weergegee word, is die invloed van $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ (FA), $\text{NH}_4\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ (AFA) en $\text{NaAc-2-}^{14}\text{C}$ (NaA) op jong (J) en ou (O) blare van Gifblaar en op volwasse blare van Grysappel (P) bepaal. Ongeveer 5 mikrocurie van een van die drie radioaktiewe verbindings is op die betrokke blaar gesmeer soos reeds aangedui. Die blare is na 5 uur afgeknip en verwerk soos reeds aangedui. Die aktiwiteit in die onderskeie fraksies is ook bepaal soos in hoofstuk II aangedui en die resultate word in tabel 13 weergegee. Chromatogramme en radio-outogramme is van die organiese sure (PAW en BMW), die koolhidrate (BAW) en die aminosure (waterversadigde fenol) gemaak. Die resultate word in tabel 14 en plate 17, 18, 19 en 20 weergegee.

	Lipiede	Koolhidrate	Aminosure	Org. sure
11 FA-O	0.08	8.20	25.00	270.98
12 AFA-O	0.00	3.63	13.78	142.20
13 NaA-O	4.61	26.65	98.63	119.45
14 FA-J	3.15	2.90	10.35	235.15
15 AFA-J	2.30	2.23	5.43	141.08
16 NaA-J	70.85	40.03	43.55	74.15
17 FA-P	2.80	1.58	1.75	245.23
18 AFA-P	3.70	0.85	12.48	54.90
19 NaA-P	184.03	23.38	94.20	67.15

Tabel 13 Die aktiwiteit (in t.p.m. x 1/1000) van verskillende fraksies van ou (O) en jong (J) blare van Gifblaar en volwasse blare van Grysappel (P) nadat $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ (FA), $\text{NH}_4\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ (AFA) en $\text{NaAc-2-}^{14}\text{C}$ (NaA) toegedien is.



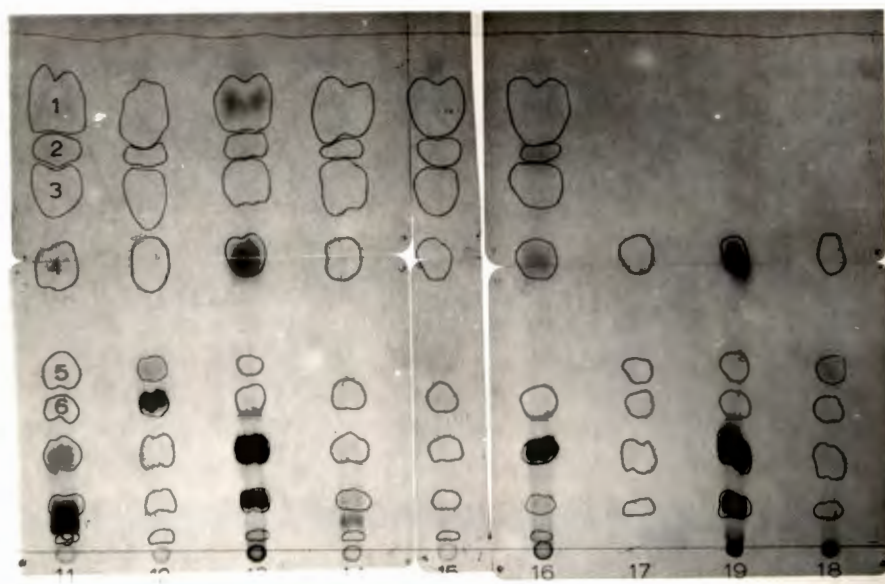
Plaat 17 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike PAW-chromatogramme geplaas) van die organiese sure na toediening van radio-aktiewe verbindings. (11, 12, 13 = jong en 14, 15, 16 = ou Gifblaarblare, 17, 18, 19 = Grysappel) (11, 14, 17 = FAc-2- 14 C, 12, 15, 18 = NH_4FAc -2- 14 C en 13, 16, 19 = NaAc-2- 14 C toegedien) (1 = askorbiensuur, 2 = appelsuur, 3 = suksiensuur, 4 = sitroensuur).



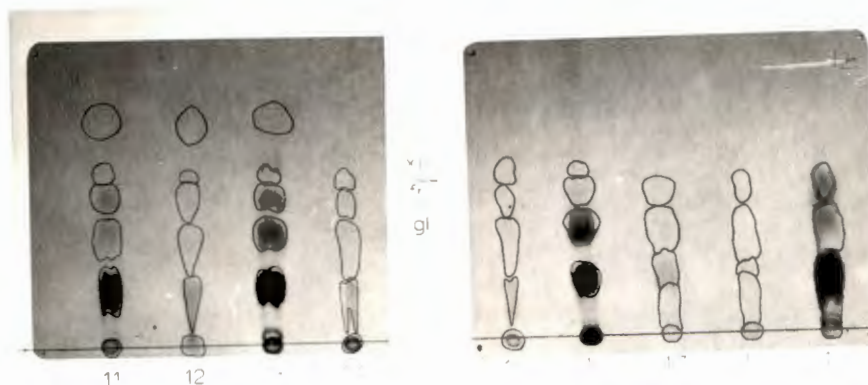
Plaat 18 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike BMW-chromatogramme geplaas) van die organiese sure na toediening van radio-aktiewe verbindings. (1 = suksiensuur, 2 = appelsuur, 3 = sitroensuur, 4 = askorbiensuur) (Kyk na plaat 17 vir verdere gegewens).

	11 FA-O	12 A FA-O	13 NaA-O	14 FA-J	15 A FA-J	16 NaA-J	17 FA-P	18 A FA-P	19 NaA-P
Appelsuur	+	-	-	-	-	+++	-	-	+++
Askorbiensuur	++	-	+	++	-	-	-	-	-
FAc	++++	+++	-	++++	+++	-	++++	+++	-
Glikolsuur	++	+	+	++	-	+	+++	+	++
Sitroensuur	-	-	-	-	-	++	-	-	++
Suksiensuur	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++
Ander org. sure	+++ (3)	-	+++ (3)	++++ (5)	-	-	+++ (3)	+++ (2)	++ (1)
Xilose	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Fruktose	+	-	++	-	-	+	-	-	++
Glukose	+	-	++	-	-	++	-	-	++
X	+++	++	++++	++	++	+++	+	+	+++
NMA	+	-	++	-	-	+	-	-	-
γ -am. bottersuur	-	-	+	-	-	++	-	-	-
Alanien	-	-	+++	-	-	++	-	-	++
Glisien	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Serien	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Glutamiensuur	+	-	++++	+	-	++	-	-	++++
Aspartiensuur	-	-	+++	-	-	-	-	-	++
Ander amino- sure	+++ (1)	-	+	++ (1)	+	+	-	-	+++ (4)

Tabel 14 Die relatiewe radioaktiwiteit van verskillende metaboliete van Gifblaar en Grysappel nadat radioaktiewe verbindings toegedien is. (FA = FAc-2-¹⁴C, A FA = NH₄ FAc-2-¹⁴C, NaA = NaAc-2-¹⁴C, O = Ou blare van Gifblaar, J = Jong blare van Gifblaar, P = Volwasse blare van Grysappel (Parinari-
rium capense)).



Plaat 19 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike chroma= togramme geplaas) van die aminosure van Gifblaar en Grysappel nadat radio= aktiewe verbindings toegedien is. (1 = NMA, 2 = gamma-aminobottersuur, 3 = NMS, 4 = alanien, 5 = glisien, 6 = serien, 7 = glutamiensuur, 8 = aspartiensuur, 9 = sisteiensuur) (Kyk na plaat 17 vir verdere gegewens).



Plaat 20 Radio-outogramme (oor lyndiagramme van die oorspronklike chromato= gram geplaas) van die koolhidrate van Gifblaar en Grysappel nadat radioak= tieve verbindings toegedien is. (xil. = xilose, fr. = fruktose, gl. = glukose) (Kyk na plaat 17 vir verdere gegewens).

Dit is duidelik dat ou blare van Gifblaar $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ meer aktief gemetaboliseer het as jong blare. Die belangrikste organiese suur wat in albei gevalle gemerk was, was askorbiensuur. Dit moet in gedagte gehou word dat glikolsuur 'n onsuierheid in die preparaat van $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ is. Die koolhidraat X en glutamiensuur was ook in albei gevalle gemerk. Die feit dat ou blare FAC beter gemetaboliseer as jong blare ondersteun die teorie dat ou blare minder FAC as jong blare bevat omdat die FAC weggemetaboliseer word. Dit is interessant dat NMA ook in dié geval van ou blare gemerk was.

Die blare van Grysappel is ook in staat om $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ tot 'n geringe mate te gemetaboliseer. Een van die onbekende organiese sure is heel waarskynlik fluoorsitroensuur. Die feit dat die aktiwiteit hier soveel minder was as wat die geval met Gifblaar was, skakel die moontlikheid dat slegs 'n nie-ensiematiese proses hierby betrokke was, uit.

Daar is baie minder radioaktiewe verbindings uit $\text{NH}_4\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ gevorm. Die koolhidraat X was weer eens een van die belangrikste gemerkte verbindings. Die feit dat soveel minder radioaktiewe verbindings uit $\text{NH}_4\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ gevorm is, mag moontlik aan 'n swakker opname en/of swakker vervoer van NH_4FAC na die aktiewe posisies in die sitoplasma toegeskryf word. 'n Ander moontlikheid is dat die groter aantal radioaktiewe verbindings in die geval waar $\text{FAC-2-}^{14}\text{C}$ toegedien is, aan radioaktiewe onsuierhede wat verder gemetaboliseer is, toegeskryf moet word, maar dit lyk baie onwaarskynlik indien die hoeveelheid radioaktiwiteit wat in die vorm van onsuierhede toegedien is, in ag geneem word. Indien dit die onsuierhede is wat oorsprong gee aan die ander gemerkte verbindings sou 'n mens kon verwag om dieselfde gemerkte verbindings ook in die geval van Grysappel aan te tref.

Wat die metabolisme van $\text{NaAc-2-}^{14}\text{C}$ betref, stem die merkpatroon wat by jong blare van Gifblaar en by Grysappel aangetref is, goed ooreen, en albei pas baie goed in by die idee dat die Kriebssiklus 'n belangrike rol in die metabolisme speel. Net soos met piruvaat- ^{14}C aangetref is, het die merkpatroon aangedui dat die Kriebssiklus nie so 'n groot aandeel in die metabo-

lisme van ou blare as van jong blare van Gifblaar het nie. Ook hier is bevind dat NMA in die geval van ou blare gemerk was. Verder was die onbekende koolhidraat (X) in elke geval waar NaAc-2-¹⁴C toegedien is, radioaktief.

Pogings is aangewend om die identiteit van X vas te stel. Ekstrakte van Gifblaar-koolhidrate is met BAW gechromatografeer en hierna met die difenielamien-anilien-fosforsuur-reagens⁽⁵²⁾ gespuut. Beide die kleur (donkerbruin) en die R_f het aangedui dat die verbinding glukuroonsuur is. Toe ander oplosstelsels en kleurreagense op standaard glukuroonsuur toegepas is, het dit duidelik geword dat X definitief nie glukuroonsuur is nie.

Met orsinol-trichloorasynsuur het X dieselfde kleur as die ketoheksoses gegee. A.g.v. die posisie op die chromatogram kon afgelei word dat X nie een van die algemene ketoheksoses is nie. Die moontlikheid het bestaan dat X 'n disakkaried mag wees, maar nie een van sellobiose, laktose, maltose of sukrose het dieselfde kleur as X met verskillende kleurreagense gegee nie. M.b.v. preparatiewe papierchromatografie is 'n klein hoeveelheid van X in 'n suiwer vorm verkry. Die verbinding is hierna volgens die metode van MacRae & Castro⁽⁶²⁾ gehidroliseer. Toe die hidrolisaat gechromatografeer is, is slegs glukose gevind. Tyd het ongelukkig nie toegelaat dat verdere aandag aan hierdie saak bestee word nie. Laastens is egter nagegaan of X fluoor bevat of nie volgens die metode in hoofstuk II beskryf. Dit het geblyk dat X geen fluoor bevat het nie, soos ook verwag is, aangesien X blykbaar ook in Grysappel voorkom. (Kyk plaat 20).

D. Bespreking

In hierdie afdeling is dit bewys dat Gifblaar oor 'n aktiewe Kriebssiklus beskik en dat die Kriebssiklus 'n groter rol in die metabolisme van jong as van ou blare speel. Daar is ook tentatiewe aanduidings verkry dat die blare van Gifblaar in staat is om FAc uit piruvaat en sitroensuur te sintetiseer.

'n Metode is uitgewerk vir die mikroskaal-sintese van FAc-2-¹⁴C wat

'n verbetering op die reeds beskrewe metodes^{is.} Die metode berus op die omsetting van $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ na $\text{MeFAc-2-}^{14}\text{C}$ deur KF wat in asetamied opgelos is. Dit is bevind dat onder optimale toestande (verhitting van 'n 1:1.4 (g:g) mengsel van MeBrAc tot $\text{KF} + \text{AA}$ vir 30 minute by 100°C) 'n 65% opbrengs van MeFAc teweeggebring is. Toe die suiwerheid van die gesintetiseerde $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ bepaal is, is bevind dat FAc twee komponente op 'n PAW -chromatogram lewer. Die preparaat het op grond van radioaktiwiteit uit 94% $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$, 4.4% $\text{glikolsuur-2-}^{14}\text{C}$ en 1.6% van 'n onbekende verbinding bestaan. (Die uitgangstof vir die sintese, nl. $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$, was radiochemies 95% suiwer).

Toe $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ aan Gifblaarblare toegedien is, is bevind dat 'n onbekende koolhidraat na 10 minute gemerk was, en dat twee onbekende aminosure na 45 minute radioaktief was. Die aminosure was in so 'n lae konsentrasie teenwoordig dat hulle nie positief met ninhidrien op die chromatogram reageer het nie.

Daar is bevind dat NH_4FAc deur 'n nie-ensiematiese proses tydens die bewerking omgeskakel is na glisien.

Voorts is bevind dat ou blare FAc meer aktief metaboliseer as jong blare. Dit pas in by die teorie dat die laer konsentrasie FAc in ou blare aan die wegmetabolisering daarvan toegeskryf kan word.

Grysappel was ook in staat om FAc in 'n geringe mate te metaboliseer. Dit mag wees dat Grysappel FAc op 'n identiese wyse as Gifblaar metaboliseer met die uitsondering dat Gifblaar in staat is om die omsetting na FSS te verhoed. Die groot verskil tussen Gifblaar en Grysappel is dus daarin geleë dat FAc nie deur Gifblaar na FSS omgeskakel word nie, terwyl FAc , a.g.v. FSS -vorming, die metabolisme van Grysappel sterk inhibeer.

Uit die resultate is dit duidelik dat die hoofroete van metabolisme, veral in ou blare, nie na enige lipiede is nie. Grysappel het 'n hoër konsentrasie gemerkte lipiede uit $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ as die ou blare van Gifblaar gevorm.

Die feit dat die onbekende koolhidraat wat na 10 minute alreeds gemerk was, geen fluoor bevat nie, dui daarop dat fluoor op een of ander wyse

uit FAc vrygestel is. Dit is al aangedui dat fluoorpiruvaat (FP) fluoor vry=
 stel indien dit met sulfhidrielgroepe reageer⁽²⁾, maar dit is baie onwaarskyn=
 lik dat FAc-metabolisme in Gifblaar langs hierdie weg plaasvind omdat FP
 respirasie rem terwyl FAc respirasie stimuleer, en tweedens omdat die
 merkpatroon na toediening van FAc-2-¹⁴C nie hierdie teorie bevestig nie.
 Indien FAc na FAc-KoA omgesit word, mag lg. verbinding met CO₂ reageer
 om malonielkoënsiem A te vorm waarvan die C-F-binding baie verswak sal
 wees. 'n Ander moontlikheid is dat fluoorasetoasetaat kan vorm en dat hier=
 die verbinding 'n onstabiele F-binding mag bevat.

SAMEVATTING

Uit die resultate van die respirasieproewe is dit duidelik dat Gifblaar wel in staat is om FAc te metaboliseer. Dit verklaar, ten minste gedeeltelik, waarom ou blare soveel minder FAc as jong blare bevat. Hierdie resultate is bevestig deur proewe wat met FAc-2-¹⁴C uitgevoer is. Daar is naamlik bevind dat ou blare radioaktiewe FAc beter metaboliseer as jong blare. Dit is dus duidelik dat die vermindering van die FAc-konsentrasie namate die blaar ouer word in 'n groot mate toegeskryf kan word aan die wegmetabolisering van FAc. In die gevalle waar FAc aan kontroleplante toegedien is, is gevind dat 'n verhoging van die FAc-konsentrasie altyd tot 'n onderdrukking van respirasie gelei het.

Voorts is bevind dat die opname van FAc 'n beperkende faktor betreffende die invloed van FAc op die respirasie van Gifblaar is. MeFAc het tot 'n hoër stimulering van die respirasie gelei omdat dit makliker opgeneem word. Hoë konsentrasies van beide MeFAc as MeAc het egter tot 'n verlaging van die respirasietempo van Gifblaar gelei. Die verklaring hiervoor het heel waarskynlik te doen met die in vivo vrystelling van metanol.

Dit is interessant dat die stimulerende invloed van FAc op die respirasie van Gifblaar met tyd afneem. Dit mag moontlik toegeskryf word aan die effek van 'n verlaging van die suurstofspanning in die Warburgflessie.

Toe respirasieproewe met fluoorsitroensuur (FSS) onderneem is, is bevind dat FSS die respirasie van Gifblaar sterk onderdruk. Dit beteken dus dat Gifblaar nie FAc na FSS omskakel nie, en dit dui ook daarop dat Gifblaar oor 'n aktiewe Kriebssiklus beskik, veral omdat latere proewe 'n ophoping van sitroensuur aangedui het. Aangesien die omsetting van FAc na FSS 'n twee stap-proses is, d.w.s. eerstens aktivering van die FAc (vorming van FAc-KoA) en tweedens 'n kondensering van die geaktiveerde FAc met oksaalase taat om FSS te vorm, is dit van belang om te weet of Gifblaar moontlik een van hierdie omsettings kan bewerkstellig.

Aangesien FAc-KoA nie kommersieel verkrygbaar is nie, is respirasieproewe met fluoorpiruvaat (FP) aangewend met die doel om FAc-KoA in vivo vanuit FP te laat vorm, en dan vas te stel of die respirasie gerem word. Remming van die respirasie sal aandui dat FAc-KoA na FSS omgeskakel word. Daar is bevind dat die respirasie van beide Gifblaar en Grysappel (kontrole=plant) gerem word, maar in hierdie geval is geen sitroensuurophoping gevind nie. Dit wil dus voorkom asof FSS nie uit FP deur Gifblaar of Grysappel gesintetiseer word nie. Hieruit is gepostuleer dat FP die piruvaatoksidasestelsel in plante inhibeer.

Dit mag wees dat Gifblaar glad nie oor die nodige ensiemstelsels beskik om asetaat te aktiveer nie. Proewe met NaAc-2-¹⁴C het egter die teendeel bewys. Die kom dus daarop neer dat Gifblaar van ander plante verskil daarin dat dit kan onderskei tussen asetaat en FAc. Die plant beskik dus oor 'n meganisme om die vorming van FSS uit FAc te verhoed.

Die vrye aminosuorkonsentrasie van Gifblaarweefsels is besonder hoog in vergelyking met die van ander plante. Van die vrye aminosure is daar twee wat in 'n baie hoë konsentrasie voorkom en wat, volgens die posisie op 'n chromatogram, nie algemeen bekende aminosure is nie. Die twee aminosure is geïsoleer en m.b.v. elementêre analise, massaspektrometrie, kernmagnetiese resonansspektrometrie en infrarooispektroskopie is vasgestel dat die twee aminosure N-metiel-L-alanien (NMA) en N-metiel-L-serien (NMS) is. Hierdie aminosure is sover bekend nog nooit voorheen in plante aangetref nie.

Die konsentrasie van hierdie twee aminosure is in blare van verskillende ouderdom, risoompunte, perikarp, saad en bloeisels van Gifblaar bepaal. Dit het geblyk dat hoe jonger die blaar is, hoe hoër is die NMA en NMS konsentrasies. Toe die FAc-konsentrasie in dieselfde monsters bepaal is, is bevind dat, afgesien van die perikarp 'n hoë NMA- en NMS-konsentrasie met 'n hoë FAc-konsentrasie gepaard gaan. Dit mag beteken dat FAc die metabolisme so beïnvloed dat NMA en NMS gesintetiseer word, of anders mag

NMA en/of NMS tot die vorming van FAc lei. Toe 'n ander plant (Acacia georginae) wat ook FAc bevat, ondersoek is, is bevind dat geen NMA of NMS teenwoordig is nie. Die metabolisme van FAc is dus moontlik nie aan dié van hierdie twee aminosure gekoppel nie.

In die risoompunt van Gifblaar verteenwoordig die stikstof aanwesig in NMA 22% van die totale stikstofinhoud van die weefsel. Dit is dus moontlik dat NMA en NMS 'n rol speel by die berging en/of vervoer van stikstof in die plant. Nie een van die twee aminosure het in die proteïene van die blare, bloeisel, saad of perikarp van Gifblaar voorgekom nie. Hierdie aminosure was nie toksies vir muise nie en het ook nie onder die aminosure van Grysappel voorgekom nie.

Voorts is bewys dat hierdie twee aminosure nie bloot inerte eindprodukte van metabolisme is nie, aangesien hoë konsentrasies gemerkte NMA in ou blare uit 'n hele aantal gemerkte verbindings (alanien, glisien, serien, piruvaat, asetaat en ook FAc) vorm. Jong blare beskik skynbaar nie in so 'n groot mate oor die vermoë om NMA te sintetiseer nie. Net in enkele gevalle is geringe tekens van aktiwiteit in NMA by ekstrakte van jong blare wat van radioaktiewe verbindings voorsien is, aangetref. Alle beskikbare gegewens dui daarop dat NMA deur metilering uit alanien vorm. In een eksperiment is 'n aanduiding gevind dat NMS deur metilering uit serien vorm. Dit sal van belang wees om vas te stel watter verbinding die skenker van die metielgroep is.

Proewe wat met piruvaat-1-¹⁴C, piruvaat-2-¹⁴C, piruvaat-3-¹⁴C, sitroensuur-1,5-¹⁴C en natriumasetaat-2-¹⁴C uitgevoer is, het bewys dat Gifblaar oor 'n aktiewe Kresssiklus beskik. Dit het ook duidelik geword dat hoe jonger die blaar is, hoe groter is die rol wat die Kresssiklus in die metabolisme speel. Daar is aanduidings gekry dat die blare van Gifblaar onder sekere omstandighede in staat is om FAc uit piruvaat en sitroensuur te sintetiseer.

'n Metode is uitgewerk waardeur $\text{MeBrAc-2-}^{14}\text{C}$ met 'n opbrengs van 65% na $\text{MeFAc-2-}^{14}\text{C}$ omgesit kon word. Hierdie metode is 'n verbetering op reeds beskrewe metodes vir die mikroskaal-sintese van $\text{FAc-}^{14}\text{C}$. Die preparaat het uit 94% FAc, 4.4% glikolsuur en 1.6% van 'n onbekende verbinding bestaan.

Toe $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ aan Gifblaarblare toegedien is, is bevind dat 'n onbekende koolhidraat na 10 minute radioaktief was en dat twee onbekende aminosure na 45 minute gemerk was. Die aminosure was in so 'n lae konsentrasie aanwesig dat hulle nie positief met ninhidrien op die chromatogram reageer het nie.

Toe die onbekende koolhidraat ondersoek is, is bevind dat die verbinding geen fluoor bevat het nie. Aangesien hierdie verbinding al reeds 10 minute na dat $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ toegedien is, gemerk was, dui dit daarop dat een van die vroeë stappe van die metabolisme van FAc met die vrystelling van fluoried gepaard gaan. Dit is reeds voorheen aangedui dat FP fluoor vrystel indien dit met sulfhidriël-groepe reageer⁽²⁾, maar dit is baie onwaarskynlik dat FAc-metabolisme in Gifblaar langs hierdie weg plaasvind omdat FP respirasie rem, terwyl FAc respirasie in hierdie plantsoort stimuleer, en tweedens omdat die merkpatroon na toediening van $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ nie hierdie teorie bevestig nie. Indien FAc na FAc-KoA oorgeskakel word, mag laasgenoemde verbinding met CO_2 reageer om malonielkoënsien A te vorm waarvan die C-F-binding baie verswak sal wees. 'n Ander moontlikheid is dat fluoorasetoasetaat kan vorm en dat hierdie verbinding 'n onstabiele F-binding mag bevat. Daar is aanduidings gevind dat NH_4FAc nie-ensiematies na glisien verander kan word met die vrystelling van fluoried. Die feit dat geen gemerkte glisien aangetref is in die gevalle waar $\text{FAc-2-}^{14}\text{C}$ toegedien is nie, bewys dat FAc nie op hierdie wyse gemetaboliseer word nie, maar dit dui op nog 'n moontlikheid waarvolgens die C-F-binding gebreek kan word.

Aangesien D. toxicarium 'n hoë konsentrasie van twee fluoorbevattende vetsure het, is vermoed dat die metabolisme van FAc grotendeels via die

lipiede sal gaan. Daar is egter bevind dat slegs 'n geringe mate van aktiwiteit, veral by ou blare, in die lipiedfraksie aangetref word. Grysappel het selfs 'n hoër konsentrasie gemerkte lipiede as die ou blare van Gifblaar uit FAc-2-¹⁴C gevorm.

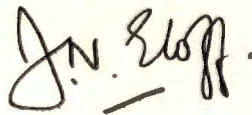
Grysappel was ook in staat om FAc in 'n geringe mate te metaboliseer. Dit mag wees dat Grysappel FAc op 'n identiese wyse as Gifblaar metaboliseer met die uitsondering dat Gifblaar in staat is om die omsetting na FSS te verhoed. Na aanleiding hiervan sou die groot verskil tussen Gifblaar en Grysappel dan daarin geleë wees dat FAc nie deur Gifblaar na FSS omskakel word nie, terwyl FAc, a.g.v. FSS-vorming, die metabolisme van Grysappel sterk rem.

DANKBETUIGINGS

Benewens my dank aan my promotor, prof. P.J. Botha, wil ek hiermee graag my hartlike dank ook teenoor prof. N. Grobbelaar en die personeel van die Margaretha Mes Instituut vir Plantfisiologie en Plantbiochemie uitspreek vir die ondersteuning wat ek tydens hierdie ondersoek van hulle ontvang het. 'n Besondere woord van dank kom mev. M.C. van Beijma, mnr. Lourens du Plessis en dr. Burkard von Sydow toe vir die vriendelike samewerking en hulpvaardigheid wat ek van hulle ontvang het.

As 'n teken van dankbaarheid word hierdie werk aan my vrou Christna, wat 'n blymoedige grasweduwee en voortdurende inspirasie vir my was, opgedra.

Laastens wil ek ook hier my diepe erkentlikheid teenoor die Skenker van alle goeie gawes bely, wat die geleenthede voorsien het om in sy lig die lig te soek.



Pretoria
Januarie 1968

ABSTRACT

It has been shown by means of respiration studies that Gifblaar is capable of metabolizing FAc. A method was worked out for the synthesis of FAc-2- ^{14}C from MeBrAc-2- ^{14}C with a yield of 65%. When FAc-2- ^{14}C was applied to Gifblaar leaves it was found that one of the first radioactive components was an unknown carbohydrate. Indications were found that Grysappel (Parinarium capense), a control plant, also metabolizes FAc-2- ^{14}C to a small extent.

The application of fluorocitrate (FC) was shown to inhibit the respiration of Gifblaar and lead to an accumulation of citrate. This indicates that FAc is not metabolized via FC and that Gifblaar contains an active Krebs cycle. The latter was confirmed in experiments with radioactive pyruvate, citrate, acetate, alanine, serine and glycine.

It was found that Gifblaar has a relatively high free amino acid concentration and that the two amino acids present in the highest concentration are not commonly encountered in other organisms. These two amino acids represented more than 30% of the total nitrogen present in the tip of the rhizome.

The two amino acids were isolated and with the aid of elementary analysis, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectrometry and infrared spectroscopy they were characterized as N-methyl-L-alanine (NMA) and N-methyl-L-serine (NMS) respectively. These amino acids have not yet been encountered in other plants, as far as is known.

It was found that a high NMA and NMS concentration usually went hand in hand with a high FAc concentration. Furthermore these amino acids were not poisonous to mice and it was established that they are formed in vivo by methylation of alanine and serine.

LITERATUURVERWYSINGS

1. ALDOUS, J.G. & ROZEE, K.R. 1956. The effect of pH on the toxicity of fluoroacetic acid. *Biochem. J.* 62, 605-610.
2. AVI-DOR, Y. & MAGER, J. 1956. The effect of fluoropyruvate on the respiration of animal-tissue preparations. *Biochem. J.* 63, 613-618.
3. BADENHUIZEN, N.P. & SLINGER, JUNE. 1954. Detection of monofluoroacetic acid in Gifblaar, Dichapetalum cymosum (Hook) Engl. *S. Afr. J. Sci.* 50, 269-270.
4. BALINSKY, J.B. & SCHNEIDERMAN, E.R. 1964. Histochemical studies of Dichapetalum cymosum. *S. Afr. J. Med. Sci.* 29, 96.
5. BARRON, E.S.G., LING, G.K.K., KLEIN, R.M. & MICHEL, B.E. 1950. The metabolism of potato slices. *Arch. Bioch.* 28, 377-398.
6. BARTLETT, G.R. & BARRON, E.S.G. 1947. The effect of fluoroacetate on enzymes and on tissue metabolism. Its use for the study of the oxidative pathway of pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 170, 67-82.
7. BEEVERS, H. 1960. Respiratory metabolism in plants. Row, Peterson & Co., N.Y.
8. BERGMANN, E.D. & BLANK, I. 1953. Studies on organic fluorine compounds. Part I. Some esters of monofluoroacetic acid and related compounds. *J. Chem. Soc.*, 3786-3788.
9. BEVENUE, A. & WILLIAMS, K.T. 1951. Further evidence indicating the specificity of the orcinol spray reagent for keto heptoses on paper chromatograms. *Arch. Biochem.* 34, 225-227.
10. BIELESKI, R.L. & TURNER, R.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17, 278-293.
11. BIEMANN, K. 1962. Mass spectrometric methods. in PAECH, K., TRACEY, M.V. & LINSKENS, H.F. *Modern methods of plant analysis*, V, 26-50. Springer-Verlag, Berlin.
12. BIEMANN, K. & VETTER, W. 1960. Quantitative amino acid analysis by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2, 93-96.

13. BLOCK, R.J. DURRUM, E.L., ZWEIG, G. 1958. A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press Inc., N.Y.
14. BOARDMAN, N.K. 1962. Ion-exchange chromatography in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. PAECH, K., TRACEY, M.V. & LINSKENS, H.F. Springer-Verlag, Göttingen V, 159-204.
15. BONNER, J. 1949. Relations of respiration and growth in the Avena coleoptile. *Amer. J. Bot.* 36, 429-436.
16. BONNER jr, W.D. & THIMANN, K.V. 1950. Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. III The action of some inhibitors concerned with pyruvate metabolism. *Amer. J. Bot.* 37, 66-75.
17. BOSSI, R., HÜTTER, R., KELLER-SCHIERLEIN, W., NEIPP, L. & ZÄHNER, H. 1958. Stoffwechselprodukte von Actinomy=ceten. 14. Actinomyzin Z. *Helv. Chim. Acta* 41, 1645-1652.
18. BRADY, R.O. 1955. Fluoroacetyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 217, 213-224.
19. BRENNER, M., NIEDERWIESER, A., PATAKI, G. & WEBER, R. 1965. in E. STAHL. Theoretical aspects of thin-layer chromatography. A laboratory handbook. Academic Press Inc., Publ., New York.
20. BUFFA, P., PETERS, R.A. & WAKELIN, R.W. 1951. Bioche=mistry of fluoroacetate poisoning. Isolation of an active tri=carboxylic acid fraction from poisoned kidney homogenates. *Biochem. J.* 48, 467-477.
21. BUSCH, H & POTTER, V.R. 1952. Multiple effects of fluoro=acetate on pyruvate metabolism in vitro. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 80, 701-704.
22. CONWAY, E.J. 1962. Microdiffusion analysis and volumetric error. 5th rev. ed. Lockwood, London.
23. DAVID, W.A.L. & GARDINER, B.O.C. 1953. The systematic insecticidal action of sodium fluoroacetate and of three phos=phorus compounds on the eggs and larvae of Pieris brassicae. *Ann. Appl. Bot.* 40, 403-417.
24. DAVIES, D.D., GIOVANELLI, J. & Ap REES, T. 1964. Plant Biochemistry. Blackwell Scientific Publ., Oxford. p.373.
25. ^{DE} OLIVIERA, Marilda M. 1963. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from Palicourea marcgravii. *Experien=tia* 19, 586-587.

26. E. MERCK AG. DARMSTADT. Chromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Papierchromatographie. (Vorsien deur Taeuber & Corssen, Johannesburg).
27. EIMHJELLEN, K.E. & LARSEN, H. 1955. The mechanism of itaconic acid formation by Aspergillus terreus. 2. The effect of substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 60, 139-147.
28. ELLIOTT, W.B. & KALNITSKY, G. 1950. A mechanism for fluoroacetate inhibition. *J. Biol. Chem.* 186, 487-493.
29. FOWDEN, L. 1965. Origins of the amino acids. in BONNER, J. & VARNER, J. E. *Plant Biochemistry*. Academic Press, N.Y. p. 384.
30. GAL, E.M., DREWES, P.A. & TAYLOR, N.F. 1961. Metabolism of fluoroacetic acid -2-C¹⁴ in the intact rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 1-14.
31. GIESE, A.C. 1957. *Cell physiology*. W.B. Saunders Company, London. p.208.
32. GILLIESON, A.H.C.P. & NEWCOMB, R.A. 1951. Harwell Report C/R 764, Ministry of Supply, (Great Britain) soos aan=gehaal deur PETERS, R.A. 1957. Mechanism of toxicity of Dichapetalum cymosum and related compounds. *Adv. Enzym.* 18, 113-159.
33. GOLDMAN, P. 1965. The enzymic cleavage of the carbon-fluorine bond in fluoroacetate. *J. Biol. Chem.* 240, 3434-3438.
34. GOLDMAN, P. & MILNE, G.W.A. 1966. Carbon-fluorine bond cleavage. II Studies on the mechanism of the defluorination of fluoroacetate. *J. Biol. Chem.* 241, 5557- 5559.
35. GRANVILLE, W.A., SMITH, P.F. & LONGLEY, W.R. 1934. *Elements of the differential and integral calculus*. Revised Edition. Ginn & Co., N.Y. p.247.
36. HACKETT, D.P. & THIMANN, K.V. 1953. The nature of the auxin-induced water uptake by potato tissue. II The relation between respiration and water absorption. *Amer. J. Bot.* 40, 183-188.
37. HARLEY, J.K. & SMITH, D.C. 1956. Sugar absorption and surface carbohydrate carbohydrase activity of Peltigera polidactyla. *Ann. Bot.* 20, 513-543.
38. HEITEFUSS, R. & FUCHS, W.H. 1962. Phosphatwechsel und Sauerstoffaufnahme in Weizenkeimpflanzen nach Infektion mit Puccinia graminis tritici. *Phytopath. Z.* 46, 174-198.

39. HIRS, C.H.W., MOORE, S. & STEIN, W.H. 1952. Isolation of amino acids by chromatography on ion exchange columns; use of volatile buffers. *J. Biol. Chem.* 195, 669-683.
40. HIRS, C.H.W., MOORE, S. & STEIN, W.H. 1954. The chromatography of amino acids on ion exchange resins. Use of volatile acids for elution. *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 6063-6065.
41. HODGE, H.C., SMITH, F.A. & CHEN, P.S. 1963. Biological effects of Organic fluorides. Fluoroacetate, in SIMONS, J.H. *Fluorine Chemistry Vol. III*, 1-26. Academic Press, New York.
42. HUDLICKY, M. 1961. *Chemistry of Organic Fluorine compounds*. Pergamon Press Ltd., London.
43. HUMPHRIES, E.C. 1956. Mineral components and ash analysis. in PAECH, K. & TRACEY, M.V. *Modern Methods of Plant Analysis*. Vol. I, 479. Springer Verlag, Berlin.
44. JAMES, W.O. 1957. Reaction paths in the respiration of the higher plants. *Adv. Enzymology* 18, 281-318.
45. JERMSTAD, A. & JENSEN, K.B. 1950. Paper chromatographic separation and identification of organic plant acids with special reference to the acids occurring in Aconitum septentrionale. *Pharmaceutica Acta. Helv.* 25, 209-229.
46. JOHNSON, C.A. & LEONARD, M.A. 1961. The semi micro determination of Fluorine in Organic Compounds. *Analyst* 86, 101-104.
47. KALMBACH, E.R. 1945. "Ten-eighty". A war-produced rodenticide. *Science* 102, 232-233.
48. KALNITSKY, G. 1948. Effect of barium chloride, magnesium chloride, and fluoroacetate on the formation and utilization of citrate. *Arch. Biochem.* 17, 403-411.
49. KALNITSKY, F. & BARRON, E.S.G. 1948. Inhibition by fluoroacetate and fluorobutyrate of fatty acid and glucose oxidation produced by kidney homogenates. *Arch. Biochem.* 19, 75-87.
50. KATES, J.R. & JONES, R.F. 1964. Fluoroacetate inhibition of amino acids during photosynthesis of Chlamydomonas reinhardi. *Science* 143, 145-146.
51. KELLER, R.A. & GIDDINGS, J.C. 1960. Multiple zones and spots in chromatography. *J. Chrom.* 3, 205-220.

52. KOCOUREK, J., TICHA, M., KOSTIR, J. 1966. The use of diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent in the detection and differentiation of monosaccharides and their derivatives on paper chromatograms. J. Chrom. 24, 117-124.
53. LAFFERTY, R.M. 1961. Soos aangehaal deur HIRSCH, P. 1963. CO₂-fixierung durch Knallgasbakterien. II Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsprodukte. Archiv für Mikrobiologie 46, 53-78.
54. LANGE, N.A. & FORKER, G.M. 1961. Handbook of Chemistry. 10^e uitgawe. McGraw-Hill Book Co. N.Y.
55. LEEMANN, A.C. 1936. Die uitroeiing van Gifblaar. Dept. Landbou en Bosbou. Pamflet No. 153.
56. LEEMANN, A.C. 1939. Contribution à l'étude de Dichapetalum cymosum (Hook) Engl. et à l'écologie du Transvaal. Bull. de la Soc. Botanique de Geneve 29, 1-63.
57. LIEBECQ, C. & PETERS, R.A. 1949. The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle. Biochim. et Biophys. Acta 3, 215-230.
58. LOUW, N. 1968. Voorlopige studies i.v.m. die fluoormetabolisme in Dichapetalum cymosum Engl. M.Sc.-thesis ingehandig te word Universiteit van Pretoria. Ook jaarverslae van die Margaretha Mes Instituut fir Plantfisiologie en Plantbiochemie, U.P.
59. McARDLE, B. 1955. A modified method for the microdetermination of citric acid. Biochem. J. 60, 647-649.
60. McCOMBIE, H. & SAUNDERS, B.C. 1946. Fluoroacetates and allied compounds. Nature 158, 382-385.
61. McEWAN, T. 1964. Isolation and identification of the toxic principle of Gastrolobium grandiflorum. Queensland J. Agric. Sci. 21, 1-14.
62. MACRAE, I.C. & CASTRO, T.F. 1966. Carbohydrates and amino acids in the root exudates of rice seedlings. Phyton 23, 95-100.
63. MARAIS, J.S.C. 1944. Monofluoroacetic acid the toxic principle of "Gifblaar", Dichapetalum cymosum (Hook) Engl. Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind. 20, 67-73.
64. MARCUS, A. & ELLIOTT, W.B. 1956. Enzymatic reactions of fluoroacetate and fluoroacetyl Coenzyme A. J. Biol. Chem. 218, 823-830.

65. MARTTUS, C. 1949. Über die Unterbrechung des Citronen-Cyklus durch Fluoressigsäure. Ann. 561, 227-232.
66. MASSEY, V. & ROGERS, W.P. 1951. Conditions affecting the action of fluoroacetate on the metabolism of nematode parasites and vetebrate animals. Australian J. Sci. Research B4, 561.
67. MEISTER, A. 1965. Biochemistry of the amino acids. Academic Press, N.Y.
68. MELAMED, M.D. 1958. Preliminary studies on the fluoride metabolism of Gifblaar. (Dichapetalum cymosum (Hook) Engl.) M.Sc.-thesis, Witwatersrand Universiteit.
69. MES, M.G. & DE VILLIERS, E. 1944. Die Gousiektebossie. 'n Studie van die Morfologie, Fisiologie en Uitroeing van Pachystigma pygmaeum (Schl.) Robyns. Dept. Landbou en Bosbou Pamflet 245. Landbounavorsingsreeks no. 4.
70. METZNER, H. 1960. Soos aangehaal deur HIRSCH, P. 1963. CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien II Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsprodukte. Archiv für Mikrobiologie 46, 53-78.
71. MIURA, K. & HORI, T. 1961. Studies on the metabolism of fluoroacetate in the liver of a rat. Part II. Isolation and identification of monofluoroacetone bodies. Agric. biol. Chem. Tokyo 254, 94-99.
72. MOGG, A.O.D. 1930. An aut-ecological note on the poisonous "Gifblaar" (Dichapetalum cymosum) (Hook) Engl. S. Afr. J. Sci. 27, 368-375.
73. MORRISON, J.F. & PETERS, R.A. 1954. Biochemistry of Fluoroacetate poisoning: the effect of fluorocitrate on purified aconitase. Biochem. J. 58, 473-479.
74. MOSS, M.B. 1928. The Genus Dichapetalum in East, South and Subtropical Africa. Kew Bulletin 115-130.
75. OELRICHS, P.B. & McEWAN, T. 1961. Isolation of the toxic principle in Acacia georginae. Nature Lond. 190, 808.
76. PAECH, K. & TRACEY, V. 1954. Modern methods of plant analysis. Springer-Verlag, Berlyn.
77. PARTRIDGE, S.M. 1949. Aniline hydrogen phthatalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature Lond. 164, 443.
78. PARTRIDGE, S.M. & BRIMLEY, R.C. 1949. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 2. The separation of organic acids and acidic amino-acids by the use of anion-exchange resins. Biochem. J. 44, 513-521.

79. PATTISON, F.L.M. 1953. Toxic fluorine compounds. *Nature Lond.* 172, 1139-1141.
80. PATTISON, F.L.M., PETERS, R.A. 1966. hoofstuk 8. Monofluoro Aliphatic Compounds (p.401) in Eichler, O., Farah, A., Herken, H. & Welch, A.D. *Handbuch der experimentelle Pharmakologie* Vol. XX/I, 387-458. Springer-Verlag.
81. PENOT, M. 1967. Effect of sodium fluoride pretreatment on ^{32}P absorption, respiration and phosphatase activity in Nicotiana tabacum leaf disks. *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D.* 264, 1169-1171.
82. PETERS, R.A. 1957. Mechanism of the toxicity of the active constituent of Dichapetalum cymosum and related compounds. *Adv. Enzym.* 18, 113-160.
83. PETERS, R.A., HALL, R.J. WARD, P.F.V., SHEPPARD, N. 1960. The chemical nature of the toxic compounds containing fluorine in the seeds of Dichapetalum toxicarium. *Biochem. J.* 77, 17-23.
84. PETERS, R.A., MURRAY, L.R. & SHORTHOUSE, M. 1965. Fluoride metabolism in Acacia georginae Gidyea. *Biochem. J.* 95, 724-730.
85. PETERS, R.A. & SHORTHOUSE, M. 1964. Fluoride metabolism in plants. *Nature Lond.* 202, 21-22.
86. PETERS, R.A. & SHORTHOUSE, M. 1967. Observations on the metabolism of fluoride in Acacia georginae and some other plants. *Nature Lond.* 216, 80-81.
87. PETERS, R.A., SHORTHOUSE, M. & WARD, P.F.V. 1965. Synthesis of C-F bond by Acacia georginae in vitro. *Life Sci.* 4, 749-752.
88. PETERS, R.A. WAKELIN, R.W. BUFFA, P. & THOMAS, L.C. 1953. Biochemistry of fluoroacetate poisoning. The isolation and some properties of the fluorotricarboxylic acid inhibitor of citrate metabolism. *Proc. Roy. Soc. London B*, 140, 497.
89. PETERS, R.A. WAKELIN, R.W., RIVETT, D.E.A. & THOMAS, L.C. 1953. Fluoroacetate poisoning : Comparison of synthetic fluorocitric acid with the enzymically synthesized fluorotricarboxylic acid. *Nature Lond.* 171, 1111-1112.
90. PHILLIPS, A.H. & LANGDON, R.G. 1955. Incorporation of monofluoroacetic acid into the nonsaponifiable lipids of rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 58, 247-249.

91. QUITT, P., HELLERBACH, J. & VOGLER, J. 1963. Die Synthese optisch aktiver N-Monomethyl-Aminosäuren. *Helv. Chim. Acta*, 46, 327.
92. REINACH, S.G. 1966. Distribution-free methods in experimental design. D.Sc. (Agric.)-proefskrif, U.P.
93. RIMINGTON, D.E.A. 1935. Chemical Investigations of the "Gifblaar" Dichapetalum Cymosum (Hook) Eng. I. Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind. 5, 81-95.
94. RIVETT, D.E.A. 1955. The synthesis of monofluorocitric acid. *J. Chem. Soc.* 3710-3711.
95. SAUNDERS, B.C. 1947. Toxic properties of ω -fluorocarboxylic acids and derivatives. *Nature Lond.* 160, 179-181.
96. SAUNDERS, B.C. & WORTHY, T.S. 1953. Toxic fluorine compounds containing the C-F link. Part IX. Preparation of carbon-labelled sodium fluoroacetate on a microscale. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1929-1934.
97. SIEGEL, S. 1956. *Nonparametric Statistics for the behavioral sciences*. McGraw Book Co., N.Y.
98. STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. 1960. *Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences*. McGraw Book Co., N.Y.
99. STENT, S.M. 1916. Giftblaar. *Agric. J. & Small Holder of South Africa*. March 1916.
100. STEWARD, F.C. 1958. Growth and organised development of cultured cells. III Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Amer. J. Bot.* 45, 709-713.
101. STEWARD, F.C., MAPES, M.O. & SMITH, J. 1958. Growth and organised development of cultured cells. I Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45, 693-703.
102. STEWARD, F.C., MAPES, M.O. & MEARS, K. 1958. Growth and organised development of cultured cells II Organisation in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45, 705-708.
103. STEWARD, F.C. ZACHARIUS, R.M. & POLLARD, J.K. 1955. Nitrogenous compounds in plants: recent knowledge derived from paper partition chromatography. in *Biochemistry of Nitrogen. Papers dedicated to A.I. Virtanen*. p.321-366. *Suomalainen tiedeakatemia, Helsinki*.

104. STEYN, D.G. 1928. Gifblaar poisoning. A summary of our present knowledge in respect of poisoning by Dichapetalum cymosum. Union of S.A. Dept. of Agric. 13-14th report of the Director of Vet. Educ. and Research. Part I, 187-194.
105. TRAUB, A. & GINZBURG, Y. 1959. The response of glycolytic and non-glycolytic mammalian cells to the inhibitory action of fluoropyruvate. Exptl. Cell Res. 17, 246-255.
106. TREBLE, D.H., LAMPORT, D.T.A. & PETERS, R.A. 1962. The inhibition of plant aconitate hydratase (aconitase) by fluoroacetate. Biochem. J. 85, 113-115.
107. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. 1957. Manometric techniques. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
108. VON SYDOW, B.C.L. 1966. Über den Stoffwechsel von Dichapetalum cymosum (Hook) Engl. - Voorlopige verslag aan die Deutsche Forschungsgemeinschaft en Jaarverslag vir 1966 van die Margaretha Mes Instituut vir Plantfisiologie en Plantbiochemie, Universiteit van Pretoria.
109. VON SYDOW, B.C.L. 1967. Über den Stoffwechsel von Dichapetalum cymosum (Hook) Engl. - Finale verslag aan die Deutsche Forschungsgemeinschaft en Jaarverslag vir 1967 van die Margaretha Mes Instituut vir Plantfisiologie en Plantbiochemie, Universiteit van Pretoria.
110. WARD, P.F.V. HALL, R.J. & PETERS, R.A. 1964. Fluoro-fatty acids in the seeds of Dichapetalum toxicarium. Nature Lond. 201, 611-612.
111. WARD, P.F.V. & HUSKISSON, N.S. 1966. Small scale preparation of fluoroacetic acid-2-¹⁴C. Biochim. biophys. Acta 115, 515-517.
112. WARD, P.F.V. & PETERS, R.A. 1961. The chemical and biochemical properties of fluorocitric acid. Biochem. J. 78, 661-668.
113. WATT, J.M. & BREYER-BRANDWIJK, M.G. 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. E.S. Livingstone Ltd., London. p.375.
114. WEIL-MALHERBE, H. & BONE, A.D. 1949. Microestimation of citric acid. Biochem. J. 45, 377-381.
115. YANG, S.F. & MILLER, G.W. 1963. Biochemical studies on the effect of fluoride on higher plants. 1. Metabolism of carbohydrates, organic acids and amino acids. Biochem. J. 88, 505-509.

116. YANG, S.F. & MILLER, G.W. 1963. Biochemical studies on the effect of fluoride on higher plants. 2. The effect of fluoride on sucrose-synthesizing enzymes from higher plants. *Biochem. J.* 88, 510-516.
117. YANG, S.F. & MILLER, G.W. 1963. Biochemical studies on the effect of fluoride on higher plants. 3. The effect of fluoride on dark carbon dioxide fixation. *Biochem. J.* 88, 517-522.