

ERASMUS M E C

BODAMP-GASCHROMATOGRAFIE MET DIE DINAMIESE OPLOS-
MIDDELEFFEKINLAAT: TOEPASSING IN DIE CHEMOTAK-
SONOMIE VAN ACACIA

MSc

UP

1990

Bodamp-gaschromatografie met die dinamiese
oplosmiddeleffekinlaat: Toepassing in die
chemotaksonomie van Acacia

deur

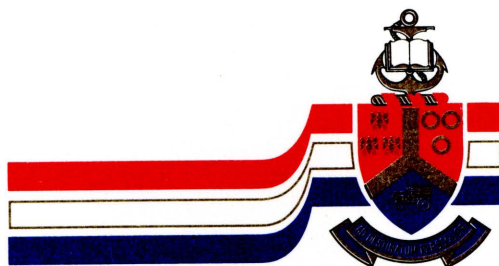
Maria Elizabeth Catharina Erasmus

Voorgelê ter vervulling van 'n deel van die
vereistes vir die graad MSc
in die Fakulteit Natuurwetenskappe
Universiteit van Pretoria

Oktober 1990

Studieleier : Professor E.R. Rohwer

Medestudieleier : Professor P.J. Robbertse



Universiteit van Pretoria

Bodamp-gaschromatografie met die
dinamiese oplosmiddeleffekinlaat:
Toepassing in die chemotaksonomie
van Acacia.

M.E.C. Erasmus

1990

**INSTITUTE FOR CHROMATOGRAPHY
INSTITUUT VIR CHROMATOGRAFIE**

**Bodamp-gaschromatografie met die dinamiese oplosmiddel-
effekinlaat: Toepassing in die chemotaksonomie van Acacia**

Kandidaat : Maria Elizabeth Catharina Erasmus

Leier : Professor E.R. Rohwer

Mede-Leier : Professor P.J. Robbertse

Departement : Chemie

Graad : MSc Chemie

Vanweë polemieë ten opsigte van die taksonomiese indeling van sekere spesies van die genus Acacia is gepoog om 'n analitiese metode te vind waarvolgens Acacia spesies deur middel van hul unieke blomgeurprofiële chemotaksonomies ingedeel kan word.

Die dinamiese oplosmideleffek (DOE) is gebruik as konsentrerings- en inlaattegniek vir gasvloeistofchromatografie. Die DOE is 'n nuwe hoëpresisie tegniek wat by die Instituut vir Chromatografie ontwikkel is. Die konsentreringsberus op die akkumulering van vlugtige verbindings op 'n poreuse bed van gesinterde glas met 'n verdampende oplosmiddelfilm. Die DOE tegniek is eerstens getoets op drie geselekteerde Acacia spesies waarvoor geen polemieë bestaan nie, ten einde die geskiktheid van die tegniek vas te stel.

Danksy die bemoedigende resultate is die studie na 'n verdere 18 Acacia spesies uit 'n bepaalde geografiese gebied van Suid Afrika uitgebrei. Die gaschromatografiese data is statisties verwerk met 'n standaard statistiekkpakket wat 'n kanoniese diskriminant-

analise uitvoer. Twee-dimensionele verspreidingsdiagramme is gekarteer, waarop die posisies van die betrokke spesies ten opsigte van mekaar duidelik aangetoon word. Op hierdie wyse kon elke ondersoekte spesie eenduidig aan 'n blomgeurprofiel gekoppel word.

Vir die eerste keer kon bodamp-gaschromatografie suksesvol toegepas word in chemotaksonomie, direk as gevolg van 'n uitnemende tegniek waarmee verbindings met 'n konsentrasie van 1-100 dele per biljoen (10^9) in die bodamp herhaalbaar waargeneem kon word.

Headspace gas chromatography with the dynamic solvent effect inlet : Application in the chemotaxonomy of Acacia.

Candidate : Maria Elizabeth Catharina Erasmus

Leader : Professor E.R. Rohwer

Co-leader : Professor P.J. Robbertse

Department : Chemistry

Degree : MSc Chemistry

In the light of the controversy surrounding the classification of some Acacia species, an analytical method was investigated for the chemotaxonomic classification of these species by means of their unique flower fragrances.

The dynamic solvent effect (DSE) was used as a concentrating and inlet technique for gas chromatography. The DSE is a new, high-precision technique developed at the Institute for Chromatography. Concentration occurs by accumulation of volatile compounds on a porous bed of sintered glass in an evaporating solvent film.

To determine the applicability of the technique, tests were initially performed on three Acacia species of uncontroversial classification.

Encouraging results led to a further 18 Acacia species being studied from a specific geographical area in South Africa. The

gas chromatographic data was statistically treated by a standard computer programme that performed canonical discriminant analysis. Two dimensional scatter plots were obtained which clearly mark the position of the species in relation to one another. In this way, each investigated species could be uniquely correlated to a flower fragrance profile.

The results constitute the first successful application of headspace gas chromatography in chemotaxonomy. The success is directly ascribed to the excellent inlet technique that allows highly reproducible analysis of compounds in the 1 - 100 parts per billion (10^9) concentration range.

BEDANKINGS

Ek wil graag die volgende persone bedank :

Aan my studieleier, Professor E.R. Rohwer wil ek baie dankie sê vir sy deskundige en doelgerigte leiding, inspirasie, raad en volgehoue belangstelling tydens die uitvoering en finalisering van hierdie studie. Ek waardeer in besonder die mooi wyse en geduld waarmee u kennis en begrip aan my oorgedra het. Dankie vir u waardevolle hulp, waarsonder hierdie verhandeling nie daargestel sou kon word nie.

- My medeleier, Professor P.J. Robbertse wil ek bedank vir sy bereidwilligheid, hulpvaardigheid en belangstelling. Dankie ook vir u bydrae tot die aanvanklike formulering van die projek.

- Die Raad en Senaat, vir die geleentheid om aan die Universiteit van Pretoria te kon studeer.

- Mnr. H.P. Wolmarans, vir sy vriendelike hulp, belangstelling en insiggewende inligting in verband met statistiek.

- Drr. H.W. Viljoen en P.J. Apps vir hul vriendelike samewerking, hulp en waardevolle wenke. Dankie dat ek altyd op julle kon staatmaak vir hulp.

- Mnr. A.J. Hasset vir sy hulpvaardigheid.

- Mnr. G. Chen, Solomon Matshaba, Robert Tsiane en Isaac Hlongwane vir hulp tydens insameling van biologiese monsters.

- In nagedagtenis aan Professor Victor Pretorius vir sy inspirerende werkywer, simpatieke leiding en persoonlike belangstelling tydens die beplanning en aanvanklike uitvoering van my studie. Dit was 'n voorreg om hierdie innoverende leermeester van formaat as persoon te kon ken en onder hom te studeer.

- Persoonlik - aan my familie, in besonder my moeder en nagedagtenis van my vader - vir hulle inspirerende ywer wat aanvanklik die begeerte tot studie by my laat ontwikkel het en vir wie my ideale al die jare na aan die hart gelê het. Mamma baie dankie vir al u onderskraging.

- In erkentlikheid teenoor God vir Sy Genade.

Baie dankie aan almal.

INHOUDSOPGAWE:

1. INLEIDING.	1
2. BODAMP-ANALISES.	3
2-1. Inleiding:	
2-1-1. Ewewigsbodamp.	4
2-1-2. Dinamiese Bodamp	5
2-1-3. Vlugtige verbindings kan uit die bodamp geakkumuleer word deur middel van die volgende opsies:	6
a) Kondensasie deur afkoeling.	8
b) Vastestof-adsorpsie	9
i) Grob 'Closed Loop Stripping.'	11
c) Vloeistof-adsorpsie.	15
i) Dinamiese Oplosmiddeleffek.	16
2-2. Die Dinamiese Oplosmiddeleffek : Instrumentasie.	22
2-2-1. Konsentreerder.	22
2-2-2. Temperatuurprogrammeerbare Inlaat.	22
2-2-3. Opstelling vir die akkumulاسie van bodamp.	24
2-3. Die Dinamiese Oplosmiddeleffek : Eksperimentele Metode en Bedryfsaspekte.	25
2-3-1. Suiwerheid.	25
2-3-2. Verhittingstyd.	29
2-3-3. Droging.	30
2-3-4. Konsentrering.	31
2-3-5. Chromatografiese Skeiding.	31

3. BIOLOGIESE PROBLEEM:	33
3-1. Vooraf bevestiging van chemotaksonomiese waarde van geurprofiele.	34
3-2. Spesifieke probleemarea: <u>Acacia karroo</u> .	40
3-3. Addisionele lede van die genus <u>Acacia</u> .	41
4. STATISTIEK:	44
4-1. Patroonherkenning.	44
4-1-1. Enkele praktiese toepassings van meervoudige analise op chemiese probleme.	47
4-1-2. Chemotaksonomiese probleem: <u>Acacia</u> .	48
4-2. Statistiekprogram.	50
4-2-1. Praktiese oplossing.	55
5. RESULTATE en BESPREKING:	57
5-1. Chromatografiese Data.	57
5-2. Statistiek: Verspreidingsdiagramme.	67
6. GEVOLGTREKKING.	83
7. BRONVERWYSING.	85
8. ADDENDUM.	100

LYS VAN FIGURE:

Figuur 2-1. Skematiese voorstelling van die geslote-lus-stropingsapparaat.	14
Figuur 2-2. 'n Skematiese model van die dinamiese oplosmiddeleffek.	20 21
Figuur 2-3. 'n Metaal temperatuurprogrammeerbare inlaat met silika-passtuk en koppeling met die kapillêre kolom binne-in die verhitbare sone van die inlaat.	23
Figuur 2-4. Monsterring van die bodamp van blomme met behulp van die dinamiese oplosmiddeleffek.	24
Figuur 2-5. Chromatogram (blanko) om die graad van suiwerheid van die gaschromatografiese stelsel (reagense, gasse, glasware) aan te toon.	28
Figuur 3-1. Groepering van <u>Acacia</u> spesies (volgens die tipe bloeistelsel) wat vir die ondersoek gebruik is.	43
Figuur 5-1. Geurprofiel van <u>Acacia galpinii</u> Boom 1.	58
Figuur 5-2. Geurprofiel van <u>Acacia galpinii</u> Boom 2.	58
Figuur 5-3. Geurprofiel van <u>Acacia galpinii</u> Boom 3.	59

Figuur 5-4. Geurprofiel van <u>Acacia galpinii</u> Boom 4.	59
Figuur 5-5. Geurprofiel van <u>Acacia robusta</u> Boom 1.	60
Figuur 5-6. Geurprofiel van <u>Acacia robusta</u> Boom 2.	60
Figuur 5-7. Geurprofiel van <u>Acacia caffra</u> Boom 1.	61
Figuur 5-8. Geurprofiel van <u>Acacia caffra</u> Boom 2.	61
Figuur 5-9. Geurprofiel van <u>Acacia caffra</u> Boom 3.	62
Figuur 5-10. Geurprofiel van <u>Acacia tenuispina</u> Boom 1.	63
Figuur 5-11. Geurprofiel van <u>Acacia tenuispina</u> Boom 2.	63
Figuur 5-12. Geurprofiel van <u>Acacia tenuispina</u> Boom 3.	64
Figuur 5-13. Geurprofiel van <u>Acacia tenuispina</u> Boom 4.	64
Figuur 5-14. Geurprofiel van <u>Acacia galpinii</u> Boom 1.	65
Figuur 5-15. Geurprofiel van <u>Acacia robusta</u> Boom 1.	66
Figuur 5-16. Geurprofiel van <u>Acacia caffra</u> Boom 4.	66
Figuur 5-17. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die volledige stel van 21 <u>Acacia</u> spesies.	70
Figuur 5-18. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van 17 <u>Acacia</u> spesies.	72
Figuur 5-19. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die oorblywende 11 <u>Acacia</u> spesies.	74
Figuur 5-20. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die oorblywende 5 <u>Acacia</u> spesies.	77

- Figuur 5-21. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van drie variasies van Acacia. 79
- Figuur 5-22. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van drie variasies van Acacia karroo uit verskillende lokaliteite. 82

HOOFSTUK 1.

INLEIDING:

Die doel van hierdie navorsingsprojek was tweërlei van aard. Ener syds was dit 'n chemies analitiese projek om lig te probeer werp op chemotaksonomiese problematiek rondom die spesie Acacia karroo van die genus Acacia. Andersyds is die herhaalbaarheid en sensitiwiteit van die dinamiese oplosmiddeleffek inlaat prakties en krities geëvalueer ten opsigte van 'n werklike probleem in die biologiese veld.

In die literatuur [1] bestaan daar onsekerheid oor die omgrensing en benaming van variasies binne die takson Acacia karroo. In haar MSc-verhandeling het Swartz bevind dat die verskillende 'ekotipes' van die takson wat inheems voorkom, inderdaad as subspesies onderskei behoort te word. Indien 'n verskil in geurstowwe van die blomme hierdie bevindings ondersteun, sal dit van groot taksonomiese belang wees. Tans bestaan daar denkverskille hieromtrent in die plantkundige geledere.

Uit voorlopige studies wat op die bestuiwing van die Suid-Afrikaanse subgenusse Gummiferae (A.karroo-groep) en die Vulgares (A.caffra-groep) gedoen is, blyk dit volgens Robbertse [2] dat eersgenoemde groep meestal deur kewers bestuif word, terwyl laasgenoemde deur bye bestuif word. Die morfologie van die stuifmeel van die groepe verskil opvallend van mekaar [2]. Geurstowwe mag dalk 'n belangrike rol speel by die selektiwiteit van die insekte ten opsigte van bestuiwing. Gevolglik is besluit om ondersoek in te stel na die geurprofiële afkomstig van die blomme van sekere inheemse lede van die genus Acacia, eerder as om 'n studie te doen van die vlugtige geurverbindinge van hetsy blare, wortels of selfs takkies.

Aangesien die gebruik van vlugtige verbindinge as taksonomiese karakters tot dusver geensins bewys is nie, is verkies om hierdie benadering eerstens te toets aan die hand van spesies waarvan die verwantskappe bekend is. Drie verskillende spesies van die genus Acacia is uitgesonder vir die ondersoek. Twee van

die spesies groei direk langs mekaar en geniet dus totaal dieselfde klimaat en grondtoestande. Indien verskille in vlugtige verbindings van die verskillende spesies met die beoogde chemiese tegniek aangetoon kan word, kan die geurprofiele gebruik word om ander karakters aan te vul in gevalle waar sistematiese verwantskappe kontroversieël is. Weens die bemoedigende resultate van die voorlopige toets, is die ondersoek uitgebrei na 18 spesies wat morfologies duidelik omgrens is.

Die dinamiese oplosmiddeleffek is 'n konsentrasie/inlaattegniek vir kapillêre gaschromatografie, wat by die Instituut vir Chromatografie ontwikkel is en was die metode van keuse vir die analise van geurprofiele. Fundamenteel is die tegniek goed bestudeer [3;4], asook goed gedokumenteer sedert 1984 [5;6] en krities ge-evalueer ten opsigte van toetsmengsels [4;7]. Die dinamiese oplosmiddeleffek monsterring maak dit moontlik dat 'n wye reeks organiese verbindings bepaal kan word. Analises van toetsmengsel het konsentrasies van $5:10^9$ aangetoon met variasiekoëffisiënte kleiner as 10 %. In terme van presisie is die dinamiese oplosmiddeleffek net so goed as ander monsterings-tegnieke en in terme van die hoeveelhede waarmee hierdie presisie bereik is, aansienlik beter as die meeste ander analitiese tegnieke [7]. Vir die karakterisering van geurprofiele deur middel van bodamp-gaschromatografiese analises, moet uiters verdunde gasmengsels baie herhaalbaar geanaliseer word om klein veranderinge in piek/geurprofiele sistematies te kan waarneem. Benewens die ondersoek van 'n moeilike plantkundige probleem is die projek dus 'n verdere kritiese evaluering van die genoemde inlaattegniek in die algemene praktyk van gaschromatografie.

Vir die objektiewe koppeling van geur/piekprofiele aan sekere Acacia spesies, is die gaschromatografiese data van al die geïdentifiseerde monsters statisties verwerk met behulp van kanoniese-diskriminant-analise. Mits karakteristieke patrone in die gaschromatografiese data waargeneem word, kan die datastel hiervolgens in onderskeibare, spesie-eie, groepe ingedeel en op 'n twee-dimensionele verspreidingsdiagram vertoon word.

HOOFSTUK 2. BODAMP-ANALISETEGNIKIE:

2-1. Inleiding

2-2. Dinamiese oplosmiddeleffek: Instrumentasie

2-3. Dinamiese oplosmiddeleffek: Metode en Bedryfsaspekte.

2-1. Inleiding:

Biologiese monsters is kompleks en is onder andere saamgestel uit 'n wye reeks vlugtige verbindings.

Daar kan aangeneem word dat vlugtige verbindings afkomstig van plante, direkte metaboliëte is wat in plantorgane geproduseer word deur intrasellulêre biogenetiese weë. Gevolglik hang die kwaliteit en kwantiteit hiervan af van genetiese faktore [8].

In 'n poging om 'n mengsel vlugtige verbindings te verkry wat die unieke geurkarakteristieke van die plantmateriaal verteenwoordig, behoort die bodamp van die plantmateriaal ondersoek te word. Die bodamp bevat die komplekse mengsel van komponente wat verantwoordelik is vir die geur, soos deur die reuksintuie van mens en dier waargeneem. Bodamp-gaschromatografie van plantmateriaal is bepaald die aangewese tegniek vir die analise van plantgeure [9]. Hierdie tegniek is gebruik in die studie van verbindings van sommige blomme, bv. lelies van die veld [10] en stikstofbevattende spoorverbindings van sommige blomme, soos hiasint, ylang-ylang, bitter-lemoen, ensovoorts [11]. Selfs nadat 'n blom afgepluk is, word verskeie vlugtige verbindings vrygestel omdat die metabolisme van die blom nie onmiddelik daardeur beeindig word nie.

Party vlugtige verbindings is baie onstabiel en die analise daarvan vereis hoogs inerte analitiese sisteme. Bodamp-analise is 'n geskikte tegniek om 'n wye verskeidenheid materiale te ondersoek of te karakteriseer. Baie voordele spruit voort uit

hierdie doeltreffende en elegante manier van ondersoek, soos: eenvoud en spoed waarmee analise uitgevoer kan word; moontlikheid om tydrawende monstervoorbereidingstappe vry te spring; nie-destruktiewe karakter wat waarborg dat die monstersamestelling en struktuur van die stowwe wat geanaliseer word, nie verander sal word tydens monsterneming nie [12].

In die literatuur word bodampmonsters dikwels opgedeel in twee groepe, naamlik:

Statiese/Ewewigsbodamp.

Dinamiese Bodamp.

2-1-1. Ewewigsbodamp:

In ewewigsbodampmonstering word 'n buisflessie ('vial') gedeeltelik gevul met vloeistof of 'n vastestofmonster. Die flessie word geseël en gewoonlik by verhoogde temperature verhit totdat ewewigskondisies bewerkstellig is tussen die twee fases, naamlik die vloeistofmonster (of vastestofmonster) en die gasvolume bokant die monster (die sogenaamde bodamp / 'headspace'). 'n Hoeveelheid van die bodamp word in die gaschromatografiese kapillêre kolom ingelaat en geskei. Die samestelling van die bodamp verskil van die samestelling van die oorspronklike monster. Die samestelling hang nie net af van die partiële druk nie maar ook van die oplosbaarheid van die komponente in nie-polêre oplosmiddels. Monsterkomponente met hoë partiële drukke by verhoogde temperature sal in hoë konsentrasies voorkom in die bodamp, terwyl monsterkomponente met lae partiële drukke by so-danige temperature afwesig kan wees in die bodamp of teenwoordig in baie lae konsentrasies [13].

In die statiese bodampsisteem word die dampfase in 'n geslote ruimte onttrek en geanaliseer want kwantisering vereis termodinamiese ewewig tussen die dampfase en die monster.

Ewewigsbodampmonstering is baie geskik wanneer die vlugtige verbindings teenwoordig is in redelike hoë konsentrasies bo klein monsters. Nadele verbonde aan hierdie tipe analise sluit onder andere in, afdigtingsmateriaal soos bv. septa wat adsorpsie en verlies kan meebring.

Wanneer biologiese intaktheid van die monster gehandhaaf moet word, (wat natuurlik die ideaal sou wees) behoort die blom terwyl dit nog aan die boom is, gemonster te word. Om ewewig te bereik moet die monster egter lugdig verseël word, wat nadelig meewerk vanweë die feit dat sodra lugvoorsiening opgehef word, ingemeng word met metaboliese produkvrystelling. Hierdie metode blyk dus nie die ideale een te wees vir die monstering van geurprofiële vir chemotaksonomiese doeleindes nie.

2-1-2. Dinamiese-Bodamp-Metode.

Vlugtige komponente teenwoordig in komplekse mengsels met 'n minder vlugtige matriks, word uitgespoel ('purged') deur 'n stroom inerte gas [14]. Inerte gas kan oor/deur die monster geblaas word en die vlugtige verbindings wat uit die monster te voorskyn kom, word gevolglik met die stroom inerte gas weggevoer na bv. 'n val waar akkumulاسie van die vlugtige verbindings in die gasstroom kan plaasvind. Die dinamiese-bodamp-metode word gekenmerk deur 'n kontinue ekstraksie van vlugtige verbindings afkomstig van die monster [15]. Omdat geen ewewig hier ter sprake is nie, is die konsentrasie nog laer, maar omdat gespoel word, kan verbindings meer volledig geëkstraheer word.

In die lig van genoemde intaktheid van die monster, wat verkieslik behoue moet bly, is besluit om dinamiese-bodamp-monstering te doen met sintetiese lug as spoelgas.

2-1-3. Vlugtige verbindings kan uit die bodamp geakkumuleer word deur middel van die volgende opsies:

- a) Kondensasie deur afkoeling.
- b) Vastestof-adsorpsie.
- c) Vloeistof-absorpsie.

Aangesien plantgeure normaalweg bestaan uit baie lae konsentrasies vlugtige verbindings, kan hierdie verbindings dikwels nie direk waargeneem word deur instrumentele tegnieke nie. 'n Konsentreringstap moet ingevoer word vir sodanige geurverbindings wat voorkom in lae konsentrasies. Metodes vir die konsentrering van bodamp vlugtige verbindings is uitgebreid nagegaan [16], [17], [18], [19]. Konsentrering beteken dat stowwe selektief teruggehou word in valle wat die 'bulk' gasse deurlaat.

In die geval van die aromaverbindings afkomstig van druiwe, druiwesap en wyn [20] kan konsentrering bewerkstellig word deur kondensasie in valle, of adsorpsie op geaktiveerde koolstof of Tenax fases of Chromosorb of Porapak Q, soos uitgevoer deur Rapp et al [20].

Dikwels word konsentrering uitgevoer in twee stappe, naamlik a) op die konsentreerder ('off-line') en b) fokusering in die begin van die kolom tydens die oordrag van die monster vanaf die konsentreerder. Termiese fokusering word gebruik om die grootte van die monster wat op die kapillêre kolom gelaai kan word, te vergroot sonder om die skeidingsdoeltreffendheid te verminder [21], [22], [23], [24], [25].

Die verwydering van water vanuit nat monsters is 'n universiële probleem in die veld van gaschromatografie waar gebruik gemaak word van kapillêre kolomme. Die gebruik van kouevalle sonder 'n drogingstap is prakties onmoontlik - selfs al sou die val nie met ys blokkeer nie, ly die kolom onder die effek van gekondenseerde

waterdruppels [26], [27].

Alhoewel water suksesvol verwyder kan word deur addisionele valle te gebruik, is die selektiwiteit van sodanige tegnieke beperk sodat sommige komponente neig om saam met die water verlore te gaan. Noij et al. [28] het dan ook gerapporteer dat die gebruik van Nafioonbuisse tot die verlies van koolwaterstowwe swaarder as dekaan lei, asook die verlies van komponente met polariteite meer gematig as ketone. Polemiek het ontstaan omtrent die verlies van vlugtige verbindings tydens die kondensasie van water tussen die monster en 'n koueval / adsorbent. Die verskil is weldra in 1975 opgelos deur Liebich en Al-Babbili [29]. Deur 'n spoelkondenserder-adsorbent monsteringsstelsel te gebruik het Raymer et al. [30], 'n verskeidenheid van polêre en hoogkokende verbindings van wolf-anaalkliersekresie, suksesvol geanaliseer, alhoewel vetsure wat deur ekstraksie opgespoor is, opvallend afwesig was van die bodampmonsters.

In 'n poging om ontslae te raak van water vanuit geakkumuleerde vlugtige verbindings op die konsentreerderbed het Schmidbauer en Oehme gedurende 1986 silikagel en anhidriese soute respektiewelik gebruik, maar dit het net gelei tot die verlies van alle vetsure en fenole [31].

Sodra vogtige gas deur 'n adsorbentval gestuur word, sal selfs hidrofobiese materiaal soos Tenax, voldoende water kan akkumuleer om probleme op die kapillêre kolom te veroorsaak [32]. Tydens 1982 het Pankow & Isabelle probeer om hierdie ongewenste water te verwyder deur onder andere sentrifugasie en vakuumdehidrasie [33]. Droë gas teen 'n hoë vloeisnelheid is ook ingespan [34], [35], [36]. Die effek van spoeling op die herwinning van vlugtige verbindings blyk volgens Apps et al. nog nie nagevors te wees nie [37].

Gedurende 1986 het Elkin en Eposito met 'n nuwe voorstel vorendag gekom om waterakkumulاسie op Tenax te voorkom. Deur verhitting van die valle en verdunning van die monsteringsgasvloei tot 50:50 met droë helium, is herwinnings van 100% behaal [38] vanaf organiese verbindings in vogtige monsters.

a) Kondensاسie deur afkoeling.

Konsentrering van bodamp vlugtige verbindings kan bewerkstellig word deur middel van afkoeling. Hierdie benadering maak gebruik van die feit dat versadigde dampdrukke verlaag word met verlaagde temperature.

Die bodamp van 'n betrokke monster beweeg deur 'n koueval, waartydens vlugtige verbindings gekonsentreer word en 'bulk' gasse soos stikstof, suurstof en koolstofdiksied deurbeweeg en nie gekonsentreer word nie. Konsentrering vind selektief plaas op grond van dampdrukversadiging van minder vlugtige verbindings in die teenwoordigheid van die meer vlugtige draergas.

Om die moontlikheid van chemiese reaksies tussen individuele komponente uit te skakel en om onder andere 'n meer volledige akkumulاسie van spore water te verseker, het Kaiser 'n aanpassing aangebring wat bestaan uit 'n kombinasie van kondensاسie en adsorpsie. 'n Temperatuurgradiënt van -20°C tot -160°C is langs die sorpsiepad toegepas [20] en met stadige afkoeling van vogtige gasse, kondenseer water op die oppervlakte sonder misvorming. Laasgenoemde proses gee dikwels aanleiding tot onvolledige akkumulاسie in die koueval omdat gekondenseerde materiaal deurgevoer kan word met die draergas.

Verskeie tipes kriogeniese valle kan geïmplementeer word [39]. Vir afkoeling van hierdie valle word òf soliede koolstofdiksied (droë ys), òf vloeibare stikstof òf koolstofdiksied, verkoel deur middel van die Joule Thomson-effek, gebruik. Die Joule

Thomson-effek verwys na die verandering in temperatuur wat plaasvind wanneer 'n gas deur 'n vernouing uitsit [40]. 'n Belangrike nadeel van die kriogeniese val is die akkumulering van ongewenste hoeveelhede water van vogtige monsters wat die akkumulering self ontwrig en die kolom verstop. Selektiewe konsentrasie van organiese verbindings uit vogtige monsters is dikwels gewens in bodamp-analises.

b]. Vastestof adsorpsie.

Adsorbente wat algemeen gebruik word vir die konsentrasie van vlugtige verbindings uit gasmonsters, sluit in: aluminiumoksied; geaktiveerde koolstof; silika gel; molekulêre siwwe; en poreuse polimere. Gedetailleerde resensies oor adsorbente is gegee deur Weurmann et al. [41]; Teranishi et al. [42]; Jennings et al. [43], [44], [45]; Schaefer [46], [47]; Sugisawa [48] en Cronin [16].

Vlugtige verbindings word selektief ('bulk' gasse soos draer-gasse word deurgelaat) vasgevang op 'n soliede adsorbent. Daar bestaan egter algemene probleme soos deurbraakvolumes en matrikseffekte en daarom word daar altyd gesoek na die tipe adsorbent wat water nie sterk sal aantrek nie, dit wil sê, nie-polêre adsorbente soos koolstof en nie-polêre polimere. Voordele van geaktiveerde koolstof sluit onder andere in dat koolstof nie deur water gedeaktiveer word nie en dat dit boonop 'n groot kapasiteit het om organiese verbindings te adsorbeer. Poreuse polimeeradsorbente vertoon 'n lae affiniteit vir water en lae molekulêre massa alkohole.

Verskeie eksperimente is uitgevoer om die effek van opgaardoel-treffendheid en monsterverliese by die gebruik van adsorbentkonsentreerders te bestudeer [49]. Die mees algemene van die adsorbente, naamlik Tenax, begin monsterverliese vertoon by monstervolumes van grootte 59 - 1560 liter per gram adsorbent,

in die $C_6 - C_{10}$ koolwaterstowwe reeks [50], [51]. Hierdie volumes staan bekend as die deurbraakvolumes vir die betrokke adsorbent.

Deurbreekvolumes van 'n paar liter is deur Jemiolo et al. waargeneem toe die bodamp van muisuriene met helium gespoel is teen 'n vloeisnelheid van $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ en op 4 mg Tenax geadsorbeer is [52].

Die oopbuisvalle wat deur Grob en Habich gedurende 1985 ontwikkel en uitgetoets is, toon die deurbreek van vlugtige verbindings afkomstig van wyn, nadat slegs 4 cm^3 bodamp deur die valle gestuur is [53]. Daarteenoor het Burger en Munro gebruik gemaak van dieselfde beginsel as Grob en Habich, maar gedurende 1986 verbeter op die ontwerp en registreer deurbreekvolumes van tot 500 cm^3 vir n-oktaan [54].

Onlangs het Burger en Munro et al. die vlugtige geurstowwe bestudeer van die insekaantrekkende Allomone van die parasitiese plant Hydnora africana, deur gebruikmaking van Grob-Habich geaktiveerde koolstofvalle [55]. Die hoofdoel van die studie was die identifikasie van die geurprofiel van die blomme van Hydnora africana. Verskillende tipes koolstofvalle is mettertyd voorberei en gebruik, nl. Grob-Habich-koolstof-ooopbuisvalle (COTT's) en film-geaktiveerde-koolstof-ooopbuisvalle (FACOTT's) [56].

Roeraade en Enzell [57] asook Grob en Zürcher [58] het melding gemaak van spesiale tipes geaktiveerde koolstof wat uiters geskik is om vlugtige verbindings mee vas te vang. Vlugtige geurverbindings van okkerneute is gekonsentreer en herwin deur middel van geaktiveerde koolstof [59]. Net so word in omgewingsnavorsing feitlik uitsluitlik gebruik gemaak van poreuse polimeeradsorbente wat in die handel onder die name Chromosorb, Porapak, Tenax-GC bemark word. Hierdie genoemde adsorbente is ook gebruik in die konsentrering van vlugtige verbindings vanuit die bodamp van verskeie plantmateriale [60]. Poreuse polimeerkonsentrering is 'n

relatief eenvoudige metode, maar probleme kan ondervind word as gevolg van artefakte. Dit kan te wyte wees aan kontaminasie van die polimere (die meeste polimere moet vooraf gekondisioneer word), afwesigheid van pieke weens onvolledige termiese desorpsie, onsuiver draergas en termiese ontbinding van die monster en die polimeer self tydens termiese desorpsie van die gekonsentreerde monster. Om laasgenoemde probleem te voorkom word die monster dikwels met mikrovloeistofekstraksie van die adsorbent verwyder en dan in vloeistofvorm in die gaschromatograaf ingespuut.

i). Grob-metode: 'Closed loop stripping / Geslote-lus-gasekstraksie.'

Hierdie metode is oorspronklik deur Grob (1973) ontwikkel vir die bepaling van organiese verbindings van intermediêre molekulêre massa, wat in drinkwater teenwoordig is op ng.l^{-1} vlak. Hierdie metode kombineer 'n hoë konsentrasiefaktor met 'n klein finale monstergrootte vir die GC en vinnige proseseringstyd van ongeveer twee ure [61], [62]. Die metode is met verloop van tyd deur Grob verbeter. Voordele van hierdie metode is a) die afwesigheid van die probleem van deurbraakvolumes, b) termiese desorpsie met sy bekende nadele word nie gebruik nie en c) groot hoeveelhede uiters suiwer spoelgas word nie benodig nie.

Krasner et al. het hierdie tegniek uiters geskik gevind in die bepaling van geurveroorsakende organiese verbindings in water. Met behulp van die geslote lus gasekstraksie (CLSA-GC) gekoppel met gaschromatografie, kon spoorverbindings op 'n ng.l^{-1} vlak opgespoor word wat konsentrasies verteenwoordig wat gelyk is aan en selfs minder is as die geurdrempelwaardes van hierdie betrokke verbindings [63].

Hierdie tegniek maak gebruik van 'n skoon uitgebakte bottel vir stroping ('stripping bottle'), wat in 'n waterbad geplaas word. Aangesien dit baie belangrik is dat alle monsters asook die kalibrasiestandaard by dieselfde temperatuur gestroop word, moet die waterbad voorsien wees van 'n termoreguleringsstelsel wat tot ongeveer $0,5^{\circ}\text{C}$ akkuraat is. Deur deurgaans 'n konstante temperatuur te handhaaf, kan verseker word dat stroopherwinnings konsekwent bly.

Ongeveer 1,5 mg geaktiveerde koolstof word per filter gebruik om 'n geaktiveerde Grob koolstoffilter saam te stel. Sodoende kan die filterweerstand teen lugvloei tot 'n minimum beperk word. Die klein filter kan volledig met $20\ \mu\text{l}$ geëkstraheer word, wat die konsentrasiedoeltreffendheid van die tegniek verder verhoog. Die geaktiveerde koolstoffilter word by 'n temperatuur van $20^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$ bokant die temperatuur van die waterbad gehou om kondensasie van die waterdamp op die geaktiveerde koolstoffilter te verhoed. Indien kondensasie sou plaasvind op die filter sal dit 'n verlies van organiese verbindings tydens die herwinning vanaf die koolstof tot gevolg hê.

'n Sekere hoeveelheid interne standaard word by die monster wat bestudeer word gevoeg, waarna die monster in die stropingsbottel in die waterbad geplaas word. Met behulp van 'n pomp word lug teen 'n snelheid van $1-1,5\ \text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ deur die filter geblaas. Stroping van organiese verbindings word uitgevoer vir 'n tydspan van twee ure. Hierna word geakkumuleerde verbindings met koolstof disulfied geëkstraheer. Die ekstrakt word dan gaschromatografies geanaliseer.

Die CLSA/GC tegniek kan gebruik word om verbindings op $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ vlak te kwantifiseer met ongeveer 15% akkuraatheid [64].

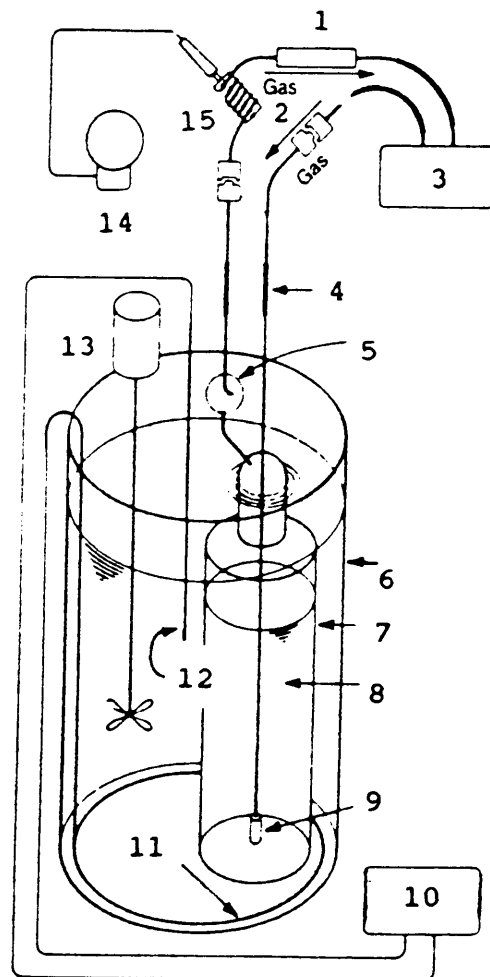
'n Nadeel van die tegniek is dat die reeks verbindings wat effektief met behulp van die Grob CLSA metode bepaal kan word,

beperk is. Hoogs vlugtige verbindings soos bv. chlormetaan, vinielchloried, metileenchloried en chloroform word swak herwin. Medium- tot hoogs polêre organiese verbindings word ook swak herwin [65]. Boonop is die geaktiveerde koolstoffilters duur en kos tans sowat R400-00 per filter. Ook bestaan die gevaar dat hoogs gekontamineerde monsters soos industriële afval, die koolstofval kan oorlaai en die geslote-lus kontamineer.

SKEMATIESE VOORSTELLING VAN DIE GESLOTE-LUS-STROPINGSAPPARAAT:

Figuur 2-1. [66]

1. Filterhouer
2. gasvloei
3. pomp
4. buigbare metaalbuis
5. skuimval ('foam trap')
6. termostaatbeheerde waterbad
7. stropingsbottel
8. watermonster
9. hoë-porositeit glassinter ('frit')
10. temperatuurbeheer
11. verhitte
12. temperatuurbeheer
13. roerder
14. veranderbare transformator
15. aluminium verhittingsilinder



c) Vloeistof-absorpsie.

Hier word gebruik gemaak van selektiewe oplossing van organiese verbindings in vloeistowwe of kruisverbinde polimere. Alternatiewelik kan die val 'n gekose reagens bevat om met 'n spesifieke funksionele groep te reageer [67]. Vlugtige verbindings word versamel deur absorpsie in 'n vloeistof mits die distribusiefaktor (k) gunstig is. Hoë k -waardes vertraag die chromatografiese beweging van komponente in die val en het groot deurbraakvolumes tot gevolg. ($k = \text{massakomponent in vloeistoffase} / \text{massakomponent in dampfase}$). Dik films ($80 \mu\text{m}$) in byvoorbeeld SE 30 valle (nie-polêre fase) laat groot deurbraakvolumes toe en selektiewe akkumulering van vlugtige verbindings kan gedoen word selfs sonder om die valle af te koel [68].

Smeltsilika-oopbuisvalle, bedek met 'n $15\mu\text{m}$ metielsilikonfilm is suksesvol aangewend deur Bicchi et al. in 'n poging om die vlugtige verbindings wat deur die plant Mentha piperita vrygestel word te konsentreer [69]. Grob et al weer, het die bodamp van wyn geanaliseer met behulp van 'n konsentreringsval wat bestaan uit 'n kort kapillêre kolom met 'n fase-bedekking van $0,4 \mu\text{m}$ OV-1701 [70]. Vloeistofabsorpsie kan onder andere gebruik word in ondersoeke van lugbesoedeling. Daarbenewens is vloeistofabsorpsie suksesvol gebruik in ondersoeke na die gedrag van vlugtige verbindings tydens rypwordingsprosesse en prosesering van voedselprodukte [67].

Bogenoemde is voorbeelde waar vloeistowwe wat in 'n val gebruik word, laer dampdrukke het as die monster wat geakkumuleer is. Oordrag van die monster na die gaschromatografiese sisteem kan dus gerieflik plaasvind deur verhitting van die val. Ander tegnieke maak egter gebruik van vloeistowwe wat meer vlugtig is as die geakkumuleerde monster. Die gebruik van oplosmiddel om vlugtige verbindings te ekstraheer vanuit gasse vir gaschromato-

grafiese analise, dateer terug tot in 1964 toe Pavelka 'n film van oplosmiddel oor glaskrale gesprei het om sodoende organiese verbindings vanuit die lug op te vang [71].

Grob het met behulp van die statiese oplosmiddeleffek en 'n 2 μ l hekasaanfilm op 'n kapillêre kolom, die fokusering van hoogs vlugtige verbindings van speserybodamp gedemonstreer [72]. Die volume en gepaardgaande gasmonster is egter beperk.

Jennings weer, het nie van die oplosmiddeleffek gebruik gemaak nie, maar die bodamp vlugtige verbindings van voedsel op 'n refluksierende Freon-12 film opgevang [73].

Blomberg en Roeraade noem die moontlikheid om die oplosmiddeleffek te gebruik om gasfase vlugtige verbindings te fokuseer [74]. Die gewone (statiese) oplosmiddeleffek is ook met 'n mate van sukses uitgebrei by die Instituut vir Chromatografie, om groter monsters te hanteer [75]. Vir polêre verbindings met die groot gepakte beddens wat hiervoor gebruik is, in plaas van die sogenaamde 'retention gap', kom adsorpsieprobleme voor. Die dinamiese oplosmiddeleffek het juis in hierdie stadium ontstaan as teenvoeter vir hierdie probleem.

i). Die Dinamiese Oplosmiddeleffek:

Die dinamiese oplosmiddeleffek (DOE) is 'n spesiale geval van 'n konsentreringstegniek wat berus op vloeistof-absorpsie. Hier vind akkumulاسie plaas op 'n verdampende oplosmiddelfilm. Groot hoeveelhede monster kan hanteer word sonder die nadele van hoë adsorpsie-oppervlakke en gepaardgaande verliese of pieksterting van veral polêre verbindings. Daar is geen hoë desorpsietemperature en geen deurbraakvolumes ter sprake nie. Tydens akkumulاسie van koolwaterstowwe vanuit lug, is geen herkenbare monsterverliese waargeneem nie en mag die maksimum volume gas wat gemonster is nl. 800 cm³, beskou word as 'n konserwatiewe

minimumwaarde vir die 'deurbraakvolume ' van n-dekaan [76]. Die waarde stem ooreen met die bevindings van Burger en Munro (1986) tydens eksperimentering met oopbuis-valle [52].

Volgens Apps et al. [77] is die dinamiese oplosmiddeleffek 'n veelsydige monsterringstegniek wat 'n wye reeks monsters, ook biologiese materiaal wat problematies van aard is, onderwerp aan betroubare, kwantitatiewe analises deur hoëresolusie gasvloei-stofchromatografie.

Die werking van die DOE berus op die volgende beginsel:

Vlugtige verbindings word geakkumuleer op 'n suiwer oplosmiddelfilm. Hierdie oplosmiddelfilm word in dinamiese ewewig gehou tussen die kapillêre styging van oplosmiddel in die poreuse bed en die verdamping vanuit die bopunt van die poreuse konsentreerder, deur 'n afwaartse gasvloei oor die bed (sien figuur 2-2). Dit beteken dat die totale hoeveelheid oplosmiddel op enige gegewe tydstep in die konsentreerder konstant bly op slegs sowat 20 μ l. Vlugtige verbindings wat op hierdie manier geakkumuleer is in 20 μ l oplosmiddel, word vanaf die konsentreerder oorgedra na die kapillêre kolom via 'n temperatuurprogrammeerbare inlaat. Verdere konsentring na 'n nou band soos vereis vir hoëresolusie gaschromatografie, vind plaas volgens die statiese oplosmiddeleffek, wanneer die draergas deur die konsentreerder na die kolom vloei. Hierdie laaste stap stem ooreen met 'n 20 μ l 'on column' inspuiting van die verkrygte konsentraat. Na afloop van die verdamping word die inlaat ballisties verhit om enige aktiwiteit van die gesinterde glasbed in die konsentreerder ten opsigte van die polêre verbindings teë te werk. Die dinamiese oplosmiddeleffek is 'n hoëpresisietegniek, maar nogtans vry van artefakte [4], mits 'n aantal voorsorgmaatreëls getref word.

Hierdie tegniek bied onder andere, 'n ideale analitiese metode vir die analyses van monsters wat lae konsentrasies vlugtige verbindings bevat. Hitte-labiele verbindings kan met groot sukses ondersoek word met hierdie lae temperatuur inlaattegniek wat nie van blitsverdamping gebruik maak nie. Die DOE is 'n monsterringstegniek wat ten volle aanpasbaar is met die vermoë van kapillêre kolomme en gaschromatografiese detektors om nanogram hoeveelhede te skei en te kwantiseer vanuit komplekse mengsels [4].

Mits voorsiening gemaak word dat potensiële bronne van veranderlikes soos temperatuurveranderinge, adsorpsie op houers, onvolledige piekresolusie en veranderinge in die monsters self, voldoende gekontroleer word, bied die DOE 'n tegniek waar lae konsentrasies ($5:10^9$ toetsmengsel) en sub-nanogram hoeveelhede van 'n wye reeks organiese verbindings bepaal kan word met variasie-koëffisiënte deurgaans kleiner as 10 % [4]. Daar bestaan 'n leemte in die veld van semiochemikalieë [78] en kliniese chemie [5], vir 'n tegniek van hierdie omvang.

In terme van presisie, is die DOE net so goed soos ander monsterringstegnieke en in terme van die hoeveelhede waarmee presisie bereik is, is die DOE heelwat beter as ander tegnieke [4]. Wat sensitiwiteit betref, is onsuiverhede in konsentrasies van $3 : 10^{12}$ reeds waargeneem in 'n $200 \mu\text{l}$ oplosmiddelmonster [79].

Die dinamiese oplosmiddeleffek is as tegniek vir die betrokke projek gekies. Een doel van hierdie studie was om te bepaal tot watter mate die oplosmiddeleffek 'n monsterringstegniek vir kwantitatiewe hoëresolusie gaschromatografie kan bied, wat terselfdertyd sensitief genoeg is om probleme ten opsigte van geurprofiele van blomme, herhaalbaar te analiseer vir taksonomiese doeleindes.

Om bogenoemde doel te kon bereik was die minimum vereiste dat sistematiese verskille tussen chromatografiese geurprofile gevind moet word wat verskil op biologiese grondslag. Chemiese identifikasie van individuele komponente van die geurprofiel is nie benodig nie.

'n Toets kan as suksesvol beskou word indien die dinamiese oplosmiddeleffekmonstering en kapillêre gaschromatografie die volgende oplewer :

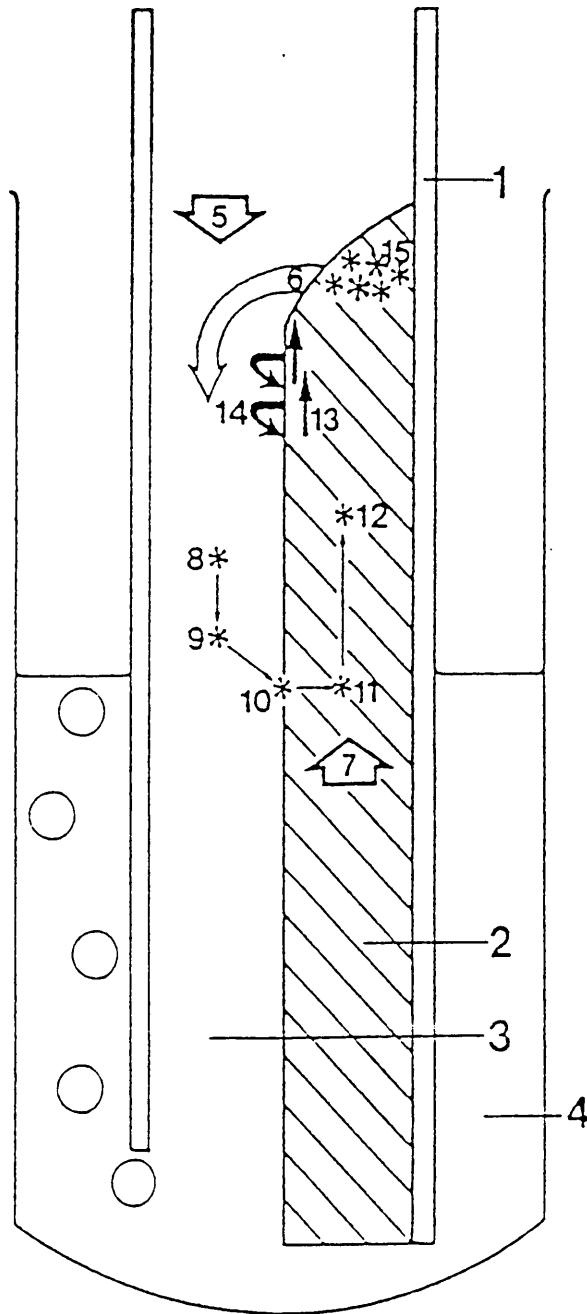
- 1) chromatogramme van hoë kwaliteit om te toon dat die werkverrigting van die dinamiese oplosmiddeleffek nie merkbaar nadelig beïnvloed is deur die monster self nie.
- 2) soortgelyke chromatogramme van soortgelyke monstermateriaal.
- 3) goeie korrelasie tussen biologiese en chromatografiese data.

'n SKEMATIESE MODEL VAN DIE DINAMIESE OPLOSMIDDELEFFEK:

Figuur 2-2. [80]

1. Glasbuis
2. gesinterde poreuse bed
3. gaskanaal
4. oplosmiddel
5. Wanneer gas afbeweeg met die buis, vind verdamping plaas by die bopunt van die bed en
6. veroorsaak 'n opwaartse beweging van oplosmiddel deur middel van kappilêre styging.
7. Opgeloste stowwe in die gasfase
8. word afwaarts gedryf deur die gas,
9. bots,
10. en los op in die oplosmiddel
11. en word opwaarts gedryf deur die oplosmiddel.
12. Uitruiing van organiese verbindings tussen gas en vloeistof het 'n chromatografiese beweging van opgeloste stowwe tot gevolg.
13. So lank as die snelheid van die opwaartse beweging groter is as die snelheid van die afwaartse beweging,
14. sal die opgeloste stowwe akkumuleer
15. in die verdampingsone

'n SKEMATIESE MODEL VAN DIE DINAMIESE OPLOSMIDDELEFFEK:



2.2. Dinamiese oplosmiddeleffek: Instrumentasie

Hierdie konsentrerings- en inlaattegniek in gaschromatografie soos hierbo bespreek, maak gebruik van 'n spesiaal ontwerpte a) konsentreerder en b) inlaat, wat aangebring is op 'n Varian 2700 GC, toegerus met 'n vlamionisasiedetektor. Hier volg 'n bespreking van die instrumentasie waarmee die ondersoek uitgevoer is.

2-2-1. Konsentreerder:

Die konsentreerder is 'n gestandaardiseerde poreuse bed, en word vervaardig uit borosilikaatglasbuisies met die volgende afmetings: 12 cm lank; 2 mm buitedeursnee en 1,7 mm interne deursnee. Borosilikaatstukkies van 125 μm word op so 'n wyse gesinter in die onderste 6 cm van die buisies, dat een helfte van die dwarsdeursnee van elke buisie as 'n oop kanaal gelaat word.

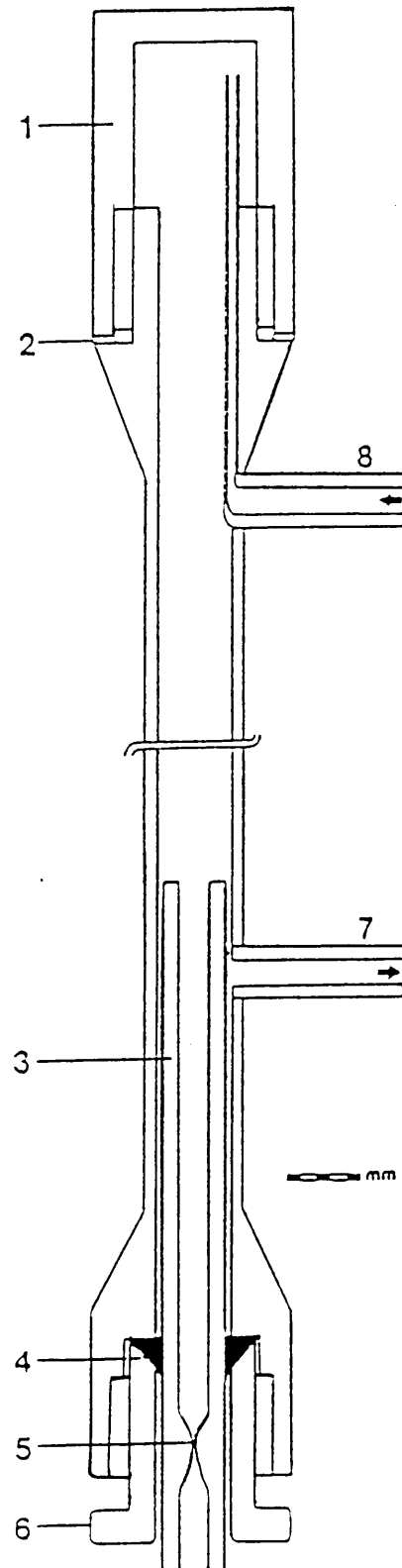
Deaktivering van die borosilikaatglaskonsentreerders is uitgevoer deur middel van hoëtemperatuur chemiese deponering van Si vanuit SiH_4 gasfase, gevolg deur gammabestraling in die teenwoordigheid van eteen [81]. Hierdie prosedure verskaf konsentreerders met lang leeftye en hoë inertheid [82].

2-2-2. Temperatuurprogrammeerbare inlaat:

'n Metaal, temperatuurprogrammeerbare inlaat is gebruik wat spesiaal ontwerp is om die dinamiese oplosmiddeleffek te komplementeer [83]. Silikabuis met 'n interne deursnee van 2mm is gebruik vir die vervaardiging van die passtuk wat aan die een kant die konsentreerder ontvang en aan die ander kant deur middel van 'n poli-imied drukpaskoppeling aansluiting aan die kapillêre kolom bewerkstellig.

Figuur 2-3. 'n Metaal temperatuurprogrammeerbare inlaat met silika-passtuk en koppeling met die kapillêre kolom binne-in die verhitbare sone van die inlaat [84].

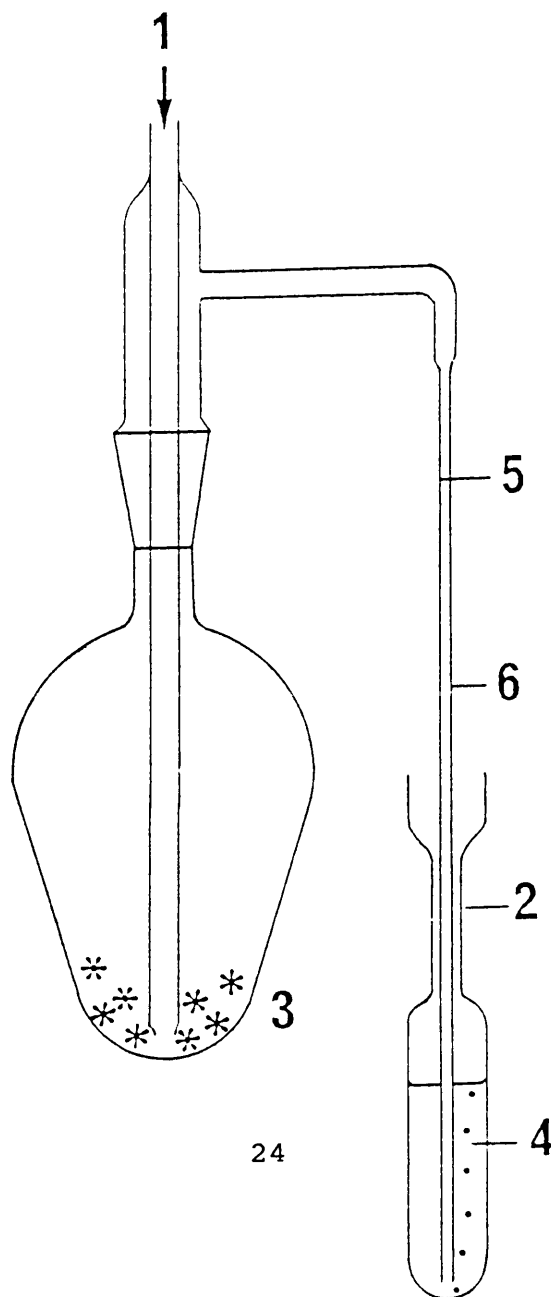
1. skroefprop
2. seëling
3. silika-passtuk
4. grafiet beslagring
5. drukpas-koppeling met die kolom
6. kompressie moer
7. spoelgasvloei
8. draergastoevoer



2-2-3. Opstelling vir die akkumulasie van bodamp:

Figuur 2-4. Monstering van die bodamp van blomme met behulp van die dinamiese oplosmiddeleffek [85].

1. Suiwergas-inlaat.
2. Vernouings om terug-diffusie van kontaminante te voorkom.
3. Bodampmonster (geur).
4. Suiwer oplosmiddel, naamlik n-heksaan.
5. Politetrafluoro-etileen-koppeling
6. Dinamiese oplosmiddeleffekkonsentreerder.



2-3. Die Dinamiese Oplosmiddeleffek: Eksperimentele Metode en Bedryfsaspekte.

2-3-1. Suiwerheid:

Vir die suksesvolle bedryf van die dinamiese oplosmiddeleffek (DOE) word ultra-hoësuiverheid oplosmiddels vereis. Die redes hiervoor is as volg:

Soos reeds bekend is die dinamiese oplosmiddeleffek 'n hoë- presisie en sensitiewe tegniek, wat primêr bedoel is vir analyses van monsters wat uiters lae konsentrasies van die belanghebbende verbindings bevat. Aangesien die dinamiese oplosmiddeleffek so sensitief is, lewer dit probleme, want onsuiverheidsvlakke wat in minder sensitiewe analyses verdra sou kon word, is nou egter problematies by aanwending van hierdie tegniek.

Verder verteenwoordig die geurprofiel van blomme 'n komplekse mengsel van vlugtige verbindings en daarom is dit ook baie belangrik dat reagense volkome suiwer moet wees, want hoe meer kompleks die mengsel vlugtige verbindings in 'n monster, hoe groter is die kans dat 'n gegewe onsuiverheid die analise van ten minste een komponent kan affekteer. 'n Klas onsuiverhede wat in hoë konsentrasies verdra kan word, is die onsuiverhede wat nie akkumuleer op die oplosmiddelfilm tydens monsterring nie, bv. die gasse wat gebruik word vir spoel ("purgings"). Tydens monsterring word suiwer lug benodig sodat die blomme se metaboliese reaksies nie versteur word nie.

Kommersieël is gas met die nodige suiwerheid wat aanvaarbaar is vir die dinamiese oplosmiddeleffek, nie beskikbaar nie en gevolglik is saamgeperste lug gesuiwer deur die gas deur 'n gekondisioneerde, geaktiveerde koolstoffilter te stuur. Die lugvloei is beheer, deur 'n metaaldiafragma-massavloei-beheereenheid net bokant die koolstoffilter te installeer. Die

koolstoffilter is elke nag herkondisioneer deur die filter oornag uit te bak in 'n moffeloond by 'n temperatuur van 450°C , terwyl stikstofgas teen 'n vloeï-snelheid van $15\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ deurvloei. 'n Blanko is ten minste een maal per dag uitgevoer om te toets vir die deurbreek van vlugtige verbindings.

Hoësuïwerheid waterstof word eweneens benodig vir die verwydering van gekondenseerde water uit die konsentreerder (sien 2-3-3). Waterstofgas is gesuïwer deur die gas deur 'n spesiaal gekonstrueerde palladiumsel te stuur. Die vloeï van die palladiumgesuïwerde waterstof is beheer deur die temperatuur van die palladiumsel. Om die suïwerheid van die gasse te handhaaf, word na finale suïwering, slegs van uitgevlamde vlekvrÿe staal gaslyne gebruik gemaak.

In die ondersoek van geurprofieë van Acacia spesies is gebruik gemaak van baie suïwer n-heksaan as oplosmiddel. n-Heksaan is eksklusief as oplosmiddel gebruik vanweë die algemene beskikbaarheid daarvan en omdat n-heksaan met gemak hanteer kan word by 'n laboratoriumtemperatuur van 30°C vir die dinamiese oplosmiddeleffek.

Wanneer gasfase vlugtige verbindings gemonster word, word opgeloste stowwe met dampdrukke soortgelyk aan n-dekaan, kwantitatief opgevang oor lang monsterperiodes. Die langste tyd wat geneem is in die praktyk vir monsterring is een uur. Oplosmiddelverbruik en oplosmiddelsuïwerheid is hier die beperkende faktore. Vir die meeste verbindings sal akkumulاسie nog steeds kwantitatief wees oor'n gemiddelde monsterringstyd van tien tot twintig minute [86].

Vanweë die ontstaan van minder vlugtige onsuïwerhede kon die gesuïwerde n-heksaan nie vir onbeperkte tye geberg word nie. Wanneer die gesuïwerde oplosmiddel egter in gesuïwerde boro-silikaatglashouers by kamertemperatuur gebêre word, was die

oplosmiddelsuiwerheid vir ten minste twee dae lank binne perke vir gebruik. Binne 1-3 dae vertoon hierdie gebergte oplosmiddel kontaminasiepieke.

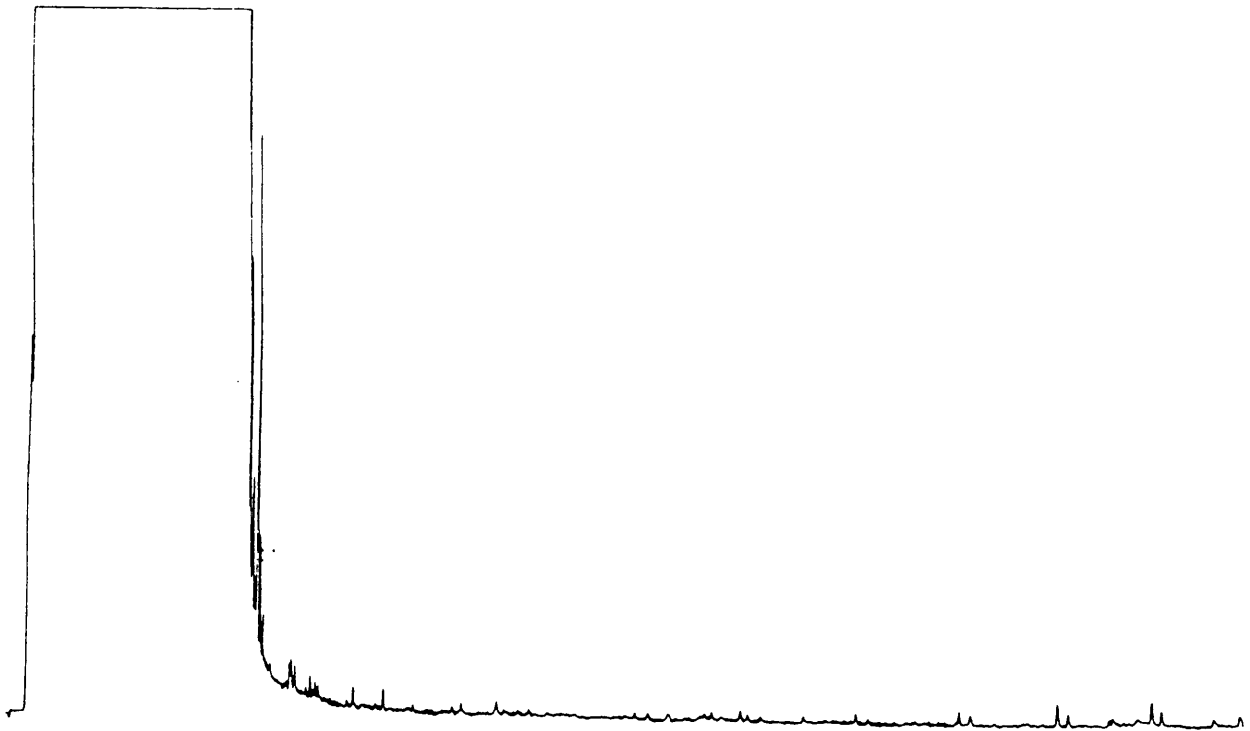
Suiwer n-heksaan word dus daaglik benodig en 'n metode moes gevind word om suiwer n-heksaan gemaklik op 'n daaglikse basis te kon lewer. Frontale-elusie-gas-vastestofchromatografie het die oplossing vir die suiweringsprobleem gebied. Tydens frontale-elusie-chromatografie is gebruik gemaak van 'n 1 m x 17 mm aluminiumoksied W200 kolom. Die draergas was koolstofgesuiwerde stikstofgas, versadig met n-heksaandamp by 'n temperatuur van 40°C. Die draergas is deur die kolom gestuur teen 'n vloeisnelheid van 250cm³.min⁻¹ by 'n temperatuur van 180°C. Tussen lopies is die aluminiumoksiedkolom asook die geaktiveerde koolstofkolom teruggespoel met stikstofgas teen 'n vloeisnelheid van 250cm³.min⁻¹ by 'n temperatuur van 270°C. Die eluerende suiwer n-heksaandamp is direk in spesiaal vooraf behandelde bewaringshouers gekondenseer by 'n temperatuur van ongeveer -10°C.

Borosilikaatglasbotteltjies wat oornag uitgebak is by 100°C in 'n konvensionele oond, is gebruik as bewaringshouers vir die suiwer n-heksaan. Hierdie houers is bedek met skroefproppe waarvan die binnekant uitgevoer is met politetrafluoroëtileenvoerings. Hierdie PTFE voerings is ook oornag by 100°C uitgebak en is met behulp van 'n (uitgebakte) tang hanteer. Die botteltjies is warm uit die oond gehaal, dadelik bedek met skoon politetrafluoroëtileen-uitgevoerde skroefproppe en gelaat om heeltemal af te koel tot kamertemperatuur voor gebruik.

As gevolg van die bewaringsprobleem is ongeveer 10-20 cm³ n-heksaan daaglik vars voorberei. Die kolom wat tydens frontale elusie gas-vastestof-chromatografie gebruik word is telkens oornag teruggespoel met stikstofgas by 'n temperatuur van 270°C, sodat die apparaat gereed sou wees die volgende dag vir die suiwering van n-heksaan. Die produksie van een dag se voorraad

neem ongeveer negentig minute. Deur die oplosmiddel af te tap soos dit elueer , kan die monsterring binne 45 minute begin word. Van hierdie 45 minute neem die kolomoond ongeveer 25 minute om af te koel.

Figuur 2-5. Chromatogram (blanko) om die graad van suiwerheid van die gaschromatografiese stelsel (reagense, gasse, glasware) aan te toon.



2-3-2. Verhittingstyd.

Daar bestaan 'n verband tussen die tyd wat die oplosmiddel neem om te verdamp en die tydstip wanneer 'n oplosmiddeleffekinlaat verhit behoort te word [87] en gevolglik is suksesvolle werking van die dinamiese oplosmiddeleffek onder andere ook afhanklik van die tydsduur totdat die inlaat verhit word. Hierdie tyd staan in vaste verhouding met die tyd wat dit neem totdat oplosmiddelverdamping voltooi is. Dit is belangrik dat die oplosmiddelverdampingstyd konstant bly van monster tot monster wat op sy beurt konstante kondisies van temperatuur en draergasvloei vereis, sowel as 'n konstante monstergrootte.

Om die korrekte verhittingstyd vir die inlaat vas te stel is die volgende prosedure uitgevoer :

'n Volume van 20 μ l toetsmengsel [87] - bestaande uit n-oktaan, n-nonaan, 2,6-dimetielhepta-4-noon, n-dekaan, p-kresol, linalool, 2,6-dimetielanilien, n-dodekaan, n-dekanol, metiel-dekanoaat, n-tetradekaan en n-pentadekaan, elk met 'n konsentrasie van 2 : 10⁷ in n-heksaan, is met behulp van die konsentreerder in die inlaat geplaas. Die inlaat is verhit vanaf die oomblik dat die oplosmiddelpiek terugkeer na die basislyn. Die wydte van die oplosmiddelpiek se bopunt is gemeet (in tyd). Na voltooiing van die lopie is 'n tweede lopie uitgevoer en die verhitter is aangeskakel na 'n tydsduur wat ooreenstem met 60 % van die oplosmiddelpiekwydte (in tyd), soos slegs kort vantevore bereken. Die chromatogram so verkry, is bestudeer om enige aanduiding te verkry van vroeë of te laat verhitting van die inlaat en die tyd is ooreenkomstig aangepas in inkremente van 30s. Sodra die verhittertyd ingestel is vir 'n bepaalde volume monster onder 'n gegewe stel kondisies, is geen heraanpassing nodig nie.

Wanneer die inlaat te vroeg verhit word, splyt die laat

eluerende alkaanpieke. Hierdie verskynsel kan toegeskryf word aan kondensasie van heksaan op die kolom. Dit is soortgelyk aan pogings om die oplosmiddeleffek uit te voer in die teenwoordigheid van 'n stasionêre fase - 'n prosedure wat bekend is daarvoor om ernstige piekdistorsies tot gevolg te hê [88], [89]. Wanneer te laat verhit word, neem pieksterting van polêre verbindings toe weens die adsorpsie-interaksie met die poreuse bed.

2-3-3. Droging.

Die meeste biologiese materiaal bevat 'n hoë persentasie water. Wanneer vlugtige verbindings vanuit biologiese eksemplare gemonster word, is 'n gevolg dat die waterdampinhoud van die draergas versadiging nader. Alhoewel water nie chromatografies akkumuleer op films van nie-polêre oplosmiddels nie, is die afkoeling wat veroorsaak word deur oplosmiddelverdamping by die bopunt van die konsentreerder voldoende om kondensasie van waterdruppels op die wande van die konsentreerder te veroorsaak [90]. Wanneer hierdie water vervoer word na die kapillêre kolom, vorm die water vloeistoflense wat stadig via die kolom beweeg en 'n negatiewe invloed uitoefen op die chromatografiese werkverrigting deur die stasionêre fase te beskadig en selfs ook die die vlam van die vlamionisasie detektor uit te doof.

'n Standaard praktyk om gekondenseerde water te verwyder na afloop van die monsterring van biologiese materiaal is ingevoer en bestaan daarin dat palladiumselgesuiwerde waterstof teen 'n vloeisnelheid van $12 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ deur die konsentreerderbed gestuur is vir 'n periode van 4 minute en twintig sekondes. Aangesien kwantitatiewe vergelykings getref word tussen monsters met verskillende waterinhoud, is 'n gestandaardiseerde drogingstyd ingevoer in die uitvoering van die metode. Hierdie drogingstyd (soos bo vermeld) is lank genoeg om die natste monster te kan droog en is deurgaans toegepas, sodat (enige klein) verlies vir alle monsters dieselfde is.

2-3-4. Monstering of konsentreering.

Monstering verwys hier na die akkumulering van die vlugtige geurverbindings van die biologiese monsters, op 'n n-heksaanfilm in die poreuse bed van die konsentreerder, waarna die geakkumuleerde verbindings direk na die kapillêre kolom gestuur word vir skeiding via 'n spesiale inlaat.

Monstering is uitgevoer vir 'n periode van 20 minute. Vyf vars bloeiwyses van dieselfde optimum stadium van ontwikkeling, asook hulle steeltjies waarmee hulle aan die takkies geheg was, is met behulp van 'n skoon uitgebakte tang van die onderskeie takkies verwyder en in 'n afgekoelde, uitgebakte borosilikaatglas peerfles geplaas. Gesuiwerde silinderlug is oor die bodamp van die bloeiwyses geblaas teen 'n vloeisnelheid van $12\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ by 'n temperatuur van 26°C . Sowat 2cm^3 vars gesuiwerde n-heksaan is gebruik as oplosmiddel vir die DOE. Die waterdamp wat tydens monstering in die konsentreerder gekondenseer het, is direk na afloop van die monstering vir 'n tydsduur van 4 minute en twintig sekondes weggedamp met palladiumselgesuiwerde waterstof. Hierna is die konsentreerder direk na die inlaat geneem.

2-3-5. Chromatografiese skeiding.

Chromatografiese skeidings is uitgevoer met 'n Varian 2700 GC, toegerus met 'n dinamiese oplosmiddeleffekinlaat en 'n $25\text{m} \times 0,3\text{mm}$ i.d. kapillêre kolom wat bedek is met 'n $0,4\ \mu\text{m}$ metiel-silikonfilm (SE-30).

Die aanvanklike temperatuur van die inlaat en die kolom was 40°C . Die inlaat is ballisties verhit tot 220°C nadat 'n oplosmiddelverdampingstyd bepaal is vir elk van twee konsentreerders [91]. Die kolomtemperatuur was geprogrammeer vanaf 40°C tot 220°C teen 'n tempo van $6^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die draergas was waterstof met 'n liniêre snelheid van $50 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. 'n Vlamionisasie detektor is gebruik by 'n sensitiwiteit van $8 \times 10^{-12} \text{ A}\cdot\text{mV}^{-1}$ en chromatogramme is geregistreer op 'n persoonlike rekenaar met die DAPA-sisteem ('Data Acquisition Plotting & Analysis : Software for chromatography by chemists for chemists').

HOOFSTUK 3.

BIOLOGIESE PROBLEEM:

Wat die biologiese probleem betref, is in hierdie betrokke projek ondersoek ingestel na die geurprofiel van 'n verskeidenheid van Acacia spesies waarvan interspesifieke verwantskappe bekend is. Variasies van Acacia karroo uit verskillende lokaliteite is ondersoek om a) vas te stel of daar verskille bestaan tussen die geurstowwe van die blomme van verskillende Acacia spesies en van variasies van Acacia karroo uit verskillende lokaliteite en b) om te kyk of daar enige verband bestaan tussen 'n indeling gebaseer op geurstofverskille en 'n tradisionele plantkundige indeling.

Die genus Acacia, bestaande uit 700-1000 spesies, kom wyd verspreid voor met verteenwoordigers in Afrika, Asië en Australië. Die takson is volgens Bentham ingedeel in 6 subgenera en volgens hierdie indeling ressorteer alle Suid-Afrikaanse verteenwoordigers van hierdie takson onder die twee subgenera *Vulgares* en *Gummiferae* [92]. Die onderskeiding van die twee subgenera deur Bentham is gedoen op grond van die verskil in uitbeelding van die bloeiwyse. In feitlik alle beskikbare sleutels wat van Suid-Afrikaanse Acacia soorte opgestel is, word daar in een of ander stadium gebruik gemaak van die tipe bloeiwyse as 'n taksonomiese kenmerk [93], [94], [95], [96], [97].

Soos in die inleiding gemotiveer, is dit sinvol geag om die bodamp van die geurverbindings van die Acacia blomme te analiseer (sien hfst.1). Aangesien die blomme redelik klein is en saamgegroepeer op 'n kompakte bloeiwyse voorkom, sou disseksie van die bloeiwyse , om 'n beperkte aantal blomme vir eksperimentele doeleindes te bekom, onnodige moeite en tyd verg. Boonop is die vlugtige verbindings verantwoordelik vir die unieke geur van elke Acacia spesie in lae konsentrasies teenwoordig en daarom is besluit om 'n vasgestelde aantal bloeiwyses van elke spesie

vir die studie van die geurprofile van die onderskeie spesies te gebruik.

3-1. Vooraf bevestiging van chemotaksonomiese waarde van geurprofile:

Aangesien die gebruik van vlugtige verbindingsprofile as taksonomiese karakters tot dusver nog geensins uitgetoets en aanvaar is nie, is verkies om hierdie benadering eerstens te toets aan die hand van spesies waarvan die verwantskappe bekend is.

Om as taksonomiese kriterium te kwalifiseer moet geurstowwe aan die volgende vereistes voldoen: As vlugtige geurverbindings van een spesie noukeurig en met die nodige sorg versamel word en daarna met behulp van hoëresolusie gaschromatografie geskei word, behoort die reeks chromatogramme eienskappe te vertoon (afwesigheid of teenwoordigheid van pieke, patrone van relatiewe piekareas, ensovoorts) wat ooreenstemmend tussen spesies verskil, maar nie binne 'n spesie nie.

Natuurlike en oorspronklike vlugtige geurverbindings is teenwoordig in intakte weefsel, terwyl addisionele verbindings gevorm word wanneer die plantmateriaal versteur word soos tydens homogenisering, distillasie en ekstraksie. Hierdie addisionele vlugtige geurverbindings word gevorm deur verskeie ongekontroleerde ensiematiese prosesse. Artifakte kan ontstaan as gevolg van chemiese ontbinding of as gevolg van reaksies tydens die isolasie-proses. Aangesien natuurlike geure, soos blomgeure, uit verskeie vlugtige verbindings saamgestel is en in lae konsentrasies voorkom, is besluit om die bodamp van die ongeskonde blomme te konsentreer en te analiseer met die dinamiese oplosmiddeleffek.

Om te toets of die dinamiese oplosmiddeleffek 'n geskikte tegniek is om chemotaksonomiese verskille tussen Acacia spesies te kan

aandui, via konsentrerings van bodamp geurverbindinge afkomstig van die bloeiwyses en gaschromatografiese ontleding, is drie verskillende Acacia spesies aanvanklik vir die ondersoek gekies.

Acacia tenuispina en Acacia karroo groei saam op die Springbokvlakte (10 km Noord van die Pienaarsrivier) en geniet gevolglik identiese grondtoestande en klimaat. Acacia karroo is 'n bladwisselende struik met 'n hoogte van 1-1,5m. Die hofievormige bloeiwyses is saamgestel uit welriekende, heldergeel klein blommetjies wat vanaf November tot Februarie verskyn. Acacia tenuispina is 'n bladwisselende struik van ongeveer 1-1,5m hoog. Morfologies vertoon hierdie twee spesies redelik eenders en het beide ook opvallende heldergeel hofievormige bloeiwyses, maar kan maklik onderskei word vanweë kenmerkende kliertjies wat op die takkies, blare en peule van Acacia tenuispina voorkom en 'n klewerige substans sekreteer. Blommetjies verskyn vanaf November tot Februarie.

Die derde keuse het geval op Acacia ataxacantha wat in die Pretoria-Oos omgewing aangeplant is. Acacia ataxacantha is 'n kragtige leunplant, maar kan as boom 'n hoogte van tot 15 m bereik. Klein blommetjies kom saamgepak voor in digte, roomkleurige silindriese are met 'n lengte van ongeveer 10 cm lank. Die plante blom gedurende November tot Februarie.

Seleksie van geskikte biologiese materiaal is baie belangrik. Besoedelde, besmette, verouderde en bedorwe materiaal is totaal onaanvaarbaar en is ten alle koste vermy. In die totale analitiese proses is monsterversameling en voorbereiding die mees kritiese stappe en geen gesofistikeerde instrumentele tegniek of 'n hoë vlak van dataprozessering kan vergoed vir foute wat tydens vroeë analitiese stappe gemaak is, of vergoed vir minderwaardige biologiese materiaal nie.

Bloeiwyses wat geanaliseer word, moet biologies homogeen wees ten opsigte van dieselfde stadium van ontwikkeling. Aangesien dit moeilik is om presiese stadia vas te stel, is bloeiwyses van "optimum ontwikkeling" deurgaans vir analyses uitgesoek. Met "optimum" ontwikkeling word bedoel, bloeiwyses wat visueel gesond en intakt vertoon en waarvan die meeste blomme oop en vars is.

Biologiese materiaal moet ook korrek hanteer en geberg word. Artifakte moet waar moontlik, vermy word. Artifakte kan insluip deur per ongeluk 'n monster vreemde materiaal (bv. kakiebos), by die biologiese materiaal wat ondersoek word, te voeg; die verlies van vlugtige geurverbindinge en die verandering van biologiese materiaal-komponente tot komponente wat nie oorspronklik teenwoordig was nie. Soms kan insekte teenwoordig wees en hulle karakteristieke vlugtige geurverbindinge kan problematies bydra tot die totale geurprofiel.

Met die aanvang van die betrokke projek het heelwat praktiese probleme opgeduik. Basies sentreer hierdie probleme rondom monsteringskondisies.

Die eerste vraag wat na vore getree het, was of daar enige noemenswaardige verskil in geurprofiel intree deur die bloeiwyse vanaf die boom te verwyder en die bodamp in die laboratorium te akkumuleer, teenoor monstering direk aan die boom. Tydens konsentrering van die vlugtige geurverbindinge moet sekere vereistes nagekom word. Die bloeiwyse moet in 'n geslote glashouer wees om die effek van die omringende atmosfeer te elimineer. Die buite-atmosfeer bevat verskeie vlugtige komponente wat steurings in die oorspronklike geurprofiel van die bloeiwyse kan veroorsaak.

Gewone laboratoriumlug vertoon ook kontaminante in lae konsentrasie, wanneer gaschromatografies geanaliseer word. In die veld is die probleem veel erger - veral in die direkte atmosfeer waar

die bloeiwyse geëposisioneer is, vanweë verskeie addisionele bloeiwyses en ander plante, wat vlugtige geurverbindinge in die atmosfeer vrystel.

Die morfologie van die bloeiwyse van die genus Acacia bemoeilik pogings om monstereing uit te voer terwyl die bloeiwyse intakt aan die boom is. As gevolg van kort bloeistele is die bloeiwyse betreklik dig teen die tak geheg. Hierdie faktor bemoeilik die ontwerp van glasware wat enersyds lugdig behoort te seël en terselfdertyd die hele bloeiwyse, geïsoleer van die takkie, kan omsluit. Selfs al sou die takkie met aluminiumfoelie omwind word in 'n poging om die vrystelling van vlugtige geurverbindinge vanaf die takkie self te isoleer, is dit nie voldoende nie. Die bloeiwyse kon dus nie lugdig in die glashouer verseël word nie. Indien die seël nie lugdig is nie, sal die vloeiensnelheid van die koolstofgesuiwerde lug wat tydens konsentriereing van die bodamp oor die bloeiwyse geblaas word, nie konstant gereguleer word nie.

Vanweë steurende vlugtige verbindinge wat vrygestel word, kan geen seëllaar soos 'prestik' of rubberproppe gebruik word om die glashouer lugdig te seël nie.

Die enigste opsie was dus om die bloeiwyse met takkie en al, met behulp van 'n skoon tang en minimum beskadiging, van die boom te verwyder en direk na die labaratorium in 'n skoon glasbeker met 'n klein hoeveelheid gedistilleerde water te vervoer. Dit vergemaklik verder die taak aansienlik om konsentriereing in die laboratorium uit te voer.

Houers vir vervoer, bewaring en monstereing moet inert wees. Glashouers is voor gebruik met 'n oplossing chroomsuur behandel, met gedistilleerde water en asetoon afgespoel en hierna in 'n oond by 200°C uitgebak. Borosilikaatglas kan by 'n temperatuur van 450°C uitgebak word om sodoende alle organiese en silikoon-kontaminante te oksideer.

Polimeermateriaal soos sakkies, plastiekproppe, parafilm, sili-konghries, ensovoorts, moet as gevolg van neweprodukte en additiewe soos plastiseerders en residuele monomere wat dit bevat, ten alle koste vermy word. Polimeermateriaal het ook absorberende eienskappe en kan vlugtige verbindings vanuit die lug, of van biologiese materiaal wat voorheen daarin gehou is, absorbeer en kan sodoende bydra tot kontaminasie van die monster wat ondersoek word.

Die bloeiwyse word aan die takkie gelaat, sodat vlugtige geur-verbindings nog metabolies geproduseer kan word.

Daar is bevind dat berging van biologiese materiaal in 'n yskas onwenslik is vanweë absorpsie van onwenslike geurverbindings. Berging by kamertemperatuur is voldoende. Indien die bloeiwyses bevries sou word met soliede koolstofdioksied, word ongewenste resultate verkry wat daarop dui dat vermenging van komponente plaasvind, skynbaar as gevolg van selmembrane wat bars. Wanneer bodamp-analises van sodanige monster na ontdooiing uitgevoer word, verskil die chromatogram totaal van die chromatogram wat sonder bevriësing met soliede koolstofdioksied, verkry is.

Vars biologiese materiaal is vir 'n kort periode per dag by kamertemperatuur bewaar. Tydens berging is die vertrek nie goed geventileer nie, maar wel na berging om enige agtergeblewe aroma weg te voer.

Deur versigtig te beplan, is probeer om vars biologiese materiaal op dieselfde tyd van die dag in te samel en die tydsduur tussen afpluk en monsterring, so kort moontlik te hou.

Verskeie aspekte van biologiese variasie is ondersoek. Bodamp-analises van bloeiwyses van dieselfde tak, van dieselfde boom, op dieselfde dag versamel, het getoon dat interblomvariasie gering

is. Intertakvariasie (bloeiwyses van dieselfde boom, verskillende takke, op dieselfde dag gepluk, gekonsentreer en geanaliseer) toon ook geen noemenswaardige verskille nie. Interdagvariasie (bloeiwyses van dieselfde boom, afkomstig van verskillende takke, op verskillende dae versamel en geanaliseer) blyk ook weglaatbaar te wees.

Reën affekteer die kwaliteit en kwantiteit van bloeiwyses nadelig en gevolglik is klam of natgereënde biologiese monsters vermy - ook vanweë gaschromatografiese probleme wat sulke monsters lewer.

Alle monsters wat van die gekose Acacia spesies versamel is, is voor analise deur prof. P.J. Robbertse geïdentifiseer, terwyl gedeeltes van die monsters ook by die UP-herbarium ingedien is.

Vir elke analise is die vlugtige geurverbindinge van 5 bloeiwyses met steeltjies met behulp van die dinamiese oplosmiddeleffek gekonsentreer. Die bloeiwyses is verteenwoordigend van verskillende takke van dieselfde boom. Vir elke daaropvolgende analise is bloeiwyses van 'n volgende boom van dieselfde spesie gebruik. Vir elk van die drie Acacia spesies is gemiddeld sewe analises uitgevoer, waarvan elke analise verteenwoordigend is van 'n verskillende boom van dieselfde spesie uit dieselfde omgewing.

Ooglopende verskille tussen die drie spesies (voorstudie) kon verkry word, terwyl chromatogramme binne 'n spesie opvallend ooreenkom. Hierdie visuele waarneming is bevestig met die statistiekprogram (soos beskryf in hoofstuk 5-1 en 5-2). Hierdie voorlopige sukses het die metode van bodamp-analise, monstervoorbereiding en statistiese verwerking van chromatografiese data bekragtig en het aanleiding gegee tot die verdere detail-ondersoek na ander Acacia spesies (sien 3-1) (vir die resultate - sien hoofstuk 5-2 figure 17 - 21). Die GC - dinamiese oplosmiddeleffekmetode is beskryf in hoofstuk 2-3.

3-2. Spesifieke probleemarea: Acacia karroo

Coates Palgrave [96] beskryf Acacia karroo as 'n inheemse bladwisselende boom wat 'n hoogte van tot 15m kan bereik. In die tydperk vanaf November tot Februarie kan die boom verskeie kere blom. Die heldergeel blommetjies kom saamgepak voor in poeierkwasbloeiwyses van 1,3 cm in deursnee en verskaf 'n welriekende aroma, tipies van die soetdoring, soos dit in die volksmond bekend staan. Na 'n reënstorm verwelk en bederf die blomme dadelik en dit kan tot 10 dae neem voordat nuwe blomme uitbot.

In hierdie betrokke projek is ondersoek ingestel na Acacia karroo van drie verskillende lokaliteite, nl. a) Roossenekal (Steel-poort) ; b) op die Springbokvlakte, 10 km noord van Pienaarsrivier digby Warmbad; en c) Pretoria-Oos omgewing. Volgens Brain [98] is Acacia karroo van Roossenekal, geneties ver van alle ander lokaliteite. Morfologiese gegewens ondersteun hierdie siening, want hierdie bladwisselende bome met 'n hoogte van tot 8 m is oortrek met gryskleurige kort haartjies op blare en takkies, sodat dit die indruk skep van 'n gryskleurige boom. Die heldergeel poeierkwasbloeiwyses vertoon ook meer donsиг as in vergelyking met plante van ander lokaliteite. Acacia karroo van die Springbokvlakte is 'n redelik vertakte struik van 1-1,5 m hoog, met heldergeel poeierkwasbloeiwyses wat verskyn vanaf November tot Februarie.

Acacia karroo van Pretoria-Oos omgewing is 'n kleinerige (8 m) bladwisselende boom met spreierende, ronderige kroon en laagvertakkende stam. Welriekende heldergeel poeierkwasbloeiwyses verskyn vanaf November tot Februarie.

Bodamp-analises van die geurverbindinge van 5 vars bloeiwyses van elke lokaliteit is telkens uitgevoer met die dinamiese oplosmiddeleffek. Na afloop van die analises is die chromatogramme met mekaar vergelyk deur middel van superponering. Pieknommers is

toegeken volgens die manier wat in die volgende hoofstuk in detail beskryf word. Die data is statisties verwerk. SAS CANDISC pakket is gebruik. Vervolgens is 'n verspreidingsdiagram geteken van die variasies van Acacia karroo uit die verskeie lokaliteite (sien p.82 figuur 5-22).

3-3. Addisionele lede van die genus Acacia.

Vervolgens is ondersoek ingestel na nog 16 beskikbare Acacia spesies wat in die Nasionale Botaniese Tuin en op die kampus van die Universiteit van Pretoria aangeplant is en waarvan sommige natuurlik voorkom.

Hierdie 16 spesies behoort tot die twee subgenera *Vulgares* en *Gummiferae*. Die hoofverskil tussen die bloeiwyses van bogenoemde, is dat die bloeiwyses van *Gummiferae* hofievormig is en daar 'n omwindseltjie van skutblare op die bloeisteel voorkom. Die steunblare is omvorm tot dorings. By die subgenus *Vulgares* is die bloeiwyse aarvormig, sonder skutblare op die bloeisteel. Die steunblare is membraanagtig en haakdorings wat nie steunblare is nie, kom voor op die stingels.

Die tipe bloeiwyse as 'n taksonomiese kenmerk word dikwels in die literatuur gebruik (sien die begin van hoofstuk 3). Bloeiwyses van die genus Acacia kom gegroepeerd aan die punte of basisse van takke voor. Op grond van die kenmerk, onderskei Robbertse [97] verskillende tipes bloeisisteme waar 'n bloeisisteam 'n tak met groepe bloeiwyse daarop verteenwoordig. By bloeisisteme 1 en 3 (figuur 3-1) kom die bloeiwyses aan die punte van lang takke voor. Bloeiwyses kan nie gevorm word voordat die tak eers 'n ent uitgegroeï het nie. Daarom blom die soorte met hierdie bloeisisteam eers later in die seisoen (Oktober-April).

By bloeisisteme 2 en 4 word die bloeiwyses op gedronge takke gedra en kan die bloeiwyses direk na die winter uitgroeï. Die

blomtyd is vanaf Augustus tot in die begin van Oktober.

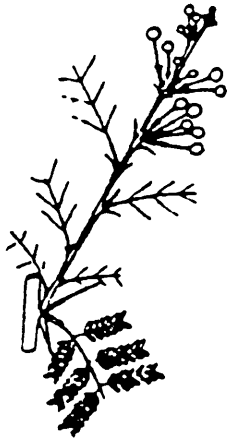
By sekere Vulgares-soorte soos A.galpinii en A.nigrescens (tipe 4), verskyn die blomme lank voordat die blare verskyn het, omdat die bloeiwyses slegs op die gedronge primêre pluimas gedra word.

By A.caffra (variasies van tipe 4) en A.erubescens (variasies van tipe 4) dra die gedronge primêre pluimas ook 'n aantal blare op die punt. Hierdie blare verskyn saam of net na die bloeiwyses.

By bloeisisstiem tipe 2 verskyn bloeiwyses van A.robusta en A.xanthophloea saam of net kort voor die blare, op die gedronge pluimas. By A.hebeclada verskyn die blare net na die bloeiwyses.

Weens bogenoemde verskille varieër die blomtye. Plante wat gedurende die begin van die seisoen blom, trek moontlik 'n ander verskeidenheid insekte vir bestuiwing aan as die plante wat later in die seisoen blom. Geurstowwe speel 'n belangrike rol by die aanlok van insekte wat die blomme bestuif. Dit mag wees dat geurstowwe van vroeë- en laatblommende spesies verskil en verband hou met insekte wat vir bestuiwing verantwoordelik is.

Fig 3-1. Groepering van Acacia spesies (volgens die tipe bloeisisteen) wat vir hierdie ondersoek gebruik is: [97].



Tipe 1	Tipe2	Tipe3	Tipe4
Gummiferae	Gummiferae	Vulgares	Vulgares
Wit/Roomkleurige blomme:	Geel blomme:	Roomkleurige blomme:	Roomkleurige blomme:
<u>A.grandicornuta</u>	<u>A.xanthophloea</u>	<u>A.polyacantha</u>	<u>A.galpinii</u>
<u>A.sieberiana</u>			
<u>var. woodii</u>	<u>A.erioloba</u>	<u>A.ataxacantha</u>	<u>A.nigrescens</u>
<u>A.luederitzii</u>			
<u>var.luederitzii</u>	Wit blomme:		
<u>A.luederitzii var.</u>	<u>A.robusta</u>		<u>A.erubescens</u>
<u>retinens</u>	<u>A.hebeclada</u>		<u>A.caffra</u>
Geel blomme:			
<u>A.davyi</u>			
<u>A.nilotica</u>			
<u>A.karoo</u>			
<u>A.swazica</u>			
<u>A.tenuispina</u>			
<u>A.exuvialis</u>			

Gas-chromatografiese analises is uitgevoer soos beskryf in hoofstuk 2-3. Die verkrygte data is statisties verwerk soos beskryf in hoofstuk 4-1-2 en 4-2-1.

4. STATISTIEK:

4-1. Patroonherkenning.

Patroonherkenning is 'n vertakking van kunsmatige intelligensie en het begin as 'n versameling van rekenaartoerusting om klassifikasieprobleme in 'n verskeidenheid areas op te los. Om te kompeteer met die menslike vermoë om patrone in twee tot drie dimensies te herken, is redelik moeilik aangesien die mens 'n formidabele patroonherkenner is in hierdie domein. Mense kan maklik voorwerpe herken of persone eien, terwyl dieselfde funksie moeilik reproduseerbaar is deur rekenaars. In terme van groot tabelle getalle, met baie monsters en baie afmetings, is die menslike vermoë om die patrone in die data raak te sien, egter minder goed. 'n Klassieke voorbeeld en terselfdertyd een van die vroegste gebruike van patroonherkenning was die herkenning van handgeskrewe en gedrukte alfanumeriese karakters. Herkenning van spraak by verskillende sprekers, identifikasie van vingerafdrukke, radar- en sonarseinprosesserings, elektrokardiogram analises, weervoorspelling en analises van die aandelemark is verdere toepassingsvelde van patroonherkenning.

In die veld van gaschromatografie, kan na die herkenbare patroon van pieke, wat die verskeie chemiese verbindings in 'n monster verteenwoordig, verwys word as 'n vingerafdruk. In bodampgaschromatografie kan hierdie vingerafdrukke geassosieer word met die geurprofiel van 'n monster. 'n Vingerafdruk kan ook die teenwoordigheid van unieke nuwe bestanddele wat tipies is vir elke geanaliseerde spesie, beteken. Met behulp van 'n vingerafdruk kan komponente in een of ander suiwer enantiomeriese vorm opgespoor word en so bydra tot spesifisiteit [99].

Die chromatogramme van verskeie materiale, verdowingsmiddels, dele van lewende organismes en hulle metaboliese produkte is so

kenmerkend dat hulle as vingerafdrukke kan dien om monsters eenduidig uit te ken, sonder chemiese identifikasie van die individuele pieke. Die tegniek van vingerafdrukherkenning verdien groter toepassing in alle areas van chromatografie [100], [101].

Ter wille van 'n duideliker begrip van terminologie is dit miskien wenslik om na 'n paar begrippe te verwys. Wanneer in statistiek verwys word na 'n versameling van voorwerpe, word inderwaarheid verwys na die monsters geneem om 'n sisteem te verteenwoordig, bv. chemiese verbindings, watermonsters, proteïenmolekules of mense, terwyl 'n veranderlike 'n faset of 'n aspek is van die monster wat gemeet word en wat op een van die asse in 'n n-dimensionele ruimte voorgestel kan word. 'n Meting is die eksperimenteel bepaalde waarde vir 'n veranderlike wat gebruik is om monsters te karakteriseer. 'n Veranderlike kan byvoorbeeld die ysterkonsentrasie in 'n monster, die brekingsindeks, die smeltingswarmte of die absorpsie by 254 nm. wees.

Die sukses van patroonherkenningstudies hang af van 'n aantal aannames. Natuurlik word meervoudige monsters van 'n sisteem, met meervoudige metings, op elke monster vereis. Vir sommige tegnieke moet die sisteem goed oorbepaal word, dit is, die verhouding van die getal monsters tot die getal metings, behoort ten minste drie te wees. Verder opereer hierdie tegnieke onder die aanname dat die nabyheid van punte in n-dimensionele ruimte, die enersheid van die eienskappe van die monsters getrou reflekteer. Die data kan gerangskik word in 'n datamatriks met een ry per monster, en die inskrywings van elke ry dus die metings op elke monster. Die informasie nodig om vrae te kan beantwoord moet implisiet vervat wees in die datamatriks en die dataverteenwoordiging moet aanpasbaar wees met patroonherkenningsalgoritmes wat gebruik word [102].

Ongeag die tipe toepassing is daar 'n sentrale doel en strategie wat gemeenskaplik is aan alle patroonherkenningsanalises, naamlik

om uit 'n gegewe stel voorwerpe met 'n verteenwoordigende stel metings van elke voorwerp, 'n eienskap van die voorwerp te voorspel, wat opsigself nie direk meetbaar is nie. Hierdie eienskap is egter indirek verwant aan die metings via 'n onbekende of onbepaalde verhouding [103].

Eienskappe wat nie direk meetbaar is nie, is byvoorbeeld die kwaliteit van die produk, die bron van die materiaal of die impak van besoedeling op die omgewing. Dit is dikwels wenslik om 'n eienskap te voorspel op 'n vroeë stadium selfs al is dit nie altyd moontlik om dit te meet nie, byvoorbeeld om die werksverrigting van 'n meganiese deel te voorspel via nie-destruktiwe analise, of die voorspelling van die gebruiker se aanvaarding van 'n produk nog voordat die produk op die mark is; biologiese aktiwiteit van 'n organiese molekule voordat die molekule gesintetiseer is, of die teenwoordigheid van 'n siekte-toestand by 'n persoon voor diagnose.

Voorafprosesseringstegnieke is ontwerp om data te omskep in die beste verteenwoordiging van inligting in die konteks van die studie. Die data-analise mag besluit om die verwerkte data te vertoon in 2-dimensies of met rekenaargrafieke, moontlik 3-dimensies vir menslike inspeksie maar steeds word die maksimum hoeveelheid inligting omtrent die struktuur van die databasis bewaar soos dit bestaan in 'n n-dimensionele ruimte. 'Unsupervised learning' verwys na die metodes wat geen vooraf aanname maak omtrent kategorie-lidmaatskap van die monsters nie, maar eerder die analise help om intrinsieke groepe of patrone in die data te ontdek. Omgekeerd hiervan "leer" 'supervised learning' die rekenaar om monsters optimaal te klassifiseer, gebaseer op vooraf kennis omtrent die kategorie-lidmaatskap. Die doel van so 'n studie is om 'n klassifikasieëel of algoritmes te ontwikkel in 'n poging om die korrektheid van die klassifikasie te toets of om in staat te wees om 'n onbekende waarneming te klassifiseer [104].

Behalwe dat 'n navorser graag sal wil voorspel tot watter kategorie 'n item behoort, mag die navorser selfs bereken watter van die verskeie veranderlikes die meeste bydra tot die diskriminant koëffisiënte, nadat hulle gestandaardiseer is [105].

4-1-1. Enkele praktiese toepassings van meervoudige analises op chemiese probleme:

Statistiese metodes soos patroonherkenning wat bestaan uit empiriese KMR-spektrum-struktuur korrelasies, bied 'n vinnige klassifikasie van die onbekende verbinding tot 'n gegewe chemiese familie. Die beginsel van patroonherkenningsmetodes bestaan uit 'n empiriese klassifikasie van 'n verbinding - met 'n meetbare eienskap wat ooreenstem met n spesifieke strukturele eienskap - binne 'n reeks referensieverbindings verteenwoordig deur punte in 'n n-dimensionele ruimte. Hoe meer verbindings ooreenstem, hoe nader aan mekaar is hulle in die n-dimensionele ruimte [106].

In die literatuur is gevind dat meervoudige regressieanalises, hoofkomponentanalises en groeperingsanalises onder andere gebruik is om die verwantskappe tussen die gaschromatografiese profiele en aromakarakteristieke van sojasous te ondersoek [107]. Hierdie groepering van die twee kanoniese veranderlikes het dieselfde tendens aangetoon (soos gevind in sensoriese analises), naamlik dat die verskil in kwaliteit en die handelsmerkkarakteristieke bykans ekwivalent is in die gaschromatografiese profiele wat essensiële inligting van die aromakwaliteit van sojasous bevat [108]. 'n Vergelyking van hierdie aromapatrone kon ooreenkomste en verskille in die aromakwaliteit van sojasous gemaklik aantoon [109].

Bodamp-analises kan op roetine basis aangewend word deur middel van patroonherkenning [110], [111], [112], [113], onder andere vir kwaliteitsbeheer van plante.

In 1978 het 'n artikel van Rapp et al. verskyn waar met behulp kapillêre gaschromatografiese ondersoeke van rieslingdruive getoon is dat onafhanklik van die geografie/ligging, die variëteit-spesifieke aromasamestelling (vingerafdrukpatroon) duidelik uitgewys kon word. Kwantitatiewe fyn patrone, verantwoordelik vir die tipiese karakter van die bepaalde streek (soos gekondisioneer deur ligging, grond en klimaat) asook verskillende graad van volwassenheid, kan binne hierdie aromapatrone herken word. Wanneer hierdie kultivar vergelyk word met 'n ander kultivar, kan gesien word dat sekere belangrike, alreeds geselekteerde bestanddele, geskik is vir karakterisering van die variëteite, onafhanklik van graad van volwassenheid of ligging. Hierdie belangrike getuienis is aangetoon met behulp van multivariante diskriminantanalise. Deur hierdie aromagramme van wynsoorte van verskillende variëteite te vergelyk kon Rapp et al. insiggewende verskille aantoon in die aroma-samestelling (vingerafdrukpatroon) [20].

Lineêre diskriminantanalise is onder andere gebruik in petrochemiese navorsing en gevolglik kon brandstofkontaminante deur middel van infrarooipatrone gekarakteriseer word. In 'n ander geval is gebruik gemaak van hoofkomponentanalise in die ondersoek van wynkwaliteit, terwyl hiërarchiese groeperingsanalise suksesvol aangewend kon word in analyses van gaschromatografiese pirolise-profiële van oligosakkariede [114].

4-1-2. Chemotaksonomiese probleem: Acacia.

As vlugtige geurverbindinge van een spesie noukeurig en met die nodige sorg versamel word en daarna geskei word met behulp van hoëresolusie GC, behoort die reeks chromatogramme, eienskappe te vertoon (byvoorbeeld die aanwesigheid of afwesigheid van pieke, patrone van relatiewe piekareas, ensovoorts.) wat ooreenstem binne 'n spesie, maar verskil tussen spesies. Hierdie ooreenkomste word visueel waargeneem in die chromatogramme (sien

hoofstuk 5-1 en 5-2).

'n Waarneming (chromatogram) van elke monster verskaf die data benodig vir die opstel van die matriks. Bodampmonsters word beskou as die "voorwerpe", terwyl die gekose pieke die meetbare eienskappe verteenwoordig en piekoppervlaktes die ' metings ' van elke veranderlike verteenwoordig.

In die geval van hierdie betrokke projek kon daar nie eksplisiet gebruik gemaak word van retensietye om piektoekennings te maak nie, want alhoewel piekpatrone van chromatogramme visueel vergelykbaar is, is die pieke op verskillende retensietye geregistreer. Verskeie faktore speel 'n rol by retensietye wat varieer by monsters van dieselfde standaard, onder identiese toestande. Faktore wat 'n rol speel is onder andere, dat die temperatuurgradiënt van 'n verouderde gaschromatograaf en die verdampingstyd van die oplosmiddel nie presies herhaalbaar is nie.

Patroonherkenning is dus uitgevoer sonder om noodwendig identifikasie van die verbindings te doen deur middel van GC/MS. Superponering is aangewend om chromatogrampeke en piekpatrone van die verskeie spesies met mekaar te vergelyk. Dieselfde pieknommers is toegeken aan pieke, dwarsdeur die reeks chromatogramme, wat tydens superponering dieselfde piekposisie het. Oppervlakkig gesien, word die aanname gemaak dat pieke met dieselfde pieknommer dus dieselfde verbinding verteenwoordig. Soos die navorser egter ook bewus is, kan hierdie punt aanvegbaar wees, want die vraag kan ontstaan of aannames ten opsigte van die piekidentiteit gemaak mag word sonder massaspetrometriese bevestiging. Dit is verder belangrik om daarop te let dat die uiteindelijke resultate dui op 'n werkbare metode van pieknommertoekenning ; nie dat die pieke met soortgelyke nommers noodwendig dieselfde verbinding verteenwoordig nie.

nommertoekenning ; nie dat die pieke met soortgelyke nommers noodwendig dieselfde verbinding verteenwoordig nie.

Tydens die navorsingsprojek is 'n stadium bereik waar die gaschromatografiese analyses afgehandel was en die data statisties verwerk moes word. Ten spyte van 'n verskeidenheid beskikbare statistiekpakkette en 'n verwarrende aantal meervoudige analisetegnieke wat in die literatuur aangetref word (sien 4-1-1 vir statistiekvoorbeelde), was dit uit die oogpunt van 'n chemikus moeilik om 'n keuse uit te oefen oor watter pakket wetenskaplik die mees geskikte sou wees vir die betrokke doel.

4-2. Statistiekprogram:

Daar is by die Departement Statistiek om hulp aangeklop om 'n korrekte statistiekpakket te kies vir hierdie betrokke projek. Hier volg 'n uiteensetting volgens die persoonlike mededeling van mnr. H.P. Wolmarans (verbonde aan die Departement Statistiek aan die Universiteit van Pretoria).

Meerveranderlike vergelykingstegnieke:

Sommige meerveranderlike tegnieke ondersoek verwantskappe tussen veranderlikes sonder om sommige van die veranderlikes as afhanklik te klassifiseer, byvoorbeeld hoofkomponent-analise en faktoranalise. Waar een of meer van die veranderlikes wel as afhanklik geklassifiseer word, kan verder 'n onderskeid gemaak word tussen tegnieke waar daardie veranderlike op 'n kontinue skaal gemeet kan word (byvoorbeeld by meervoudige regressie), en tegnieke waar die afhanklike veranderlike in een van verskeie kategorieë geklassifiseer kan word (byvoorbeeld diskriminantanalise). Aan die ander kant, indien klassifikasie van die waarnemings nie vooraf bekend is nie, kan groeperingsanalise gebruik word om die waarnemings in

groepe te plaas op so 'n wyse dat die elemente binne 'n groep in 'n sekere sin soortgelyk is, terwyl die elemente in verskillende groepe van mekaar verskil.

Vervolgens sal aan verskillende prosedures wat binne die rekenaartaal SAS ('Statistical Analysis Systems') vir meerveranderlike analise beskikbaar is, aandag gegee word. Eerstens sal die belangrikste verskille tussen hoofkomponentanalise en faktoranalise aangetoon word, tweedens sal verskillende metodes van diskriminantanalise beskou word en derdens sal ook na groeperingsanalise gekyk word [115].

a) Hoofkomponentanalise, faktoranalise en korrelasie-koëffisiënte:

Onder die tegnieke waarvolgens verhoudings tussen veranderlikes ondersoek word sonder om een of meer van die veranderlikes as afhanklik te klassifiseer, ressorteer ook hoofkomponentanalise, faktoranalise, kanoniese korrelasie-analise en die berekening van korrelasiekoëffisiënte. 'n Kort beskrywing van elk van die prosedures waarvolgens hierdie tegnieke toegepas word, volg.

Prosedure CORR is seker die prosedure van bogenoemde vier wat die meeste gebruik word, deurdat dit aangewend kan word om Pearson se korrelasiekoëffisiënt vir elk van 'n stel veranderlikes met elke veranderlike te bereken. Sodanige koëffisiënt is 'n maatstaf van die lineêre verwantskap tussen enige twee veranderlikes, en omdat hierdie prosedure streng gesproke, elke veranderlike afsonderlik beskou, sou beweer kon word dat dit nie eintlik 'n meerveranderlike prosedure is nie. Omdat die volgende prosedure egter meerveranderlik van aard is, en voortbou op prosedure CORR, sou hierdie prosedure wel hier genoem kan word.

Prosedure CANCORR het ten doel om die verwantskap tussen twee stelle veranderlikes te verduidelik en op te som deur middel van 'n kanoniese korrelasie-analise. Dit word bewerkstellig deur 'n relatief klein aantal linieëre kombinasies van elke stel veranderlikes te vind wat die hoogste moontlike korrelasies tussen die twee stelle het. Die gevolglike stip van die kanoniese veranderlikes (verspreidingsdiagram), kan handig wees by die ondersoek van meervoudige afhanklikheid tussen die stelle veranderlikes.

Prosedure PRINCOMP voer 'n hoofkomponentanalise uit en het as uitvoer, gestandaardiseerde en ongestandaardiseerde hoofkomponenttellings.

Prosedure FACTOR voer beide 'n hoofkomponentanalise en 'n algemene faktoranalise met rotasies uit en het as uitvoer, gestandaardiseerde komponenttellings of beramings van algemene faktortellings.

By 'n vergelyking van PRINCOMP met FACTOR het PRINCOMP die volgende voordele: PRINCOMP is makliker om te gebruik en is vinniger as slegs 'n klein aantal komponente vereis word. Aan die ander kant het FACTOR die volgende voordele as dit met PRINCOMP vergelyk word : FACTOR doen rotasies van asse, het meer uitvoere as PRINCOMP waarby 'n aantal visuele voorstellings ingesluit is, en FACTOR het laastens ook opsies om matrikse in makliker interpreteerbare vorm te druk.

b) Prosedures vir diskriminantanalise:

Die prosedures wat binne SAS beskikbaar is vir diskriminantanalise is geskik vir data met een klassifikasie-veranderlike en verskeie kwantitatiewe veranderlikes. Diskriminantanalise het een van die volgende ten doel:

- i) die bepaling van 'n wiskundige reël oftewel diskriminantfunksie om te beraam aan welke klas 'n waarneming tuishoort, slegs gebaseer op die kwantitatiewe veranderlikes;
- ii) die vind van 'n stel lineêre kombinasies van die kwantitatiewe veranderlikes wat die verskil tussen klasse die beste aantoon; of
- iii) die vind van 'n subversameling kwantitatiewe veranderlikes wat die verskille tussen die groepe die beste aantoon.

Die prosedure wat binne SAS vir diskriminantanalise beskikbaar is, sal vervolgens kortliks bespreek word.

Prosedure DISCRIM klassifiseer waarnemings terwyl 'n meer-veranderlike normaalverdeling binne elke klas veronderstel word. Hierdie prosedure is geskik vir gevalle waar die binnegroep verdelings benaderd normaal is. Die kovariansiematrikse binne klasse mag verder gelyk of ongelyk wees.

Prosedure NEIGHBOR klassifiseer waarnemings deur middel van 'n nie-parametriese "nearest-neighbor" metode. Hierdie prosedure behoort slegs gebruik te word as die klasse beslis nie normaal verdeel is nie.

Prosedure STEPDISC gebruik stapsgewyse seleksie of terugwaartse eliminasië om 'n subversameling van

veranderlikes te probeer vind wat die verskille tussen die klasse die beste uitwys. Nadat 'n subversameling veranderlikes met behulp van hierdie prosedure uitgesoek is, kan enige van die ander diskriminantprosedures gebruik word om meer detail te verkry.

Prosedure CANDISC voer 'n kanoniese analise uit om linieêre kombinasies van die veranderlikes te vind wat die verskille tussen die klasse die beste opsom. Kanoniese diskriminant-analise is 'n tegniek waarvolgens die dimensies van 'n datastel verminder word en wat verwant is aan hoofkomponentanalise en kanoniese korrelasie. Hierdie prosedure het ook as uitvoer 'n visuele voorstelling in die vorm van 'n verspreidingsdiagram van die belangrikste kanoniese faktore per waarneming, wat nie by enige van die ander diskriminant-prosedures moontlik is nie.

Al bogenoemde prosedures wat gebruik kan word om diskriminantanalise mee uit te voer, gebruik 'n maatstaf van inligting van die klasse wat vooraf beskikbaar is. In hierdie opsig moet diskriminantanalise nie verwar word met groepeeringsanalise (oftewel "cluster analysis") waar vooraf kennis van die klasse nie nodig is nie.

c) Groepeeringsanalise ("Cluster analysis").

Die doel van groepeeringsanalise is om die waarnemings in groepe te klassifiseer soos uit die data na vore kom, sonder dat vooraf kennis gebruik word. Hierdie klassifikasie word op so 'n wyse gedoen dat die elemente in elke groep op 'n sekere wyse soortgelyk aan mekaar is, terwyl elemente in verskillende groepe van mekaar verskil.

d) Samevatting.

Die volgende vraag wat beantwoord moet word, is welke van bogenoemde tegnieke oftewel prosedures, aangewese is vir die studie waarvan hierdie afdeling deel uitmaak. Die data wat immers hier beskou word, is waar inligting oor 'n aantal pieke (kwantitatiewe data) per spesie (oftewel waarneming) beskikbaar is, terwyl die spesie self as 'n enkele simbool voorgestel word. Die doel is om die spesies te klassifiseer volgens die verskille / ooreenkomste wat tussen pieke van verskillende spesies bestaan.

Dit is duidelik dat hoofkomponentanalise en faktoranalise nie hiervoor geskik is nie, en net so blyk groeperingsanalise nie die aangewese tegniek te wees nie, omdat die spesies alreeds bekend is. Die oplossing moet deur middel van diskriminantanalise gesoek word.

Binne die prosedures wat diskriminantanalise ten doel het blyk kanoniese diskriminantanalise eerder die antwoord te wees as enige ander tegniek, omdat 'n visuele voorstelling deur CANDISC moontlik is, terwyl die voordele van hoofkomponentanalise en kanoniese korrelasie ook hierdeur na vore kom.

4-2-1. Praktiese oplossing:

'n Standaard statistiekpakket wat 'n kanoniese diskriminantanalise in die SAS rekenaartaal uitvoer is gebruik om met behulp van die piekwaardes van elke chromatogram 'n meerveranderlike analise uit te voer. Volgens hierdie pakket word die waarnemings in 'n datastel in duidelik onderskeibare groepe verdeel en die koëffisiënte van die veranderlikes word gegee vir die toewysing van 'n onbekende datapunt (spesie onbekend) waarvan die ver-

anderlikes wel bekend is. Die evaluasie-kriterium is die verspreiding van waardes soos aangedui op 'n verspreidingsdiagram.

Twee-dimensionele verspreidingsdiagramme is gekarteer, waarop die posisies van die betrokke spesies ten opsigte van mekaar duidelik aangetoon word. Die statistiese studie is stapsgewyse uitgevoer. Met die eerste stap (rondte een) is 'n twee-dimensionele verspreidingsdiagram van 21 spesies van Acacia verkry. Spesies wat reeds duidelik van die ander spesies op die verspreidingsdiagram geskei is, is van die stel data wat in 'n tweede rondte verwerk moes word, geëlimineer. Geen nuwe data is ingevoer nie, maar slegs spesies waarvan die posisionering op die verspreidingsdiagram baie naby aan mekaar is, se data is dus in die volgende rondte verwerk. Inderwaarheid is 'n herhaling van die CANDISC-prosedure met 'n substel van die data telkens tydens elke rondte uitgevoer. Hoe minder spesies betrokke is, hoe makliker kan CANDISC die spesies van mekaar skei. Daar moet daarop gelet word dat 'n substel data nie dieselfde detail van verspreiding verteenwoordig as in die vorige rondte nie - vergelyk byvoorbeeld die vergroting op die grafiek in figuur 5-18 (tweede rondte) met figuur 5-19 (derde rondte).

Met herhaling van die CANDISC-prosedure kon uiteindelik al die spesies duidelik van mekaar geskei word in 'n totaal van vier rondtes.

HOOFSTUK 5. RESULTATE en BESPREKING:

5-1. Chromatografiese Data:

Die eksperimentele metode vir die opneem van die bodamp chromatogramme van die blomme van Acacia spesies is breedvoerig bespreek in hoofstuk 2-3. Die metode van statistiese verwerking van geselekteerde piekdata is bespreek in hoofstuk 4-1-2.

Chromatogramme van die geurprofile van verskeie spesies van die genus Acacia is onder dieselfde kondisies verkry, naamlik: Konsentrering (20 min) is met behulp van die dinamiese oplosmiddeleffek uitgevoer. Koolstofgesuiwerde lug met 'n vloeisnelheid van $12 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ is gebruik om die bodamp te konsentreer. Gaschromatografiese skeiding is met 'n Varian 2700 GC, toegerus met 'n dinamiese oplosmiddeleffek-inlaat en 'n 25 m x 0,3mm i.d. kapillêre kolom (SE 30)($0,4 \mu\text{m}$ metielsilikonfilm) uitgevoer. Die aanvanklike inlaatteratuur en die kolomtemperatuur was beide 40°C . Na ongeveer 6 min (oplosmiddelverdamptyd) is die inlaat ballisties tot 220°C verhit. Die kolomtemperatuur is teen $6^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ geprogrammeer. Waterstof is as draergas ($50 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) gebruik. 'n Vlamionisasiedetektor is by 'n sensitiwiteit van $8 \times 10^{-12} \text{ A} \cdot \text{mv}^{-1}$ gebruik. Chromatogramme is op 'n persoonlike rekenaar, toegerus met die DAPA-sisteem, uitgedruk.

Die volledige stel chromatogramme verkry van al die spesies wat ondersoek is, word in die addendum weergegee (sien hfst. 8). Ter illustrasie word hier slegs 'n paar chromatogramme, verteenwoordigend van uitgesoekte voorbeelde, vertoon in hierdie hoofstuk.

Ooreenkomste tussen piekareas en piekpatrone in chromatogramme van dieselfde spesie, was baie opsigtelik in sekere gevalle, soos byvoorbeeld, in die geval van Acacia galpinii. Die herhaalbaarheid van die piekpatrone van chromatogramme (van verskillende bome van dieselfde spesie) word duidelik geïllustreer by geurprofiel van Acacia galpinii(figure 5-1 tot 5-4), Acacia robusta (figure 5-5 tot 5-6) en Acacia caffra (figure 5-7 tot 5-9) .

Figuur 5-1: Acacia galpinii Boom 1.

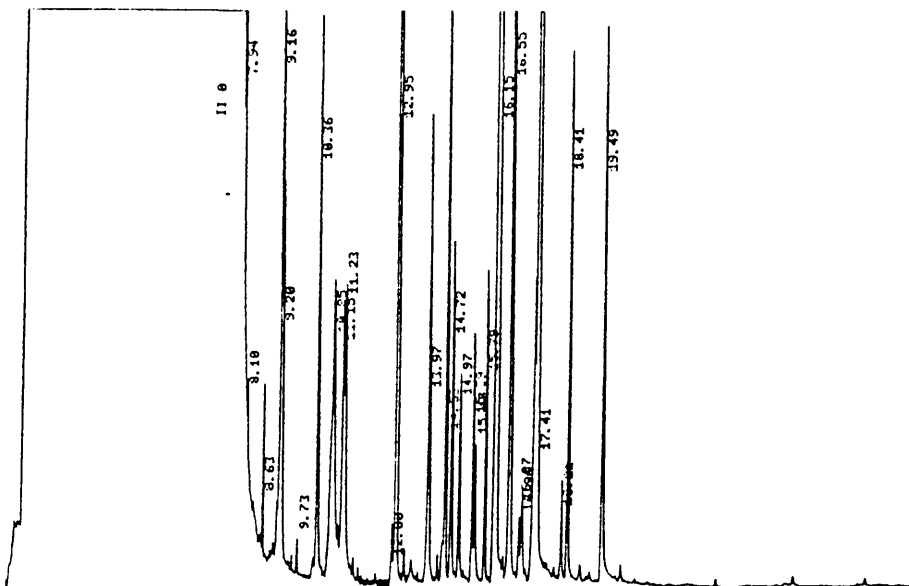


Fig. 1: Acacia galpinii

RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNOMMER
8.63	3374	20
9.16	24278	1
9.20	11211	2
9.73	886	43
10.36	20425	3
10.85	24081	4
11.15	10924	5
11.23	12443	6
12.80	2428	39
12.95	506671	11
14.53	34217	7
14.72	12503	21
14.97	7129	22
15.39	8306	36
15.47	4758	30
15.79	10747	23
16.15	958697	8
16.55	47667	44
16.96	3781	32
17.41	296566	9
18.21	3200	24
18.41	19120	25
19.49	23293	15

Figuur 5-2: Acacia galpinii Boom 2.

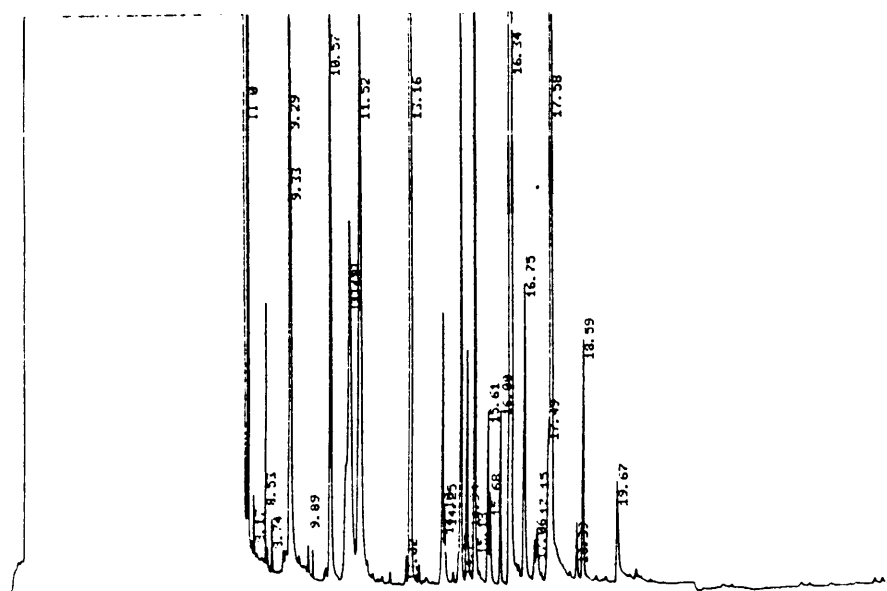
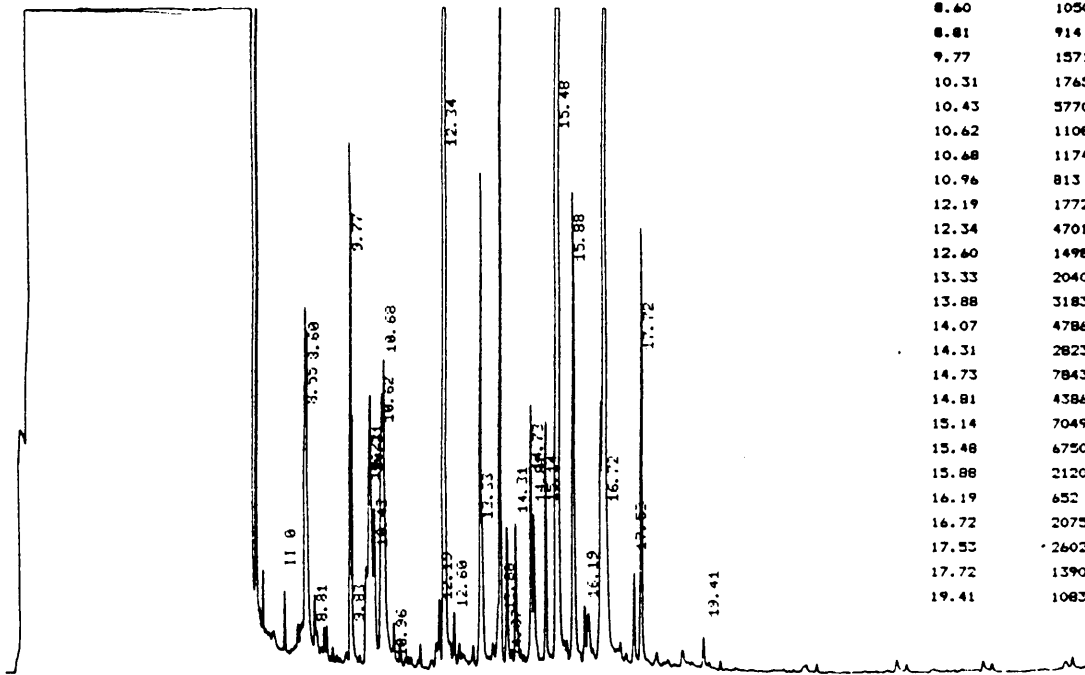


Fig. 2: Acacia galpinii Boom 2.

RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNOMMER
8.53	2244	20
8.74	1065	40
9.29	24570	1
9.33	14633	2
9.89	803	43
10.57	53539	3
11.11	5723	14
11.18	30035	5
11.52	49553	6
13.02	946	39
13.16	331656	11
14.75	22623	7
14.94	9542	21
15.88	36070	22
15.61	5696	36
15.68	2934	30
16.00	6004	23
16.34	684527	8
16.75	13742	44
17.15	2408	32
17.58	139995	9
18.39	2101	24
18.59	9060	25
19.67	4278	15

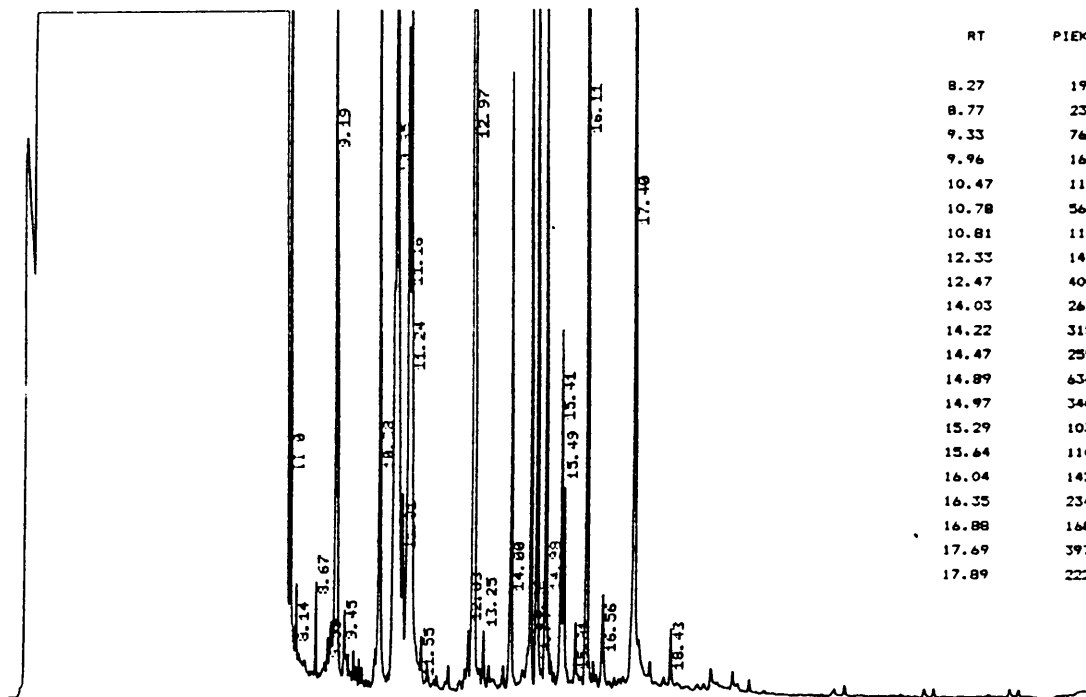
Figuur 5-3: Acacia galpinii Boom 3.

Fig. 3: ACACIA GALPINII Boom 3.

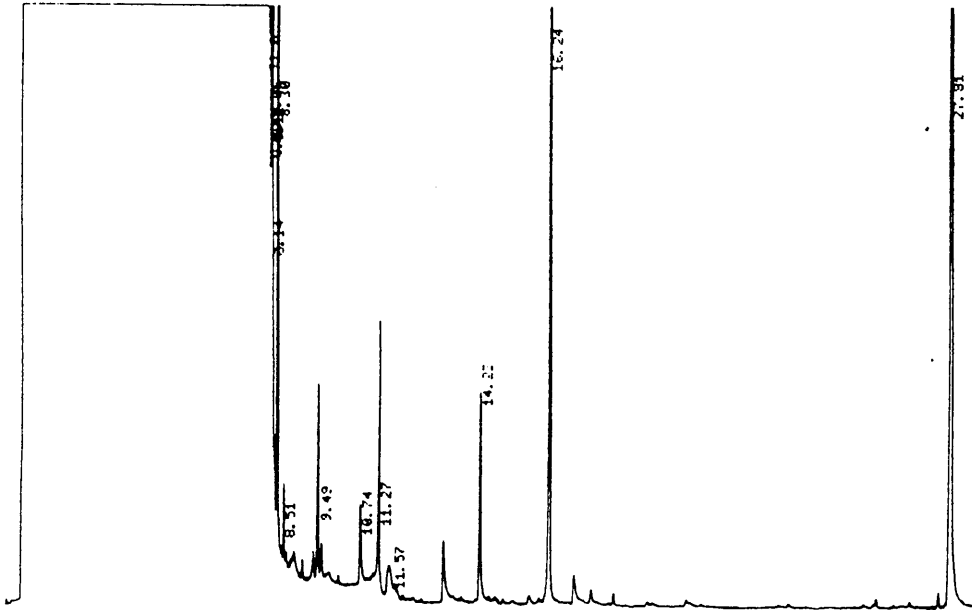


Figuur 5-4: Acacia galpinii Boom 4.

Fig. 4: ACACIA GALPINII Boom 4.



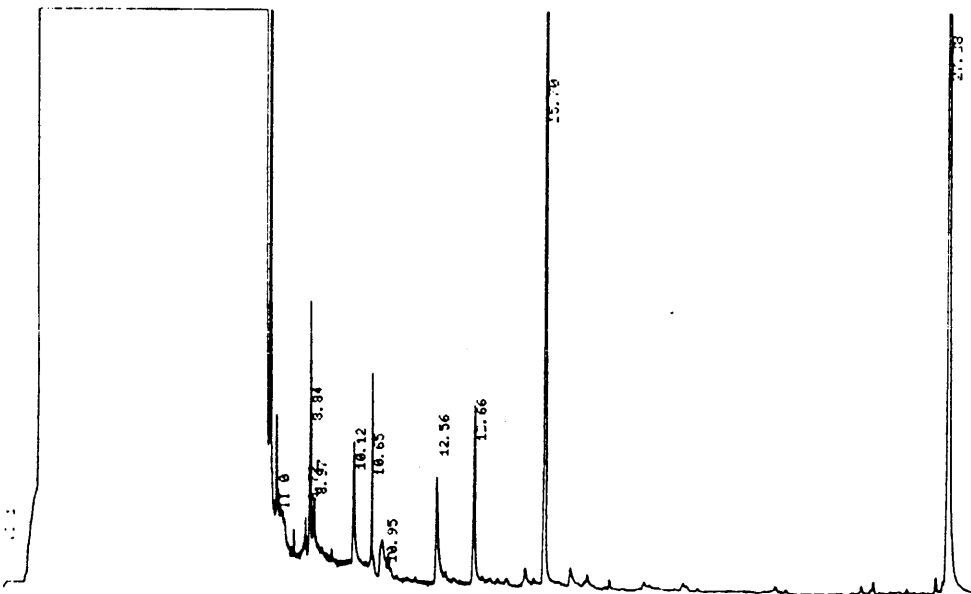
Figuur 5-5: Acacia robusta Boom 1.



Figuur 5-5: A.robusta Boom 1.

RT	PIEKAREA	TOEGEKEND PIEKNOMME
9.49	5968	43
10.74	2424	4
11.27	6002	6
11.57	2639	31
14.23	6830	7
16.24	43564	8
27.81	87943	10

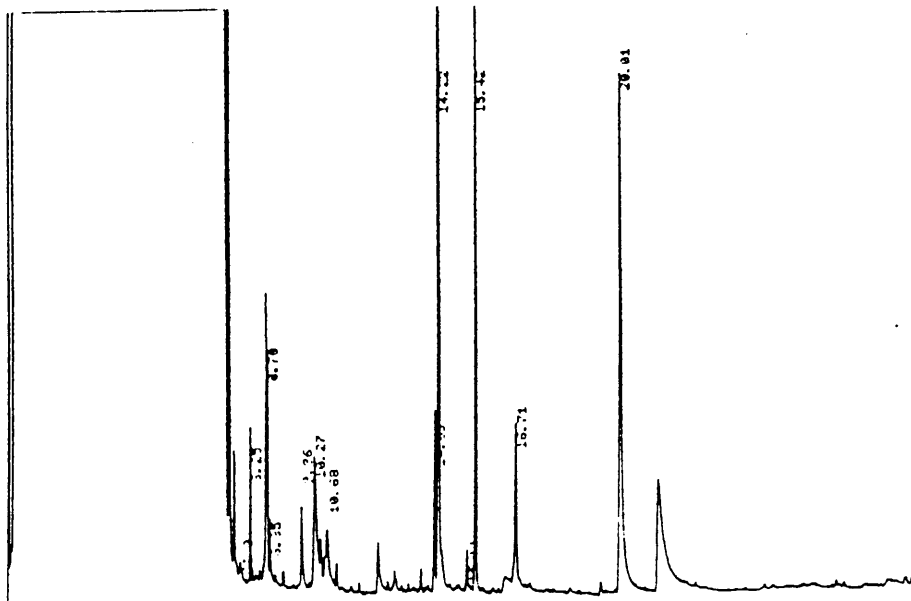
Figuur 5-6: Acacia robusta Boom 2.



Figuur 5-6: A.robusta Boom 2.

RT	PIEKAREA	TOEGEKEND PIEKNOMME
8.72	700	1
8.84	6306	2
8.97	1005	43
10.12	4032	4
10.65	2363	6
10.95	2782	31
12.56	3943	11
13.66	6792	7
15.70	55740	8
27.38	111744	10

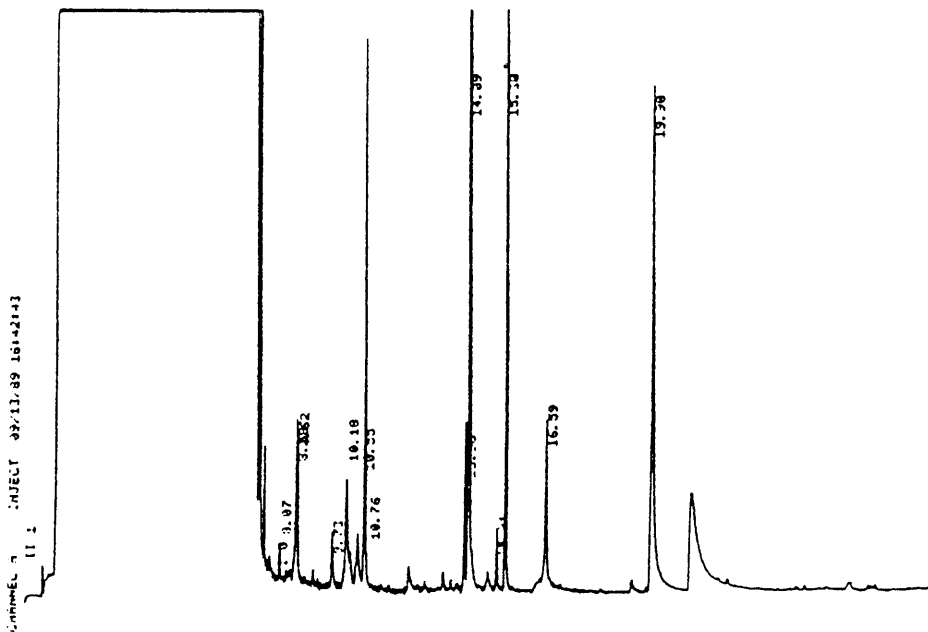
Figuur 5-7: Acacia caffra (Universiteitskampus) Boom 1.



Figuur 5-7: A.caffra Boom 1.

RT	PIEKAREA	TOEGEKEND PIEKNUMMER
8.21	1725	20
8.69	14419	1
8.73	8543	2
9.91	4304	3
10.46	12314	14
10.83	7755	6
12.41	3052	11
14.22	9705	7
14.34	77051	21
15.27	1807	23
15.56	41714	8
16.83	15567	9
20.11	47287	45

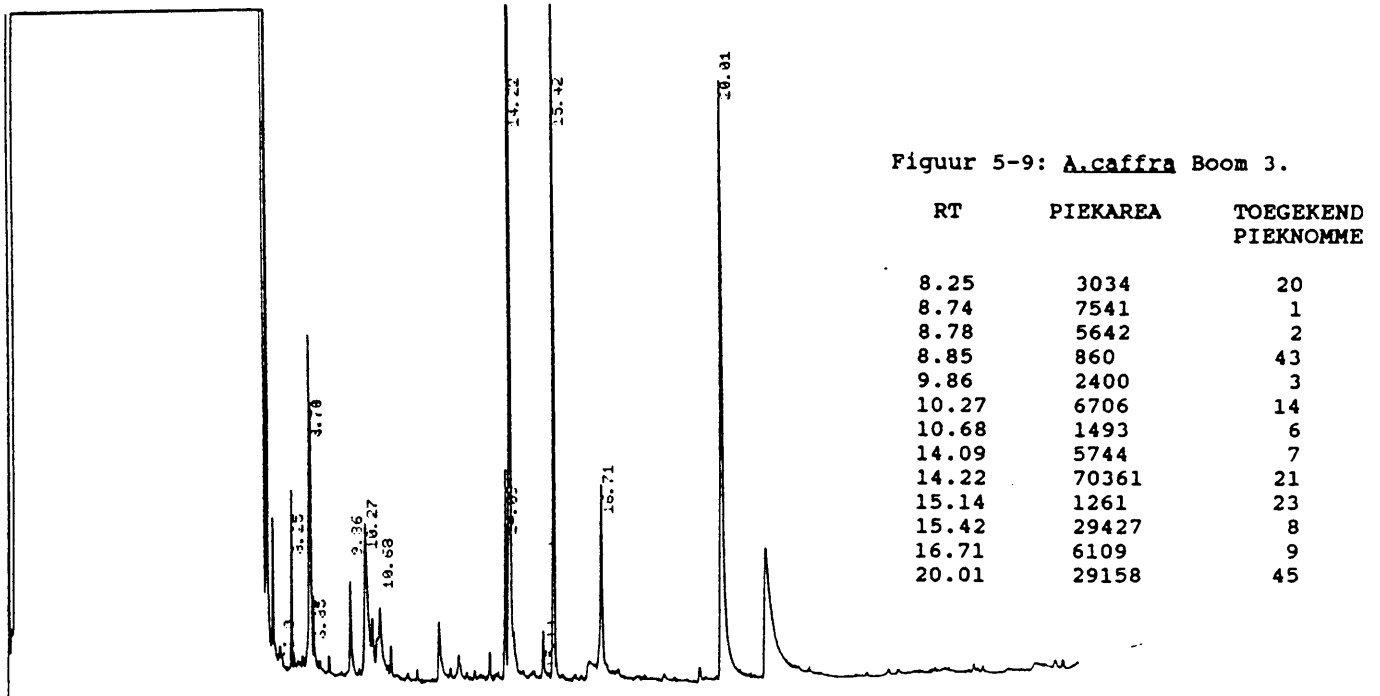
Figuur 5-8: Acacia caffra (Universiteitskampus) Boom 2.



Figuur 5-8: A.caffra Boom 2.

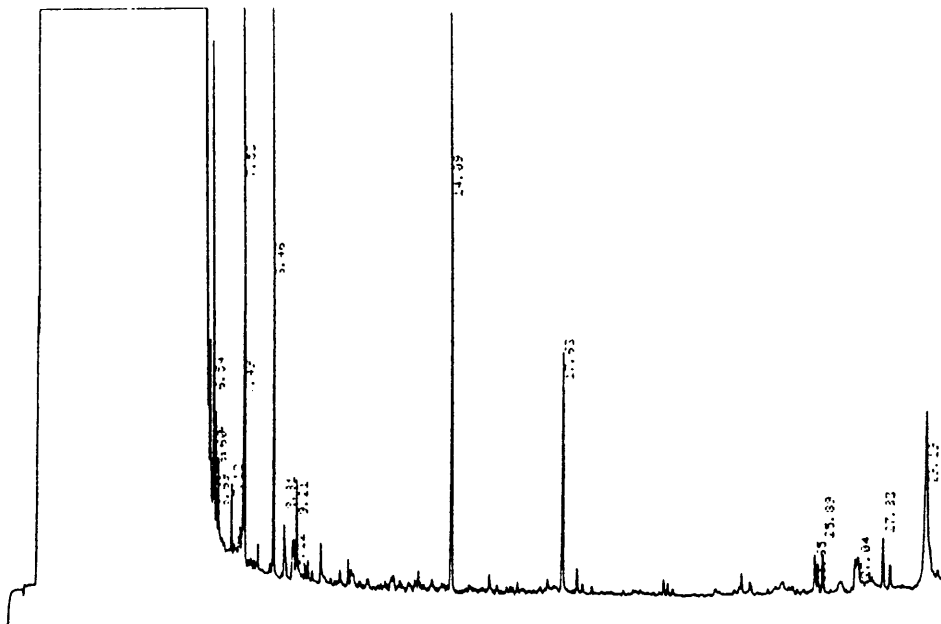
RT	PIEKAREA	TOEGEKEND PIEKNUMMER
8.07	750	20
8.58	3455	1
8.62	3563	2
9.73	1515	3
10.18	4592	14
10.55	2549	6
10.76	18510	31
13.96	5291	7
14.09	76229	21
15.01	1878	23
15.30	34782	8
16.59	6134	9
19.90	25936	45

Figuur 5-9: *Acacia caffra* (Universiteitskampus) Boom 3.



Daar was egter ook gevalle waar die herhaalbaarheid van die volle chromatogramme (van verskillende bome van dieselfde spesie) nie so goed voorgekom het nie, soos in die geval van die geurprofiele van Acacia tenuispina (sien figure 5-10 -5-13). Korrekte statistiese verwerking van hierdie data toon egter dat genoegsame herhaalbare piekpatrone in die substruktuur van die chromatogramme verkry kan word vir die eenduidige karakterisering van die spesie.

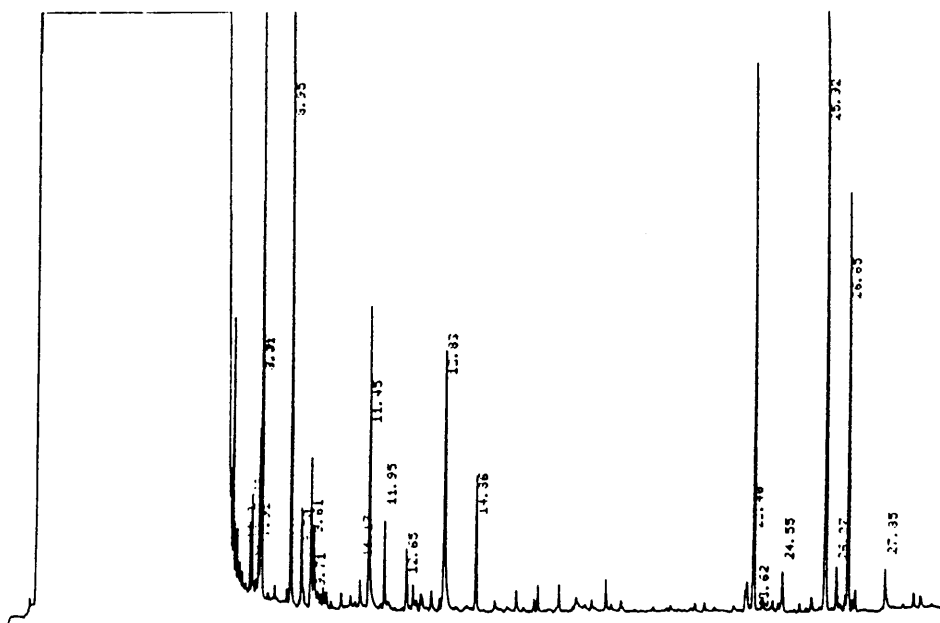
Figuur 5-10: Acacia tenuispina Boom 1.



Figuur 5-10: A.tenuispina Boom 1.

RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNUMMER
7.12	1129	20
7.49	4429	1
7.53	17867	2
8.46	14850	3
8.81	1080	4
9.12	2281	14
9.21	2864	5
14.09	19336	8
17.63	8118	15
25.65	882	26
25.89	1347	10
27.83	1778	17

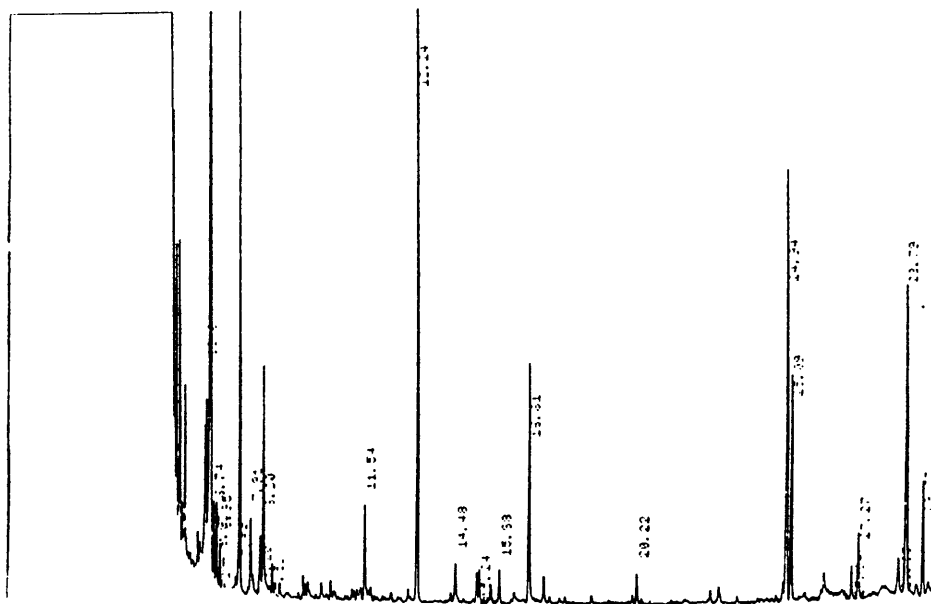
Figuur 5-11: Acacia tenuispina Boom 2.



Figuur 5-11: A.tenuispina Boom 2.

RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNUMMER
7.62	1134	20
7.91	3118	40
7.97	7642	1
8.01	12587	2
8.95	30364	3
9.30	2418	4
9.61	5227	14
9.71	2512	5
11.45	8669	11
11.95	2640	29
13.83	10282	13
14.86	4396	8
23.62	20438	42
25.92	25225	26
26.27	1422	10
26.65	15044	16
27.85	1216	17

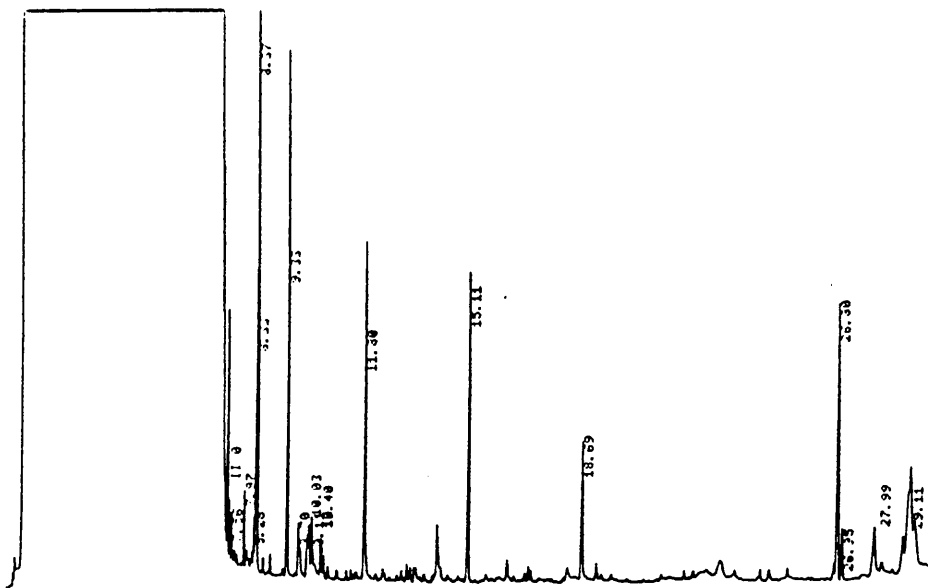
Figuur 5-12: Acacia tenuispina Boom 3.



Figuur 5-12: A.tenuispina Boom 3.

RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNUMMER
6.64	71111	1
6.74	1195	2
7.56	19726	3
7.91	1702	4
8.20	1897	14
8.30	6557	5
8.59	703	31
11.54	2659	7
13.24	30010	8
14.48	1141	9
15.24	842	24
16.81	8351	15
24.94	15318	10
25.09	8194	16
27.27	2448	17

Figuur 5-13: Acacia tenuispina Boom 4.

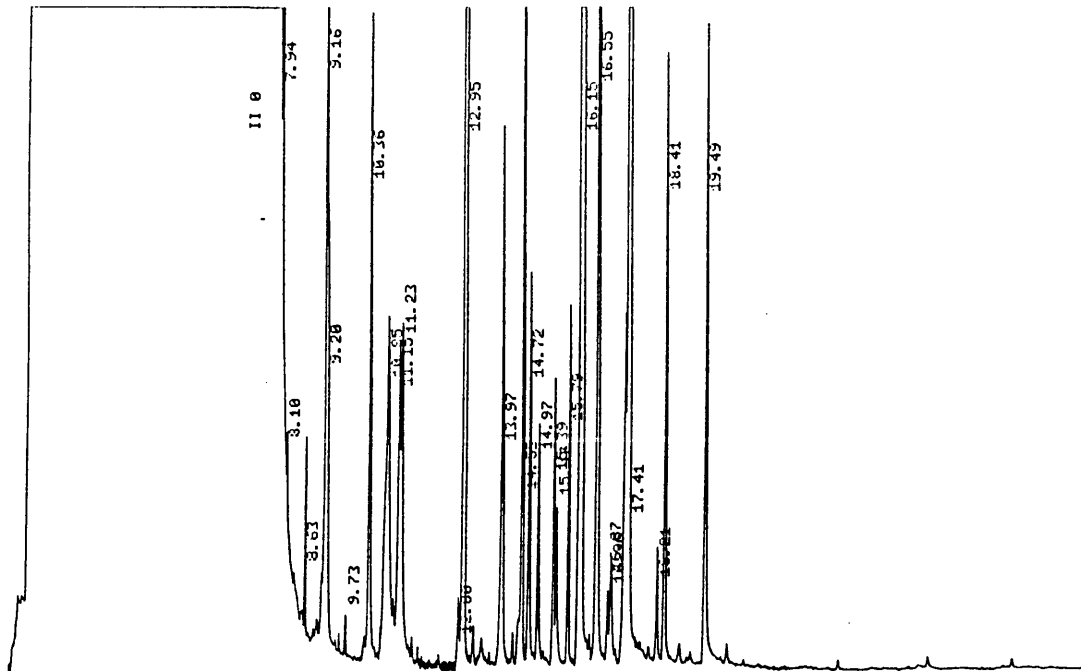


Figuur 5-13: A.tenuispina Boom 4.

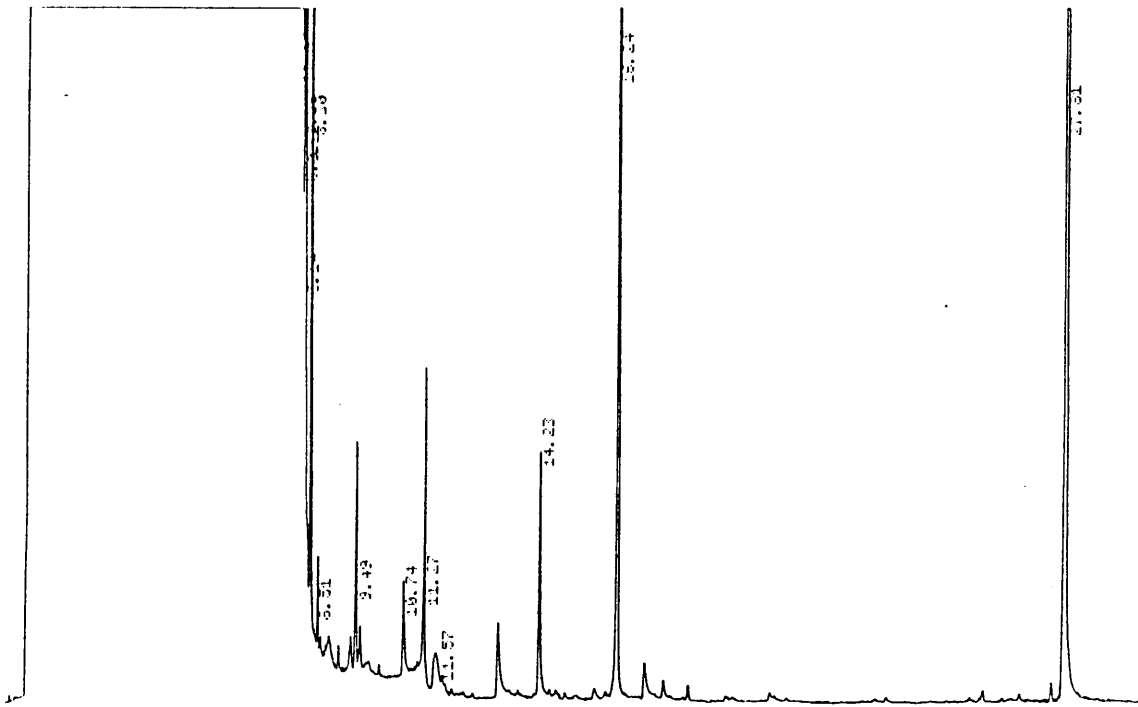
RT	PIEKAREA	TOEGEKENDE PIEKNUMMER
7.97	1218	20
8.28	816	40
8.33	5548	1
8.37	30165	2
9.33	12724	3
9.70	1003	4
10.03	2850	14
10.11	1734	5
10.40	913	41
11.80	9710	11
15.11	10226	8
18.69	4725	15
26.80	9748	10
26.95	1829	16
29.11	5740	17

Duidelikheidshalwe kan een voorbeeld van elk van eersgenoemde drie spesies van die genus Acacia saam vertoon word om die verskil tussen die chromatogramme van verskillende spesies van Acacia te wys. Vir die CANDISC statistiese verwerking van die chromatografiese data is 'n aantal pieke uit die chromatogramme gekies, wat gelyktydig kenmerkend was van 'n betrokke spesie en gediskrimineer het tussen spesies. Nie al die pieke word noodwendig volledig in 'n chromatogram van een spesie verteenwoordig nie (sien figure 5-14;5-15;5-16). Die geselekteerde pieke wat teenwoordig is in hierdie chromatogramme word deur die toegekende pieknommers aangedui.

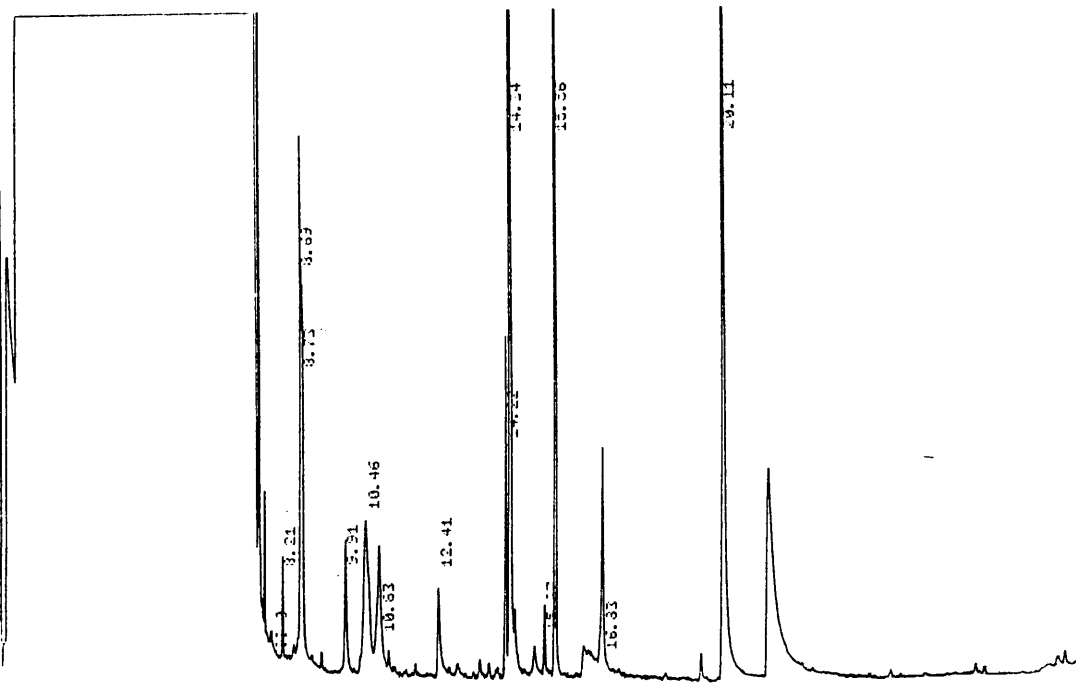
Figuur 5-14: Acacia galpinii Boom 1.



Figuur 5-15: Acacia robusta Boom 1.



Figuur 5-16: Acacia caffra Boom 1.



5-2-2. Bespreking van die verspreidingsdiagramme:

Die klassifikasie van 'n beperkte aantal spesies is in die meerdere gevalle ooglopend (sien figure 5-14; 5-15; 5-16). Vir die klassifikasie van groter getalle spesies is rekenaarhulp egter belangrik, veral omdat korrekte statistiese verwerking van die resultate 'n objektiewe maatstaf daarstel vir klassifikasie - ook vir die spesies waar die herkenning nie so opsigtelik is nie, weens die teenwoordigheid van nie-herhaalbare pieke wat visuele klassifikasie bemoeilik.

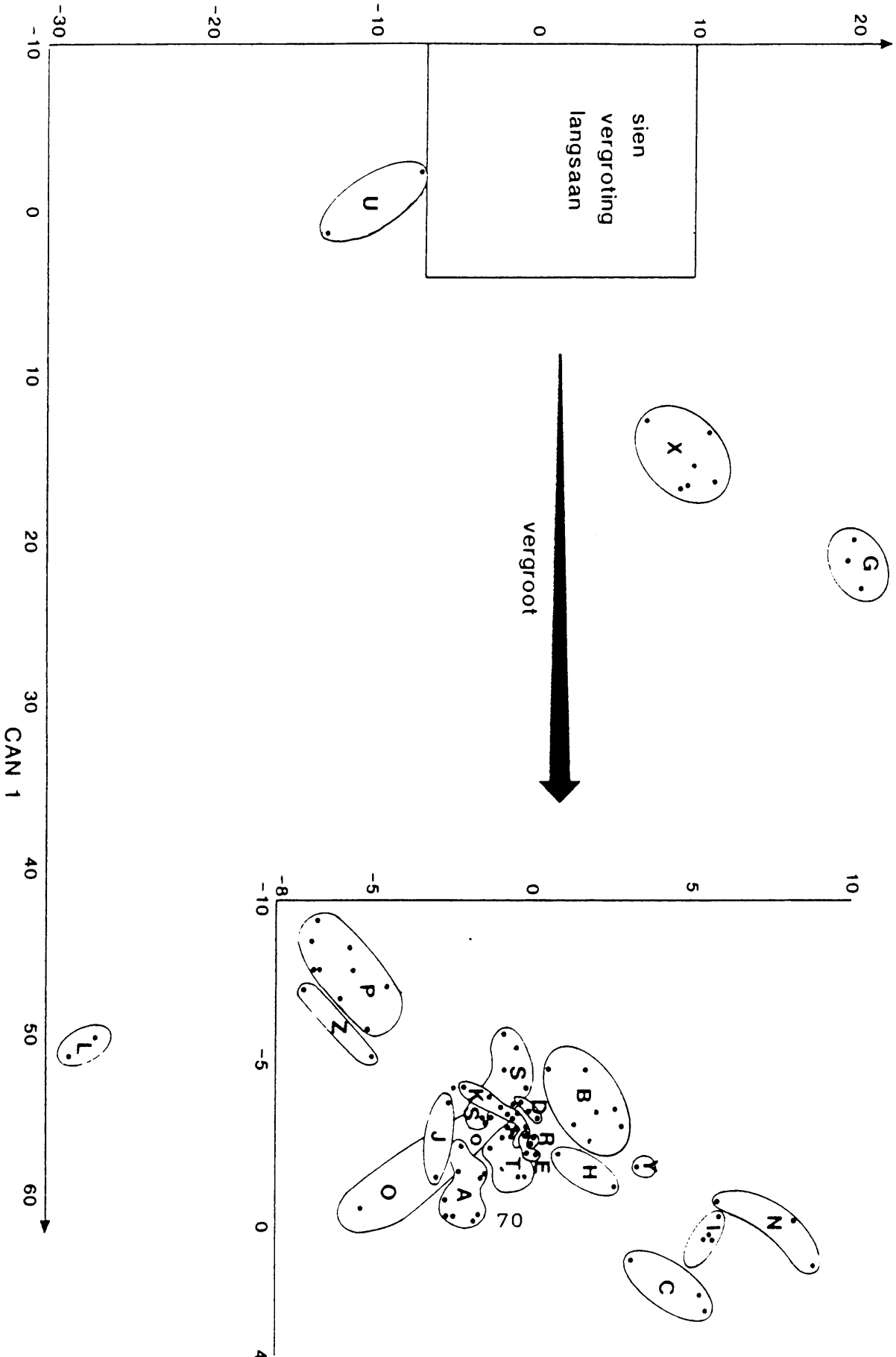
Die geurprofiele van die ondersoekte spesies verskil van mekaar in so 'n mate dat daar op grond van die verskille, verspreidingsdiagramme saamgestel kon word. In die bespreking wat volg, word die posisie van die spesies op die verspreidingsdiagramme in verband gebring met taksonomiese verwantskappe wat volgens morfologiese kenmerke bepaal is. In hoofstuk 3-3 figuur 3-1, word die ondersoekte spesies volgens die struktuur van die bloeiwyse en dorings in groepe verdeel [99].

Die volledige stel spesies wat ondersoek is kan volgens die voortbring van hulle blomme in twee tipes verdeel word, naamlik die wat hulle blomme op ou hout dra en die wat blomme voortbring op nuwe hout. Hierdie verskynsel bring dus mee dat blomtye tussen ou hout-blomdraers en nuwe hout-blomdraers varieër van vroeg (met die aanvang van die blomseisoen) tot aan die einde van die blomseisoen. Verskillende blomtye kan gevolglik verband hou met verskillende tipe insekte wat betrokke is by die bestuiwing en die geurprofiele kan dus dienooreenkomstig verskil.

a-i) Eerste rondte: Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die volledige stel van 21 Acacia spesies (sien figuur 5-17):

Figuur 5-17. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die volledige stel van 21 Acacia spesies:

GRAFIEK VAN CAN 1*CAN 2 : VOLLEDIGE STEL VAN 21 ACACIA SPESIES

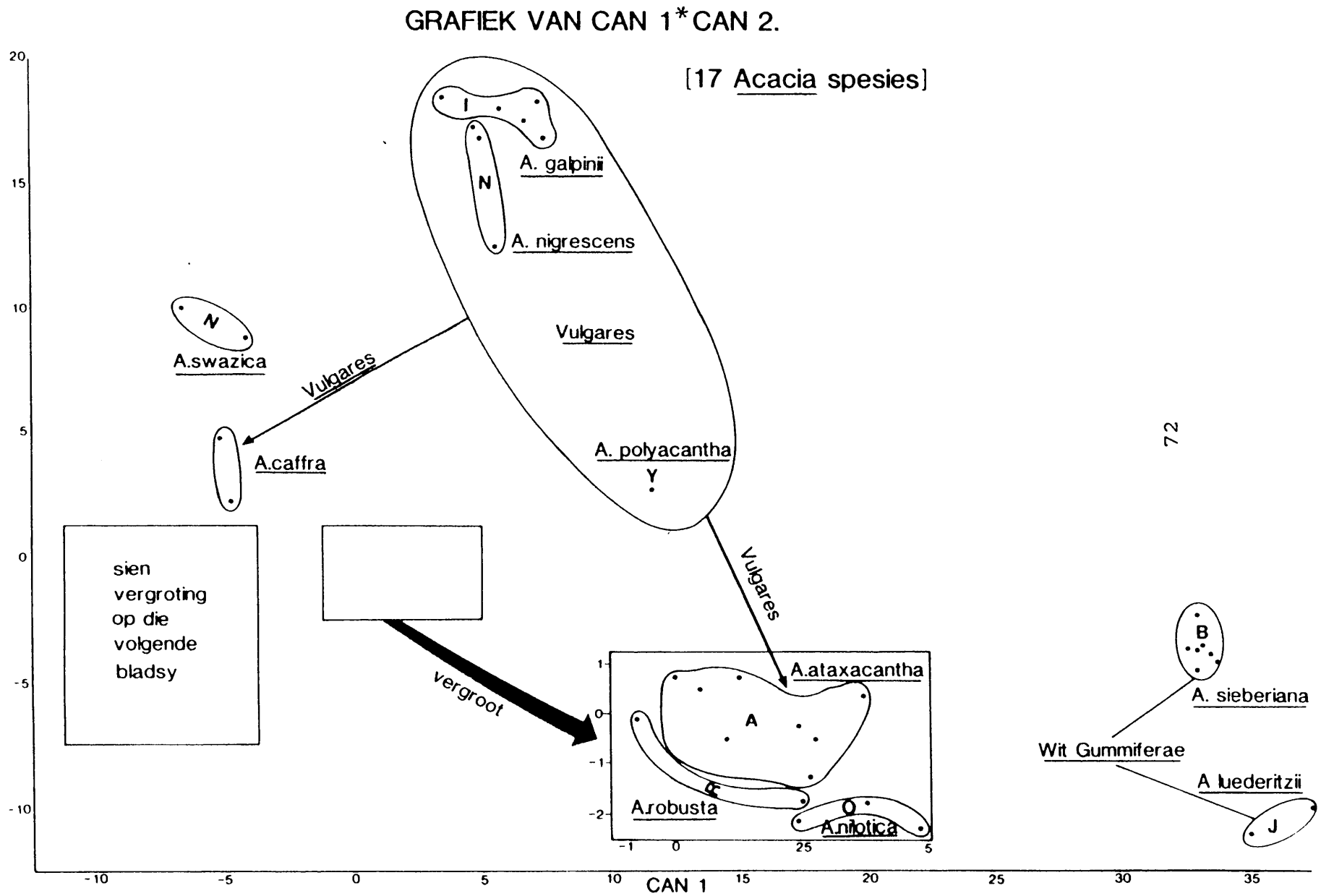


a-ii) Tweede rondte: Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die oorblywende 17 Acacia spesies (figuur 5-18):

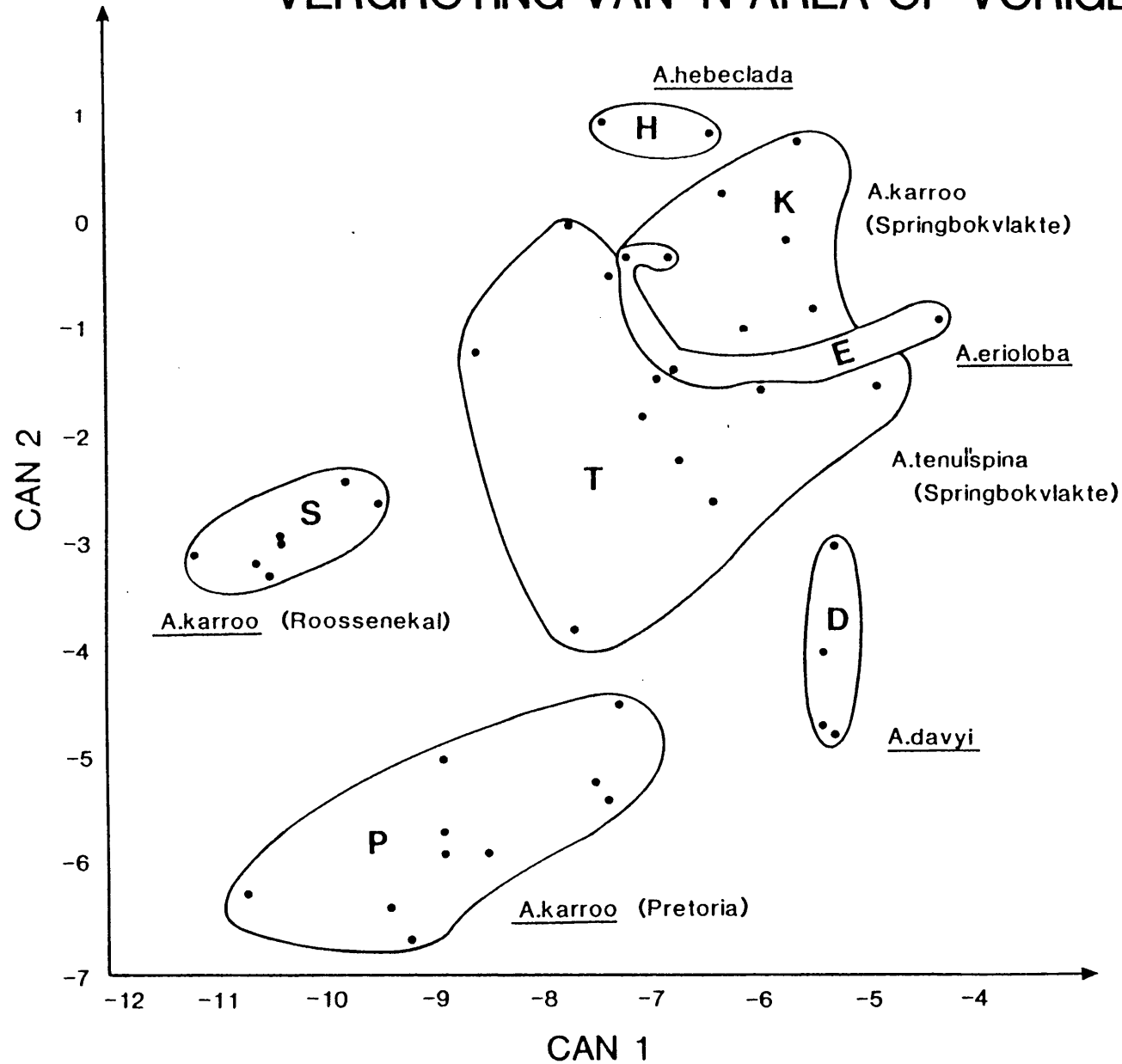
Met die data van die vier duidelik onderskeibare spesies van rondte een uitgelaat, is die skeiding tussen die oorblywende 17 spesies baie beter.

Volgens hierdie skeiding lê A.luederitzii var. retinens en A.sieberiana var. woodii die verste weg van die ander spesies. Albei hierdie soorte behoort aan Gummiferae en het wit blomme. Die tweede groep wat duidelik van die res geskei is, is die vyf Vulgares-soorte, naamlik A.nigrescens (N), A.galpinii (I), A.caffra (C), A.polyacantha (Y) en A.ataxacantha (A). In die groep is A.ataxacantha en A.polyacantha wat beide 'n tipe 3 bloeisistiem het, redelik geskei van die ander drie soorte met 'n tipe 4 bloeisistiem. Die oorblywende spesies in hierdie verspreidingsdiagram behoort almal aan die subgenus Gummiferae en het almal geel blomme.

Figuur 5-18. 'n Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van 17 Acacia spesies.



VERGROTING VAN 'N AREA OP VORIGE GRAFIEK:



a-iii) Derde rondte: 'n Verdere verbeterde skeiding is van die oorblywende 11 spesies van Acacia verkry, sonder om nuwe data in te voer (figuur 5-19):

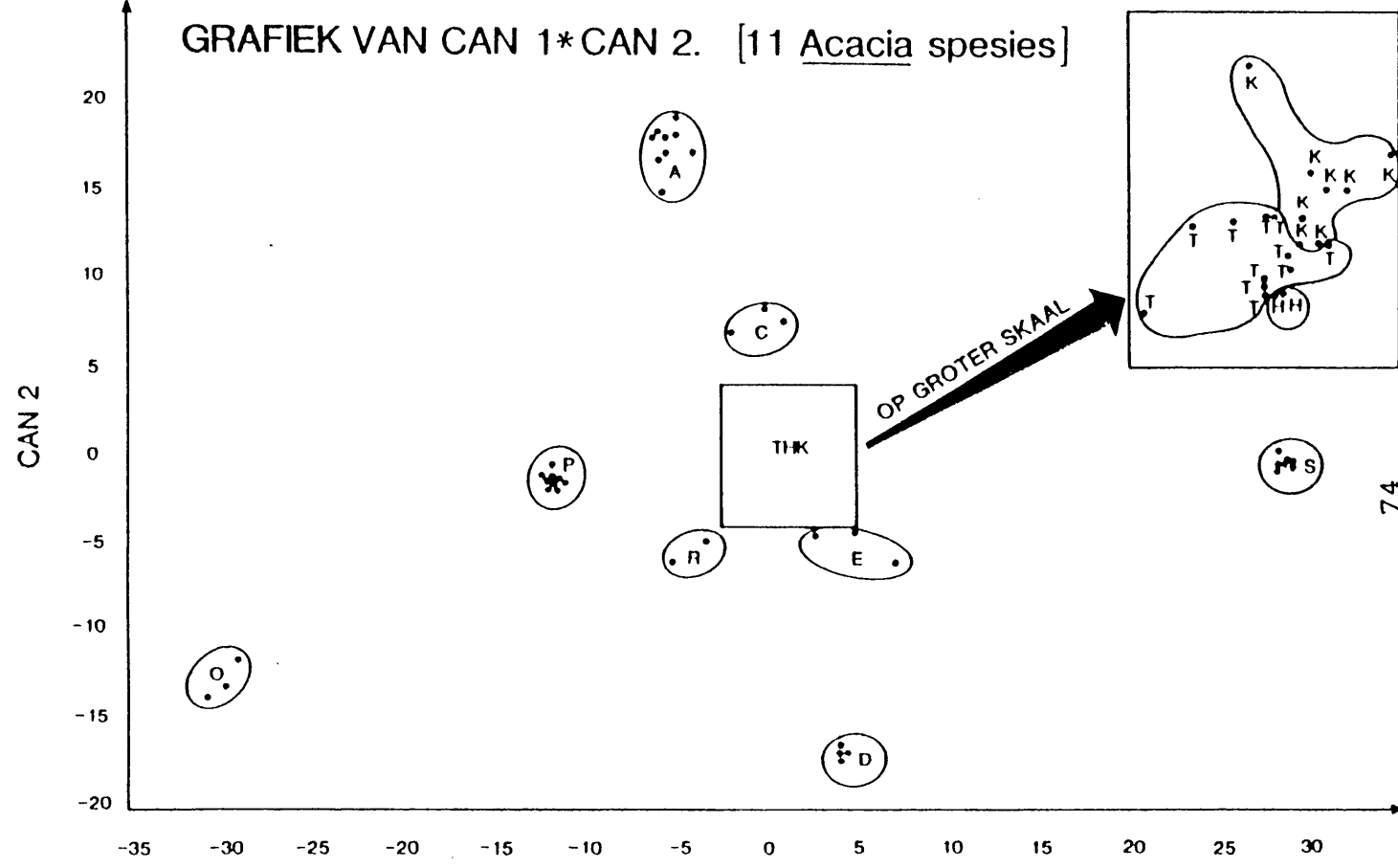
A.ataxacantha (A) en A.caffra (C) is beide van mekaar en van die res van die spesies wat tot Gummiferae behoort, geskei.

Op hierdie verspreidingsdiagram kan ook duidelik onderskei word tussen A.karroo van die drie lokaliteite, naamlik:

P : A.karroo Pretoria Heldergeel hofies; Gummiferae
K : A.karroo Springbokvlakte Tipe 1 bloeisisysteem
S : A.karroo Roosenekal

Die oorblywende vyf spesies behoort tot die subgenus Gummiferae en is as volg: A.hebeclada (H) met wit hofies en 'n tipe 2 bloeisisysteem ; A.erioloba (E) met geel hofies en 'n tipe 2 bloeisisysteem ; en A.robusta (R) met wit hofies en 'n tipe 2 bloeisisysteem. A.robusta (R), A.hebeclada (H) en A.erioloba (E) lê ook relatief naby aan mekaar op die verspreidingsdiagram, al is hulle ook duidelik van mekaar geskei. Wat hierdie drie spesies met mekaar gemeen het, is dat al drie hierdie spesies hulle blomme dra op ou hout. Die oorblywende spesies, naamlik A.tenuispina (T), A.karroo (K), A.karroo (S) en A.karroo (P) dra hulle blomme op nuwe hout. Hierdie drie spesies is morfologies van mekaar geskei, alhoewel hulle naby aan mekaar lê op die verspreidingsdiagram. Hierdie bevinding stem ooreen met morfologiese gegewens in die sin dat hulle dieselfde bloeisisisteme het en die kiemplantmorfologie ook ooreenstem [99]. Die stuifmeelmorfologie [99] en die blomkleur van A.erioloba verskil egter van die ander twee soorte, naamlik A.nilotica (O) met geel hofies en tipe 1 bloeisisysteem, en A.davyi (D) wat geel hofies op 'n tipe 1 bloeisisysteem voortbring. Laasgenoemde twee spesies is duidelik van mekaar en van die ander spesies, behorende tot Gummiferae, geskei. Hierdie bevinding stem ooreen met morfologiese eienskappe.

Figuur 5-19. 'n Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die oorblywende 11 Acacia spesies:



- A = A ataxacantha
- O = A nilotica
- D = A davyi
- R = A robusta
- E = A erioloba
- C = A caffra

CAN 1

- P = A karroo (Pretoria)
- K = A karroo (Springbokvlakte)
- S = A karroo (Roosenekal)
- T = A tenuispina
- H = A hebeclada

a-iv) Vierde en finale rondte:

Tydens hierdie rondte van statistiese verwerking kon die laaste vyf spesies van mekaar geskei word. Dit beteken dat die volledige stel data van 21 Acacia spesies in slegs vier rondtes, duidelik geskei kon word.

Let op die posisies van die x en y koördinate van die kanoniese koëffisiënte in figuur 20, naamlik:

SPESIE E : A.erioloba

Boomnommer	CAN 1	CAN 2
1	2.21168	-12827464
2	2.21168	-12827464
3	2.21168	-12827464

SPESIE H : A.hebeclada

Boomnommer	CAN 1	CAN 2
4	0.35090	45108404.95
5	0.35090	45108404.95
6	0.35090	45108404.95

SPESIE K : A.karoo Springbokvlakte

Boomnommer	CAN 1	CAN 2
7	0.39475	5492171.92
8	0.39475	5492171.92
9	0.39475	5492171.92
10	0.39475	5492171.92
11	0.39475	5492171.92
12	0.39475	5492171.92
13	0.39475	5492171.92
14	0.39475	5492171.92

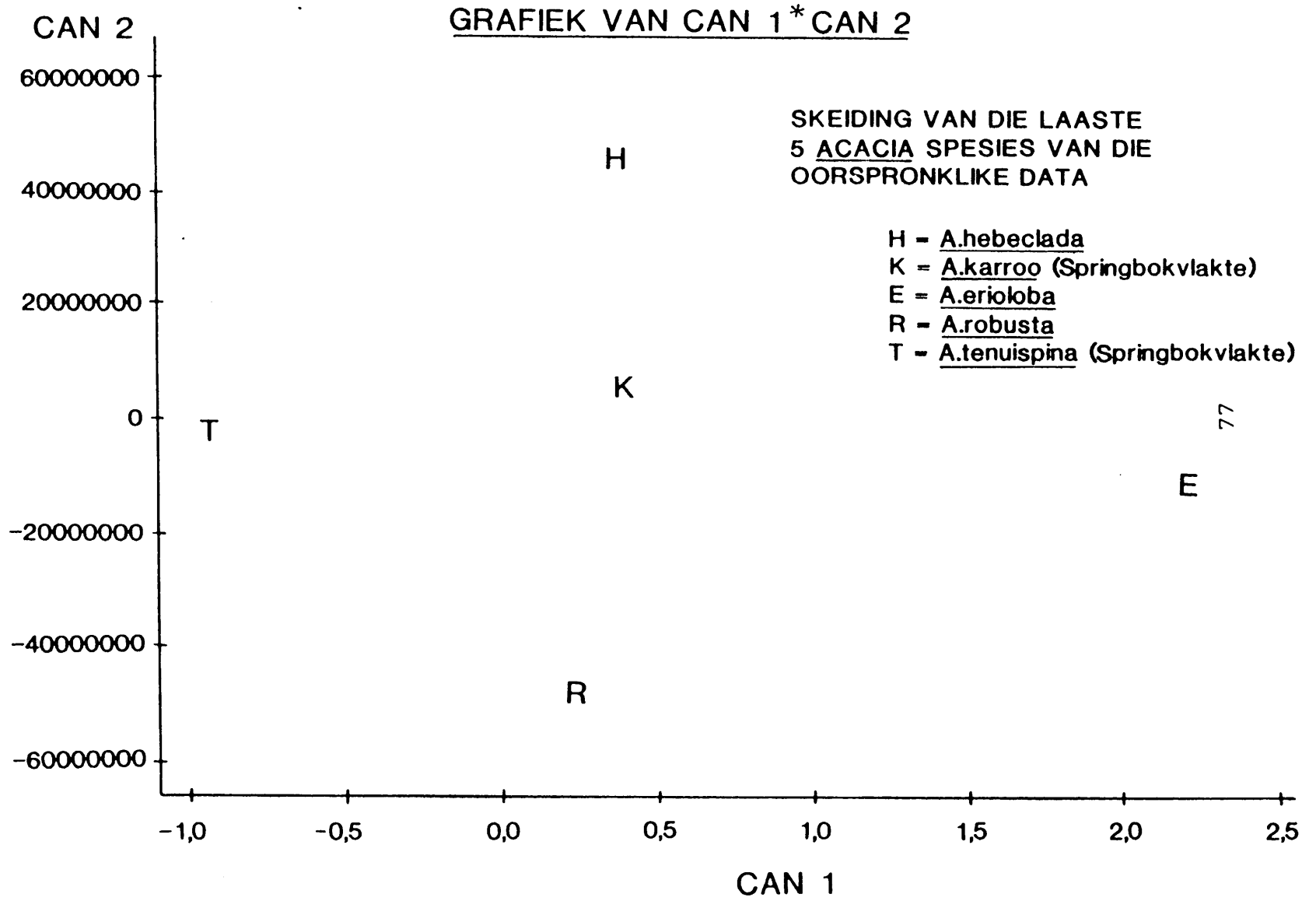
SPESIE R : A.robusta

Boomnommer	CAN 1	CAN 2
15	0.21967	-48320251.12
16	0.21967	-48320251.12

SPESIE T : A.tenuispina

Boomnommer	CAN 1	CAN 2
17	-0.94043	-3678307.99
18	-0.94043	-3678307.99
19	-0.94043	-3678307.99
20	-0.94043	-3678307.99
21	-0.94043	-3678307.99
22	-0.94043	-3678307.99
23	-0.94043	-3678307.99
24	-0.94043	-3678307.99
25	-0.94043	-3678307.99
26	-0.94043	-3678307.99
27	-0.94043	-3678307.99
28	-0.94043	-3678307.99

Figuur 5-20. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van die oorblywende vyf Acacia spesies:

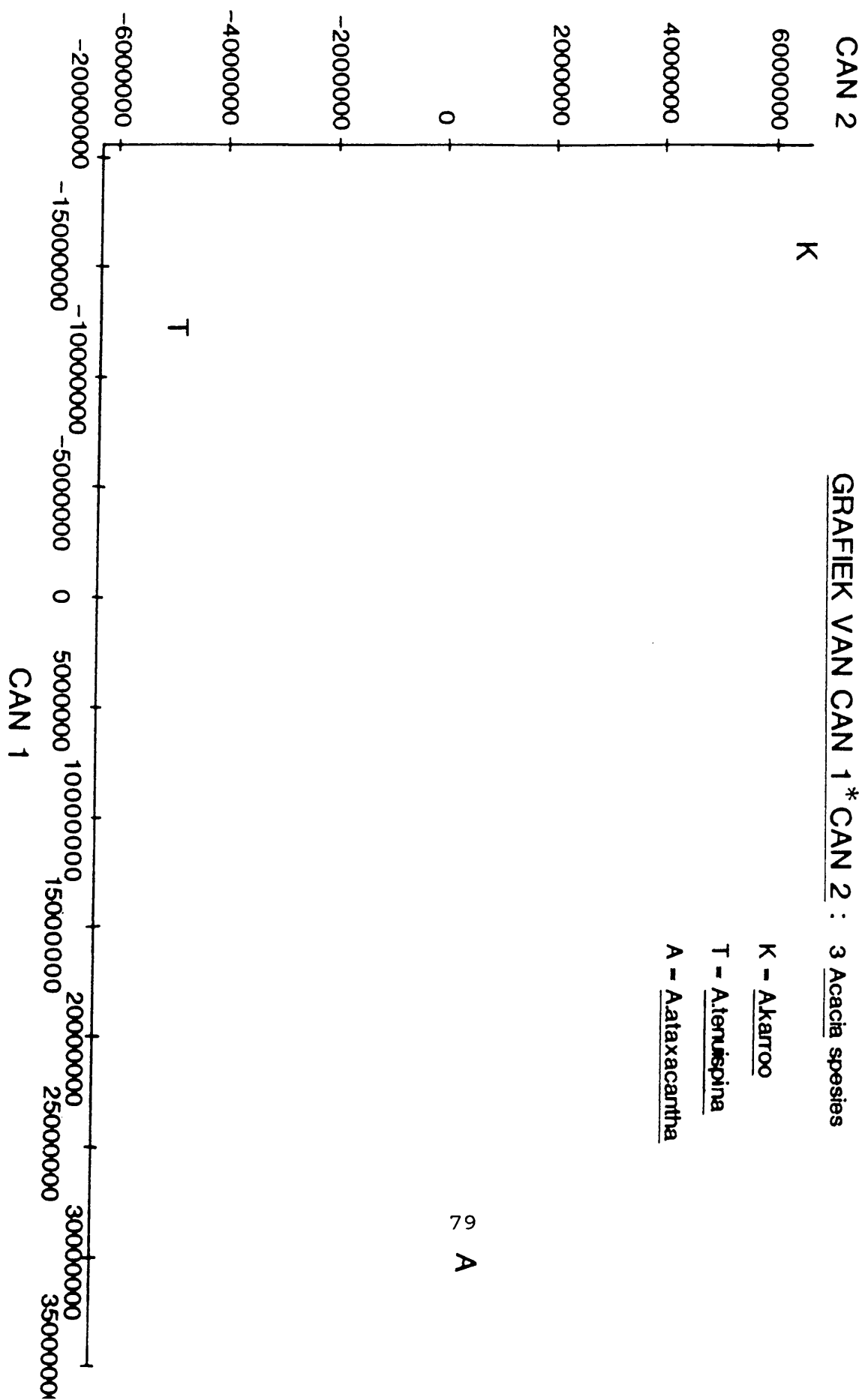


5-2-2 b-i) Die volledige stel data is alreeds in die vorige rondte geskei, maar om die skeiding tussen A.tenuispina (T), A.karoo (K) en A.ataxacantha (A) visueel duideliker uit te beeld kan 'n twee-dimensionele verspreidingsdiagram van slegs hierdie drie spesies vertoon word (duplisering van kennis wat reeds tydens die derde rondte raakgesien kon word - figuur 5-19).

Bogenoemde drie spesies is gekies vir die aanvanklike analise om vas te stel of verskille van die blomme gaschromatografies met behulp van die dinamiese oplosmiddeleffek aangetoon kon word.

A.tenuispina (T) en A.karoo (K) is naverwant aan mekaar en hierdie feit kan ook geïen word op die verspreidingsdiagram. Boonop groei hierdie twee spesies van Springbokvlakte in dieselfde area en geniet gevolglik dieselfde klimaat en grondtoestande. Dit is waarskynlik dat vermenging van gene alreeds begin plaasvind by hierdie twee spesies van die betrokke area, aangesien bome voorkom wat morfologiese eienskappe van beide verteenwoordig en as hibriedes uitgeken kan word. Hierdie vermoede word verder versterk deurdat die twee spesies volgens hulle geurprofile ook naverwant skyn te wees.

Figuur 5-21. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van drie variasies van Acacia:

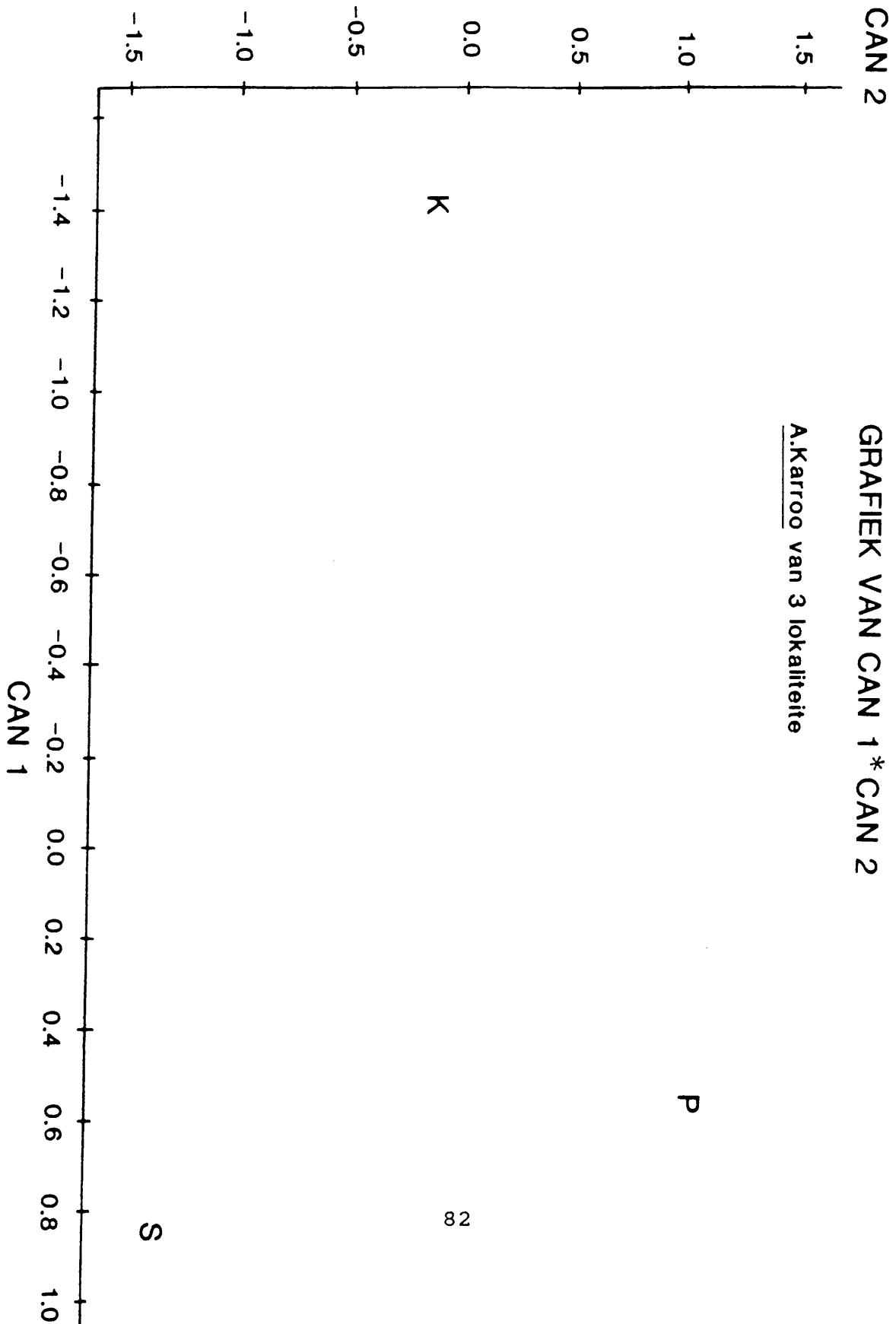


b-ii) 'n Algemene verskynsel van die statistiekpakket CANDISC is dat hoe minder spesies betrokke is, hoe beter is die skeiding tussen die spesies. Enige spesie kan uitgelig word. In hierdie geval word die duidelike skeiding tussen die drie variasies van Acacia karroo aangetoon, ter wille van visuele duidelikheid. Hierdie kennis kon reeds tydens die derde rondte bekom word (figuur 5-22).

Morfologies is A.karroo van Roossenkal die mees diskriminante variasie van die drie, wat dan ook ooreenstem met die verspreiding op die verspreidingsdiagram, aangesien A.karroo (S) van Roossenkal die verste weg van die ander twee lê. Volgens die literatuur stem hierdie gegewens ooreen met 'n elektroforese polimorfisme ondersoek van blaaroksidase in A.karroo in Suid-Afrika, wat deur Brain [98] uitgevoer is. Hierdie ondersoek het 3080 individuele bome van 42 verskillende lokaliteite betrek. Die data is statisties verwerk en met behulp van groepeeringsanalise ('cluster analysis') is drie genetiese rasse blootgelê, naamlik 'n Westelike / Karroo ras, 'n intermediêr / Oos-Kaap ras en 'n Oostelike, Natal-Laeveld ras. Die Westelike ras vertoon baie verskillend van die ander twee rasse, selfs ten opsigte van die morfologie van die wortels. Die Oos-Kaap ras is beide geneties en geografies intermediêr. Die Karroo ras het 'n hoogste frekwensie van die stadiger bande K en I, terwyl die Oos-Kaap ras die hoogste frekwensie het van die sentrale M band en die Oostelike Natal-Laeveld ras met hoogste frekwensie van die vinnigste bande N en O en zero K. Laasgenoemde ras ontmoet 'n ras met hoër K frekwensie by twee plekke - naby die Natal-Transkei grens op die Oos-Kus waar daar 'n geleidelike oorgang is van zero K, soos na die Noorde beweeg word, en by die noordelike einde van die ring tot wes van Pietersburg, waar 'n skielike daling in die k frekwensie waar geneem word. Die frekwensie daling is van 29% tot 3% binne enkele kilometers vanaf wes na oos [98].

Die spesies omsirkel die Drakensbergmassief, met geen genevloei in breedte nie [98]. Volgens 'n artikel van Wake en Yanev (1986) is ringspesies waarin 'n reeks populasies rondom 'n natuurlike grens van genevloei gerangskik is, van buitengewone evolusionêre belang [116]. Die individuele populasies verskil nie net biochemies nie, maar ook morfologies. Volgens bevindinge van Wake en Yanev blyk A.karoo 'n spesie van hierdie tipe te wees. 'n Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van hierdie drie variasies toon presies wat Wake en Yanev met bogenoemde ondersoek bevind het (sien figuur 5-22).

Figuur 5-22. Twee-dimensionele verspreidingsdiagram van drie variasies van A.karoo uit verskillende lokaliteite:



HOOFSTUK 6.

GEVOLGTREKKING:

1. Soos blyk uit die resultate, kon die dinamiese oplos-middeleffek uiters geslaagd aangewend word in die analise van die geurverbindings van al 21 taksons van Acacia wat ondersoek is. Alle spesies kon in slegs vier rondtes van statistiese verwerking van die data met CANDISC, suksesvol geskei en gekarteer word op twee-dimensionele verspreidingsdiagramme.

2. Implisiet kon aangetoon word dat die herhaalbaarheid van die bodamp-GC tegniek net so goed of beter is as die beste herhaalbaarheid verkry met die chromatogramme van verskillende bome van dieselfde spesie.

Wat bodamp-gaschromatografie met behulp van die oplosmiddeleffek betref, is die ideaal dus bereik, dat die variasie van die monsters wat geanaliseer word, die bykomende variasie van die analitiese tegniek heeltemal oorheers [7].

Die feit dat die bodamp-analises gedoen is van monsters met totale massa minder as 1 g, maak die tegniek des te meer merkwaardig. Die massas van verbindings wat die geurprofiële verteenwoordig varieer tussen sowat 1 ng tot 100 ng en die ooreenkomstige konsentrasie van die bodamp was sowat 1 - 100 dele per 10⁹ dele (1 - 100 dpb). Die verbindings verteenwoordig 'n wye reeks van vlugtighede.

3. Dit wil voorkom of die geurprofiële spesifiek is vir bepaalde spesies, eerder as wat dit 'n kenmerk is op grond waarvan breër groeperings in die genus Acacia gedoen kan word. Ten opsigte van bestuiwing lyk dit logies dat dit so moet wees aangesien geur 'n sekondêre aanlokmiddel vir bestuiwers is; spesifieke geurprofiële behoort dan spesifieke bestuiwers te lok (selektiewe bestuiwing) wat daartoe sal lei dat interspesifieke bestuiwing teengewerk en intraspesifieke bestuiwing bevorder sal word.

4. Die bodamp-samestelling van Acacia blomme bevat genoegsame en herhaalbare inligting om as vingerafdruk van die betrokke spesie te dien. Hoewel hierdie studie beperk was tot slegs 21 Acacia spesies uit 'n bepaalde geografiese gebied van Suid-Afrika, is daar geen ooglopende rede dat die studie nie suksesvol uitgebrei kan word na klassifikasie van alle spesies in verskeie grondsoorte, klimaatstreke en geografiese gebiede nie. Bodamp-analise is moontlik nog nie voorheen suksesvol in die chemotaksonomie gebruik nie en is 'n belangrike toevoeging tot die bestaande reeks analitiese tegnieke wat in hierdie vakgebied gebruik kan word. 'n Voorvereiste vir suksesvolle bodamp-gaschromatografie is 'n baie herhaalbare inlaat-tegniek vir komplekse en uiters verdunde mengsels van organiese verbindings. Die bekende tekortkominge van konvensionele inlaattegnieke is waarskynlik die rede dat bodamp-gaschromatografie tot dusver nog nie in die chemotaksonomie aangewend is nie.

HOOFSTUK 7.

BRONVERWYSING:

- 1]. SWARTZ, P.P., MSc verhandeling, Universiteit van Pretoria, Pretoria. (1982) p. 10.
- 2]. ROBBERTSE, P.J., Margaretha Mes Instituut vir Saadnavorsing, Universiteit Pretoria, Persoonlike mededeling 1990.
- 3]. APPS, P.J., PRETORIUS, V., ROHWER, E.R., CENTNER, M.R., VILJOEN, H.W. & HULSE, G. Trace analysis of complex organic mixtures using capillary gas-liquid chromatography and the dynamic solvent effect. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10 (1987) pp. 122-127.
- 4]. APPS, P.J. High-precision sampling of trace gas-borne volatiles by the dynamic solvent effect with a comparative review of alternative techniques. J. Chromatogr., 504 (1990) pp. 21-43.
- 5]. APPS, P.J. and PRETORIUS, V. Comparison between the conditions for solute focussing by the static and dynamic solvent effects under ideal conditions. J. Chromatogr., 471 (1989) pp. 397-400.
- 6]. CENTNER, M.R., APPS, P.J., VILJOEN, H.W. & PRETORIUS, V. Simultaneous accumulation and derivatization of volatiles using the dynamic solvent effect. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 11 (1988) pp. 521-524.
- 7]. APPS, P.J., High-precision sampling of sub-nanogram, low-parts-per-billion solutes from liquids using the dynamic solvent effect. J. Chromatogr., 511 (1990) pp. 271-279.

- 8]. CHARALAMBOUS, G., Analysis of foods and beverages. Headspace Techniques. Academic Press, New York. (1978) p. xii.
- 9]. DIRINCK, P., DE POOTER, H., WILLAERT, G. & SCHAMP, N., Analysis of volatiles - Methods and applications. Walter de Gruyter, Berlin. (1984) p. 381.
- 10]. MACK, H., KOPSEL, M. and PILZ, W., Communication presentee au Veme Congres international des huiles essentielles, Sao Paulo ; Suppl. des Annales de l'Academie bresilienne des sciences. 44 (Mauro Taveira Magalhaes, Sdatiel Kotta, edit.), (1972) p. 203.
- 11]. KAISER, R. and LAMPARSKY, D., Communication presentee au Villemes Congres international des huiles essentielles, Cannes Grasse, Oct. 1980 - Actes du Congres 90 (n° 90). (1980) p.
- 12]. SANDRA, P & BICCHI, C., Microtechniques in essential oil analysis in Capillary Gas Chromatography, in: Essential Oil Analysis. (P. Sandra & C. Bicchi eds.), Hüthig, Heidelberg. (1987) pp. 85-122.
- 13]. SANDRA, P., Sample Introduction, in: Capillary Gas Chromatography, in: Chromatographic Methods Vol. 1 (P. Sandra ed.), Hüthig, Heidelberg. (1985) p. 16.
- 14]. SANDRA, P., Sample Introduction, in: Capillary Gas Chromatography, in: Chromatographic Methods Vol. 1 (P. Sandra ed.), Hüthig, Heidelberg. (1985) p. 17.
- 15]. IOFFE, B.V. & VITENBERG, A.G., Head-Space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography. John Wiley & Sons, New York. (1983) pp. 49-57.

- 16]. CRONIN, D.A. Techniques of analysis of flavours - chemical methods including sample preparation, in: Food flavours, Part A. Introduction (I.D.Morton and A.J.McLeod, eds.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York. (1982) p. 15.
- 17]. JENNINGS, W.G. and RAPP, A., Sample preparation for gas chromatographic analysis. Alfred Hüthig, Heidelberg, Basel, New York. (1983) p.
- 18]. SCHAEFER, J., Comparison of adsorbents in headspace sampling, in: FLAVOURS '81. (P. Schreier ed.), W.de Gruyter, Berlin, New York. (1981) p.
- 19]. SCHAEFER, J., Isolation and concentration from the vapour phase, in: Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research. (H.Maarse & R.Beltz, eds.), Akademie-Verlag, Berlin. (1981) p.37.
- 20]. RAPP, A., An analysis of grapes, wines and brandies, in: Applications of Glass capillary Gas Chromatography. (W.G. Jennings ed.), Marcel Dekker, New York. (1981) pp. 579-621.
- 21]. PRETORIUS, V. and LAWSON, K.H., S.A. J. Chem., 37 (1984) p. 2.
- 22]. PRETORIUS, V., LAWSON, K.H. & ROHWER, E.R., A Joule-Thomson Cooler for Stationary-Phase or Thermal Focusing in Capillary GLC, J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) pp. 298-300.
- 23]. WILLIS, D.E., Anal. Chem., 40 (1968) p. 1597.

24]. ADAM, S., Efficiency of Cryogenic On-column and Pre-column Focusing of Volatile Compounds for High-Resolution GC. J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 6 (1983) p. 36.

25]. JACOBSON, S. and BERG, S., Evaluation of a Rotary Valve / Cold Trap / Reinjection System for Capillary Columns, J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 5 (1982) p. 236.

26]. TERANISHI, R., MON, T.R., ROBINSON, A.B., CARY, P. & PAULING, L. Gas chromatography of volatiles from breath and urine, in: Advances in Chromatography. (A. Zlatkis ed.) 1971 Chromatography Symposium, University of Houston, Houston. (1971) pp. 135-137.

27]. COCHRAN, J.W. Selective water removal in purge/GC analysis of volatile aromatics in aqueous samples. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10 (1987) pp. 573-575.

28]. NOIJ, T., VAN ES, A., CRAMERS, C., RIJKS, J. & DOOPER, R. Selective removal of water in purge and cold-trap capillary gas chromatographic analysis of volatile organic traces in aqueous samples. J. High Resolut. Chromatogr. Commun., 10 (1987) pp. 60-66.

29]. LIEBICH, H.M. & AL-BABBILI, O. Gas chromatographic-mass spectrometric study of volatile organic metabolites in urines of patients with diabetes mellitus. J. Chromatogr., 112 (1975) pp. 539 - 550.

30]. RAYMER, J., WIESLER, D., NOVOTNY, M., ASA, C., SEAL, U.S. & MECH, L.D. Chemical investigations of wolf (Canis lupus) anal-sac secretion in relation to breeding season. J. Chem. Ecol., 11 (1985) pp. 593-608.

- 31]. SCHMIDBAUER, N. & OEHME, M., Improvement of a cryogenic preconcentration unit for C₂-C₆ hydrocarbons in ambient air at ppt levels. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) pp. 502-505.
- 32]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, (1988) p. 153.
- 33]. PANKOW, J.P. & ISABELLE, Lorne M., Adsorption-thermal desorption as a method for the determination of low levels of aqueous organics. J. Chromatogr., 237 (1982) pp. 25-39.
- 34]. WILLIAMS, P.J. & STRAUSS, C.R. Apparatus and procedure for reproducible, high resolution gas chromatographic analysis of alcoholic beverage headspace volatiles. J. Inst. Brew., 83 (1977) pp. 213-219.
- 35]. LEE, K.Y., NUROK, D. & ZLATAKIS, A. Combined headspace and extraction technique for profile analysis by capillary gas chromatography. J. Chromatogr., 158 (1978) p. 86.
- 36]. LANGLOIS, D., MIELLE, P. & ETIEVANT, P., Device for injection of absorbent-trapped compounds on to a WCOT column. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 7 (1984) pp. 477-479.
- 37]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) pp. 182-185.
- 38]. BELKIN, F. & EPOSITO, G.G., Dynamic thermal stripping procedure for the analysis of fuel oil no. 2 and kerosene in water. J. Chromatogr. Sci., 24 (1986) pp. 216-219.

- 39]. SCHAEFER, J., Isolation and concentration from the vapour phase, in: Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research. (H. Maarse and R. Belz, eds.), Akademie-Verlag, Berlin (1981) pp.
- 41]. WEURMAN, C. Isolation and concentration of volatiles in food odor research, J. Agric. Food Chem., 17 (1969) p. 370.
- 42]. TERANISHI, R., ISSENBERG, P., HORNSTEIN, I. and WICK, E. Flavor research, Marcel Dekker, New York. (1971) pp.
- 43]. JENNINGS, W.G. & FILOSOOF, M., Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis. J. Agric. Food Chem., 25 (1977) p. 441.
- 44]. JENNINGS, W.G., Gas chromatography with glass capillary columns.(2nd. ed.), Academic Press, New York, London. (1980) p.
- 45]. JENNINGS, W.G. and RAPP, A. Sample preparation for gas chromatographic analysis. Alfred Hüthig, Heidelberg, Basel, New York. (1983) p.
- 46]. SCHAEFER, J., FLAVOUR'81 (P. Schreier, ed.), W. de Gruyter, Berlin, New York (1981) p. 301.
- 47]. SCHAEFER, J., Isolation and concentration from the vapour phase, in: Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research (H.Maarse & R.Beltz, eds.), Akademie - Verlag, Berlin (1981) p. 37.
- 48]. SUGISAWA, H. Sample preparation: Isolation and concentration, in : Flavor research - Recent Advances, Food Sciences Ser. 7 (R. Teranishi, R.A. Flath & H. Sugisawa, eds.), Marcel Dekker, New York. (1981) p. 11.

49]. NAMIESNIK, J., TORRES, L., KOZLOWSKI, E. & MATHIEU, J., Evaluation of the suitability of selected porous polymers for preconcentration of volatile organic compounds. J. Chromatogr., 208 (1981) pp. 239-252.

50]. VAN DER STRAETEN, D., VAN LANGENHOVE, H. & SCHAMP, N. Comparison between theoretical and experimental sampling efficiencies on Tenax GC. J. Chromatogr., 331 (1985) pp. 207-218.

51]. SUPELCO. Carbotrap - an excellent adsorbent for sampling many airborne contaminants. The Supelco Reporter , 5 (1986) pp. 5-7.

52]. JEMIOLO, B., ANDREOLINI, F., WIESLER, D & NOVOTNY, M. Variations in mouse (Mus musculus) urinary volatiles during different periods of pregnancy and lactation. J. Chem. Ecol., 13 (1987) pp. 1941-1956.

53]. GROB, K. & HABICH, A. Headspace Gas Analysis: The role and the design of concentration traps specifically suitable for capillary gas chromatography. J. Chromatogr., 321 (1985) pp. 45-58.

54]. BURGER, B.V. & MUNRO, Z. Headspace gas analysis. Quantitative trapping and thermal desorption of volatiles using fused silica open tubular capillary traps. J. Chromatogr., (1986) pp. 449-464.

55]. BURGER, B.V. & MUNRO, Z. & VISSER, J.H. Determination of plant volatiles 1: Analysis of the insect-attracting allomone of the parasitic plant Hydnora Africana using Grob-Habich activated charcoal traps. J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 11 (1988) pp. 496-499.

- 57]. ROERAADE, J. and ENZELL, C.R., Tobacco chemistry xiv. Sampling concentration and examination of tobacco headspace vapors, J. Agric. Food Chem., 20 (1972) p. 1035.
- 58]. GROB, K. and ZÜRCHER, F., Stripping of trace organic substances from water equipment and procedure., J. Chromatog., 117 (1976) p. 285.
- 59]. CLARK, R.G. and NURSTEN, H.E., The sensory analysis and identification of volatiles from walnut (Juglans regia, L) headspace., J. Sci. Food Agric., 28 (1977) p. 69.
- 60]. BICCHI, C. and D'AMATO, A., Capturing of volatiles emitted by living plants by means of thick film open tubular traps., J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 12 (1989) pp. 316-321.
- 61]. FRANSON, M.A.H., Standard Methods for the examination of water and wastewater., (16th ed.) American Public Health Association.(Greenberg, A.E. et al., eds.), (1985) pp. 602-603.
- 62]. FRANSON, M.A.H., Standard Methods for the examination of water and wastewater., (16th ed.) American Public Health Association. (Greenberg, A.E. et al., eds.), (1985) pp. 605-608.
- 63]. KRASNER, S.W., HWANG, C.J. & MCGUIRE, M.J. Development of a closed-loop-stripping technique for the analysis of taste-and-odor-causing substances in drinking water., in Advances in the Identification and analysis of organic pollutants in drinking water. 2. (Keith, L. ed.) Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor. Michigan. (1981) p. 689.

64]. COLEMAN, W.E., ALLEN, W.K., SLATER, R.W., VOTO, S.J., MELTON, R.G., KOPFLER, F.C. and AURAND, T.A., Automatic Quantification and Statistical evaluation of organic contaminants using a computerized glass capillary gas chromatography / mass spectrometry system and Grob- closed- loop stripping, in : Advances in the identification and analysis of organic pollutants in water. 2 (KEITH, L.H. ed.), Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor. Michigan. (1981) p. 688.

65]. MELTON, R.G., COLEMAN, W.E., SLATER, R.W., KOPFLER, F.C., ALLEN, W.K., AURAND, T.A., MITCHELL, D.E. and VOTO, S.J., Comparison of Grob-closed-loop stripping analysis with other trace organic methods, in : Advances and identification of organic pollutants in water. 2 (KEITH, L. ed.), Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, Michigan. (1981) p. 668.

66]. KRASNER, S.W., HWANG, C.J. & MCGUIRE, M.J., A Standard method for quantification of earthy-musty odorants in water, sediments and algal cultures. Wtr. Sci. Technol., 15 (1984) p. 127.

67]. MAARSE, H. and SCHAEFER, J., Quantitative headspace analysis: Total and specific group analysis, in: Analysis of foods and beverages - Headspace Techniques. (G. Charalambous, ed.), Academic Press, New York, San Francisco, London. (1978) p. 17.

68]. SCHREIER, P., Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Dr. Alfred HÜthig Verlag GmbH, Heidelberg. (1984) p. 4.

69]. BICCHI, C. & D'AMATO, A., Capturing of Volatiles Emitted by Living Plants by means of Thick Film Open Tubular Traps., J. High

Resolut. Chromatogr., 12 (1989) pp. 316-321.

70]. GROB, K. & HABICH, A., Headspace Gas Analysis : The role and the design of concentration traps specifically suitable for capillary gas chromatography, J. Chromatogr., 321 (1985) pp. 57-58.

71]. PAVELKA, F., Microchim. Acta , 6 (1964) p. 1121.

72]. GROB, K. Chromatographia, 8 (1975) p. 423.

73]. JENNINGS, W.G., Vapor-Phase Sampling J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 2 (1979) p. 221.

74]. ROERADE, J. & BLOMBERG, S., Chromatog., 17 (1983) p. 387.

75]. LAWSON, K.H., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1987)

76]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, (1988) p. 148.

77]. APPS, P.J. High-precision sampling of trace gas-borne volatiles by the dynamic solvent effect with a comparative review of alternative techniques. J. Chromatogr., 504 (1990) p. 42.

78]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, (1988) p. 18.

79]. APPS, P.J. Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p. 125.

- 80]. APPS, P.J., PRETORIUS, V., LAWSON, K.H., ROHWER, E.R., CENTNER, M.R., VILJOEN, H.W. & HULSE, G., Trace Analysis of Complex Organic Mixtures Using Capillary Gas-Liquid Chromatography and the Dynamic Solvent Effect J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10 (1987) p. 340.
- 81]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p. 76.
- 82]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p.86.
- 83]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) pp. 98-108.
- 84]. APPS, P.J., PRETORIUS, V., LAWSON, K.H., ROHWER, E.R., CENTNER, M.R., VILJOEN, H.W. & HULSE, G., Trace analysis of Complex Organic Mixtures Using Capillary Gas-Liquid Chromatography and the Dynamic Solvent Effect J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10 (1987) p. 341.
- 85]. APPS, P.J., PRETORIUS, V., LAWSON, K.H., ROHWER, E.R., CENTNER, M.R., VILJOEN, H.W. & HULSE, G., Trace Analysis of Complex Organic Mixtures Using Capillary Gas-Liquid Chromatography and the Dynamic Solvent Effect. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10 (1987) p. 342.
- 86]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p. 146.
- 87]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p. 55.

- 88]. GROB, K., Organic substances in potable water and its precursor. Part 1. Methods for their determination by gas-liquid chromatography. J. Chromatogr., 84 (1973) pp. 255-273.
- 89]. TAKEOKA, G. & JENNINGS, W. Developements in the analysis of headspace volatiles: On-column injections into fused silica capillaries and split injections with a low- temperature bonded PEG stationary phase. J. Chromatographic Sci., 22 (1984) pp. 177-184.
- 90]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) p. 55.
- 91]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria. (1988) pp. 54-56.
- 92]. OLIVER, D., Flora of Tropical Africa, London, Reeve & Co. (1871) p.
- 93]. HARVEY, W.H. & SONDER, O.W., Flora Capensis II, Kent, Reeve & Co. (1894) p.
- 94]. BRENAN, J.P.M., Flora Zambesiaca, (1970) p.
- 95]. VON BREITENBACH, F., The Indigenous trees of Southern Africa. II , Government Printer, Pretoria. (1965) p.
- 96]. COATES PALGRAVE, K., Trees of Southern Africa., (2nd ed.), (1984) p. 241.
- 97]. ROBBERTSE, P.J., The genus Acacia in South Africa. II. Phytomorphology 24., 1 & 2 , (1974) pp. 1-15.

- 97a]. ROBBERTSE, P.J., A scanning electronmicroscopic investigation of the pollen of South African Acacia species. J. S. Afr. Bot. 40 (1974) pp. 91-99.
- 98]. BRAIN, P., Genetic races in a ring species, Acacia karroo, Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap, 85 (1989) pp. 181-185.
- 99]. SANDRA, P. & BICCHI, C., Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, Chromatographic Methods., (1987) p. 157.
- 100]. JELTES, R., J. Chromatogr. Sci., 12, (1974) p. 599.
- 101]. POLITZER, I.R., DOWLY, B.J. & LASETER, J.L., Clin. Chem., 22, (1976) p. 1775.
- 102]. SHARAF, M.A., ILLMAN, D.L. and KOWALSKI, B.R., Chemometrics, Chemical Analysis. 82, John Wiley and Sons, (1986) p.
- 103]. SHARAF, M.A. et al., Chemometrics - Chemical Analysis. 82. John Wiley & Sons. (1986) p. 184.
- 104]. SHARAF, M.A., ILLMAN, D.L., KOWALSKI, B.R., Chemometrics - Chemical Analysis. 82, John Wiley & Sons. (1986) p. 187.
- 105]. HANKE, J., REITSCH, A. & DICKSON, J.P., Statistical Decision Models for Management. Newton, Massachusetts: Allyn and Bacon Ind. (1984) p. 477.
- 106]. SANDRA, P. & BICCHI, C., Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis, Chromatographic Methods., (1987) p. 289.

- 107]. CHARALAMBOUS, G. & INGLETT, G. (eds), Instrumental Analysis of Foods, Recent Progress. Academic Press, New York. 1. (1983) p. 39.
- 108]. CHARALAMBOUS, G. & INGLETT, G. (eds), Instrumental Analysis of Foods, Recent Progress. Academic Press, New York. 1. (1983) p. 47.
- 109]. CHARALAMBOUS, G. & INGLETT, G. (eds), Instrumental Analysis of Foods, Recent Progress. Academic Press, New York. 1. (1983) p. 53.
- 110]. GABRI, G. & CHIALVA, F., Qualitative Evaluation of Aromatic Herbs by Direct Headspace (GC)² Analysis. Methodology and Some Preliminary Applications. HRC & CC, 4 (1981) p. 215.
- 111]. CHIALVA, F., GABRI, G., LIDDLE, P.A.P. & ULIAN, F., Qualitative Evaluation of Aromatic Herbs by Direct Headspace GC Analysis. Applications of the Method and Comparison with the Traditional Analysis of Essential Oils. HRC & CC, 5 (1982) p. 182.
- 112]. CHIALVA, F., DOGLIA, G., GABRI, G. & ULIAN, F., J. Chromatogr., 279 (1983) p. 333.
- 113]. BICCHI, C., D'AMATO, A., NANO, G.M. & FRATTINI, C., Chromatographia, 18 (1984) p. 560.
- 114]. CHARALAMBOUS, G. & INGLETT, G., Instrumental Analysis of Foods, Recent Progress, Academic Press, New York . 1. (1983) p. 38.
- 115]. WOLMARANS, H.P., Departement Statistiek, Universiteit van Pretoria, Persoonlike mededeling 1990.

117]. APPS, P.J., Ph.D. Thesis. University of Pretoria, Pretoria.
(1988) pp. 36-43.

HOOFSTUK 8.

ADDENDUM:

'n Basiese model van die meganisme van die dinamiese oplosmiddeleffek is deur Apps [117] as volg uiteengesit:

Wanneer 'n buis met beide 'n poreuse laag en oop kanaal langs die as, in 'n vloeistof gedoop word, word die poreuse laag benat en gevolglik sal vloeistof opstyg in die buis danksy kapillêre kragte. Die volgende formule toon die hoogte wat die vloeistof in die buis sal styg: [Levich 1962, p383]

$$h = 2 \tau / (p_1 \cdot g \cdot r_h) \quad \dots\dots\dots 1$$

Indien die poreuse laag verteenwoordigend is van onreëlmatige verpakking van die vaste stof sferiese deeltjies, geld:

$$r_h = 1 / [S_p \cdot (1 - \epsilon)] \quad \dots\dots\dots 2$$

$$S_p = [6 (1 - \epsilon)] / d_p \quad \dots\dots\dots 3$$

Vanuit [1],[2],[3], geld:

$$h = [12 \cdot \tau \cdot (1 - \epsilon)^2] / p_1 \cdot g \cdot \epsilon \cdot d_p \quad \dots\dots\dots 4$$

Die mees algemene oplosmiddel wat gebruik word is n-heksaan. Vir n-heksaan is: $p = 0,7 \text{ g.cm}^{-1}$; $\tau = 20 \text{ dyne.cm}^{-1}$ en vir onreëlmatige gepakte sferiese deeltjies is $\epsilon = 0,35$.

As die gemiddelde grootte van die deeltjies 0,1 mm is, dan is

$$h = 12 \cdot 20 \cdot (1 - 0,35)^2 / (0,7 \cdot 981 \cdot 0,35 \cdot 0,01) = 376 \text{ mm}$$

Dit is dus duidelik dat die vloeistoffilm 6-7 maal hoër styg as wanneer die dinamiese oplosmiddeleffek vir die monstering gebruik

word. Die hidrostatiiese druk op die gedrag van die film kan dus uitgelaat word vir die volgende model.

As daar geen drukgradiënt is nie soos hier die geval is, word die snelheid waarmee 'n vloeistof 'n porie as gevolg van kapillariteit binnedring, gegee deur :

$$U_{pp} = (r_h \cdot \tau) / (4 \cdot \eta \cdot L) \quad \dots\dots\dots 5$$

Die spoed waarmee 'n vloeistoffront binne-in 'n poreuse bed ingetrek word, word verminder deur die kronkeling van die kanale waardeur dit vloei:

$$U_{pb} = U_{pp} / \tau = (r_h \cdot \tau) / (4 \cdot \eta \cdot L \cdot \tau) \quad \dots\dots\dots 6$$

Die volumesnelheid waarmee die vloeistof in die poreuse laag invloei, hang af van die dwarsdeursnee area van die vloeistof annulus:

$$V_{pb} = (r_h \cdot \tau \cdot A_1) / (4 \cdot \eta \cdot L \cdot \tau) \quad \dots\dots\dots 7$$

Die volume vloeistof wat in die poreuse laag gehou word, hang af van die lengte van die benatte bed en die vloeistofannulus dwarsdeursnee area:

$$Q_1 = l_f \cdot A_1 \quad \dots\dots\dots 8$$

Wanneer gas afbeweeg met die aksiale kanaal sal die vloeistof wat in die bed opgestyg het verdamp tot gas. Verdamping sal dus beperk wees tot die boonste vlak van die film en die snelheid daarvan sal gegee word deur:

$$E_{1v} = (M_1 \cdot V_g \cdot P_v) / (R \cdot T \cdot p_1) \quad \dots\dots\dots 9$$

As die verdampingsnelheid hoër is as die tempo waarteen vloeistof in die poreuse laag inbeweeg, sal daar met tyd 'n vermindering wees in die volume vloeistof binne-in die poreuse laag en uit vergelyking 8, is dit duidelik dat die lengte van die film sal verminder. (A is vasgestel deur die geometrie van die poreuse laag).

$$l_f = L / \tau \quad \dots\dots 10$$

en uit vergelyking 7: Die volume wat die bed binnegaan is omgekeerd eweredig aan die lengte van die porieë waardeur die vloeistof diffundeer en die verkorting van die film laat 'n vinniger vloeistofsnelheid toe in die poreuse laag. Soos die film verkort word 'n punt bereik waar:

$$V_{pb} = E_{1v} \quad \dots\dots 11$$

en geen verdere verandering in filmvolume, filmlengte, of vloeistof-vloeistofsnelheid sal plaasvind nie. Die boonste vlak van die vloeistoffilm het nou 'n vaste posisie tussen die porieë en vloeistof word voorsien aan die poreuse laag deur middel van kapillêre krag teen 'n tempo (verg 7.) en verwyder deur middel van verdamping teen 'n tempo gegee deur verg. 9.

In die ewewigskondisie:

$$V_{pb} = (M_1 \cdot V_g \cdot P_v) / (R \cdot T \cdot p_1) \quad \dots\dots 12$$

Die verband tussen die gemiddelde lineêre snelheid van die opwaartse beweging van die vloeistof en die vloeivolume word gegee deur verg. 6 en verg. 7, respektiewelik:

$$U_{pb} = (M_1 \cdot V_g \cdot P_v) / (R \cdot T \cdot p_1 \cdot A_1) \quad \dots\dots 13$$

Dus vloei 'n vloeistof in 'n dinamiese oplosmiddelfilm opwaarts teen dieselfde snelheid as die snelheid waarmee die boonste vlak van die ekwivalente film afwaarts, beweeg.

onder ewewigstoestande beweeg opgeloste stowwe chromatografies weg van die verdampingssone en nà die verdampingssone deur die vloeistofvloei. Die snelheid vir die afwaartse beweging word gegee deur:

$$v_{sd} = U_g / (k_s + 1) \quad \dots\dots\dots 14$$

en die snelheid van die opwaartse beweging deur:

$$v_{su} = U_{pb} / [(1 / k_s) + 1] \quad \dots\dots\dots 15$$

$$\text{Opgeloste stowwe waarvan } v_{sd} > v_{su} \quad \dots\dots\dots 16$$

ondervind 'n netto afwaartse beweging en word weggestroop van die vloeistoffilm.

$$\text{Opgeloste stowwe waarvan } v_{sd} < v_{su} \quad \dots\dots\dots 17$$

ondervind 'n netto opwaartse beweging na die verdampingssone waar die opgeloste stowwe akkumuleer. Dit is die kondisie vir opgeloste stof fokusering deur die dinamiese oplosmiddeleffek.

Uit verg. 14 en verg. 15, kan oneweredigeheid verg. 17 herskryf word as:

$$U_g / (k_s + 1) < U_{pb} / [(1 / k_s) + 1] \quad \dots\dots\dots 18$$

$$U_{pb} / [(1 / k_s) + 1] = (U_{pb} \cdot k_s) / (k_s + 1) \quad \dots\dots\dots 19$$

Oneweredigheid (verg. 18) word dan:

$$U_g < (U_{pb} \cdot k_s) \quad \dots\dots 20$$

$$k_s > (U_g / U_{pb}) \quad \dots\dots 21$$

$$\text{en } U_g = V_g / A_g \quad \dots\dots 22$$

en vanuit verg. 13 volg dat:

$$k_s > V_g / [(M_1 \cdot V_g \cdot P_v \cdot A_g) / (R \cdot T \cdot p_1 \cdot A_1)] \quad \dots\dots 23$$

$$k_s > 1 / [(M_1 \cdot P_v \cdot \beta) / (R \cdot T \cdot p_1)] \quad \dots\dots 24$$

$$k_s > (R \cdot T \cdot p_1) / (M_1 \cdot P_v \cdot \beta) \quad \dots\dots 25$$

Soos in die geval van die statiese film (verg. 19):

$$k_1 = (p_1 \cdot R \cdot T) / (P_v \cdot M_1 \cdot \beta) \quad \dots\dots 26$$

sodat verg. 25 herskryf kan word as:

$$k_s > k_1 \quad \dots\dots 27$$

waaruit volg dat $K_s > K_1$

Ter verduideliking van simbole:

A_g = dwarsdeursnee area van die gaskanaal.

A_o = dwarsdeursnee area van die vloeistofannulus.

d_p = gemiddelde dearsnee van 'n deeltjie in poreuse materiaal.

E_{1m} = massa snelheid van oplosmiddelverdamping.

E_{1v} = volume snelheid van oplosmiddelverdamping.

g = versnelling as gevolg van swaartekrag.

h = hoogte van 'n vloeistofkolom.

k_1 = partisieverhouding van oplosmiddel tussen die gas en vloeistoffase.

k_s = partisieverhouding van die opgeloste stof tussen die vloeistof en die gas

l_f = lengte van die vloeistoffilm.

L = lengte van 'n porie.

m_1 = massa van oplosmiddel.

M_1 = molekulêre massa van 'n oplosmiddel.

p_1 = digtheid van 'n oplosmiddel.

p_v = parsiële dampdruk.

Q_1 = volume van 'n vloeistof.

r_h = hidrouliese radius.

R = universiële gaskonstante.

S_p = spesifieke oppervlakte area van 'n poreuse vastestof.

T = temperatuur.

U_f = snelheid van die stroomop kant van die film.

U_g = liniêre snelheid van die gas.

U_{pb} = liniêre snelheid waarmee 'n vloeistof 'n poreuse vastestof binnedring.

U_{pp} = liniêre snelheid waarmee 'n vloeistof 'n porie binnedring.

V_g = volumevloeiensnelheid van 'n gas.

V_{pb} = volume snelheid waarmee vloeistof in 'n poreuse vastestof invloei.

v_s = chromatografiese snelheid van opgeloste statiese film.

v_{sd} = chromatografiese opwaartse snelheid van 'n dinamiese film.

β = fase verhouding.

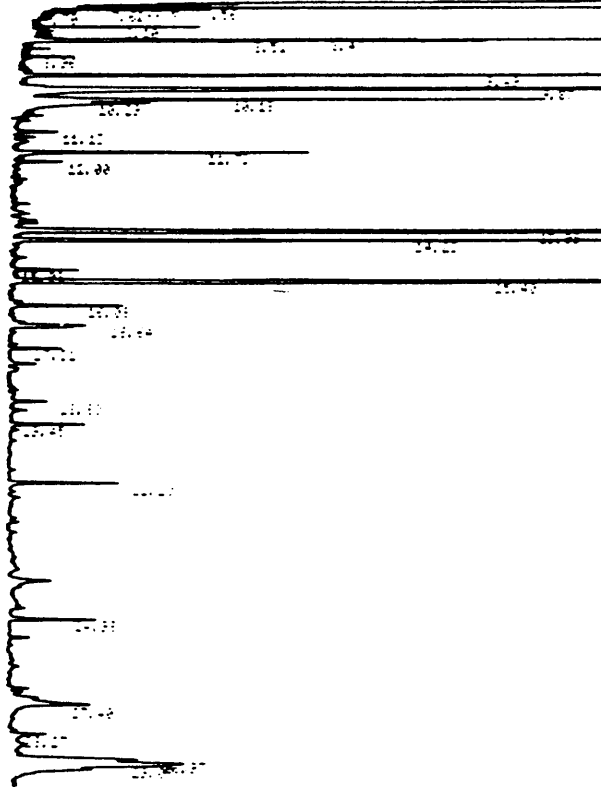
η = viskositeit.

ϵ = porositeit van 'n vaste stof.

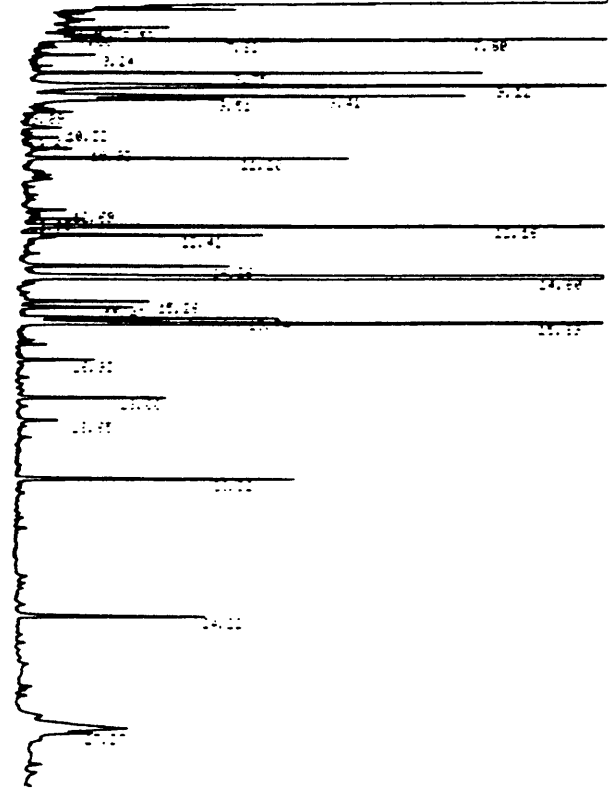
ω = tortuositeit van die porieë in 'n poreuse vaste stof.

τ = oppervlakspanning van 'n vloeistof.

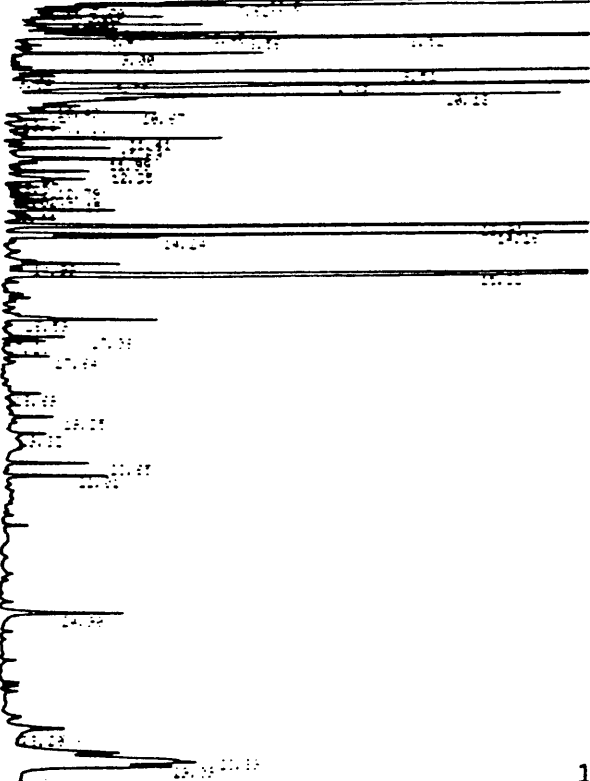
A. ataxacantha Boom 7



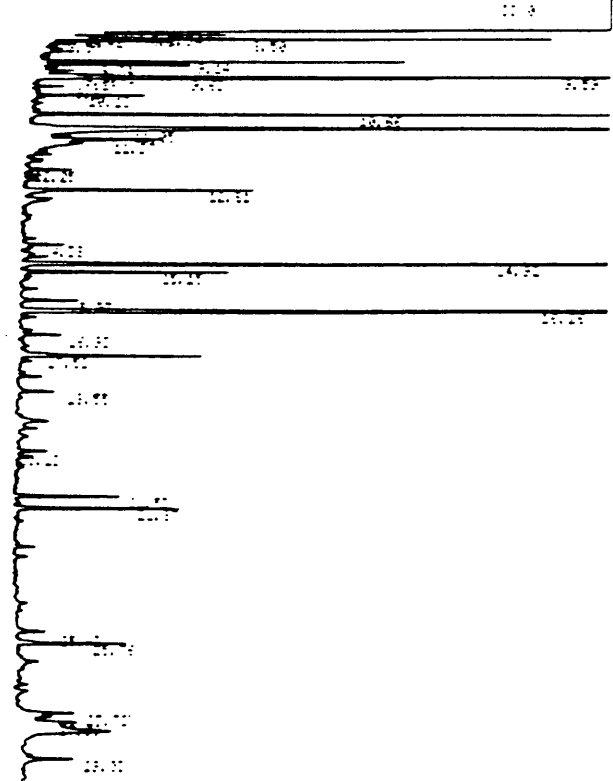
A. ataxacantha Boom 5

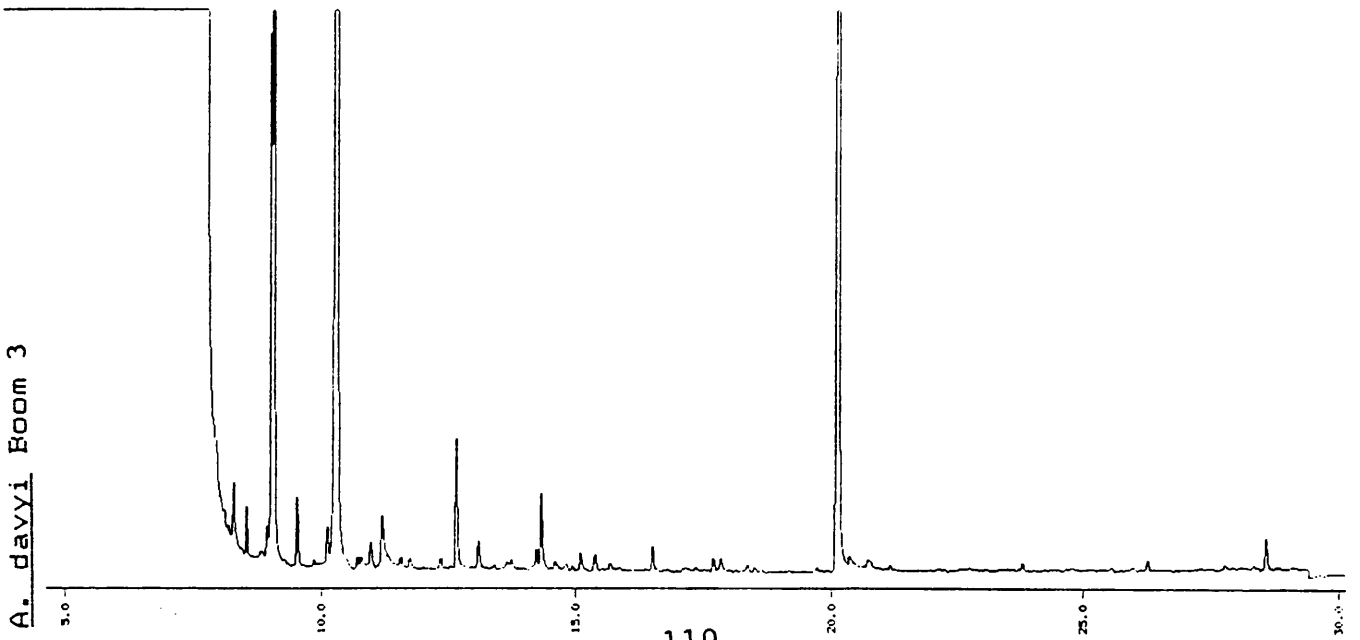
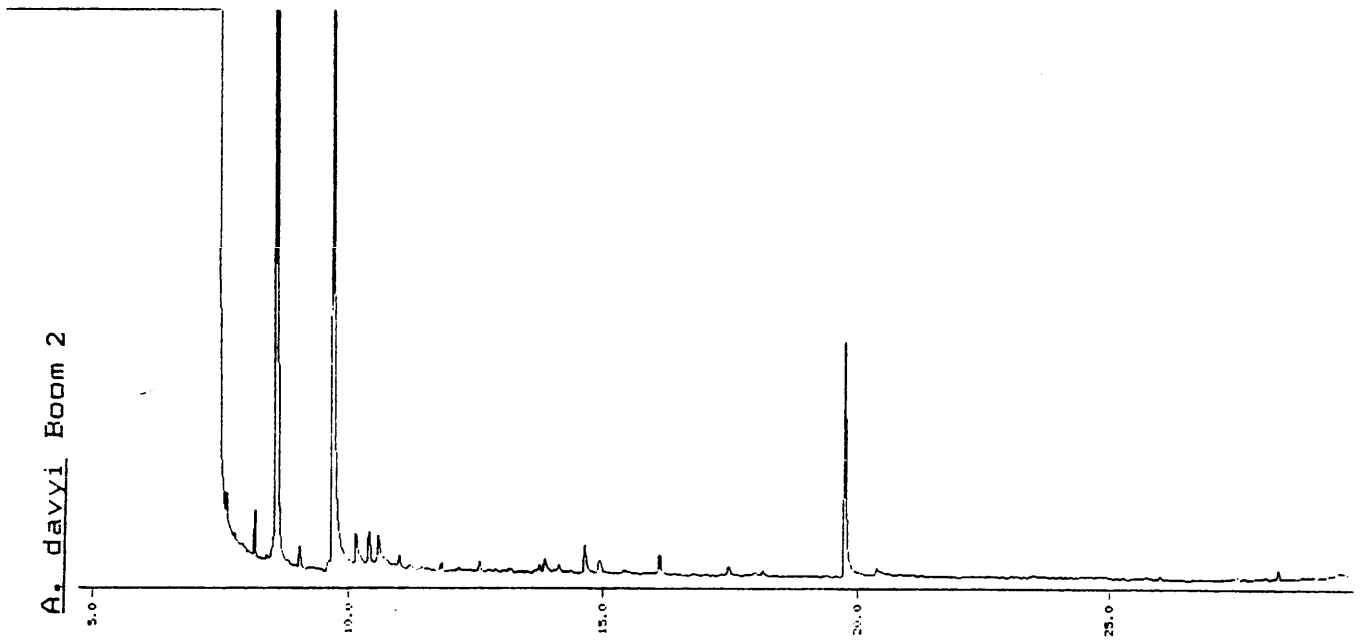
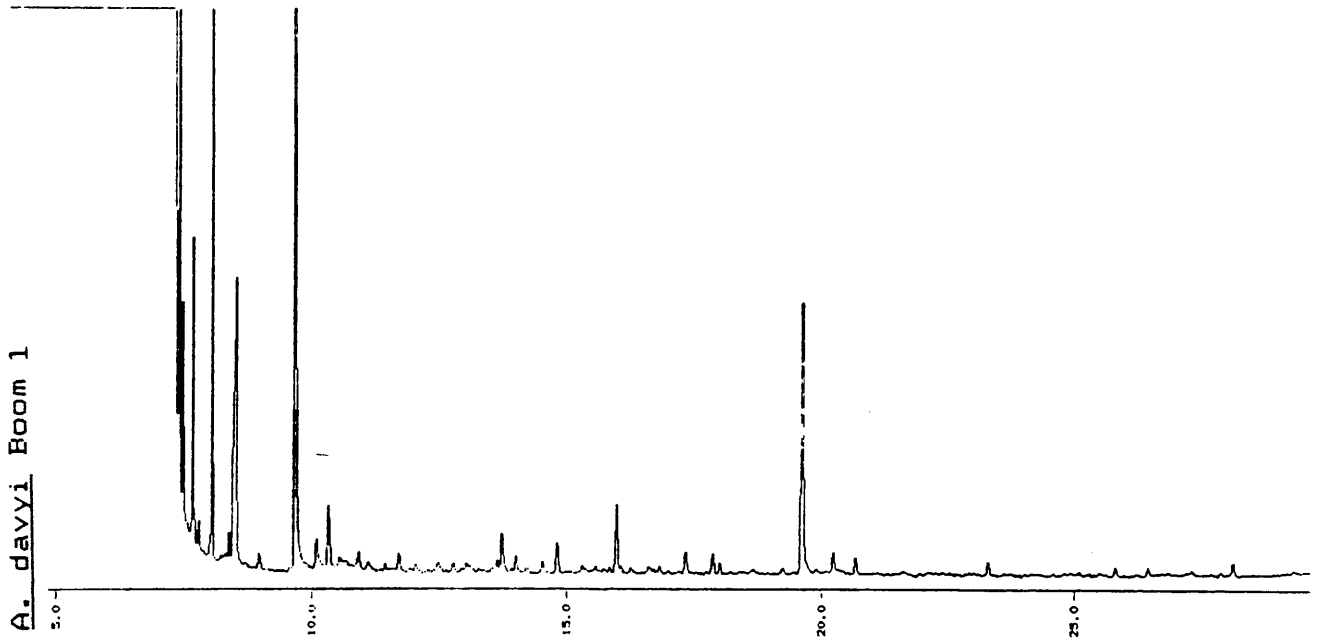


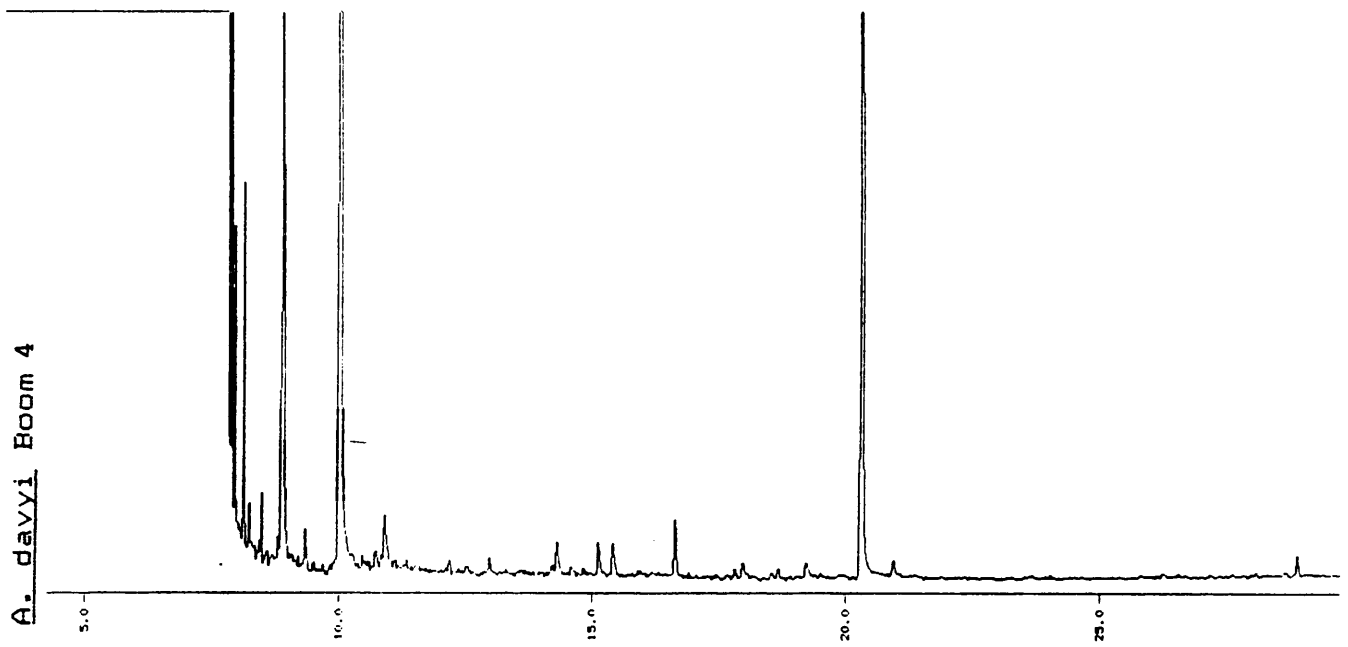
A. ataxacantha Boom 8

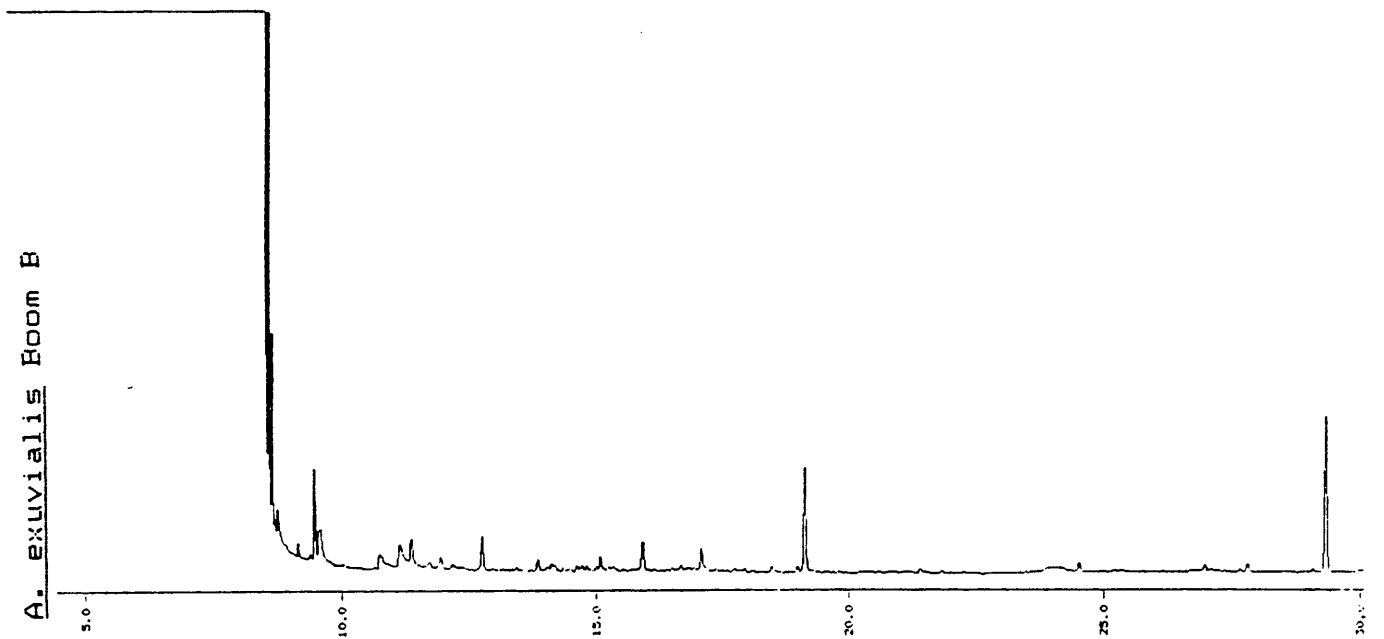
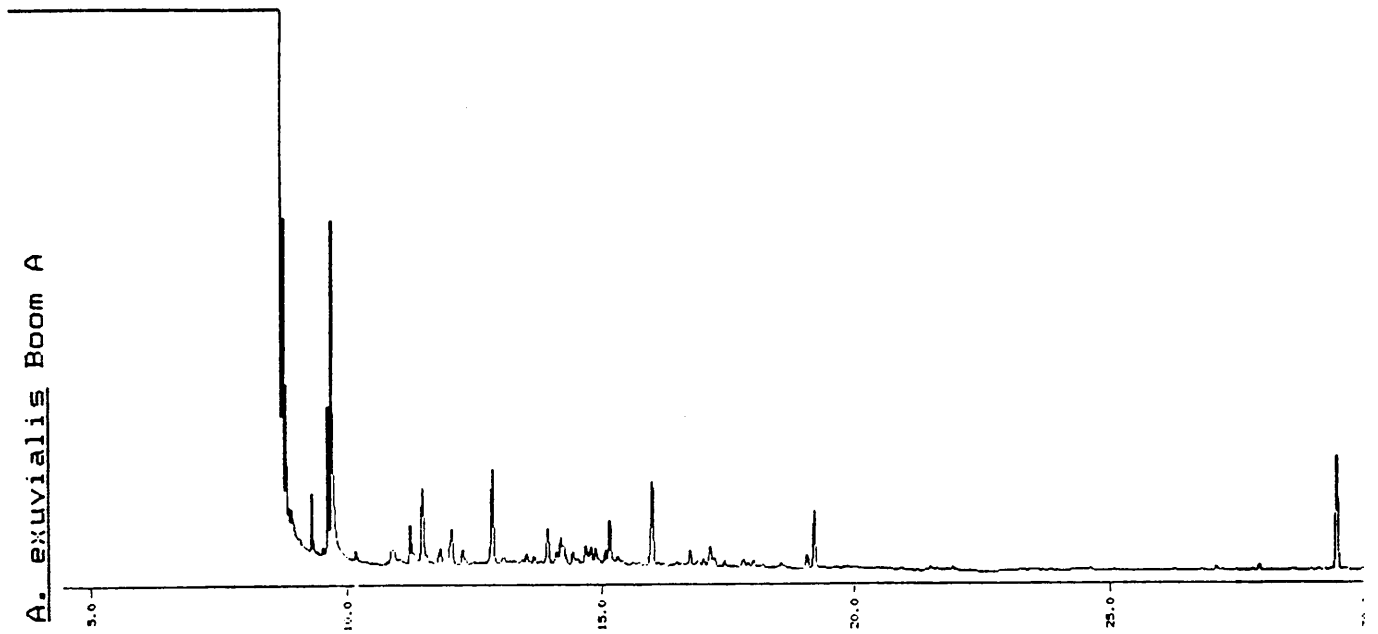


A. ataxacantha Boom 6

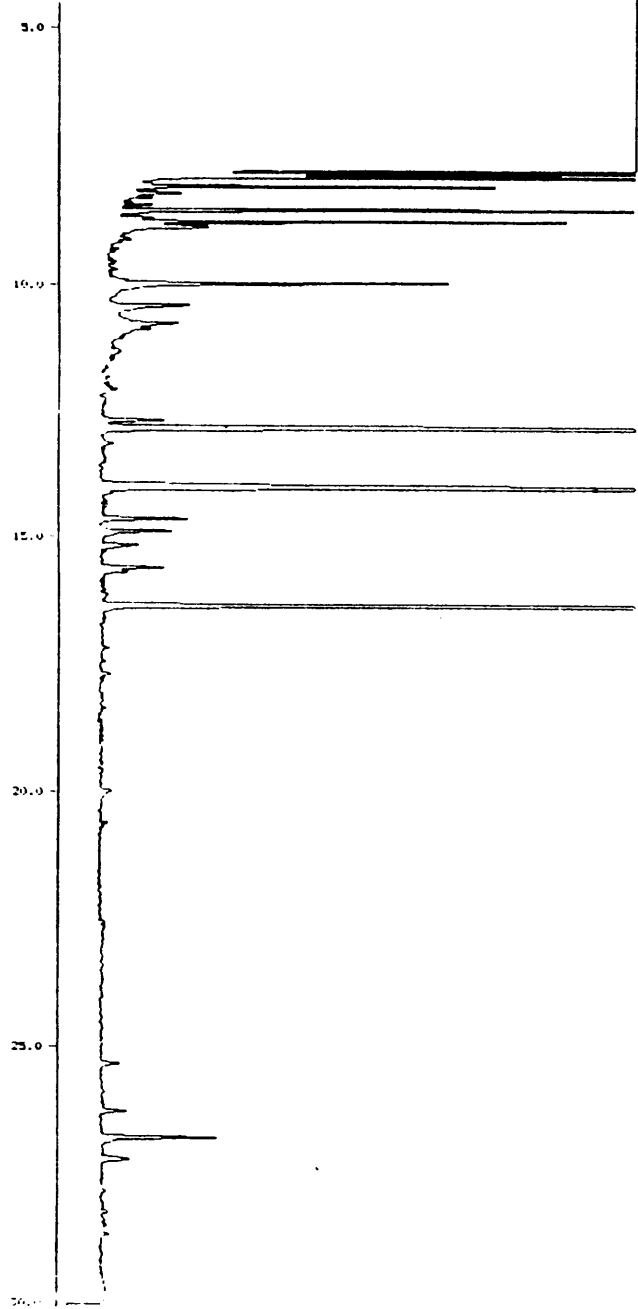




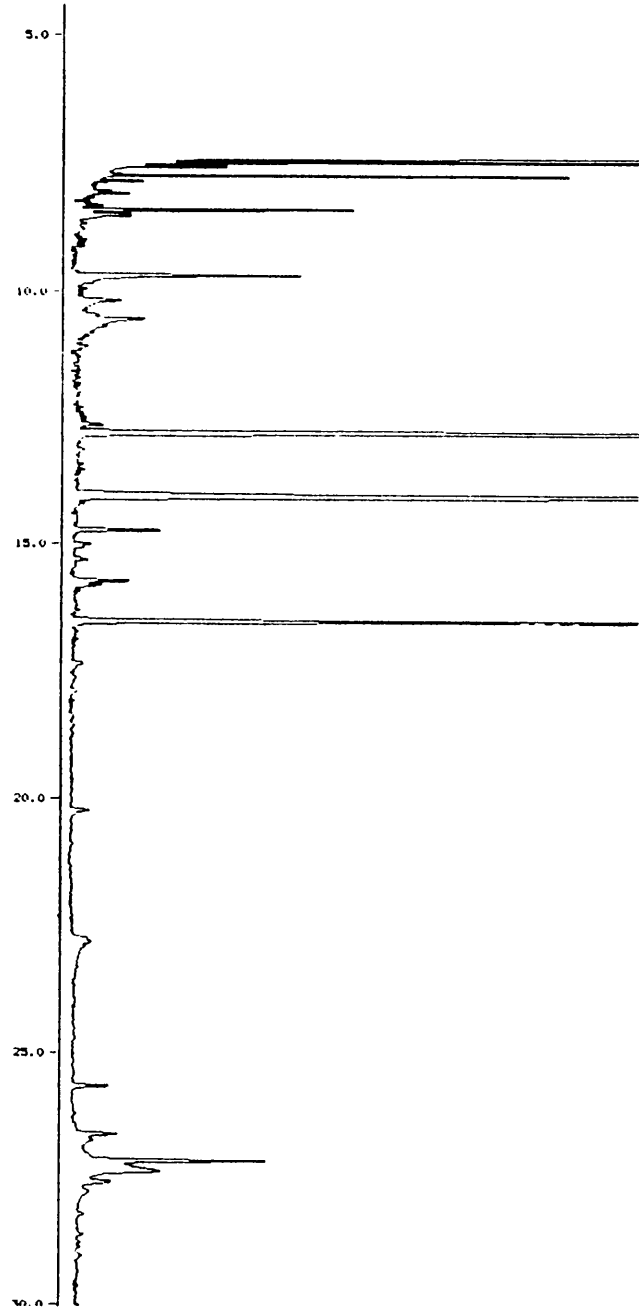




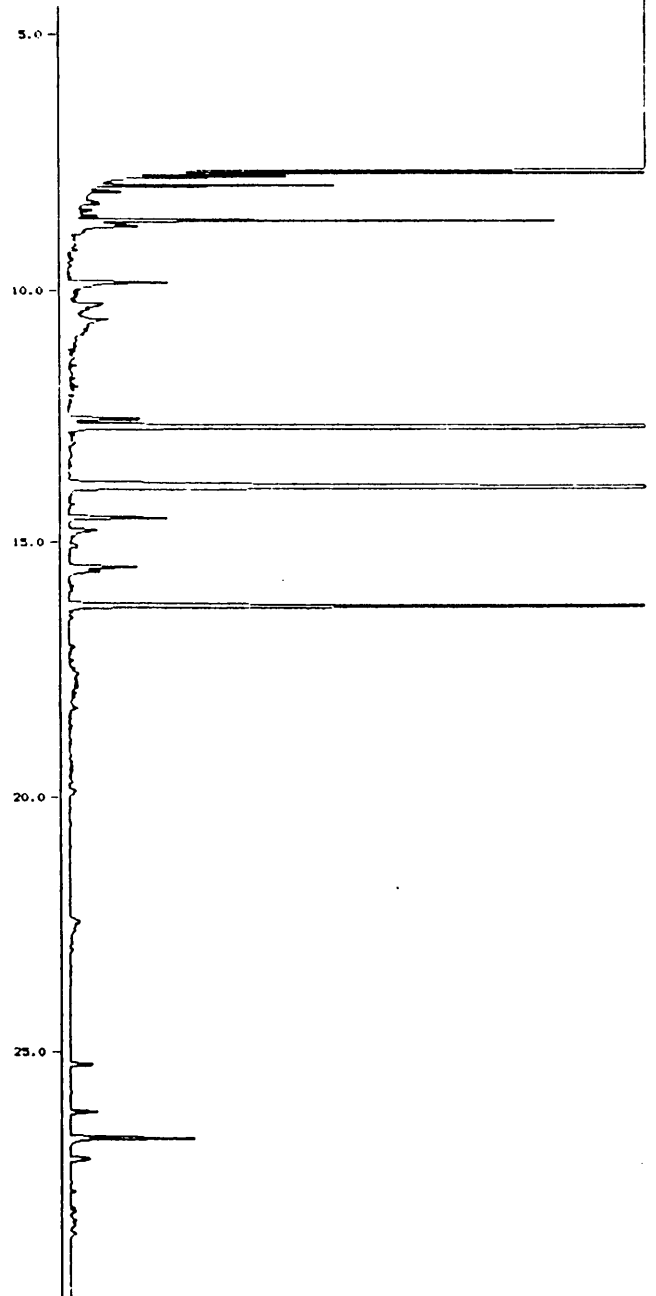
A. grandicornuta Boom 3

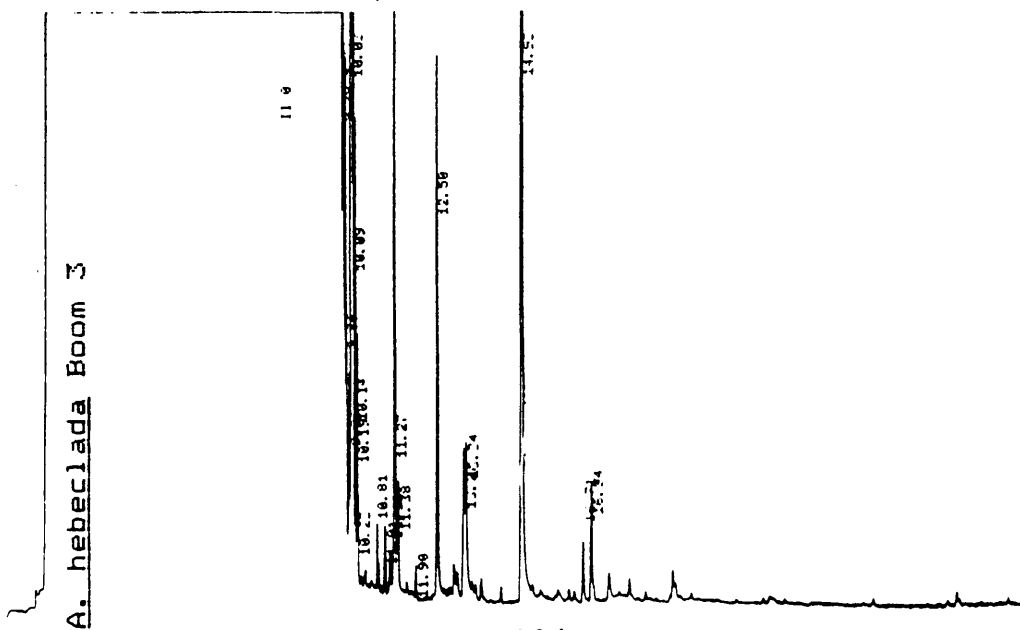
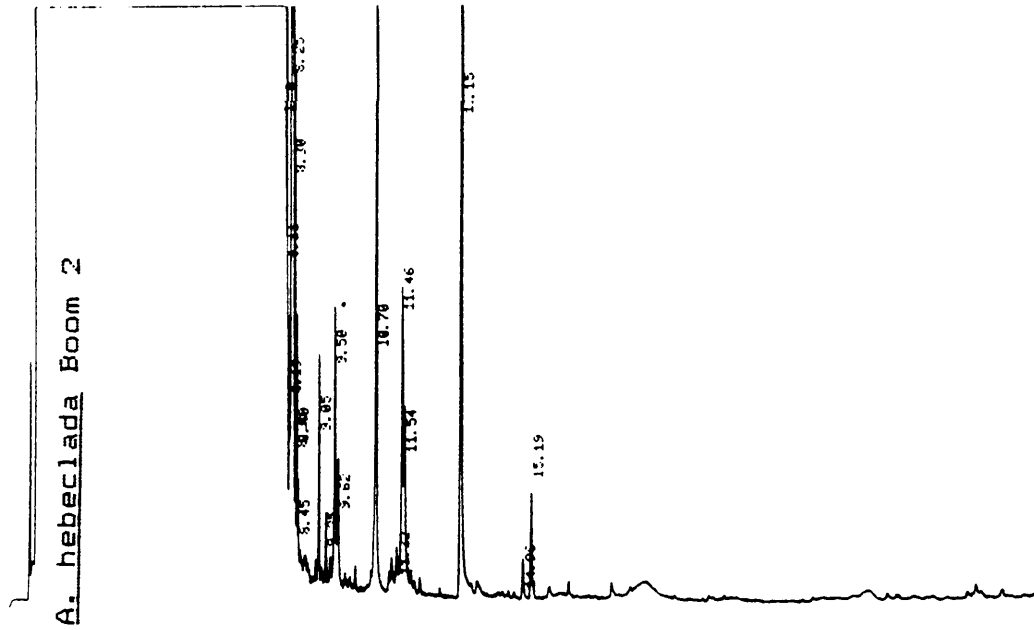
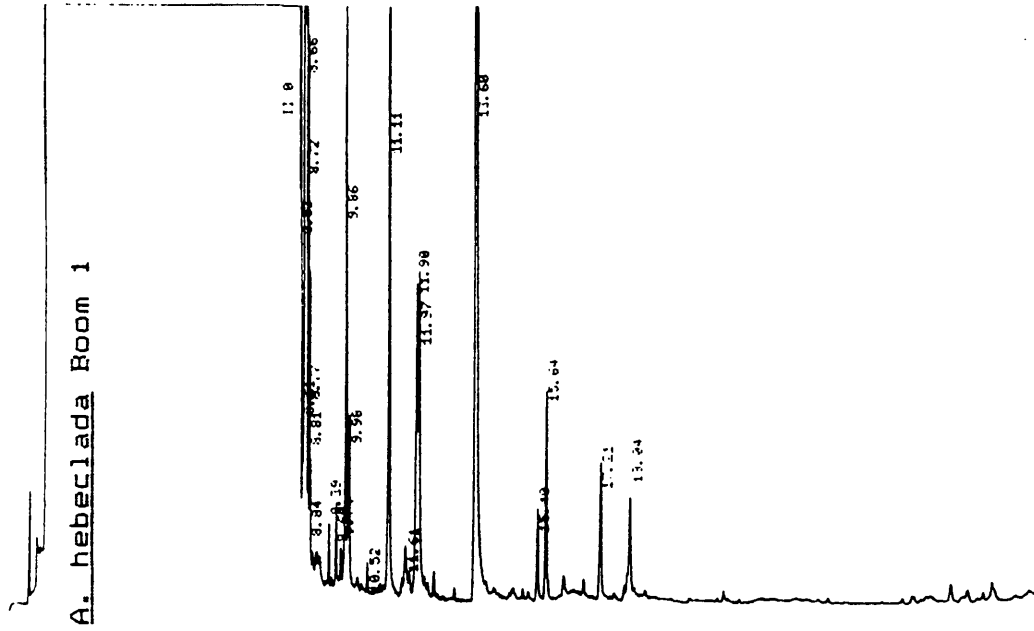


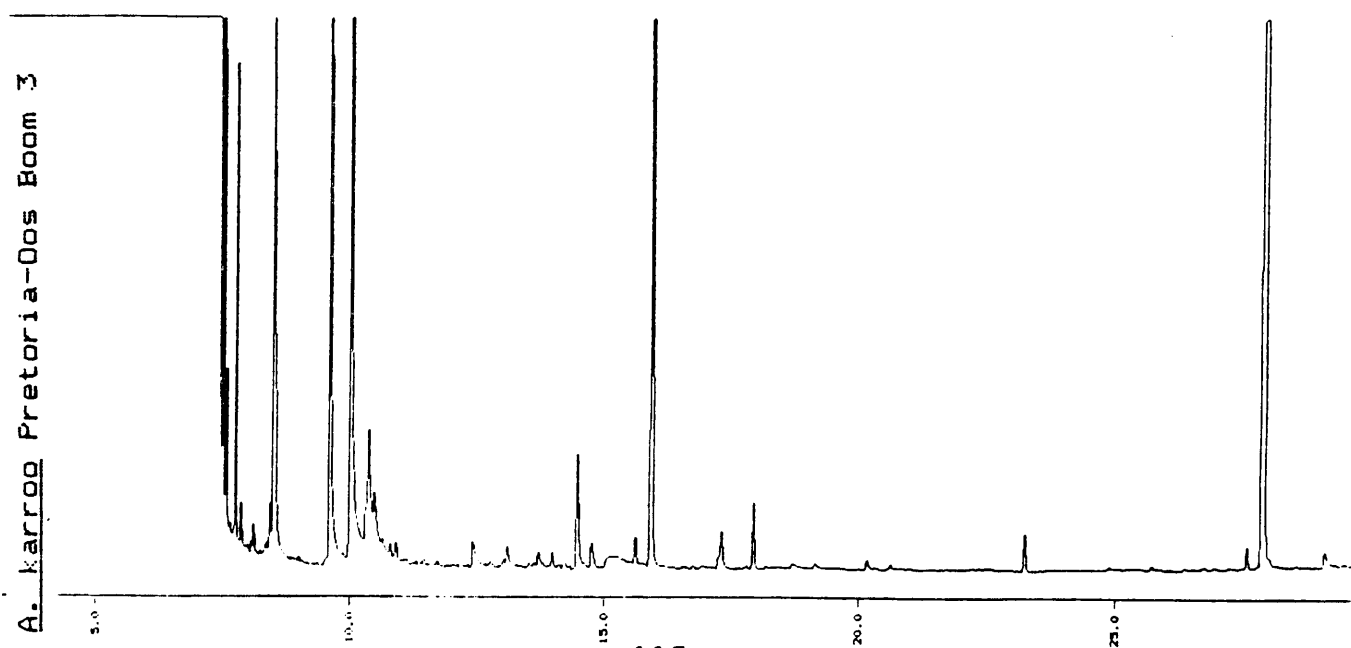
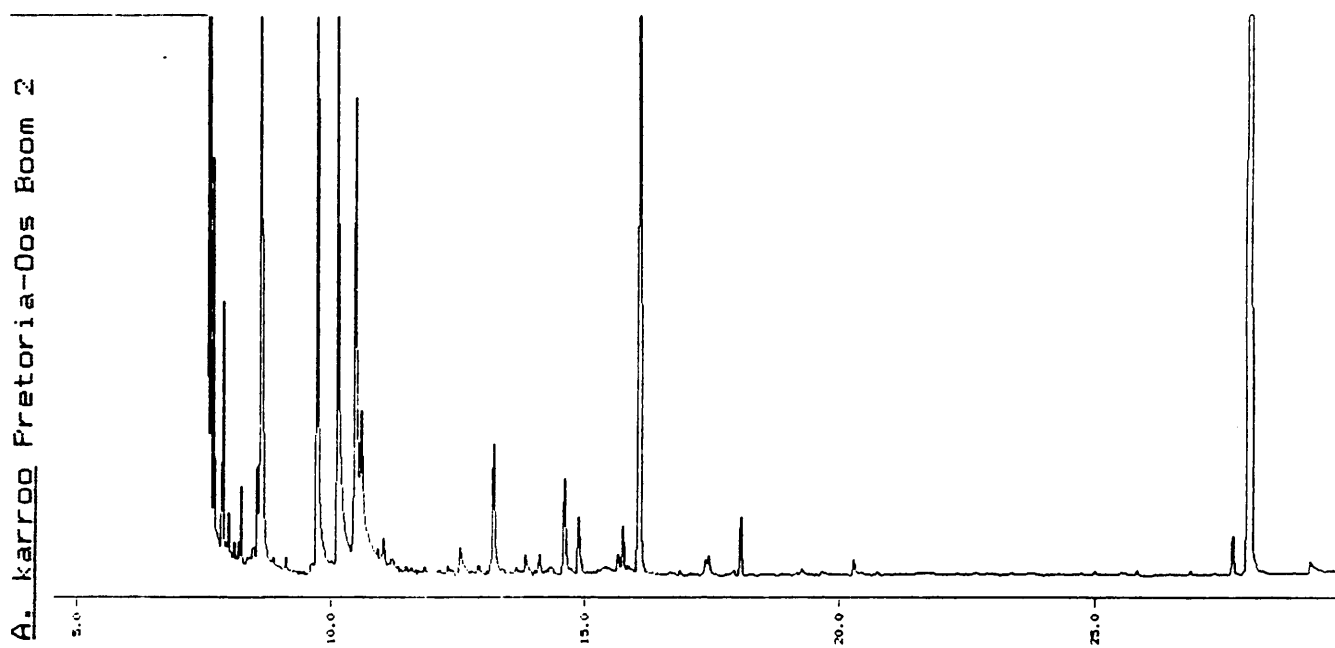
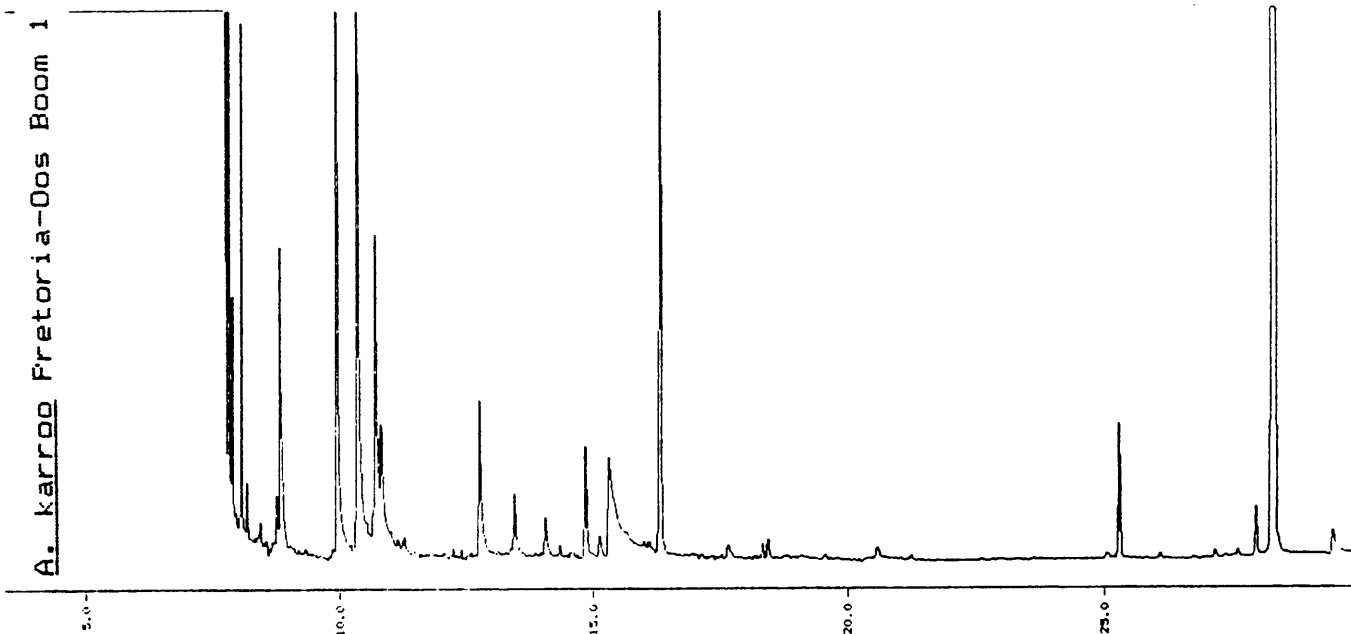
A. grandicornuta Boom 2

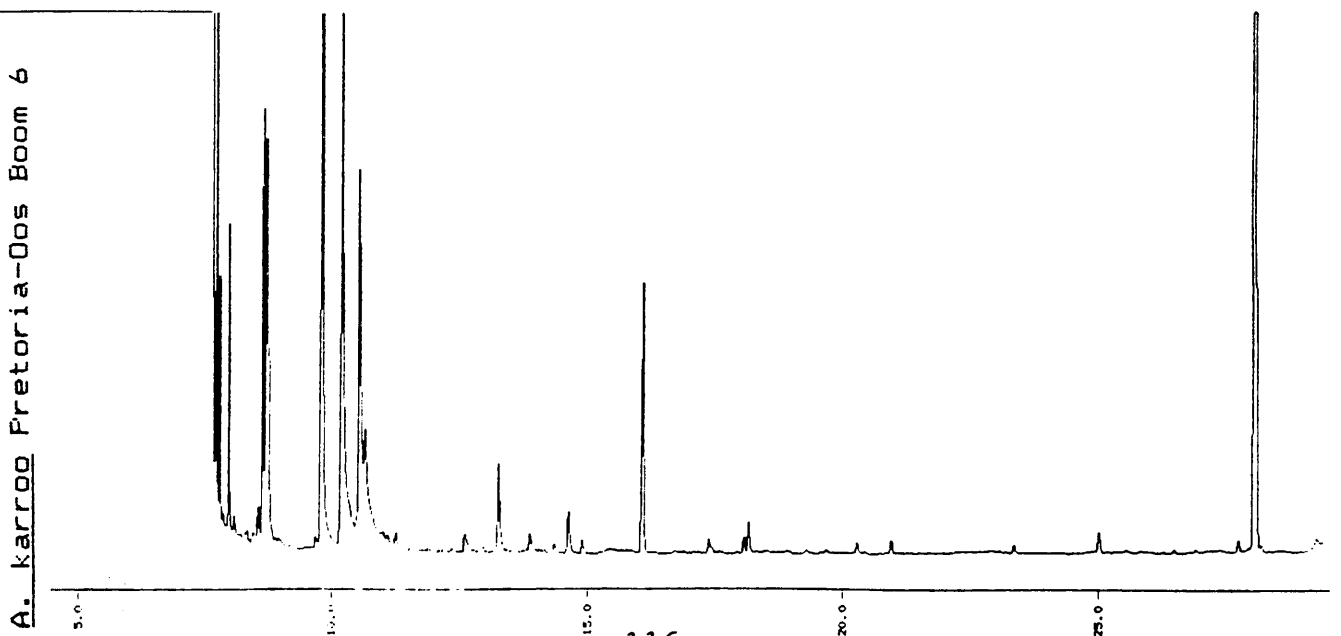
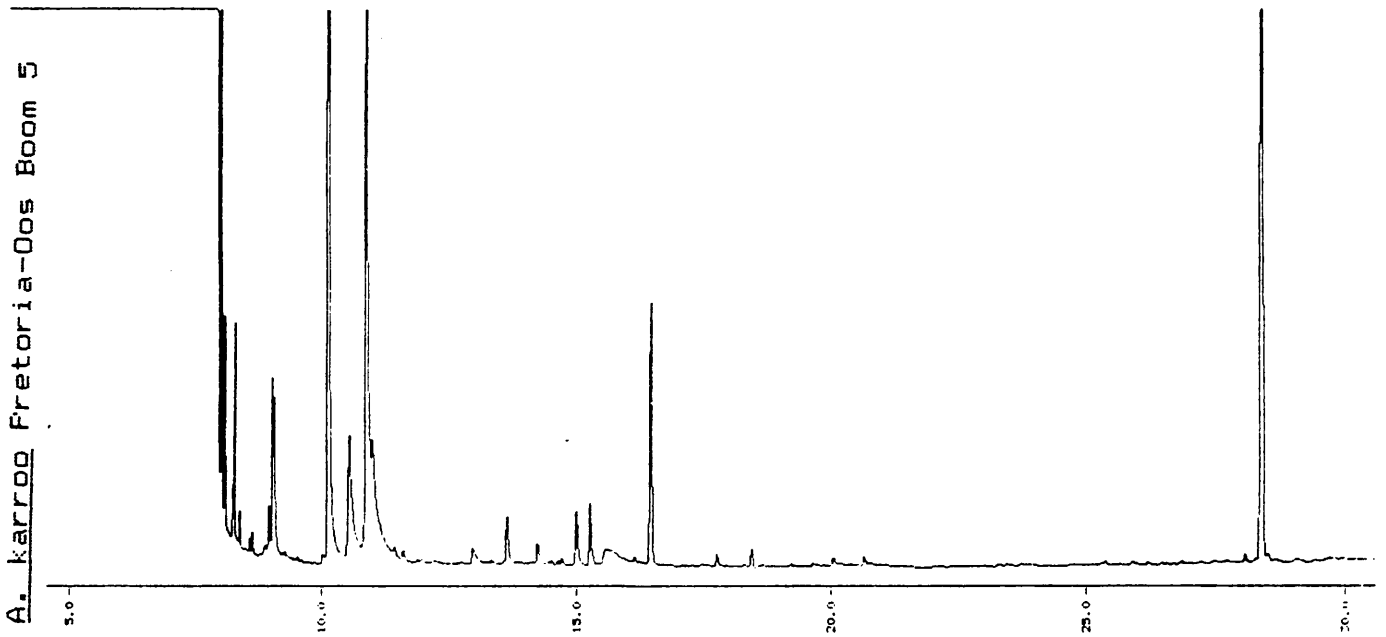
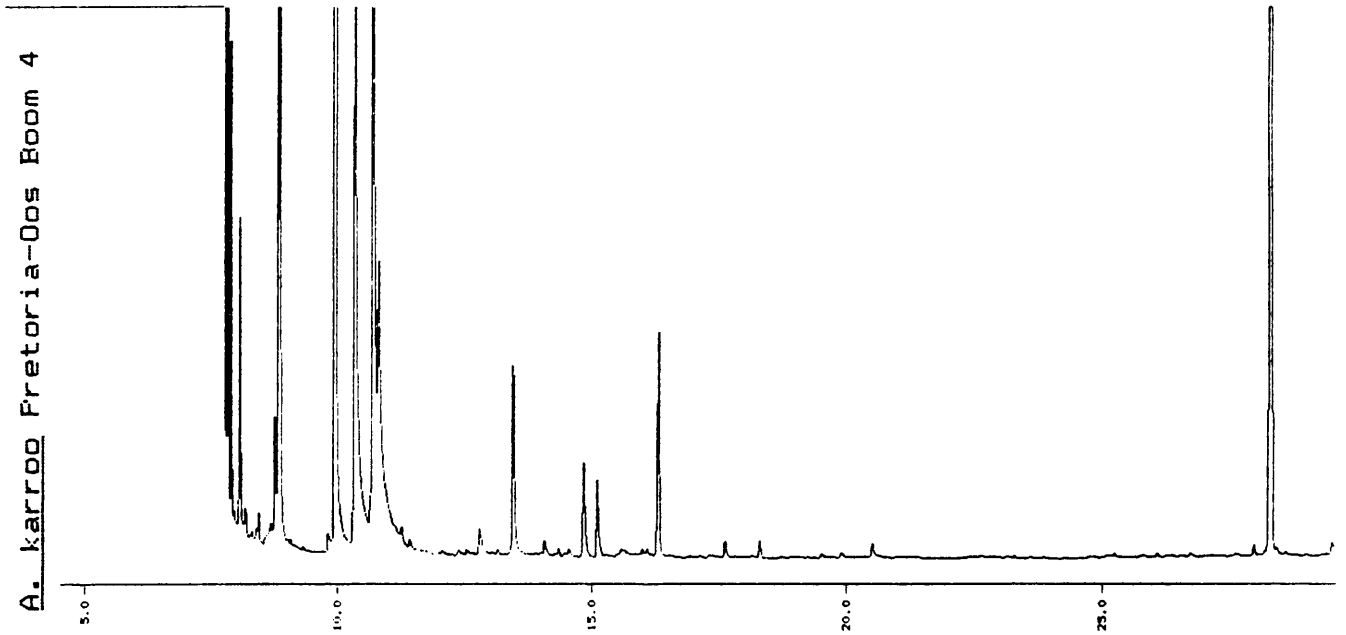


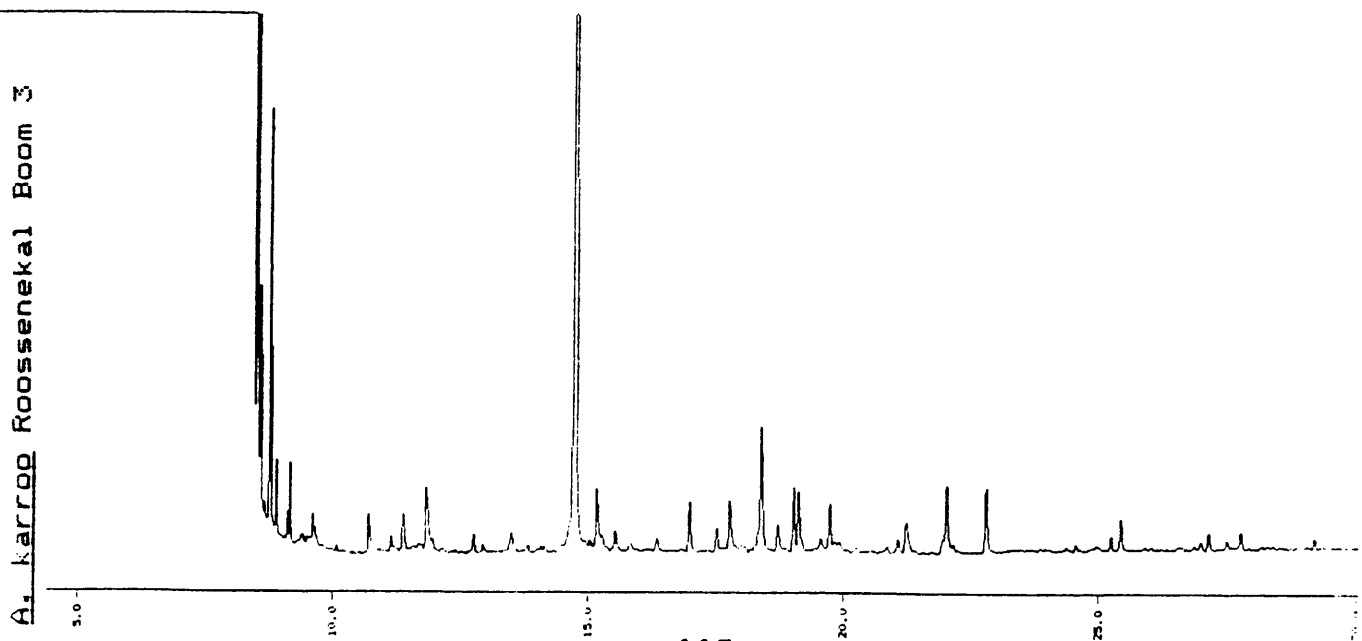
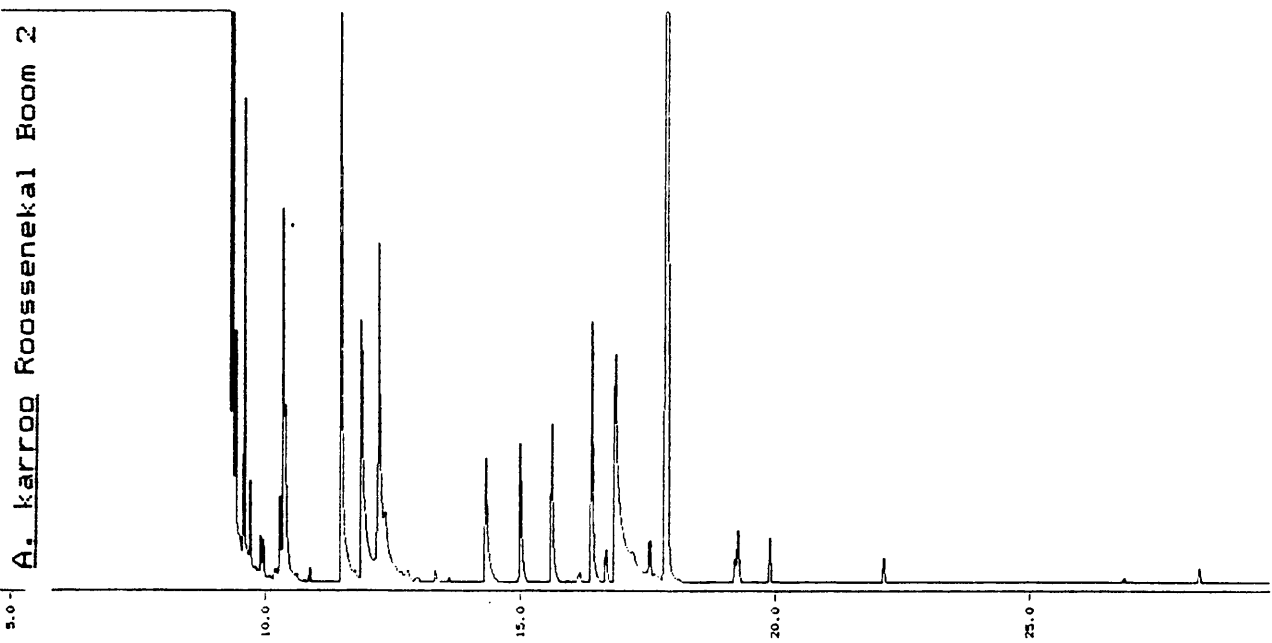
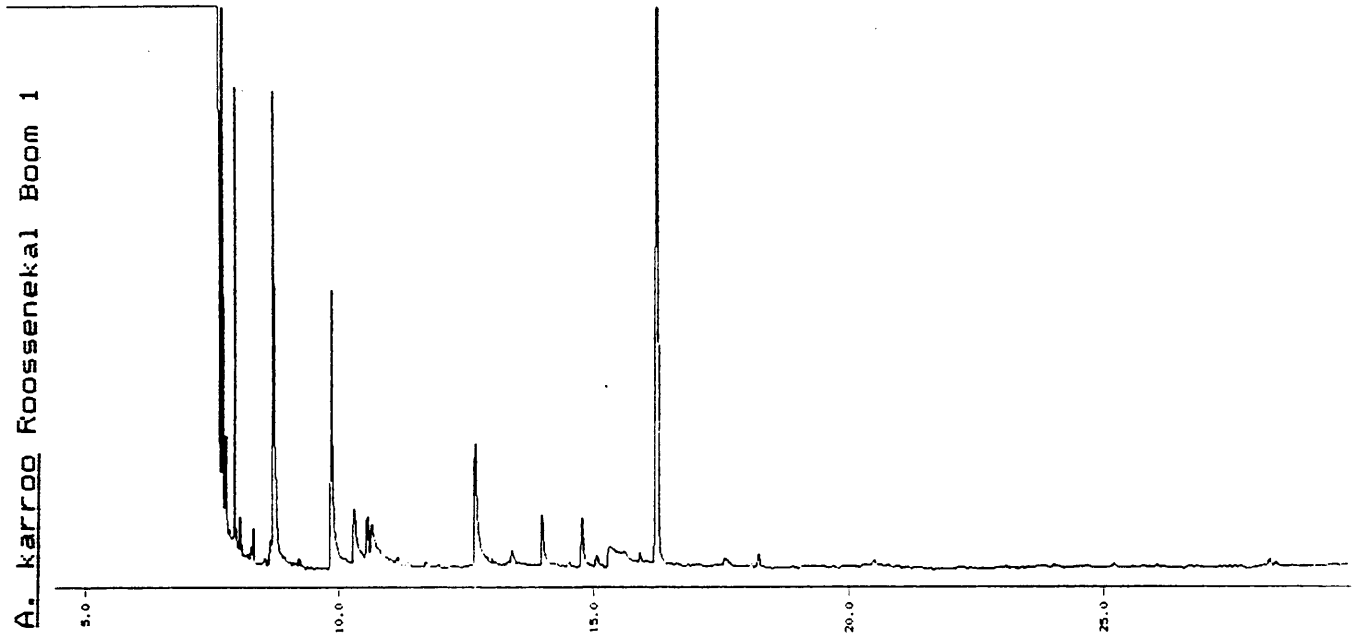
A. grandicornuta Boom 1

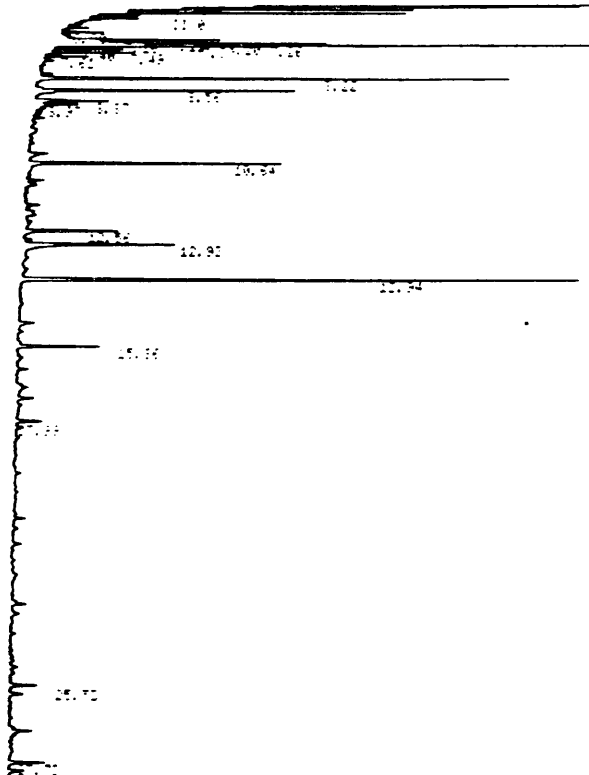
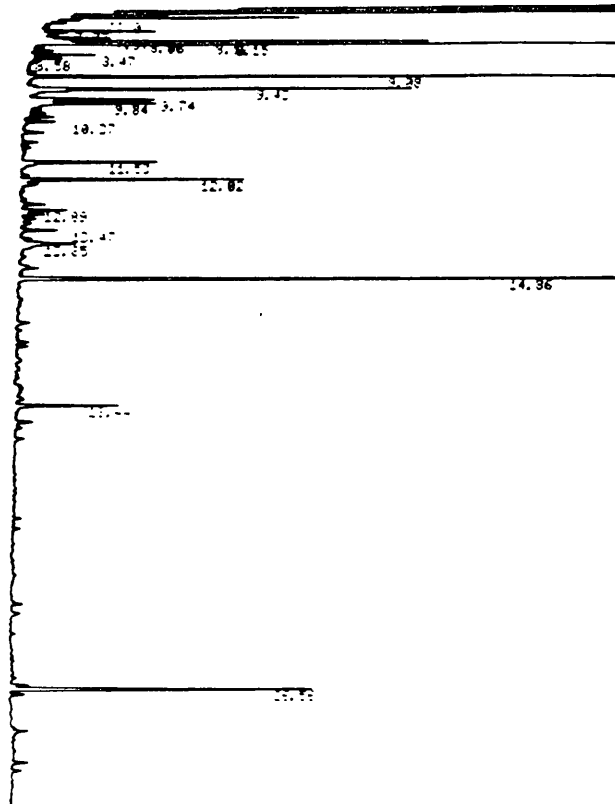
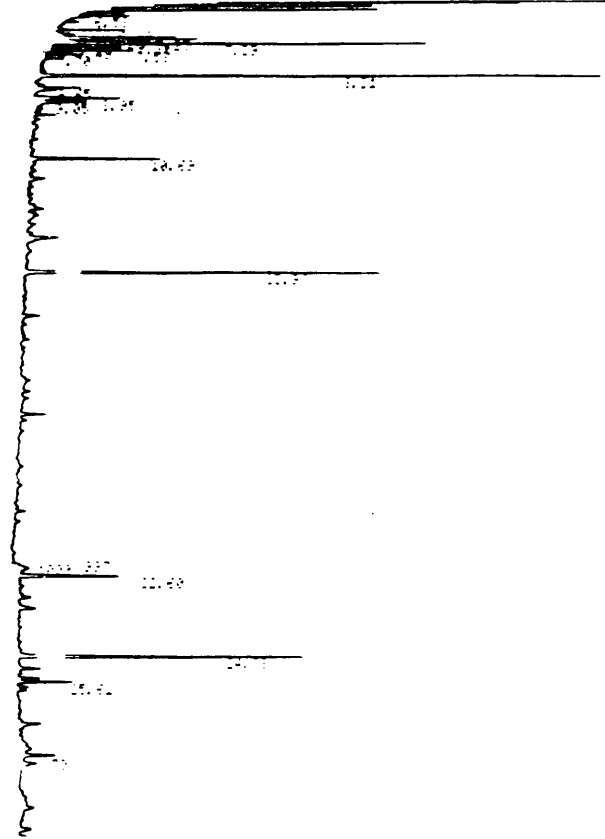
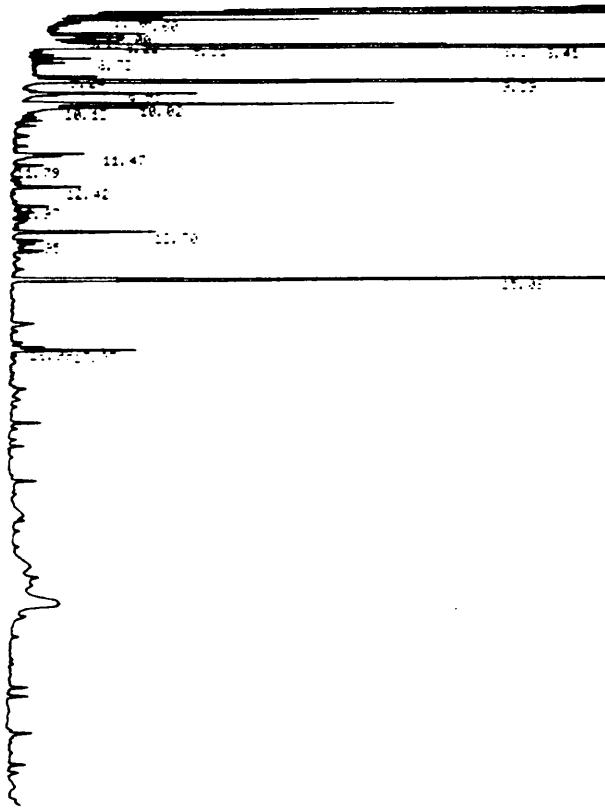


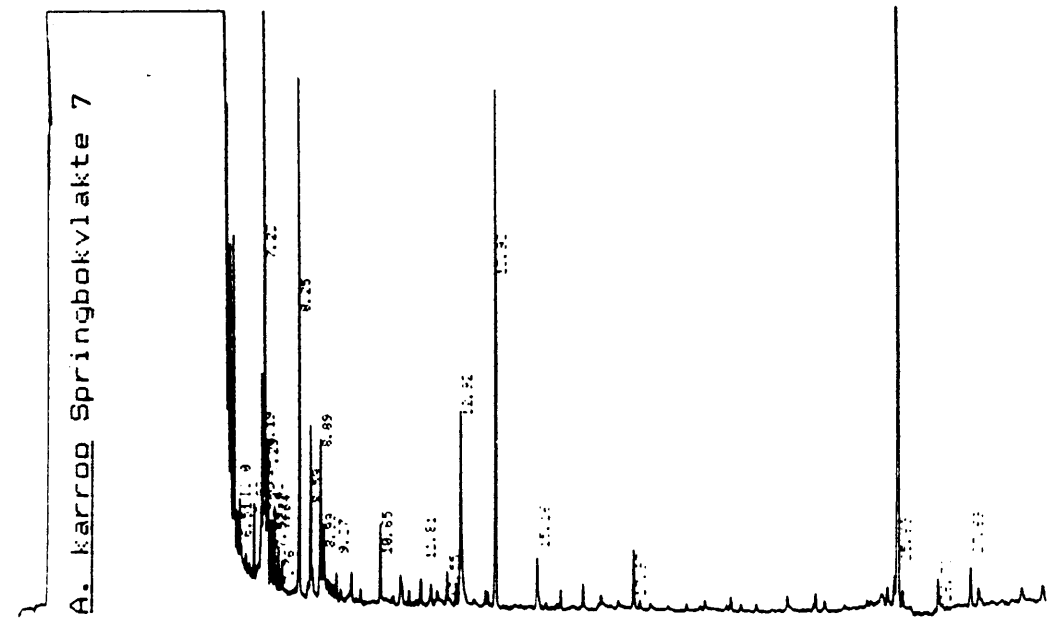
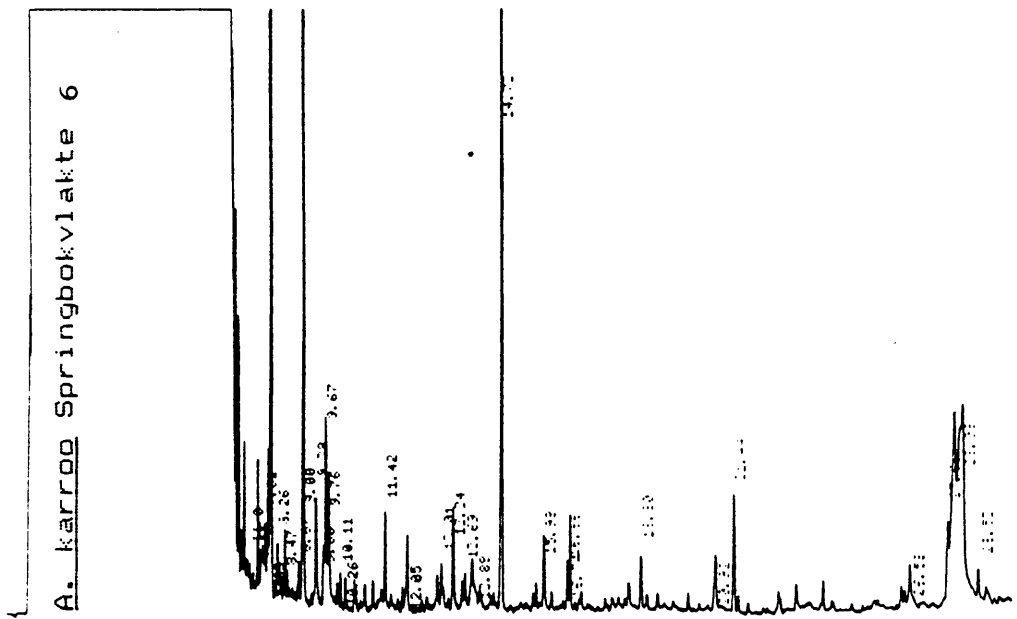
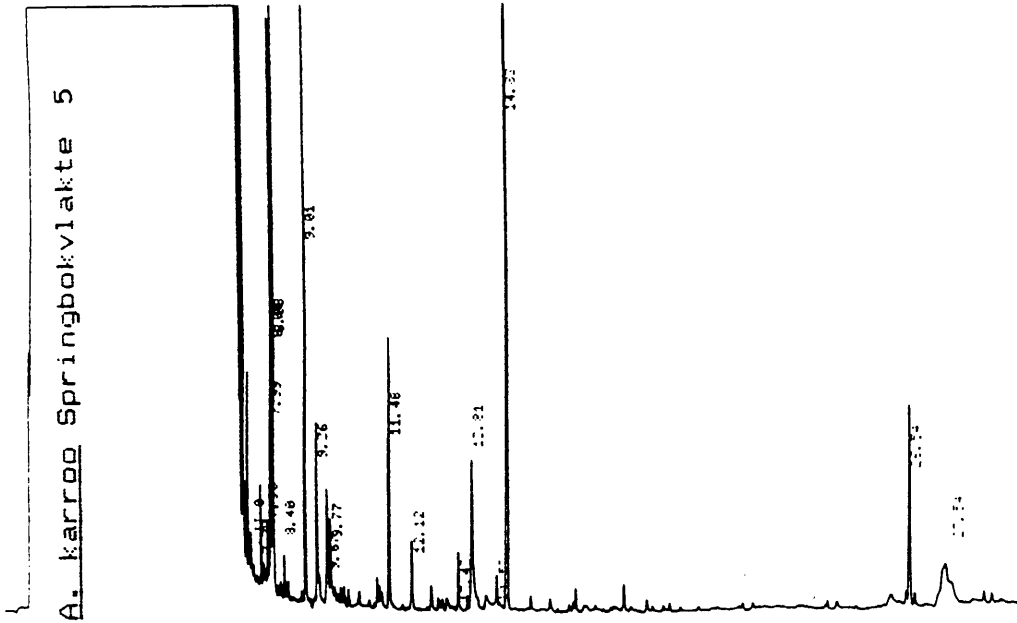


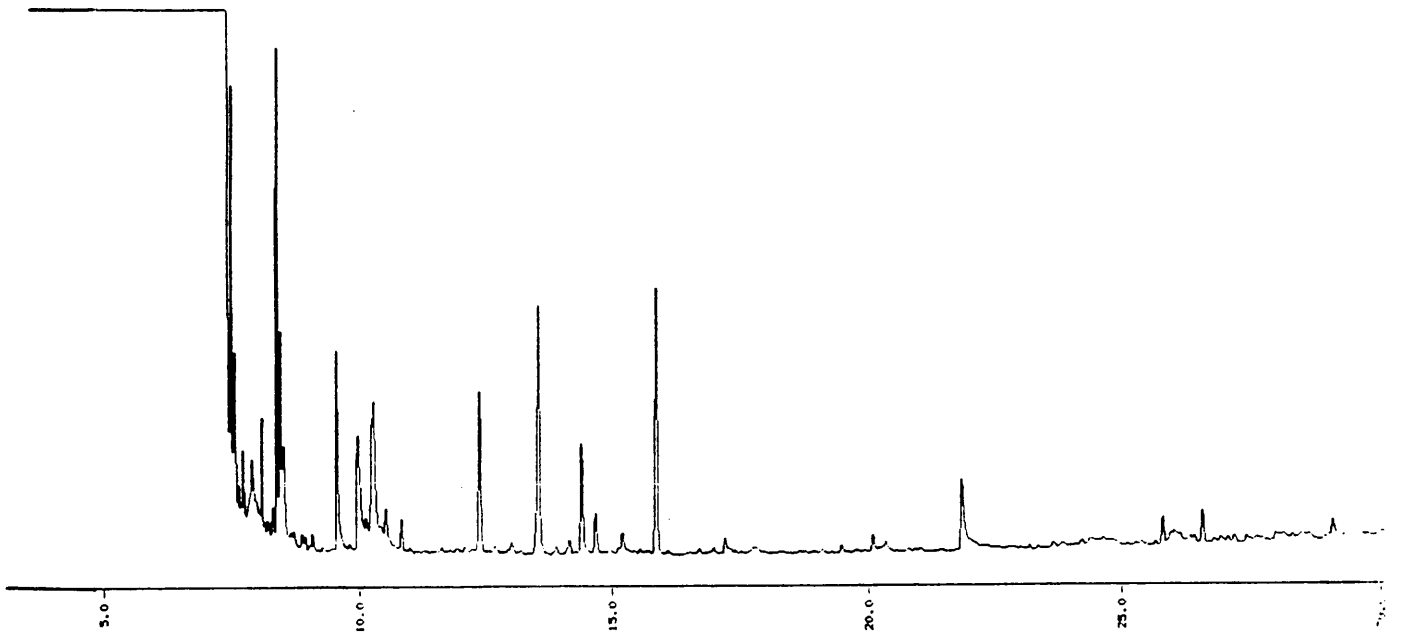




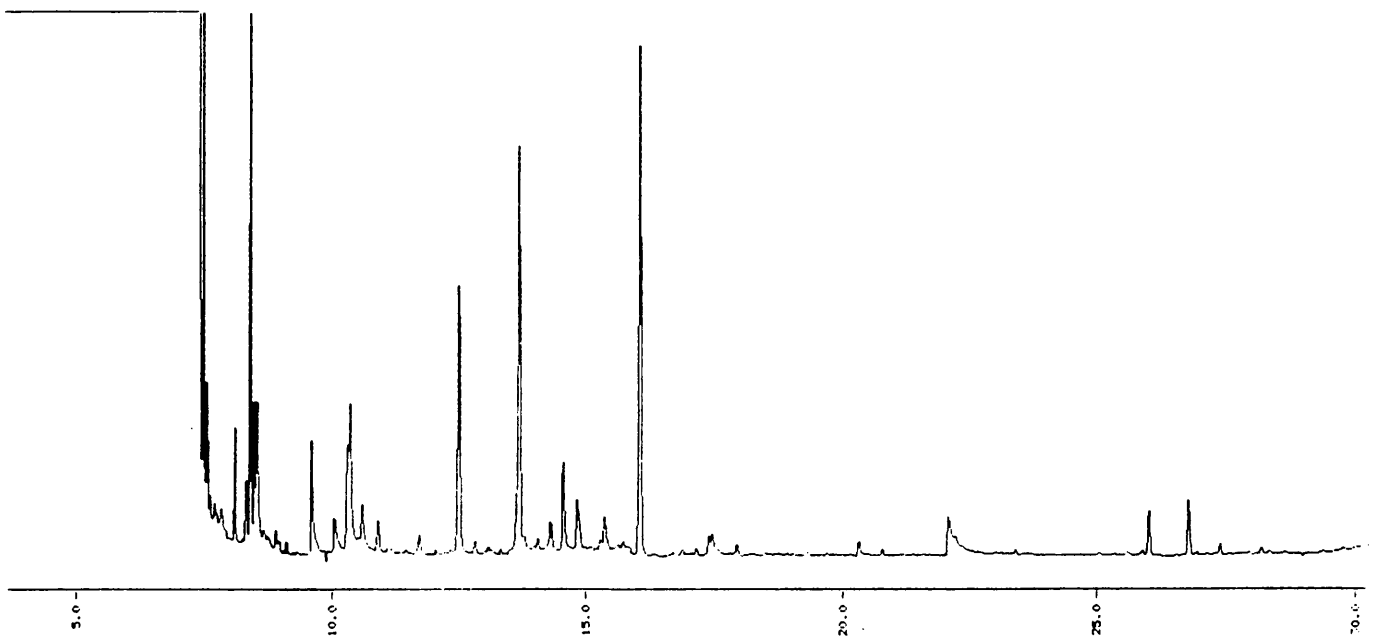




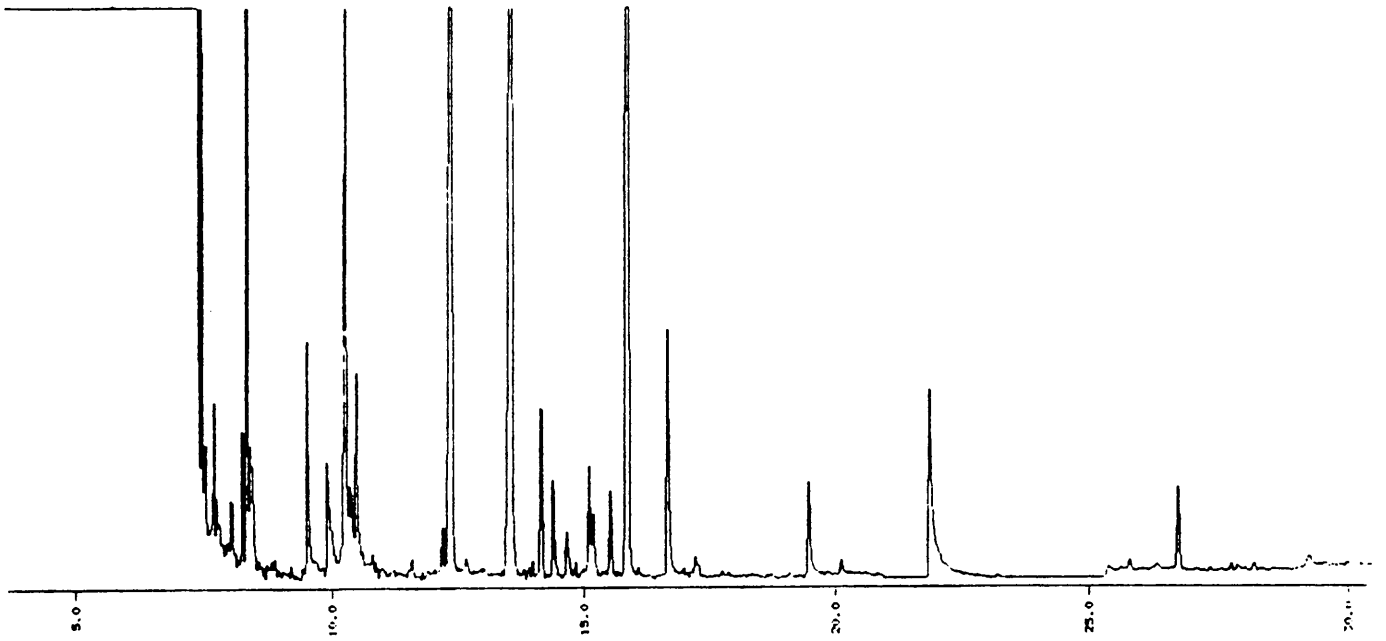




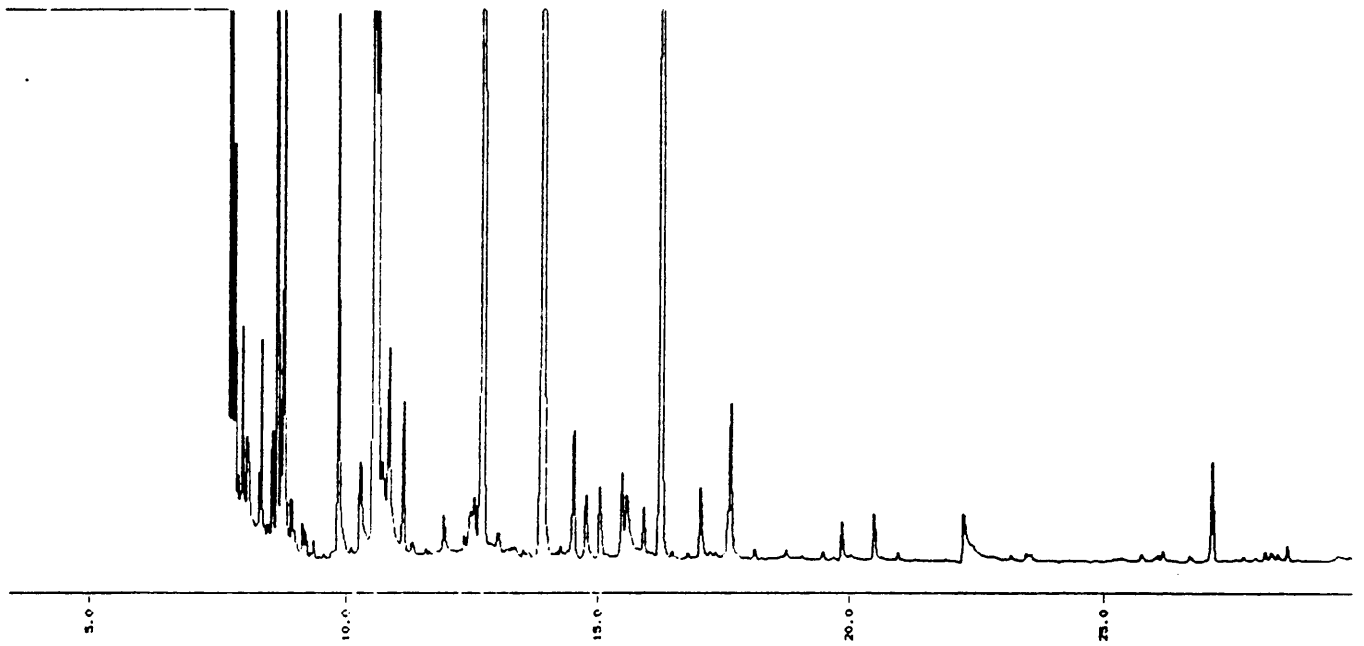
A. luederitzii var. luederitzii Boom 7a L



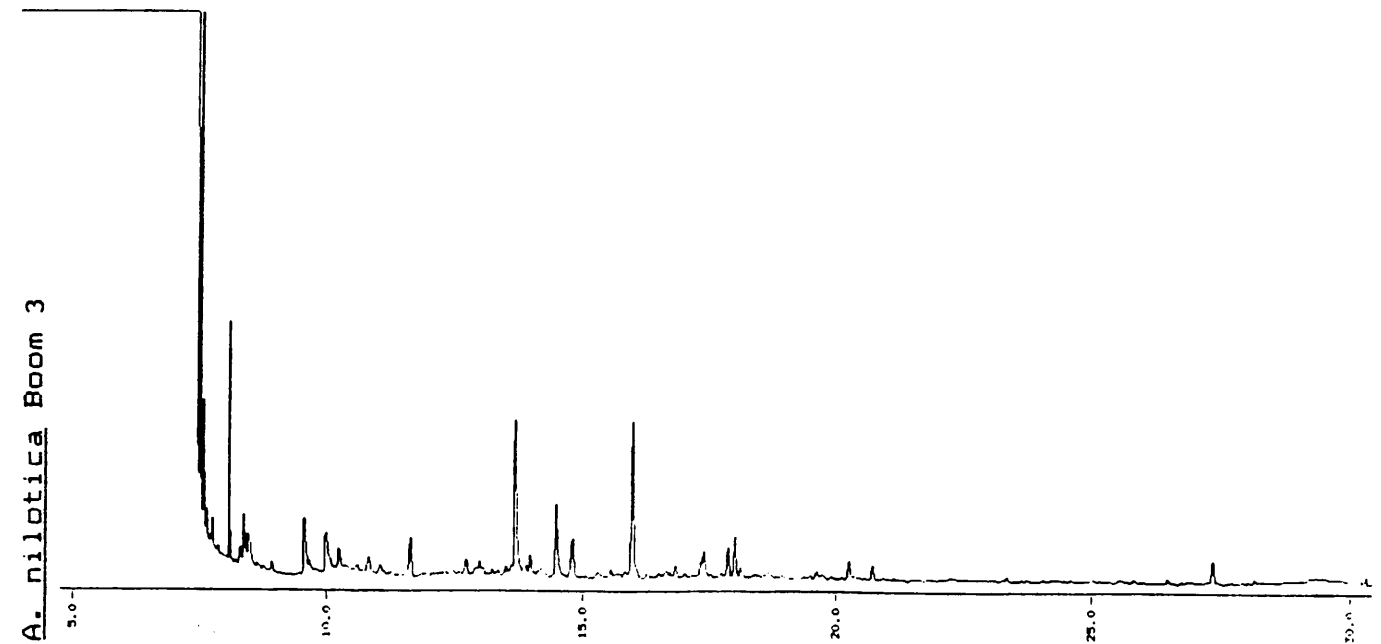
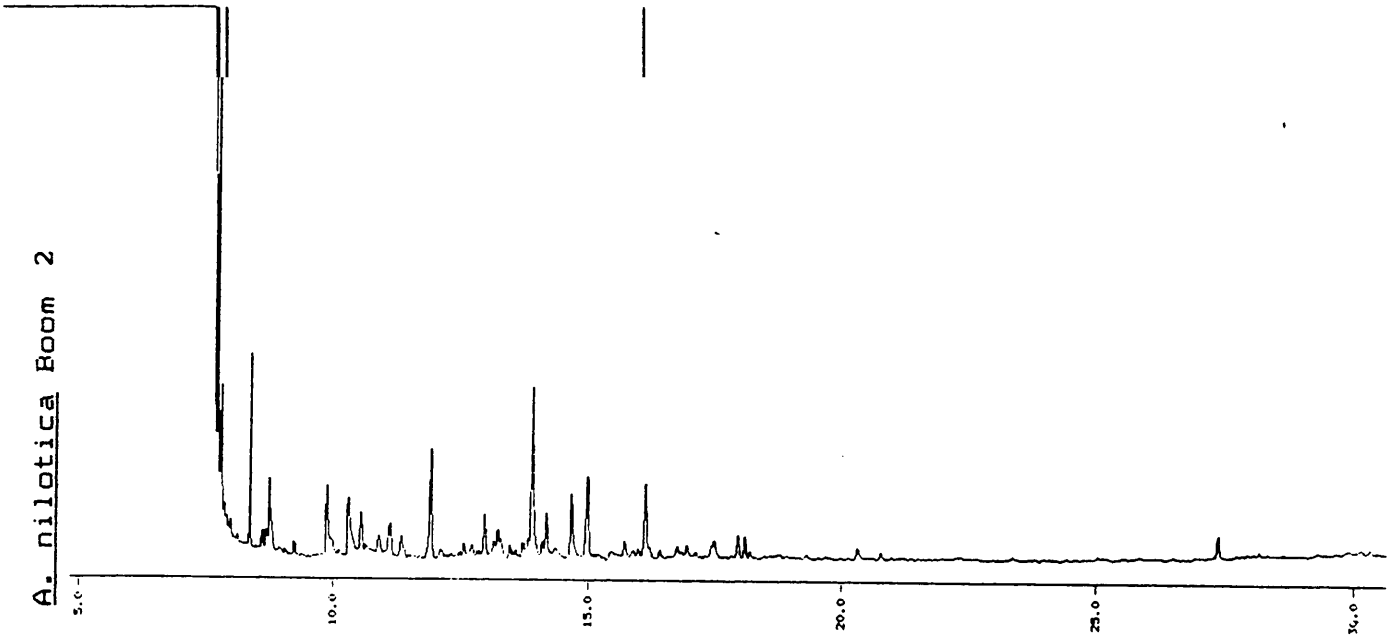
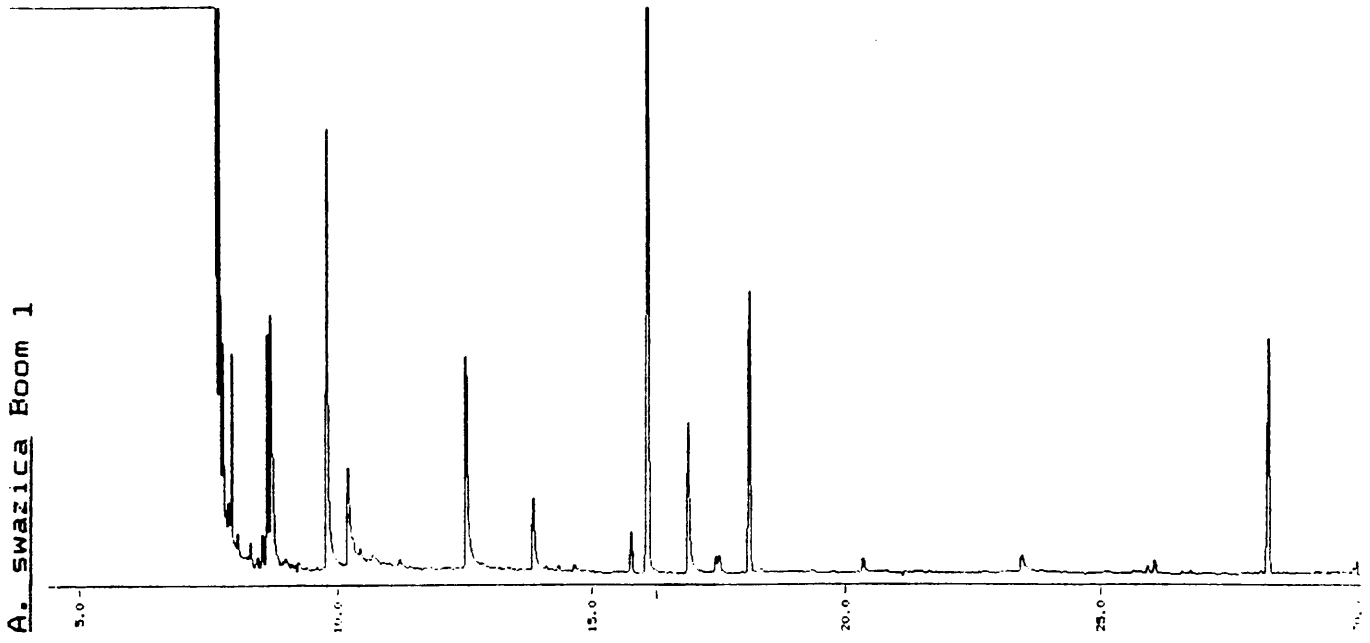
A. luederitzii var. luederitzii Boom 10a

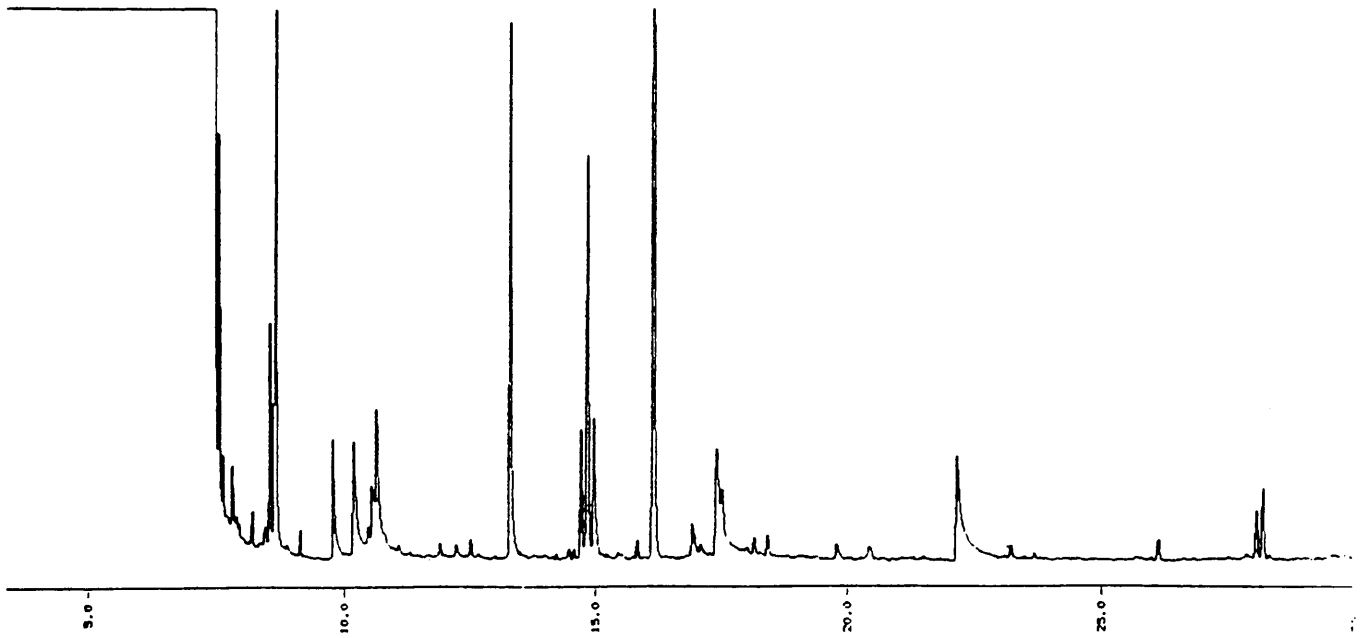


A. luederitzii var. retinens Boom 7a J

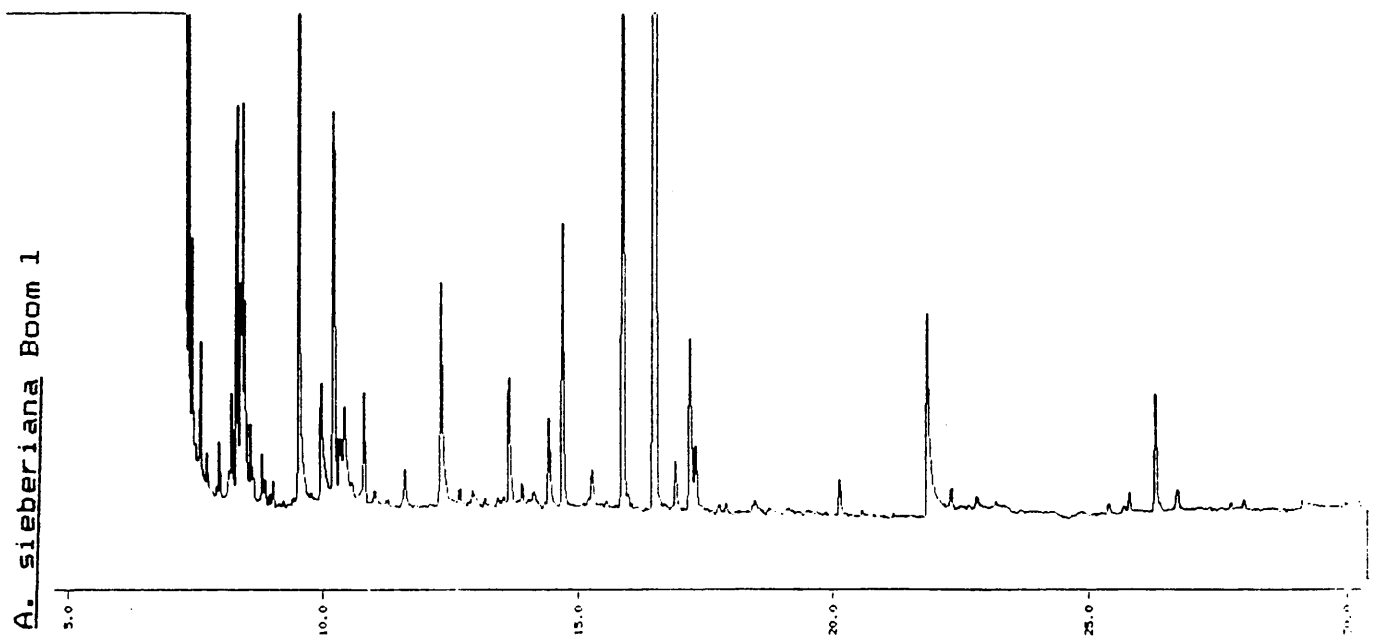
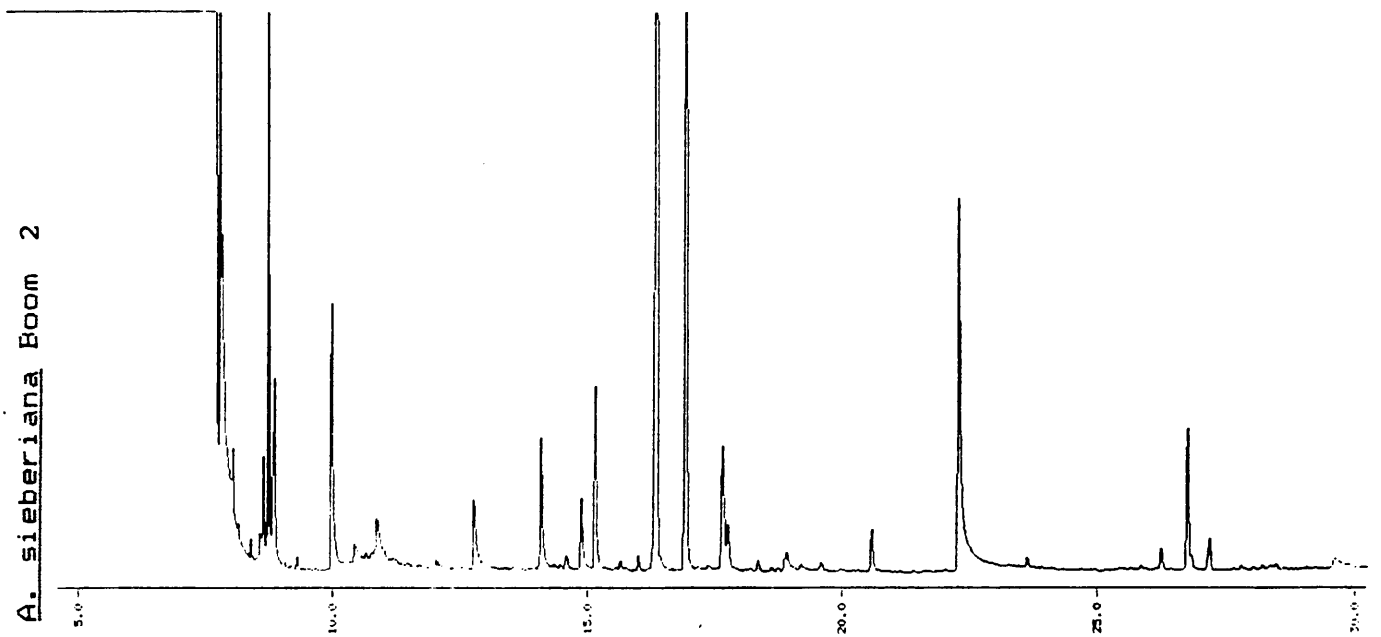
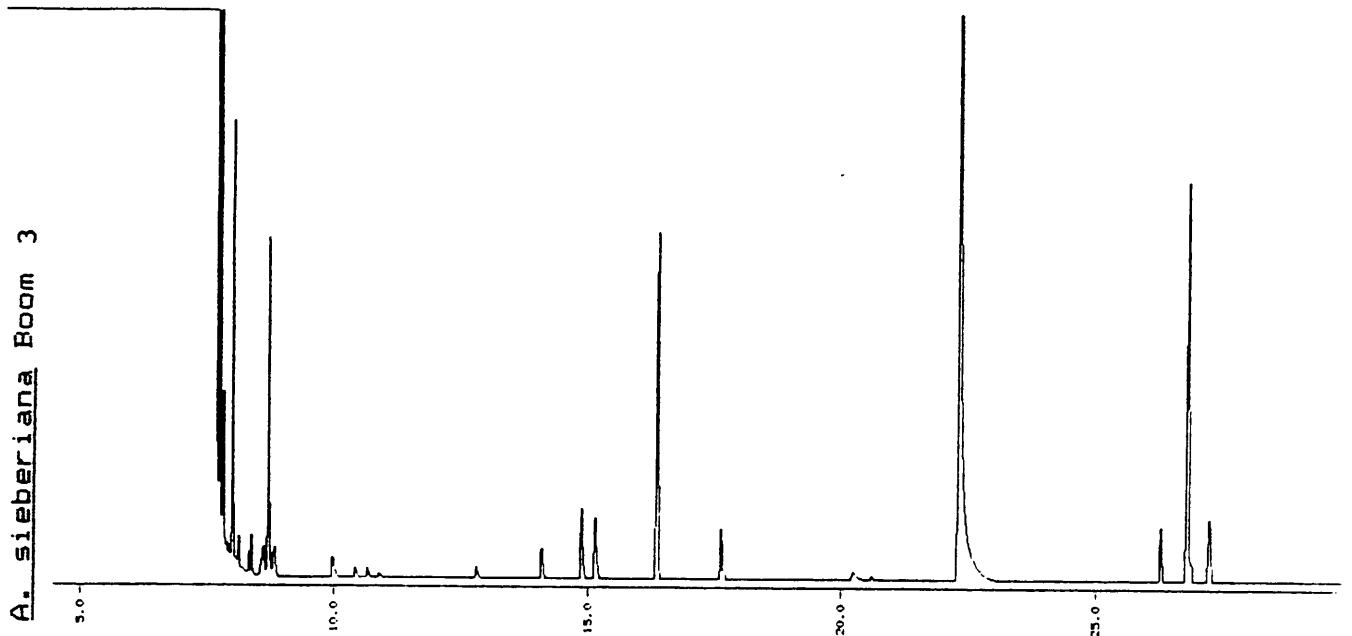


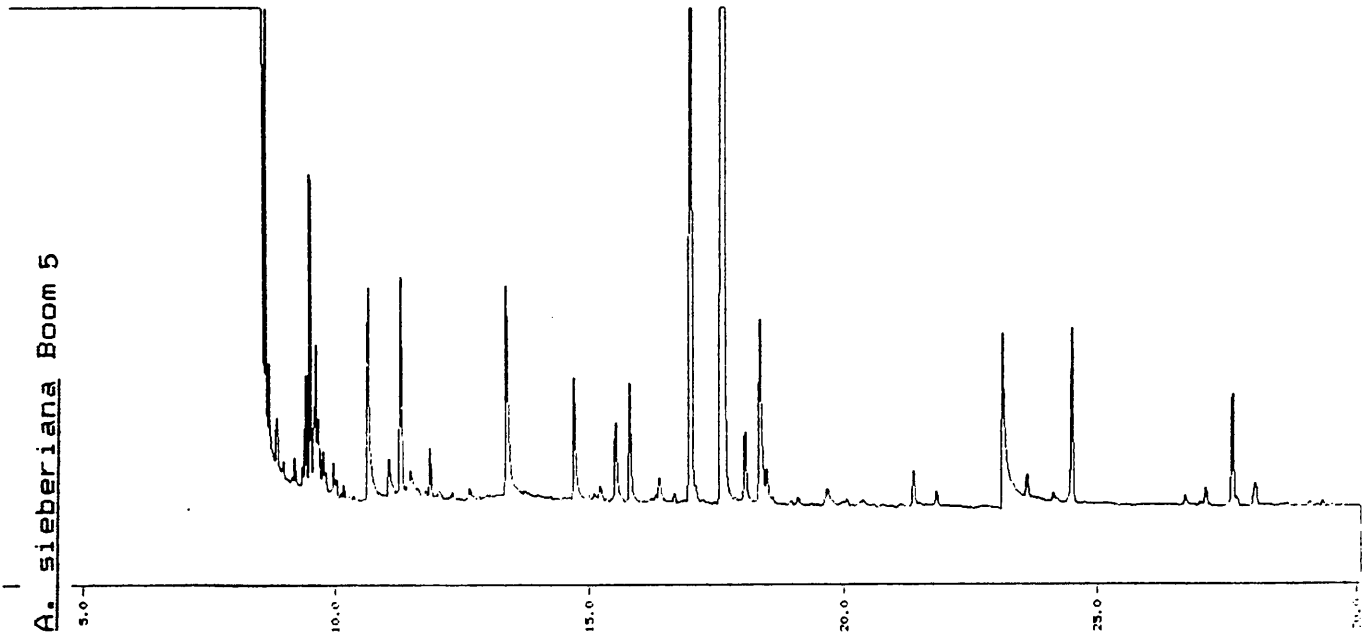
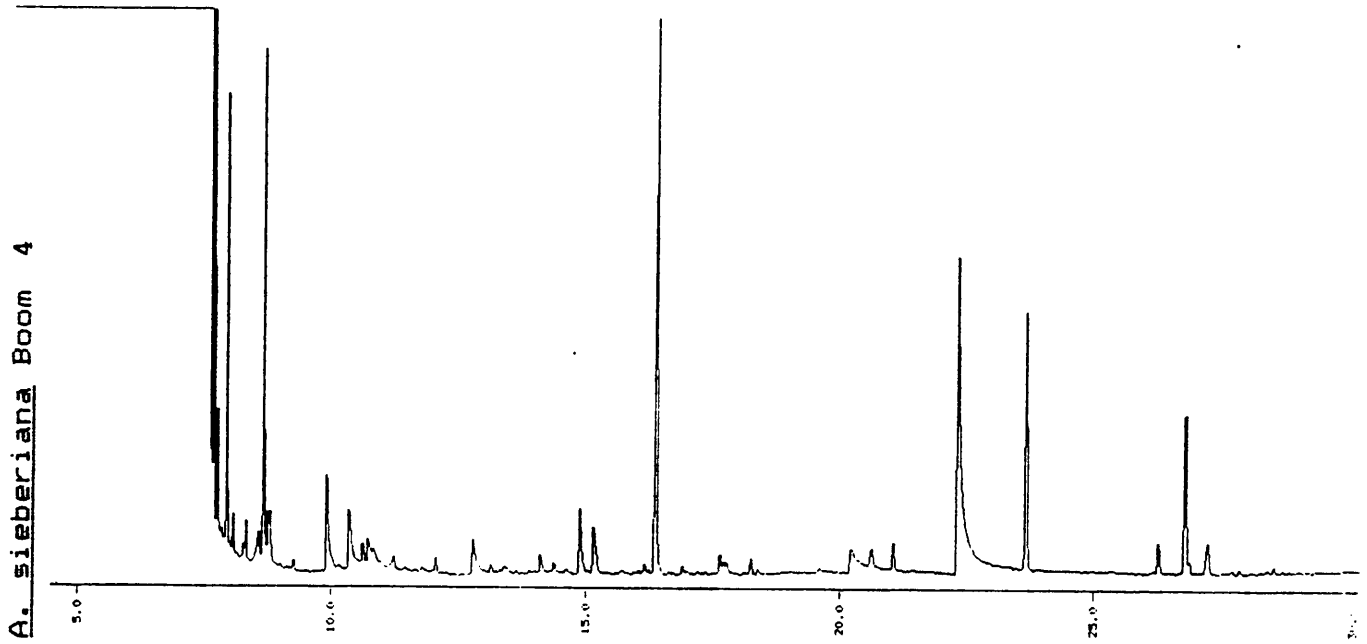
A. luederitzii var. retinens Boom 9a J

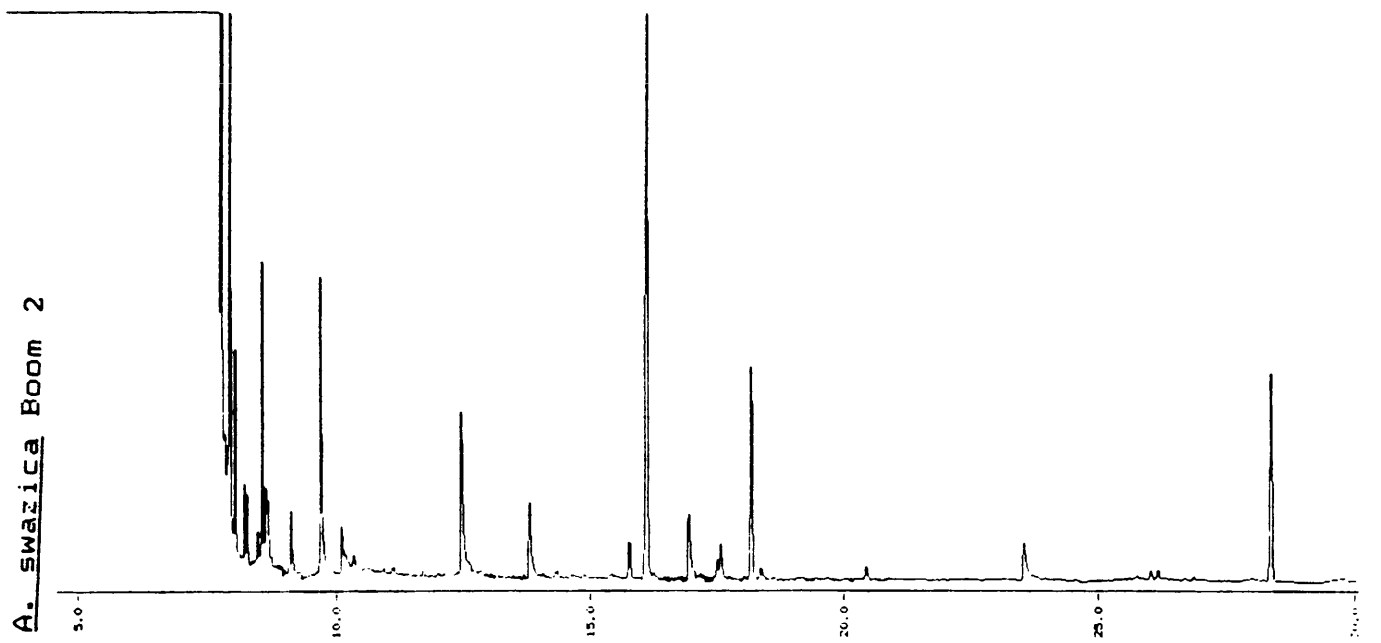
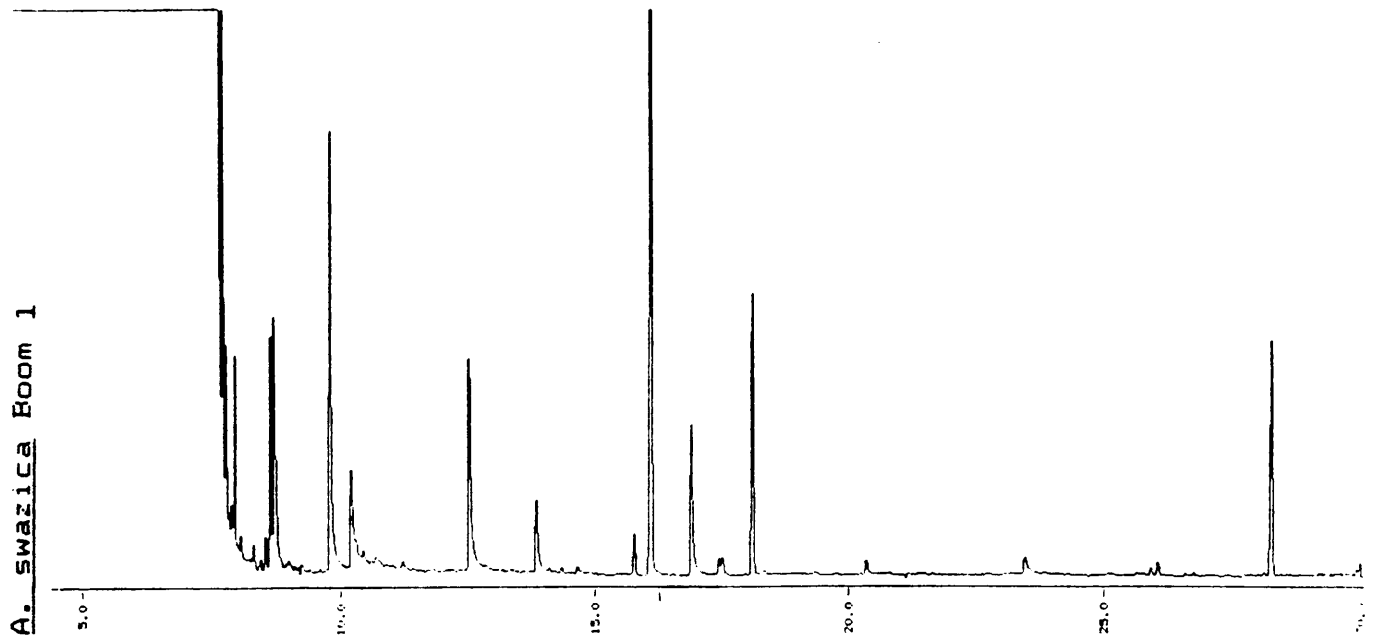


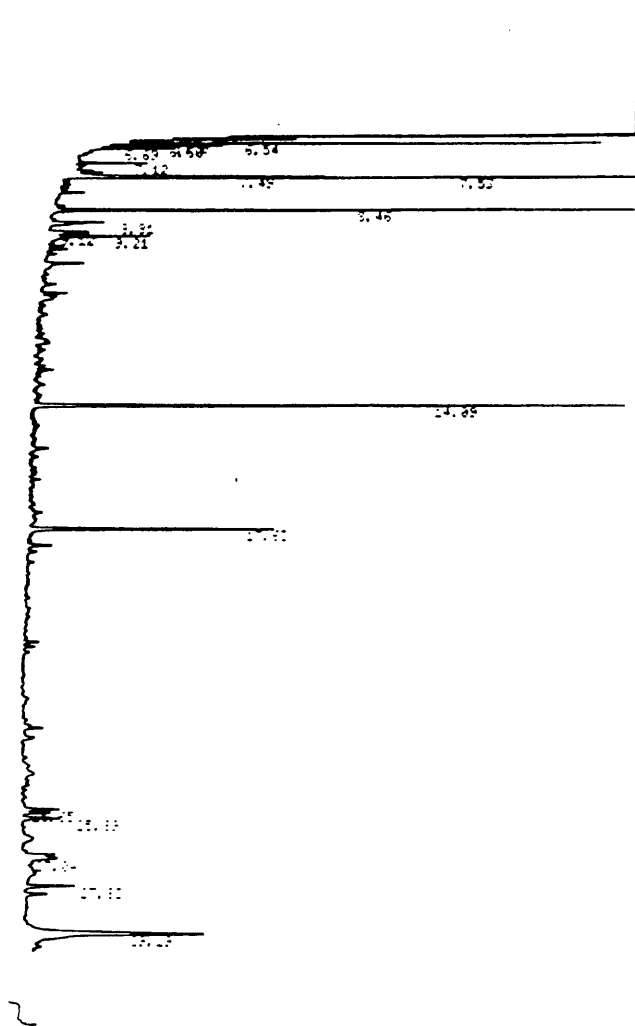
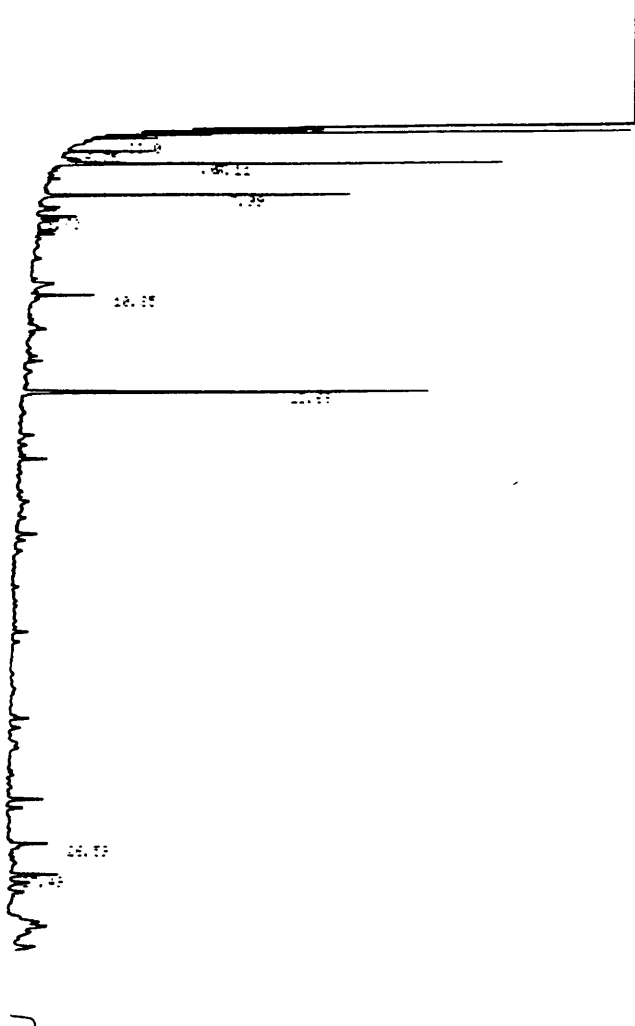


A. polyacantha Boom 1









A. tenuispina Springbokvlakte 4

A. tenuispina Springbokvlakte 3

