STRUKTUUR EN SINTESE VAN METABOLIETE UIT ROOIBOSTEE (*Aspalathus linearis*). FISIOLOGIESE AKTIWITEIT EN BIOMIMETIESE MODEL VIR DIE FERMENTASIEPROSES.

Proefskrif voorgelê ter vervulling van die vereistes vir die graad

PHILOSOPHIAE DOCTOR

in die Fakulteit Natuurwetenskappe,
Departement Chemie
aan die
Universiteit van die Oranje-Vrystaat,
Bloemfontein

deur

Charlene Marais

Promotor: Dr. J.A. Steenkamp
Mede-promotor: Prof. D. Ferreira

DESEMBER 1995

DANKBETUIGINGS

Hiermee wil ek graag my opregte dank en waardering betuig aan:

Dr. J.A. Steenkamp en prof. D. Ferreira as promotor en mede-promotor vir hul bekwame leiding, tyd (dikwels na-ure) en geduld,

Prof. P. Wessels (Departement Chemie, Universiteit van Pretoria), Johan Coetzee, Dr. J.F.W. Burger en Prof. E.V. Brandt vir die afname van sekere KMR-eksperimente,

Dr. J.M. Steyn (Departement Farmakologie, UOVS) en Dr. Louis Fourie (Departement Chemie, PU vir CHO) vir die bepaling van akkurate massas en die afneem van massaspektra,

Fanie Otto, Matthys van Vuuren en Gerdus Kemp vir die afname van ultraviolet spektra,

Thys Botha vir rekenaarmodellering,

Dr. D. Litthauer (Departement Mikrobiologie en Biochemie, UOVS) vir waardevolle voorstelle in verband met reaksies met lakkase,

Riaan Bekker vir die teken van chemiese strukture,

Rooibostee Natuurlike Produkte vir finansiële steun en die verskaffing van plantmateriaal,

Die Stigting vir Navorsingsontwikkeling vir finansiële steun,

Dr. E. Joubert (Infruitec) vir die voorsiening van outentieke monsters,

Prof. J.C. Pretorius van die Technickon Vrystaat vir sy begrip en die afstaan van werksure vir die voltooiing van hierdie studie,

Mede-nagraadse studente en personeel vir die aangename gees van samewerking,

Vriende en familie, in die besonder my ouers, Franz en Philida Rabe en skoonouers, Charl en Elleta Marais, vir hulle belangstelling en onderskraging,

My man, Lochner, aan wie hierdie werk opgedra word as geringe blyk van waardering vir al sy opofferinge, ondersteuning en liefde tydens hierdie studie,

My Hemelse Vader.

Charlene Marais

Inhoudsopgawe

LITERATUUROORSIG 1

1 ROOIBOS: VAN WILDE PLANT TOT EKONOMIES-VATBARE GEWAS 2

1.1 Klassifikasie 2

1.2 Beskrywing 2

1.3 Habitat 3

1.4 Die verwerkingsproses 3

1.4.1 Oksidasie 3
1.4.2 *Salmonella sp.*- dekontaminasie 4

1.5 Bemarkingsgeskiedenis 5

2 DIE PRODUK, ROOIBOSTEE 7

2.1 Algemene gebruike 7

2.2 Fisiologiese aktiwiteit 7

2.2.1 Algemeen 7
2.2.2 Die effek van rooibostee op sommige dermatologiese siektes 8
2.2.3 Beskermende effek teen sitotoksisiteit van H_2O_2 9

3 AKTIEWE SUURSTOFSPESIES EN ANTI-OKSIDANTE 11

3.1 Die menslike immuniteitsisteem 11

3.2 Aktiewe suurstofspesies 13

3.3 Anti-oksidante 15

3.3.1 Ensieme en peptiede as anti-oksidante 15
3.3.2 Stikstofverbindings 16
3.3.3 Fenoliese verbindings 17
3.3.4 Vitamien C 18

4 ROOIBOS: 'n CHEMIESE PROFIEL 20

4.1 Vlugtige komponente 20

4.2 Nie-vlugtige fenoliese samestelling 21

4.3 Biogenese 22

BESPREKING 27

---

5 STRUKTUUR EN METABOLIETE UIT ROOIBOS 28

5.1 Inleiding 28

5.2 (+)-Pinitol (3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol) (**68a**) 28

5.3 Fenoliese karboksielsure 30

5.4 C-O-glikosiede en aglikone van flavone en flavonole 33

5.5 C-C Flavoonglikosiede 37

5.6 5,7-Dihidroksi-6-ß-D-glukopiranosielchromoon (**85a**) 41

5.7 Die aard van rooibos-tanniene 44

5.8 Uridien (**94a**) 46

5.9 Struktuur, anti-oksiderende eienskappe en fisiologiese aktiwiteit 48

6 DIE ISOLASIE EN SINTESE VAN 'N UNIEKE FENIELPIRODRUIWESUUR-GLUKOSIED. 'n VERGELYKENDE ANALISE VAN STEREO- EN REGIO-ISOMERE **54**

6.1 Inleiding 54

6.2 Die isolasie van (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (**116a**) 54

6.3 Die sintese van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**120b**) 56

6.4 Die sintese van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**122b**) 59

6.5 Die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-gluko-piranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) 60

6.6 Die sintese van (E)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-gluko-piranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**117b**) 68

6.7 Algemene struktuurverwantskappe 69

6.8 Waarde van die studie 70

7 STRUKTURE VAN DIE NUWE C-C GLUKOSIDIESE FLAVANONE, (2R)- EN (2S)-2,3-DIHIDRO-ISO-ORIëNTIEN 71

7.1 Inleiding 71

7.2 Gedeeltelike struktuurbepaling van (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) 72

7.3 Pogings tot derivatisering 74

7.3.1 Pogings tot metilering 74
7.3.2 Asetilering 76

7.4 Pogings om die struktuur van die natuurproduk (**88a**) deur die hidrogenering van iso-oriëntien (**40a**) te bevestig 76

7.5 Konvensionele metodes vir die bepaling van die posisie van alkilering 78

7.5.1 Die chemiese verskuiwing van 5-OH 78
7.5.2 $AlCl_3$ geïnduseerde UV-verskuiwing 78
7.5.3 Massaspektrometrie 79

7.6 Verdere KMR-eksperimente 79

7.6.1 ^1H-^1H langafstand COSY 79

7.6.2 ^{13}C KMR-, HETCOR- en HMBC-eksperimente 80

7.7 Sirkulêre dichroïsme 80

7.8 Opsomming 83

8 'n BIOMIMETIESE MODEL VIR DIE ROOIBOSTEE FERMENTASIEPROSES EN DIHIDROCHALKOONCHEMIE 85

8.1 Inleiding 85

8.2 Die effek van lig 88

8.3 Die effek van hitte 93

8.4 Lakkase as katalisator 93

8.5 Koolhidrate as katalisatore 95

8.6 Die effek van oksideer- en reduseermiddels 99

8.7 Algemene dihidrochalkoonchemie 104

8.7.1 Inleiding 104
8.7.2 Die invloed van die A-ring op enolisasie 106
8.7.3 Die isolasie en sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (**183**) 109
8.7.4 Pogings om geskikte aspalatienderivate vir dehidrogenering te vind 111
8.7.5 Fisiologiese aktiwiteit 115
8.7.6 Opsomming 116

EKSPERIMENTEEL 118

---

9 STANDAARD EKSPERIMENTELE METODES 119

9.1 Chromatografiese metodes 119

9.1.1 Papierchromatografie 119
9.1.2 Dunlaagchromatografie (DLC) 119
9.1.3 Kolom- (KC) en mediumdrukkolomchromatografie (MPLC) 120
9.1.4 "Flash"-kolomchromatografie (FKC) 120
9.1.5 "High performance liquid chromatography" (HPLC) 120
9.1.6 Sproeireagense 121
9.1.6.1 Formaldehied-swawelsuur 121
9.1.6.2 Ammonialkaliese silwernitraat 121
9.1.6.3 Bis-gediasoteerde bensidien 121

9.2 Chemiese metodes 121

9.2.1 Metilering met diasometaan 121
9.2.2 Asetilering 122

9.3 Droging van reagense 122

9.3.1 Asetoon 122
9.3.2 Dimetielformamied (DMF), triëtielamien, tetrametieletileendiamien (TMEDA), dichlorometaan en 1,2-dichloroëtaan 122
9.3.3 Heksaan, benseen en tetrahidrofuraan (THF) 123
9.3.4 Piridien 123
9.3.5 Metanol 123
9.3.6 Dimetielsulfoksied (DMSO) 123

9.4 Standaardisasie van n-butiellitium (n-BuLi) in heksaan 123

9.5 Spektrometriese en spektroskopiese metodes 124

9.5.1 Kernmagnetiese resonansspektrometrie (KMR) 124
9.5.2 Massaspektrometrie (MS) 124
9.5.3 Infrarooispektroskopie (IR) 124
9.5.4 Sirkulêre dichroïsme (SD) 124
9.5.5 Ultravioletspektroskopie (UV) 125

9.6 Smeltpunte 125

9.7 Optiese rotasie $[\alpha]_D$ 125

9.8 Fotochemie 125

9.9 Afkortings 125

10 DIE ISOLASIE VAN METABOLIETE UIT ROOIBOSTEE **127**

10.1 Ekstraksie van die plantmateriaal 127

10.2 Fraksionering 127

10.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol] (**68a**) 128

10.2.1.1 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**) 129

10.2.1.2 Subfraksie AF3F2 130

10.2.1.2.1 Subfraksie AF3F2F2 130

10.2.1.2.1 (a) *p*-Hidroksibensoësuur (**71**) en vanilliensuur (4-hidroksi-3-metoksibensoësuur) (**73**) 131

10.2.1.2.1 (b) Vanilliensuur (4-hidroksi-3-metoksibenoësuur) (**73**) en seringsuur (4-hidroksi-3,5-dimetoksibensoësuur) (**74**) 131

10.2.1.2.1 (c) *p*-Kumaarsuur (4-hidroksikaneelsuur) (**75a**) en feruliensuur (4-hidroksi-3-metoksikaneelsuur) (**77a**) 131

10.2.1.3 Subfraksie AF3F5 132

10.2.1.3.1 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**) 132

10.2.1.4 Subfraksie AF3F6 132

10.2.1.4.1 (Z)-3-Feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (**116a**) 133

10.2.1.4.2 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)- katesjien (**93a**) 133

10.2.2 Fraksie AF4 134

10.2.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol] (**68a**) 134

10.2.2.1.1 Protokatesjoësuur (3,4-dihidroksibensoësuur) (**72a**) 135

10.2.2.1.2 *N*-metieluridien-2',3',5'-triasetaat [*N*-metiel-1-(2,3,5-tri-*O*-asetiel-ß-D-ribofuranosiel)-2,4-pirimidioon] (**94c**) 135

10.2.2.1.3 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-3',4',5-tri-*O*-metielluteolien-7-*O*-glukosied [3',4',5-trimetoksi-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)flavoon] (**82b**) 136

10.2.2.1.4 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien

[4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (**84b**), 5,7-dimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-(glukopiranosiel)chromoon (**85b**) en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielviteksien [4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (**83b**) 136

10.2.3 Fraksie AF5 137

10.2.3.1 Subfraksie AF5F2 137

10.2.3.1.1 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-4',5,7- tri-*O*- metielisoviteksien [4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (**84b**) en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metielisooriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-6- (2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (**40b**) 138

10.2.3.1.2 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieloriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (**39b**) 138

10.3 Herondersoek van verwerkte rooibos 138

10.3.1 Subfraksie VAF8 139

10.3.1.1 3',4',5,7-Tetra-*O*-asetielluteolien [3',4',5,7-tetraasetoksiflavoon] (**38c**) 140

10.3.2 Subfraksie VAF9 140

10.3.2.1 Etielasetaat-ekstrak 140

10.3.2.1 (a) Chrisoeriol [4',5,7-trihidroksi-3'-metoksiflavoon] (**81**) 141

10.3.2.2 Water-ekstrak 141

10.3.2.2 (a) Uridien [1-ß-D-ribofuranosiel-2,4-pirimidioon] (**94a**) 142

10.3.3 Subfraksie VAF10 (H_2O) 142

10.3.3.1 "Nothofagin" [2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (**160a**) 142

10.3.3.2 Luteolien (3',4',5,7-tetrahidroksiflavoon) (**38a**) 143

10.3.4 Aspalatien [2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (**43a**) 143

10.3.5 Subfraksie VAF14 143

10.3.5.1 Aspalatien [2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (**43a**) 144

10.3.5.2 Kwersitien (3',4',5,7-tetrahidroksiflavonol) (**37a**) 144

11 DIE ISOLASIE VAN METABOLIETE UIT ONVERWERKTE ROOIBOS 145

11.1 Ekstraksie van die plantmateriaal 145

11.2 Fraksionering 145

11.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol] (**68a**) 146
11.2.2 Fraksie GAF5 147

11.2.2.1 Subfraksie GAF5F2 147
11.2.2.1.1 Aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (**43a**) 148
11.2.2.1.2 2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (**183**) 148
11.2.2.1.2 (a) Moontlike vorming van die 4:6-*O*-isopropilideenverbinding (**183**) tydens die isolasieproses 149
11.2.2.1.2 (b) Sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (**183**) 149

11.2.2.1.3 Die per-*O*-asetielderivate van aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (**43a**) en "nothofagin" (2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (**160a**) 149

11.2.2.1.4 Aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (**43a**) 150

11.2.2.2 Katesjien [(2R,2S)-2,3-*trans*-3',4',5,7-tetrahidroksiflavan-3-ol] (**91a**) 150

11.2.2.2 (a) Bepaling van die absolute konfigurasie van die geïsoleerde verbinding 151

11.2.3 Prosianidien B_3 [(4α,8)-*bis*-katesjien (**92a**) 152

12 STRUKTUURBEVESTIGING VAN (Z)-2-ß-D-GLUKOPIRANOSIELOKSI-3-FENIELPROPENOëSUUR 153

12.1 Sintese van fenielpirodruiwesuur (2-okso-3-fenielpropanoësuur) (**129**) 153

12.1.1 Sintese van asetielglisien (**125**) 153
12.1.2 Sintese van 4-bensilideen-2-metieloksasool-5-oon (**127**) 153
12.1.3 Sintese van α-asetamidokaneelsuur (**128**) 154
12.1.4 Sintese van fenielpirodruiwesuur (2-okso-3-fenielpropanoësuur) (**129**) 154

12.2 Sintese van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**32**) 155

12.2.1 Bereiding van 'n 52 % (m/v) oplossing van HBr in asynsuur 155

12.2.2 Sintese van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α -D-glukopiranosielbromied (**132**) 155

12.3 Sintese van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**120b**) 156

12.4 Sintese van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**122b**) 156

12.5 Pogings tot die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) 157

12.5.1 Poging 1 157
12.5.2 Poging 2 158
12.5.3 Pogings tot die sintese van metielfenielpiruvaat (**138**) 158

12.5.3.1 Poging 1 158
12.5.3.2 Poging 2 159
12.5.3.3 Poging 3 159
12.5.3.4 Poging 4 160
12.5.3.5 Poging 5 160
12.5.3.6 Poging 6 160
12.5.3.7 Poging 7 161
12.5.3.8 Poging 8 161

12.5.4 Pogings tot die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) *via in situ* metielfenielpiruvaat- (**138**) bereiding 162

12.5.4.1 Poging 1 162
12.5.4.2 Poging 2 163
12.5.4.3 Poging 3 163

12.6 Sintese van (E)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-gluko-piranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**117b**) 164

13 STRUKTURE VAN (2R)- EN (2S)-2,3-DIHIDRO-ISO-ORIëNTIEN [(2R)- en (2S)-3',4',5,7-TETRAHIDROKSI-6-ß-D-GLUKOPIRANOSIELFLAVANOON] 166

13.1 Isolasie 166

13.2 Pogings om die glukosidiese koppelingsposisie te bevestig 168

13.2.1 Hidrogenering van iso-oriëntien (**40a**) 168

13.2.1.1 Poging 1 168
13.2.1.2 Poging 2 168
13.2.1.3 Poging 3 169

13.3 Derivatisering 169

14 BIOMIMETIESE ONDERSOEK VAN DIE ROOIBOSTEE FERMENTASIEPROSES EN DIHIDROCHALKOONCHEMIE 171

14.1 Fotochemiese omskakeling 171

14.2 Die effek van suurstof, hitte en katalisatore/inhibitore 172

14.2.1 Aspalatien en suurstof 172
14.2.2 Aspalatien en suurstof by 30 °C 172
14.2.3 Aspalatien, suurstof en mikrokristallyne sellulose by 30 °C 173
14.2.4 Aspalatien, suurstof en amilose by 30 °C 173
14.2.5 Aspalatien, suurstof en ß-siklodekstrien by 30 °C 174
14.2.6 Aspalatien, suurstof en dekstriene by 30 °C 174
14.2.7 Aspalatien, argon en dekstriene by 30 °C 174
14.2.8 Aspalatien, suurstof en dekstriene by kamertemperatuur 175
14.2.9 Aspalatien, suurstof en D-(+)-glukose by 30 °C 175
14.2.10 Die effek van die byvoeging van 'n radikaalblusser 175

14.3 Die effek van alkaliese kondisies, suurstof en katalisatore 176

14.3.1 Aspalatien, pH 10 en suurstofvrye kondisies 176
14.3.2 Aspalatien by pH 10 in die teenwoordigheid van 'n katalitiese hoeveelheid suurstof 177
14.3.3 Ondersoek na die invloed van pH op die vrystelling van glukose 177
14.3.4 Aspalatien en pirogallol by pH 10 178
14.3.5 Aspalatien en *p*-bensokinoon by pH 10 en suurstofvrye kondisies 178
14.3.6 Aspalatien, suurstof en *p*-bensokinoon by pH 10 179

14.4 Die invloed van die ensiem lakkase 180

14.4.1 Blanko-eksperiment 180
14.4.2 Ensiemkatalise 180

14.5 Derivatisering van aspalatien **(43a)** 181

14.5.1 Asetilering 181
14.5.2 Poging tot die dehidrogenering van 'n mengsel van die pergeasetileerde keto- **(43b)** en enolasetaatvorme **(43c)** van aspalatien **(43a)** 181
14.5.3 Poging tot die selektiewe metilering van apalatien **(43a)** 182
14.5.4 Pogings tot die volledige metilering van aspalatien **(43a)** 182

14.5.4.1 Poging 1 182
14.5.4.2 Poging 2 183
14.5.4.3 Poging 3 183

BYLAE 1
KMR-plate 1-73

BYLAE 2
KMR-tabelle 1-19

BYLAE 3
MS-skema's 1-11

BYLAE 4
SD-plate 1-2

BYLAE 5
HPLC-profiel 1

BYLAE 6
UV-spektra 1-5

BYLAE 7
Verklaring van mediese terme **i-viii**

VERWYSINGS 1-265

SAMEVATTING/SUMMARY **I-VI**

LITERATUUROORSIG

HOOFSTUK 1

ROOIBOS: VAN WILDE PLANT TOT EKONOMIES-VATBARE GEWAS

1.1 Klassifikasie

Rooibos (*Aspalathus linearis*) is vir die eerste keer in 1768 deur N.L. Burman in sy "Florae Capensis prodromus" beskryf.[1] Die oorspronklike eksemplaar word in Burman se herbarium in Genève onder die naam *Psoralea linearis* Burm. bewaar.[2] Ander sinomieme wat deur die jare aan die plant gegee is en ook in verskeie publikasies gebruik is, is *A. contaminatus* Druce deur Druce (1917), *A. corymbosus* E. Mey. deur Meyer (1832) en *Borbonia pinifolia* Marl. deur Marloth (1912). Die korrekte naam, *Aspalathus linearis* (Burm. fil.) R. Dahlgr., is eers in 1963 deur Dahlgren aan hierdie lid van die Fabaceae-familie toegeken.

Rooibos kan in vier hooftipes nl., die rooi-, vaal-, swart- en rooibruintipes, onderverdeel word. Die meer algemene rooibruintipe word eweneens verdeel in die Nortier- en Sederbergtipes, waarvan die Nortiertipe, oftewel die ekotipe *Nortiera*, die plant is wat kommersieel vir die maak van tee verbou word.[2]

Die produk rooibostee staan ook as rooitee, koopmanstee, naaldtee, speldtee, "roter busch"-tee of "massai"-tee (Duitsland) en "Kaffree Tea" (Verenigde State van Amerika) bekend.[2]

1.2 Beskrywing

Rooibos is 'n regop of rankende substruik met 'n dun stam en 'n hoogte van 1.35 tot 2 m. 'n Sterk penwortelstelsel penetreer 2 m of dieper, die rooibruin takke is ongeveer 60 cm lank en die lineêre, naaldagtige blare wissel tussen 2 en 6 cm in lengte. Die geel blomme van die tipiese Fabaceae-vorm word in trossies gedra en is 6.5 mm lank, terwyl die lansetagtige peulvrug 1.5 cm lank is en 'n enkele

klein, harde, niervormige saadjie huisves wat uitgeskiet word wanneer die peul oopbars. Die plant het 'n goed-genoduleerde wortelsisteem en fikseer self effektief stikstof.[2]

1.3 Habitat

Rooibos is 'n inheemse Suid-Afrikaanse plant met 'n baie beperkte verspreiding. Die plant groei natuurlik in die Wes-Kaap Provinsie en kom hoofsaaklik in die Seder- en Olifantsrivierbergreekse te Clanwilliam en Citrusdal voor.

Die plant benodig 'n Mediterreense klimaat en groei tussen 450 en 900 m bo seespieël. Volwasse plante is aangepas by koue winters en warm somers maar jong plante is sensitief vir ryp en sneeu. Diep, goed gedreineerde, sanderige, suur grond (pH 4.5 - 5.5) wat ryk is aan fosfaat en kalium is noodsaaklik.[2,3]

1.4 Die verwerkingsproses

1.4.1 Oksidasie

Rooibos moet, soos swarttee, verwerk word om die kenmerkende geur, smaak en kleur te ontwikkel.[4] Die tee word gedurende die somermaande (hoofsaaklik Januarie tot Maart) geoes. Vir hoë kwaliteit tee moet die aktiewe groeipunte met oestyd verkieslik nie langer as 30 tot 50 mm wees nie en mag daar nie blomme en peule aan die plant wees nie.

Die plant word op 'n hoogte van ongeveer 45 cm bo die grond afgesny sodat beide blare en takke geoes word. Nadat die plantmateriaal in 3 - 4 mm lengtes gekerf is, word dit met rollers gekneus. Water word net voor en na kneusing by die plantmateriaal gevoeg sodat fenole uit die blare ook die stokkies kan kleur. Die fenoliese inhoud van die stokkies is slegs 10 % van dié van die blare en ekstrakte hiervan sal dus 'n swak kleur en kwaliteit hê.

Tydens kneusing word die selle beskadig en ensieme in kontak met substrate gebring. Die mate van oksidasie en die uiteindelike kwaliteit van die tee hou dus nou verband met die mate van kneusing.

Gedurende oksidasie word die gekneusde plantmateriaal in hope van 15 tot 20 cm hoog gelaat. In koue weersomstandighede word die hope met sakke bedek ten einde hitte te behou om die oksidasieproses te onderhou. Vir hoë kwaliteit tee behoort die sogenaamde "fermentasie"-proses by 30 - 35 °C plaas te vind.[5] Tydens fermentasie verander die kleur van groen na rooi tot rooibruin. Oorfermentasie lei tot 'n bruin en later vaalbruin kleur. Goeie kleurontwikkeling vereis ook gereelde deurlugting van hope vir goeie temperatuurverspreiding en suurstofvoorsiening. Die geur wissel tydens fermentasie van 'n groen, harsagtige, spesery-agtige geur tot die gewenste soet blommegeur.

Ná oksidasie word die plantmateriaal in dun lae van 1.5 - 2 cm gegooi om tot 'n voginhoud van ongeveer 10 % te droog. Sodoende word die fermentasieproses met 'n gemiddelde duur van 12 tot 18 uur beëindig.

Hierna word die nie-bemarkbare fraksie (groter as 40 maas en kleiner as 10 maas) bestaande uit growwe stokke en fyn teestof uitgesif. Hierdie fraksie kan tot soveel as 15 % van die oes beslaan, terwyl stokkies steeds soveel as 30 % van die bemarkbare deel kan verteenwoordig.

1.4.2 *Salmonella sp.*- dekontaminasie

Die Gesondheidskommissie van Victoria, Australië, het gedurende November 1984 die teenwoordigheid van verskillende serotipes van salmonelle in rooibosteesakkies bekend gemaak.[6] Hierdie kontaminasie is in 1985 deur Holzapfel en Niemand[7] gestaaf. Aangesien die teenwoordigheid van salmonelle in voedsel, drank en die omgewing 'n potensiële gesondheidsgevaar inhou, is dekontaminasie van die uiterste belang.

Die dekontaminasie van produkte soos speserye, gedehidreerde groentes en verskillende teesoorte het nie ten doel om die kommoditeit te steriliseer nie, maar eerder om die produk mikrobiologies veilig en aanvaarbaar vir menslike gebruik te maak.

Die mees effektiewe dekontaminasieproses is aan die volgende vereistes onderworpe[7]:

1. Dit mag geen nadelige effek op die organoleptiese gehalte van die produk hê nie.

2. Dit mag geen gesondheidsgevaar vir die verbruiker inhou nie.

3. Dit moet prakties en ekonomies uitvoerbaar wees.

4. Dit moet verkieslik 'n terminale proses wees, d.w.s. na finale verpakking, waarna geen herkontaminasie meer sal plaasvind nie.

'n Dekontaminasiemetode wat op *gamma*-bestraling gebaseer is en wat in hoofsaak aan bostaande vereistes voldoen, is deur Holzapfel *et al.*[7] gerapporteer.

Tans word 'n stoompasteurisasieproses egter gebruik.[8] Hiervolgens word die tee aan optimumkondisies van 92 - 95 °C vir twee minute, gevolg deur droging by 36 - 38 °C vir twee minute blootgestel. In gevalle waar die hitte-behandelde tee by matige temperature (20 - 30 °C) of 37 °C gestoor is, is geen salmonelle geïsoleer nie, terwyl salmonelle-besmetting na 33 weke in 60 % van alle hittebehandelde monsters wat by 4 °C gestoor is, voorgekom het.

1.5 Bemarkingsgeskiedenis

Die plantkundige Carl Thunberg het reeds in 1772 die gebruik van rooibos vir die maak van tee deur die Khoikhoi gerapporteer. Vroeë setlaars het die gebruik aangeleer en in 1902 het die pionier Barend Ginsberg - stigter van B. Ginsberg (Pty.) Ltd., Kaapstad en vandag die grootste verpakker en verspreider van rooibos in Suid-Afrika - bemarking begin. Kleinskaalse verbouing het hierop gevolg. In 1930 het die bedryf 'n oplewing beleef toe die geneesheer P. le Frais Nortier onder die indruk van die heilsaamheid van die produk gekom het. Nortier het saad in die Sederberge versamel en maniere

ontwikkel om dit te kiem, terwyl Oloff Bergh en William Riordan, ondersteuners en vriende van Nortier, die eerste plantasies in die Pakhuisberge gevestig het.[2]

Die aanvraag na rooibostee het weens die tekort aan "Oriental tea" skerp gedurende die Tweede Wêreldoorlog toegeneem. Daarna het 'n skerp daling in aanvraag egter ingetree as gevolg van 'n tekort aan hoë kwaliteit saad en die gevolglike bemarking van 'n lae graad produk. Stabilisasie van die mark het in 1948 met die stigting van die Clanwilliam Teekoöperasie en die daaropvolgende stiging van die Rooibosteeraad in 1954 ingetree. *Salmonella sp.*-kontaminasie (par. 1.4.2), droogte en vloede het die bedryf gedurende die vroeë tagtigerjare tydelik ingekort.[2]

Ten spyte van hierdie terugslae groei die rooibosteebedryf steeds - nie net in die plaaslike mark nie, maar ook wat uitvoer betref. Lande waarheen die tee reeds uitgevoer word sluit Duitsland, Switserland, Korea, Israel, Brittanje, Spanje en Nederland in, terwyl Japan op die oomblik die grootste invoerder is. Die rooibosteehandel tussen Suid-Afrika en Japan het in 1983 begin toe 'n paar sakke na Japan uitgevoer is. Met die opheffing van sanksies in 1990 is die weg vir uitvoer na Japan gebaan en in 1991 is die eerste formele uitvoerkontrak met Japan gesluit.[9] 'n Aanvanklike bestelling van 180 ton in 1991 het 240 ton in 1992, 380 ton in 1993 en 'n rekord 1 000 ton in 1994 geword.[10]

Die twee naasgrootste invoerders van rooibostee is Duitsland en Switserland met 'n gesamentlike bestelling van 240 ton per jaar, terwyl Korea en Amerika saam sowat 44 ton per jaar invoer.[11]

Die Rooibosteeraad het in 1994 gedereguleer in 'n private maatskappy en staan sedertdien as Rooibostee Natuurlike Produkte bekend.[10]

Aanvanklik is slegs die landdrosdistrikte van Clanwilliam, Calvinia, Vanrhynsdorp en Piketberg as produksie-areas ingesluit. Kragtens Artikel 2 van die Rooibosteeskema, is die landdrosdistrikte van Ceres, Hopefield, Malmesbury, Paarl, Tulbach en Wellington hierby gevoeg.[3]

HOOFSTUK 2

DIE PRODUK, ROOIBOSTEE

2.1 Algemene gebruike

Rooibostee het 'n kenmerkende rooibruin kleur en 'n delikate geurige smaak. Die tee kan warm of koud, met of sonder melk, met of sonder suiker, kunsmatige versoeters, heuning of suurlemoensap gedrink word. Rooibos bied 'n alternatiewe basis vir ponse en skemerdrankies en kan ook met vrugtesap gemeng word. As alternatief kan die tee met kaneel of ander speserye gegeur word. Hierbenewens kan water in enige bereiding van sop, bredies en marinades met rooibostee vervang word om sodoende 'n betekenisvolle bydrae tot die kleur, geur en heilsaamheid van die gereg te maak en kan rooibostee met sukses as natuurlike sagmaakmiddel vir vleis gebruik word.

In Japan word die produk verwerk tot kitstee en ystee waarvan lg. in kartonhouers en 200 ml blikkies verkoop word. Hierbenewens word kougom, jellie en selfs stokkielekkers met die rooibosembleem daarop, bemark.[11]

2.2 Fisiologiese aktiwiteit

2.2.1 Algemeen

Rooibostee is kaffeïenvry met 'n lae tannien-inhoud.[12] Lg. eienskap verseker dat ysterabsorpsie nie belemmer word nie[13] en dat geen of min inmenging met die verteerbaarheid van proteïene plaasvind[2] - rooibos veroorsaak dus geen hardlywigheid of sooibrand nie. Hierbenewens bevat rooibostee tot 15.7 mg/100 g van die anti-oksidant askorbiensuur. Verskeie minerale, waaronder yster, kalium, kalsium, koper, sink, magnesium, mangaan en natrium is teenwoordig. Hierbenewens bevat rooibostee genoeg fluoried (gemiddeld 1.14 mg/dm^3) om antikariogeniese waarde te hê.[2]

Alhoewel rooibos in die eerste plek 'n dorslesser is, word dit nie net as skadeloos nie, maar as heilsaam vir die liggaam beskou.[2] Rooibos word klinies dikwels vir senuspanning, allergieë, maag- en verteringsprobleme, aptytloosheid en slaaploosheid voorgeskryf.[14] Wat allergieë betref, besit rooibostee die flavonol kwersitien (**37a**) en die flavoon luteolien (**38a**) (par. 4.2) met welbekende antispasmodiese aktiwiteit en word dit met vrug gebruik vir babas wat allergies vir melk is.[2]

2.2.2 Die effek van rooibostee op sommige dermatologiese siektes

Talle inflammatoriese velsiektes word met aktiewe suurstofspesies, geproduseer deur polimorfonukleêre leukosiete en ultravioletlig, geassosieer.[15] Oor die jare is verskeie anti-oksiderende middels (kaliumjodied, tetrasikliene, β-karoteen, vitamien E, ens.) gebruik om hierdie siektes te behandel. Weens rooibos se vermoë om superoksiedradikale te blus sonder om die respiratoriese aktiwiteit van die menslike polimorfonukleêre leukosiete te affekteer[14], is die kliniese effekte daarvan op terugkerende of ongeneeslike siektes verwant aan aktiewe suurstofspesies ondersoek.

A. Virusinfeksies

Alhoewel *herpes simplex* gewoonlik binne 'n week uitgewoed is, is dit terugkerend by sekere individue. Acycrovil is die beste beskikbare geneesmiddel en bring genesing binne 2 - 3 dae. Dit kan egter nie terugkering inhibeer nie. Rooibostee tree wel by sekere individue as onderdrukker op deur die periode tussen aanvalle te verleng.

Verruca plana juvenilis word algemeen hipotermies met vloeibare stikstof behandel. In die geval van vratte op die gesig is hipotermie egter nie 'n goeie keuse nie aangesien dit merke laat. Alhoewel vratte gewoonlik op eenvoudige behandeling reageer en soms spontaan verdwyn, is sommiges terugkerend. Rooibosteebehandeling het daartoe gelei dat die vratte in die geval van drie pasiënte binne een week feitlik verdwyn het en dat die hoeveelheid vratte in twee gevalle verminder het. Dit was egter in drie gevalle oneffektief.

B. In die volgende gevalle is rooibostee addisioneel tot normale terapie gebruik:

(a) Chroniese siektes met intense gejeuk

Rooibostee kan die gejeuk wat met atopiese dermatitis gepaard gaan, verlig. Verligting is ook in die gevalle van *Prurigo nodularis* (jeukende knoppies oor die hele liggaam) en eritroderma (afskilferende dermatitis) ondervind.

(b) Siektes met infiltreerde polimorfonukleêre leukosiete

Rooibostee kan die voorkoms van terugkerende aftose verminder. *Acne vulgaris* en *acne postulosa* is terugkerend en word gewoonlik met antibiotika behandel. Sewe uit elf gevalle van *acne postulosa* is met slegs topiese antibiotika en rooibostee beheer. Hierbenewens kon 'n rooibostee-aanvulling tot die terapie van steroïedgeïnduseerde dermatitis die behandeling se effek versnel.

(c) Fotosensitiwiteit

Fotosensitiewe dermatitis is verwant aan aktiewe suurstofspesies geproduseer deur ultravioletbestraling. 'n Rooibostee-aanvulling tot glukokortikoïed-behandeling kon die toestand onder beheer hou.

2.2.3 Beskermende effek teen die sitotoksisiteit van H_2O_2

Muis leukemieselle, L5178Y, wat voor H_2O_2-blootstelling met rooibostee behandel is, is volgens Ito *et al.*[16] so gemodifiseer dat dit meer verdraagsaam t.o.v. oksidatiewe spanning opgetree het. Die sitotoksisiteit van H_2O_2 word aan die vorming van ·OH *via* die Fenton-reaksie in die teenwoordigheid van metaalione toegeskryf (vgl. 1).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \dashrightarrow Fe^{3+} + HO^- + \cdot OH \quad ... 1$$

Die aktiewe komponente in die tee-ekstrak word nog ondersoek.[16]

HOOFSTUK 3

AKTIEWE SUURSTOFSPESIES EN ANTI-OKSIDANTE

3.1 Die menslike immuniteitsisteem

Die liggaam se immuniteit berus op primêre (neutrofiele) en sekondêre (limfosiete) verdedigingsmeganismes. Sodra vreemde liggaampies die liggaam binnedring, word dit deur die neutrofiele omring en verteer. Die limfosiete vorm 'n versperring agter die neutrofiele en verhoed moontlike ontsnapping van die vreemde liggaampies deur die primêre verdedigingslyn. Vertering van die vreemde liggaampies is gebaseer op die produksie van aktiewe suurstofspesies deur die neutrofiele.[17] Oorproduksie van aktiewe suurstofspesies kan egter ook menslike weefsel beskadig deur die oksidatiewe degradasie van proteïene, onversadigde lipiede, koolhidrate en nukleïensure.[18] Aktiewe suurstofspesies is nie net bekend as die bron van spesifieke ongesteldhede nie, maar is ook die hoofoorsaak van drie fatale siektes by volwassenes bo die ouderdom van 40 jaar, nl. beroerte, miokardiale infarksie en kankers.[17]

Die liggaam word teen aktiewe suurstofspesies beskerm deur veral superoksieddismutase (SOD), 'n ensiem wat oormaat superoksiede blus (vgl. 2).

$$2O_2^{-\cdot} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad ...2$$

In geval van abnormale superoksiedproduksie is die SOD teenwoordig in die menslike liggaam egter nie voldoende nie. Dit geld veral vir persone bo die ouderdom van 40 jaar weens verlaging in superoksieddismutaseproduksie en -aktiwiteit.

Bio-anti-oksiderende voedsel maak in hierdie verband vinnig opgang. Dit kan oraal toegedien word in teenstelling met SOD en liposoom-SOD (L-SOD) wat ingespuit moet word en onderdruk die vorming van vetperoksiede deur aktiewe suurstofspesies sodanig dat dit egalige bloedsirkulasie bevorder.

Gesondheidsbevorderende effekte van bio-anti-oksiderende voedsel sluit onder andere die volgende in:

A. Algemene kwale

Neuralgie, rumatiek, jig, breintrombose, hartprobleme, hoë en lae bloeddruk, diabetes, lewerprobleme, atopiese dermatitis, aambeie en pioree.

B. Spesifieke kwale

Kwaadaardige gewrigsrumatiek, inflammasie van 'n peptiese dikderm, gevorderde sistemiese sklerose en spierontsteking.

C. Ander simptome

Vetsug, hardlywigheid en slaaploosheid (par. 2.2.1), medisinale skade, alkohol- en nikotienvergiftiging, futloosheid, ens.

D. Vel en hare

Bevorder gladheid en gloed van die vel, verwyder velvlekke, verleen beskerming teen sonbrand (par. 2.2.2), word gebruik in kosmetiese middels, laat hare blink, voorkom haarverlies en vertraag gryswording.

Punte A en D is aanduidend dat bio-anti-oksiderende voedsel 'n verjongingsinvloed het.[18] Uit bogenoemde effekte is dit ook opvallend dat rooibostee bio-anti-oksiderende aktiwiteit ten opsigte van sekere van die bogenoemde simptome, nl. atopiese dermatitis, hardlywigheid, slaaploosheid en sonbrand toon.

3.2 Aktiewe suurstofspesies

Suurstof is paramagneties en 'n biradikaal in die triplet- ($^3\Sigma_g^-$) of grondtoestand ($^3O_2$) met twee elektrone van parallelle spin in twee verskillende antibindingsorbitale.[19,20] Triplet suurstof kan met elemente en ione reageer om oksiede te vorm, maar kan gewoonlik nie met organiese molekules in die singulettoestand reageer nie. Dit reageer wel maklik met vryradikale geproduseer deur ander aktiewe radikale, bestraling, ultravioletlig, hitte, ens.[19]

Hoogs reaktiewe suurstofspesies word gevorm deur die opwekking of reduksie van tripletsuurstof. Opgewekte of singuletsuurstof ($^1O_2$) kan in twee kategorieë, $^1\Delta_g$ en $^1\Sigma_g^+$ (fig. 1) geplaas word.

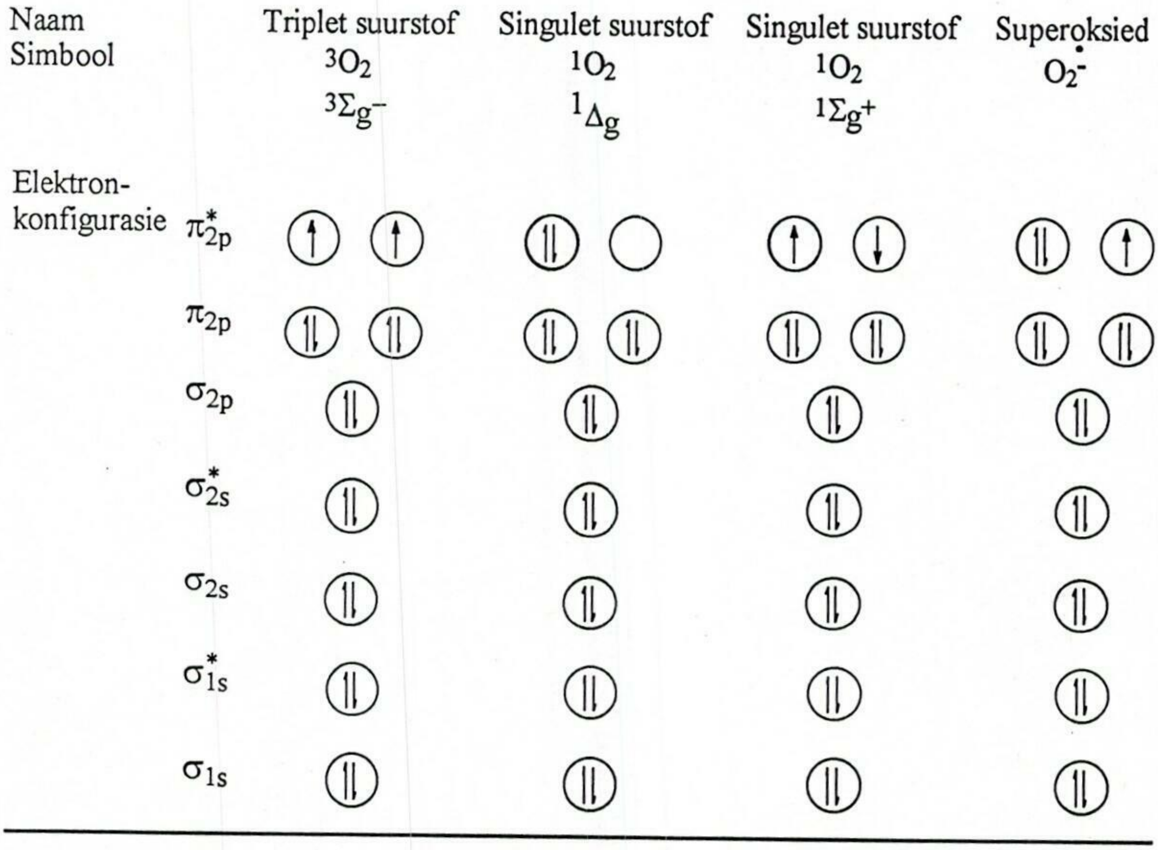
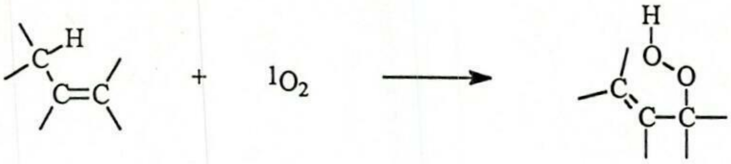


Fig. 1: Elektronkonfigurasie van suurstof in die grond-, opgewekte en gereduseerde toestande

Laasgenoemde toestand is labiel en het 'n kort leeftyd, maar die $^1\Delta_g$-toestand kan wel met onversadigde bindings [sg. een-reaksies met verwydering van die alliliese waterstof en die vorming van hidroperoksiede (vgl. 3) of vorming van endoperoksiede (SKEMA 3)] reageer.



...3

Singuletsuurstof word meestal deur foto-opwekking in die teenwoordigheid van sensitiseerders soos metileenblou en chlorofil gevorm (fig. 2).

$$Sen + h\upsilon \longrightarrow Sen^*$$

$$Sen^* + O_2(^3\Sigma_g^-) \longrightarrow Sen + {}^1O_2$$

$$^3Sen + O_2(^3\Sigma_g^-) \longrightarrow Sen + {}^1O_2\ (^1\Delta_g \text{ of } ^1\Sigma_g^+)$$

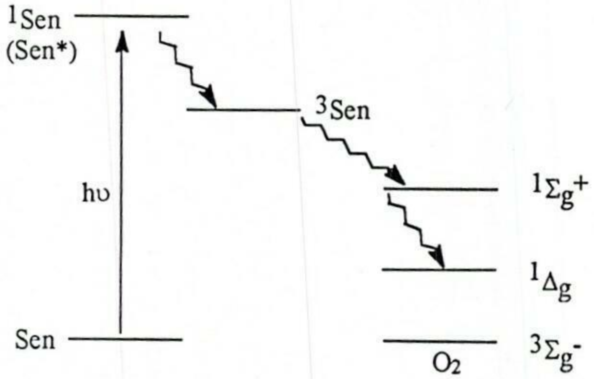


Fig. 2: Die vorming van singuletsuurstof deur fotosensitisering.

Monovalente reduksie van suurstof tot water behels die oordrag van vier elektrone met die vorming van verskeie intermediêre (vgl. 4).[20]

$$O_2 \xrightarrow[H^+]{1e'} HOO\cdot \xrightarrow[H^+]{1e'} H_2O_2 \xrightarrow[H^+ - H_2O]{1e'} HO\cdot \xrightarrow[H^+]{1e'} H_2O \quad ...\ 4$$

Die eerste van hierdie intermediêre, die perhidroksielradikaal (HOO·) of die geïoniseerde vorm daarvan, die superoksiedanioon ($O_2^{-}\cdot$) gee aanleiding tot die vorming van die relatief stabiele waterstofperoksied (H_2O_2), wat verder gereduseer word tot die hidroksielradikaal (·OH).

Die ·OH-radikaal is hoogs reaktief en is die hoofoorsaak van die sg. "suurstofvergiftiging"[19] deurdat dit oksidatief met biologiese materiaal reageer deur waterstofonttrekking, dubbelbindingaddisie, elektron-oordrag en radikaalvorming en inisieer ook autoksidasie, polimerisasie en fragmentasie. Singuletsuurstof, daarenteen, is nie van veel belang in biologiese sisteme nie, terwyl superoksied, $O_2^{-\cdot}$, self ook nie 'n hoogs aktiewe radikaal is nie en, soos waterstofperoksied, selde lipiedperoksidasie inisieer. Die aktiwiteit van die superoksiedanioon en waterstofperoksied is gesetel in die vermoë daarvan om die hoogs reaktiewe ·OH-radikaal *via* die Fenton-reaksie (vgl. 1) en die Haber-Weiss-reaksie (vgl. 5) te vorm.

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \dashrightarrow HO\cdot + HO^- + O_2 \quad \ldots 5$$

3.3 Anti-oksidante

Anti-oksiderende aktiwiteit kom by 'n wye verskeidenheid tipes verbindings voor. Weens die omvang van die onderwerp word met enkele voorbeelde volstaan.

3.3.1 Ensieme en peptiede as anti-oksidante

Superoksieddismutase (SOD) kataliseer die omskakeling van $O_2^{-\cdot}$ na H_2O_2 en O_2 (vgl. 2), terwyl katalase, een van die mees effektiewe proteïenkatalisatore bekend, die redoksreaksie van H_2O_2 bevorder (vgl. 6).

$$2H_2O_2 \dashrightarrow 2H_2O + O_2 \quad \ldots 6$$

Glutatioon (GSH), 'n tripeptied met 'n tiolgroep, reageer met oksidante soos H_2O_2 en ROOH om die geoksideerde disulfiedvorm, GSSG, te lewer (vgl. 7).

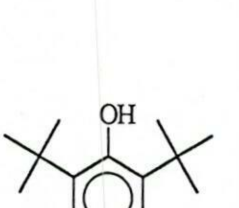
$$ROOH + 2GSH \dashrightarrow ROH + GSSG + H_2O \quad \ldots 7$$

Hierbenewens reageer glutatioon ook met ander potensieel skadelike oksidante soos $^1O_2$, $O_2^{-\cdot}$ en $HO\cdot$, bv.

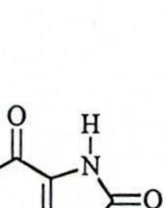
$$\cdot OH + GSH \dashrightarrow H_2O + GS\cdot \quad \ldots 8$$

3.3.2 Stikstofverbindings

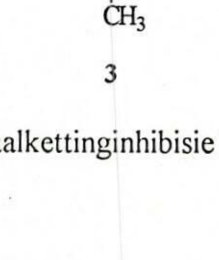
Getuienis uit 'n verskeidenheid bronne dui toenemend daarop dat verskeie stikstofverbindings van hoër plante potente onderdrukkers van verskeie *in vivo* en *in vitro* oksidatiewe prosesse is.[21] Kaffeïen (1) uit die blare van tee (*Thea sinensis*) en koffie (*Coffea arabica*) toon anti-oksiderende aktiwiteit (in 'n linoleïensuur oksidasietoets) vergelykbaar met dié van die sintetiese anti-oksidante gebutileerde hidroksi-anisool (BHA, **2**) en gebutileerde hidroksitolueen (BHT, **3**). Uriensuur (**4**) reageer op soortgelyke wyse met vryradikale in die sitoplasma.[18]



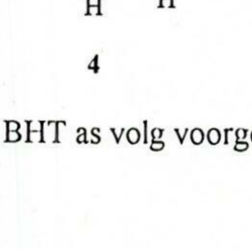
1



2

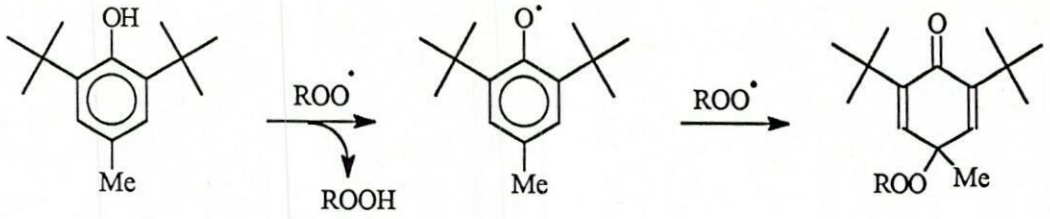


3



4

Die meganisme vir vryradikaalkettinginhibisie kan vir BHT as volg voorgestel word[22]:



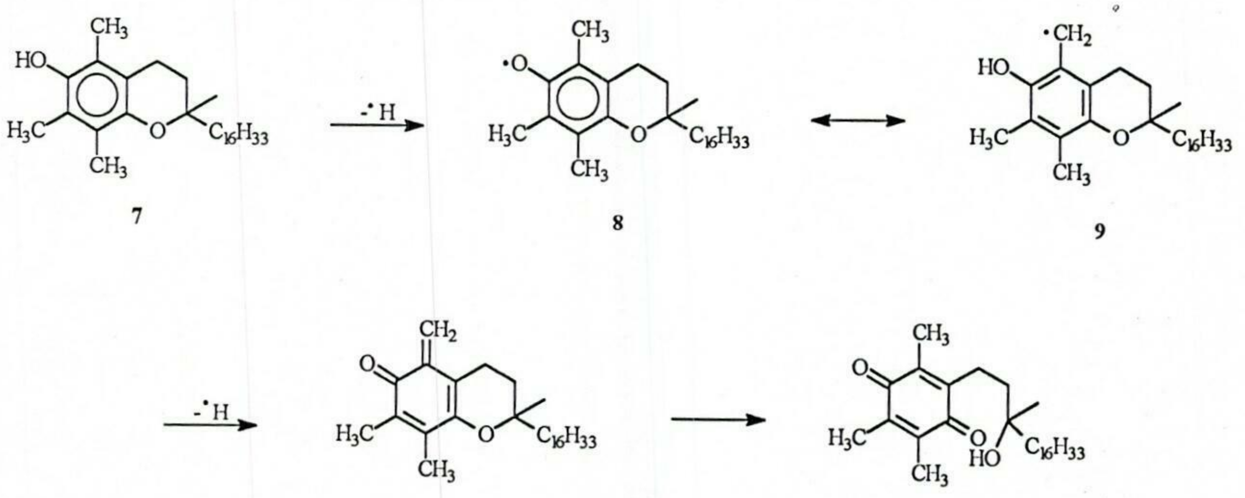
3 5 6

SKEMA 1

3.3.3 Fenoliese verbindings

Fenoliese anti-oksidante sluit ook sekere flavonoïede en fenoliese karboksielsure, waaraan later aandag gegee sal word (par. 5.9), in. Vir eers word met 'n enkele voorbeeld, vitamien E, volstaan.

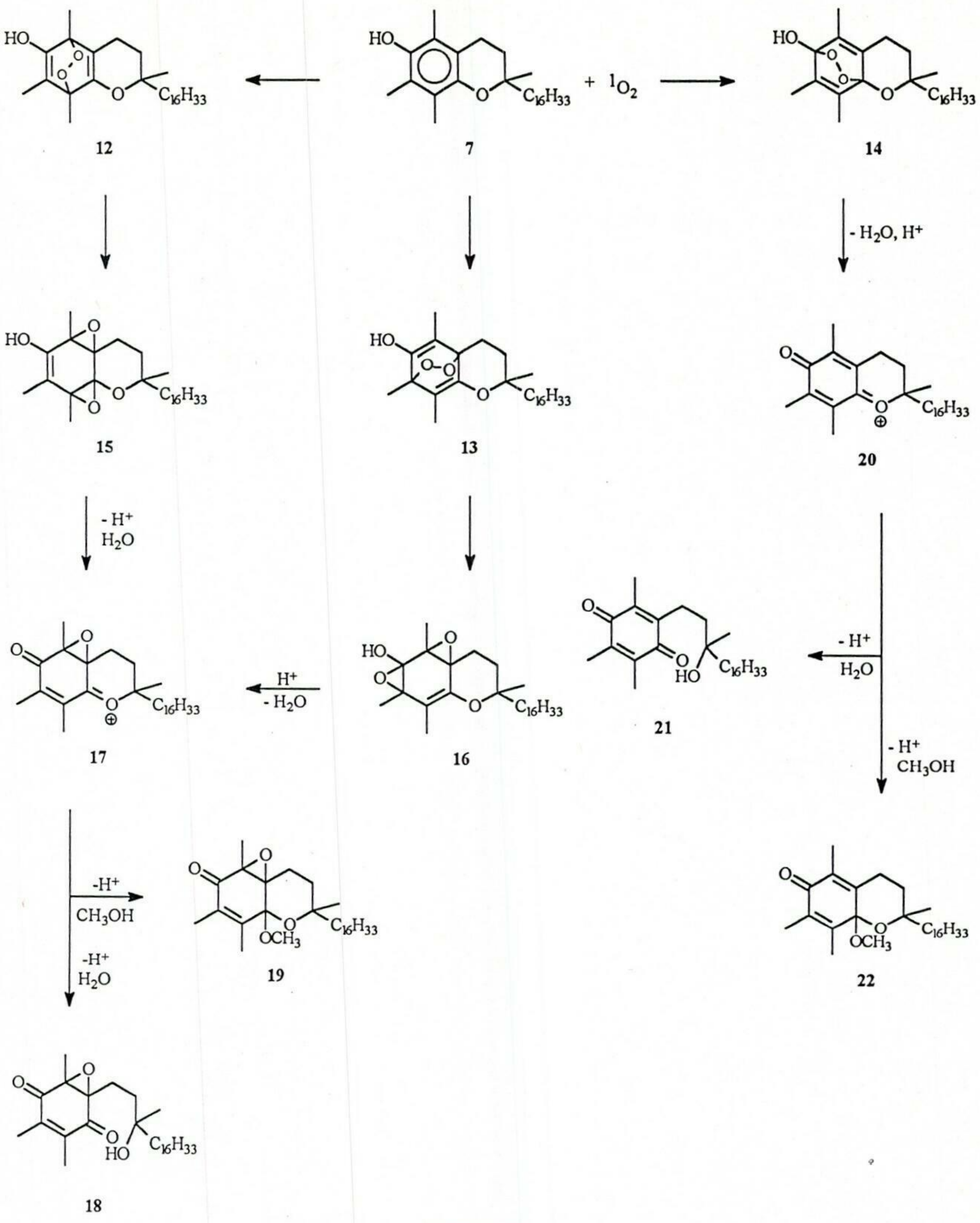
Van die vier biologies aktiewe tokoferole met vitamien E aktiwiteit, is α-tokoferol (**7**) die mees potente. Soos in die geval van ander fenoliese anti-oksidante, bv. BHT (**3**), is die normale meganisme van werking die deaktivering van peroksiradikale en dus vryradikaalkettinginhibisie.[22]



7 8 9 10 11

SKEMA 2

Vitamien E is verder een van die beste blussers van $^1O_2$[20] (voorgestelde meganisme: SKEMA 3) en reageer oënskynlik ook met $O_2^{-\cdot}$ om 'n fenoksiradikaal te lewer.[21]

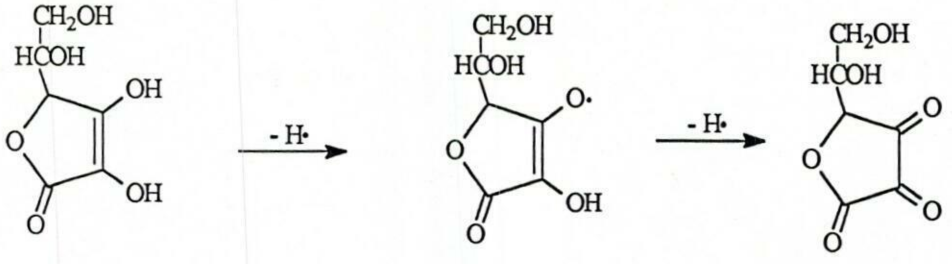


SKEMA 3

3.3.4 Vitamien C

Vitamien C (askorbiensuur, **23**) reduseer twee ekwivalente $O_2^{-\cdot}$ om H_2O_2 en die triketoderivaat, dehidroaskorbiensuur (**25**) te lewer (SKEMA 4).[21] Hierbenewens blus dit peroksiradikale in

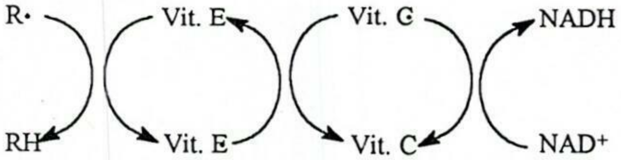
vryradikaalkettingreaksies, reageer dit met $^1O_2$ en word HO· ook in neutrale media geblus.[19]



23 24 25

SKEMA 4

Vitamien C en vitamien E tree hierby sinergisties op deurdat eersgenoemde 'n waterstofatoom aan die vitamien E-afgeleide fenoksiradikaal doneer en sodoende vitamien E regenereer. Die *in vivo* regenerasie van vitamien E ten koste van vitamien C mag die feit dat daar nog nooit 'n kliniese tekort aan vitamien E in die mens gedemonstreer is nie, gedeeltelik verklaar. Onder sekere toestande kan die vitamien C radikaal selfs ensimaties deur 'n NADH-sisteem gereduseer word (SKEMA 5).[23]



RH = Lipied
NADH = Nikotienamiedadeniendinukleotied

SKEMA 5

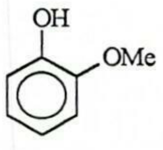
Uit bogenoemde gegewens volg dat die anti-oksiderende aktiwiteit van rooibostee (par. 2.2.2) ten minste gedeeltelik aan die teenwoordigheid van askorbiensuur (par. 2.2.1) toegeskryf kan word.

HOOFSTUK 4

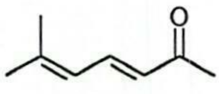
ROOIBOS : 'n CHEMIESE PROFIEL

4.1 Vlugtige komponente

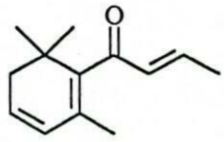
Habu *et al.*[24] het in 1985 die eerste ondersoek na die vlugtige komponente van rooibostee geloods. 'n Vlugtige olie, berei met behulp van 'n gemodifiseerde Likens-Nickerson stoomdistillasie/kontinue oplosmiddel ekstraksie tegniek, het 99 komponente gelewer, waaronder 26 ketone, 19 aldehiede, 16 alkohole, 12 esters, 9 koolwaterstowwe, 7 fenole, 4 sure, 3 eters en 3 uiteenlopende verbindings. Die hoofkomponente van die ekstrak is gauiacol (**26**), 6-metiel-3,5-heptadien-2-oon (**27**), damascenoon (**28**), geranielasetoon (**29**), 2-fenieletanol (**30**) en 6-metiel-5-hepten-2-oon (**31**).



26

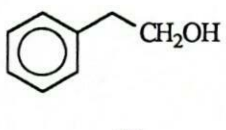


27

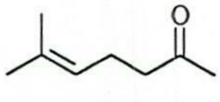


28

29



30

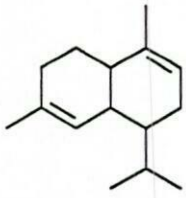


31

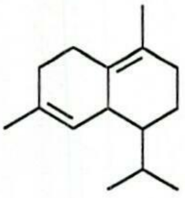
Boruimte-analise het tot die positiewe of tentatiewe identifikasie van 218 komponente, waaronder 47 alkohole, 41 ketone, 39 aldehiede, 27 koolwaterstowwe, 24 esters, 7 fenole, 6 sure en 14 uiteenlopende komponente, gelei.

In 1993 is in 'n opvolgondersoek deur Kawakami *et al.*[25] 'n verdere 42 vlugtige verbindings geïdentifiseer, insluitende 5 koolwaterstowwe, 7 alkohole, 7 aldehiede, 5 ketone, 4 sure, 1 ester, 8

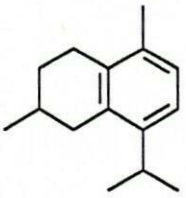
laktone, 2 anhidriede, 1 imied, 1 fenol en 1 furaan. Vyf nouverwante verbindings, α-muurolene (**32**), δ-cadinene (**33**), calamene (**34**), calamenene (**35**) en cadalene (**36**) is hierby ingesluit.



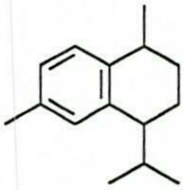
32



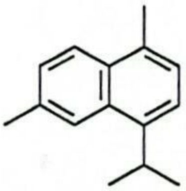
33



34



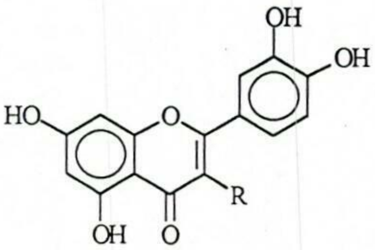
35



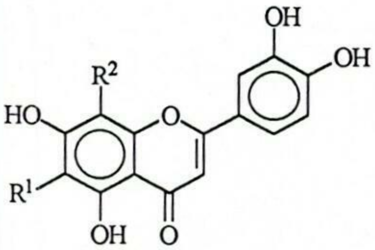
36

4.2 Nie-vlugtige fenoliese samestelling

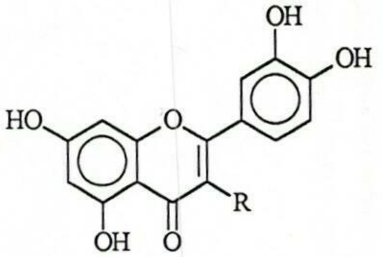
Alhoewel uitgebreide ondersoeke na die vlugtige komponente van rooibostee met groot sukses geloods is, is die nie-vlugtige fenoliese samestelling van rooibos 'n feitlik onontginde terrein. Slegs sewe nie-vlugtige fenoliese verbindings (almal flavonoïede) is deur vorige navorsers uit rooibos geïsoleer en geïdentifiseer. Twee van hierdie verbindings, nl. die flavonol, kwersitien (**37a**) en die flavoon, luteolien (**38a**) is in 1974 deur Snyckers en Salemi[26] uit verwerkte rooibos geïsoleer. Die oorblywende vyf verbindings, nl. die twee C-C-glikosidiese flavone, oriëntien (**39a**) en iso-oriëntien (**40a**), die flavonolglikosiede, isokwersitrien (**41a**) en rutien (**42a**) en die dihidrochalkoon, aspalatien (**43a**) is gedurende 1959 - 1961 deur Koeppen[27,28] uit die gedroogde groen plantmateriaal geïsoleer.



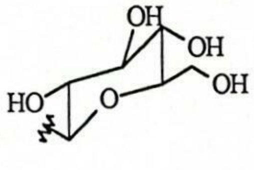
37a R = OH
38a R = H



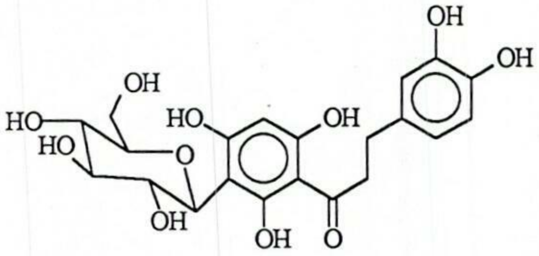
39a R^1 = H, R^2 = C-C β-D-glukopiranosiel
40a R^1 = C-C β-D-glukopiranosiel, R^2 = H



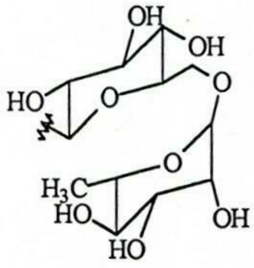
41a R = C-O β-D-glukopiranosiel
42a R = C-O Rutinosiel



β-D-glukopiranosiel



43a



Rutinosiel

4.3 Biogenese

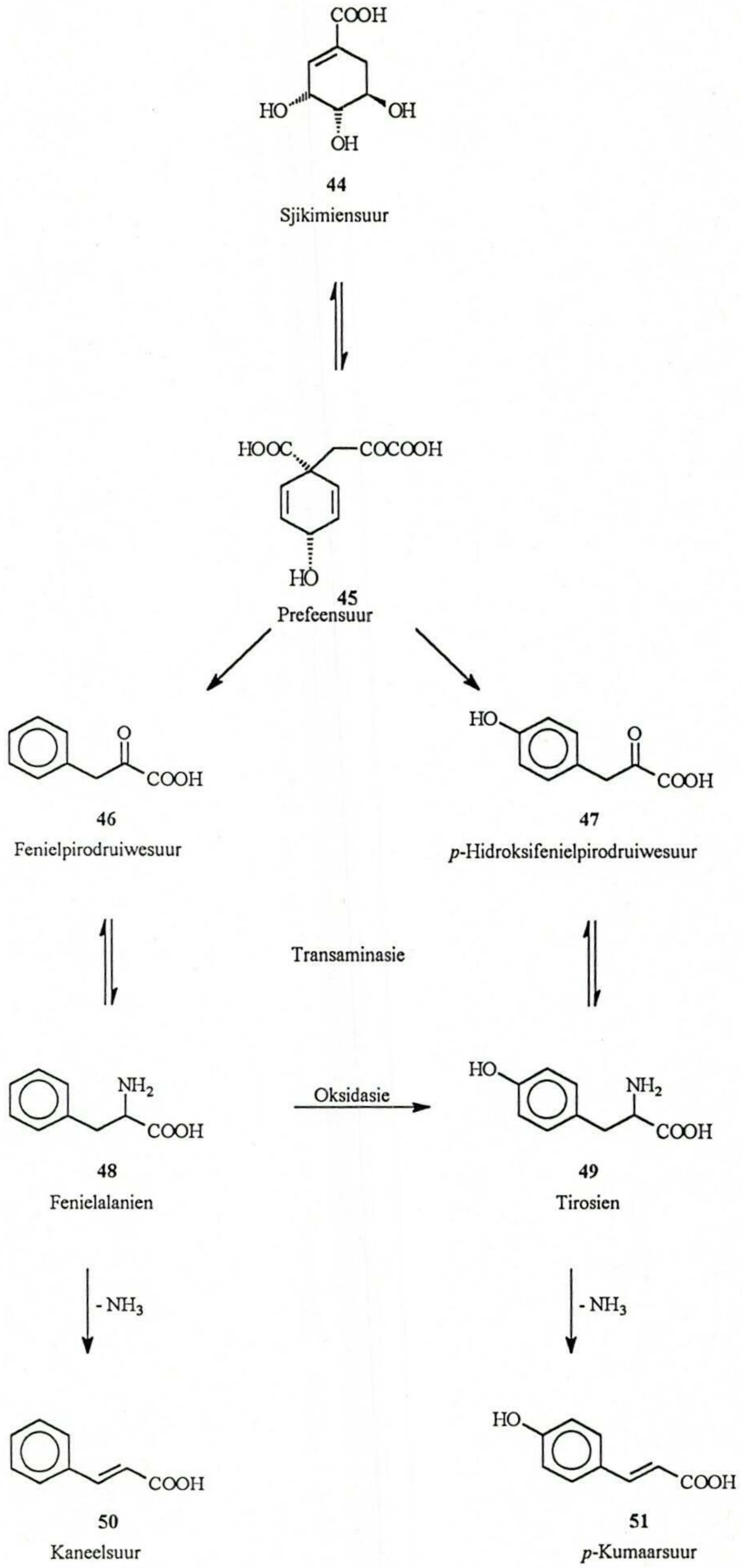
Alhoewel beduidende vordering na die biogenetiese oorsprong van flavonoïede met isotopiese merkingseksperimente gemaak is[29-31], is daar steeds aspekte van die voorgestelde roetes waaroor uitsluitsel verkry moet word.[32] Uit die ondersoeke blyk dat drie asetaateenhede die A-ring *via* die malonaatweg lewer, terwyl onsekerheid oor die werklike struktuur van die fenielpropaaneenheid wat deur plante in poliketiedkondensasie gebruik word, bestaan.[33]

Die meeste chemici is huidiglik van mening dat die kaneelsure noodsaaklike intermediêre in die biosintese van die meeste flavonoïede is, terwyl fenielpirodruiwesuur- of bensoïelasynsuureenhede aan sekondêre biosintetiese roetes mag deelneem, by die hoof sintetiese weg mag aansluit of vir die biosintese van spesifieke flavonoïede verantwoordelik mag wees.[33]

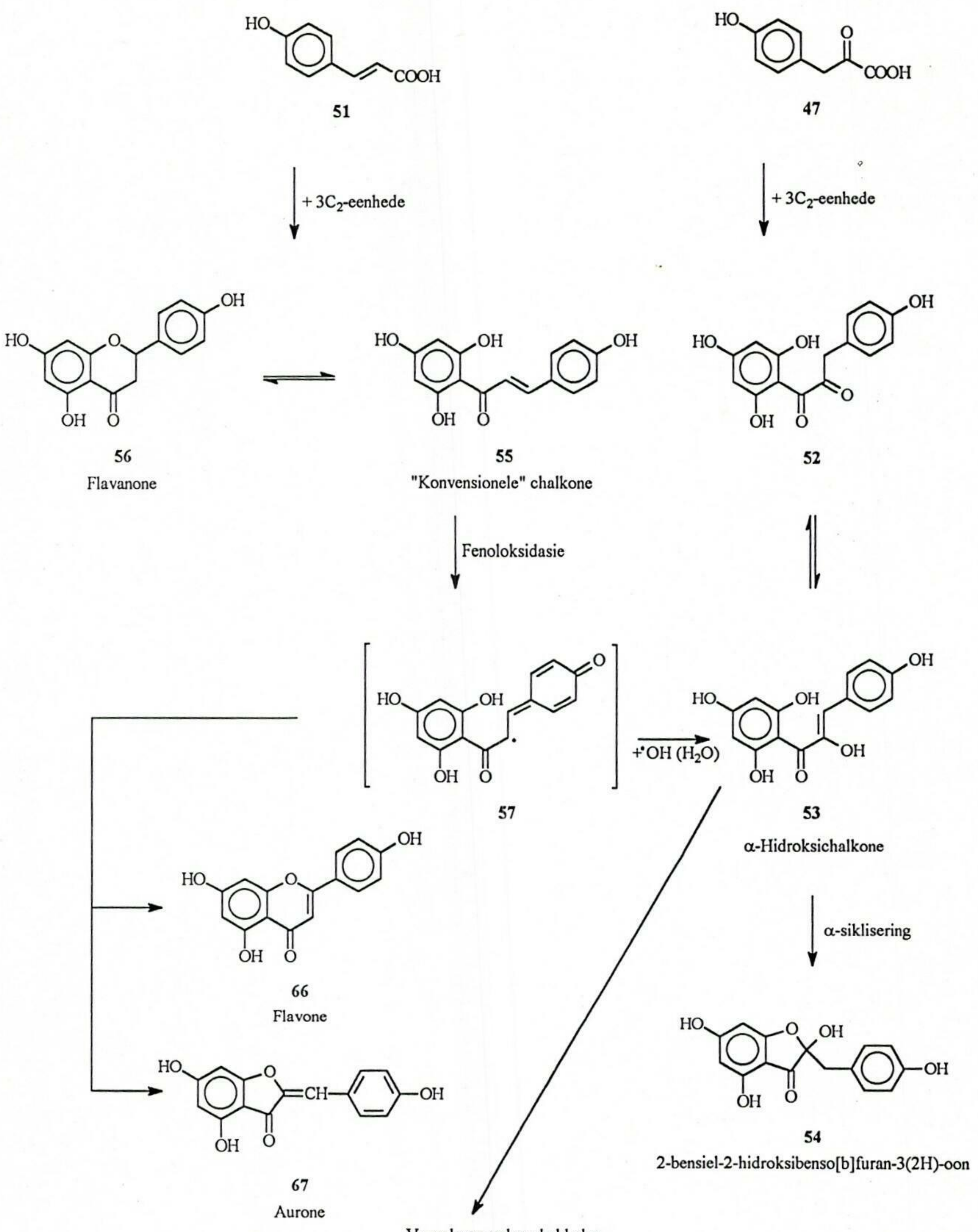
Die wydverspreide kaneelsure word biosinteties vanaf fenielalanien (**48**) en tirosien (**49**) berei deur ensimatiese eliminasie van ammoniak gevolg deur aromatiese hidroksilering en metilering (SKEMA 6).[34]

Stapsgewyse kondensasie van drie asetaateenhede met 'n geskikte geaktiveerde hidroksikaneelsuur, gewoonlik 4-kumaroïel-CoA [die CoA-ester van *p*-kumaarsuur (**51**)], lewer 'n chalkoon (**55**) as C_{15}-intermediêr, wat in die teenwoordigheid van chalkoonisomerase sikliseer om die ooreenstemmende flavanoon (**56**), met die tipiese flavonoïedskelet, te lewer.[35]

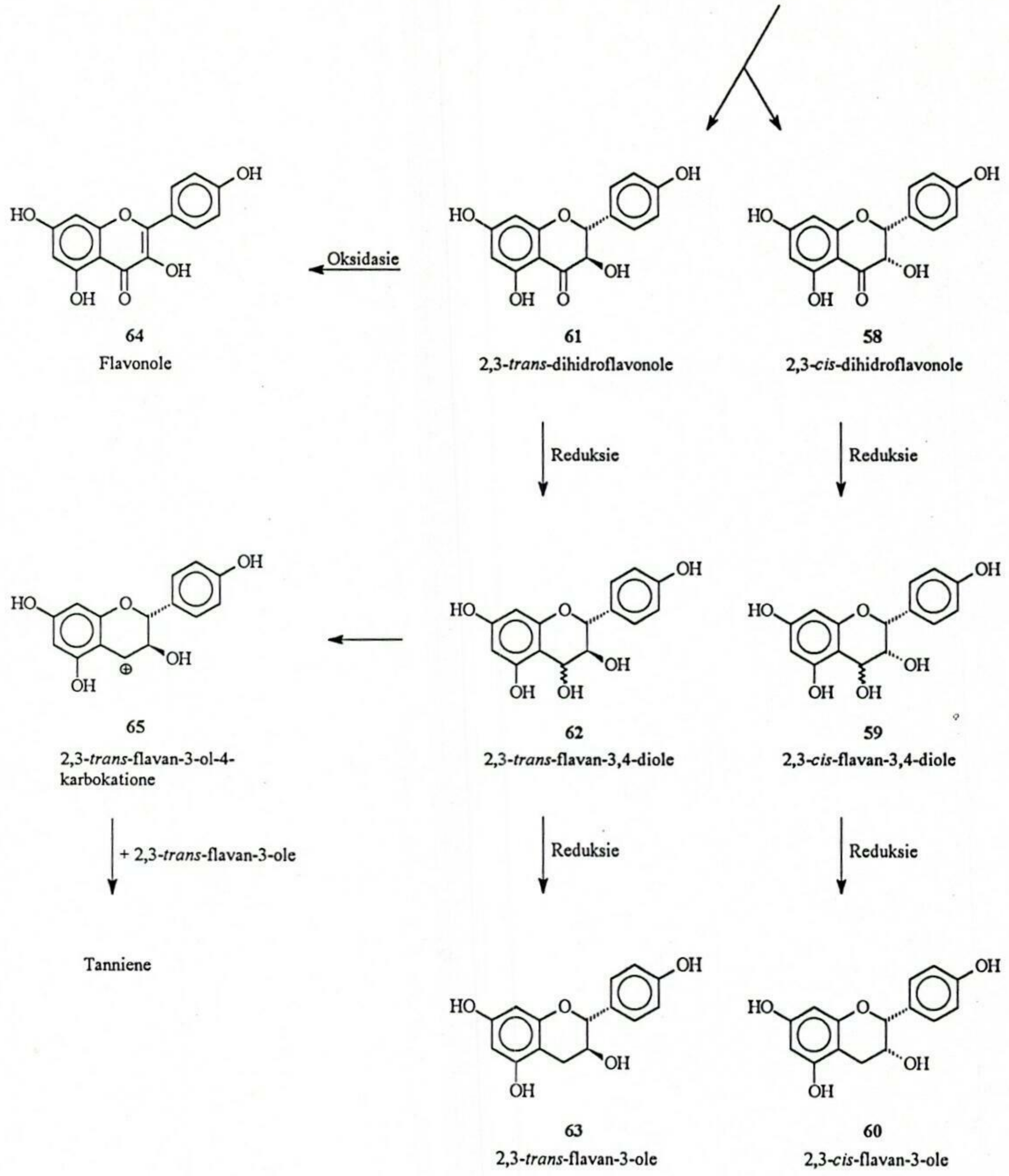
Twyfel oor die ontstaan van flavonoïede met 3-oksigenering is vermoedelik beredder deur die isolasie van α-hidroksichalkone (**53**) uit verskeie plantbronne.[36-38] In die lig van die bestaan van verskeie 3,8-gekoppelde biflavonoïede, vind aanval deur water of 'n hidroksielradikaal waarskynlik op die α-posisie van 'n chalkoonradikaal (**57**) plaas om 'n α-hidroksichalkoon (**53**) te lewer.[39] Hierdie hipotese sluit egter die vorming van flavonoïede waarvan die B-ring nie 4'- of 2'-hidroksilering besit nie, uit. SKEMA 7 is verteenwoordigend van die vorming van die verskillende flavonoïedklasse waar 'n eenvoudige 4'-hidroksileringspatroon van die B-ring voorkom.


COOH
HO
OH
OH
44
Sjikimiensuur
HOOC
COCOOH
HO
45
Prefeensuur
O
COOH
46
Fenielpirodruiwesuur
HO
O
COOH
47
p-Hidroksifenielpirodruiwesuur
Transaminasie
NH2
COOH
48
Fenielalanien
Oksidasie
HO
NH2
COOH
49
Tirosien
- NH3
- NH3
COOH
50
Kaneelsuur
HO
COOH
51
p-Kumaarsuur

SKEMA 6



Vervolg op volgende bladsy


Oksidasie
64
Flavonole
61
2,3-trans-dihidroflavonole
58
2,3-cis-dihidroflavonole
Reduksie
Reduksie
65
2,3-trans-flavan-3-ol-4-karbokatione
62
2,3-trans-flavan-3,4-diole
59
2,3-cis-flavan-3,4-diole
+ 2,3-trans-flavan-3-ole
Reduksie
Reduksie
Tanniene
63
2,3-trans-flavan-3-ole
60
2,3-cis-flavan-3-ole

SKEMA 7

BESPREKING

HOOFSTUK 5

STRUKTUUR VAN METABOLIETE UIT ROOIBOS

5.1 Inleiding

In die huidige ondersoek is nie alleen op die isolasie en karakterisering van wateroplosbare metaboliete uit rooibostee gefokus nie, maar is daar gepoog om 'n profiel van die fisiologiese aktiwiteit van sodanige verbindings daar te stel ten einde wetenskaplike stukrag te verleen aan aansprake oor die heilsame invloed van rooibostee wat reeds oor dekades heen gemaak word.

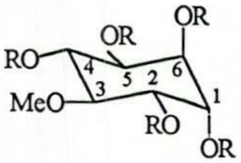
5.2 (+)-Pinitol (3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol) (68a)

(+)-Pinitol (**68a**) is in hierdie ondersoek vir die eerste keer uit die rooibos geïsoleer. Die ^{1}H KMR-spektrum (Plaat 1, Tabel 1) in D_2O het op die teenwoordigheid van ses protone van die tipe H-C-OH(R) (δ 3.10 - δ 3.77), sowel as 'n metoksigroep (δ 3.36), gedui. Asetilering het 'n penta-*O*-asetielderivaat (Plate 2 en 3, Tabel 1) gelewer. 'n Spin-spinontkoppelingseksperiment op per-*O*-asetiel-(+)-pinitol (**68b**) in C_6D_6 het bevestig dat H-3 (δ 3.78, dd, J = 9.5 en 10.0 Hz) met H-2 (δ 5.61, dd, J = 3.5 en 10.0 Hz), sowel as H-4 (δ 5.86, dd, J = 9.5 en 10.0 Hz) gekoppel is, terwyl die metoksigroep (δ 3.31, 3 H, s) in 'n n.O.e-eksperiment met H-2 (δ 5.61, 0.85 %), H-3 (δ 3.78, 6 %) en H-4 (δ 5.86, 1.54 %) gekorreleer is. 'n ^{13}C-spektrum (asetoon-d_6, plaat 4) van per-*O*-asetiel-(+)-pinitol (**68b**) het die teenwoordigheid van ses koolstowwe van die tipe -O-CH sowel as 'n *O*-metielgroep (δ_C 60.86 - 79.40) bevestig.

Die infrarooispektrum van (+)-pinitol (**68a**) is identies aan dié van 'n outentieke monster.[40]

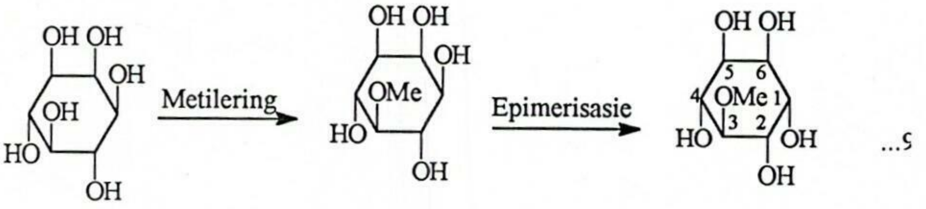
Massaspektrometrie volgens die chemiese-ionisasie-tegniek het vir beide (+)-pinitol (**68a**) (MS Skema 1) en per-*O*-asetiel-(+)-pinitol (**68b**) (MS Skema 2) die geprotoneerde moederione (*m/z* 195 en 405, respektiewelik) gelewer en verdere fragmentasies het plaasgevind deur eliminasie van H_2O, MeOH en asynsuur.

Die optiese rotasie $[\alpha]_D$ = +67° (9 mg/cm^3, H_2O) van die geïsoleerde verbinding is in ooreenstemming met dié van outentieke (+)-pinitol **(68a)**[41] en het aldus onderskeid tussen die twee enantiomere moontlik gemaak.



68a R = H
b R = Ac

D-pinitol (**68a**), een van die mees algemene siklitole in plante, kom in betekenisvolle konsentrasies in die blare of hout van feitlik alle gimnosperme en verskeie ander plantfamilies voor.[42,43] D-pinitol (**68a**) is reeds in 1855 deur Berthelot[44] uit die gimnosperm *Pinus lambertiana* Dougl. geïsoleer en sedertdien is die biogenese daarvan in gimnosperme, Leguminosae en Asclepiadaceae onafhanklik bepaal.[42,45] Hiervolgens verloop die biosintese *via* die metilering van *mio*-inositol (**69**) en daaropvolgende epimerisasie van die gevormde "sequoyitol" (**70**) (reaksie 9).

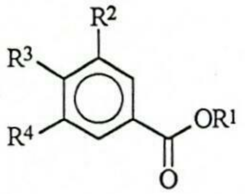


69 **70** **68a**

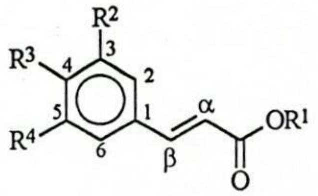
Inositole (sikloheksaanheksole) en die fosfate daarvan is verantwoordelik vir sellulêre kommunikasie en word ook aan antiglikosidiese (inhibeer glikosidases) en antivirale aktiwiteit gekoppel.[47-50]

(+)-Pinitol (**68a**) tree op as voedingstimulant vir larwes van die geel skoenlapper *Eurema hecabe mandarina*[51] en inhibeer larwale groei van *Heliothus zea* op sojabone (*Glycine max* [L] Merr.).[52] Meer merkwaardig egter, is die betekenisvolle hipoglukemiese en antidiabetiese aktiwiteit (minimum orale dosis van 0.01 g/kg vir aktiwiteit) van (+)-pinitol (**68a**) in normale en alloksaangeïnduseerde diabetiese albino muise[53], asook die gebruik daarvan as ekspektorant.[54]

5.3 Fenoliese karboksielsure

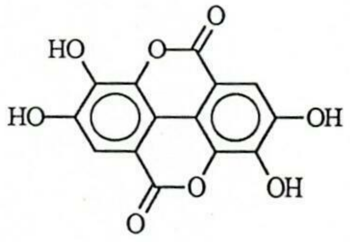


71 $R^1 = R^2 = R^4 = H, R^3 = OH$
72a $R^1 = R^4 = H, R^2 = R^3 = OH$
b $R^1 = Me, R^2 = R^3 = OMe, R^4 = H$
73 $R^1 = R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OH$
74 $R^1 = H, R^2 = R^4 = OMe, R^3 = OH$.

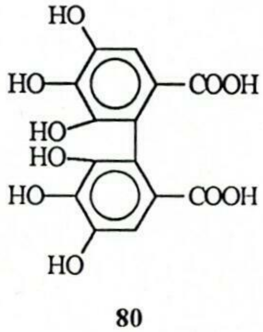


75a $R^1 = R^2 = R^4 = H, R^3 = OH$
b $R^1 = R^2 = R^4 = H, R^3 = OAc$
76 $R^1 = R^4 = H, R^2 = R^3 = OH$
77a $R^1 = R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OH$
b $R^1 = R^4 = H, R^2 = OMe, R^3 = OAc$
78a $R^1 = H, R^2 = R^4 = OMe, R^3 = OH$
b $R^1 = H, R^2 = R^3 = R^4 = OH$
c $R^1 = Me, R^2 = R^3 = R^4 = OMe$

Verskeie fenoliese karboksielsure, waaronder *p*-hidroksibensoësuur (**71**), 3,4-dihidroksibensoësuur (protokatesjoësuur) (**72a**), 4-hidroksi-3-metoksibensoësuur (vanilliensuur) (**73**), 4-hidroksikaneelsuur (*p*-kumaarsuur) (**75a**), 3,4-dihidroksikaneelsuur (kaffeïensuur) (**76**) en 4-hidroksi-3-metoksikaneelsuur (feruliensuur) (**77a**) is in 'n vorige ondersoek uit rooibos geïsoleer.[55,56] In dieselfde ondersoek is metiel-3,4,5-trimetoksi-sinnamaat (**78c**) na diasometaanmetilering geïdentifiseer. In die lig van die isolasie van 4-hidroksi-3,5-dimetoksibensoësuur (seringsuur) (**74**) (Plaat 8, Tabel 3) uit rooibos in die huidige ondersoek, sou verwag kon word dat metiel-3,4,5-trimetoksi-sinnamaat (**78c**) 'n derivaat van 4-hidroksi-3,5-dimetoksikaneelsuur (sinapiensuur) (**78a**), eerder as van 3,4,5-trihidroksikaneelsuur (**78b**), is - 3,4,5-trihidroksikaneelsuur (**78b**) is nog nooit in natuurlike bronne gevind nie en "ellagic acid" (**79**), die dilaktoon van heksahidroksidifeensuur (**80**) word as sistematiese ekwivalent beskou.[57,58]



79



80

p-Hidroksibensoësuur (**71**) en vanilliensuur (**73**) is in die huidige ondersoek weer in die vry fenoliese vorme geïsoleer (Plate 6 en 7, Tabel 3), terwyl protokatesjoësuur (**72a**) as metiel-3,4-dimetoksibensoaat (**72b**) (Plaat 18, Tabel 3) ná diasometaanmetilering en *p*-kumaarsuur (**75a**) sowel as feruliensuur (**77a**) as die monoasetate (**75b** en **77b**) na asetilering geïsoleer is (Plate 9 en 10, Tabel 3). Die ^{1}H KMR-spektra van die ooreenstemmende derivate van outentieke protokatesjoësuur (**72a**), *p*-kumaarsuur (**75a**) en feruliensuur (**77a**) het die identiteit van die geïsoleerde verbindings bevestig.

Soos voorheen gemeld (par. 4.3), is geaktiveerde kaneelsure, d.i. as CoA-esters, belangrike intermediêre in die biosintese van verskeie fenielpropanoïedmetaboliete.[34] Bensoësure, daarenteen, blyk afbraakprodukte van kaneelsure[34,59,60] en flavonoïede[61] te wees.

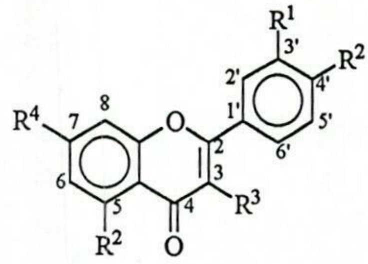
Verskeie fisiologiese en terapeutiese aktiwiteite word aan hierdie oënskynlik eenvoudige verbindings toegesê (Tabel 5.1).

<u>TABEL 5.1</u> Fisiologiese en terapeutiese eienskappe van fenoliese karboksielsure in rooibos.

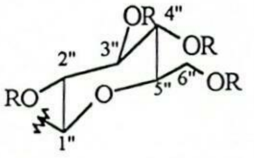
AKTIWITEIT	**(71)**	**(72a)**	**(73)**	**(74)**	**(75a)**	**(76)**	**(77a)**	**(78a)**
Antibakteries		*62				*62	*62	*62
Antifungaal		*62			*62	*62	*62	*62
Antigis						*62		*62
Antiviraal		*62					*62	
Anthelminties			*62					
Aritmieweerder							*62	
Verlaag miokardiale O_2 verbruik		*62						
Antihepatotoksies		*62			*62	*62	*62	*62
Antimitoties							*62	
Antitumor							*62	
Antimutagenies	*62							
DNA-binding						*62		
Geen-omskakeling						*62		
Anti-estrogenies							*62	
Anti-oksiderend	*64	*63	*64	*64	*64	*21	*21	
Antitiamien						*62		
Fagositose stimulant							*62	
Plaatjie aggregasie inhibisie						*62	*62	
Prolaktien stimulant							*62	
Spasmolities	*62							
Klastogenies						*62		
Anti-ulkus						*62		

*Literatuurverwysings

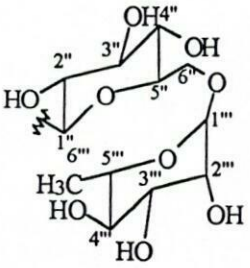
5.4 C-O-glikosiede en aglikone van flavone en flavonole



37a $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = OH$
38a $R^1 = R^2 = R^4 = OH, R^3 = H$
b $R^1 = R^2 = R^4 = OMe, R^3 = H$
c $R^1 = R^2 = R^4 = OAc, R^3 = H$
41a $R^1 = R^2 = R^4 = OH$, R^3 = C-O β-D-glukopiranosiel
42a $R^1 = R^2 = R^4 = OH$, R^3 = C-O Rutinosiel
81 $R^1 = OMe, R^2 = R^4 = OH, R^3 = H$
82a $R^1 = R^2 = OH, R^3 = H$, R^4 = C-O β-D-glukopiranosiel
b $R^1 = R^2 = OMe, R^3 = H$, R^4 = C-O tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel



R = H, β-D-glukopiranosiel
R = Ac, tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel



Rutinosiel

Kwersitien (**37a**), een van die eerste fisiologies aktiewe verbindings geïdentifiseer in rooibos[2], is reeds in 1974 uit verwerkte rooibos geïsoleer.[26] Vergelyking van die ^1H KMR-spektrum van die verbinding (Plaat 35, Tabel 8) met dié van outentieke kwersitien, het die identiteit daarvan bevestig. 300 MHz ^1H KMR-data is in 'n vorige ondersoek versamel.[55,56]

Luteolien (**38a**) (Plaat 33, Tabel 8), wat ook voorheen as fisiologies aktiewe bestanddeel uit rooibos geïsoleer is[26], is in 'n vorige ondersoek intensief met 300 MHz ^1H KMR-spektroskopie bestudeer.[55,56] In die huidige ondersoek is luteolien (**38a**) na derivatisering ook as 3',4',5,7-tetra-*O*-asetielluteolien (**38c**) geïsoleer en geïdentifiseer deur vergelyking van die ^1H KMR-spektrum (Plaat 28, Tabel 6) met die van die geasetileerde derivaat van outentieke luteolien.

Chrisoeriol (**81**), wat in 1992 vir die eerste keer uit die rooibos geïsoleer is,[55] is weereens in vry fenoliese vorm geïsoleer (Plaat 29, Tabel 8).

Beide kwersitien (**37a**) en luteolien (**38a**) is anti-oksidante[65,66] met antispasmodiese aktiwiteit[26]. Kwersitien het hierbenewens antivirale[67-69] en antineoplastiese[70,71] aktiwiteit, maar inhibeer kalsiumvervoersisteme in senuwee-eindpunte - kalsiumvervoer-ATPase van die sinaptosomale blasies word deur kwersitien geïnhibeer met gevolglike inhibisie van beide die vervoer van kalsium en die hidrolise van ATP.[72] Die anti-oksiderende eienskappe van hierdie twee verbindings kom ook tot 'n mindere mate in die ooreenstemmende C-O flavonolglikosiede isokwersitrien[73] (**41a**) en rutien[66] (**42a**), wat beide reeds in 1959 uit rooibos geïsoleer is[27], voor. Rutien (**42a**) is, soos die ooreenstemmende aglikoon kwersitien (**37a**), antineoplasties (Tabel 5.2).[70,71]

TABEL 5.2 Fisiologiese en terapeutiese aktiwiteite van C-O-glikosiede en aglikone van flavone en flavonole.

AKTIWITEIT	(37a)	(38a)	(41a)	(42a)
Anti-oksidatief	*65,66	*65,66	*73	*66
Antispasmodies	*26	*26		
Antineoplasties	*70,71			*70,71
Antiviraal	*67-69			
Inhibeer kalsium vervoer-sisteme	*72			
Vitamien P				*74

*Literatuurverwysings

Van groter belang egter, is die farmakodinamiese toepassing van rutien (**42a**) soos weerspieël word deur die bewese vitamien P aktiwiteit (P = "permeability") daarvan met gepaardgaande bevordering van die stabiliteit en deurlaatbaarheid van kapillêre bloedvate. Hierdie eienskap is belangrik by die behandeling van toestande waar die neiging tot bloeding vergroot a.g.v. verlaagde weerstand of verhoogde deurlaatbaarheid van kapillêre bloedvate, veral in gevalle van hoë bloeddruk en diabetes. Danksy rutien (**42a**) se geredelike beskikbaarheid, word dit in verskeie mediese preparate ingesluit.[74]

Rutien (**42a**) stimuleer voeding van *Manduca sexta* wurms op tabak (*Nicotiana sp.*)[75], terwyl kwersitien (**37a**) die aartappelvirus X, moontlik deur blokkering van die geïnfekteerde gebiede op die blaaroppervlak[76], inhibeer.

Luteolien-7-*O*-glukosied[77] (**82a**), voorheen onbekend in rooibos, is na derivatisering as die metieleterasetaat (**82b**) geïsoleer en geïdentifiseer.

Die ^{1}H KMR-spektrum van (**82b**) in C_6D_6 (Plaat 21, Tabel 6) het 'n tipiese ABX-sisteem, twee *meta*-gekoppelde doeblette en 'n een-proton singulet in die aromatiese gebied vertoon. Drie drie-proton singulette by δ 3.39, δ 3.35 en δ 3.28 het op die teenwoordigheid van drie metoksigroepe gedui, terwyl vier asetoksigroepe as vier drie-proton singulette by δ 1.74, 1.71, 1.67 en 1.54 geresoneer het.

Individuele suikerprotone is op grond van koppelingskonstantes en na analogie van soortlyke sisteme in analoë verbindings[55,56] toegeken. Uit die groot koppelingskonstantes tussen H-1" en H-2" (J = 8.0 Hz), H-2" en H-3" (J = 9.5 Hz), H-3" en H-4" (J = 9.5 Hz), asook H-4" en H-5" (J = 10.0 Hz), volg dat die protone van elke paar *trans*-diaksiaal[78] t.o.v. mekaar georiënteer is en dat die suiker dus gederivatiseerde glukose (in die piranose-vorm) is. Die absolute D-konfigurasie van glukose volg uit die natuurlike voorkoms van die suiker[79], terwyl die anomeriese ß-konfigurasie en die C-O-koppelingswyse uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^{3}J_{HH}$ = 8.0 Hz) volg.[55,56,78-97]

Onderskeid tussen H-8 (δ 6.65) en H-6 (δ 6.31) is op grond van n.O.e-eksperimente getref. H-6 (δ 6.31) het in 'n n.O.e-eksperiment met 'n metoksigroep (5-OMe) (δ 3.35, 3 %) geassosieer, terwyl H-8 (δ 6.65) met H-1" (δ 4.91, 20 %) en H-1" (δ 4.91) met H-8 (δ 6.65, 34 %) geassosieer het. Uit hierdie resultate kan afgelei word dat die suikermoïeteit op posisie 7 deur 'n C-O-binding aan die aglikoon gekoppel is, terwyl die 5-OMe groep om die O-C-as na H-6 weg van die lywige *peri*-karbonielgroep georiënteer is (fig. 3).

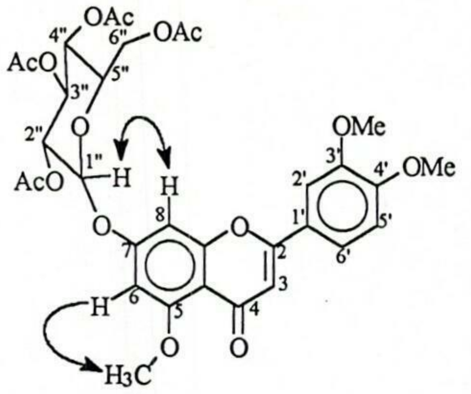


Fig. 3. Voorkeurkonformasie van 2",3",4",6"-tetra- *O*-asetiel-3',4',5-tri- *O*-metiellutedien-7-*O*-glukosied **(82b)**

Ter ondersteuning van bogenoemde struktuurvoorstelling, is die ^{1}H KMR-spektrum in $CDCl_3$ (Plaat 22, Tabel 6) met dié van 3',4',5,7-tetrametoksiflavoon [3',4',5,7-tetra-*O*-metielluteolien][55,56] **(38b)** vergelyk (Tabel 5.3).

Uit tabel 5.3 is dit opvallend dat die chemiese verskuiwings van die aglikoonprotone, uitgesonderd H-6 en H-8, feitlik ooreenstem, terwyl die OMe-sein by δ 3.91 afwesig is. Die verskille t.o.v. H-6 en H-8 bevestig dat die suiker op die A-ring gesetel moet wees.

Massaspektrometrie (EI) (MS SKEMA 4) het bevestig dat beide die aglikoon soos afgelei uit bg. eksperimente ($C_{18}H_{16}O_6$, *m/z* 328, 89.2 %) en die C-O-gekoppelde 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielsubstituent (fragment $C_{14}H_{19}O_9$, *m/z* 331, 7.1) teenwoordig is.

Tabel 5.3 Vergelyking van die ^{1}H KMR-data ($CDCl_3$) van 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5-tri-*O*-metielluteolien-7-*O*-glukosied (**82b**) en 3',4',5,7-tetra-*O*-metielluteolien (**38b**). Chemiese verskuiwings word in d.p.m. en J-waardes (in hakies) in Hz aangegee.

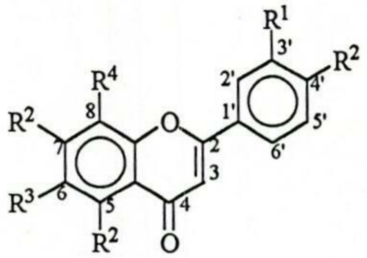
Ring	Proton	(82b)	(38b)
A	6	6.44 (d, 2.3)	6.37 (d, 2.5)
	8	6.64 (d, 2.3)	6.55 (d, 2.5)
B	2	7.29 (d, 2.0)	7.31 (d, 2.1)
	5	6.95 (d, 8.5)	6.95 (d, 8.8)
	6	7.49 (dd, 2.0, 8.5)	7.50 (dd, 2.1, 8.8)
C	3	6.60 (s)	6.60 (s)
Glc	1-4	5.37 - 5.11 (m)	
	5	4.00 (m)	
	6	4.27 (dd, 5.2, 12.2)	
		4.19 (dd, 2.8, 12.2)	
	-OMe	3.96, 3.95, 3.94, elk s	3.96, 3.95, 3.94, 3.91, elk s
	-OAc	2.07, 2.05, 2.04, 2.02, elk s	

5.5 C-C Flavoonglikosiede

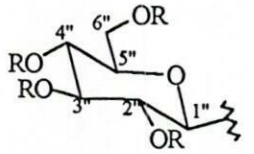
Oriëntien[28,99,100] (**39a**), iso-oriëntien[28,99,100] (**40a**), viteksien[55,56] (**83a**) en isoviteksien[55,56] (**84a**) is in hierdie ondersoek na derivatisering as die metieleterasetate geïsoleer en geïdentifiseer.

Die ^{1}H KMR-spektrum van 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieliso-oriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielflavoon] (**40b**) (Plaat 26, Tabel 7) het op die teenwoordigheid van 'n tipiese ABX-sisteem, twee een-proton singulette, vier metoksigroepe (δ 4.00, 3.96, 3.94 en 3.89) en vier alifatiese asetoksigroepe (δ 2.06, 2.03, 2.01, 1.75) gedui.

Individuele suikerprotonresonansies is soos in par. 5.4 geïdentifiseer, terwyl die C-C koppelingswyse van die 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielsubstituent aan die aglikoon uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^3J_{HH}$ = 10.2 Hz) volg.[55,56,78-97]



39a $R^1 = R^2 = OH$, $R^3 = H$, R^4 = C-C β-D-glukopiranosiel
b $R^1 = R^2 = OMe$, $R^3 = H$, R^4 = C-C tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel
40a $R^1 = R^2 = OH$, $R^4 = H$, R^3 = C-C β-D-glukopiranosiel
b $R^1 = R^2 = OMe$, $R^4 = H$, R^3 = C-C tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel
83a $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = OH$, R^4 = C-C β-D-glukopiranosiel
b $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = OMe$, R^4 = C-C tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel
84a $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = OH$, R^3 = C-C β-D-glukopiranosiel
b $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = OMe$, R^3 = C-C tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel



R = H, β-D-glukopiranosiel
R = Ac, tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel

N.O.e-eksperimente het onderskeid tussen die A-ring singulet en H-3 moontlik gemaak. Hiervolgens het H-3 (δ 6.58) met H-2' (δ 7.30 en 7.29, 6 %) en H-6' (δ 7.48, 5 %) van die B-ring geassosieer. Die A-ring singulet (δ 6.76) het daarenteen slegs met een metoksigroep (7-OMe) (δ 4.00, 3 %) geassosieer en is op grond daarvan as H-8 geïdentifiseer. Ter ondersteuning hiervan het H-1" (δ 5.10) met twee metoksigroepe, 5-OMe (δ 3.89, 4 %) en 7-OMe (δ 4.00, 4 %), geassosieer. Hierbenewens het 5-OMe (δ 3.89) met H-1" (δ 5.10, 4 %) en die suikerasetoksigroepe (δ 1.75, 0.6 %, 2.01, 0.4 %, 2.03, 0.3 % en 2.06, 0.3 %) geassosieer, terwyl 7-OMe (δ 4.00) met H-8 (δ 6.76, 13 %) en H-2" (δ 6.07, 11 %) geassosieer het. Onderskeid tussen die B-ring metoksigroepe kon getref word op grond van 'n assosiasie van 3'-OMe (δ 3.96) met H-2' (δ 7.30, 10 %) en van 4'-OMe (δ 3.94) met H-5' (δ 6.95, 10 %).

In die ^{1}H KMR-spektrum is sekere seine verdubbel (H-2' - δ 7.30 en 7.29 en H-2" - δ 6.07 en 5.90) weens die effek van dinamiese rotasie-isomerie en is 'n *ca.* 7:1 verhouding van rotameerpopulasies gevind.

Anders as in die geval van die analoë verbinding 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien[55,56] (**84b**) (Plaat 23, Tabel 7), waar 'n voorkeurkonformasie (fig. 4) op grond van 'n n.O.e-assosiasie van H-1" (δ 5.10, d, J = 10.1 Hz) met 5-OMe (δ 3.89, 1 %), maar nie met 7-OMe (δ 3.99) nie, voorgestel is, kan in die geval van tetra-*O*-asetiel-tetra-*O*-metieliso-oriëntien (**40b**) geen sodanige afleiding gemaak word nie weens n.O.e-assosiasie van H-1" (δ 5.10, d, J = 10.2) met beide 5-OMe (δ 3.89, 4 %) en 7-OMe (δ 4.00, 4 %) teen ongeveer dieselfde intensiteit.

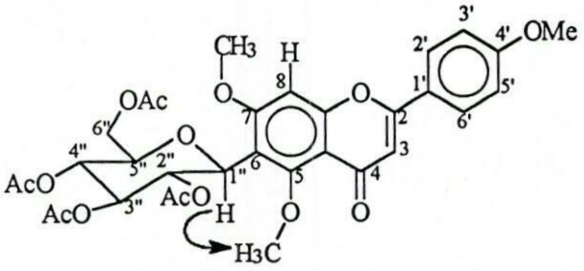


Fig. 4. Voorkeurkonformasie van 2",3",4",6"-tetra- *O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien (**84b**)

Weens rotasie-isomerie met gevolglike verdubbeling van seine, moes die ^{1}H KMR-spektrum van 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieloriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielflavoon] (**39b**) by 411 K in DMSO-d_6 (Plaat 27, Tabel 7) afgeneem word. Die spektrum het weereens 'n tipiese ABX-sisteem, twee een-proton singulette, vier metoksigroep- en vier alifatiese asetoksigroepresonansieseine vertoon.

Spin-spinontkoppelingseksperimente het die toekenning van individuele suikerprotonresonansies moontlik gemaak, terwyl die C-C-koppelingswyse van die per-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielsubstituent en die aglikoon weereens uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^3J_{HH}$ = 10.0 Hz) gevolg het.[55,56,78-97] Die moontlike C-6 C-C koppeling van die suiker aan die aglikoon is uitgeskakel danksy onomwonde bewyse hierbo vir die toekenning van die ^{1}H KMR-seine van die ooreenstemmende C-6 C-C-glikosied, 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieliso-oriëntien (**40b**), wat as enigste alternatief laat dat die per-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielsubstituent en die aglikoon C-8 gekoppel is.

In die geval van 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielviteksien[55,56] (**83b**) (Plaat 25, Tabel 7) is n.O.e-effekte tussen 4'-OMe (δ 3.89) en H-1" (δ 5.24, 5 %), H-3" (δ 5.39, 5 %) en H-4" (δ

5.51, 5 %) van die glukosieleenheid waargeneem en kon 'n voorkeurkonformasie (fig. 5) voorgestel word. Hierdie langafstand n.O.e-assosiasie van die B-ring- en C-8 glukopiranosielprotone is voorheen vir soortgelyke gederivatiseerde regio-isomeriese glikoflavonole waargeneem.[56,93,101]

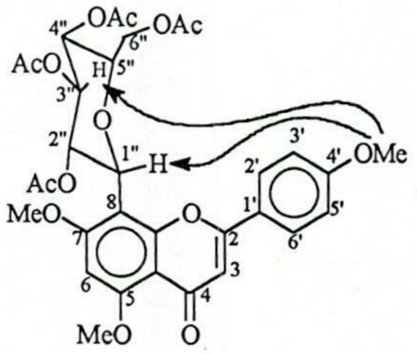
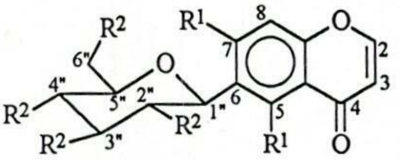


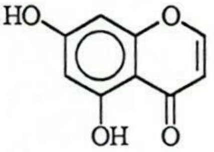
Fig. 5. Voorkeurkonformasie van 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielviteksien (**83b**)

Wanneer bg. gegewens met dié van vry fenoliese iso-oriëntien (**40a**) en oriëntien (**39a**) vergelyk word, kan met stelligheid gekonstateer word dat die effek van dinamiese rotasie-isomerie meer geaksentueer in verbindings met C-8 C-C-gekoppelde suikers as met C-6 C-C-gekoppelde suikers is. Wat eersgenoemde betref, het verbrede en verdubbelde seine die bestudering van die ^{1}H KMR-spektra van oriëntien (**39a**) en die metieleterasetaat (**39b**) daarvan by verhoogde temperatuur (120° en 138 °C, respektiewelik) genoodsaak, terwyl die rotameerpopulasieverhouding vir tetra-*O*-asetiel-tri-*O*-metielviteksien (**83b**) *ca.* 3:2 was. Temperatuurverhoging het dus in die gevalle van oriëntien (**39a**) en die metieleterasetaat (**39b**) die energievereistes om vry rotasie om die sp^2-sp^3-binding te bewerkstellig, bevredig.[102] In teenstelling hiermee was daar geen getuienis van beperking op rotasie by 23 °C in die geval van iso-oriëntien (**40a**) [$(CD_3)_2CO$-D_2O] nie en was die rotameerpopulasieverhouding vir tetra-*O*-asetiel-tetra-*O*-metieliso-oriëntien (**40b**) en tetra-*O*-asetiel-tri-*O*-metielisoviteksien (**84b**) respektiewelik *ca.* 7:1 en 4:1. Hierdie waarnemings dui daarop dat daar 'n groter beperking op rotasie in die geval van die C-8 C-C-gekoppelde suikers, met 'n gepaardgaande groter rotasie-energieheuwel wat oorkom moet word, as in die geval van die C-6 C-C-gekoppelde suikers voorkom, moontlik a.g.v. steriese interaksie van die suiker op die 8-posisie met die B-ring.

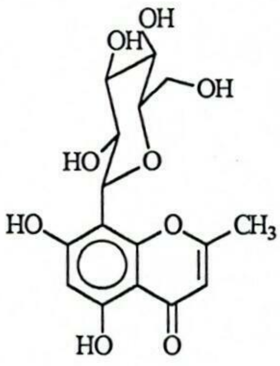
5.6 5,7-Dihidroksi-6-ß-D-glukopiranosielchromoon (85a)



85a R[1] = R[2] = OH
b R[1] = OMe, R[2] = OAc



86



87

'n Nuwe verbinding, 5,7-dihidroksi-6-ß-D-glukopiranosielchromoon (**85a**), is in die huidige ondersoek na derivatisering as die metieleterasetaat (**85b**) geïsoleer en geïdentifiseer. Die aglikoon, 5,7-dihidroksichromoon (**86**), is reeds in 1902 gesintetiseer[103], terwyl 'n analoë glikosied 5,7-dihidroksi-8-ß-D-glukopiranosiel-2-metielchromoon (**87**) in 1993 uit die blare van *Syzygium aromaticum*[104] geïsoleer is.

Die ^{1}H KMR-spektrum (Plaat 24, Tabel 7) het 'n een-proton singulet (δ 6.63), twee visinaal-gekoppelde doeblette (δ 7.64, J = 6.0 Hz en δ 6.18, J = 6.0 Hz), twee metoksiresonansieseine (δ 3.94 en 3.85) en vier alifatiese asetoksiseine (δ 2.05, 2.02, 2.01 en 1.74) vertoon. Individuele suikerprotonseine is op grond van spin-spinontkoppelingseksperimente toegeken en die C-C-koppelingswyse van die per-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosielsubstituent aan die aglikoon het weereens uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^{3}J_{HH}$ = 10.2 Hz) gevolg.[55,56,78-97]

In 'n n.O.e-eksperiment het die A-ring singulet (δ 6.63) slegs met een van die twee metoksigroepe (δ 3.94, 4 %) geassosieer, wat daarop dui dat die singulet aan die resonansie van H-8 (δ 6.63) toe te

skryf is. Bestraling van 5-OMe (δ 3.85) het op 'n assosiasie met H-1" (δ 5.07, 7 %) gedui, terwyl 7-OMe (δ 3.94) met H-8 (δ 6.63, 14 %), maar nie met H-1" (δ 5.07) nie, geassosieer het. Hierdie resultate dui daarop dat 'n voorkeurkonformasie bestaan waarin 7-OMe om die O-C-as weg van die steries lywige suikersubstituent georiënteer is, terwyl 5-OMe na die suikersubstituent weg van die steries lywige *peri*-karbonielgroep gerig is (fig. 6).

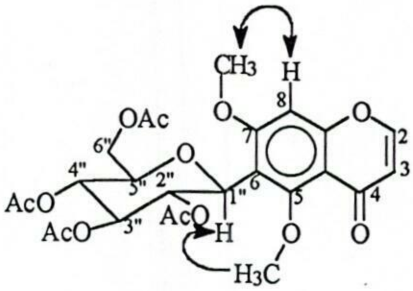
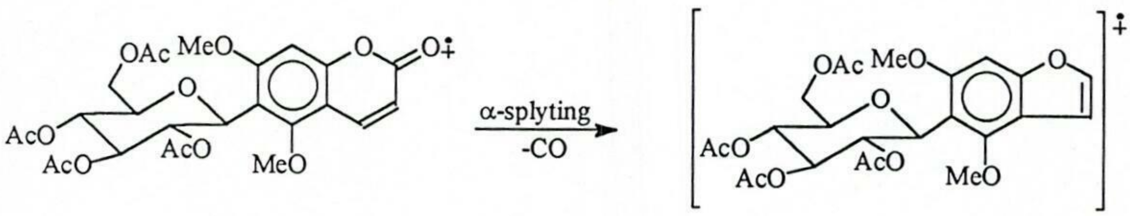


Fig. 6. Voorkeurkonformasie van 5,7-dimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)chromoon (**85b**)

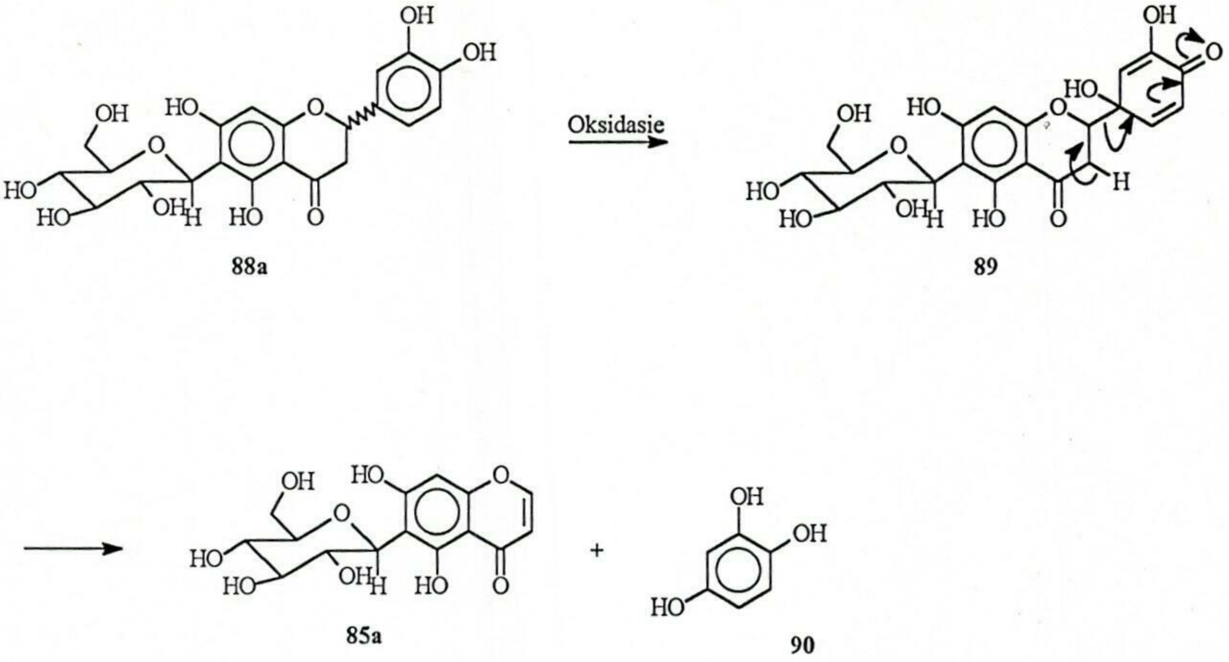
Alhoewel onvoldoende materiaal die afneem van 'n ^{17}O KMR-spektrum[105] gekortwiek het en massaspektrometrie (CI) nie uitsluitsel kon gee of die aglikoon 'n chromoon of kumarien is nie [die geprotoneerde moederioon (MH^+, *m/z* 537, 100 %) kan in beide gevalle CO vrystel om dieselfe *m/z* 509 fragment te lewer (MS Skema 5, reaksie 10)] bevestig die IR absorpsieband in die frekwensiegebied karakteristiek aan die karbonielgroep van 'n chromoon (1 650 cm^{-1} *versus* 1 700 - 1 750 cm^{-1} vir kumariene) die identiteit van die aglikoon onomwonde.[106]



...10

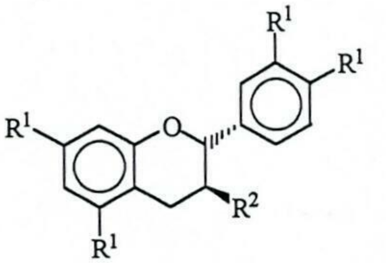
MH^+ *m/z* 537 *m/z* 509

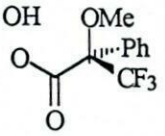
Ter ondersteuning van bogenoemde kan aangevoer word dat chromone produkte van *postmortem* prosesse is en dat die vorming daarvan aan fenoloksidasie van 4'-hidroksiflavanone en daaropvolgende splyting, toegeskryf kan word.[103,108] Beide (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**), die C_2-C_3 versadigde analoë van iso-oriëntien (**40a**), sou as voorlopers vir die vorming van 5,7-dihidroksi-6-ß-D-glukopiranosielchromoon (**85a**) kon dien (SKEMA 8) en kom inderdaad in die metaboliese poel van die rooibos voor (Hoofstuk 7).

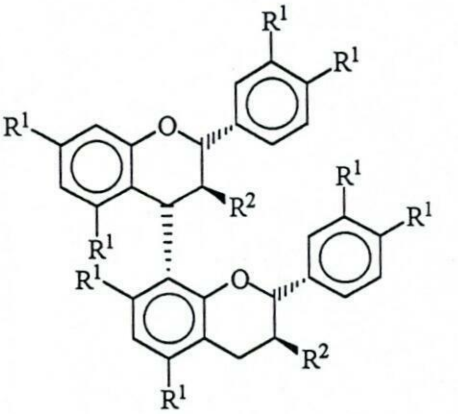


SKEMA 8

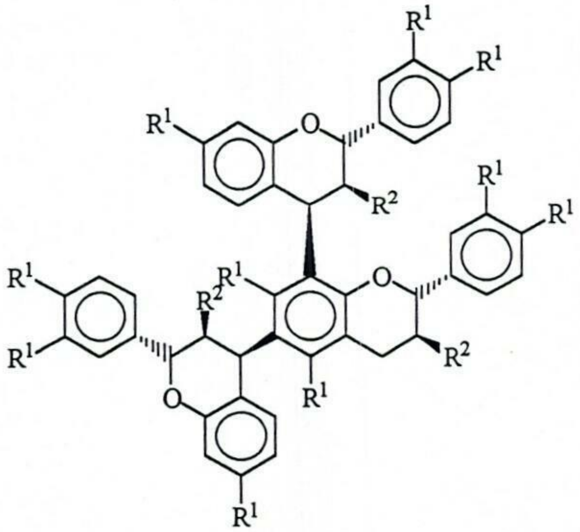
7 Die aard van rooibos-tanniene



91a $R^1 = R^2 = OH$
b $R^1 = OMe, R^2 = OH$
c $R^1 = OMe, R^2 =$ 



92a $R^1 = R^2 = OH$
b $R^1 = OMe, R^2 = OAc$



93a $R^1 = R^2 = OH$
b $R^1 = OMe, R^2 = OAc$

lhoewel daar reeds vir etlike jare daarop aanspraak gemaak word dat rooibostee 'n lae tannienhoud[12] het, is daar tot dusver nie ondersoek na die aard van die tanniene ingestel nie.

die huidige ondersoek is die tannienvoorloper katesjien [(2R,3S)-2,3-*trans*-3',4',5,7-trahidroksiflavan-3-ol] (**91a**) en prosianidien B_3 [(4α,8)-*bis*-katesjien] (**92a**) na derivatisering as e metieleterasetaat[109] (**92b**) uit onverwerkte rooibos geïsoleer. Hierbenewens is die angulêre

trimeriese fisetinidien *bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**) op tweërlei wyse as die vry fenol (**93a**) en na derivatisering as die metieleterasetaat (**93b**) uit verwerkte rooibos geïsoleer.

Die ^1H KMR-spektra van katesjien (**91a**) (Plaat 39, Tabel 11) en die ooreenstemmende metieleter (**91b**) (Plaat 40, Tabel 11) is met dié van outentieke monsters vergelyk, terwyl die absolute konfigurasie volgens die Mosher-protokol (Plaat 41, Tabel 11) bevestig is.[110]

Die identiteit van die metieleterasetaat van prosianidien B_3 (**92b**) is bevestig deur vergelyking van die ^1H KMR-data (Plaat 42, Tabel 2) met dié van 'n outentieke monster.[109] Sirkulêre dichroïsme (hoë amplitude negatiewe Cotton effek by 225 nm) het die 4S konfigurasie bevestig.[109]

Die ^1H KMR- (Plaat 17, Tabel 2) en SD-spektra (SD-1) van die geïsoleerde fisetinidien *bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**) is vingerafdrukke van dié van 'n outentieke monster[*] en bevestig dus die identiteit daarvan. Metilering en asetilering volgens die standaardmetodes het die ooreenstemmende metieleterasetaat[111] (**93b**) (Plaat 5) gelewer.

Bogenoemde resultate bevestig dat gekondenseerde tanniene in rooibos teenwoordig is. Gekondenseerde tanniene en hul katesjienvoorlopers verteenwoordig een van die grootste fenoliese subgroepe[112] en word in reaksie op biotiese en abiotiese stres soos koue, droogte en hoë intensiteit sonlig, gesintetiseer om sodoende as verdedigingsmeganisme op te tree. Tanniene mag antifungale[112,113] en antipredatoriese [112,114] (biotiese verdediging) eienskappe besit, terwyl dit die plant ook teen abiotiese faktore kan beskerm weens die waterbindingsvermoë en anti-oksiderende eienskappe daarvan.[112] Gekondenseerde tanniene se grootste ekonomiese belang lê egter in menslike en dierevoeding, aangesien hierdie tanniene met groenteproteïene kompleksoor en die verteerbaarheid daarvan beperk.[115] Alhoewel kanker van die esofagus (slukderm) met 'n hoë tannien-inname geassosieer word, word aanvaar dat matige inname van gewone tee (veral met melk) relatief veilig is.[116] Dit kan dus aanvaar word dat rooibostee, wat volgens vorige aansprake aansienlik minder tanniene as gewone tee bevat[2], weinig gesondheidsgevaar inhou.

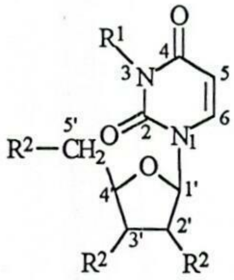
---

[*] J.F.W .Burger, Departement Chemie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat.

Katesjien en die derivate daarvan besit verskeie potensieel bruikbare bio-aktiwiteite[117], nl. antihepatotoksiese, anticholesterolemiese, antineoplastiese, anti-anafilaktiese, antikoagulerende[62] en homeostatiese[62] eienskappe. Hierbenewens is die antibakteriese aktiwiteit van katesjien en die ooreenstemmende 3-*O*-asielderivate teen *Streptococcus mutans*, wat vir tandbederf verantwoordelik is, reeds in mondspoel- en tandepastaformules benut.[117] Katesjien-derivate word hierby gebruik om soet smaak te bevorder en vind ook toepassing as kosmetiese basisse.[117]

5.8 Uridien (94a)

Uridien (1-ß-D-ribofuranosiel-2,4-pirimidioon) (**94a**), in hierdie ondersoek as die eerste nukleosied uit rooibos geïdentifiseer, is as beide die asetaat (**94b**) en die metieleterasetaat (**94c**) gesuiwer en geïdentifiseer.

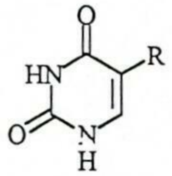


94a R^1 = H, R^2 = OH
b R^1 = H, R^2 = OAc
c R^1 = Me, R^2 = OAc

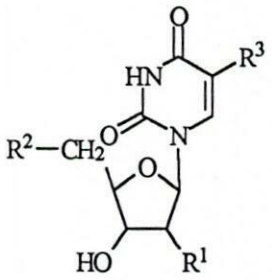
Die ^1H KMR-spekrum van uridien-3',4',5'-tri-asetaat (**94b**) in asetoon-d_6 (Plaat 30, Tabel 5) het twee een-proton viniliese doeblette met (Z)-koppeling (δ 7.69 en 5.70, J = 8.5 Hz), drie asetoksigroepseine [δ 2.08 (x2), 2.05] en 'n suikersisteem met vyf protonresonansies vertoon. Aangesien van die suikerprotonseine oorvleuel het, is die verbinding ook in C_6D_6 met ^1H KMR-spektroskopie ondersoek (Plaat 31, Tabel 5) en kon individuele suikerseine op grond van koppelingskonstantes toegeken word. Finale bevestiging vir die struktuur is gevind deur die ^1H KMR-spektra met dié van outentieke uridien-3',4',5'-triasetaat (**94b**) te vergelyk.

Soortgelyk is in die geval van *N*-metieluridien-3',4',5'-triasetaat (**94c**) met ^{1}H KMR-analise (Plaat 19, Tabel 5) getuienis van twee gekoppelde viniliese protone (δ 7.34 en 5.81, J = 8.2 Hz), drie asetoksigroepe [δ 2.12, 2.10 (x2)] en 'n X-Me-groep (X = elektronegatiewe atoom) (δ 3.31, 3H, s) gevind. 'n COSY-eksperiment (Plaat 20) het die toekenning van individuele suikerseine moontlik gemaak.

Verskeie nukleosiede vind reeds toepassing in die chemoterapie van kanker.[118] Die waarneming dat die pirimidien urasiel (**95a**) tot 'n groter mate in die nukleïensuurbiosintese van 'n chemies-geïnduseerde rot lewertumor as in 'n normale rot lewer gebruik word, het tot die ondersoek van urasielanaloë in kankerstudies gelei. 5-Fluoro-urasiel (**95b**), die ooreenstemmende ribosied (**96a**) en deoksiribosied (**96b**) is gesintetiseer en het betekenisvolle aktiwiteit teenoor 'n reeks tumors vertoon.



95a R = H
b R = F

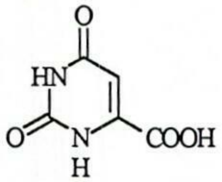


96a $R^1 = R^2 = OH, R^3 = F$
b $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = F$
c $R^1 = H, R^2 = -OPO(OH)_2, R^3 = F$
d $R^1 = OH, R^2 = -OPO(OH)_2, R^3 = H$

5-Fluoro-urasiel (**95b**) en 5-fluorodeoksi-uridien (**96b**) word *in vivo* na die nukleotied 5-fluorodeoksi-uridien-5'-fosfaat (5-FUDRP) (**96c**) omgeskakel. 5-FUDRP (**96c**) kompeteer met uridienmonofosfaat (**96d**) by die aktiewe sentrum van die ensiem "thymidylate" sintetase en aangesien die 5-posisie nie in die geval van 5-FUDRP (**96c**) gemetileer kan word nie, word DNA-sintese geïnhibeer met 'n gevolglike antikanker effek.

Uridien (**94a**) is reeds suksesvol in die behandeling van oorerflike orotiensuurasidurie aangewend.[119-121] Hierdie siekte is die resultaat van 'n ingebore fout in die pirimidienmetabolisme en lei tot kristaluria en oormatige ekskresie van orotiensuur (**97**) in die urine, groot-rooikiemsel

bloedarmoede met hipochromiese mikrositiese eritrosiete asook fisiese groeivertraging en verstandelike vertraging.[122]



97

5.9 Struktuur, anti-oksiderende eienskappe en fisiologiese aktiwiteit

Poli-onversadigde vette word maklik *via* vryradikaalkettingreaksies geoksideer (SKEMA 9).[123]

Lipiedperoksidasie kan deur radikale ($O_2^{-}\cdot$ en $\cdot OH$) sowel as singulet suurstof ($^1O_2$) in biologiese sisteme geïnisieer word en kan dus op inisiëringsvlak deur singulet-suurstof-blussers of vryradikaalblussers voorkom word.

1. Inisiëring	RH			--->	R·
2. Propagering	R·	+	O_2	--->	ROO·
	ROO·	+	RH	--->	ROOH + R·
3. Terminering	ROO·	+	ROO·	--->	Inerte produk
	ROO·	+	R·	--->	Inerte produk
	R·	+	R·	--->	Inerte produk

SKEMA 9

Die propageringskettingreaksie kan daarenteen deur peroksiradikaalblussers soos fenole (AOH) getermineer word (reaksie 11).

ROO· + AOH ---> ROOH + AO· ... 11

Sintetiese anti-oksidante soos gebutileerde hidroksi-anisool (BHA) (**2**) en gebutileerde hidroksitolueen (BHT) (**3**) word sedert die begin van die eeu as anti-oksidante in voedsel gebruik. Weens die nadelige invloed van lg. op gesondheid is beperkings op die gebruik daarvan geplaas en is

daar 'n toenemende behoefte aan natuurlike, veilige, ekonomiese anti-oksidante om die sintetiese chemikalieë te vervang.[124,125]

Benewens die gebruik van anti-oksidante as voedselbymiddels, word die gebruik daarvan as terapeutiese middels vir geriatriese siektes ook oorweeg.[126] Getuienis dui daarop dat verskeie siektes in die lewende organisme aan lipiedperoksidasie toegeskryf kan word.[126] Die oksidasie van lae-digtheid lipoproteïen (LDL), die hoof cholesterolbevattende proteïen in menslike bloedplasma, word as die inisieerder van arteriosklerose beskou.[127] Flavonoïede soos kwersitien (**37a**) inhibeer die oksidasie en sitotoksisiteit van lae-digtheid lipoproteïene (LDL) *in vitro* en daar word gespekuleer dat soortgelyke *in vivo* aktiwiteit verantwoordelik is vir die voorkoming van arteriosklerose en gevolglik die risiko van miokardiale infarksie.[66,70]

Hierbenewens is gevind dat verhoogde vlakke van reaktiewe suurstofintermediêre met tumorontwikkeling geassosieer word. Daar is gevind dat groen tee, wat bekend is daarvoor dat dit karsinogenese inhibeer, die vorming van bg. aktiewe suurstofintermediêre effektief onderdruk. Dit dui daarop dat groen tee karsinogenese moontlik *via* die anti-oksiderende aktiwiteit daarvan, onderdruk.[71] So ook is gevind dat die flavonole kwersitien (**37a**) en rutien (**42a**), beide met bewese anti-oksiderende eienskappe, kolonneoplasia in muise inhibeer.[70,71]

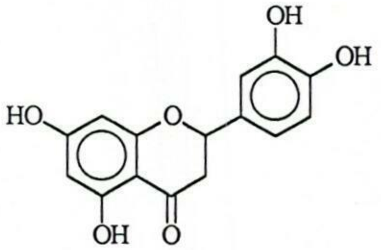
'n Duidelike verband tussen lipiedperoksidasie en die inflammatoriese proses is deur Yuda *et al.*[128] gedemonstreer, terwyl lewersiektes ook met die noodlottige beskadiging van hepatosiete deur vryradikale geassosieer word.[129,130] Net so word diabetes met lipiedperoksidasie geassosieer en is bewys dat anti-oksidante soos glutatioon (GSH), superoksieddismutase (SOD), katalase en ander verbindings soos dimetielureum [$(CH_3)_2NCONH_2$] wat hidroksielradikale blus, alloksaan geïnduseerde diabetes inhibeer.[131]

Die anti-oksiderende aktiwiteit van flavonoïede word toegeskryf aan die vermoë daarvan om 'n waterstofatoom aan die lipiedperoksiradikaal te doneer. Hierbenewens is flavonoïede potente $O_2^{-\cdot}$ en $^1O_2$-blussers.[21]

Flavonole kan hierbenewens metaalione by die 3-hidroksi-4-ketogroep en/of die 5-hidroksi-4-ketogroep (waar die A-ring op posisie 5 gehidroksileer is) cheleer. Soortgelyk kan 'n *o*-kinolgroep op die B-ring metaalcheleringsaktiwiteit besit.[22]

Die anti-oksiderende aktiwiteit van flavonoïede word hoofsaaklik bepaal deur die graad en posisie van hidroksilering. Hidroksilering van die B-ring is die vernaamste oorweging, waarna eienskappe soos die teenwoordigheid van 'n karbonielgroep op posisie 4 en 'n vry hidroksielgroep op posisies 3 en/of 5 in ag geneem moet word. Kwersitien (**37a**) (I = 7.1)[•] is bv. 'n beter anti-oksidant as die 3-deoksi-analoog, luteolien (**38a**) (I = 4.3), terwyl katesjien (**91a**) (I = 1.6), waar die 4-karbonielgroep afwesig is, aansienlik minder aktief as beide bogenoemde is.[65] 3',4'-Dihidroksilering van die B-ring dra betekenisvol by tot anti-oksiderende aktiwiteit van flavonoïede. 'n Addisionele hidroksigroep in die 5'-posisie lei tot verhoogde aktiwiteit. Die 5,7-dihidroksilering van die A-ring het feitlik geen invloed op die aktiwiteit nie, maar 3-glikosilering van flavonoïede lei tot 'n verlaging in aktiwiteit relatief tot die aglikone.[22] Isokwersitrien (**41a**) en die ooreenstemmende aglikoon kwersitien (**37a**) het byvoorbeeld aktiwiteite van 0.59 en 2.98, respektiewelik, relatief tot dié van BHA (**2**) (1).[73]

Flavanone vertoon aktiwiteit in dieselfde orde as dié van die flavone. Eriodiktiol (**98**) (I = 6.7) vertoon effens beter aktiwiteit as die ooreenstemmende flavoon, luteolien (**38a**) (I = 4.3).[65]



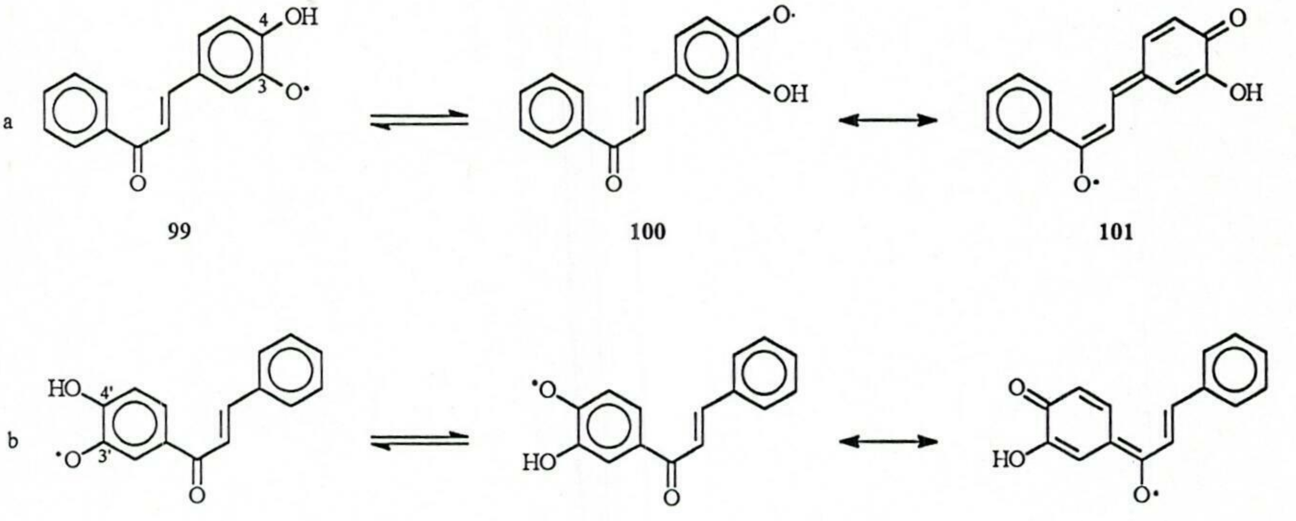
98

Chalkone, die natuurlike voorlopers van flavone en flavanone, besit betekenisvolle anti-oksiderende aktiwiteit.[22] Die 3,4-dihidroksichalkone is veral effektief en chalkone vertoon beter aktiwiteit as die ooreenstemmende flavanone.[22] 3',4'-Dihidroksichalkone is aansienlik minder effektief as 3,4-

---

• I = Induksieperiode in uur wat dit varkvet by 100 °C neem om in die teenwoordigheid van die anti-oksidant te oksideer.

dihidroksichalkone weens verlaagde resonansstabilisasie van die vryradikaal in vergelyking met dié van 3,4-dihidroksichalkone (SKEMA 10).[132]

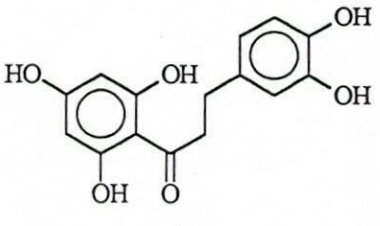


99 **100** **101**

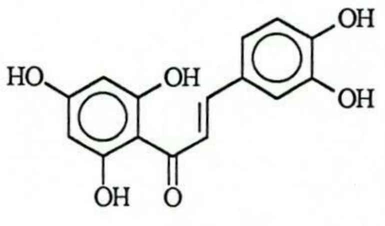
102 **103** **104**

SKEMA 10

Hidrogenering van die chalkoondubbelbinding lei tot verhoogde anti-oksiderende aktiwiteit; pentahidroksidihidrochalkoon (**105a**) is byvoorbeeld *ca.* 2-3 maal meer aktief as die ooreenstemmende onversadigde chalkoon (**106**).[21]



105a

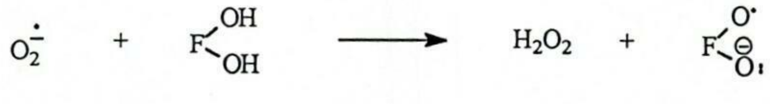


106

Tournaire *et al.*[133] het die oksidasie van flavonoïede in die teenwoordigheid van $O_2^{-\cdot}$ ondersoek en gevind dat die C-ring van flavonole in aprotiese media danksy die teenwoordigheid van die enol oopmaak om sure en aldehiede lewer (SKEMA 11).

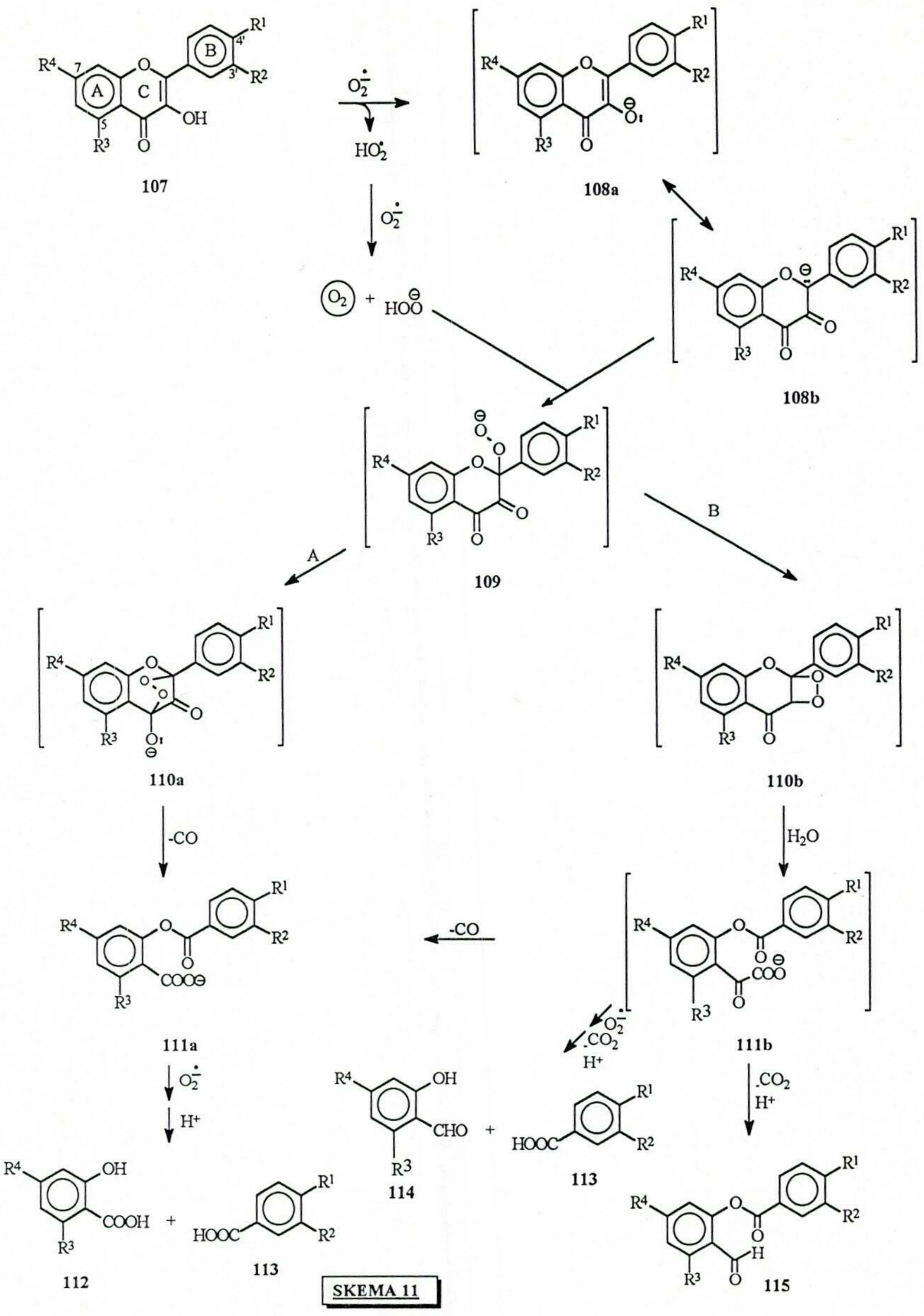
BLOEMFONTEIN
BIBLIOTEEK - LIBRARY
1996 020781 02

Ander flavonoïede soos flavone, flavane en flavanone induseer slegs die disproporsionering van die superoksiedanioon en ondergaan nie verdere oksidasie nie (reaksie 12).[134] Laasgenoemde flavonoïede is dus van spesifieke belang as anti-oksidante.



...12

$F(OH)_2$ = Flavonoied


107
108a
108b
109
A
B
110a
110b
-CO
H2O
111a
111b
112
113
114
115
SKEMA 11

HOOFSTUK 6

DIE ISOLASIE EN SINTESE VAN 'N UNIEKE FENIELPIRODRUIWESUURGLUKOSIED. 'n VERGELYKENDE ANALISE VAN STEREO- EN REGIO-ISOMERE

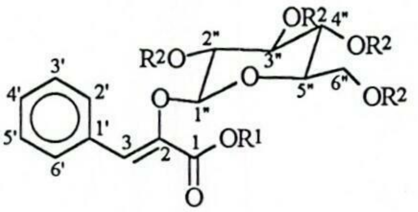
6.1 Inleiding

Die eerste glikosied van fenielpirodruiwesuur, 'n belangrike voorloper in die biogenese van α-hidroksichalkone, is in hierdie ondersoek geïsoleer. Aangesien KMR-eksperimente nie voldoende inligting kon verskaf om die verbinding te identifiseer nie, is struktuurbewys *via* sintese verkry.

6.2 Die isolasie van (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (116a)

'n Opwindende nuwe verbinding, (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (**116a**), is uit rooibos geïsoleer en na derivatisering as die metieleterasetaat (**116b**) geïdentifiseer.

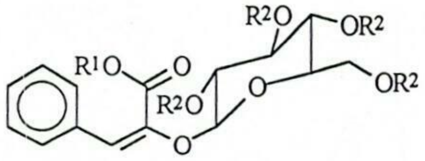
Die ^{1}H KMR-spektrum van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) (Plaat 11, Tabel 4) het op die teenwoordigheid van 'n ongesubstitueerde fenielgroep (δ 7.86, 2H, m; δ 7.36, 3H, m), 'n viniliese proton (δ 7.03, s), 'n metoksigroep (δ 3.83) en vier asetoksigroepe (δ 2.01, 1.98, 1.96 en 1.90) gedui.



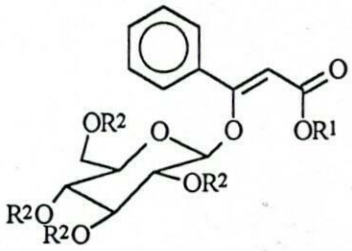
116a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$

Individuele suikerprotonresonanse is op grond van spin-spinontkoppelingseksperimente toegeken en die groot koppelingskonstantes tussen H-1" en H-2" (J = 8.0 Hz), H-2" en H-3" (J = 9.5 Hz), H-3" en H-4" (J = 9.5 Hz) asook H-4" en H-5" (J = 10.0 Hz) het bevestig dat die protone van elke paar *trans*-diaksiaal[78] t.o.v. mekaar georiënteer is en dat die suiker dus gederivatiseerde glukose in die piranose-vorm is. 'n N.O.e-assosiasie van H-5" (δ 3.96) met H-1" (δ 5.56, 8 %) en H-3" (δ 5.37; 26 %) het die 1,3-diaksiale interaksie tussen hierdie protone bevestig. Die absolute D-konfigurasie van glukose volg uit die natuurlike voorkoms van die suiker, terwyl die anomeriese ß-konfigurasie uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^3J_{HH}$ = 8.0 Hz) gevolg het.[55,56,78-97] Die relatief klein koppelingskonstante bevestig dat die suiker C-O aan die aglikoon gekoppel is.[55,56,78-97]

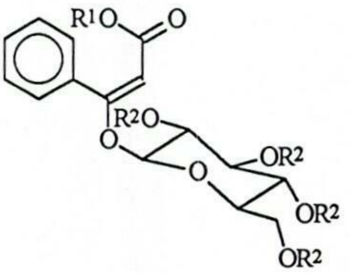
'n N.O.e-eksperiment het op 'n assosiasie van die metoksigroep (δ 3.83) met die viniliese waterstof (H-3) (δ 7.03, 1 %), H-1" (δ 5.56, 0.6 %) en twee suikerasetoksigroepe (δ 2.01, 0.3 %, δ 1.90, 0.2 %) gedui, terwyl H-3 (δ 7.03) met H-2' en H-6' (δ 7.86, 5 %) geassosieer het. Indien aanvaar sou word dat C-1" van die suiker deur 'n eter- of esterbinding aan die aglikoon gebind is, kan buiten (**116b**) nog sewe strukture (**117b**, **118b**, **119b**, **120b**, **121b**, **122b** en **123b**) voorgestel word wat bg. KMR-vereistes sou kon bevredig.



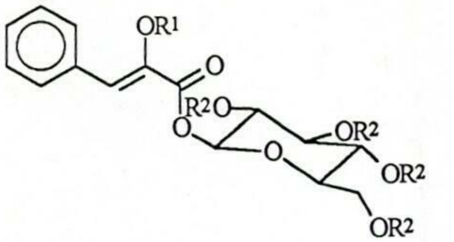
117a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



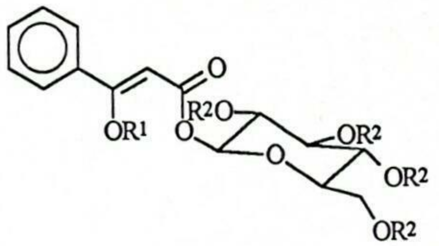
118a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



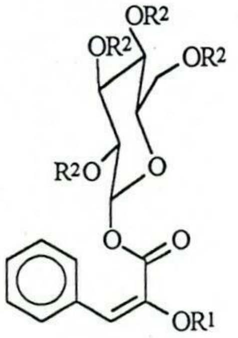
119a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



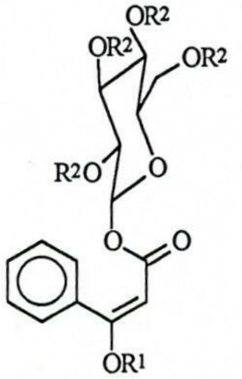
120a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



121a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



122a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$



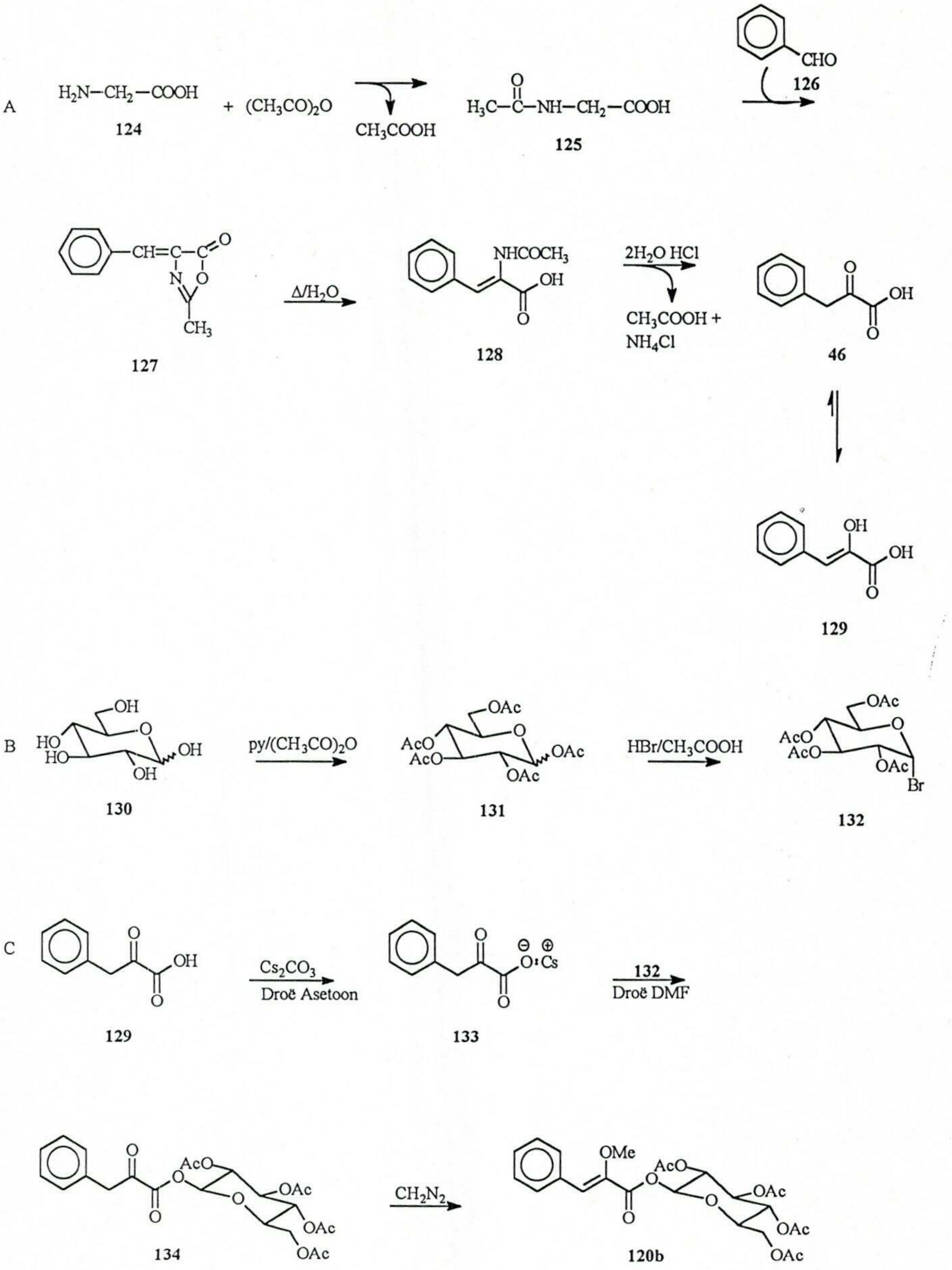
123a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Me, R^2 = Ac$

6.3 Die sintese van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (120b)

Weens die algemene voorkoms van suikeresters in die natuur, is aanvanklik besluit om (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**120b**) te sintetiseer vanaf fenielpirodruiwesuur (**129**) en 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (SKEMA 12).

Fenielpirodruiwesuur (**129**) is volgens bekende metodes vanaf asetielglisien (**125**) en bensaldehied (**126**) gesintetiseer,[135,136] terwyl 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) *via* die brominering van per-*O*-asetielglukose (**131**) verkry is*.

* Danksy die sterk anomeriese effek domineer die α-anomeer.[137,138]

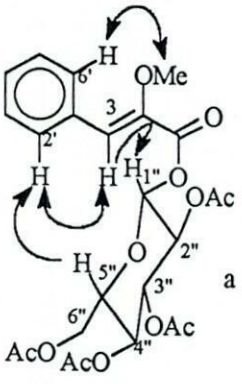

A
H2N–CH2–COOH
124
+ (CH3CO)2O
CH3COOH
H3C–C(O)–NH–CH2–COOH
125
CHO
126
CH=C–C=O
N O
CH3
127
Δ/H2O
NHCOCH3
OH
128
2H2O HCl
CH3COOH +
NH4Cl
OH
46
OH
OH
129
B
OH
HO
HO
OH
OH
130
py/(CH3CO)2O
OAc
AcO
AcO
OAc
OAc
131
HBr/CH3COOH
OAc
AcO
AcO
OAc
Br
132
C
OH
129
Cs2CO3
Droë Asetoon
O:Cs
133
132
Droë DMF
AcO
OAc
OAc
OAc
134
CH2N2
OMe
AcO
OAc
OAc
OAc
120b

SKEMA 12

Die verestering van fenielpirodruiwesuur (**129**) en 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) is stereoselektief en onder milde reaksiekondisies danksy die cesium-effek bewerkstellig.[139,140] Weens die groot ioonradius van die cesiumkatioon is die ooreenstemmende sout van die karboksielsuur in 'n polêre oplosmiddel soos DMF meer gedissosieer as in die geval van kleiner katione. Aangesien die karboksilaat, en nie die ioonpaar nie, as nukleofiel optree om die halogeen te verplaas, is 'n groot mate van dissosiasie dus wenslik en veroorsaak dit dat 'n hoë konsentrasie reagerende spesie teenwoordig is met gepaardgaande verhoging in reaksietempo.[140] Getuienis dui daarop dat nukleofiele reaksies van cesiumkarboksilate 'n S_N2-reaksiemeganisme volg met gevolglike inversie van anomeriese konfigurasie onafhanklik van die beskermende groep patroon van die koolhidraat. Hierbenewens word die ongewenste eliminasie van HBr om die glukaalderivaat te vorm effektief onderdruk danksy kort reaksietye by matige temperature.[139] Diasometaanmetilering het die enolmetieleter (**120b**) en dus die teikenmolekuul gelewer.

Vergelyking van die ^{1}H KMR-spektrum van verbinding (**120b**) (Plaat 49, Tabel 4) met dié van die natuurprodukderivaat (**116b**) (Plaat 11, Tabel 4) het opvallende verskille in die chemiese verskuiwings van veral die suikerprotone beklemtoon, terwyl die chemiese verskuiwing van H-3 (δ 7.03) identies vir die twee verbindings was. In 'n n.O.e-eksperiment het H-3 (δ 7.03) met H-2' en H-6' (δ 7.80, 7 %), H-1" (δ 6.03, 0.9 %) en H-2" (δ 5.20, 0.8 %) geassosieer en die metoksigroep (δ 3.77) met H-2' en H-6' (δ 7.80, 2 %), H-1" (δ 6.03, 0.4 %), H-2" (δ 5.20, 0.8 %) en H-6" (δ 4.11, 0.005 %). H-6" (δ 4.11) het met H-1" (δ 6.03, 0.2 %), H-2" (δ 5.20, 0.3 %), H-3" (δ 5.46, 0.2 %), H-4" (δ 5.16, 0.5 %), H-2' en H-6' (δ 7.80, 0.2 %) sowel as H-3', H-4' en H-5' (δ 7.41, 0.2 %) geassosieer, terwyl H-2' en H-6' (δ 7.80) met H-3 (δ 7.03, 24 %) en die metoksigroep (δ 3.77, 3 %) geassosieer het.

Uit bogenoemde resultate volg dat die volgende konformasies, waarvan (**a**) die voorkeurkonformasie is, aangeneem word (fig. 7a en b).



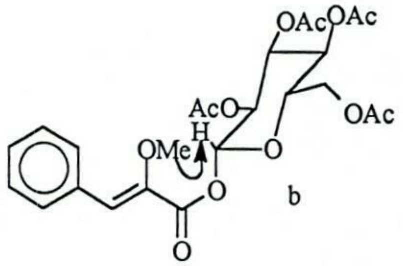
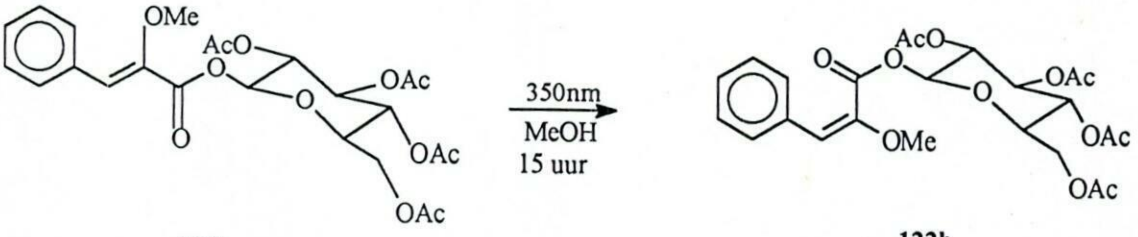


Fig. 7. Konformasies van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(120b)**

Indien die n.O.e-assosiasies van die "onbekende" verbinding **(116b)** en dié van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(120b)** vergelyk word, word bevind dat daar in beide gevalle 'n n.O.e-assosiasie van die metoksigroep met die protone van die suikersubstituent asook 'n n.O.e-assosiasie van die viniliese waterstof (H-3) met H-2' en H-6' is. 'n Belangrike verskil is egter dat die metoksigroep in die geval van die natuurprodukderivaat **(116b)** met die viniliese waterstof (H-3) geassosieer het, terwyl die ooreenstemmende assosiasie in die geval van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(120b)** afwesig was. Hierdie waarneming het die vraag laat ontstaan of die natuurprodukderivaaat nie moontlik (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(122b)** is nie.

6.4 Die sintese van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (122b)

(E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(122b)** is fotochemies[141] vanaf die ooreenstemmende (Z)-verbinding **(120b)** berei (SKEMA 13).



120b **122b**

SKEMA 13

e viniliese proton (H-3, δ 6.25) in derivaat (**122b**) is volgens die ^{1}H KMR-spektrum (Plaat 50, Tabel aansienlik meer geskerm (Δ 0.78 d.p.m.) as in die geval van die twee isomere (**120b** en **116b**). vallend egter was die feitlik identiese chemiese verskuiwing van H-1" (δ 6.00) en die reenstemmende proton in die (Z)-analoog (**122b**) (δ 6.03), maar dat dit betekenisvol van dié van die uurprodukderivaat (**116b**) (δ 5.56) verskil het.

n n.O.e-eksperiment het die metoksigroep (δ 3.75) wel met H-3 (δ 6.25, 15.06 %) geassosieer en het 3 (δ 6.25) met die metoksigroep (δ 3.75, 3 %) en die aromatiese protone (δ 7.27, 3 %) geassosieer. e aromatiese protone (δ 7.27) het in die omgekeerde bestraling ook met H-3 (δ 6.25, 5 %) assosieer, terwyl H-1" (δ 6.00) met die aromatiese protone (δ 7.27, 1 %) geassosieer het. Op grond n bogenoemde assosiasies kon 'n voorkeurkonformasie soos in (fig. 8) voorgestel word.

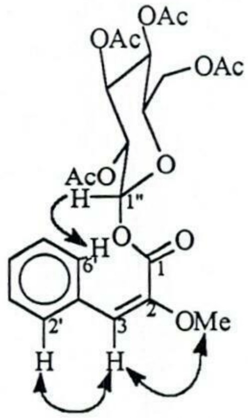


Fig. 8. Voorkeurkonformasie van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**122b**)

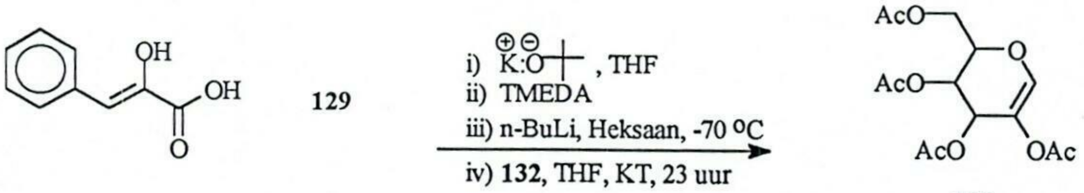
5 Die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-iëlpropenoaat (116b)

t bogenoemde eksperimente is afgelei dat n.O.e-assosiasies as sodanig nie 'n betroubare basis vir derskeid tussen die moontlike regio-isomere (**116b**, **117b**, **118b**, **119b**, **120b**, **121b**, **122b** en **123b**) d nie en is op grond van die skerming van H-1" in die natuurprodukderivaat (δ 5.56) relatief tot dié n (Z)- (**120b**) en (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat

(**122b**) (δ 6.03 en 6.00, respektiewelik) afgelei dat die suiker moontlik deur 'n eterbinding eerder as 'n esterbinding aan die aglikoon gekoppel is.

Hierop gebaseer en in die lig van die identiese chemiese verskuiwings van die viniliese protone (δ 7.03) van die natuurprodukderivaat (**116b**) en (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metielpropenoaat (**120b**), is op (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) as volgende teikenmolekuul besluit. Hierdie sintese het die ontwikkeling van nuwe metodologie vereis aangesien enolsuikers seldsaam is en die enkele sintetiese roetes van sodanige teikenmolekule hoofsaaklik die α-anomere lewer.[142,143] Hierbenewens moes kompromieë tussen kondisies vir *O*-alkilering (*versus* *C*-alkilering), substitusie (*versus* eliminasie) en die bevoordeling van die vorming van die ß-anomeer (*versus* die α-anomeer), wat swak versoenbaar is, getref word.[144-157]

'n Tipiese metode vir die aktivering van die enolsuurstof gevolg deur elektrofiele substitusie[157] (reaksie 13) het tot die eliminasie van HBr uit die suiker en die vorming van die glukaal (**135**) as enigste identifiseerbare produk gelei.

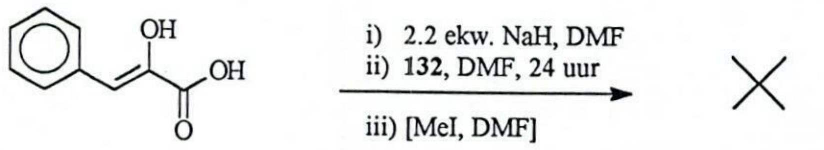


129 **135** ...13

Die ^{1}H KMR-spektrum van die glukaal (**135**) (Plaat 51, Tabel 13) het op die teenwoordigheid van 'n viniliese proton (δ 6.60, s), vier asetoksigroepe [δ 2.06 (x3), 2.02] en vyf addisionele alifatiese protone gedui. Individuele suikerresonanse is op grond van koppelingskonstantes toegeken terwyl massaspektrometrie (CI) die teenwoordigheid van die verlangde moederioon (MH^{+} *m/z* 331) bevestig het (MS Skema 8).

Eliminasie van HBr kan verklaar word in terme van die elektrononttrekkende 2-asetoksigroep (verhoog die suurheid van H-2) van (**132**), die teenwoordigheid van sterk basisse en die relatief hoë temperatuur wat benodig is om omskakeling van die fenielpirodruiwesuursout te verkry.

In 'n tweede poging is fenielpirodruiwesuur (**129**) met 2.1 ekwivalente NaH by 0 °C in droë DMF behandel, waarna dit by 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (1 ekw) in DMF by kamertemperatuur gevoeg is (reaksie 14). Totale ontbinding het egter plaasgevind en die beplande byvoeging van MeI (1 ekw) is nie uitgevoer nie.



...14

129

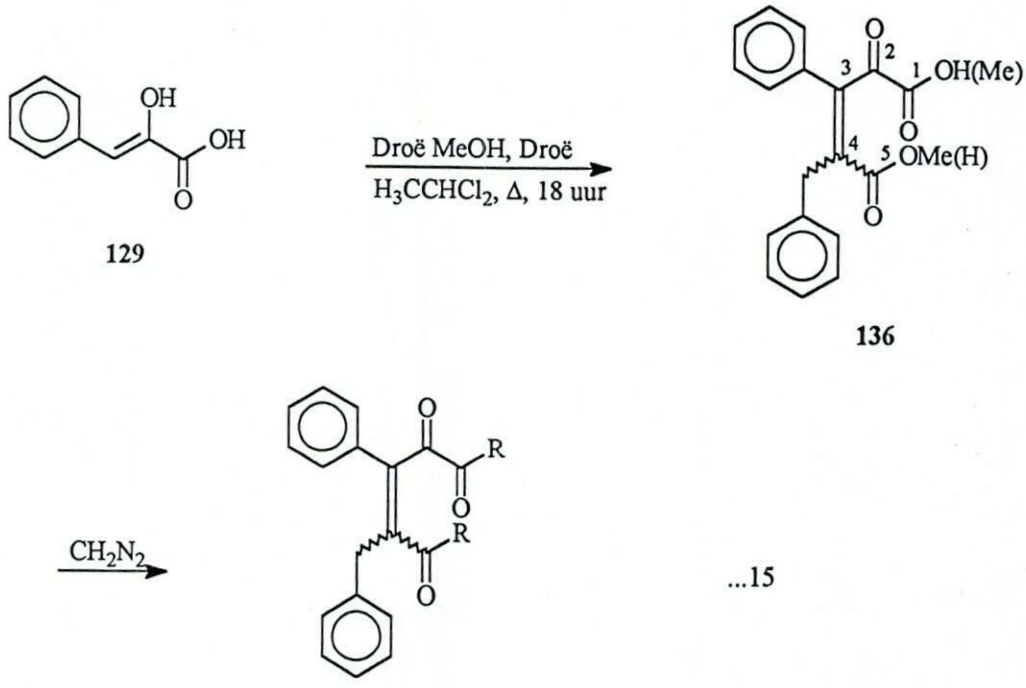
Die rasionaal agter bogenoemde pogings was dat die karboksilaat 'n swakker gekonjugeerde basis as die enolaat sou wees [pKa vir $CH_3COCOOH$ is 2.5 en 9 vir $H_2C(COCH_3)_2$] en dat die enolaat by voorkeur met die elektrofiel sou reageer.[158]

Derdens is besluit om metielfenielpiruvaat (**138**) as uitgangstof te benut.

'n Aanvanklike poging om metielfenielpiruvaat (**138**) te sintetiseer, het tot die vorming van 'n aldol-tipe produk (**136**) (Plaat 52, Tabel 14) (reaksie 15) gelei. Diasometaanmetilering van lg. het die dimetielester (**137b**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-pentendioësuur (**137a**) (Plaat 53, Tabel 14) gelewer. Die ^{1}H KMR-spektrum van lg. het op die teenwoordigheid van tien aromatiese protone, twee gekoppelde bensiliese metileenprotone (δ 3.59 en 3.47, beide d, 14.5 Hz) en twee metoksigroepe (δ 3.81, 3.73) gedui. Massaspektrometrie (CI) (MS Skema 9) het die bestaan van die ooreenstemmende moederioon (MH^+ *m/z* 339) bevestig.

Dieselfde reaksiekondisies met byvoeging van 'n druppel gekonsentreerde swawelsuur na 15 uur en verdere verhitting van die reaksiemengsel vir 6 uur (reaksie 16) het wel die verlangde metielfenielpiruvaat (**138**) as hoofproduk gelewer, maar ontbinding het plaasgevind voordat suiwering bewerkstellig kon word. Die ^{1}H KMR-spektrum (Plaat 54, Tabel 14) van metielfenielpiruvaat (**138**) het die teenwoordigheid van vyf aromatiese protone, 'n viniliese proton (δ 6.53, s) en 'n metoksigroep (δ 3.91) bevestig.

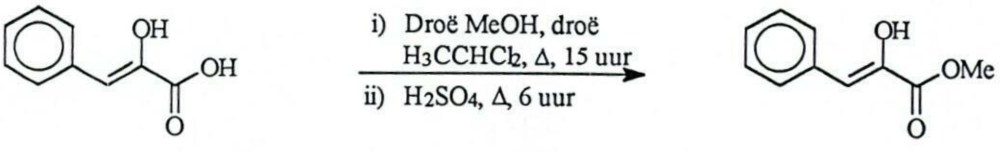
Byvoeging van H_2SO_4 by die aanvang van die reaksie het tot die vorming van die monometielester (**136**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-pentendioësuur (**137a**) gelei, terwyl langer reaksietye by laer temperature (5 °C - 24 uur, kamertemperatuur - 9 dae) tot totale ontbinding gelei het. Alternatiewe opwerkprosedures van reaksie 16 het wel die verlangde hoofproduk gelewer, maar ontbinding het telkens plaasgevind voordat suiwering bewerkstellig kon word.



129 **136**

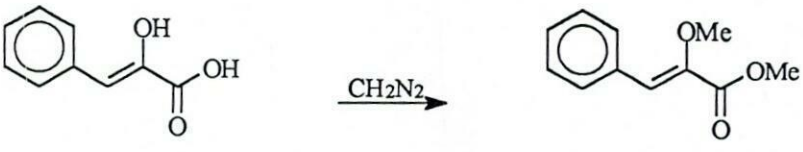
137a R = OH
b R = OMe

...15



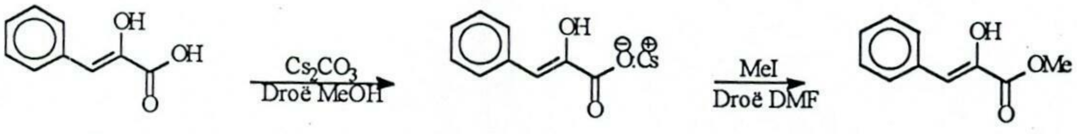
129 **138** ...16

Diasometaanmetilering van fenielpirodruiwesuur (**129**) het (E/Z)-metiel-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**139**) as enigste produk gelewer (reaksie 17). Die ^1H KMR-spektrum (Plaat 55, Tabel 14) van lg. het op die teenwoordigheid van vyf aromatiese protone, 'n viniliese proton (δ 6.94) en twee metoksigroepe (δ 3.80, 3.77) gedui.



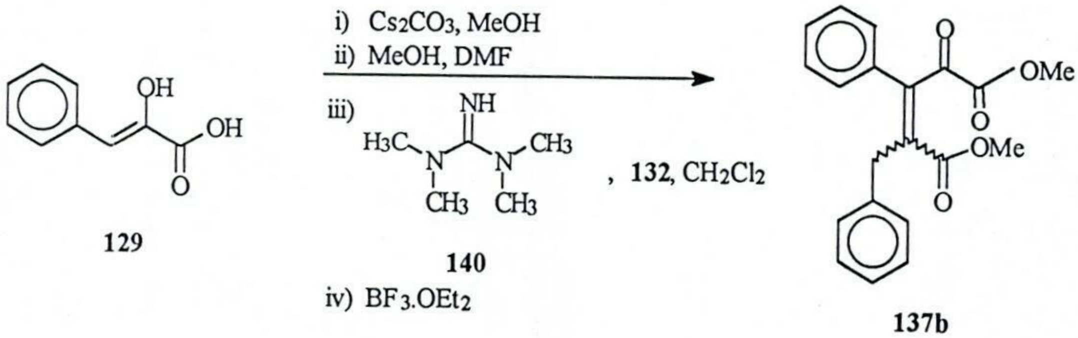
129 **139** ...17

As alternatief is fenielpirodruiwesuur (**129**) geaktiveer deur van die cesium-effek gebruik te maak en is met MeI in droë DMF gemetileer (reaksie 18).[153] DLC-analise het daarop gedui dat metielfenielpiruvaat (**138**) wel gevorm het, maar dat ontbindig weereens tydens die opwerkprosedure plaasgevind het.



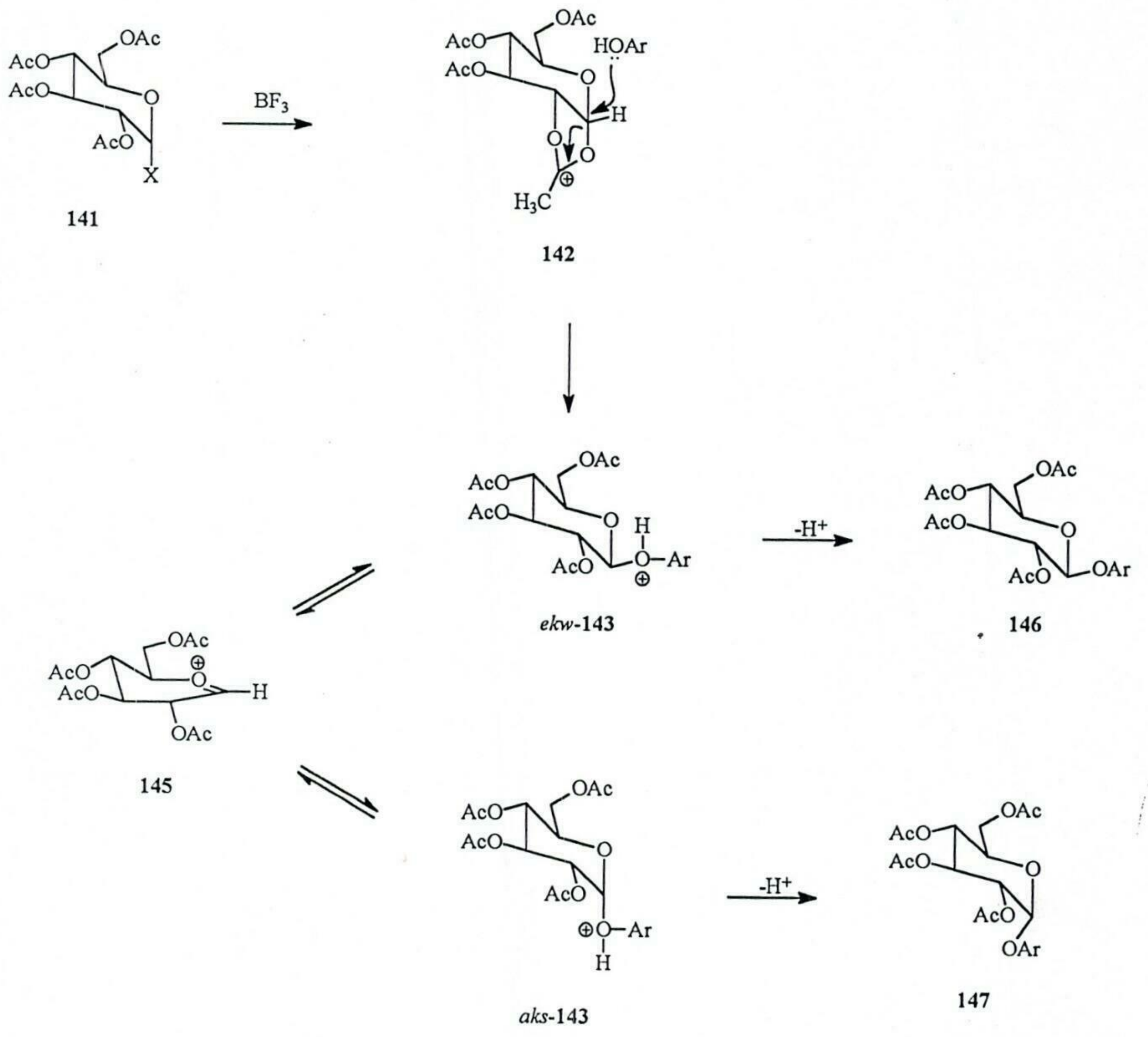
129 **133** **138** ...18

Alhoewel daar dus daarin geslaag is om die verlangde metielester (reaksies 16 en 18) te berei, was dit vanweë die onstabiliteit daarvan nie vir verdere sintese geskik nie en is op 'n *in situ* bereiding besluit. Metielfenielpiruvaat (**138**) is soos in reaksie 18 berei, waarna die reaksiemengsel by 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) en 1,1,3,3-tetrametielguanidien (**140**) in droë CH_2Cl_2 gevoeg is. Die Lewissuur $BF_3 \cdot OEt_2$ is vervolgens bygevoeg, maar in plaas van die verlangde (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) het die dimetielester (**137b**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-pentendioësuur (**137a**) (Plaat 53, Tabel 14) as enigste identifiseerbare produk gevorm (reaksie 19).



129 **137b** ...19

Bg. metodiek is deur Yamaguchi *et al.*[155] ontwikkel om selektief ß-glikosiede van fenole te lewer en die meganisme is voorgestel soos in SKEMA 14.

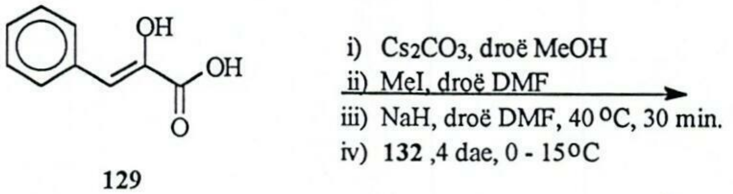


SKEMA 14

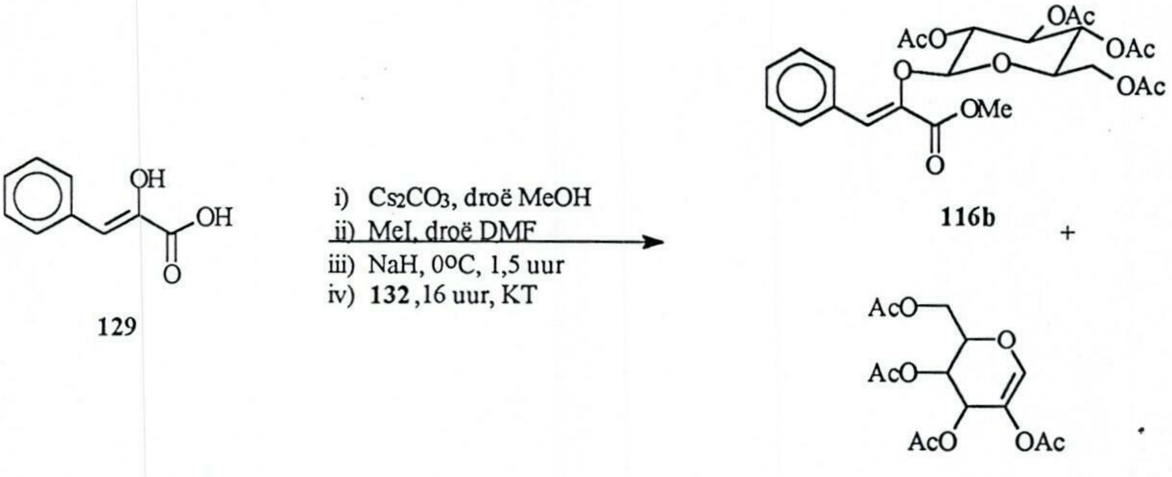
Dit word algemeen aanvaar dat nukleofiele aanval op die oksoniumintermediêr (**142**) kineties vanaf die ekwatoriale kant plaasvind. In die teenwoordigheid van 'n amienbasis word die proton vinnig van *ekw*-(**143**) verwyder om selektief ß-anomere (**146**) te lewer, terwyl interomskakeling tussen *ekw*-(**143**) en *aks*-(**143**) in die afwesigheid van sodanige basis sou plaasvind om die termodinamies meer stabiele α-anomeer (**147**) te lewer.[155]

As alternatief is metielfenielpiruvaat (**138**) weereens *in situ* berei, waarna dit in droë DMF by 'n suspensie van NaH in DMF gevoeg is. Nadat die reaksiemengsel vir 30 min. by 40 °C geroer is om

volledige enolaatvorming te verseker, is dit by 0 °C by 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) gevoeg en vir vier dae by 0 - 15 °C geroer (reaksie 20). Totale ontbinding het plaasgevind en daar is besluit om enolaatvorming by 0 °C uit te voer ten einde moontlike aldolkondensasie te beperk, terwyl glikosilering by kamertemperatuur en dus met verkorte reaksietyd uitgevoer is om die verlangde (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**), sowel as 'n glukaal (**135**) te lewer (reaksie 21).



129 ...20



129 **116b** **135** ...21

Glukaalvorming is weereens toe te skryf aan HBr-eliminasie. Temperatuurverlaging ten einde eliminasie te beperk (reaksie 20) het egter tot 'n reeks newe-reaksies, wat aan die onstabiliteit van metielfenielpiruvaat (**138**) en die enolaat daarvan by verlengde reaksietye toegeskryf kan word, aanleiding gegee.

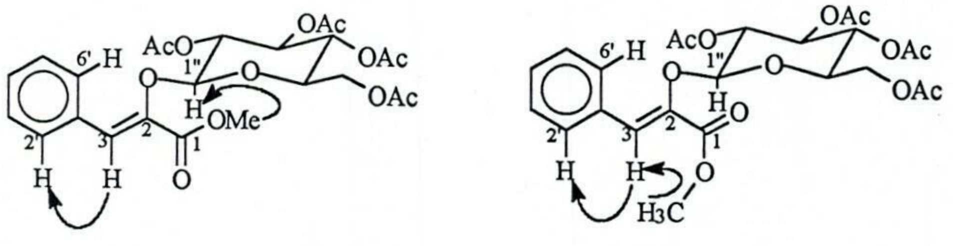
Die polêre aprotiese oplosmiddel DMF is gekies om *O*-alkilering van die enol bo *C*-alkilering te bevorder. In hierdie oplosmiddel is die meer elektronegatiewe suurstofatoom vryer om as nukleofiel op te tree weens verminderde interaksie met oplosmiddelmolekules en die katioon en is *O*/*C*-alkileringsverhoudings ook onafhanklik van die katioon. Hierbenewens behoort die polêre oplosmiddel substitusie bo eliminasie te bevoordeel.[144-147]

Glikosilering behoort danksy die buurgroepeffek van die 2-asetoksigroep in 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) *via* die asieloksoniumioon (**142**) te verloop[151,155,156] en dieselfde meganisme as in SKEMA 14 kan gepostuleer word. Alhoewel daar slegs uiters klein hoeveelhede vry basis (NaH) tydens glikosilering in die reaksiemengsel behoort te wees [basis bevorder ß-anomeervorming deur die verwydering van die proton in *ekw*-(**143**)], kan die voorkeurvorming van die ß-anomeer (**146**) verklaar word in terme van die vorming van 'n sterk anomeriese koolstof-suurstofbinding in die geval van *ekw*-(**143**) danksy moontlike oorheersing van die elektrondonerende eienskappe van die gekonjugeerde fenielring oor die elektrononttrekkende eienskappe van die estergroep. Sodoende kan die vorming van intermediêr (**145**), wat noodsaaklik vir α-anomeervorming is, geïnhibeer word. In analoë gevalle is inderdaad gevind dat die koolstof-suurstof binding in *ekw*-(**143**) swakker vir fenole met elektrononttrekkende groepe as vir dié met elektrondonerende groepe is, sodat eersgenoemde meer vatbaar vir isomerisasie na *aks*-(**143**) is.[155]

Die ^{1}H KMR-spektrum van die gesintetiseerde (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) was inderdaad 'n vingerafdruk van dié van die natuurprodukderivaat (**116b**) (Plaat 11, Tabel 4) en het dus as sodanig die struktuur van laasgenoemde (**116b**) onomwonde bevestig.

Danksy die beskikbaarheid van 'n voldoende hoeveelheid materiaal van (**116b**), het ^{13}C-, DEPT- en HETCOR-eksperimente (Plate 12 - 14) die toekenning van ^{13}C-^{1}H gekorreleerde seine moontlik gemaak. 'n COLOC-eksperiment (Plaat 15) by 300 MHz kon geen addisionele inligting verskaf nie, maar dieselfde eksperiment by 500 MHz (Plaat 16) het 'n korrelasie tussen die metoksigroep (δ 3.83) en 'n karbonielkoolstof (δ_C 164.51), wat bevestig het dat die metoksigroep deel van 'n esterfunksionaliteit is, sowel as tussen H-1" (δ 5.56) en 'n suurstofgebonde viniliese koolstof (C-2) (δ_C 141.39) getoon, wat aldus bevestig dat die anomeriese koolstof deur 'n enoliese eterbinding aan die aglikoon gekoppel is. Ten spyte van die kragtigheid van hierdie tegnieke kon nie ondubbelsinnig sonder fisiese vergelyking van die ^{1}H KMR-spektra tussen (Z)- en (E)-isomere onderskei word nie en was sintese dus noodsaaklik.

In hierdie stadium was dit ook moontlik om n.O.e-assosiasies (par. 6.2) te interpreteer en twee konformasies, waarvan (**b**) die voorkeurkonformasie is, kon vir (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) voorgestel word (fig. 9).



a **b**

Fig. 9. Konformasies van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra- *O*-asetiel-β-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**)

6.6 Die sintese van (E)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (117b)

Die titelverbinding is ter wille van die opbou van 'n ^{1}H KMR-databasis fotochemies vanaf (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) berei (SKEMA 15).

116b **117b**

SKEMA 15

Uit die lang reaksietyd om slegs gedeeltelike omskakeling na die (E)-isomeer te verkry, is dit duidelik dat 'n aansienlike aktiveringsenergie voorsien moes word en dat die (Z)-isomeer betekenisvol meer stabiel as die (E)-isomeer is. Lg. kan aan steriese interaksies soos in par. 6.7 bespreek, toegeskryf word.

Volgens die ^{1}H KMR-spektrum (Plaat 56, Tabel 4) was die viniliese proton van die (E)-isomeer **(117b)** (δ 6.76) weereens geskerm relatief tot die ooreenstemmende proton van die (Z)-isomeer **(116b)** (δ 7.03).

6.7 Algemene struktuurverwantskappe

Vergelyking van die ^{1}H KMR-spektra van **(116b)**, **(117b)**, **(120b)** en **(122b)** het aan die lig gebring dat die aromatiese protone in die geval van die (E)-isomere [**(117b)** en **(122b)**] as 'n enkele multiplet resoneer, terwyl 'n drie-proton en 'n twee-proton multiplet in die geval van die (Z)-isomere [**(116b)** en **(120b)**] waargeneem is. Hierbenewens resoneer die viniliese proton (H-3) na hoër veld in die geval van die (E)-isomere relatief tot dié van die (Z)-isomere (δ 6.76 *v/s* 7.03 vir **117b** en **116b**; δ 6.25 *v/s* 7.03 vir **122b** en **120b**).

Alhoewel die chemiese verskuiwings van die OMe-groepe nie onderskeid tussen enoliese en ester-tipe metoksigroepe moontlik gemaak het nie, is gevind dat waar die suiker deur die anomeriese posisie verester is, H-1" na laer veld resoneer (δ 6.03 *v/s* 5.56 vir **120b** en **116b**; δ 6.00 *v/s* 5.24 vir **122b** en **117b**).

Indien na die grootte van die n.O.e-effekte gekyk word, is dit duidelik dat die voorkeurkonformasie telkens sodanig is dat die karbonielgroep parallel aan en in dieselfde vlak as die C-C dubbelbinding is (fig. 7a, 8 en 9b). Hiervolgens is daar duidelik 'n groter steriese interaksie tussen nabygeleë substituente in die geval van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat **(122b)** as in die ooreenstemmende (Z)-isomeer **(120b)**, wat die groter stabiliteit van lg. en die regioselektiewe vorming daarvan in SKEMA 12 verklaar. Net so is (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat **(116b)** meer stabiel as die ooreenstemmende (E)-isomeer **(117b)**.

Akkurate massabepalings het in al vier gevalle die verwagte molekulêre massa vereis vir $C_{24}H_{28}O_{12}$ gelewer en die fragmentasiepatrone in die massaspektra (MS Skema 3) is in ooreenstemming met die verwag vir hierdie verbindings.

6.8 Waarde van die studie

Die isolasie van (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (**116a**) verteenwoordig die eerste isolasie van 'n glikosied van fenielpirodruiwesuur (**46/129**). Lg. lewer met hidroksilering *p*-hidroksifenielpirodruiwesuur (**47**), 'n belangrike voorloper in die biogenese van α-hidroksichalkone (**53**) en dus flavonoïede met 3-oksigenering (par. 4.3).[39] Die vorming van die enoliese glukosied (**116a**) stabiliseer waarskynlik fenielpirodruiwesuur (**129**) en verteenwoordig moontlik die vorm waarin die metaboliet gestoor en beskikbaar gestel word vir spesifieke metaboliese stappe[33,34,156] in die rooibosplant.

Fenielpirodruiwesuur (**129**) vind verder toepassing in die voorkomende en terapeutiese behandeling van verskeie dermatologiese kwale, insluitend 'n droë vel, skilfers, aknee, ekseem, ouderdomsvlekke, plooie en vratte.[160]

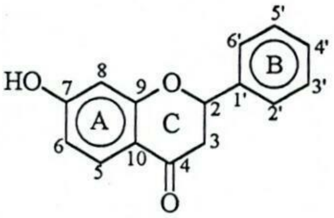
(Z)- (**116b**) en (E)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**117b**), sowel as (Z)- (**120b**) en (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**122b**) is dus vir die eerste keer gesintetiseer, 'n ^{1}H KMR-databasis is opgebou en belangrike konformasionele afleidings, wat noodsaaklik vir die sinvolle interpretasie van n.O.e-assosiasies is, is gemaak.

HOOFSTUK 7

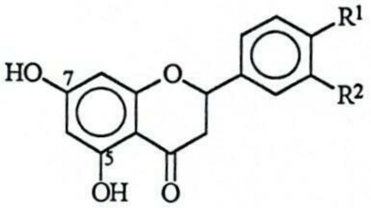
STRUKTURE VAN DIE NUWE C-C GLUKOSIDIESE FLAVANONE, (2R)- EN (2S)-2,3-DIHIDRO-ISO-ORIëNTIEN

7.1 Inleiding

Flavanone verteenwoordig 'n relatief klein, maar belangrike groep verbindings in flavonoïed chemie. 7-Hidroksiflavanoon (**148**) is die eenvoudigste natuurlike flavanoon, terwyl 5,7-dihidroksiflavanoon (**149**) die eenvoudigste flavanoon met 'n floroglusinol A-ring hidroksileringspatroon is.[161]



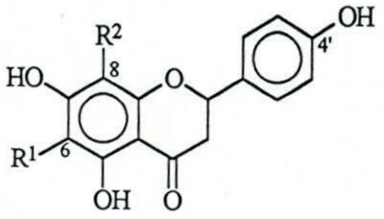
148



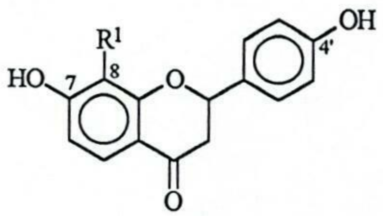
149 $R^1 = R^2 = H$
150 $R^1 = OH, R^2 = H$
98 $R^1 = R^2 = OH$

Naringenien (4',5,7-trihidroksiflavanoon) (**150**) en eriodiktiol (3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon) (**98**) kom wyd verspreid in die planteryk as die vryfenole en as 'n verskeidenheid van glikosiede voor.[162] Hierbenewens is dit in verskeie *O*-gemetileerde vorms geïsoleer en is dit ook die basismolekules vir 'n verskeidenheid *C*-alkilerings.[162]

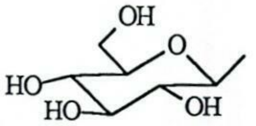
In teenstelling met die algemene voorkoms van *O*-glikosiede van flavanone, is *C*-glikosiede uiters skaars en is slegs drie sodanige flavanone bekend[162], nl. 6-*C*-glukosielnaringenien (4',5,7-trihidroksi-6-glukosielflavanoon)[164] (**151**), 8-*C*-glukosielnaringenien (4',5,7-trihidroksi-8-glukosielflavanoon) (**152**) en 8-*C*-galaktosiel "liguiritigenin" (4',7-dihidroksi-8-galaktosielflavanoon)[165] (**153**).



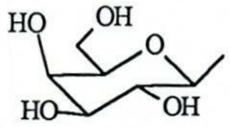
151 R^1 = C-C glukosiel, R^2 = H
152 R^1 = H, R^2 = C-C glukosiel



153 R^1 = C-C galaktosiel



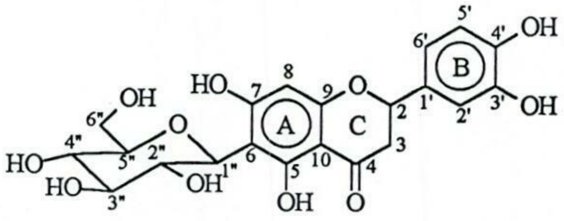
ß-D-glukosiel



ß-D-galaktosiel

7.2 Gedeeltelike struktuurbepaling van (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (88a)

Suiwering van die asetoon-ekstrak van kommersiële rooibostee het tot die isolasie van die nuwe flavanone, (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien [(2R)- en (2S)-3',4',5,7-tetrahidroksi-6-ß-D-glukopiranosielflavanoon] (**88a**), gelei. Die molekulêre formule is met akkurate massabepaling as $C_{21}H_{22}O_{11}$ (M^+ gevind 450.1161; vereis M 450.1162) bevestig.



88a

KMR-ondersoeke is tot 'n groot mate bemoeilik deur die swak oplosbaarheid van die vryfenoliese verbindings (**88a**) in sekere oplosmiddels. Alhoewel (**88a**) geredelik in $(CD_3)_2SO$ en THF-d_8 opgelos het, was die ^{1}H KMR-spektra in hierdie oplosmiddels nie interpreteerbaar nie weens die verbreding van seine. Die beste ^{1}H KMR-spektrum is in $(CD_3)_2CO$ verkry, maar slegs 'n uiters klein gedeelte van die monster het opgelos en ander meer gesofistikeerde KMR-eksperimente (buiten ^{13}C KMR) was dus nie

uitvoerbaar nie. D_2O is vervolgens by die $(CD_3)_2CO$ gevoeg, maar met die nadeel dat waterstof-deuteriumuitruiling van 5-OH plaasgevind het en moontlike assosiasie van hierdie hidroksigroep met naasliggende koolstowwe en/of protone in ^1H-^1H langafstand COSY- of HMBC-eksperimente nie waarneembaar was nie.

Die ^1H KMR-spektrum van (**88a**) in $(CD_3)_2CO/D_2O$ (Plaat 57, Tabel 15) het die teenwoordigheid van die tipiese heterosikliese protone van 'n flavanoonskelet (δ 5.33 en 5.31, dd, J = 3.0, 12.8 Hz, H-2; δ 2.70 en 2.68, dd, J = 3.0, 17.5 Hz, H-3_{cis} en δ 3.10, dd, J = 12.8, 17.5 Hz, H-3_{trans})*, wat goed vergelykbaar met die ooreenstemmende gedeelte van die ^1H KMR-spektrum van die gesintetiseerde aglikoon eriodiktiol (**98**)[55] was, vertoon.

'n Een-proton singulet (δ 5.95) kon aan H-6 of H-8 van die A-ring toegeskryf word en 'n *C*-ß-D-glukopiranosielsubstituent was duidelik identifiseerbaar. Individuele suikerprotone is met 'n COSY-eksperiment geïdentifiseer[55], terwyl die ß-konfigurasie en D-absolute konfigurasie sowel as die C-C-koppeling soos in par. 5.4 bepaal is.[55,56,78-97] Verdubbeling van seine is in hierdie stadium aan rotasie-isomerie of die teenwoordigheid van diastereomere of regio-isomere toegeskryf.

Aangesien geen afleidings aangaande die substitusiepatroon van die B-ring uit bg. spektrum gemaak kon word nie, is 'n ^1H KMR-spektrum van (**88a**) ook in CD_3CD_2OD verkry (Plaat 59, Tabel 15). 'n Duidelike ABX-sisteem (δ 6.93, d, J = 2.0 Hz, H-2'; δ 6.80, d, J = 8.4 Hz, H-5' en δ 6.74, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6') was waarneembaar wat aldus die teenwoordigheid van 'n pirokatesjolring bevestig het.

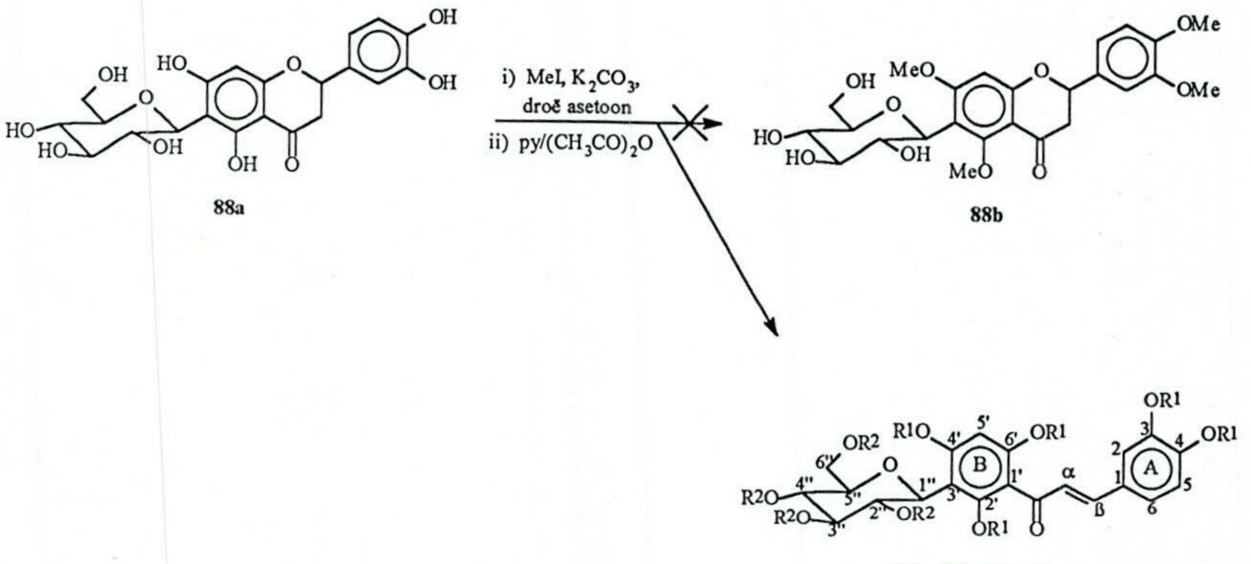
---

* Verdubbeling van seine as gevolg van die teenwoordigheid van 'n diastereomeriese mengsel; die twee 3-waterstowwe is as H-3_{trans} en H-3_{cis} aangedui aangesien die ekwatoriale en aksiale konfigurasies nie in die diastereomeriese mengsel toekenbaar is nie.

7.3 Pogings tot derivatisering

7.3.1 Pogings tot metilering

Met die oog op die waarneming van n.O.e-assosiasies tussen die metoksiseine van die A-ring en die residuele singulet of H-1" ten einde die koppelingsposisie van die suiker te bevestig, is gepoog om die natuurproduk (**88a**) te metileer. Diasometaanmetilering volgens die standaardmetode, het tot totale ontbinding gelei, terwyl metilering met MeI en K_2CO_3 in droë asetoon[166,167] (reaksie 22) nie die verwagte metieleterderivaat (**88b**) nie, maar 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-ß-D-glukopiranosielchalkoon (**154b**) gelewer het.



154a R1 = R2 = H
b R1 = Me, R2 = H
c R1 = Me, R2 = Ac ...22

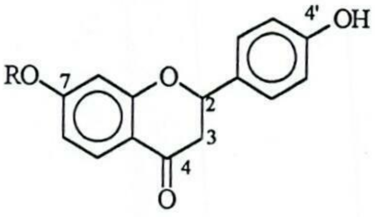
Alhoewel bg. metode onsuksesvol was om die regiochemie van die natuurproduk (**88a**) te bepaal, word die voorgestelde strukture van die flavanoonglukosiede deur die karakterisering van die chalkoon (**154c**) ondersteun.

Die ^1H KMR-spektrum van (**154b**) (Plaat 66, Tabel 17) het 'n tipiese ABX-sisteem vir die A-ring protone, 'n enkele B-ring singulet (δ 6.56) en die teenwoordigheid van vyf metoksiresonansies (δ 3.87,

3.83, 3.82, 3.78 en 3.69) vertoon, terwyl die α- en ß-protone van 'n tipiese chalkoon[168-170] (δ 6.86 en 7.27, albei d, J = 16.0 Hz) duidelik waarneembaar was. Asetilering het 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)chalkoon (**154c**) as 'n geel amorfe vaste stof gelewer. In die ^{1}H KMR-spektrum van (**154c**) (Plaat 67, Tabel 17) was die individuele suikerprotone (uitgesluit H-5") duidelik onderskeibaar. Verdubbeling van seine as gevolg van rotasie-isomerie [bewys deur 'n omgekeerde n.O.e-assosiasie tussen die twee anomeriese protone[171] - bestraling van H-1" (δ 4.99) het gelei tot 'n omgekeerde n.O.e assosiasie met H-1" (δ 4.81, 49 %) en soortgelyke bestraling van H-1" (δ 4.81) tot 'n omgekeerde assosiasie met H-1" (δ 4.99, 51 %)] het daartoe gelei dat agt asetoksiseine en tien metoksiseine waargeneem is.

2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosielchalkoon (**154a**) en derivate daarvan was tot dusver onbekend en beide (**154b**) en (**154c**) is dus nuwe bydraes tot die chalkone.

Chalkoonvorming vanaf 'n flavanoon in die teenwoordigheid van die swak basis K_2CO_3 (reaksie 22) vind 'n presendent in die vorming van chalkone vanaf 4'-hidroksi-7-alkoksi (**155a**) of 4'-hidroksi-7-*O*-glukosielflavanone (**155b**), wat vinnig (binne 5 tot 10 minute) chalkone in baie verdunde alkali vorm.[172] Hierdie verskynsel kan aan die verhoogde suurheid van die α-waterstof relatief tot verbindings met 'n 7-OH groep, toegeskryf word.



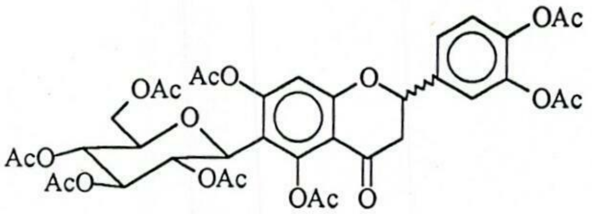
155a R = alkiel
b R = glukosiel

Alhoewel beide (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) 'n 7-OH groep (en nie 'n 7-alkoksi- of 7-*O*-glukosielgroep soos in bogenoemde gevalle nie) besit, kan na analogie van (fig. 14) (par. 8.7.2) voorgestel word dat daar 'n sterk waterstofbinding tussen die 7-hidroksigroep van (**88a**) en die heterosikliese suurstof van die suikersubstituent bestaan. Sodoende sal die 7-hidroksigroep swakker

aktiverend wees en sal die suurheid van H-3 verhoog relatief tot gevalle waar bogenoemde waterstofbinding afwesig is.

7.3.2 Asetilering

Asetilering van die natuurproduk (**88a**) volgens die standaardmetode het 3',4',5,7-tetra-asetoksi-6-(2,3,4,5-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavanoon (**88c**) as 'n wit amorfe vaste stof gelewer.[55]



88c

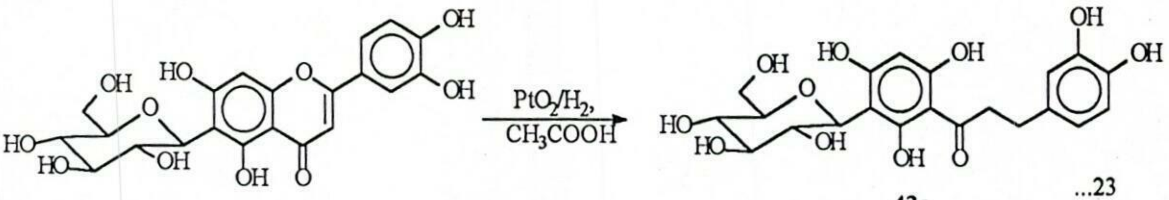
Pogings om met n.O.e-eksperimente onderskeid tussen die aromatiese asetoksigroepe te tref en dan deur n.O.e-assosiasies na of van die A-ring asetoksigroepe en die A-ring singulet [δ 6.85, 6.84, $(CD_3)_2CO$] die koppelingsposisie van die suiker te bevestig, was onsuksesvol. Afname van die ^{1}H KMR-spektrum ($CDCl_3$) van (**88c**) by 80 °C het tot vereenvoudiging van die spektrum gelei[55] weens die opheffing van rotasie-isomerie, maar feitlik alle seine was steeds gedupliseer. Dit dui op die teenwoordigheid van 'n mengsel van regio- of diastereomere. Verdere pogings tot skeiding was egter onsuksesvol (par. 13.1).

7.4 Pogings om die struktuur van die natuurproduk (88a) deur die hidrogenering van iso-oriëntien (40a) te bevestig

Verskeie pogings is aangewend om iso-oriëntien (**40a**) te hidrogeneer. Eerstens is iso-oriëntien (**40a**) vir 8 ure in etanol en die teenwoordigheid van Adams se katalisator (PtO_2) aan waterstof blootgestel. Geen reaksie het plaasgevind nie.

Tweedens is iso-oriëntien (**40a**) volgens die metode van Koeppen en Roux[97] in asynsuur opgelos en vir 30 min. in die teenwoordigheid van PtO_2 aan waterstof blootgestel. In stede van die verwagte

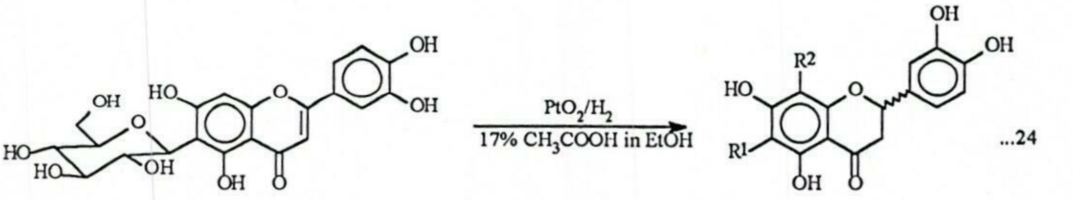
flavanoon, het die dihidrochalkoon aspalatien (**43a**) in 54 % opbrengs gevorm en is 27 % ongereageerde iso-oriëntien (**40a**) herwin (reaksie 23).



40a **43a**

Hidrogenering van iso-oriëntien (**40a**) het dus klaarblyklik plaasgevind om die ooreenstemmende flavanoon te lewer, waarna isomerisasie na die chalkoon in die suurmedium plaasgevind het en hidrogenering van laasgenoemde[172] die dihidrochalkoon aspalatien (**43a**) gelewer het.

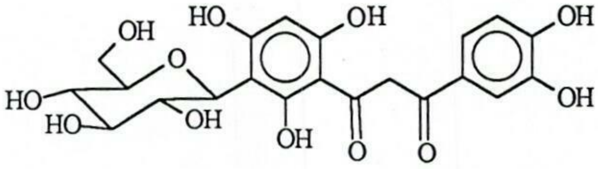
Milder kondisies met etanol, twee druppels asynsuur en dieselfde katalisator het tot geen reaksie gelei nie, terwyl 'n 17 % asynsuuroplossing in etanol (reaksie 24) tot die isolasie van 'n mengsel van (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) sowel as (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-oriëntien (**156a**) gelei het.



40a

88a R1 = C-C β-D-glukopiranosiel, R2 = H
156a R1 = H, R2 = C-C β-D-glukopiranosiel

Die vorming van die regio-isomere (**156a**) van (**88a**) is rasionaliseerbaar in terme van 'n Wesseley-Moser herrangskikking[162,163] waartydens ringopening van (**88a**) die ooreenstemmende 1,3-diketoon (**157**) en met hersiklisering beide (**88a**) en die regio-isomere (**156a**) lewer.



157

Die ^{1}H KMR-spektrum van (**88a**) en (**156a**) (Plaat 65, Tabel 15) was buiten vir die teenwoordigheid van 'n addisionele A-ring singulet (δ 6.03) en 'n addisionele anomeriese protonsein (δ 4.87) 'n replika van

dié van die natuurlike verbinding (Plaat 57, Tabel 15).* Dit bevestig dat die natuurlike verbinding nie 'n mengsel van die twee regio-isomere (**88a**) en (**156a**) is nie, maar wel die (2R) en (2S)-diastereomere van (**88a**) of (**156a**). Alhoewel sekere navorsers onderskeid tussen regio-isomeriese flavanone op grond van die chemiese verskuiwings van die A-ring singulet getref het,[173,174] is daar teenstrydighede in die literatuur.[173-175]

7.5 Konvensionele metodes vir die bepaling van die posisie van alkilering

7.5.1 Die chemiese verskuiwing van 5-OH

Fukai en Namura het in 1990[176] gevind dat alkilering op posisie ses van flavanone veroorsaak dat die sein van die waterstofgebonde 5-OH groep na laer veld in die ^{1}H KMR-spektrum relatief tot die ooreenstemmende sein in vergelykbare verbindings waar 6-alkilering nie teenwoordig is nie (ingesluit 8-gealkileerde 6-nie-gesubstitueerde flavanone) verskuif.

Afname van die ^{1}H KMR-spektrum van die natuurproduk (**88a**) in $(CD_3)_2CO$ (Plaat 58, Tabel 15) het bevestig dat 5-OH na laer veld in (**88a**) (δ 12.70) as in die aglikoon, eriodiktiol (**98**) [δ 12.18 in $(CD_3)_2CO$ by kamertemperatuur][176] resoneer. Dit dui dus daarop dat die suiker aan C-6 in die natuurproduk (88a) gekoppel is.

7.5.2 $AlCl_3$ geïnduseerde UV-verskuiwing

Volgens Sherif *et al.*[177] vertoon flavonoïede met 'n cheleerde OH-groep 'n batochromiese $AlCl_3$ geïnduseerde verskuiwing (20-60 nm) in die UV-spektra, maar is sodanige verskuiwing afwesig indien 'n alkielgroep *orto* ten opsigte van die cheleerde 5-OH teenwoordig is.

* Verdere pogings tot skeiding was onsuksesvol (par. 13.2.3).

Alhoewel 'n klein verskuiwing vir die natuurproduk (**88a**) [λ^{MeOH} nm: 289, +$AlCl_3$: 295, Δ 6 nm] in vergelyking met die aglikoon eriodiktiol (**98**) [λ^{EtOH} nm: 289, +$AlCl_3$: 310, Δ 21 nm][172] waargeneem is, is dit tentatief aanduidend van 'n C-6 C-C-glukosielsubstituent.

7.5.3 Massaspektrometrie

Volgens Prox[178,179] is daar 'n duidelike verskil in die fragmentasiepatrone van C-6 en C-8 C-C-glukosielverbindings en lewer C-8 C-C-glukosielverbindings 'n M-149 piek, terwyl C-6 C-C-glukosielverbindings beide M-148 en M-149 pieke lewer. Sekere navorsers het hierdie eienskap ook op C-C glukosidiese flavanone toegepas om regiochemie toe te ken.[164]

In die massaspektrum van die natuurproduk (**88a**) (MS SKEMA 10) is nie een van hierdie twee pieke egter waargeneem nie.

7.6 Verdere KMR-eksperimente

7.6.1 ^1H-^1H langafstand COSY

'n ^1H-^1H langafstand COSY eksperiment[180] (Plaat 60) op die natuurproduk (**88a**) in $(CD_3)_2CO$ het 'n korrelasie tussen die A-ring singulet (δ 5.92) en H-6' van die B-ring (δ 6.95) vertoon. Aangesien korrelasie oor sewe bindings onwaarskynlik is, is hierdie resultaat slegs as 'n moontlike aanduiding dat die A-ring singulet aan die resonansie van H-8 toe te skryf is, beskou. Die korrelasie waarvoor gehoop is, nl. tussen 5-OH (δ 12.70) en H-1" (δ 4.85), is nie waargeneem nie.

7.6.2 ^{13}C KMR-, HETCOR- en HMBC-EKSPERIMENTE

Alhoewel die ^{13}C KMR-spektrum* (300 Mz) van die natuurproduk (**88a**) in $(CD_3)_2CO$ (Plaat 61) nie direk vergelykbaar met dié van die aglikoon, eriodiktiol (**98**) in $(CD_3)_2SO$[181] was nie, is 'n duidelike tendens waargeneem. Slegs een van C-6 en C-8 is ongeveer 10 d.p.m. na laer veld relatief tot die ooreenstemmende koolstowwe van die aglikoon (**98**) verskuif (δ_C 105.68 en 96.72/96.58 *versus* 95.7 en 94.8 vir C-6 en C-8, respektiewelik)[180], wat bevestig dat slegs een van hierdie twee koolstowwe 'n C-C-gekoppelde suikersubstituent besit.[182,183] Hierbenewens het H-1" (δ 4.68) met slegs een van C-6 of C-8 (δ_C 104.95) in 'n HMBC-eksperiment (500 MHz) gekorelleer. Die seine van C-3 (δ_C 43.62 en 43.36), C-5 (δ_C 163.51 en 163.45), C-6 of C-8 (δ_C 96.72 en 96.58) en C-1' (δ_C 131.48 en 131.40) [300 MHz] was verdubbel. Dit is betekenisvol wanneer opgelet word dat al hierdie koolstowwe deel van of aangrensend aan die heterosikliese C-ring (mits die δ_C 96.72 en 96.58 seine aan C-8 toegeskryf word) is. Die verdubbeling sou dus aan die teenwoordigheid van die (2S)- en (2R)-diastereomere van 2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) toegeskryf kon word en dui weereens op 'n C-6 C-C-gekoppelde suiker. Verdere tentatiewe getuienis vir die koppelingsposisie het uit 'n HMBC-eksperiment (Plaat 63) by 500 MHz gevolg. Hiervolgens het H-8 (δ 5.93) met C-6 (δ_C 105.95), C-9* (δ_C 162.87) en C-10 (δ_C 102.35) geassosieer, terwyl H-1" (δ 4.68) met C-5* (δ_C 163.08), C-6 (δ_C 104.94) en C-7 (δ_C 166.28) geassosieer het.

7.7 Sirkulêre dichroïsme

C-2 van flavanone is 'n chirale sentrum sodat hierdie tipe verbindings in die (2S)- of (2R)-konfigurasie kan voorkom. Eersgenoemde word as die natuurlike vorm beskou.[162]

Flavanone vertoon 'n UV maksimum by 270-290 nm en 'n infleksie by 320-330 nm. Vir flavanone met 'n (2S)-konfigurasie en met die 2-arielgroep ekwatoriaal georiënteer, word 'n positiewe Cotton-effek as

---

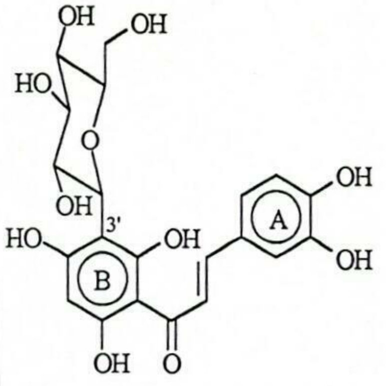
* Individuele koolstowwe is op grond van 'n HETCOR-eksperiment (Plaat 62) en na analogie van die ooreenstemmende seine van die aglikoon, eriodiktiol (98)[181], toegeken. Onderskeid tussen C-5 en C-9 is tentatief op grond van chemiese verskuiwings getref.[184]

gevolg van die n->π^* oorgang by 320-330 nm en 'n negatiewe Cotton effek as gevolg van die π ->π^* oorgang by 270-290 nm waargeneem.[188]

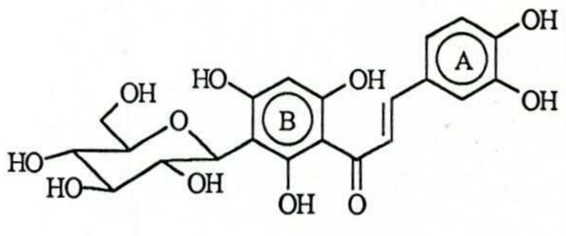
Alhoewel 'n flavanoonglikosied ook optiese aktiwiteit as gevolg van die koolhidraatmoïeteit addisioneel tot die chirale sentrum van die aglikoon besit, stem die Cotton-effekte van die glikosiede en aglikone ooreen.[188]

Die SD-spektrum van die natuurproduk (**88a**) (SD Plaat 2) het bevestig dat dit nie opties suiwer is nie. Soortgelyke "verwringing" van SD-kurwes is wel voorheen vir ander diastereomeriese flavanoonmengsels gerapporteer.[188]

Aangesien die verwagte konfigurasie van 'n natuurlike verbinding (2S) is, kan voorgestel word dat die diastereomeriese mengsel van (**88a**) ontstaan het deur die siklisering van die ooreenstemmende chalkoon (**154a**) tydens isolasie. Laasgenoemde mag óf 'n natuurlike produk wees (nog nie geïsoleer nie) óf 'n intermediêr in 'n Wesseley-Moser herrangskikking wees.[162] In beide gevalle sou egter verwag kon word dat die C-8 C-C-glukosielregio-isomeer (**156a**) van (**88a**), soos in par. 7.4, ook sou vorm. In hierdie verband kan na analogie van 'n vorige studie[55,56], waartydens 'n n.O.e-assosiasie tussen die suikerprotone van 'n C-8 C-C gekoppelde ß-D-glukopiranosielsubstituent en die B-ring protone van flavone waargeneem is, gepostuleer word dat steriese interaksie tussen die suikersubstituent op C-3' en die A-ring teenwoordig sal wees indien 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosielchalkoon (**154a**) konformasie a (fig. 10) aanneem en sal siklisering om (**156a**) te vorm dus minder gunstig wees as wanneer konformasie b (fig. 10) aangeneem word om met siklisering (**88a**) te vorm.



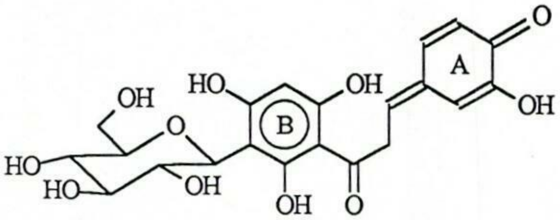
a



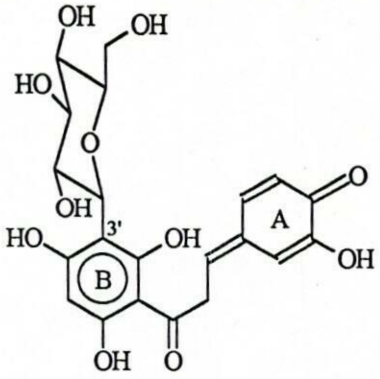
b

Fig. 10 Moontlike konformasies van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-β-D-glukopiranosielchalkoon (**154a**).

Soos in hoofstuk 8 bespreek sal word, is vir die eerste keer gedemonstreer dat flavanone ook deur die oksidatiewe siklisering van dihidrochalkone gevorm kan word en word hierdie as die waarskynlikste weg vir flavanoonvorming in rooibos beskou. Volgens hierdie weg word aspalatien (**43a**), die hoofkomponent van onverwerkte rooibos, geoksideer om 'n fenoksiradikaal (**158**) en deur die verwydering van 'n bensiliese waterstofatoom, 'n kinoonmetied (**159**) te lewer, waarna nukleofiele aanval deur 2'-OH op die elektrofiele bensiliese posisie die ooreenstemmende flavanoon(e) (**88a, 156a**) lewer (SKEMA 21, par. 8.6). Indien die voorkeurkonformasie van aspalatien (**43a**) (fig. 14, par. 8.7.2) beskou word, is dit duidelik dat die suikersubstituent by voorkeur in die posisie ekwivalent aan posisie 6 van heterosikliese flavonoïede voorkom en sou weereens gevisualiseer kon word dat weens steriese interaksie tussen die suikersubstituent en die A-ring van die kinoonmetied (**159**) soos in konformasie b (fig. 11), oksidatiewe siklisering by voorkeur (**88a**) sou lewer.



a



b

Fig. 11 Moontlike konformasies van die kinoonmetied (**159**).

(2S)- en (2R)- 2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) behoort dus by voorkeur *via* alle moontlike meganismes te vorm.

7.8 Opsomming

Opwindende nuwe C-C-glikosidiese flavanone, (2R) en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) is geïsoleer. C-C glikosidiese flavanone is uiters skaars en slegs drie sodanige verbindings is voorheen geïsoleer.

Verdubbeling van seine in die ^{1}H KMR- en ^{13}C-spektra het bevestig dat twee regio- of diastereomere teenwoordig is. Die hidrogenering van iso-oriëntien (**40a**) het beide diastereomere van 2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) en 2,3-dihidro-oriëntien (**156a**) gelewer en het bevestig dat die natuurlike produk nie 'n mengsel van regio-isomere is nie. Die teenwoordigheid van 'n diastereomeriese mengsel is verder deur die verdubbeling van slegs sekere seine (seine van die C-ring en aangrensende koolstowwe) in die ^{13}C KMR-spektrum en met sirkulêre dichroïsme bevestig.

Die regiochemie is tentatief op grond van (a) die chemiese verskuiwing van 5-OH [δ 12.70 *versus* 12.80 vir eriodiktiol (**98**)], (b) 'n ^{1}H-^{1}H langafstand korrellasie tussen H-8 (δ 5.92) en H-6' (δ 6.95) (Plaat 60), (c) die verdubbeling van die koolstofseine van die C-ring koolstof, C-3 (δ_C 43.62 en 43.36), en van

koolstowwe aangrensend aan die heterosikliese ring, nl. C-5 (δ_C 163.51 en 163.45), C-8 (δ_C 96.72 en 96.58) en C-1' (δ_C 131.48 en 131.40) (Plaat 61) en (d) 'n HMBC-eksperiment (Plaat 63) toegeken. Hiervolgens het H-1" (δ 4.68) met C-5 (δ_C 163.08), C-6 (δ_C 104.95) en C-7 (δ_C 166.28) geassosieer, terwyl H-8 (δ 5.93) met C-6 (δ_C 104.95), C-9 (δ_C 162.87) en C-10 (δ_C 102.35) geassosieer het.*

In hoofstuk 8 sal gedemonstreer word dat (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) sleutelrolle in die biosintese van flavonoïede sowel as in die verwerkingsproses van rooibos speel.

* Individuele koolstowwe is op grond van 'n HETCOR-eksperiment (Plaat 62) en na analogie van die ooreenstemmende seine van die aglikoon, eriodiktiol (98)[181], toegeken. Onderskeid tussen C-5 en C-9 is tentatief op grond van chemiese verskuiwings getref.[184]

HOOFSTUK 8

'n BIOMIMETIESE MODEL VIR DIE ROOIBOSTEE FERMENTASIEPROSES EN DIHIDROCHALKOONCHEMIE

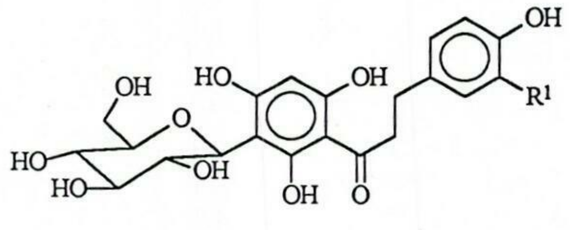
8.1 Inleiding

Soos in par. 1.4.1 bespreek, word rooibos in die buitelug verwerk. Fermentasie kan van 8 tot 24 uur neem (gemiddeld 12 - 18 uur), afhangend van klimaatstoestande, die samestelling van die plantmateriaal en verwerkingstoestande soos die mate van kneusing, die hoeveelheid water bygevoeg, ens. Alle waarnemings en aanbevelings ten opsigte van die verwerkingsproses is op praktiese ervaring van die produsente gebaseer en dit is algemeen aanvaar dat blootstelling van die tee aan sonlig tydens verwerking noodsaaklik vir die ontwikkeling van die karakteristieke smaak en kleur van rooibostee is.

Weens die gebrek aan beheer oor verwerkingsprosesse en dus konstante produksie van hoë kwaliteit tee asook die gebrek aan kennis aangaande die optimum kondisies vir die produksie van sodanige tee, het Joubert in 1994[189] die effek van belugting, fermentasietyd, fermentasietemperatuur en die drogingsmetode op die kwaliteit van die produk bepaal. Daarvolgens het **belugting** tydens fermentasie die teekwaliteit aansienlik verbeter. **Fermentasietyd** het die smaak en algehele kwaliteit van die tee beïnvloed en die optimum **fermentasieperiode** was afhanklik van die **fermentasietemperatuur**. Vir die fermentasieperiode 13 - 15 uur is die beste kwaliteit tee by 38 of 40 °C verkry. Die effek van droging onder beheerde toestande *versus* sondroging op teekwaliteit, chlorofilinhoud, fenoliese samestelling

(HPLC-analise) en kleur van die teeblare is ook ondersoek. Sondroging is hiervolgens nie noodsaaklik vir die ontwikkeling van die karakteristieke organoleptiese eienskappe van rooibostee nie en droging by 40 °C het die beste kwaliteit tee gelewer.

Volgens Joubert[189] neem die konsentrasies (HPLC-analise) van aspalatien (**43a**) en "nothofagin" (**160a**), die hoof etielasetaatoplosbare polifenole in onverwerkte rooibos, af tydens verwerking. Trouens, 'n gedeelte van die dihidrochalkone word reeds voor fermentasie net na die snyproses omgeskakel (Fig. 11).



43a R^1 = OH
160a R^1 = H

Die afname in dihidrochalkooninhoud is op grond van bogenoemde aan oksidasie, wat geïnisieer sou kon word deur die beskadiging van selle en gevolglike blootstelling van die dihidrochalkone aan suurstof tydens die snyproses, toegeskryf.[189] Die aard van hierdie reaksies in rooibos is egter nog onbekend.

In die huidige studie is die *in vitro* omskakeling van die dihidrochalkoon, aspalatien (**43a**) ondersoek om die fermentasieproses te modelleer. In hierdie verband is daar op die effek van lig, hitte, suurstof en pH gefokus en is moontlike natuurlike katalisatore van die reaksie geïdentifiseer.

LET WEL: Weens die oënskynlike oksidasie van aspalatien (**43a**) tydens skeiding met Sephadex LH-20, sellulose MN-300, mikrokristallyne sellulose en sellulosetriasetaat en soos ook inderdaad met

tweedimensionele papierchromatografie gedemonstreer is, asook die verlies aan materiaal tydens skeidings met Kieselgel F_{254} en poli-amied, is op ^1H KMR-analise staatgemaak om 'n betroubare weergawe van die samestelling van die reaksiemengsels te verkry. Massas van reaksiemengsels is dus na die opwerkprosedures bepaal, waarna ^1H KMR-integraalwaardes gebruik is om opbrengste te kwantifiseer.

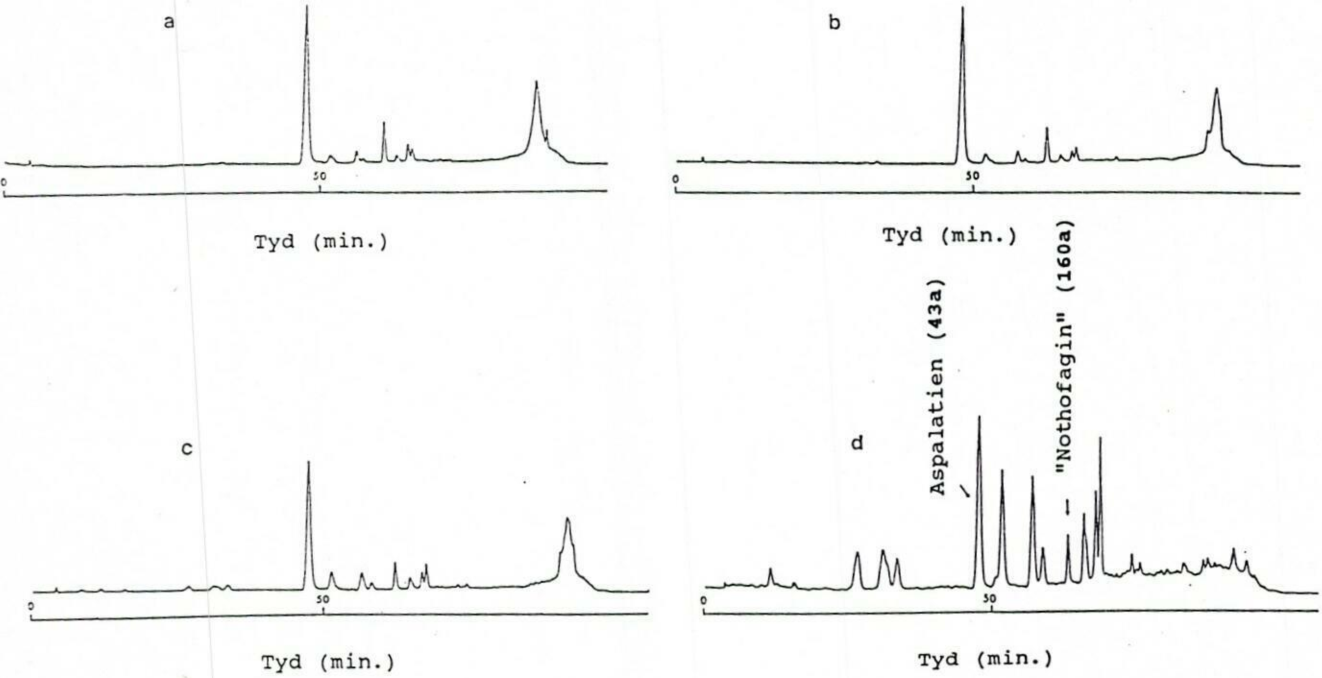
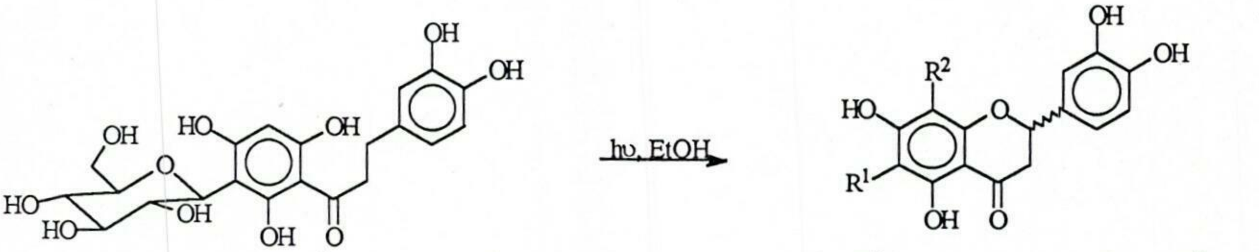


Fig. 11 HPLC chromatogramme van rooibos polifenole by 280 nm: (a) Groen, ongesny, nie-gefermenteerd, gevriesdroog; verdunning 8:400 (b) Gesny *ca.* 15 min. voor bevriesing, gevriesdroog; verdunning 7:300 (c) Gesny *ca.* 210 min. voor bevriesing, gevriesdroog; verdunning 15:300 (d) Gesny, gefermenteer by 38 °C vir 14 uur, gedroog by 40 °C vir 3 uur; verdunning 160:400.

8.2 Die effek van lig

Koeppen en Roux[96,97] het reeds in 1965 bepaal dat aspalatien (**43a**) in 'n etanoliese oplossing en die teenwoordigheid van sonlig na 2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) en 2,3-dihidro-oriëntien (**156a**) omgeskakel word (reaksie 25). Alhoewel geen aspalatien (**43a**) na langdurige blootstelling teenwoordig was nie, is relatief klein hoeveelhede flavanoon opgespoor weens verdere oksidasie na bruin onidentifiseerbare produkte. 'n Kontrole-eksperiment by dieselfde temperatuur, maar in die afwesigheid van lig, het geen omskakeling getoon nie.

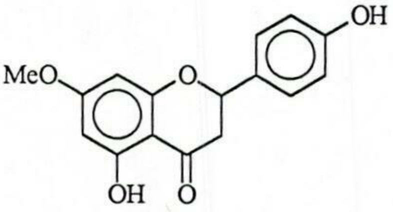


43a

88a R^1 = C-Cβ-D-glukopiranosiel, R^2 = H
156a R^1 = H, R^2 = C-Cβ-D-glukopiranosiel

...25

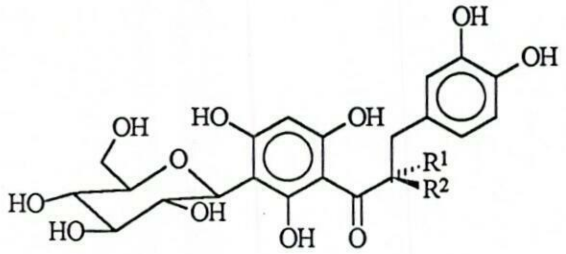
Hierbenewens het Kodama *et al.*[190] gevind dat die flavanoon, "sakuranetin" (**161**) gevorm het wanneer rysblare vir 20 min. met ultravioletlig (254 nm) bestraal is en vir 2 dae by 27 °C in 'n houer by hoë humiditeit geïnkubeer is. Hierdie flavanoon was afwesig in die kontrole-eksperiment.



161

Na aanleiding van bogenoemde is aspalatien (**43a**) met die oog op direkte ^{1}H KMR-analise en die uitsluiting van veranderlikes soos temperatuurverandering en langdurige blootstelling aan golflengtes anders as 254 nm (tydens die verwydering van nie-gedeuterieerde oplosmiddels), in deuteriumoksied in

'n kwartsfles opgelos en is suurstof vir 20 min. deur die reaksiemengsel geborrel, waarna vir 9 dae met ultravioletlig (254 nm) bestraal is. Na 37 uur is daar met ^{1}H KMR-analise 'n verandering in die gebied van die α- en ß-protone van aspalatien (**43a**) waargeneem en volgens ^{1}H KMR-analise het 6 % (2R)-en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**)* na 9 dae gevorm, terwyl 94 % aspalatienanaloë (**162a** en **b**) wat op die α-posisie gemodifiseer was (Plate 68 en 69, Tabel 18), gevorm het. Lg. is aan α-waterstof-deuteriumuitruiling *via* enolisasie toegeskryf.



162a R¹ = H, R² = D
b R¹ = D, R² = H

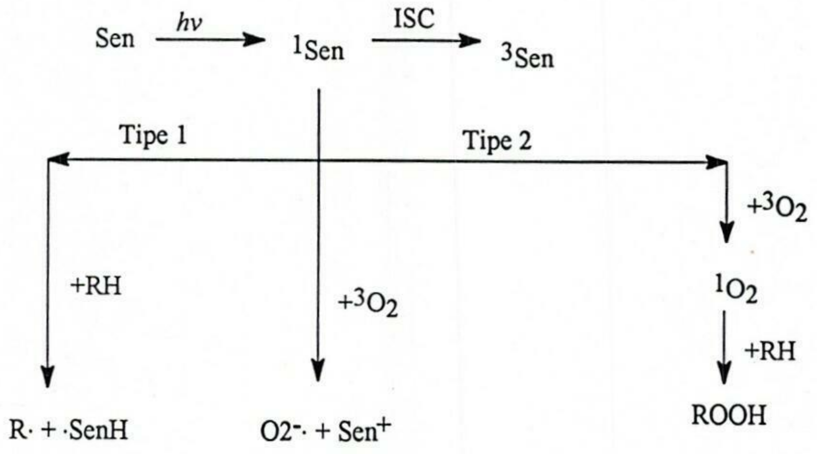
Die α-deuterium sou die sikliseringsreaksie tot 'n mate *via* die ß-sekondêre isotoopeffek (stabilisasie van die oorgangstoestand deur hiperkonjugasie)[191] kon vertraag mits 'n ß-H-C-binding tydens siklisering gebreek word (vorming van 'n kinoonmetied, SKEMA 21).

Flavanoonvorming vanaf aspalatien (**43a**) in die afwesigheid van 'n sensitiseerder het die vraag laat ontstaan of aspalatien (**43a**) self as sensitiseerder optree en, indien wel, watter meganisme gevolg word. Dit word algemeen aanvaar dat fotosensitiseerders (Sen, bv. bensofenoon) deur die absorpsie van lig na 'n onstabiele singulettoestand (^{1}Sen) opgewek word (fig. 2).[192] Lg. gee met verlies aan energie [interne omskakeling, fluoressensie of intersisteemkruising (ISC)] oorsprong aan die triplet omgewekte toestand (^{3}Sen) wat (a) deur **waterstofatoom- of elektronoordrag** met maklik oksideerbare verbindings soos fenole of amiene of maklik reduseerbare verbindings soos kinone reageer om vry

---

* Finale spektrum in $(CD_3)_2CO/D_2O$, Plaat 57, Tabel 15.

radikale te lewer (tipe 1, SKEMA 16) of (b) deur energie-oordrag aan atmosferiese suurstof ($^3O_2$) opgewekte singulet suurstof ($^1O_2$) lewer (tipe 2, SKEMA 16). Singulet suurstof reageer met elektronryke verbindings soos olefiene, diëne en aromatiese verbindings om hidro- en endoperoksiede te lewer (par. 3.2), maar kan ook fisies geblus word deur energie- of ladingsoordrag waartydens $^1O_2$ na $^3O_2$ gedegenereer word sonder suurstofverbruik of produkvorming. Fenole blus $^1O_2$ danksy die elektrondoneringsvermoë daarvan deur 'n ladingsoordragmeganisme (SKEMA 17).[192] In hierdie geval sou geen produkvorming vanaf aspalatien (**43a**) dus plaasvind nie.



SKEMA 16

$$D + {}^1O_2 \longrightarrow [D^{+} \cdots O_2^{-}]^1 \longrightarrow [D^{+} \cdots O_2^{-}]^3 \longrightarrow D + {}^3O_2$$

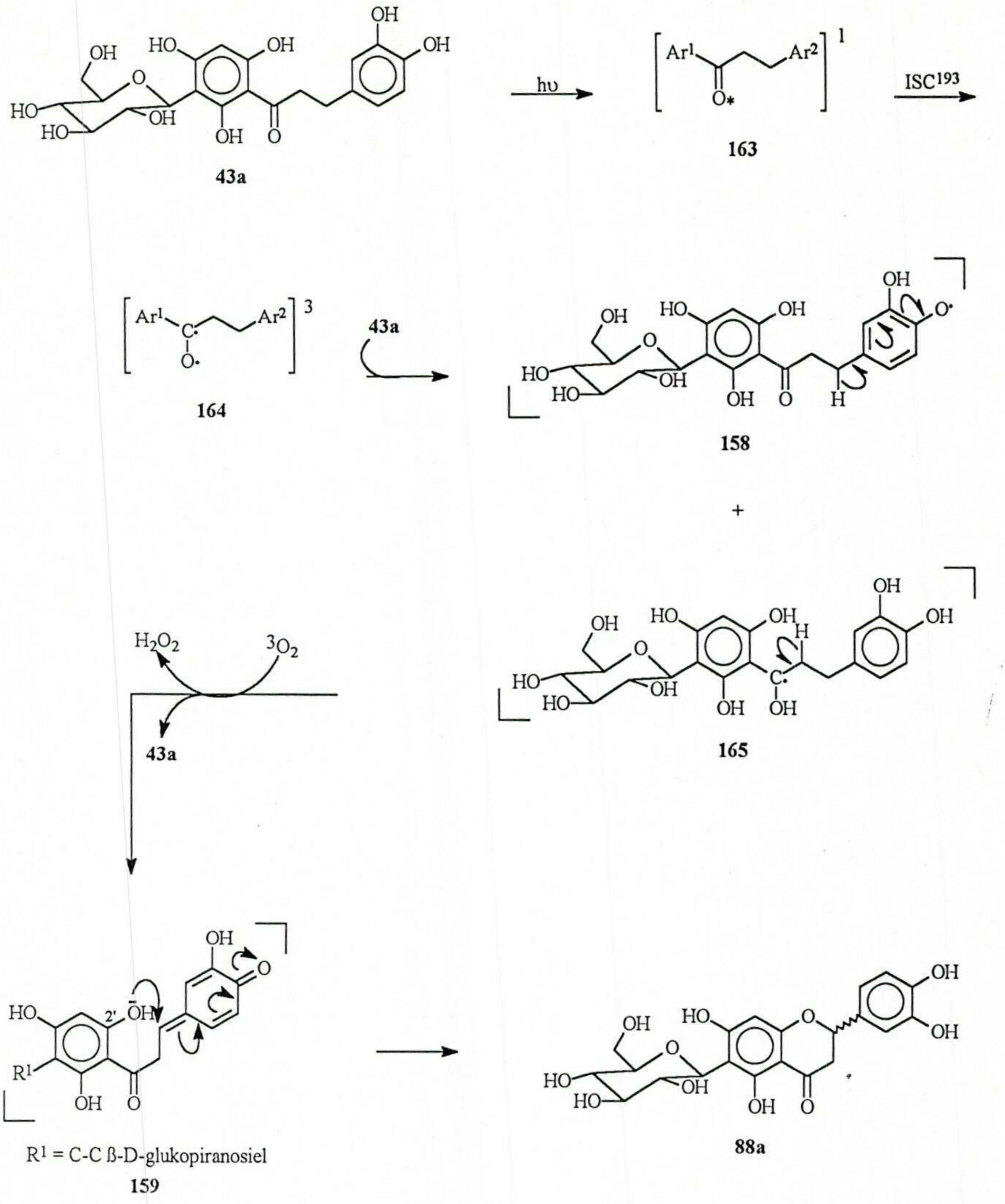
D = Donor

SKEMA 17

Hierbenewens kan elektronoordrag vanaf die opgewekte triplet sensitiseerder na triplet suurstof plaasvind om 'n superoksiedioon, wat vir verdere oksidasie verantwoordelik mag wees, te lewer (SKEMA 16). Minder as 1 % van die triplet suurstof word egter volgens Bradley[192] na superoksied

omgeskakel weens botsings met die triplet sensitiseerder, sodat omskakeling van aspalatien (**43a**) volgens hierdie weg ook onwaarskynlik lyk.

In die lig van bogenoemde blyk dit dat tipe 1 (SKEMA 16) die enigste haalbare verduideliking vir 'n fotochemiese omskakeling van aspalatien (**43a**) kan wees. Hiervolgens kan voorgestel word dat aspalatien (**43a**) self as sensitiseerder optree danksy die teenwoordigheid van die karbonielgroep[193], waarna 'n waterstofatoom van aspalatien (**43a**) in die grondtoestand volgens tipe 1 (SKEMA 16) deur die sensitiseerder in die triplet toestand (**164**) (SKEMA 18) verwyder word om 'n fenoksiradikaal (**158**) te lewer. Verwydering van die bensiliese waterstof deur suurstof (sien ook vergelyking 4, par. 3.2) lewer in die daaropvolgende stap die kinoonmetied (**159**), waarna nukleofiele aanval deur 2'-OH op die elektronarme dubbelbinding die verlangde flavanone (**88a**) mag lewer.



43a
hυ
163
ISC193
164
43a
158
+
165
H2O2
3O2
43a
R1 = C-C ß-D-glukopiranosiel
159
88a

SKEMA 18

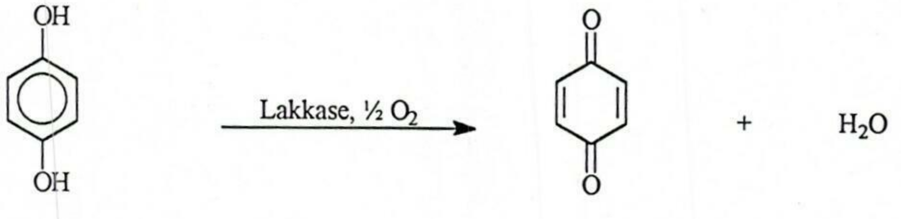
8.3 Die effek van hitte

Aspalatien (**43a**) is onderskeidelik by kamertemperatuur en 30 °C onder vergelykbare toestande vir ses dae aan suurstof blootgestel. In eersgenoemde geval is geen omskakeling gevind nie, terwyl (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (16 %, 99 % omskakeling) wel by 30 °C gevorm het. Hierdie resultate is in ooreenstemming met dié van Joubert[189] en bevestig dat hitte 'n bepalende rol in die oksidasieproses speel.

8.4 Lakkase as katalisator

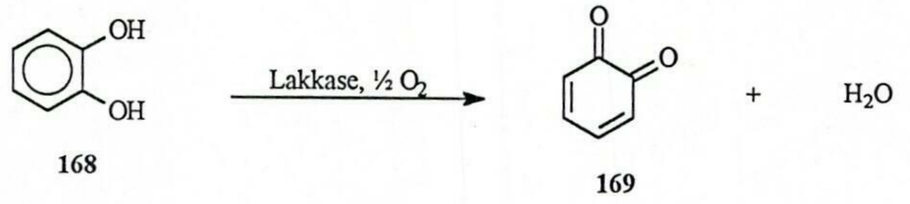
Lakkases besit die karakteristieke vermoë om die oksidasie van *p*- en *o*-kinole na die ooreenstemmende kinone te kataliseer (reaksies 26 en 27).[194,195]

Die eerte stap van die oksidasie behels die vorming van 'n semikinoon met elektronoordrag vanaf die substraat na die koper van die ensiem, terwyl die tweede stap 'n nie-ensimatiese disproporsioneringsreaksie tussen twee semikinoonmolekules behels om een molekuul kinoon en een molekuul kinol te lewer.



...26

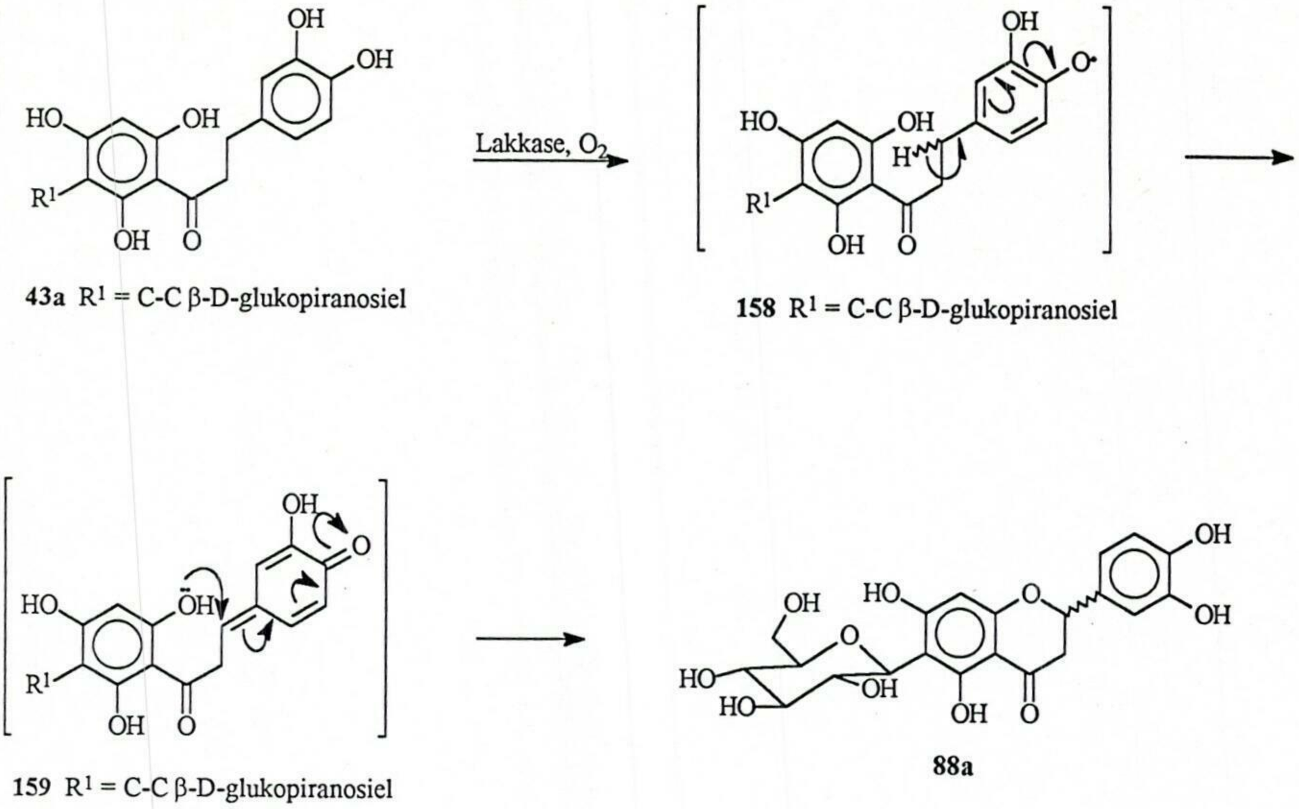
166 **167**



...27

Blootstelling van aspalatien (**43a**) aan lakkase by pH 5[196,197] en 30 °C het 14 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) en 48 % ongereageerde aspalatien (**43a**) gelewer, terwyl die res van die reaksiemengsel uit onidentifiseerbare produkte bestaan het. Lg. was baie wateroplosbaar, terwyl die etielasetaatekstrak ná vloeistof-vloeistofekstraksie uit 52 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) en 48 % aspalatien (**43a**) bestaan het. Die kontrolereaksie sonder lakkase het ook tot die vorming van aansienlike hoeveelhede bruin, hoogs wateroplosbare produkte gelei, terwyl 25 % aspalatien (**43a**) herwin is en geen aanduiding van flavanone gevind is nie. Beide reaksies is met ultravioletspektrofotometrie in die sigbare gebied, waar fenoksiradikale in suur media absorbeer[198], gevolg (**UV** plate 4 en 5).

Na aanleiding van die aard van katalise deur lakkase en die verandering in die ultravioletspektra met verloop van tyd, kan inderdaad gepostuleer word dat 'n fenoksiradikaal (**158**) gevorm word, waarna die verwydering van 'n bensiliese waterstofatoom die ooreenstemmende kinoonmetied (**159**) sou kon lewer en nukleofiele aanval deur 2'-OH op die elektronarme dubbelbinding die verlangde flavanoon mag lewer (SKEMA 19). Verdere steun vir hierdie meganisme volg later in die hoofstuk.



SKEMA 19

8.5 Koolhidrate as katalisatore

Twee-dimensionele papierchromatografiese analise van aspalatien (**43a**) wat volgens ^{1}H KMR-analise suiwer was, het nie net op die teenwoordigheid van aspalatien (**43a**) nie, maar ook van die flavone, oriëntien (**39a**) en iso-oriëntien (**40a**) (ko-chromatografie met outentieke monsters) gedui (fig. 12).

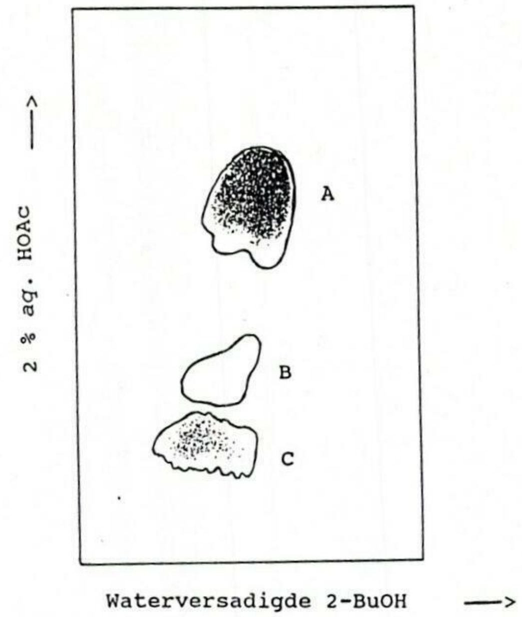


Fig. 12 Tweedimensionele papierchromatografiese analise van aspalatien (**43a**); A = Aspalatien (**43a**), B= Iso-oriëntien (**40a**) en C = Oriëntien (**39a**)

'n Moontlike verklaring vir hierdie vreemde verskynsel was dat die sellulose die oksidatiewe siklisering van aspalatien (**43a**) na die ooreenstemmende flavanone en verdere oksidasie na die flavone, kataliseer. Aspalatien (**43a**) is dus onder vergelykbare toestande [50 % (v/v) etanol-water, 6 dae] aan 'n reeks natuurlike koolhidrate blootgestel (Tabel 8.1).

TABEL 8.1: Ondersoek na die effek van moontlike katalisatore op die oksidatiewe siklisering van aspalatien (**43a**)

Katalisator	**T (°C)**	**O_2/Inert**	**(43a) (%**	**(88a)**	
			Herwinning)	**(% Opbrengs)**	**(% Omskakeling)**
-	30	O_2	84	16	99
Sellulose	30	O_2	99	-	-
Sellulose[a]	30	O_2	93	7	87
Amilose	30	O_2	84	-	-
β-siklodekstrien	30	O_2	19	-	-
Dekstrien	30	O_2	57	28	65
Dekstrien	30	Argon	86	-	-
D-glukose	30	O_2	89	4	34
Dekstrien	KT	O_2	86	4.5	32
-	KT	O_2	100	-	-

[a]Oplossing tien maal meer gekonsentreer.

Uit hierdie studie blyk dat **dekstriene** die beste resultate lewer en het kontrole-eksperimente bevestig dat **suurstof** noodsaaklik vir omskakeling is. Hierbenewens is gevind dat alhoewel omskakeling by kamertemperatuur in die teenwoordigheid van dekstriene plaasvind, **hitte** die reaksie aansienlik versnel.

In 'n poging om vas te stel of oksidasie volgens 'n vryradikaal- of ioniese meganisme verloop, is 2,6-di-*ters*-butiel-*p*-kresol (gebutileerde hidroksitolueen, BHT) **(3)**, 'n bewese vryradikaalblusser[199], by aspalatien (**43a**) en dekstriene gevoeg en is die reaksiemengsel soos hierbo vir 6 dae by 30 °C in die teenwoordigheid van suurstof geroer. Geen (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien **(88a)** het volgens ^{1}H KMR-analise gevorm nie, wat sterk aanduidend van 'n **radikaalmeganisme** vir hierdie oksidatiewe proses is (SKEMA 19).

In teenstelling met die positiewe resultate verkry met dekstriene het mikrokristallyne sellulose, amilose, ß-siklodekstriene en D-glukose die oksidasie relatief tot die blanko geïnhibeer.

Die onderdrukking van die reaksie is moontlik rasionaliseerbaar in terme van die vorming van insluitingskomplekse. Dit is bekend dat ß-siklodekstriene (fig. 13) insluitingskomplekse met 'n verskeidenheid verbindings vorm en sodoende die substraat in die siklodekstrienholte steries teen suurstof kan beskerm.[200,201,202] Gevalle is egter ook bekend waar siklodekstriene oksidasiereaksies kataliseer.[203] Die lae herwinningspersentasie van aspalatien (**43a**) is aanduidend dat kompleksvorming wel plaasgevind het en laat ook die moontlikheid dat **(88a)** wel gevorm het, maar as 'n insluitingskompleks met ß-siklodekstrien gepresipiteer het.

Beide amilose (fig. 14) en dekstriene word in die voedsel- en farmaseutiese bedryf as stabiliseerders aangewend danksy die vermoë van hierdie verbindings om insluitingskomplekse met o.a. vitamien F[204], vitamien A[205], karotenoïede[206], lipiede[207] en sekere kinone[208] te vorm. Die helikskonformasie bly behoue met kompleksvorming.[209,210]

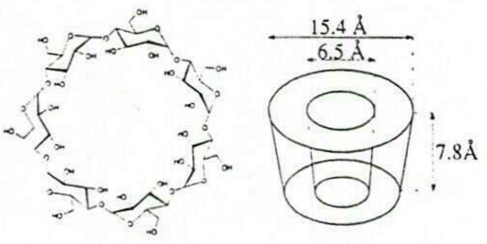


Fig. 13 Struktuur en molekulêre dimensies van ß-siklodekstrien.

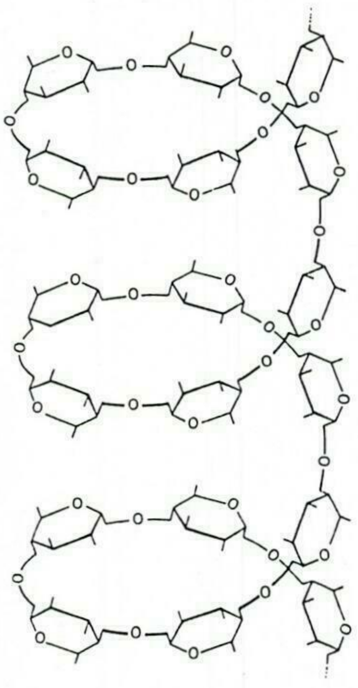


Fig. 14 Die helikskonformasie van α-amilose.

Die feit dat amilose ten spyte van die struktuurooreenkoms met dekstriene die omskakeling van aspalatien (**43a**) inhibeer, dui daarop dat die molekulêre grootte van die koolhidraat 'n belangrike rol speel.

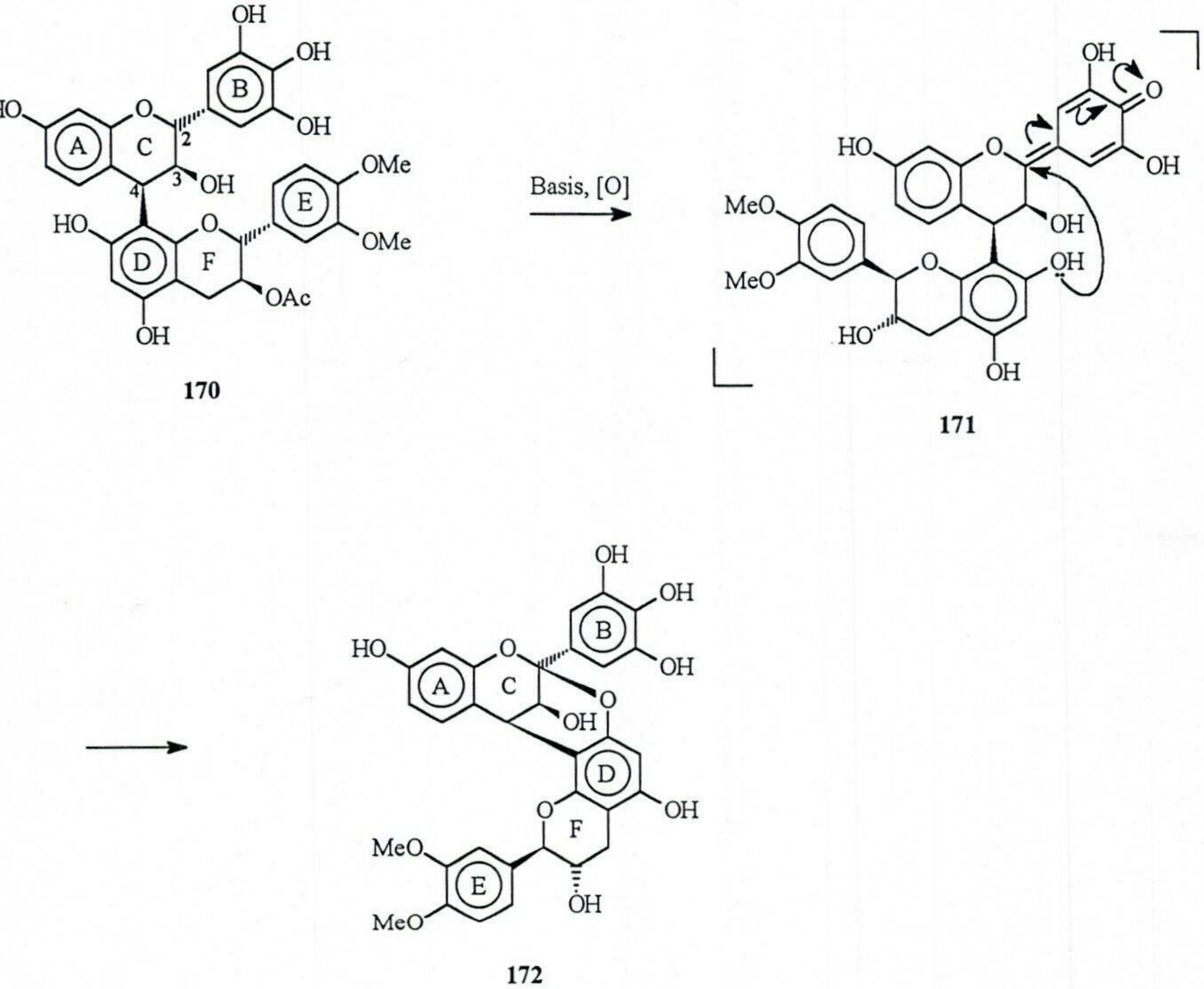
Hierbenewens dui die swak omskakeling van aspalatien (**43a**) in die teenwoordigheid van D-glukose (**130**) daarop dat katalise nie afhanklik van die funksionele groepe van die suiker is nie, maar dat die konformasie en molekulêre grootte van die koolhidraat die bepalende faktore is.

Dit wil dus voorkom asof die katalise van die reaksie deur dekstriene daaraan toegeskryf kan word dat oksidasie in die teenwoordigheid van suurstof plaasvind en dat die gevormde kinoonmetied (**159**) 'n gunstige oriëntasie vir siklisering (SKEMA 19, fig. 11) in die windings van die dekstrien-heliks aanneem.

Hierdie *in vitro* katalise van die oksidatiewe siklisering van aspalatien (**43a**) deur dekstriene vind waarskynlik ook tydens die verwerking van rooibos plaas deurdat α-amilase moontlik met die beskadiging van selle en organelle tydens die snyproses in aanraking met stysel kom en dit na dekstriene hidroliseer wat dan vir interaksie met aspalatien (**43a**) beskikbaar is.[211,212]

8.6 Die effek van oksideer- en reduseermiddels

Die vorming van die A-tipe prorobinetinidien (**172**) vanaf robinetinidol-(4ß,8)-katesjien-di-*O*-metieleter (**170**) in basiese media verloop volgens Cronjé[213] waarskynlik *via* die aanvanklike oksidatiewe verwydering van 'n hidriedioon by C-2 om die kinoonmetied (**171**) te lewer (SKEMA 20). Twyfel bestaan egter steeds of die oksideermiddel suurstof of 'n *orto*-kinoon, gevorm deur die aanvanklike oksidasie van die *orto*-dihidroksifunksionaliteit van die pirogallol B-ring, is.



SKEMA 20

a aanleiding hiervan is aspalatien (**43a**) by 40 °C en pH 10 aan reaksiekondisies soos in Tabel 8.2 ɪeengesit, blootgestel.

olgens TABEL 8.2 is dit duidelik dat suurstof noodsaaklik vir flavanoonvorming is, selfs wanneer die ksideermiddel *p*-bensokinoon (**174**) teenwoordig is. Die rede waarom *p*-bensokinoon (**174**) as ɪtalisator opgetree het en pirogallol (**177**) nie, kan verklaar word in terme van kompetisie tussen lg. en

aspalatien (**43a**) vir suurstof. Pirogallol (**177**) word vinnig in alkaliese waterige oplossings geoksideer[214] en die reaksiemengsel het inderdaad onmiddelik verbruin met die byvoeging van suurstof.

Tabel 8.2 Die oksidasie van aspalatien (**43a**) by pH 10 in die teenwoordigheid van potensiële oksideermiddels.

Poging	Potensiële oksideermiddels	Produkte[a]	
		Produkte	**% Opbrengs**
1a	-	**(131)** **(43c)**	17 5.7
1b	O_2[b]	**(131)** **(43c)**	5 1
2a	Pirogallol (**177**)[b]	**(43c)**	18
2b	Pirogallol (**177**)/O_2[b]	**(43c)**	11
3a	*p*-Bensokinoon (**174**)[b]	**(131)** **(43c)**	3 6
3b	*p*-Bensokinoon (**174**)/ O_2[b]	**(176)** **(40a)** **(39a)** **(88a)**	26 0.7 1.3 1

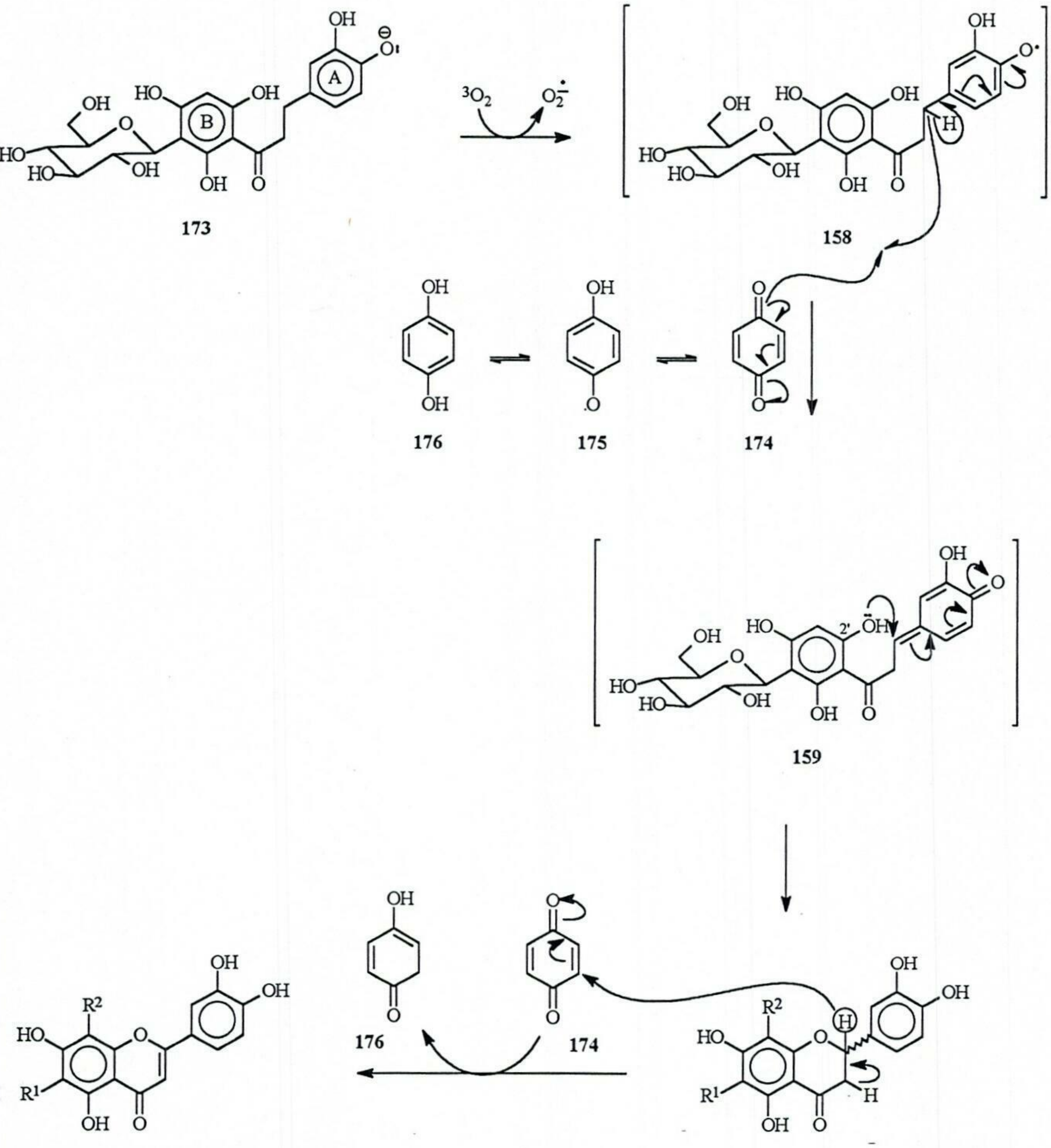
a In gevalle 1a, 1b, 2b en 3a is die reaksiemengsel na opwerk geasetileer.
b Bruin nie-identifiseerbare, hoogs wateroplosbare oksidasieprodukte het bykomend gevorm.
Langer reaksietye het tot die uitsluitlike vorming van onidentifiseerbare en hoogs polêre produkte gelei.

Cilliers *et al.*[215] het in 'n soortgelyke sisteem waarin kaffeïensuur (**76**) in die teenwoordigheid van suurstof geoksideer is, bevestig dat die fenolaatione 'n belangrike rol speel. Dit word aanvaar dat die fenolaatione noodsaaklik is om direk met triplet suurstof te reageer om *via* elektronoordrag 'n semikinoon en superoksied te vorm. Sodoende word die spinverbode interaksie van triplet suurstof met die singulet fenol vermy en word 'n geaktiveerde vorm van suurstof nie benodig nie. Dit dien as verdere steun vir 'n radikaalmeganisme tydens die oksidasie van aspalatien (**43a**) en is ook in ooreenstemming met die algemene opvatting dat autoksidasie van fenole met atmosferiese suurstof 'n vryradikaalmeganisme volg.[216]

Aangesien suurstof nodig is om die gewenste oksidatiewe siklisering van aspalatien (**43a**) in die teenwoordigheid van *p*-bensokinoon (**174**) te inisieer, kan gepostuleer word dat 'n fenoksiradikaal (**158**) eers *via* elektronoordrag aan $^3O_2$ gevorm word, waarna 'n waterstofatoom op die bensiliese posisie deur *p*-bensokinoon (**174**)[217] of die gevormde superoksiedioon verwyder sou kon word. Nukleofiele aanval op die gevormde kinoonmetied (**159**) vind 'n presedent in die werk van Cilliers *et al.*[215] en lei tot die vorming van flavanone (**88a** en **156**a) terwyl oksidasie van lg.* waarskynlik dehidrogenering deur *p*-bensokinoon (**174**) behels (SKEMA 21).[216]

Die vrystelling van D-glukose (**130**) in gevalle 1a, 1b en 3a kan aan oksidasie toegeskryf word en vind 'n presedent in die ferrichloriedoksidasie van aspalatien (**43a**), oriëntien (**39a**) en iso-oriëntien (**40a**) deur Koeppen en Roux.[96,97,100] Hierdie oksidasie vind in beide alkaliese en suur media plaas en behels waarskynlik die oordrag van 'n hidriedioon (SKEMA 22). Die waarneming dat hierdie oksidasie ook in ontgaste buffer sonder die byvoeging van 'n katalitiese hoeveelheid suurstof plaasgevind het, dui daarop dat suurstof nie volledig verwyder is nie.

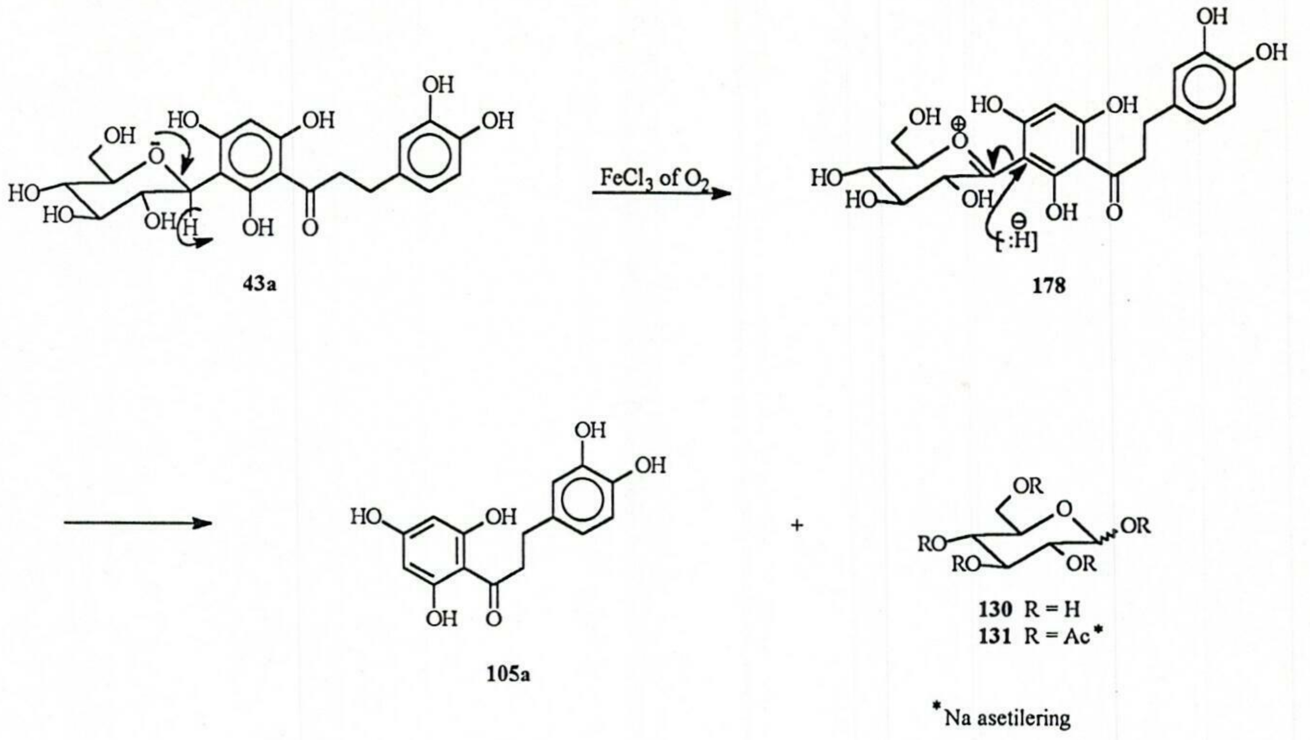
* Moontlik vorming van (**88a**), gevolg deur 'n Wesseley-Moser herrangskikking (sien par. 7.7) om ook (**156a**) te lewer of oksidasie van (**88a**) na (**40a**), gevolg deur 'n Wesseley Moser herrangskikking van (**40a**) om ook (**39a**) te lewer.



a R1 = H, R2 = C-C β-D-glukopiranosiel
a R1 = C-C β-D-glukopiranosiel, R 2 = H

88a R1 = C-C β-D-glukopiranosiel, R 2 = H
156a R1 = H, R2 = C-C β-D-glukopiranosiel

SKEMA 21

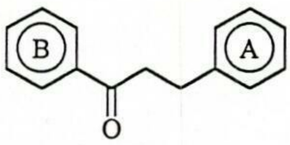


SKEMA 22

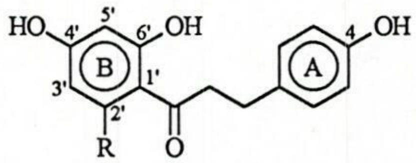
8.7 Algemene dihidrochalkoonchemie

8.7.1 Inleiding

Dihidrochalkone is een van die kleinste flavonoïedgroepe en nou verwant aan chalkone. Beide hierdie groepe is aromatiese ketone wat van die oorgrote meerderheid flavonoïede daarin verskil dat dit asiklies is.[218] Dihidrochalkoon (**179**) self is 'n seldsame voorbeeld van 'n natuurlike flavonoïed weens die afwesigheid van ring substituente, terwyl die glukosied floridsien (**180**) en die aglikoon daarvan, floretien (**181a**) van die bekendste dihidrochalkone is.[218]



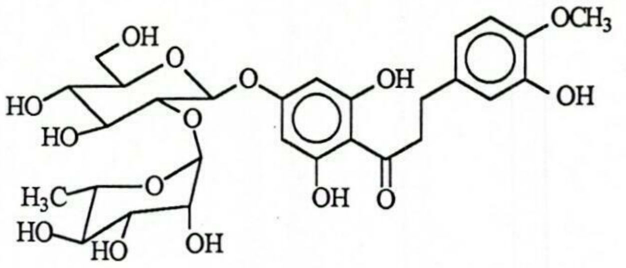
179



180 R = C-O β-D-glukopiranosiel
181a R = OH

In kontras met die relatiewe algemene voorkoms van *O*-glikosiede van dihidrochalkone, is *C*-glikosielderivate uiters skaars.[219-221] 'n Kombinasie van 'n *C*-glikosielverbinding en 'n dihidrochalkoon is dus 'n seldsame verskynsel en tot dusver is slegs twee gevalle, aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (**43a**)[96] en "nothofagin" (2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (**160a**)[222], beide met 3'-ß-D-*C*-glukopiranosielsubstituente, in die literatuur beskryf. Hierbenewens was die gepubliseerde verspreiding van genoemde dihidrochalkone tot op datum beperk tot slegs twee spesies, nl. aspalatien (**43a**) in *Aspalathus linearis* (rooibos) en "nothofagin" (**160a**) in *Nothofagus fusca*. "Nothofagin" (**160a**) is in hierdie ondersoek vir die eerste keer uit *Aspalathus linearis* (rooibos) geïsoleer.

Verdere gepubliseerde studies van dihidrochalkone is beperk tot die sintese daarvan vir struktuurbevestiging[219-221], die bestudering van die kristalstrukture van neohesperidiendihidrochalkoon (2',3,6'-tetrahidroksi-4-metoksi-4'-*O*-neohesperidosieldihidrochalkoon) (**182**) en floridsiendihidraat (**180**) om insig in die versoetende eienskappe van eersgenoemde en die inhibisie van "iodothyronine deiodinase" deur laasgenoemde te verkry[220,223] en laastens die bepaling van die fisiologiese aktiwiteit van 'n paar dihidrochalkone.[220,224-227]

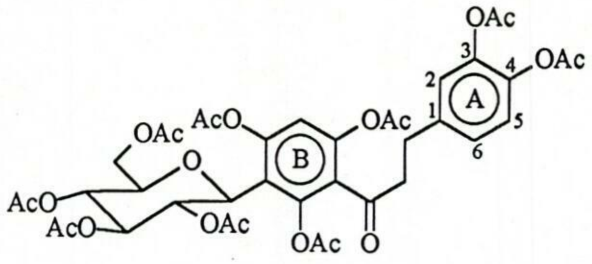


182

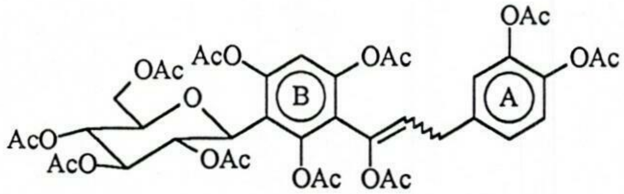
Dihidrochalkone word biosinteties moontlik deur die reduksie van die dubbelbinding van die ooreenstemmende chalkone gevorm, alhoewel 'n direkte poliketiedsintese vanaf dihidrokaneelsure nie uitgesluit kan word nie.[33]

8.7.2 Die invloed van die A-ring op enolisasie

Asetilering van aspalatien (**43a**) volgens die standaardmetode het 'n mengsel van die pergeasetileerde keto- (**43b**) en enolasetaatvorme (**43c**) gelewer[55]. Byvoeging van 'n katalitiese hoeveelheid triëtielamien het egter volledige omskakeling na die enolasetaat (**43c**) (KMR Plaat 37, Tabel 10) met tien asetoksigroepe [δ 2.14, 2.12, 2.10 (x2), 2.05, 2.03 (x2), 1.99 (x2), 1.85] bewerkstellig. Die α- (δ 3.05, 2H, t - swak gedefinieer) en ß-waterstowwe (δ 2.93, 2H, t - swak gedefinieer) van die ketoderivaat (**43b**) ($CDCl_3$)[55] was duidelik afwesig met die α-H (δ 5.40, 1H, t, J = 8.0 Hz) in hierdie geval aansienlik ontskerm weens konjugasie met die elektrononttrekkende asetoksigroep, terwyl die ekwivalente ß-waterstowwe as 'n doeblet (δ 3.34, 8.0 Hz) geresoneer het.

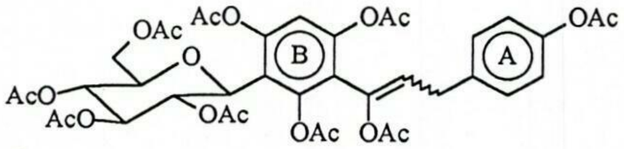


43b



43c

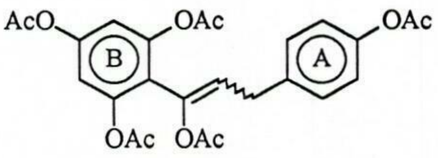
Daarenteen het asetilering van "nothofagin" (**160a**) volgens die standaardmetode uitsluitlik die pergeasetileerde enolasetaat (**160b**) (KMR Plaat 38, Tabel 10) met nege asetoksigroepe (δ 2.31, 2.23, 2.18, 2.12, 2.08, 2.07, 2.02, 2.00 en 1.97) gelewer. Die α-waterstof was weereens ontskerm (δ 5.51, t, J = 7.8 Hz), terwyl die ß-waterstowwe as 'n enkele doeblet (δ 3.38, J = 7.8 Hz) geresoneer het.



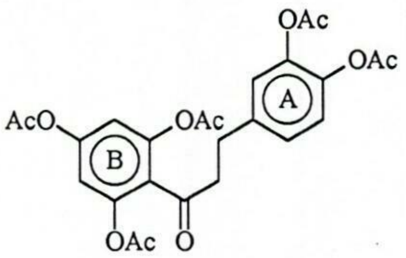
160b

Soortgelyke asetilering van 2',4,4',6'-tetrahidroksidihidrochalkoon (floretien) (**181a**) met asynsuuranhidried en piridien het tot die vorming van die ooreenstemmende enolasetaat (**181b**) gelei[97],

terwyl enolasetaatvorming afwesig in die geval van 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihidrochalkoon (3-hidroksifloretien) (**105a**) was.[97]



181b



105b

Uit hierdie gegewens wil dit voorkom asof die oksigeneringspatroon van die A-ring die gemak van enolisasie beïnvloed. Aangesien asetilering van die enol eers plaasvind nadat alle fenoliese hidroksigroepe geasetileer [byvoeging van die sterker basis, triëtielamien, was nodig om volledige omskakeling na die enolasetaat (**43c**) vanaf 'n mengsel van (**43b**) en (**43c**), gevorm deur die standaardasetilering van aspalatien (**43a**), te bewerkstellig] is en die gebrek aan konjugasie tussen die enol en die A-ring moontlike stabilisasie van die enolaat deur die induktiewe effek uitskakel[228], moet daar 'n ruimtelike interaksie tussen die A-ring en die karbonielgroep ter sprake wees. Die gemodelleerde voorkeurkonformasie van aspalatien (**43a**) (fig. 14) ondersteun bogenoemde moontlikheid. In sodanige voorkeurkonformasie kan 'n situasie gevisualiseer word waar afstoting tussen die karbonielgroepe van die dihidrochalkoon basisskelet en 3-OAc teenwoordig is met gevolglike inhibisie van die vorming van 'n

negatief gelaaide enolaat sodat 'n sterker basis en/of meer energie benodig word om volledige enolaatvorming en dus enolasetilering van die 3,4-digeasetileerde derivate van genoemde dihidrochalkone, te bewerkstellig.

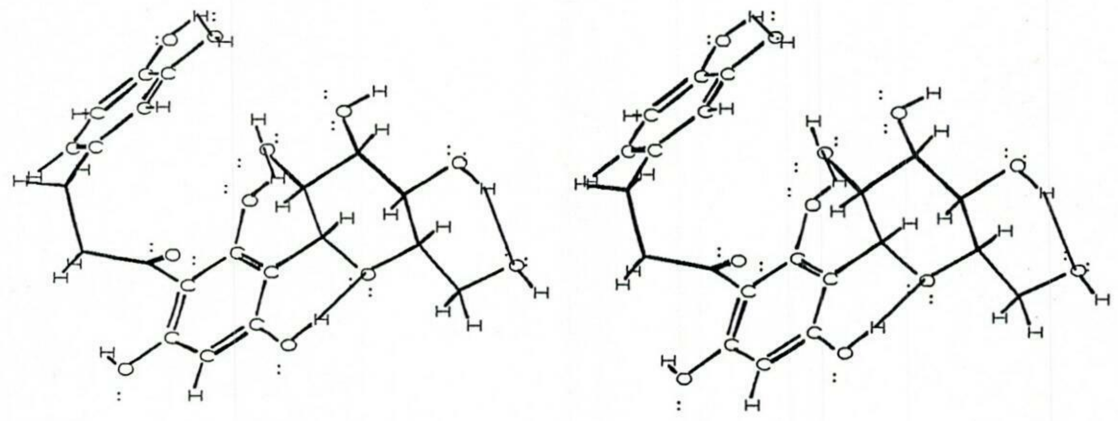


Fig. 14 Driedimensionele voorstelling van die gemodelleerde (PC Model) voorkeurkonformasie van aspalatien (**43a**).

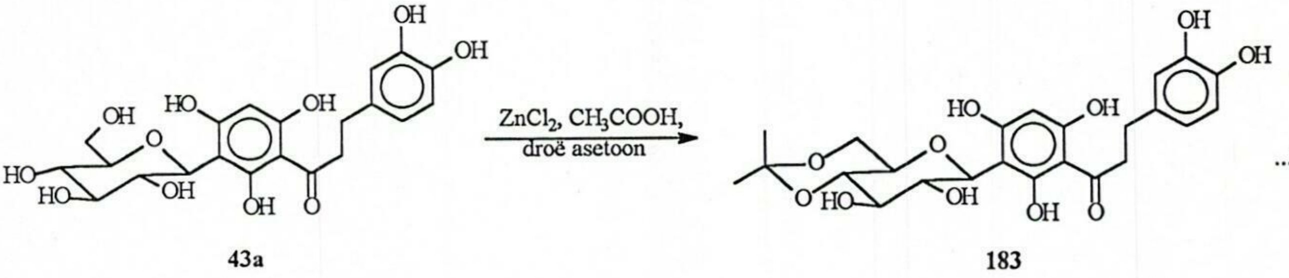
8.7.3 Die isolasie en sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (183)

'n Nuwe derivaat van aspalatien (**43a**), 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (**183**), is uit 'n fraksie van onverwerkte rooibos geïsoleer.

Die ^{1}H KMR-spektrum van (**183**) (Plaat 36, Tabel 9) het groot ooreenkomste met dié van aspalatien (**43a**) (Plaat 34, Tabel 9) getoon met die grootste verskille die chemiese verskuiwings van H-2" (δ 3.93

versus 3.64), H-4" (δ 3.79 *versus* 3.62) en H-6" (δ 3.90 en 3.82 *versus* 3.84), asook die teenwoordigheid van twee addisionele metielresonansies(δ 1.49, 1.33).

Die struktuur is bevestig deur die bereiding van die titelverbinding vanaf aspalatien (**43a**) en asetoon in die teenwoordigheid van sinkchloried en asynsuur as katalisatore (reaksie 28).[229]



...28

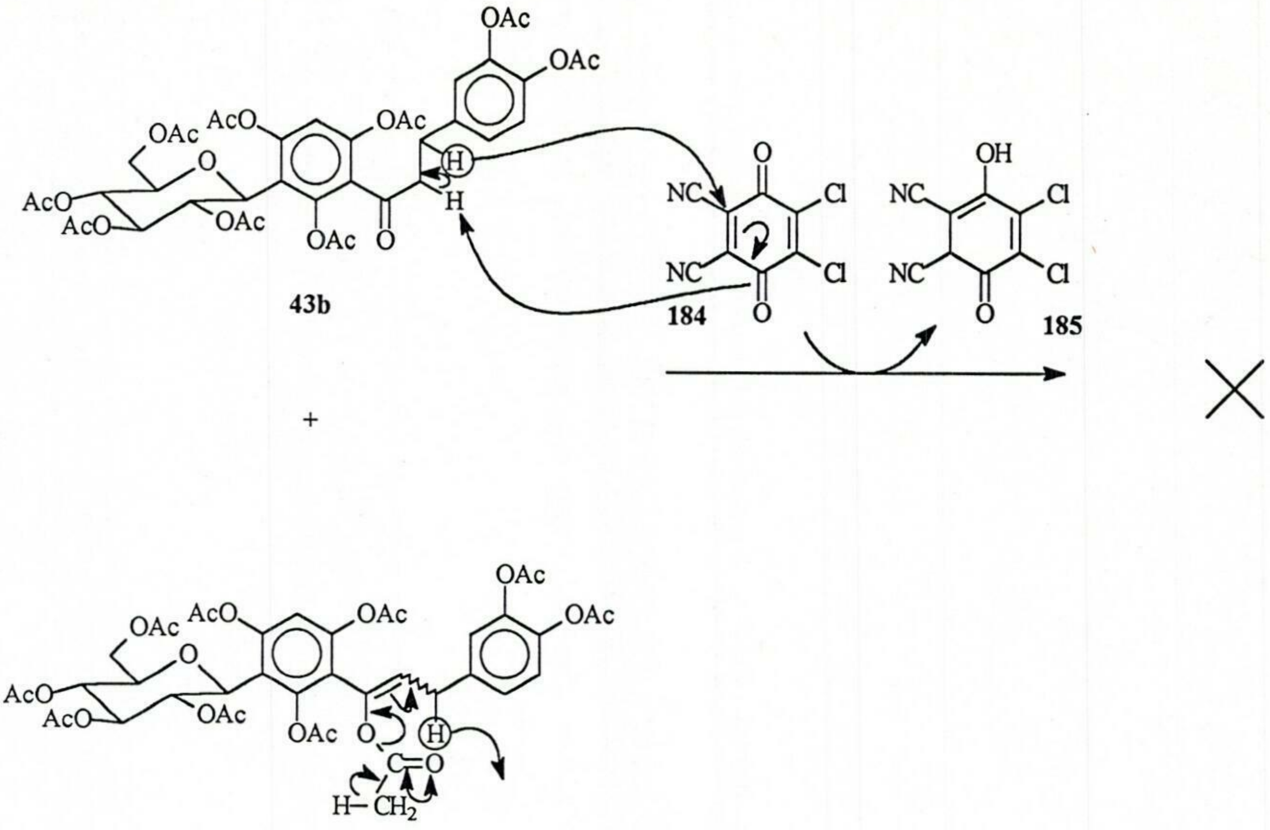
Die regioselektiwiteit van die reaksie kan eerstens daaraan toegeskryf word dat reaksie met asetoon nie in die geval van *trans*-visinale hidroksifunksies kan plaasvind nie, wat asetaalvorming vir alle ander suikerhidroksipare uitsluit[230], en tweedens daaraan dat alifatiese hidroksigroepe aansienlik meer basies as fenoliese hidroksigroepe is (die pKa van CH_3OH is 15.2, 16 vir RCH_2OH, 16.5 vir R_2CHOH en 17 vir R_3COH, terwyl dit 8-11vir ArOH is).[231]

Aangesien hierdie verbinding met gemak vanaf aspalatien (**43a**) en asetoon in die teenwoordigheid van suur as katalisator gesintetiseer kon word, bestaan die moontlikheid dat dit 'n artefak is. In 'n poging om te bepaal of bogenoemde verbinding tydens die isolasieproses sou kon vorm, is aspalatien (**43a**) en 'n ekwivalente hoeveelheid protokatesjoësuur (**72a**), 'n suur teenwoordig in rooibos, in asetoon opgelos en by kamertemperatuur gelaat. DLC-analise het aangetoon dat selfs na drie maande geen omskakeling na die isopropilideenderivaat (**183**) plaasgevind het nie en is dit dus onwaarskynlik dat omskakeling langs

hierdie weg tydens die isolasieproses met kortstondige blootstelling aan asetoon, sou kon vorm. Die vorming van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (**183**) vanaf aspalatien (**43a**) in die teenwoordigheid van ander natuurlike rooibossure kan egter nie sonder meer uitgeskakel word nie.

8.7.4 Pogings om geskikte aspalatienderivate vir dehidrogering te vind

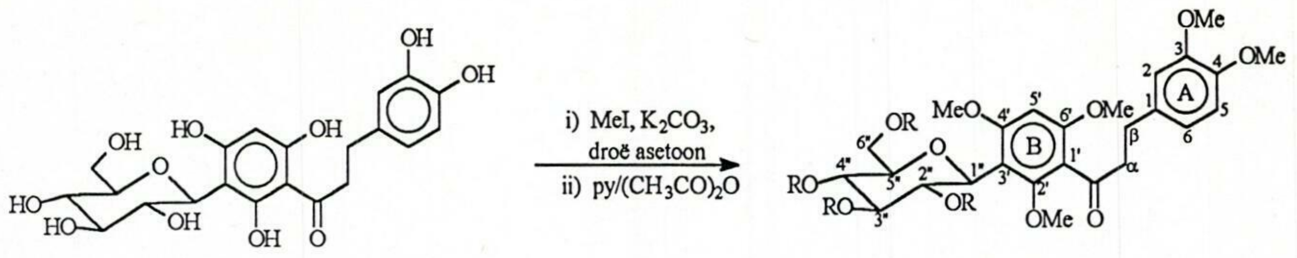
'n Poging om 'n mengsel van nona- (**43b**) en deka-*O*-asetielaspalatien (**43c**) met die bekende dehidrogeneringsreagens, 2,3-dichloro-5,6-disiano-1,4-bensokinoon (DDQ) (**184**), te dehidrogeneer[232] was onsuksesvol, moontlik weens die deaktivering van die A-ring deur die asetoksigroepe en die onvermoë daarvan om die vormende karbokatioon op die ß-posisie met hidriedioonoordrag aan DDQ, te stabiliseer (SKEMA 23).[233-236]



43c

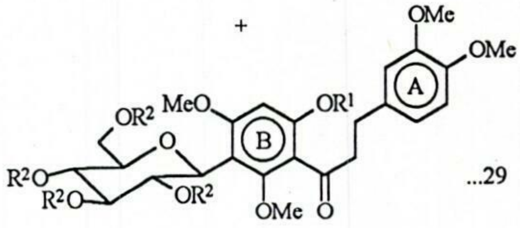
SKEMA 23

As alternatief is besluit om aktiverende in plaas van deaktiverende beskermende groepe te gebruik. Hierbenewens is besluit om die hidroksigroep *peri* ten opsigte van die karboniel (2'-OH en/of 6'-OH) onbeskermd te laat ten einde siklisering ná chalkoonvorming te bewerkstellig. In die lig hiervan is gepoog om aspalatien (**43a**) selektief met MeI en K_2CO_3 in droë asetoon te metileer.[166,167] Die hoofproduk uit die reaksie was egter die penta-*O*-metielderivaat (**186a**), terwyl slegs klein hoeveelhede tetra-*O*-metielaspalatien (**187a**) geïsoleer is (reaksie 29).



43a

186a R = H
b R = Ac



...29

187a $R^1 = R^2 = H$
b $R^1 = Ac, R^2 = H$

Beide fraksies is geasetileer en die ^1H KMR-spektrum van die penta-*O*-metielderivaat na asetilering (**186b**) (Plaat 73, Tabel 19) was 'n replika van dié van outentieke 2',3,4,4',6'-penta-*O*-metiel-3'-(2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (**186b**).[55]

N.O.e-assosiasies tussen 3-OMe (δ 3.55) en H-2 (δ 6.80, 15 %), sowel as tussen 4-OMe (δ 3.51) en H-5 (δ 6.67, 10 %) is waargeneem en het identifikasie van die A-ring metoksigroepe moontlik gemaak. Hierbenewens het H-1" (δ 5.02) met 2'-OMe (δ 3.75, 2 %) sowel as die A-ring metoksigroepe (δ 3.55, 1 %, en δ 3.51, 1 %) geassosieer, terwyl H-5' (δ 5.89) met twee ander B-ring metoksigroepe (δ 3.41 en 3.19, beide 3.5 %) geassosieer het. Bogenoemde dui soos in par. 5.5 op 'n voorkeurkonformasie waarin 4'-OMe om die O-C-as weg van die steries lywige suikersubstituent georiënteer is, terwyl 2'-OMe na die suikersubstituent weg van die steries lywige *peri*-karbonielgroep gerig is. Hierbenewens dui die assosiasie van H-1" met die A-ring metoksigroepe daarop dat hierdie derivaat van aspalatien (**43a**), soos

die vryfenoliese vorm (fig. 14) 'n voorkeurkonformasie aanneem waarin die A-ring in die nabyheid van die B-ring voorkom.

Die ^{1}H KMR-spektrum van die asetaat van die tetra-*O*-metielderivaat (**187b**) (Plaat 72, Tabel 19) het die teenwoordigheid van vier metoksigroepe (δ 3.69, 3.70, 3.52 en 3.48) en vyf asetoksigroepe [δ 2.05, 1.75 (x2), 1.66, 1.48], waarvan een aromaties was (δ 2.05), bevestig.

In 'n n.O.e-eksperiment het 4-OMe (δ 3.48) met H-5 (δ 6.67, 4 %) en 3-OMe (δ 3.70) met H-2 (δ 6.83, 7 %) geassosieer, terwyl al vier metoksigroepe (δ 3.70, 3.69, 3.52, 3.48) ingesluit die twee A-ring metoksigroepe (δ 3.69, 3.52), met H-1" (δ 4.94; 0.9 %, 5 %, 2 % en 1 %, respektiewelik) geassosieer het. Dit bevestig dat hierdie derivaat van aspalatien (**43a**) 2'-asetoksi-3,4,4',6'-tetrametoksi-5'-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (2'-*O*-asetiel-3,4,4',6'-tetra-*O*-metielaspalatien) (**187b**) is.

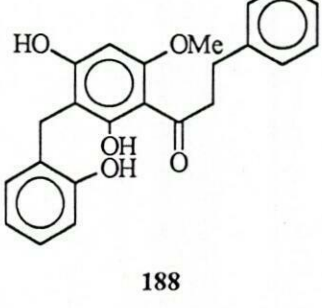
Soos in die geval van (**186b**) is daar dus vir die tetrametieleterasetaat (**187b**) ook duidelike assosiasies van beide die A-ring en B-ring metoksigroepe met H-1" waargeneem, wat weereens bevestig het dat 'n voorkeurkonformasie aangeneem word waarin die A-ring in die nabyheid van die B-ring voorkom.

Aangesien geen betekenisvolle selektiwiteit met bogenoemde metode bereik is nie, is besluit om op chalkoonbereiding te konsentreer en beide aromatiese en alifatiese hidroksigroepe deur metilering te beskerm, waarna beplan is om die ooreenstemmende enolasetaat of silielenol deur die toepassing van palladiumchemie te dehidrogeneer.[237-240]

Aspalatien (**43a**) is dus aan dimetielsulfaat en kaliumkarbonaat in droë asetoon blootgestel[241], maar 'n verskeidenheid van gedeeltelik gemetileerde fraksies het na selfs langdurige blootstelling nie verder gemetileer nie. Aangesien meer drastiese reaksiekondisies soos die gebruik van *aq*. natriumhidroksied nie oorweeg kon word nie weens die gevaar van epimerisasie[242], is (a) dimetielsulfaat in die teenwoordigheid van bariumhidroksiedoktahidraat en bariumoksied in 'n mengsel van droë DMSO en DMF[243] en (b) metieljodied en silweroksied in droë DMF[244] as alternatiewe probeer. In beide gevalle is onvolledige metilering verkry, moontlik weens die teenwoordigheid van waterstofbindings tussen die suikerhidroksigroepe (fig. 14).

8.7.5 Fisiologiese aktiwiteit

Verskeie dihidrochalkone besit antimikrobiese aktiwiteit[224-226], terwyl die dihidrochalkoon "uvaretin" (**188**) ook antitumor aktiwiteit[227] besit. Die gebruik van dihidrochalkoonderivate as versoetmiddels geniet ook wye aandag en studies in die verband het hoofsaaklik op die aard van die aktiewe sentrum van die reseptore vir soet smaak en dus op strukturele eienskappe wat noodsaaklik is vir die ideale "pas" van die aktiewe verbinding in die reseptorholte, hoofsaaklik konformasie, A-ring substitusiepatroon en die hidrofobiese/hidrofiliese eienskappe van die B-ring, gefokus.[246-248] Hierdie onderwerp is in 'n vorige studie breedvoerig bespreek.[55]



188

Soos reeds in par. 5.9 bespreek, is dihidrochalkone meer potente anti-oksidante as die ooreenstemmende chalkone.[21] Vorige navorsers kon egter geen verklaring hiervoor bied nie. In die lig van Skema's 10 (par. 5.9) en 21 (par. 8.6) is dit egter duidelik dat dihidrochalkone, in teenstelling met chalkone, tydens oksidasie nie net fenoksiradikale nie, maar ook flavanone en flavone met potensiële anti-oksiderende aktiwiteit, vorm. In hierdie ondersoek is gedemonstreer dat aspalatien (**43a**) hoogs oksideerbaar is en alhoewel geen formele toetse vir anti-oksiderende aktiwiteit van hierdie verbinding gedoen is nie, kan met stelligheid gekonstateer word dat aspalatien (**43a**) met oksidasie o.a. die aglikoon 3-hidroksifloretien (**105a**)* (Skema 22), wat wel anti-oksiderend is,[21] lewer. Aspalatien (**43a**) speel klaarblyklik nie net 'n sleutelrol in die "fermentasie" van die rooibos met gevolglike ontwikkeling van die organoleptiese gehalte van die produk nie, maar lewer ook 'n direkte of indirekte [*via* 3-hidroksifloretien (**105a**)] bydrae tot die bewese anti-oksiderende eienskappe (par. 2.2.2) van hierdie veelsydige produk.

8.7.6 Opsomming

Hierdie studie verteenwoordig die eerste bydrae tot die unieke chemie van dihidrochalkone asook die rol van dihidrochalkone in die biosintese van flavonoïede en werp vir die eerste keer lig op die aard van veranderinge tydens die verwerking van rooibos.

Daar is gedemonstreer dat aspalatien (**43a**) in die teenwoordigheid van suurstof en lig of hitte oksidatief sikliseer om die flavanone (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) en (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-oriëntien (**156a**), wat met verdere oksidasie die flavone, iso-oriëntien (**40a**) en oriëntien (**39a**) vorm, te

---

* Sien par. 5.9.

lewer. Flavanoonvorming vanaf dihidrochalkone was tot dusver onbekend en plaas dihidrochalkone onmiddelik in perspektief in die biosintese van flavonoïede.

Getuienis dui daarop dat die omskakeling van aspalatien (**43a**) in die teenwoordigheid van beide ultravioletlig en hitte 'n fenoksiradikaal (**158**) vorm, waarna die verwydering van 'n bensiliese waterstofatoom die ooreenstemmende kinoonmetied (**159**) lewer en nukleofiele aanval deur 2'-OH op die kinoonmetied (**159**) die verlangde flavanone lewer.

Die aanname deur produsente van rooibostee dat sonlig noodsaaklik vir die verwerking van rooibos is, is dus slegs gedeeltelik waar, aangesien hitte-energie sonder die teenwoordigheid van ultravioletlig dieselfde proses onderhou. Dit beteken dus dat kwaliteit rooibostee inderdaad onder streng gekontroleerde kondisies moontlik is, met die voordeel dat verwerking selfs in swak weersomstandighede, dag en nag, dwarsdeur die jaar voortgesit kan word.

Die waargenome *in vitro* katalise van die oksidatiewe siklisering van aspalatien (**43a**) deur dekstriene vind waarskynlik ook tydens die verwerking van rooibos plaas deurdat α-amilase moontlik met die beskadiging van selle en organelle tydens die snyproses in aanraking met stysel kom en dit na dekstriene hidroliseer wat dan vir interaksie met aspalatien (**43a**) beskikbaar is. Soortgelyke *in vivo* katalise van die oksidatiewe siklisering na die vrystelling van ensieme met die snyproses is *in vitro* met lakkase gemodelleer.

EKSPERIMENTEEL

HOOFSTUK 9

STANDAARD EKSPERIMENTELE METODES

9.1 CHROMATOGRAFIESE METODES

9.1.1 Papierchromatografie[249]

Twee-dimensionele (2D) papierchromatogramme is op Whatman nr. 1 papier (28.5 x 46 cm) met waterversadigde butan-2-ol (eerste rigting) en 'n 2 % (v/v) asynsuuroplossing (tweede rigting), agtereenvolgens, ontwikkel.

9.1.2 Dunlaagchromatografie (DLC)

Kwalitatiewe dunlaagchromatogramme is op "Merck TLC-plastic sheets: Silika Gel 60 F_{254}" uitgevoer. Alle Rf-waardes verwys na kwalitatiewe DLC-ondersoeke.

Glasplate (20 x 20 cm) bedek met Kieselgel (Merck PF_{254}, 1.0 mm) en gedroog by kamertemperatuur is ongeaktiveerd vir preparatiewe DLC gebruik. Die belading was 10 - 15 mg per plaat. Mikroskeidings is op "Merck precoated TLC plates: Silika Gel PF_{254}" (0.25 mm), met 'n maksimum belading van 2.5 mg per plaat, uitgevoer. Na ontwikkeling is die plate by kamertemperatuur in 'n vinnige lugstroom gedroog, die bande deur middel van sproeireagense en u.v.-lig (254 nm) onderskei, afgeskraap en die silika met 50 % (v/v) asetoon-metanol geëlueer, waarna die oplosmiddel *in vacuo* by kamertemperatuur met 'n Büchi "rotary evaporator" verwyder is.

9.1.3 Kolom- (KC) en mediumdrukkolomchromatografie (MPLC)

Kolomchromatografiese skeidings is op kolomme van verskillende groottes en teen verskillende vloeitempo's (soos aangedui) op Sephadex LH-20, Fractogel, mikrokristallyne sellulose, sellulose MN 300 en silika (Merck Kieselgel 60, 230 - 400 maas) uitgevoer. Mediumdrukkolomchromatografie is met 'n Büchi mediumdruksisteem op Lichroprep RP-18 en sellulosetriasetaat (besonderhede word telkens gespesifiseer) uitgevoer. Fraksies is met 'n ISCO (Model 272) outomatiese versamelaar versamel en oplosmiddels is *in vacuo* met 'n Büchi "rotary evaporator" by kamertemperatuur verwyder. In gevalle waar water as elueermiddel gebruik is, is die fraksies na oordeelkundige kombinasie van proefbuise met 'n Virtis 12 SL vriesdroër gevriesdroog.

9.1.4 "Flash" -kolomchromatografie (FKC)

Silika (Merck Kieselgel 60, 230- 400 maas) is as 'n suspensie in die betrokke elueermiddel, styf in 'n glaskolom gepak deur met druk (verkry van 'n N_2-silinder) alle lug uit die silika te pers. Die monster is in 'n minimum hoeveelheid elueermiddel opgelos en met 'n pasteurpipet op die silika-oppervlak aangewend, waarna die kolombed met 'n wattepluisie beskerm is en die kolom onder N_2-druk ontwikkel is. Fraksies is met die hand in proefbuise opgevang en na DLC-analise oordeelkundig gekombineer. Oplosmiddels is *in vacuo* by kamertemperatuur met 'n Büchi "rotary evaporator" verwyder.

9.1.5 "High performance liquid chromatography" (HPLC)

HPLC-fraksionering is met 'n Beckmann HPLC, toegerus moet 'n 80 *ul* loep, uitgevoer. Pieke is by 254 nm waargeneem en deur 'n Beckmann integreerder geïntegreer. Skeiding is met 'n Phenomenex Sperisorb 10 ODS 2 kolom (250 x 10.0 mm, 10 mikron) by kamertemperatuur bewerkstellig. 'n Konkawe metanol - 2 % *aq.* mieresuurgradiënt vanaf 20 % metanol tot 80 % metanol oor 60 min. (0.5 cm^3/min.) het goeie skeiding gelewer. Alle oplosmiddels was HPLC-graad en is voor gebruik *in vacuo* ontgas.

9.1.6 Sproeireagense

9.1.6.1 Formaldehied-swawelsuur[250]

Silika dunlaagchromatogramme is liggies met 'n 2 % (v/v) oplossing van formaldehied in gekonsenteerde swawelsuur gesproei en tot optimum kleurontwikkeling verhit.

9.1.6.2 Ammonialkaliese silwernitraat[251]

Silwernitraat (4 g) is in gedistilleerde water (50 cm^3) opgelos, waarna 'n gekonsentreerde ammoniakoplossing bygevoeg is totdat die gevormde silweroksied net verdwyn het. Nadat die twee-dimensionele papierchromatogramme liggies met hierdie oplossing gesproei is, is dit met gedistilleerde water (3 x) gewas. Die oormaat reagens is met 'n 1 % (m/v) natriumtiosulfaatoplossing vernietig. Alle oormaat chemikalieë is verwyder deur die chromatogramme vir *ca.* 15 minute onder lopende kraanwater te spoel, waarna die chromatogramme by kamertemperatuur gedroog is.

9.1.6.3 Bis-gediasoteerde bensidien[252,253]

Bensidien (5 g) is in gekonsentreerde soutsuur (14 cm^3) opgelos en by gedistilleerde water (980 cm^3) gevoeg. Papierchromatogramme is liggies met 'n varsbereide mengsel van bensidien en 'n 10 % natriumnitrietoplossing (3:2, v/v) gesproei en vir *ca.* 15 minute onder lopende kraanwater gewas.

9.2 CHEMIESE METODES

9.2.1 Metilering met diasometaan[254]

Die fenoliese materiaal (100 mg, tensy anders vermeld) is in metanol (*ca.* 40 cm^3) opgelos en tot -15 °C afgekoel. Diasometaan, ontwikkel deur die reaksie van kaliumhidroksied (5 g) in 'n 95 % (v/v)

etanoloplossing met *N*-metiel-*N*-nitroso-*p*-tolueensulfoonamied (15 g) in eter (100 cm^3), is stadig in die voorafbereide monsteroplossing gestook. Die reaksiemengsel is vir 48 uur by -15 °C gelaat, waarna die oormaat diasometaan en oplosmiddel in 'n vinnige lugstroom by kamertemperatuur verwyder is.

9.2.2 Asetilering[255]

Die droë fenoliese materiaal is in 'n minimum hoeveelheid droë piridien opgelos, waarna asynsuuranhidried (*ca.* 1:1, v/v, piridien en asynsuuranhidried) bygevoeg is. Nadat die reaksiemengsel vir *ca.* 12 uur onder droë toestande by 30 °C verhit is, is dit by 'n yskoue versadigde *aq.* NaCl-oplossing (20 cm^3) gevoeg en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer. Die gekombineerde etielasetaatfases is oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gefiltreer en gekonsentreer.

9.3 DROGING VAN REAGENSE[256]

9.3.1 Asetoon

Asetoon is oornag oor droë K_2CO_3 gelaat, waarna gedekanteer en die asetoon vir 24 uur oor molekulêre siwwe in 'n N_2-atmosfeer gerefluks en voor gebruik gedistilleer is.

9.3.2 Dimetielformamied (DMF), triëtielamien, tetrametieletileendiamien (TMEDA), dichlorometaan en 1,2-dichloroëtaan

Dimetielformamied, triëtielamien, TMEDA, dichlorometaan en 1,2-dichloroëtaan is oor CaH_2 onder N_2 gerefluks totdat geen opbruising meer plaasgevind het wanneer NaH by 'n toetsmonster gevoeg is nie en net voor gebruik gedistilleer.

9.3.3 Heksaan, benseen en tetrahidrofuraan (THF)

Heksaan, benseen en THF (bevattende bensofenoon) is onder N_2 oor Na gerefluks totdat bensofenoon 'n blou kleur aangeneem het.

9.3.4 Piridien

Piridien is oor KOH in 'n dig verseëlde fles gestoor.

9.3.5 Metanol

Fraksioneel gedistilleerde metanol (50 cm^3) is by Mg (1 g) en jodium (0.1 g) gevoeg en verhit totdat die jodium opgebruik was en waterstofvrystelling gestaak het, waarna addisionele metanol (200 cm^3) bygevoeg is. Nadat vir 1 uur gerefluks is, is die metanol in die teenwoordigheid van stikstof gedistilleer en oor molekulêre siwwe gestoor.

9.3.6 Dimetielsulfoksied (DMSO)

DMSO is vir 24 uur onder argon oor CaH_2 gelaat, waarna dit fraksioneel gedistilleer is (111 °C, 11.25 mmHg) en onder N_2 oor molekulêre siwwe gestoor is.

9.4 STANDAARDISASIE VAN n-BUTIELLITIUM (n-BuLi) IN HEKSAAN[257]

THF (3 cm^3) en 2,2'-bipiridien (10 mg, 0.064 mmol) is in 'n rondebolfles (10 cm^3) tot 0 °C afgekoel. Met die byvoeging van 'n oplossing van n-BuLi in heksaan (1 cm^3) het die reaksiemengsel 'n dieprooi kleur aangeneem. Die oplossing is met 2-butanol getitreer tot by 'n omslagpunt van donker oranje/geel. Die prosedure is drie keer herhaal en die gemiddelde volume 2-butanol is gebruik om die konsentrasie n-BuLi te bereken.

9.5 SPEKTROMETRIESE EN SPEKTROSKOPIESE METODES

9.5.1 Kernmagnetiese resonansspektrometrie (KMR)

^{1}H en ^{13}C KMR-spektra is in 'n verskeidenheid gedeuterieerde oplosmiddels met 'n Bruker AM-300 FT spektrometer afgeneem. Chemiese verskuiwings is in dele per miljoen (d.p.m.) op die δ-skaal uitgedruk en koppelingskonstantes (J) is in Hz gegee. Die volgende afkortings is gebruik: s - singulet, d - doeblet, t - triplet, k - kwartet, m - multiplet, dd - doeblet van doeblette en O - oplosmiddel of onsuiwerheid.

9.5.2 Massaspektrometrie (MS)

Massaspektra en akkurate massabepalings is op 'n Kratos MS-80 massaspektrometer met dubbele fokus volgens die chemiese ionisasie (CI)- of elektronimpak (EI)-tegnieke, soos gespesifiseer, afgeneem. "Fast atom bombardment" (FAB) spektra is afgeneem op 'n VG 70-70E instrument met 'n VG 11-250J datasisteem en "iontech saddlefield FAB gun".

9.5.3 Infrarooispektroskopie (IR)

Infrarooispektra is in chloroform of volgens die KBr-skyfie metode met 'n Unicam SP 1000 spektrofotometer afgeneem.

9.5.4 Sirkulêre dichroïsme (SD)

SD-kurwes is in metanol met 'n Jasco J-710 spektropolarimeter verkry.

9.5.5 Ultravioletspektroskopie (UV)

Ultravioletspektra is met 'n Hitachi 150-20 of 'n GBC UV/VIS 916 spektrofotometer, toegerus met 'n kuvethouer waardeur water gesirkuleer kan word vir temperatuurbeheer, afgeneem.

9.6. SMELTPUNTE

'n Reichert Thermopan mikroskoop met 'n Koffler "hot stage" is gebruik om smeltpunte te bepaal en die waardes word ongekorrigeerd aangegee.

9.7 OPTIESE ROTASIE $[\alpha]_D$

Optiese rotasies is met 'n Jasco DIP-370 polarimeter bepaal.

9.8 FOTOCHEMIE

Fotochemiese reaksies is in 'n Rayonet fotochemiese reaktor uitgevoer.

9.9 AFKORTINGS

Die volgende afkortings is deurgaans vir oplosmiddels en reagense gebruik:

A = Asetoon	n-BuLi = n-Butiellitium
B = Benseen	DCM = Dichlorometaan
C = Chloroform	DMF = Dimetielformamied
E = Etielasetaat	DMAP = Dimetielaminopiridien
H = Heksaan	DMSO = Dimetielsulfoksied
	EtOH = Etanol

MeOH = Metanol

THF = Tetrahidrofuraan

TMEDA = Tetrametieletileendiamien

HOOFSTUK 10

DIE ISOLASIE VAN METABOLIETE UIT ROOIBOSTEE

10.1 Ekstraksie van die plantmateriaal

Kommersiële plantmateriaal voorsien deur Rooibostee Natuurlike Produkte (600 g) is vir 30 min. in gedistilleerde water (3 dm^3) gekook terwyl voortdurend geroer is. Nadat die tee vir *ca.* 17 uur by kamertemperatuur gelaat is, is gedekanteer, gefiltreer en die filtraat gevriesdroog om 'n rooibruin vaste stof (49 g) te lewer.

Die gevriesdroogde materiaal (43.6 g) is vir 6.5 uur kontinu met chloroform (3 dm^3) in 'n Soxhlet-apparaat geëkstraheer, waarna die chloroform-onoplosbare materiaal in 'n lugstroom by kamertemperatuur gedroog is. Hierdie residu (85 g)* is vir 20 min. in etanol (2 dm^3) by 60 °C geroer en nadat dit vir 48 uur in 'n donker kas gelaat is, *in vacuo* gefiltreer. Die filtraat is *in vacuo* gekonsentreer om 'n rooibruin vaste stof (4.3 g) te lewer.

10.2 Fraksionering

Kolomchromatografiese fraksionering van die etanol-ekstrak (45.7 g)* [Sephadex LH-20, 90.5 x 6 cm, 17 cm^3/proefbuis; EtOH - 6 770 cm^3, 10 % (v/v) MeOH:EtOH - 1 550 cm^3 en 50 % (v/v) A:MeOH - 5 470 cm^3, opeenvolgend] het ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies gelewer:

* Verkry deur verskeie herhalings van die ekstraksieprosedure.

* Verkry deur verskeie herhalings van die ekstraksieprosedure.

Fraksie	Proefbuise	Massa (g)
AF1	1 - 38	1.83
2	39 - 62	4.28
3	63 - 86	7.40
4	87 - 119	4.49
5	120 - 218	6.29
6	219 - 414	8.37
7	415 - 532	2.91

Fraksies AF3, 4 en 5 is op grond van twee-dimensionele papierchromatografiese analise verder bestudeer.

10.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol][42] (68a)

Etanol (5 cm^3) is by fraksie AF3 (7.40 g) gevoeg en nadat dit vir ongeveer 5 min. geroer is, is gefiltreer. Die presipitaat is met etanol (3 x 3 cm^3), gevolg deur metanol (2 x 3 cm^3) gewas om (+)-pinitol (**68a**) as wit naalde na herkristallisasie (MeOH) (1.19 g) te lewer; Spt. 184-186 °C, (lit.[258] 185-186 °C), $[\alpha]_D$ = +67° (9 mg/ml, H_2O), lit.[258] $[\alpha]_D$ = +64.8° [c, 1.0 (H_2O)], **IR**[40] ν^{KBr} cm^{-1}: 3 406, 3 322 (O-H) , 1 284, 1 251, 1 194, 1 128 en 1 104 (C-O) en 2 956 en 2 908 (C-H)

^{1}H KMR - Plaat 1, Tabel 1

MS SKEMA 1 (CI) - *m/z* 195 (MH^+, 100 %), 177 (MH^+ - H_2O, 19), 159 (MH^+ - 2 H_2O, 8), 145 (MH^+ - H_2O - MeOH, 13) 127 (MH^+ - 2 H_2O - MeOH, 63).

'n Deel van die geïsoleerde fraksie (55.5 mg) is volgens die standaardmetode geasetileer om penta-*O*-asetiel-(+)-pinitol (**68b**) as 'n wit amorfe vaste stof (110 mg, 95 %) te lewer.

KMR: ^{1}H KMR - Plate 2 en 3, ^{13}C: Plaat 4 (Asetoon-d_6) - δ_C (d.p.m.) $CH_3\underline{C}OO$ (170.24, 170.21 en 169.85), $\underline{C}H_3COO$ (20.67, 20.55 en 20.47), -O-$\underline{C}$H en -O$\underline{C}$H3 (79.40, 71.67, 71.44, 69.99, 68.28, 68.16 en 60.86)

MS SKEMA 2 (CI)- *m/z* 405 (MH^+, 8), 373 (MH^+ - MeOH, 26) en 345 (MH^+ - CH_3COOH, 100 %)

MS SKEMA 2 (CI)- *m/z* 405 (MH^+, 8), 373 (MH^+ - MeOH, 26) en 345 (MH^+ - CH_3COOH, 100 %)

Die etanoloplosbare deel van fraksie AF3 (6.21 g) is ná *in vacuo* konsentrasie met KK [Fractogel, 50.5 x 6 cm, 13 cm^3/proefbuis; EtOH - 4 510 cm^3 en 50 % (v/v) A:water - 2 000 cm^3, opeenvolgend] gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF3F1	**1 - 44**	**93**
2	**45 - 58**	**1 807**
3	**59 - 68**	**333**
4	**69 - 76**	**84**
5	**77 - 193**	**1 125**
6	**194 - 347**	**804**
7	**348 - 501**	**1 960**

10.2.1.1 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (93a)

Subfraksie AF3F1 (93 mg) is volgens die standaardmetodes gemetileer en geasetileer, waarna DLC-skeiding (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) die metieleterasetaatderivaat (**93b**) van *bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**) as 'n amorfe wit vaste stof[111] gelewer het.

^{1}H KMR[259]: Plaat 5

10.2.1.2 Subfraksie AF3F2

Subfraksie AF3F2 (1870 mg) is met KK (mikrokristallyne sellulose, 50 x 3.5 cm, 25 cm^3/proefbuis; H_2O - 1 150 cm3 en MeOH - 2 000 cm3, opeenvolgend) gefraksioneer om na oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie en/of vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF3F2F1	**1 - 43**	**999**
2	**44 - 74**	**502**
3	**75 - 84**	**61**
4	**85 - 123**	**122**
5	**124 - 166**	**25**

Subfraksie AF3F2F2 is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

10.2.1.2.1 Subfraksie AF3F2F2

Die hoogs komplekse subfraksie AF3F2F2 (502 mg) is met MPLC [Lichroprep RP-18, 5 - 20 μm, 45 x 2 cm, 18 bar, 2.5 cm^3/min., 16 cm^3/proefbuis, 20 % tot 80 % (v/v) MeOH-water-gradiënt - 2 800 cm^3] gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise (DLC-analise) en *in vacuo* konsentrasie gevolg deur vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF3F2F2F1	**1 - 14**	**390**
2	**15 - 16**	**9**
3	**17 - 18**	**12**
4	**19 - 27**	**25**
5	**28 - 30**	**11**
6	**31 - 160**	**45**

Subfraksies AF3F2F2F2, 3 en 5 is op grond van DLC-analise vir verdere ondersoek geselekteer.

10.2.1.2.1 (a) *p*-Hidroksibensoësuur (71) en vanilliensuur (4-hidroksi-3-metoksibensoësuur) (73)[55,56]

Subfraksie AF3F2F2F2 (9 mg) is met DLC (B:A 9:1, v/v, H^+) gesuiwer om *p*-hidroksibensoësuur (**71**) (Rf 0.55, 2 mg) en vanilliensuur (**73**) (Rf 0.66, 1 mg) as wit amorfe vaste stowwe te lewer.

^{1}H KMR: Plate 6 en 7, Tabel 3

10.2.1.2.1 (b) Vanilliensuur (4-hidroksi-3-metoksibensoësuur)[55,56] (73) en seringsuur (4-hidroksi-3,5-dimetoksibensoësuur) (74)

Subfraksie AF3F2F2F3 (12 mg) is op soortgelyke wyse met DLC (B:A 9:1, v/v, H^+) gesuiwer om vanilliensuur (**73**) (Rf 0.66, 1.5 mg) en seringsuur (**74**) (Rf 0.42, 1.7 mg) as wit amorfe vaste stowwe te lewer.

^{1}H KMR: Plate 7 en 8, Tabel 3

10.2.1.2.1 (c) *p*-Kumaarsuur (4-hidroksikaneelsuur) (75a) en feruliensuur (4-hidroksi-3-metoksikaneelsuur) (77a)

Subfraksie AF3F2F2F5 (11 mg) is volgens die standaardmetode geasetileer en met DLC (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) gefraksioneer om 4-*O*-asetiel-*p*-kumaarsuur (4-asetoksikaneelsuur) (**75b**) (Rf 0.43, 0.5 mg) en 4-*O*-asetielferuliensuur (4-asetoksi-3-metoksikaneelsuur) (**77b**) (Rf 0.4, 1.5 mg) as wit amorfe vaste stowwe te lewer.

^{1}H KMR: Plate 9 en 10, Tabel 3

10.2.1.3 Subfraksie AF3F5

Subfraksie AF3F5 (1.13 g) is met KK (Sellulose MN 300, 15 x 4 cm, 11 cm^3/proefbuis, H_2O - 2 030 cm^3 en MeOH - 500 cm^3, agtereenvolgens) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en vriesdroging en/of *in vacuo* konsentrasie die volgende subfraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF3F5F1	**1 - 16**	**680**
2	**17 - 32**	**289**
3	**33 - 124**	**62**
4	**125 - 171**	**92**

Subfraksie AF3F5F4 is op grond van DLC-analise vir verdere ondersoek geselekteer.

10.2.1.3.1 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (93a)

Subfraksie AF3F5F4 (92 mg) is volgens die standaardmetode gemetileer, waarna DLC-skeiding (B:A:M 8:1:1, v/v) subfraksie 1 (Rf 0.53, 1.5 mg) gelewer het. Lg. is volgens die standaardmetode geasetileer om 'n verdere monster van die metieleterasetaatderivaat **(93b)** van *bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien **(93a)** as 'n wit amorfe vaste stof[111] (1.6 mg) te lewer.

^1H KMR[259]: Plaat 5

10.2.1.4 Subfraksie AF3F6

Subfraksie AF3F6 (804 mg) is met MPLC (Lichroprep RP-18, 5 - 20 µm, 45 x 2 cm, 18 bar, 2.5 cm^3/min., 16.5 cm^3/proefbuis; 20 % (v/v) MeOH:water - 5 940 cm^3, 40 % (v/v) MeOH:water - 1 470 cm^3, 60 % (v/v) MeOH:water - 2 190 cm^3, 80 % (v/v) MeOH:water - 2 760 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise (DLC-analise) en *in vacuo* konsentrasie en/of vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF3F6F1	**1 - 80**	**268**
2	**81 - 426**	**10**
3	**427 - 430**	**15**
4	**431 - 750**	**49**

Subfraksies AF3F6F1 en 3 is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

10.2.1.4.1 (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (116a)

Subfraksie AF3F6F1 is volgens die standaardmetode gemetileer en met DLC (B:A:M 4:5:1, v/v) gefraksioneer om subfraksie 1 (Rf 0.4, 7.4 mg) te lewer. Asetilering en daaropvolgende DLC-skeiding (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) het die metieleterasetaat (**116b**) van (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropenoësuur (**116a**) as 'n *geel olie* (Rf 0.57, 4.4 mg), gelewer; gevind: M^+, 508.1579, $C_{24}H_{28}O_{12}$ vereis M, 508.1581.

KMR: ^{1}H KMR - Plaat 11, Tabel 4, ^{13}C - Plaat 12 (Asetoon-d_6) - δ_C (d.p.m.) $CH_3\underline{C}OO$- (170.55, 170.34, 170.09 en 169.94), $\underline{C}H_3COO$- (20.70, 20.64, 20.59, 20.53 en 20.42), C-1 (164.51), C-2 (141.39), C-1' (133.80), C-2' en C-6' (131.62), C-3', C-4' en C-5' (130.13 en 129.23), C-3 (126.09), C-1" (99.69), C-3" (73.22), C-2" en C-5" (72.63, 72.48), C-4" (69.29), C-6" (62.41) en -$O\underline{C}H_3$ (52.64), DEPT - Plaat 13, HETCOR - Plaat 14, COLOC (300 MHz) - Plaat 15, COLOC (500 MHz) - Plaat 16.
MS SKEMA 3 (CI): *m/z* 331 (55), 271 (15), 229 (3), 211 (10), 179 (21), 169 (100 %)
(EI): *m/z* 178 (13), 163 (0.2), 119 (13), 118 (54), 91 (60 %)

10.2.1.4.2 *Bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (93a)

Subfraksie AF3F6F3 is as *bis*-fisetinidol-(4ß,6:4ß,8)-katesjien (**93a**), 'n amorfe rooibruin vaste stof• (15 mg), geïdentifiseer.

• Outentieke monster: J.F.W. Burger, Departement Chemie, UOVS, Bloemfontein.

^1H KMR: Plaat 17, Tabel 2

SD Plaat 1 : $[\Phi]_{304}$ -146, $[\Phi]_{291}$ -14 790 , $[\Phi]_{287}$ -10 420, $[\Phi]_{279}$ -20 390, $[\Phi]_{256}$ -2 701, $[\Phi]_{250}$ - 3 392, $[\Phi]_{246}$ -21, $[\Phi]_{241}$ +20 530, $[\Phi]_{234}$ +1 648.

10.2.2 Fraksie AF4

Fraksie AF4 (4.49 g) is met KK (mikrokristallyne sellulose, 61 x 3.5 cm, 13 cm^3/proefbuis, EtOH) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende subfraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (g)*
AF4F1	**1 - 6**	**3.04**
2	**62 - 80**	**0.51**
3	**81 - 127**	**0.25**

Subfraksie AF4F3 is op grond van DLC-analise vir verdere ondersoek geselekteer.

10.2.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol] (68a)

Metanol (5 x 1 cm^3) is porsiegewys by subfraksie AF4F3 (252 mg) gevoeg, waarna telkens gefiltreer is om (+)-pinitol (**68a**) as wit naalde na herkristallisasie (MeOH) (11 mg) te lewer; Spt. 184-186 °C, (lit.[258] 185-186 °C), $[\alpha]_D$ = +67° (9 mg/ml, H_2O), lit.[258] $[\alpha]_D$ = +64.8° [c, 1.0 (H_2O)], **IR**[40] ν^{KBr} cm^{-1}: 3 406, 3 322 (O-H) , 1 284, 1 251, 1 194, 1 128 en 1 104 (C-O) en 2 956 en 2 908 (C-H).

^1H KMR - Plaat 1, Tabel 1

MS SKEMA 1 (CI) - *m/z* 195 (MH^+, 100 %), 177 (MH^+ - H_2O, 19), 159 (MH^+ - 2 H_2O, 8), 145 (MH^+ - H_2O - MeOH, 13) 127 (MH^+ - 2 H_2O - MeOH, 63).

Die filtraat is *in vacuo* gekonsentreer en volgens die standaardmetode gemetileer, waarna die gemetileerde mengsel (176 mg) met KK (Kieselgel 60, 22.5 x 2 cm, 10 cm^3/proefbuis; B:A:M 6:3:1, v/v - 800 cm^3 en 50 % (v/v) A:MeOH - 500 cm^3, agtereenvolgens) gefraksioneer is. Alle fraksies wat uit die skeiding gespruit het, is direk geasetileer.

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa van metieleterasetate (mg)*
AF4F3MeF1	**1 - 2**	**5.8**
2	**3 - 6**	**49.9**
3	**7 - 9**	**10.7**
4	**10 - 11**	**1.9**
5	**12 - 27**	**79.7**
6	**28 - 130**	**27.3**

Die geasetileerde subfraksies AF4F3MeF1, 3 en 5 is op grond van DLC-analise verder geanaliseer.

10.2.2.1.1 Protokatesjoësuur (3,4-dihidroksibensoësuur) (72a)

Subfraksie AF4F3MeF1Ac (5.8 mg) is met DLC (B:A 9:1, v/v) gesuiwer om metiel-3,4-dimetoksibensoaat (**72b**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.63, 1.2 mg) te lewer. Fisiese data was in ooreenstemming met die van 'n monster verkry deur die standaardmetilering van outentieke protokatesjoësuur (**72a**).

^{1}H KMR: Plaat 18, Tabel 3

10.2.2.1.2 *N*-metieluridien-2',3',5'-triasetaat [*N*-metiel-1-(2,3,5-tri-*O*-asetiel-ß-D-ribofuranosiel)-2,4-pirimidioon] (94c)

Subfraksie AF4F3MeF2Ac (49.9 mg) is met DLC (H:E:A 60:25:25, v/v) gefraksioneer, waarna die Rf 0.35 band (9.8 mg) verder gesuiwer is (DLC H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, 2x) om *N*-metieluridien-2',3',5'-triasetaat (**94c**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.44 in H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, 1.2 mg) te lewer.

KMR: ^{1}H KMR - Plaat 19, Tabel 5, COSY - Plaat 20

10.2.2.1.3 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-3',4',5-tri-*O*-metielluteolien-7-*O*-glukosied [3',4',5-trimetoksi-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)flavoon] (82b)

Subfraksie AF4F3MeF3Ac (10.7 mg) is met DLC (H:E:A 60:25:25, v/v, 2x) gesuiwer om 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5-tri-*O*-metielluteolien-7-*O*-glukosied[77] (**82b**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.09 in H:E:A 60:25:25, v/v, 1.0 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plate 21 en 22, Tabel 6
MS SKEMA 4 (EI) - *m/z* 331 (7), 328 (89), 299 (30), 285 (4), 169 (80), 166 (2), 152 (6), 133 (6 %).

10.2.2.1.4 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien [4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (84b)[55,56], 5,7-dimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)chromoon (85b) en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielviteksien [4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (83b)[55,56]

Subfraksie AF4F3MeF5Ac (79.7 mg) is met DLC (H:E:A 60:25:25, v/v, 3x) gefraksioneer om drie bande te lewer. Die eerste en laaste bande is onderskeidelik as 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien (**84b**), 'n wit amorfe vaste stof[55,56] (Rf 0.34 in H:E:A 60:25:25, v/v, 0.4 mg), en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielviteksien (**83b**) (Rf 0.04 in H:E:A 60:25:25, v/v, 1 mg), ook 'n wit amorfe vaste stof[55,56], geïdentifiseer. 5,7-Dimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)chromoon (**85b**) is hierbenewens as 'n *wit amorfe vaste stof* (Rf 0.26 in H:E:A 60:25:25, v/v, 1.7 mg) geïsoleer; **IR** $\nu^{chloroform}$ cm^{-1}: 3 420, 2 932, 1 650 (CO) en 1 470.

^{1}H KMR: Plate 23, 24 en 25, Tabel 7
MS SKEMA 5 (CI) - *m/z* 537 (MH^{+}, 100 %), 509 (14), 495 (4), 477 (9) en 435 (3)

10.2.3 Fraksie AF5

Fraksie AF5 (6.29 g) is met KK (mikrokristallyne sellulose, 74 x 3.5 cm, 16 cm^3/proefbuis, gedistilleerde water) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (g)*
AF5F1	**1 - 99**	**4.52**
2	**100 - 280**	**1.00**
3	**281 - 524**	**0.25**

Subfraksie AF5F2 is op grond van DLC-analise verder geanaliseer.

10.2.3.1 Subfraksie AF5F2

'n Deel van subfraksie AF5F2 (300 mg) is volgens die standaardmetodes gemetileer en geasetileer, waarna die gederivatiseerde fraksie (335 mg) met FKC (58 X 2.2 cm, 15.5 cm^3/proefbuis; C:A 8:2, v/v - 990 cm^3) gefraksioneer is om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer.

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
AF5F2MeAcF1	**1 - 11**	**23.5**
2	**12 - 19**	**33.0**
3	**20 - 30**	**9.5**
4	**31 - 64**	**126.0**

Subfraksies AF5F2MeAsF2 en 4 is op grond van DLC-analise vir verdere ondersoek geselekteer.

10.2.3.1.1 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien [4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (84b)[55,56] en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieliso-oriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-flavoon] (40b)[99]

Subfraksie AF5F2MeAcF2 (33.0 mg) is met DLC (H:E:A 60:25:25, v/v, 2x) gefraksioneer om 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisoviteksien (**84b**) (Rf 0.38 in H:E:A 60:25:25, v/v, 0.8 mg) en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieliso-oriëntien (**40b**) (Rf 0.28 in H:E:A 60:25:25, v/v, 3.3 mg) as wit amorfe vaste stowwe te lewer.

^{1}H KMR: Plate 23 en 26, Tabel 7

10.2.3.1.2 2",3",4",6"-Tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metiel-oriëntien [3',4',5,7-tetrametoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)flavoon] (39b)[99]

Subfraksie AF5F2MeAcF4 (126 mg) is met DLC (B:A:M 7:2:1, v/v) gesuiwer om 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metieloriëntien (**39b**) as liggeel naalde (DMSO)* (Rf 0.41, 10.3 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 27, Tabel 7

10.3 Herondersoek van verwerkte rooibos

Etanol-ekstrak (par. 10.1, 16.5 g) is met KK (Sephadex LH-20, 125 x 5 cm, 9 cm^3/proefbuis; EtOH - 6 000 cm^3 en 50 % (v/v) A:water - 2 000 cm^3, agtereenvolgens) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

* Smeltpunt nie bepaal nie weens ontbinding.

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
VAF1	**1 - 30**	**157**
2	**31 - 34**	**80**
3	**35 - 52**	**706**
4	**53 - 74**	**1 071**
5	**75 - 94**	**844**
6	**95 - 138**	**3 004**
7	**139 - 188**	**1 026**
8	**189 - 218**	**393**
9	**219 - 246**	**457**
10	**247 - 299**	**401**
11	**300 - 365**	**4 474**
12	**366 - 399**	**731**
13	**400 - 436**	**559**
14	**437 - 482**	**2 074**
15	**483 - 497**	**229**
16	**498 - 515**	**320**
17	**516 - 531**	**144**
18	**532 - 574**	**177**
19	**575 - 797**	**421**

Ten einde oorvleueling met die vorige ondersoek tot 'n minimum te beperk en met inagneming van die potensiaal van die ru-fraksies op grond van 2D papierchromatografiese analise, is fraksies VAF8, 9, 10, 11 en 14 vir verdere ondersoek geselekteer.

10.3.1 Subfraksie VAF8

Subfraksie VAF8 (393 mg) is in gedistilleerde water (50 cm^3) opgelos en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer. Die organiese laag is oor $MgSO_4$ gedroog en *in vacuo* gekonsentreer, waarna die ekstrak (111 mg) met KK (Sephadex LH-20, 51 x 2 cm, 13 cm^3/proefbuis, 50 % (v/v) EtOH-water - 2 120 cm^3) gefraksioneer is om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie ses fraksies, waarvan slegs fraksie VAF8F4 verder ondersoek is, te lewer.

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
VAF8F1	**1 - 12**	**2.6**
2	**13 - 20**	**11.4**
3	**21 - 28**	**2.8**
4	**29 - 98**	**6.8**
5	**99 - 117**	**1.9**
6	**118 - 163**	**2.0**

10.3.1.1 3',4',5,7-Tetra-*O*-asetielluteolien [3',4',5,7-tetra-asetoksiflavoon] (38c)

Subfraksie VAF8F4 (6.8 mg) is volgens die standaardmetode geasetileer en met DLC (H:E:A 5:3:2, v/v, 2x) gefraksioneer om 3',4',5,7-tetra-*O*-asetielluteolien (**38c**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.56, 1.5 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 28, Tabel 6

10.3.2 Subfraksie VAF9

Subfraksie VAF9 (457 mg) is soos fraksie VAF8 met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer, waarna die organiese fase *in vacuo* gekonsentreer is en die waterlaag gevriesdroog is.

10.3.2.1 Etielasetaat-ekstrak

Die etielasetaat-ekstrak (150 mg) is met KK (Sephadex LH-20, 51 x 2 cm, 3 cm^3/proefbuis, 50 % (v/v) EtOH:water - 930 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
VAF9F1	1 - 10	19.0
2	11	14.0
3	12 - 14	18.4
4	15 - 18	31.7
5	19 - 22	17.5
6	23 - 28	14.6
7	29 - 32	5.2
8	33 - 36	5.8
9	37 - 79	16.1
10	80 - 92	2.2
11	93 - 114	0.7
12	115 - 310	4.5

Fraksie VAF9F10 is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

10.3.2.1 (a) Chrisoeriol [4',5,7-trihidroksi-3'-metoksiflavoon] (81)[55,56]

Subfraksie VAF9F10, 'n geel amorfe vaste stof (2.2 mg), is as chrisoeriol (**81**)[55] geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 29, Tabel 8

10.3.2.2 Water-ekstrak

Die waterekstrak (150 mg) is ook met KK (Sephadex LH-20, 52 x 2 cm, 13 cm^3/proefbuis, 50 % (v/v) EtOH:water - 1 550 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
VAF9F1 (H_2O)	1 - 11	5.8
2	12	11.3
3	13 - 16	37.0
4	17 - 19	12.6
5	20 - 45	9.8
6	46 - 122	4.5

Subfraksie VAF9F4 (H_2O) is op grond van 2D papierchromatografiese analise verder ondersoek.

10.3.2.2 (a) Uridien [1-ß-D-ribofuranosiel-2,4-pirimidioon] (94a)

Subfraksie VAF9F4 (H_2O) (12.6 mg) is geasetileer en met DLC (H:E:A 5:3:2, v/v) geskei om uridien-2',3',5'-triasetaat (**94b**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.29 in H:E:A 5:3:2, 3.8 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plate 30 en 31, Tabel 5

10.3.3 Subfraksie VAF10 (H_2O)

Subfraksie VAF10 (401 mg) is soos fraksies VAF8 en 9 met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer, waarna die etielasetaat-ekstrak (343 mg) met KK (Sephadex LH-20, 56 x 2 cm, 13 cm^3/proefbuis, 50 % (v/v) EtOH:water - 3 750 cm^3) gefraksioneer is om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
VAF10F1 (H_2O)	**1 - 20**	**44.3**
2	**21 - 24**	**18.8**
3	**25 - 30**	**9.4**
4	**31 - 36**	**38.3**
5	**37 - 48**	**122.6**
6	**49 - 126**	**40.8**
7	**127 - 134**	**2.1**
8	**135 - 289**	**2.9**

Fraksies VAF10F5 en 8 (H_2O) is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

10.3.3.1 "Nothofagin" [2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (160a)[222]

Subfraksie VAF10F5 (H_2O), 'n geel amorfe vaste stof (122.6 mg), is as "nothofagin" [2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (**160a**) geïdentifiseer.

^{1}**H KMR**: Plaat 32, Tabel 9

10.3.3.2 Luteolien (3',4',5,7-tetrahidroksiflavoon) (38a)[26]

Subfraksie VAF10F8 (H_2O), 'n geel amorfe vaste stof (2.9 mg), is as luteolien (**38a**)[55] geïdentifiseer.

^{1}**H KMR**: Plaat 33, Tabel 8

10.3.4 Aspalatien [2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (43a)

Ekstraksie van subfraksie VAF11 (4.47 g) met etielasetaat op 'n wyse soortgelyk aan dié vir fraksies VAF8, 9 en 10 het ná *in vacuo* konsentrasie aspalatien (**43a**) as 'n geel amorfe vaste stof[55,260] (1.22 g) gelewer.

^{1}**H KMR**: Plaat 34, Tabel 9

10.3.5 Subfraksie VAF14

Subfraksie VAF14 (2.07 g) is in gedistilleerde water (50 cm^3) opgelos en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer, waarna die organiese lae oor $MgSO_4$ gedroog en *in vacuo* gekonsentreer is. Die etielasetaatekstrak (155 mg) is met KK (Sephadex LH-20, 54 x 2 cm, 3 cm^3/proefbuis, 50 % (v/v) EtOH:H_2O - 600 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	Proefbuise	Massa (mg)
VAF14F1	1 - 9	3.6
2	10 - 16	25.3
3	17 - 26	23.4
4	27 - 50	66.9
5	51 - 128	21.0
6	129 - 197	10.2

Subfraksies VAF14F4 en 6 is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

10.3.5.1 Aspalatien [2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon] (43a)

Subfraksie VAF14F4 is as aspalatien (**43a**)[55,260], 'n geel amorfe vaste stof (66.9 mg), geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 34, Tabel 9

10.3.5.2 Kwersitien (3',4',5,7-tetrahidroksiflavonol) (37a)[26]

Subfraksie VAF14F6 is as kwersitien (**37a**)[55], 'n geel amorfe vaste stof (10.2 mg) geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 35, Tabel 8

HOOFSTUK 11

DIE ISOLASIE VAN METABOLIETE UIT ONVERWERKTE ROOIBOS

11.1 Ekstraksie van die plantmateriaal

Die naaldagtige groen blaartjies van gedroogde onverwerkte plantmateriaal voorsien deur Rooibostee Natuurlike Produkte, is van die takke gestroop (1.95 g) en met metanol (6 dm^3) vir 48 uur by kamertemperatuur geëkstraheer. Ná dekantasie is die ekstrak by 20 °C *in vacuo* gekonsentreer. Die donkergroen metanol-ekstrak is in gedistilleerde water (7.5 dm^3) opgelos en met chloroform (3 x 3 dm^3) geëkstraheer, waarna die waterfase gevriesdroog is om 'n geel amorfe vaste stof (120.5 g) te lewer.

'n Deel van die waterekstrak (40 g) is vir 24 uur in etanol (250 cm^3) geroer, waarna gefiltreer en die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is, in 'n minimum hoeveelheid water (500 cm^3) opgelos en gevriesdroog is om 'n liggeel amorfe vaste stof (20 g) te lewer.

11.2 Fraksionering

Kolomchromatografiese skeiding (Sephadex LH-20, 126 x 5 cm, 20 cm^3/proefbuis; EtOH - 8 000 cm^3, 80 % (v/v) EtOH:MeOH - 1800 cm^3, 60 % (v/v) EtOH:MeOH - 2 300 cm^3 en 50 % (v/v) A:water - 2 000 cm^3, opeenvolgend) van die etanol-ekstrak (18 g) het ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies gelewer:

Fraksie	Proefbuise	Massa (mg)
GAF1	1 - 43	198
2	44 - 54	1 555
3	55 - 92	2 245
4	93 - 147	1 194
5	148 - 293	5 838
6	294 - 341	569
7	342 - 420	201
8	421 - 500	343
9	501 - 703	2 983

Die hoofdoel van hierdie ondersoek was om gramhoeveelhede van die dihidrochalkoon aspalatien (**43a**) te isoleer en is daar op grond van 2D papierchromatografiese analise op fraksie GAF5 gefokus. Hierbenewens was die besondere ligroos kleur van sekere bande in fraksie GAF7 wanneer DLC-plate met 2% (v/v) formaldehied in gekonsentreerde swawelsuur gesproei is, vreemd aan tipiese rooibos metaboliete en is hierdie fraksie ook bestudeer. Die rooi, stroperige fraksie GAF3 is ondersoek met die oog op die isolasie van suikers en/of inositole.

11.2.1 (+)-Pinitol [3-*O*-metiel-D-*chiro*-inositol] (68a)

Fraksie GAF3 (2.25 g) is in metanol (6 cm^3) geroer, waarna gefiltreer en die presipitaat met addisionele metanol (3 x 10 cm^3) gewas is. Herkristallisasie (MeOH) van die presipitaat het (+)-pinitol (**68a**) as wit naalde (1.09 g) gelewer; Spt. 184-186 °C, (lit.[258] 185-186 °C), $[\alpha]_D$ = +67° (9 mg/ml, H_2O), lit.[258] $[\alpha]_D$ = +64.8° [c, 1.0 (H_2O)], **IR**[40] ν^{KBr} cm^{-1}: 3 406, 3 322 (O-H) , 1 284, 1 251, 1 194, 1 128 en 1 104 (C-O) en 2 956 en 2 908 (C-H).

^{1}H KMR - Plaat 1, Tabel 1

MS SKEMA 1 (CI) - *m/z* 195 (MH^+, 100 %), 177 (MH^+ - H_2O, 19), 159 (MH^+ - 2 H_2O, 8), 145 (MH^+ - H_2O - MeOH, 13) 127 (MH^+ - 2 H_2O - MeOH, 63).

11.2.2 Fraksie GAF5

Fraksie GAF5 (5.84 g) is met KK (Sephadex LH-20, 108 x 5 cm, 9 cm^3/proefbuis; 50 % (v/v) EtOH:water en EtOH:H_2O:A 1:1:2, (v/v), opeenvolgend) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie gevolg deur vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
GAF5F1	**1 - 104***	**883**
2	**105 - 179**	**3 810**
3	**180 - 213**	**51**
4	**214 - 270**	**84**
5	**271 - 690**	**202**

Met die oog op die isolasie van aspalatien (**43a**) is subfraksie GAF5F2 verder ondersoek, terwyl fraksie GAF5F4 'n belowende ligroos kleur met 2 % (v/v) formaldehied in gekonsentreerde swawelsuur aangeneem het.

11.2.2.1 Subfraksie GAF5F2

Subfraksie GAF5F2 (3.81 g) is met KK (mikrokristallyne sellulose , 55.5 x 2 cm, 1 cm^3/proefbuis; H_2O - 400 cm^3 en 50 % (v/v) H_2O:MeOH - 1 000 cm^3, opeenvolgend) gefraksioneer om na oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie gevolg deur vriesdroging 'n aspalatien-bevattende fraksie as 'n geel amorfe vaste stof (proefbuise 36 - 77, 3.2 g) te lewer.

Verdere fraksionering van lg. fraksie met KK (Sephadex LH-20, 75 x 5 cm, 27 cm^3/proefbuis; EtOH:H 4:1, v/v - 19 dm^3) het ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie die volgende fraksies gelewer:

* 750 cm^3 is vooraf versamel.

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
GAF5F2F1F1	1 - 155	83
2	156 - 194	157
3	195 - 254	193
4	255 - 268	17
5	269 - 694	2 526

Subfraksies GAF5F2F1F2, 3 en 5 is op grond van DLC-analise verder ondersoek.

11.2.2.1.1 Aspalatien (2',3 ,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (43a)

Subfraksie GAF5F2F1F2 (157 mg) is op grond van ^{1}H KMR-analise as aspalatien[55,260] (**43a**) geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 34, Tabel 9

11.2.2.1.2 2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (183)

Subfraksie GAF5F2F1F3 (193 mg) is met DLC (H:B:A:M 1:3:5:1, v/v, H^+) geskei om twee fraksies (Rf 0.6, 22 mg en Rf 0.17, 90 mg) te lewer. Die Rf 0.6 fraksie is met behulp van sintese [par. 11.2.2.1.2 (b)] as 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (**183**), 'n *geel amorfe vaste stof*, geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 36, Tabel 9

11.2.2.1.2 (a) Moontlike vorming van die 4:6-*O*-isopropilideenverbinding (183) tydens die isolasieproses

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol, 1 ekw) en protokatesjoësuur (3,4-dihidroksibensoësuur) (**72a**) (3.4 mg, 0.022 mmol, 1 ekw), wat natuurlik in rooibostee voorkom, is vir 3 maande in asetoon (5 cm^3) gelaat. DLC-analise (H:B:A:M 1:3:5:1, v/v) het aangetoon dat geen omskakeling na die isopropilideenderivaat onder hierdie toestande plaasgevind het nie.

11.2.2.1.2 (b) Sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-(4:6-*O*-isopropilideen-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (183)

Aspalatien (**43a**) (30 mg, 0.066 mmol, 1 ekw), vars gesmelte sinkchloried (10 mg, 0.073 mmol, 1.1 ekw) en asynsuur (0.1 cm^3, 105 mg, 1.7 mmol, 26.5 ekw) is vir 1.5 uur in droë asetoon (4 cm^3) onder argon by kamertemperatuur geroer[229], waarna die reaksiemengsel deur K_2CO_3 gefiltreer en die presipitaat met asetoon (3 x 50 cm^3) gewas is. Die filtraat is *in vacuo* by kamertemperatuur gekonsentreer en met KK (Kieselgel 60, 9 x 1.5 cm, 13 cm^3/proefbuis, H:B:A:M 1:3:5:1, v/v) gefraksioneer. Proefbuise 1 tot 3 is ná DLC-analise gekombineer en *in vacuo* gekonsentreer om die verlangde produk as 'n *geel amorfe vaste stof* (20 mg, 62 %) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 36, Tabel 9

11.2.2.1.3 Die per-*O*-asetielderivate van aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (43a) en "nothofagin" (2',4,4',6'-tetrahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (160a)

'n Deel van die Rf 0.17 subfraksie van fraksie GAF5F2F1F3 (7 mg) is met piridien en asynsuuranhidried in die teenwoordigheid van 'n katalitiese hoeveelheid triëtielamien geasetileer en met DLC (H:E:A 5:3:2, v/v) geskei om per-*O*-asetiel"nothofagin" (**160b**) (Rf 0.7, 0.9 mg, gevind: M^+, 814.2316, $C_{39}H_{42}O_{19}$

vereis M, 814.2320) en per-*O*-asetielaspalatien (**43c**)[56] (Rf 0.66, 6.0 mg, gevind: M^+, 872.2277, $C_{41}H_{44}O_{21}$ vereis M, 872.2275) as *geel amorfe vaste stowwe* te lewer. Die ^{1}H KMR-spektra is replikas van dié van die geasetileerde derivate van outentieke aspalatien en "nothofagin".

^{1}H KMR: Plate 37 en 38, Tabel 10

MS SKEMA 6 (EI) - *m/z* 746 (9), 686 (15), 609 (2), 549 (6), 506 (14 %)

MS SKEMA 7 (FAB)- *m/z* 814 (30), 754 (13), 712 (7), 549 (2), 465 (6), 423 (7), 331 (8), 169 (25), 164 (11), 149 (76), 107 (100 %).

11.2.2.1.4 Aspalatien (2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-ß-D-glukopiranosieldihidrochalkoon) (43a)

Herhaalde (3x) kolomchromatografiese skeiding (MPLC) (Sellulosetriasetaat, 45 x 2 cm, 17 cm^3/proefbuis, 80 % (v/v) EtOH:H (ontgas) - 2 000 cm^3) van subfraksie GAF5F2F1F5 (840 mg per kolom) het aspalatien (**43a**)[260] as 'n geel amorfe vaste stof (proefbuise 1 - 40, 2.13 g) gelewer.

^{1}H KMR: Plaat 34, Tabel 9

11.2.2.2 Katesjien [(2R,3S)-2,3-*trans*-3',4',5,7-tetrahidroksiflavan-3-ol] (91a)

Subfraksie GAF5F4 (84 mg) is met KK (Sephadex LH-20, 65 x 4 cm, 9 cm^3/proefbuis; 60 % (v/v) H_2O:EtOH - 1 450 cm^3, EtOH:H_2O:MeOH 18:27:55 (v/v) - 2 550 cm^3 en 50 % A:MeOH - 2 000 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van proefbuise, *in vacuo* konsentrasie en vriesdroging die volgende fraksies te lewer:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
GAF5F4F1	1 - 215	12
2	216 - 274	51
3	275 - 440	18

Subfraksie GAF5F4F2 (51 mg) het die band met die belowende ligroos kleur wanneer met 2 % (v/v) formaldehied in gekonsentreerde swawelsuur gesproei is, bevat en is met DLC (H:B:A:M 1:3:5:1, v/v) geskei om katesjien (**91a**) as 'n geelbruin amorfe vaste stof (Rf 0.56, 8 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 39, Tabel 11

11.2.2.2 (a) Bepaling van die absolute konfigurasie van die geïsoleerde verbinding[110]

Die Rf 0.56 fraksie (8 mg) is volgens die standaardmetode gemetileer en met DLC (H:E:A 5:3:2, v/v) geskei om 3',4',5,7-tetra-*O*-metielkatesjien (**91b**) (Rf 0.55, 2.8 mg) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 40, Tabel 11

(S)-(+)-α-metoksi-α-trifluorometielfenielasetielchloried is berei deur oksalielchloried (0.007 cm^3, 0.077 mmol, 9.5 ekw) by 'n oplossing van (R)-(+)-α-metoksi-α-(trifluorometiel)fenielasynsuur [(R)-(+)-MTPA][110] (3.8 mg, 0.016 mmol, 2 ekw) in droë DMF (0.001 cm^3) en droë heksaan (0.4 cm^3) te voeg en vir 1 uur onder N_2 by kamertemperatuur te roer. Die titelverbinding is verkry deur filtrasie onder N_2 en *in vacuo* konsentrasie, waarna aseotropies met droë benseen gedroog is.

3',4',5,7-Tetra-*O*-metiel-katesjien (**91b**) (2.8 mg, 0.0081 mmol, 1 ekw) en dimetielaminopiridien (0.8 mg, 0.0066 mmol, 0.819 ekw) is aseotropies met droë benseen gedroog, waarna droë triëtielamien (0.01 cm^3, 0.081 mmol, 10 ekw) en dichlorometaan (0.08 cm^3) in die teenwoordigheid van N_2 bygevoeg is. Hierdie reaksiemengsel is drupsgewys m.b.v. 'n oordragnaald en N_2-druk by (S)-(+)-α-metoksi-α-trifluorometielfenielasetielchloried gevoeg. Ná 1 uur is aangesuur met yskoue 0.1 M HCl (3 x 30 cm^3), waarna met etielasetaat (5 x 50 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese lae is gekombineer en met 'n 10 % *aq*. $NaHCO_3$-oplossing (3 x 30 cm^3) geneutraliseer, waarna dit met 'n versadigde *aq*. NaCl-oplossing (3 x 10 cm^3) gewas, oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gefiltreer en *in vacuo* gekonsentreer is.

DLC-skeiding (H:E:A 6:3:1, v/v) het (2R,3S)-3',4',5,7-tetrametoksiflavan-3-[(αR)-α-metoksi-α-trifluorometielfeniel]asetaat (**91c**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.67, 0.6 mg, 13 %, 27 % omskakeling) en ongereageerde 3',4',5,7-tetra-*O*-metiel-katesjien (**91b**) as 'n "buff" amorfe vaste stof (Rf 0.36, 1.4 mg) gelewer. Eersgenoemde is volgens ^{1}H KMR identies aan die ooreenstemmende derivaat van katesjien (**91c**)[110].

^{1}H KMR: Plaat 41, Tabel 11

11.2.3 Prosianidien B_3 [(4α,8)-*bis*-katesjien (92a)

Fraksie GAF7 (201 mg) is volgens die standaardmetode gemetileer en met DLC (H:B:A:M 4:3:2:1, v/v) gefraksioneer om subfraksie 1 (Rf 0.42, 20 mg) as 'n rooibruin vaste stof te lewer. Asetilering het die metieleterasetaat (**92b**) van prosianidien B_3 (**92a**)[109] as 'n wit amorfe vaste stof (24.3 mg) gelewer.

^{1}H KMR: Plaat 42, Tabel 2

HOOFSTUK 12

STRUKTUURBEVESTIGING VAN (Z)-2-ß-D-GLUKOPIRANOSIELOKSI-3-FENIELPROPENOëSUUR

12.1 Sintese van fenielpirodruiwesuur (2-okso-3-fenielpropanoësuur) (129)

Fenielpirodruiwesuur is volgens bekende metodes[135,136] vanaf asetielglisien (**125**) en bensaldehied (**126**) *via* 4-bensilideen-2-metieloksasool-5-oon (**127**) en α-asetamidokaneelsuur (**128**) berei.

12.1.1 Sintese van asetielglisien (125)[135,136]

Glisien (**124**) (10 g, 0.13 mol, 1 ekw) is vir *ca.* 2 uur in gedistilleerde water (40 cm^3) geroer, waarna vars gedistilleerde asynsuuranhidried (25 cm^3, 0.27 mol, 2 ekw) bygevoeg en die reaksiemengsel vir 'n verdere 30 min. geroer is. Die reaksiemengsel is oornag in 'n yskas gelaat, waarna die presipitaat affiltreer, met koue water gewas (250 cm^3) en vir 2 uur by 100 - 110 °C gedroog is om suiwer asetielglisien (**125**) (11.4 g, 73 %) te lewer; Spt. 206-208 °C, (lit.[261] 207-208 °C).

^{1}H KMR: Plaat 43, Tabel 12

12.1.2 Sintese van 4-bensilideen-2-metieloksasool-5-oon (127)[135]

'n Mengsel van asetielglisien (**125**) (6 g, 0.051 mol, 1.4 ekw), vars gedistilleerde bensaldehied (**126**) (7.5 cm^3, 0.074 mol, 2 ekw), watervrye natriumasetaat (3 g, 0.037 mol, 1 ekw) en vars gedistilleerde asynsuuranhidried (12 cm^3, 0.13 mol, 3.5 ekw) is vir 1 uur gerefluks, waarna dit afgekoel en vir *ca.* 13 uur in die yskas gelaat is. Gedistilleerde water (60 cm^3) is bygevoeg, waarna *in vacuo* gefiltreer en die geel presipitaat met koue water (3 x 20 cm^3) en koue eter (30 cm^3) gewas is om die titelverbinding as geel kristalle (Rf 0.5 in H:A 9.5:0.5, v/v, 2x, 6.15 g, 89 %) te lewer; Spt. 148-150 °C (lit.[261] 150 °C).

^{1}H **KMR**: Plaat 44, Tabel 12

12.1.3 Sintese van α-asetamidokaneelsuur (128)[135]

4-Bensilideen-2-metieloksasool-5-oon (**127**) (3 g, 0.016 mol) is vir 8 uur in 'n mengsel van gedistilleerde water (23 cm^3) en asetoon (56 cm^3) gerefluks, waarna die asetoon *in vacuo* verwyder en die reaksiemengsel met gedistilleerde water (50 cm^3) verdun is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere 1 uur gerefluks en gefiltreer om ongereageerde 4-bensilideen-2-metieloksasool-5-oon (**127**) (1.2 g) te lewer. Dierkool (1.2 g) is by die filtraat gevoeg, waarna vir 'n verdere 5 min. gekook en *in vacuo* gefiltreer is. Die presipitaat is met kookwater (3 x 25 cm^3) gewas, uit water geherkristalliseer en oornag *in vacuo* by 100 °C gedroog om die titelverbinding as wit naalde (1.6 g, 49 %, 81 % omskakeling) te lewer; Spt. 191-192 °C (lit.[261] 191-192 °C).

^{1}H **KMR**: Plate 44 en 45, Tabel 12

12.1.4 Sintese van fenielpirodruiwesuur (2-okso-3-fenielpropanoësuur) (129)[135]

1 N HCl (10.5 cm^3) is by α-asetamidokaneelsuur (**128**) (500 mg, 2.4 mmol) gevoeg, waarna die reaksiemengsel vir 6 ure gerefluks is. Die gevormde geel olie is affiltreer, waarna die filtraat vir *ca.* 24 uur in die yskas gelaat is. Die wit poeieragtige presipitaat is *in vacuo* affiltreer, met yswater (3 x 20 cm^3) gewas, uit water geherkristalliseer en oornag in 'n vakuumdessikator oor KOH en $CaCl_2$ gedroog om fenielpirodruiwesuur (**129**) (260 mg, 66 %) te lewer; Spt. 152-154 °C (lit.[135] 150-154 °C).

^{1}H **KMR**: Plaat 46, Tabel 12

12.2 Sintese van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- α-D-glukopiranosielbromied (132)

12.2.1 Bereiding van 'n 52 % (m/v) oplossing van HBr in asynsuur[262]

Broom (60 cm^3, 1.2 mol) is met 'n drukgekompenseerde druptregter by tetralin (1,2,3,4-tetrahidronaftaleen)* (250 cm^3) gedrup terwyl heftig geroer is. Die gas wat ontwikkel het is deur tetralin (150 cm^3) in 'n tweede fles gelei ten einde oortollige broom te verwyder, waarna dit in 'n geweegde fles met asynsuur (100 cm^3, 101.5 g) geborrel is. Na 4.5 uur is 'n groot hoeveelheid gas by die uitlaat van die laaste fles vrygestel (wat daarop gedui het dat die asynsuur met HBr versadig is) en byvoeging van broom gestaak. Die massatoename van die fles met die asynsuur was 58 g, terwyl die volume-toename 12 cm^3 was, sodat die berekende konsentrasie van HBr in asynsuur 52 % (m/v) is.

12.2.2 Sintese van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- α-D-glukopiranosielbromied (132)

'n Mengsel van 1,2,3,4,6-penta-*O*-asetiel- α- en -ß-D-glukose (**131**) (1 g, 2.6 mmol), berei deur die standaard asetilering van D-glukose (**130**), is in die versadigde oplossing van HBr in asynsuur (50 cm^3) opgelos en vir 8 ure by kamertemperatuur geroer. Yswater (150 cm^3) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met $CHCl_3$ (3 x 100 cm^3) geëkstraheer is. Die chloroform-laag is met 'n versadigde *aq.* $NaHCO_3$-oplossing geneutraliseer (50 cm^3), met yswater (3 x 50 cm^3) gewas, oor $MgSO_4$ gedroog en *in vacuo* gekonsentreer, waarna dit uit eter-ligte petroleum (kookpunt 40-60 °C) geherkristalliseer is om die titelverbinding (570 mg, 55 %) te lewer; Spt. 87-89 °C (lit.[263] 88-89 °C).

^{1}H KMR: Plate 47 en 48, Tabel 13

---

* Gedroog oor $MgSO_4$.

12.3 Sintese van (Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (120b)

Cs_2CO_3 (29 mg, 0.09 mmol, 1 ekw) is by 'n oplossing van fenielpirodruiwesuur (**129**) (28 mg, 0.17 mmol, 1 ekw) in metanol (2.2 cm^3) gevoeg terwyl voortdurend geroer is. Die oplosmiddel is ná 30 min. *in vacuo* verwyder[139], waarna die gevormde cesiumkarboksilaat in vars gedistilleerde DMF (1.7 cm^3) opgelos en 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (69 mg, 0.17 mmol, 1 ekw) in DMF (1 cm^3) bygevoeg is terwyl heftig geroer is. Die gevormde CsBr is ná 30 min. *in vacuo* affiltreer, waarna die DMF *in vacuo* by 60 °C verwyder is om 'n geel presipitaat (85 mg) te lewer. Diasometaanmetilering, gevolg deur DLC-skeiding (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) het die titelverbinding as 'n *geel stroop* (Rf 0.6, 18.2 mg, 22 %) gelewer; gevind: M^+, 508.1581, $C_{24}H_{28}O_{12}$ vereis M, 508.1581.

^{1}H KMR: Plaat 49, Tabel 4

MS SKEMA 3 (CI): *m/z* 331 (55), 271 (15), 229 (2), 211 (9) en 169 (100 %)

(EI): *m/z* 178 (100 %), 177 (1), 133 (28), 119 (10), 118 (76), 91 (30)

12.4 Sintese van (E)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (122b)

(Z)-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**120b**) (18 mg, 0.036 mmol) is in metanol (80 cm^3) opgelos. Nadat N_2 vir *ca.* 30 min. deur die reaksiemengsel geborrel is, is vir 15 uur by 350 nm bestraal.[141] DLC (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) het ongereageerde uitgangstof as 'n geel stroop (Rf 0.6, 9.6 mg) en die titelverbinding as 'n *kleurlose stroop* (2.7 mg, 15 %, 32 % omskakeling) gelewer; gevind: M^+, 508.1578, $C_{24}H_{28}O_{12}$ vereis M, 508.1581.

^{1}H KMR: Plate 49 en 50, Tabel 4

MS SKEMA 3 (CI): *m/z* 331 (40), 271 (12), 229 (3), 211 (8), 179 (17) en 169 (100 %)

(EI): *m/z* 178 (80), 177 (13), 119 (8), 118 (53), 91 (26 %)

12.5 Pogings tot die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (116b)

12.5.1 Poging 1[157]

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (70 mg, 0.43 mmol, 1 ekw) is in droë THF (0.6 cm^3) opgelos en onder N_2 met 'n oordragnaald by -70 °C by 'n oplossing van kalium-*ters*-butoksied (119 mg, 1.06 mmol, 2.5 ekw) in THF (2.2 cm^3) oor 'n periode van 10 min. gedrup. Die reaksiemengsel het 'n geel kleur aangeneem. 'n Mengsel van droë TMEDA (0.6 cm^3) en THF (2.2 cm^3) is bygedrup en nadat vir 20 min. by -70 °C geroer is, is 'n oplossing van BuLi in heksaan (1.6 M, 0.8 cm^3, 1.28 mmol, 3 ekw) oor 'n periode van 15 min. bygevoeg. Die reaksiemengsel het 'n oranje kleur aangeneem en nadat vir 'n verdere uur by -70 °C geroer is, is 'n oplossing van tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (506 mg, 1.3 mmol, 3 ekw) in THF (2.2 cm^3) oor 'n periode van 15 min. onder N_2 met 'n oordragnaald bygedrup terwyl heftig geroer is. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere 23 uur by kamertemperatuur geroer, waarna met yskoue 0.01 N HCl aangesuur is tot pH 6 en met etielasetaat (3 x 100 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese fase is oor $MgSO_4$ gedroog, *in vacuo* gekonsentreer en met DLC (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) geskei om 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-D-glukaal (**135**), 'n amorfe wit vaste stof (Rf 0.68, 45.5 mg, 11 %), as enigste skeibare produk te lewer. Totale ontbinding het weereens plaasgevind.

^{1}H KMR: Plaat 51, Tabel 13

MS SKEMA 8 (CI): *m/z* 331 (21), 316 (1), 303 (54), 271 (45), 229 (69), 211 (40), 172 (2), 169 (100 %), 157 (4)

12.5.2 Poging 2

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (100 mg, 0.61 mmol, 1 ekw) is in droë DMF (2 cm^3) by 0 °C onder N_2 geroer, waarna 'n suspensie van NaH (32 mg, 1.3 mmol, 2.1 ekw) in droë DMF (2 cm^3) by 0 °C oor 'n periode van 30 min. met 'n oordragnaald daarby gedrup is. Nadat die reaksiemengsel vir 2.5 uur by 0 °C geroer is, is dit oor 'n periode van 30 min. by 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (251 mg, 0.63 mmol, 1 ekw) in DMF (2 cm^3) by kamertemperatuur gedrup, waarna dit vir 24 uur in 'n argonatmosfeer geroer is. 'n Yskoue versadigde *aq.* NaCl-oplossing (50 cm^3) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met EtOAc (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is, die organiese fase oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer is. DLC-analise (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) het op totale ontbinding gedui.

12.5.3 Pogings tot die sintese van metielfenielpiruvaat (138)

12.5.3.1 Poging 1[159]

Varsbereide fenielpirodruiwesuur (**129**) (200 mg, 1.2 mmol) is in 'n oplossing van droë metanol (0.4 cm^3) en droë dichloroëtaan (5 cm^3) opgelos en vir 18 uur onder argon gerefluks. *In vacuo* konsentrasie gevolg deur DLC-skeiding (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) het as hoofproduk 'n dimeriese aldolproduk (**136**) (Rf 0.72, 80 mg, 45 %) as 'n kleurlose olie gelewer. Diasometaanmetilering het die dimetielester (**137b**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-penteendioësuur (**137a**) as 'n wit amorfe vaste stof (Rf 0.74, 65 mg, 35 %) gelewer.

^{1}H KMR: Plate 52 en 53, Tabel 14

MS SKEMA 9 (CI): *m/z* 339 (100 %), 295 (8), 279 (20)

12.5.3.2 Poging 2

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (50 mg, 0.3 mmol) is in droë metanol (0.5 cm^3) en droë dichloroëtaan (5 cm^3) vir 15 uur onder argon gerefluks, waarna 'n druppel gekonsentreerde swawelsuur by die reaksiemengsel gevoeg is. Nadat vir 'n verdere 6 uur gerefluks is, is yswater (200 cm^3) by die reaksiemengsel gevoeg en is met chloroform (4 x 100 cm^3) geëkstraheer. Die organiese fase is oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer om 'n geel olie, volgens ^{1}H KMR-analise hoofsaaklik metielfenielpiruvaat (**138**) (Rf 0.75, H:B:A:M 40:40:15:5, v/v), te lewer. Ontbinding het egter plaasgevind voordat suiwering bewerkstellig kon word.

^{1}H KMR: Plaat 54, Tabel 14

(L.W.: Wanneer die swawelsuur by die aanvang van die reaksie bygevoeg word, word die monometielester (**136**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-penteendioësuur (**137a**) as hoofproduk gevorm.)

^{1}H KMR: Plaat 52, Tabel 14
MS SKEMA 9 (CI): *m/z* 339 (100 %), 295 (8), 279 (20)

12.5.3.3 Poging 3

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (107 mg, 0.65 mmol) is vir 11 ure in 'n mengsel van droë metanol (4 cm^3) en 1,2-dichloroëtaan (4 cm^3) by 55 °C geroer, waarna 'n druppel gekonsentreerde H_2SO_4 bygevoeg en vir 'n verdere 14 uur by 55 °C geroer is. Piridien (*ca.* 1.5 cm^3) en 'n yskoue *aq.* NaCl-oplossing (200 cm^3) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met 80 % (v/v) H:EtOAc (4 x 100 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese laag is oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer om 'n geel olie te lewer. ^{1}H KMR-analise het weereens bevestig dat metielfenielpiruvaat (**138**) in die enolvorm die hoofproduk is, maar soos in die vorige geval het ontbinding verdere suiwering verhoed.

^1H KMR: Plaat 54, Tabel 14

12.5.3.4 Poging 4

'n Druppel H_2SO_4 is by 'n oplossing van fenielpirodruiwesuur (**129**) (110 mg, 0.67 mmol) in droë metanol (4 cm^3) by 0 °C gevoeg, waarna die reaksiemengsel vir 24 uur by 5 °C geroer is. Aangesien geen reaksie volgens DLC (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v) plaasgevind het nie, is die temperatuur tot kamertemperatuur verhoog. DLC-analise het na 9 dae geen verdere verandering getoon nie en 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (200 cm^3) is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met etielasetaat (3 x 100 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese fase is oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer. Totale ontbinding het egter volgens DLC plaasgevind.

12.5.3.5 Poging 5

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (40 mg, 0.24 mmol, 1 ekw) is in droë metanol (4 cm^3) opgelos, waarna vars gedistilleerde tionielchloried (0.9 cm^3, 1.2 mmol, 5 ekw) stadig bygedrup is terwyl heftig geroer is. Ná 24 uur is die metanol met N_2 verwyder om 'n geel olie te lewer. DLC-analise het egter op totale ontbinding gedui.

12.5.3.6 Poging 6

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (15 mg, 0.091 mmol) is in eter (5 cm^3) opgelos en volgens die standaardmetode met diasometaan gemetileer om (E/Z)-metiel-2-*O*-metiel-3-fenielpropenoaat (**139**) as 'n geel olie (17.44 mg, 99.7 %) te lewer.

^1H KMR: Plaat 55, Tabel 14

12.5.3.7 Poging 7

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (112 mg, 0.68 mmol, 1 ekw) en Cs_2CO_3 (111 mg, 0.34 mmol. 1 ekw) is vir 30 min. by kamertemperatuur in droë metanol geroer, waarna die metanol met N_2 verwyder is.[139] Vars gedistilleerde DMF (5 cm^3) is by die gevormde karboksilaat gevoeg, waarna MeI (0.05 cm^3, 0.8 mmol, 1.2 ekw) bygevoeg is terwyl heftig geroer is. Na 2 ure is die gevormde CsI affiltreer, die filtraat met 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (100 cm^3) verdun en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer. Die organiese lae is oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer. Soos in die geval van pogings D en E het DLC tydens die reaksie aangedui dat die verlangde produk wel gevorm het, maar dat ontbinding tydens die opwerkprosedure plaasgevind het.

12.5.3.8 Poging 8

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (2.5 g, 15 mmol, 1 ekw) en Cs_2CO_3 (2.5 g, 7.7 mmol, 1 ekw) is vir 30 min. by kamertemperatuur in droë metanol (40 cm^3) geroer, waarna die metanol met N_2 verwyder is. Vars gedistilleerde DMF (40 cm^3) is by die gevormde karboksilaat gevoeg, waarna MeI (1.4 cm^3, 23 mmol, 1.5 ekw) bygevoeg is. Na 2 ure is die gevormde CsI affiltreer, waarna gepoog is om die verlangde produk met vakuumdistillasie (waterpomp, 39 - 41 °C) te suiwer. Die reaksiemengsel het drasties vergeel en geen fraksionering is met distillasie verkry nie. 'n Yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (150 cm^3) is by die distillaat gevoeg, waarna met 80 % (v/v) H:EtOAc (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese fase is oor $MgSO_4$ gedroog en *in vacuo* gekonsentreer om 'n geel olie te lewer. DLC-analise het weereens op totale ontbinding gedui.

Weens probleme met ontbinding is besluit om metielfenielpiruvaat (**138**) *in situ* te berei.

12.5.4 Pogings tot die sintese van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (116b) *via in situ* metielfenielpiruvaat- (138) bereiding

12.5.4.1 Poging 1[139,155]

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (100 mg, 0.61 mmol, 1 ekw) en Cs_2CO_3 (99 mg, 0.3 mmol, 1 ekw) is vir 30 min. in droë metanol (0.5 cm^3) onder N_2 geroer, waarna die metanol met N_2 verwyder is. Droë DMF (0.5 cm^3) en MeI (0.04 cm^3, 0.61 mmol, 1 ekw) is bygevoeg terwyl die reaksiemengsel in 'n N_2-atmosfeer geroer is. Na 1 uur was die vorming van metielfenielpiruvaat (**138**) volgens DLC-analise (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, Rf 0.75) voltooi en is die reaksiemengsel drupsgewys met 'n oordragnaald by 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (376 mg, 0.94 mmol, 1.5 ekw) en 1,1,3,3-tetrametielguanidien (**140**) (392 mg, 3.4 mmol, 5.6 ekw) in droë dichlorometaan (6 cm^3) gevoeg terwyl heftig geroer is. Vars gedistilleerde $BF_3{\cdot}OEt_2$ (0.3 cm^3, 2.4 mmol, 4 ekw) is oor 'n periode van 15 min. by kamertemperatuur onder N_2 bygedrup. Die reaksiemengsel is vir *ca.* 18 uur by kamertemperatuur geroer, waarna 'n yskoue versadigde *aq.* $NaHCO_3$-oplossing (50 cm^3) bygevoeg is, met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is en die organiese fase agtereenvolgens met versadigde *aq.* $KHSO_4$- (3 x 50 cm^3) en versadigde *aq.* NaCl-oplossings (3 x 50 cm^3) gewas is. Die etielasetaatfase is oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gekonsentreer en met DLC (H:B:A:M 50:40:5:5, v/v) geskei om die dimetielester (**137b**) van (E/Z)-4-bensiel-3-feniel-2-okso-3-penteendioësuur (**137a**) (Rf 0.74, 4.9 mg, 5 %), 'n wit amorfe vaste stof, as hoofproduk te lewer. Totale ontbinding van die res van die reaksiemengsel het plaasgevind.

^{1}H KMR: Plaat 53, Tabel 14

MS SKEMA 9 (CI): *m/z* 339 (100 %), 295 (8), 279 (20)

12.5.4.2 Poging 2

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (226.5 mg, 1.4 mmol, 1 ekw) en Cs_2CO_3 (225 mg, 0.69 mmol, 1 ekw) is vir 30 min. in 'n N_2-atmosfeer in droë metanol (5 cm^3) geroer, waarna die metanol met N_2 verwyder is. Die gevormde cesiumkarboksilaat is in droë DMF (5 cm^3) opgelos en MeI (0.08 cm^3, 1.38 mmol, 1 ekw) is bygevoeg. Na 1 uur was metilering volgens DLC-analise (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, Rf 0.75) voltooi en is die reaksiemengsel oor 'n periode van 2 uur met 'n oordragnaald na 'n suspensie van NaH (36.5 mg, 1.5 mmol, 1.1 ekw) in droë DMF (5 cm^3) oorgedra. Die reaksiekleur het onmiddelik na geel verander. Die temperatuur is vervolgens tot 40 °C verhoog en vir 'n verdere 30 min. geroer om volledige enolaatvorming te verseker, waarna tot 0 °C afgekoel is en die reaksiemengsel oor 'n periode van 15 min. by 'n oplossing van 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (569 mg, 1.4 mmol, 1 ekw) by 0 °C gedrup is. Hierdie reaksiemengsel is vir 2 dae by 0 °C en 'n verdere 2 dae by 15 °C onder argon geroer, waarna 'n yskoue versadigde *aq.* NaCl-oplossing (150 cm^3) bygevoeg is en met 80 % (v/v) E:H (3 x 150 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese fase is oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer. DLC-analise het op totale ontbinding gedui.

12.5.4.3 Poging 3

Fenielpirodruiwesuur (**129**) (110 mg, 0.67 mmol, 1 ekw) en Cs_2CO_3 (110.8 mg, 0.34 mmol, 1 ekw) is vir 30 min. onder N_2 in droë MeOH (5 cm^3) geroer, waarna die metanol met N_2 verwyder is. Die gevormde cesiumkarboksilaat is in droë DMF (5 cm^3) opgelos, waarna MeI (0.04 cm^3, 0.68 mmol, 1 ekw) bygevoeg is terwyl heftig geroer is. Die reaksiemengsel het melkerig vertoon. Na 30 min. is die gevormde metielfenielpiruvaat (**138**) (DLC H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, Rf 0.75) tot 0 °C afgekoel en met 'n oordragnaald en N_2-druk oor 'n periode van 30 min. by 'n suspensie van NaH (18 mg, 0.75 mmol, 1.1 ekw) by 0 °C gedrup terwyl heftig geroer is. Die reaksiemengsel het onmiddelik met kontak 'n geel kleur aangeneem. Nadat vir 'n verdere 1 uur by 0 °C geroer is om volledige enolaatvorming te verseker, is lg. reaksiemengsel oor 'n periode van 30 min. by 'n oplossing van tetra-*O*-asetiel-α-D-glukopiranosielbromied (**132**) (290 mg, 0.73 mmol, 1.09 ekw) in droë DMF (2 cm^3) by 0 °C gedrup

terwyl heftig geroer is. Die temperatuur is tot kamertemperatuur verhoog, waarna vir 'n verdere 16 ure geroer is en 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (150 cm^3) bygevoeg is. Die reaksiemengsel is met 80 % E:H (3 x 150 cm^3) geëkstraheer, waarna die organiese fase oor Na_2SO_4 gedroog en *in vacuo* gekonsentreer is. DLC-skeiding (H:B:A:M 50:40:5:5, v/v) het 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-D-glukaal (**135**) (Rf 0.44, 66 mg, 27 %) as 'n kleurlose olie en en (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) as 'n *amorfe geel vaste stof* (Rf 0.35, 70 mg, 21 %) en identies aan die verbinding geïsoleer uit verwerkte rooibos (par. 10.2.1.4.1), gelewer; gevind: M^+, 508.1579, $C_{24}H_{28}O_{12}$ vereis M, 508.1581.

^{1}H KMR: Plaat 51, Tabel 13

MS SKEMA 8 (CI): *m/z* 331 (21), 316 (1), 303 (54), 271 (45), 229 (69), 211 (40), 172 (2), 169 (100 %), 157 (4)

KMR: ^{1}H KMR - Plaat 11, Tabel 4, ^{13}C - Plaat 12 (Asetoon-d_6) - δ_C (dpm) $CH_3\underline{C}OO$- (170.55, 170.34, 170.09 en 169.94), $\underline{C}H_3COO$- (20.70, 20.64, 20.59, 20.53 en 20.42), C-1 (164.51), C-2 (141.39), C-1' (133.80), C-2' en C-6' (131.62), C-3', C-4' en C-5' (130.13 en 129.23), C-3 (126.09), C-1" (99.69), C-3" (73.22), C-2" en C-5" (72.63, 72.48), C-4" (69.29), C-6" (62.41) en -O$\underline{C}H_3$ (52.64), DEPT - Plaat 13, HETCOR - Plaat 14, COLOC (300 MHz) - Plaat 15, COLOC (500 MHz) - Plaat 16.
MS SKEMA 3 (CI): *m/z* 331 (55), 271 (15), 229 (3), 211 (10), 179 (21), 169 (100 %)
(EI): *m/z* 178 (13), 163 (0.2), 119 (13), 118 (54)), 91 (60 %)

12.6 Sintese van (E)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (117b)

(Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat (**116b**) (20 mg, 0.39 mmol) is in metanol (80 cm^3) opgelos. Nadat N_2 vir 30 min. deur die reaksiemengsel geborrel is, is vir 53 uur onder N_2 by 350 nm bestraal.[141] DLC-skeiding (H:B:E 5:4:1, v/v, 7x) het beide ongereageerde uitgangstof (**116b**) (Rf 0.59, 1.4 mg) as 'n geel olie en die titelverbinding (Rf 0.60, 1.3 mg, 6.5 %, 7 %

omskakeling) as 'n *wit amorfe vaste stof* gelewer; gevind: M^+, 508.1582, $C_{24}H_{28}O_{12}$ vereis M, 508.1581.

^{1}H KMR: Plate 11 en 56, Tabel 4

HOOFSTUK 13

STRUKTURE VAN (2R)- EN (2S)-2,3-DIHIDRO-ISO-ORIëNTIEN [(2R)- EN (2S)-3',4',5,7-TETRAHIDROKSI-6-ß-D-GLUKOPIRANOSIELFLAVANOON]

13.1 Isolasie

Kommersiële plantmateriaal (15 x 200 g) is vir *ca.* 15 uur met chloroform (15 x 2.5 dm^3) in 'n Soxhlet-ekstraktor geëkstraheer, waarna die droë residuele plantmateriaal (2 x 1 kg) vir 15 min. in gedistilleerde water (2 x 4 dm^3) gekook is. Nadat die tee vir 24 uur by kamertemperatuur gelaat is, is gedekanteer. Gedistilleerde water (2 x 3 dm^3) is weereens by die plantmateriaal gevoeg, waarna vir 'n verdere 15 min. gekook is. Die residuele plantmateriaal is na dekantering by kamertemperatuur gedroog en herhaaldelik met asetoon (3 x 2.5 dm^3), vir 24 uur elk, by kamertemperatuur geëkstraheer. Die asetoon is *in vacuo* verwyder om 'n taai groen vaste stof (25 g) te lewer.

Die asetoon-ekstrak (21 g) is met KK (Sephadex LH-20, 80 x 4.5 cm, 13 cm^3/proefbuis, 15 % (v/v) MeOH:A - 5.9 dm^3) gefraksioneer om na oordeelkundige kombinasie van proefbuise en *in vacuo* konsentrasie twee flavanoon-bevattende fraksies (volgens 2D papierchromatografie), fraksie BF1 (proefbuise 240 - 269, 470 mg) en fraksie BF2 (proefbuise 270 - 295, 430 mg) te lewer.

Fraksie BF1 (470 mg) is met KK (Silika, 21 x 2 cm, 4 cm^3/proefbuis; B:A:M 5:3:2, v/v - 160 cm^3 en A:MeOH 7:3, v/v - 500 cm^3) gefraksioneer om ná oordeelkundige kombinasie van fraksies en *in vacuo* konsentrasie subfraksie BF1F1 (proefbuise 13 - 165, 161.8 mg) wat volgens ^{1}H KMR-analise (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) bevat het, te lewer.

Subfraksie BF1F1 (161.8 mg) is op sy beurt met KK (Sellulose MN 300, 34 x 2 cm, 4 cm^3/proefbuis, gedistilleerde water -760 cm^3) gefraksioneer om (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien [(2R)- en (2S)-

3',4',5,7-tetrahidroksi-6-ß-D-glukopiranosielflavanoon] (**88a**) as 'n *geel amorfe vaste stof* (proefbuise 1 - 14, 86 mg) na vriesdroging te lewer*; **UV**** λ^{MeOH} nm: 289, + $AlCl_3$: 295, UV Plaat 1, gevind: M^+, 450.1161, $C_{21}H_{22}O_{11}$ vereis M, 450.1162.

KMR: ^1H KMR - Plate 57 [$(CD_3)_2CO/D_2O$], 58 [$(CD_3)_2CO$], 59 [CD_3CD_2OD], Tabel 15, ^1H-^1H langafstand COSY - Plaat 60, ^{13}C KMR: Plaat 61 (Asetoon-d_6) - δ_C (d.p.m.) C-2 (79.41), C-3 (43.62, 43.36), C-4 (197.52), C-5 (163.45, 163.51), C-6 (105.68), C-7 (166.51), C-8 (96.72, 96.58), C-9 (163.08), C-10 (102.81), C-1' (131.48 en 131.40), C-2' (114.68 en 114.65), C-3' (146.01), C-4' (146.38), C-5' (115.98), C-6' (119.19), suikerkoolstowwe (81.86, 79.85, 75.31, 73.52, 70.75 en 61.76) , HETCOR - Plaat 62, HMBC (500 MHz)- Plaat 63

MS SKEMA 10 (FAB): *m/z* 450 (16 %), 288 (8), 286 (2) en 136 (78).

SD Plaat 2: $[\Phi]_{330}$ +0.5, $[\Phi]_{312}$ +0.29, $[\Phi]_{301}$ +0.17, $[\Phi]_{297}$ +0.22, $[\Phi]_{291}$ +0.079, $[\Phi]_{285}$ +0.33, $[\Phi]_{271}$ +0.11, $[\Phi]_{262}$ -0.0057.

Ter vergelyking: [265]

a. **UV** van oriëntien (**39a**) λ^{MeOH} nm: 256, 270, 350, + $AlCl_3$: 266 sk, 271, 300 sk, 360, 393, UV Plaat 2.

b. **UV** van iso-oriëntien (**40a**) λ^{MeOH} nm: 271, 350, + $AlCl_3$: 256, 276, 294 sk, 362, 390, UV Plaat 3.

---

* Verdere pogings om die diastereomeriese mengsel te skei was onsuksesvol weens oënskynlike oksidasie in die teenwoordigheid van sellulose MN-300, mikrokristallyne sellulose en sellulosetriasetaat en die verlies aan materiaal tydens pogings tot skeiding met Kieselgel F_{254} en poli-amied. Pogings deur dr. M. Davies-Coleman en dr. L. Parolis, Rhodes Universiteit, Grahamstad, om die diastereomere met HPLC te skei, was ook onsuksesvol.

** Die toetsverbinding is in gedistilleerde metanol opgelos en verdun totdat die absorpsie minder as 1 was. Drie druppels 10 % *aq*. $AlCl_3$ is bygevoeg.

13.2 Pogings om die glukosidiese koppelingsposisie te bevestig

13.2.1 Hidrogenering van iso-oriëntien (40a)[97]

13.2.1.1 Poging 1

H_2 is vir 4 uur deur 'n suspensie van Adams se katalisator (PtO_2, 3.2 mg) in EtOH (1 cm^3) geborrel, waarna 'n oplossing van iso-oriëntien (3',4',5,7-tetrahidroksi-6-ß-D-glukopiranosielflavoon) (**40a**) (9.8 mg, 0.02 mmol) in etanol (2 cm^3) by die katalisator gevoeg is. H_2 is vir 8 ure by 8 kPa deur die reaksiemengsel geborrel waarna deur Celite gefiltreer is en die oplosmiddel *in vacuo* gekonsentreer is. Geen reaksie het volgens DLC (B:A:M 5:3:2, v/v, H^+) plaasgevind nie.

13.2.1.2 Poging 2

Iso-oriëntien (**40a**) (10 mg, 0.022 mmol) is in asynsuur (6 cm^3) opgelos en in die teenwoordigheid van Adams se katalisator (PtO_2) (10 mg) by 8 kPa, kamertemperatuur, vir 30 min. gehidrogeneer terwyl deurentyd geroer is. Die reaksiemengsel is vervolgens deur Celite gefiltreer, met 'n *aq.* versadigde $NaHCO_3$-oplossing geneutraliseer (universele indikator) en met etielasetaat (3 x 100 cm^3) geëkstraheer. Die organiese fase is oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gefiltreer en gekonsentreer om 'n geel amorfe vaste stof te lewer. ^{1}H KMR-analise het bevestig dat 34 % van die reaksiemengsel uit ongereageerde iso-oriëntien (**40a**) (bereken: 2.7 mg) bestaan het, terwyl 66 % daarvan aspalatien (**43a**) (bereken: 5.3 mg, 54 %, 73 % omskakeling) was. Geen aanduiding van flavanoon is gevind nie.

^{1}H KMR: Plaat 64, Tabel 16

Plaat 38, Tabel 9

13.2.1.3 Poging 3

Iso-oriëntien (**40a**) (13 mg, 0.029 mmol) is in etanol (5 cm^3) opgelos, waarna Adams se katalisator (PtO_2) (13 mg) en CH_3COOH (1 cm3) bygevoeg is en vir 2 ure by 8 kPa, kamertemperatuur, gehidrogeneer is. Droë K_2CO_3 is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna *in vacuo* deur Celite gefiltreer, gekonsentreer en met DLC (B:A:M 5:3:2, v/v, H^+) geskei is om ongereageerde iso-oriëntien **(40a)** (Rf 0.26, 1.7 mg) en 'n mengsel* van (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**), asook (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-oriëntien (**156a**) (Rf 0.36, 0.9 mg, 7 %, 8 % omskakeling) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 64, Tabel 16
Plaat 65, Tabel 15

LET WEL: Geen reaksie het onder soortgelyke kondisies, maar met slegs twee druppels CH_3COOH, plaasgevind nie.

13.3 Derivatisering

Diasometaanmetilering van (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) het tot totale ontbinding gelei. As alternatief is die volgende metode[166,167] probeer:

Droë K_2CO_3 (608 mg, 4.4 mmol, 40 ekw) sowel as (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (50 mg, 0.11 mmol, 1 ekw) is vir 10 min. onder N_2 in droë asetoon geroer, waarna MeI (0.55 cm^3, 8.8 mmol, 80 ekw) bygedrup is. Die reaksiemengsel is vir 15 uur gerefluks, waarna die K_2CO_3 affiltreer en die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is. DLC-skeiding (H:B:A:M 1:3:5:1, v/v) het 2',3,4,4',6'-penta-*O*-metiel-3'-ß-D-glukopiranosielchalkoon (**154b**) as 'n *geel amorfe vaste stof* (8.3 mg, 14.5 %) gelewer.

^{1}H KMR: Plaat 66, Tabel 17

* Verdere pogings tot skeiding was onsuksesvol om soortgelyke redes as in par. 13.1.

2',3,4,4',6'-penta-*O*-metiel-3'-ß-D-glukopiranosielchalkoon (**154b**) (8.3 mg, 0.016 mmol) is volgens die standaardmetode geasetileer om 2',3,4,4',6'-penta-*O*-metiel-3'-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosiel)chalkoon (**154c**) as 'n *geel amorfe vaste stof* (8.3 mg, 27 %) te lewer; gevind: M^+, 688.2432, $C_{34}H_{40}O_{15}$ vereis M, 688.2418.

^{1}H KMR: Plaat 67, Tabel 17

MS SKEMA 11 (FAB): *m/z* 660 (11, 525 (100 %), 495 (26), 483 (9), 453 (37), 423 (12), 381 (18), 331 (15), 289 (23), 136 (80)

HOOFSTUK 14

BIOMIMETIESE ONDERSOEK VAN DIE ROOIBOSTEE FERMENTASIEPROSES EN DIHIDROCHALKOONCHEMIE*

14.1 Fotochemiese omskakeling

Aspalatien (**43a**) (40 mg, 0.088 mmol) is in D_2O (3 cm^3) met die oog op direkte ^1H KMR-analise opgelos, waarna O_2 vir 20 min. deur die reaksiemengsel geborrel, die reaksiefles verseël en die reaksiemengsel vir 9 dae met lig van golflengte 254 nm bestraal is.[190] ^1H KMR integraalwaardes het aangedui dat die reaksiemengsel (40.2 mg) uit 6 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien **(88a)** (bereken: 2.4 mg, 6.06 %) en 94 % aspalatien-analoë wat op die α- en ß-posisies gemodifiseer is **(162a** en **b**), bestaan.

HPLC-fraksionering (Phenomenex Sperisorb 10 ODS 2 kolom, 250.0 x 10.0 mm, 10 mikron, 0.5 cm^3/min., 0.3 min/proefbuis, metanol-2 % *aq.* mieresuur-gradiënt: konkaaf vanaf 20 % metanol tot 80 % metanol oor 60 min.) van 'n deel van die fraksie (4.56 mg in totaal, konsentrasie van 8 mg/cm^3, 8 x 80 μl-toedienings) het bande 1 (proefbuise 8 - 12, RT 42.8 min., 2.4 mg) en 2 (proefbuise 13 - 16, RT 44.5 min, 2.0 mg) gelewer. ^1H KMR-analise het aangetoon dat deuteriumuitruiling op die α-posisie plaasgevind het en dat bande 1 en 2 regio-isomere van mekaar is.

^1H KMR: Plate 68 en 69, Tabel 18

HPLC-Profiel 1

---

* Weens die oënskynlike oksidasie van aspalatien (**43a**) en beide (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) tydens skeiding met Sephadex LH-20, sellulose MN-300, mikrokristallyne sellulose en sellulosetriasetaat en soos ook inderdaad met tweedimensionele papierchromatografie gedemonstreer is, asook die verlies aan materiaal tydens skeidings met Kieselgel PF_{254} en poli-amied, is hoofsaaklik op ^1H KMR-analise staatgemaak om 'n betroubare weergawe van die samestelling van die reaksiemengsels te verkry. Massas van reaksiemengsels is dus na die opwerkprosedures bepaal, waarna ^1H KMR-integraalwaardes gebruik is om opbrengste te kwantifiseer.

14.2 Die effek van suurstof, hitte en katalisatore/inhibitore

14.2.1 Aspalatien en suurstof

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) is in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) opgelos en vir 6 dae met gereelde suurstoftoediening by kamertemperatuur geroer. Na 6 dae is die oplosmiddel *in vacuo* verwyder en die reaksiemengsel met ^1H KMR geanaliseer. Suiwer aspalatien (**43a**) (10 mg, 100 % herwinning) is herwin.

^{1}H KMR: Plaat 38, Tabel 9

14.2.2 Aspalatien en suurstof by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (11 mg, 0.024 mmol) is in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) opgelos en vir 6 dae met gereelde suurstoftoediening by 30 °C geroer. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder waarna die reaksiemengsel met ^1H KMR geanaliseer is. ^1H KMR integraalwaardes het aangetoon dat 84 % van die reaksiemengsel (11 mg) steeds aspalatien (**43a**) was (bereken: 9.24 mg), maar dat siklisering wel plaasgevind het om 16 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 1.76 mg, 16 %, 99 % omskakeling) te lewer.

^{1}H KMR: Plate 38 en 57, Tabelle 9 en 15

14.2.3 Aspalatien, suurstof en mikrokristallyne sellulose by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (100 mg, 0.22 mmol) en mikrokristallyne sellulose (100 mg) is vir 6 dae in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (10 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Na 6 dae is die sellulose affiltreer en die filtraat *in vacuo* gekonsentreer om volgens ^1H KMR-analise slegs ongereageerde aspalatien (**43a**) (99 mg, 99 %) te lewer.

^1H KMR: Plaat 38, Tabel 9

Wanneer die oplosmiddel verminder word na 0.5 cm^3 vind reaksie wel plaas om volgens ^1H KMR-integraalwaardes 7 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 6.9 mg, 7 %, 87 % omskakeling) en 93 % ongereageerde aspalatien (**43a**) (bereken: 92 mg) te lewer.

^1H KMR: Plate 38 en 57, Tabelle 9 en 15

14.2.4 Aspalatien, suurstof en amilose by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en amilose (10 mg) is vir 6 dae by 30 °C in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder waarna asetoon (5 x 2 cm^3) bygevoeg is en die amilose affiltreer is. Die filtraat is *in vacuo* gekonsentreer om slegs ongereageerde aspalatien (**43a**) (8.4 mg, 84 % herwinning) te lewer.

^1H KMR: Plaat 38, Tabel 9

14.2.5 Aspalatien, suurstof en ß-siklodekstrien by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en ß-siklodekstrien (10 mg) is vir 6 dae by 30 °C in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Die oplosmiddel is *in vacuo* gekonsentreer, asetoon (5 x 2 cm^3) is bygevoeg en die ß-siklodekstrien is affiltreer, waarna die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is om aspalatien (**43a**) (1.9 mg, 19 % herwinning)* te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 38, Tabel 9

14.2.6 Aspalatien, suurstof en dekstriene by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en dekstrien (10 mg) is vir 6 dae by 30 °C in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder, asetoon (5 x 2 cm^3) is bygevoeg en die dekstriene is affiltreer, waarna die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is om 'n rooibruin amorfe vaste stof (8.5 mg) te lewer. Volgens ^{1}H KMR-integraalwaardes het die reaksiemengsel uit 66.6 % aspalatien (**43a**) (bereken: 5.7 mg) en 33.3 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 2.8 mg, 28 %, 65 % omskakeling) bestaan.

^{1}H KMR: Plate 38 en 57, Tabelle 9 en 15

14.2.7 Aspalatien, argon en dekstriene by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en dekstrien (10 mg) is vir 6 dae by 30 °C in 'n suurstofvrye 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) in 'n argonatmosfeer geroer. Dieselfde opwerkprosedure as in (par. 14.2.6) het aspalatien (**43a**) (8.6 mg, 86 % herwinning) as 'n geel amorfe vaste stof gelewer.

^{1}H KMR: Plaat 38, Tabel 9

---

* 'n Onoplosbare ß-siklodekstrien-aspalatien kompleks het vermoedelik gevorm.

14.2.8 Aspalatien, suurstof en dekstriene by kamertemperatuur

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en dekstrien (10 mg) is vir 6 dae by kamertemperatuur in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) geroer. Suurstof is gereeld toegedien. Dieselfde opwerkprosedure as in par. 14.2.6 is gevolg en het 'n rooibruin amorfe vaste stof (9 mg) gelewer. Volgens ^{1}H KMR-integraalwaardes het die reaksiemengsel uit 95 % aspalatien (**43a**) (bereken: 8.6 mg) en 5 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 0.45 mg, 4.5 %, 32 % omskakeling) bestaan.

^{1}H KMR: Plate 38 en 57, Tabelle 9 en 15

14.2.9 Aspalatien, suurstof en D-(+)-glukose by 30 °C

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) en D-(+)-glukose (**130**) (10 mg) is vir 6 dae by 30 °C in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (5 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder, asetoon (5 x 2 cm^3) is bygevoeg en die D-(+)-glukose is affiltreer, waarna die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is om 'n rooibruin amorfe vaste stof (9.3 mg) te lewer. Volgens ^{1}H KMR-integraalwaardes het die reaksiemengsel uit 96 % ongereageerde aspalatien (**43a**) (bereken: 8.9 mg) en 4 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 0.37 mg, 3.7 %, 34 % omskakeling) bestaan.

^{1}H KMR: Plate 38 en 60, Tabelle 9 en 15

14.2.10 Die effek van die byvoeging van 'n radikaalblusser[199]

Aspalatien (**43a**) (100 mg, 0.22 mmol, 1 ekw), dekstrien (100 mg) en 2,6-di-*ters*-butiel-*p*-kresol (**3**) (gebutileerde hidroksitolueen, BHT, 13.4 mg, 0.061 mmol, 0.27 ekw) is vir 6 dae by 30 °C in 'n 50 % (v/v) etanol-wateroplossing (50 cm^3) geroer terwyl suurstof gereeld toegedien is. Die reaksiemengsel is

in vacuo gefiltreer, die filtraat *in vacuo* gekonsentreer en met droë benseen aseotropies gedroog, droë asetoon (5 x 2 cm^3) is bygevoeg en die presipitaat* affiltreer, waarna die filtraat *in vacuo* gekonsentreer is. ^1H KMR-analise bevestig het dat aspalatien (**43a**) teenwoordig is (62 %) en dat geen flavanoon gevorm het nie.

Asetilering (piridien, asynsuuranhidried en triëtielamien) het per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 15 mg) na DLC-suiwering (H:E:A 5:3:2, v/v) as enigste identifiseerbare produk gelewer.

^1H KMR: Plaat 37, Tabel 10

14.3 Die effek van alkaliese kondisies, suurstof en katalisatore

14.3.1 Aspalatien, pH 10 en suurstofvrye kondisies

Gedistilleerde water is vir 8 uur *in vacuo* in 'n ultrasoniese bad by 40 °C ontgas. Stikstof is met uurlikse intervalle deur die water geborrel, waarna weer geëvakueer is.

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) is in 'n suurstofvrye 0.025 M $NaHCO_3$-0.025 M Na_2CO_3-buffer (pH 10, 4 cm^3) opgelos en vir 7 ure in 'n inerte atmosfeer by 40 °C geroer, waarna die reaksiemengsel by 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (50 cm^3) gevoeg is en met 0.1 N HCl aangesuur is tot pH 6 (universele indikator).[213] Ekstraksie met etielasetaat (3 x 50 cm^3), droging van die organiese fase oor Na_2SO_4 en *in vacuo* konsentrasie, gevolg deur asetilering (asynsuuranhidried, piridien en NEt_3) en DLC-skeiding (H:E:A 5:3:2, v/v) het per-*O*-asetiel-D-glukose (**131**) as 'n mengsel van die α- en ß-anomere, 'n wit amorfe vaste stof, (Rf 0.62, 1.5 mg, 17 %) en per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 1.1 mg, 5.7 %) as 'n geel amorfe vaste stof gelewer.

^1H KMR: Plate 37 en 47 , Tabelle 10 en 13

---

* Hoogs polêre bruin produkte.

14.3.2 Aspalatien by pH 10 in die teenwoordigheid van 'n katalitiese hoeveelheid suurstof

Aspalatien (**43a**) (100 mg, 0.22 mmol) is in 'n suurstofvrye 0.025 M $NaHCO_3$-0.025 M Na_2CO_3-buffer (pH 10, 40 cm^3) opgelos, 'n katalitiese hoeveelheid suurstof* is bygevoeg en daar is vir 7 ure in 'n inerte atmosfeer by 40 °C geroer, waarna die reaksiemengsel by 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (100 cm^3) gevoeg is en met 0.1 N HCl aangesuur is tot pH 6 (universele indikator). Ekstraksie met etielasetaat (3 x 100 cm^3), droging van die organiese fase oor Na_2SO_4 en *in vacuo* konsentrasie, gevolg deur asetilering (asynsuuranhidried, piridien en NEt_3) en DLC-skeiding (H:E:A 5:3:2, v/v) het per-*O*-asetiel-D-glukose (**131**) as 'n mengsel van die α- en ß-anomere, 'n wit amorfe vaste stof, (Rf 0.62, 4 mg, 5 %) en per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 2 mg, 1 %) as 'n geel amorfe vaste stof gelewer. Bruin nie-identifiseerbare, hoogs wateroplosbare produkte het as hoofkomponente gevorm.

^{1}H KMR: Plate 37 en 47 , Tabelle 10 en 13

14.3.3 Ondersoek na die invloed van pH op die vrystelling van glukose

Aspalatien (**43a**) (10 mg, 0.022 mmol) is in gedistilleerde water (4 cm^3) opgelos. Een druppel gekonsentreerde HCl is bygedrup en die reaksiemengsel is vir 7 ure by 40 °C geroer, waarna dit by 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (50 cm^3) gevoeg is en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is. Die organiese fase is oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gekonsentreer, geasetileer (asynsuuranhidried, piridien en NEt_3) en met DLC geskei (H:E:A 5:3:2, v/v) om α- en ß-per-*O*-asetiel-D-glukose (**131**) (Rf 0.62, 0.4 mg, 4.7 %) en per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 0.2 mg, 1 %) as wit en geel amorfe vaste stowwe, respektiewelik, te lewer.

^{1}H KMR: Plate 37 en 47 , Tabelle 10 en 13

---

* 'n Ballon is ongeveer half met suurstof gevul, waarna die suurstof deur 'n naald deur die reaksiemengsel geborrel is.

14.3.4 Aspalatien en pirogallol by pH 10

Aspalatien (**43a**) (20 mg, 0.044 mmol, 1 ekw) en pirogallol (**177**) (5.6 mg, 0.044 mmol, 1 ekw) is in 'n suurstofvrye 0.025 M $NaHCO_3$-0.025 M Na_2CO_3-buffer (pH 10, 8 cm^3) opgelos en vir 3 ure by 40 °C in 'n inerte atmosfeer geroer. Geen reaksie het volgens DLC-analise plaasgevind nie. 'n Katalitiese hoeveelheid suurstof* is deur die reaksiemengsel geborrel, waarna vir 'n verdere 4 uur in 'n argonatmosfeer geroer is. Dieselfde opwerkprosedure as in (par. 14.3.1) is gevolg, waarna asetilering (asynsuuranhidried, piridien en triëtielamien) gevolg deur DLC-skeiding (H:E:A 5:3:2, v/v) as enigste identifiseerbare produk per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 2.2 mg, 6 %) as 'n geel amorfe vaste stof gelewer het.

^{1}H KMR: Plaat 37, Tabel 10

14.3.5 Aspalatien en *p*-bensokinoon by pH 10 en suurstofvrye kondisies

Aspalatien (**43a**) (200 mg, 0.44 mmol, 1 ekw) en *p*-bensokinoon (**174**) (48 mg, 0.44 mmol, 1 ekw) is in 'n suurstofvrye 0.025 M $NaHCO_3$-0.025 M Na_2CO_3 buffer (pH 10, 50 cm^3) opgelos en vir 3 ure by 40 °C onder argon geroer. Dieselfde opwerkprosedure as in par. 14.3.1 is gevolg, waarna asetilering (asynsuuranhidried, piridien en NEt_3) gevolg deur DLC-skeiding (H:E:A 5:3:2, v/v) per-*O*-asetiel-D-glukose (**131**) as 'n mengsel van die α- en ß-anomere (Rf 0.62, 3 mg, 2 %), 'n wit amorfe vaste stof, en per-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (Rf 0.31, 12.5 mg, 6 %) as 'n geel amorfe vaste stof, gelewer het.

^{1}H KMR: Plate 37 en 47, Tabelle 10 en 13

LET WEL: 'n Oormaat suurstof het tot totale ontbinding gelei.

---

* 'n Ballon is ongeveer half met suurstof gevul, waarna die suurstof deur 'n naald deur die reaksiemengsel geborrel is.

14.3.6 Aspalatien, suurstof en *p*-bensokinoon by pH 10

Aspalatien (**43a**) (200 mg, 0.44 mmol, 1 ekw) en *p*-bensokinoon (**174**) (48 mg, 0.44 mmol, 1 ekw) is in 'n suurstofvrye 0.025 M $NaHCO_3$-0.025 M Na_2CO_3 buffer (pH 10, 50 cm^3) opgelos. 'n Katalitiese hoeveelheid suurstof is bygevoeg, waarna vir 3 ure by 40 °C in 'n argonatmosfeer geroer is. Dieselfde opwerkprosedure as in (par. 14.3.1) is gevolg, waarna KK (Sephadex LH-20, 12 x 2 cm, 2 cm^3/proefbuis, etanol - 250 cm^3) na sorgvuldige kombinasie van proefbuise en vriesdroging die volgende fraksies gelewer het:

Fraksie	*Proefbuise*	*Massa (mg)*
1	**7 - 11**	**12.6**
2	**12 - 13**	**2.8**
3	**14 - 15**	**3.0**

Fraksie 1, 'n amorfe wit vaste stof, is op grond van die vergelyking van die ^{1}H KMR-spektrum met dié van 'n outentieke monster as kinol (hidrokinoon) (**176**) (12.6 mg, 26 %) geïdentifiseer.

^{1}H KMR: Plaat 70, (Asetoon-d_6/D_2O) - δ 6.47 (4H, s, ArH)

Fraksies 2 en 3 is op grond van vergelyking van die ^{1}H KMR-spektra met dié van outentieke monsters as mengsels van 64 % oriëntien (**39a**) (bereken: 1.8 mg) en 36 % iso-oriëntien (**40a**) (bereken: 1 mg) in die geval van fraksie 2 en 23 % oriëntien (**39a**) (bereken: 0.69 mg), 12 % iso-oriëntien (**40a**) (bereken: 0.36 mg) en 65 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 1.95 mg) in die geval van fraksie 3, geïdentifiseer. Hiervolgens is iso-oriëntien (**40a**) (1.36 mg, 0.7 %), oriëntien (**39a**) (2.49 mg, 1.3 %) en (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (1.95 mg, 0.98 %) uit die reaksiemengsel geïsoleer.

^{1}H KMR: Plate 57, 64 en 71, Tabelle 15 en 16

LET WEL: Verlengde reaksietyd het tot die vorming van groot hoeveelhede oorsprongsmateriaal gelei.

14.4 Die invloed van die ensiem lakkase

14.4.1 Blanko eksperiment

Aspalatien (**43a**) (40 mg, 0.088 mmol) is in 'n NaOAc-HOAc buffer (pH 5, 5 cm^3) opgelos en liggies vir 112 uur by 30 °C geroer. Na 112 uur is die reaksiemengsel by 'n yskoue versadigde *aq*. NaCl-oplossing (100 cm^3) gevoeg en met EtOAc (3 x 100 cm^3) geëkstraheer. Die organiese fase is oor $MgSO_4$ gedroog en *in vacuo* gekonsentreer om ongereageerde aspalatien (**43a**) (10 mg, 25 % herwinning) as 'n geel amorfe vaste stof te lewer. Die waterlaag het uit onidentifiseerbare hoogs polêre produkte bestaan.

^{1}H KMR: Plaat 38, Tabel 9

UV Plaat 4

14.4.2 Ensiemkatalise

'n Oplossing van aspalatien (**43a**) (40 mg, 0.088 mmol) in 'n NaOAc-HOAc buffer (pH 5, 5 cm^3) is met 'n oplossing van lakkase (4 mg) in dieselfde buffer (5 cm^3) gemeng en liggies vir 28 uur by 30 °C geroer.[197] Dieselfde opwerkprosedure as in (par. 14.4.1) is gevolg om 'n rooibruin amorfe vaste stof (10.3 mg) te lewer. ^{1}H KMR integraalwaardes het aangetoon dat die organiese laag uit 52 % (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (**88a**) (bereken: 5.4 mg, 14 %) en 48 % ongereageerde aspalatien (**43a**) (bereken: 4.9 mg) bestaan het. Die waterlaag het weereens uit onidentifiseerbare hoogs polêre produkte bestaan.

^{1}H KMR: Plate 57 en 38, Tabelle 15 en 9

UV Plaat 5

14.5 Derivatisering van aspalatien (43a)

14.5.1 Asetilering[56]

Aspalatien (**43a**) (100 mg, 0.22 mmol) is in 'n minimum hoeveelheid piridien opgelos, waarna 'n gelyke hoeveelheid asynsuuranhidried bygevoeg is. Nadat twee druppels triëtielamien bygevoeg is, is die reaksiemengsel vir *ca.* 24 uur onder droë toestande by 30 °C gelaat, waarna 'n yskoue versadigde *aq.* NaCl-oplossing (20 cm^3) bygevoeg is en met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is. Die gekombineerde etielasetaatlae is oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gefiltreer, *in vacuo* gekonsentreer en met DLC (H:E:A 5:3:2, v/v) gesuiwer om die pergeasetileerde enolasetaatderivaat (**43c**) van aspalatien (**43a**) (Rf 0.66, 186 mg, 97 %) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 37, Tabel 10

14.5.2 Poging tot die dehidrogenering van 'n mengsel van die pergeasetileerde keto- (43b) en enolasetaatvorme (43c) van aspalatien (43a)

'n Mengsel van nona-*O*-asetiel- (**43b**) en deka-*O*-asetielaspalatien (**43c**) (56 mg, ~ 0.07 mmol, ~ 1 ekw) is in droë THF (7 cm^3) opgelos, waarna vars geherkristalliseerde (CH_2Cl_2) 2,3-dichloro-5,6-disiano-1,4-bensokinoon (DDQ) (**184**) (17 mg, 0.07 mmol, 1 ekw) bygevoeg is en vir 20 uur onder N_2 gerefluks is.[232] Die liggeel reaksiemengsel het met verloop van tyd tot 'n dieprooi verdonker, is *in vacuo* gefiltreer en die presipitaat met yskoue water (3 x 70 cm^3) gewas, oor Na_2SO_4 gedroog, *in vacuo* gefiltreer en *in vacuo* gekonsentreer om slegs ongereageerde uitgangstof (46 mg, 82 % herwinning) te lewer.

^{1}H KMR: Plaat 37, Tabel 10

14.5.3 Poging tot die selektiewe metilering van aspalatien (43a)

'n Oplossing van aspalatien (**43a**) (100 mg, 0.22 mmol, 1 ekw) in droë asetoon (12 cm^3) is by droë K_2CO_3 (1.2 g, 8.8 mmol, 40 ekw) gevoeg, waarna MeI (1.1 cm^3, 2.5 g, 18 mmol, 80 ekw) bygevoeg is en vir 15 uur onder argon gerefluks is.[166,167] Die K_2CO_3 is *in vacuo* affiltreer en die reaksiemengsel, nadat dit *in vacuo* gekonsentreer is, met DLC (H:B:A:M 1:3:5:1, v/v) gefraksioneer om 2',3,4,4'-tetra-*O*-metielaspalatien (**187a**) (Rf 0.48, 15.3 mg, 14 %) en 2',3,4,4',6'-penta-*O*-metielaspalatien (**186a**) (Rf 0.31, 35.3 mg, 31 %) as geel strope te lewer.

Beide fraksies is volgens die standaardmetode geasetileer om die ooreenstemmende metieleterasetate (**187b** en **186b**) te lewer.

^{1}H KMR: Plate 72 en 73, Tabel 19

14.5.4 Pogings tot die volledige metilering van aspalatien (43a)

14.5.4.1 Poging 1

'n Oplossing van aspalatien (**43a**) (200 mg, 0.44 mmol, 1 ekw) in droë asetoon (24 cm^3) is by droë K_2CO_3 (980 mg, 7.09 mmol, 16 ekw) gevoeg, waarna dimetielsulfaat (1 cm^3, 6 mmol, 13 ekw) oor 'n periode van 15 min. onder N_2 bygedrup is.[241] Na vier dae is die oormaat kalsiumkarbonaat affiltreer en die asetoon *in vacuo* verwyder. Die konsentraat is met 0.1 N HCl aangesuur (universele indikator) nadat 'n yskoue versadigde *aq.* NaCl-oplossing (50 cm^3) bygevoeg is, waarna met etielasetaat (3 x 50 cm^3) geëkstraheer is. Die gekombineerde organiese lae is oor $MgSO_4$ gedroog, *in vacuo* gefiltreer en *in vacuo* gekonsentreer, waarna DLC-skeiding (B:A:M 6:3:1, v/v, H^+) verskeie gedeeltelik gemetileerde fraksies (Rf 0.43, 3.6 mg; Rf 0.48, 5.5 mg; Rf 0.64, 15.7 mg; Rf 0.75, 2.6 mg; Rf 0.79, 2.8 mg; Rf 0.80, 43 mg; Rf 0.81, 15 mg en Rf 0.91, 30 mg) gelewer het. Langer blootstelling aan die metileringskondisies het geen effek gehad nie.

14.5.4.2 Poging 2

2',3,4,4',6'-Penta-*O*-metielaspalatien (**198a**) (30 mg, 0.057 mmol, 1 ekw) is in 'n mengsel van droë DMSO (0.8 cm^3) en droë DMF (0.8 cm^3) opgelos en tot 0 °C afgekoel, waarna bariumoksied (301 mg, 2 mmol, 35 ekw) en bariumhidroksiedoktahidraat (164 mg, 0.52 mmol, 9 ekw), bygevoeg is. Dimetielsulfaat (0.45 cm^3, 593 mg, 4.7 mmol, 82.5 ekw) is drupsgewys oor 'n periode van 15 min. by 0 °C onder N_2 bygevoeg, waarna vir 7 dae by kamertemperatuur geroer is.[243] 'n Gekonsentreerde *aq.* ammoniakoplossing (0.5 cm^3) is drupsgewys oor 'n periode van 15 min. bygevoeg, waarna 4 N HCl (0.5 cm^3) oor dieselfde periode by 0 °C bygedrup is. Die reaksiemengsel is by 'n yskoue *aq.* versadigde NaCl-oplossing (100 cm^3) gevoeg en met etielasetaat (3 x 100 cm^3) geëkstraheer. *In vacuo* konsentrasie gevolg deur DLC-skeiding (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, H^+) het vier onvolledig gemetileerde fraksies (Rf 0.54, 2.3 mg; Rf 0.46, 3 mg; Rf 0.43, 2.6 mg en Rf 0.27, 2.6 mg) gelewer.

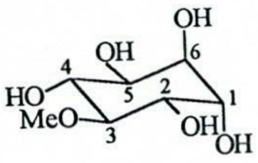
14.5.4.3 Poging 3

2',3,4,4',6'-Penta-*O*-metielaspalatien (**198a**) (45 mg, 0.086 mmol, 1 ekw) is in die teenwoordigheid van N_2 in droë DMF (0.5 cm^3) by kamertemperatuur opgelos, waarna MeI (0.13 cm^3, 2.1 mmol, 24 ekw) bygevoeg is terwyl heftig geroer is. 'n Suspensie van silweroksied (120.5 mg, 0.52 mmol, 6 ekw) in droë DMF (0.5 cm^3) is stadig m.b.v. 'n oordragnaald en stikstofdruk by die reaksiemengsel gedrup.[244] Na 7 dae is die silweroksied affiltreer en die neerslag met chloroform (3 x 50 cm^3) gewas, waarna met gedistilleerde water (3 x 50 cm^3) gewas is, die organiese fases oor Na_2SO_4 gedroog is, *in vacuo* gefiltreer is en *in vacuo* gekonsentreer is. DLC-analise (H:B:A:M 40:40:15:5, v/v, H^+) het die teenwoordigheid van dieselfde onvolledig gemetileerde fraksies (Rf 0.54, Rf 0.46, Rf 0.43 en Rf 0.27) as in par. 14.5.5 bevestig.

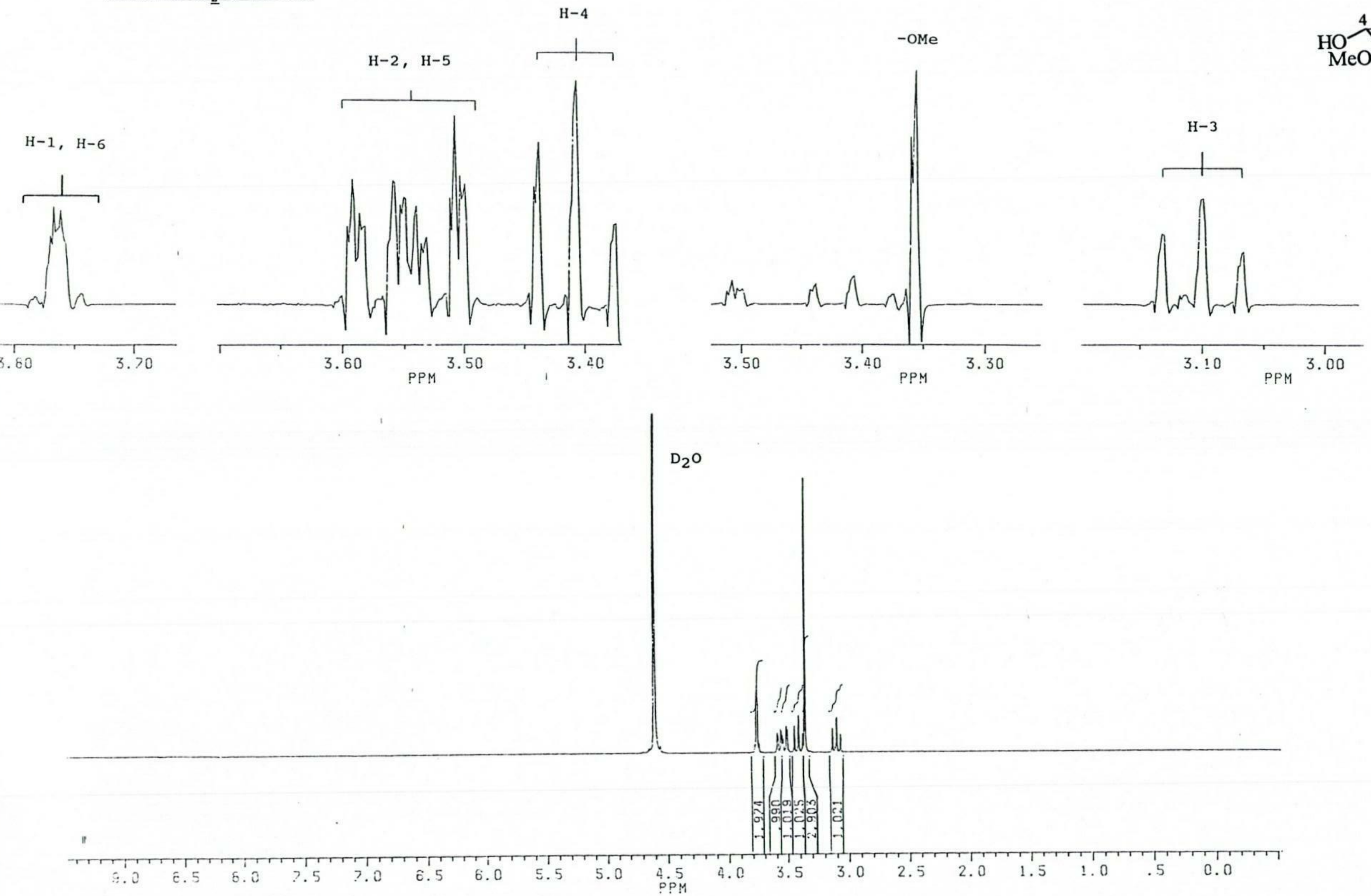
BYLAE 1

KMR-PLATE

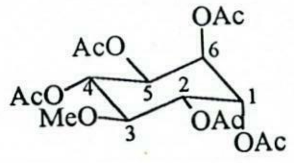
Plaat 1 (D_2O, 296 K)



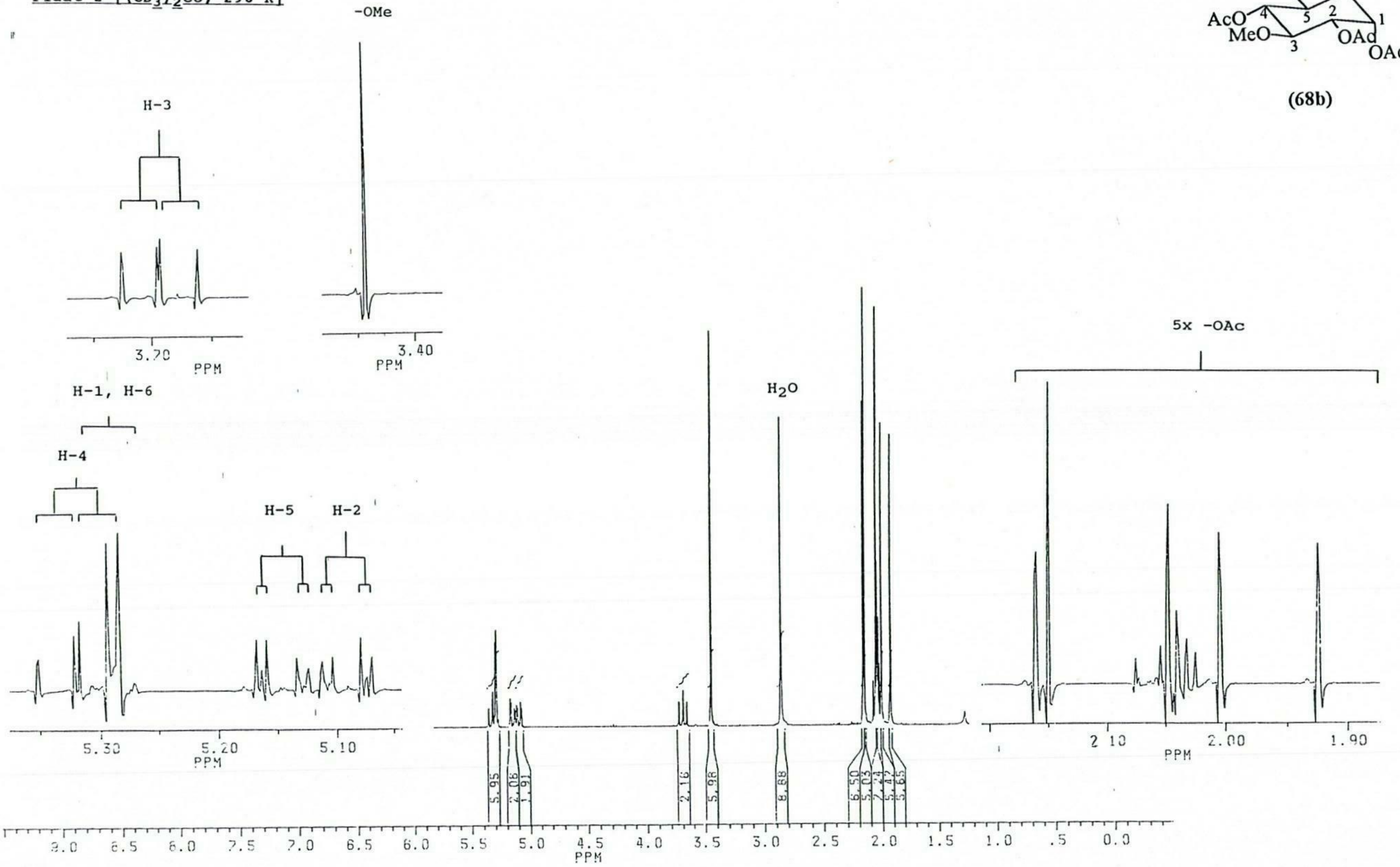
(68a)



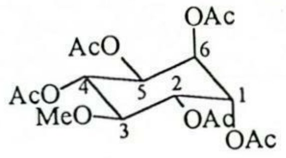
Plaat 2 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



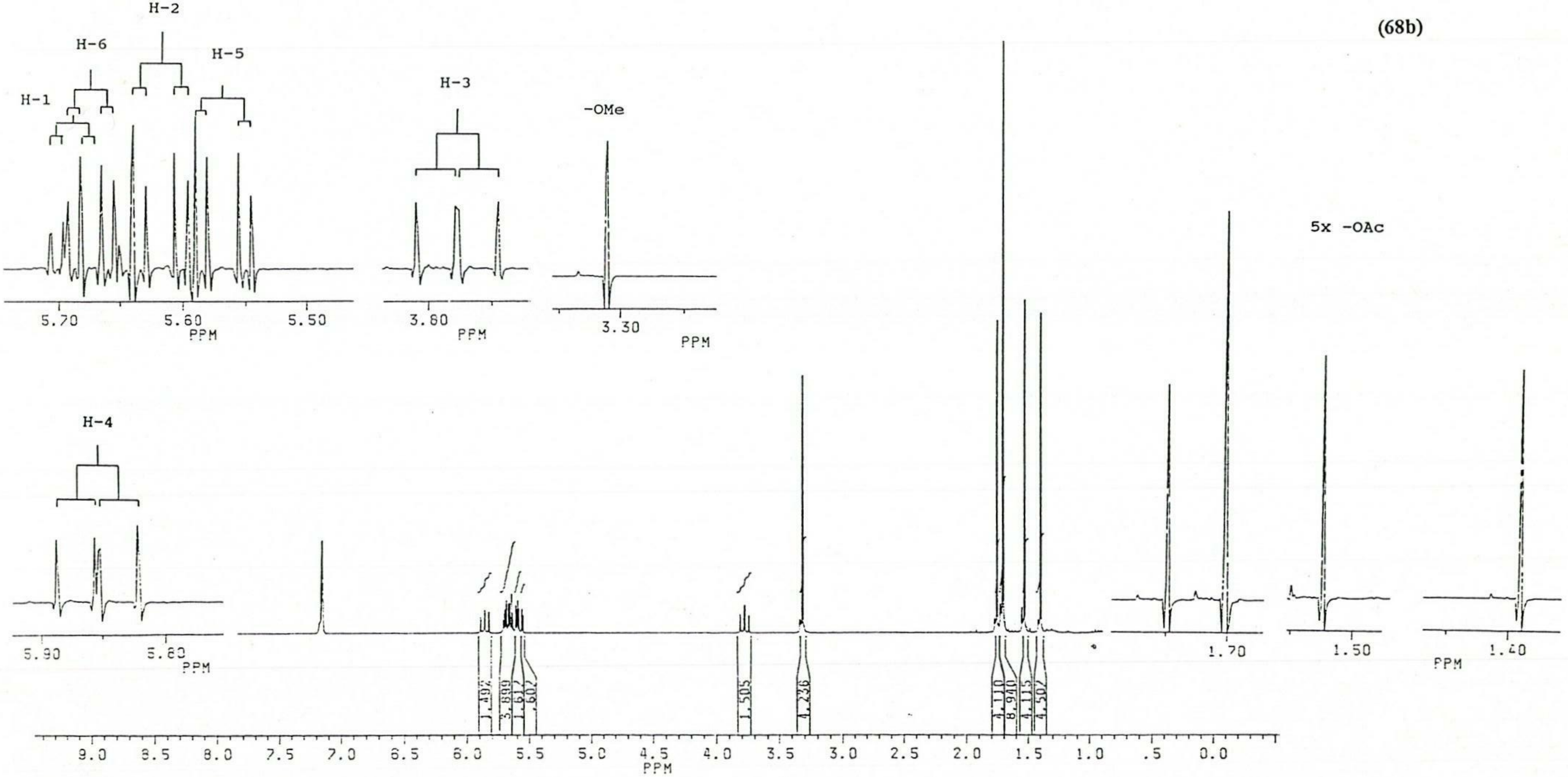
(68b)



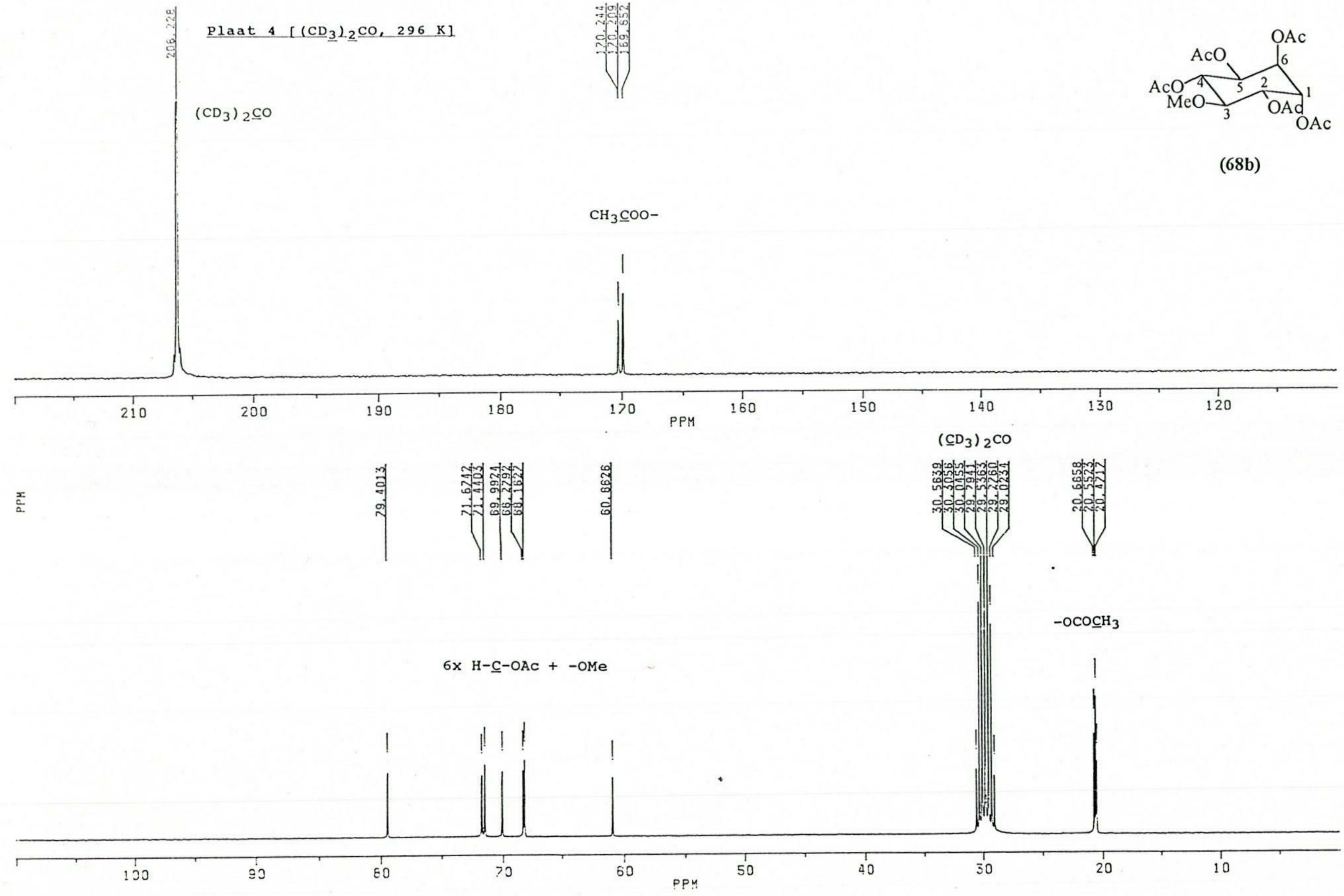
Plaat 3 (C_6D_6, 296 K)



(68b)

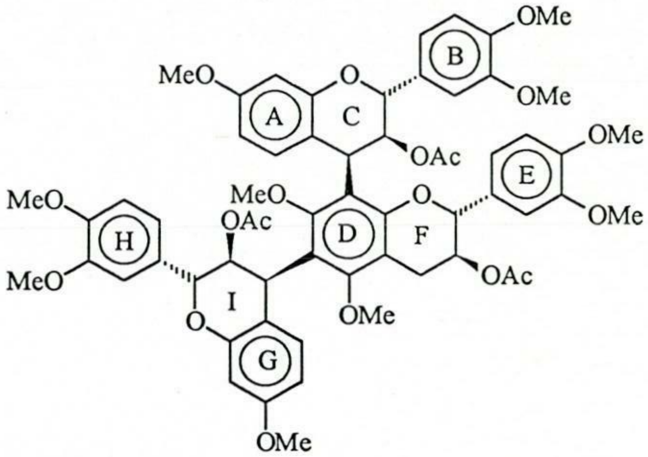


Plaat 4 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]

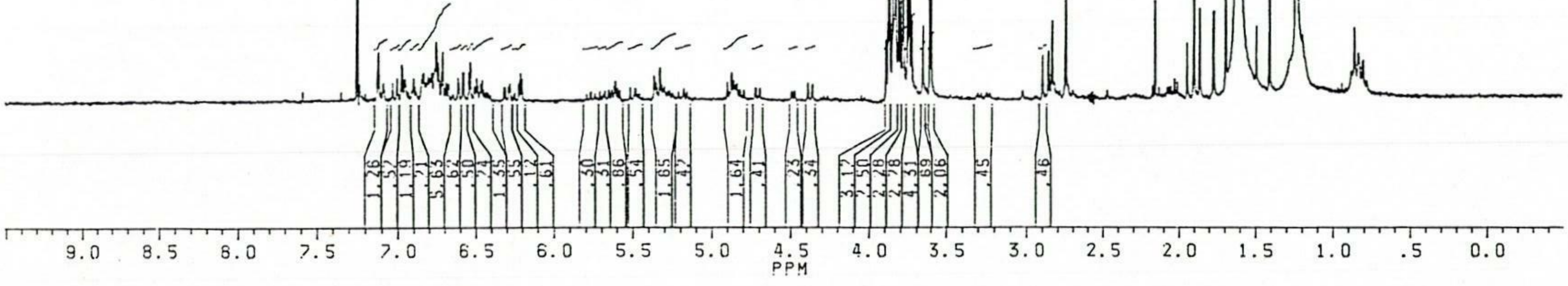


(68b)

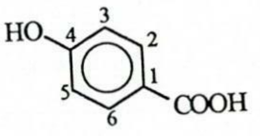
Plaat 5 ($CDCl_3$, 353 K)



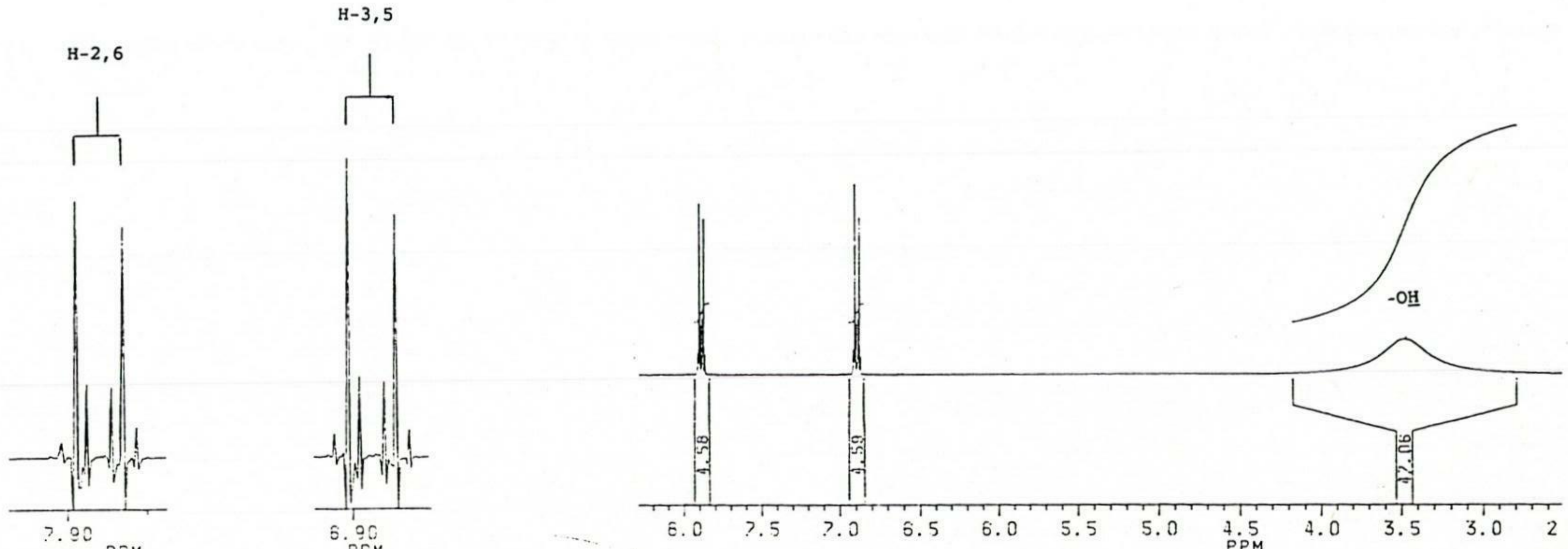
(93b)



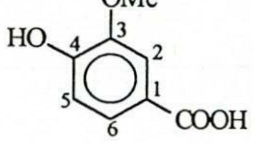
Plaat 6 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



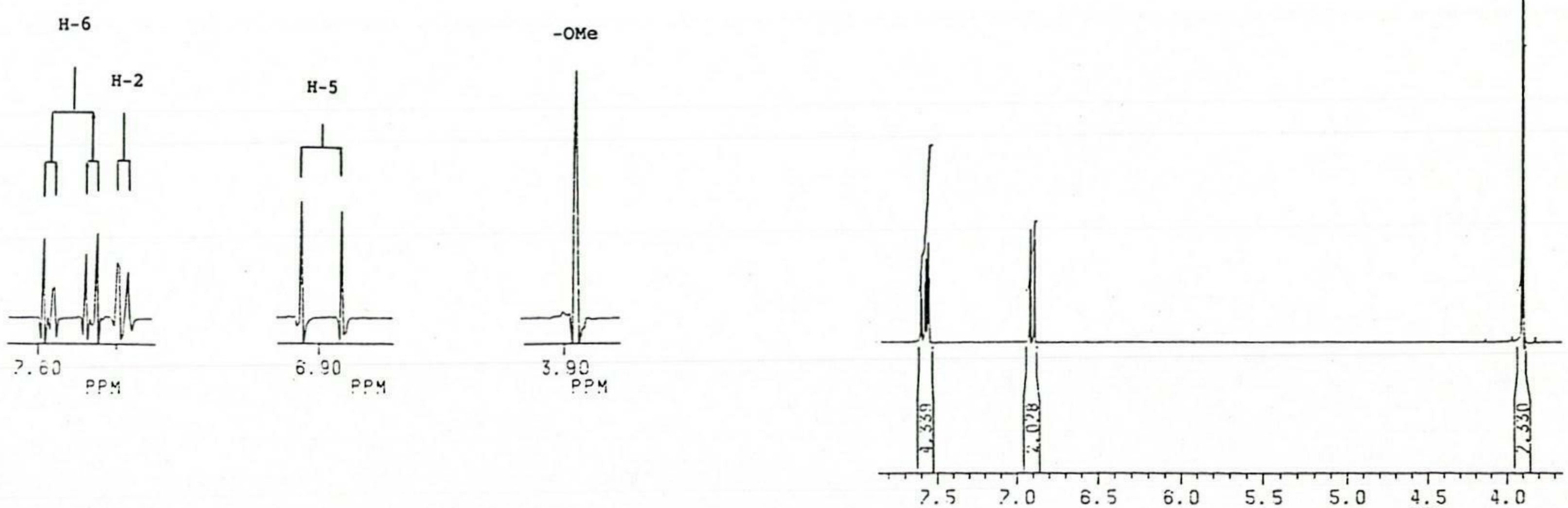
(71)



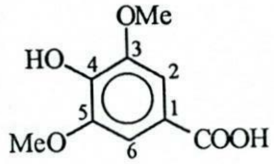
Plaat 7 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



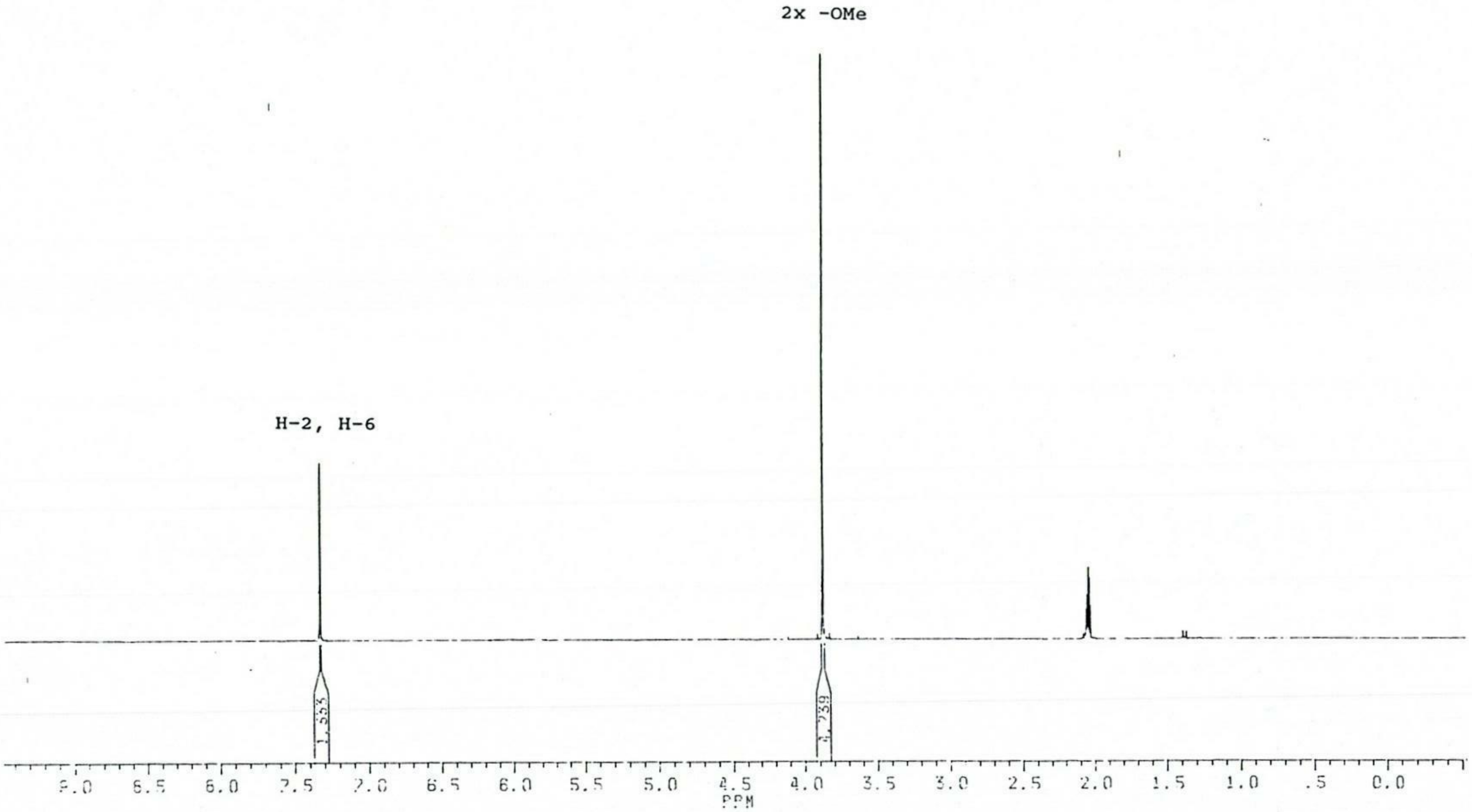
(73)



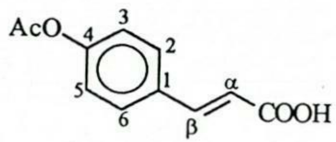
Plaat 8 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



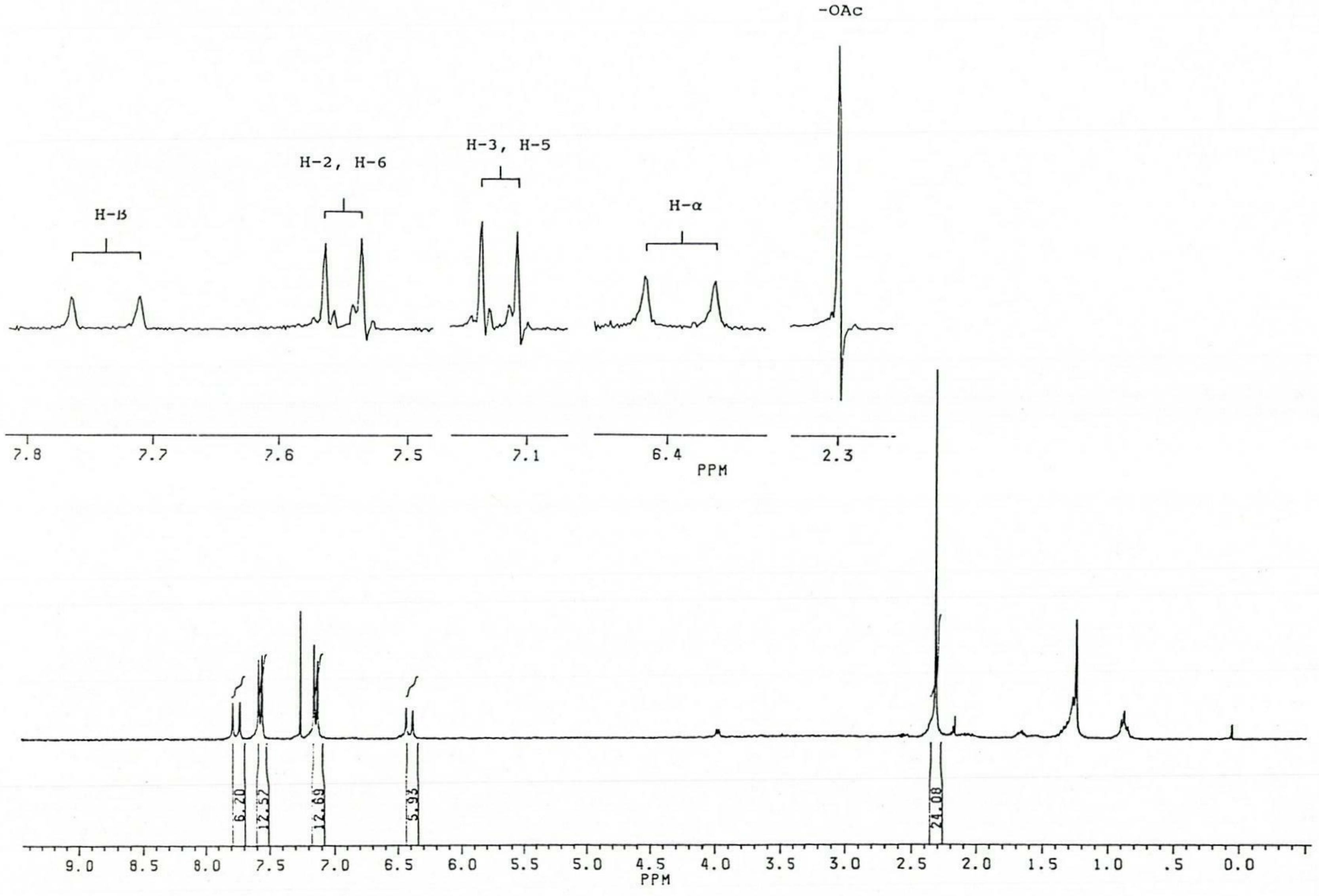
(74)



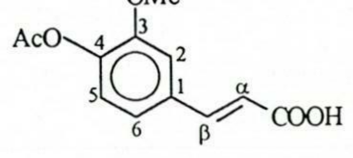
Plaat 9 ($CDCl_3$, 296 K)



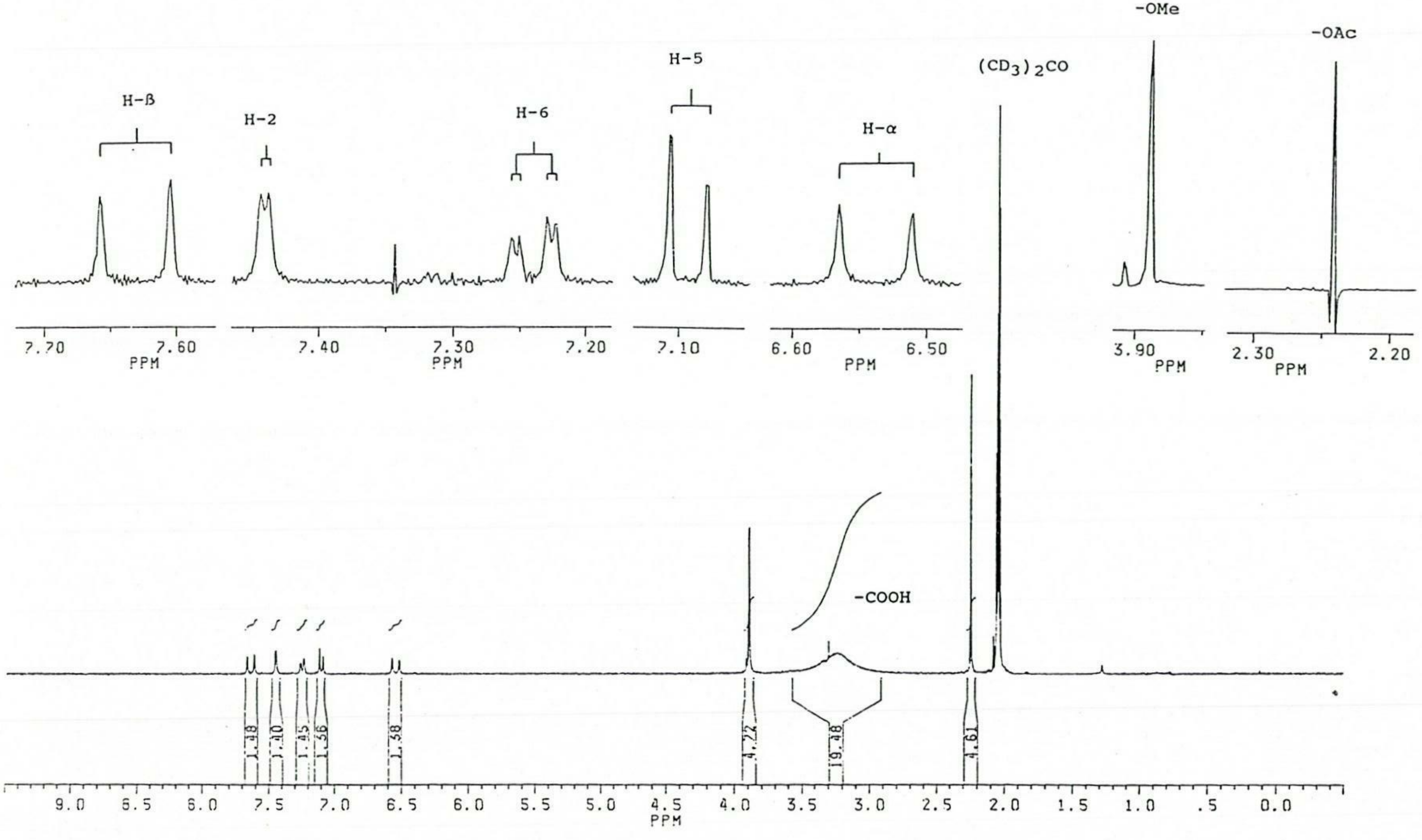
(75b)



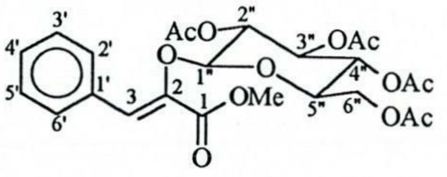
Plaat 10 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



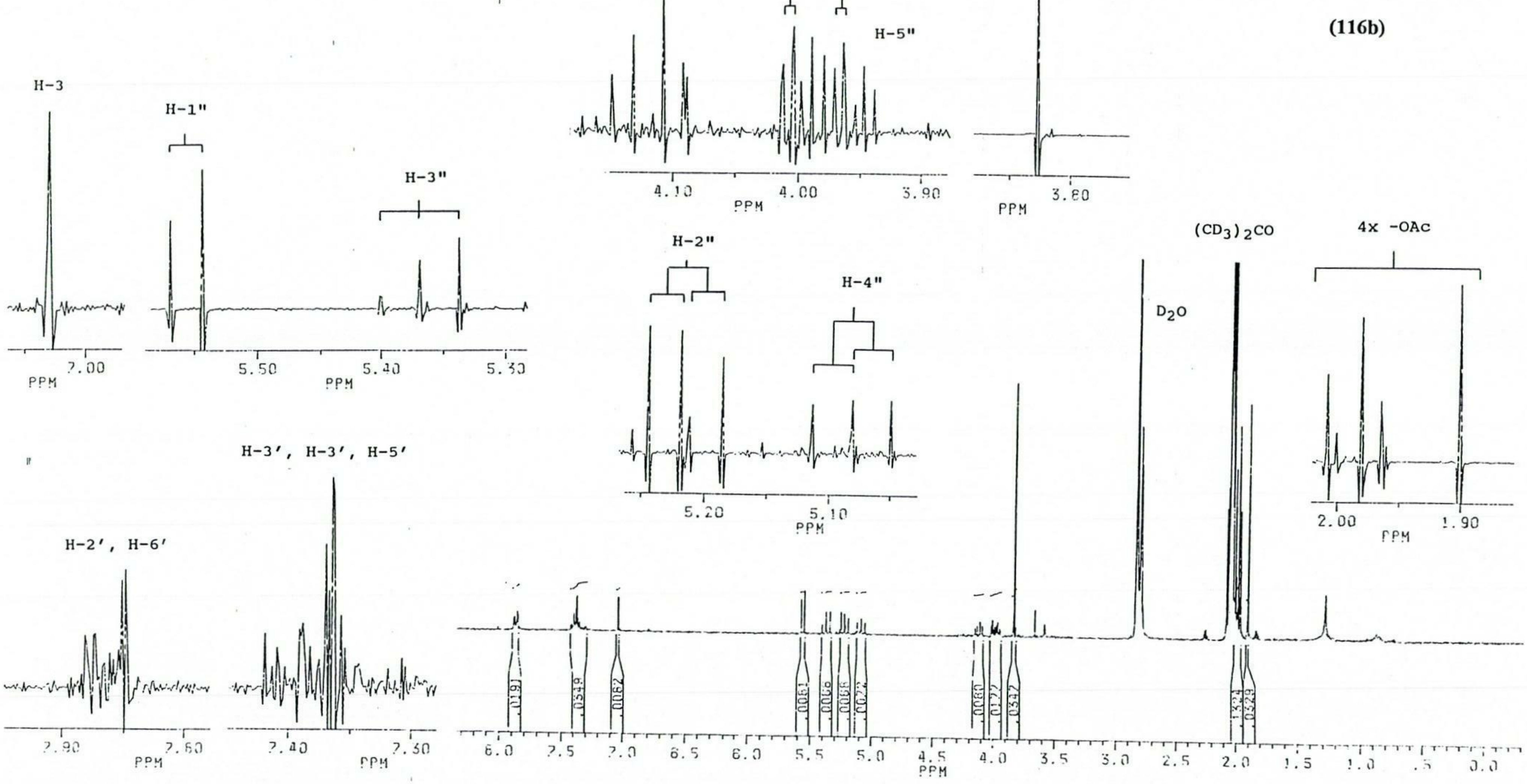
(77b)



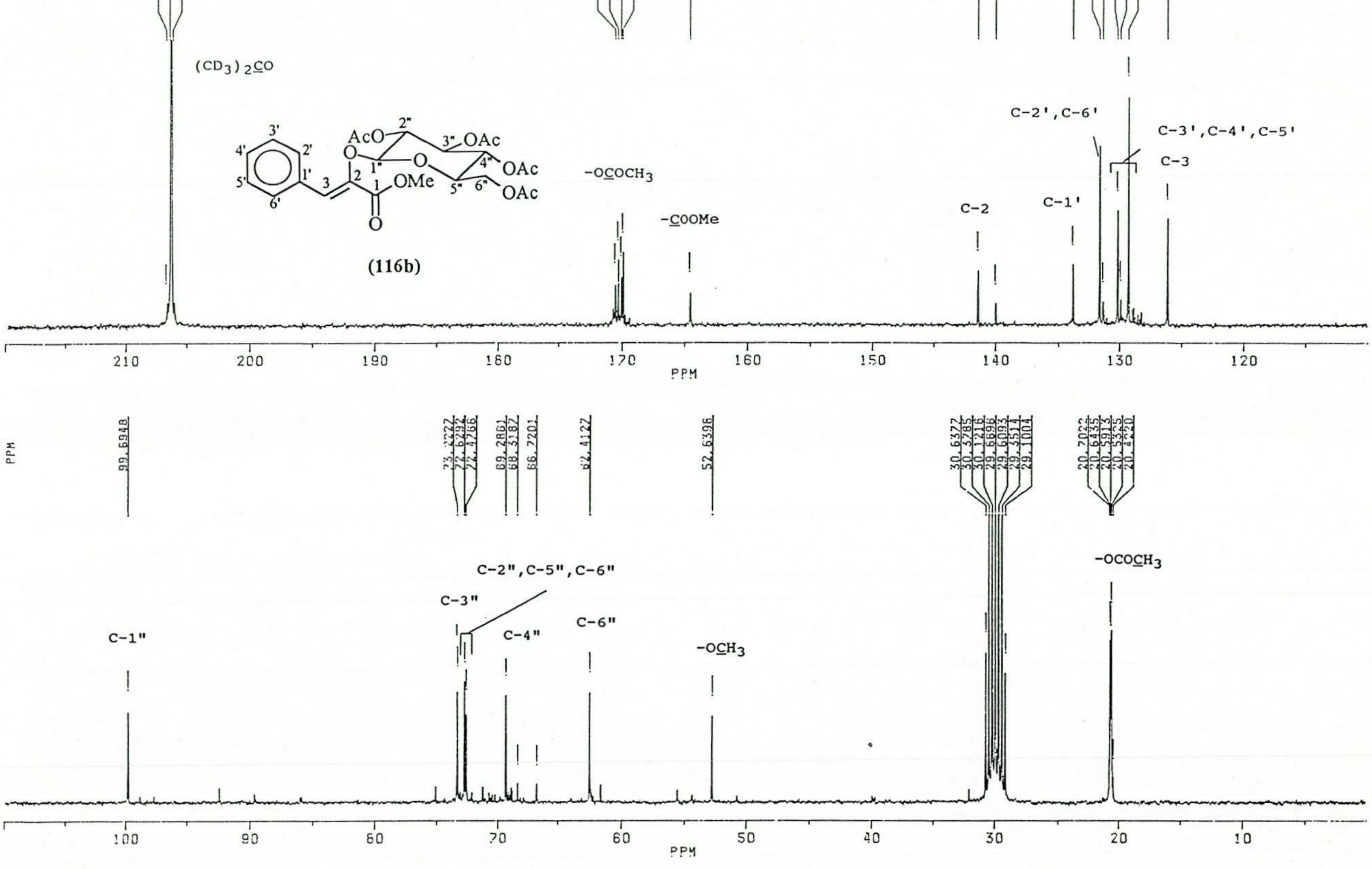
Plaat 11 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



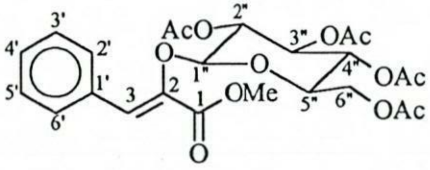
(116b)



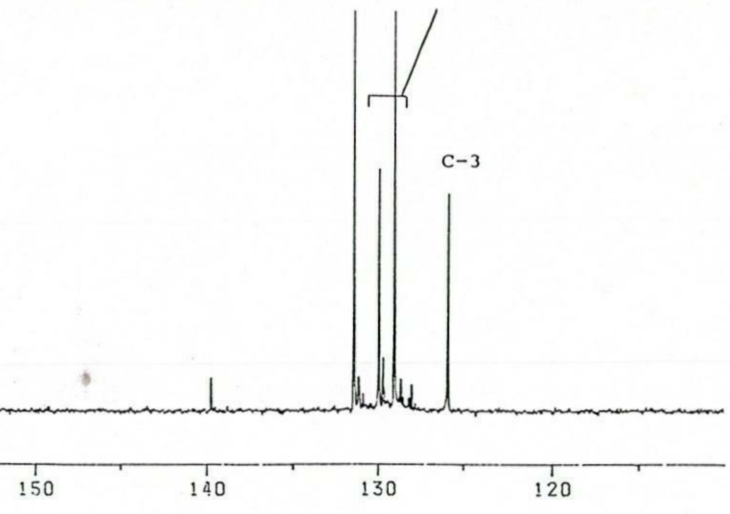
Plaat 12 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

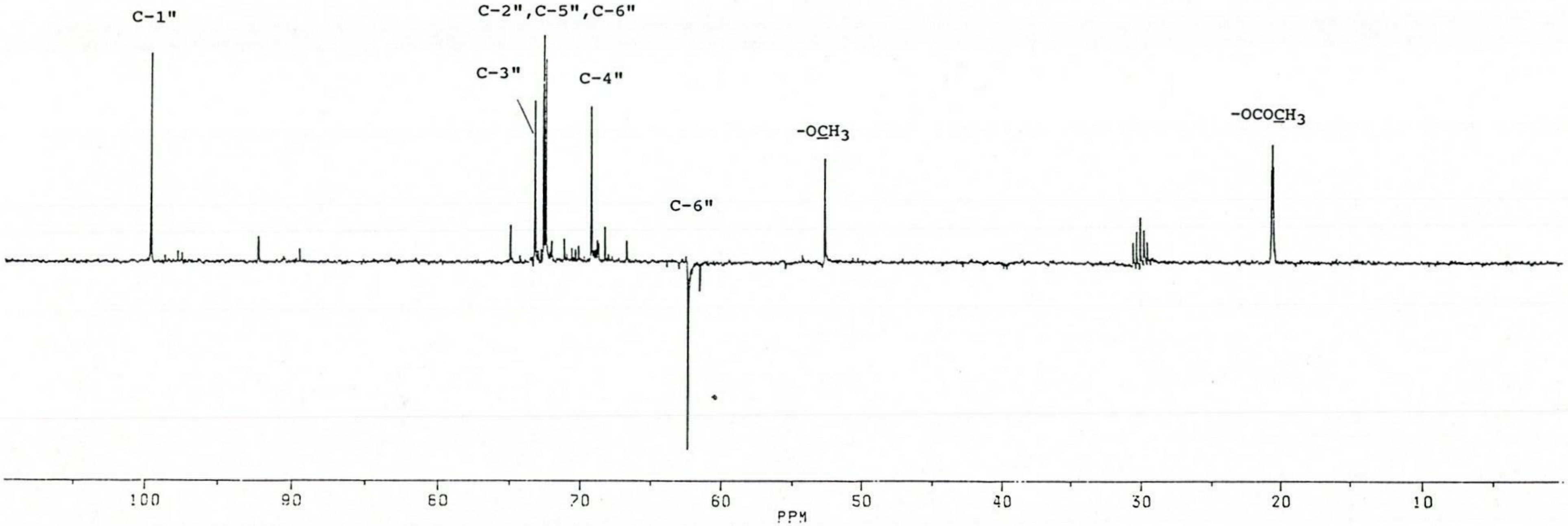


Plaat 13 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

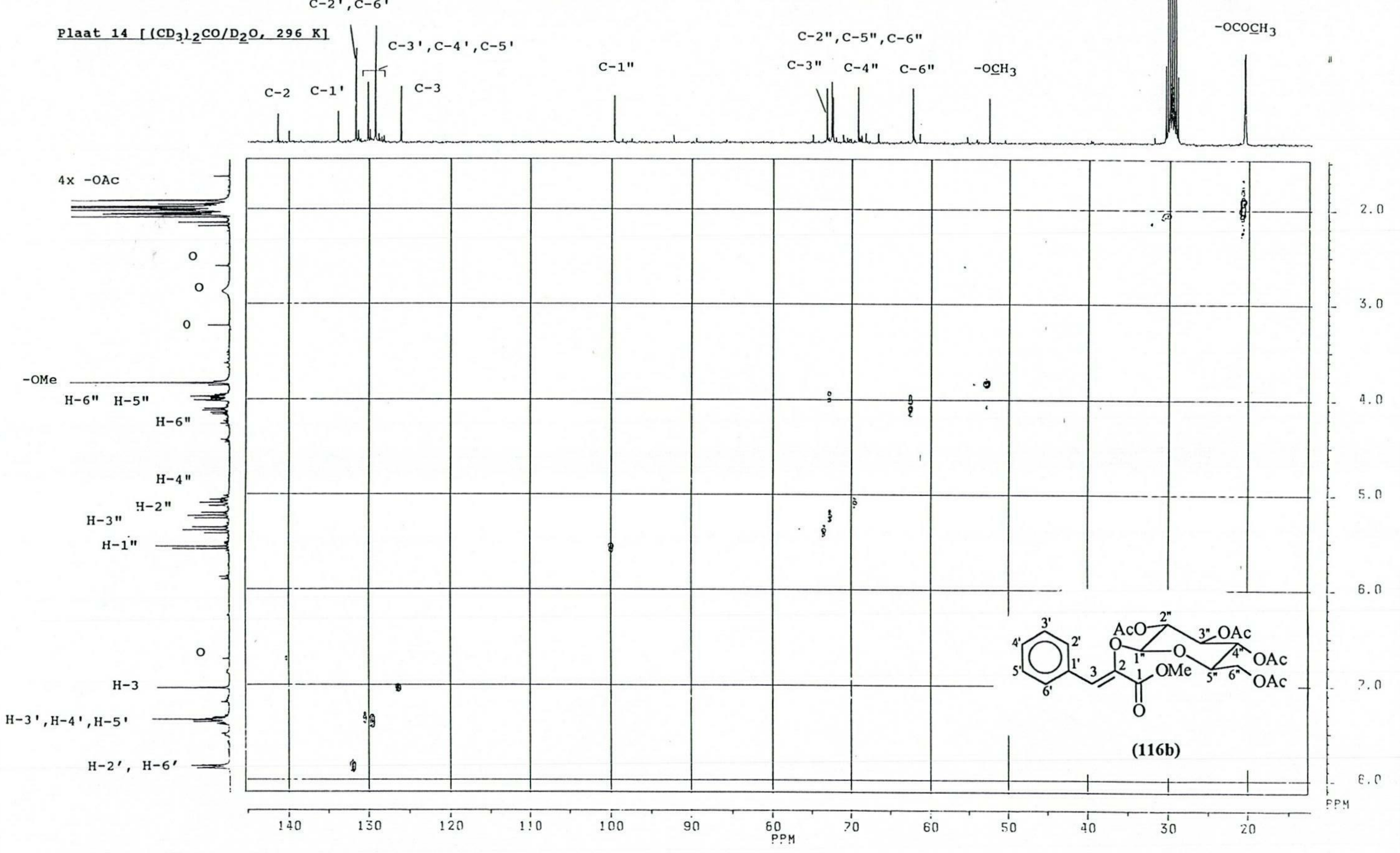


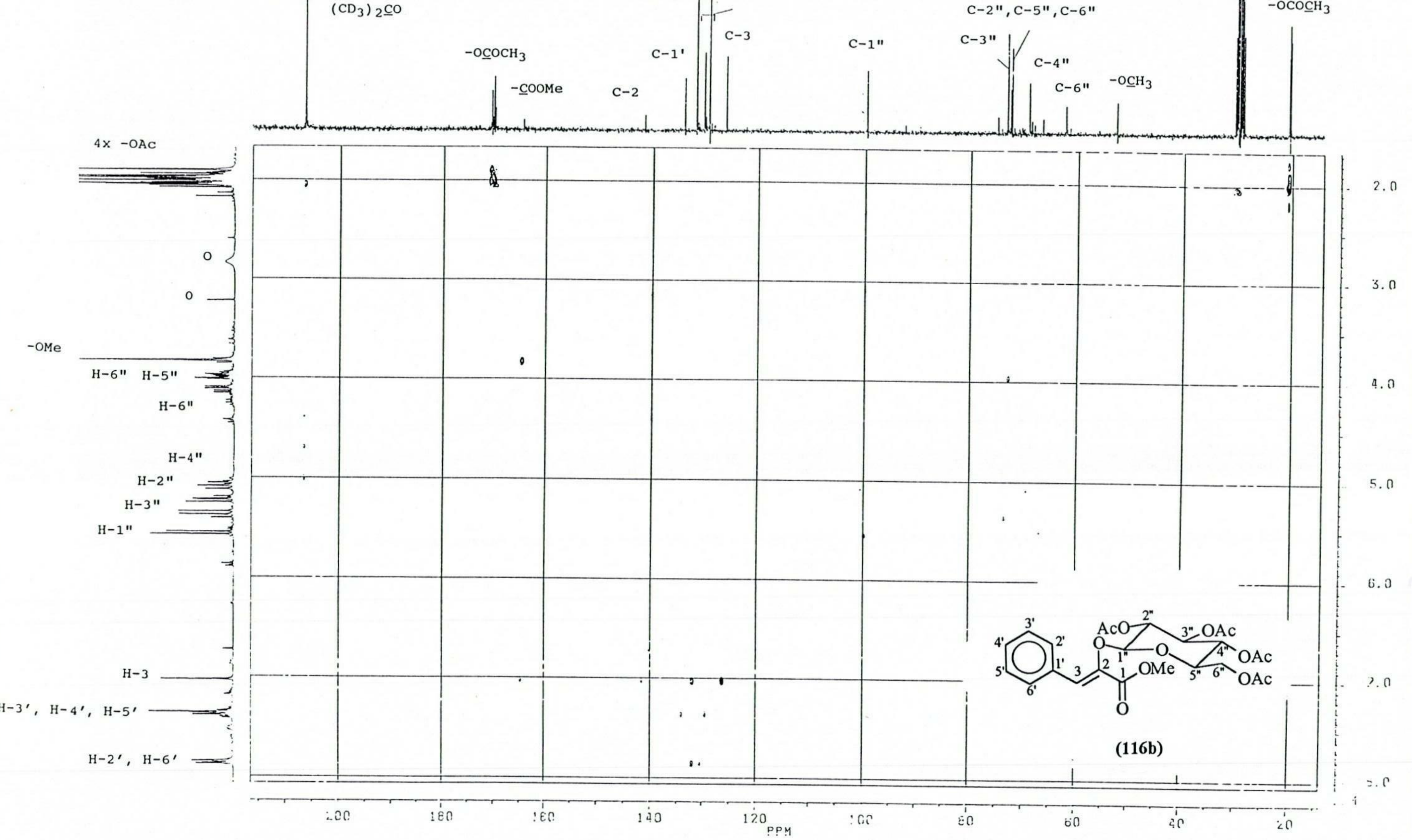
(116b)



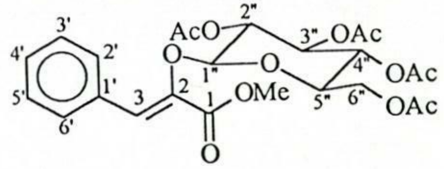


Plaat 14 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

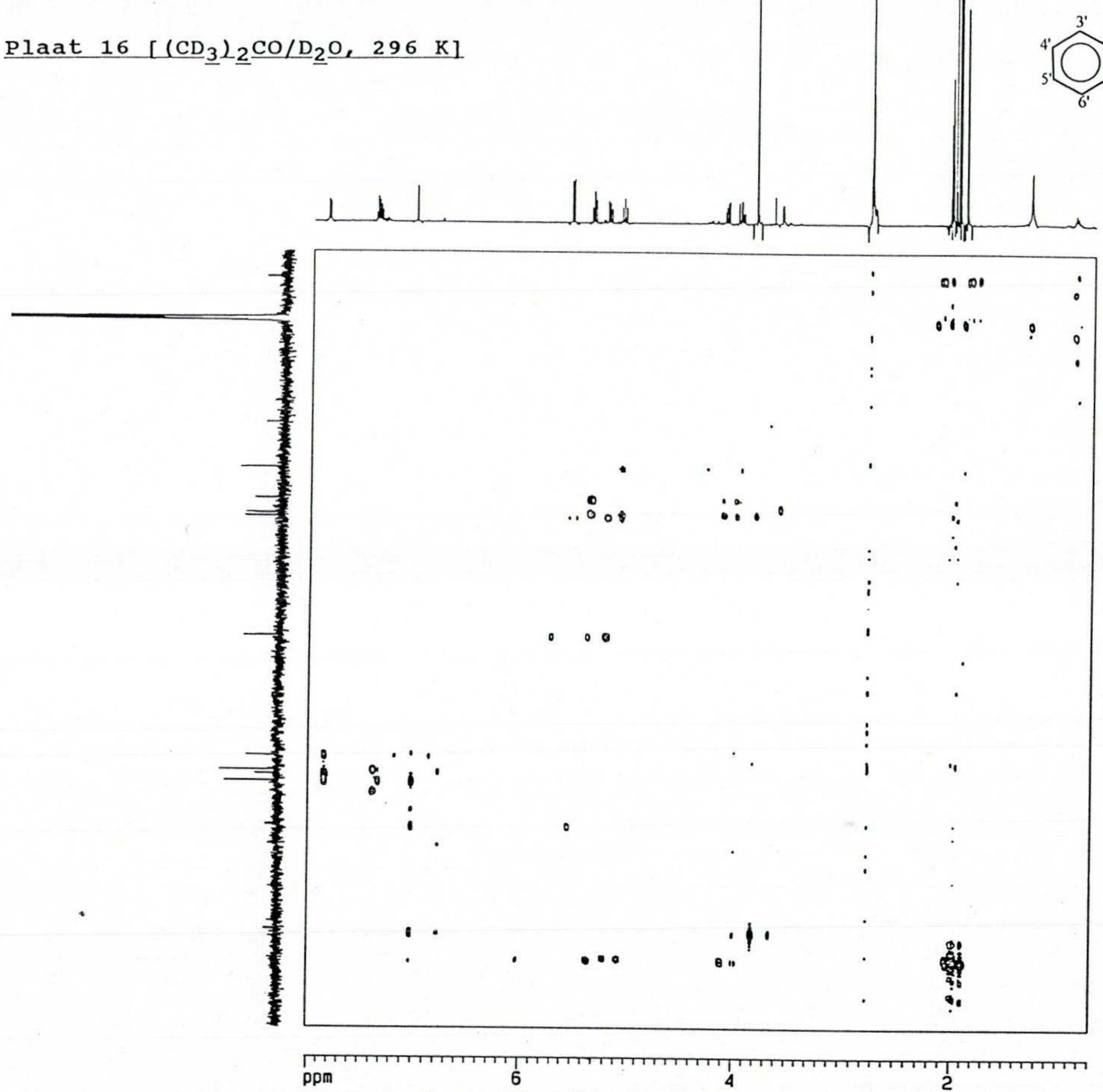



(CD3)2CO
-OCOCH3
-COOMe
C-2
C-1'
C-3
C-1"
C-3"
C-2",C-5",C-6"
C-4"
C-6"
-OCH3
-OCOCH3
4x -OAc
-OMe
H-6" H-5"
H-6"
H-4"
H-2"
H-3"
H-1"
H-3
H-3', H-4', H-5'
H-2', H-6'
AcO
OAc
OMe
(116b)
PPM

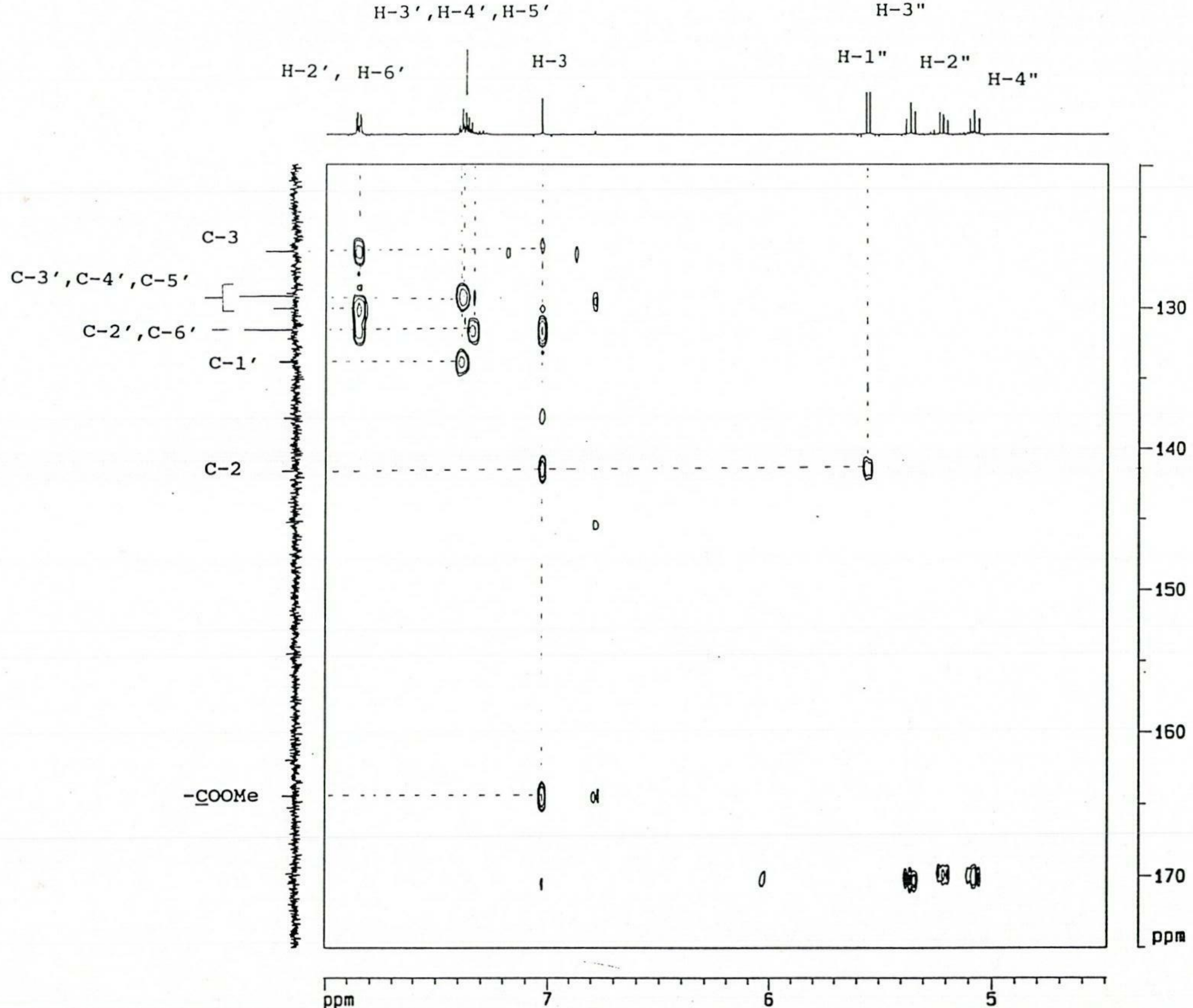
Plaat 16 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

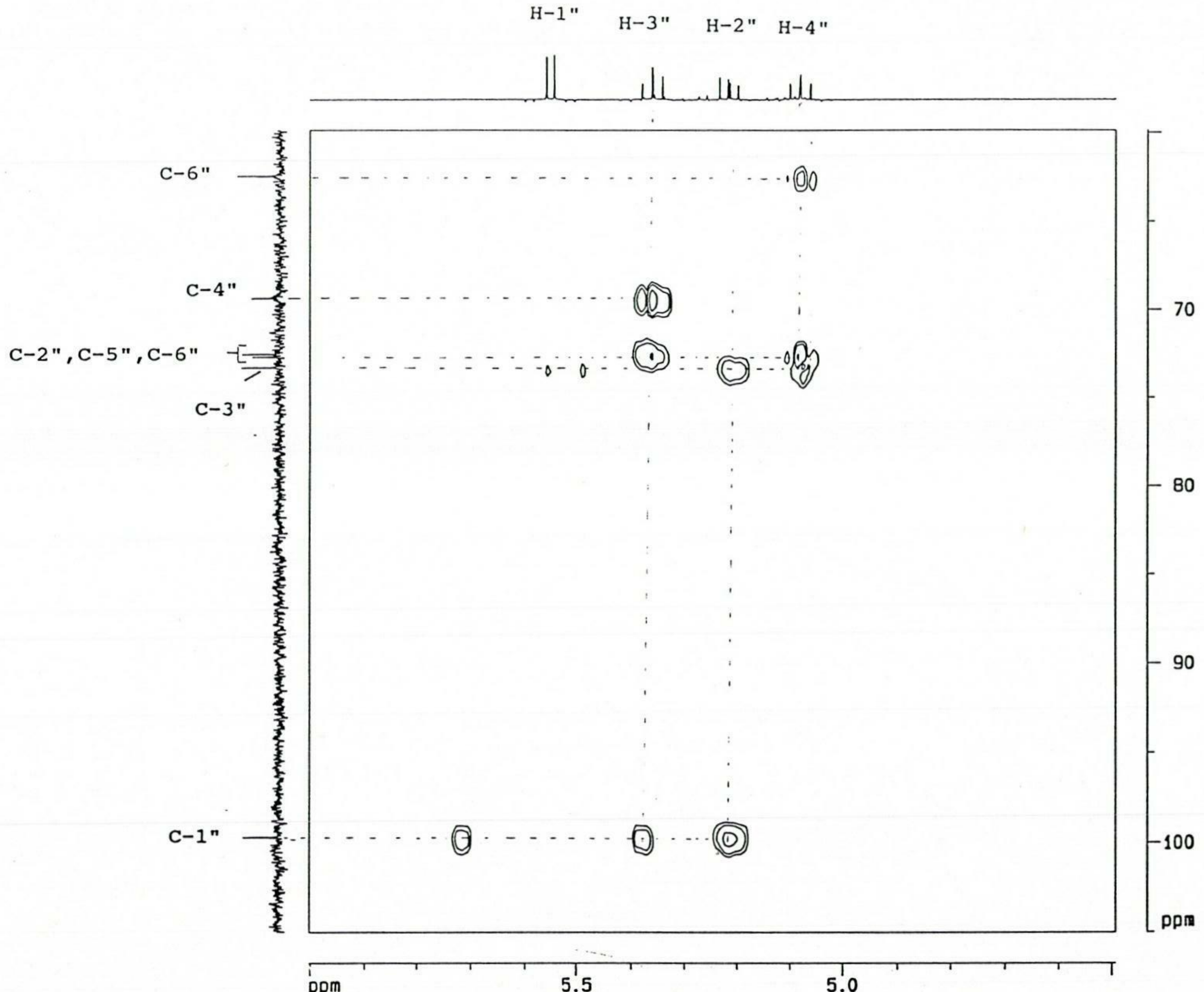


(116b)

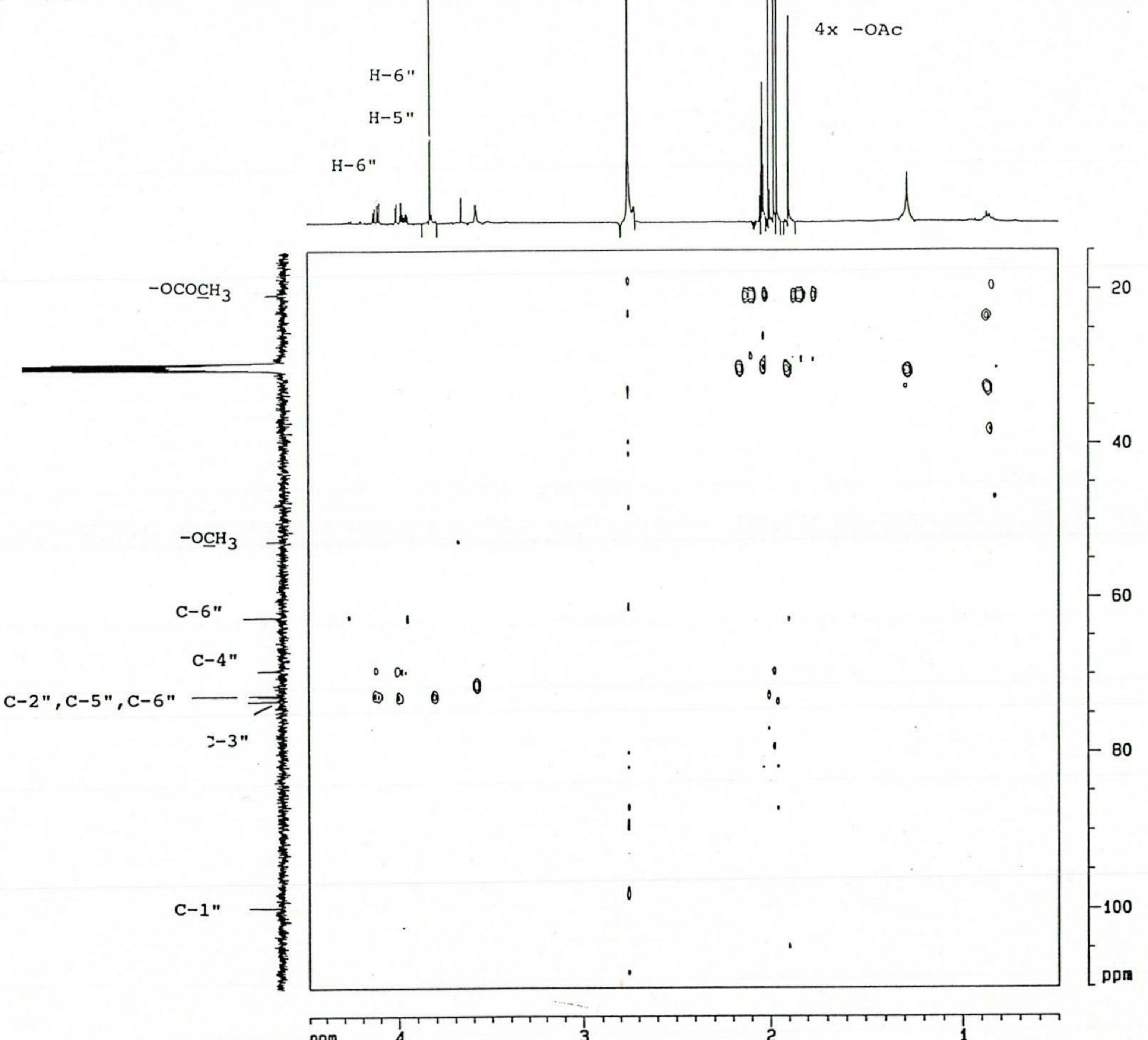


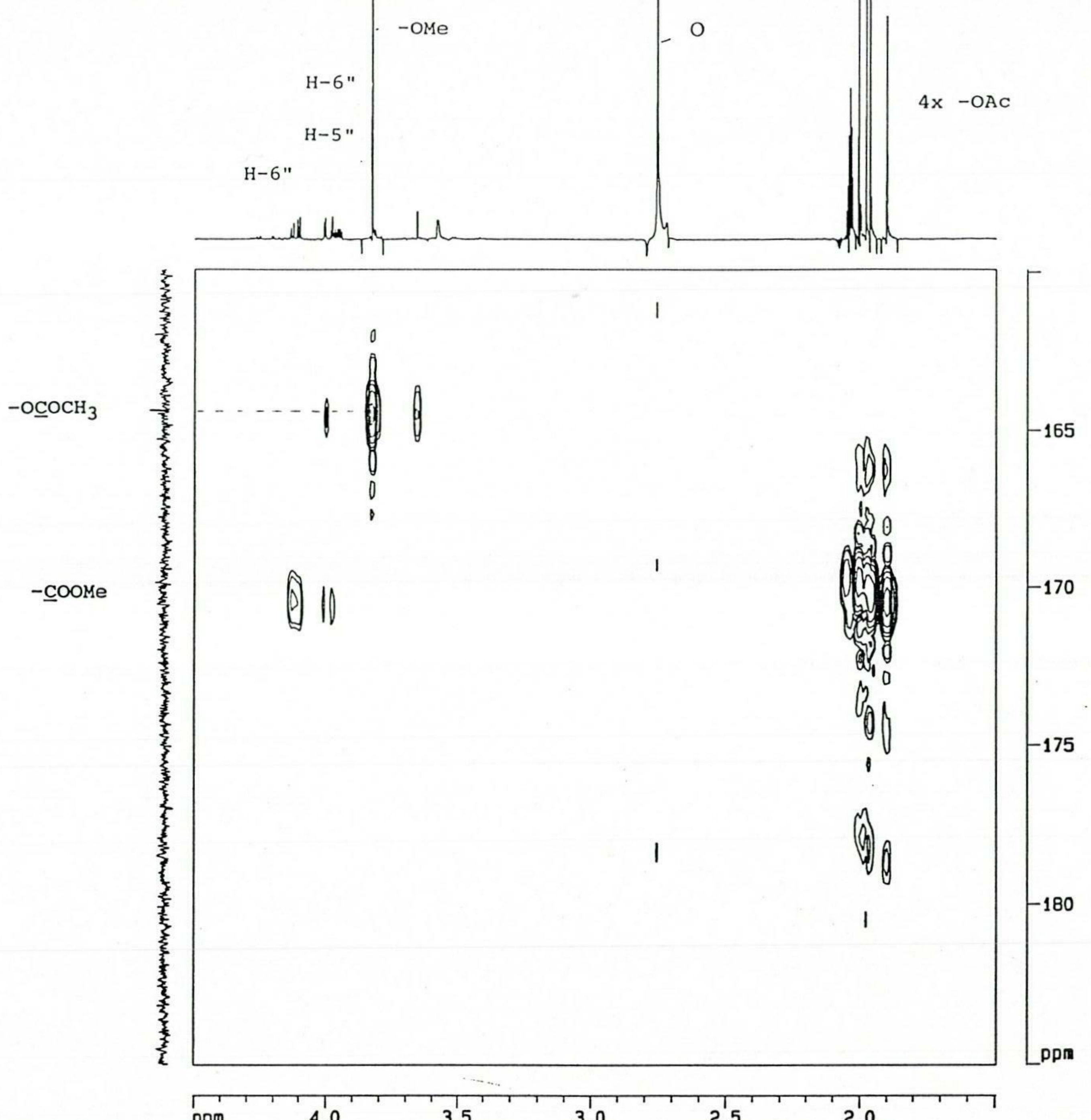
Plaat 16 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



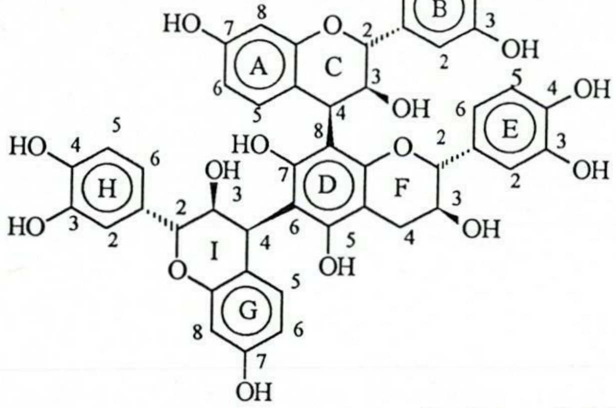


H-1"
H-3"
H-2"
H-4"
C-6"
C-4"
C-2",C-5",C-6"
C-3"
C-1"
70
80
90
100
ppm
ppm
5.5
5.0

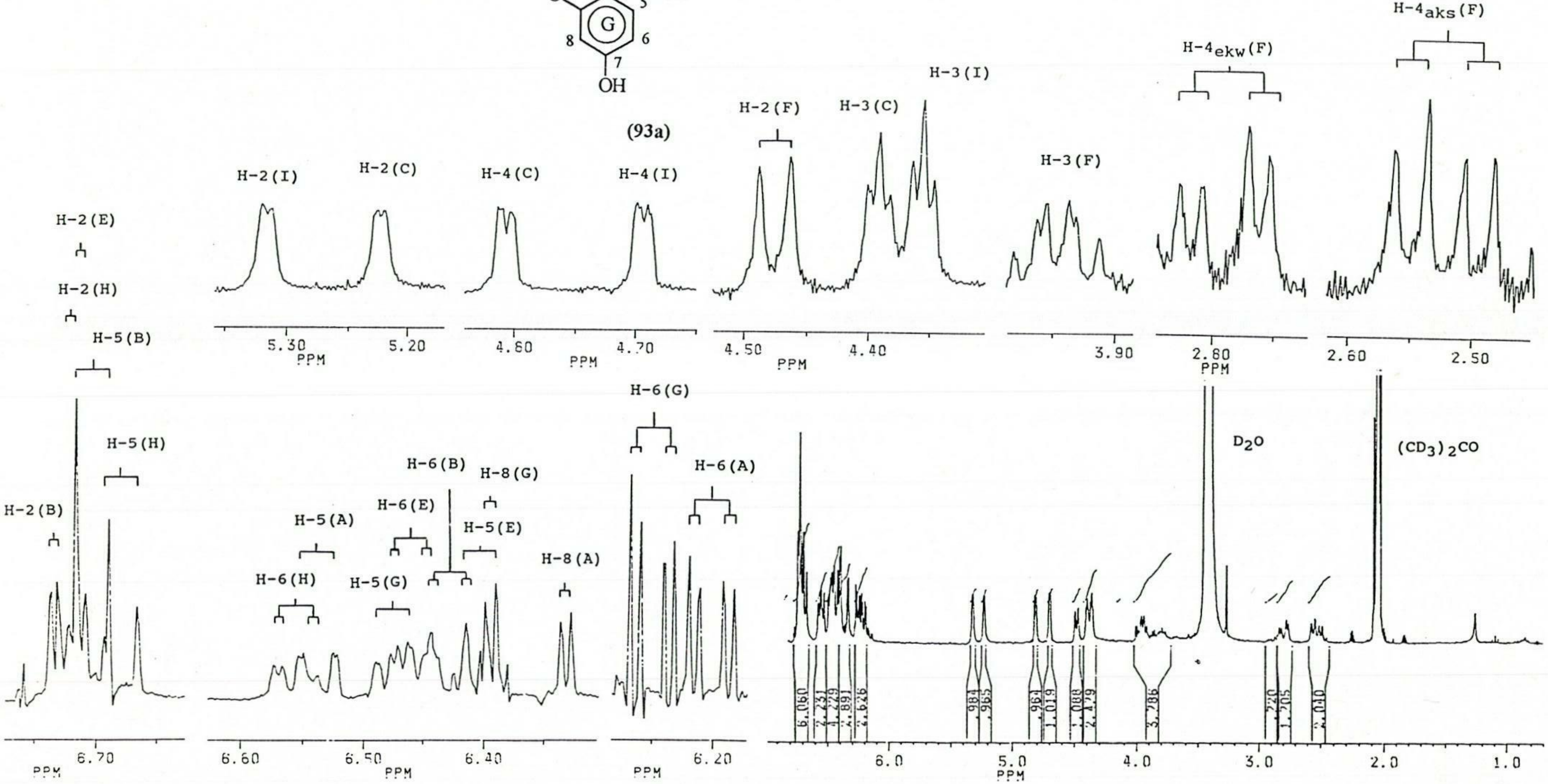

4x -OAc
H-6"
H-5"
H-6"
-OCOCH3
-OCH3
C-6"
C-4"
C-2",C-5",C-6"
C-3"
C-1"
20
40
60
80
100
ppm
4
3
2
1


-OMe
O
H-6"
H-5"
H-6"
4x -OAc
-O$\underline{C}$OCH$_3$
-$\underline{C}$OOMe
165
170
175
180
ppm
ppm
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0

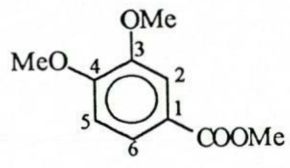
Plaat 17 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



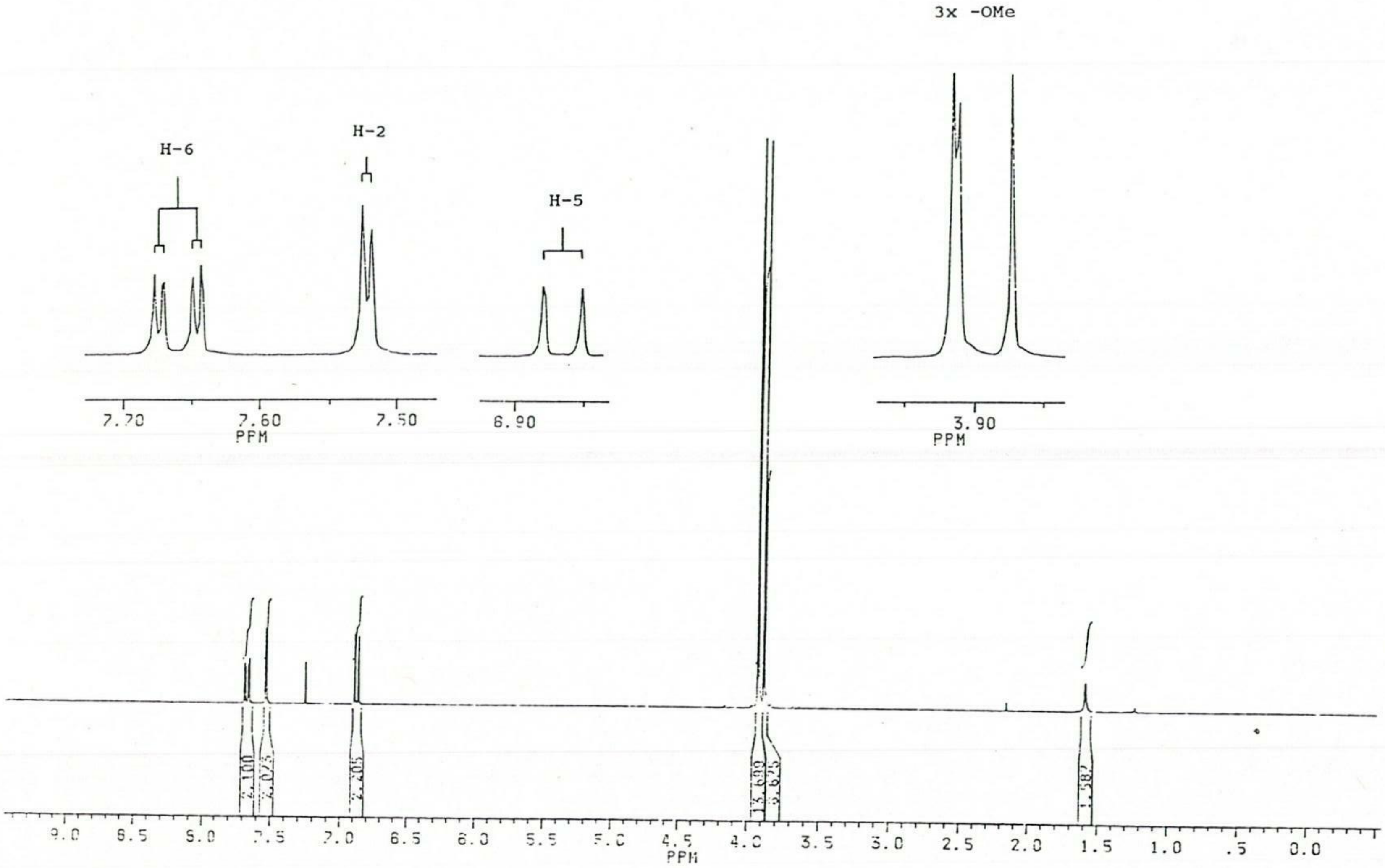
(93a)



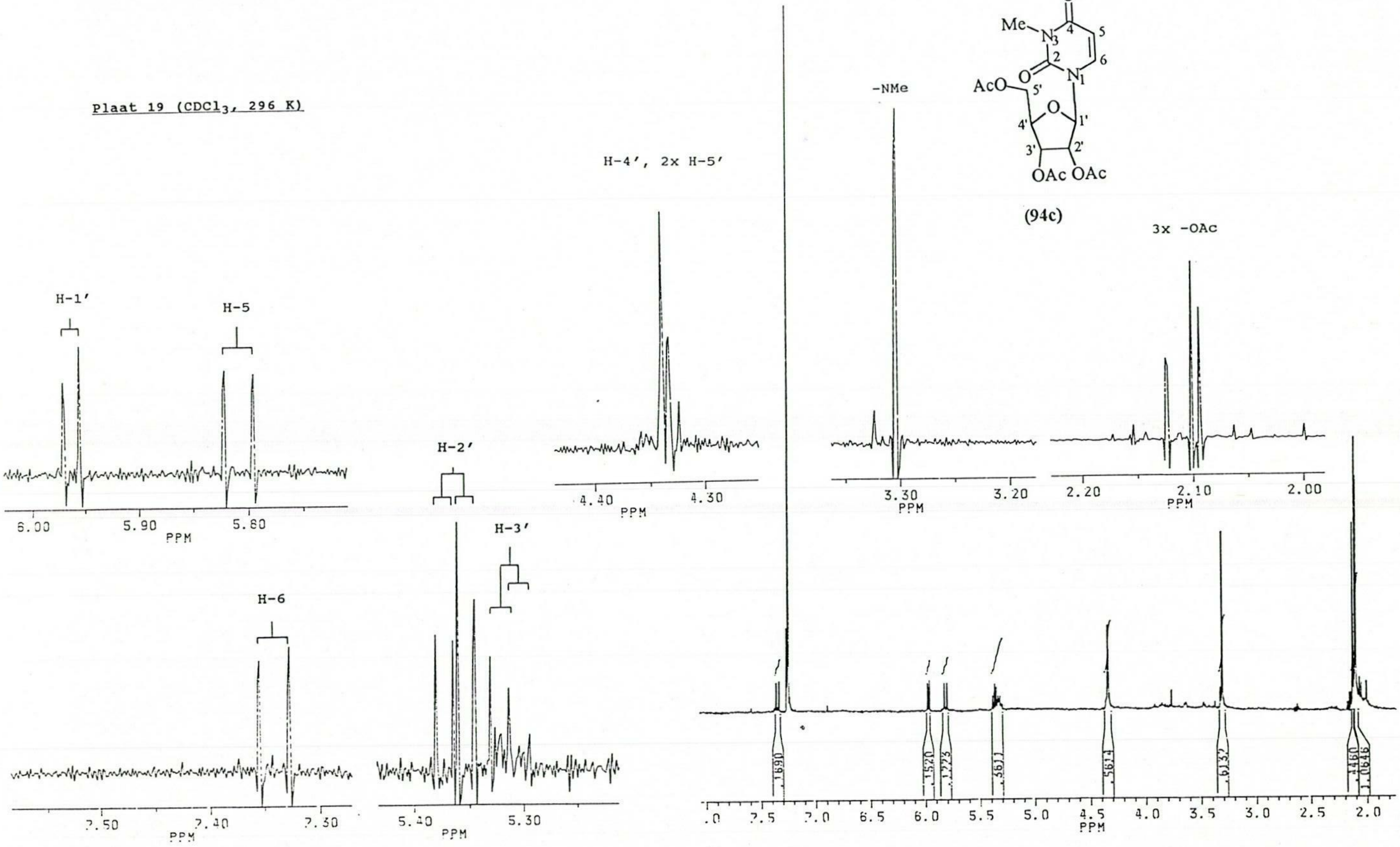
Plaat 18 (CDCl$_3$, 296 K)

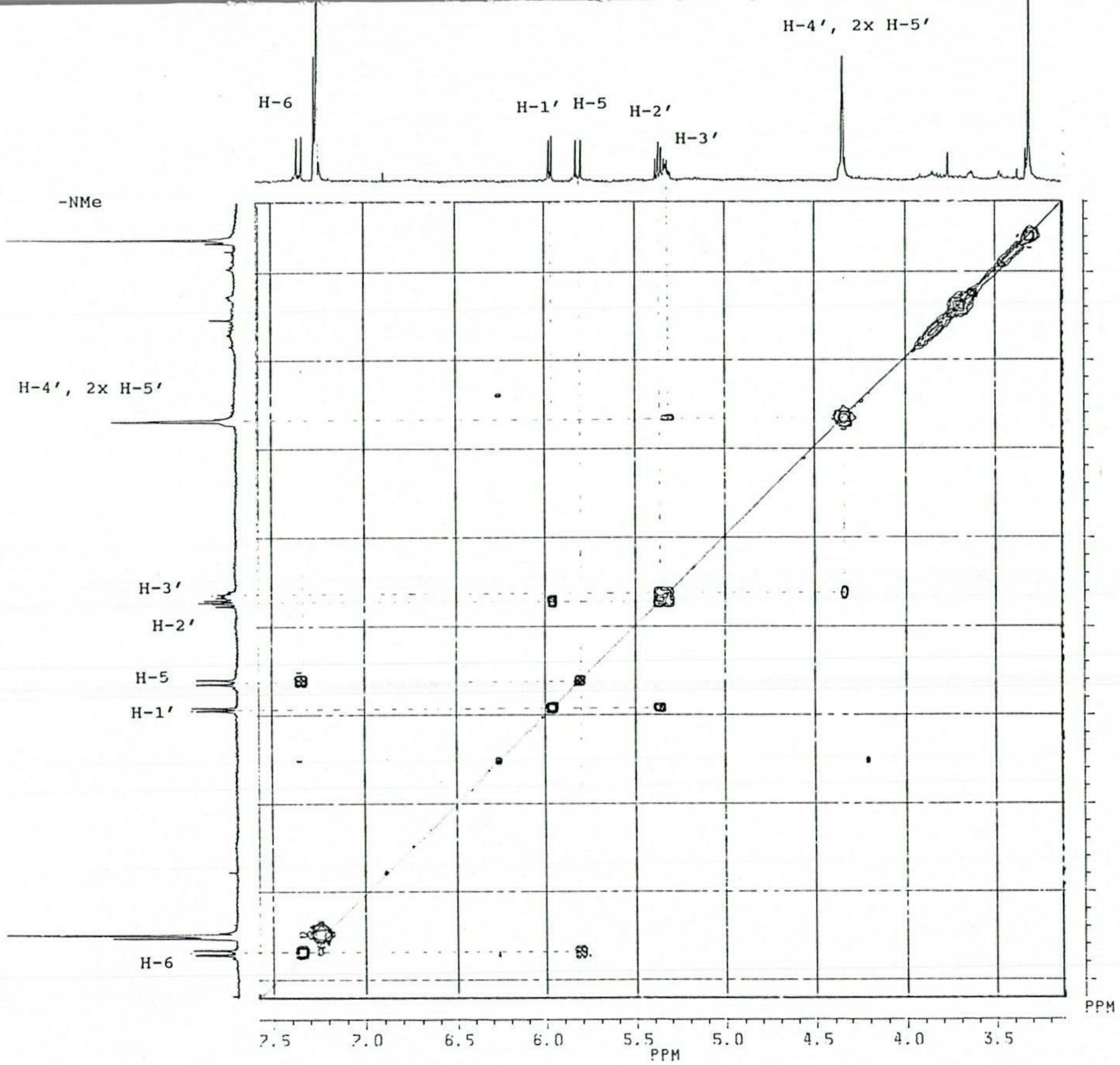


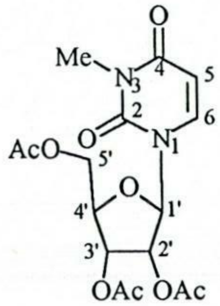
(72b)



Plaat 19 ($CDCl_3$, 296 K)

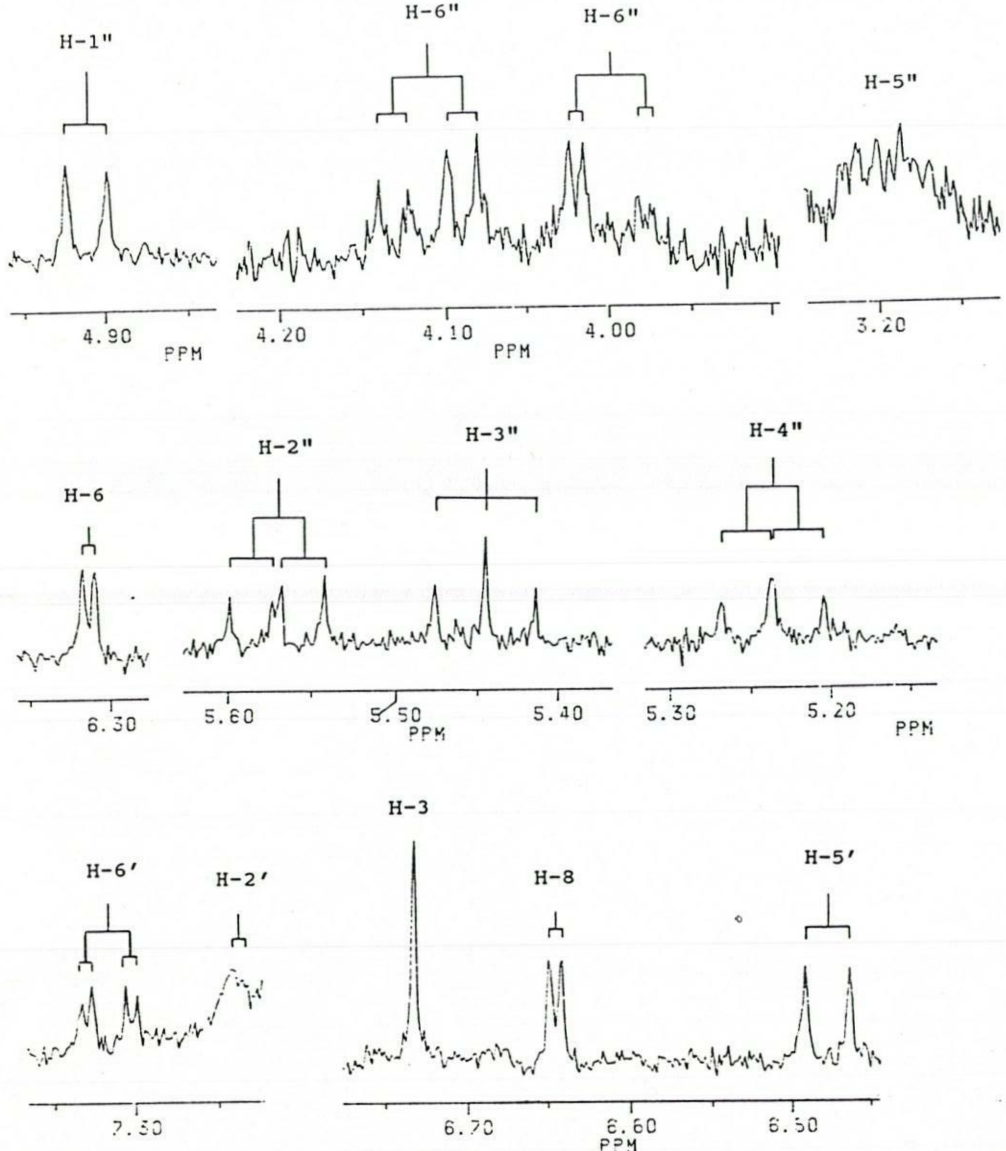


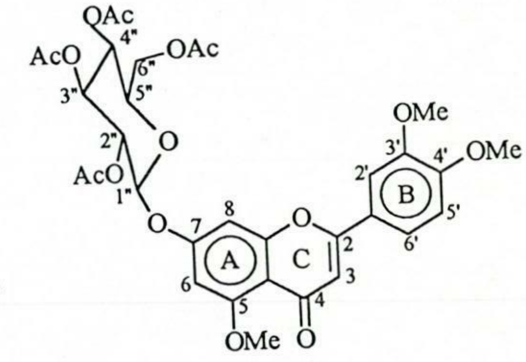

H-6
H-1′ H-5
H-2′
H-3′
H-4′, 2x H-5′
-NMe
H-4′, 2x H-5′
H-3′
H-2′
H-5
H-1′
H-6
PPM
PPM


Me
AcO
OAc OAc

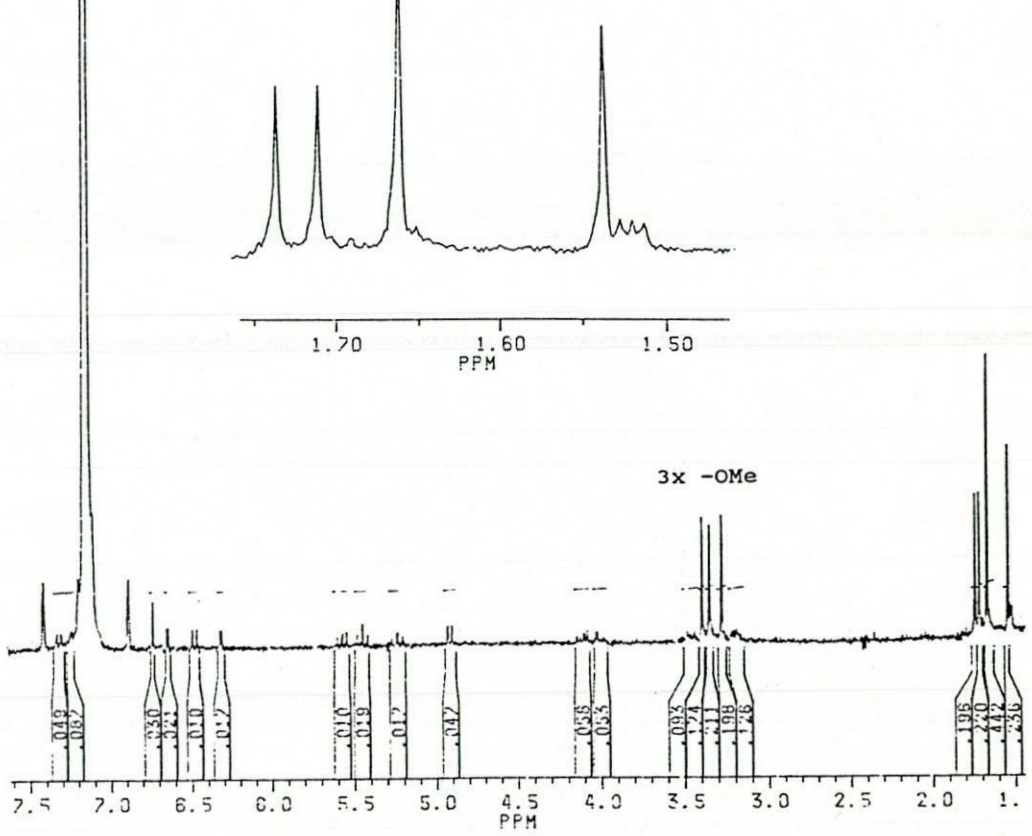
(94c)

Plaat 21 (C_6D_6, 296 K)

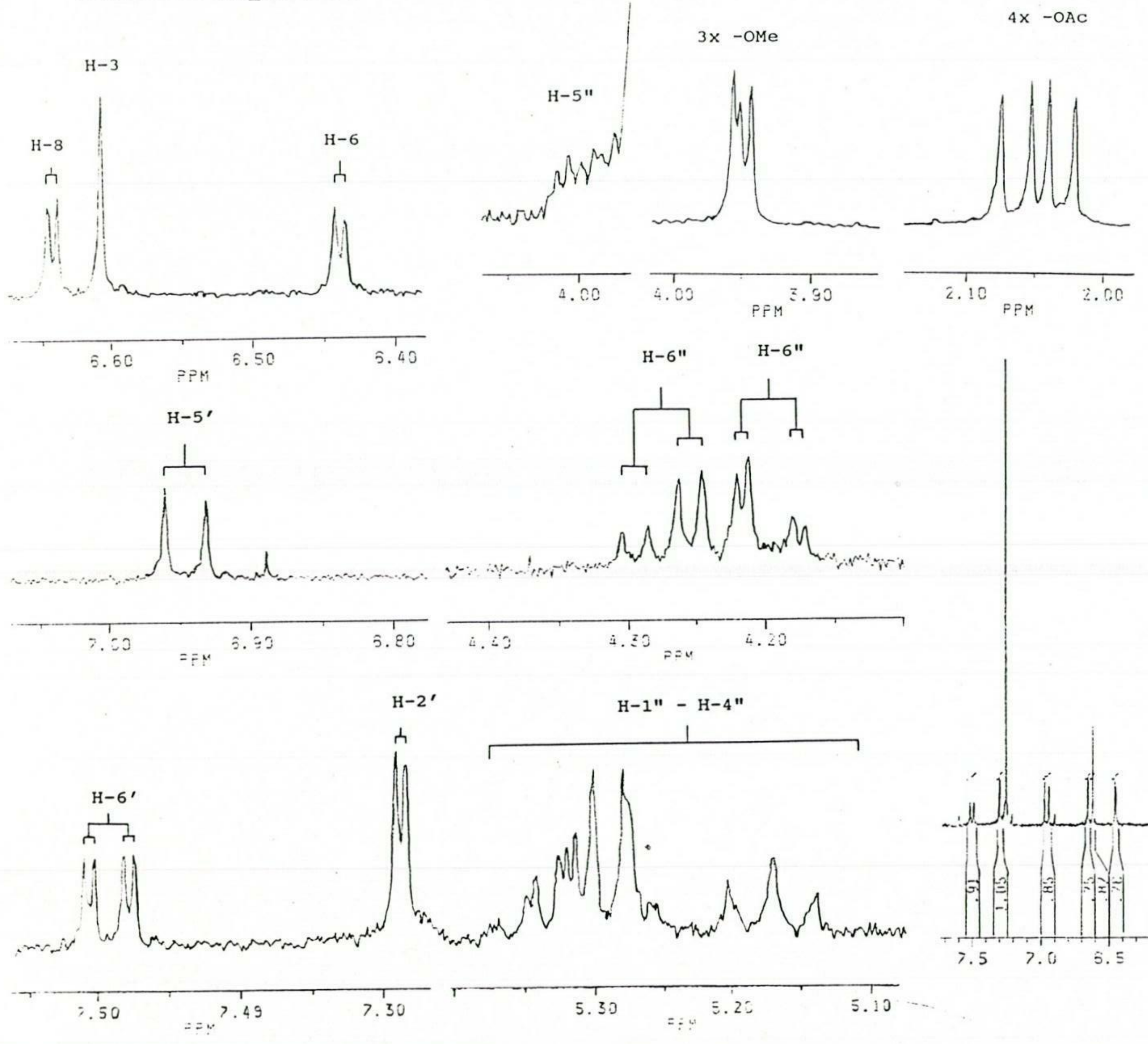


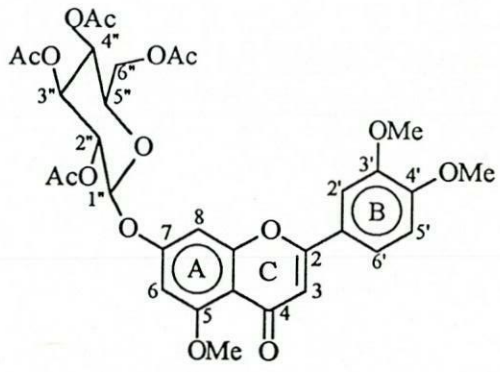


(82b)

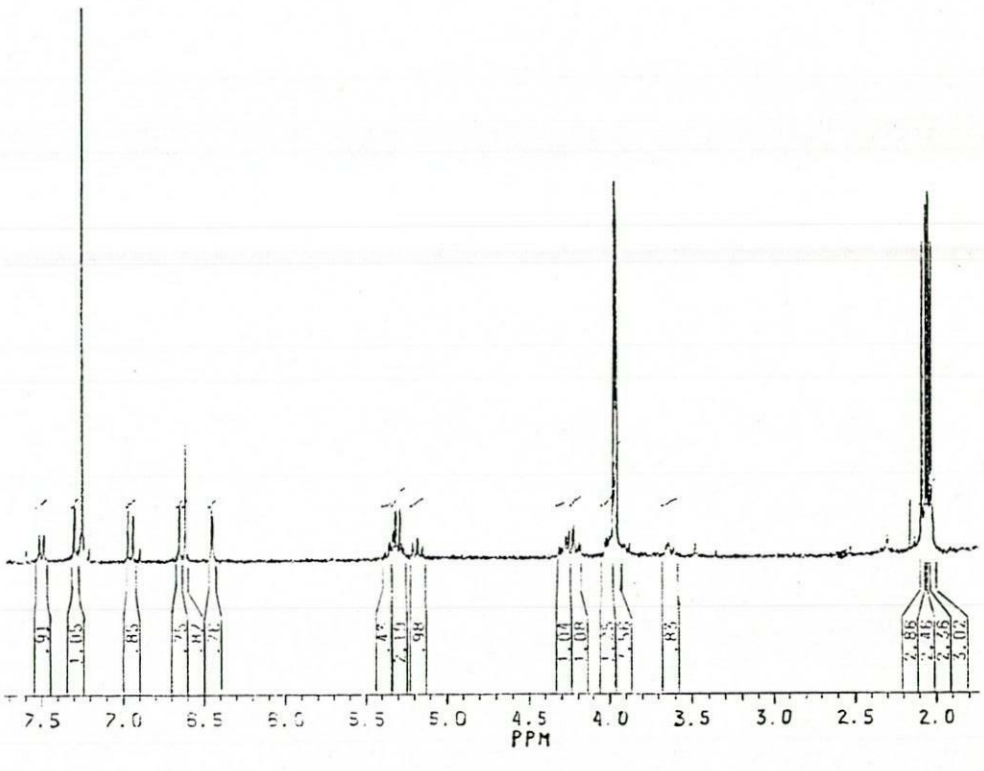


Plaat 22 ($CDCl_3$, 296 K)

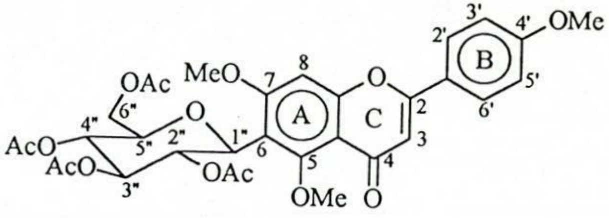




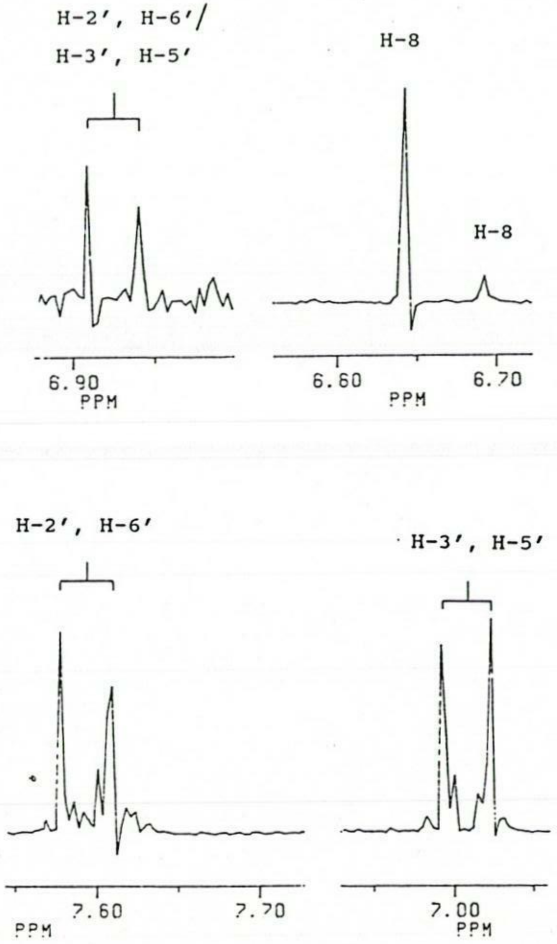
(82b)

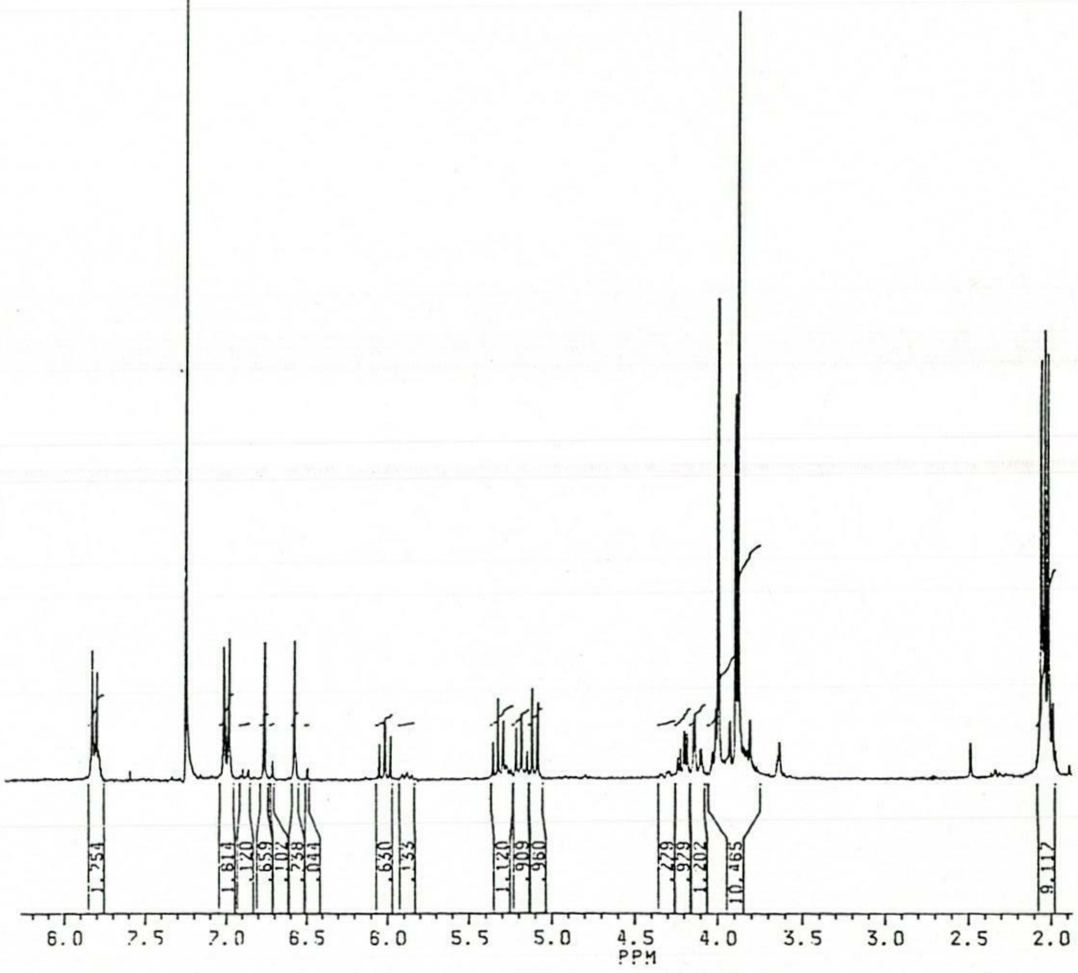


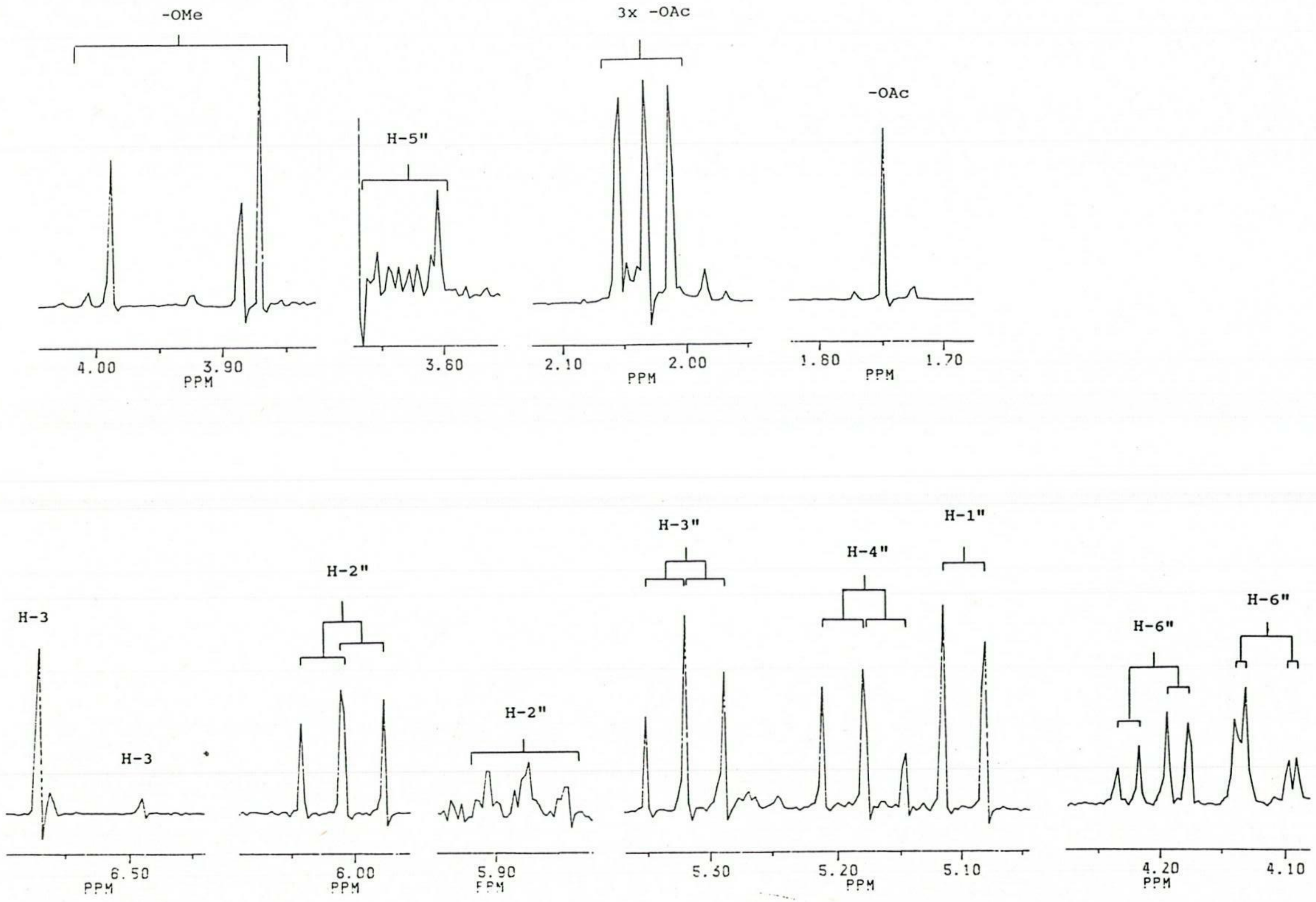
Plaat 23 ($CDCl_3$, 296 K)



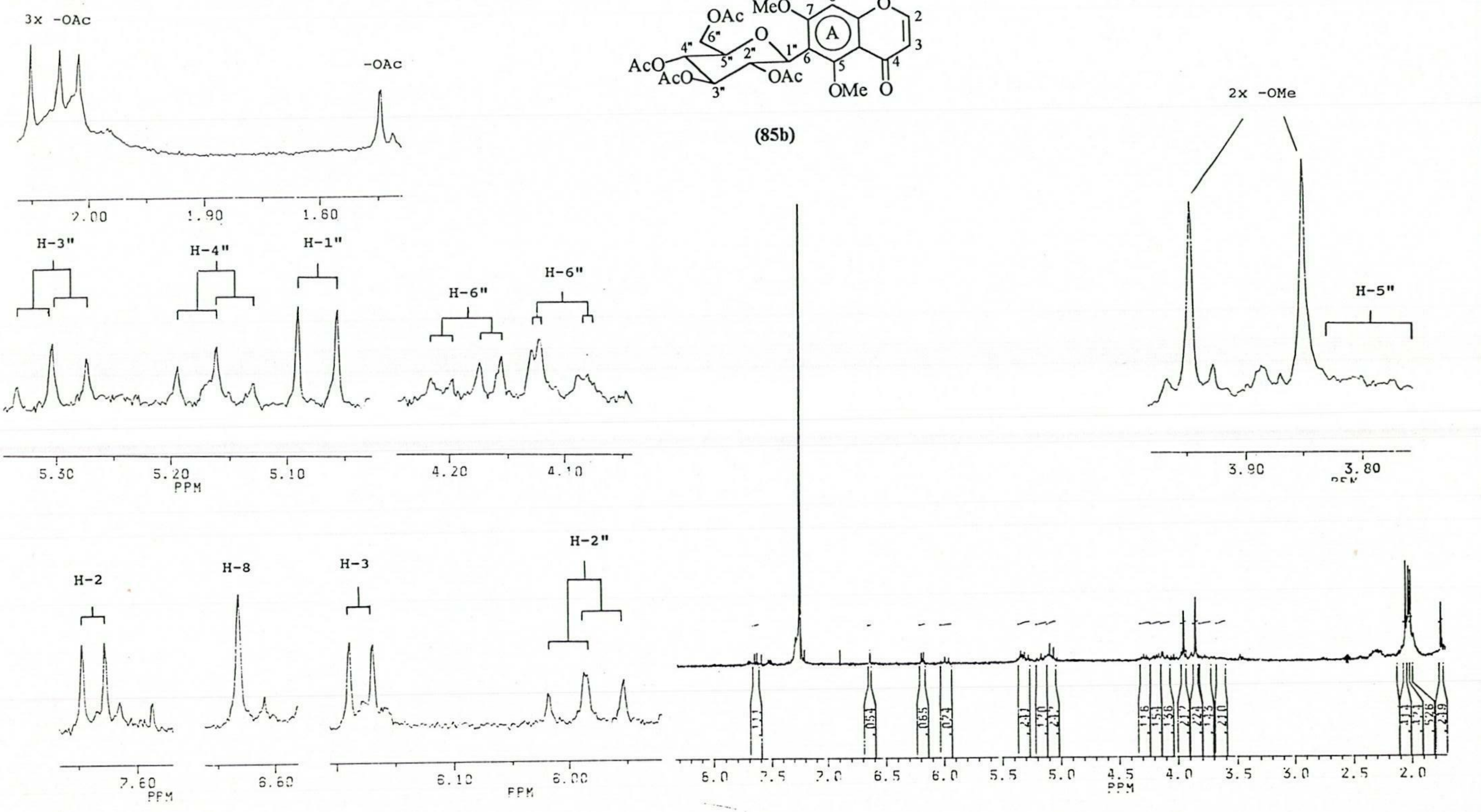
(84b)



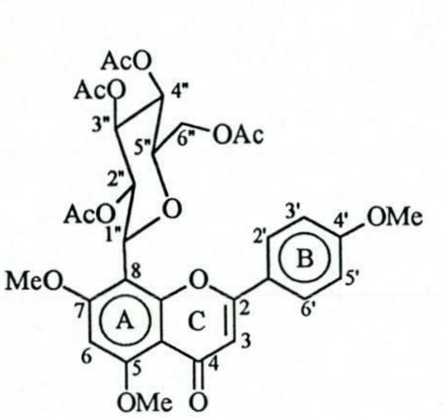



-OMe
H-5"
3x -OAc
-OAc
4.00
3.90
PPM
3.60
2.10
2.00
PPM
1.80
1.70
PPM
H-3
H-3
H-2"
H-2"
H-3"
H-4"
H-1"
H-6"
H-6"
6.50
PPM
6.00
PPM
5.90
PPM
5.30
5.20
PPM
5.10
4.20
PPM
4.10

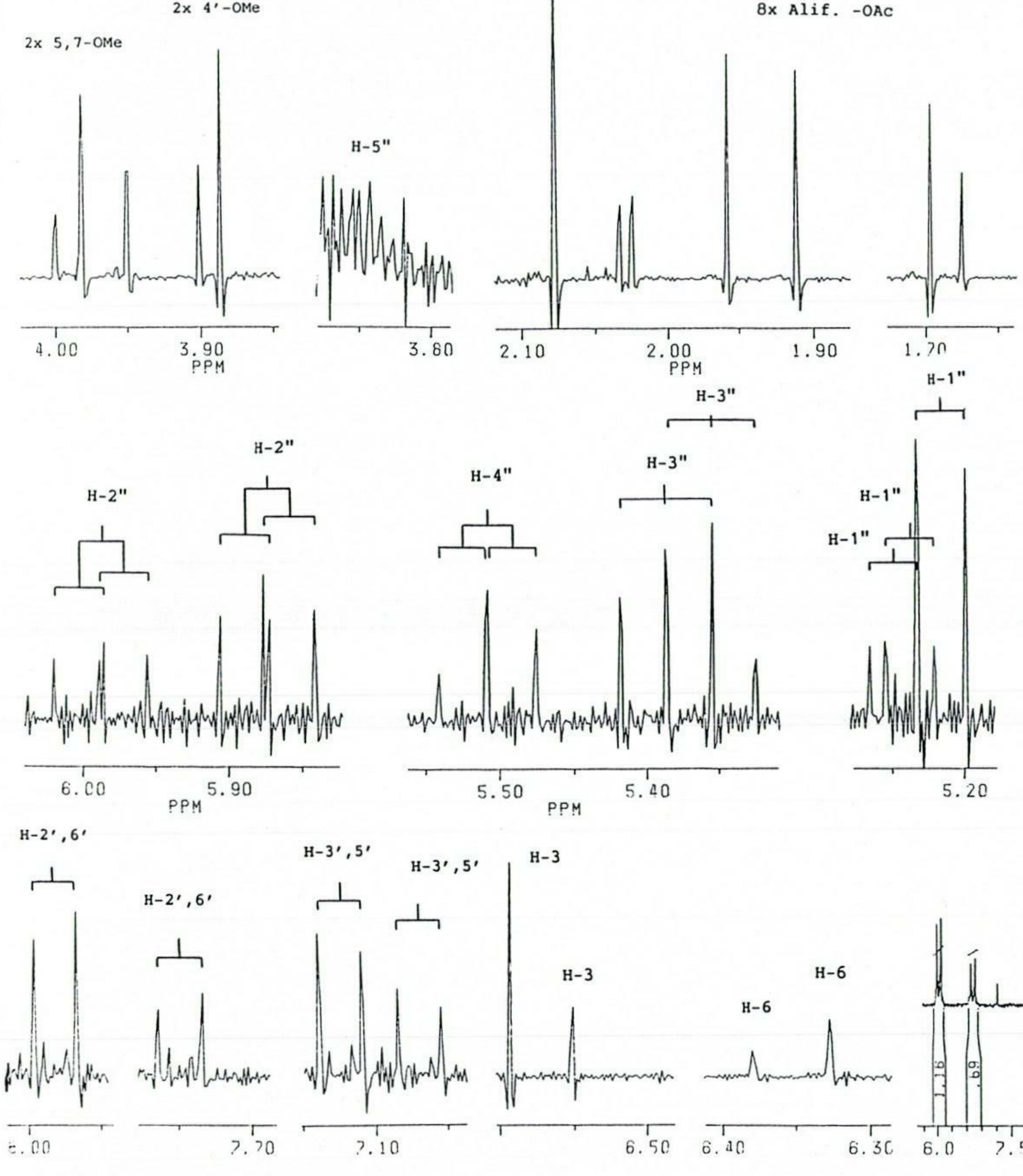
Plaat 24 ($CDCl_3$, 296 K)

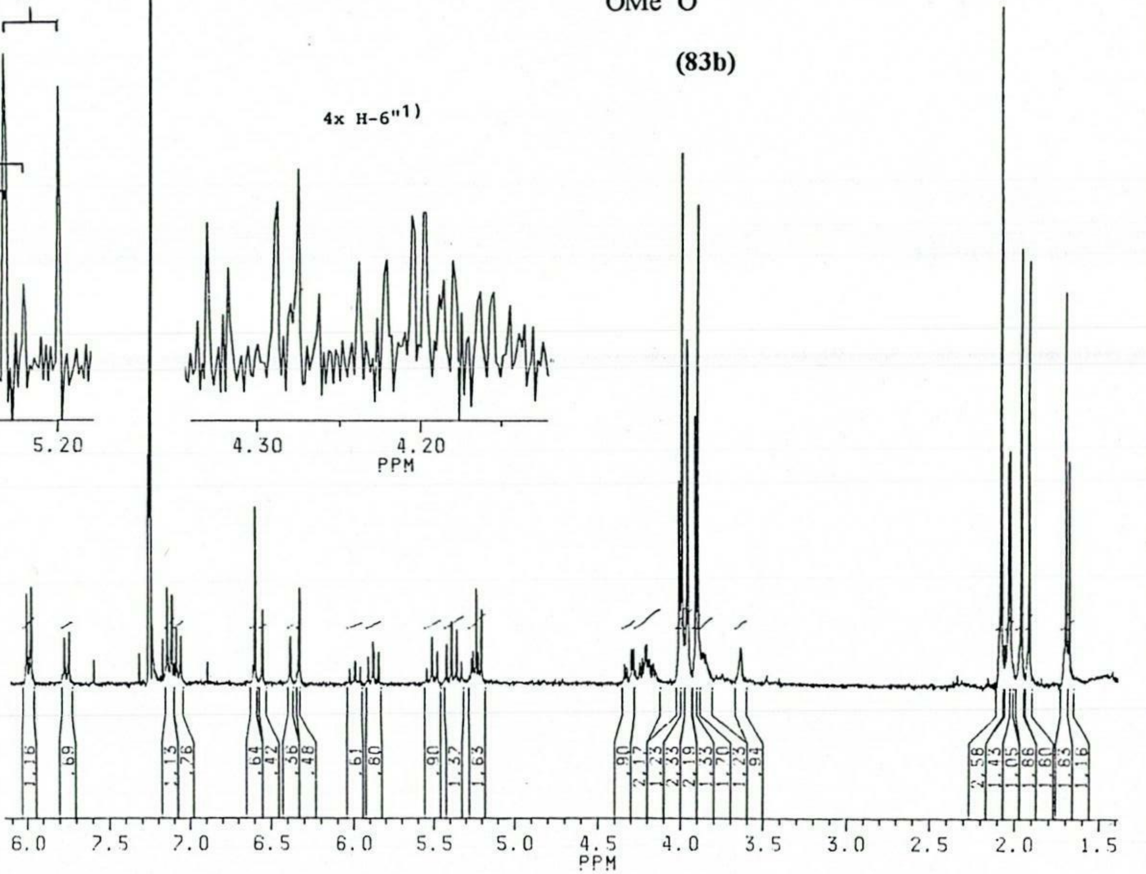


Plaat 25 ($CDCl_3$, 296 K)



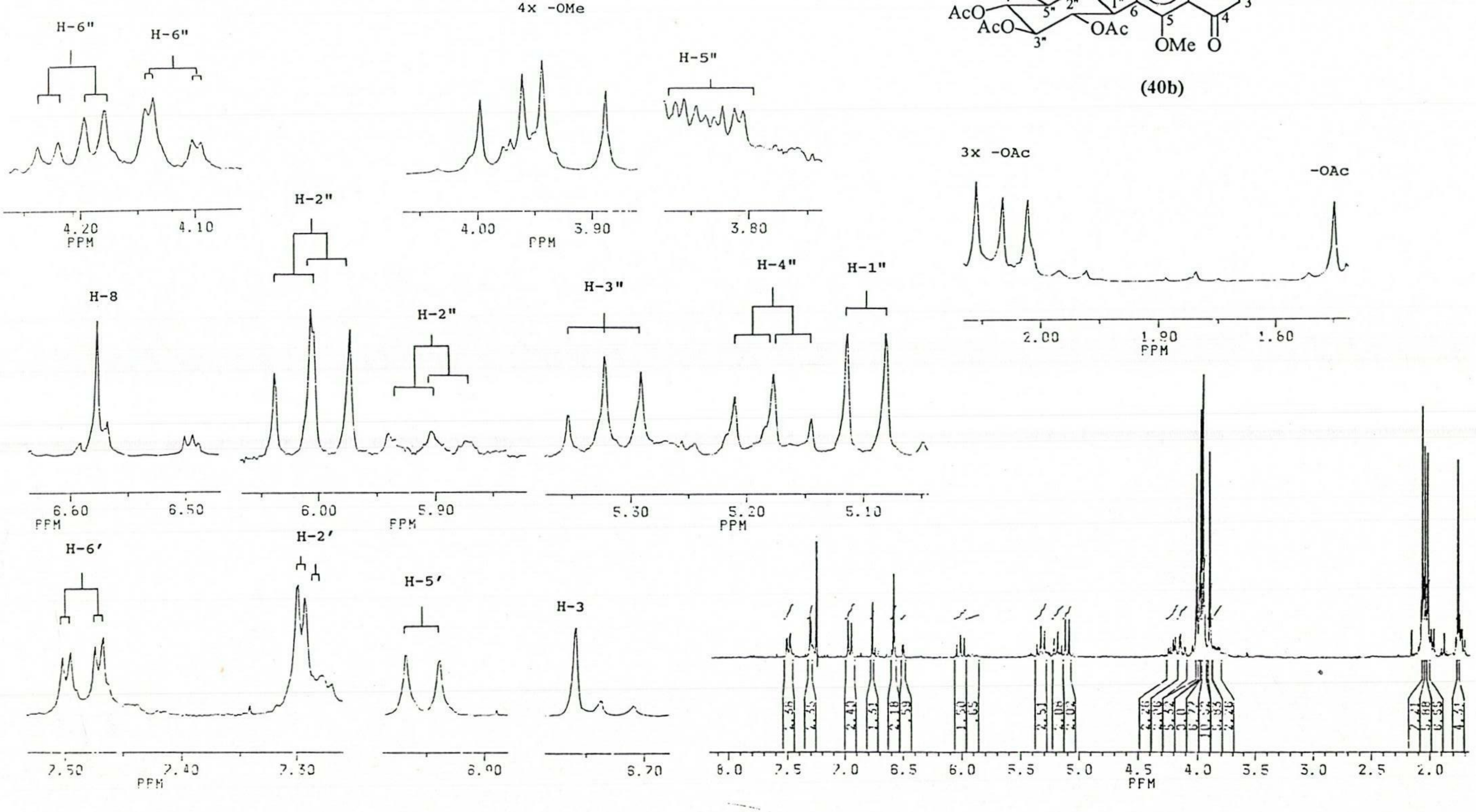
(83b)

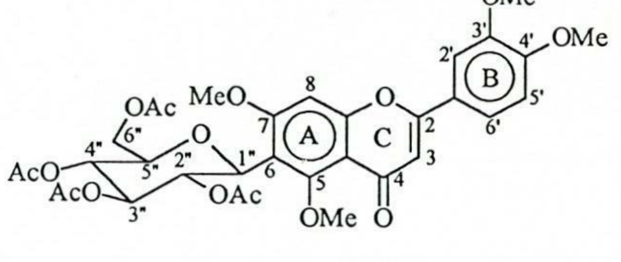




1. Multiplisiteit nie toek

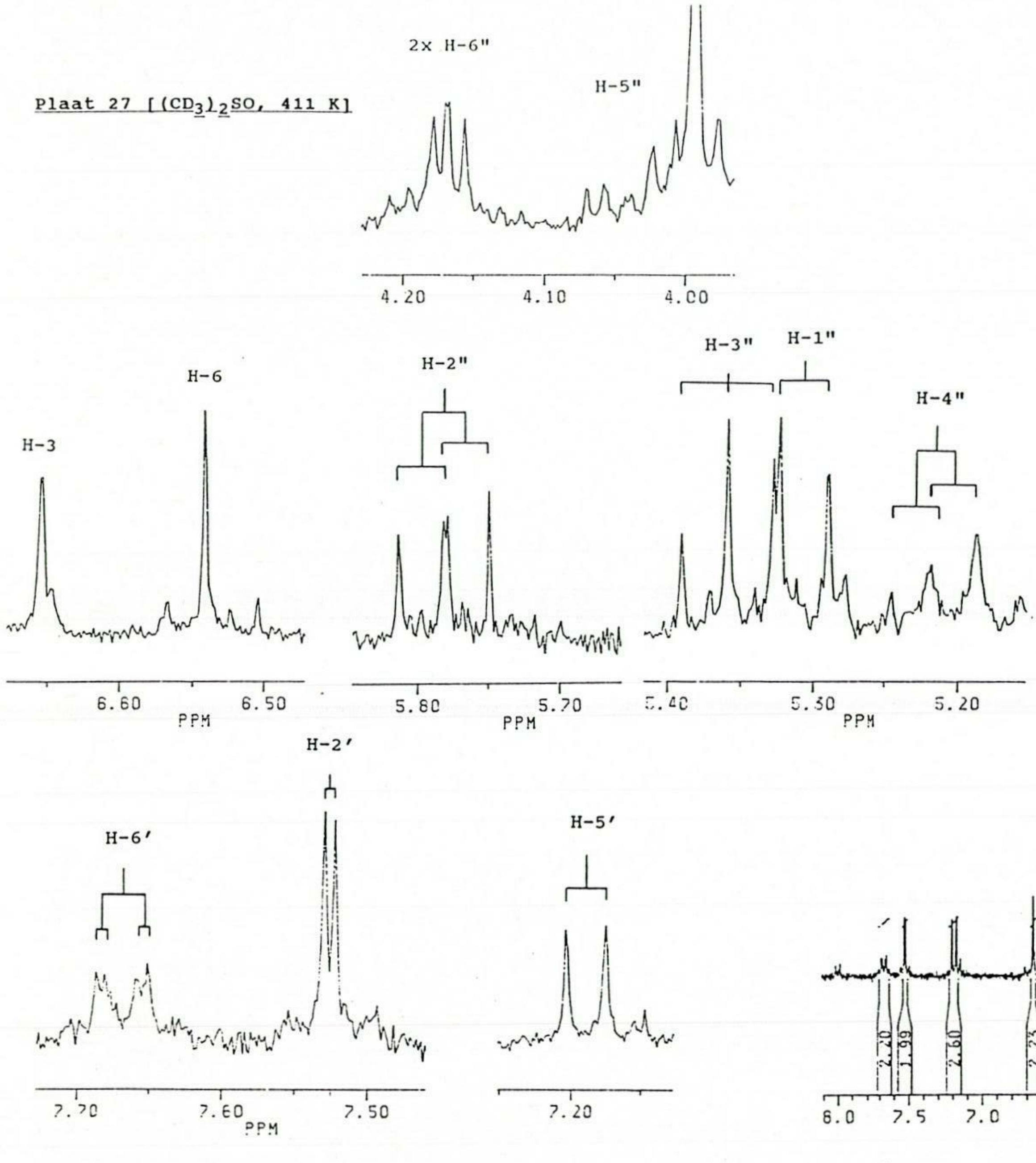
Plaat 26 (CDCl$_3$, 296 K)

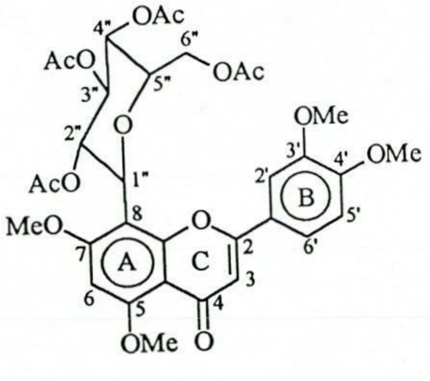




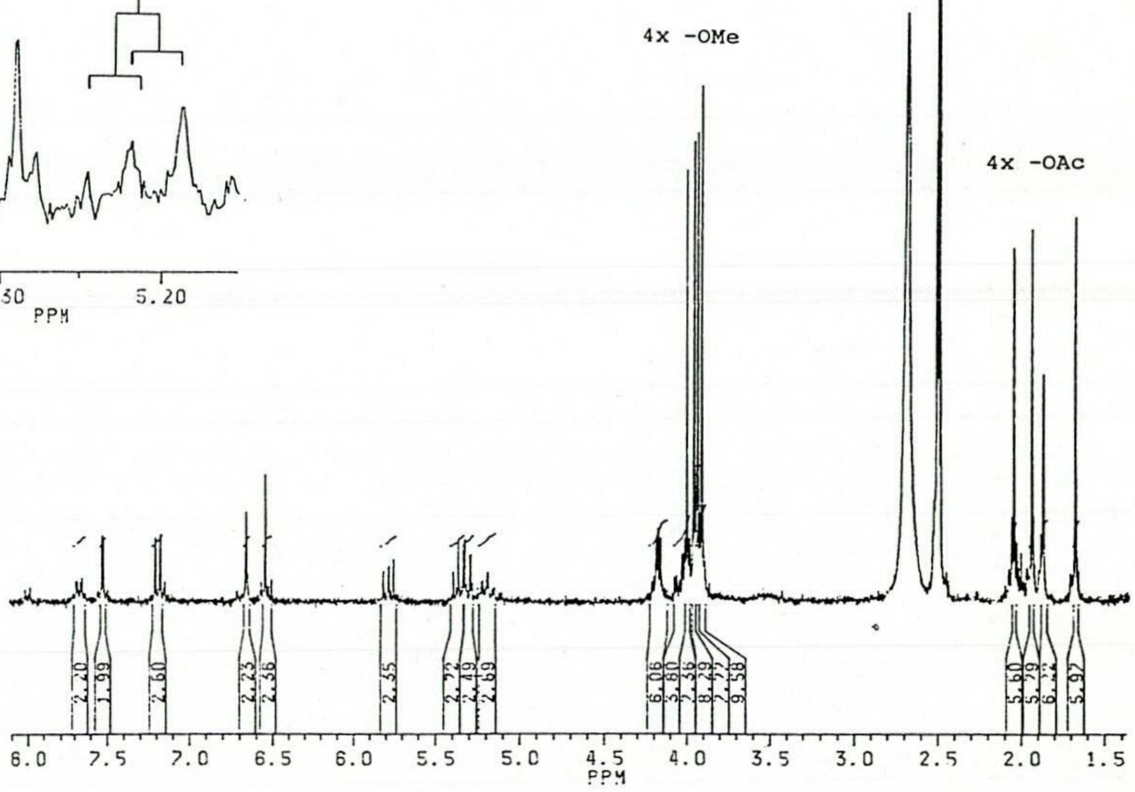
(40b)

Plaat 27 [$(CD_3)_2SO$, 411 K]

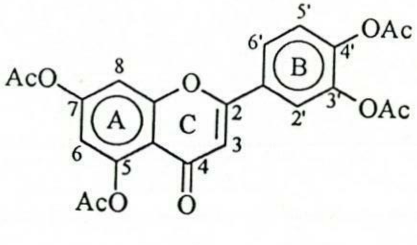




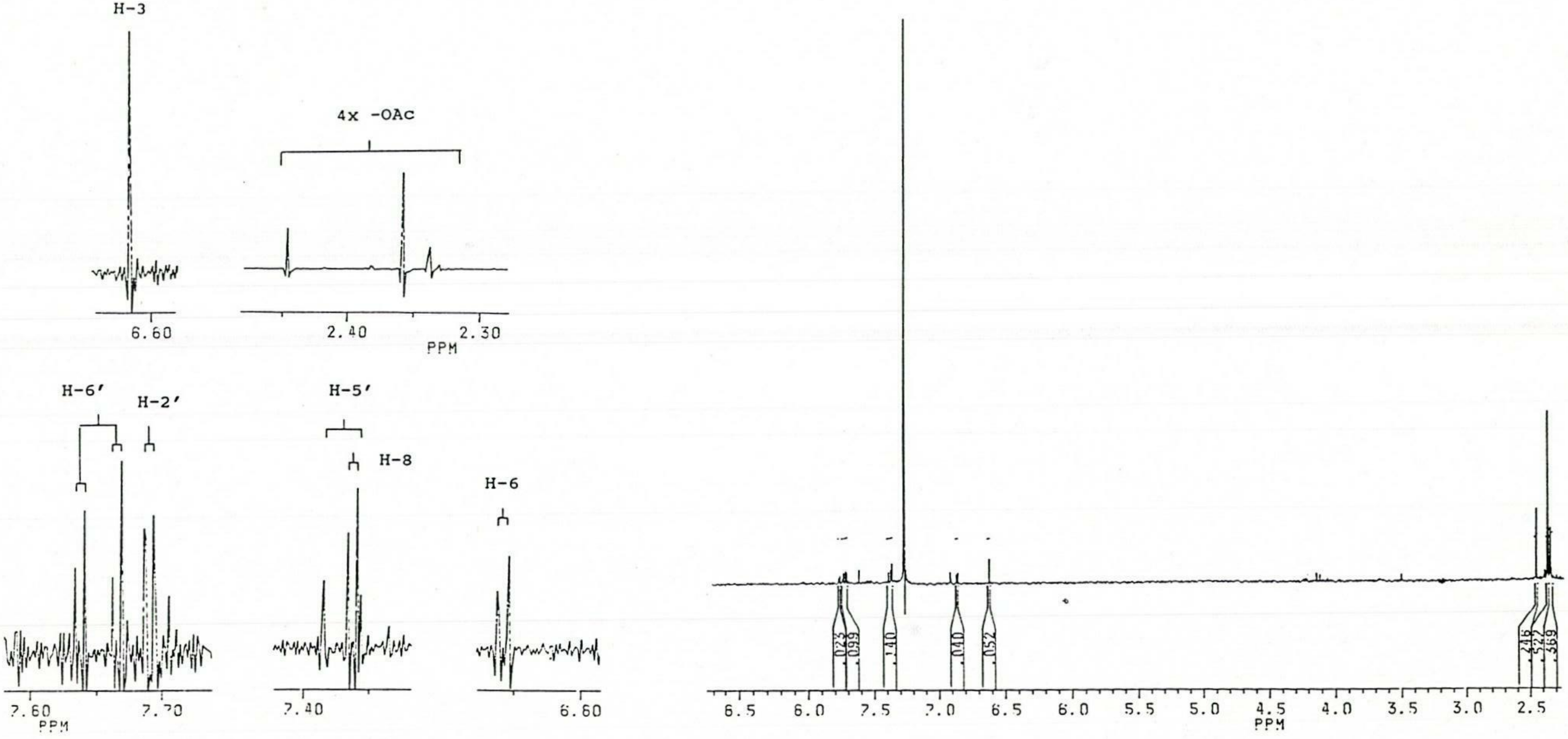
(39b)



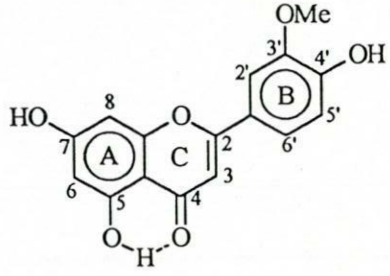
Plaat 28 ($CDCl_3$, 296 K)



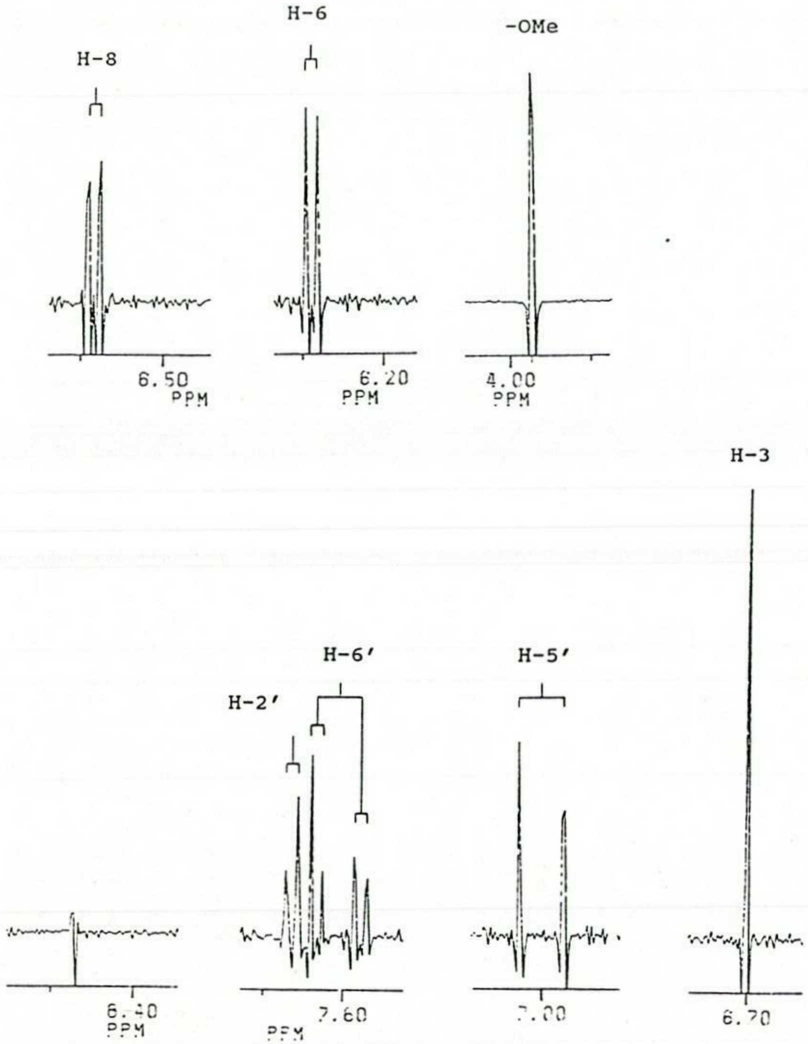
(38c)

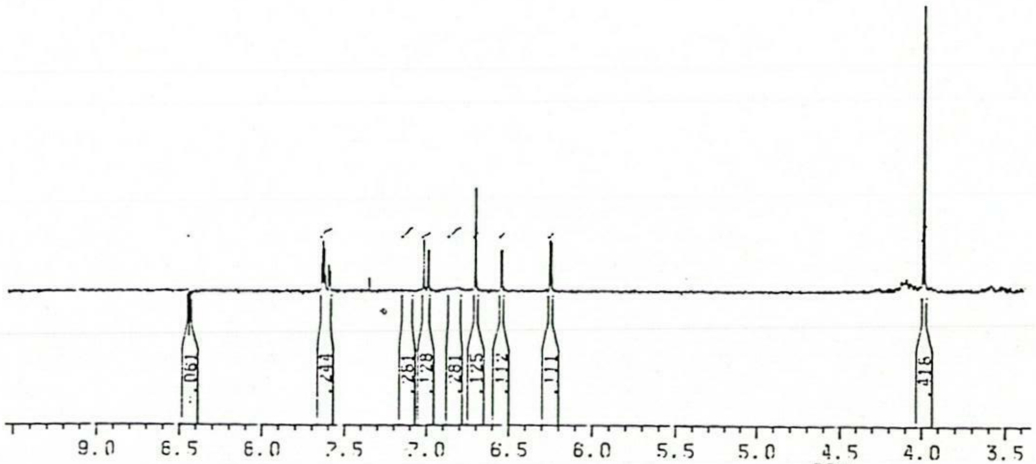


Plaat 29 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]

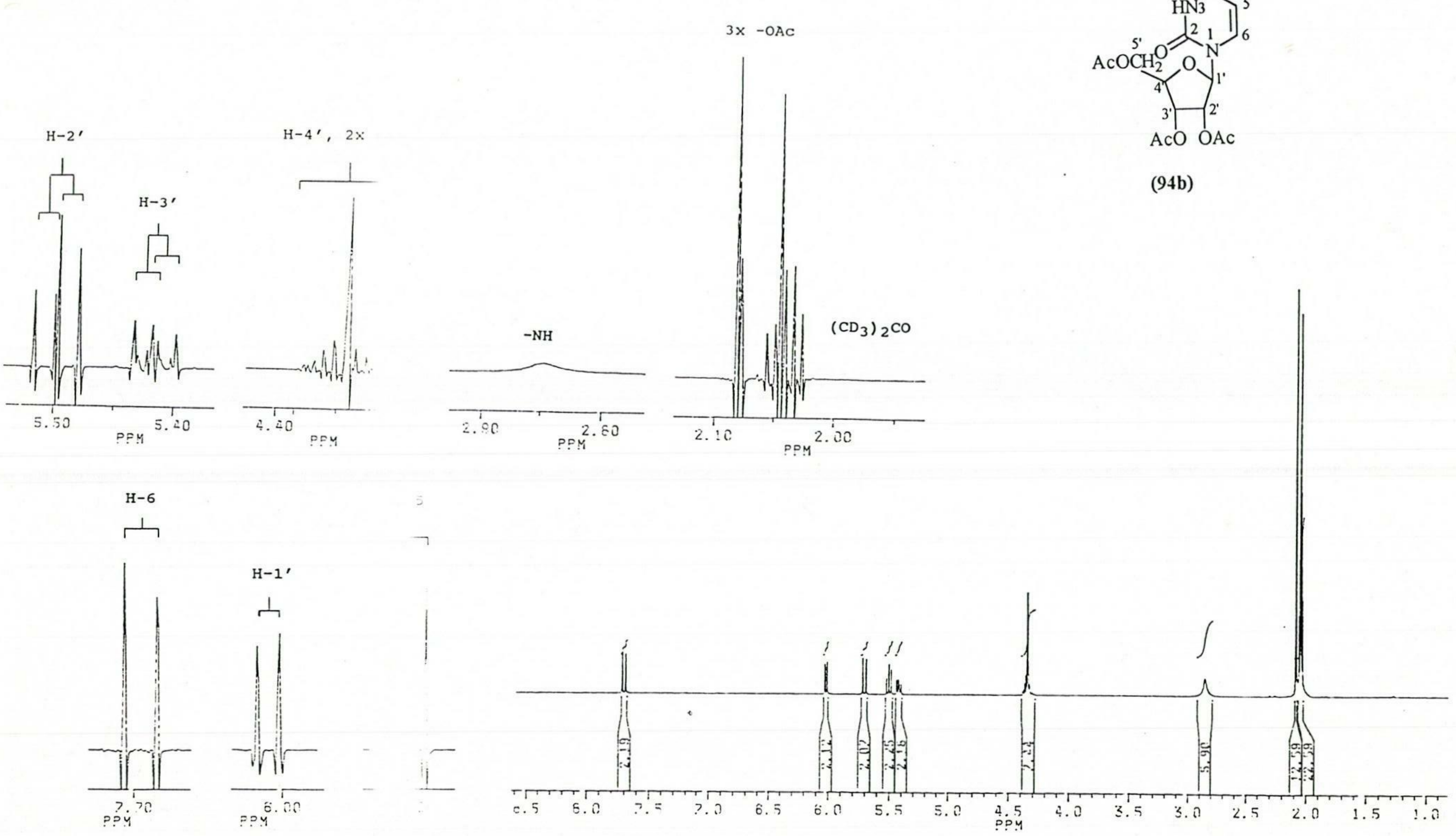


(81)



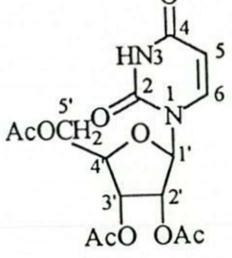


Plaat 30 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]

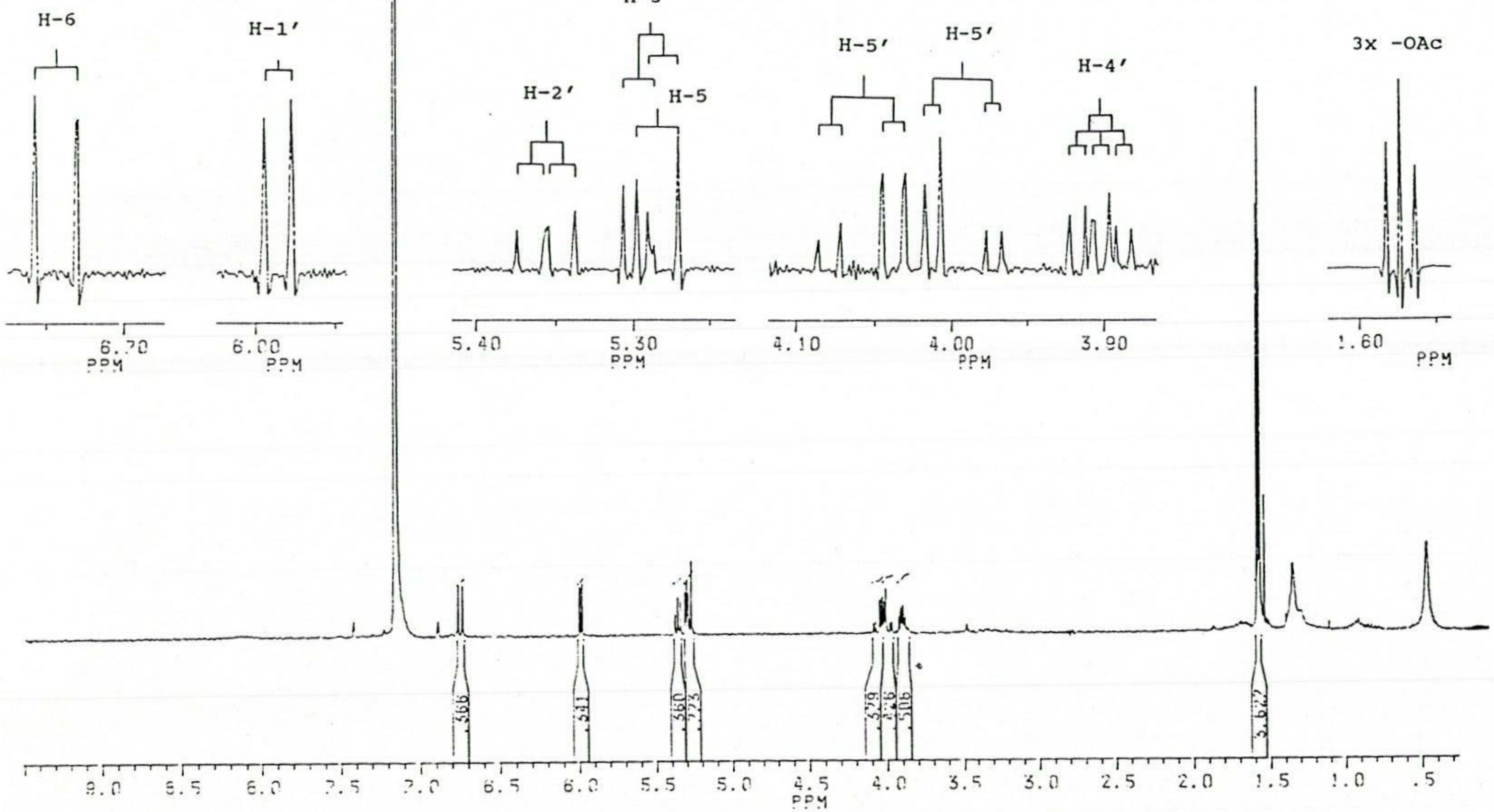


(94b)

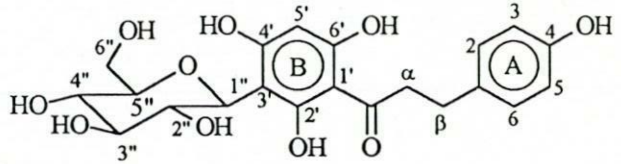
Plaat 31 (C_6D_6, 296 K)



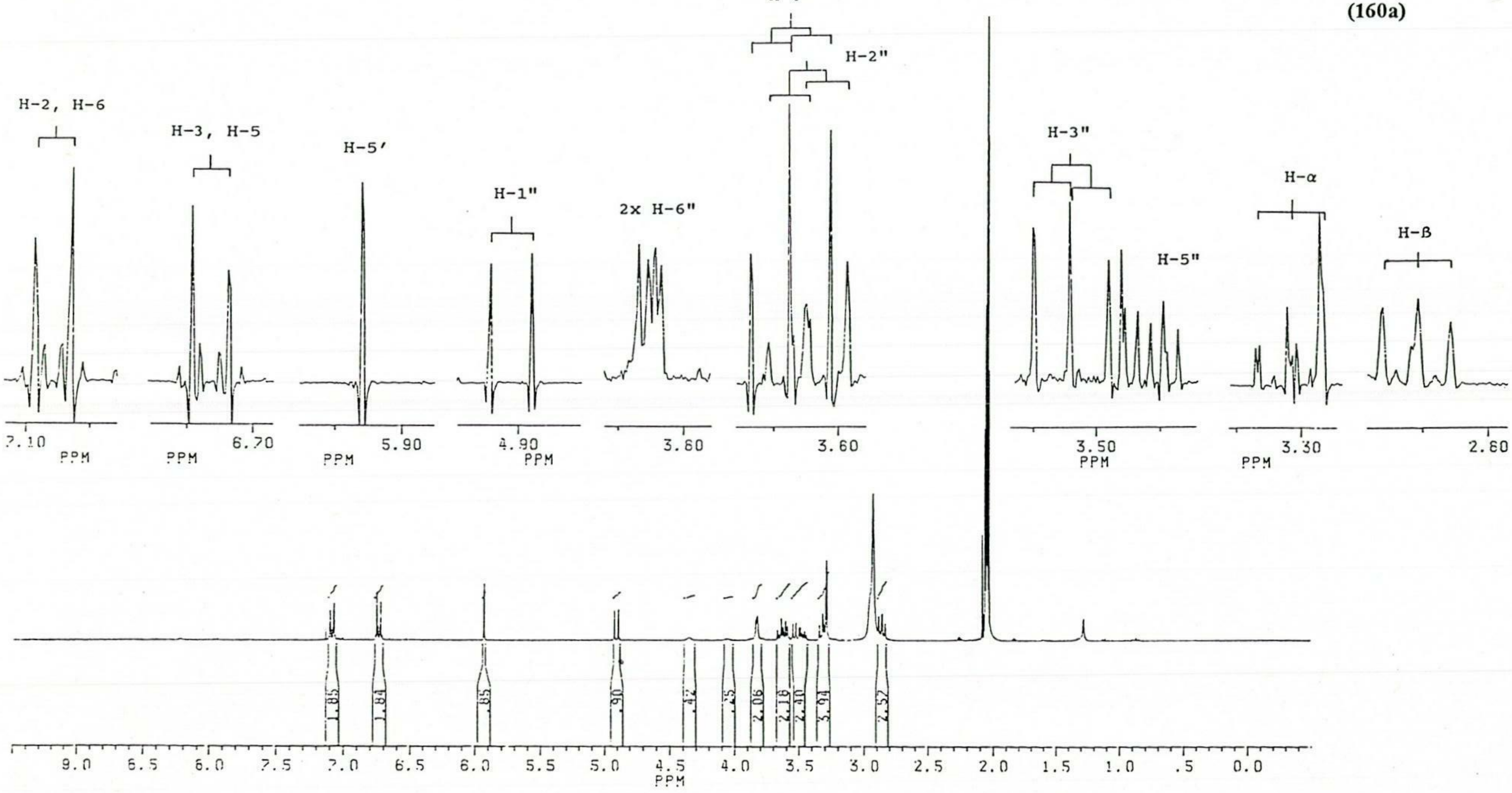
(94b)



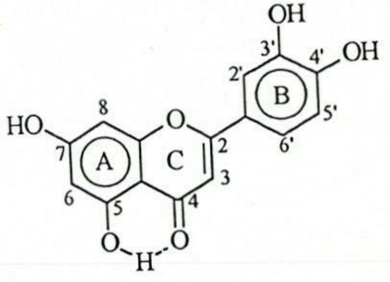
Plaat 32 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



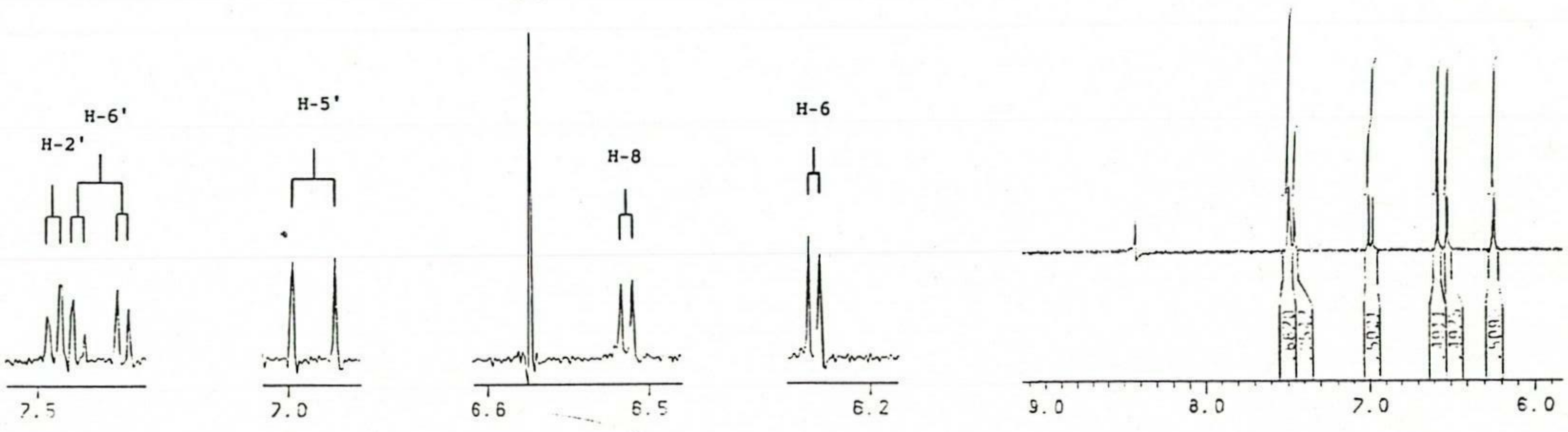
(160a)



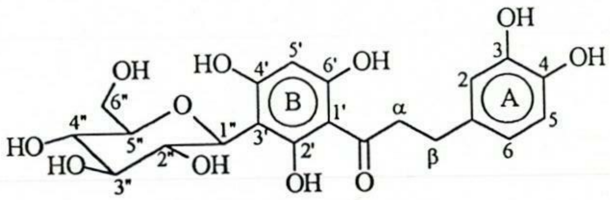
Plaat 33 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



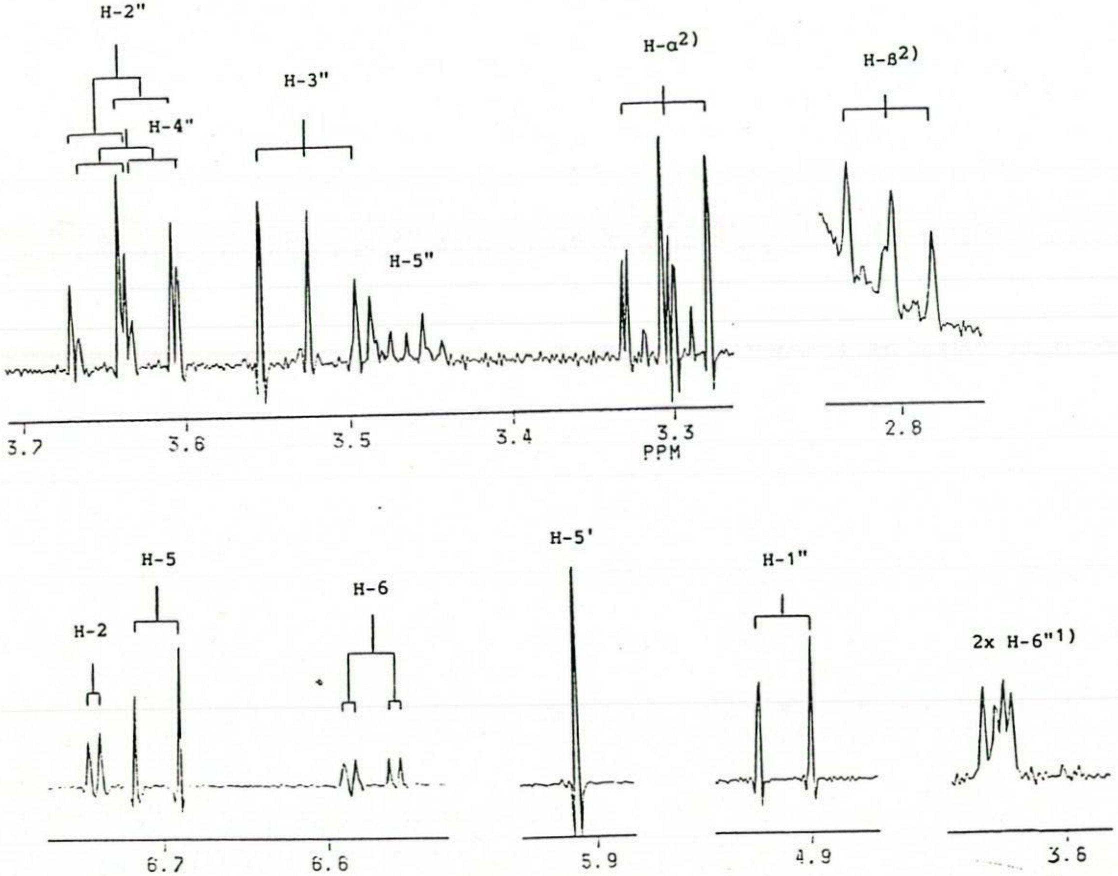
(38a)

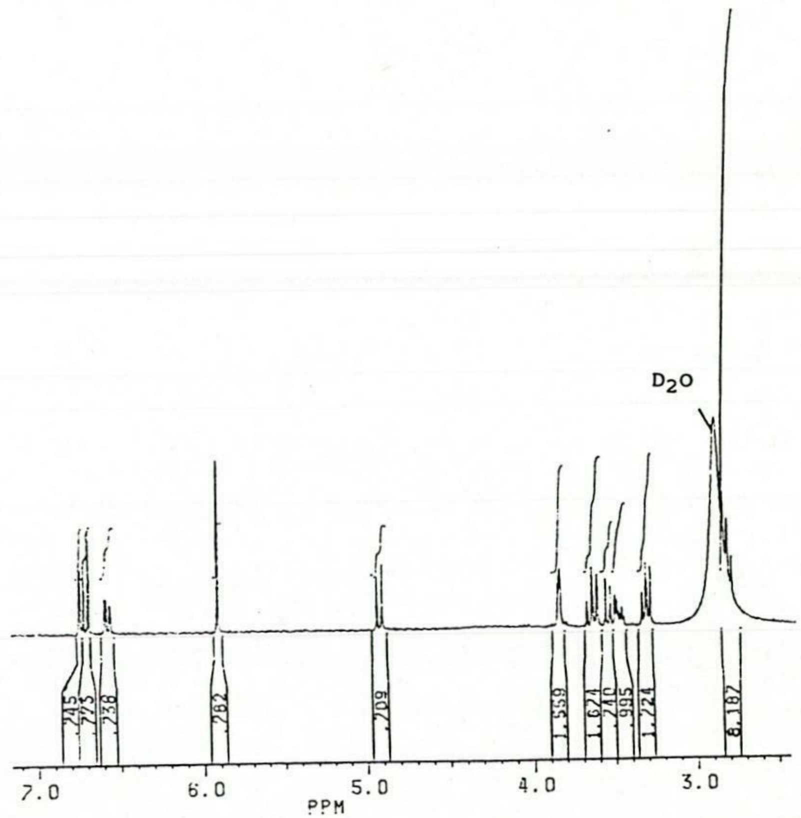


Plaat 34 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]

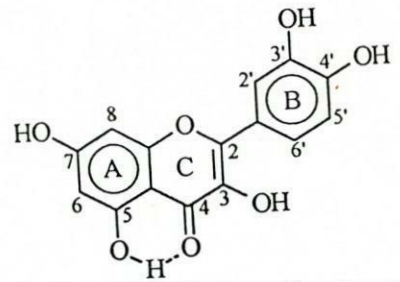


(43a)

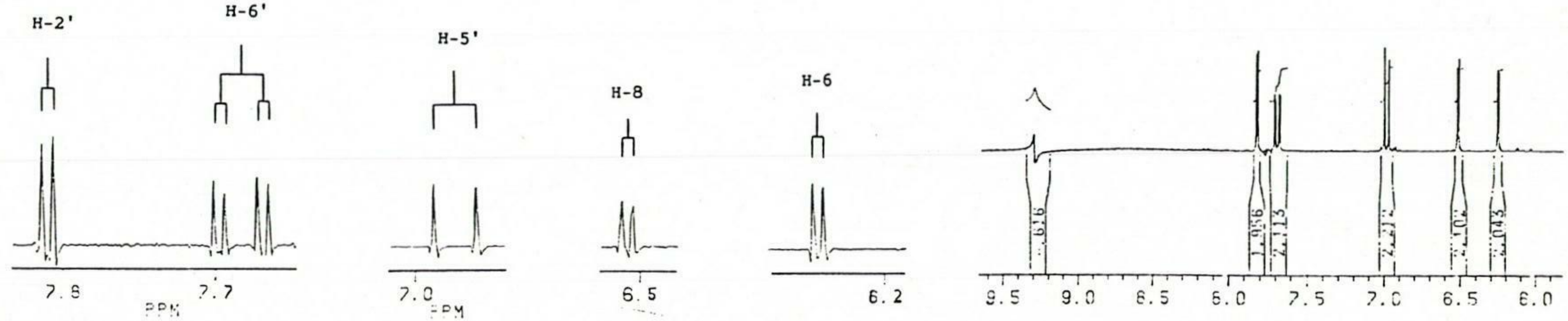




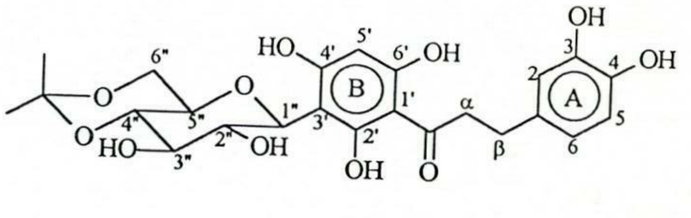
Plaat 35 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



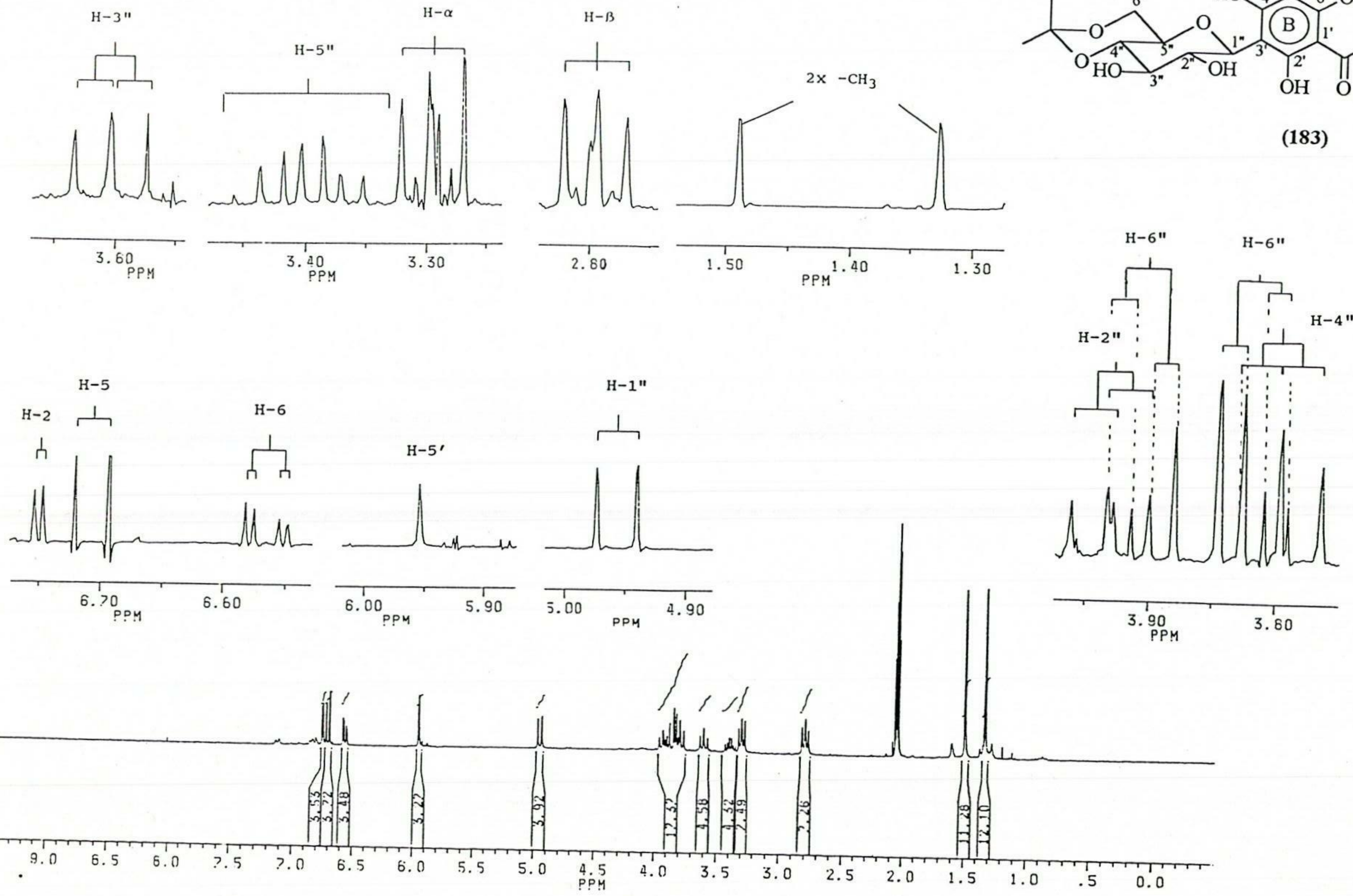
(37a)



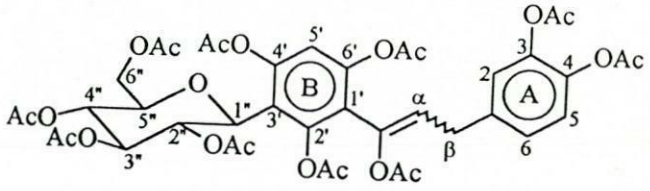
Plaat 36 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



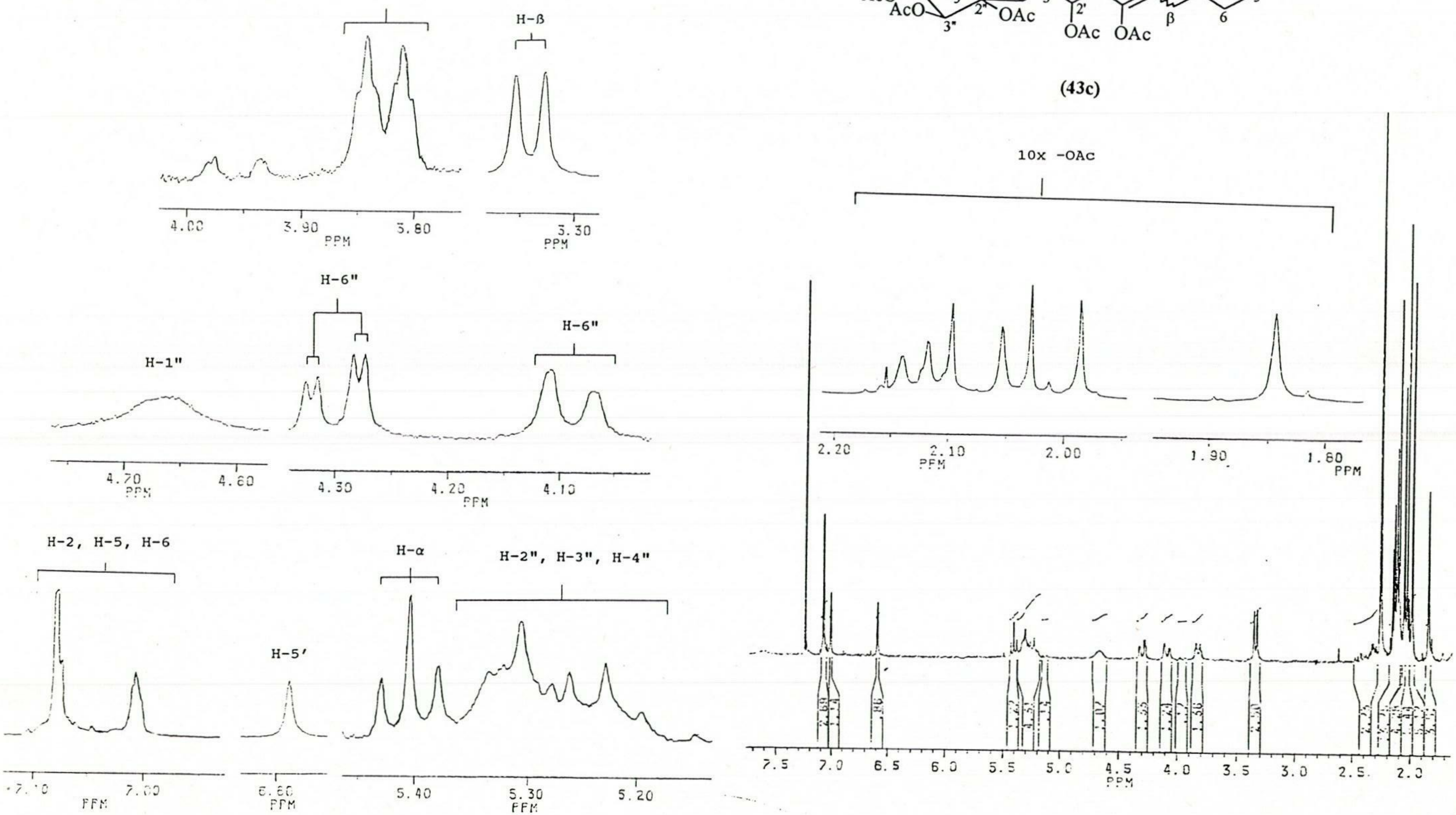
(183)



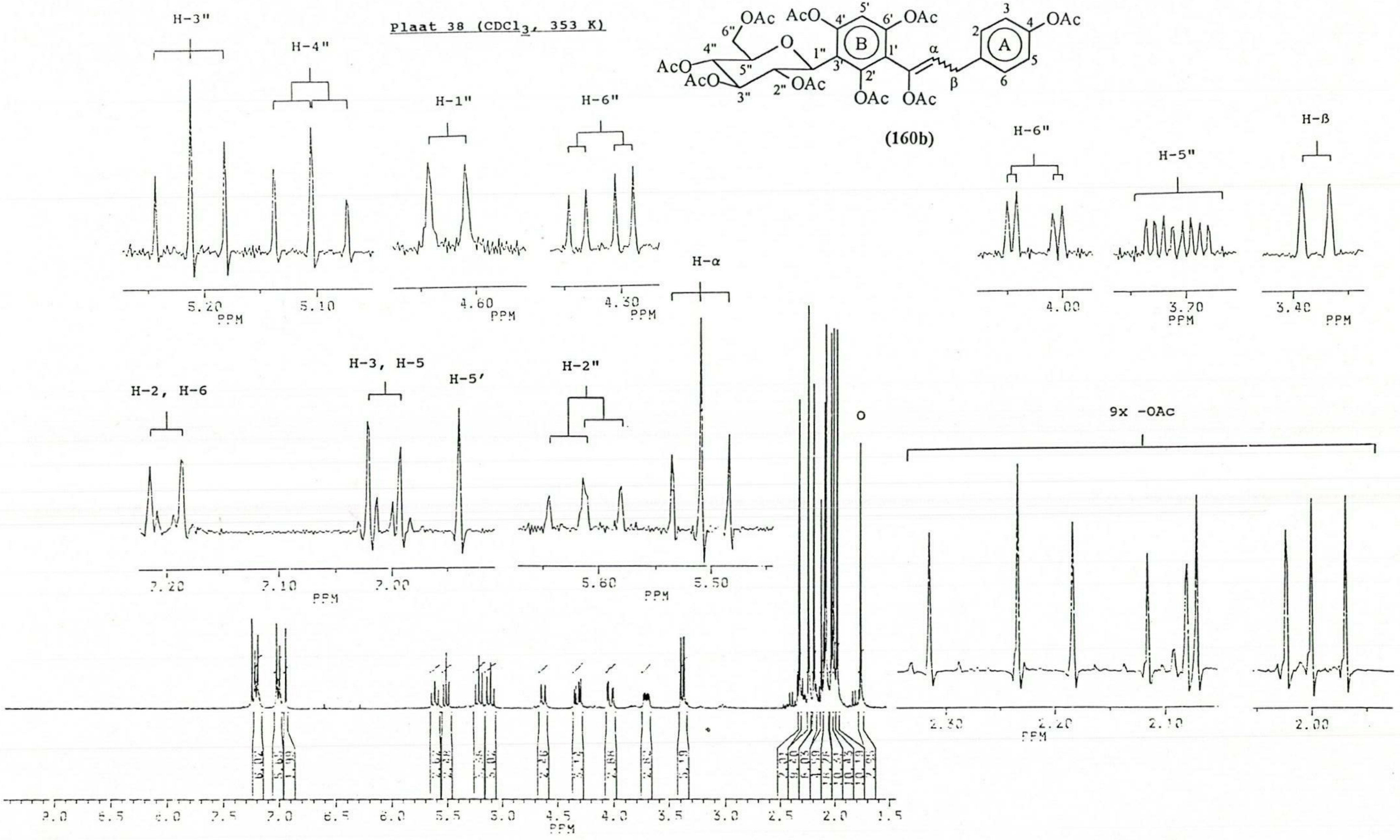
Plaat 37 (CDCl$_3$, 296 K)



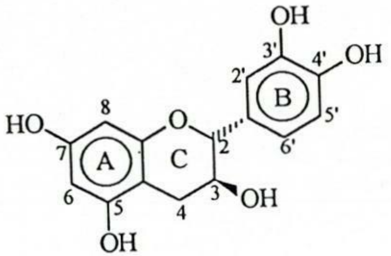
(43c)



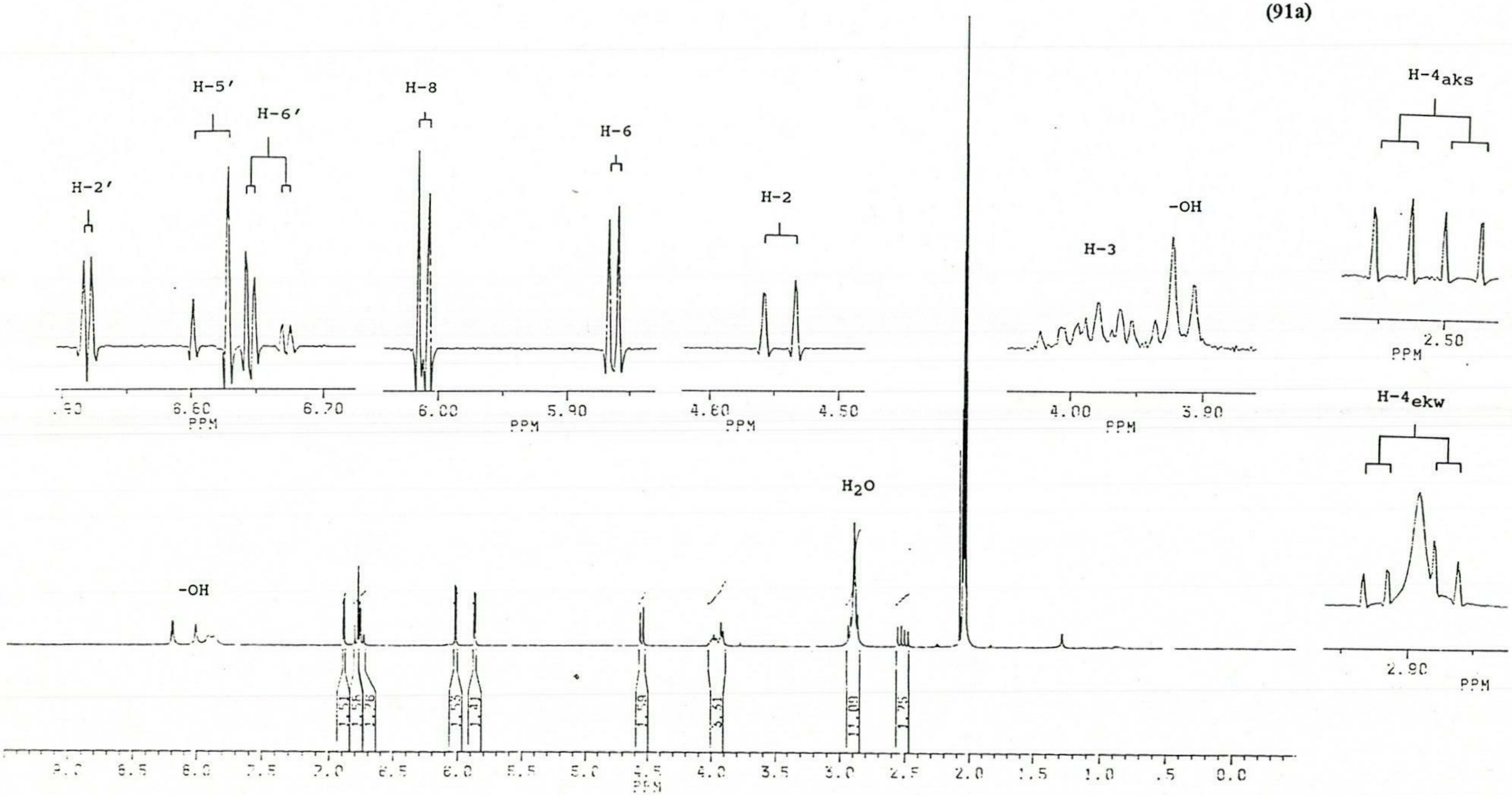
Plaat 38 (CDCl$_3$, 353 K)



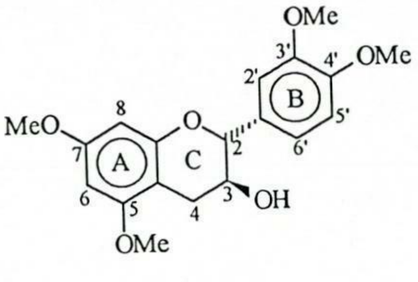
Plaat 39 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



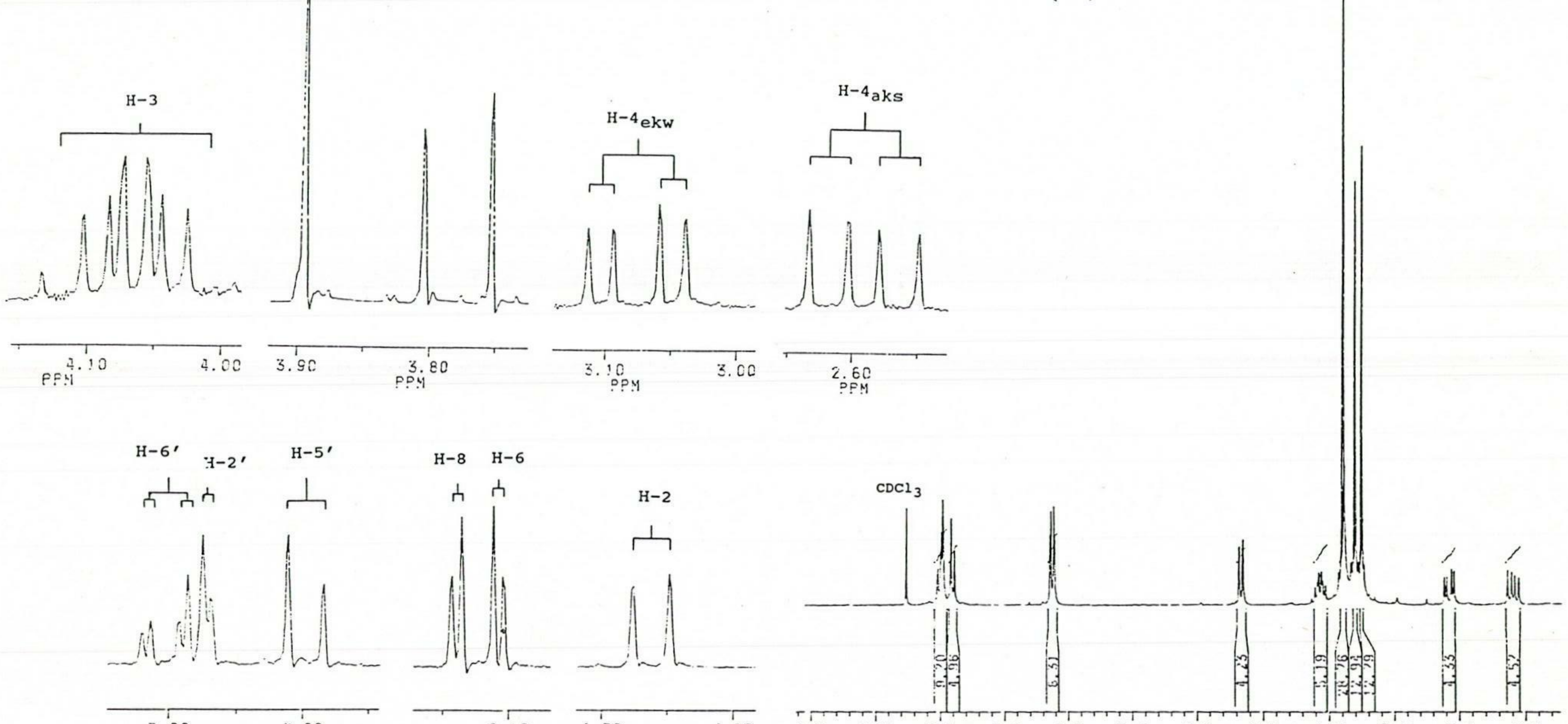
(91a)



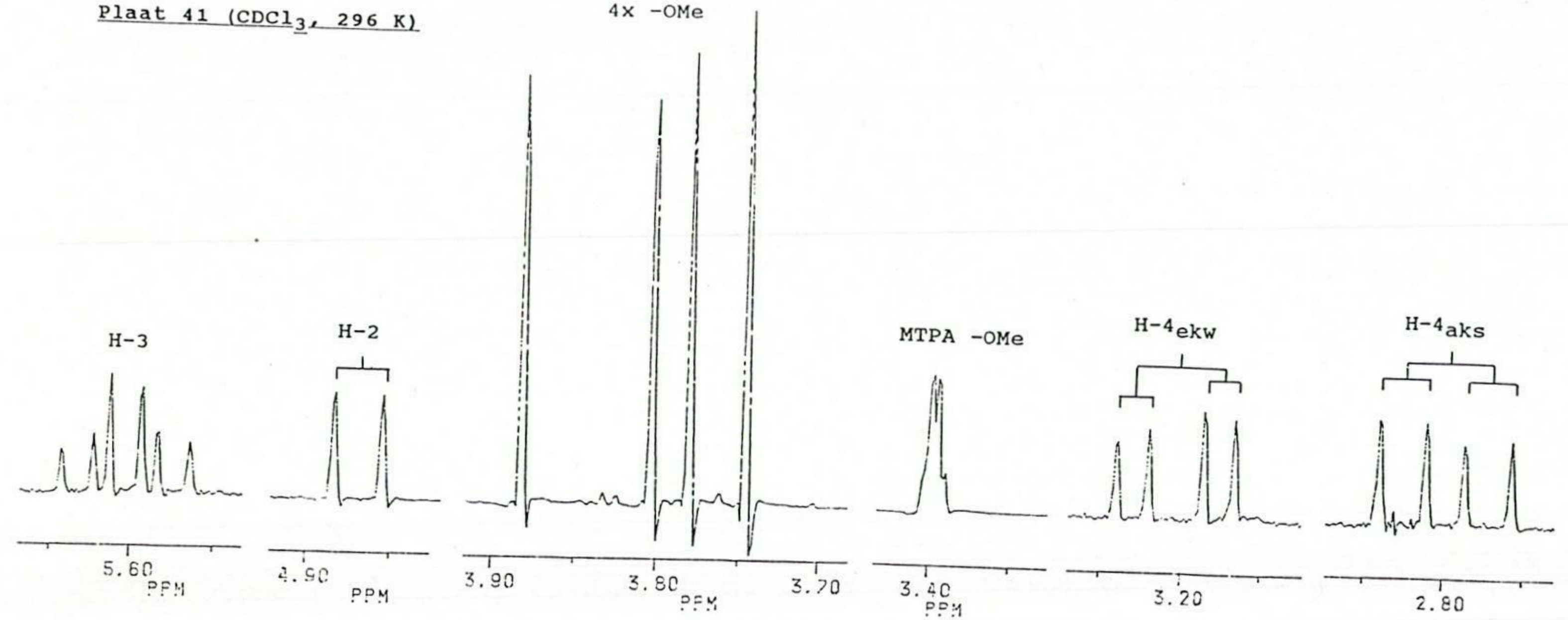
Plaat 40 ($CDCl_3$, 296 K)

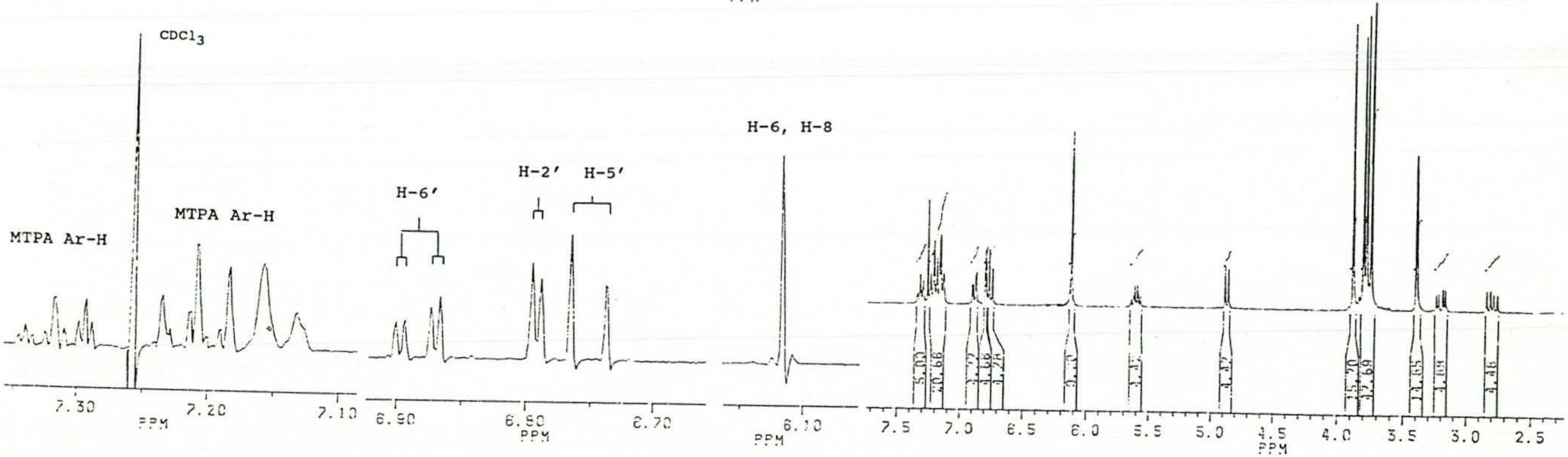


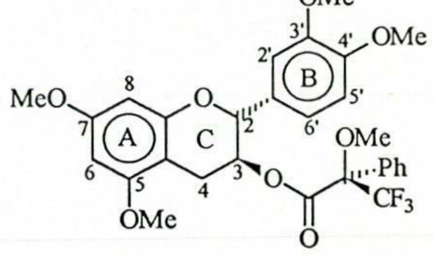
(91b)



Plaat 41 ($CDCl_3$, 296 K)

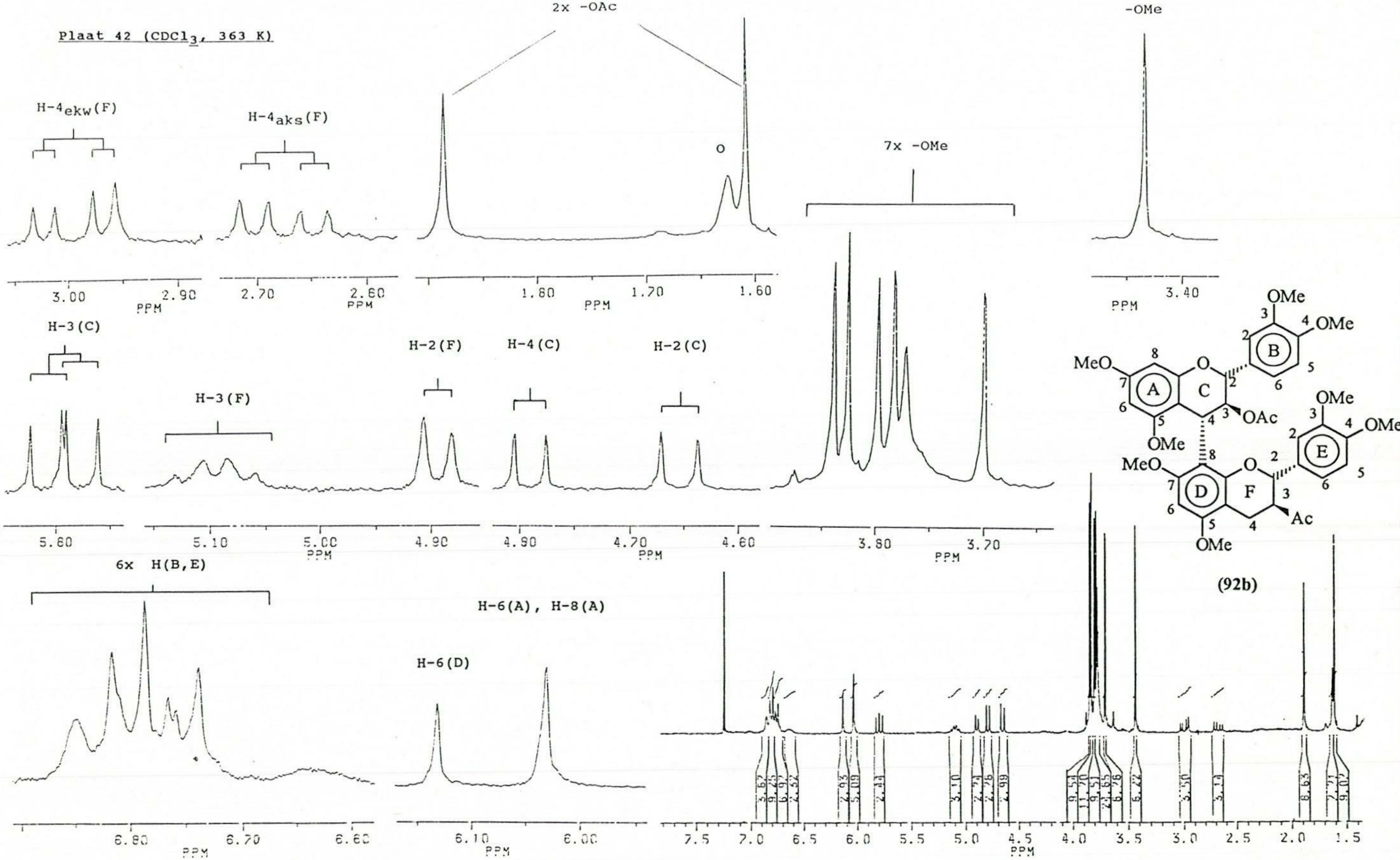




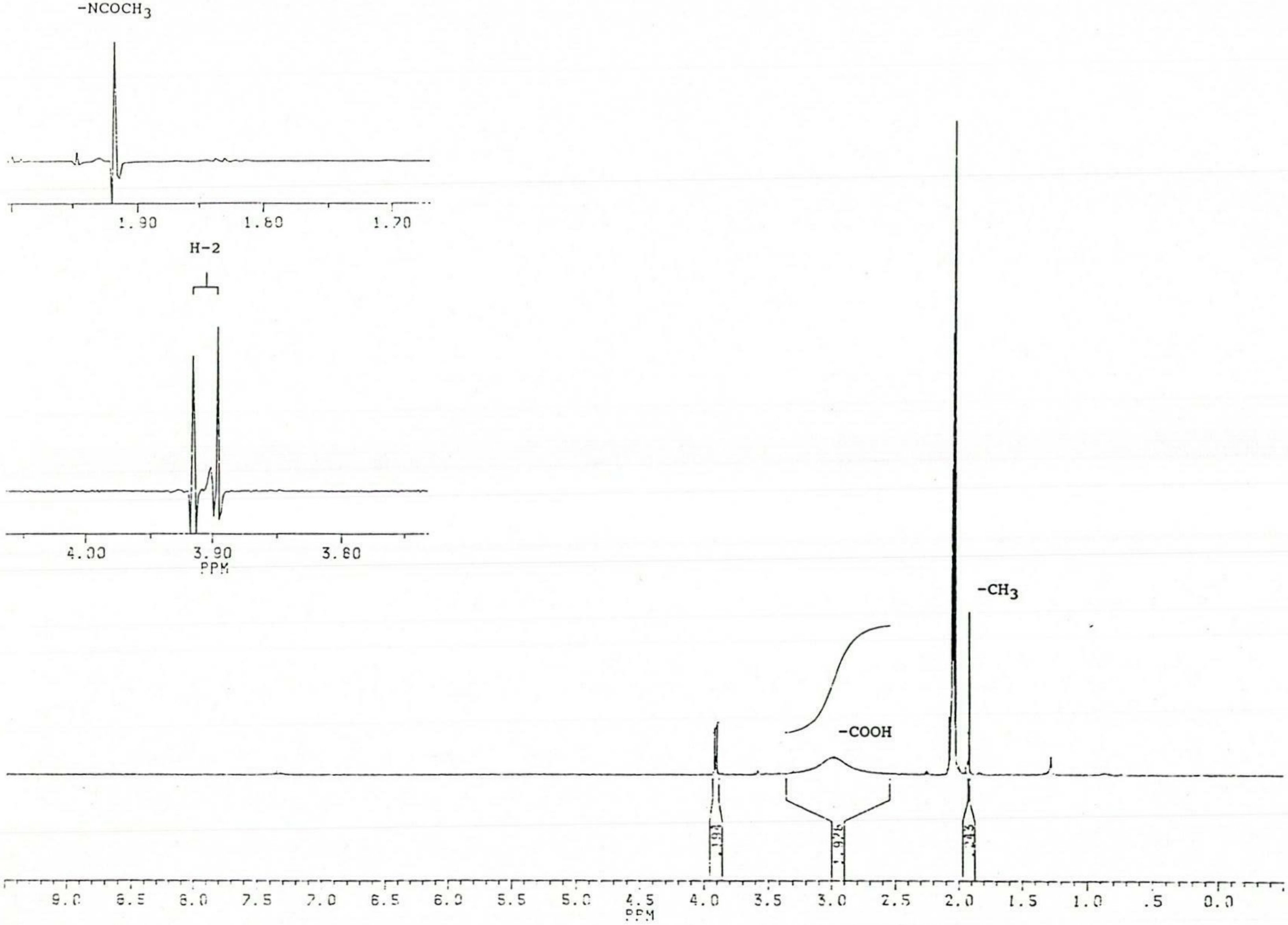


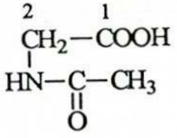
(91c)

Plaat 42 ($CDCl_3$, 363 K)



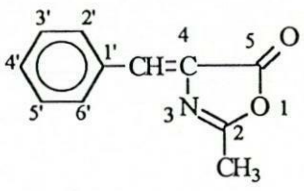
Plaat 43 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]



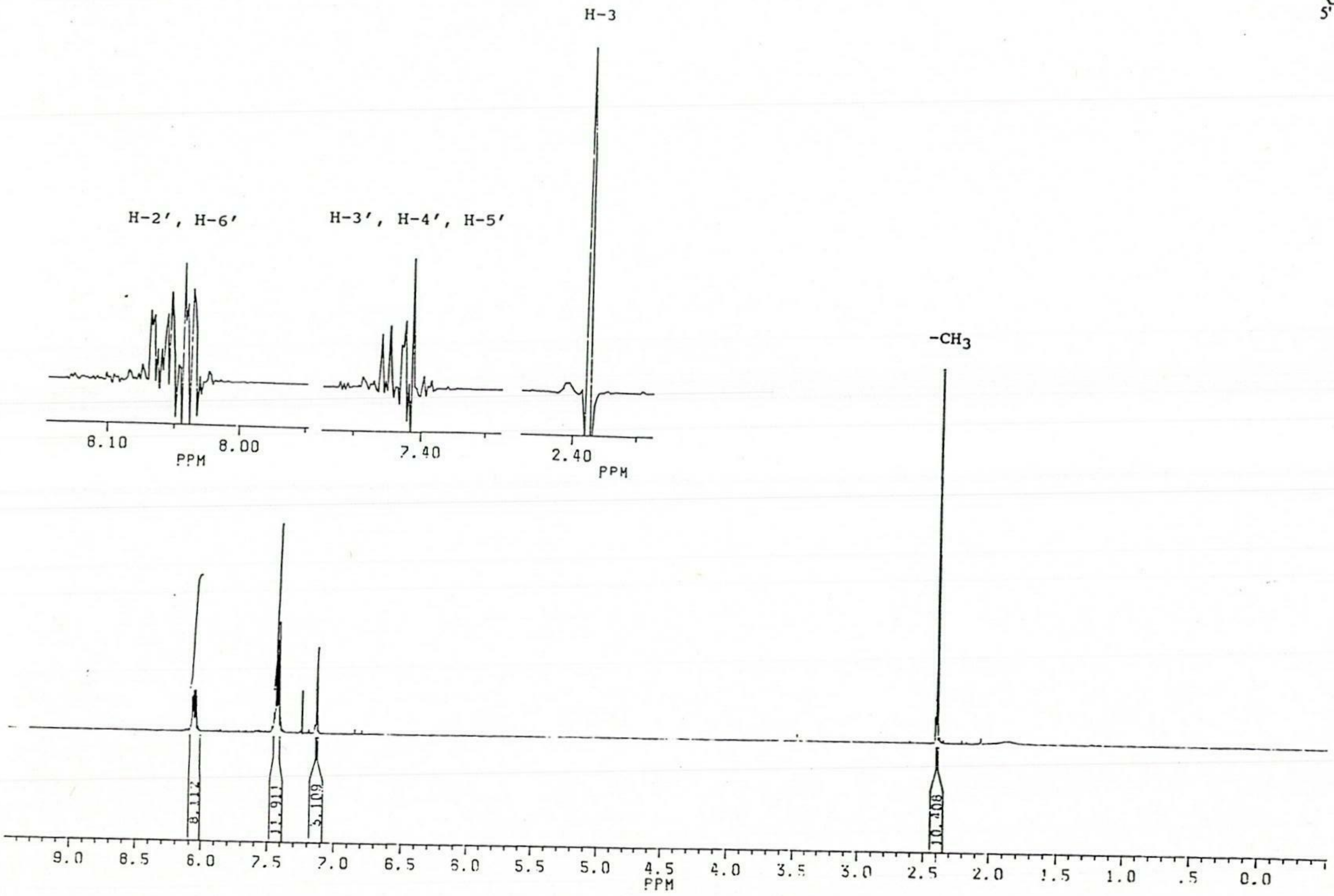


(125)

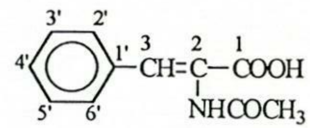
Plaat 44 ($CDCl_3$, 296 K)



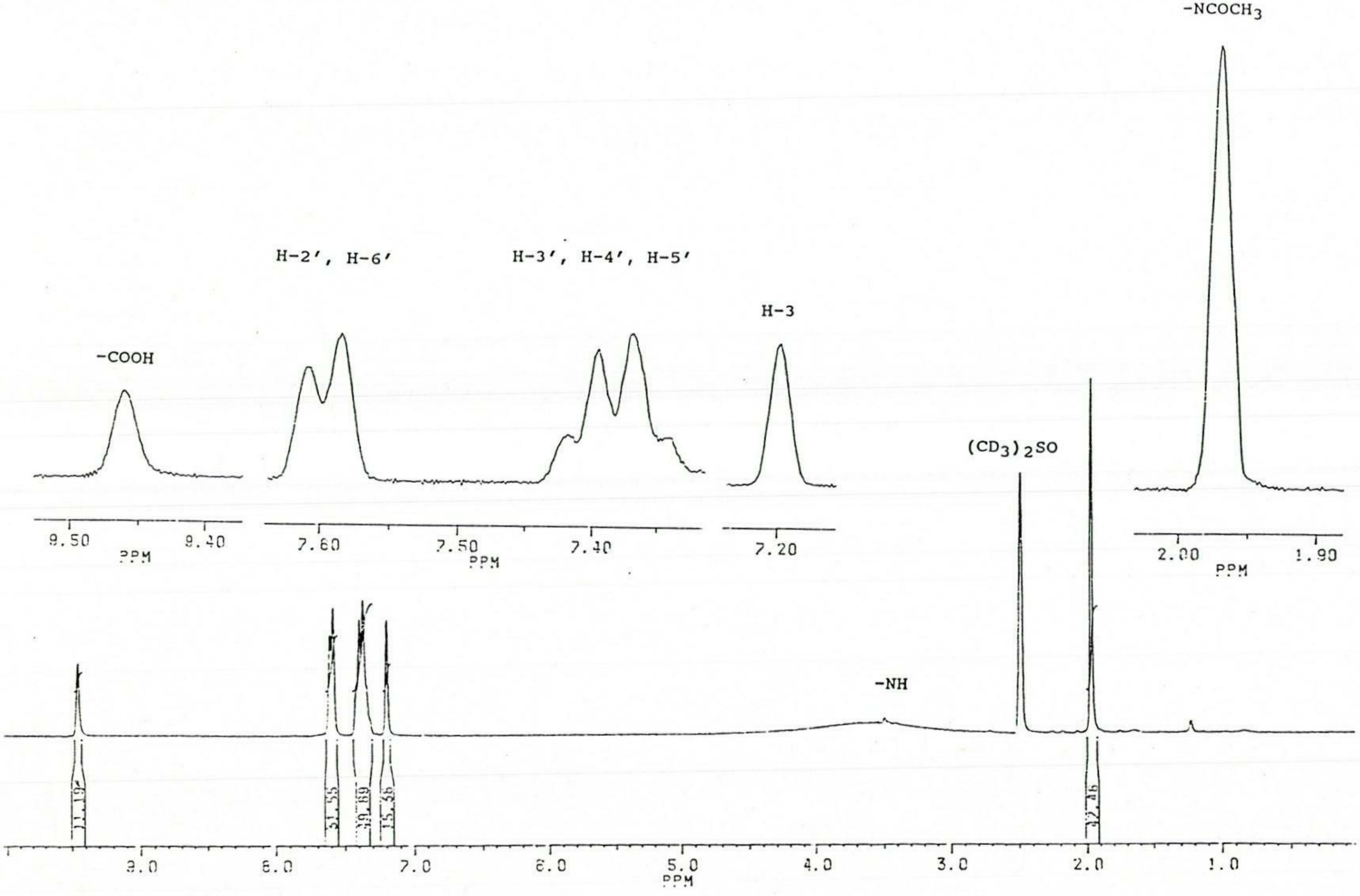
(127)



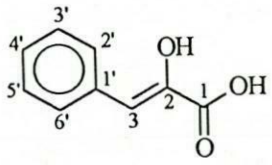
Plaat 45 [(CD3)2SO, 296 K]



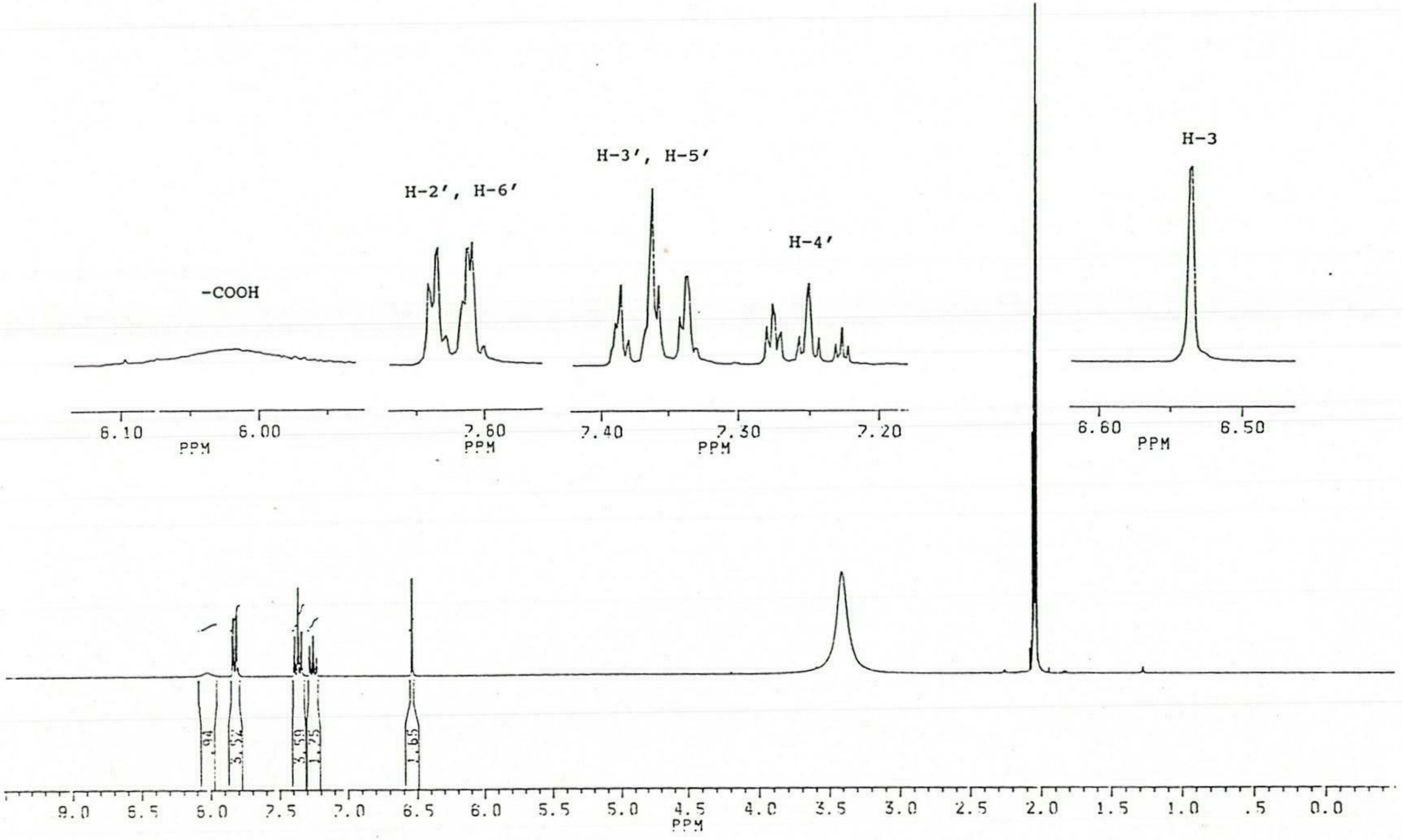
(128)



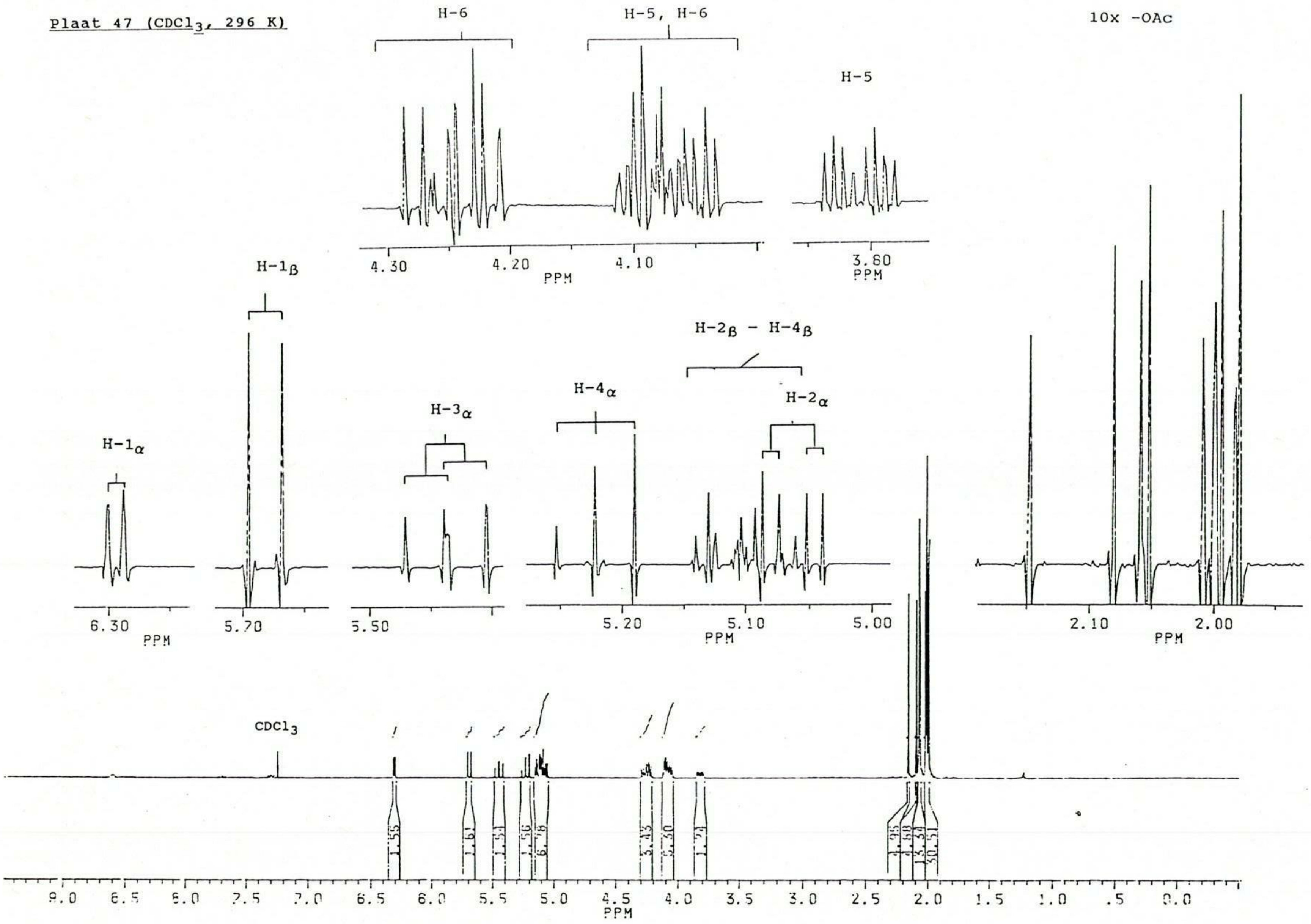
Plaat 46 [(CD$_3$)$_2$CO, 296 K]

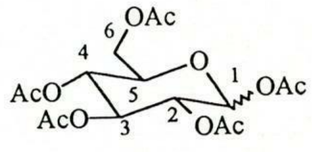


(129)



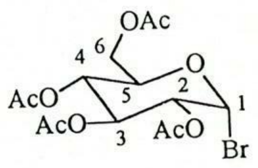
Plaat 47 ($CDCl_3$, 296 K)



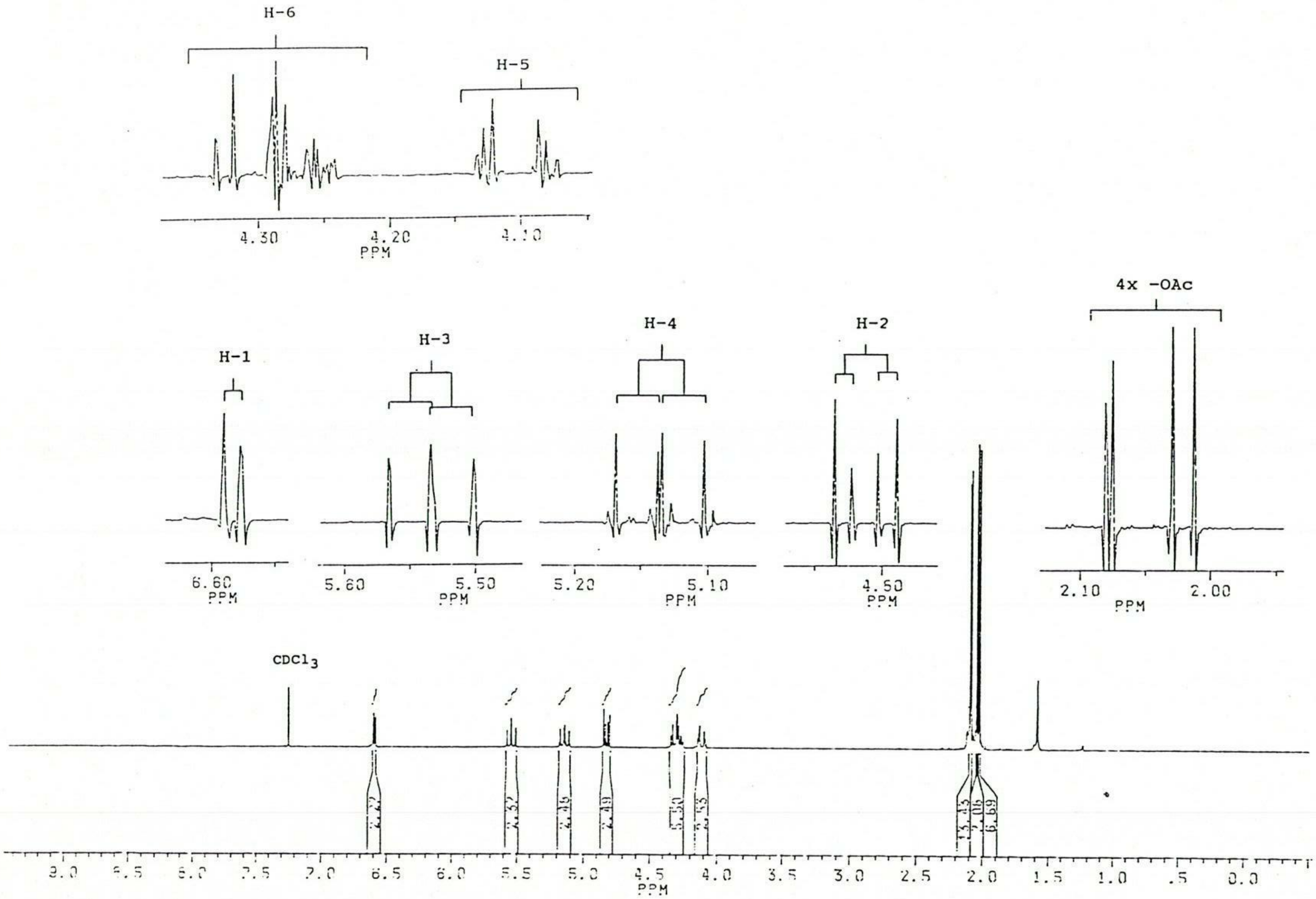


(131)

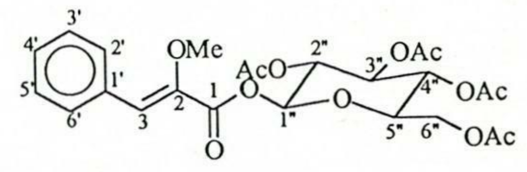
Plaat 48 ($CDCl_3$, 296 K)



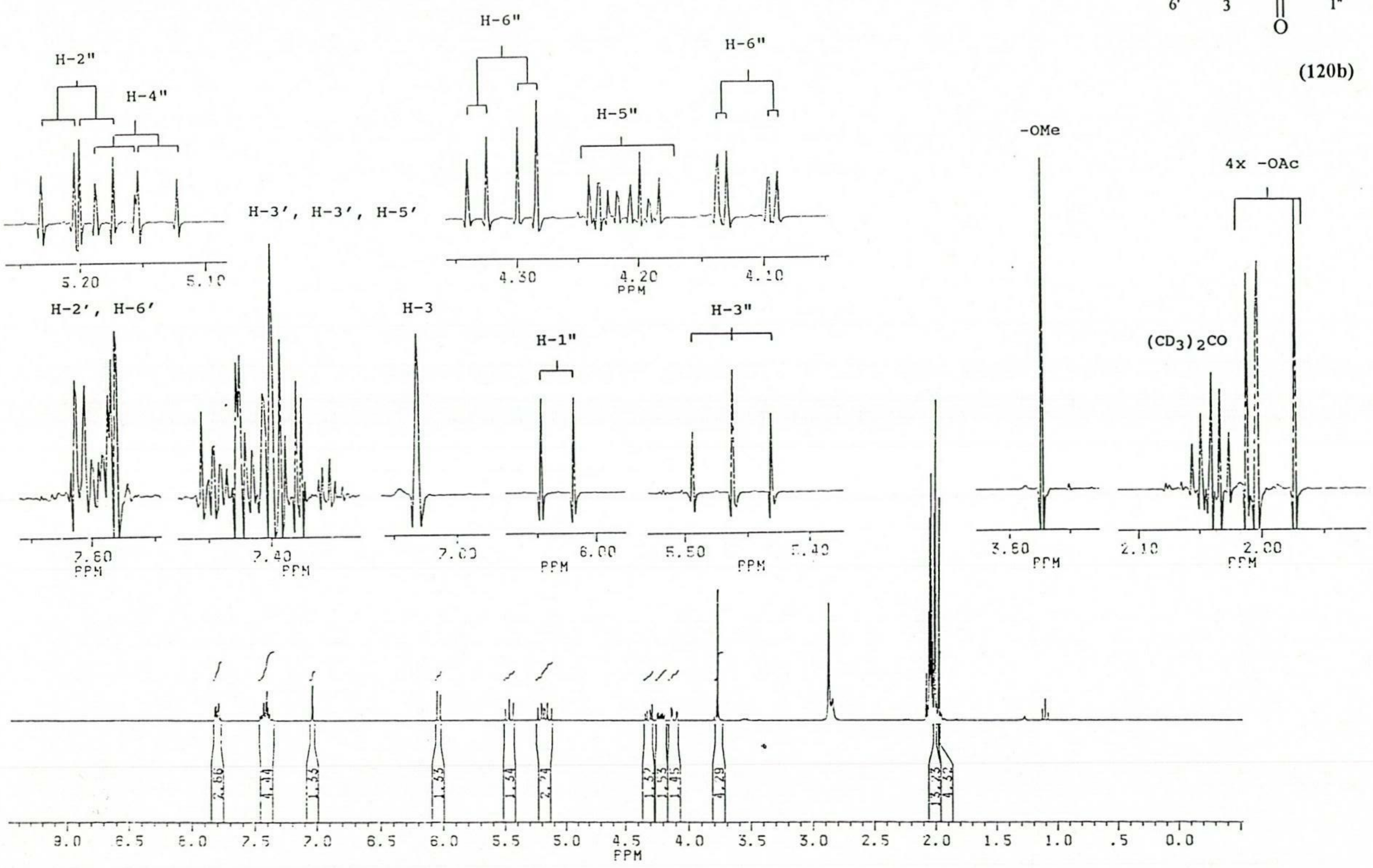
(132)



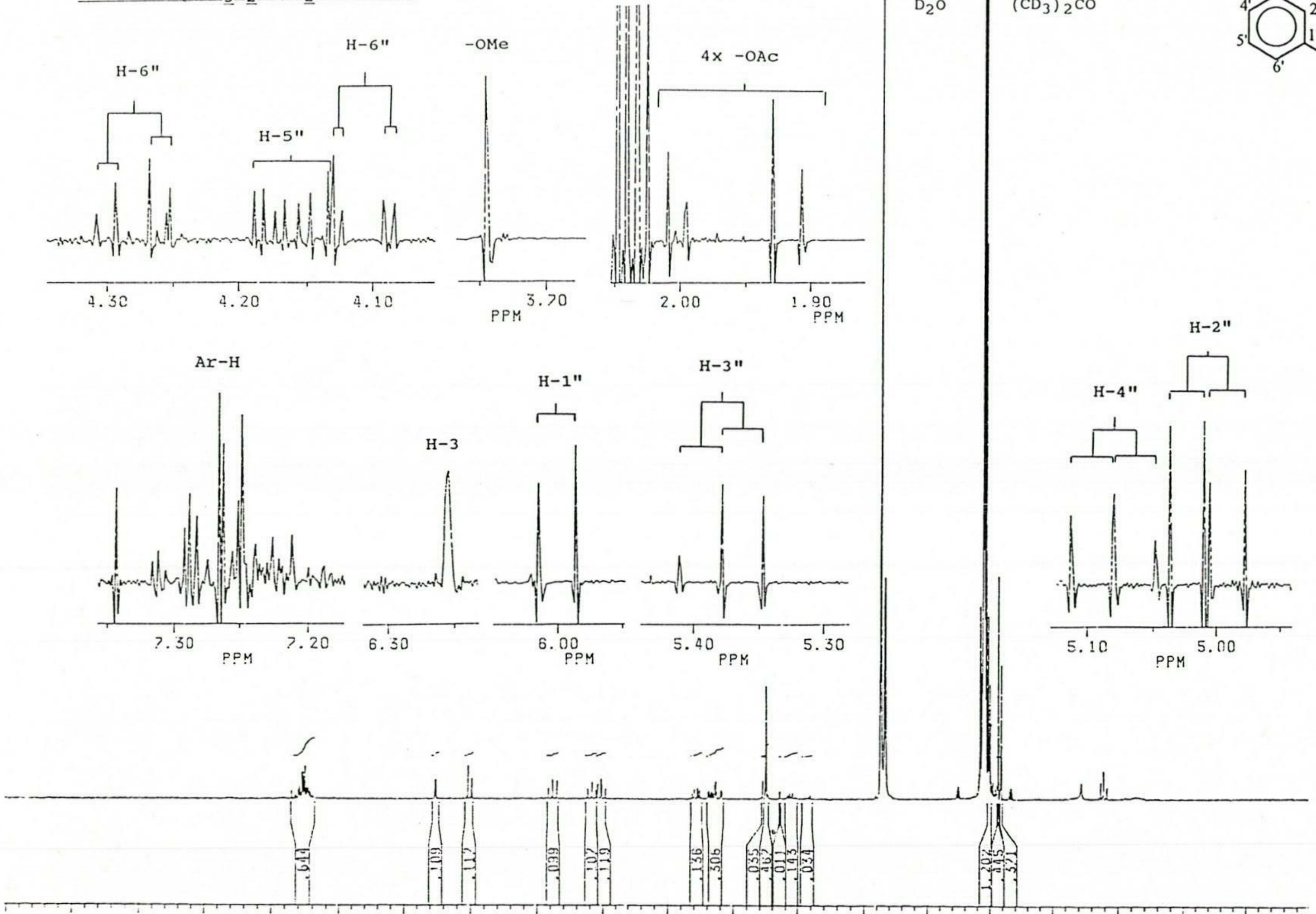
Plaat 49 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

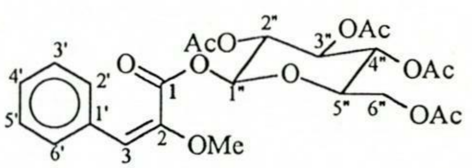


(120b)



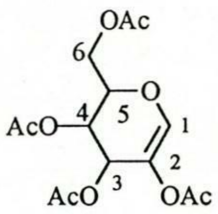
Plaat 50 [$(CD_3)_2\underline{CO}/D_2\underline{O}$, 296 K]



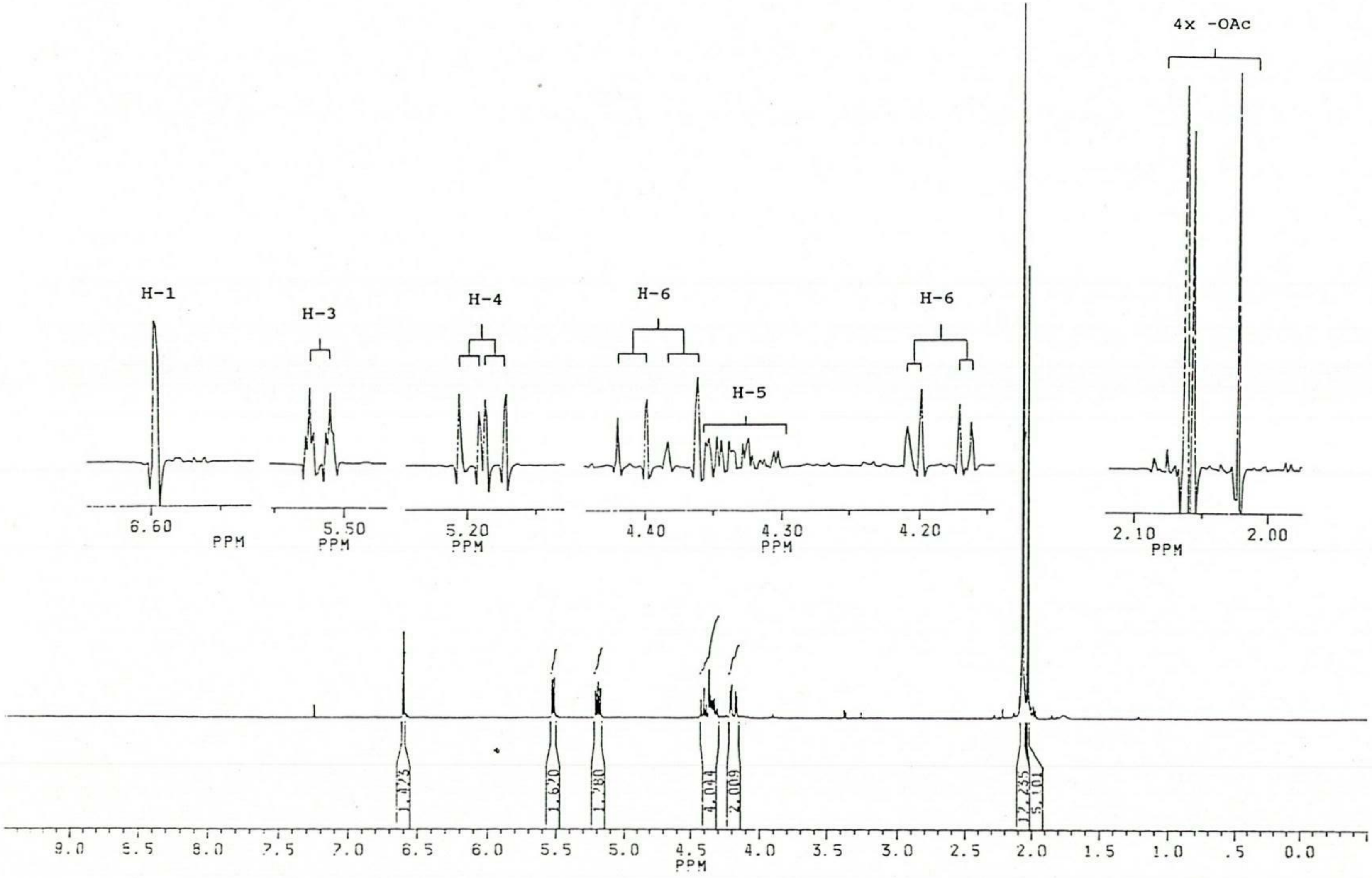


(122b)

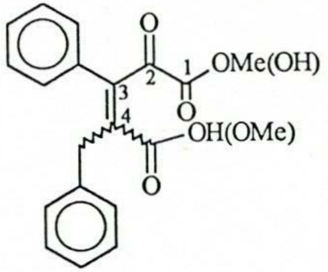
Plaat 51 ($CDCl_3$, 296 K)



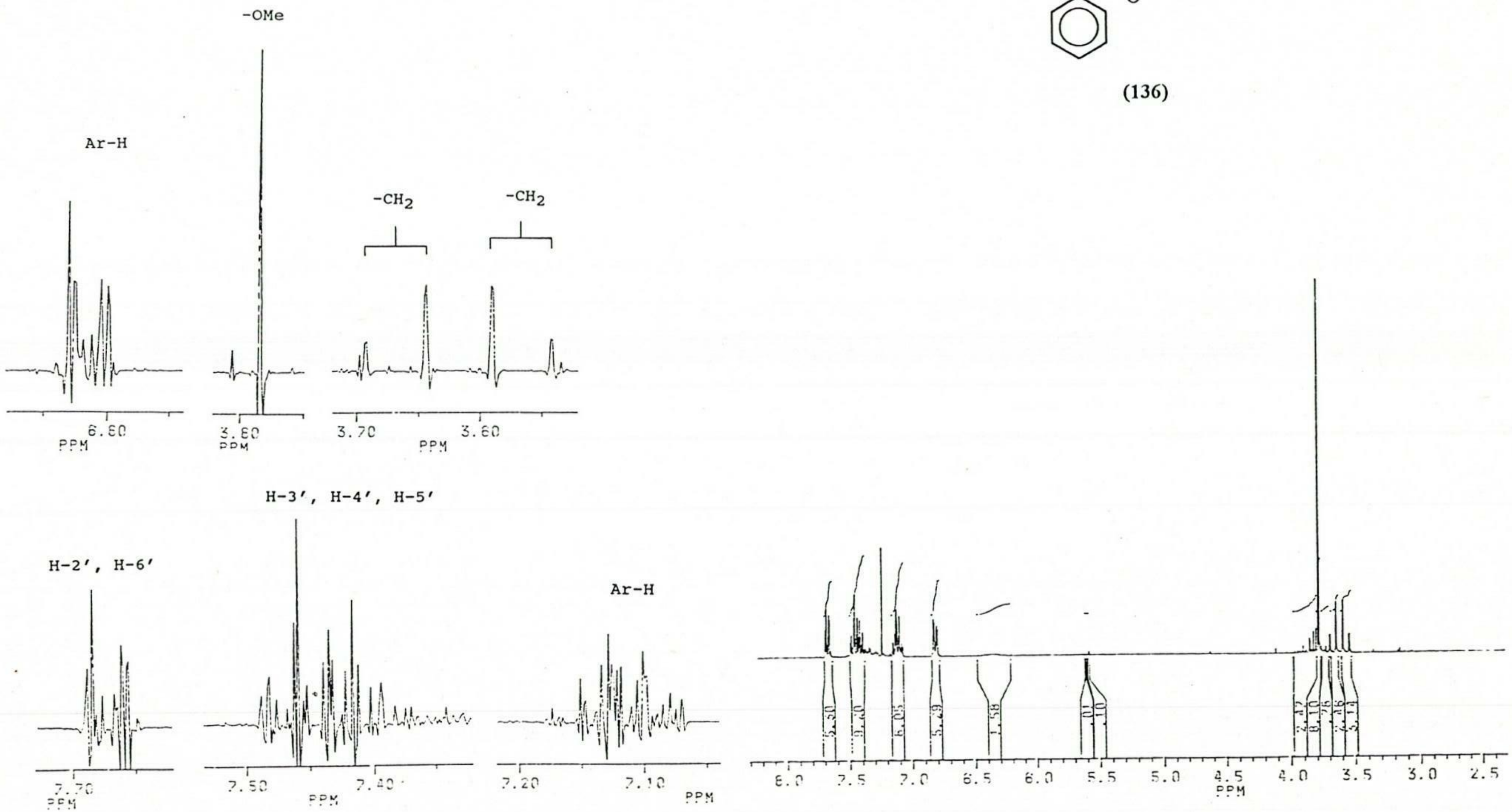
(135)



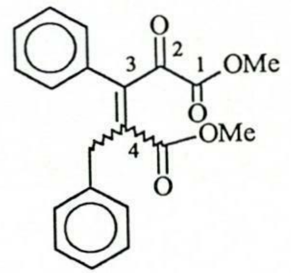
Plaat 52 ($CDCl_3$, 296 K)



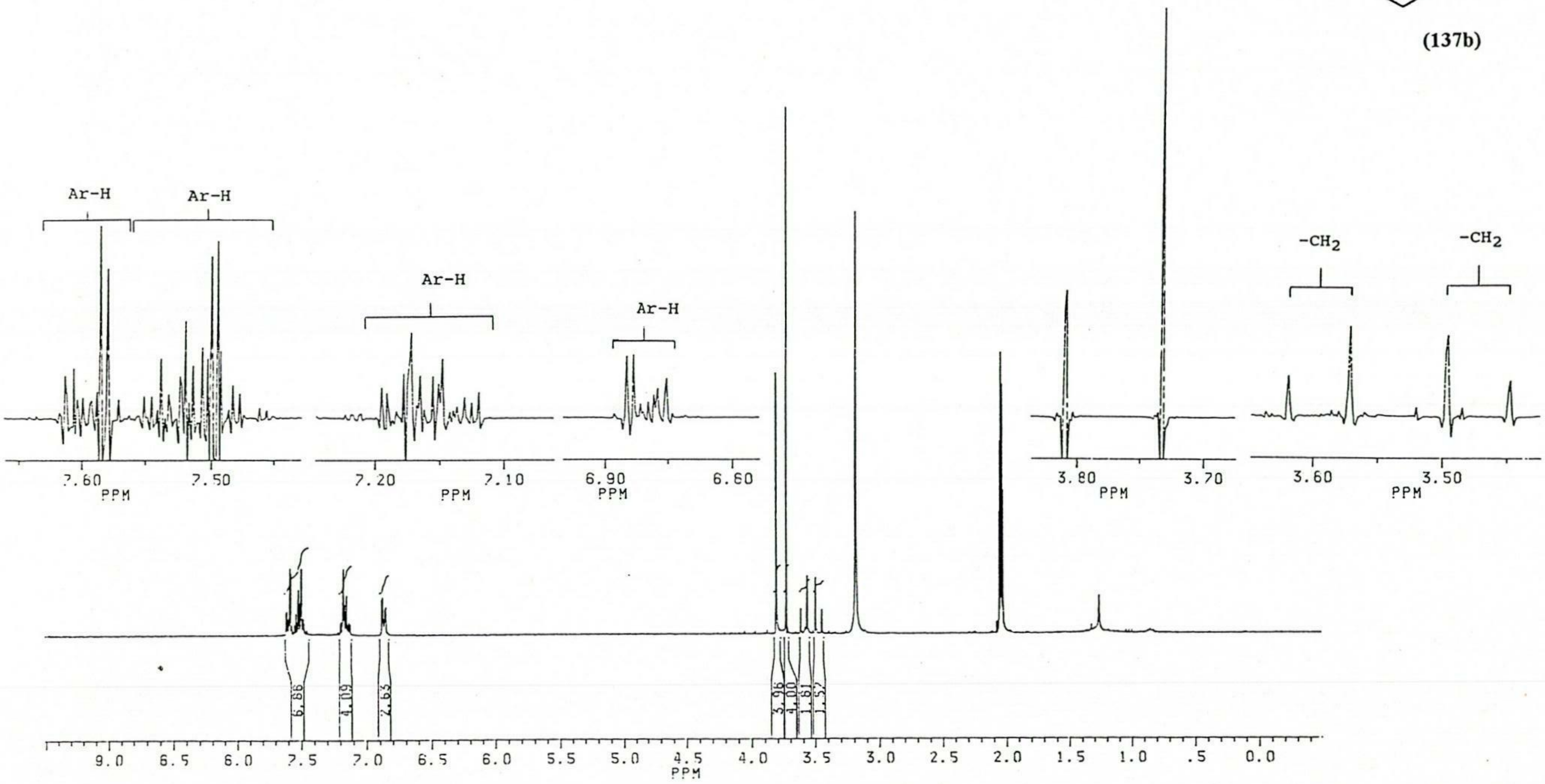
(136)



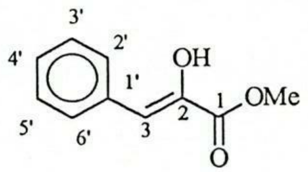
Plaat 53 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



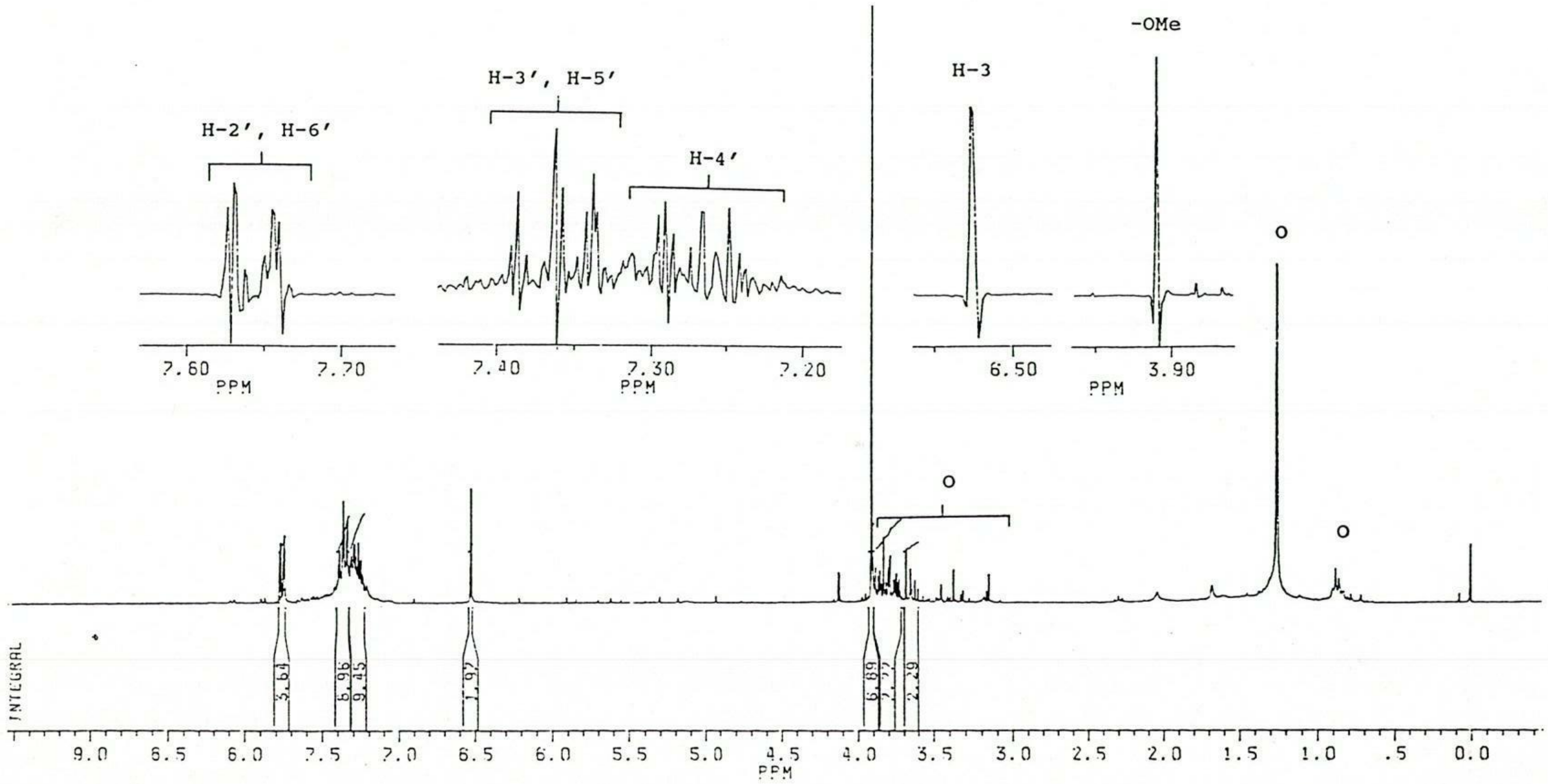
(137b)



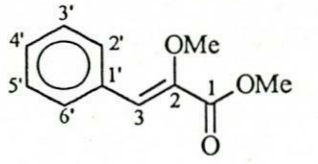
Plaat 54 ($CDCl_3$, 296 K)



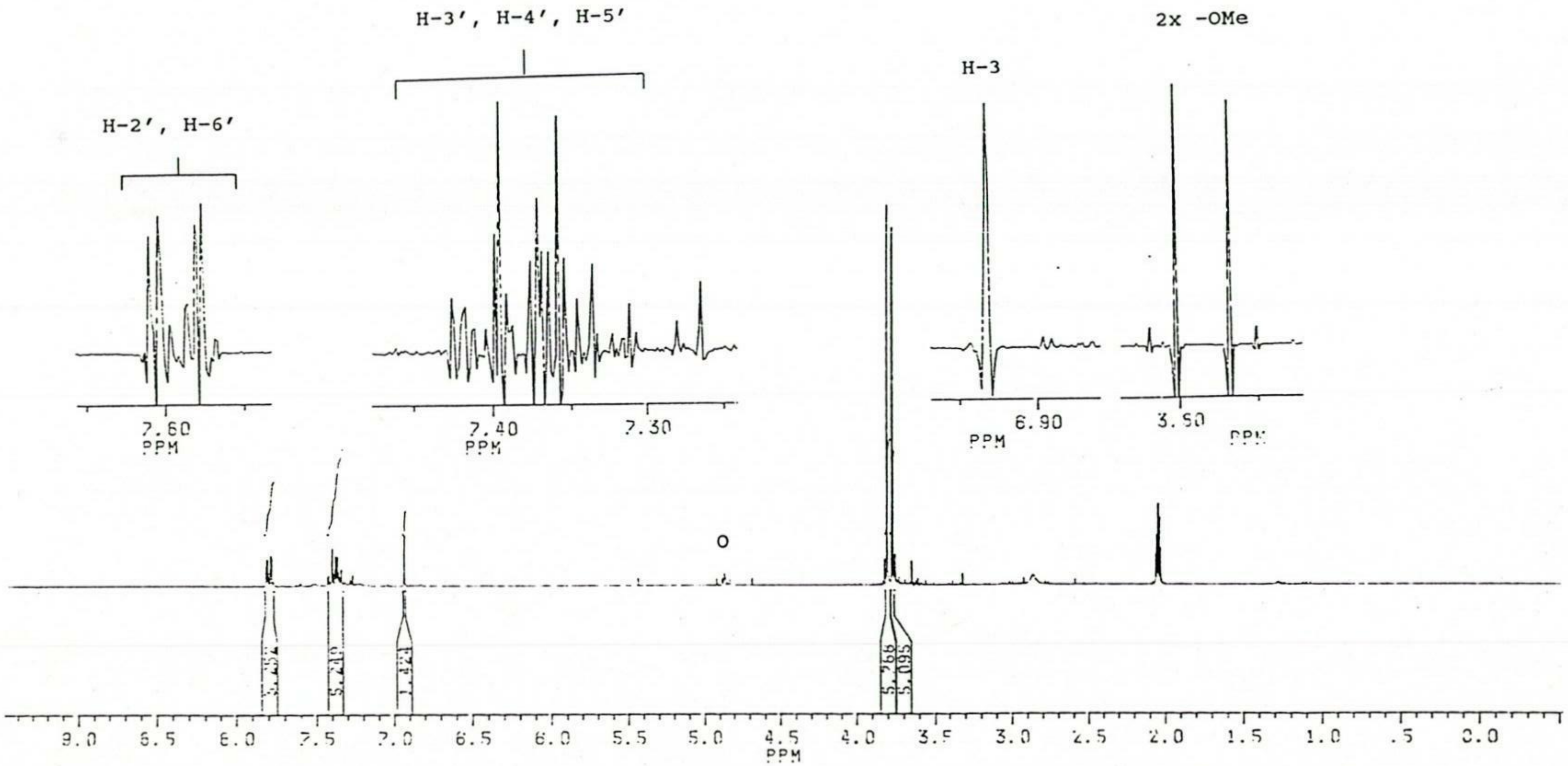
(138)



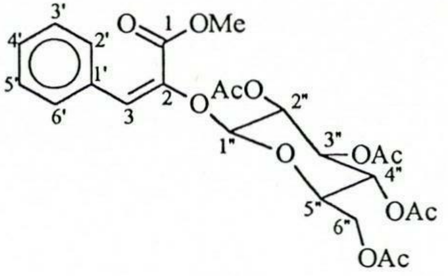
Plaat 55 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



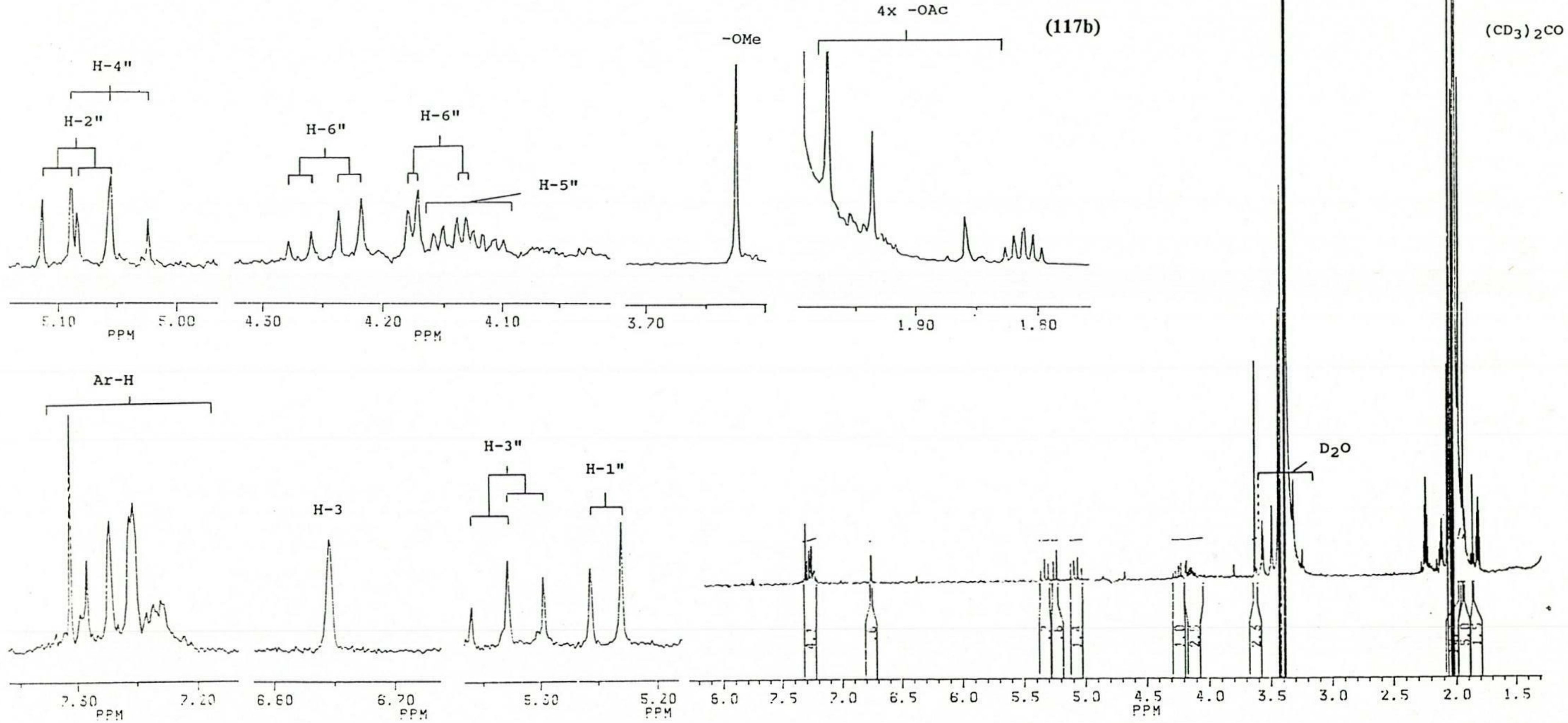
(139)



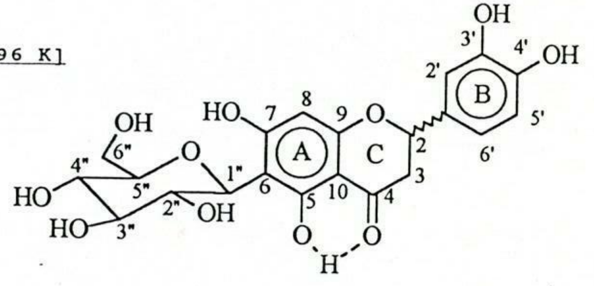
Plaat 56 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



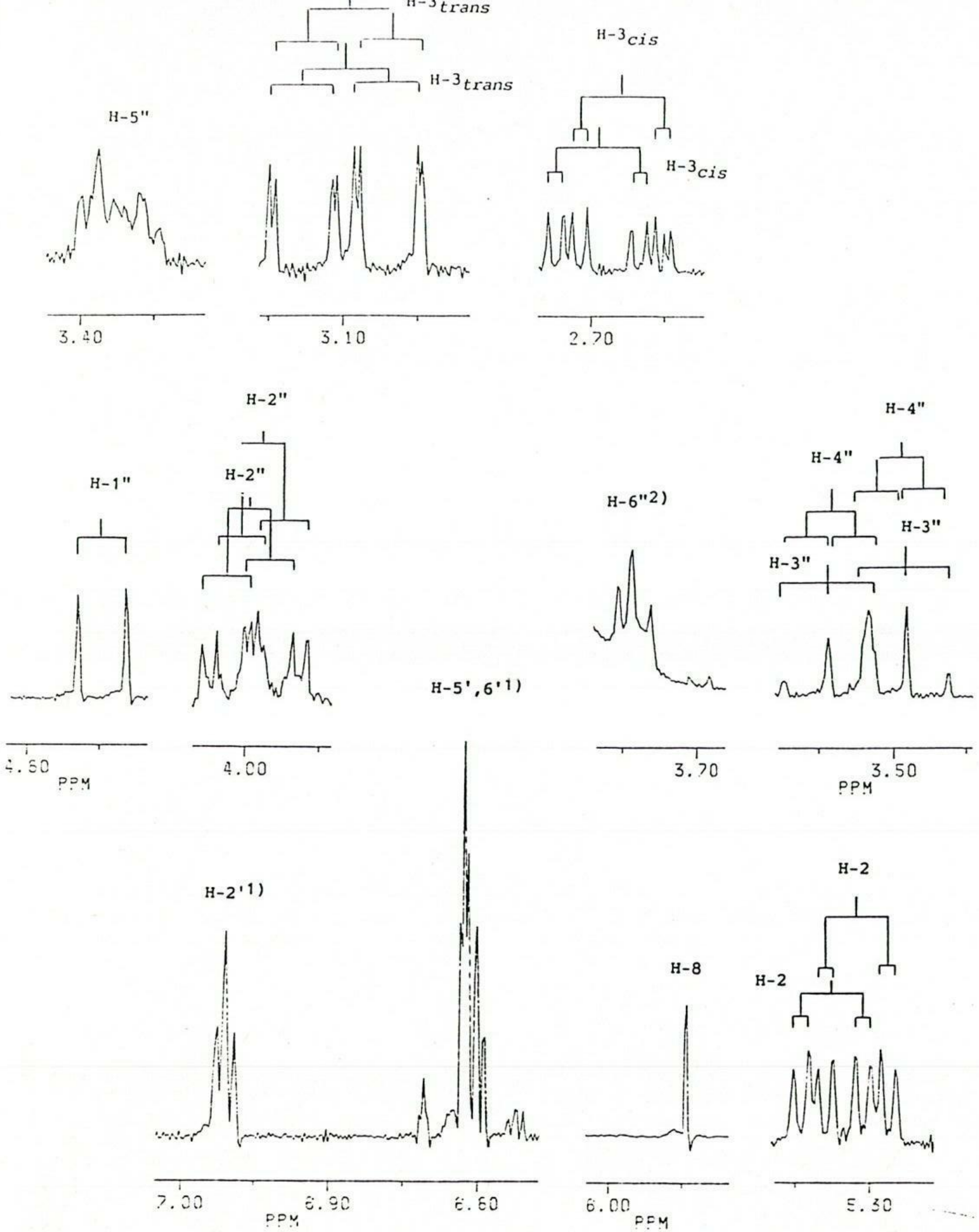
(117b)

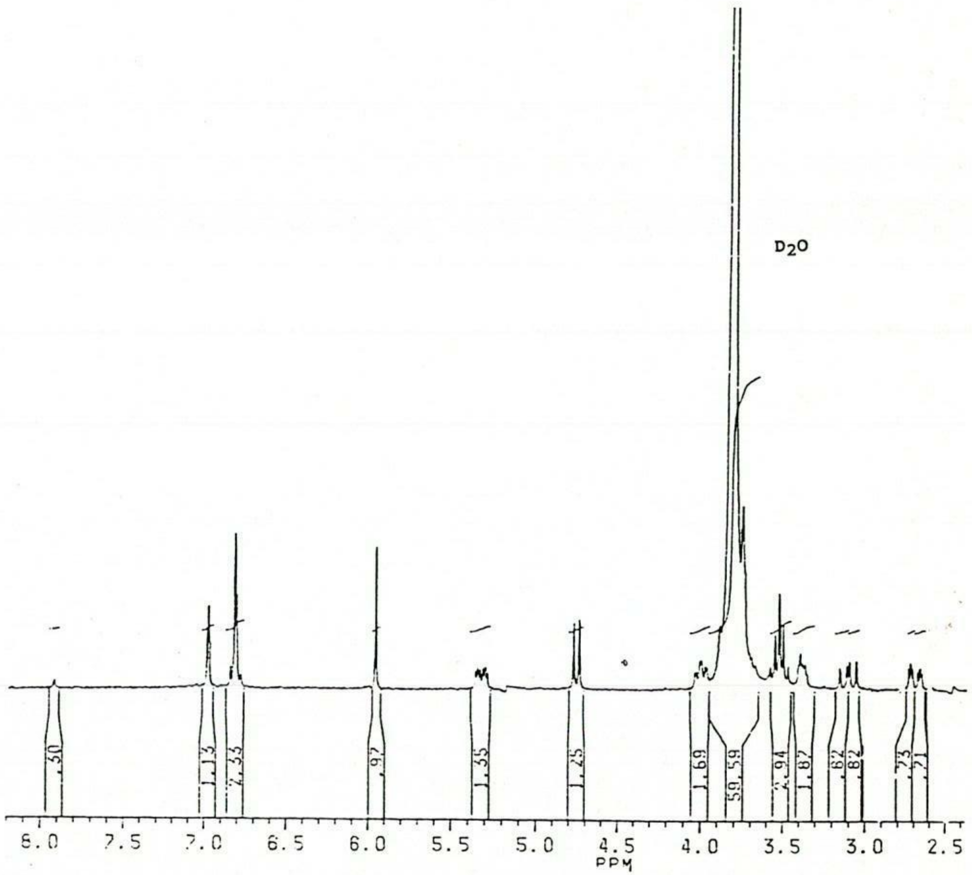


Plaat 57 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

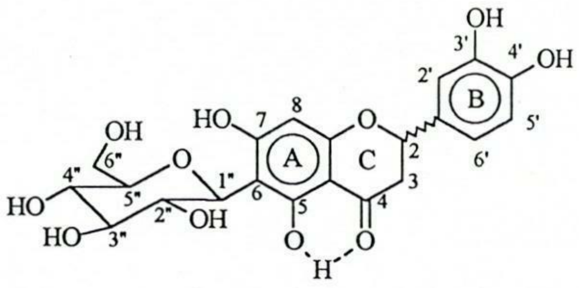


(88a)

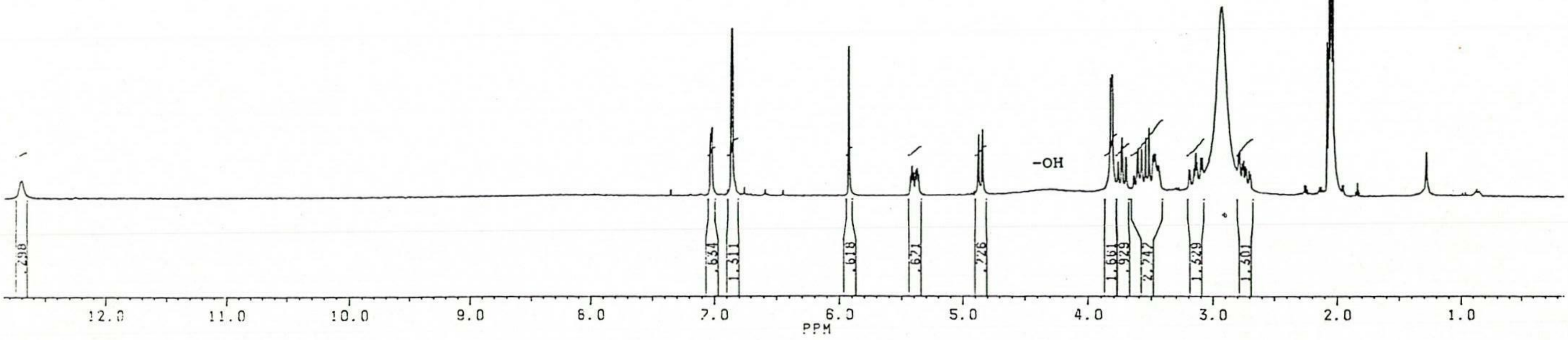


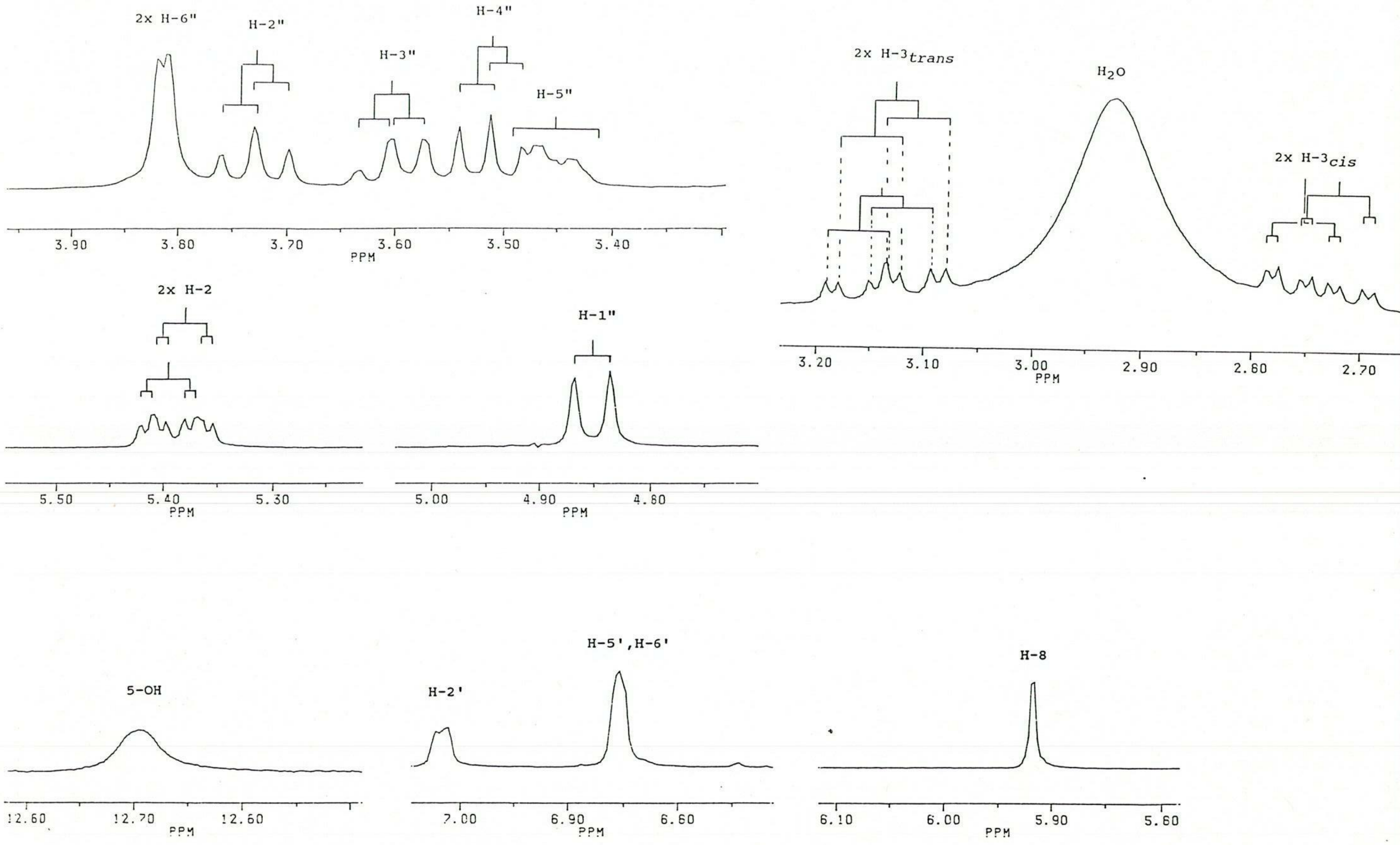


Plaat 58 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]

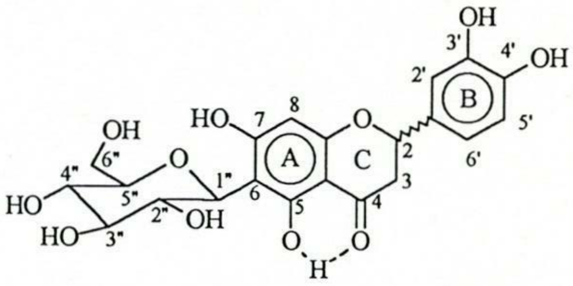


(88a)

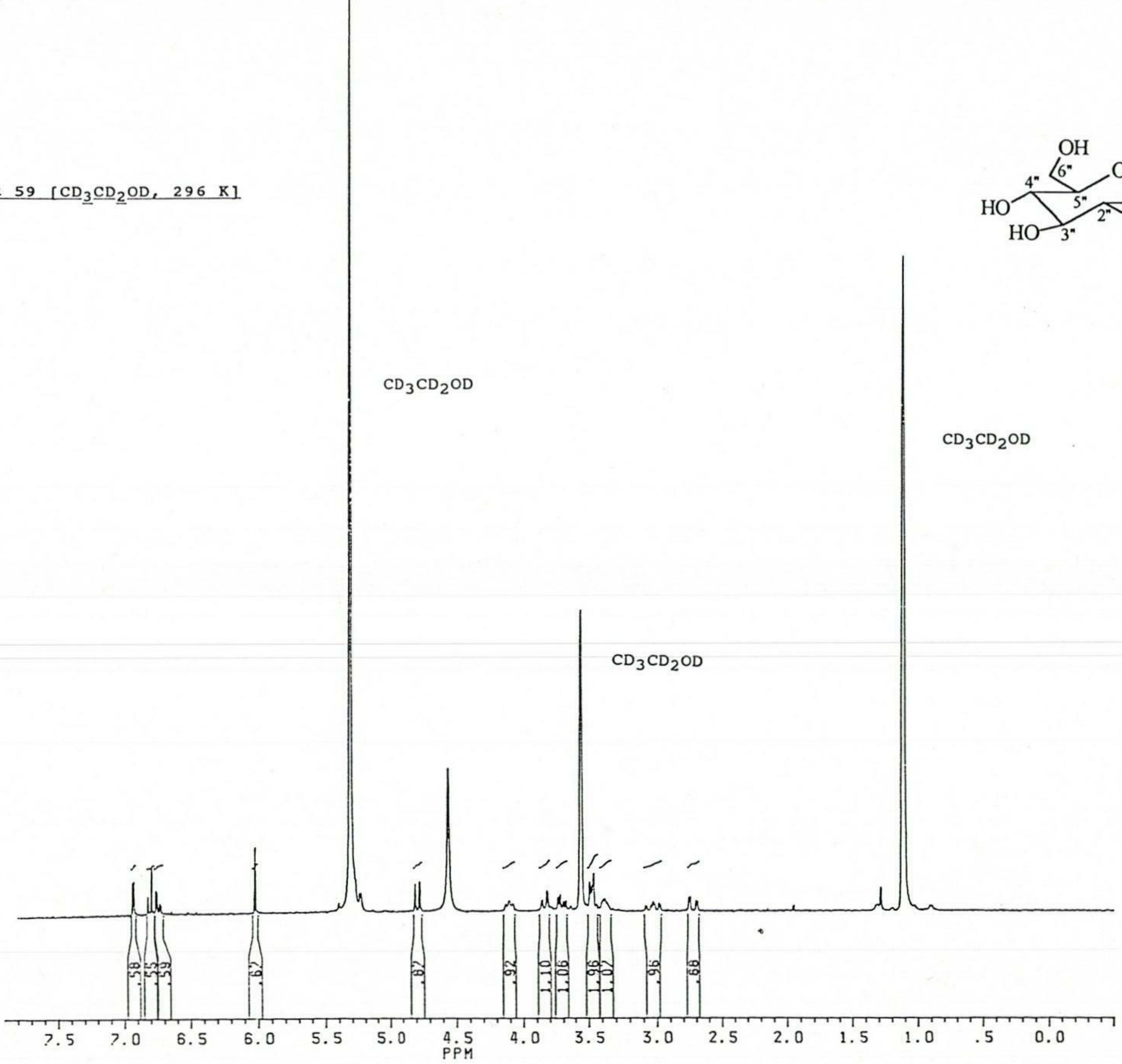


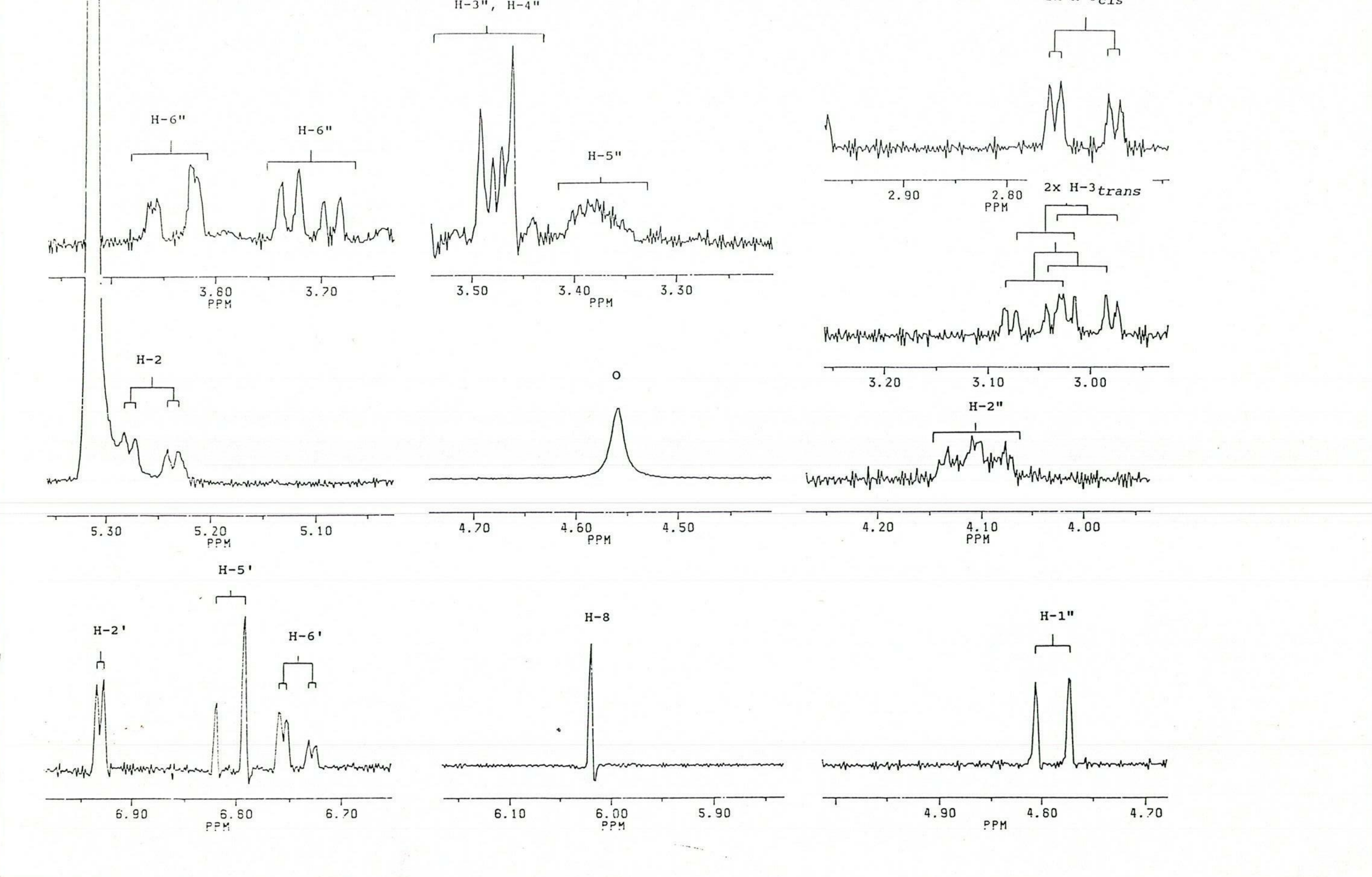

2x H-6"
H-2"
H-3"
H-4"
H-5"
3.90
3.80
3.70
3.60
PPM
3.50
3.40
2x H-3trans
H2O
2x H-3cis
3.20
3.10
3.00
PPM
2.90
2.60
2.70
2x H-2
5.50
5.40
PPM
5.30
H-1"
5.00
4.90
PPM
4.80
5-OH
12.60
12.70
PPM
12.60
H-2'
H-5',H-6'
7.00
6.90
PPM
6.60
H-8
6.10
6.00
PPM
5.90
5.60

Plaat 59 [CD_3CD_2OD, 296 K]

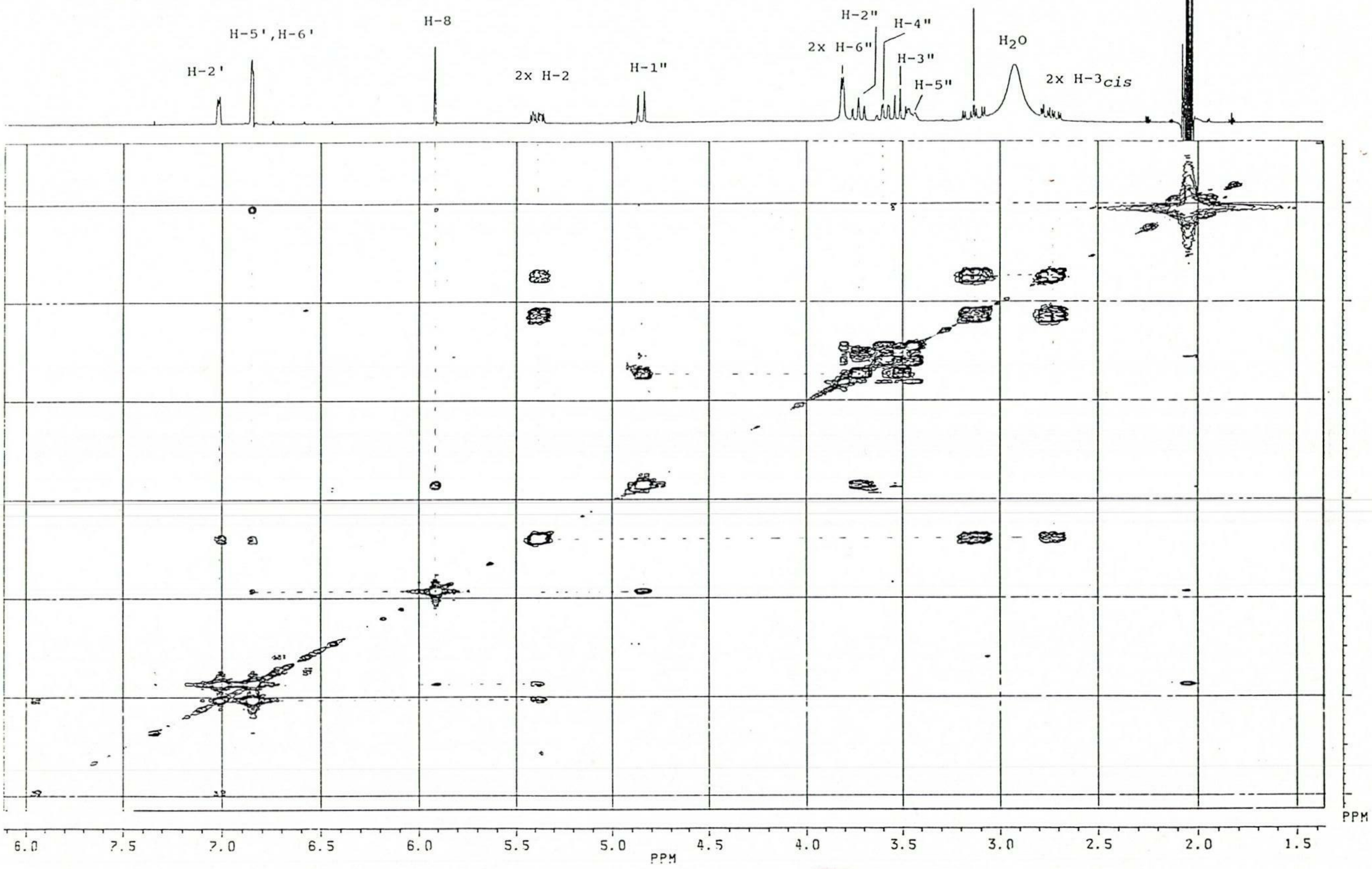


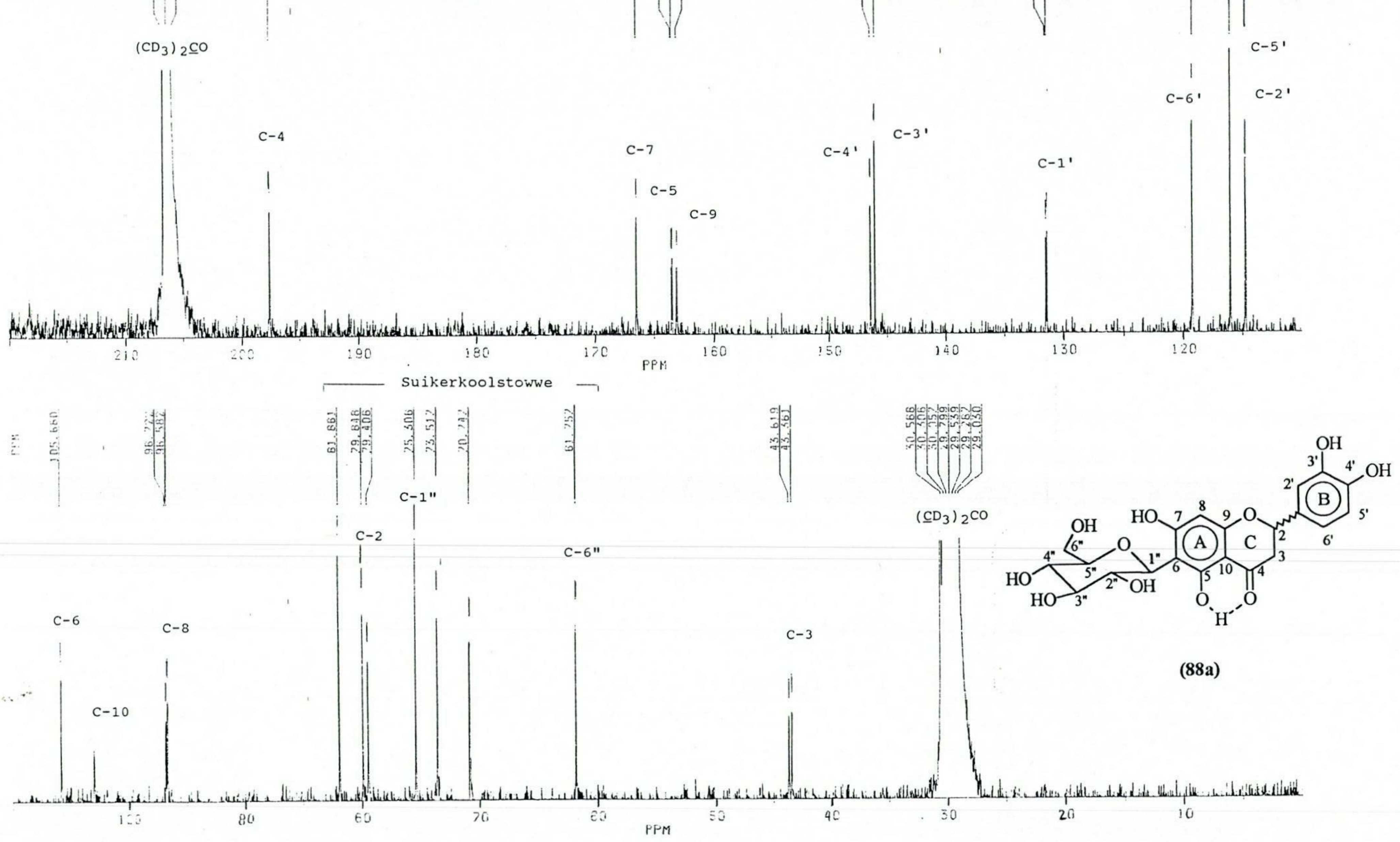
(88a)




H-6"
H-6"
3.80
3.70
PPM
H-3", H-4"
H-5"
3.50
3.40
3.30
PPM
2.90
2.80
PPM
2x H-3trans
3.20
3.10
3.00
H-2
5.30
5.20
5.10
PPM
O
4.70
4.60
4.50
PPM
H-2"
4.20
4.10
4.00
PPM
H-2'
H-5'
H-6'
6.90
6.80
6.70
PPM
H-8
6.10
6.00
5.90
PPM
H-1"
4.90
4.60
4.70
PPM

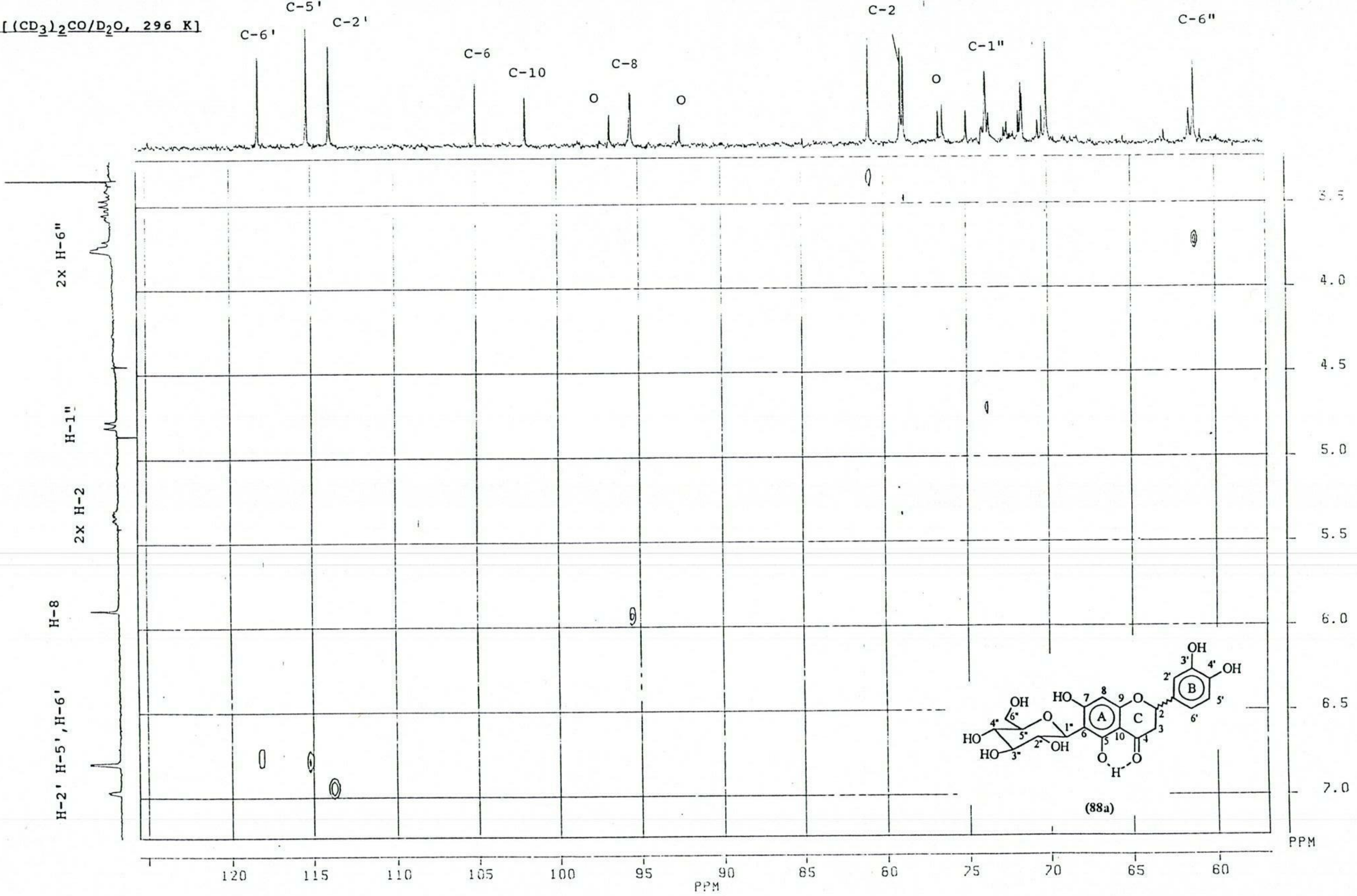
Plaat 60 [$(CD_3)_2CO$, 296 K]




(CD3)2CO
C-4
C-7
C-5
C-9
C-4'
C-3'
C-1'
C-6'
C-5'
C-2'
PPM
Suikerkoolstowwe
C-1"
C-2
C-6"
(CD3)2CO
C-6
C-10
C-8
C-3
PPM

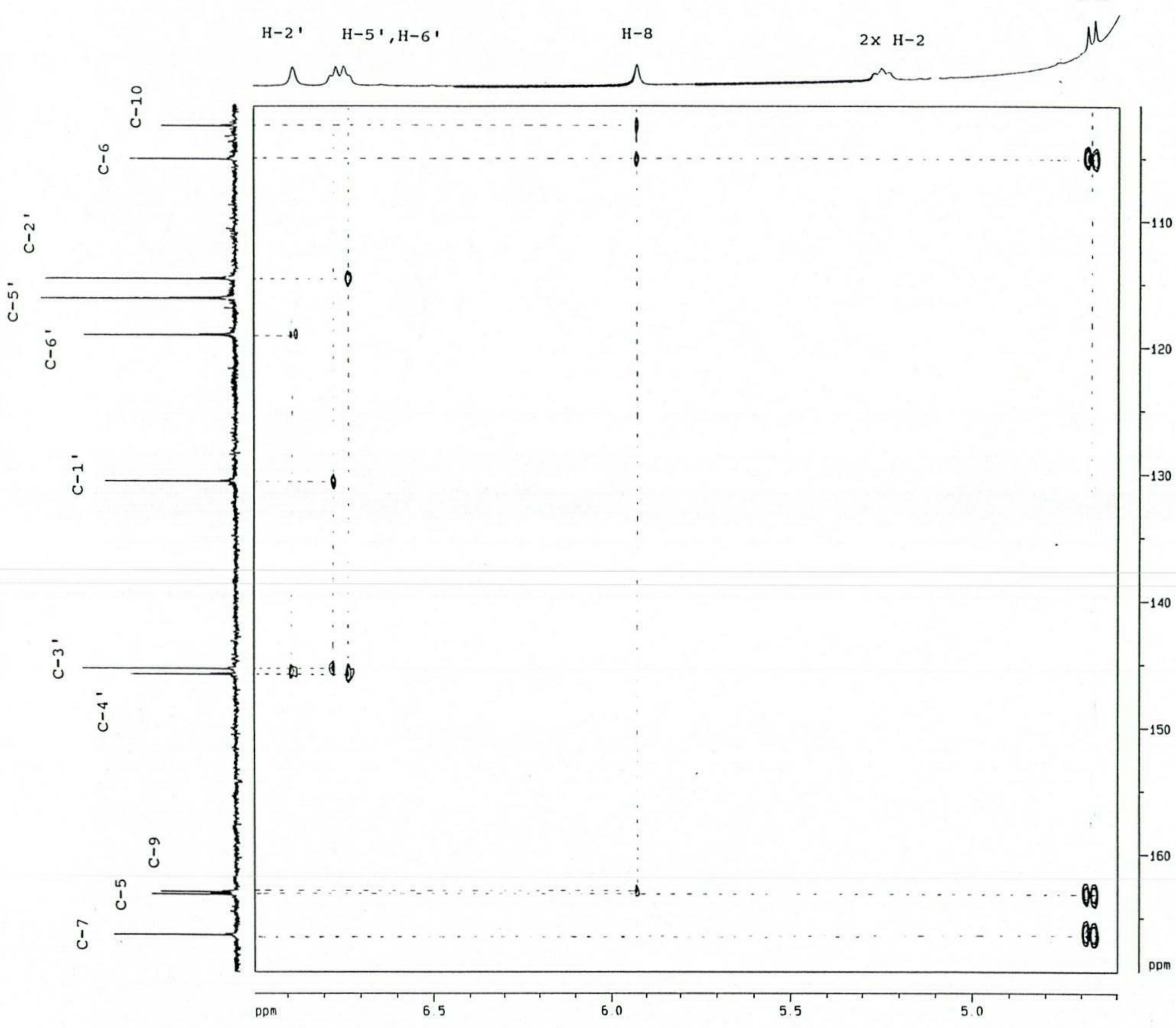
(88a)

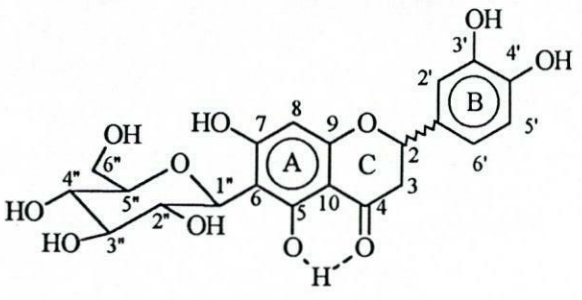
Plaat 62 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



'n Mate van ontbinding het ingetree.

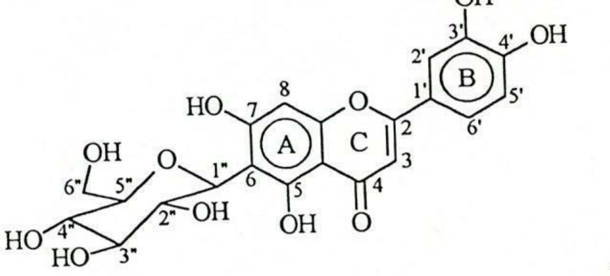
Plaat 63 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



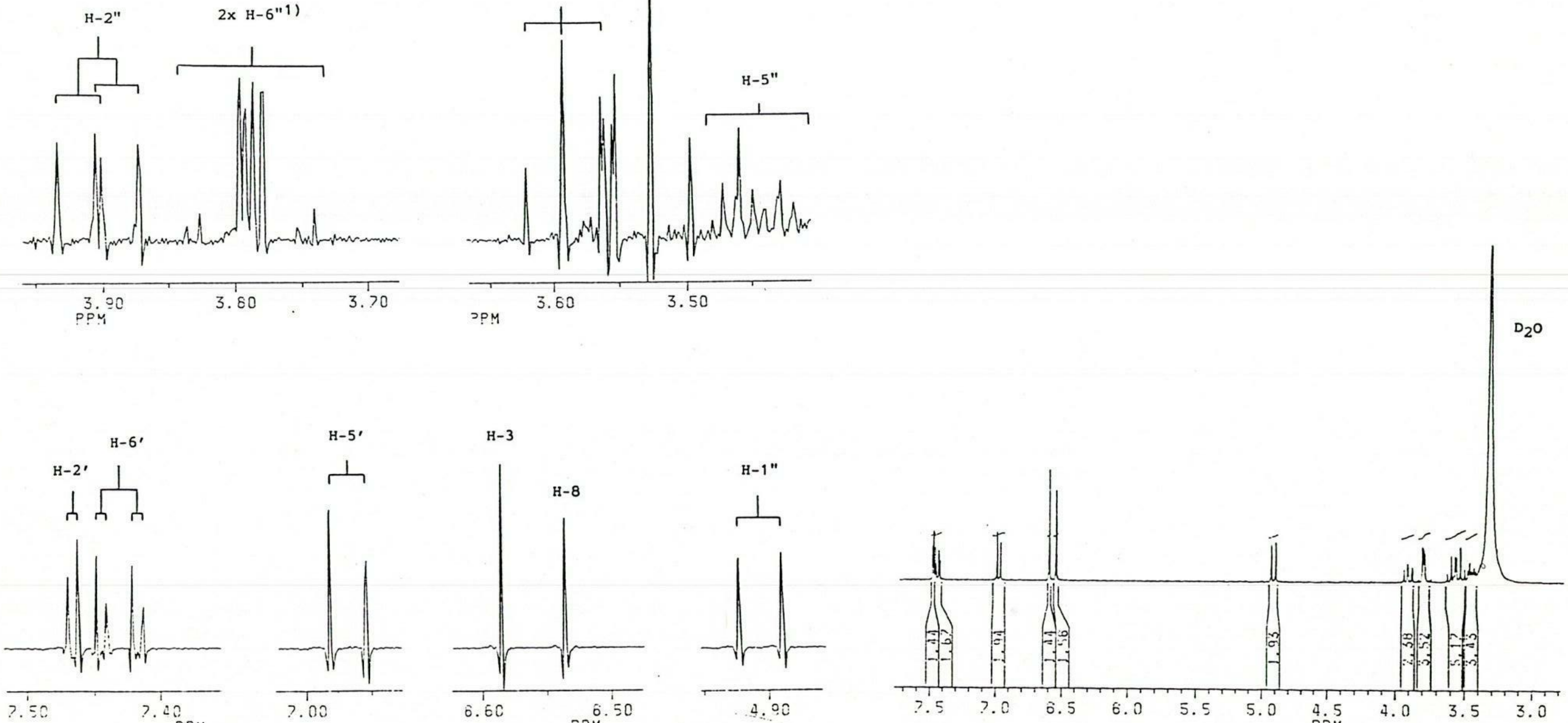


(88a)

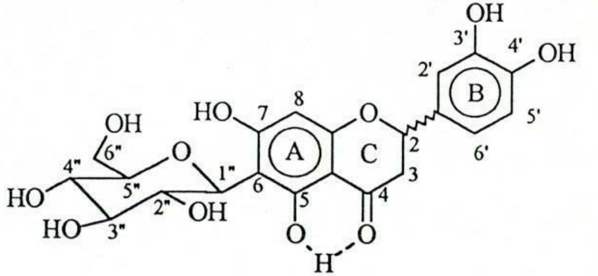
Plaat 64 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



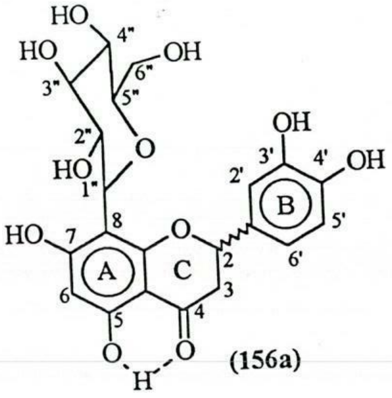
(40a)



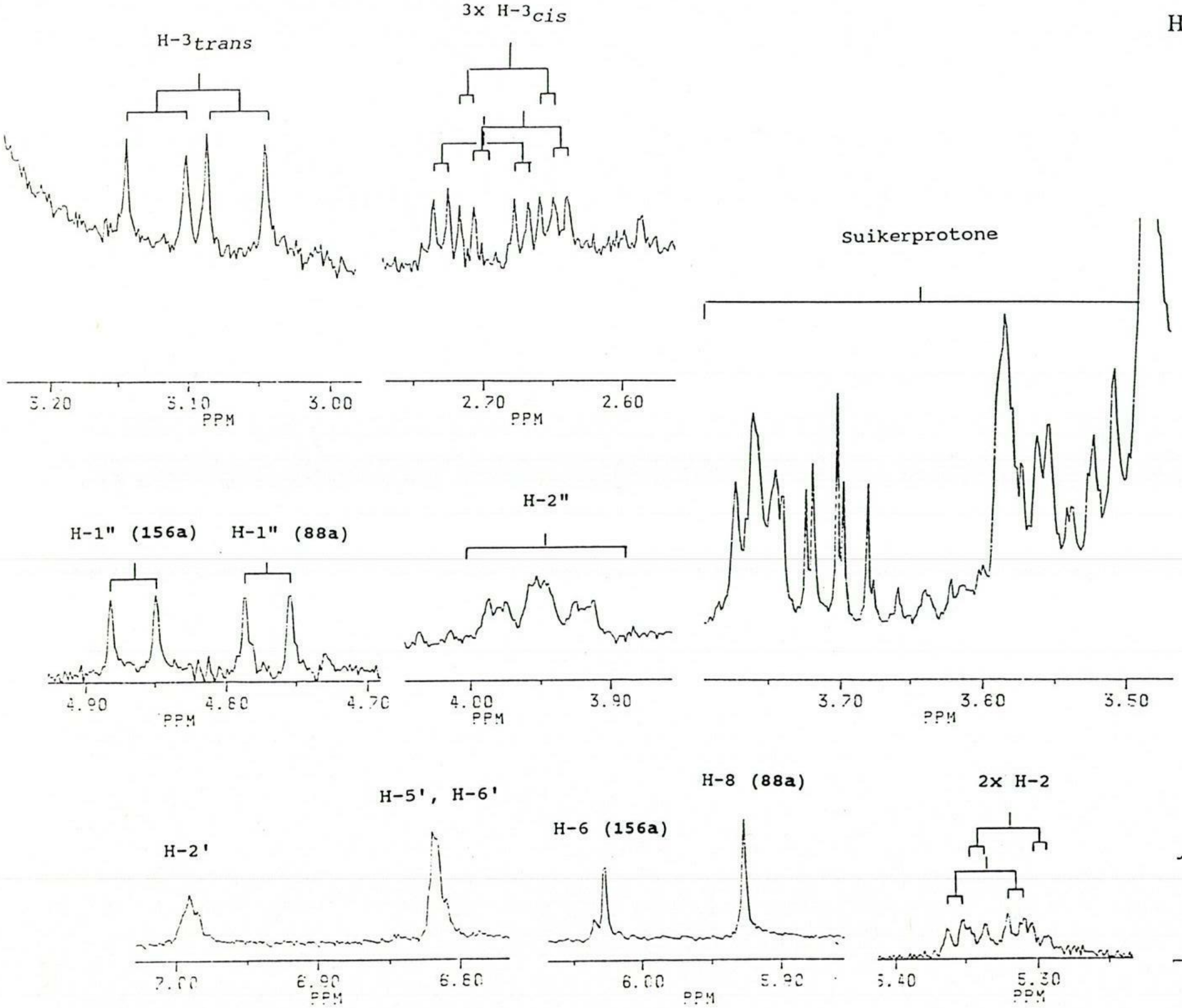
Plaat 65 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



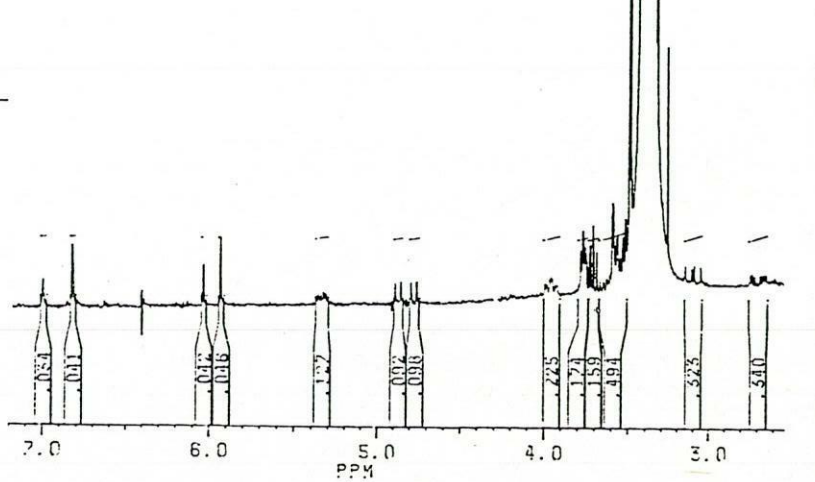
(88a)



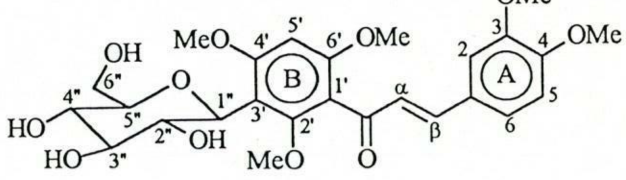
(156a)



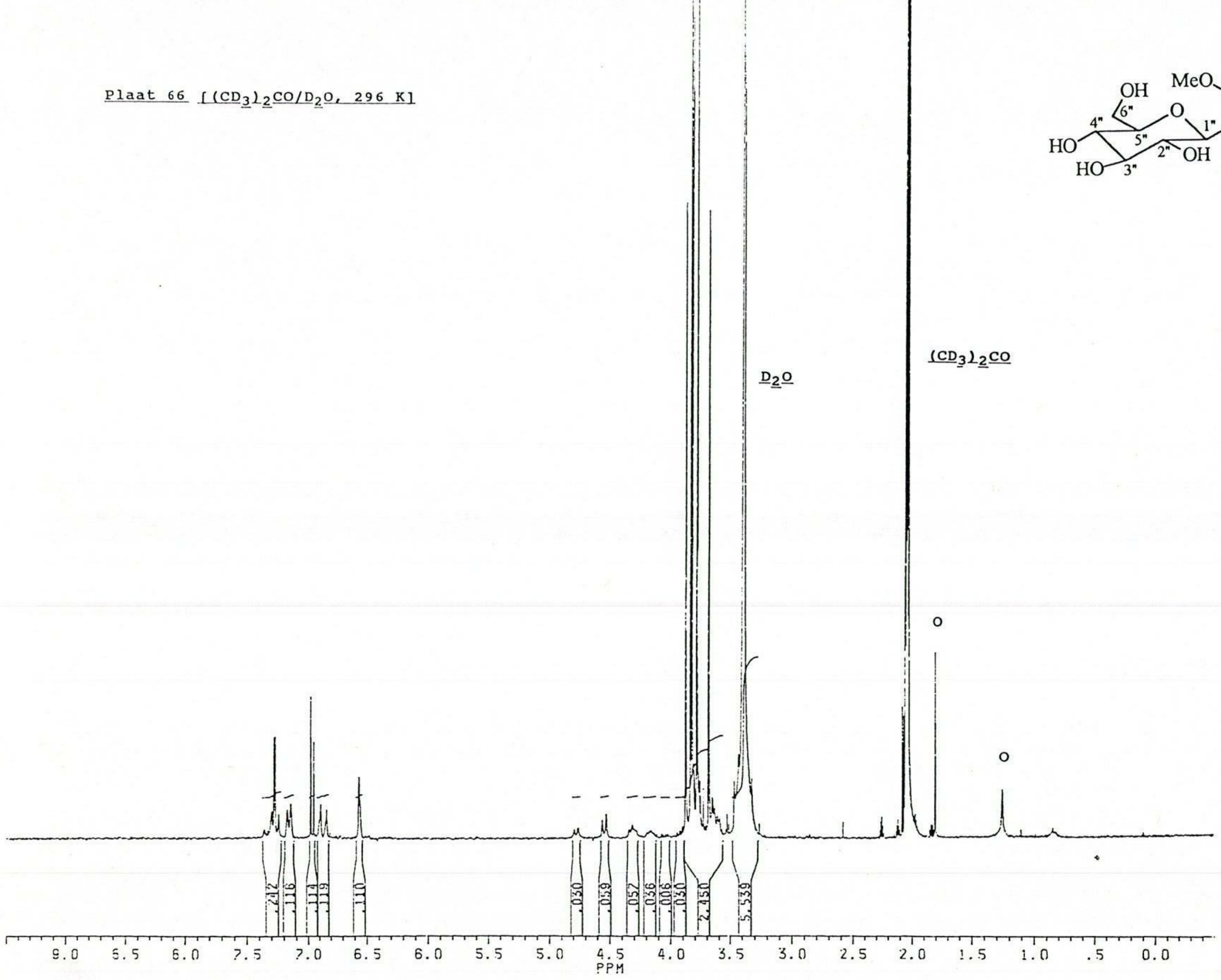
D2O

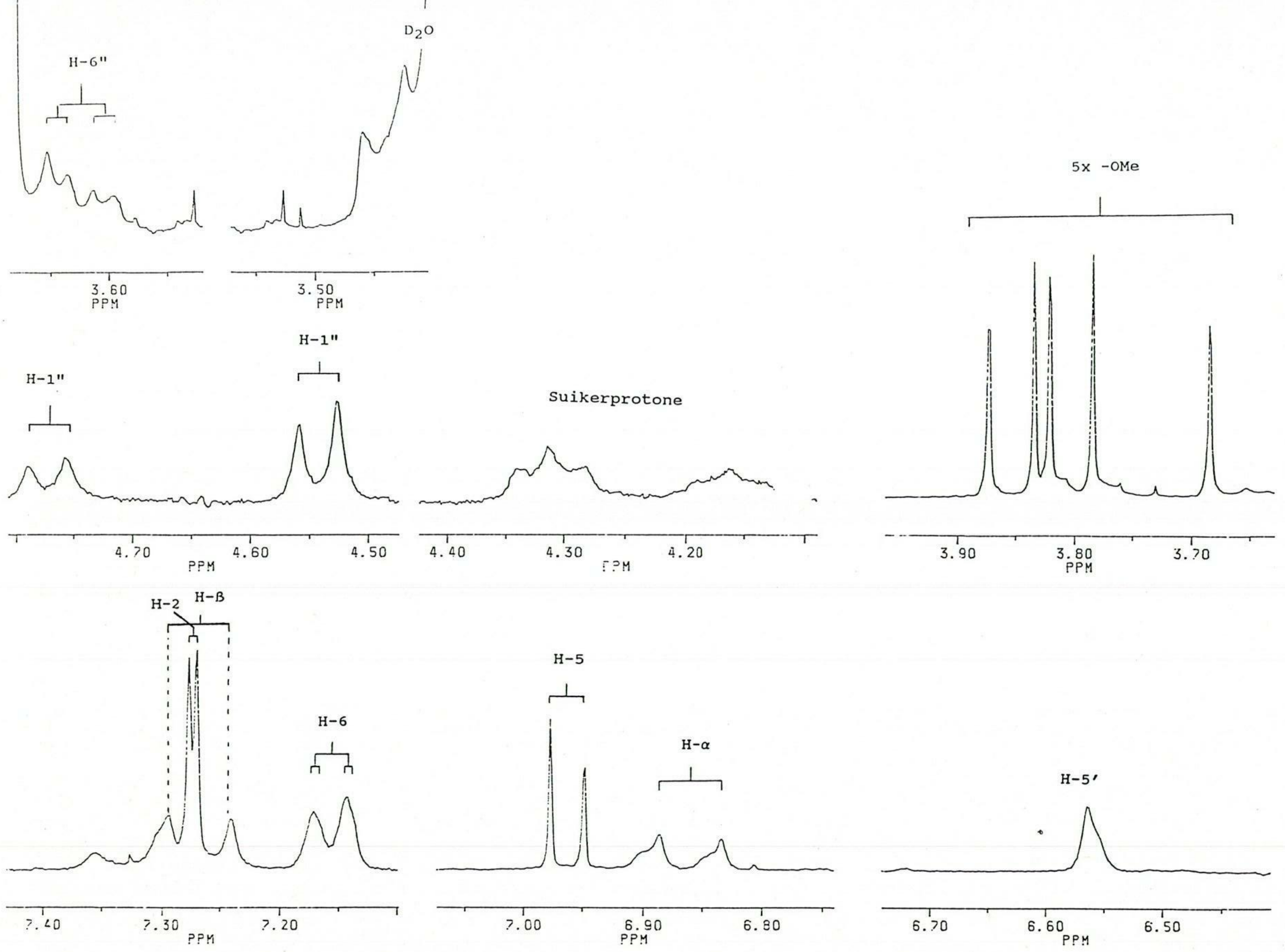


Plaat 66 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

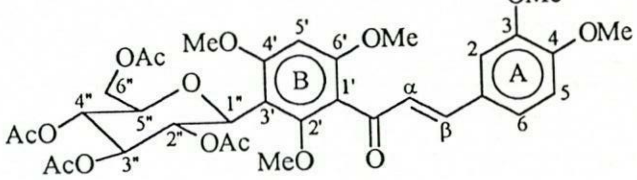


(154b)

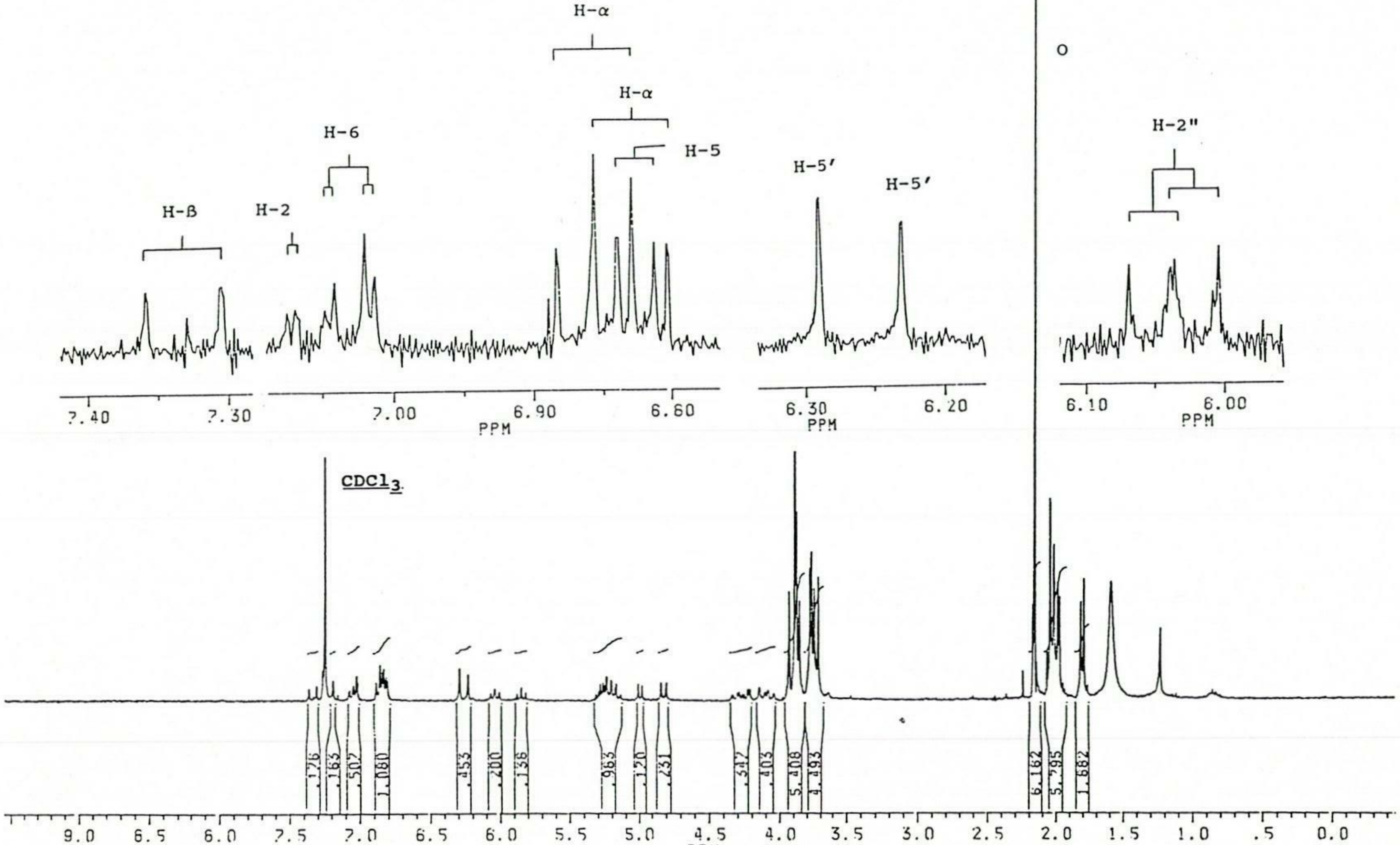


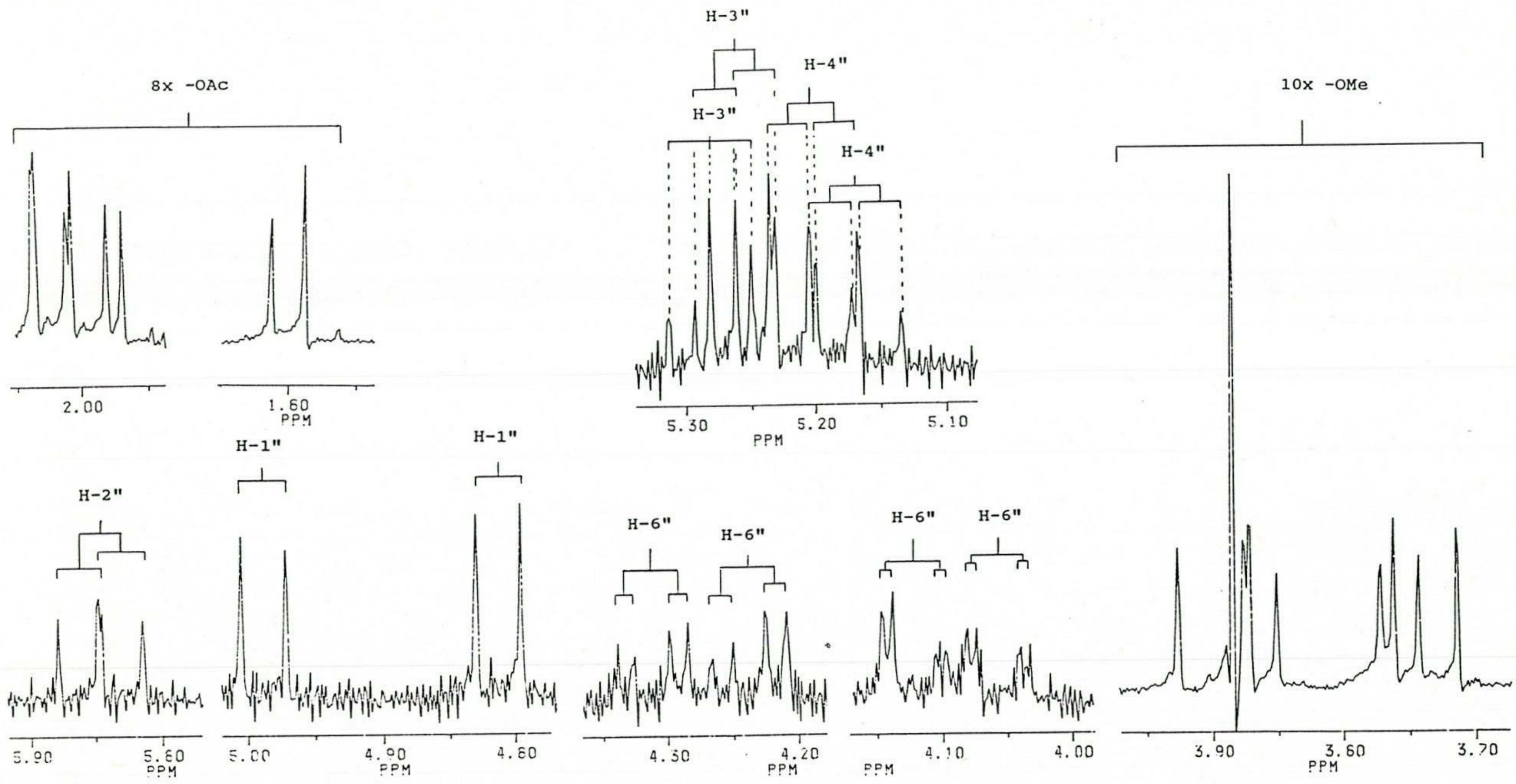

H-6"
D$_2$O
3.60 PPM
3.50 PPM
H-1"
H-1"
Suikerprotone
4.70
4.60
4.50
PPM
4.40
4.30
4.20
PPM
5x -OMe
3.90
3.80
3.70
PPM
H-2
H-β
H-6
7.40
7.30
7.20
PPM
H-5
H-α
7.00
6.90
6.80
PPM
H-5′
6.70
6.60
6.50
PPM

Plaat 67 [$CDCl_3$, 296 K]



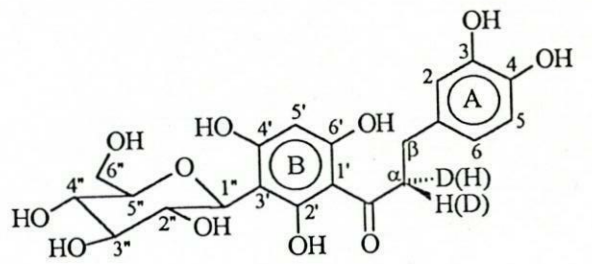
(154c)



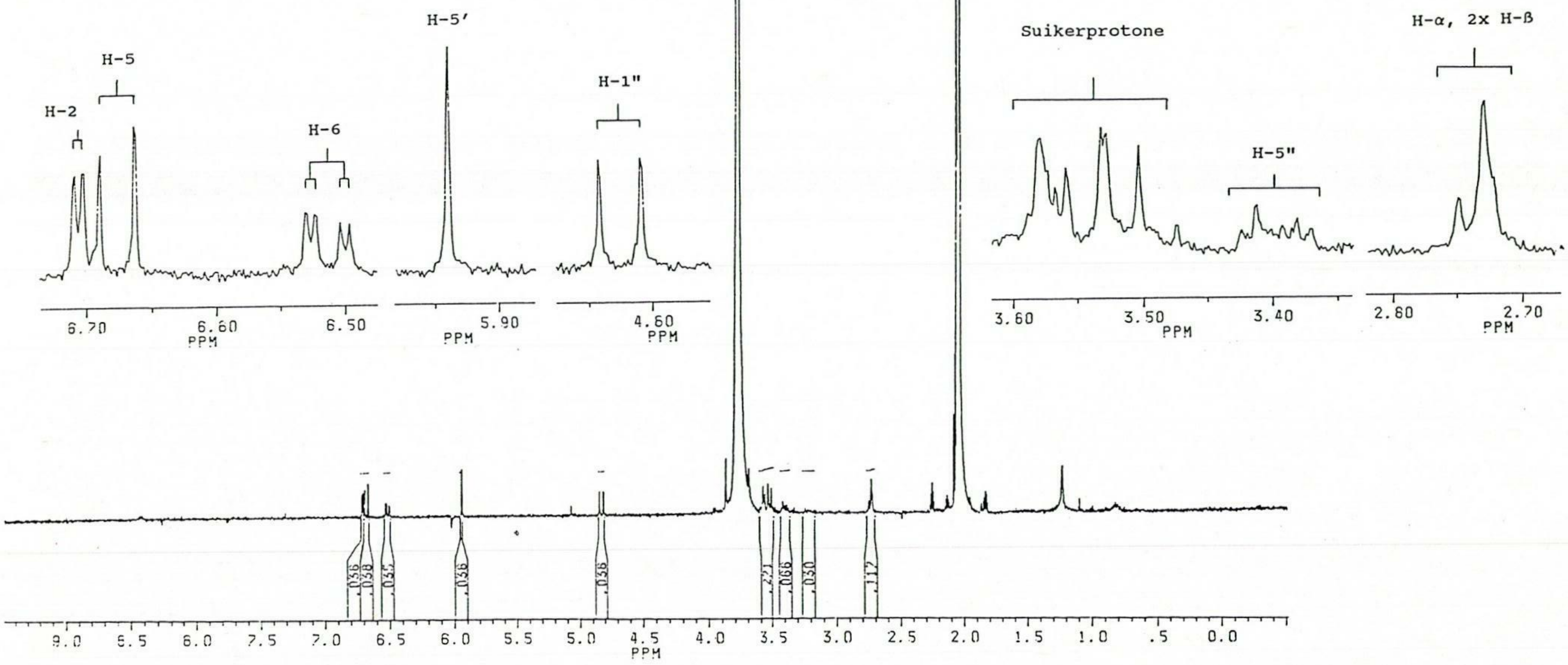


8x -OAc
2.00
1.60
PPM
H-3"
H-4"
H-3"
H-4"
5.30
5.20
5.10
PPM
10x -OMe
3.90
3.60
PPM
3.70
H-2"
5.90
5.80
PPM
H-1"
H-1"
5.00
4.90
PPM
4.80
H-6"
H-6"
4.30
4.20
PPM
H-6"
H-6"
PPM
4.10
4.00

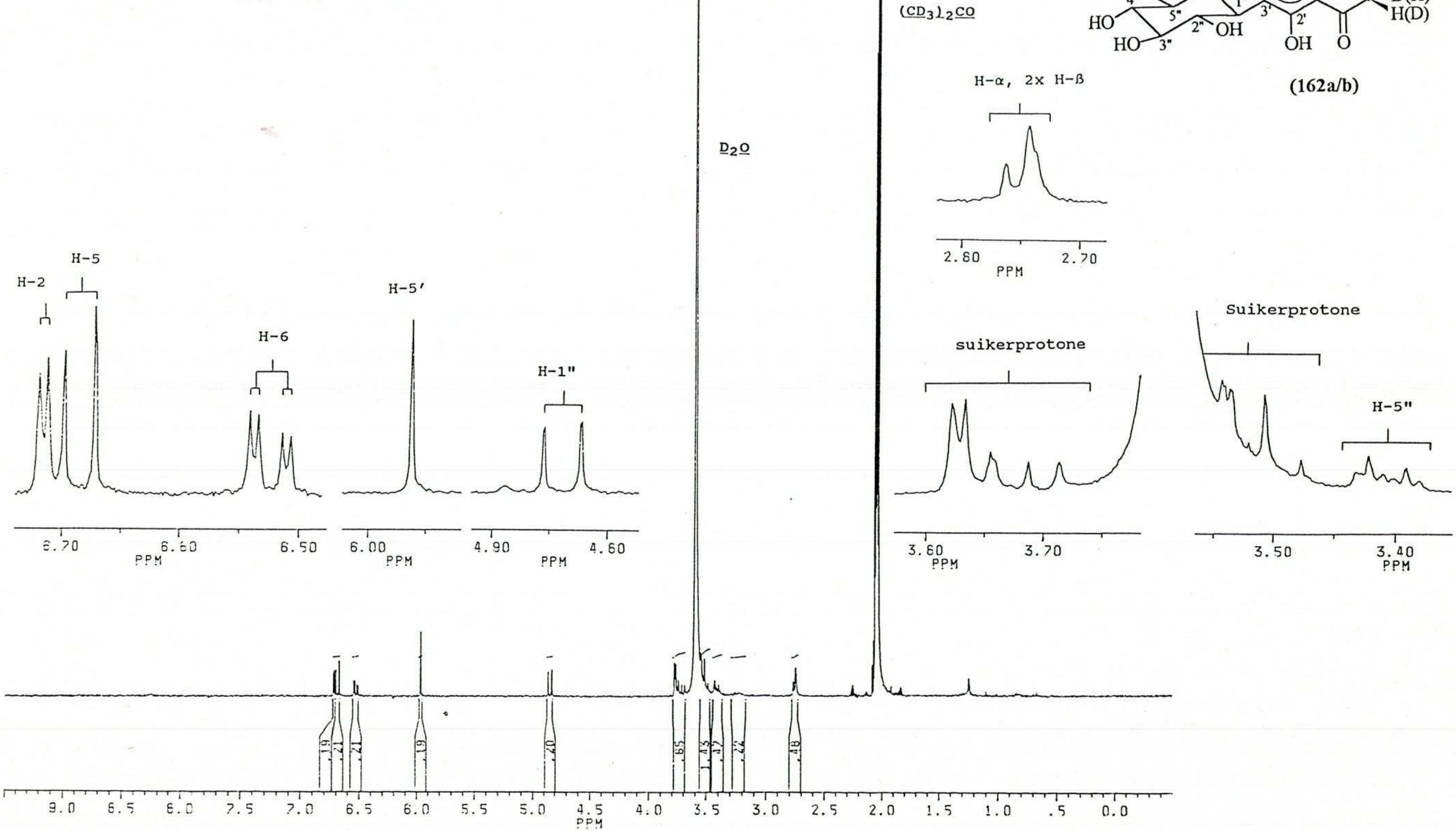
Plaat 68 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]

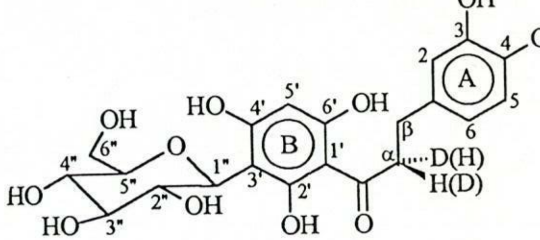


(162a/b)



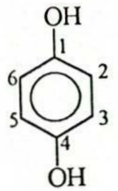
Plaat 69 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



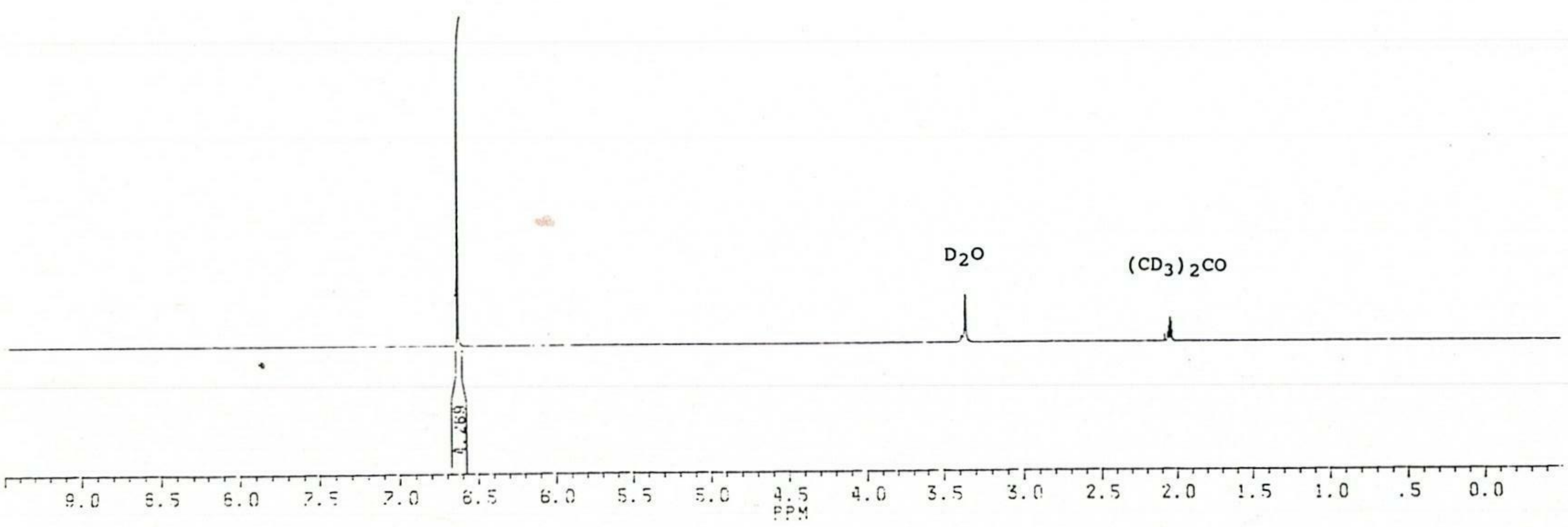


(162a/b)

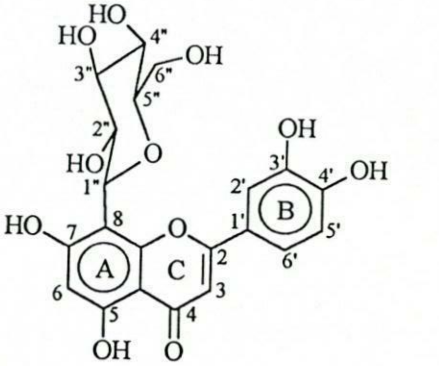
Plaat 70 [$(CD_3)_2CO/D_2O$, 296 K]



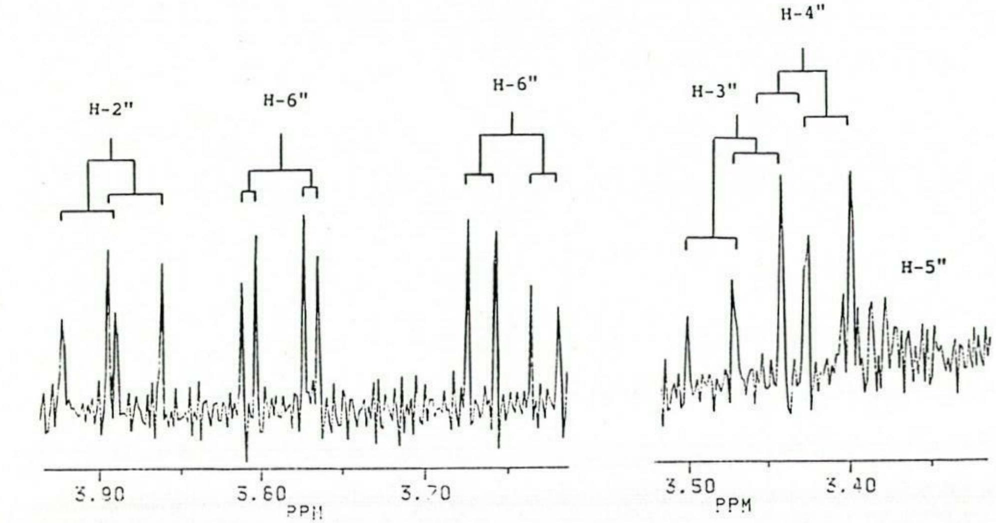
(176)

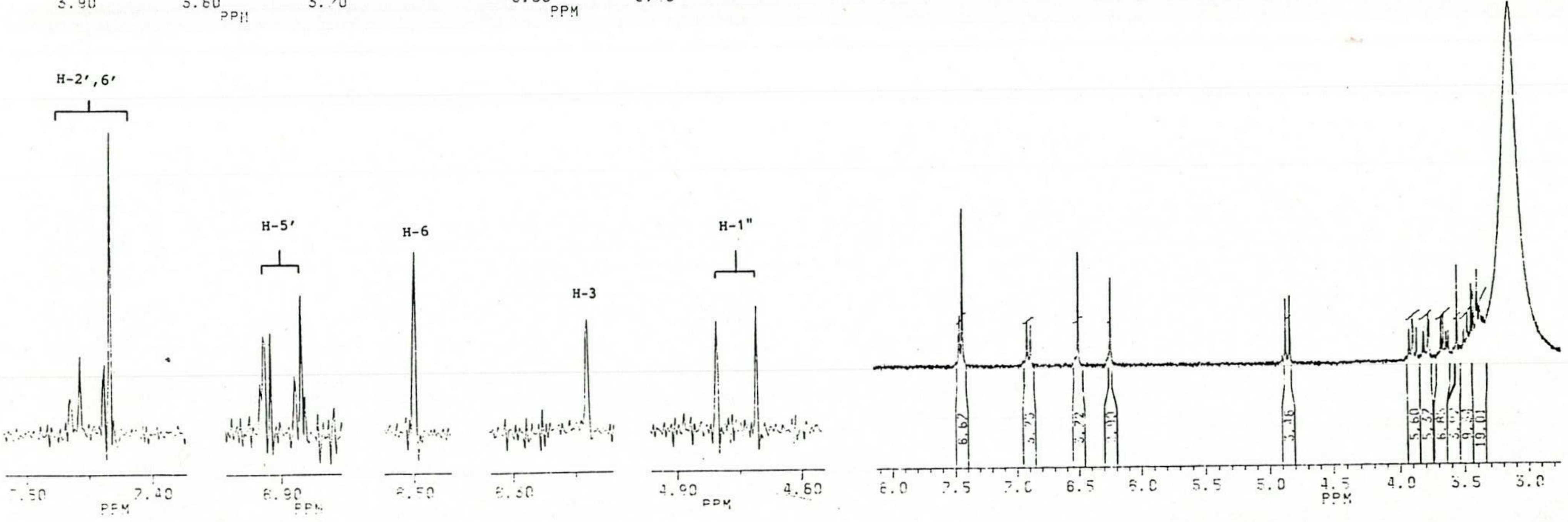


Plaat 71 [$(CD_3)_2SO$, 393 K]

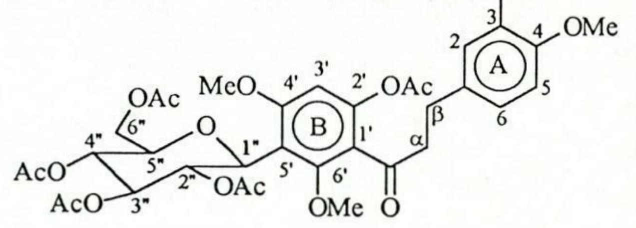


(39a)

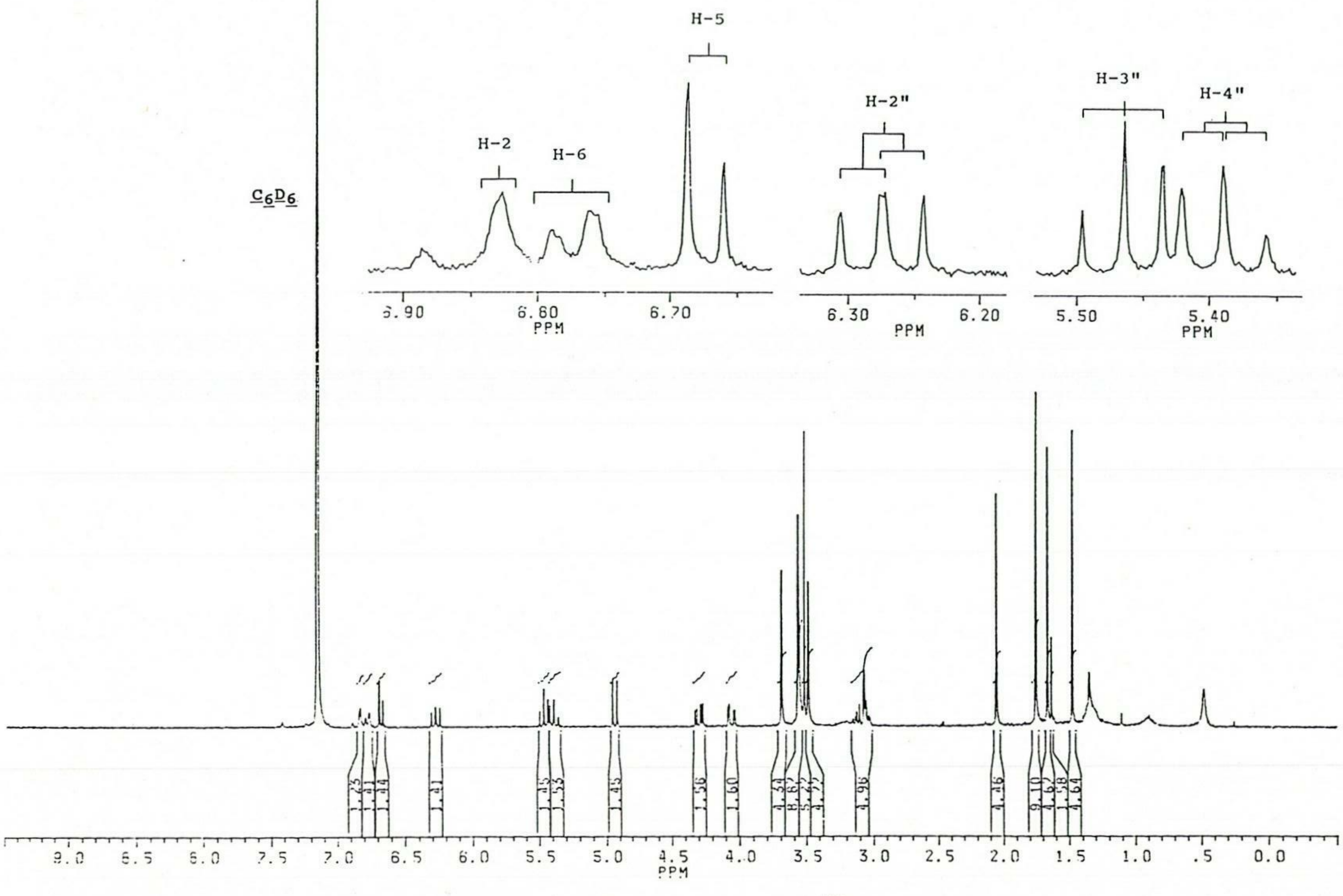


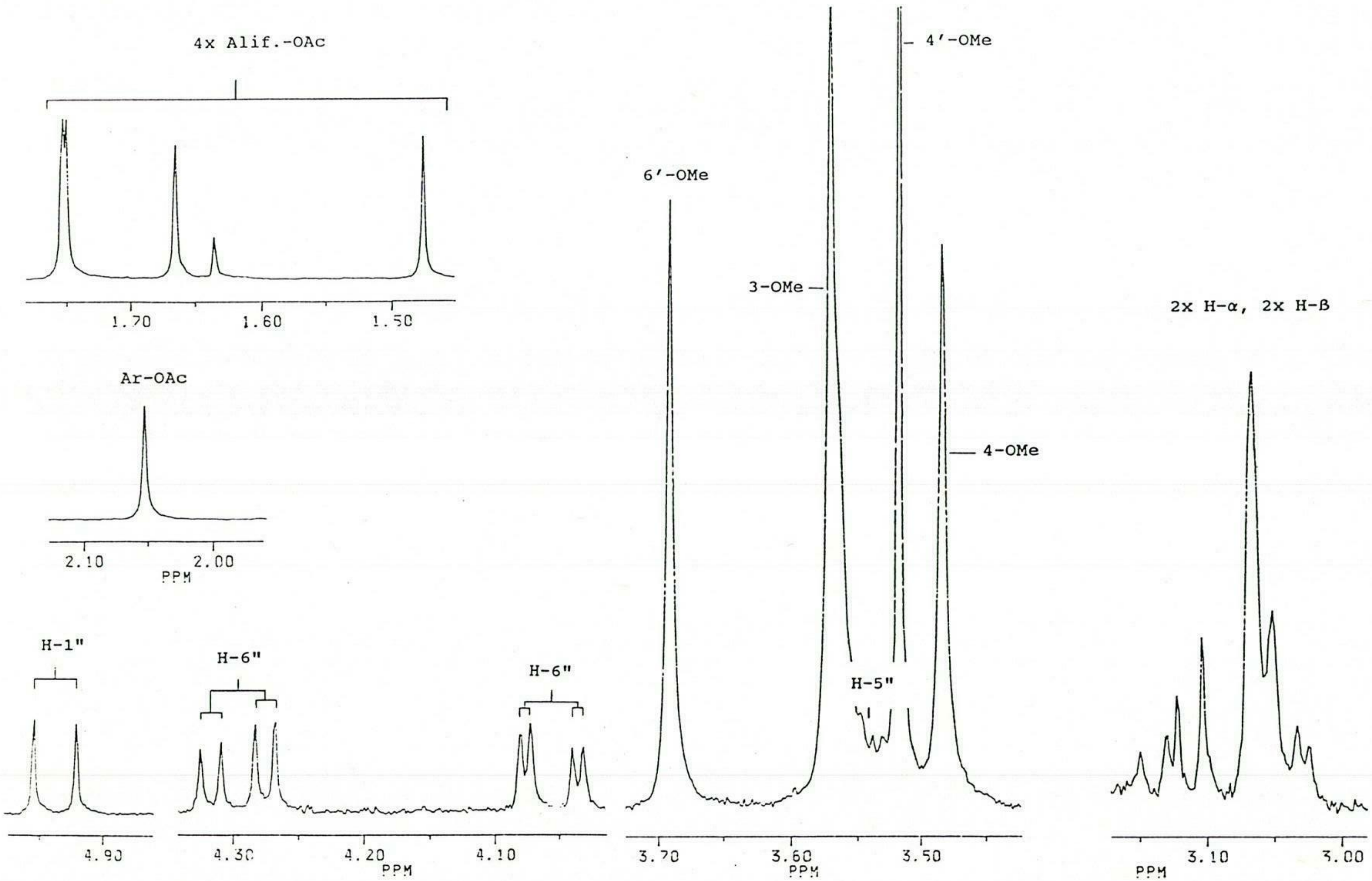


Plaat 72 [C_6D_6, 353 K]

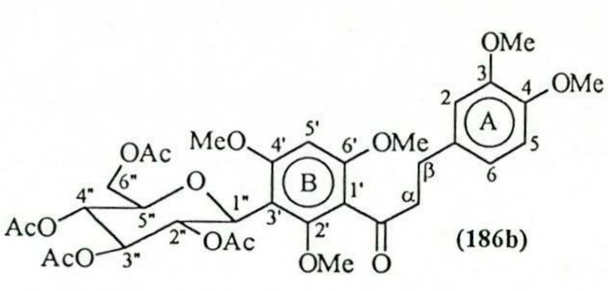


(187b)

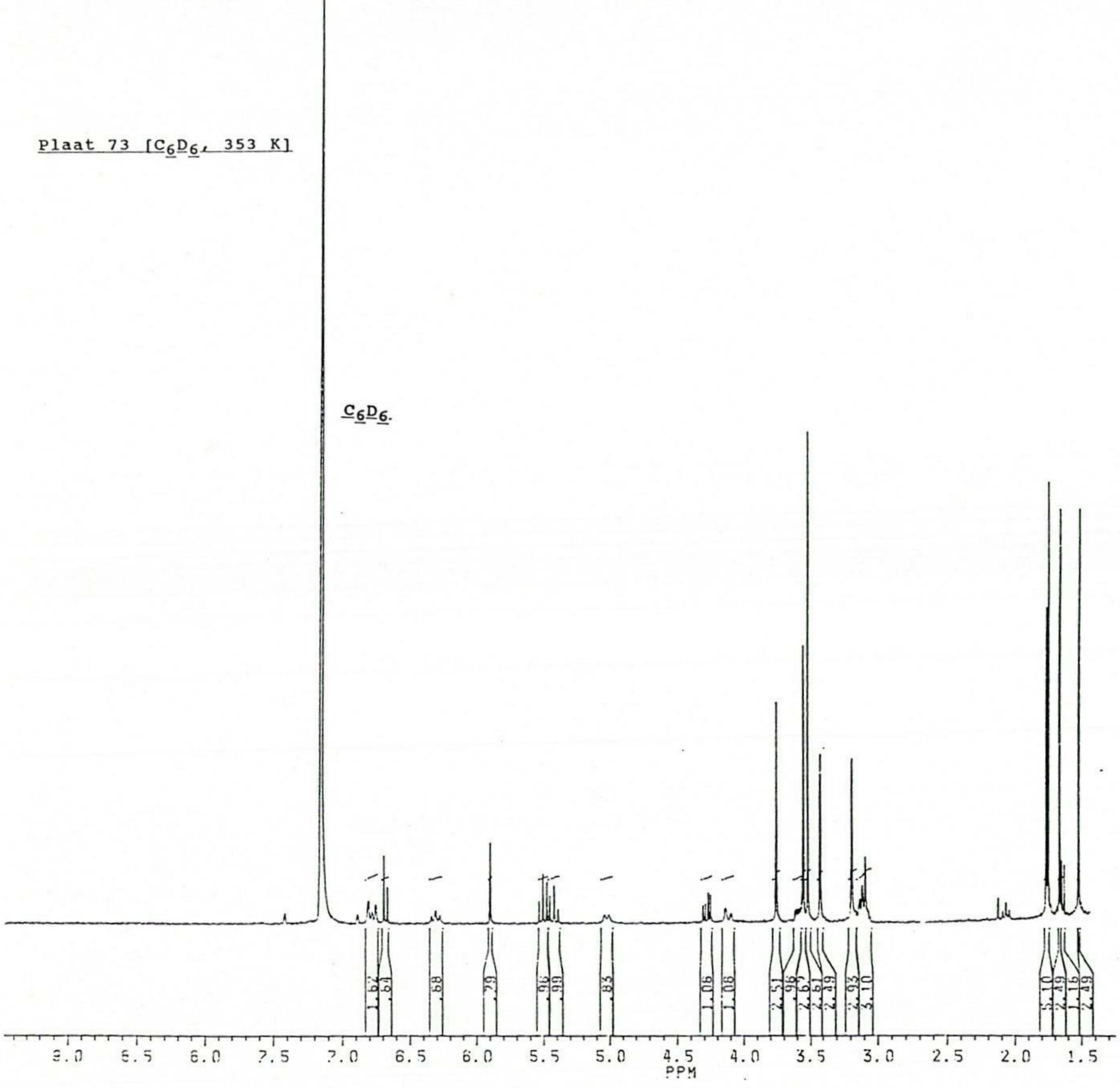


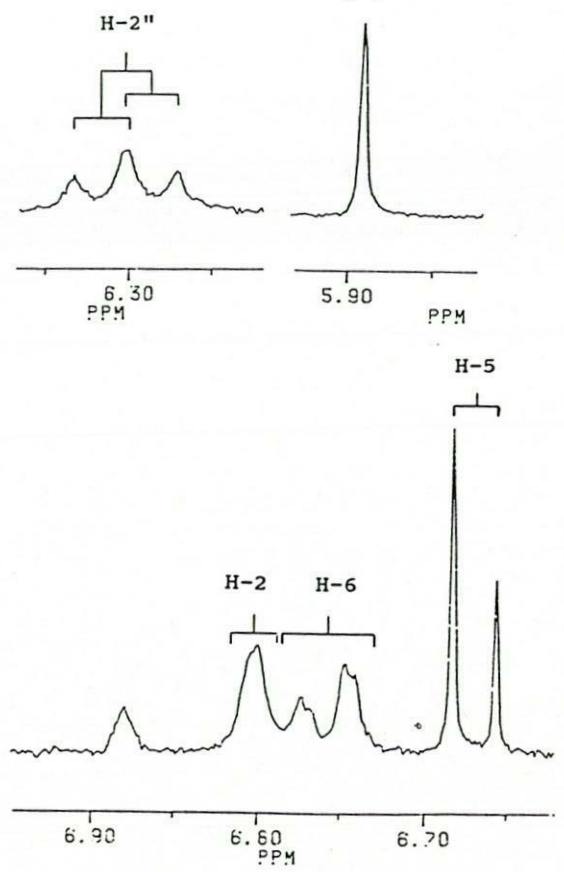

4x Alif.-OAc
1.70
1.60
1.50
Ar-OAc
2.10
2.00
PPM
6'-OMe
3-OMe
4'-OMe
4-OMe
H-5"
2x H-α, 2x H-β
H-1"
H-6"
H-6"
4.90
4.30
4.20
PPM
4.10
3.70
3.60
PPM
3.50
PPM
3.10
3.00

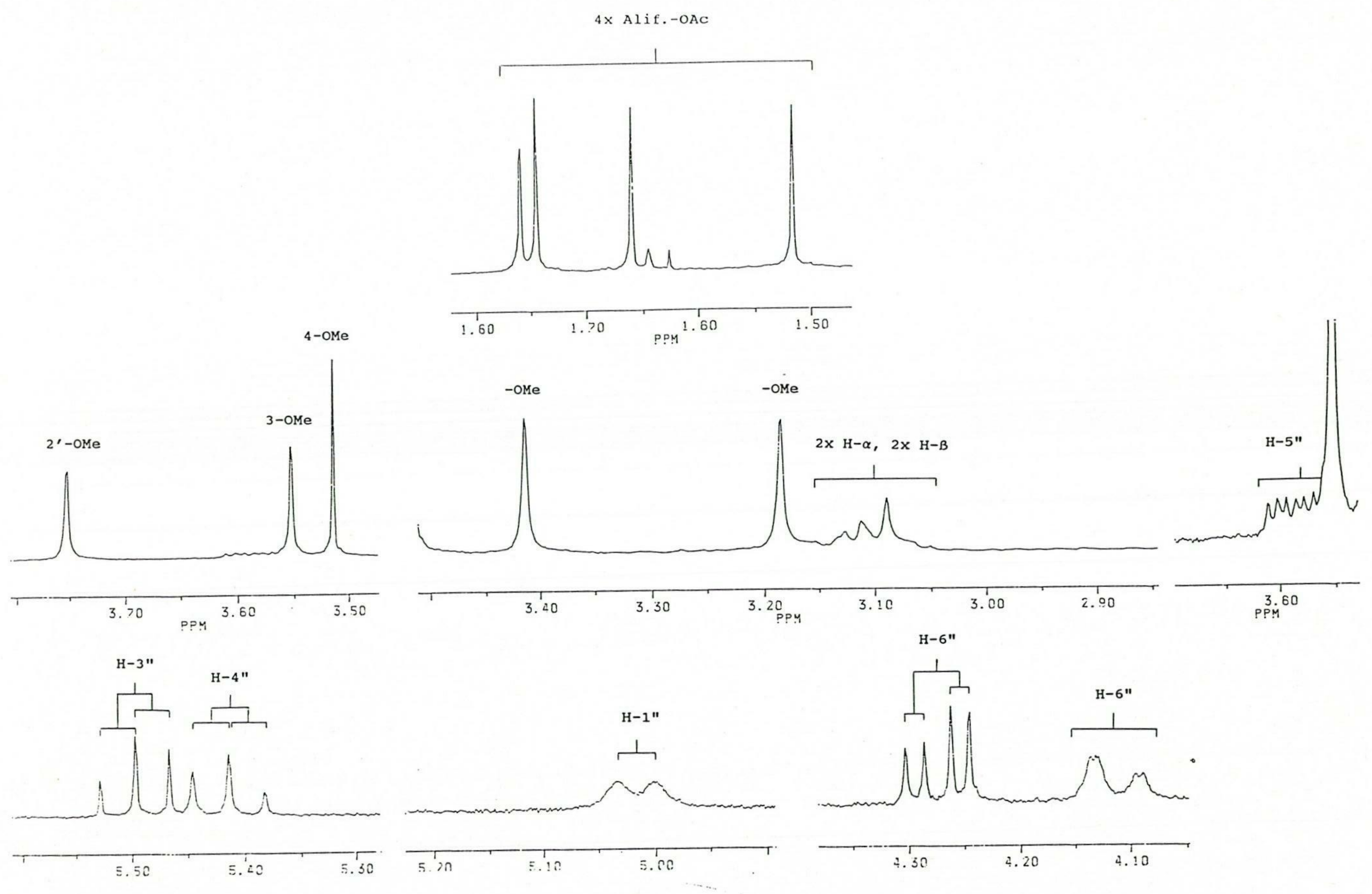
Plaat 73 [C_6D_6, 353 K]



(186b)






4x Alif.-OAc
1.60
1.70
1.60
1.50
PPM
4-OMe
3-OMe
2'-OMe
3.70
3.60
3.50
PPM
-OMe
-OMe
2x H-α, 2x H-β
3.40
3.30
3.20
3.10
3.00
2.90
PPM
H-5"
3.60
PPM
H-3"
H-4"
5.50
5.40
5.30
H-1"
5.20
5.10
5.00
H-6"
H-6"
4.30
4.20
4.10

BYLAE 2

KMR-TABELLE

Tabel 1. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m.) van (**68a**) en (**68b**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

H	(**68a**) D_2O	(**68b**) $(CD_3)_2CO$	(**68b**) C_6D_6
1	3.77 (m)	5.29 (m)	5.68 (dd, 8.0, 3.5)
6			5.67 (dd, 8.0, 3.0)
3	3.10 (t, 9.6)	3.69 (dd, 10.4, 9.5)	3.78 (dd, 10.0, 9.5)
4	3.41 (t, 9.6)	5.32 (dd, 11.0, 9.5)	5.86 (dd, 10.0, 9.5)
2	3.55 (m)	5.09 (dd, 10.4, 3.0)	5.61 (dd, 10.0, 3.5)
5		5.15 (dd, 11.0, 2.5)	5.56 (dd, 10.0, 3.0)
-OMe	3.36 (s)	3.44 (s)	3.31 (s)
-OAc		2.16, 2.15, 2.05, 2.00, 1.92, almal s	1.75, 1.70 (x2), 1.52, 1.39, almal s

Tabel 2. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m.) van (**92b**) en (**93a**) by 300 MHz. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**92b**) ($CDCl_3$) 363 K	(**93a**) $(CD_3)_2CO/D_2O$ 296K
A	5		6.54 (d, 8.5)
	6	⌉	6.20 (dd, 8.5 en 2.6)
	8	⌋ 6.03 (s)	6.33 (d, 2.6)
B	2		6.73 (d, 2.0)
	5		6.70 (d, 8.8)
	6		6.43 (dd, 8.8, 2.0)
C	2	4.65 (d, 10.0)	5.22 (br. s)
	3	5.79 (dd, 10.0, 9.0)	4.41-3.34 (br. t)
	4	4.79 (d, 9.0)	4.80 (br. d)
D	6	6.13 (s)	
E	2		6.71 (d, 2.0)
	5		6.40 (d, 8.0)
	6		6.46 (dd, 8.0, 2.0)
B,E		6.88-6.72 (6H, m)	
F	2	4.89 (d, 7.8)	4.48 (d, 7.5)
	3	5.10 (m)	3.95 (m)
	4_{ekw}	3.00 (dd, 6.0, 16.5)	2.79 (dd, 7.5, 17.0)
	4_{aks}	2.67 (dd, 7.8, 16.5)	2.52 (dd, 7.8, 17.0)
G	5		6.48 (d, 8.5)
	6		6.25 (dd, 8.5, 2.6)
	8		6.40 (d, 2.6)
H	2		6.72 (d, 2.0)
	5		6.68 (d, 8.3)
	6		6.56 (dd, 2.0, 8.3)
I	2		5.32 (br. d)
	3		3.38-4.34 (br. t)
	4		4.69 (br. d)
	-OMe	3.84, 3.83, 3.80, 3.78, 3.77 (x2), 3.70, 3.43, almal s	
	-OAc	1.89, 1.61, almal s	

Tabel 3. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van **(71)**, **(72b)**, **(73)**, **(74)**, **(75b)** en **(77b)** by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

H	**(71)** $(CD_3)_2CO$	**(72b)** $CDCl_3$	**(73)** $(CD_3)_2CO$	**(74)** $(CD_3)_2CO$	**(75b)** $CDCl_3$	**(77b)** $(CD_3)_2CO$
2		7.52 (d, 2.0)	7.55 (d, 2.1)			7.44 (d, 2.0)
5		6.87 (d, 8.5)	6.90 (d, 8.0)			7.09 (d, 8.5)
6		7.66 (dd, 2.0, 8.5)	7.58 (dd, 2.1, 8.0)			7.24 (dd, 2.0, 8.5)
3,5	6.89 (d, 8.9)				7.12 (d, 8.8)	
2,6	7.89 (d, 8.9)			7.33 (s)	7.55 (d, 8.8)	
-OH	3.47 (br.s)					
-COOH						3.37–3.08 (br.s)
-OMe		3.92, 3.91, 3.88, elk s	3.89 (s)	3.88 (x2) (s)		3.99 (s)
-OAc					2.30 (s)	2.42 (s)
α					6.39 (d, 16.0	6.54 (d, 16.4)
ß					7.74 (d, 16.0)	7.63 (d, 16.4)

Tabel 4. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**116b**), (**117b**), (**120b**) en (**122b**) by 300 MHz in $(CD_3)_2CO/D_2O$ by 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**116b**)	(**117b**)	(**120b**)	(**122b**)
Ar	2,6	7.86 (m)	7.31-7.19 (m)	7.80 (m)	7.27 (m)
	3,4,5	7.36 (m)		7.41 (m)	
	3	7.03 (s)	6.76 (s)	7.03 (s)	6.25 (s)
Gluk	1	5.56 (d, 8.0)	5.24 (d, 8.0)	6.03 (d, 8.0)	6.00 (d, 8.1)
	2	5.21 (dd, 8.0, 9.5)	5.09 (dd, 8.0, 9.8)	5.20 (dd, 8.0, 9.5)	5.01 (dd, 8.1, 10.0)
	3	5.37 (t, 9.5)	5.33 (dd, 9.8, 9.6)	5.46 (t, 9.5)	5.38 (dd, 10.0, 9.5)
	4	5.08 (dd, 9.5, 10.0)	5.06 (t, 9.6)	5.16 (dd, 9.5, 10.5)	5.08 (dd, 9.5, 10.0)
	5	3.96 (m)	4.13 (m)	4.21 (m)	4.16 (m)
	6	3.99 (dd, 2.5, 12.5)	4.15 (dd, 2.5, 12.5)	4.11 (dd, 2.2, 12.6)	4.11 (dd, 2.5, 12.0)
	6	4.12 (dd, 5.5, 12.5)	4.25 (dd, 5.8, 12.5)	4.31 (dd, 4.8, 12.6)	4.28 (dd, 4.5, 12.0)
	-OMe	3.83 (s)	3.63 (s)	3.77 (s)	3.75 (s)
	-OAc	2.01, 1.98, 1.96, 1.90, almal s	1.97 (x2) 1.93, 1.86, almal s	2.01, 2.00 (x2), 1.98, almal s	2.01, 2.00, 1.93, 1.91, almal s

Tabel 5. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**94c**) en (**94b**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**94c**) $CDCl_3$	(**94b**) C_6D_6	(**94b**) $(CD_3)_2CO$
Pirimidien	5	5.81 (d, 8.2)	5.29 (d, 8.5)	5.70 (d, 8.5)
	6	7.34 (d, 8.2)	6.74 (d, 8.5)	7.69 (d, 8.5)
	-NH			2.85 (br.s)
	-NMe	3.31 (s)		
Ribosiel	1	5.97 (d, 5.0)	5.99 (d, 5.0)	6.01 (d, 5.0)
	2	5.36 (dd, 5.0, 6.0)	5.36 (dd, 5.0, 6.0)	5.50 (dd, 5.0, 6.0)
	3	5.31 (dd, 6.0, 5.0)	5.29 (dd, 6.0, 4.5)	5.41 (dd, 6.0, 5.0)
	4	4.35-4.32 (m)	3.90 (ddt, 3.0, 4.5, 4.5)	4.39-4.30 (m)
	5		4.06 (dd, 4.5, 12.0)	
	5		3.99 (dd, 3.0, 12.0)	
	-OAc	2.12, 2.10 (x2), almal s	1.58, 1.57, 1.56, almal s	2.08 (x2), 2.05, almal s

Tabel 6. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**82b**) en (**38c**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**82b**) C_6D_6	(**82b**) $CDCl_3$	(**38c**) $CDCl_3$
A	6	6.31 (d, 2.1)	6.44 (d, 2.3)	6.86 (d, 2.0)
	8	6.65 (d, 2.1)	6.64 (d, 2.3)	7.46 (d, 2.0)
B	2	7.24 (d, 2.5)	7.29 (d, 2.0)	7.71 (d, 2.0)
	5	6.48 (d, 8.4)	6.95 (d, 8.5)	7.47 (d, 8.0)
	6	7.32 (dd, 2.5, 8.4)	7.49 (dd, 2.0, 8.5)	7.75 (dd, 8.0, 2.0)
C	3	6.73 (s)	6.60 (s)	6.62 (s)
Gluk	1	4.91 (d, 8.0)	5.37-5.11 (m)	
	2	5.57 (dd, 8.0, 9.5)		
	3	5.44 (t, 9.5)		
	4	5.24 (dd, 9.5, 10.0)		
	5	3.20 (m)	4.00 (m)	
	6	4.11 (dd, 5.2, 13.0)	4.27 (dd, 5.2, 12.2)	
	6	4.00 (dd, 2.5, 13.0)	4.19 (dd, 2.8, 12.2)	
	-OMe	3.39, 3.35, 3.28, almal s	3.96, 3.95, 3.94, almal s	
	-OAc	1.74, 1.71, 1.67, 1.54, almal s	2.07, 2.05, 2.04, 2.02, almal s	2.45, 2.36 (x2), 2.34, almal s

Tabel 7. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**39b**), (**40b**), (**83b**), (**84b**) en (**85b**) by 300 MHz. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**39b**) $(CD_3)_2SO$ 411 K	(**40b**) $CDCl_3$ 296 K	(**83b**) $CDCl_3$ 296 K	(**84b**) $CDCl_3$ 296 K	(**85b**) $CDCl_3$ 296 K
A	6	6.54 (s)		6.38, 6.33 (s)		
	8		6.58 (s)		6.76, 6.71 (s)	6.63 (s)
B	2,6			7.98, 7.75 (d, 8.9)	7.80 (d, 9.0)	
	3,5			7.12, 7.07 (d, 8.9)	6.99 (d, 9.0)	
	2	7.52 (d, 2.0)	7.30, 7.29 (d, 2.0)			
	5	7.19 (d, 9.0)	6.95 (d, 9.0)			
	6	7.67 (dd, 2.0, 9.0)	7.48 (dd, 2.0, 9.0)			
C	2					7.64 (d, 6.0)
	3	6.60 (s)	6.76 (s)	6.59, 6.55 (s)	6.57, 6.49 (s)	6.18 (d, 6.0)
Gluk	1	5.31 (d, 10.0)	5.10 (d, 10.2)	5.22, 5.24, 5.25 (d, 10.1)	5.10 (d, 10.5)	5.07 (d, 10.2)
	2	5.78 (dd, 10.2, 9.5)	6.07, 5.90 (dd, 10.2, 9.0)	5.99, 5.87 (dd, 10.1, 9.2)	6.01, 5.88[a] (dd, 10.5, 9.0)	5.98 (dd, 10.2, 8.5)
	3	5.36 (t, 9.5)	5.32 (t, 9.0)	5.39, 5.36 (t, 9.2)	5.32 (dd, 9.0, 9.5)	5.30 (dd, 8.5, 10.0)
	4	5.22 (dd, 9.5, 8.0)	5.18 (dd, 9.0, 10.2)	5.51 (dd, 9.2, 10.0)	5.18 (dd, 9.5, 10.2)	5.16 (dd, 10.0, 9.8)
	5	4.04 (m)	3.83 (m)	3.85 (m)	3.83 (m)	3.80 (m)
	6	4.16 (m)	4.20 (dd, 12.6, 6.0)	4.12-4.33 (m)	4.20 (dd, 5.5, 12.0)	4.19 (dd, 5.6, 12.8)
	6		4.12 (dd, 2.2, 12.6)		4.11 (dd, 2.5, 12.0)	4.10 (dd, 2.4, 12.8)
	-OMe	3.99, 3.95, 3.93, 3.91, almal s	4.00, 3.96, 3.94, 3.89, almal s	4.00, 3.98, (x2), 3.95, 3.90, 3.89, almal s	3.99, 3.89, 3.87 (x2), almal s	3.94, 3.85, albei s

	-OAc	2.05, 1.93, 1.86, 1.66, almal s	2.06, 2.03, 2.01, 1.75, almal s	2.08 (x2), 2.03,(x2), 1.96, 1.91, 1.70, 1.68, almal s	2.05, 2.03, 2.01, 1.75, almal s	2.05, 2.02, 2.01, 1.74, almal s

a. Swak gedefinieer.

Tabel 8. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**37a**), (**38a**) en (**81**) in $(CD_3)_2CO$ by 300 MHz en 296 K. Multplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**37a**)	(**38a**)	(**81**)
A	6	6.24 (d, 2.1)	6.23 (d, 2.1)	6.25 (d, 2.1)
	8	6.51 (d, 2.1)	6.51 (d, 2.1)	6.54 (d, 2.1)
	5-OH[a]			
B	2	7.81 (d, 2.1)	7.49 (d, 2.1)	7.63 (d, 2.2)
	5	6.97 (d, 8.5)	6.98 (d, 8.0)	7.00 (d, 8.5)
	6	7.68 (dd, 2.1, 8.5)	7.46 (dd, 2.1, 8.0)	7.60 (dd, 2.2, 8.5)
C	3		6.57 (s)	6.70 (s)
	-OMe			3.99 (s)

a. Weens die grootte van die spektrumvenster is die chemiese verskuiwing van 5-OH onbekend.

Tabel 9. [1]H KMR-pieke van (**160a**), (**43a**) en (**183**) by 300 MHz en 296 K in $(CD_3)_2CO/D_2O$. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**160a**)	(**43a**)	(**183**)
A	2		6.74 (d, 2.1)	6.75 (d, 2.0)
	6	7.08 (d, 8.5)	6.57 (dd, 2.1, 8.0)	6.56 (dd, 2.0, 8.0)
	3	6.73 (d, 8.5)		
	5		6.71 (d, 8.0)	6.71 (d, 8.0)
B	5	5.93 (s)	5.91 (s)	5.95 (s)
Gluk	1	4.91 (d, 9.6)	4.92 (d, 10.0)	4.96 (d, 10.0)
	2	3.62 (dd, 9.6, 8.8)	3.64 (dd, 10.0, 8.5)	3.93 (dd, 10.0, 8.5)
	3	3.52 (dd, 8.8, 9.4)	3.52 (t, 8.5)	3.60 (dd, 8.5, 9.8)
	4	3.64 (dd, 9.4, 9.3)	3.62 (dd, 8.5, 10.0)	3.79 (dd, 9.8, 9.6)
	5	3.46 (m)	3.49 (m)	3.40 (m)
	6			3.90 (dd, 6.0, 10.5)
	6	3.83[a]	3.84[a]	3.82 (dd, 5.5, 10.5)
	α	3.31 (2H, t, 8.0)[b]	3.30 (2H, t, 8.0)[b]	3.30 (2H, t, 8.0)[b]
	β	2.85 (2H, t, 8.0)[b]	2.81 (2H, t, 8.0)[b]	2.79 (2H, t, 8.0)[b]
	$-CH_3$			1.49, 1.33 (s)

a. Multiplisiteit nie toekenbaar nie.
b. Swak gedefinieerd.

Tabel 10. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**43c**) en (**160b**) by 300 MHz in $CDCl_3$. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**43c**) 296 K	(**160b**) 353 K
A	2	7.08-7.10[a]	7.20 (d, 8.6)
	6		
	5		7.01 (d, 8.6)
	3		
B	5	6.59 (s)	6.94 (s)
Gluk	1	4.67 (br.)[a]	4.62 (d, 10.0)
	2	5.36-5.17[a]	5.61 (dd, 10.0, 9.5)
	3		5.21 (t, 9.5)
	4		5.10 (dd, 9.5, 9.8)
	5	3.83[a]	3.70 (m)
	6	4.30 (dd, 3.0, 12.5)	4.32 (dd, 4.8, 12.5)
	6	4.09 (br. dd)	4.03 (dd, 2.5, 12.5)
	α	5.40 (t, 8.0)	5.51 (t, 7.8)
	β	3.34 (2H, d, 8.0)	3.38 (2H, d, 7.8)
	-OAc	2.14, 2.12, 2.10 (x2), 2.05, 2.03 (x2), 1.99 (x2), 1.85, almal s	2.31, 2.23, 2.18, 2.12, 2.08, 2.07, 2.02, 2.00, 1.97, almal s

a. Nie definieerbaar nie.

Tabel 11. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**91a**), (**91b**) en (**91c**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**91a**)	(**91b**)	(**91c**)
A	6	5.87 (d, 2.5)	6.11 (d, 2.4)	6.12 (s)
	8	6.10 (d, 2.5)	6.14 (d, 2.4)	
B	2	6.88 (d, 2.2)	6.97 (d, 2.2)	6.89 (d, 2.2)
	5	6.79 (d, 8.0)	6.90 (d, 8.6)	6.75 (d, 8.5)
	6	6.74 (dd, 2.2, 8.0)	7.00 (dd, 2.2, 8.6)	6.88 (dd, 2.2, 8.5)
C	2	4.55 (d, 7.8)	4.66 (d, 8.4)	4.87 (d, 9.2)
	3	3.97 (m)	4.07 (m)	5.60 (m)
	4_{ekw}	2.90 (dd, 5.8, 16.0)	3.08 (dd, 5.8, 16.2)	3.20 (dd, 6.0, 16.5)
	4_{aks}	2.51 (dd, 8.0, 16.0)	2.59 (dd, 9.5, 16.2)	2.80 (dd, 9.0, 16.5)
	-OMe		3.89 (x2), 3.80, 3.76, almal s	3.88, 3.80, 3.78, 3.75, almal s
	MTPA			
	-OMe			3.40 (3H, m)
	Ar-H			7.35-7.12 (m)

Tabel 12. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**125**), (**127**), (**128**) en (**129**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**125**) $(CD_3)_2CO$	(**127**) $CDCl_3$	(**128**) $(CD_3)_2SO$	(**129**) $(CD_3)_2CO$
A	2,6		8.05 (m)	7.60 (m)	7.82 (m)
	3,5		7.41 (m)	7.38 (m)	7.36 (m)
	4				7.25 (m)
	2	3.90 (2H, d, 6.0)	2.39 (s)		
	3			7.20 (br.s)	6.53 (s)
	-COOH	3.00 (br. s)		3.55 (br.s)	8.02 (br.s)
	-NH			9.46 (br.s)	
	$-NCOCH_3$	1.92 (s)		1.97 (br.s)	
	$-CH_3$	2.83 (s)	2.40 (s)		

Tabel 13. ^{1}H KMR-pieke van (**131**), (**132**) en (**135**) by 300 MHz in $CDCl_3$ by 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

H	(**131**)	(**132**)	(**135**)[a]
1α	6.29 (d, 4.0)	6.58 (d, 4.0)	6.60 (s)
2α	5.06 (dd, 4.0, 10.5)	4.81 (dd, 4.0, 10.0)	
3α	5.44 (dd, 10.5, 9.8)	5.53 (dd, 10.0, 9.5)	5.52 (d, 4.2)
4α	5.22 (t, 9.8)	5.13 (dd, 9.5, 10.0)	5.19 (dd, 4.2, 5.5)
1β	5.68 (d, 8.0)		
2β-4β	5.09 (m)		
5	3.81 (m)	4.10 (m)	4.33 (m)
5	⌉ 4.07 (3H, m)		
6	⌋		4.39 (dd, 7.0, 11.6)
6	4.25 (2H, m)	4.29 (2H, m)	4.18 (dd, 3.0, 11.6)
-OAc	1.98 (x2), 1.99, 2.00 (x2), 2.01, 2.05, 2.06, 2.08, 2.15, almal s	2.01, 2.03, 2.08 (x2), almal s	2.06 (x3), 2.02, almal s

a. α- en ß-Notasie nie van toepassing nie.

Tabel 14. ¹H KMR-pieke (d.p.m) van (**136**), (**137b**), (**138**) en (**139**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**136**) $CDCl_3$	(**137b**) $(CD_3)_2CO/D_2O$	(**138**) $CDCl_3$	(**139**) $(CD_3)_2CO/D_2O$
A	2,6	7.67 (m)		7.76 (m)	7.79 (m)
	3,5	7.44 (m) (3,5 en 4)		7.36 (m)	7.37 (m) (3,5 en 4)
	4			7.27 (m)	
	Ar-H	7.12 (m) 6.82 (m)	7.60, 7.51, 7.16, 6.87, almal m		
	3			6.53 (s)	6.94 (s)
	-CH_2	3.67 (d, 15.0) 3.57 (d, 15.0)	3.59 (d, 14.5) 3.47 (d, 14.5)		
	-OMe	3.77 (s)	3.81, 3.73, elk s	3.91 (s)	3.80, 3.77, elk s

Tabel 15. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m.) van (**88a**) en (**156a**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**88a**) $(CD_3)_2CO/D_2O$	(**88a**) $(CD_3)_2CO$	(**88a**) CD_3CD_2OD	(**88a**), (**156a**) $(CD_3)_2CO/D_2O$
A	8	5.95 (s)	5.92 (br. s)	6.02 (s)	5.93 (s)
	5-OH	-	12.70	-	-
	6				6.03 (s)
B	2	6.97[a]	7.15 (br. d))	6.93 (d, 2.0)	6.99[a]
	5	6.77-6.82[a] (5, 6)	6.85[a] (5, 6)	6.80 (d, 8.4)	6.82[a] (5, 6)
	6			6.74 (dd, 8.4, 2.0)	
C	2	5.33, 5.31 (dd, 3.0, 12.0)	5.39, 5.38 (dd, 3.0, 12.0)	5.26 (dd, 3.5, 12.5)	5.34, 5.32 (dd, 3.0,12.5)
	3*cis*	2.70, 2.68 (dd, 3.0, 17.5)	2.75, 2.72 (dd, 3.0, 17.2)	2.73 (dd, 3.5, 17.0)	2.70, 2.68, 2.67 (dd, 3.0, 17.5)
	3*trans*	3.10 (dd, 12.8, 17.5)	3.14, 3.13 (dd, 17.2,12.0)	3.03, 3.02 (dd, 17.0, 12.5)	3.09 (dd, 12.5, 17.5)
Glc	1	4.75 (d, 10.0)	4.85 (d, 9.6)	4.79 (d, 10.0)	4.86, 4.77 (d, 10.0)
	2	4.00, 3.99 (dd, 10.0, 8.9)	3.72 (dd, 9.6, 8.5)	4.11 (br. dd)	3.95 (br. dd)
	3	3.54, 3.49 (t, 8.9)	3.60 (dd, 8.5, 9.5)	3.48[a] (3, 4)	3.80-3.50[b] (3–6)
	4	3.54, 3.50 (dd, 8.9, 9.9)	3.51 (dd, 9.5, 8.0)		
	5	3.37 (m)	3.45 (m)	3.38 (m)	
	6	3.75, 3.70[a]	3.81[a]	3.84 (br. dd) 3.71 (br. dd)	

a. Multiplisiteit nie-toekenbaar.
b. Nie definieerbaar.

Tabel 16. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**39a**) en (**40a**) by 300 MHz. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**39a**) $(CD_3)_2SO$ 393 K	(**40a**) $(CD_3)_2CO/D_2O$ 296 K
A	6	6.50 (s)	6.54 (s)
	8		
B	2'	⌉ 7.45[a]	7.47 (d, 2.2)
	6'		7.43 (dd, 2.2, 8.1)
	5'	6.90 (d, 8.9)	6.97 (d, 8.1)
C	3	6.24 (s)	6.59 (s)
Gluk	1	4.85 (d, 9.8)	4.91 (d, 10.0)
	2	3.89 (dd, 9.8, 8.7)	3.91 (dd, 10.0, 9.0)
	3	3.47 (dd, 8.7, 8.0)	3.59 (t, 9.0)
	4	3.43 (dd, 8.0, 9.0)	3.53 (t, 9.0)
	5	3.37 (m)	3.45 (m)
	6	3.79 (dd, 2.7, 11.5)	⌉ 3.79[a]
	6	3.65 (dd, 11.5, 5.0)	

a. Multiplisiteit nie toekenbaar nie.

Tabel 17. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**154b**) en (**154c**) by 300 MHz en 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**154b**) $(CD_3)_2CO/D_2O$	(**154c**) $CDCl_3$
A	2	7.27 (d, 2.0)	7.07 (d, 2.0)
	5	6.96 (d, 8.5)	6.82 (d, 8.5)
	6	7.16 (br. dd)	7.03 (dd, 2.0, 8.5)
B	5	6.56 (br. s)	6.29, 6.23, albei s
Gluk	1	4.77, 4.54 (br. d, 10.5)	4.99, 4.81 (d, 10.5)
	2		6.03, 5.84 (dd, 10.5, 9.5)
	3		5.28 (t, 9.5), 5.26 (dd, 9.5, 9.5)
	4		5.20, 5.17 (dd, 9.5, 11.5)
	5		*[a]
	6	3.63 (dd, 5.5, 12.0)	4.31 (dd, 4.5, 12.5), 4.24 (dd, 5.0, 12.5)
	6		4.12, 4.06 (dd, 2.5, 12.5)
	Suiker	4.31 (m), 4.16 (m)[b]	
	α	6.86 (d, 16.0)	6.86, 6.83 (d, 16.5)
	ß	7.27 (d, 16.0)	7.33 (d, 16.5)
	-OMe	3.87, 3.83, 3.82, 3.78, 3.69, almal s	3.93, 3.99 (x2), 3.88, 3.87, 3.85, 3.77, 3.76, 3.74, 3.72, almal s
	-OAc		2.04 (x2), 2.01 (x2), 1.98, 1.97, 1.81, 1.79, almal s

a. Nie waarneembaar nie.
b. Nie onderskeibaar nie.

Tabel 18. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**162a**) en (**162b**) by 300 MHz in $(CD_3)_2CO/D_2O$ by 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**162a/b**)	(**162b/a**)
A	2	6.70 (d, 2.0)	6.71 (d, 2.0)
	5	6.68 (d, 8.0)	6.68 (d, 8.0)
	6	6.51 (dd, 2.0, 8.0)	6.52 (dd, 2.0, 8.0)
B	5	5.94 (s)	5.96 (s)
Gluk	1	4.83 (d, 10.0)	4.84 (d, 9.8)
	Suiker	3.60-3.46[a]	3.78-3.47[a]
	5	3.40 (m)	3.41 (m)
	α,β	2.74 (3H, m)	2.75 (3H, m)

a. Nie onderskeibaar nie.

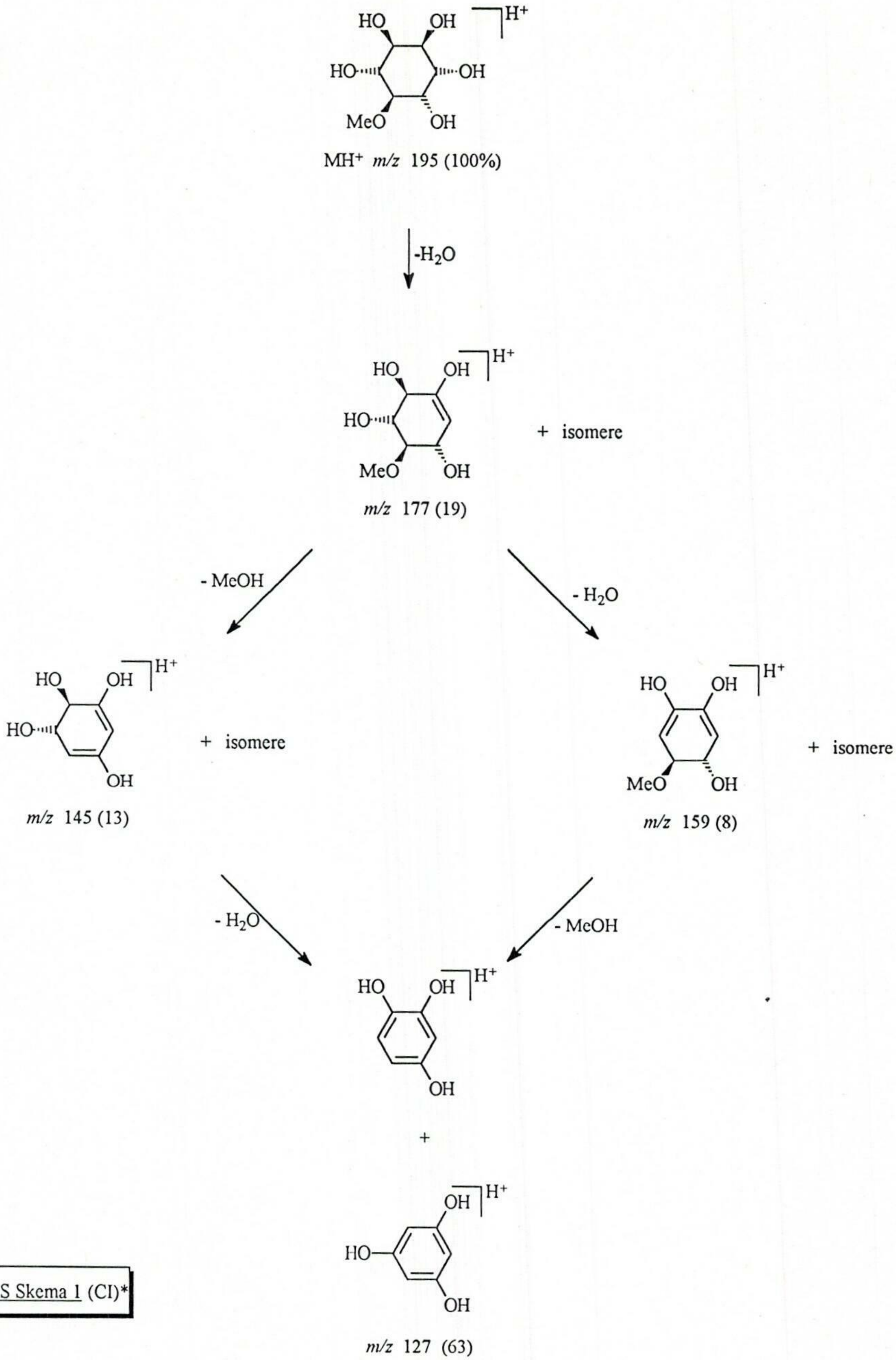
Tabel 19. ^{1}H KMR-pieke (d.p.m) van (**186b**) en (**187b**) by 300 MHz in C_6D_6 by 353 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies.

Ring	H	(**187b**)	(**186b**)
A	2	6.83 (br. d)	6.80 (br.d)
	5	6.67 (d, 8.5)	6.67 (d, 8.5)
	6	6.78 (br. dd)	6.76 (br. dd)
B	3	*[a]	5.89 (s)
Gluk	1	4.94 (d, 10.0)	5.02 (br. d)
	2	6.27 (dd, 10.0, 9.0)	6.30 (br. dd)
	3	5.46 (t, 9.0)	5.50 (dd, 9.5, 9.0)
	4	5.39 (dd, 9.0, 9.5)	5.41 (dd, 9.0, 10.0)
	5	3.54 (m)	3.58 (m)
	6	4.30 (dd, 4.5, 12.5)	4.28 (dd, 5.2, 12.5)
	6	4.06 (dd, 2.5, 12.5)	4.12 (br. dd)
	α,β	3.08 (4H, m)	3.10 (4H, m)
	2'-OMe		3.75 (s)
	3-OMe	3.70 (s)	3.55 (s)
	4'-OMe	3.52 (s)	
	4 -OMe	3.48 (s)	3.51 (s)
	6'-OMe	3.69 (s)	
	-OMe		3.41, 3.19, elk s
	Ar-OAc	2.05 (s)	
	Alif. -OAc	1.75 (x2), 1.66, 1.48, almal s	1.76, 1.74, 1.66, 1.52, almal s

a. Uitgeruil met deuterium.

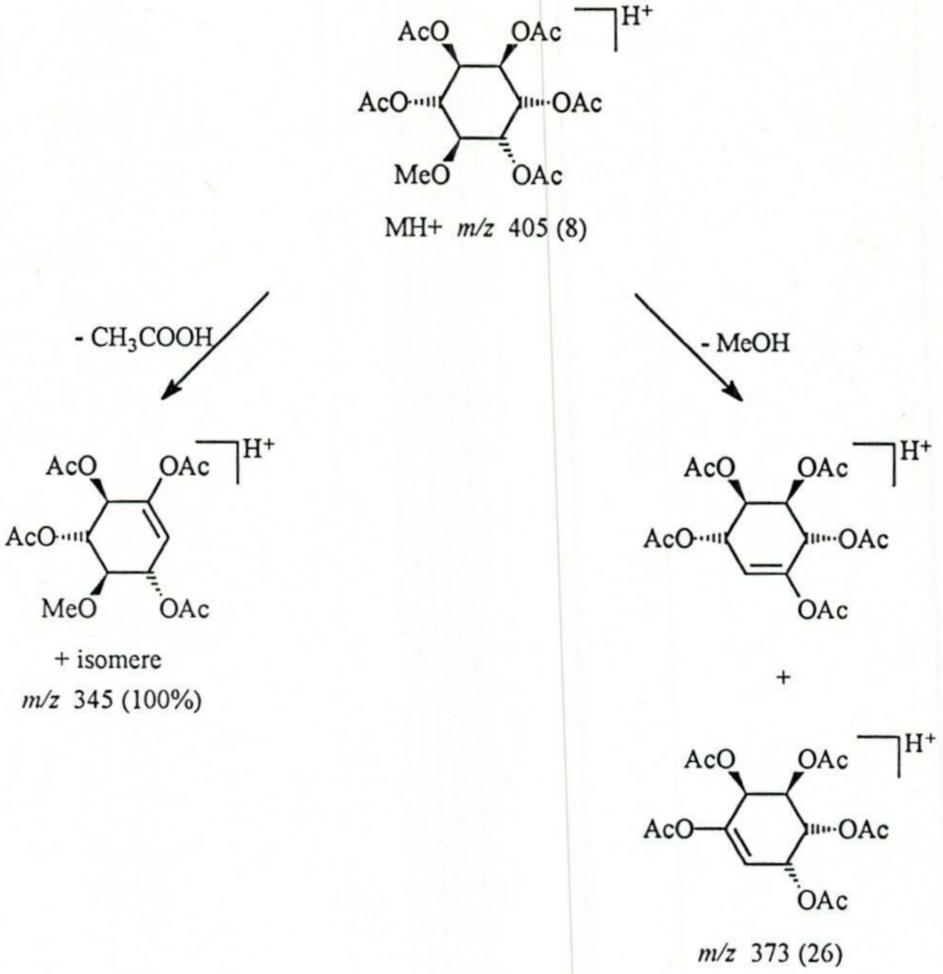
BYLAE 3

MS SKEMA'S

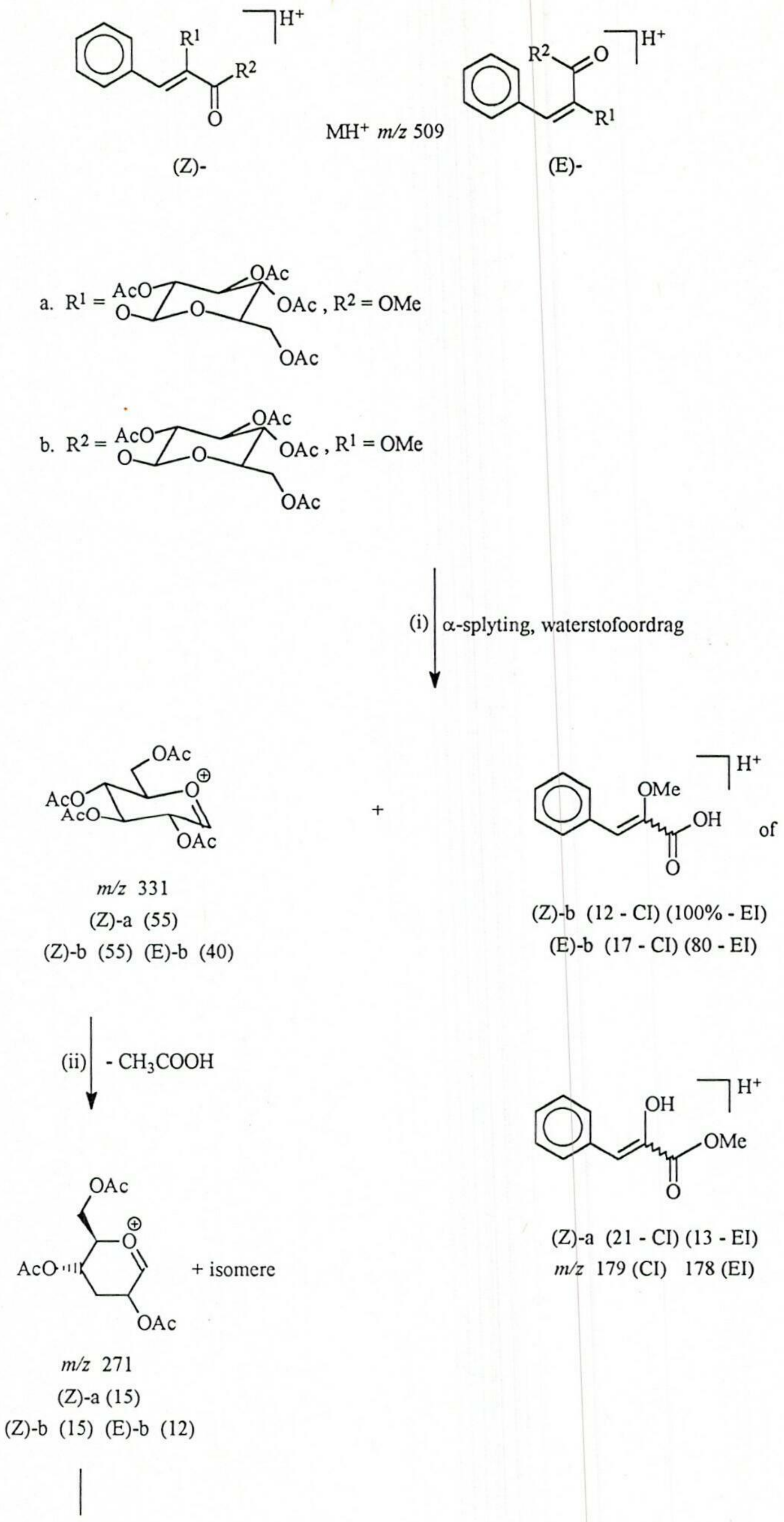


MS Skema 1 (CI)*

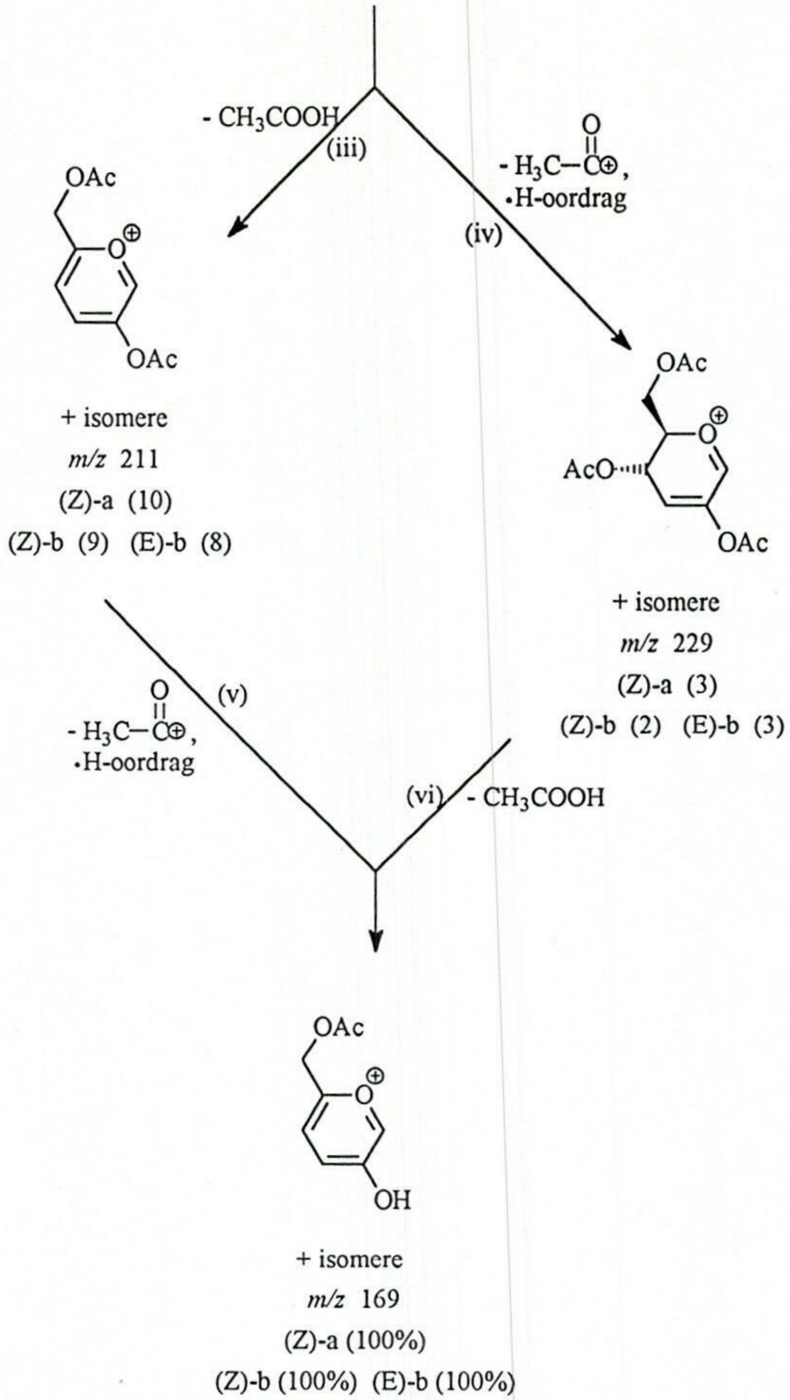
*Sekere fragmente is geprotoneer



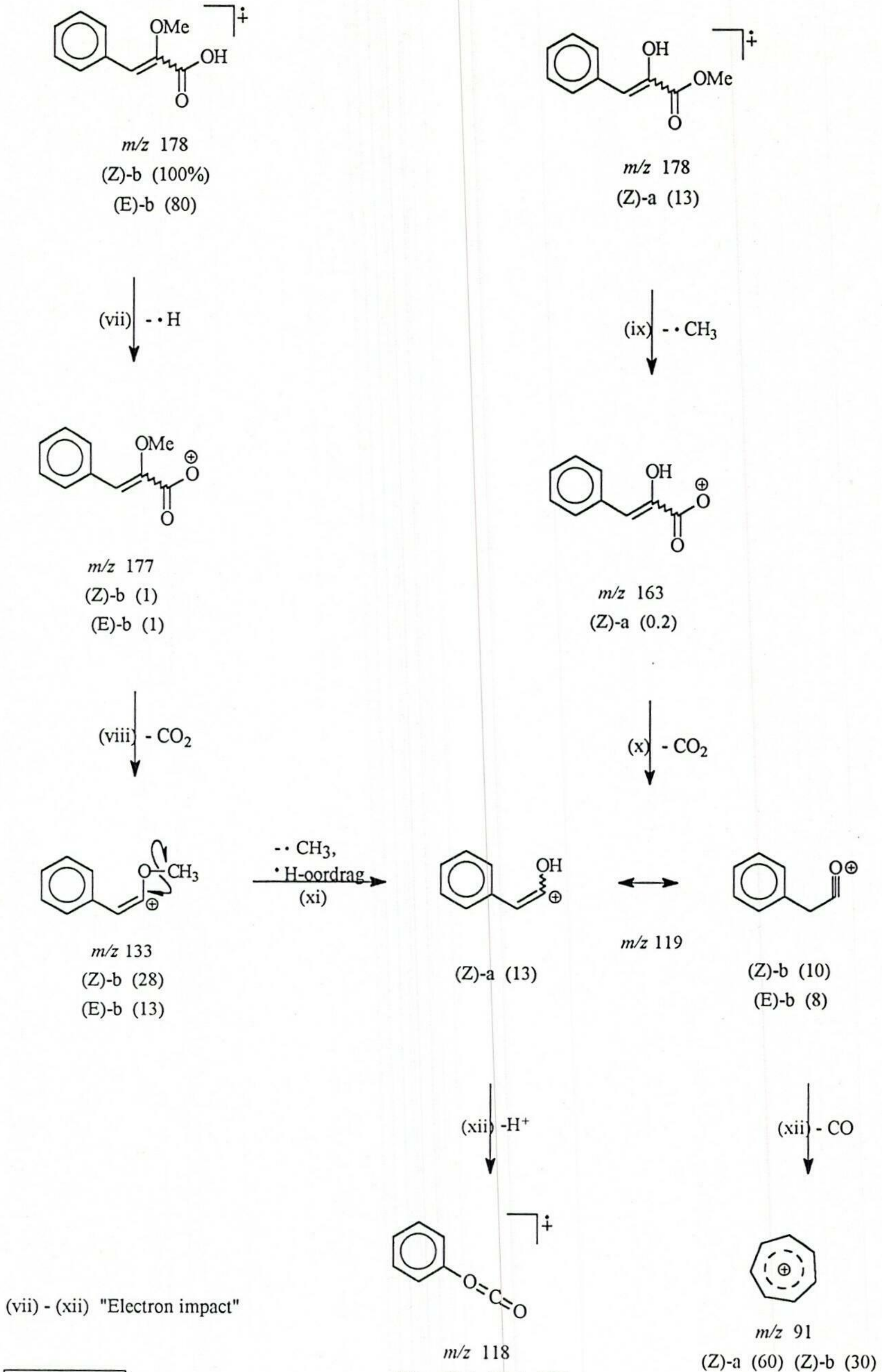
MS Skema 2 (CI)



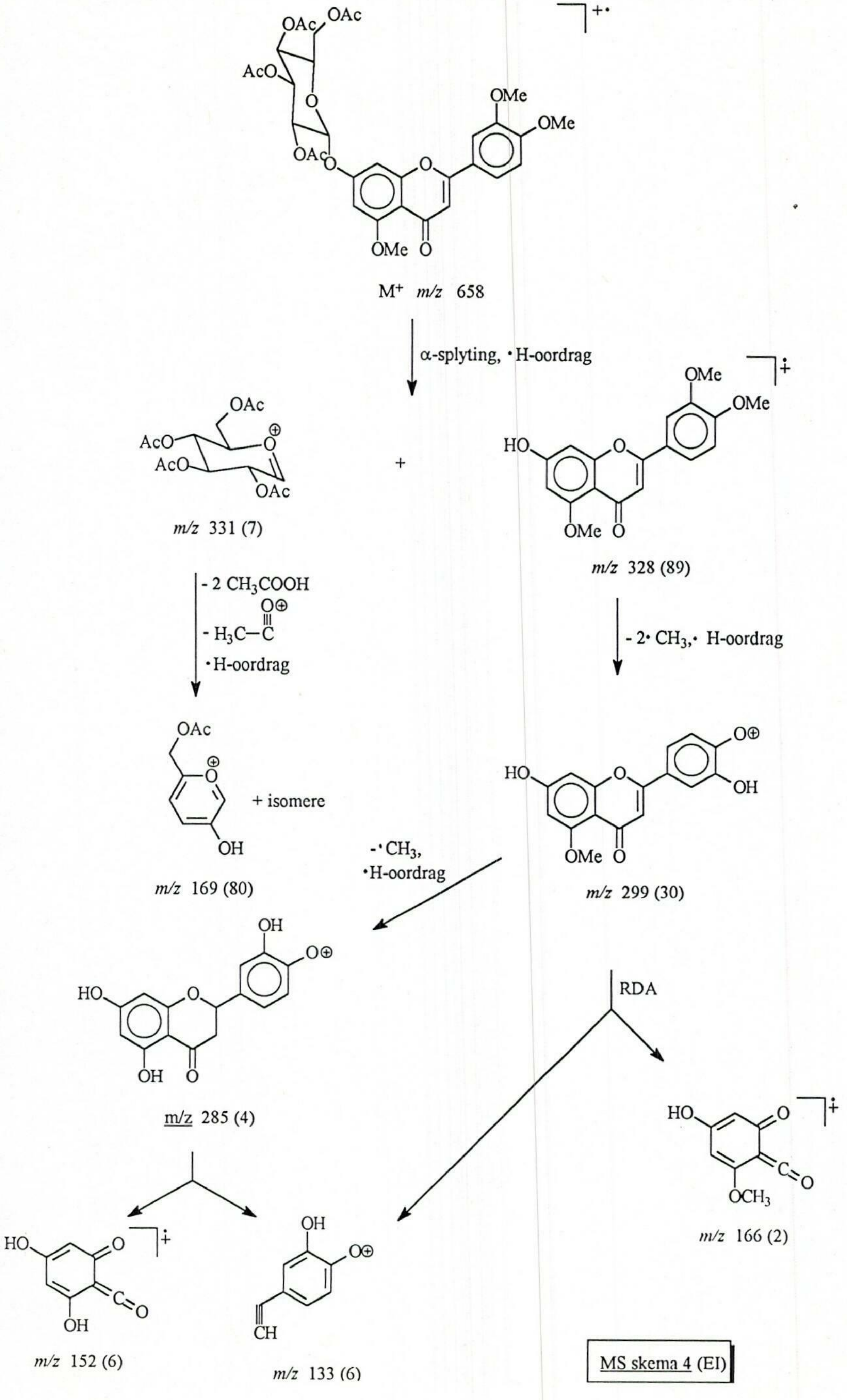
H+
MH+ m/z 509
(Z)-
(E)-
a. R1 = AcO O O OAc OAc OAc, R2 = OMe
b. R2 = AcO O O OAc OAc OAc, R1 = OMe
(i) α-splyting, waterstofoordrag
OAc
AcO
AcO
OAc
+
OMe
OH
of
m/z 331
(Z)-a (55)
(Z)-b (55) (E)-b (40)
(Z)-b (12 - CI) (100% - EI)
(E)-b (17 - CI) (80 - EI)
(ii) - CH3COOH
OH
OMe
OAc
AcO
OAc
+ isomere
(Z)-a (21 - CI) (13 - EI)
m/z 179 (CI) 178 (EI)
m/z 271
(Z)-a (15)
(Z)-b (15) (E)-b (12)



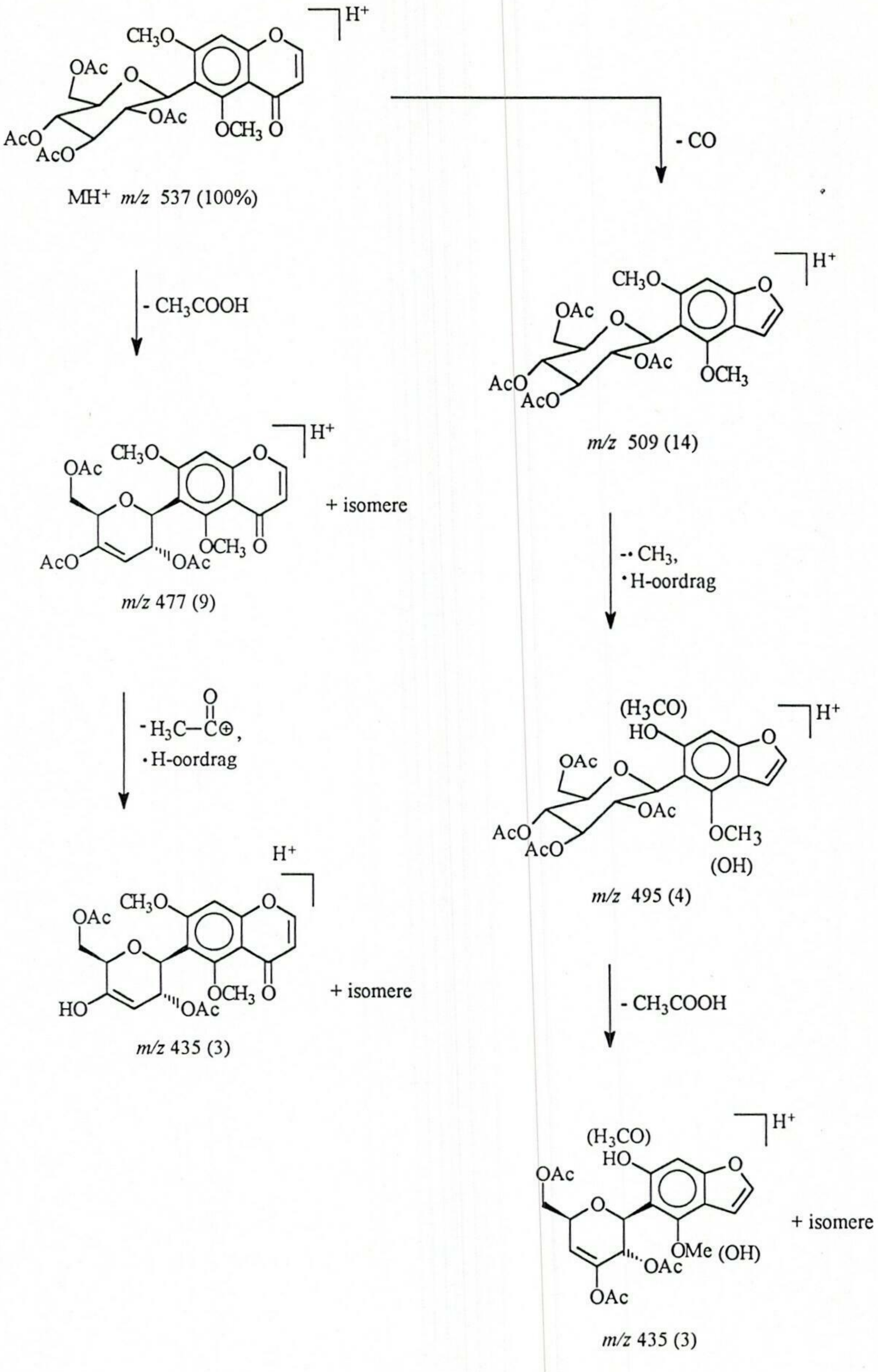
(i) - (vi) "Chemical ionization"


OMe
OH
O
m/z 178
(Z)-b (100%)
(E)-b (80)
OH
OMe
O
m/z 178
(Z)-a (13)
(vii) - • H
(ix) - • CH3
OMe
O
m/z 177
(Z)-b (1)
(E)-b (1)
OH
O
m/z 163
(Z)-a (0.2)
(viii) - CO2
(x) - CO2
CH3
- • CH3,
• H-oordrag
(xi)
OH
O
m/z 133
(Z)-b (28)
(E)-b (13)
m/z 119
(Z)-a (13)
(Z)-b (10)
(E)-b (8)
(xii) -H+
(xii) - CO
(vii) - (xii) "Electron impact"
O=C=O
m/z 118
(Z)-a (54) (Z)-b (76)
(E)-b (53)
m/z 91
(Z)-a (60) (Z)-b (30)
(E)-b (26)

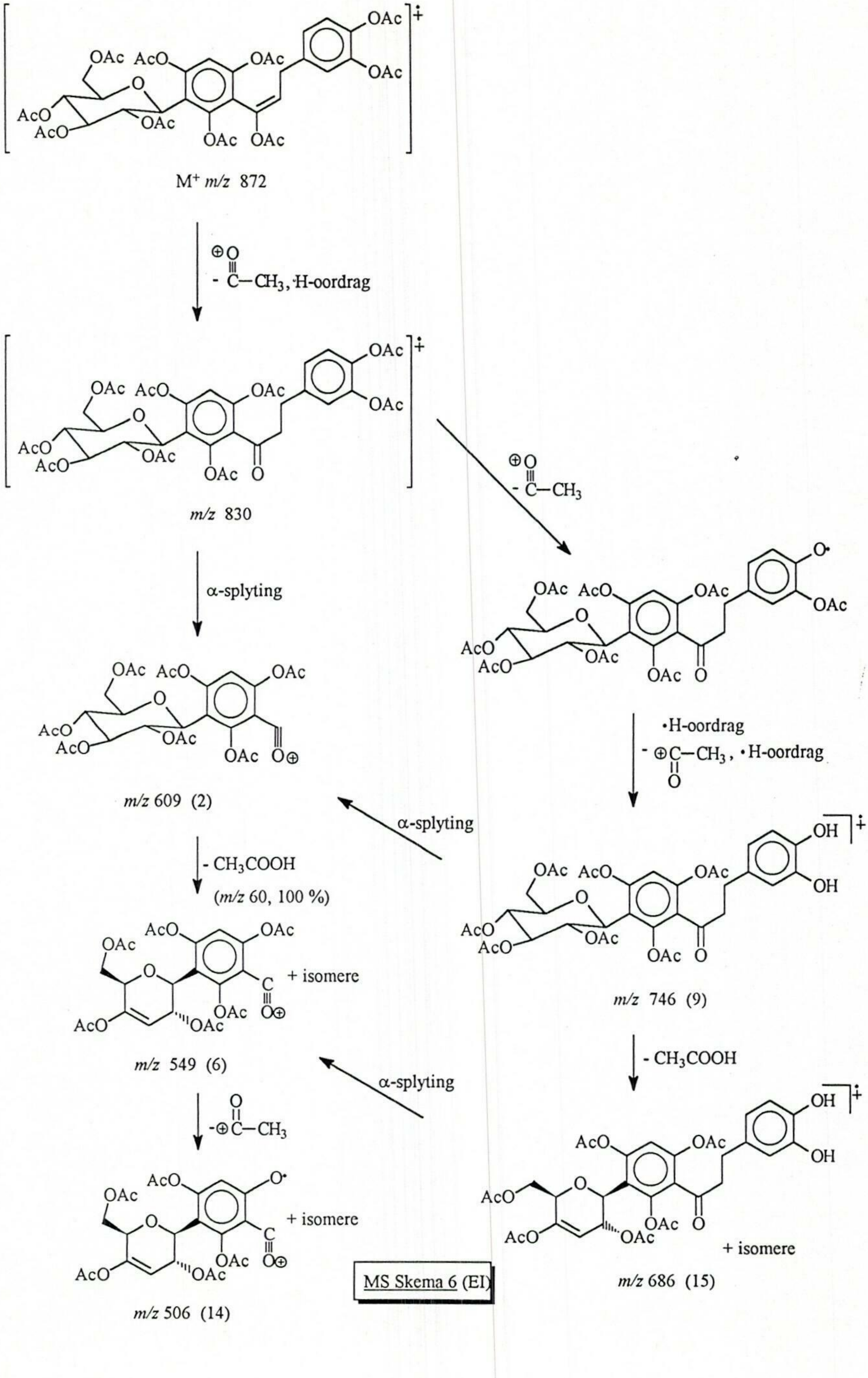
MS Skema 3


M+ m/z 658
α-splyting, ·H-oordrag
m/z 331 (7)
m/z 328 (89)
- 2 CH3COOH
- H3C—C=O⊕
·H-oordrag
- 2· CH3,· H-oordrag
+ isomere
m/z 169 (80)
-·CH3,
·H-oordrag
m/z 299 (30)
RDA
m/z 285 (4)
m/z 166 (2)
m/z 152 (6)
m/z 133 (6)

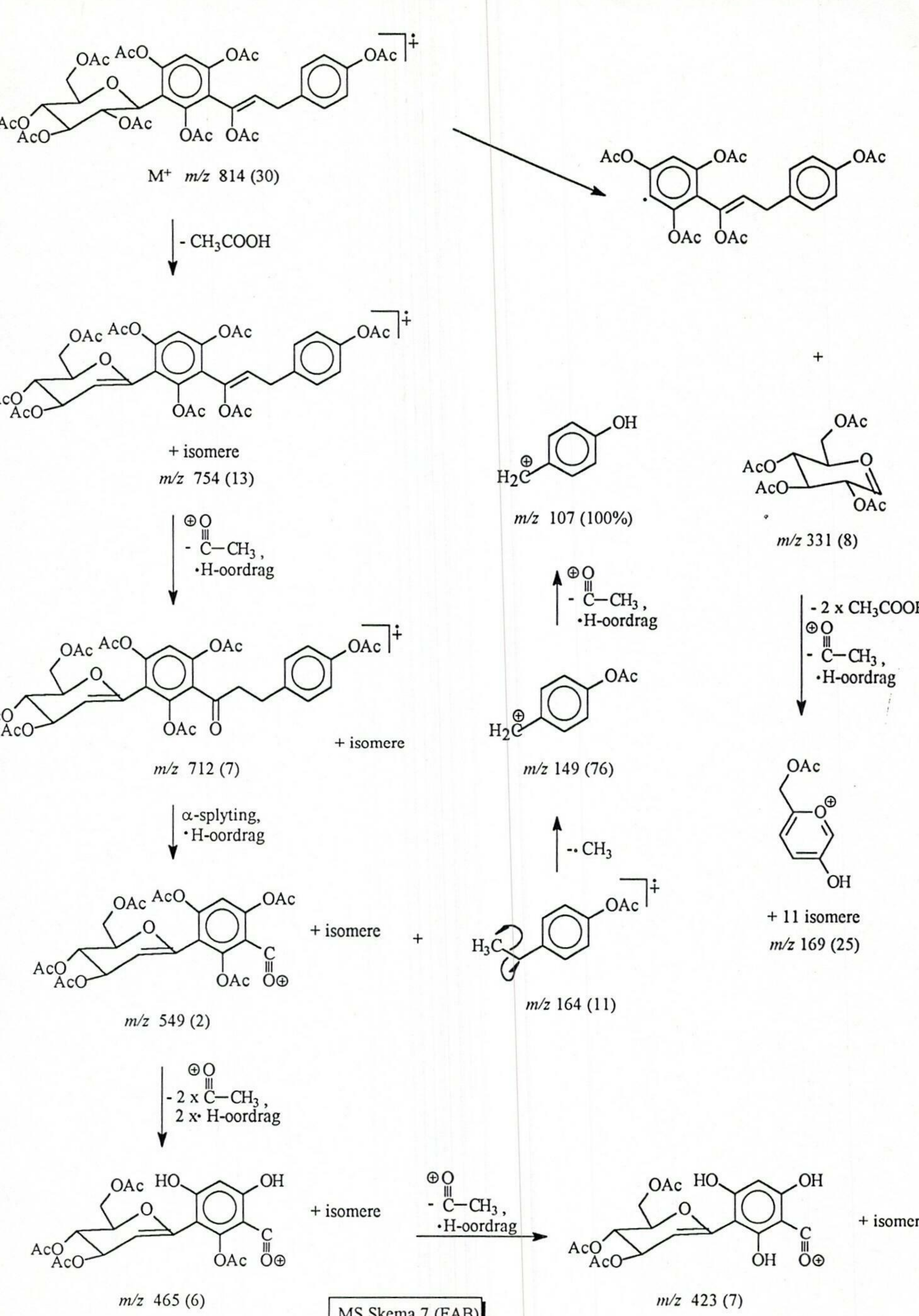
MS skema 4 (EI)


MH+ m/z 537 (100%)
- CO
- CH3COOH
m/z 509 (14)
+ isomere
m/z 477 (9)
-· CH3,
·H-oordrag
- H3C—C⊕,
·H-oordrag
m/z 495 (4)
- CH3COOH
+ isomere
m/z 435 (3)
+ isomere
m/z 435 (3)

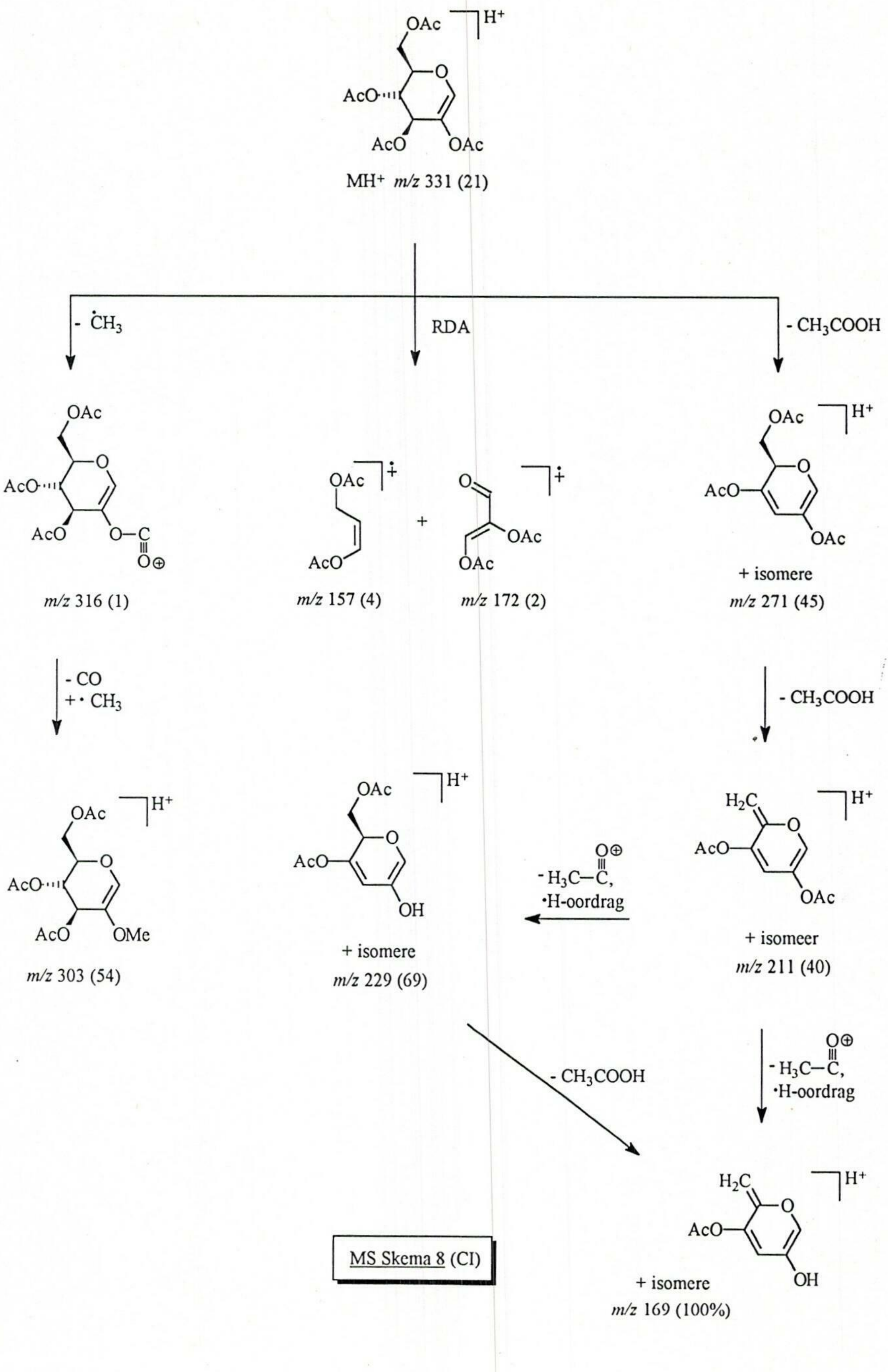
MS Skema 5 (CI)


M+ m/z 872
- C(O)CH3 ⊕, ·H-oordrag
m/z 830
- C(O)CH3 ⊕
α-splyting
m/z 609 (2)
·H-oordrag
- ⊕C(O)—CH3, ·H-oordrag
α-splyting
- CH3COOH
(m/z 60, 100 %)
m/z 746 (9)
+ isomere
m/z 549 (6)
α-splyting
- CH3COOH
- ⊕C(O)—CH3
+ isomere
m/z 506 (14)
+ isomere
m/z 686 (15)

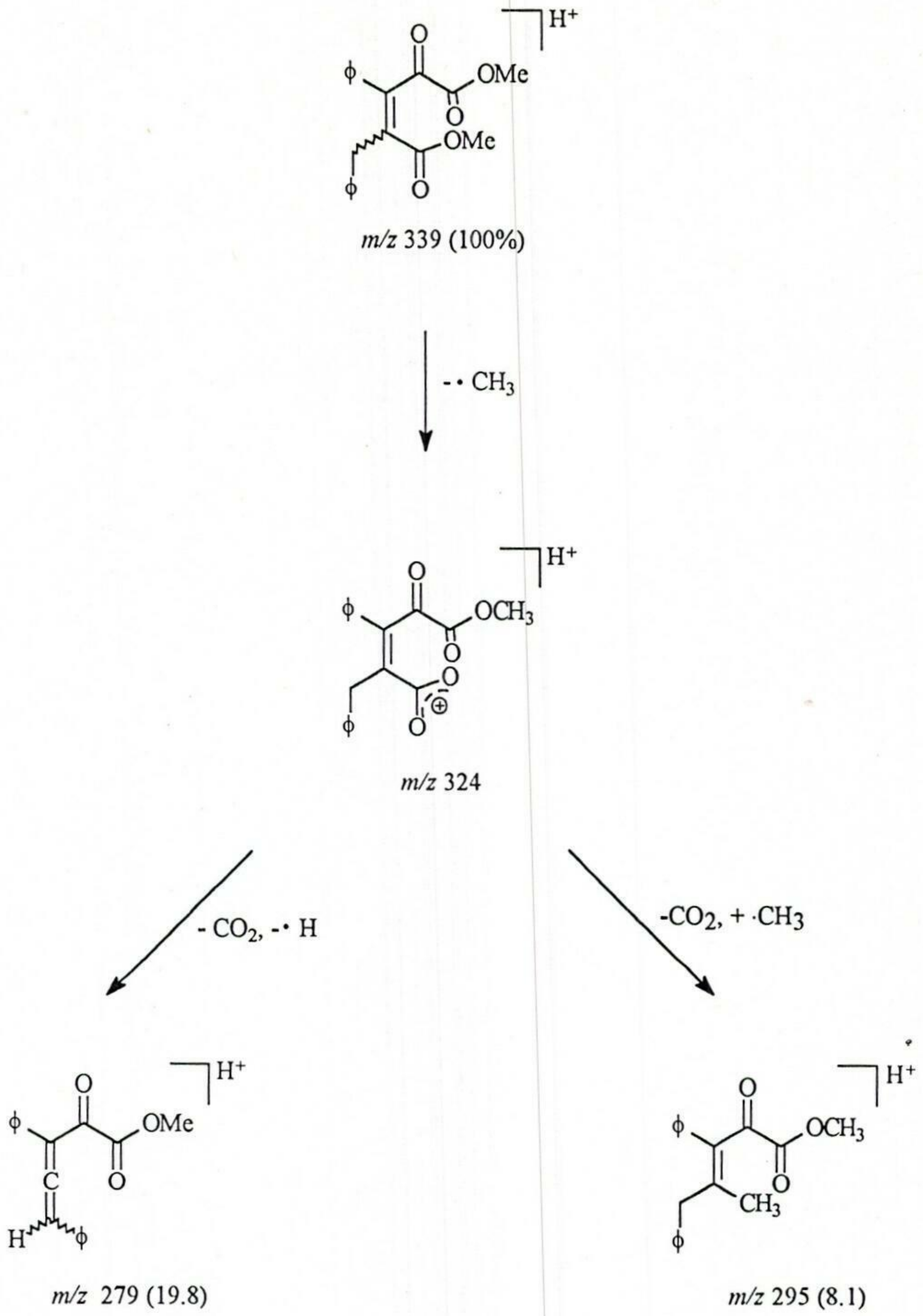
MS Skema 6 (EI)



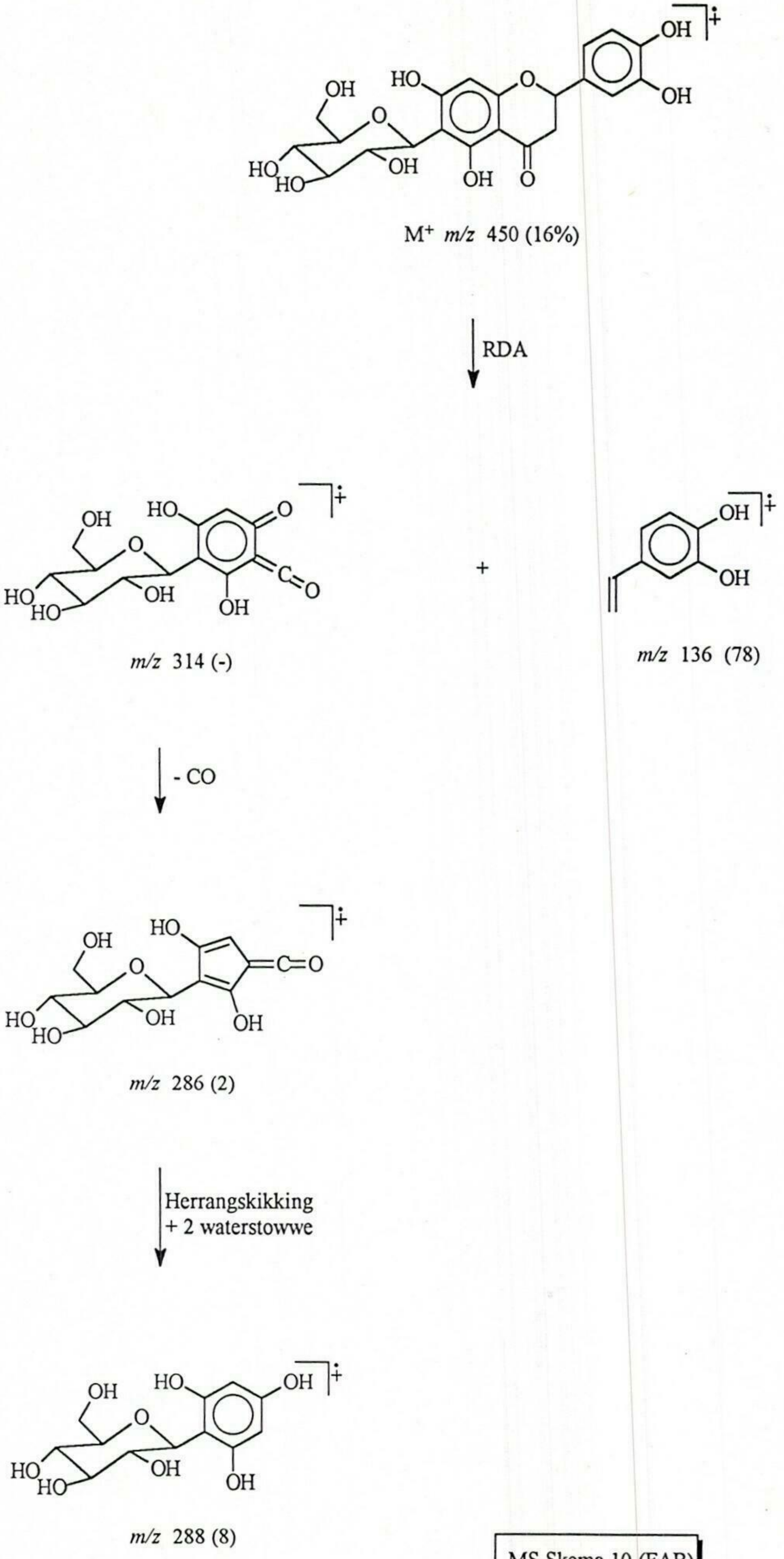
MS Skema 7 (FAB)


OAc
H+
AcO
AcO
OAc
MH+ m/z 331 (21)
- ĊH3
RDA
- CH3COOH
OAc
AcO
AcO
O–C
O⊕
m/z 316 (1)
OAc
AcO
m/z 157 (4)
+
O
OAc
OAc
m/z 172 (2)
OAc
H+
AcO
OAc
+ isomere
m/z 271 (45)
- CO
+ · CH3
- CH3COOH
OAc
H+
AcO
AcO
OAc
OMe
m/z 303 (54)
OAc
H+
AcO
OH
+ isomere
m/z 229 (69)
- H3C–C, O⊕
·H-oordrag
H2C
H+
AcO
OAc
+ isomeer
m/z 211 (40)
- CH3COOH
- H3C–C, O⊕
·H-oordrag
H2C
H+
AcO
OH
+ isomere
m/z 169 (100%)

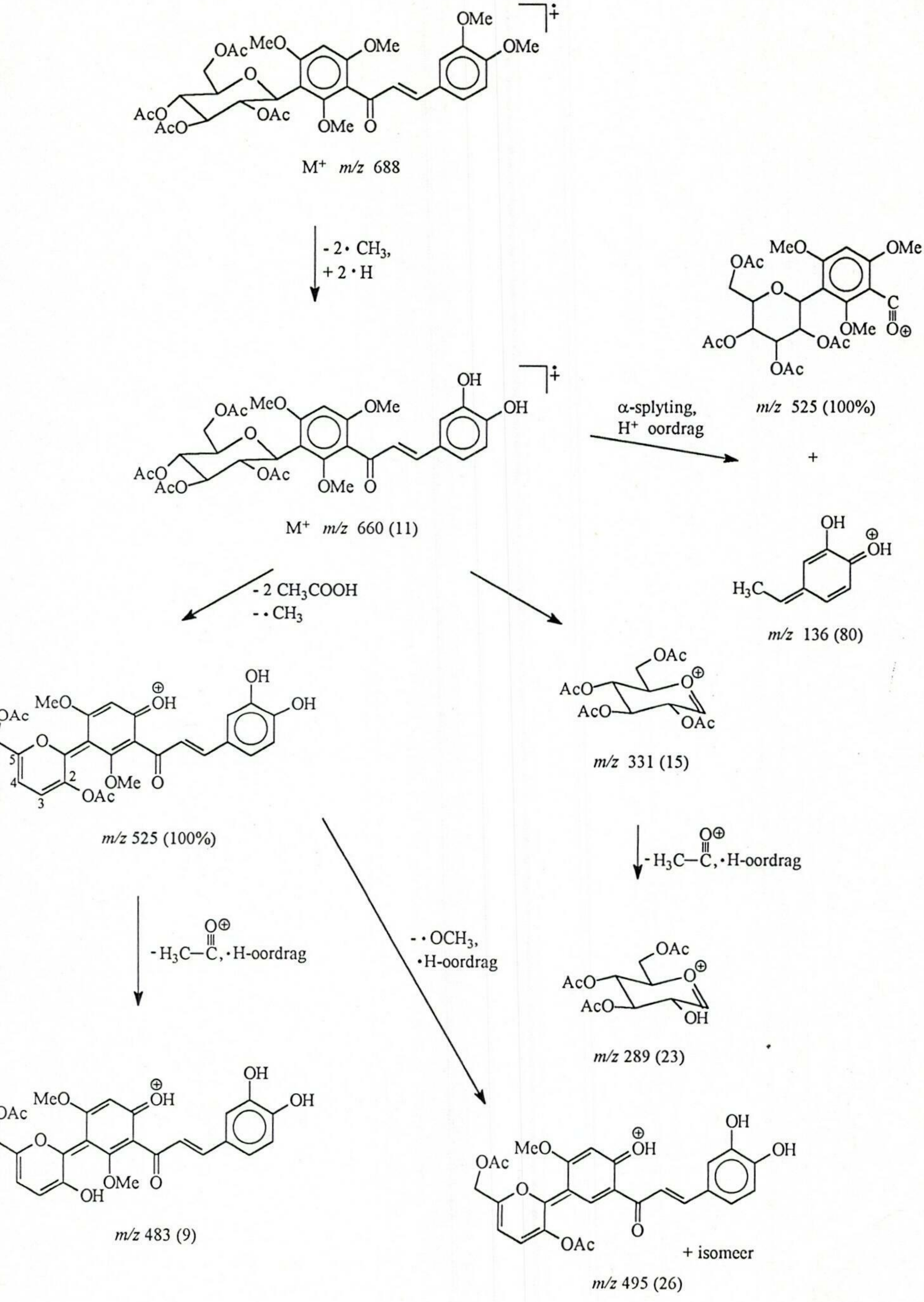
MS Skema 8 (CI)


H+
OMe
OMe
m/z 339 (100%)
- • CH3
H+
OCH3
m/z 324
- CO2, - • H
-CO2, + ·CH3
H+
OMe
H
m/z 279 (19.8)
H+
OCH3
CH3
m/z 295 (8.1)

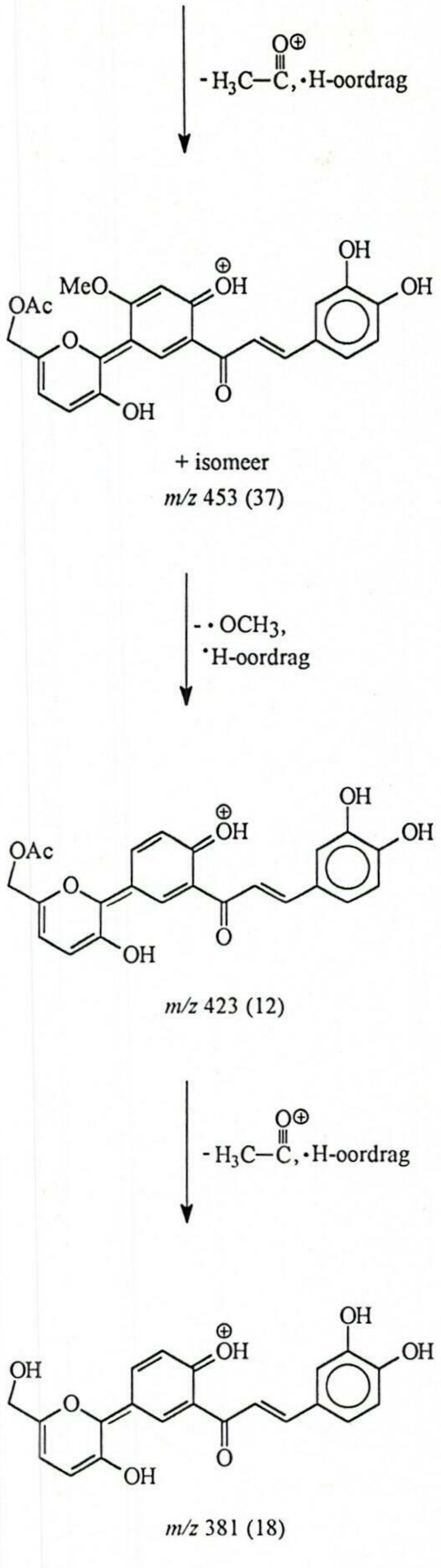
MS Skema 9 (CI)



MS Skema 10 (FAB)



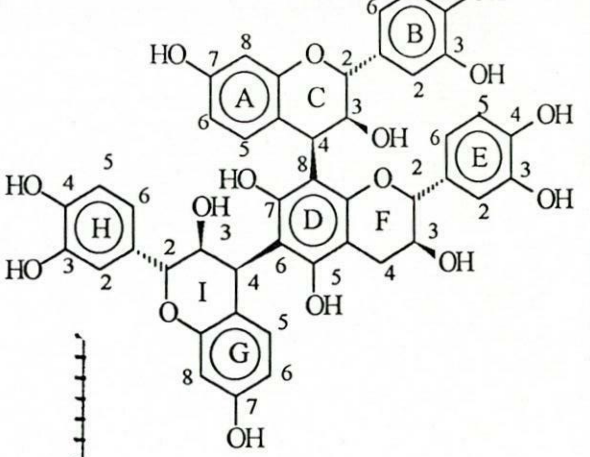
OMe
OAc MeO
OMe
OMe
AcO
AcO
OAc
OMe
O
M+ m/z 688
- 2 • CH3, + 2 • H
OH
OH
M+ m/z 660 (11)
α-splyting, H+ oordrag
m/z 525 (100%)
+
H3C
m/z 136 (80)
- 2 CH3COOH
- • CH3
m/z 525 (100%)
m/z 331 (15)
- H3C—C, • H-oordrag
m/z 483 (9)
- • OCH3, • H-oordrag
m/z 289 (23)
+ isomeer
m/z 495 (26)



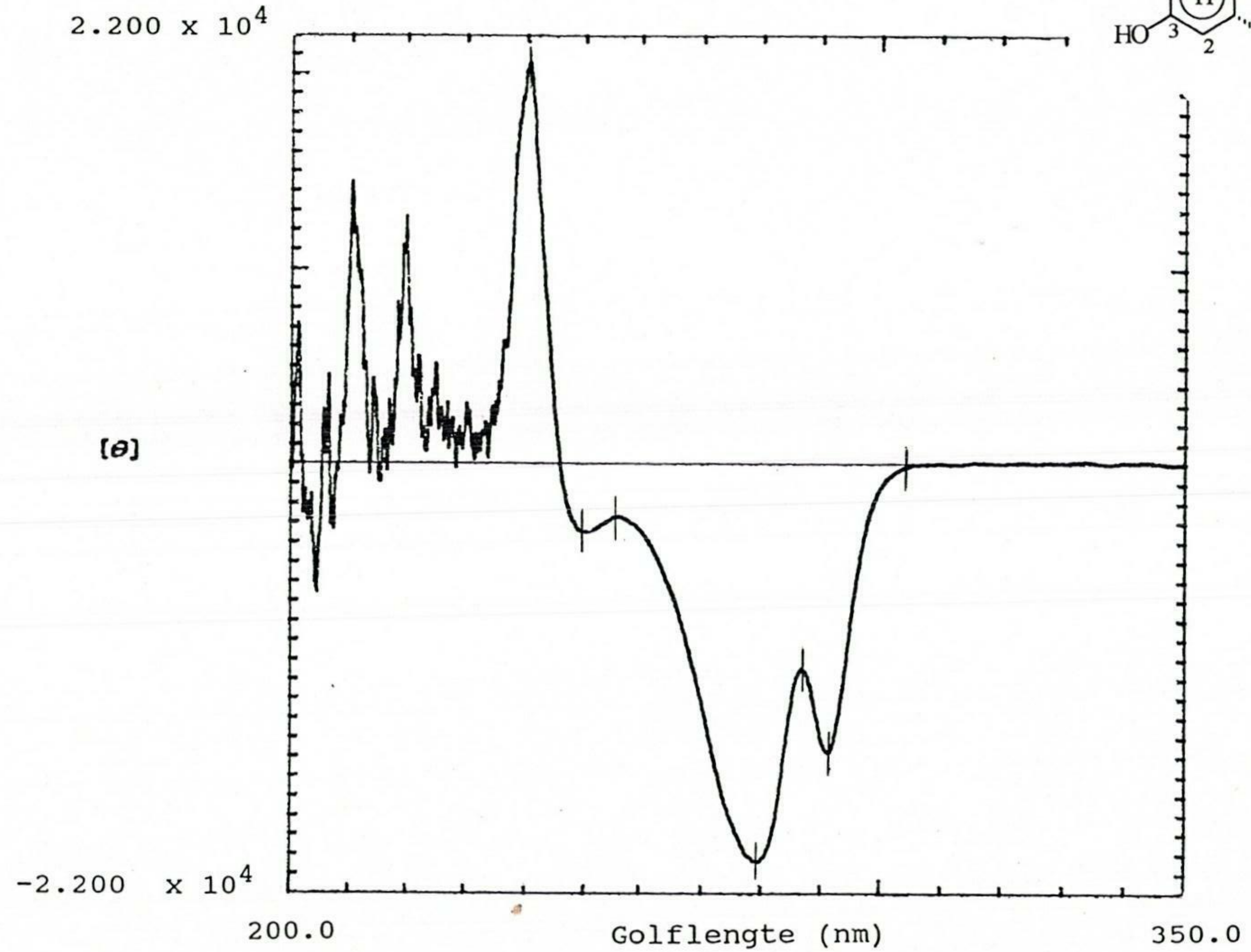
MS Skema 11 (FAB)

BYLAE 4

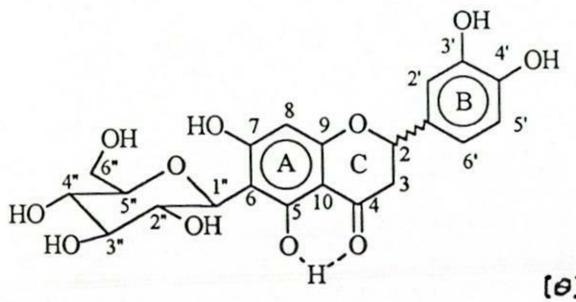
SD-PLATE



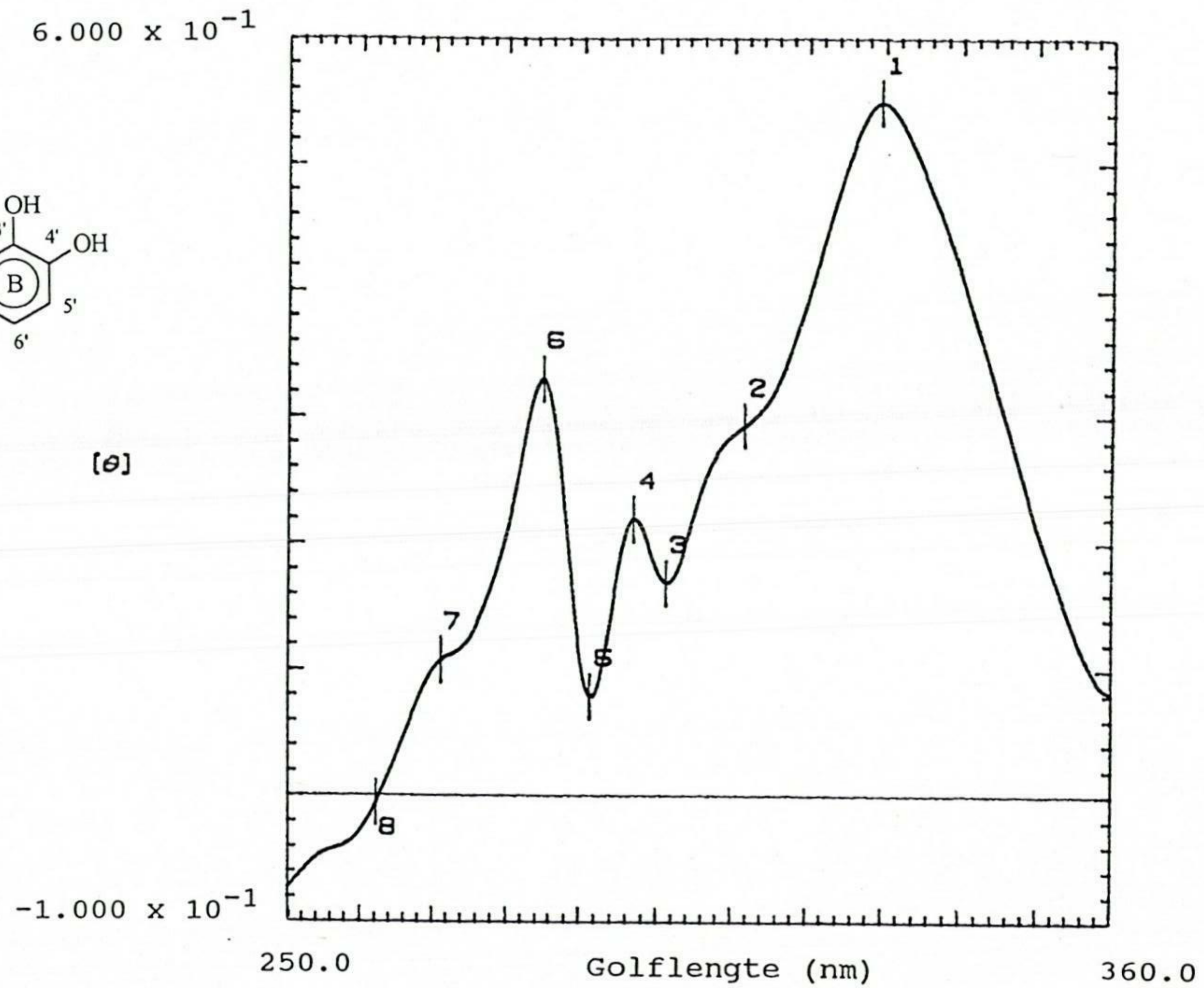
(93a)



SD-1



(88a)

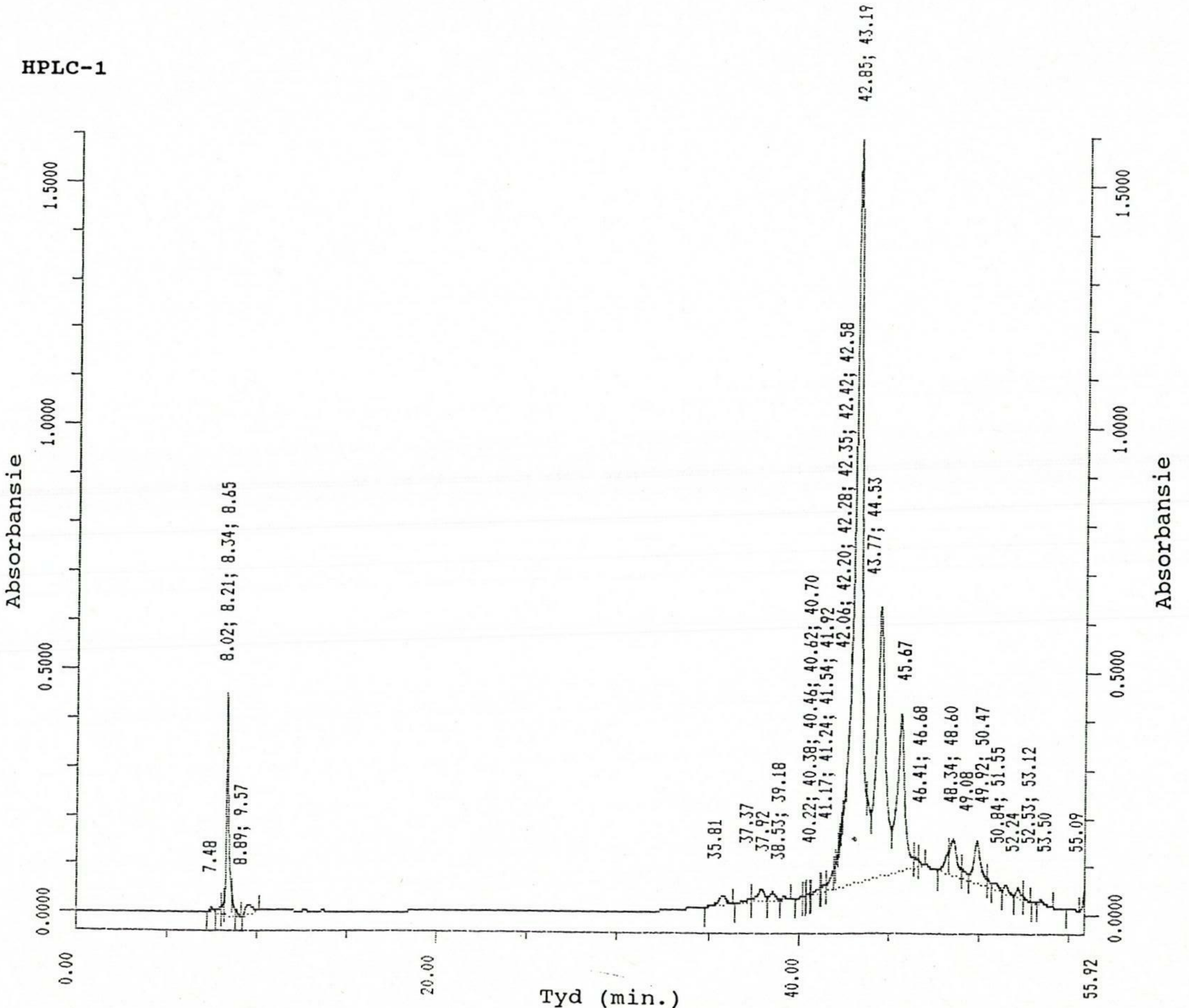


SD-2

BYLAE 5

HPLC-PROFIEL

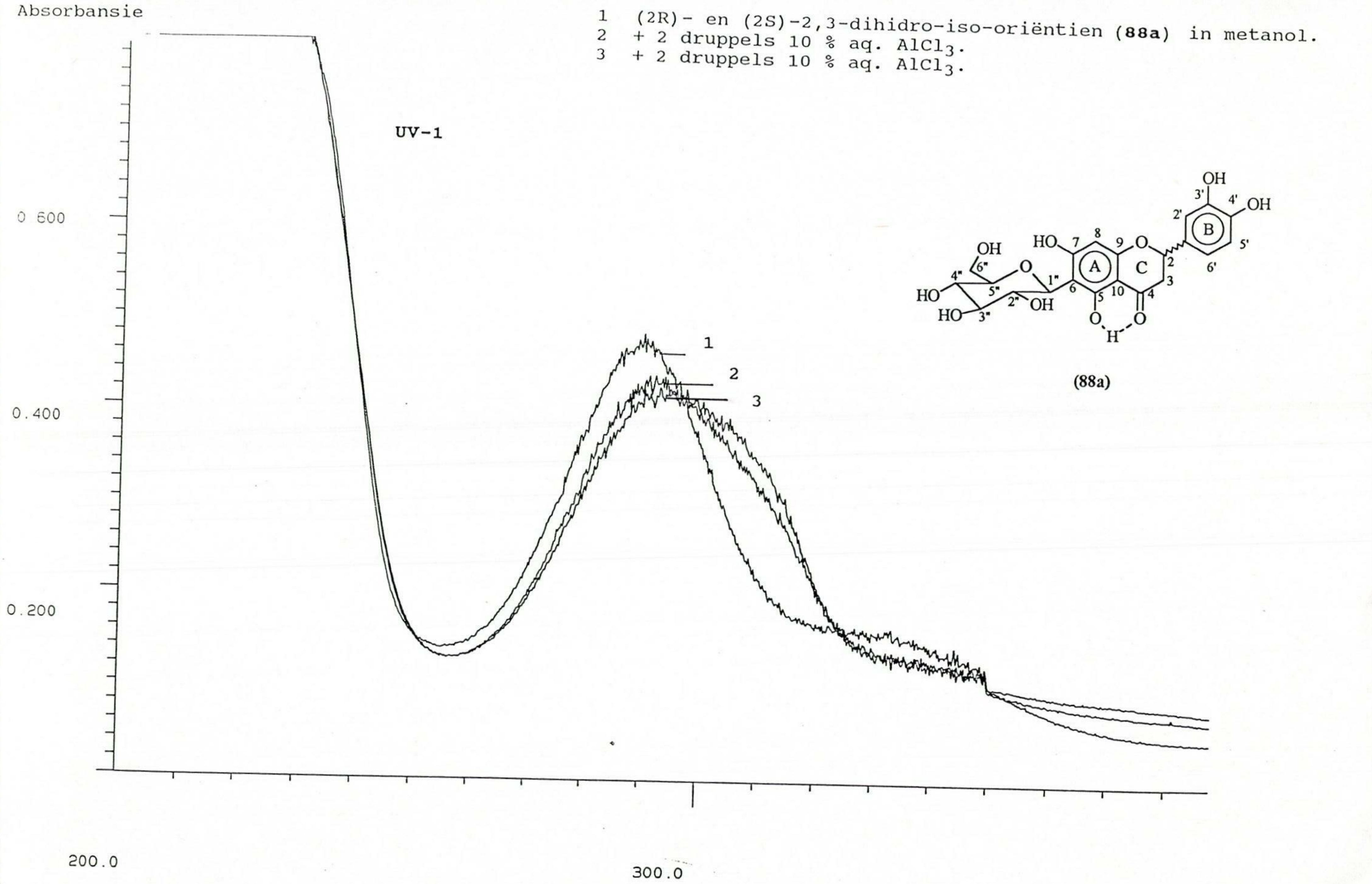
HPLC-1

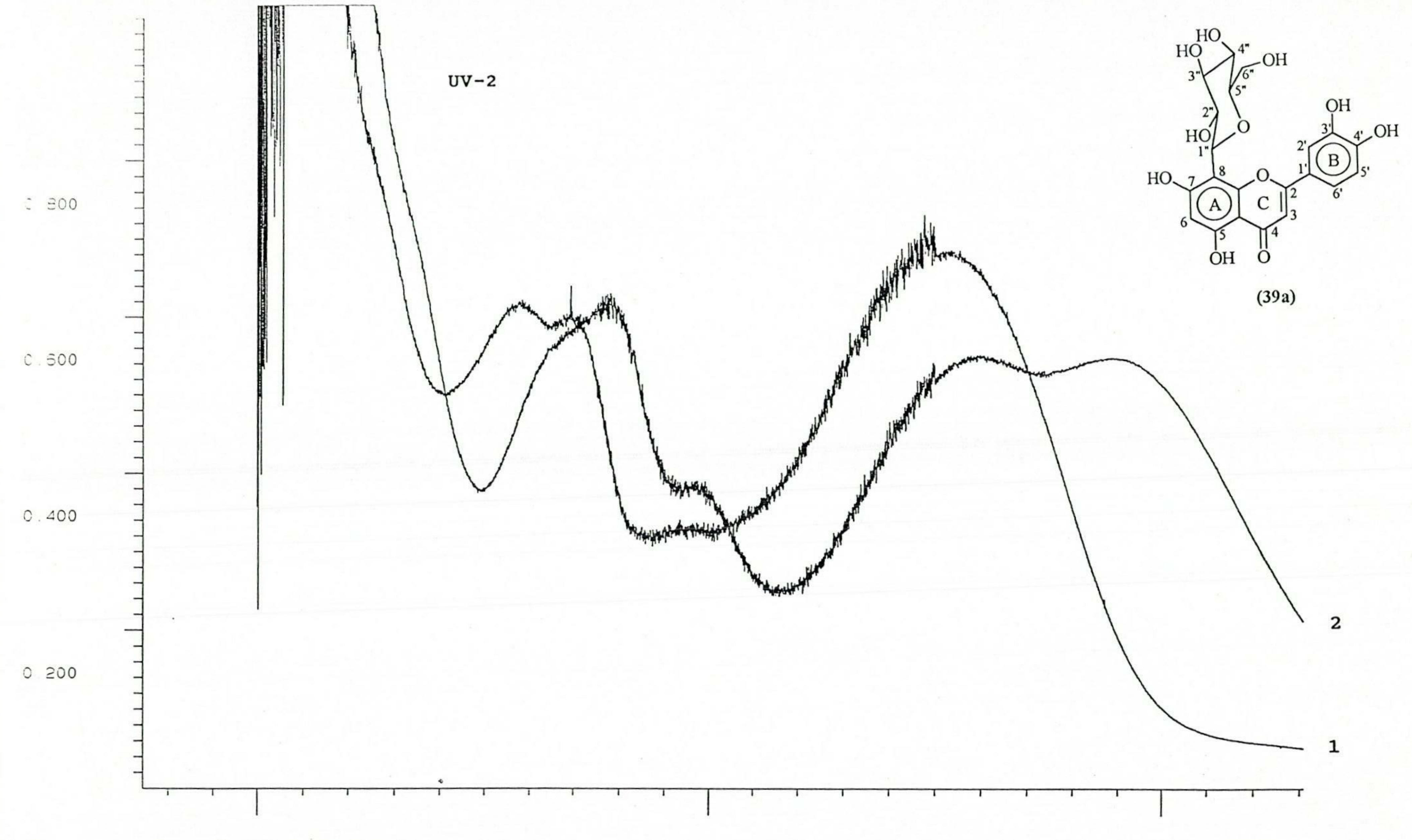


Absorbansie
Absorbansie
Tyd (min.)
0.00
20.00
40.00
55.92
0.0000
0.5000
1.0000
1.5000
7.48
8.02; 8.21; 8.34; 8.65
8.89; 9.57
35.81
37.37
37.92
38.53; 39.18
40.22; 40.38; 40.46; 40.62; 40.70
41.17; 41.24; 41.54; 41.92
42.06; 42.20; 42.28; 42.35; 42.42; 42.58
42.85; 43.19
43.77; 44.53
45.67
46.41; 46.68
48.34; 48.60
49.08
49.92; 50.47
50.84; 51.55
52.24
52.53; 53.12
53.50
55.09

BYLAE 6

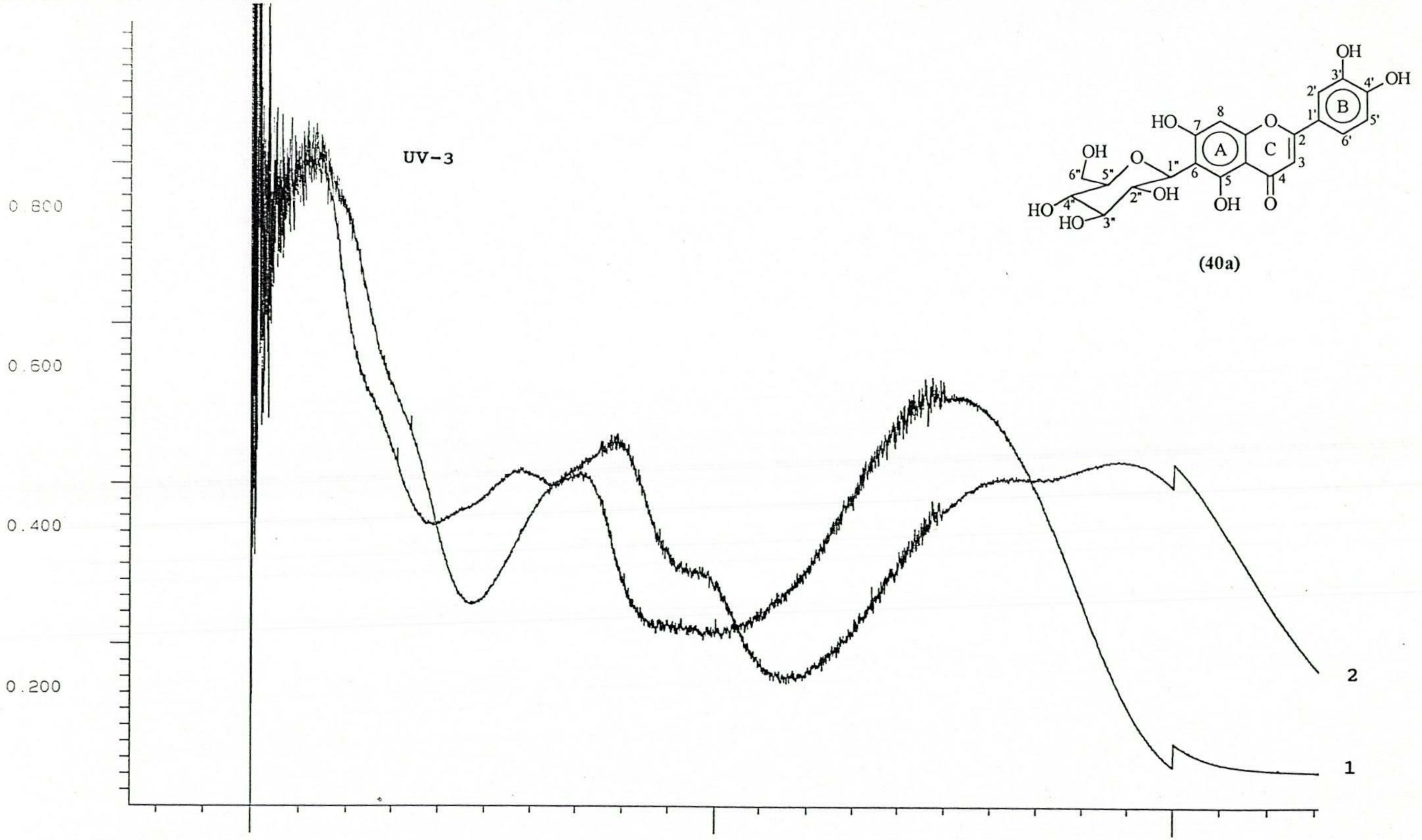
UV-SPEKTRA


Absorbansie
1 (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien (88a) in metanol.
2 + 2 druppels 10 % aq. AlCl3.
3 + 2 druppels 10 % aq. AlCl3.
UV-1
0.600
0.400
0.200
200.0
300.0
1
2
3
(88a)



(39a)

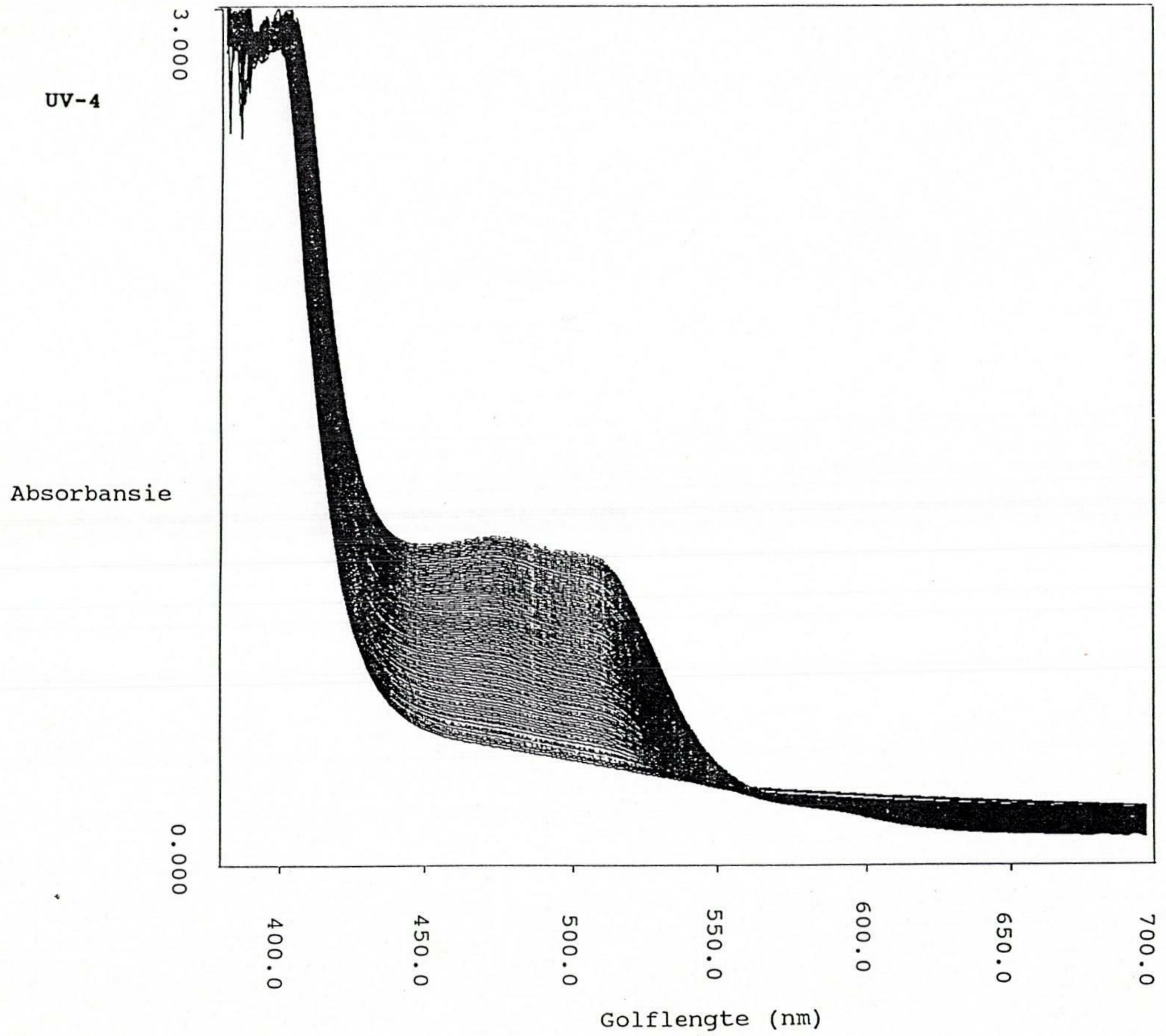
1 Oriëntien (**39a**) in metanol.
2 + 3 druppels 10 % *aq*. $AlCl_3$.



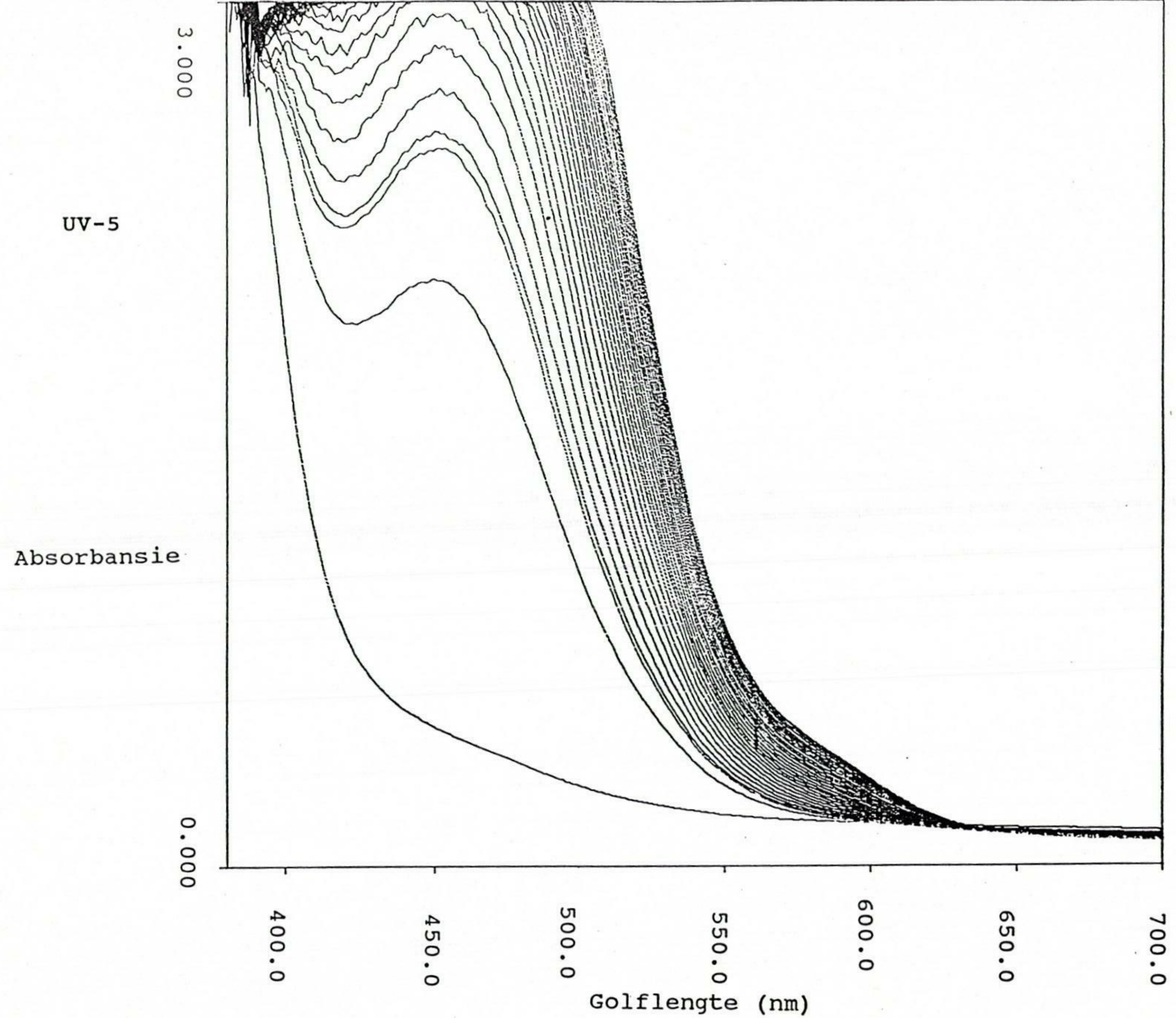
(40a)

1 Iso-oriëntien (**40a**) in metanol.
2 + 3 druppels 10 % *aq*. $AlCl_3$.

UV-4



3.000
Absorbansie
0.000
400.0
450.0
500.0
550.0
600.0
650.0
700.0
Golflengte (nm)


UV-5
Absorbansie
3.000
0.000
400.0
450.0
500.0
550.0
600.0
650.0
700.0
Golflengte (nm)

BYLAE 7

VERKLARING VAN MEDIESE TERME

AFTOSE

Mondseertjies

ANAFILAKSIE

Anafilaktiese skok; 'n manifestering van onmiddelike hipersensitiwiteit waarin die blootstelling van 'n gesensitiseerde individu aan 'n spesifieke antigeen of "hapten" tot lewensgevaarlike respiratoriese benoudheid wat gewoonlik deur vaskulêre ineenstorting en skok met gepaardgaande netelroos (brand), jeukerigheid en vaatoedema gevolg word, lei.

Anafilaksie word algemeen deur stuifmeelekstrakte, sekere voedselsoorte, sekere medisyne soos penisillien, ens. veroorsaak.

ANAFILAKTIEN

Die antiliggaam in anafilaksie.

ANAPLASEA

'n Verlies aan differensiasie van selle en hulle oriëntasie na mekaar asook van hulle aksiale raamwerk en bloedvate, 'n karakteristieke eienskap van tumorweefsel.

ANTHELMINTIES

'n Middel wat wurms vernietig.

ATOPIESE DERMATITIS

'n Chroniese jeukende veluitslag by adolessente en volwassenes van onbekende oorsprong,alhoewel allergiese, oorerflike en psigiese faktore waarskynlik betrokke is. Dit word gekenmerk deur ligenifikasie (verdikking), ekskoriasie (skawing) en kors- of roofvorming.

ARITMIEWEERDER

'n Middel wat kardiale aritme voorkom of ophef.

ARITME

Enige variasie van die normale ritme van die hartslag.

"CHLORETIC"

'n Middel wat die vloei van gal versnel.

CHOLESTEROLEMIE

Oormaat cholesterol in die bloed.

EKSEEM

'n Oppervlakkige inflammatoriese proses van hoofsaaklik die epidermis, gekarakteriseer deur aanvanklike rooiheid, jeukerigheid, papules en blasies, eksudasie (uitskeiding), korsvorming en later afskilfering, ligenifikasie en dikwels pigmentasie.

EKSPEKTORANT

'n Middel wat die uitwerping van slym uit die longe, bronchi en trachea bevorder; somtyds gebruik vir middels wat hoes stil.

FAGOSITOSE

Endositose van partikulêre materiaal, soos mikroörganismes of selfragmente. Die materiaal word in die sel ingeneem in membraangebonde blasies (fagosome) wat deur die afsnyding van instulpings van die plasmamembrane ontstaan. Fagosome smelt met lisosome (organelle met ensieme) saam om fagolisosome te vorm en waarin die omsluite materiaal gedood en verteer word.

"HAPTEN"

'n Klein molekule, nie self antigenies nie, wat met antiliggame van geskikte spesifisiteit kan reageer en die vorming van sulke antiliggame kan ontlok wanneer dit met 'n groter antigeniese molekuul, gewoonlik 'n proteïen, gekonjugeer is.

HEPATOTOKSIES

Giftig vir lewerselle.

HIPOCHROMIE

Abnormale afname in die hemoglobieninhoud van eritrosiete.

HIPOTENSIEF

Gekarakteriseer deur of veroorsaak verlaagde druk, soos abnormale lae bloeddruk.

HIPOTERMIA

'n Lae liggaamstemperatuur, soos veroorsaak deur blootstelling aan koue weer of geïnduseer ten einde die metabolisme van weefsels en dus die behoefte aan suurstof te verlaag; gebruik in verskeie chirurgiese metodes, veral in die geval van die hart, of in 'n orgaan wat vir oorplanting bewaar word.

HIPOTERMIES

Veroorsaak verlaagde liggaamstemperatuur, het betrekking op hipotermia.

HOMEOSTASE

'n Neiging tot stabiliteit van die normale liggaamstoestande (interne omgewing) van die organisme. Dit word deur 'n sisteem van beheermeganismes bereik. 'n Hoë konsentrasie koolstofdioksied in die ekstrasellulêre vloeistof sal byvoorbeeld verhoogde pulmonêre ventilasie veroorsaak met gevolglike verlaging in die koolstofdioksied konsentrasie.

KLASTOGENIES

Veroorsaak of induseer breuke, soos in chromosome.

KRISTALURIA

Ekskresie van kristalle in die uriene.

METASTASE

Die oordrag van siekte van een orgaan of deel na 'n ander wat nie direk daarmee in verbinding is nie. Dit mag toe te skryf wees aan die oordrag van patogeniese mikroörganismes of aan die oordrag van selle, soos in kwaadaardige tumors. Die vermoë tot metastase is karakteristiek aan alle kwaadaardige tumors.

MIKROSIET

Abnormale klein eritrosiet.

MIOKARDIALE INFARKSIE

Obstruksie van die koronêre are, gevolglike tekort aan bloedvoorsiening aan en afsterwing van dele van die hartspier.

MITOGENIES

Veroorsaak of induseer mitose of seltransformasie.

MITOSE

'n Metode van indirekte seldeling, bestaande uit verskeie prosesse waardeur twee dogterkerne identiese komplemente van die aantal chromosome karakteristiek van die somatiese selle (liggaamsselle) van die spesie ontvang. Proses waardeur die liggaam groei en selle vervang.

MUTASIE

'n Permanente oordraagbare verandering in die genetiese materiaal, gewoonlik in 'n enkele geen.

NEOPLASIA

Die vorming van 'n neoplasma, d.w.s die progressiewe vermeerdering van selle onder toestande waarin normale selle nie sou vermeerder nie.

NEOPLASMA

Enige nuwe en abnormale groei; spesifiek nuwe groei van weefsel waarin die groei van die weefsel ongekontroleerd en progressief is. Kwaadaardige neoplasmas word van goedaardiges daarin onderskei dat eg. 'n groter mate van anaplasea vertoon en eienskappe van indringing en metastase besit.

NEOPLASTIES

Het betrekking op neoplasia.

NEURALGIE

Senupyn; Spasmatiese pyn wat langs een of meer senuwees strek.

OROTIENSUUR ASIDURIE

'n Ingebore fout in die pirimidienmetabolisme outosomaal resessief oorgeërf as gevolg van defektiewe orotaatfosforibosieltransferase (OPRT) of orotidien-5'-fostaatdikarboksilase (ODC). Manifestasies sluit kristaluria en oormatige ekskresie van orotiensuur in die urine, groot-rooikiemsel bloedarmoede met

hipochromiese mikrositiese sirkulerende eritrosiete, asook fisiese groeivertraging en verstandelike vertraging in.

OUTOSOME

Enige gewone gepaarde chromosoom wat identies in mans en vrouens is, soos onderskei van geslagschromosome.

PIOREE

Die vrystelling van 'n vloeibare inflammatoriese produk, bestaande uit selle (leukosiete) en 'n verdunde vloeistof bekend as puris.

PROLAKTIEN

Een van die hormone wat laktasie stimuleer en onderhou.

SISTEMIES

Affekteer die hele liggaam.

SKLEROSE

'n Verharding, veral 'n verharding van 'n deel as gevolg van inflammasie. Die term word gewoonlik gebruik vir sodanige verharding van die senustelsel of van die bloedvate.

SPASMA

Skielike, hewige onwillekeurige sametrekking van 'n spier of 'n groep spiere met gepaardgaande pyn.

TIAMIEN

Vitamien B6

TUMOR

1. Swelling, een van die kardinale tekens van inflammasie; ongesonde vergroting.

2. 'n Nuwe groei van weefsel waarin die vermeerdering van selle ongekontroleerd en progressief is; ook 'n neoplasma genoem.

VAATVERWYDING

Verwyding van 'n bloedvat, veral van arteriole; lei tot verhoogde bloedvloei na 'n gebied.

VERWYSINGS

1. R. Dahlgren, *Bot. Notiser*, 1968, **121**, 165.

2. J.F. Morton, *Econ. Bot.*, 1983, **37**, 164.

3. P.J.C. Stassen, *Aspalathus linearis* (Rooibostee): Die invloed van oespraktyke op sekere vegetatiewe en fisiologiese aspekte, D.Sc (Agric)-proefskrif, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1987, 1 - 8.

4. E. Joubert, **Tuinbougewasse, invloed van fisieseveranderlikes tydens fermentasie en droging op die kwaliteit van rooibostee**, faset VV24111/52/3/1, 12 April 1990, 1 - 7.

5. F.G.J. Van der Westhuizen, **Rooibosteebeheerraad navorsingsverslag no. 7**, 28 September 1983, 1 - 8.

6. H.J. Du Plessis en I.M.M. Roos, *Phytophylactica*, 1986, **18**, 177.

7. W.H. Holzapfel en J.G. Niemand, *Proceedings of SAFFOST*, 1985, **2**, 443.

8. J.J. Roberts en A.M.M. Engelbrecht, *Supplement to FOOD REVIEW*, Februarie/Maart 1988, 26.

9. J. Coetzee, Finansies en Tegniek, 11 Oktober 1991, 22.

10. T. De Villiers, Finansies en Tegniek, 22 April 1994, 41.

11. J. Booyens, Sake-Rapport, 17 April 1994, 8.

12. K.L.J. Blommaert, J. Steenkamp, *Agroplantae*, 1978, **10**, 49.

13. P.B. Hesseling, J.F. Klopper en P.D.R. van Heerden, *S.A. Mediese Tydskrif*, 1979, 631.

14. T. Yoshikawa, Y. Naito, H. Oyamada, S. Ueda, T. Tanigawa, T.Takemura, S. Suoino en M. Kondo, in Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine, ed. I. Emeril, Plenum Press, New York, 1990, 171.

15. Y. Shindo en K. Kato, in Proceedings of the International Symposium on Tea Science, The

Organizing Committee of ISTS, Shizuoka, Japan, Kurofane printing Co. Ltd., 1991, 385.

16. A. Ito, K. Shinohara en K. Kator, Proceedings of the International Symposium on Tea Science, The Organizing Committee of ISTS, Shizuoka, Japan, Kurofane printing Co. Ltd., 1991, 381.

17. Y. Niwa en K. Okamura, presentation at the Japanese Food Science and Technology Academy, 20 September 1985, 1-6.

18. R.L. Rusting, *Scientific American*, 1992, 87.

19. M. Namiki, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1990, **29** (4), 273.

20. M.B. Korycka-Dahl en T. Richardson, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1978, **10**, 209.

21. R.A. Larson, *Phytochemistry*, 1988, **27** (4), 969.

22. F. Shahidi, P.K. Janitha en P.D. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992, **32** (1), 67.

23. J.E. Packer, T.F.Slater en R.L. Willson, *Nature*, 1979, **278**, 737.

24. T. Habu, R.A. Flath, T.R. Mon en J.F. Morton, *J. Agric. Food Chem.*, 1985, **33** (2), 249.

25. M. Kawakami, A. Kobayashi en K. Kator, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 633.

26. F.O. Snyckers en G. Salemi, *The Journal of the South African Chemical Institute*, 1974, **XXVII** (1), 5.

27. B.H. Koeppen, The ethyl acetate soluble polyphenols of rooibos tea, M.Sc-tesis, Universiteit van Stellenbosch, 1959, 1-132.

28. B.H. Koeppen, The Flavonoid constituents of *Aspalathus accuminatus*, D.Sc-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch, 1961, 1 - 169.

29. J.B. Harborne, Comparative Biochemistry of Flavonoids, Academic Press, Londen, 1967, 251.

30. H. Pacheco, *Bull. Soc. France Physiol. Vegetale*, 1969, **15**, 3.

31. H. Grisebach en W. Barz, *Naturwissenchaften*, 1969, **56**, 538.

32. A. Pelter, J. Bradshaw en R.F. Warren, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 835.

33. P. Manitto en P.G. Sammes, Biosynthesis of natural products, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1982, 400.

34. K.B.G. Torssell, Natural Product Chemistry, A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism, John Wiley and Sons limited, Chichester, 1983, 80 - 106, 138 - 145, 319 - 347.

35. W. Heller en G. Forkmann in The Flavonoids - Advances in research since 1986, ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, Londen, 1994, 499.

36. J.P. Van der Merwe, D. Ferreira, E.V. Brandt en D.G. Roux, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1972, 521.

37. E. Malan en D.G. Roux, *Phytochemistry*, 1974, 575.

38. F. du R. Volsteedt, G.J.H. Rall en D.G. Roux, *Tetrahedron Letters*, 1973, 1001.

39. D.G. Roux en D. Ferreira, *Phytochemistry*, 1974, **13**, 2039.

40. P.T. Viljoen, Die oksidasie van Pinitol en gedeeltelike identifikasie van 'n triterpeen glikosied uit *Sutherlandia microphylla* Burch., M.Sc-tesis, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1968, 1-82.

41. Y. Hirai, S. Sanada, Y. Ida en J. Shoji, *J. Chem. Pharm. Bull.*, 1984, **32**, 295.

42. P. Dittrich en A. Korak, *Phytochemistry*, 1984, **23** (1), 65.

43. T. Hudlicky, J.D. Price, F. Rulin en T. Tsunoda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9439.

44. M. Berthelot, *Compt. rend.*, 1855, **41**, 392.

45. H. Kindl en O. Hoffmann-Ostenhof, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1966, **24**, 149.

46. S.J. Angyal en C.G. MacDonald, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 686.

47. M. Mandel en T. Hudlicky, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1993, 741.

48. D.H.R. Barton, P. Dalko en S.D. Gero, *Tetrahedron Letters*, 1991, **32** (22), 2471.

49. D.C. Billington, *Chem. Soc. Rev.*, 1989, **18**, 83.

50. M.J. Berridge, *Nature*, 1993, **361**, 315.

51. A. Numata, K. Hokimoto, A. Shimada, H. Yamaguchi en K. Takaishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, **27** (3), 602.

52. D.L. Dreyer, R.G. Binder, B.G. Chan, A.C. Waiss, E.E. Hartwig en G.L. Beland, *Experientia*, 1979, **35**, 1182.

53. C.R. Narayanan, D.D. Joshi, A.M. Mujumdar en V.V. Dhekne, *Current Science*, 1987, **56** (3), 139.

54. N.R. Farnsworth, O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto, en Z. Guo, *Bulletin of the World Health Organization*, 1985, **63** (6), 965.

55. C. Rabe, Struktuur en sintese van fenoliese metaboliete uit rooibostee (*Aspalathus linearis*), M.Sc-tesis, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1992, 1-125.

56. C. Rabe, J.A. Steenkamp, E. Joubert, J.F.W. Burger en D. Ferreira, *Phytochemistry*, 1994, **35** (6), 1559.

57. E.C. Bate-Smith, *J. Linn. Soc. (Bot.)*, 1961, **58** (371), 95.

58. Von M. H. Zenk, *Zeitschrift fur Naturforschung*, 1964, **19B**, 83.

59. K. Yazaki, L. Heide en M. Tabata, *Phytochemistry*, 1991, **30** (7), 2233.

60. S.Z. El-Basyouni, D. Chen, R.K. Ibrahim, A.C. Neish, en G.H.N. Towers, *Phytochemistry*, 1964, **3**, 485.

61. E. Balogh-Hergovich, G. Speier en G. Argay, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 551.

62. C.W.W. Beecher, N.R. Farnsworth en C. Gyllenhaal in Natural products of Woody Plants II, ed. J.W. Rowe, Springer-Verlag, Berlyn, 1989, 1070.

63. M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mitsuta en T. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, **64**, 1447.

64. S.N. Onyeneho en N.S. Hettiarachchy, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1496.

65. B.J.F. Hudson en J.I. Lewis, *Food Chemistry*, 1983, **10**, 47.

66. J. Robak en R.J. Gryglewski, *Biochem. Pharmacol.*, 1988, **37** (5), 837.

67. H. Ogawara, T. Akiyama, S. Watanabe, N. Ito, M. Kobori en Y. Seoda, *The Journal of Antibiotics*, 1989, **XLII** (2), 340.

68. B.D.M. Cunningham, M.D. Threadgill en J.A. Hickman, *British Journal of Cancer*, 1987, **56** (2), 207.

69. Y. Inouye, K. Yamaguchi, Y. Take en S. Nakamura, *The Journal of Antibiotics*, 1989, **XLII** (10), 1523.

70. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman en B. Van de Putte, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 1242.

71. W. Worthy, *C & EN*, 16 September 1991, 27.

72. A. Barzilai en H. Rahamimoff, *Israel Journal of Medical Sciences*, 1982, **18** (6), 2.

73. H. Okamura, A. Mimura, Y. Yakou, M. Niwano en Y. Takahara, *Phytochemistry*, 1993, **33** (3), 557.

74. K. Herrmann, *J. Fd Technol.*, 1976, **11**, 433.

75. M.E. Snook, O.T. Chortyk, V.A. Sisson en C.E. Costello, *Phytochemistry*, 1992, **31** (5), 1639.

76. C.J. French en G.H.N. Towers, *Phytochemistry*, 1992, **31** (9), 3017.

77. S. Hattori en H. Matsuda, *Acta Phytochim. Jpn.*, 1949, **15**, 233.

78. B.K. Carté, S. Carr, C. DeBrosse, M.E. Hemling, L. MacKenzie, P. Offen en D.E. Berry, *Tetrahedron*, 1991, **47** (10/11), 1815.

79. T. Sekine, J. Arita, A. Yamaguchi, K. Saito, S. Okonogi, N. Morisaki, S. Iwasaki en I. Murakoshi, *Phytochemistry*, 1991, **30** (3), 991.

80. H. Ravn, S. Nishibe, M. Sasahara en L. Xuebo, *Phytochemistry*, 1990, **29** (11), 3627.

81. A. Finger, U.H. Engelhardt en V. Wray, *Phytochemistry*, 1991, **30** (6), 2057.

82. A. Finger, U.H. Engelhardt en V. Wray, *J. Sci. Food Agric.*, 1991, **55**, 313.

83. F. De Simone, A. Dini, C. Pizza, P. Saturnino en O. Schettino, *Phytochemistry*, 1990, **29** (11), 3690.

84. J. Budzianowski, *Phytochemistry*, 1990, **29** (11), 3643.

85. T. Kokubo, M. Nakamura, T. Yamakawa, H. Noguchi en T. Kodama, *Phytochemistry*, 1991, **30** (3), 829.

86. A.S. Kende en Y. Fujii, *Tetrahedron Letters*, 1991, **32** (20), 2199.

87. R.F. Webby, *Phytochemistry*, 1991, **30** (7), 2443.

88. N. Terahara, N. Saito, T. Honda, K. Toki, Y. Osajima, *Phytochemistry*, 1990, **29** (11), 3686.

89. Y. Shoyama, I. Nishioka, W. Herath, S. Uemoto, K. Fujieda en H. Okubo, *Phytochemistry*, 1990, **29** (9), 2999.

90. N. Terahara, K. Toki, N. Saito, T. Honda, T. Isono, H. Furumoto en Y. Kontani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1990, 3327.

91. T. Kondo, M. Ueda en T. Goto, *Tetrahedron*, 1990, **40** (13/14), 4749.

92. H. Nishimura, H. Sasaki, T. Morota, M. Chin en H. Mitsuhashi, *Phytochemistry*, 1990, **29** (10),

3303.

93. J.P. Steynberg, E.V. Brandt, J.F.W. Burger, B.C.B. Bezuidenhoudt en D. Ferreira, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1988, 37.

94. R. Tschesche en K. Struckmeyer, *Chem. Ber.*, 1976, **109**, 2901.

95. M. Billeter, B. Meier en O. Sticher, *Phytochemistry*, 1991, **30** (3), 987.

96. B.H. Koeppen en D.G. Roux, *Tetrahedron Letters*, 1965, **39**, 3497.

97. B.H. Koeppen en D.G. Roux, *Biochem. J.*, 1966, **99**, 604.

98. P. Van Loo, A. De Bruyn en M. Budêsínský, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1986, **24**, 879.

99. B.H. Koeppen, *Chemistry and Industry*, 1962, 2145.

100. B.H. Koeppen en D.G. Roux, *Biochem. J.*, 1965, **97**, 444.

101. J.P. Steynberg, Sintese en konformasie van natuurlike flobatanniene. Die meganisme van basisgekataliseerde piraanherrangskikkings, Ph.D-proefskrif, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1988, 41 - 42.

102. D.A. Young, E. Young, D.G. Roux, E.V. Brandt en D. Ferreira, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1987, 2345.

103. R. Pendse, A.V.R. Rao en K. Venkataraman, *Phytochemistry*, 1973, **12**, 2033.

104. T. Tanaka, Y. Orii, G. Nonaka en I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, **41** (7), 1232.

105. K. Nagasawa, Y. Higuchi, K. Ito, M. Imanari en N. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, **41** (1), 211.

106. R.D.H. Murray, J. Méndez en S.A. Brown, The Natural Coumarins, Occurrence, Chemistry and Biochemistry, John Wiley and Sons, Chichester, 1982, 34.

107. Looker, J.H. en W.W. Hanneman, *J. Org. Chem.*, 1962, **27**, 381.

108. M. Stocker en R. Pohl, *Phytochemistry*, 1976, **15**, 571.

109. J.A. Delcour, D. Ferreira en D.G. Roux, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1983, 1711.

110. W. Rossouw, A.F. Hundt, J.A. Steenkamp en D. Ferreira, *Tetrahedron*, 1994, **50** (43), 12477.

111. P.M. Viviers, Isolasie en sintese van tanniene van kommersiële belang: enantiomeriese verwantskappe, Ph.D-proefskrif, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1983, 71.

112. L. Chalker-Scott en R.L. Krahmer in Chemistry and Significance of Condensed Tannins, eds. R.W. Hemmingway en J.J. Karchesy, Plenum Press, New York, 1989, 345.

113. F. Petereit, H. Kolodziej en A. Nahrstedt, *Phytochemistry*, 1991, **30** (3), 981.

114. R.J. Grayer, F.M. Kimmins, D.E. Padgham, J.B. Harborne en D.V.R. Rao, *Phytochemistry*, 1992, **31** (11), 3795.

115. L.J. Porter en R.W. Hemingway in Natural Products of Woody Plants II, ed. J.W. Rowe, Springer-Verlag, Berlyn, 1989, 988.

116. E.P. Swam in Natural Products of Woody Plants II, ed. J.W. Rowe, Springer-Verlag, Berlyn, 1989, 939.

117. D. Lambusta, G. Nicolosi, A. Patti en M. Piattelli, *Synthesis*, 1993, 1155.

118. D.T. Hurst, An introduction to the Chemistry and Biochemistry of pyrimidines, purines and pteridines, John Wiley and Sons, Chichester, 1980, 104 - 134, 219 - 252.

119. D.M.O. Becroft en L.I. Phillips, *Br. Med J.*, 1965, **1**, 547.

120. D.M.O. Becroft, *New Engl. J. Med.*, 1984, **310**, 1333.

121. R. Girot, *New Engl. J. Med.*, 1983, **308**, 700.

122. E.J. Taylor, Dorland's illustrated Medical Dictionary, WB Saunders Company, Londen, 27ste uitgawe, 1988.

123. J. Torel, J. Cillard en P. Cillard, *Phytochemistry*, 1986, **25** (2), 383.

124. T. Osawa, H. Katsuzaki, Y. Hagiwara, H. Hagiwara en T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1135.

125. H. Haraguchi, K. Hashimoto en A. Yagi, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1349.

126. H. Tanizawa, Y. Ohkawa, Y. Takino, T. Miyase, A. Ueno, T. Kageyama en S. Hara, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40** (7), 1940.

127. V.W. Bowry en R. Stocker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6029.

128. Y. Yuda, J. Tanaka, F. Hirano, K. Igarashi en T. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39** (2), 505.

129. T. Sato, A. Kawamoto, A. Tamura, Y. Tatsumi en T. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40** (3), 721.

130. S.R. Husain, J. Cillard en P. Cillard, *Phytochemistry*, 1987, **26** (9), 2489.

131. K. Sakurai en T. Ogiso, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39** (3), 737.

132. S.Z. Dziedzic en B.J.F. Hudson, *Food Chemistry*, 1983, **12**, 205.

133. C. Tournaire, M. Hocquaux, I. Beck, E. Oliveros en M.T. Maurette, *Tetrahedron*, 1994, **50** (31), 9303.

134. J.M.R. Da Silva, N. Darmon, Y. Fernandez en S. Mitjavila, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1549.

135. R.M. Herbst en D. Shemin, *Organic Syntheses Coll. Vol II*, 1943, 1-4, 11-12, 519-520.

136. D.B. Davies en Md. A. Khaled, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1973, **II**, 1651.

137. E. Juaristi en G. Cuevas, *Tetrahedron*, 1992, **48** (24), 5019.

138. G. Wulff en G. Röhle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1974, **13** (3), 157.

139. H. Kunz, R. Kullmann, P. Wernig en J. Zimmer, *Tetrahedron Letters*, 1992, **33** (15), 1969.

140. B.F. Gisin, *Helv. Chim. Acta*, 1973, **56** (143), 1476.

141. D. Ferreira en D.G. Roux, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1977, 134.

142. S. Saito, S. Sumita, Y. Kanda en Y. Sasaki, *Tetrahedron Letters*, 1992, **33** (48), 7381.

143. S. Saito, S. Sumita, Y. Kanda en Y.Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, **42** (5), 1016.

144. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, Third Edition, John Wiley and Sons, New York, 1985, 255.

145. H.D. Zook en J.A. Miller, *J. Org. Chem.*, 1971, **36** (8), 1112.

146. A.J. Parker, *Chemical Reviews*, 1969, **1**, 1.

147. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, Third Edition, John Wiley and Sons, New York, 1985, 873-896.

148. T. Matsumoto, M. Katsuki, H. Jona en K. Suzuki, *Tetrahedron Letters*, 1989, **30** (45), 6185.

149. T. Matsumoto, M. Katsuki en K. Suzuki, *Tetrahedron Letters*, 1989, **30** (7), 833.

150. K. Toshima, G. Matsuo en K. Tatsuta, *Tetrahedron Letters*, 1992, **33** (16), 2175.

151. J.A. Mahling en R.R. Schmidt, *Synthesis*, 1993, **3**, 325.

152. K. Toshima, G. Matsuo, T. Ishizuka, M. Nakata en M. Kinoshita, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 1641.

153. P. Sinaÿ, *Pure & Appl. Chem.*, 1991, **63** (4), 519.

154. Y.D. Vankar, P.S. Vankar, M. Behrendt en R.R. Schmidt, *Tetrahedron*, 1991, **47** (48), 9985.

155. M. Yamaguchi, A. Horiguchi, A. Fukuda en T. Minami, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1990,

1079.

156. S. Mabic, C. Benezra en J.P. Lepoittevin, *Tetrahedron Letters*, 1993, **34** (28), 4531.

157. R.B. Bates en S. Caldera, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 6920.

158. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, Third Edition, John Wiley and Sons, New York, 1985, 323.

159. A.E. Opara en G. Read, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1973, **12**, 1221.

160. R.J. Yu en E.J. Van Scott, *European Patent 0 413 528 A1*, 1991.

161. B.A. Bohm in The Flavonoids: Advances in Research, ed. J.B. Harborne en T.J. Mabry, Chapman and Hall, Londen, 1982, 349-372.

162. B.A. Bohm in The Flavonoids: Advances in Research since 1980, ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, Londen, 1988, 348-372.

163. J. Staunton in Comprehensive Organic Chemistry, The Synthesis and Reactions of Organic Compounds, eds. D. Barton en W.D. Ollis, Pergamon Press, Oxford, 1979, **4**, 681.

164. J. Budzianowski en L. Skrzypczakowa, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 2044.

165. S.P. Garg, R. Bhushan en R.C. Kapoor, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 1265.

166. A.R. MacKenzie, C.J. Moody en C.W. Rees, *Tetrahedron*, 1986, **42** (12), 3259.

167. G.N. Vyas en N.M. Shah, *Organic Syntheses*, Coll. Vol **4**, 1963, 836.

168. K. Redl, B. Davis en R. Bauer, *Phytochemistry*, 1993, **32** (1), 218.

169. M. D'Agostino, V. De Feo, F. De Simone en C. Pizza, *Phytochemistry*, 1991, **30** (7), 2440.

170. S. Song-San, S. Watanabe en T. Saito, *Phytochemistry*, 1989, **28** (6), 1776.

171. J. Coetzee, J.P. Steynberg, P.J. Steynberg, E.V.Brandt en D. Ferreira, *Tetrahedron*, 1995, **51**(8),

2339.

172. R.M. Horowitz en L. Jurd, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 2446.

173. W.L. Lasswell en C.D. Hufford, *J. Org. Chem.*, 1977, **42** (8), 1295.

174. A.M. Dawidar, J. Jakupovic, M. Abdel-Mogib en I.A. Mashaly, *Phytochemistry*, 1994, **36** (3), 803.

175. M. Iinuma, M. Ohyama, T. Tanaka, M. Mizuno en S.K. Hong, *Phytochemistry*, 1992, **31** (2), 665.

176. T. Fukai en T. Nomura, *Heterocycles*, 1990, **31** (10), 1861.

177. E.A. Sherif, R.K. Gupta en M. Krishnamurti, *Tetrahedron Letters*, 1980, **21**, 641.

178. A. Prox, *Tetrahedron*, 1968, **24**, 3697.

179. A. Prox, *Liebigs Ann. Chem.*, 1970, **732**, 199.

180. M. Iinuma, T. Tanaka, M. Mizuno en F.A. Lang, *Phytochemistry*, 1992, **31** (2), 721.

181. H. Wagner, V.M. Chari en J. Sonnenbichler, *Tetrahedron Letters*, 1976, **21**, 1799.

182. A. Bakhtiar, J. Gleye, C. Moulis en I. Fouraste, *Phytochemistry*, 1991, **30** (11), 3840.

183. K.R. Markham, Techniques of flavonoid identification, Academic Press Inc., Londen, 1982, 82.

184. K.R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger en T.J. Mabry, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 1389.

185. Y. Chen, J. Liu, R.S. Davidson en O.W. Haworth, *Tetrahedron*, 1993, **49** (23), 5169.

186. Y. Shiratakai, I. Yokoe, M. Noguchi, T. Tomimori en M. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36** (6), 2220.

187. M. Iinuma, T. Tanaka, M. Mizuno, Y. Shirataki, I. Yokoe, M. Komatsu en F.A. Lang, *Phytochemistry*, 1990, **29** (8), 2667.

188. W. Gaffield, *Tetrahedron*, 1970, **26**, 4093.

189. E. Joubert, Processing of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) under controlled conditions, Ph.D-dissertation, University of Stellenbosch, 1994, 1-183.

190. O. Kodama, J. Miyakawa, T. Akatsuka en S. Kiyosawa, *Phytochemistry*, 1992, **31** (11), 3807.

191. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, John Wiley & Sons, New York, 1985, 197-201.

192. D.G. Bradley en D.B. Min, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992, **31** (3), 211.

193. J.A. Howard in Free Radicals, Vol II, ed. J.K. Kochi, John Wiley and Sons, New York, 1973, 9.

194. A.M. Mayer en E. Harel, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 193.

195. A.I. Yaropolov, O.V. Skorobogat'ko, S.S. Vartanov en S.D. Varfolomeyev, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994, **49**, 257.

196. L.Z.G. Touyz en A.A. Smit, *Journal of the Dental Association of South Africa*, 1982, **37**, 737.

197. G. Benfield, S.M. Bocks, K. Bromley en B.R. Brown, *Phytochemistry*, 1964, **3**, 79.

198. S.V. Jonavonic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic en M.G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4846.

199. P.D. Bartlett en R. Banavali, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 6043.

200. W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1980, **19**, 344.

201. S. Li en W.C. Purdy, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 1457.

202. D. Diaz, I. Vargas-Baca en J. Gracia-Mora, *Journal of Chemical Education*, 1994, **71** (8), 708.

203. A.V. Eliseev en A.K. Yatsimirskii, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 264.

204. I. Shibauchi en K. Nakamura, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60,181,014*, 1985.

205. Riken Vitamin Co., Ltd., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 59,137,410*, 1984.

206. L.E. Schlipalius, *PCT Int. Appl. WO 93 04,598*, 1993.

207. J. Karkalas en S. Raphaelides, *Carbohydr. Res.*, 1986, **157**, 215.

208. Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 59,161,314*, 1984.

209. M.A. Rutschmann en J. Solms, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 1990, **23** (1), 84.

210. M.P. Williamson, C. Trevitt en J.M. Noble, *Carbohydr. Res.*, 1995, **266**, 229.

211. D. Scott, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, ed. M. Grayson, John Wiley and Sons, New York, 1980, **9**, 194-199.

212. H. F. Mark, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, ed. M. Grayson, John Wiley and Sons, New York, 1978, **3**, 896-900.

213. A. Cronjé, Struktuur en sintese van prorobinetinidien- en prosianidientipe gekondenseerde tanniene, Ph.D- proefskrif, UOVS, 1992, 75-85, 140, 145.

214. J.J.L. Cilliers en V.L. Singleton, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 1789.

215. J.J.L. Cilliers en V.L. Singleton, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1298.

216. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, John Wiley & Sons, New York, 1985, 1053, 1060-1061.

217. T. Laird, Comprehensive Organic Chemistry, ed. J.F. Stoddard, Pergamon Press, Oxford, 1979, **1**, 1213.

218. I. Skjevrak, E. Solheim en R.R. Scheline, *Xenobiotica*, 1986, **16** (1), 35.

219. B.A. Bohm in The Flavonoids: Advances in Research, ed. J.G. Harborne en T.J. Mabry, Chapman and Hall, Londen, 1982, 339-349.

220. B.A. Bohm in The Flavonoids: Advances in Research since 1980, ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, Londen, 1988, 372-348.

221. B.A. Bohm in The Flavonoids: Advances in Research since 1986, ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, Londen, 1994, 401-406.

222. W.E. Hillis en T. Inoue, *Phytochemistry*, 1967, **6**, 59.

223. R.Y. Wong en R.M. Horowitz, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1986, 843.

224. C.D. Hufford en B.O. Oguntimein, *Phytochemistry*, 1980, **10** (9), 2036.

225. C.D. Hufford en B.O. Oguntimein, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 5286.

226. H. Tanaka, K. Ichino en K. Ito, *Phytochemistry*, 1984, **23** (5), 1198.

227. J.R. Cole, S.J. Torrance en R.M. Wiedhopf, *J. Org. Chem.*, 1976, **41** (10), 1852.

228. H.O. House en V. Kramar, *J. Org. Chem.*, 1963, **28**, 3362.

229. J.F.W. Burger, Nuwe inhoudstowwe van 'n medisinale plant, *Harpagophytum procumbens dc*, M.Sc-verhandeling, UOVS, 1985, 70, 93-94.

230. L. Hough en A.C. Richardson, Comprehensive Organic Chemistry, ed. E. Haslam, Pergamon Press, Oxford, 1979, 698.

231. J. March, Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and structure, Third Edition, John Wiley and Sons, New York, 1985, 220.

232. Ch. G. Shanker, B.V. Mallaiah en G. Srimannarayana, *Synthesis*, 1983, 310.

233. F. Stoos en J. Rocek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94** (8), 2719.

234. B.M. Trost, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89** (8), 1847.

235. P. Müller, D. Joly en F. Mermoud, *Helv. Chim. Acta*, 1984, **67** (12), 105.

236. H.D. Becker, A. Björk en E. Adler, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 1596.

237. J. Tsuji, I. Minami en I. Shimizu, *Tetrahedron Letters*, 1983, **24** (50), 5639.

238. I. Minami, K. Takahashi, I. Shimizu, T. Kimura en J. Tsuji, *Tetrahedron*, 1986, **42** (11), 2971.

239. Y. Ito, T. Hirao en T. Saegusa, *J. Org. Chem.*, 1978, **43** (5), 1011.

240. P. Cazeau, F. Duboudin, F. Moulines, O. Babot en J. Dunogues, *Tetrahedron*, 1987, **43** (9), 2089.

241. H.L. Hergert, P. Coad en A.V. Logan, *J. Org. Chem.*, 1956, **21** (1), 304.

242. L.F. Fieser en M. Fieser, Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, New York, 1968, **1**, 293-296.

243. J.T.A. Reuvers en A. de Groot, *J. Org. Chem.*, 1986, **51** (24), 4594.

244. R. Kuhn, I. Low en H. Trischmann, *Chem. Ber.*, 1957, **90**, 203.

245. G.E. DuBois, G.A. Crosby en R.A. Stephenson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **24** (4), 408.

246. G.E. DuBois, G.A. Crosby, G.V. McGarraugh, S.Y.W. Ng, R.A. Stephenson, P.C. Wang en R.E. Wingard, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 1319.

247. G.E. DuBois en R.A. Stephenson, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, **30**, 676.

248. M.L. Whitelaw, H.J. Chung en J.R. Daniel, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 663.

249. E.C. Bate-Smith, *Nature*, 1948, **161**, 835.

250. H.M. Saayman en D.G. Roux, *Biochem. J.*, 1965, **96**, 36.

251. S.M. Patridge, *Biochem. J.*, 1948, **42**, 238.

252. G. Linstedt, *Acta Chem. Scand.*, 1940, **4**, 65.

253. D.G. Roux en E.A. Maihs, *J. Chromatog.*, 1960, **4**, 65.

254. A.I. Vogel, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, hersien deur B.S. Furniss, A.J. Hannaford, V. Rogers, P.W.G. Smith en A.R. Tatchell, Longman Scientific and Technical, Londen, Vierde Uitgawe, 1978, 292.

255. T. Kametani en S. Kano, *J. Pharmac. Soc. Jpn.*, 1962, **82**, 1059.

256. A.I. Vogel, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, hersien deur B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith en A.R. Tatchell, Longman Scientific and Technical, New York, Vyfde Uitgawe, 1989, 397-412.

257. R.E. Ireland en R.S. Meissner, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 4566.

258. A.B. Anderson, D.L. MacDonald en H.O.L. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 1479.

259. J.F.W. Burger, Struktuur, sintese en absolute konfigurasie van flobatanniene verwant aan profisetinidien- en prosianidientipe oligoflavanoïede, Ph.D.-proefskrif, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, 1990, 170.

260. B.H. Koeppen, *Food Industry of South Africa*, 1961, **14**, 49.

261. A.I. Vogel, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, hersien deur B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith en A.R. Tatchell, Longman Scientific and Technical, New York, Vyfde Uitgawe, 1989, 1155-1156.

262. *Ibid.*, 437.

263. *Ibid.*, 647.

264. T.A. Geissman en R.O. Clinton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 697.

265. S. Kitanaka en M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40** (1), 249.

SAMEVATTING

Ten spyte van geloofwaardige aansprake oor baie dekades van die heilsaamheid van rooibostee op die mens, bestaan weinig inligting rakende die chemiese verbindings en die moontlike verwantskap van sodanige verbindings en die aansprake oor heilsaamheid.

'n Omvattende ondersoek is gevolglik na die chemiese samestelling van rooibos geloods met die oog op die daarstelling van 'n verwantskap tussen strukture en fisiologiese en anti-oksiderende aktiwiteit. Die ondersoek het tot die isolasie van verskeie bensoë- en kaneelsure, C-O glikosiede van flavone en flavonole, C-C flavoonglikosiede, 'n chromoon, C-C dihidrochalkoonglikosiede, C-C flavanoon-glikosiede, die flavan-3-ol, katesjien, sowel as prosianidien B_3 en 'n trimeriese profisetinidien gelei. Hierbenewens is die inositol (+)-pinitol en die nukleosied uridien vir die eerste keer uit rooibos geïsoleer. Verskeie van hierdie verbindings besit bewese fisiologiese en anti-oksiderende aktiwiteit en lewer die studie dus 'n wesentlike bydrae tot die wetenskaplike fundering vir die aansprake van die gesondheidseienskappe van rooibostee.

Die eerste glikosied van fenielpirodruiwesuur (Z)-3-feniel-2-ß-D-glukopiranosieloksipropensoësuur is as die metielester glukose asetaat geïdentifiseer. Hierdie verbinding is waarskynlik 'n belangrike voorloper in die biogenese van flavonoïede met 3-oksigenering en die vorming van die enoliese glukosied stabiliseer moontlik die aglikoon, fenielpirodruiwesuur. Ten einde die struktuur van hierdie nuwe verbinding onteenseglik te bewys en om onderskeid tussen (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat en die regio-isomere daarvan te tref, is 'n unieke sintetiese roete ontwikkel. Hierdie sintese het die ontwikkeling van nuwe metodologie vereis aangesien enolsuikers seldsaam is en die enkele sintetiese roetes na sodanige teikenmolekule hoofsaaklik die α-anomere lewer. Hierbenewens moes kompromieë tussen kondisies vir *O*-alkilering

(*versus* *C*-alkilering), substitusie (*versus* eliminasie) en die bevoordeling van die vorming van die ß-anomeer (*versus* die α-anomeer), wat swak versoenbaar is, getref word. Tesame is drie regio-isomere van (Z)-metiel-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-ß-D-glukopiranosieloksi)-3-fenielpropenoaat vir die eerste keer gesintetiseer waardeur 'n ^{1}H KMR-databasis opgebou is en belangrike konformasionele afleidings, wat noodsaaklik vir die sinvolle interpretasie van n.O.e-assosiasies is, gemaak kon word.

Een van die hoogtepunte van die studie was die isolasie van die nuwe C-C glikosidiese flavanone, (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien. C-C glikosidiese flavanone is uiters skaars en slegs drie sodanige verbindings is voorheen geïsoleer. Hierbenewens is daar gedemonstreer dat hierdie verbindings 'n sleutelrol in die biosintese van flavonoïede sowel as in die verwerkingsproses van rooibos speel.

In 'n biomimetiese studie van die rooibos fermentasieproses is gedemonstreer dat die dihidrochalkoon aspalatien in die teenwoordigheid van lig of hitte oksidatief sikliseer om die flavanone (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-iso-oriëntien sowel as (2R)- en (2S)-2,3-dihidro-oriëntien, wat met verdere oksidasie die flavone, iso-oriëntien en oriëntien vorm, te lewer. Getuienis dui daarop dat die omskakeling van aspalatien in die teenwoordigheid van beide ultravioletlig en hitte die vorming van 'n fenoksiradikaal behels, waarna die verwydering van 'n bensiliese waterstofatoom die ooreenstemmende kinoonmetied lewer en nukleofiele aanval deur 2'-OH op die elektrofiele bensiliese posisie van die kinoonmetied die ooreenstemmende flavanone lewer.

Die *in vitro* katalise van die oksidatiewe siklisering van aspalatien deur dekstriene is gedemonstreer en vind waarskynlik 'n presedent in die verwerking van rooibos deurdat α-amilase moontlik met die beskadiging van selle en organelle tydens die snyproses in aanraking met stysel kom en dit na

dekstriene hidroliseer wat dan vir interaksie met aspalatien beskikbaar is. Soortgelyke *in vivo* katalise van die oksidatiewe siklisering na die vrystelling van ensieme met die snyproses is *in vitro* met lakkase gemodelleer.

Flavanoonvorming vanaf dihidrochalkone was tot dusver onbekend en plaas dihidrochalkone onmiddelik in perspektief in die biosintese van flavonoïede. Hierdie studie verteenwoordig inderdaad die eerste bydrae tot die unieke chemie van dihidrochalkone en werp vir die eerste keer lig op die aard van veranderinge tydens die verwerking van rooibos.

SUMMARY

Despite convincing claims over decades that rooibos tea has health-promoting properties, limited knowledge regarding the chemical compounds and the possible relationship between these compounds and the claims of wholesomeness, exists.

Hence, a comprehensive analysis aimed at unravelling the chemical composition of rooibos was launched to investigate the relationship between structure and physiologial and anti-oxidative activity. The investigation resulted in the isolation of various benzoic- and cinnamic acids, C-O glycosides of flavones and flavonols, C-C flavone glycosides, a chromone, C-C dihydrochalcone glycosides, C-C flavanone glycosides, the flavan-3-ol, catechin, as well as procyanidin B_3 and a profisetinidin triflavanoid. In addition, the inositol (+)-pinitol and nucleoside uridine were isolated from rooibos for the first time. Several of these compounds possess well known physiological and anti-oxidative activity and the study contributes significantly towards the scientific foundation of the health promoting properties of rooibos tea.

The first glycoside of phenylpyruvic acid, (Z)-3-phenyl-2-ß-D-glucopyranosyloxypropenoic acid was identified as the methyl ester glucose acetate. This compound is presumably an important precursor in the biogenesis of flavonoids with 3-oxygenation and the formation of the enolic glucoside possibly stabilizes the aglycone, phenylpyruvic acid. Owing to inconclusive ^{1}H NMR data to distinguish between (Z)-methyl-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-ß-D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoate and possible regio-isomers, a unique synthetic route was developed. This synthesis necessitated the development of new methodology because of the rareness of enol sugars and the preferred formation of the α-anomer *via* the few known synthetic routes to these target molecules. In addition, it was necessary to compromise between conditions for *O*-alkylation (*versus* *C*-alkylation), substitution

ersus elimination) and the favouring of the ß-anomer (*versus* the α-anomer), hich are poorly reconcilable. Parallel with these, three regio-isomers of (Z)-methyl-2-(2,3,4,6-tra-*O*-acetyl-ß-D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoate were synthesized for the first time, a ^{1}H MR data base was accumulated and important conformational deductions, which are essential for e sensible interpretation of n.O.e associations, were made.

ne of the highlights of the study was the isolation of the new C-C glycosidic flavanones, (2R)- and 2S)-2,3-dihidro-iso-orientin. C-C glycosidic flavanones are extremely rare and only three ompounds of this kind were isolated previously. In addition, it was demonstrated that it is key ompounds in the biosynthesis of flavonoids as well as in the processing of rooibos.

biomimetic study of the rooibos fermentation process revealed that the dihydrochalcone, spalathin cyclises oxidatively in the presence of light and heat to form the flavanones (2R)- and 2S)-2,3-dihidro-iso-orientien as well as (2R)- and (2S)-2,3-dihidro-orientien, which are further xidized to the flavones, iso-orientin and orientin. Evidence suggests that the conversion of spalathin in the presence of both ultraviolet light and heat initially gives a phenoxyl radical that loses benzilic hydrogen atom to give the corresponding quinone methide. Nucleophilic attack of 2'-OH n the electrophilic benzilic position of the quinone methide leads to the formation of the orresponding flavanones.

he *in vitro* catalysis of the oxidative cyclization of aspalathin by dextrin was demonstrated and resumably also takes place during the processing of rooibos. α-Amylase may come into contact ith starch during the damaging of cells and organelles in the cutting process to hydrolyze it to extrin, which would then be available to interact with aspalathin. Similar *in vivo* catalysis of the

oxidative cyclization after the release of enzymes in the cutting process was modelled *in vitro* with laccase.

Flavanone formation from dihydrochalcones was previously unknown and immediately places dihydrochalcones in perspective in the biosynthesis of flavonoids. In addition, this study represents the first contribution towards the unique chemistry of dihydrochalcones and clarifies for the first time the type of changes during the processing of rooibos.

BIBLIOTEEK LIBRARY