

**STRUKTUUR EN SINTESE VAN FENOLIESE METABOLIE TE UIT
ROOIBOSTEE
(*Aspalathus linearis*)**

*Verhandeling voorgelê ter vervulling van die
vereistes vir die graad*

MAGISTER SCIENTIAE

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

deur

Charlene Rabe

Studieleier: Dr. J.A. Steenkamp
Medestudieleiers: Prof. D. Ferreira
Dr. J.F.W. Burger

MEI 1992

DANKBETUIGINGS

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

Dr. J.A. Steenkamp as studieleier, asook prof. D. Ferreira en dr. J.F.W. Burger as medestudieleiers, vir hul bekwame leiding, bereidwillige hulp en geduld tydens hierdie studie;

Prof. E.V. Brandt, dr. J.P. Steynberg, dr. B.C.B Bezuidenhout, mev. R. Versteeg, mnr. P.J. Steynberg, mnr. C.H.L. Mouton en in die besonder dr. J.F.W. Burger, vir die afname van KMR-spektra;

Die Rooibosteebeheerraad en SNO, vir finansiële ondersteuning;

Die Rooibosteebeheerraad, vir die voorsiening van plantmateriaal en hul gasvryheid tydens ons besoek aan Clanwilliam;

Mej. Lizette Joubert, vir die verskaffing van outentieke monsters en inligting, asook haar belangstelling en gasvryheid tydens besoeke aan Stellenbosch;

Mej. Michèlle Marais, wie verantwoordelik is vir alle chemiese strukture in hierdie tesis;

Mev. M. Havenga, wie verantwoordelik is vir alle tabelle in hierdie tesis;

Mev. M. Harding, vir hulp met die rekenaar;

Mede-nagraadse studente en personeel, in die besonder Thys Botha, vir die aangename gees van samewerking;

Familie, in die besonder Liezel, Kobus, Renette en Jopie vir hul belangstelling, aanmoediging en hulp;

Freddie, vir sy voortdurende onderskraging en aanmoediging;

My ouers, aan wie hierdie werk opgedra word, as geringe blyk van waardering vir hulle belangstelling, ondersteuning en opoffering tydens my studies;

My Hemelse Vader, sonder Wie ek tot niks in staat is nie.

C. Rabe

C. Rabe

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
INLEIDING	1

LITERATUURSTUDIE

1.1	<u>PLANTKUNDIGE KLASSIFIKASIE EN BOU VAN <i>Aspalathus linearis</i> (Rooibostee)</u>	2
1.1.1	Klassifikasie	2
1.1.2	Bou	3
1.2	<u>VOORKOMS, VERBOUING EN BEMARKING</u>	3
1.2.1	Voorkoms	3
1.2.2	Verbouing en bemarking	4
1.2.2.1	Ontstaan	4
1.2.2.2	Verbouing	4
1.2.2.3	Verwerking	4
1.2.2.4	Dekontaminasie	6
1.2.2.5	Bemarking	7

Hoofstuk 2:	<u>EIESOORTIGE SMAAK EN GESONDHEIDSEIENSKAPPE</u>	
	<u>VAN ROOIBOSTEE</u>	8
2.1	SMAAK EN GEBRUIKE	8
2.2	GESONDHEIDSEIENSKAPPE VAN ROOIBOSTEE	8
2.2.1	Anti-oksiderende eienskappe van rooibostee en	
	bio-anti-oksiderende voedsel	9
2.2.1 A	Bio-anti-oksiderende voedsel	9
2.2.1 B	Rooibostee in "Bio-harmonie" (B-H) en anti-oksiderende produkte (AOA)	11
2.2.1 C	Anti-oksiderende eienskappe van rooibostee	11
2.2.1 CA	Die effek van rooibostee op sommige dermatologiese siektes	12
2.2.1 CB	Beskermerende effek teen die sitotoksiteit van H ₂ O ₂	13
Hoofstuk 3:	DIE FENOLIESE INHOUD VAN ROOIBOSTEE	14
3.1	Quercetin	14
3.2	Luteolin	14
3.3	Orientin en Iso-orientin	15
3.4	Isoquercetrin	16
3.5	Rutin	17
3.6	Aspalathin	17

Hoofstuk 4:	FISIOLOGIESE EIENSKAPPE VAN FENOLTIPES UIT ROOIBOSTEE	19
4.1	ANTI-OKSIDATIEWE AKTIWITEIT	19
4.1.1	Inleiding	19
4.1.2	Inhibisie van lipiedperoksidasie en vasobeskermdende eienskappe	20
4.1.3	Preserveermiddels	23
4.2	ANTISPASMODIESE AKTIWITEIT	25
4.3	ANTI-KARSINOGENIESE EIENSKAPPE	26
4.3.1	Algemeen	26
4.3.2	Antivirus chemoterapeutiese middels	28
4.3.2.1	Effek op tirosienproteïenkinase-aktiwiteit	28
4.3.2.2	Inhibisie van omgekeerde transkriptase	29
4.4	MUTAGENITEIT	30
4.5	DIE EFFEK OP KALSIMUMVERVOERSISTEME IN SENUWEE-EINDPUNTE	34
4.6	INHIBISIE VAN <i>in vitro</i> PLASENTALE ESTROGEENSINTETASE (AROMATASE) IN BEESTE	34
4.7	VERSOETMIDDELS	35
4.8	ANTI-MIKROBIESE EIENSKAPPE	38

EKSPERIMENTEEL

<u>STANDAARD EKSPERIMENTELE METODEDES</u>	41
1. CHROMATOGRAFIESE METODEDES	41
1.1 Papierchromatografie	41
1.2 Dunlaagchromatografie (DLC)	41
1.2.1 Kwalitatiewe dunlaagchromatografie	41
1.2.2 Preparatiewe dunlaagchromatografie	41
1.3 Kolom- (KC) en mediumdrukkolomchromatografie (MPLC)	42
1.4 "Flash"-kolomchromatografie (FKC)	42
1.5 Sproeireagense	43
1.5.1 Formaldehyd-swaawelsuur	43
1.5.2 Ammonialkaliese silwernittraat	43
1.5.3 Bis-gediasoteerde bensidien	43
2. CHEMIESE METODEDES	44
2.1 Metilering met diasometaan	44
2.2 Asetilering	44
3. SPEKTROMETRIE	45

4.	AFKORTINGS	46
Hoofstuk 5:	DIE ISOLASIE VAN FENOLE UIT VERWERKTE ROOIBOSTEE	47
5.1	EKSTRAKSIE VAN DIE PLANTMATERIAAL	47
5.2	FRAKSIONERING VAN DIE ETEREKSTRAK	48
5.2.1	Fraksionering van fraksie AF 1: 4-Hidroksi-3-metoksibensoësuur (vanilliensuur) [34] en <i>p</i> -hidroksibensoësuur [35]	49
5.2.2	Fraksionering van fraksie AF 2: 4-Hidroksi-3-metoksikaneelsuur (feruliensuur) [36] en 4-hidroksikaneelsuur (<i>p</i> -kumaarsuur) [37]	49
5.2.3	Fraksionering van fraksie AF 3: 3,4-Dihidroksibensoësuur (protokatesjoësuur) [38] en 3,4-dihidroksikaneelsuur (kaffeïensuur) [39]	50
5.2.4	Suiwering van fraksie AF 5: 4',5,7-Trihidroksi- 3'-metoksiflavoon (chrysoeriol) [40]	50
5.2.5	Suiwering van fraksie AF 7: 3',4',5,7-tetrahidroksiflavoon (luteolin) [2]	51
5.2.6	Suiwering van fraksie AF 9: 3',4',5,7-tetra-asetoksi-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D-glukopiranosieloksi)-flavonol (okta- <i>O</i> -asetielisoquercetrin)	

	[6a]	51
5.2.7	Suiwering van fraksie AF 13: 3',4',5,7-tetrahidroksiflavonol (quercetin) [1]	51
5.3	FRAKSIONERING VAN DIE ETIELASETAATEKSTRAK	52
5.3.1	Fraksionering van fraksie BF 11	53
5.3.2.1	Fraksionering van die derivaat van band 1: 5-Asetoksi-3',4,7-trimetoksiflavoon (5- <i>O</i> -asetiel-3',4', 7-tri- <i>O</i> -metielluteolin) [2a]	54
5.3.2.2	Suiwering van die derivate van bande 2 en 3: 3',4',5,7- tetrametoksiflavoon (tetra- <i>O</i> -metielluteolin) [2b]	54
5.3.2.3	Suiwering van die derivate van bande 5 en 6: 4',5, 7-trimetoksi-6-(2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel-6- <i>O</i> -metiel-β-D- glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4''-tri- <i>O</i> -asetiel-4',5,6'',7-tetra- <i>O</i> -metielisovitexin) [41a]	55
5.3.2.4	Suiwering van die derivate van bande 8 en 9: 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -asetiel-β-D-glukopiranosiel)flavoon(2'',3'',4'',6''-tetra- <i>O</i> -asetiel- 4',5,7-tri- <i>O</i> -metielisovitexin) [41b] en 4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel-β-D-glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4'',6''-tetra- <i>O</i> -asetiel-4',5,7- tri- <i>O</i> -metielvitexin) [42a]	55
5.3.2.5	Suiwering van band 11 na derivatisering: 3,4-Dihidroksibensoësuur	

	[38], metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a] en metiel (3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]	56
5.3.3	Fraksionering van fraksie BF 15: 3,3',4',5,7-Penta-asetoksiflavonol (penta- <i>O</i> -asetielquercetin) [1a] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-6- β -D- glukopiranosiel flavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) [44A]	56
5.4	FRAKSIONERING VAN DIE ASETOONEKSTRAK	57
5.4.1	Fraksionering van fraksie CF 10	58
5.4.1.1	Isolasie van 3',4',5,7-tetrahidroksi-6- β -D- glukopiranosiel flavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) [44A]	58
5.4.1.2	Isolasie van 2',3,4,4',6'-penta-asetoksi-3'-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D- glukopiranosiel)dihidrochalkoon (nona- <i>O</i> -asetielaspalathin) [8b]	59
Hoofstuk 6:	ASPALATHIN: STRUKTUURBEPALING EN REAKTIWITEIT	60
6.1	Vryfenolies [8]	60
6.2	Keto-enol ewewig	61
6.3	Alternatiewe asetilering	61
6.4	Metieleterasetate	62
Hoofstuk 7:	DIVERSE STRUKTUURBEPALINGS	63

7.1	3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-(6- <i>O</i> - α -L-rhamnopiesiel- β -D-glukopiesieloksi)flavonol (Rutin) [7]	63
7.2	4',5,7-Trihidroksi-8-(4- <i>O</i> - α -L-rhamnopiesiel- β -D-glukopiesiel)flavoon (4"- <i>O</i> -rhamnosielvitexin) [45]	64
7.3	3',4',5,7-Tetrahidroksi-6- β -D-glukopiesielflavoon (Iso-orientin) [4] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-8- β -D-glukopiesielflavoon (Orientin) [3]	64
Hoofstuk 8:	SINTESE	65
8.1	Die sintese van 3,4,5-trimetoksikaneelsuur en die ooreenstemmende metielester	65
8.1.1	Suiwering van 3,4,5-trimetoksibensaldehyd [46]	65
8.1.2	Die sintese van 3,4,5-trimetoksikaneelsuur [47]	66
8.1.3	Die sintese van metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]	67
8.2	Alternatiewe sintese van metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]	67
8.2.1	Die sintese van etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [48]	67
8.2.2	Die sintese van metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]	68
8.3	Die sintese van 4-asetoksi-3,5-dimetoksikaneelsuur (4- <i>O</i> -asetielsinapiensuur) [49]	68

8.4	Die sintese van <i>trans</i> -2',3,4,4',6'-pentahidroksichalkoon, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon (eriodictyol) en 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihydrochalkoon (3-hidroksifloretin)	69
8.4.1	Die sintese van 2,4,6-trimetoksimetielasetofenoon [51]	69
8.4.2	Die sintese van 3,4-dimetoksimetielbensaldehyd [52]	70
8.4.3	Die sintese van <i>trans</i> -2',3,4,4',6-pentametoksimetielchalkoon [53]	71
8.4.4	Die sintese van 2',3,4,4',6'-pentametoksimetioldihydrochalkoon [54]	71
8.4.5	Die sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihydrochalkoon (3-hidroksifloretin) [55]	72
8.4.6	Die sintese van 3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon (eriodictyol) [56]	72

BESPREKING

INLEIDING	74
Hoofstuk 9: DIE ISOLASIE VAN FENOLE UIT VERWERKTE ROOIBOS	79
9.1 Inleiding	79
9.2 Karboksielsure	80
9.3 4',5,7-Trihidroksi-3'-metoksiflavoone (chrysoeriol) [40] en 4',7-di-asetoksi-5-hidroksi-3'-metoksiflavoone (4',7-di- <i>O</i> -asetielchrysoeriol)	

	[40a]	81
9.4	3',4',5,7-Tetrahidroksiflavoon (luteolin) [2], 5-asetoksi-3',4',7-trimetoksiflavoon (5- <i>O</i> -asetiel-3',4',7-tri- <i>O</i> -metielluteolin) [2a] en 3',4',5,7-tetrametoksiflavoon (3',4',5,7-tetra- <i>O</i> -metielluteolin) [2b]	82
9.5	3',4',5,7-Tetra-asetoksi-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D-glukopiranosieloksi)flavonol[okta- <i>O</i> -asetielisoquercetrin] [6a]	84
9.6	3',4',5,7-Tetrahidroksiflavonol (quercetin) [1] en 3,3',4',5,7-penta-asetoksiflavonol (3,3',4',5,7-penta- <i>O</i> -asetielquercetin) [1a]	85
9.7	4',5,7-Trimetoksi-6-(2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel-6- <i>O</i> -metiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2",3",4"-tri- <i>O</i> -asetiel-4',5,6",7-tetra- <i>O</i> -metielisovitexin] [41a] en 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2",3",4",6"-tetra- <i>O</i> -asetiel-4',5,7-tri- <i>O</i> -metielisovitexin] [41b]	86
9.8	4',5,7-Trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2",3",4",6"-tetra- <i>O</i> -asetiel-4',5,7-tri- <i>O</i> -metielvitexin] [42a]	89
9.9	3,4-Dihidroksibensoësuur [38], metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a] en metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]	91
9.10	3',4',5,7-Tetrahidroksi-6- β -D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihydro-iso-orientin) [44A] en okta- <i>O</i> -asetiel-2,3-dihydro-iso-orientin [44Aa]	92

9.11	2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'-β-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (aspalathin) [8] en derivate	94
9.11.1	2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosieldihidrochalkoon [8a]	95
9.11.2	Asetielderivate van die keto- (8b) en enoltoutomere (8c) van aspalathin	96
9.11.3	2',3,4,4',6'-Pentametoksi-3'-(2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel-6- <i>O</i> -metiel- β -D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (2'',3'',4''-tri- <i>O</i> -asetiel-2',3,4,4',6',6''-heksa- <i>O</i> -metielaspalathin) [8d] en 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -asetiel- β -D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (2'',3'',4'',6''-tetra- <i>O</i> -asetiel-2',3,4,4',6'-penta- <i>O</i> -metielaspalathin) [8e]	98
9.12	3',4',5,7-Tetra-asetoksi-3-[2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel-6- <i>O</i> -(2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel- α -L-rhamnopiranosiel)- β -D-glukopiranosieloksi]flavonol [deka- <i>O</i> -asetielrutin] [7a], 2'',2''',3'',3''',4'',4'''-heksa- <i>O</i> -asetiel-3',4',5,7-tetra- <i>O</i> -metielrutin [7b] en 2'',2''',3'',3''',4'',4''',5-hepta- <i>O</i> -asetiel-3',4',7-tri- <i>O</i> -metielrutin [7c]	99
9.13	4',5,7-Trihidroksi-8-(4- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (4''- <i>O</i> -rhamnosielvitexin) [45] en 4',5,7-tri-asetoksi-8-[2,3,6-tri- <i>O</i> -asetiel-4- <i>O</i> -(2,3,4-tri- <i>O</i> -asetiel- α -L-rhamnopiranosiel)- β -D-glukopiranosiel]flavoon [45a]	102
9.14	3',4',5,7-Tetrahidroksi-6- β -D-glukopiranosielflavoon (iso-orientin)	

	[4] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-8-β-D-glukopiranosielflavoon (orientin) [3]	104
Hoofstuk 10: SINTESE		106
10.1A	Metiel(3,4,5-Trimetoksi)sinnamaat [43]	106
10.1B	Metiel(3,4,5-Trimetoksi)sinnamaat [43]: Alternatiewe sintese	106
10.2	4-Asetoksi-3,5-dimetoksikaneelsuur (4- <i>O</i> -asetielsinapiensuur) [49]	108
10.3	Die sintese van 3-hidroksifloretin (2',3,4,4',6'-penta- hidroksidihydrochalkoon) [55]	110
10.4	Die sintese van 3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon (eriodictyol) [56]	111
Hoofstuk 11: NIE-VOEDENDE VERSOETMIDDELS		112
11.1	Isovanillielversoeters	115
11.1.1	Konformasionele effekte	116
11.1.2	B-ring substitusie	120
11.1.3	Hidrofobisiteit	123
OPSOMMEND		124

KERNMAGNETIESE RESONANSSPEKTROMETRIE

SAMEVATTING

VERWYSINGS

Literatuuroorsig

INLEIDING¹

Rooibostee is eie aan Suid-Afrika aangesien slegs die Sederbergstreek in die Kaap die ideale klimaat vir die kweek daarvan het. Hierdie unieke tee het 'n kenmerkende rooibruin kleur en 'n delikate, geurige smaak wat wêreldwyd al hoe gewilder word.

Groen rooibosplante moet verwerk word (sien 1.2.2.3) om die gewenste organoleptiese eienskappe (kleur, geur en smaak) te ontwikkel. Die kondisies waaronder verwerking plaasvind, bevoordeel die vorming van gewenste of ongewenste verbindings met gevolglike toenemende of afnemende kwaliteit van die produk. Kennis van die chemiese samestelling van rooibos voor verwerking, die geskiktheid daarvan as substraat vir oksidases en die chemiese samestelling na verwerking, kan lig werp op chemiese veranderinge tydens oksidasie. Sodoende sal prosesaanpassings op 'n chemiese grondslag gemaak kan word.

In die huidige ondersoek, is klem op die fenoliese inhoud van verwerkte rooibostee gelê. Die ondersoek het tot die isolasie van verskeie bensoë- en kaneelsure, asook flavone, flavonole, flavonolglukosiede, C-glikosidiese flavone, 'n dihidrochalkoon en 'n C-glikosidiese flavanoon gelei. Soos uit die literatuurstudie sal blyk, kan die fisiologiese aktiwiteit van rooibostee waarskynlik aan die teenwoordigheid van sekere geïsoleerde verbindings toegeskryf word (sien 2.2 en hoofstuk 4).

1. Om verwarring te voorkom word Engelse triviale name deurgaans behou.

LITERATUURSTUDIE

1.1 PLANTKUNDIGE KLASSIFIKASIE EN BOU VAN *Aspalathus linearis* (Rooibostee)

1.1.1 KLASSIFIKASIE

Rooibos (*Aspalathus linearis* R. Dahlgr.; sinonieme *A. contaminatus* Druce; *A. corymbosus* E. Mey.; *Borbonia piriifolia* Marl.; *Psoralea linearis* Burm.) (Peterson en Dahlgren 702, G.P. en D. 1032, Universiteit van Lund; oorspronklike eksemplaar "*Psoralea linearis*" in Burman se herbarium, Genève) is die eerste keer in 1768 deur Burman beskryf. Dahlgren het egter in 1963 die plant onder die genus *Aspalathus* geplaas en dit herbenaam as *Aspalathus linearis* (Burm. fil.) R. Dahlgr. Rooibos kan verder onderverdeel word in vier hooftipes, nl. die rooi-, vaal-, swart- en rooibruintipe. Lg. is meer algemeen en word weereens onderverdeel in die Nortier- en Sederbergtipe. Die Nortiertipe, oftewel die ekotipe *Nortieria*, is die plant wat kommersiël verbou word vir die maak van tee.

Die genus *Aspalathus* behoort aan die Fabaceae-familie en bestaan uit ongeveer 200 spesies, almal uniek aan Suid-Afrika. Slegs die spesie *A. linearis* het ekonomiese waarde.¹⁾

1.1.2 BOU

Rooibos is 'n regop of rankende substruik van 1,35 tot 2 m. Die sterk penwortelstelsel dring 2 m (of dieper) in, die takke is rooibruin en ongeveer 60 cm lank en die naaldagtige blaartjies 2 tot 6 cm. Geel blomme van die tipiese Fabaceae-vorm, is 6,5 mm lank en word in trossies gedra. Die lansetagtige vrug is 1,5 cm lank en dra 'n enkele klein, harde, geel, niervormige saad wat uitgeskiet word wanneer die vrug oopbars.

1.2 VOORKOMS, VERBOUING EN BEMARKING

1.2.1 VOORKOMS

Rooibos is inheems in Suid-Afrika en het 'n baie beperkte verspreiding. Die plant groei natuurlik in die Wes-Kaap en kom hoofsaaklik in die Seder- en Olifantsrivierbergreekse te Clanwilliam en Citrusdal voor. Die plant groei in die winterreënstreek, veral in die koeler, diep, goed gedreineerde, arm Tafelbergsandsteengronde en hoofsaaklik die koeler gronde met 'n goeie voghouvermoë.³⁾

1.2.2 VERBOUING EN BEMARKING

1.2.2.1 ONTSTAAN

Volgens die plantkundige Carl Thunberg, het Hottentotte reeds in 1772 tee gemaak van rooibosplante wat wild gegroei het.¹⁾ Barend Ginsberg, stigter van B. Ginsberg (Pty.) Ltd, Kaapstad en vandag die grootste verpakker en verspreider van rooibostee in Suid-Afrika, het in 1902 met kleinskaalse bemarking begin. In 1930 was 'n geneesheer, Pieter le Fraiss Nortier, beïndruk met die heilsaamheid van die produk en het sy vriende, Oloff Bergh en William Riordan, die eerste plantasies in die Pakhuisberge gevestig.

1.2.2.2 VERBOUING

Aanvanklik is slegs die landdrostdistrikte van Clanwilliam, Calvinia, Vanrhynsdorp en Piketberg ingesluit as produksie-areas. Kragtens Artikel 21 van die Rooibosteeskema, is die landdrostdistrikte van Ceres, Hopefield, Malmesbury, Paarl, Tulbagh en Wellington hierby gevoeg.³⁾

1.2.2.3 VERWERKING

Groen rooibostee moet net soos swarttee verwerk word om sy karakteristieke geur, smaak en kleur te ontwikkel. Die verwerkingspraktyke is gebaseer op jarelange ondervinding. Die tee word in die somer, en hoofsaaklik tussen Januarie en Maart, geoes. Vir hoë kwaliteit tee moet die aktiewe groeipunte nie langer as 30 tot 50 mm wees nie. Tydens oestyd mag daar ook geen blomme of peule aan die plant wees nie.

Die plant word op 'n hoogte van ongeveer 45 cm bo die grond afgesny, sodat beide blare en stokke geoes word. Die tee word in 3 tot 4 mm lengtes gekerf en daarna met rollers gekneus. Water word voor en na kneusing by die materiaal gevoeg sodat fenoliese stowwe van die blare ook die stokkies kan kleur. Stokkies se fenoliese inhoud is slegs 10 % van dié van die blare, sodat ekstrakte van die stokke 'n swak kleur en kwaliteit het.

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

✓ Tydens oksidasie word die gekneusde plantmateriaal in hope van 15 tot 20 cm hoog gegooi. Die hope word op 'n koue dag met sakke bedek om die oksidasieproses te onderhou. Die aanbevole temperatuur waarby fermentasie moet plaasvind is 30 °C, alhoewel dit nie die optimum is nie.⁴⁾ Tydens fermentasie verander die kleur van groen na rooi tot rooibruin. Oorfermentasie lei tot 'n bruin en later vaalbruin kleur. Goeie kleurontwikkeling vereis ook deeglike deurlugting vir goeie temperatuurverspreiding en suurstofvoorsiening. Geur wissel tydens fermentasie van 'n groen, harsagtige, spesery-agtige geur tot die gewenste soet blommegeur.

Sodra die plantmateriaal voldoende geoksideer is, word dit in lae van 1.5 tot 2 cm gegooi om te droog tot 'n voginhoud van ongeveer 10 %. Die fermentasieproses van gemiddeld 12 tot 18 uur word hierdeur beëindig. Hierna word die tee gesif. Alle fraksies groter as 40 maas en kleiner as 10 maas word uitgesif. Die nie-bemerkbare deel beslaan

ongeveer 15 tot 20 % van die oes en is saamgestel uit growwe stokke en fyn teestof.

1.2.2.4 DEKONTAMINASIE

Die teenwoordigheid van verskillende serotipes van salmonelle in rooibosteesakkies is in November 1984 deur die Gesondheidskommissie van Victoria, Australië, gerapporteer. Hierdie bevinding is gestaaf toe Holzapfel en Niemand⁶⁾ in 1985 ook *Salmonella spp.* uit rooibostee geïsoleer het.⁵⁾ Die teenwoordigheid van salmonelle in voedsel, drank en die omgewing hou 'n potensiële gesondheidsgevaar in en dekontaminasie is dus van die uiterste belang.

Die "ideale" dekontaminasieproses is aan die volgende vereistes onderworpe:

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 uitvoerbaar wees sonder hoë koste.
4. Dit moet verkieslik 'n terminale proses wees (ná finale verpakking), sodat geen herkontaminasie kan plaasvind nie.

Dekontaminasie deur radusering (*gamma*-bestraling) is in 1985 deur Holzapfel et. al.⁶⁾ gerapporteer. Die proses wat tans in gebruik is, behels stoompasteurisasie. Rooibostee blootgestel aan optimumkondisies van 92 to 95 °C vir 2 minute, gevolg deur droging by 36 tot 38 °C vir 2 minute, was vry van *Salmonella* in gevalle waar die tee by gematigde temperature (20 tot 30 °C) of 37 °C gestoor is. Tee wat by 4 °C gestoor word, het 'n 60 % kans om weer besmet te word.

1.2.2.5 BEMARKING

Die aanvraag na rooibostee het skerp toegeneem tydens die Tweede Wêreldoorlog weens die tekort aan hoë kwaliteit saad en die gevolglike bemarking van lae graad produkte. Die industrie is intussen gestabiliseer deur die stigting van die Clanwilliam Teekoöperasie in 1948 en die Rooibosteebeheerraad in 1954. Die rooibosteebedryf brei steeds uit - nie net in die plaaslike mark nie, maar ook met uitvoer na die buiteland. Die binnelandse verbruik van rooibostee het in 1990 met 12 % toegeneem ten opsigte van 1989, terwyl die buitelandse mark met sowat 66 % gegroei het. Die opswaai op die buitelandse mark is volgens Van Putten toe te skryf aan 'n nuwe uitvoerstrategie wat gevolg word (Rapport, 24 November 1991). Nuwe markte is reeds in Europa, Australië en Suid-Korea ontgin. 'n Duitse maatskappy het intussen belangstelling getoon en agente is aangestel om markte in Wes- en Sentraal-Afrika en in die Arabiese gemeenskappe in Afrika te ontwikkel. Markte is reeds in Brittanje, Spanje en Nederland gevestig. Japan is op die oomblik die grootste invoerder en in 1991 is vir die eerste keer 'n formele kontrak met die land gesluit vir uitvoer daarheen.

HOOFSTUK 2

EIESOORTIGE SMAAK EN GESONDHEIDSEIENSKAPPE VAN ROOIBOSTEE

2.1 SMAAK EN GEBRUIKE

Rooibostee het 'n kenmerkende rooibruin kleur en 'n delikate, geurige smaak. Sommige mense kla aanvanklik oor 'n "hooismaak", maar word gou lief daarvoor. Die tee kan warm of koud, met of sonder suiker, kunsmatige versoeters of heuning gedrink word. Melk, vrugtesap of suurlemoensap kan bygevoeg word en die tee kan selfs as basis vir pons gebruik word. As alternatief kan die tee ook geur word met kaneel of ander speserye.

Die gebruik van rooibostee is nie beperk tot drankies nie, maar word ook as bestanddeel in nageregte, vla, terte, koeke, brood, slaaie, bredies, souse, ens., gebruik. Die moontlikhede is onbeperk.

2.2 GESONDHEIDSEIENSKAPPE VAN ROOIBOSTEE

Rooibostee is ryk aan minerale, bevat 'n lae persentasie tannien en geen kaffeïen nie. Danksy hierdie eienskappe word rooibostee dikwels sterk aanbeveel vir senukwale, allergieë, maagkwale, nierkwale, slaaploosheid en as aptytwekker. Rooibostee bevat genoeg fluoried om antikariogeniese waarde te hê.

2.2.1 ANTI-OKSIDERENDE EIENSKAPPE VAN ROOIBOSTEE EN BIO-ANTI-OKSIDERENDE VOEDSEL

2.2.1 A Bio-antioksiderende voedsel.

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. Tydens die verteringsproses word superoksiede (O_2^- , H_2O_2 , en OH^-) deur die neutrofiele geproduseer. Oorproduksie van superoksiede kan egter ook menslike weefsel oplos en irriteer. Die liggaam word teen superoksiede beskerm deur veral superoksieddismutase (SOD), 'n ensiem wat superoksiede aanval. Die SOD kan egter in gevalle van oormatige superoksiedproduksie onvoldoende wees, veral in die geval van mans ouer as 40 jaar. Om hierdie rede is persone ouer as 40 na bewering ook meer vatbaar vir beroerte, hartaanvalle en kanker.

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

Gesondheidsbevorderende effekte van bio-anti-oksiderende voedsel sluit onder andere die volgende in:¹¹⁾

1. Algemene kwale

Neuralgie, rumatiek, jig, breintrombose, hartprobleme, hoë en lae bloeddruk, diabetes, lewermoeilikheid, atopiese dermatitis, velsiektes (sien 2.2.1 CA), aambeie en piorree.

2. Spesifieke kwale

Betzettis, Kawasaki, Crohn en Raynaud se siektes, kwaadaardige gewigrumatiek, inflammasie van die dikderm met sere, gevorderde sistemiese sklerose en spierontsteking.

3. Ander simptome

Vetsug, hardlywigheid, slaaploosheid (sien 2.2), medisinale skade, alkohol- en nikotienvergiftiging, moegheid, ens.

4. Vel en hare

Knap die vel op en bevorder gladheid en gloed, verwyder velvlekke, verleen beskerming teen sonbrand (sien 2.2.1 CA), word gebruik in kosmetiese middels, laat hare blink, voorkom verlies aan hare en vertraag gryswording.

Soos later sal blyk, word van hierdie eienskappe ook aan rooibostee toegesê. Punt 4 word ook ondersteun deur die Anique Theron

velsorgreeks met sy rooibosteebasis.

2.2.1 B **Rooibostee in "Bio-harmonie" (B-H) en anti-oksiderende produkte (AOA)**

Niwa et. al.¹¹⁾ het in 1988 rooibostee in die B-H en AOA-produkte gebruik vir hul eksperimente. Hul resultate dui daarop dat AOA en B-H-produkte die reaktiewe suurstofspesies (superoksiede) effektief vasvang en lipiedperoksidase en *in vivo* inflammatoriese edeem in rotte inhibeer. Hierdie produkte verlaag verder ook serumlipiedperoksiedvlakke en verminder die aktiwiteit van chroniese inflammatoriese kwale. Die vermindering van lipiedperoksiede aan die binnewande van die arteries en gevolglike verbeterde bloedsirkulasie lei ook tot die verligting van sekere tipes nefritis en hepatitis, hardlywigheid, ens.

'n Japanese farmaseutiese maatskappy is tans besig om die aktiewe verbindings in AOA en B-H te identifiseer.¹¹⁾

2.2.1 C **Anti-oksiderende eienskappe van rooibostee**

Yoshikawa et. al.¹⁴⁾ het in 1990 getoon dat 'n rooibostee-ekstrak, net soos askorbiensuur, superoksiedradikale vasvang sonder om die respiratoriese aktiwiteit van menslike polimorfonukleêre leukosiete te affekteer.

2.2.1 CA Die effek van rooibostee op sommige dermatologiese siektes

Talle inflammatoriese velsiektes hou verband met aktiewe suurstof (AO) of vryradikale. Soos reeds gesê is superoksied-dismutase die liggaam se natuurlike verdedigingsmeganisme teen superoksiede. Abnormale produksie van superoksiede kan egter die aktiewe konsentrasie van die SOD oorskry. Dit is bewys dat rooibostee soos SOD funksioneer sonder enige nuwe-effekte. Volgens Shindo et al.¹²⁾ is rooibostee getoets vir die volgende effekte:

1. Virusinfeksies

Rooibostee het die periode tussen aanvalle van *herpes simplex* verleng. Sommige individue wie aan die ongeneeslike *verruca plane juvenilis* of *verruca vulgaris* gely het, se *verruca* het binne 'n week verdwyn.

2. Jeuksiekte met inflammasie (atopiese dermatitis)

Rooibostee verlig die simptome van *prurigo nodularis*.

3. Siektes met ingefiltreerde neutrofiële

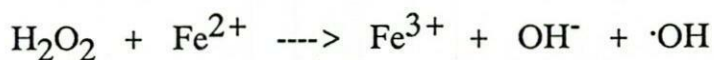
Rooibostee verminder die voorkoms van ongeneeslike herhaalde aftose in die geval van Behcet se siekte. In die geval van *acne postulosa* verminder rooibostee verstopping, terwyl 'n rooibostee-aanvulling tot terapie van steroïedgeïnduseerde dermatitis die behandeling se effek versnel.

4. Fotosensitiwiteit

UV-bestraling produseer AO en lei tot fotosensitiwiteit. Hierdie toestand kan onder milde kondisies deur rooibostee beheer word.

2.2.1 CB Beskermende effek teen die sitotoksiteit van H₂O₂

Muis leukemieselle, L5178Y, is met 'n rooibostee-ekstrak behandel voor H₂O₂ toediening. Ito et. al.¹³⁾ se resultate het daarop gedui dat hierdie voorafbehandeling met rooibostee die selle modifiseer sodat hulle meer verdraagsaam is ten opsigte van oksidatiewe spanning. Die sitotoksiteit van H₂O₂ kan toegeskryf word aan die vorming van die ·OH-radikaal *via* die Fenton-reaksie in teenwoordigheid van metaalione¹³⁾:



Die effektiewe komponente in die tee-ekstrak word nog ondersoek.¹³⁾

HOOFSTUK 3

DIE FENOLIESE INHOUD VAN ROOIBOSTEE

Die fenoliese samestelling van rooibostee is 'n feitlik onontginde terrein. In skerp kontras met 238 vlugtige verbindings¹⁵⁾ wat in rooibos geïdentifiseer is, is slegs sewe fenoliese verbindings bekend. Twee van hierdie verbindings, nl. quercetin en luteolin, is uit verwerkte rooibostee geïsoleer, terwyl die res uit gedroogde groen plantmateriaal geïsoleer is.

Slegs twee aglikone, nl. quercetin ('n flavonol) en luteolin ('n flavoon), is tot dusver geïsoleer.

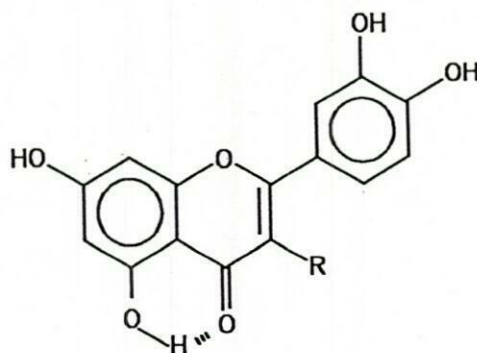
3.1 QUERCETIN [1]

sin ook p 25

Quercetin (1) is in 1974 vir die eerste keer uit rooibostee geïsoleer.¹⁶⁾ Die verbinding is suiwer verkry as 'n penta-asetaat na asetilering. Die smeltpunt, sowel as die infrarooi- en ultravioletspektra, het ooreengestem met dié van 'n outentieke monster. Massa- en KMR-spektrometrie het die toegekende struktuur bevestig.

3.2 LUTEOLIN [2]

Snyckers en Salemi¹⁶⁾ was ook die eerste om luteolin (2) uit rooibostee te isoleer. Luteolin is as die tetra-asetaat gekarakteriseer en die struktuur is weereens op smeltpunt-, infrarooi-, ultraviolet-, massaspektrometrie en KMR-data gegrond.



1. R = OH

2. R = H

3.3 ORIENTIN [3] EN ISO-ORIENTIN [4]

Twee C-glikosidiese flavonoïede, nl. orientin (3) (voorheen lutexin) en iso-orientin (4) (voorheen homo-orientin en lutonaretin), is uit rooibostee geïsoleer.¹⁷⁾

Die strukture van hierde verbindings is gebaseer op perjoodsuur- en ferrichloriedoksidasie van die tetrametieleters, sowel as KMR-spektroskopie.¹⁸⁾

Koeppen¹⁸⁾ en Hörhammer²⁴⁾ het gevind dat glikosiede [3] en [4] in warm, verdunde, waterige suurmedia interomskakelbaar is, moontlik as gevolg van 'n Wessely-Moser herrangskikking van die flavoonskelet. Aangesien dit bekend is dat die Wessely-Moser herrangskikking slegs kan plaasvind indien 'n 5-hidroksigroep vry is, word die moontlikheid van so 'n meganisme in die geval van glikosiede [3] en [4] bevestig deur die feit dat die betrokke 3',4',5,7,-tetrametieleters nie interomskakelbaar is nie, maar die 3',4',7-trimetieleters wel.¹⁸⁾

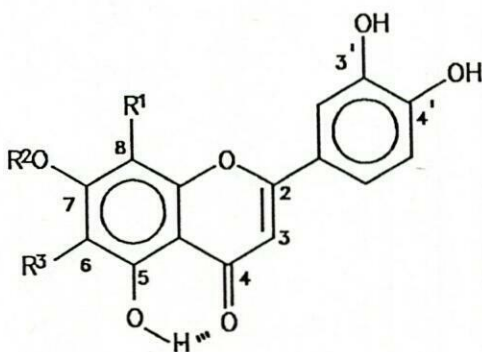
Orientin (8-C-β-D-glukopiranosieluteolin) en iso-orientin (6-C-β-D-

glukopiranosieluteolin) is oorspronklik in 1958 uit *Polygonum orientale* (Polygonaceae) deur Hörhammer et al. geïsoleer.²⁴⁾ Beide glikosiede [3] en [4] is hidroliseprodukte van lutanarin (7-O-glukosieliso-orientin) [5], 'n O-glukosied deur Seikel en Bushnell (1959) uit *Hordeum vulgare* (Graminae) geïsoleer.²⁴⁾

Chopin et al. het in 1966 die 6-C-β-D-glukopiranosieluteolinstruktuur van iso-orientin ook deur sintese bevestig.²⁴⁾

3.4 ISOQUERCETIN [6]

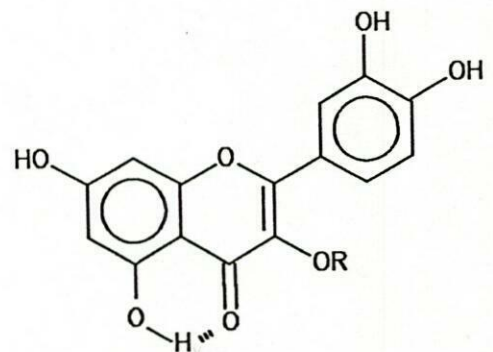
Iso-quercetin (6) (quercetin-3-glukosied), 'n flavoonglikosied, is in 1959 uit rooibostee geïsoleer.¹⁹⁾ Die struktuur is toegeken deur die tweedimensionele papierchromatografiese R_f-waarde en kleurreaksies van die natuurmonster, sowel as dié van die suurhidroliseprodukte, met dié van 'n outentieke monster te vergelyk. Die UV-spektrum, gemengde smeltpuntbepaling, die bereiding van metieleters en die gravimetriese bepaling van die suiker:aglikoon verhouding, het bg. afleiding ondersteun.¹⁷⁾



3. R¹ = glukose, R² = R³ = H

4. R³ = glukose, R¹ = R² = H

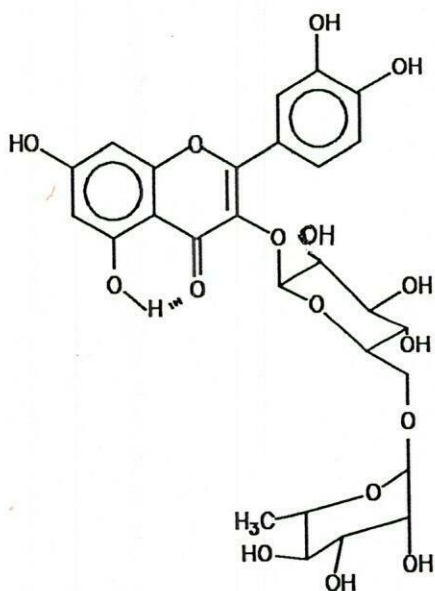
5. R² = R³ = glukose, R¹ = H



6. R = glukose

3.5 RUTIN [7]

Rutin (7) (quercetin-3-rhamnoglukosied) is 'n flavonolglukosied met 'n disakkaried, rutinose, as substituent. Die identiteit van die natuurlike monster is weereens deur die bepaling van twee-dimensionele papierchromatografiese Rf-waardes, kleurreaksies en die identifikasie van die produkte van suurhidrolise, bevestig. Die ultravioletspektrum het bg. resultate ondersteun.¹⁹⁾ Verdere bewyse vir die struktuur is verkry deur bepaling van die gemengde smeltpunt, deur die bereiding van metieleters en die gravimetriese bepaling van die suiker:aglikoon verhouding.¹⁷⁾



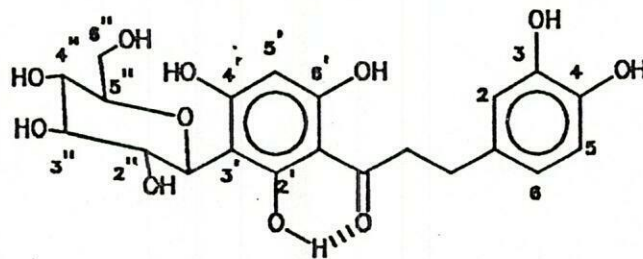
7.

3.6 ASPALATHIN [8]

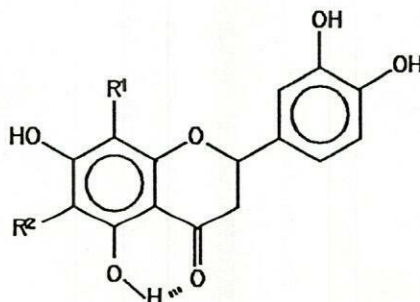
Aspalathin is 'n C-glikosidiese dihidrochalkoon waarvan die voorkoms tot

duisver uniek aan rooibostee is. Hierdie verbinding is die hoof fenoliese komponent van die groen plantmateriaal²⁰⁾ en alhoewel die verbinding reeds in 1959 geïsoleer is¹⁹⁾, is die struktuur eers in 1965 bepaal.^{21,23)} Die struktuur is toegeken op grond van die resultate van alkalismelting, UV- en IR-spektrometrie, perijoodsuuroksidasie en boorhidriedreduksie, permanganaatoksidasie, suurhidrolise en ferrichloriedoksidasie. ¹H KMR-studies het die struktuurtoekenning bevestig.

Aspalathin is bekend vir sy onstabiliteit.²²⁾ 'n Betekenisvolle reaksie van aspalathin behels die vorming van 2,3-dihidro-orientin [9] en 2,3-dihidro-iso-orientin [10] wanneer 'n etanoliese oplossing van aspalathin aan sonlig blootgestel word. 2,3-Dihidro-iso-orientin het voor 2,3-dihidro-orientin begin vorm en geen reaksie het plaasgevind in 'n lugdigverseëlde reaksiefles nie. Die resultate is aan moontlike fotochemiese oksidasie toegeskryf.²³⁾



8-

9- R¹ = glukose, R² = H10- R² = glukose, R¹ = H

HOOFSTUK 4

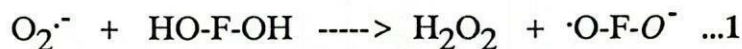
FISIOLOGIESE EIENSKAPPE VAN FENOLTIPES UIT ROOIBOSTEE

4.1 ANTI-OKSIDATIEWE AKTIWITEIT

4.1.1 INLEIDING

Suurstofafgeleide spesies, soos die superoksiedradikaal ($O_2^{\cdot-}$) en hidroksielradikaal ($\cdot OH$), kan weefselskade veroorsaak deur die oksidatiewe degradasie van proteïene, onversadigde lipiede, koolhidrate en nukleïensure.²⁵⁾ Ondersoek word ingestel na anti-oksidatiewe middels wat nie net die rakleef tyd van voedsel sal verleng nie, maar ook radikale in lewende organismes sal vernietig. Die anti-oksidatiewe aktiwiteit van natuurlike verbindings, o.a. flavonoïede, geniet tans aandag.²⁵⁾

Hierdie aktiwiteit van flavonoïede [$F(OH)_2$] kan in die geval van die superoksiedradikaal, $O_2^{\cdot-}$, as volg voorgestel word:



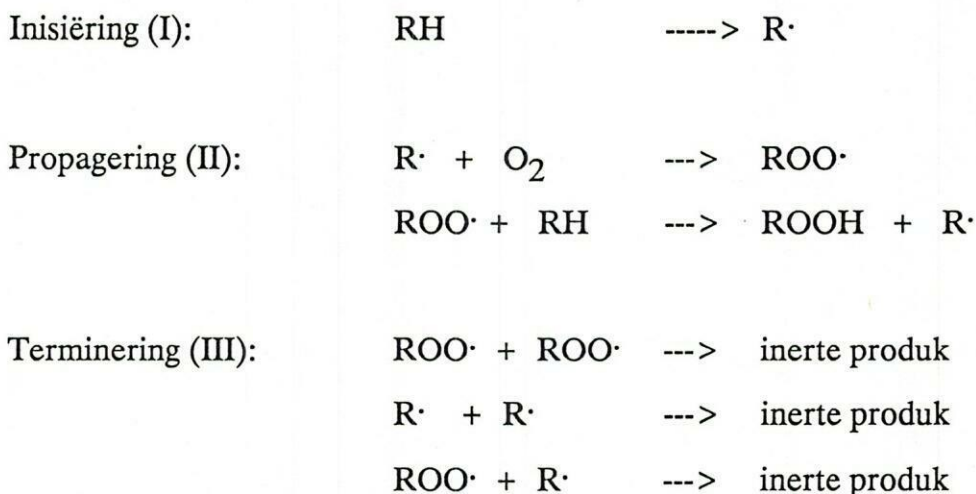
Reaksie (1) is in kompetisie met die spontane dismutasie van $O_2^{\cdot-}$:



Uit vergelyking (2) volg dat spontane dismutasie stadiger by hoër pH's plaasvind. Die anti-oksidatiewe flavonoïed se vermoë om $O_2^{\cdot-}$ te vernietig, is dus groter by 'n hoër pH.

4.1.2 INHIBISIE VAN LIPIEDPEROKSIDASIE EN VASOBESKERMENDE EIENSKAPPE

Poli-onversadigde vetsure in die membrane word maklik ensimaties en deur oksidatiewe peroksidase *via* vryradikaalkettingreaksies geoksideer:²⁷⁾

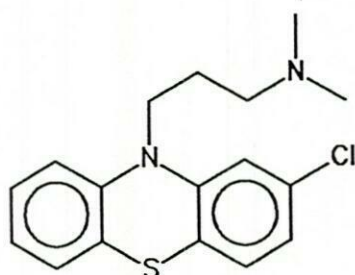


Die inisiëring van lipiedperoksidase (I) kan deur biologies genereerde vryradikale ($O_2^{\cdot-}$; $\cdot OH$) en singulet suurstof (1O_2) geïnduseer word.

Getuienis dui daarop dat quercetin [1], luteolin [2] en rutin [7] effektiewe inhibitore van superoksiedanione is.²⁶⁾

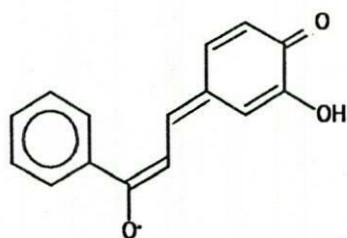
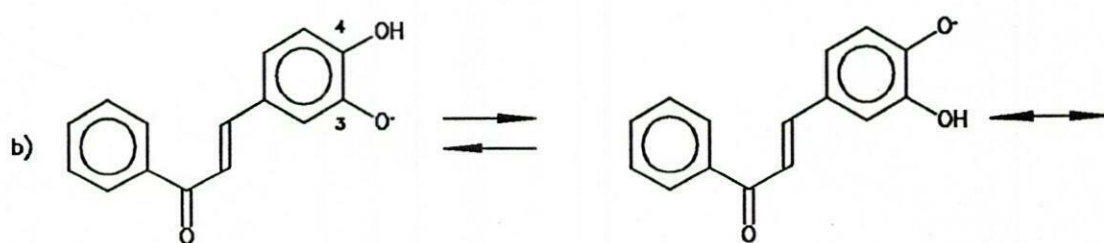
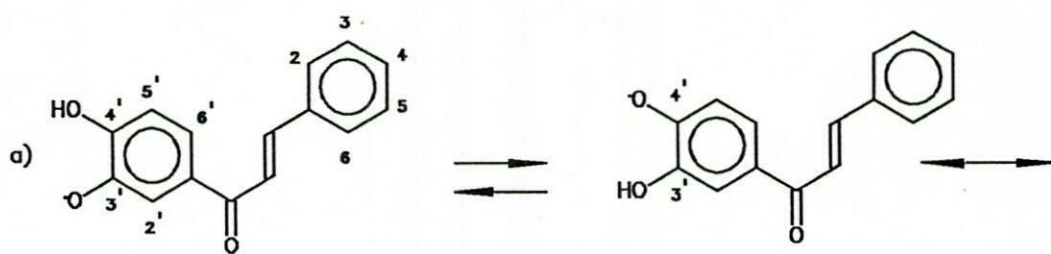
Daar word gespekuleer dat flavonoïede superoksiedanione, wat die kettingvryradikaalreaksies inisiëer, vasvang en sodoende lipiedoksidase verhoed. Hierdie meganisme van anti-oksidatiewe aktiwiteit verskil van dié van sintetiese anti-oksidente soos gebutileerde 4-metoksifenol of chlorpromasien [11], wat hidroksielradikale vasvang. Sintetiese anti-oksidente funksioneer dus op 'n "laer vlak" (sien die Fenton-reaksie, 2.2.1 CB). Die unieke tipe anti-oksidatiewe aktiwiteit van flavonoïede kan 'n

moontlike verklaring vir die vasobeskerende eienskappe van flavonole soos quercetin bied. Hierdie verbindings se werking is orgaangerig deur selektiewe binding aan trombosiete. Flavonole verwyder superoksiedanione uit die omgewing van die wandtrombi aan die vaatwande en verleng dus direk die halfleefyd van die endoteelafgeleide ontspanningsfaktor (EDRF). In hierdie proses word prostasikliensintetase ook indirek teen vernietiging (deur hidroksielradikale en lipiedperoksidases) beskerm.

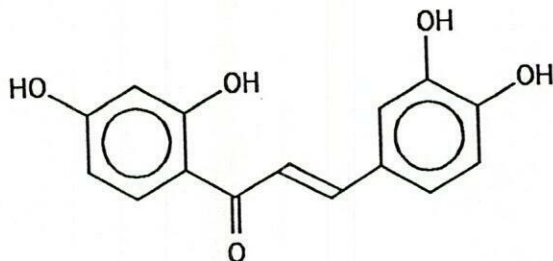


11.

Verskeie polihidroksichalkone en flavanone is potente anti-oksidente vir varkvet.²⁸⁾ Chalkone met 'n 3,4-hidroksileringspatroon toon groot potensiaal as anti-oksidente, moontlik agv. die vorming van resonansgestabiliseerde vryradikale (SKEMA 1). Die "verlengde" resonansvorm (b) sal noodwendig meer stabiel as vorm (a) wees en verklaar dus die groter anti-oksiderende aktiwiteit van 3,4-dihidroksichalkone in vergelyking met 3',4'-dihidroksichalkone. Buteïn [12] is byvoorbeeld drie maal meer aktief as luteolin. Alhoewel chalkone algemeen in ewewig met flavanone voorkom, is gevind dat chalkone meer effektief is as die ooreenstemmende flavanone.²⁸⁾



SKEMA 1



12.

4.1.3 PRESERVEERMIDDELS

Die oksidatiewe verbruining van polifenole in voedselsisteme is algemeen bekend. Twee tipes verbruiningsreaksies kom voor, nl.

1. Ensimatiese oksidasie

Ensimatiese oksidasie kom hoofsaaklik in vars vrugte en vrugtesappe voor, asook tydens die vroeë verwerkingsstappe wanneer polifenoloksidase nog teenwoordig is.

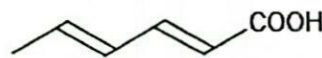
2. Nie-ensimatiese outoksidase

Nie-ensimatiese outoksidase kom in verwerkte voedsel voor nadat polifenoloksidase verwyder of gedeaktiveer is. Substansiële oksidasie

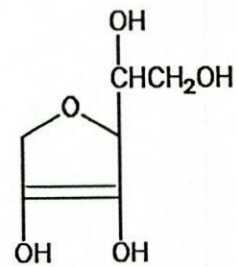
kan binne 'n paar uur in die teenwoordigheid van suurstof by pH 8,0 of ná langdurige opberging onder suurstoftoestande, selfs by lae temperature, plaasvind.²⁹⁾

Anti-oksidente het dus 'n belangrike funksie by die vervaardiging, verpakking en opberging van voedsel. Swaweldioksied, bensoësuur en sorbiensuur [13], word algemeen as preserveermiddels gebruik. Wetgewing beperk egter die gebruik van sulke anti-oksidente - SO_2 beïnvloed byvoorbeeld die produk se smaak en lei ook tot hipersensitiewe reaksies by sekere asmalyers.³¹⁾ Dit is dus wenslik om 'n geskikte plaasvervanger te verkry.

Alhoewel die effektiwiteit en biologiese impak van fenoliese anti-oksidente reeds geëvalueer is, is die effekte van hulle interaksie met voedselkomponente tydens verwerking nog nie deeglik bestudeer nie.³⁰⁾ Kohna³²⁾ het die potensiaal van die wateroplosbare anti-oksidente L-askorbiensuur (vitamien C) [14], D-iso-askorbiensuur [15], gallussuur, sorbiensuur [13] en 3,4-dihidroksibensoësuur om $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$ en/of $\text{RO}\cdot$ vas te vang, beskryf.



13.



14.

Die anti-oksiderende eienskappe tov. $O_2^{\cdot-}$ neem in die volgorde D-iso-askorbiensuur > gallussuur > L-askorbiensuur > 3,4-dihidroksibensoësuur >> sorbiensuur, af. Vir $\cdot OH$ is die potensiaal van die anti-oksidente in afnemende volgorde D-iso-askorbiensuur > L-askorbiensuur >> gallussuur \approx 3,4-dihidroksibensoësuur \approx sorbiensuur \approx 0 %. Vir $RO\cdot$ is die volgorde gallussuur > 3,4-dihidroksibensoësuur >> sorbiensuur >> L-askorbiensuur \approx D-iso-askorbiensuur = 0 %. In die geval van $ROO\cdot$ het slegs 3,4-dihidroksibensoësuur anti-oksiderende eienskappe getoon.

Kaffeïensuur kan as model vir die oksidatiewe verbruiningsreaksies dien, aangesien chlorogeensuur [16] en kaftaarsuur (kaffeoïeltartaarsuur) die hoof fenole in vrugtesap is. Lg. word deur pektinase gehidroliseer tot kaffeïensuur.³³⁾

Volgens die meganisme gepostuleer vir die oksidatiewe koppelingsreaksies van kaffeïensuur (SKEMA 2), word 'n fenolaatanioon in 'n alkaliese medium gevorm.²⁹⁾ Die fenolaatanioon reageer direk met tripletsuurstof deur ladingsoordrag om semikinone te vorm. Tripletsuurstof vorm in hierdie proses 'n superoksiedradikaal, terwyl die gevormde semikinone deur koppelingsreaksies verskillende struktuurisomeriese dimere vorm.

4.2 ANTISPASMODIESE AKTIWITEIT

Quercetin is die hoof *in vitro* aktiewe komponent van rooibostee en is welbekend vir sy antispasmodiese aktiwiteit.¹⁶⁾ Rooibostee is op sy beurt weer vir sy sogenaamde "anti-allergiese" effek bekend, hoofsaaklik weens die verligting van braking en diarree by babas. Aangesien hierdie verligting

deur gastro-intestinale antispasmodiese werking teweeg gebring word, kan die "anti-allergiese"-eienskap van rooibostee hoofsaaklik aan quercetin toegeskryf word.^{16,1)} Luteolin, wat ook antispasmodiese aktiwiteit besit, mag egter ook 'n bydrae lewer.¹⁶⁾

4.3 ANTIKARSINOGENIESE EIENSKAPPE

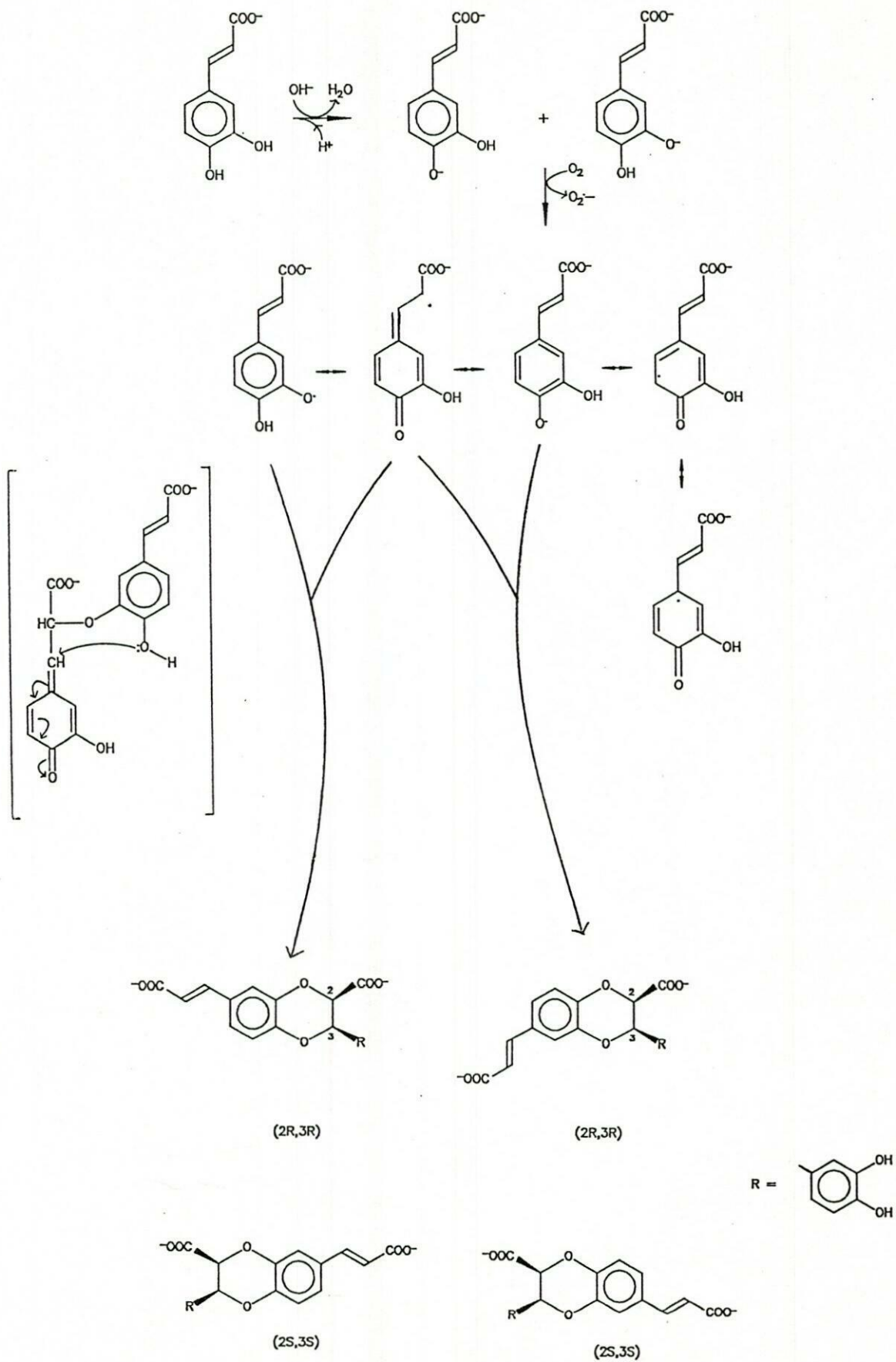
4.3.1 ALGEMEEN

Gereelde inname van groente, vrugte en groen tee, verminder die risiko van verskeie kankers in mense.³⁴⁾ Hierdie effek kan toegeskryf word aan die teenwoordigheid van spesifieke fenole en polifenole, o.a. quercetin.

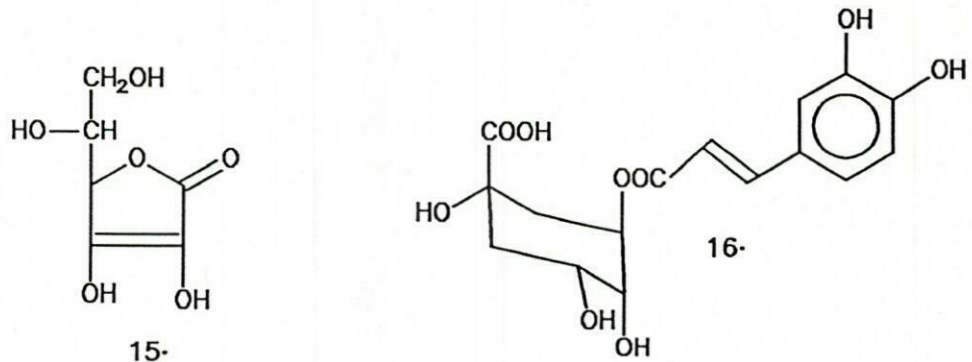
Reaktiewe suurstofintermediêre, insluitend H_2O_2 , is in muise se velle gevind tydens die ontwikkeling van veltumors. Hierdie intermediêre speel waarskynlik 'n belangrike rol in die karsinogeniese proses. Na verwagting behoort sekere flavonoïede 'n heilsame invloed in hierdie verband te hê (sien 4.1.1)

Dit is ook bekend dat kolonneoplasia in muise deur beide quercetin en rutin geïnhibeer word en dat uvaretin [17], 'n dihydrochalkoon, die *P*-388 (3PS) limfotiese leukemietoetsstelsel inhibeer.³⁵⁾

Alhoewel heelwat getuienis bestaan dat flavonoïede en ander polifenole 'n beskermende effek teen kanker het, is die meganisme van werking nog onbekend. Voorlopige resultate dui daarop dat flavonoïede in sommige gevalle die opname van 'n karsinogeen met tot 20 % verlaag. Sekere flavonoïede mag 'n dubbele beskermingsrol hê deurdat hulle beide die bio-beskikbaarheid van karsinogene en die biotransformasie daarvan in die lewer, beïnvloed.³⁴⁾



SKEMA 2

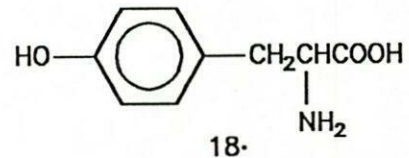
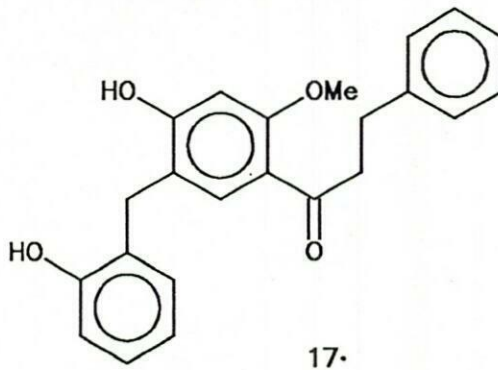


4.3.2 ANTIVIRUS CHEMOTERAPEUTIESE MIDDELS

4.3.2.1 EFFEK OP TIROSIENPROTEIENKINASE-AKTIWITEIT

Tirosienproteïenkinase word geassosieer met onkogene produkte van die retrovirus *src*-geenfamilie. Die kinase-aktiwiteit is nou gekorrelleer met retrovirusse se vermoë om selle te omvorm, aangesien virusmutante sonder tirosienkinase-aktiwiteit nie kwaadaardige transformasie kan bewerkstellig nie. Soortgelyke kinase-aktiwiteit word ook met die sellulêre reseptore vir groeifaktore, soos epidermale groeifaktor (EGF), insulien, ens., geassosieer. Dit word dus aanvaar dat tirosien- [18]-fosforilering 'n belangrike rol in verskeie selfunksies, seldifferensiasie en kwaadaardige transformasie speel. Die effek van verskeie isoflavone, flavone en flavonole op tirosienproteïenkinase-aktiwiteit van die EGF-reseptor is bestudeer. Hieruit kan afgelei word dat 'n hidroksigroep op die 5-posisie noodsaaklik vir inhibitoriese aktiwiteit is, moontlik vir chelering met die *peri*-karbonielgroep.⁴⁴⁾

Verplasing van die hidroksigroepe op die 7- en 4'-posisies met 'n metoksi- of O-glukosegroep, het ook tot 'n drastiese afname in aktiwiteit gelei. Hidroksilering van die 7- en 4'-posisies is dus noodsaaklik vir maksimale aktiwiteit. Dit blyk verder dat die 3-hidroksigroep noodsaaklik mag wees vir die inhibisie van tirosienproteïenkinase, terwyl onduidelikheid bestaan oor die rol van die 3'-hidroksigroep.⁴⁴⁾



Dit is gevind dat quercetin tirosienproteïenkinase sterk inhibeer, maar aktiwiteit t.o.v. ander ensieme soos cAMP-afhanklike proteïenkinase, fosforilase-kinase, Na^+ , K^+ -ATPase ens., is ook waargeneem.^{42,43)}

4.3.2.2

INHIBISIE VAN OMGEKEERDE TRANSKRIPTASE

Omgekeerde transkripsie is 'n deurslaggewende stap in die replisering van retrovirusse en omgekeerde transkriptase speel hier 'n vername rol. Inhibitore van omgekeerde transkriptase mag dus kandidate vir antiviruse chemoterapeutiese middels wees.

Die struktuurvereistes vir inhibitore van omgekeerde transkriptase verskil heelwat van dié vir tirosienproteïenkinase. Alle flavonole met potensiële inhibitoriese aktiwiteit t.o.v. AMV ("avian myeloblastosis" virus)-omgekeerde transkriptase, het 'n 3,3',4'-hidroksileringpatroon gehad. Quercetin het bv. betekenisvolle inhibisie getoon. Flavone met

die hidroksigroep op die 6- of 8-posisies toon 'n milde inhibisie. In hierdie geval lewer die 5-, 7- en 4'-hidroksigroepe egter geen bydrae tot die inhibisie van omgekeerde transkriptase nie.⁴⁴⁾

Dit blyk dat die struktuurvereistes vir inhibitore vir AMV-omgekeerde transkriptase in twee groepe ingedeel kan word, nl.

1. die 3-hidroksigroep
2. twee of drie hidroksigroepe op aangrensende posisies in die aromatiese ring (5,6,7-tri-, 7,8-di-, 2',3',4'-tri- of 3',4'-dihidroksistruktuur).

Inouye⁴⁴⁾ het gepostuleer dat verbindings waarvan die struktuur aan een van hierdie vereistes voldoen, matige inhibitore is, terwyl verbindings wat aan albei vereistes voldoen, sterk inhibitore behoort te wees. Die moontlikheid dat die teenwoordigheid van 'n 3'-hidroksigroep alleen voldoende potensiële inhibitoriese aktiwiteit aan die verbinding verleen, kan egter nie uitgesluit word nie - die eksperimentele reeks verbindings wat gekies is, was sodanig dat alle flavonole wat aan beide struktuurvereistes voldoen het, 'n 3',4'-hidroksileringspatroon gehad het, terwyl geen flavoon met hierdie hidroksileringspatroon getoets is nie.

4.4 MUTAGENITEIT

Dit word algemeen aanvaar dat die meeste kankers deur omgewingsfaktore beïnvloed kan word.³⁹⁾ Aangesien baie karsinogene mutagenies is, heers daar groot besorgdheid oor die mutagene, o.a. flavonole, in voedsel.

Na beraming is die daaglikse menslike flavonoïedinnname ongeveer 1 g, waarvan 50 mg waarskynlik flavonole is. Hierdie konsentrasie is voldoende vir bakteriese mutageniteit. Alhoewel dit bekend is dat mikrobiëse glikosidases aglikone in die laer intestinum vrystel, is dit moeilik om die werklike konsentrasies te voorspel weens die degradasie van die flavonolring. Die beskikbaarheid van hierdie data sal dit moontlik maak om flavonole se potensiaal om selpopulasies *in vivo* te beskadig, te definieer. Sodoende kan die potensiële gesondheidsgevaar geassosieer met flavonole in die dieet geëvalueer word.³⁷⁾

Alhoewel voorheen aanvaar is dat slegs flavonole mutagenies is, het latere werk daarop gedui dat flavone met 'n hidrokxi- of metoksigroep op die 8-posisie, ook aktief is. Verdere ondersoek het getoon dat chromoon- en asetofenoonderivate met trihidroksisubstitusie by posisies analoog aan die 5-,7- en 8-posisies van die flavoon, 'n soortgelyke, maar effens swakker mutageniteit vertoon.⁴⁰⁾ Dit blyk dus dat die strukturele vereistes vir mutageniteit die B-ring uitsluit. Die arielketoonmoïeteit blyk egter essensieel te wees, aangesien 2',4',5'-trihidroksi-asetofenoon mutageniese aktiwiteit in *Salmonella typhimurium* vertoon, maar 1,2,4-trihidroksibenseen nie. Die verlaagde aktiwiteit van chromone en asetofenone in vergelyking met flavone kan aan verskeie faktore toegeskryf word. Een hipotese is dat die teenwoordigheid van die flavoonfenielmoïetiet binding of biologiese vervoer mag beïnvloed en ook 'n steriese effek op die DNA-struktuur mag hê.⁴⁰⁾

Carver et al.³⁷⁾ het die genotoksiteit van quercetin in die eierselle van die Chinese marmot ondersoek. Dit is bevind dat quercetin sitotoksies is en ook verantwoordelik is vir chromosoomopbreking. Betekenisvolle mutasie

het by die timidienkinaselokus (*tk*-lokus) plaasgevind, terwyl geen lokusspesifieke mutasie by die *aprt*- (adenienfosforibosieltransferase), *hgprt*- (hipoxantien-guanidienfosforibosieltransferase) en ATPase-loki plaasgevind het nie en die dogterchromatieduitruilingstempo slegs effens toegeneem het. Hierdie mutasiepatroon is soortgelyk aan dié van ioniese bestraling. Lg. veroorsaak 'n betekenisvolle toename in die afbraak van DNA en chromosoomafwykings, maar het 'n minder drastiese effek op dogterchromosoomuitruiling en lokusspesifieke mutasie.

Dit is ook bekend dat quercetin 'n toename in *tk*-mutante in L5178Y limfgewasselle van muise induseer, moontlik weens chromosoomveranderinge.³⁷⁾ Getuienis dui ook daarop dat quercetin mutagenies in *Drosophila* is.⁴⁵⁾

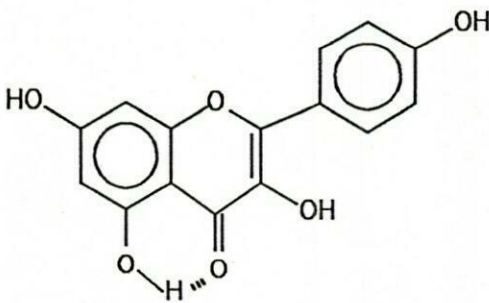
Volgens Pamukcu et al.⁴⁶⁾ het 'n 0,1 % dieetvlak van quercetin tot 'n hoë voorkoms van ileale tumors in rotte gelei. Sahu et al.⁴⁷⁾ het gerapporteer dat quercetin 'n hoë frekwensie mikronukleï in beenmurgeritrosiete van muise induseer. Hierdie resultate verskil egter van dié van Mac Gregor et al.³⁸⁾

Verdere werk het getoon dat die toename in die mutageniteit van takana ('n groentesoort) tydens die pekelproses geassosieer word met 'n toename in die quercetin- en kaempferol- [19] konsentrasies.³⁹⁾ *Salmonella typhimurium* is as toetsorganisme gebruik. Alhoewel die "pekelmeganisme" onbekend is omdat dit 'n fermentasieproses is, word gepostuleer dat flavonolglykosiede deur ensieme in die plant of deur mikroorganismes, gehidroliseer word. So 'n meganisme sal die toename in mutageniteit met toename in flavonolkonsentrasie verklaar, aangesien flavonolglykosiede nie mutagenies is nie.^{39,48)}

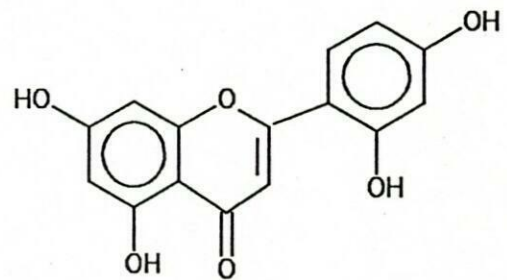
Quercetin is ook in hoofsaak vir die mutageniteit van rooi wyne verantwoordelik. Mutageniteit neem toe met masserering (sien ook die pekelproses van takana), maar neem af met veroudering.⁴¹⁾

4.5 DIE EFFEK OP KALSIUMVERVOERSISTEME IN SENUWEE-EINDPUNTE

Kalsiumvervoer-ATPase van die sinaptosomale blasies word deur quercetin geïnhibeer met gevolglike inhibisie van beide die vervoer van kalsium en die hidrolise van ATP. Morin [20] en rutin was minder effektief. Quercetin het ook die ATP-bemiddelde fosforilering van die sinaptosomale blasieproteïene geïnhibeer, terwyl rutin en morin weereens feitlik geen effek gehad het nie. Verdere ondersoek het daarop gedui dat die bindings se relatiewe aktiwiteit van hul vermoë om die lipiedmembraan te penetreer en die toeganklikheid van die proteïene in die membraan, afhang.⁴⁹⁾



19.

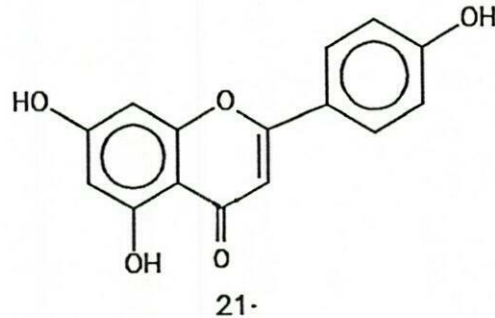


20.

4.6 INHIBISIE VAN *IN VITRO* PLASENTALE ESTROGEENSINTETASE (AROMATASE) IN BEESTE

Verskeie flavone, o.a. apigenin [21], se effek op die vermoë van beeste se fetale plasentale weefsel om ³H-androsteendioon vir estrogeensintese te gebruik, is ondersoek. 50 % Inhibisie (IC₅₀) van aromatisering is vir 2,64 μM apigenin en 35 nM androsteendioon waargeneem. Kinetiese resultate dui daarop dat die inhibisie aan kompetisie vir die substraatbindingsposisie

van die aromatase ensiem toegeskryf kan word. Vanweë die belangrikheid van estrogene vir die voortplanting en ontwikkeling van beeste en die teenwoordigheid van flavone in voedselbronne, mag die ondersoek na die *in vivo* effek van flavone op estrogeenbiosintese van groot waarde wees.



4.7 VERSOETMIDDELS

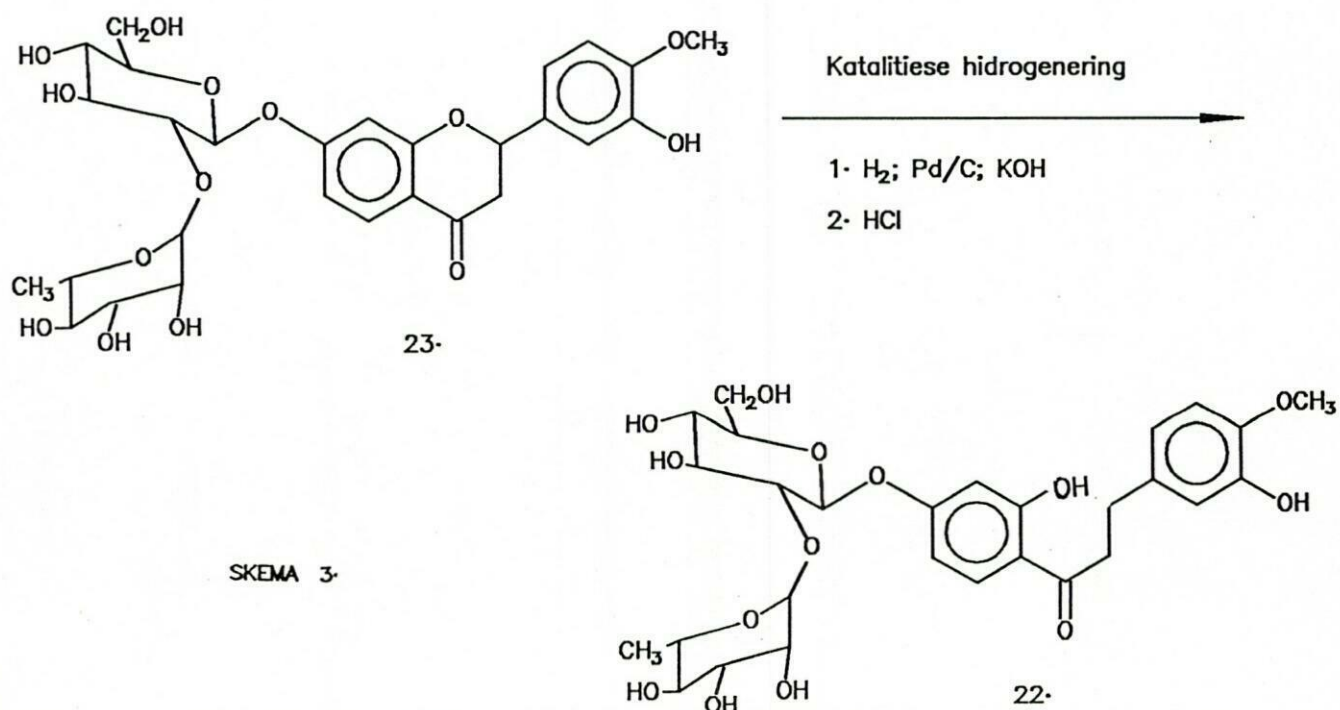
Beide natuurlike en sintetiese dihydrochalkone besit potensiaal as versoetmiddels.⁵⁰⁾

Neohesperidiendihydrochalkoon (NHDC) [22], is 'n potente versoeter wat by lae konsentrasies aansienlik soeter as sukrose is.⁵¹⁾ Die relatiewe soetheid van NHDC neem, net soos dié van ander intense versoeters, af met toename in konsentrasie. Die verbinding is stabiel oor 'n wye pH- en temperatuurgebied en kan in voedsel en drankies gebruik word. Benewens sy soet smaak, het NHDC ook smaakbevorderende eienskappe deur die oorheersing van bitter en sout komponente in voedsel. Vanweë NHDC se

talmende nasmaak, word dit normaalweg in lae konsentrasies saam met ander versoeters gebruik. Die Wetenskaplike Komitee vir Voedsel van die Europese Gemeenskappe het in 1987 'n daaglikse toelaatbare inname van 5 mg/kg liggaamsmassa aan NHDC toegeken. Hierdie stap het die weg gebaan vir die bemerking van die versoeter. NHDC word reeds in België as intense versoeter in kougom (tot 400 mg/kg) en in limonades (tot 20 mg/kg) toegelaat. Die verbinding is ook in Argentinië se Nasionale Voedselkode ingesluit.⁴⁰⁾

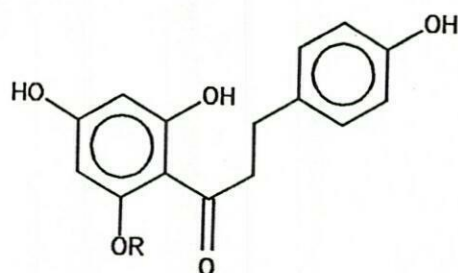
NHDC word van natuurlike neohesperidin [23] gesintetiseer deur hidrogenering onder alkaliese toestande (SKEMA 3).

Alhoewel NHDC nog nie in die natuur gevind is nie, is verskeie dihydrochalkone met soortgelyke strukture reeds uit verskeie plante geïsoleer.⁵¹⁾ Talle van hierdie dihydrochalkone is lank reeds in gebruik as natuurlike versoetmiddels. Phloridzin [24] kom byvoorbeeld in die blare van *Lithocarpus litseifolius*, 'n soet teevariëteit van China, voor. Soet dihydrochalkone kom ook in die vrugte van *Iryanthera laevis*, wat in 'n Columbiaanse soet dis gebruik word, voor.⁵¹⁾ Hesperitindihydrochalkoon [25] is volgens Chinn et al.⁵³⁾ ook soet.



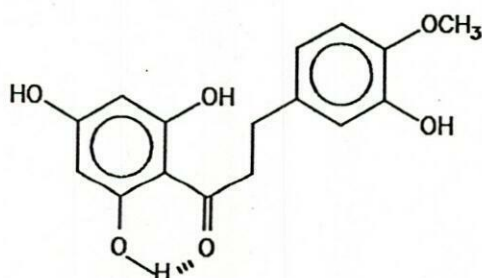
SKEMA 3.

Die disakkariedmoëteit van NHDC is volgens Du Bois et. al.⁵²⁾ nie 'n vereiste vir intense soetheid nie en vervanging hiervan met hidrofiliese sykettings, bv. karboksialkiel- en sulfoalkielsubstituente, het selfs die eienskappe van die verbinding verbeter - NHDC se soet smaak talm om te ontwikkel in vergelyking met dié van sukrose en 'n mentol- of liquorice nasmaak word ook met die verbinding geassosieer.

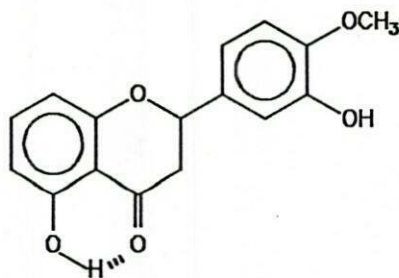


24- R = Glukose

Volgens Chinn et al.⁵³⁾ blyk dit dat die aktiewe konformeer van soet dihidrochalkome soos 'n flavanoon gevou is. Sommige flavanone, bv. [26], is potensieel soet.⁵³⁾



25-



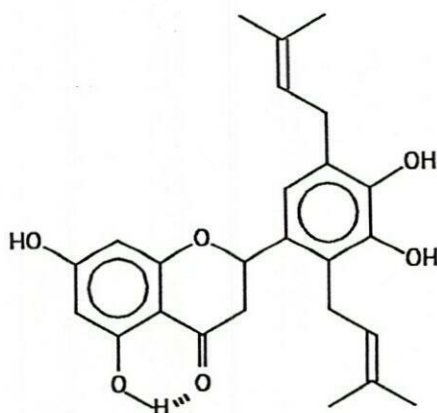
26.

4.8 ANTI-MIKROBIESE EIENSKAPPE

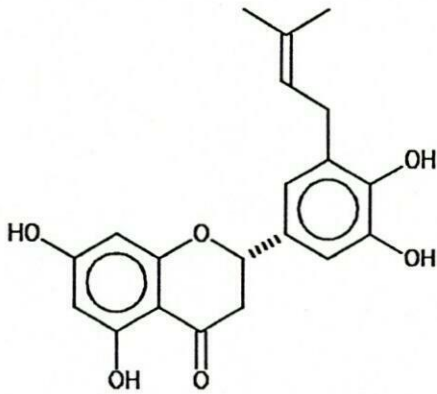
Twee antibakteriese flavanone, sigmoidin A [27] en sigmoidin B [28], is uit *Erythrina sigmoidea* Hua (Fabaceae) geïsoleer. Albei toon antibiotiese aktiwiteit teen Gram-positiewe bakterieë.^{54,55)}

Die genus *Uvaria* (Anonaceae) is bekend vir sy groot verskeidenheid natuurlike, biologies aktiewe verbindings. *Uvaria angolensis* het byvoorbeeld drie dihidrochalkone met antimikrobiële en sitotoksiese aktiwiteit opgelewer, nl. uvaretin [18], iso-uvaretin [29] en angoluvarian [30].⁵⁷⁾

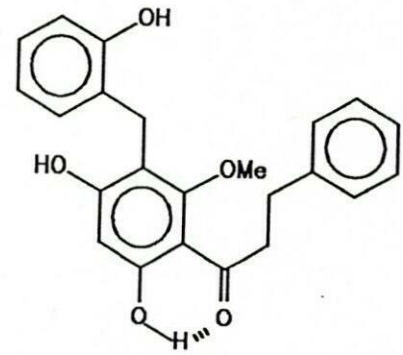
Antibakteriese aktiwiteit is ook waargeneem in die geval van die fenielpropanoïedglikosied, plantamajosied [33], wat uit *Plantago major* subsp. *major* geïsoleer is.⁵⁸⁾



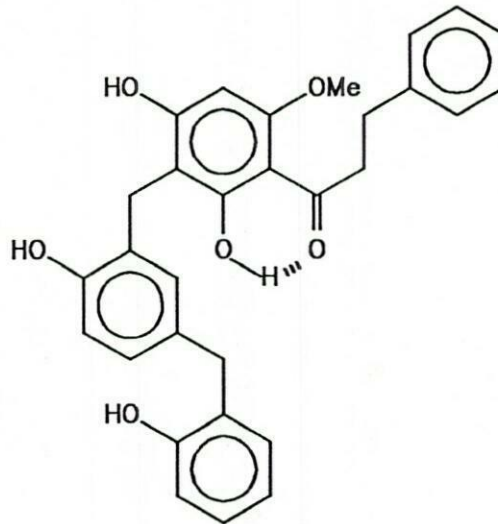
27.



28.



29.

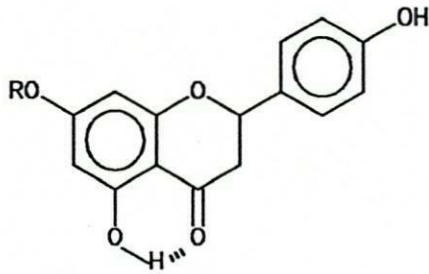


30.

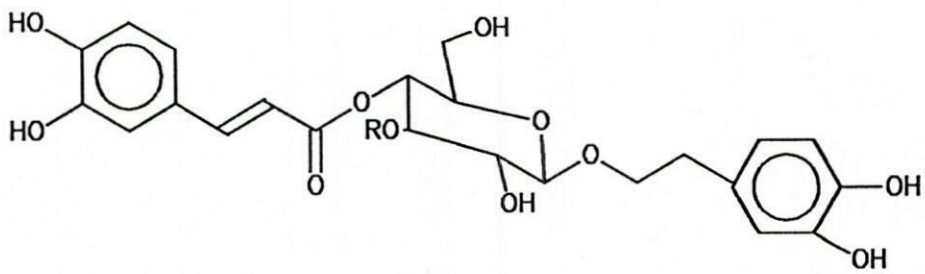
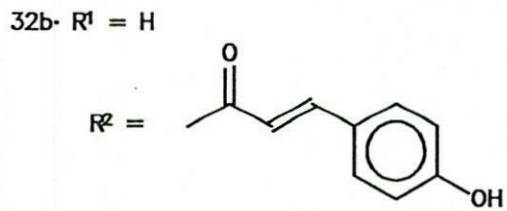
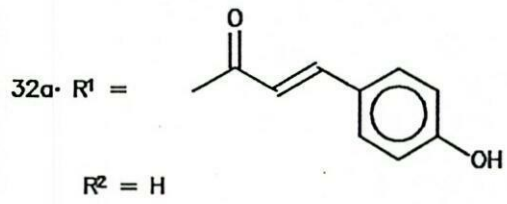
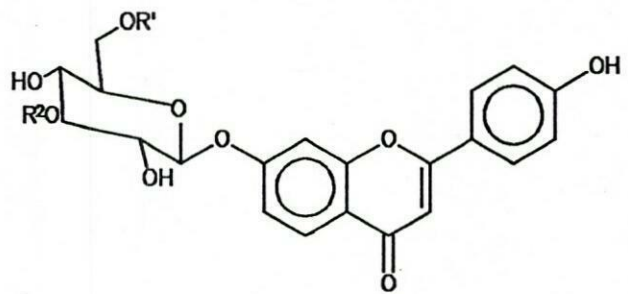
Dit is bekend dat sekere flavonoïede, en spesifiek sekere chalkone, flavone en dihydrochalkone, anti-fungusaktiwiteit kan besit.⁵⁹⁾ Apigenin [21], apigenin-7-O-glukosied [31], echinacin [32a] en echinaticin [32b] verlaag bv. die konidiale ontkieming van *Alternaria tenuissima*.⁵⁹⁾

Bensoësuur en *p*-hidroksibensoësuuresters inhibeer die groei van verskeie mikrobe, bv. *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* en *Candida albicans*.⁶⁰⁾ Hierdie antimikrobiese eienskap van bensoësuur word ook in die preserveringsbedryf toegepas om die vermenigvuldiging van bakterieë, giste

en fungi in voedsel te vertraag.⁶¹⁾



31· R = Glukose



R = glukose

33·

Eksperimenteel

EKSPERIMENTEEL

STANDAARD EKSPERIMENTELE METODEDES

Onderstaande eksperimentele tegnieke is deurgaans (tensy anders vermeld) tydens hierdie ondersoek toegepas.

1. CHROMATOGRAFIESE METODEDES

1.1 Papierchromatografie⁶³⁾

Twee-dimensionele 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.

1.2 Dunlaagchromatografie (DLC)

1.2.1 Kwalitatiewe dunlaagchromatografie is op "Merck TLC-plastic sheets: Silika Gel 60 F₂₅₄" en "Merck TLC sheets: Cellulose F₂₅₄", uitgevoer. Alle R_f-waardes verwys na kwalitatiewe DLC-ondersoeke.

1.2.2 Glasplate (20 x 20 cm), met Kieselgel (Merck PF₂₅₄, 1.0 mm) bedek en by kamertemperatuur gedroog, is ongeaktiveerd vir preparatiewe DLC gebruik. Mikroskeidings is op "Merck precoated TLC plates: Silika Gel PF₂₅₄, 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 met aseton/metanol geëlueer.

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 en sellulose uitgevoer. Mediumdrukkolomchromatografie is met 'n Büchi-mediumdruksisteem op Sephadex LH-20 (besonderhede word telkens gespesifiseer) uitgevoer. Fraksies is met 'n ISCO (Model 272) outomatiese versamelaar versamel terwyl oplosmiddels *in vacuo* met 'n Büchi "rotary evaporator" by ca. 45 °C verwyder is. In gevalle waar water as elueermiddel gebruik is, is die fraksies na oordeelkundige kombinasie met 'n "Virtis 12 SL freezmobile" gevriesdroog.

1.4 "Flash"-kolomchromatografie (FKC)

Silika (Merck Kieselgel 60, 230 - 400 maas) is as 'n suspensie in die betrokke elueermiddel, styf in 'n glaskolom (2 x 65 cm) gepak deur met druk (verkry van 'n N₂-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 N₂-druk ontwikkel is. Fraksies is met die hand in proefbuis (10 cm³/ proefbuis) opgevang en na analise met DLC oordeelkundig gekombineer. Oplosmiddels is *in vacuo* met 'n Büchi "rotary evaporator" by ca. 45 °C verwyder.

1.5 Sproeireagense

1.5.1 Formaldehyd-swawelsuur⁶⁴⁾

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

1.5.2 Ammonialkaliese silwernitrat⁶⁵⁾

Silwernitrat (4 g) is in gedistilleerde water (50 cm³) 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.

Sellulose dunlaagchromatogramme is bloot met die sproeireagens gesproei en bestudeer voordat verdonkering plaasgevind het.

1.5.3 Bis-gediasoteerde bensidien^{66,67)}

Bensidien (5 g) is in gekonsentreerde soutsoor (14 cm³) opgelos en by gedistilleerde water (980 cm³) gevoeg. Papier-chromatogramme 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.

2. CHEMIESE METODEDES

2.1 Metilering met diasmetaan⁶⁸⁾

Die fenoliese materiaal (100 mg, tensy anders vermeld) is in metanol (*ca.*, 40 cm³) opgelos en tot -10 °C afgekoel. Diasmetaan, 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 cm³), is stadig in die voorafbereide monsteroplossing gestook. Die reaksiemengsel is vir 48 uur by -15 °C gelaat en nadat dit vir 'n verdere 2 uur by 0 °C gelaat is, is die oormaat diasmetaan en oplosmiddel in 'n vinnige lugstroom by kamertemperatuur verwyder.

2.2 Asetilering⁶⁹⁾

Die droë fenoliese materiaal is in 'n minimum hoeveelheid droë piridien opgelos, waarna asynsuuranhidried (*ca.* 1 : 1, v/v piridien en asynsuuranhidried) bygevoeg is. Die reaksiemengsel is vir *ca.* 12 uur onder droë toestande by 30 °C verhit, waarna die oormaat piridien en asynsuuranhidried onder 'n N₂-stroom by kamertemperatuur verwyder is. Die geasetileerde materiaal is vervolgens in chloroform opgelos en onder gravitasie gefiltreer. Die filtraat is by kamertemperatuur in 'n N₂-stroom gekonsentreer om die verlangde asetate as vaste stowwe te lewer.

LET WEL: Aanvanklik is daar na *ca.* 12 uur 'n oormaat verkrummelde ys gevolg deur gedistilleerde water, by die reaksiemengsel gevoeg. Die gevormde presipitaat is deur gravitasiefiltrasie versamel, terwyl die filtraat met eter (3 x 20 cm³) geëkstraheer is. Die eterlaag is met 'n versadigde *aq.* CuSO₄-oplossing (3 x 20 cm³), gevolg deur gedistilleerde water (3 x 20

cm³), gewas, gedroog (Na₂SO₄) en *in vacuo* gekonsentreer. Hierdie metode het egter lae opbrengste gelewer weens die wateroplosbaarheid van die meerderheid van die gevormde asetate. 'n Alternatiewe metode (afdamping onder N₂) moes dus gevind word. Gevalle waar die ekstraksiemethode nog gebruik is, word met 'n asterisk aangedui.

3. SPEKTROMETRIE

KMR-spektra is in 'n verskeidenheid gedeuterieerde oplosmiddels met 'n Bruker AM-300 FT spektrometer afgeneem. Koppelingskonstantes (J) is in Hz aangegee, terwyl chemiese verskuiwings in dele per miljoen (d.p.m.) op die δ -skaal uitgedruk is.

Die volgende afkortings is vir die aanduiding van multiplisiteit en ander omskrywings gebruik:

s	=	singulet
d	=	doeplet
dd	=	doeplet van doeplette
t	=	triplet
m	=	multiplet
br.	=	verbreed
Ar.-H	=	aromatiese protone
Alif.-H	=	alifatiese protone
OMe	=	metoksigroep
OAc	=	asetoksigroep

4. AFKORTINGS

Die volgende afkortings is vir die beskrywing van ontwikkelingssisteme vir DLC-skeidings gebruik:

A	=	asetoon
B	=	benseen
C	=	chloroform
EA	=	etielasetaat
H	=	heksaan
M	=	metanol
H ⁺	=	1 druppel asynsuur

Ander afkortings:

Me	=	Fraksie met diasometaan gemetileer
As	=	Fraksie met asynsuuranhidried en piridien (tensy anders vermeld) geasetileer
F	=	Fraksie
P	=	Proefbuis
N	=	Bandnommer

HOOFSTUK 5

DIE ISOLASIE VAN FENOLE UIT VERWERKTE ROOIBOSTEE*

5.1 EKSTRAKSIE VAN DIE PLANTMATERIAAL

Die plantmateriaal (15 x 200 g) is vir *ca.* 15 uur met chloroform (15 x 2.5 dm³) in 'n Soxhlet-ekstraktor geëkstraheer waarna die droë residuele plantmateriaal (2 x 1 kg) vir 15 minute in gedistilleerde water (2 x 4 dm³) gekook is. Nadat die tee vir 24 uur by kamertemperatuur gelaat is, is gedekanteer. Gedistilleerde water (2 x 3 dm³) is weereens by die plantmateriaal gevoeg, waarna vir 'n verdere 15 minute gekook is. Die gekombineerde waterekstrakte is na dekantering met heksaan (2 x 675 cm³) ontvet.

Fenoliese verryking is bewerkstellig deur die waterekstrak met diëtieleter (7 x 500 cm³) te ekstraheer en oor Na₂SO₄ te droog. *In vacuo* verwydering van die diëtieleter en aseptropiese verwydering van die oorblywende water met benseen; het 'n taai, geel vaste stof (6.28 g) gelewer.

Die waterlaag is vervolgens met etielasetaat (7 x 500 cm³) geëkstraheer. Die etielasetaatekstrak het na droging met Na₂SO₄, *in vacuo* verwydering van die etielasetaat en aseptropiese verwydering van water met benseen, 'n taai, geel vaste stof (10.95 g) gelewer.

Nadat die residuele plantmateriaal by kamertemperatuur gedroog is, is dit herhaaldelik met asetoon (3 x 2.5 dm³), vir 24 uur elk, by kamertemperatuur geëkstraheer. Die asetoon is *in vacuo* verwyder om 'n

* Weens 'n gebrek aan materiaal kon geen kristallasies (behalwe waar aangedui) bewerkstellig word nie en geen smeltpunte bepaal word nie.

taai, groen vaste stof (13 g) te lewer.

5.2 FRAKSIONERING VAN DIE ETEREKSTRAK**

Die etanoloplosbare deel van die eterekstrak (5.93 g) is met KC (Sephadex LH-20, 2 x 65 cm, 175 g/kolom, 11 cm³/proefbuis) geskei. Die elueermiddel is stapsgewys as volg verander:

Etanol	(1.815 dm ³)
5 % (v/v) Metanol in etanol	(517 cm ³)
10 % (v/v) Metanol in etanol	(275 cm ³)
30 % (v/v) Metanol in etanol	(88 cm ³)

Na analise met TLC is die fraksies oordeelkundig gekombineer:

Fraksie	AF 1: Proefbuis	35 - 38	(110 mg)
	AF 2:	39 - 46	(220 mg)
	AF 3:	47 - 58	(140 mg)
	AF 4:	59 - 63	(30 mg)
	AF 5:	64 - 73	(90 mg)
	AF 6:	74 - 78	(30 mg)
	AF 7:	79 - 92	(70 mg)
	AF 8:	93 - 96	(10 mg)
	AF 9:	97 - 110	(180 mg)
	AF 10:	111 - 124	(50 mg)
	AF 11:	125 - 132	(20 mg)
	AF 12:	133 - 150	(70 mg)
	AF 13:	151 - 166	(40 mg)

** Weens 'n gebrek aan materiaal kon die subfraksies van fraksies 4, 6, 8 en 10 tot 12 nie verder ondersoek word nie.

AF 14: 167 - 210 (20 mg)

AF 15: 211 - 230 (10 mg)

5.2.1 **Fraksionering van fraksie AF 1: 4-Hidroksi-3-metoksibensoësuur (vanilliensuur) [34] en *p*-hidroksibensoësuur [35]**

Fraksie AF 1 (110 mg) is deur DLC-skeiding (B:A:M 7:2:1, v/v) in twee hoofkomponente, AF1N1 (Rf 0.63, 40 mg) en AF1N2 (Rf 0.45, 80 mg) gefraksioneer.

Verdere DLC-skeiding (B:A 9:1/H⁺, v/v) van fraksie AF1N1 (40 mg) het 'n roomwit, vaste stof (Rf 0.36, 2.3 mg), wat identies (¹H KMR) aan outentieke vanilliensuur^{b)} is, gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 1, tabel 1

DLC-suiwering (B:A 9:1/H⁺, v/v) van fraksie AF1N2 het subfraksie AF1N2B2 (Rf 0.31, 1.0 mg) gelewer wat op grond van ¹H KMR-data identies aan outentieke *p*-hidroksibensoësuur^{c)} bevind is.

¹H KMR-data: Plaat 2, tabel 1

5.2.2 **Fraksionering van fraksie AF 2: 4-Hidroksi-3-metoksikaneelsuur (feruliensuur) [36] en 4-hidroksikaneelsuur (*p*-kumaarsuur) [37]**

DLC-skeiding (B:A:M 7:2:1, v/v) van fraksie AF 2 (220 mg) het tot die isolasie van subfraksie AF2N2 (Rf 0.40, 100 mg) gelei. Uit hierdie fraksie is twee subfraksies, AF2N2B1 (Rf 0.45, 2.0 mg) en AF2N2B2 (Rf 0.44, 3.0 mg), as roomwit vaste stowwe na verdere DLC-skeiding (B:A 9:1, v/v,

b) Merck

c) BDH Laboratory reagents

gevolg deur B:A 9:1/H⁺, v/v), geïsoleer. Vergelyking van die ¹H KMR-spektra met dié van outentieke monsters^d, het bewys dat hierdie fraksies identies aan outentieke ferulien- en *p*-kumaarsuur, respektiewelik, is.

¹H KMR-data: Feruliensuur - Plaat 3, tabel 2
p-Kumaarsuur - Plaat 4, tabel 2

5.2.3 Fraksionering van fraksie AF 3: 3,4-Dihidroksibensoësuur (protokatesjoësuur) [38] en 3,4-dihidroksikaneëlsuur (kaffeïensuur) [39]

Fraksie AF 3 (140 mg) het na DLC-skeiding (B:A:M 7:2:1, v/v) fraksie AF3B1 (Rf 0.23, 8.0 mg), identies aan outentieke 3,4-dihidroksibensoësuur^e (¹H KMR), en fraksie AF3B2 (Rf 0.68, 2.0 mg), identies aan outentieke kaffeïensuur^d (¹H KMR), as roomwit en liggeel vaste stowwe, respektiewelik, gelewer.

¹H KMR-data: 3,4-Dihidroksibensoësuur - Plaat 5, Tabel 1
 Kaffeïensuur - Plaat 6, Tabel 2

5.2.4 Suiwering van fraksie AF 5: 4',5,7-trihidroksi-3'-metoksiflavoön (chrysoeriol) [40]

Fraksie AF 5 (90 mg) is verder deur DLC (B:A:M 7:2:1, v/v, 2 x) gesuiwer.

d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

e) Fluka

d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

Die isolaat (Rf 0.48, 20 mg) het na asetilering* 4,7-di-*O*-asetielchrysoeriol (40a, 14.7 mg) as 'n wit, vaste stof gelewer.

¹H KMR-data: Chrysoeriol - Plaat 7, Tabel 3
Di-*O*-asetaat - Plaat 8, Tabel 3

5.2.5 Suiwering van fraksie AF 7: 3',4',5,7-tetrahidroksiflavoon (luteolin) [2]

DLC-suiwering (B:A:M 7:2:1, v/v, 2 x) van fraksie AF 7 het luteolin (Rf 0.68, 2,3 mg) as 'n geel, vaste stof gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 9, Tabel 4

5.2.6 Suiwering van fraksie AF 9: 3',4',5,7-tetra-asetoksi-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosieloksi)flavonol (okta-*O*-asetielisoquercetrin) [6a]

Fraksie AF 9 (180 mg) is geasetileer*, waarna die geasetileerde mengsel (150 mg) met DLC (H:EA:A 60:25:25, v/v) geskei is om, ná verdere asetilering*, 'n wit, vaste stof (Rf 0.27, 0.3 mg), identies aan die okta-*O*-asetielderivaat van outentieke isoquercetrin^d (6) (¹H KMR), te lewer.

¹H KMR-data: Plaat 10, tabel 5

5.2.7 Suiwering van fraksie AF 13: 3',4',5,7-tetrahidroksiflavonol (quercetin) [1]

Fraksie AF 13 (40 mg) is met DLC (B:A:M 7:2:1, v/v, 2 x) gesuiwer. Volgens ¹H KMR-data is die gesuiwerde fraksie, AF13N1 (Rf 0.68, 4.1 mg),

d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

'n geel vaste stof, identies aan outentieke quercetin^{b)}.

¹H KMR-data: Plaat 11, Tabel 5

5.3 FRAKSIONERING VAN DIE ETIELASETAATEKSTRAK

Die etielasetaatekstrak (10.95 g) is met KC (Sephadex LH-20, 7 x ca. 90 cm, 400 g/kolom, ca. 13.3 cm³/proefbuis) geskei. Die elueermiddel is weer stapsgewys as volg verander:

Etanol	(2.66 dm ³)
5 % (v/v) Metanol in etanol	(556,5 cm ³)
10 % (v/v) Metanol in etanol	(440 cm ³)
15 % (v/v) Metanol in etanol	(2.41 dm ³)

Na oordeelkundige kombinasie m.b.v TLC is die volgende fraksies verkry:

Fraksie	BF 1: Proefbuis	1 - 34	(140 mg)
	BF 2:	35 - 53	(310 mg)
	BF 3:	54 - 64	(370 mg)
	BF 4:	65 - 80	(650 mg)
	BF 5:	81 - 102	(1.590 g)
	BF 6:	103 - 114	(687.2 mg)
	BF 7:	115 - 124	(247.6 mg)
	BF 8:	125 - 131	(135.4 mg)
	BF 9:	132 - 140	(185.9 mg)
	BF 10:	141 - 149	(239.5 mg)
	BF 11:	150 - 164	(370.2 mg)

b) Merck

BF 12:	165 - 200	(1.541 g)
BF 13:	201 - 220	(401.3 mg)
BF 14:	221 - 236	(415.8 mg)
BF 15:	237 - 268	(351.9 mg)
BF 16:	269 - 320	(179.1 mg)
BF 17:	321 - 457	(294.9 mg)

Slegs die fraksies wat volgens 'n twee-dimensionele papierchromatografiese analise belowend voorgekom het en nie met fraksies reeds uit die eterekstrak geïsoleer, ooreengestem het nie, is ondersoek.

5.3.1 Fraksionering van fraksie BF 11

'n Deel van fraksie BF 11 (270.2 mg) is met diasometaan gemetileer. Alle fraksies wat uit DLC-skeiding (B:A:M 4:5:1, v/v, 2 x) van 'n porsie van die gemetileerde fraksie (130 mg) gespruit het, is direk geasetileer:

Band:	1	Rf (Me): 0.85	Opbrengs (MeAs): 13.6 mg
	2	0.77	6.5 mg
	3	0.71	5.4 mg
	4	0.59	11.4 mg
	5	0.53	5.7 mg
	6	0.46	0.9 mg
	7	0.33	4.2 mg
	8	0.25	13.9 mg
	9	0.19	7.6 mg
	10	0.09	5.1 mg
	11	0.04	4.8 mg

Die *O*-metiel-*O*-asetiëlderivate is verder soos aangedui gefraksioneer:

5.3.2.1 Fraksionering van die derivaat van band 1: 5-Asetoksi-3',4',7-trimetoksiflavoon (5-*O*-asetiel-3',4',7-tri-*O*-metielluteolin) [2a]

Die derivaat van band 1 (13.6 mg) is met DLC (H:EA:A 60:25:25, v/v) gefraksioneer om twee fraksies (Rf 0.59, 0.7 mg) en (Rf 0.47, 5.0 mg) as wit, vaste stowwe te lewer. Die Rf 0.47 fraksie is op grond van ^1H KMR as 5-*O*-asetiel-3',4',7-tri-*O*-metielluteolin (2a) geïdentifiseer, terwyl die Rf 0.59 fraksie weens 'n gebrek aan materiaal nie verder ondersoek is nie.

^1H KMR-data: Plaat 12, Tabel 4

5.3.2.2 Suiwering van die derivate van bande 2 en 3: 3',4',5,7-tetrametoksiflavoon (tetra-*O*-metielluteolin) [2b]

Die gederivatiseerde produkte van bande 2 en 3 is gekombineer (11.9 mg) en finale suiwering met DLC (H:EA:A 60:25:25, v/v) het die tetra-*O*-metieleter van luteolin (2b) (Rf 0.09, 3.0 mg) as 'n wit, vaste stof gelewer.

^1H KMR-data: Plaat 13, Tabel 4

5.3.2.3 Suiwering van die derivate van bande 5 en 6: 4',5,7-tri-metoksi-6-(2,3,4-tri-*O*-asetiel-6-*O*-metiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4''-tri-*O*-asetiel-4',5,6'',7-tetra-*O*-metielisovitexin) [41a]

Die derivate van bande 5 en 6 is gekombineer (6.6 mg) en met DLC (H:EA:A 60:25:25, v/v) geskei om 2'',3'',4''-tri-*O*-asetiel-4',5,6'',7-tetra-*O*-metielisovitexin (42a) (Rf 0.31, 1.5 mg) as 'n wit, vaste stof te lewer.

¹H KMR-data: Plaat 14, Tabel 6

5.3.2.4 Suiwering van die derivate van bande 8 en 9: 4',5,7-tri-metoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisovitexin) [41b] en 4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielvitexin) [42a]

Bande 8 en 9 is na derivatisering gekombineer (21.5 mg). Skeiding met DLC (C:A 8:2, v/v) het 2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielisovitexin (41b) (Rf 0.38, 4.9 mg) en 2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-asetiel-4',5,7-tri-*O*-metielvitexin (42a) (Rf 0.01, 2.3 mg) as wit vaste stowwe gelewer.

¹H KMR-data: 41b:- Plaat 15, Tabel 6

42a:- Plaat 16, Tabel 6

5.3.2.5 Suiwering van band 11 na derivatisering: 3,4-Dihidroksibensoësuur [38], metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a] en metiel(3,4,5-trimetoksi)metielsinnamaat [43]

Die verskillende komponente van die onskeibare mengsel (4.5 mg) kon, deur die vergelyking van die ^1H KMR-spektrum met dié van outentieke en sintetiese monsters, geïdentifiseer word as:

1. 3,4-Dihidroksibensoësuur^{e)} [38]
2. metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a]; diasometaanmetilering van outentieke kaffeïensuur^{d)}
3. metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]; sintese

- ^1H KMR-data:
1. Plaat 5, Tabel 1
 2. Plaat 17, Tabel 2
 3. Plate 18a en b, Tabel 12

5.3.3 Fraksionering van fraksie BF 15: 3,3',4',5,7-Penta-asetoksiflavonol (penta-O-asetielquercetin) [1a] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-6- β -D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) [44A]^{h)}

Fraksie BF 15 (351.9 mg) is met FKC (A:M 7:3, v/v) verder gefraksioneer. Die hoë R_f-fraksie (TLC) (R_f 0.67f), 5.4 mg) is geasetileer en het na verdere suiwering met DLC (H:EA:A 60:25:25, v/v) 'n roomwit vaste stof (R_f 0.37, 0.6 mg), identies aan penta-O-asetielquercetin (1a), gelewer.

^1H KMR-data: Plaat 19, Tabel 5

c) Fluka

d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

h) Weens 'n tekort aan materiaal, was 'n HETCOR-eksperiment onsuksesvol en kon die koppelingswyse van die suiker nie bepaal word nie. Die verbinding mag dus ook 3',4',5,7-tetrahidroksi-8- β -D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-orientin) [44B] wees.

f) R_f in B:A:M 6:3:1, v/v

Die lae Rf-fraksie, BF15F3 (Rf 0.12g), 83.9 mg), het as rooibruin naalde uit asetoon-d₆ (ca. 1 cm³) en D₂O (2 druppels) gekristalliseer en is op grond van KMR-eksperimente op die vryfenoliese en geasetileerde monsters as 3',4',5,7-tetrahidroksi-6-β-D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) (44A)^h) geïdentifiseer.

KMR-data:	Vryfenol:-	¹ H KMR (Asetoon-d ₆ /D ₂ O) :	Plaat 20, Tabel 7
		COSY	: Plaat 21
	Okta-asetaat:-	¹ H KMR (CDCl ₃)	: Plaat 22, Tabel 7
		¹ H KMR (Asetoon-d ₆)	: Plaat 23, Tabel 7
		COSY	: Plaat 24

5.4 FRAKSIONERING VAN DIE ASETOONEKSTRAK

Die asetoonekstrak (13 g) is met MPLC (Sephadex LH-20, 5 x 125 cm, ca. 20 cm³/proefbuis) geskei. Die elueermiddel is as volg verander:

15 % (v/v) metanol in asetoon (4.8 dm³)

20 % (v/v) metanol in asetoon (1.66 cm³)

Na analise met TLC, is die fraksies oordeelkundig gekombineer:

Fraksie CF 1:	Proefbuis	1 - 62	(3.018 g)
CF 2:		63 - 87	(0.9003 g)
CF 3:		88 - 101	(0.7316 g)
CF 4:		102 - 127	(1.397 g)
CF 5:		128 - 133	(0.2105 g)

g) Rf in B:A:M 6:3:1/H⁺, v/v

CF 6:	134 - 141	(0.2624 g)
CF 7:	142 - 152	(0.6600 g)
CF 8:	153 - 167	(2.640 g)
CF 9:	168 - 189	(1.600 g)
CF 10:	190 - 221	(1.014 g)
CF 11:	222 - 310	(0.6841 g)

5.4.1 Fraksionering van fraksie CF 10

5.4.1.1 Isolasie van 3',4',5,7-tetrahidroksi-6-β-D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) [44A]^{h)}

Fraksie CF 10 het volgens twee-dimensionele papierchromatografiese analise ook 2,3-dihidro-iso-orientin (44A) bevat en is verder gesuiwer om meer materiaal van hierdie verbinding te verkry. In 'n poging om skeiding onder neutrale kondisies te bewerkstellig, is van 'n ander strategie as in paragraaf 5.3.3 gebruik gemaak.

'n Deel van fraksie CF 10 (270 mg) is met KC (Sellulose, 2 x ca. 40 cm, 13 cm³/proefbuis) en water as elueermiddel, geskei. Analise met twee-dimensionele papierchromatografie het getoon dat die verlangde verbinding in 'n enkele proefbuis (proefbuis 3) teenwoordig was. Subfraksie CF10P3 (17.1 mg) is dus, nadat dit gevriesdroog is en met ¹H KMR bevestig is dat dit identies aan BF15F3 is, met laasgenoemde fraksie gekombineer.

h) Weens 'n tekort aan materiaal, was 'n HETCOR-eksperiment onsuksesvol en kon die koppelingsposisie van die suiker nie bepaal word nie. Die verbinding mag dus ook 3',4',5,7-tetrahidroksi-8-β-D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-orientin) [44B] wees.

5.4.1.2 Isolasie van 2',3,4,4',6'-penta-asetoksi-3'-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-β-D-glukopiranosiel)dihidrochalkoon (nona-O-asetiel-aspalathin) [8b]

'n Deel van fraksie CF 10 (200 mg) het, nadat dit met DLC (B:A:M 5:3:2/H⁺, v/v) geskei en geasetileer* is, 'n wit vaste stof (Rf 0.25^h), 56.2 mg), identies aan die volledig geasetileerde* derivaat van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'-C-β-D-glukopiranosieldihidrochalkoon (aspalathin)^d) [8], gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 28, Tabel 8

h) Rf in H:EA:A 60:25:25, v/v, 2 x
d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

HOOFSTUK 6

ASPALATHIN: STRUKTUURBEPALING EN REAKTIWITEIT

6.1 Vryfenolies [8]

2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'- β -D-glukopiranosieldihidrochalkoon (aspalathin) (8) uit groen rooibostee geïsoleerⁱ⁾, is op grond van ¹H KMR-spektrometrie identies aan outentieke aspalathin^{d)} bewys.

¹H KMR-data: Plaat 25, Tabel 8

'n Twee-dimensionele papierchromatografiese analise na *ca.* 2 maande, het egter getoon dat die gevriesdroogde materiaal by kamertemperatuur in die donker kas geleidelik ontbind het om drie addisionele produkte in lae konsentrasies te vorm.

Ten einde die aspalathin vir verdere ondersoek te suiwer, is die gevriesdroogde materiaal (4.0 g) met KC (Sellulose, 2 x 65 cm, 10 cm³/proefbuis) en water as elueermiddel, geskei.

Die fraksies is na analise met twee-dimensionele papierchromatografie, oordeelkundig gekombineer. Slegs fraksie F2 (proefbuis 15 - 51, 2.0 g) het volgens twee-dimensionele papierchromatografie suiwer aspalathin bevat. ¹H KMR-analise het egter getoon dat hierdie fraksie 'n mengsel van die α - (8a) en β -(8) glukopiranosielderivate van aspalathin bevat het.

¹H KMR-data: Plaat 26, Tabel 8

i) P.J. Steynberg, Departement Chemie, UOVS, Bloemfontein
d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

6.2 Keto-enol ewewig

Outentieke aspalathin^{d)} (49.1 mg, 0.1086 mmol) het na asetilering* en daaropvolgende DLC-skeiding (B:A 8:2/H⁺, v/v), 'n mengsel van die geasetileerde derivate van die keto- (8b) en enol- (8c) tautomere van aspalathin (Rf 0.81, 4.0 mg) gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 27, Tabel 8

6.3 Alternatiewe asetilering⁷⁰⁾

Alle apparaat is vir ca. 5 uur by 120 °C gedroog, effens laat afkoel en dadelik gebruik. Aspalathin is aseotropies met benseen gedroog deur dit in benseen (3 x 10 cm³) op te los en die aseotroop *in vacuo* te verwyder.

Reagens A (1 M asynsuuranhidried en 10⁻³ M HClO₄ in etielasetaat) is as volg berei: 70 % HClO₄ (0.05 cm³, 0.5590 mmol) is by droë etielasetaat (gedistilleer na droging oor K₂CO₃, 50 cm³) gevoeg. Hierdie oplossing (10 cm³) is by asynsuuranhidried (4.8 cm³, 51 mmol) gevoeg en met etielasetaat tot 50 cm³ opgemaak, waarna die reagens in die yskas gebêre is.

Aspalathin (49.1 mg, 0.1086 mmol) is in reagens A (5.00 cm³) opgelos en tot 0 °C afgekoel, terwyl onder N₂ geroer is. 'n Versadigde NaHCO₃-oplossing (15 cm³) is na 5 minute m.b.v. 'n glasspuit by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met etielasetaat (3 x 30 cm³) geëkstraheer is. Die etielasetaat is gedroog (Na₂SO₄) en *in vacuo* gekonsentreer. DLC-skeiding

d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

(B:H:A 4:4:2, v/v, 2x) het die nona-*O*-asetiëlderivaat van aspalathin (8b) (Rf 0.34, 4.2 mg, 4.66 %) as 'n wit, vaste stof gelever.

¹H KMR-data: Plaat 28, Tabel 8

6.4 Metieleterasetate

Aspalathin (100 mg, 0.2212 mmol) is met diasometaan gemetileer en met DLC (B:A:M 6:3:1, v/v, 4 x) geskei. Die twee subfraksies, (Rf^j) 0.54, 1.7 mg) en (Rf^j 0.37, 4.6 mg), het 2",3",4"-tri-*O*-asetiel-2',3,4,4',6',6"-heksa-*O*-metiel- (8d) (Rf^k) 0.34, 3.1 mg) en 2",3",4",6"-tetra-*O*-asetiel-2',3,4,4',6'-penta-*O*-metielaspalathin (8e) (Rf^k) 0.32, 3.5 mg), beide wit vaste stowwe, na asetilering gelever.

¹H KMR-data: 8d - Plaat 29, Tabel 9

8e - Plaat 30, Tabel 9

j) Rf in B:A:M 6:3:1, v/v, 2x
k) Rf in H:EA:A 60:25:25, v/v

HOOFSTUK 7

DIVERSE STRUKTUURBEPALINGS

7.1 3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-(6-O- α -L-rhamnopyranosiel- β -D-glukopyranosieloksi)flavonol (Rutin) [7]

Outentieke rutin^{k)} (4.0 mg, 6.547 mol) het na asetilering* deka-O-asetielrutin (7a) (3.5 mg, 51.9 %) as 'n wit, vaste stof gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 31, tabel 10

Diasometaanmetilering en daaropvolgende asetilering* van outentieke rutin (20 mg, 0.03273 mmol) het, na DLC-skeiding (B:A 9:1/H⁺, v/v, 2 x), 5-asetoksi-3,4,7-trimetoksi-3-[2,3,4-tri-O-asetiel-6-O-(2,3,4-tri-O-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosieloksi]flavonol (7c) (Rf 0.2, 4.6 mg) en 3',4',5,7-tetrametoksi-3-[2,3,4-tri-O-asetiel-6-O-(2,3,4-tri-O-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosieloksi]flavonol (7b) (Rf 0.093, 6.0 mg) as wit, vaste stowwe gelewer.

¹H KMR-data: 7b: Plaat 33, Tabel 10

7c: Plaat 32, Tabel 10

k) D. Ferreira, Departement Chemie, UOVS, Bloemfontein

7.2 4',5,7-Trihidroksi-8-(4-O- α -L-rhamnopyranosiel- β -D-glukopyranosiel) flavoon (4"-O-rhamnosielvitexin) [45]

Outentieke 4"-O-rhamnosielvitexin^{k)} (5.9 mg, 0,01052 mmol^{l)} het na asetilering* die deka-O-asetiolderivaat (45a) as 'n wit, vaste stof (3.1 mg, 31.9 %) gelewer.

¹H KMR-data: 45a:- Plaat 34, tabel 10

7.3 3',4',5,7-Tetrahidroksi-6- β -D-glukopyranosiel flavoon (iso-orientin) [4] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-8- β -D-glukopyranosiel flavoon (orientin) [3]

Outentieke^{d)} orientin (3) en iso-orientin (4) is vryfenolies met ¹H KMR-spektrometrie geanaliseer:

¹H KMR-data: 3:- Plaat 35, tabel 11

4:- Plaat 36, tabel 11

k) D. Ferreira, Departement Chemie, UOVS, Bloemfontein
d) E. Joubert, NIVV, Stellenbosch

HOOFSTUK 8

SINTESE

8.1 DIE SINTESE VAN 3,4,5-TRIMETOKSIKANEELSUUR EN DIE OOREENSTEMMENDE METIELESTER

8.1.1 Suiwering van 3,4,5-trimetoksibensaldehyd⁷⁰⁾ [46]

Die ligbruin kleur van die 3,4,5-trimetoksibensaldehyd het daarop gedui dat gedeeltelike outoksidase na die ooreenstemmende bensoësuur reeds plaasgevind het.

Suiwering is bewerkstellig deur die vaste stof (200 mg) in etielasetaat op te los en met 'n versadigde *aq.* Na₂CO₃-oplossing (3 x 50 cm³) te was. Nadat met lakmoes bevestig is dat die waterlaag alkalies is, is die etielasetaatlaag in die teenwoordigheid van katesjol (10 mg) gedroog (MgSO₄) en *in vacuo* tot ca. 7 cm³ gekonsentreer. Wit naalde het by 0 °C uit-gekristalliseer. Herkristallisatie uit etielasetaat by 0 °C het rein 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (199 mg, 99.5 %) as wit naalde gelever.

¹H KMR-data: Plaat 37, tabel 12

8.1.2 Die sintese van 3,4,5-trimetoksikaneelsuur [47]

3,4,5-Trimetoksikaneelsuur is gesintetiseer deur van die Perkin-reaksie⁷¹) gebruik te maak.

3,4,5-Trimetoksibensaldehyd (100.6 mg, 0.5133 mmol) is in asynsuuranhidried (2.0 cm³, 21.14 mmol) opgelos, waarna triëtielamien (0,25 cm³, 1.796 mmol) en vars gesmelte KOAc (ca. 62.8 mg) by die oplossing gevoeg en vir 24 uur onder terugvloei en N₂ verhit is.

'n Oormaat yswater is by die reaksiemengsel gevoeg, waarna 'n versadigde *aq.* Na₂CO₃-oplossing bygevoeg is totdat die reaksiemengsel alkalies t.o.v. lakmoes was. Die reaksiemengsel is vervolgens met eter (3 x 50 cm³) geëkstraheer, waarna die waterlaag met koue 0.1 N HCl aangesuur is (blou lakmoespapier --> rooi). Die waterlaag is weereens met eter (3 x 50 cm³) geëkstraheer, waarna die eterlaag met gedistilleerde water (3 x 50 cm³) gewas, gedroog (MgSO₄) en *in vacuo* gekonsentreer is om 'n rooibruin vaste stof (100 mg) te lewer. DLC-skeiding (B:A 9:1, v/v), gevolg deur herkristallisatie uit etielasetaat, het 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (Rf 0.67, 70.4 mg, 30.02 % omskakeling) as wit naalde en 3,4,5-trimetoksikaneelsuur (Rf 0.20, 10.4 mg, 8.5 %) as geel naalde, gelewer.

¹H KMR-data: 46:- Plaat 37, tabel 12

47:- Plaat 38, tabel 12

8.1.3 Die sintese van metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]

3,4,5-Trimetoksikaneelsuur (10.4 mg, 0.0437 mmol) is vir ca. 5 uur met diasometaan gemetileer. Die titelverbinding het as liggeel naalde (11 mg,

94 %) uit eter gekristalliseer.

^1H KMR-data: Plate 18a en 18b, tabel 12

8.2 ALTERNATIEWE SINTESE VAN METIEL(3,4,5-TRIMETOKSI)SINNAMAAT

8.2.1 Die sintese van etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [48]

Etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat is gesintetiseer deur van die Wittig-reaksie⁷²⁾ gebruik te maak.

'n Mengsel van (karbo-etoksimetiel)trifenielfosfoniumchloried (500 mg, 1,29 mmol) en natriummetoksied (170mg, 3,147 mmol) is vir 24 uur in droë DMF (20 cm³) by kamertemperatuur geroer. Nadat met TLC-analise (asetoon) bevestig is dat die fosfoniumsout volledig na die ylied (Rf 0.39) omgeskakel is, is 'n oplossing van 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (380 mg, 1,939 mmol) in droë DMF (20 cm³) oor 'n periode van 45 min. by die ylied gedrup terwyl geroer is. Die reaksie is eksotermies (die reaksiefles het effens warm geword) en die kleur van die reaksieoplossing het geleidelik van kleurloos na ligblou, blougroen en liggroen verander.

'n Oormaat yswater is na 48 uur by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met eter (3 x 40 cm³) geëkstraheer is. Die waterlaag is hierna met koue 0.1 N HCl aangesuur totdat blou lakmoes rooi geword het, waarna weer met eter (3 x 40 cm³) geëkstraheer is. Die gekombineerde eterlae is met koue gedistilleerde water (3 x 40 cm³) gewas, gedroog (Na₂SO₄) en *in vacuo* gekonsentreer.

Die konsentrate is met DLC (B:A 9:1, v/v) geskei om 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (Rf 0.67, 15.9 mg, 95.82% omskakeling) as wit naalde en etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (Rf 0.72, 38.3 mg, 7.4 %) as 'n liggeel, vaste stof te lewer.

^1H KMR-data: 46:- Plaat 37, tabel 12

48:- Plaat 39, Tabel 12

8.2.2 Die sintese van etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]

Etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (4 mg, 0.01504 mmol) is in droë metanol opgelos, waarna natriummetoksied (10 mg, 0.1852 mmol) bygevoeg is terwyl by kamertemperatuur geroer is.

Nadat *ca.* 28 uur verloop het, is 'n oormaat yswater by die reaksiemengsel gevoeg en die oorblywende basis met koue 0.1 N HCl geneutraliseer. Die reaksiemengsel is vervolgens met eter (3 x 40 cm³) geëkstraheer en nadat die eterekstrak met koue gedistilleerde water (3 x 40 cm³) gewas, gedroog (Na₂SO₄) en *in vacuo* gekonsentreer is, het die verlangde produk (Rf 0.71 in B:A 9:1, v/v) as liggeel naalde uit eter gekristalliseer.

^1H KMR-data: Plate 18a en 18b, tabel 12

8.3 DIE SINTESE VAN 4-ASETOKSI-3,5-DIMETOKSIKANEELSUUR (4-O-ASETIELSINAPIENSUUR) [49]

Die titelverbinding is gesintetiseer deur van die Perkin-reaksie⁷¹⁾ gebruik te maak.

3,5-Dimetoksi-4-hidroksibensaldehyd (550 mg, 3.019 mmol) en vars gesmelte kaliumasetaat (1 klein spatelpunt) is in droë triëtielamien (0.5 cm^3 , 3.592 mmol) en asynsuuranhidried (3 cm^3 , 31.40 mmol) opgelos en vir ca. 16 uur onder N_2 gerefluks. Die reaksiemengsel het verbruin en 'n oormaat yswater is bygevoeg, waarna met eter ($3 \times 40 \text{ cm}^3$) geëkstraheer is. 'n Versadigde Na_2CO_3 -oplossing is by die waterlaag gevoeg totdat rooi lakmoes blou geword het, waarna weer met eter ($3 \times 40 \text{ cm}^3$) geëkstraheer is. Die gekombineerde eterlae is met koue gedistilleerde water ($3 \times 40 \text{ cm}^3$) gewas, gedroog (MgSO_4) en *in vacuo* gekonsentreer.

4-*O*-Asetielsinapiensuur (Rf 0.1692, 77.6 mg, 9.66 %) en 4-asetoksi-3,5-dimetoksibensaldehyd (50) (Rf 0.7231, 69.2 mg, 87.42 %) is na DLC-skeiding (H:A 9:1, v/v, 2x, gevolg deur B:A 9:1, v/v) as geel en wit, vaste stowwe, respektiewelik, geïsoleer.

^1H KMR-data: 49:- Plaat 40, tabel 13

50:- Plaat 41, tabel 13

8.4 DIE SINTESE VAN TRANS-2',3,4,4',6'-PENTAHIDROKSICHALKOON, 3',4',5,7-TETRAHIDROKSIFLAVANOON EN 2',3,4,4',6'-PENTAHIDROKSIDIHIDROCHALKOON (3-HIDROKSIFLORETIN)

8.4.1 Die sintese van 2,4,6-trimetoksimetielasetofenoon [51]

Die hidroksigroepe van floroasetofenoon (2,4,6-trihidroksiasetofenoon) is deur metoksimetilering beskerm:

Natriumhidried (3g, 0.125 mol) is vir 5 minute in droë DMF (ca. 20 cm^3) by 0°C geroer, waarna floroasetofenoon (3 g, 16.11 mmol) bygevoeg is. Die

reaksiemengsel het verbruin en verdik. DMF is bygevoeg totdat die reaksie mengsel weer vloeibaar was. Nadat vir ongeveer 10 minute by 0°C geroer is, is chlorodimetieleter (10 cm^3 , 0.1354 mol) drupsgewys bygevoeg. Die reaksie mengsel, wat intussen rooi geword het, is vir 'n verdere 2 uur by 0°C geroer, waarna 'n oormaat ys versigtig bygevoeg is en met eter ($3 \times 50\text{ cm}^3$) geëkstraheer is. Die eterlaag is met gedistilleerde water ($3 \times 50\text{ cm}^3$) gewas, gedroog (MgSO_4) en *in vacuo* gekonsentreer. 2,4,6-Trimetoksi-metielasetofenoon (Rf 0.43, 1.834 g , 38.1%) is na suiwing met DLC (H:A 8:2, v/v, 2 x) as 'n geel olie geïsoleer.

^1H KMR-data: Plaat 42, Tabel 14

8.4.2 Die sintese van 3,4-dimetoksimetielbensaldehyd [52]

Natriumhidried (6 g , 0.25 mol) is vir 5 minute in droë DMF (*ca.* 20 cm^3) by 0°C geroer, waarna 3,4-dihidroksibensaldehyd (siringaldehyd, 1 g , 7.240 mmol) bygevoeg is - 'n dik, groen pasta het gevorm. DMF is bygevoeg totdat die reaksie mengsel weer vloeibaar was. Chlorodimetieleter (5 cm^3 , 0.0677 mol) is na 10 minute drupsgewys bygevoeg. Die reaksie mengsel het liggeel geword en is vir 'n verdere 1 uur by 0°C geroer. Ys is versigtig by die reaksie mengsel gevoeg terwyl die fles ook ekstern by 0°C gehou is. 'n Wynrooi konsentraat is verkry nadat met eter ($3 \times 50\text{ cm}^3$) geëkstraheer is en die eter na droging (MgSO_4) *in vacuo* verwyder is. 3,4-Dimetoksimetielbensaldehyd (Rf 0.25, 739.2 mg , 45.18%) is na suiwing met DLC (H:A 8:2, v/v, 2 x) as 'n wit, kristallyne verbinding geïsoleer.

^1H KMR-data: Plaat 43, Tabel 14

8.4.3 Die sintese van *trans*-2',3,4,4',6'-pentametoksimetielchalkoon [53]

In hierdie sintese is van die bekende aldolkondensasie⁷³⁾ gebruik gemaak.

'n Waterige KOH-oplossing (*ca.* 152.5 mg/10 cm³) is by 'n oplossing van 2,4,6-trimetoksimetielasetofenoon (1.0376 g, 3.459 mmol) en 3,4-dimetoksimetielbensaldehyd (0.78 g, 3.451 mmol) in etanol (*ca.* 25 cm³) gevoeg terwyl by kamertemperatuur geroer is. 'n Oormaat ys is na 69 uur by die reaksiemengsel gevoeg, waarna met eter (3 x 50 cm³) geëkstraheer is. Die eterekstrak is gedroog (MgSO₄), *in vacuo* gekonsentreer en met DLC (H:A 7:3, v/v) geskei om die titelverbinding (Rf 0.65, 2.18 g, 71.24 %) as 'n geel olie te lewer.

¹H KMR-data: Plaat 44, Tabel 15

8.4.4 Die sintese van 2',3,4,4',6'-pentametoksimetioldihydrochalkoon [54]

Die titelverbinding is deur die hidrogenering van chalkoon [54] gesintetiseer:

5 % Pd/C (*ca.* 110 mg) is by 'n oplossing van 2',3,4,4',6'-pentametoksimetielchalkoon (811.6 mg, 1.630 mmol) in aseton (*ca.* 20 cm³) gevoeg, waarna H₂ vir 9 uur deur die reaksiemengsel geborrel is terwyl meganies geskud is. Die reaksiemengsel is *in vacuo* gekonsentreer nadat dit deur "celite" filtreer is en het na DLC-skeiding (H:A 7:3, v/v) die titelverbinding (Rf 0.79, 557.4 mg, 68.39 %) as 'n kleurlose olie gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 45, Tabel 15

8.4.5 **Die sintese van 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihydrochalkoon [3-hidroksifloretin] [55]**

Dihydrochalkoon 55 (63.6 mg, 0.1272 mmol) is in metanol (50 cm³) opgelos. Gedistilleerde water (10 druppels) en monochloorasynsuur (10.7 mg, 0.1132 mmol) is bygevoeg terwyl goed geskud is, waarna vir 5 uur onder terugvloei verhit is. Dichloorasynsuur (15 druppels) is oor 'n periode van 19 dae by die reaksiemengsel gevoeg, waarna 'n oormaat yswater bygevoeg en met etielasetaat (3 x 50 cm³) geëkstraheer is. Die etielasetaatlaag is met gedistilleerde water (3 x 50 cm³) gewas, gedroog (MgSO₄) en *in vacuo* gekonsentreer. DLC-skeiding (B:A 7:3, v/v) het 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihydrochalkoon as 'n geel vaste stof (Rf 0.30, 36.89 mg, 67.50 %) gelewer.

¹H KMR-data: Plaat 46, Tabel 15

8.4.6 **Die sintese van 3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon (eriodictyol) [56]**

2',3,4,4',6'-Pentametoksimetielchalkoon (49.2 mg, 0.09880 mmol) is in metanol (50 cm³) opgelos. 1N CH₃COOH (9 druppels) en gedistilleerde water (10 druppels) is oor 'n periode van 7 uur bygevoeg terwyl onder terugvloei verhit is. Gekonsentreerde CH₃COOH (5 druppels) is drupsgewys oor 'n periode van 23 uur bygevoeg, waarna monochloorasynsuur (38.7 mg, 0.4094 mmol) bygevoeg is. Na verloop van 47 uur is dichloorasynsuur (9 druppels) drupsgewys oor 'n periode van 7 dae bygevoeg, waarna 'n oormaat yswater by die reaksiemengsel gevoeg en met etielasetaat (3 x 30 cm³) geëkstraheer is. Die etielasetaatlaag is met gedistilleerde water (3 x 30 cm³) gewas, gedroog (MgSO₄) en *in vacuo*

gekonsentreer om 3',4',5,7-tetrahydroksiflavanoon (25.7 mg, 90.33 %) as 'n oranje vaste stof te lewer.

¹H KMR-data: Plaat 47, Tabel 15

Bespreking

BESPREKING

INLEIDING

Die behoefte aan wetenskaplik gefundeerde verwerkingsprosesaanpassings en getuienis van die heilsame invloed van rooibostee op senukwale, allergieë, maag- en nierkwale, slaaploosheid en aptytloosheid, het as dryfkrag vir 'n chemiese ondersoek van die verwerkte plantmateriaal gedien.

'n Ryke verskeidenheid fenoliese verbindings, verteenwoordigend van verskeie stadia van biosintese, is geïsoleer. Die biosintetiese verband tussen kaneelsure, flavanone, flavone en flavonole, waarvan voorbeelde uit rooibos geïsoleer is, word in SKEMA 4 geïllustreer.

Alle flavonoïedklasse het hul koolstofskelet aan twee basiese voorlopers, nl. maloniel-CoA en die CoA-ester van 'n hidroksikaneelsuur, te danke. Albei hierdie voorlopers word *via* die koolhidraatmetabolisme gevorm - maloniel-CoA word deur die karboksilering van die glikolise-intermediêr, asetiel-CoA, in die teenwoordigheid van CO₂ gesintetiseer, terwyl 4-kumaroïel-CoA, die CoA ester van *p*-kumaarsuur, *via* die sjikimaat/arogenaatweg gesintetiseer word. Lg. is die hoof metaboliese roete tot die vorming van die aromatiese aminosuur feniëlanien, wat in die teenwoordigheid van feniëlanienammonialise (II) deur *anti*-eliminasië na kaneelsuur omgeskakel word. Aromatiese hidroksilering van kaneelsuur deur die ooreenstemmende 4-hidroksilase (III) lei tot die vorming van *p*-kumaarsuur, wat in die teenwoordigheid van 4-kumaraat: CoA ligase (IV) na 4-kumaroïel-CoA omgeskakel word.

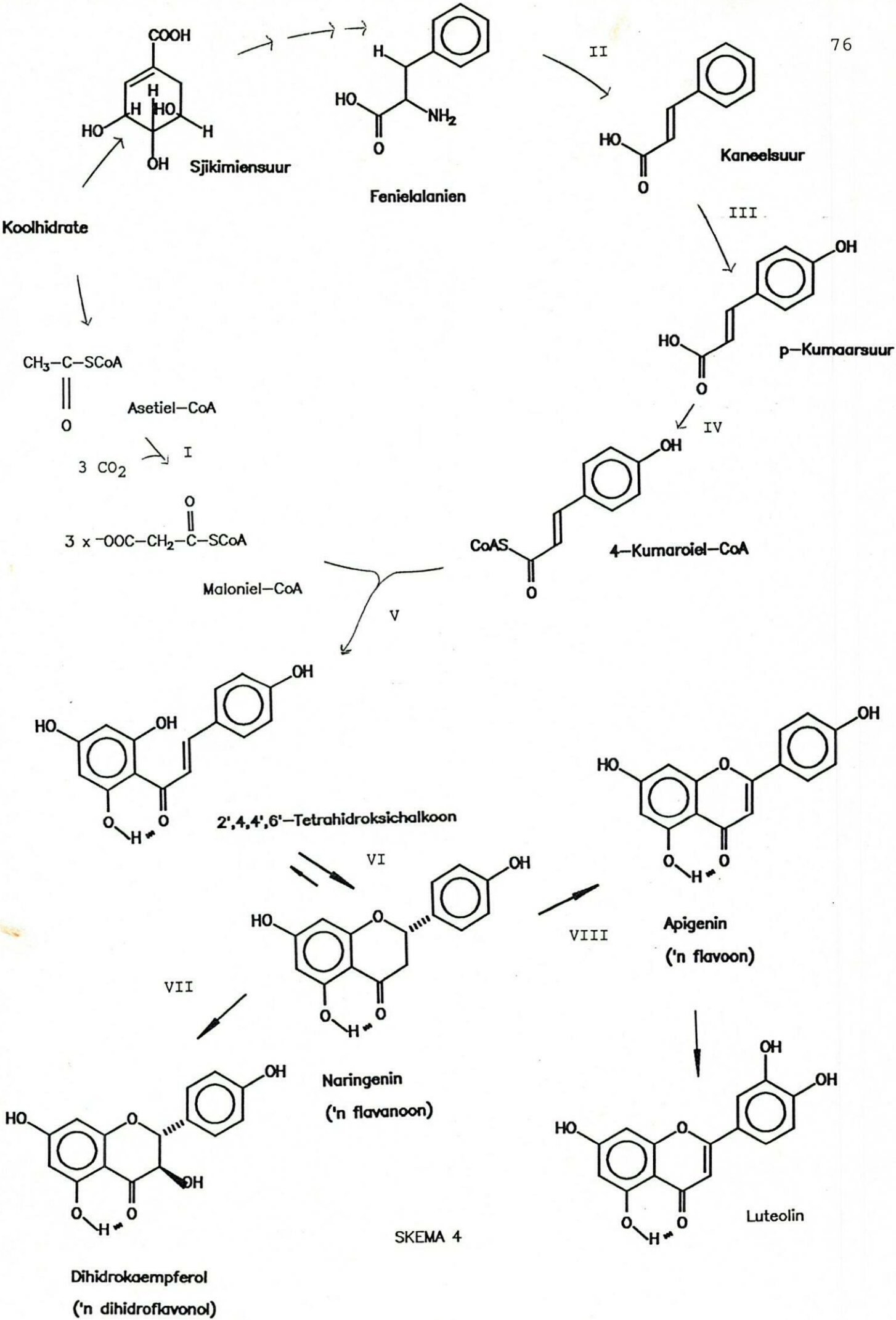
Die sentrale stap in flavonoïedbiosintese behels die kondensasië van drie molekules maloniel-CoA met 'n geskikte hidroksikaneelsuur-CoA ester, gewoonlik 4-

kumaroïel-CoA, om die chalkoonintermediêr te vorm. Hierdie reaksie word deur chalkoonsintetase (V) gekataliseer en verloop volgens Birch se hipotese *via* 'n ensiemsubstraatkompleks (SKEMA 5).⁷⁸⁾ Chalkoonisomerase (VI) kataliseer op sy beurt die isomerisasie van die chalkoon na die ooreenstemmende flavanoon, wat deur oksidasie en hidrosilering aan flavone en dihidroflavonole, respektiewelik, oorsprong gee. Dihidroflavonole is die biosintetiese intermediêre vir die vorming van flavonole.

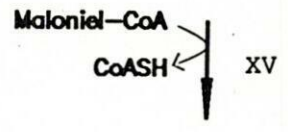
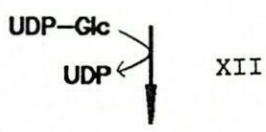
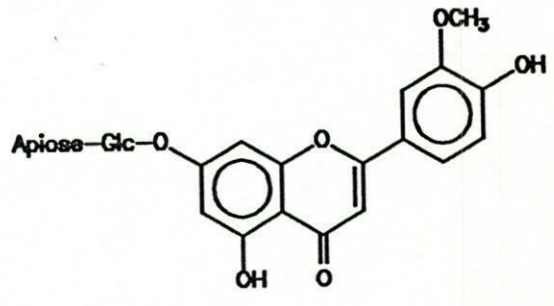
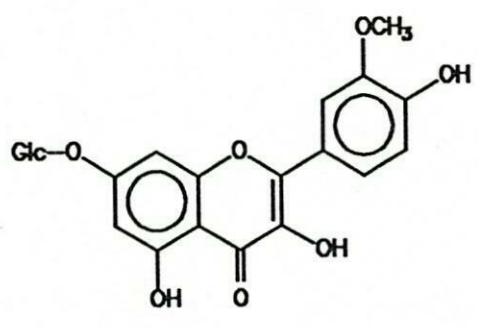
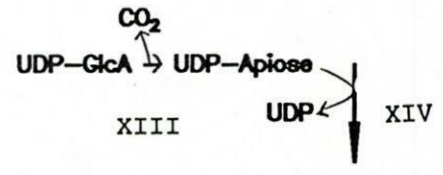
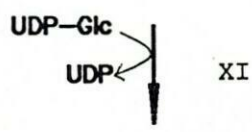
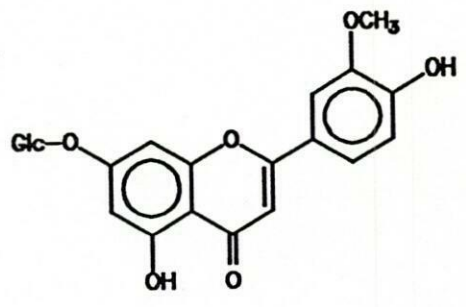
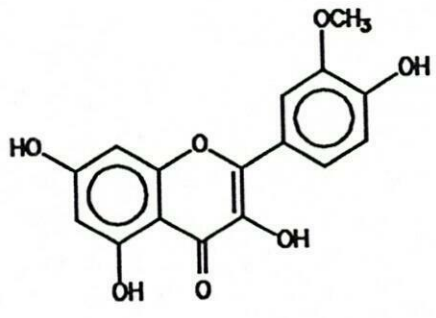
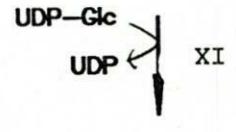
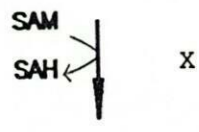
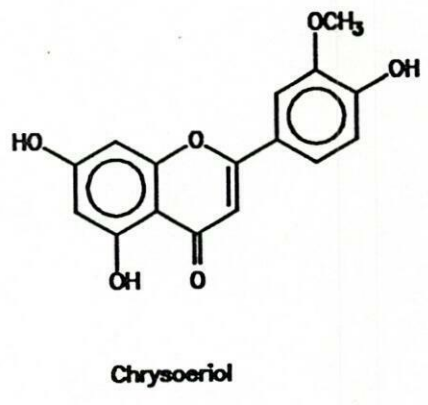
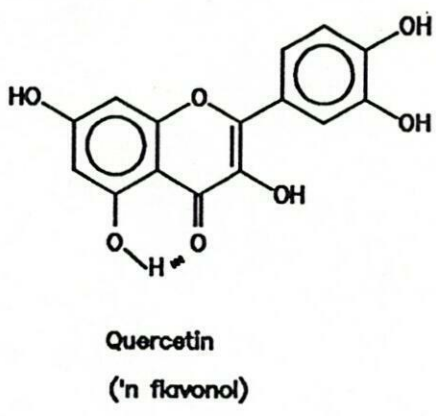
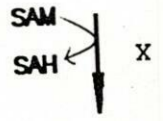
Die B-ring substitusiepatroon word bepaal deur:

1. Die inkorporering van reeds gesubstitueerde hidrosikaneelsuurderivate tydens die sintese van die C₁₅-raamwerk.
2. Substitusie tydens die C₁₅-stadium deur die werking van spesifieke hidrosilases en metieltransferases.

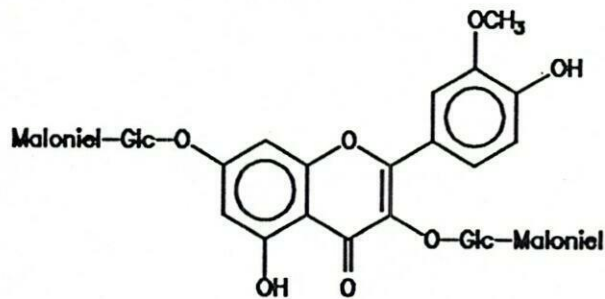
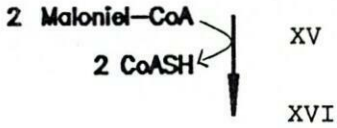
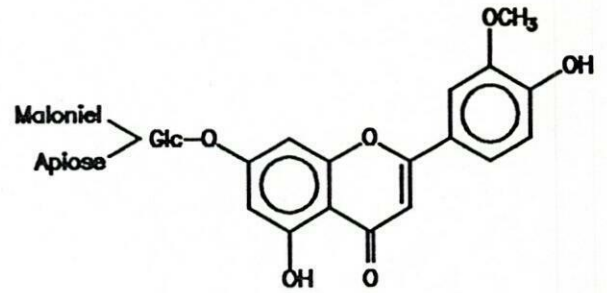
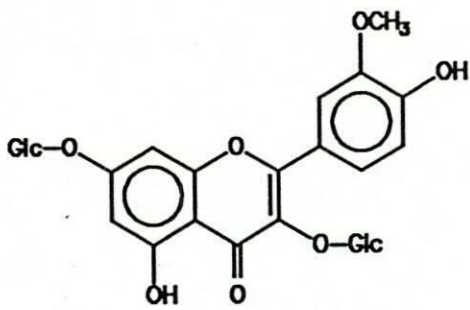
Beide *O*- en *C*-glikosilering van flavonoïede word deur substraatspesifieke glikosieltransferases gekataliseer, terwyl *O*-metieltransferases metilering kataliseer (SKEMA 4).



SKEMA 4



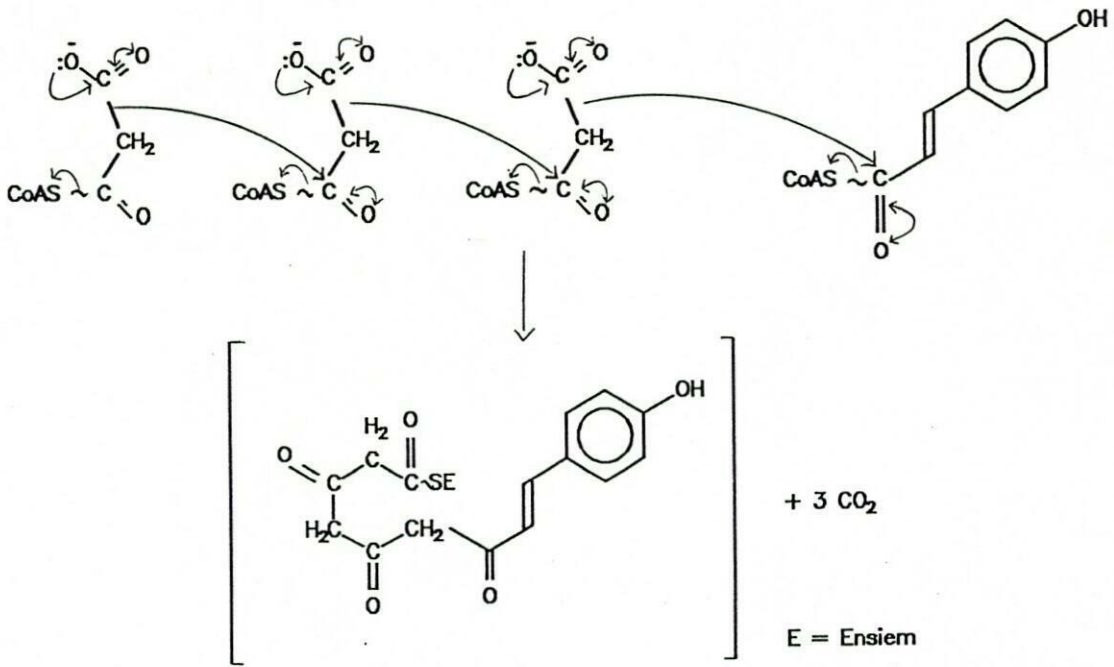
SKEMA 4 (vervolg)



- I Asetiel-CoA karboksilase
- II Feniilalanien-ammonialiase
- III Kaneelsuur-4-hidroksilase
- IV 4-Kumaraat: CoA ligase
- V Chalkoonsintetase
- VI Chalkoonisomerase
- VII "Flavonoïed-3-hidroksilase"
- VIII "Flavonoïedoksidase"
- IX "Flavonoïed-3'-hidroksilase"
- X SAM: flavonoïed-3'-metieltransferase
- XI UDP-Glukose: flavonoïed-7-O-glukosieltransferase
- XII UDP-Glukose: flavonol-3-O-glukosieltransferase
- XIII UDP-Apiose/UDP-xilose-sintase
- XIV UDP-Apiose: flavoon-7-O-glukosied-2"-O-apiosieltransferase
- XV Maloniel-CoA: flavonoïed-7-O-glukosiedmalonieltransferase
- XVI Maloniel-CoA: flavonol-3-O-glukosiedmalonieltransferase

SAM = S-adenosiel-L-metionien
 SAH = S-adenosiel-L-homosisteien
 UDP = Uridiendifosfaat

SKEMA 4 (vervolg)

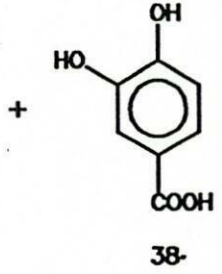
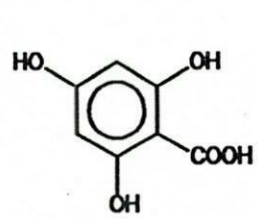
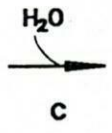
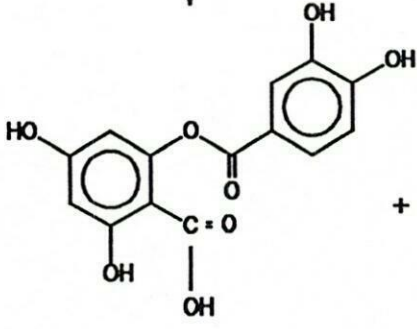
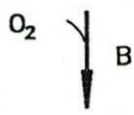
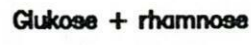
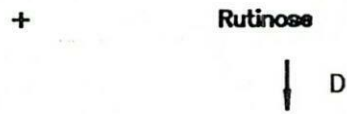
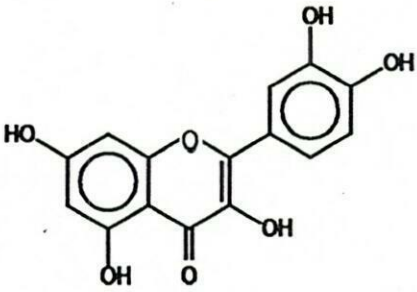
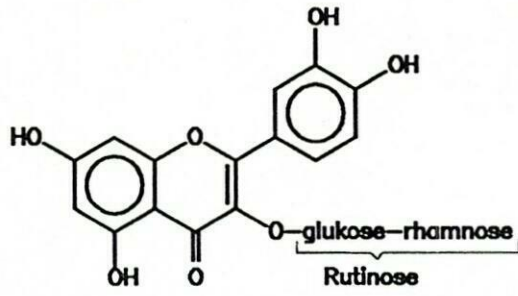


SKEMA 5

Verskeie bensoësure, waarskynlik flavonoïedmetaboliete, is ook geïsoleer. Weens die omvattenheid van die onderwerp, word met enkele voorbeelde volstaan.

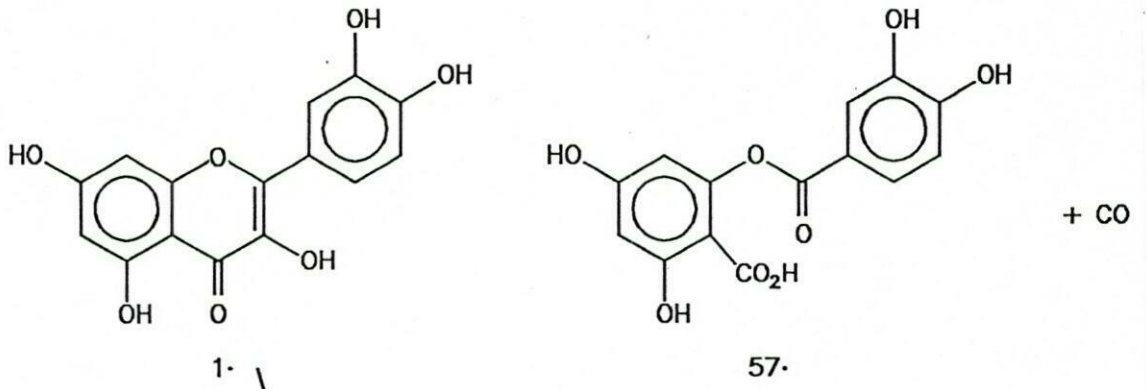
Die degradasie van flavonole deur fungi is van die bekendste voorbeelde van flavonoïedmetabolisme in mikroörganismes. Rutin (7) word byvoorbeeld deur *Aspergillus sp.*, *Pullularia fermentaris* en *Fusarium oxysporum* volgens die degradasieweg in SKEMA 6 tot o.a. 3,4-dihidroksibensoësuur (38) gekataboliseer.

Quercetin (1) word op 'n soortgelyke wyse deur quercetinase, 'n Cu^{II}-bevattende dioksigenase, tot 'n depsied (fenoliese karboksielsuurester) [57] en koolstofmonoksied gemetaboliseer. Daar word gepostuleer dat 'n Cu^{II}-chelaat van quercetin die sleutelintermediêr in die metabolisme is (SKEMA 7).⁷⁹⁾



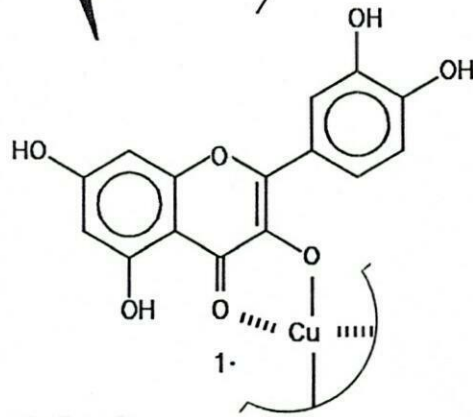
A = Rutinase, B = Quercetinase, C = Esterase, D = Rhamnosidase

SKEMA 6



Quercetinase

O₂



SKEMA 7

HOOFSTUK 9

DIE ISOLASIE VAN FENOLE UIT VERWERKTE ROOIBOS

9.1 INLEIDING¹⁾

Verskeie verrykingstegnieke, nl. kolomchromatografie (Sephadex LH-20 en sellulose), mediumdrukkolomchromatografie (Sephadex LH-20), "Flash"-kolomchromatografie (silikagel) en dunlaagchromatografie (silikagel), is vir die fraksionering van die komplekse fenoliese mengsel aangewend. Die kompleksiteit van die metaboliese poel het in sekere gevalle - veral in die geval van mengsels van O- en C-glikosidiese flavonoïede, onderskeidelik - die derivatisering van die fenoliese komponente en verdere fraksionering van die metieleter-, asetaat- of metieleterasetaatderivate vereis. Derivatisering was in sekere opsigte 'n nadeel, aangesien onvolledige metilering en asetilering dikwels tot 'n mengsel van verskillende derivate van dieselfde vryfenoliese verbinding gelei het - 'n ernstige nadeel in die lig van die lae konsentrasies waarin die verbindings voorkom. Die C-5 hidroksigroep het weens die sterk chelering met die C-4 karbonielsuurstof sterk weerstand teen metilering, en in sekere gevalle selfs asetilering, gebied. Gevalle is ook gevind waar die hidroksigroep op C-6 van glukose met diasometaan, gewoonlik selektief vir fenoliese hidroksigroepe, gemetileer het.

Verskeie aanpassings aan die algemene metodes van asetilering en metilering moes gemaak word. Ekstraksie van die asetate het, buiten lae opbrengste weens die wateroplosbaarheid daarvan, ook tot die hidrolise van veral die C-5 esterfunksionaliteit gelei. 'n Alternatiewe metode, waar

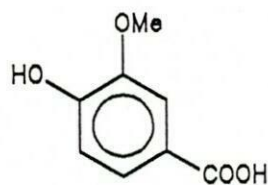
¹ Weens 'n gebrek aan materiaal, kon geen kristallasies (behalwe waar aangedui) bewerkstellig word nie en geen gemengde smeltpunte bepaal word nie.

gelyke volumes piridien en asynsuuranhidried gebruik is en vog uitgesluit is deur die reaksiemengsel onder N_2 droog te damp, is ontwikkel.

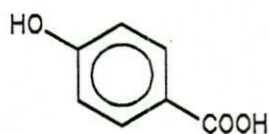
In 'n poging om die hidroksigroep op C-5 te metileer, is die reaksiemengsel, buiten die normale 48 uur by $-15^\circ C$, ook vir 2 uur by $0^\circ C$ gelaat. Selfs hierdie metode was slegs in sekere gevalle suksesvol. Ongelukkig kon die verloop van metilering nie in die geval van mengsels met TLC gekwantifiseer word nie en weens die gevaar van metileeninsersie kon meer drastiese reaksiekondisies nie oorweeg word nie.

9.2 KARBOKSIELSURE

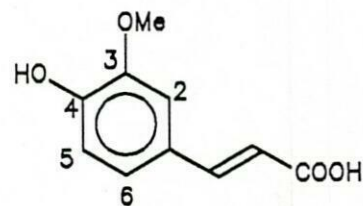
Verskeie bekende karboksiesure is geïsoleer, nl. 4-hidroksi-3-metoksibensoësuur (vanilliensuur) (34) (plaat 1, tabel 1), *p*-hidroksibensoësuur (35) (plaat 2, tabel 1), 4-hidroksi-3-metoksikaneëlsuur (feruliensuur) (36) (plaat 3, tabel 2), 4-hidroksikaneëlsuur (*p*-kumaarsuur) (37) (plaat 4, tabel 2), 3,4-dihidroksibensoësuur (protokatesjoësuur) (38) (plaat 5, tabel 1) en 3,4-dihidroksikaneëlsuur (kaffeïensuur) (39) (plaat 6, tabel 2).



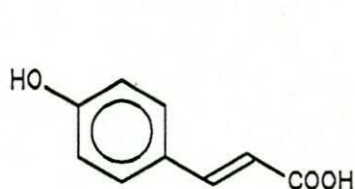
34.



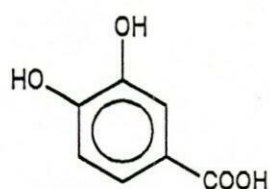
35.



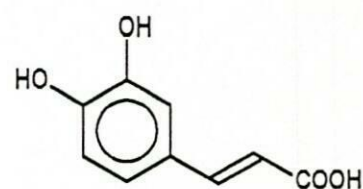
36.



37.



38.



39.

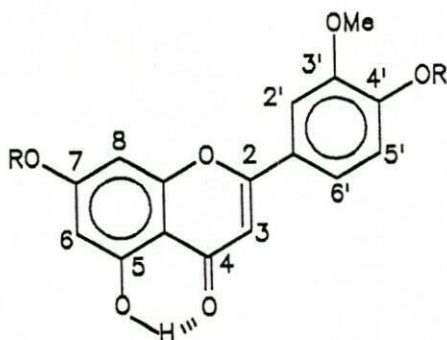
Elkeen van hierdie sure is geïdentifiseer deur die ^1H KMR spektra met dié van outentieke monsters te vergelyk.

9.3 4',5,7-Trihidroksi-3'-metoksiflavoön (Chrysoeriol) [40] en 4',7-di-asetoksi-5-hidroksi-3'-metoksiflavoön (4',7-di-O-asetielchrysoeriol) [40a]

Chrysoeriol (40) is reeds in 1977 uit *Coleus amboinicus* geïsoleer⁸⁰, maar is nuut uit rooibos.

Die ^1H KMR spektrum (plaat 7, tabel 3) van chrysoeriol vertoon 'n singulet, kenmerkend van 'n waterstofgebonde hidroksigroep, by δ 8.44. 'n Tipiese ABX-sisteem, 'n een-proton singulet en twee *meta*-gekoppelde doeblatte kom in die aromatiese gebied voor, terwyl 'n drie-proton singulet by δ 3.99 op die teenwoordigheid van 'n metoksigroep dui.

^1H KMR analise van die geasetileerde produk (40a) (plaat 8, tabel 3) het op die teenwoordigheid van twee asetoksigroepe (δ 2.33 en 2.42), sowel as 'n waterstofgebonde hidroksigroep (δ 8.50) gedui.



40. R = H

40a. R = Ac

Spin-spinontkoppelingseksperimente het onderskeid tussen die *m*-doeblette van die A- en B-ring protone moontlik gemaak. Onderskeid is tussen H-6 en H-8 getref op grond van chemiese verskuiwings.⁸⁴⁻⁸⁹) Ter staving van die relatiewe chemiese verskuiwings van H-6 en H-8, is n.O.e-ekperimente op 'n analoë verbinding uitgevoer (paragraaf 9.12). 'n N.O.e-assosiasie van die metoksigroep (δ 3.90) met H-2' (δ 7.37, 9.86 %) het bevestig dat C-3' van die B-ring die metoksisubstituent dra.

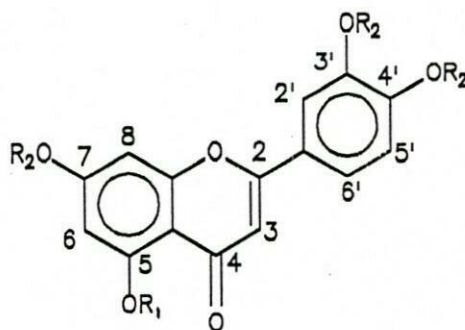
9.4 **3',4',5,7-Tetrahidroksiflavoon (Luteolin) [2], 5-asetoksi-3',4',7-trimetoksiflavoon (5-O-asetiel-3',4',7-tri-O-metielluteolin) [2a] en 3',4',5,7-tetrametoksiflavoon (3',4',5,7-tetra-O-metiel-luteolin) [2b]**

Luteolin (2) is in 1975 uit *Vernonia pectoralis*⁹⁰) en in 1974 uit verwerkte rooibos¹⁶) geïsoleer.

Die ^1H KMR spektrum van luteolin (2) (plaat 9, tabel 4), vertoon 'n ABX-sisteem, 'n een-proton singulet, twee *meta*-gekoppelde doeblette en 'n waterstofgebonde hidroksigroep by lae veld (δ 8.43).

Metilering en asetilering het aanleiding gegee tot die isolasie van twee verskillende derivate van luteolin (2a en 2b) (plaat 12, tabel 4 en plaat 13, tabel 4). Die ^1H KMR-spektrum van derivaat (2a) vertoon een asetoksi- en drie metoksiseine. Eersgenoemde is weer op grond van die sterk chelering van die hidroksigroep met die *peri*-karbonielgroep en die gevolglike weerstand teen metilering, aan die C-5 asetoksigroep toegeken.

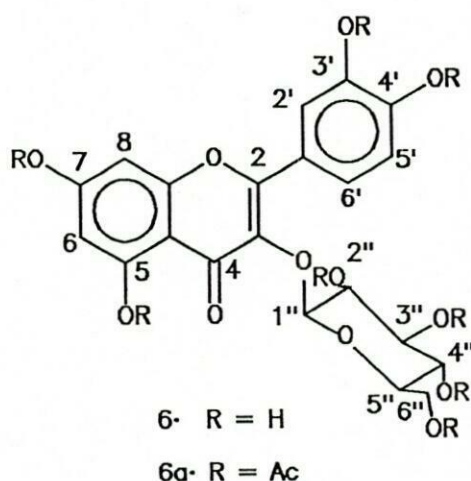
Onderskeid tussen H-6 en H-8 is op grond van dieselfde kriteria as in paragraaf 9.3 getref.



2. $R_1 = R_2 = \text{H}$
 2a. $R_1 = \text{Ac}, R_2 = \text{Me}$
 2b. $R_1 = R_2 = \text{Me}$

9.5 3',4',5,7-Tetra-asetoksi-3-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-β-D-glukopiranosieloksi)flavonol [okta-O-asetiel-isoquercetrin] [6a]

Isoquercetrin (3',4',5,7-tetrahidroksi-3-β-D-glukopiranosieloksiflavonol) (6) is reeds in 1901 uit *Gossypium herbaceum*⁹¹⁾ en in 1959 uit rooibos¹⁹⁾ geïsoleer.



Vergelyking van die ^1H KMR-spektrum van die geasetileerde derivaat van die natuurlike monster (plaat 10, tabel 5) met dié van outentieke isoquercetrin na asetilering, het die identiteit van die verbinding bevestig.

Soos later sal blyk, is daar 'n duidelike verskil in die grootte van die koppelingskonstante van H-1'' en H-2'' van glukose ($^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz) in hierdie verbinding en dié van C-gebonde β-D-glukopiranoses ($^3J_{\text{HH}} = 9.9 - 10.2$ Hz). Die waardes van die visinale koppelingskonstantes tussen H-1'' en H-2'' van die O-asetiel-O-metieleterderivate van rutin ($J = 7.8 - 8.0$ Hz) (par. 9.12) ondersteun hierdie waarneming.

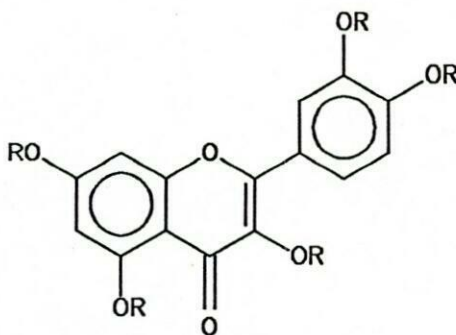
Hierdie waarnemings, tesame met gepubliseerde data^{58,85-89,92-}

101,103,18,23,102), het dit moontlik gemaak om 'n empiriese reël vir die onderskeid tussen O- en C-gebonde β -D-glukopiranoses daar te stel, nl. $J = 7 - 8$ Hz vir O-glukosiede en $9.9 - 10.2$ Hz vir C-glikosiede.

9.6 3',4',5,7-Tetrahidroksiflavonol (Quercetin) [1] en 3,3',4',5,7-penta-asetoksiflavonol (3,3',4',5,7-penta-O-asetielquercetin) [1a]

Quercetin (1) kom wyd verspreid in die natuur voor¹⁰³⁾ en is reeds in 1974 uit verwerkte rooibos geïsoleer¹⁶⁾.

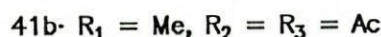
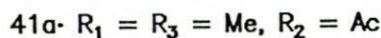
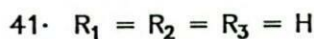
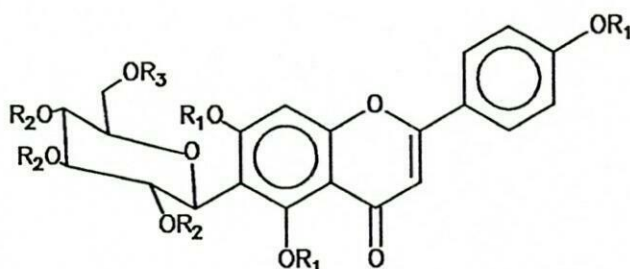
Die ^1H KMR spektra van verbindings (1) (plaat 11, tabel 5) en (1a) (plaat 20, tabel 5) is met dié van outentieke quercetin (1) en die penta-asetielerivaat van outentieke quercetin, onderskeidelik, vergelyk om die identiteit van die verbindings te bevestig.



1- R = H

1a- R = Ac

- 9.7 4',5,7-Trimetoksi-6-(2,3,4-tri-O-asetiel-6-O-metiel-β-D-glukopiranosiel)flavoon [2'',3'',4''-tri-O-asetiel-4',5,6'',7-tetra-O-metielisovitexin] [41a] en 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-β-D-glukopiranosiel) flavoon [2'',3'',4'',6''-tetra-O-asetiel-4',5,7-tri-O-metielisovitexin] [41b]



4',5,7-Trihidroksi-6-β-D-glukopiranosielflavoon (isovitexin) (41) kom wyd verspreid in die natuur voor¹⁰⁴), maar is onbekend in rooibos. Die kompleksiteit van die fraksie waarin hierdie verbinding voorgekom het, het derivatisering genoodsaak om skeiding te bewerkstellig.

Die aromatiese gebied van die ¹H KMR spektrum van verbinding (41b) (plaat 15, tabel 6) vertoon 'n AA'BB'-sisteem en twee singulette. Spin-spinontkoppelingseksperimente in 'n analoë (paragraaf 9.12) geval het die identifikasie van die individuele suikerprotone moontlik gemaak, terwyl die piranosiedvorm van die suiker uit die orde van die koppelingskonstantes tussen alle betrokke suikerprotone gevolg het. Die 1,3-diaksiale interaksie tussen H-1'', H-3'' en H-5'', wat uit 'n n.O.e-assosiasie van H-1'' (δ 5.10) met

H-3" (δ 5.32) en H-5" (δ 3.83) volg, dien as bevestiging van die piranosiedvorm van die suiker. Die β -konfigurasie van die anomeriese koolstof, sowel as die C-C-koppelingswyse, volg uit die koppelingskonstante ($^3J_{\text{HH}} = 10.1 \text{ Hz}$) tussen H-1" en H-2". van glukose^{85-89,92}), terwyl die absolute D-konfigurasie uit die natuurlike voorkoms van die suiker volg.⁹²⁾

'n N.O.e-assosiasie van die singulet by $\delta 6.57$ met H-2' en H-6' ($\delta 7.80, 7.78 \%$) van die B-ring, het bewys gelewer dat hierdie sein aan H-3 toe te skryf is. Die singulet by $\delta 6.77$ kon op grond van 'n n.O.e-assosiasie met slegs een metoksigrup ($\delta 3.99, 2.79 \%$) aan H-8 toegeskryf word. Dit is interessant dat die anomeriese proton van glukose ($\delta 5.10$) selektief met die 5-OMe-grup ($\delta 3.89$) assosieer, terwyl geen assosiasie met die 7-OMe-grup ($\delta 3.99$) waarneembaar is nie. Die 7-OMe-grup is dus in die ruimte weg van die suikermoëteit (soos uit 'n steriese oogpunt verwag sou word) georiënteer, terwyl die 5-OMe-grup vanweë die nabyheid van die karbonielgrup só georiënteer is dat ruimtelike assosiasie met H-1" wel moontlik is.

Die ^1H KMR-spektrum van verbinding (41a) (plaat 14, tabel 6) is feitlik identies aan dié van verbinding (41b) - die asetoksisein by $\delta 2.48$ ontbreek egter in die spektrum van verbinding (41a), terwyl 'n addisionele metoksisein by hoër veld ($\delta 3.30$) teenwoordig is. 'n N.O.e-assosiasie van hierdie metoksisein met H-5", sowel as een van die nie-ekwivalente H-6"-protone van glukose ($\delta 3.44$), bevestig dat die 6-OH van glukose gemetileer is. Soos reeds genoem, is die metilering van 'n alifatiese hidroksigrup met diasmetaan buitengewoon, aangesien hierdie reagens gewoonlik selektief vir fenoliese hidroksigroepe is.

Dit word algemeen aanvaar dat die hidroksigrup op die 2-posisie van suikermoëteite suurder ($\text{pK}_a \approx 12.5$) as die ander suikerhidroksiprotone is.

Backzo et al.¹⁰⁵⁾ het voorgestel dat asilering van die primêre hidroksigroep (6-OH van glukose) moontlik deur

- 1) asilering van die 2-posisie, gevolg deur intramolekulêre migrasie van die alkielgroep, of
- 2) prototropiese ewewigte tussen die vier oksi-anioniese vorme, gestabiliseer deur intramolekulêre waterstofbinding, verklaar kan word.

Dieselfde outeurs het getuienis teen hipotese 1 gevind en het 6-asilering aan prototropiese ewewigte (fig 1), gevolg deur asilering van die mees nukleofiele oksi-anioon, toegeskryf.

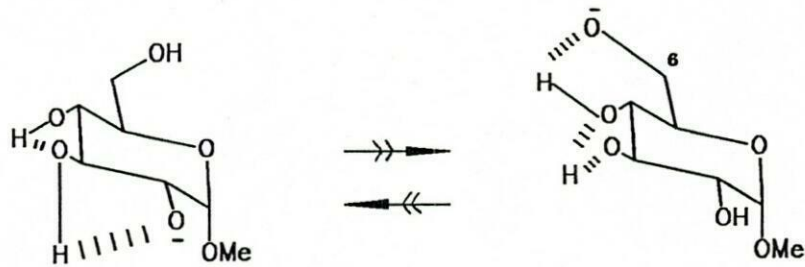
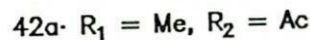
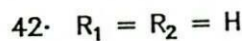
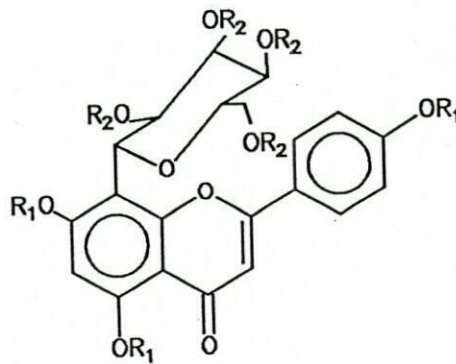


Fig 1. Prototropiese ewewigte tussen die oksi-anioniese vorme van 1-O-metiel- α -D-glukopiranose.

Hierdie hipotese bied ook 'n verklaring vir die regioselektiewe metilering van die 6-OH van glukose in die teenwoordigheid van drie ander sekondêre alifatiese hidroksigroepe.

Vergelyking van die pKa-waarde van die 2-OH van suikermoëteite (*ca.* 12.5) met dié van fenoliese verbindings soos resorsinol ($pK_a \approx 9.81$), fenol ($pK_a \approx 9.89$) en katesjol ($pK_a \approx 10.0$), toon dat eersgenoemde se suureienskappe heelwat swakker as dié van fenoliese hidroksigroepe is. Dit sou dus verwag kon word dat die 6-OH van glukose eers sal metileer nadat alle fenoliese hidroksigroepe gemetileer is - in ooreenstemming hiermee is beide die fenoliese trimetieleter en sy 6"-metieleterderivaat tydens metilering verkry. Soos in die geval van verbinding (41b), is weereens 'n n.O.e-assosiasie tussen H-3 ($\delta 6.56$) en H-2' en H-6' ($\delta 7.80, 7.69$ %) van die B-ring, asook tussen H-8 ($\delta 6.73$) en die 7-OMe-groep ($\delta 3.97, 2.38$ %), waargeneem.

9.8 4',5,7-Trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon
[2'',3'',4'',6''-tetra-O-asetiel-4',5,7-tri-O-metielvitexin] [42a]



4',5,7-Trihidroksi-8- β -D-glukopiranosielflavoon (vitexin) (42) is algemeen bekend¹⁰³), maar is nog nie voorheen uit rooibos geïsoleer nie.

Verbinding (42a) is uit dieselfde gederivatiseerde fraksie as die isovitexin-

derivate (41a) en (41b) geïsoleer. Die ^1H KMR-spektrum (Plaat 16, tabel 6) vertoon soortgelyke sisteme as dié van verbindings (41a) en (41b). Dit is egter opvallend dat, in teenstelling met die totale afwesigheid van rotamerie in die isovitexin-derivate (41a en 41b), betekenisvolle rotasie-isomerie (met gevolglike seinverdubbeling in die ^1H KMR-spektrum) in die geval van die vitexin-derivaat (42a) teenwoordig is.

Seine is na analogie van die ^1H KMR-spektra van verbindings (41a) en (41b) toegeken, terwyl n.O.e-eksperimente die voorgestelde struktuur finaal bevestig het.

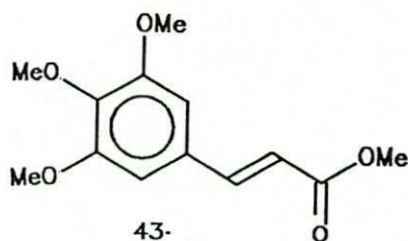
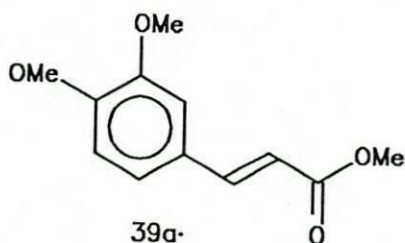
'n N.O.e-assosiasie van die singulet by δ 6.30 met drie metoksi-seine (2×3.98 en δ 3.95) dui daarop dat H-6 met twee metoksigroepe in die een rotameer en een metoksigroep in die ander rotameer, assosieer. Hierdie bestraling het ook onderskeid tussen H-3 en H-6 moontlik gemaak. Herhaalde n.O.e-assosiasies van bogenoemde metoksigroepe (δ 3.95, 2×3.98) én die metoksigroep by δ 4.00 met H-6 van albei rotamere (δ 6.38 en 6.33) vir al drie bestralings, sowel as die assosiasie van H-2' en H-6' (δ 7.98) met H-3 (δ 6.59), het bogenoemde bevindings ondersteun.

Buiten die identifikasie van die 6-posisie as die enigste ongesubstitueerde posisie op die A-ring, is addisionele bewys vir die koppelingsposisie van die suiker gevind deur die assosiasie van die oorblywende metoksigroep van elke rotameer (δ 3.90 en 3.89) met H-3' en H-5' (δ 7.12) van die B-ring, sowel as H-1" (δ 5.25, 5.24), H-3" (δ 5.39, 5.36) en H-4" (δ 5.51) van glukose. Hierdie assosiasie van die B-ring met die suiker op die 8-posisie, vind 'n presedent in die werk van Steynberg et al.¹⁰¹). 'n N.O.e-assosiasie van H-3' en H-5' van die hoof rotameer (δ 7.12) met die metoksigroep by δ 3.89, het finaal bevestig dat die singulet by δ 3.89 aan die 4'-OMe-groep toe te

skryf is.

Die toekenning van die individuele suikerseine kon ook op grond van direkte koppeling van H-1" (δ 5.25, 5.24, 5.22) met H-2" (δ 5.99, 5.87) en van H-3" (δ 5.39, 5.36) met H-2" (δ 5.99, 5.87) van albei rotamere, bevestig word.

9.9 3,4-Dihidroksibensoësuur [38], metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a] en metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43] *



N.O.e-eksperimente op die onskeibare mengsel na diasometaanmetilering, het op die assosiasie van 'n singulet (2H, δ 6.73) met twee metoksigroepe (6H, δ 3.87, 1.39 %) en 'n paar α -en β -doeblette (δ 6.33, 11.52 % en 7.59, 13.23 %) gedui. Die ^1H KMR spektrum van sintetiese metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (43) (plaat 18b, tabel 12) het presies met hierdie seine ooreengestem.

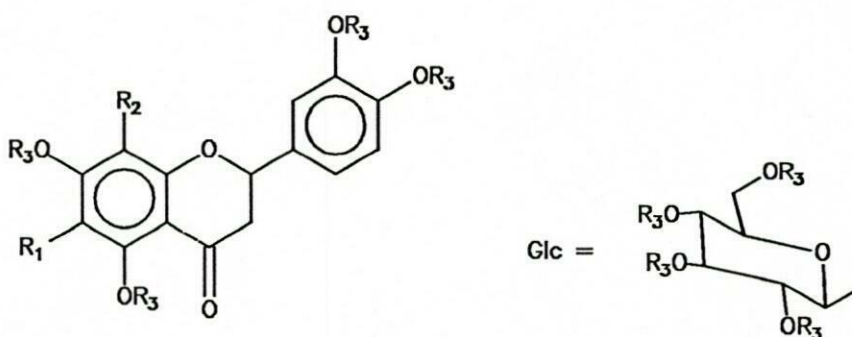
N.O.e-assosiasie van 'n *meta*-doeblet (δ 7.03) met twee metoksigroepe (6H, 3.89, 1.30 %) en die oorblywende α - en β -doeblette (δ 7.62, 5.75 % en 6.29, 9.41 %) is ook waargeneem. Die ^1H KMR spektrum van metiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat (39a) (plaat 17, tabel 2), gesintetiseer deur

* Plate 5, 17, 18a en 18b is die ^1H KMR-spektra van outentieke en sintetiese monsters en vervang die spektrum van die onskeibare mengsel.

diasometilering van outentieke kaffeïensuur (39), het presies met hierdie seine ooreengestem.

Die oorblywende seine is op grond van vergelyking van ^1H KMR spektra aan 3,4-dihidroksibensoësuur (38) (plaat 5, tabel 1) toegeken.

9.10 3',4',5,7-Tetrahidroksi-6- β -D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-iso-orientin) * [44A] en okta-O-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin [44Aa] **)



44A $R_1 = \text{Glc}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$

44B $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Glc}$, $R_3 = \text{H}$

44Aa $R_1 = \text{Glc}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Ac}$

44Ba $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Glc}$, $R_3 = \text{Ac}$

Alhoewel 2,3-dihidro-iso-orientin (44A) voorheen deur die katalitiese hidrogenering van iso-orientin berei is²¹⁾, is hierdie verbinding nog nie voorheen uit die natuur geïsoleer nie. Dieselfde geld vir 2,3-dihidro-orientin (44B).

'n Een-proton sein by δ 7.90 in die ^1H KMR spektrum van verbinding (44A) (plaat 20, tabel 7) het die teenwoordigheid van 'n cheleerde hidroksigroep by C-5 bevestig. Die B-ring protone vertoon 'n tweede orde

* Weens 'n tekort aan materiaal, was 'n HETCOR-eksperiment onsuksesvol en kon die koppelingsposisie van die suiker nie bepaal word nie. Die geïsoleerde verbinding mag dus ook 3',4',5,7-tetrahidroksi-8- β -D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihidro-orientin) [44B] wees.

** Mag ook okta-O-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin wees.

patroon, terwyl 'n singulet by δ 5.95 resoneer.

Individuele seine van die suikermoëteit kon op grond van spin-spinontkoppelings- en ^1H - ^1H COSY (plaat 21) KMR-eksperimente toegeken word. Uit die groot koppelingskonstantes tussen H-1" en H-2" ($J = 10.0$ Hz), H-2" en H-3" ($J = 8.9$ Hz), H-3" en H-4" ($J = 8.9$ Hz) en H-4" en H-5" ($J = 9.9$ Hz), volg dat die protone van elke paar *trans*-diaksiaal⁹³ t.o.v. mekaar georiënteer is en dat die suiker dus glukose (in die piranose vorm) is. Die absolute D-konfigurasie van glukose volg uit die natuurlike voorkoms⁹² van die suiker, terwyl die anomeriese β -konfigurasie en die C-C-koppelingswyse uit die visinale koppelingskonstante tussen H-1" en H-2" ($^3J_{\text{HH}} = 10.0$ Hz) volg.

Die teenwoordigheid van 'n stel seine in die heterosikliese gebied, bestaande uit een-proton doeblette van doeblette by δ 5.33 en δ 5.31 ($J = 3.0$ en 12.8 Hz), δ 3.10 ($J = 12.8$ en 17.5 Hz) en δ 2.70 en δ 2.68 ($J = 3.0$ en 17.5 Hz), is in ooreenstemming met 'n normale flavanoonskelet. Spin-spinontkoppeling het die verwantskap tussen hierdie seine bevestig.

Spin-spinontkoppelings- en ^1H - ^1H COSY (plaat 24) KMR-eksperimente van okta-*O*-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin (44Aa) (plaat 22, tabel 7) het bevestig dat die suikergedeelte 2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- β -D-glukopiranosiel is. Dieselfde tegnieke het weereens die flavanoonskelet bevestig.*

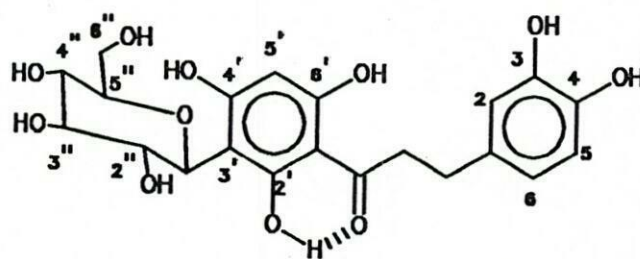
^1H KMR-analise van die aromatiese gebied van okta-*O*-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin (44Aa) in aseton- d_6 (Plaat 23, tabel 7), het op die teenwoordigheid van 'n ABX-sisteem (B-ring) en 'n singulet (A-ring), albei sisteme verdubbel weens rotasie-isomerie, gedui.

* Weens 'n defekte SD-apparaat kon die optiese rotasie van verbindings (44A/B) en (44Aa/Ba) nie bepaal word nie.

9.11 2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'-β-D-glukopiranosieldihidrochalkoon
(aspalathin) [8] en derivate

Aspalathin (8), die hoof fenoliese komponent van groen rooibos, is in 1959 vir die eerste keer geïsoleer¹⁹⁾ en is tot dusver uniek aan rooibos.

Aangesien slegs 60 MHz KMR-data van aspalathin (8) gepubliseer is^{21,23)}, is gepoog om 'n volledige stel 300 MHz ¹H KMR-data daar te stel.



8.

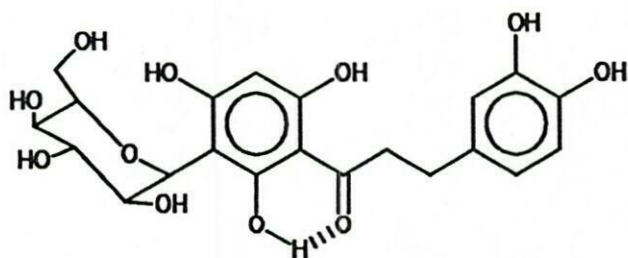
Die ¹H KMR spektrum van outentieke aspalathin (plaat 25, tabel 8) vertoon 'n ABX-sisteem vir die B-ring en 'n een-proton singulet by δ 5.91. Die individuele suikerprotone is op grond van koppelingskonstantes en na analogie van soortgelyke sisteme in die ¹H KMR-spektrum van 2,3-dihidro-iso-orientin (par. 9.10) toegeken, terwyl dieselfde kriteria as in paragraaf 9.10 bevestig het dat die suiker 'n β-D-glukopiranosielmoïeteit is.

Twee swak gedefinieerde triplette by δ 3.31 (2H, J = 8.0 Hz) en δ 2.81 (2H,

$J = 8.0$ Hz) van die karakteristieke A_2B_2 -sisteem vir dihidrochalkone, is as die $H-\alpha$ en $H-\beta$, respektiewelik, geïdentifiseer. Spinontkoppelingseksperimente het die skalare koppeling tussen hierdie twee triplette bevestig.

9.11.1 2',3,4,4',6'-Pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosieldihidrochalkoon (8a)

Suiwering van aspalathin uit groen rooibos, het tot die isolasie van 'n mengsel van aspalathin (8) en 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosieldihidrochalkoon (8a) gelei.



8a-

Alhoewel verbindings (8) en (8a) nie geskei kon word nie, kon op grond van die koppelingskonstantes van die anomeriese proton van glukose ($J_\alpha = 5.0$ Hz, $J_\beta = 10.0$ Hz) (plaat 26, tabel 8) tussen hierdie verbindings onderskei word.

Aangesien basis-geïnduseerde anomerisasie van C-glikopiranosielverbindings slegs in gevalle voorkom waar 'n geaktiveerde CH_2 - of CH -groep aan die anomeriese koolstof β -eliminasië van die piraansuurstof toelaat en suur-geïnduseerde anomerisasie van C-

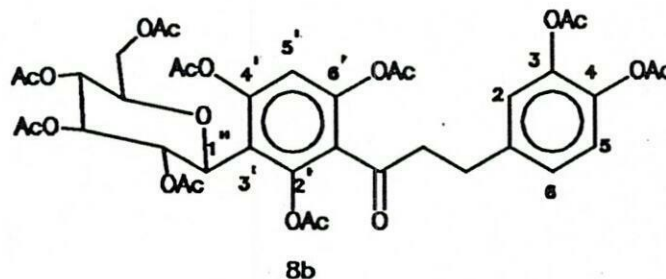
glikosielverbindings beperk is tot 'n paar voorbeelde waar 'n sterk elektronskenkende aromatiese substituent aan C-1 gebind is,⁹⁴⁾ is dit hoogs onwaarskynlik dat epimerisasie van β -D-glukopiranosose in aspalathin (8) onder neutrale kondisies kon plaasvind. Dihidrochalkoon (8a) is dus 'n nuwe natuurlike verbinding uit groen rooibos.

Buiten die feit dat hierdie verbinding tot 'n klas flavonoïede behoort wat relatief skaars in die natuur is, is hierdie verbinding ook een van die min C-glikosidiese flavonoïede met 'n α -glukopiranosielsubstituent.²⁴⁾

9.11.2 Asetiëlderivate van die keto- (8b) en enoltoutomere (8c) van aspalathin

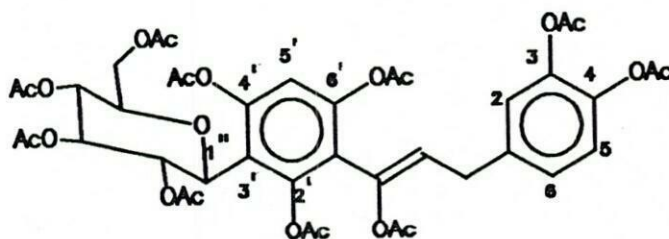
Asetilering van aspalathin met asynsuuranhidried en perchloorsuur, het verbinding (8b) as hoofproduk gelewer.

Die ^1H KMR-spektrum van nona-*O*-asetielaspalathin (8b) (plaat 28, tabel 8) vertoon 'n tweede orde aromatiese gebied. Die glukose-protone is baie beter versprei as in die geval van die vryfenoliese verbinding, terwyl die A_2B_2 -sisteem van die dihidrochalkoon meer kompleks is. Rotamering het die afname van die spektrum by 353 K genoodsaak ten einde 'n skerp spektrum te verkry.



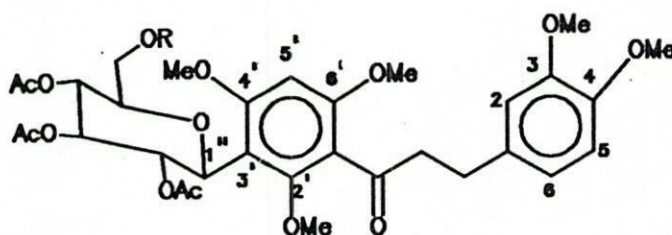
Asetilering van outentieke aspalathin volgens die standaardmetode het,

benewens die verwagte nona-*O*-asetiëlderivaat van aspalathin (8b), ook onverwags die deka-*O*-asetiëlderivaat van die enoltoutomeer (8c) (plaat 27, tabel 8), gelewer. 'n Triplet by δ 5.51 (8.0 Hz) en 'n doeplet by δ 3.38 (8.0 Hz) is as die α - en β -protone van die enoltauomeer geïdentifiseer, terwyl twee swak gedefinieerde sisteme by δ 3.05 en δ 2.95 op die teenwoordigheid van die A_2B_2 -sisteem van die keto-tauomeer gedui het. Verdubbeling van die suikermoëteitseië, 'n hoogs komplekse tweede orde aromatieëse gebied en die teenwoordigheid van negentien asetokseië, het as bevestiging vir die teenwoordigheid van die *O*-asetiëlderivate van die keto- en enoltoutomere van aspalathin gedien.



8c

9.11.3 2',3,4,4',6'-Pentametoksi-3'-(2,3,4-tri-O-asetiel-6-O-metiel-β-D-glukopiranosiel)dihydrochalkoon (2'',3'',4''-tri-O-asetiel-2',3,4,4',6',6''-heksa-O-metielaspalathin) [8d] en 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-β-D-glukopiranosiel)-dihydrochalkoon (2'',3'',4'',6''-tetra-O-asetiel-2',3,4,4',6'-penta-O-metielaspalathin) [8e]



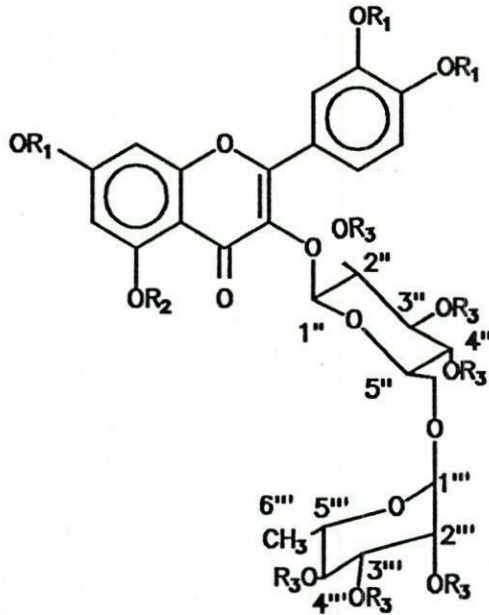
8d- R = Me

8e- R = Ac

Diasometaanmetilering en daaropvolgende asetilering van outentieke aspalathin het twee produkte, verbindings (8d) en (8e), gelewer.

Die ^1H KMR-spektra van verbindings (8d) (Plaat 30, tabel 9) en (8e) (Plaat 30, tabel 9) stem grootliks ooreen. 'n Addisionele alifatiese metoksi-sein is egter in die spektrum van verbinding (8d) teenwoordig, terwyl verskille in die gebied van die asetoksi-seine ook waarneembaar is. 'n N.O.e-assosiasie van die alifatiese metoksigrup (δ 3.30) met H-5'' (δ 3.45) van glukose bevestig, soos in die geval van isovitexin-derivaat (41a) (par. 9.7), dat die 6-OH-groep van glukose gemetileer het - weereens 'n buitengewone verskynsel.

9.12 3',4',5,7-Tetra-asetoksi-3-[2,3,4-tri-O-asetiel-6-O-(2,3,4-tri-O-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopiranosieloksi]flavonol [deka-O-asetielrutin] [7a], 2'',2''',3'',3''',4'',4'''-heksa-O-asetiel-3',4',5,7-tetra-O-metielrutin [7b] en 2'',2''',3'',4'',3''',4''',5-hepta-O-asetiel-3',4',7-tri-O-metielrutin [7c]



- 7· $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 7a· $R_1 = R_2 = R_3 = Ac$
 7b· $R_1 = R_2 = Me, R_3 = Ac$
 7c· $R_1 = Me, R_2 = R_3 = Ac$

Rutin (7) is in 1959 uit rooibos¹⁹⁾ geïsoleer en alhoewel hierdie verbinding nie in die huidige ondersoek geïsoleer is nie, is 'n 300 MHz 1H KMR-databasis van derivate van 'n outentieke monster opgebou vir vergelyking met soortgelyke verbindings.

Die 1H KMR-spektra van die geasetileerde derivate van outentieke isoquercetrin (plaat 10, tabel 5) en rutin (plaat 31, tabel 10) toon groot ooreenkomste en, met die uitsondering van die twee H-6"-protone van glukose, minimale verskille in die chemiese verskuiwings van die aromatiese en suikerprotone. Die groot verskil in die chemiese verskuiwings van die twee H-6"-protone van die twee verbindings (ca. 0.34 en 0.71 d.p.m.) het tentatiewe bewys gelewer dat die rhamnosielmoëteit aan C-6 van glukose gebind is.⁹²⁾

Metilering en daaropvolgende asetilering van outentieke rutin het derivate (7b) en (7c) gelewer.

Die ^1H KMR-spektrum van 7b (plaat 33, tabel 10) dui op die teenwoordigheid van vier metoksi- en ses asetoksigroepe, terwyl die B-ring protone 'n tweede orde patroon vertoon. Individuele suikermoëteite is op grond van spin-spinontkoppelingseksperimente geïdentifiseer. Die koppelingskonstantes tussen die glukoseprotone is in ooreenstemming met 'n suurstofgebonde β -D-glukopiranosielmoëteite, terwyl die D-konfigurasië uit die natuurlike voorkoms van die suiker volg. ^1H KMR spektroskopie het die C_1 - α konfigurasië van rhamnose bevestig ($J = 2.0$ Hz); $J < 2.5$ Hz.^{88,94}) Die groot koppelingskonstante tussen H-3''' en H-4''' ($J = 9.9$ Hz) sowel as tussen H-4''' en H-5''' van rhamnose ($J = 9.9$ Hz), dien as bevestiging van die *trans*-diaksiale oriëntasië van die protone in elke paar, terwyl die L-konfigurasië van rhamnose uit die natuurlike voorkoms van die suiker volg.⁹²⁾

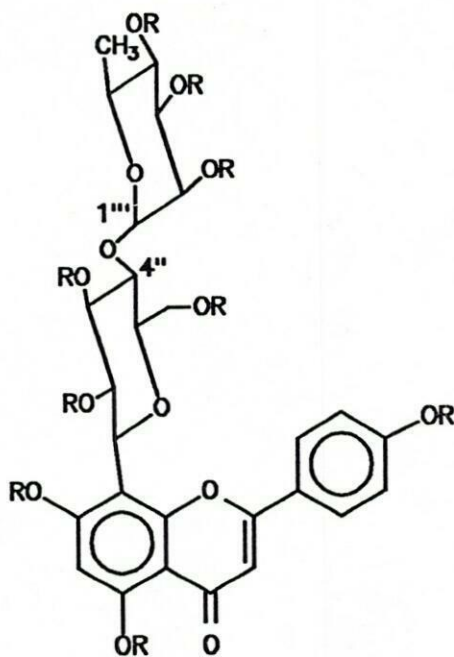
'n N.O.e-assosiasie van die twee H-6''-protone (δ 3.56 en 3.36) met H-1''' (δ 4.49) het bevestig dat die suiker wel rutinose (6-O- α -L-rhamnosiel- β -D-glukose) is. Hierdie resultaat vind 'n presedent in die werk van Steynberg¹¹⁹⁾ en Steynberg et al.¹⁰¹⁾, waar 'n assosiasie van H-1''' met een van die twee nie-ekwivalente H-6''-protone die (C-1''')-O-(C-6'')-interglukosiedbinding bevestig het. Onderskeid kon tussen die verskillende metoksisieine getref word op grond van n.O.e-assosiasie van die metoksi-singulette by δ 3.99 met H-2' (δ 7.67, 8.67 %), δ 3.94 met H-5' (δ 6.97, 15.49 %), δ 3.88 met *meta*-doeblette by δ 6.49 (12.33 %) en δ 6.34 (5.12 %) en 3.95 met 'n *meta*-doeplet by δ 6.34 (14.67 %). Op grond hiervan kon afgelei word dat die metoksisieine by δ 3.99 en δ 3.94 aan die groepe op koolstowwe 3' en 4', respektiewelik, toegeskryf kan word. Die sein by δ 3.88

kon aan die metoksigröep op C-7 toegeken word weens 'n n.O.e-assosiasie met H-6 (δ 6.34, 5.12 %) en 'n sterk assosiasie met H-8 (δ 6.49, 12.33 %), terwyl die metoksigröep op C-5 (δ 3.95) slegs met H-6 (δ 6.34, 14.67 %) geassosieer het. Hierdie assosiasies bied dus 'n metode om tussen die verskillende metoksigröepe, sowel as H-6 en H-8, te onderskei.

Vergelyking van die ^1H KMR-spektra van derivate (7b) (plaat 33, tabel 10) en 7c (plaat 32, tabel 10) dui op grootlikse verskille in die chemiese verskuiwings van die aromatiese protone, terwyl H-1" van glukose in die geval van derivaat (7c) ook na hoër veld voorkom. 'n Opvallende verskil is die tweede orde patroon vir die B-ring protone van (7b), teenoor die eerste orde geaardheid van dieselfde protone in die spektrum van (7c).

N.O.e-assosiasie het dit weereens moontlik gemaak om die posisies van die verskillende metoksigröepe te bepaal en ook te bewys dat die asetoksigröep wel op C-5 geleë is. Die metoksigröep op C-7 (δ 3.88) het weereens met H-8 (δ 6.80, 11.33 %) en H-6 (δ 6.58, 6.65 %) geassosieer, terwyl die metoksigröepe op C-3' en C-4' (δ 3.97 en δ 3.93) met H-2' (δ 7.59, 12.36 %) en H-5' (δ 6.97, 12.87 %), respektiewelik, geassosieer het.

9.13 4',5,7-Trihidroksi-8-(4-O- α -L-rhamnopiranosiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (4"-O-rhamnosielvitexin) [45] en 4',5,7'-tri-asetoksi-8-[2,3,6-tri-O-asetiel-4-O-(2,3,4-tri-O-asetiel- α -L-rhamnopiranosiel)- β -D-glukopiranosiel]flavoon [45a]

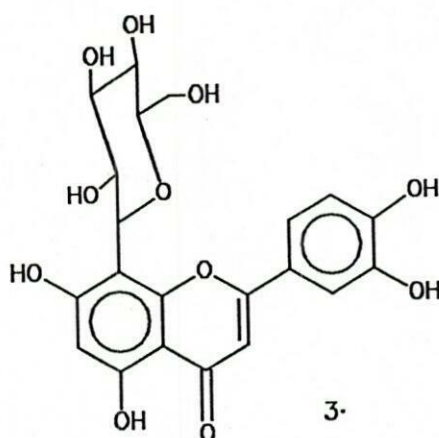


4"-O-rhamnosielvitexin (45) is reeds in 1966 uit *Craetaegus curvisepala* (Rosaceae) geïsoleer²⁴⁾ en alhoewel hierdie verbinding nie uit rooibos geïsoleer is nie, is 'n outentieke monster met ¹H KMR geanaliseer weens die ooreenkoms van die flavoonskelet en die individuele suikermoëteite met dié van verbindings uit rooibos geïsoleer.

Aangesien die ¹H KMR-spektrum van die vryfenoliese verbinding (45) van so 'n aard was dat individuele sisteme nie herken kon word nie, is die ooreenstemmende O-asetielderivaat (45a) berei en met ¹H KMR (plaat 34, tabel 10) geanaliseer. Individuele seine is na volledige spin-spinontkoppelinseksperimente toegeken. Verdubbeling van feitlik alle seine by kamertemperatuur dui op beperkte rotasie - 'n situasie soortgelyk aan dié gevind in 4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel- β -D-glukopiranosiel)-flavoon (42a). Die groot verskil in die chemiese

verskuiwings van sekere verdubbelde seine, o.a. H-3" (0.53 d.p.m), H-4" (0.34 d.p.m) en H-3''' (0.30 d.p.m), dui op die groot verskil in die chemiese omgewings van die protone in die verskillende rotamere.

9.14 3',4',5,7-Tetrahidoksi-6-β-D-glukopiranosielflavoon (iso-orientin) [4] en
3',4',5,7-tetrahidoksi-8-β-D-glukopiranosielflavoon (orientin) [3]

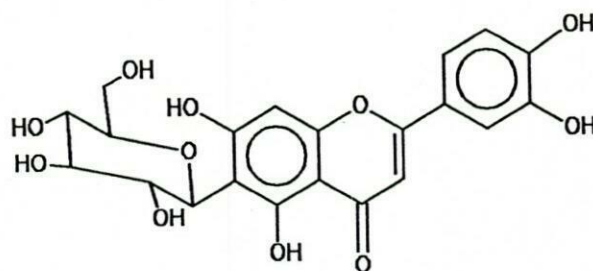


Orientin (3) en iso-orientin (4) is oorspronklik in 1958 uit *Polygonum orientale* (Polygonaceae)²⁴⁾ en in 1961 uit rooibos¹⁷⁾ geïsoleer. Alhoewel daar nie tydens hierdie ondersoek voldoende materiaal vir ¹H KMR-spektrometriese analise geïsoleer is nie, is slegs outentieke monsters bestudeer.

In teenstelling met die ¹H KMR-spektrum van iso-orientin (4) (plaat 36, tabel 11), was die spektrum van orientin (3) só stomp dat geen seintoeëkenning moontlik was nie. Rotamerie is opgehef deur die temperatuur tot 393 K in DMSO-d₆ (plaat 35, tabel 11) te verhoog. Spin-spinontkoppelingseksperimente het die identifikasie van die verskillende seine moontlik gemaak en onderskeid kon tussen die singulette by δ 6.50 en 6.24 getref word op grond van die verstomping van laasgenoemde - 'n verskynsel wat verklaar kan word in terme van die nabyheid van die B-ringprotone aan H-3.

Spin-spinontkoppelingseksperimente het ook die seintoeëkenning in die ¹H KMR-spektrum van iso-orientin (4) (plaat 36, tabel 11) bevestig. Onderskeid kon tussen die H-8- en H-3-singulette getref word op grond van

'n n.O.e-assosiasie van H-3 (δ 5.59) met H-2' (δ 7.47) en H-6' (δ 7.43) van die B-ring. 'n N.O.e-assosiasie van H-5'' (δ 3.45) en H-3'' (δ 3.59) met H-1'' (δ 4.91) van glukose het, soos in die geval van 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon (41b, par. 9.7), die 1,3-diaksiale interaksie tussen hierdie protone (en dus die piranosiedvorm van glukose) bevestig.



HOOFSTUK 10

SINTESE

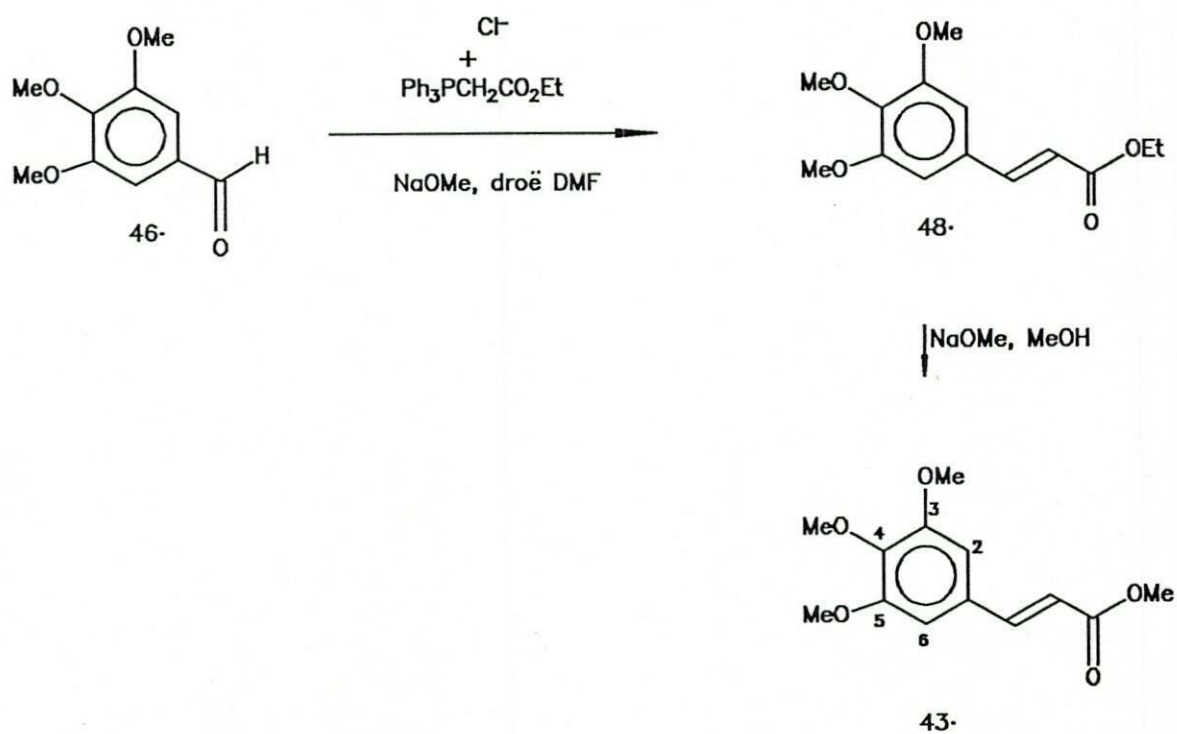
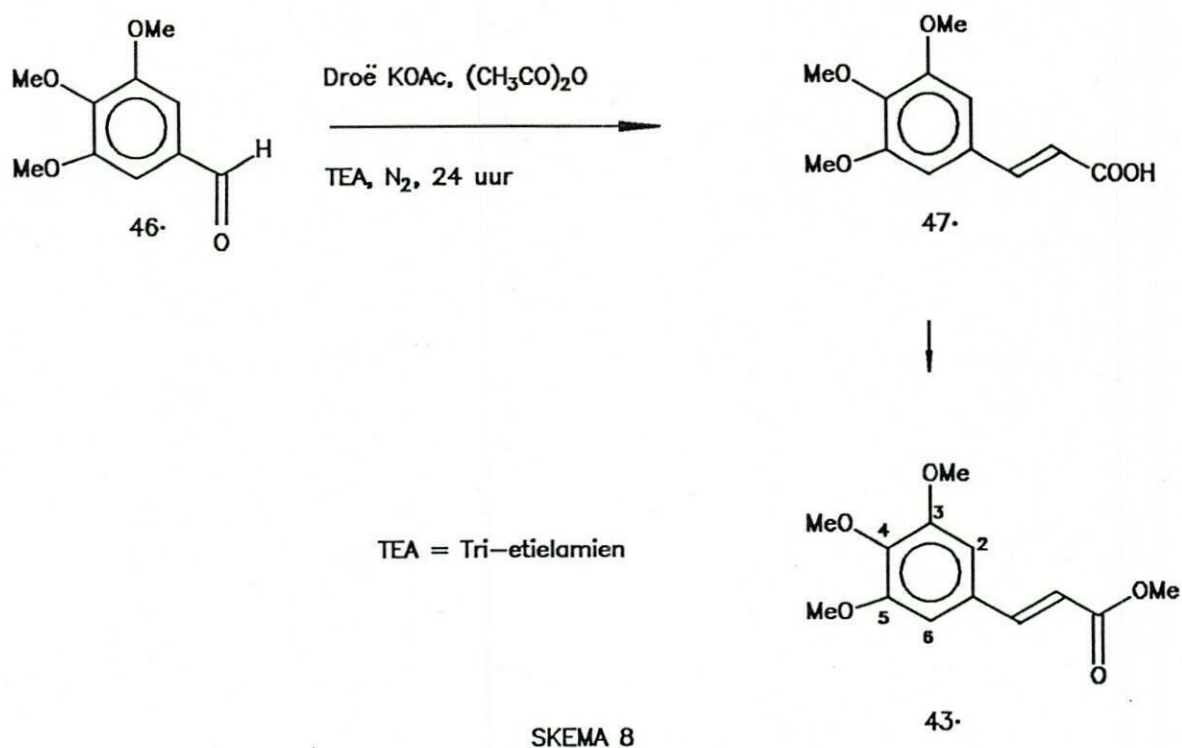
Aangesien onsekerheid bestaan het oor die identiteit van verbinding (43) in fraksie BF 11, is beide metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (43) en 4-*O*-asetielsinapiensuur (4-asetoksi-3,5-dimetoksi)kaneelsuur (49) gesintetiseer.

10.1A Metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]

Die titelverbinding (plate 18a en b, tabel 12) is gesintetiseer deur die Perkin-reaksie op 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (46) (plaat 37, tabel 12), gevolg deur diasmetaanmetilering van die gevormde 3,4,5-trimetoksikaneelsuur (47) (plaat 38, tabel 12) (SKEMA 8).

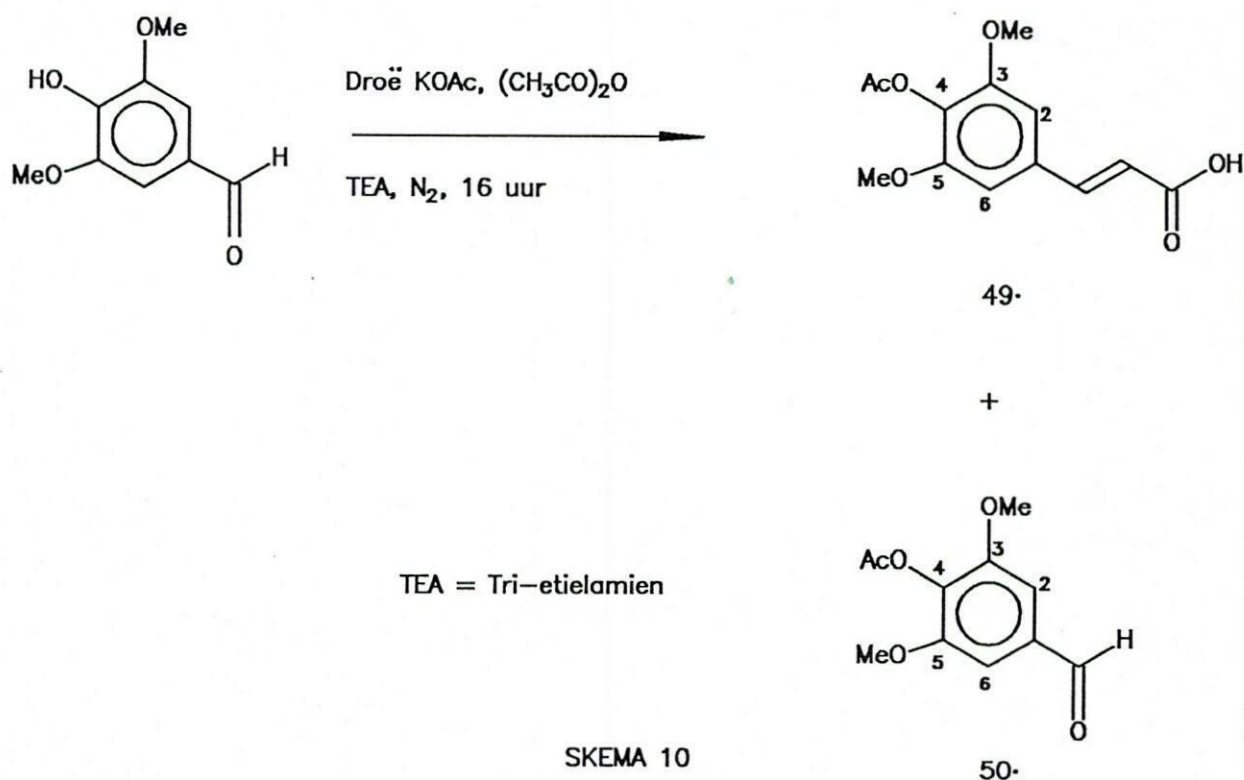
10.1B Metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43]: Alternatiewe sintese

In 'n alternatiewe metode is verbinding (43) (plate 18a en b, tabel 12) gesintetiseer deur die Wittig-reaksie op 3,4,5-trimetoksibensaldehyd (46) (plaat 37, tabel 12), gevolg deur 'n etiel-metieluitruiling met natriummetoksied in metanol op die gevormde etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (48) (plaat 39, tabel 12) (SKEMA 9).



10.2 4-Asetoksi-3,5-dimetoksikaneelsuur (4-O-asetielsinapiensuur) [49]

Verbinding 49 (plaat 40, tabel 13) is gesintetiseer deur die Perkin-reaksie op 4-hidroksi-3,5-dimetoksibensaldehyd. Hierdie reaksie het egter die verlangde verbinding as 'n neweproduk (9.66 %) gelewer, terwyl die hoofproduk 4-asetoksi-3,5-dimetoksibensaldehyd (10.23 %) (50) (plaat 41, tabel 13) was (SKEMA 10).



Vergelyking van die ^1H KMR-spektra van die sintetiese monsters, (43) (plate 18a en b, tabel 13) en (49) (plaat 40, tabel 13), met dié van die natuurlike verbinding uit fraksie BF 11 na metilering en asetilering, het bevestig dat lg. metiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat (43) - die enigste

geïsoleerde verbinding met 'n 3,4,5-tri-*O*-substitusiepatroon - is. Aangesien kaneelsure voorlopers van alle flavonoïede is, kan verwag word dat meer komplekse verbindings met 'n soortgelyke substitusiepatroon in rooibos teenwoordig mag wees.

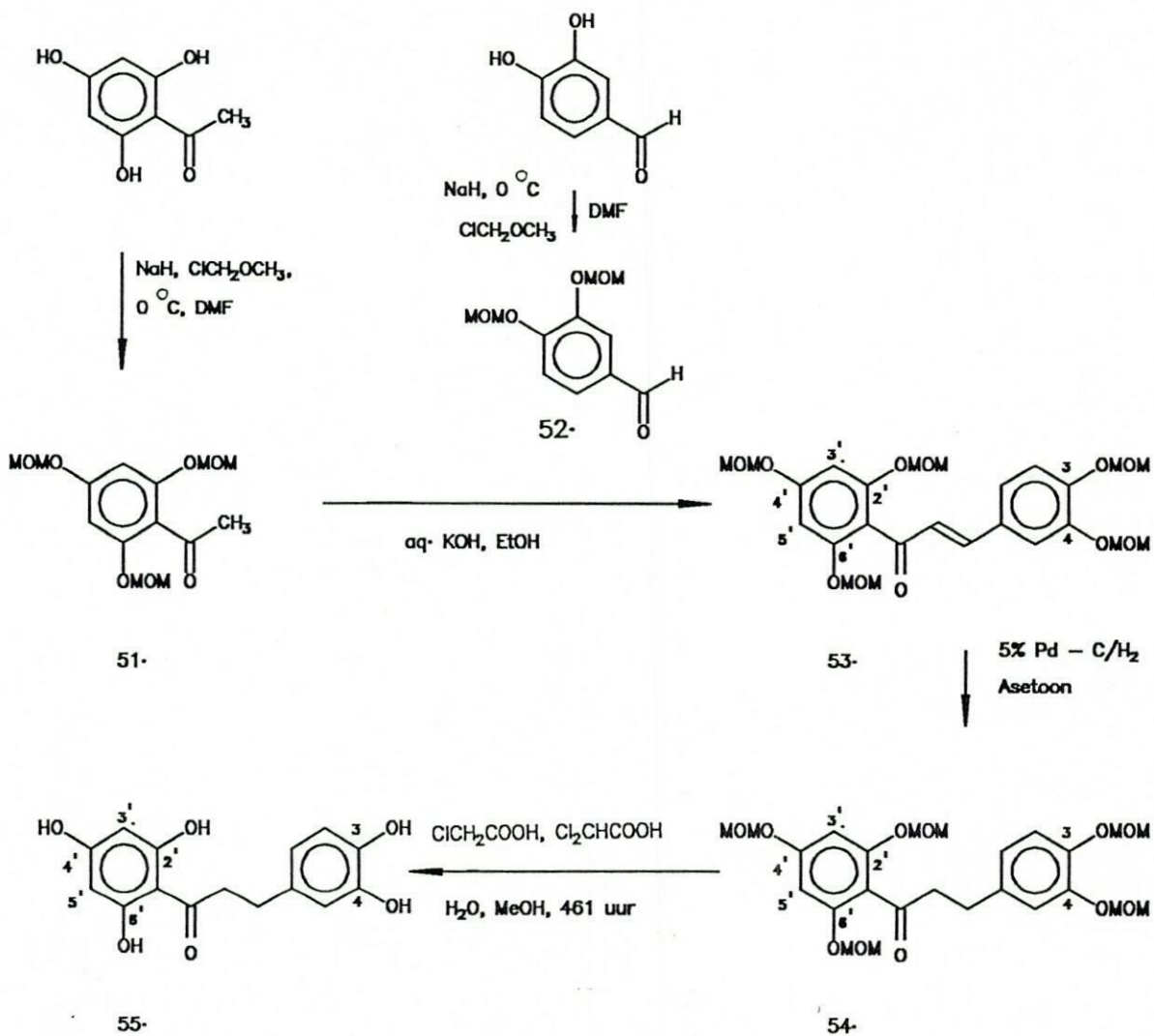
10.3 **Die sintese van 3-hidroksifloretin (2',3,4,4',6'-pentahidroksidihidrochalkoon) [55]**

Die titelverbinding (plaat 46, tabel 15) is gesintetiseer deur die aldolkondensasie van 2,4,6-trimetoksimetielasetofenoon (51) (plaat 42, tabel 14) en 3,4-dimetoksimetielbensaldehyd (52) (plaat 43, tabel 14), gevolg deur die hidrogenering van die gevormde *trans*-2',3,4,4',6'-pentametoksimetielchalkoon (53) (plaat 44, tabel 15) en hidrolise van 2',3,4,4',6'-pentametoksimetioldihidrochalkoon (54) (plaat 45, tabel 15) [SKEMA 11].

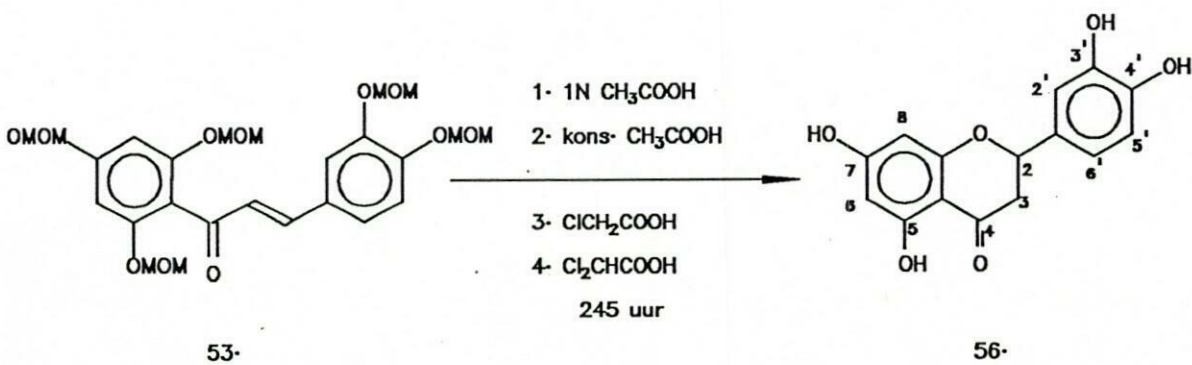
Alhoewel 3-hidroksifloretin (55) voorheen uit *Malus sieboldii* Rehd. var. *arborescens* (Rosaceae) geïsoleer is¹¹⁸), verteenwoordig hierdie die eerste sintese daarvan.

Hidrolise van 2',3,4,4',6'-pentametoksimetioldihidrochalkoon (54) volgens die konvensionele metode met 0.01 N HCl in metanol onder N₂, het na sewe dae tot totale ontbinding van die monster gelei.

Volgens ¹H KMR-spektroskopie was die metoksimetielgroepe egter steeds teenwoordig. Die verlangde produk, 3-hidroksifloretin (55), is uiteindelik verkry deur dihidrochalkoon (54) in die teenwoordigheid van mono- en dichloorasynsuur vir 461 uur onder terugvloei te verhit.



SKEMA 11



SKEMA 12

10.4 Die sintese van 3',4',5,7-tetrahidroksiflavanoon (Eriodictyol) [56]*

Die titelverbinding (plaat 47, tabel 15) is gesintetiseer deur die hidrolise en isomerisasie van *trans*-2',3,4,,4',6'-pentametoksimetielchalkoon (53) onder suurkondisies (SKEMA 12).

Die konvensionele hidrolisemetode vir die verwydering van die beskermende metoksimetielgroepe (1 N HCl in metanol) het weereens tot ontbinding, sonder verwydering van die metoksimetielgroepe, gelei. Eksperimentering met verdunde en gekonsentreerde asynsuur, monochloorasynsuur en dichloorasynsuur, het na 245 uur tot die volledige omskakeling van die beskermde chalkoon (53) na eriodictyol (56) gelei. Dit wil dus voorkom asof verhitting onder terugvloei met dichloorasynsuur die mildste toestand vir die verwydering van die metoksimetielgroepe in verbindings (53) en (54) verteenwoordig.

Dit is opvallend dat die seine van die B-ring protone van flavanoon 56 (plaat 47, tabel 15) van die tweede orde is, 'n situasie soortgelyk aan dié van die ooreenstemmende C₆-glikosidiese natuurlike flavanoon, 2,3-dihidro-iso-orientin (44A) (plaat 20, tabel 7).

* Weens 'n defekte SD-apparaat kon die optiese rotasie van verbinding (56) nie bepaal word nie.

HOOFSTUK 11

NIE-VOEDENDE VERSOETMIDDELS

Die aangename, soet smaak van rooibostee, in teenstelling met die bitter smaak van swart tee, mag waarskynlik aan die teenwoordigheid van natuurlike nie-voedende versoetmiddels toegeskryf word.

Die sensasie van soet smaak spruit uit die stimulering van die sensoriese selle (en dus die perifere sensus) van die tong. Verskeie modelle rakende die aard van die aktiewe sentrum van die reseptor, is voorgestel, nl.

1. Shallenberger-Acree-Kier model

Shallenberger en Acree het bevind dat feitlik alle soet molekules 'n waterstofdonor (AH) en 'n waterstofakseptor (B), wat *ca.* 0.3 nm van mekaar geleë is, besit. Hierdie groepe sou dan twee waterstofbindings met 'n komplementêre entiteit in die aktiewe sentrum van die reseptor kon vorm.

Shallenberger het verder voorgestel dat daar 'n ruimtelike versperring, *ca.* 0.3 nm van die lyn wat AH en B verbind, in die reseptor teenwoordig is.

Kier het gepostuleer dat daar, buiten die AH-B-entiteit, ook 'n hidrofobiese subsentrum by die punt van die driehoek met die AH-B-entiteit as basis, teenwoordig is.

Hierdie model neem egter nie die driedimensionele aard van die aktiewe verbindings of die volume van die aktiewe sentrum van die

reseptormolekuul in ag nie.

2. Temussi model

Temussi et. al.¹⁰⁸⁻¹¹⁰) het voorgestel dat die aktiewe sentrum van die reseptor 'n vlak, plat, hemihedrale holte is en dat die "buitekant" selfs tydens interaksie met die antagonis (aktiewe verbinding) toeganklik is. Die belangrikste "elektroniese eienskappe" van die reseptor, insluitend die AH-B-entiteit wat onontbeerlik vir binding is, is volgens die model in die onderste gedeelte van die holte geleë, terwyl die boonste hidrofobiese gedeelte 'n belangrike rol in die geval van hoogs aktiewe verbindings speel (fig 2).

3. Merlini modifikasie

Merlini et. al.¹¹¹) het voorgestel dat die Shallenberger versperring nie planêr is nie, maar 'n "trappie" het (fig 3a). Die aromatiese ring (B-ring van flavonoïede) van planêre verbindings sal dus in 'n posisie voorkom waar Van der Waals interaksies met die reseptor te klein is om 'n soet stimulus te veroorsaak (fig 3b).

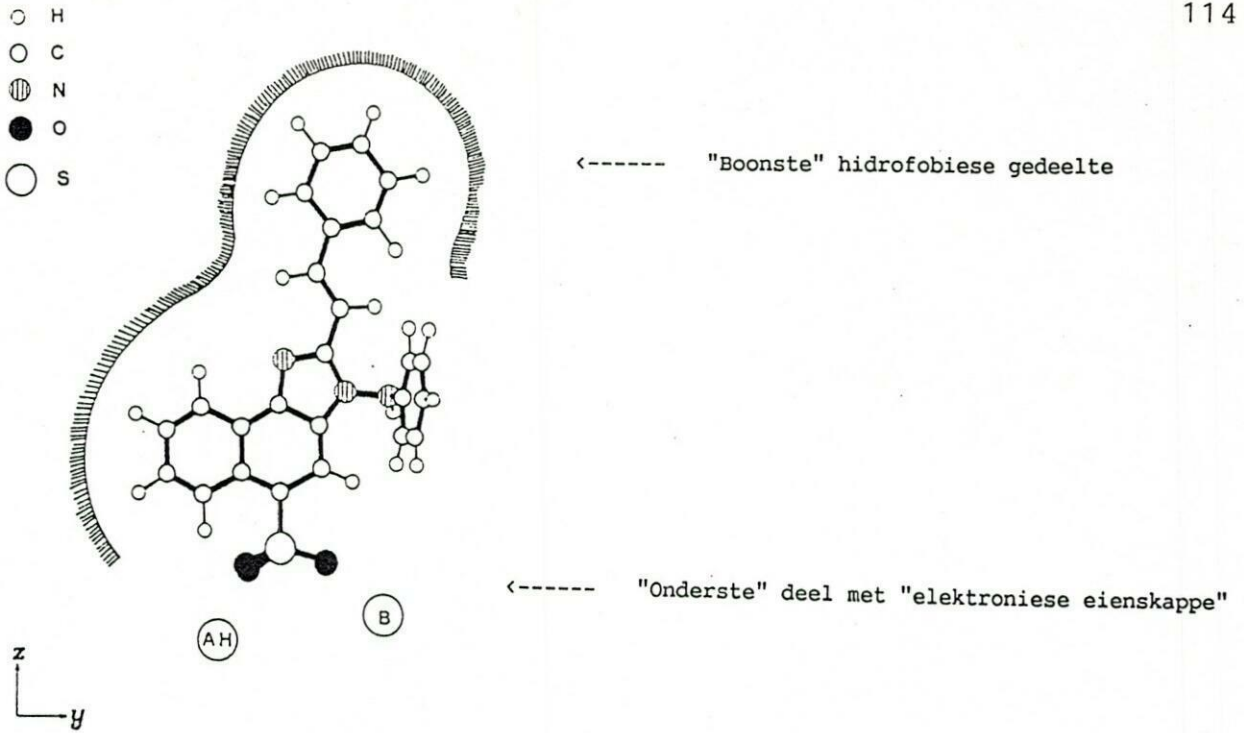


Fig 2. Skematiese voorstelling van Temussi se model: Die "vloer" van die reseptorholte (Shallenberger versperring) is in die YZ-vlak geleë, terwyl die oop "buitenste" gedeelte in die +x-rigting geleë is. Die molekulêre model in die reseptorholte is 3-anilino-2-stiriel-3H-nafto[1,2-d]imidasool-5-sulfonaat (SSN), 'n baie soet nafto-imidasool.

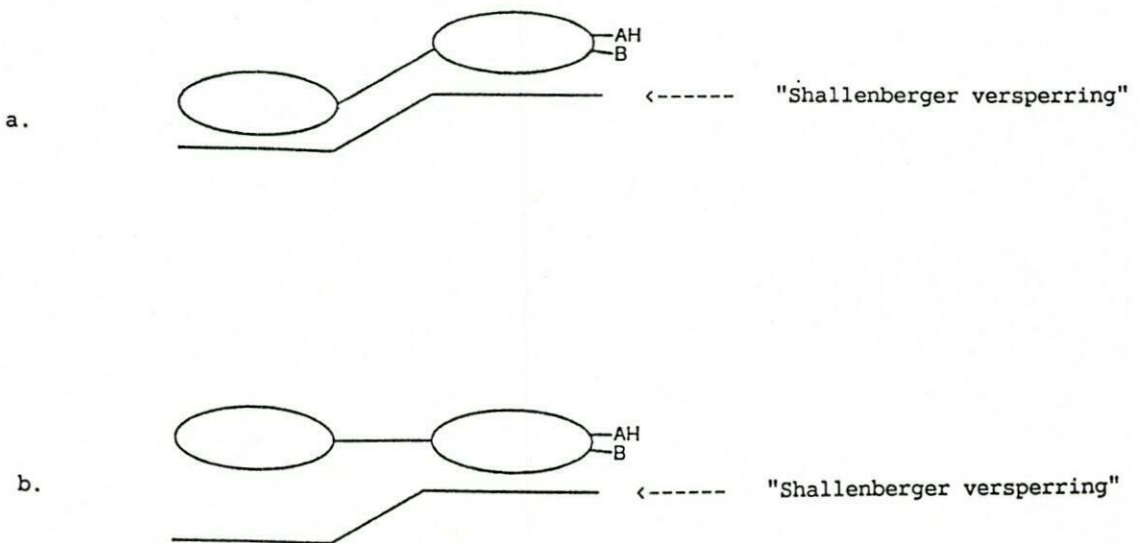


Fig 3. Moontlike interaksie van (a) soet verbindings en (b) "nie-soet" verbindings met die "Shallenberger versperring".

11.1 ISOVANILLIELVERSOETERS

Phyllodulcin (64), die eerste verteenwoordiger van hierdie klas verbindings, is in 1929 uit die blare van *Hydrangea serrata* SERINGE var. *thunbergii* SUBIMOTO geïsoleer.

Dit word algemeen aanvaar dat die 3-hidroksi-4-metoksi-feniëlgroep van hierdie groep verbindings aan die komplementêre AH-B-sisteem bind en vir die soet smaak van die verbindings verantwoordelik is, terwyl die hidrofobiese A-ring bydra tot die intensiteit van die soet smaak (fig 4).

'n Verbinding moet aan verskeie strukturele vereistes voldoen om die reseptor vir soet smaak te stimuleer:

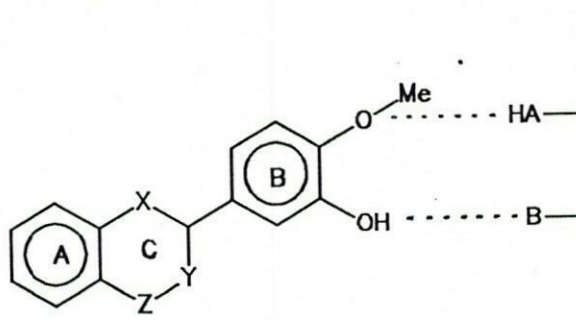


Fig 4- Die Shallenberger-Acree-Kier reseptormodel toegepas op isovanillielversoeters

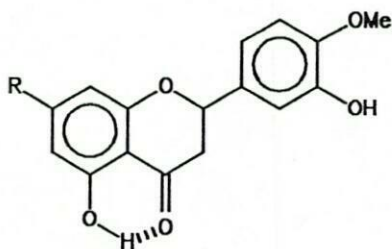
11.1.1 Konformasionele effekte

Skema 13 bevat 'n wye verskeidenheid isovanillienverbindings wat reeds sensories geanaliseer is.

Die smaaklose aard van 1,4-bensodioksien (69), in teenstelling met die soet smaak van verbindings (65)-(68), (70) en (73), het bevestig dat dit belangrik is dat die heterosikliese ring nie planêr mag wees nie. Hierdie resultaat is ondersteun deur die smaaklose aard van flavoon (61), in teenstelling met die soet eienskappe van flavanone (58)-(60.)

Flavanone kan een van twee konformasies aanneem, nl.

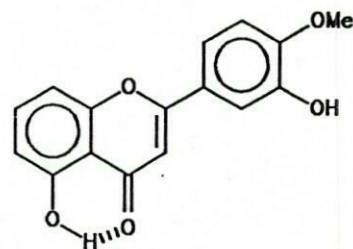
1. die B-ring in die pseudo-ekwatoriale posisie, d.w.s. 'n feitlik planêre molekule, of
2. die B-ring in die pseudo-aksiale posisie, d.w.s. 'n wigvormige molekule.



58· R = H

59· R = OCH₂COONa

60· R = O(CH₂)₃SO₃K



61·

Du Bois et. al.⁵²⁾ het voorgestel dat, aangesien die planêre flavoon (61) onaktief is, die aktiewe konformasie van dihidrochalkone wigvormig behoort te wees, sodanig dat die $\text{ArCOCH}_2\text{CH}_2$ -moëteit rofweg planêr is, terwyl die B-ring uit die vlak projekteer (fig 5). Die smaaklose aard van verbindings 62 en 63 kon, in ooreenstemming met bogenoemde hipotese, verklaar word in terme van die uitgestrekte konformasie weens amiedresonans.

Konformasionele energieberekeninge van hesperitindihydrochalkoon (25) en sy amiedanaloeë (62 en 63) het bevestig dat die waterstofgebonde hidroksi-arielketoonmoëteit neig om planêr te wees, maar dat die $\text{CH}_2\text{-Ar}'$ -groep van hesperitindihydrochalkoon (25) essensiëel ortogonaal op die vlak van die res van die molekule geleë is (fig 6). In kontras hiermee is die voorkeurkonformasie van amiede 62 en 63 sodanig dat die CO-N-CH_2 -moëteit feitlik koplanêr met die trihidroksifenielsistiem is.

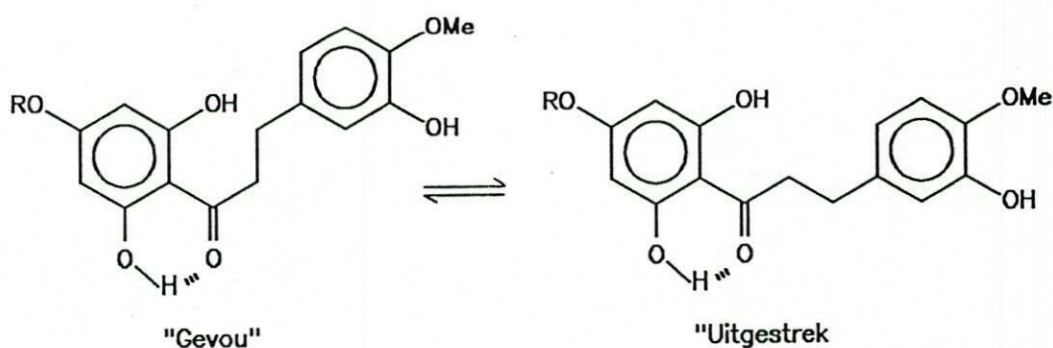
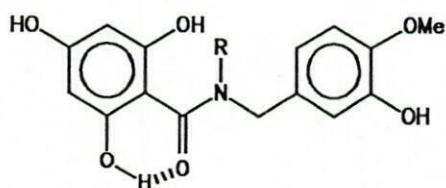


Fig 5- Konformasies van dihidrochalkone



62. R = H

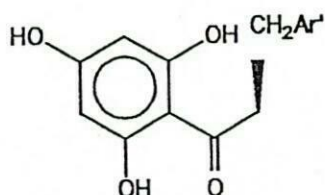
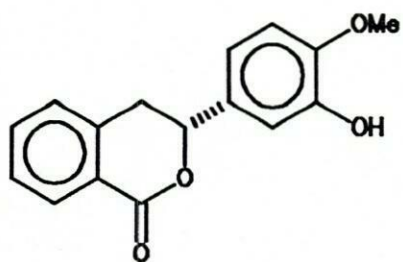
63. R = CH₃

Fig 6- Konformasie van dihydrochalkone volgens energieberekening

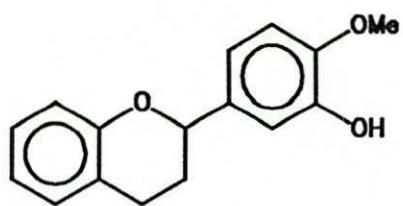
Wanneer verbindings 65-68 en 70-73 beskou word, is dit opvallend dat al die verbindings met 'n sesledige heterosikliese ring (1 of 2 suurstofatome), soet is. Verbindings 67 en 68, elk met twee suurstofatome, is meer potent as hul enkel-suurstof analoë, terwyl dié met 'n 1,3-substitusiepatroon ook meer effektief as die 1,4-analoë is.

Sensoriese analise van verbindings 71-73, dui daarop dat die grootte van die heterosikliese ring 'n bepalende faktor vir aktiwiteit is - verbindings 71 en 72 (7-ledige heterosikliese ringe) is smaakloos, terwyl verbinding 73 (5-ledige heterosikliese ring) steeds soet, maar minder potent as verbindings met 6-ledige ringe, is.

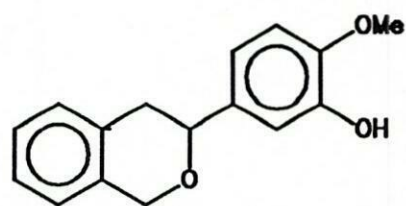
Die ¹H KMR-spektrum van 1,4-bensodioksaan (68) in [²H₆]-benseen, het getoon dat die molekule in oplossing 'n ²H₃ halfstoel konformasie (d.i. met die fenielsubstituent in 'n kwasi-ekwatoriale oriëntasie) voorkom - J_{2,3ax} =



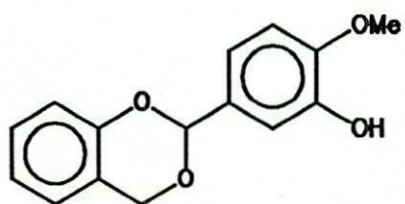
64-



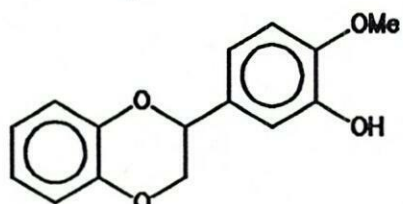
65-



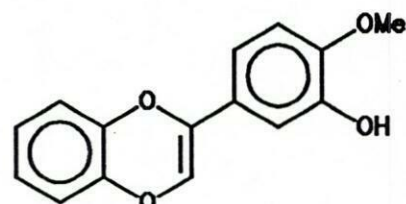
66-



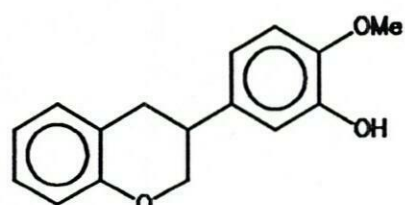
67-



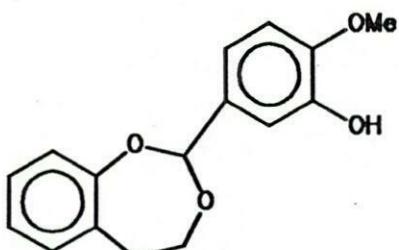
68-



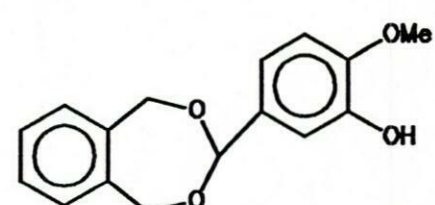
69-



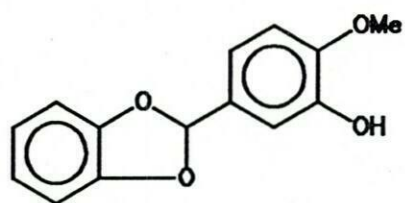
70



71-



72-



73-

SKEMA 13-

8.8 Hz in vergelyking met $J_{2,3e} = 2.5$ Hz. Hierdie waarneming is bevestig deur molekulêre meganika berekeninge, die ^1H KMR-spektra van verbindings 65 en 70, die ^1H KMR-spektrum van phylodulcin (64) [$J_{3,4a}$ 11.7 Hz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 11 Hz, CDCl_3 ; 10 Hz, CD_3OD], wat daarop dui dat die B-ring ekwatoriaal georiënteer is, sowel as X-straalstudies op neohesperidiendihydrochalkoon (22), wat bevestig dat die dihydrochalkoonaglikoonmoïeteit in die vaste toestand essensiëel in 'n "uitgestrekte" konformasie voorkom. Die berekende mees stabiele konformasie van trisikliese verbindings (64-66) vereis dat die isovanillielsubstituent feitlik ortogonaal ten opsigte van die bensogekondenseerde aromatiese ring georiënteer moet wees. Hierdie afleiding word deur KMR-spektroskopiese studies van verbinding 68 bevestig.

Energieberekeninge het getoon dat die energieheuwel vir rotasie van die isovanillielgroep om die binding wat dit met die heterosikliese ring verbind, laag is (minder as 2 kkal, 1 kal = 4.184 J), sodat dit deur waterstofbinding en/of polêre interaksies met die reseptor oorkom kan word.

Temussi se model vereis dat die isovanillielring feitlik parallel met die vlak van die benso-gekondenseerde ring moet wees, aangesien konformasies met die ring ortogonaal, of baie geroeteerd, met die "Shallenberger versperring" sal inmeng.

Die waarneming dat planêre verbindings onaktief is en dat die heterosiliese ring dus nie planêr mag wees in aktiewe verbindings nie, het tot Merlini¹¹¹⁾ se hipotese van 'n "trappie" in die "Shallenberger versperring" gelei (fig 2).

Die verband tussen soet smaak en molekulêre geometrie word tans

ondersoek.¹¹¹⁾

11.1.2 B-ring substitusie

Du Bois et. al.⁵²⁾ het bevind dat, in die geval van dihidrochalkone, die moëteite wat met die AH-B-entiteit van die Shallenberger model assosieer buiten 'n suur hidroksigroep, ook 'n baie spesiale tipe waterstofakseptor moet besit.

Die beskikbaarheid van die suur waterstofatoom vir intermolekulêre binding met die reseptor behoort (volgens figuur 7) van die sterkte van die intramolekulêre binding afhanklik te wees.

Variasie van die B-ring-substitusiepatroon (74-80) het getoon dat die smaak van dihidrochalkone optimaal met die natuurlike metoksi-hidroksi-funksionaliteit is. Eliminasië van intramolekulêre binding (cf. 80, X = H) het tot 'n dramatiese afname in soet smaak (in vergelyking met dihidrochalkoon 74) gelei, terwyl 'n totale verlies aan soet smaak in die geval van 'n verswakte intramolekulêre binding (cf. 78, X = Cl) voorgekom het.

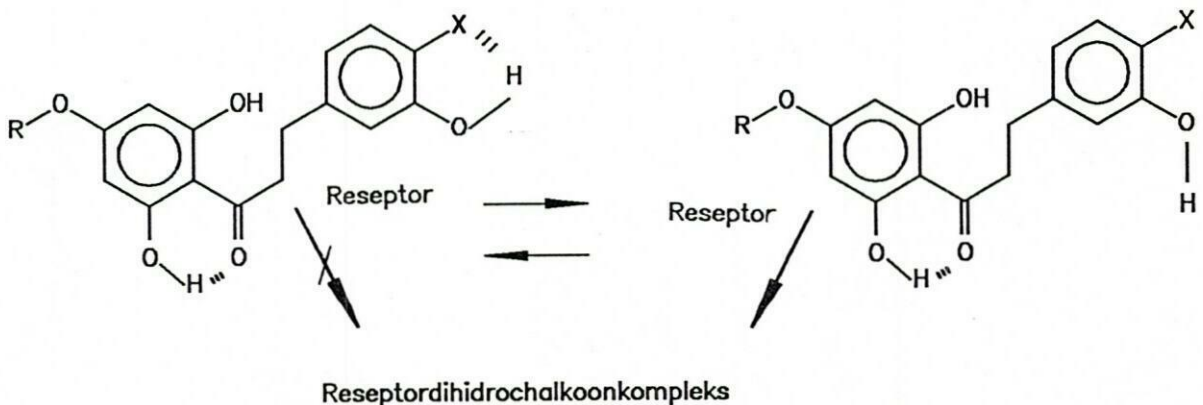
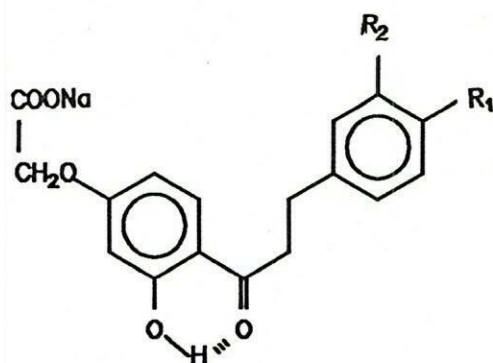
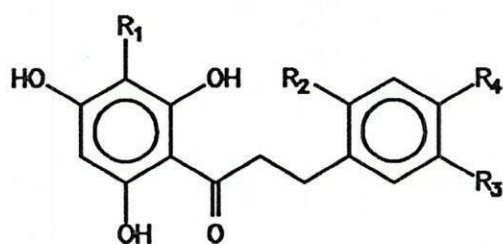


Fig 7. Intra- versus intermolekulêre binding.



74. $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$
 75. $R_1 = R_2 = \text{H}$
 76. $R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$
 77. $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{NH}_2$
 78. $R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{OH}$
 79. $R_1 = \text{NHCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$
 80. $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

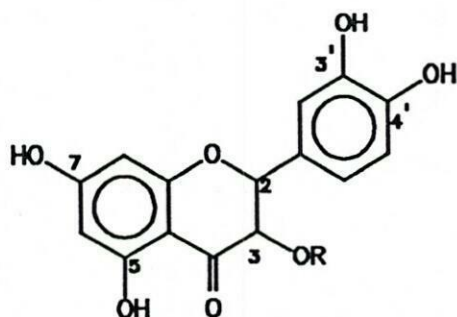
Verwydering van die hidroksi-metoksifunksie (cf. 75), kettingverlenging van die alkoksisubstituent (cf. 76), substitusie van die hidroksielgroep met 'n aminogroep (cf. 77) en substitusie van die metoksigroep



81.	R_1	R_2	R_3	R_4
a.	CO_2H	H	OH	OCH_3
b.	CO_2H	OCH_3	OH	OCH_3
c.	CO_2H	CO_2H	OH	OCH_3
d.	H	H	CO_2H	OCH_3
e.	H	H	CO_2CH_3	OCH_3
f.	CO_2H	H	CO_2H	OCH_3
g.	CO_2H	H	OH	H
h.	CO_2H	H	H	CO_2H

met 'n aminogroep (cf. 79), het tot totale verlies aan soet smaak gelei. Yamato en Hashigaki het soortgelyke effekte vir 1,2-diarieletane, flavanone en eenvoudige dihydrochalkone waargeneem.⁵²⁾ Daniel et al.¹¹⁶⁾ het bevestig dat slegs klein veranderinge in hierdie deel van die molekule toelaatbaar is - sensoriese analise van verbindings 81a-81h het getoon dat verbindings 81d-81f, sowel as 81h, smaakloos was, terwyl 'n enkele hidroksigroep op die B-ring (cf. 81g) tot 'n drastiese afname in soet smaak (in vergelyking met 81a-81c) gelei het.

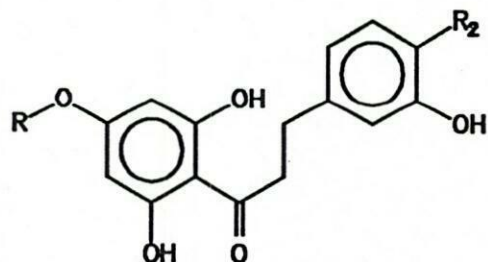
Kasai et al.¹¹⁷⁾ het onlangs gerapporteer dat sekere dihydroflavonole (82-84) met 'n 3',4'-dihidroksisubstitusiepatroon ook soet is, terwyl sensoriese analise van verbindings 85 en 86 bevestig het dat die 3',4'-dihidroksi-, sowel as die 3'-hidroksisubstitusiepatroon effense soet eienskappe aan die verbindings verleen.



82- (2S,3S), R = Rha

83- (2S,3R), R = Rha³-Glc

84- (2S,3S), R = Rha³-Glc



85- R₁ = CH₂COONa, R₂ = OH

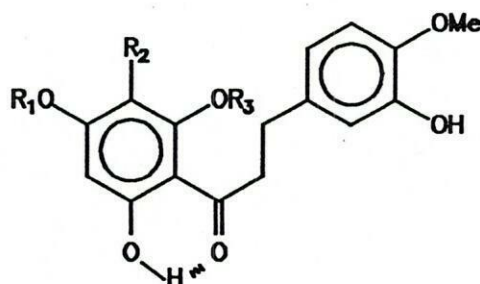
86- R₁ = CH₂COONa, R₂ = H

Rha = α-L-rhamnopyranosiel

Glc = β-D-glukopyranosiel

Die teenwoordigheid van 'n vanillielring (4-hidroksi-3-metoksifeniel) in baie sterk geurmiddels (bv. vanillien), kan moontlik suggereer dat die isovanilliel- (3-hidroksi-4-metoksifeniel) eenheid van isovanillielversoeters vir hierdie verbindings se mentol- of "liquorice" nasmaak verantwoordelik is.¹¹⁶⁾ Indien dit waar is, sou dit beteken dat rooibos, wat ryk aan

verbindings met 'n 3',4'-dihidroksi-, 4'-hidroksi- en 4'-hidroksi-3'-metoksi- (vanilliel) substitusiepatroon is, waarskynlik 'n bron van nie-voedende versoetmiddels kan wees. In die lig van bogenoemde behoort die nasmaak, wat die bruikbaarheid van isovanillielversoeters soos NHDC (22) in 'n groot mate beperk, in hierdie verbindings afwesig te wees.



- 87- $R_1 = \text{CH}_2\text{COONa}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 88- $R_1 = \text{CH}(\text{COONa})_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 89- $R_1 = \text{CH}(\text{COONa})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 90- $R_1 = \text{CH}(\text{COONa})\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 91- $R_1 = \text{CH}(\text{COONa})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 92- $R_1 = \text{CH}_2\text{COCH}_2\text{COONa}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 93- $R_1 = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 94- $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 95- $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{PO}(\text{OH})(\text{OK})$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 96- $R_1 = (\text{CH}_2)_2\text{NHSO}_3\text{K}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 97- $R_1 = (\text{CH}_2)_2\text{CHOHCOONa}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 98- $R_1 = (\text{CH}_2)_3(\text{COO}^-)(\text{NH}_3^+)$, $R_2 = R_3 = \text{H}$
 99- $R_1 = \text{OCH}_2\text{COOH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_2\text{COOH}$

11.1.3 Hidrofobisiteit

Dit word algemeen aanvaar dat die A-ring van dihydrochalkone en verwante verbindings in Kier se hidrofobiese subsentrum pas en ook vir die intensiteit van die soet smaak verantwoordelik is.¹¹¹⁾

Sensoriese analise van verbindings 87-99 het getoon dat 'n baie fyn hidrofobiese-hidrofiliese balans op die A-ring gehandhaaf moet word - verbindings 87,91,92 en 95-98 is byvoorbeeld soet, terwyl hierdie eienskap by die res van die geanaliseerde verbindings ontbreek het.

Dihydrochalkoon 98 vertoon volgens Du Bois et. al.¹¹⁴⁾ 'n drastiese afname in nasmaak ten opsigte van NHDC (22). Hierdie waarneming, in samehang met Merlini et al.¹¹¹⁾ se waarneming dat die "liquorice" nasmaak van verbinding 67 in isoflawaan 70 afwesig is en Daniel¹¹⁶⁾ se suggestie dat die isovanillielring vir die nasmaak verantwoordelik is, dui daarop dat hierdie eienskap nie aan een van hierdie entiteite alleen toegeskryf kan word nie.

OPSOMMEND

'n Verbinding moet volgens die modelle van die reseptorsentrum, aan drie vereistes voldoen om in staat te wees om die reseptore op die tong vir soet smaak te stimuleer:

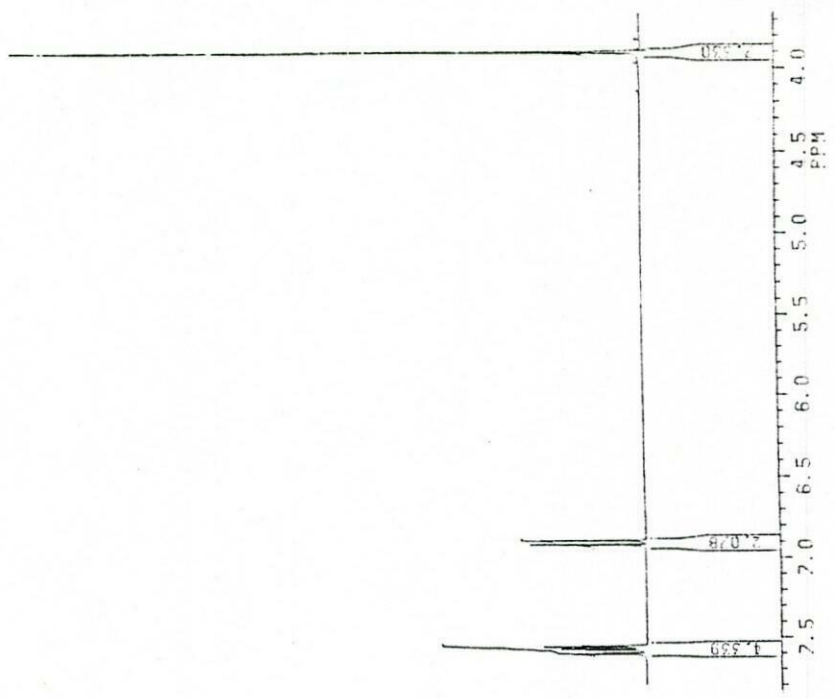
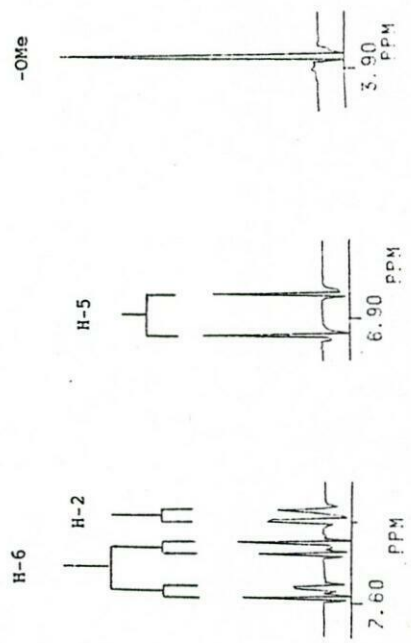
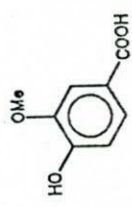
1. Soet smaak vereis dat die aktiewe verbinding 'n bepaalde **konformasie** moet aanneem - alhoewel dit voorkom asof die B-ring parallel met die bensogekondenseerde ring georiënteer moet wees en die "brug" tussen die AH-B-bevattende entiteit (B-ring) en die hidrofobiese gedeelte (A-ring) nie planêr mag wees nie, kon soet smaak nog nie kwantitatief met molekulêre geometrie gekorrelleer word nie.¹¹⁰⁾
2. Die **B-ring-substitusiepatroon** speel 'n belangrike rol in die bepaling van die aktiwiteit van die verbinding. Die natuurlike isovanillielring blyk die effektiëste te wees, terwyl verbindings met 3',4'-dihidroksi- en 3'-

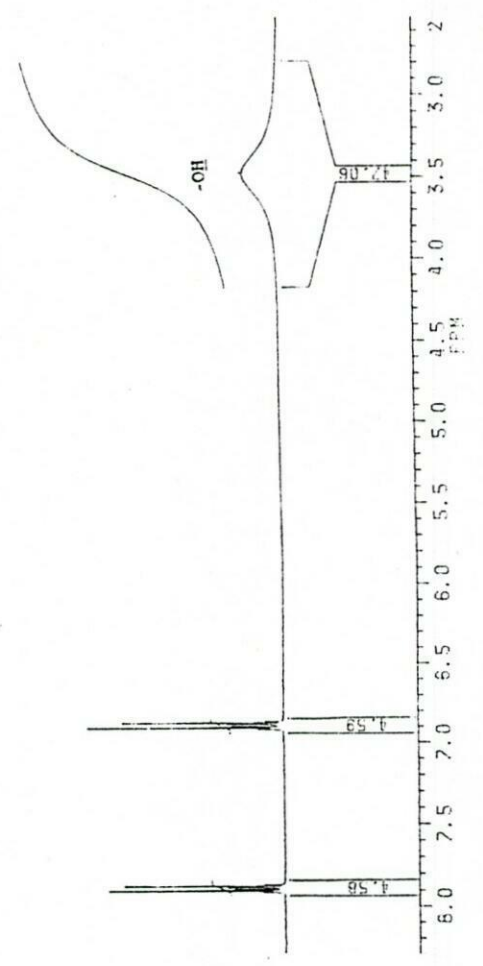
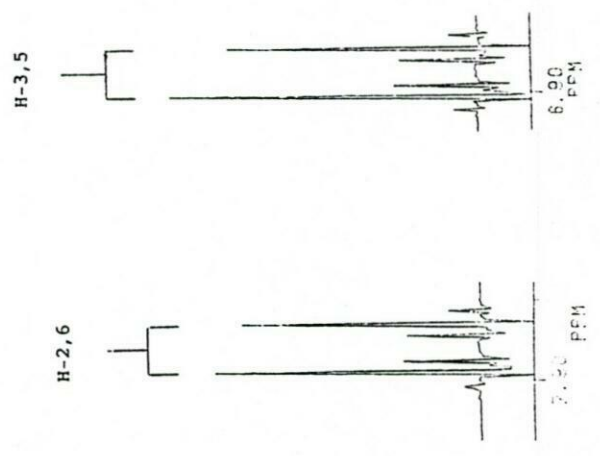
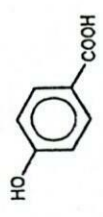
hidroksisubstitusiepatrone, alhoewel nie so effektief soos hul isovanillielanaloeë nie, ook soet is.

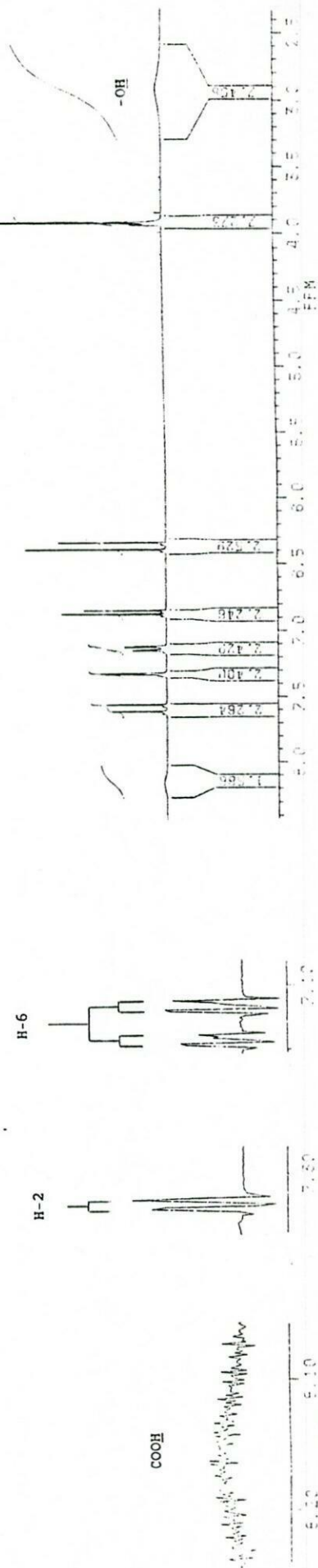
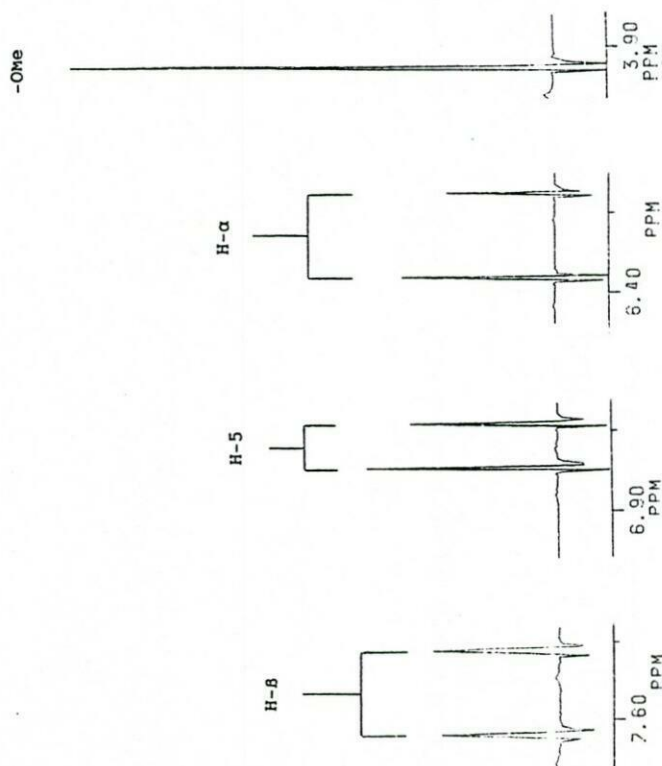
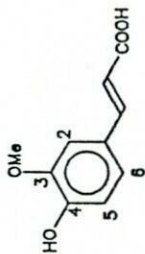
3. Die **hidrofobiese-hidrofiliese balans van die A-ring** speel 'n belangrike rol in die bepaling van die eienskappe van die verbinding.

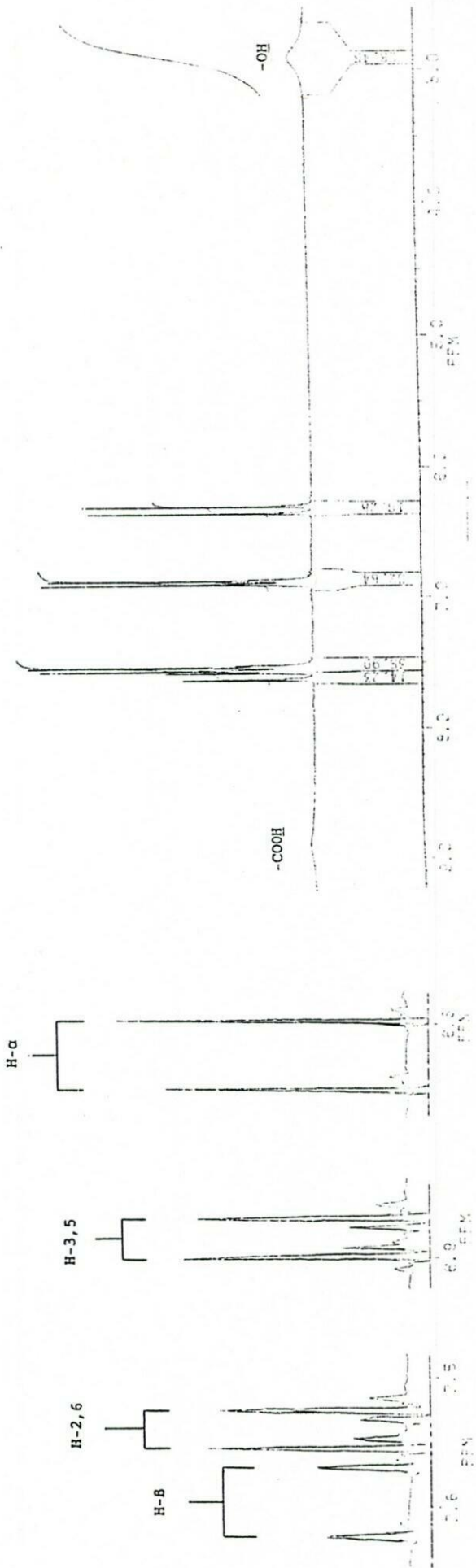
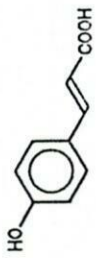
In die lig van bogenoemde sou verwag kon word dat aspalathin (8), 2,3',4,4',6'-pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosieldihydrochalkoon (8a), 2,3-dihidro-iso-orientin (44A) en 2,3-dihidro-orientin (44B) moontlik as natuurlike versoeters kan optree, terwyl die flavanoonvoorlopers van vitexin (42), iso-vitexin (41), orientin (3), iso-orientin (4), chrysoeriol (40), luteolin (2), isoquercetrin (6), quercetin (1) en rutin (7) ook moontlik aktief kan wees.

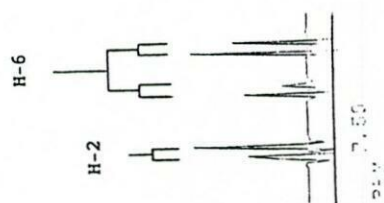
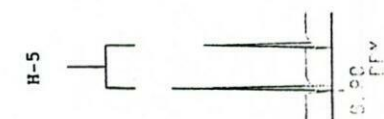
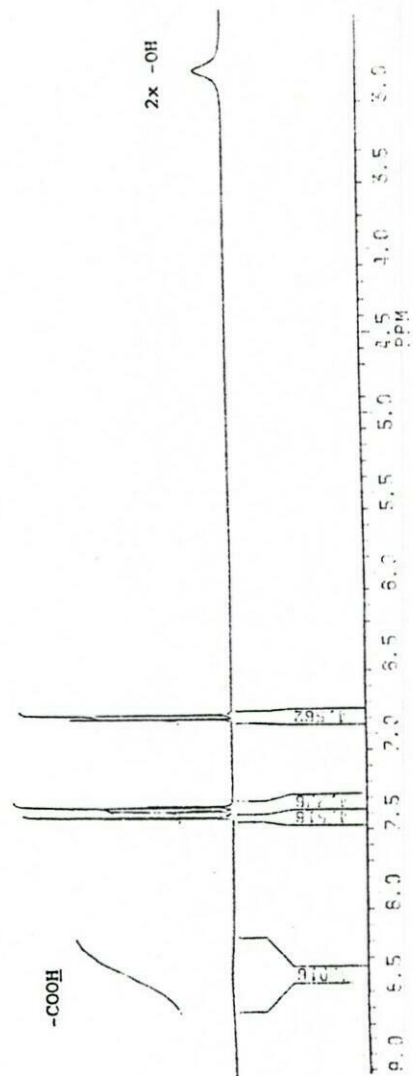
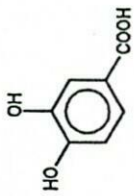
SPEKTROMETRIE

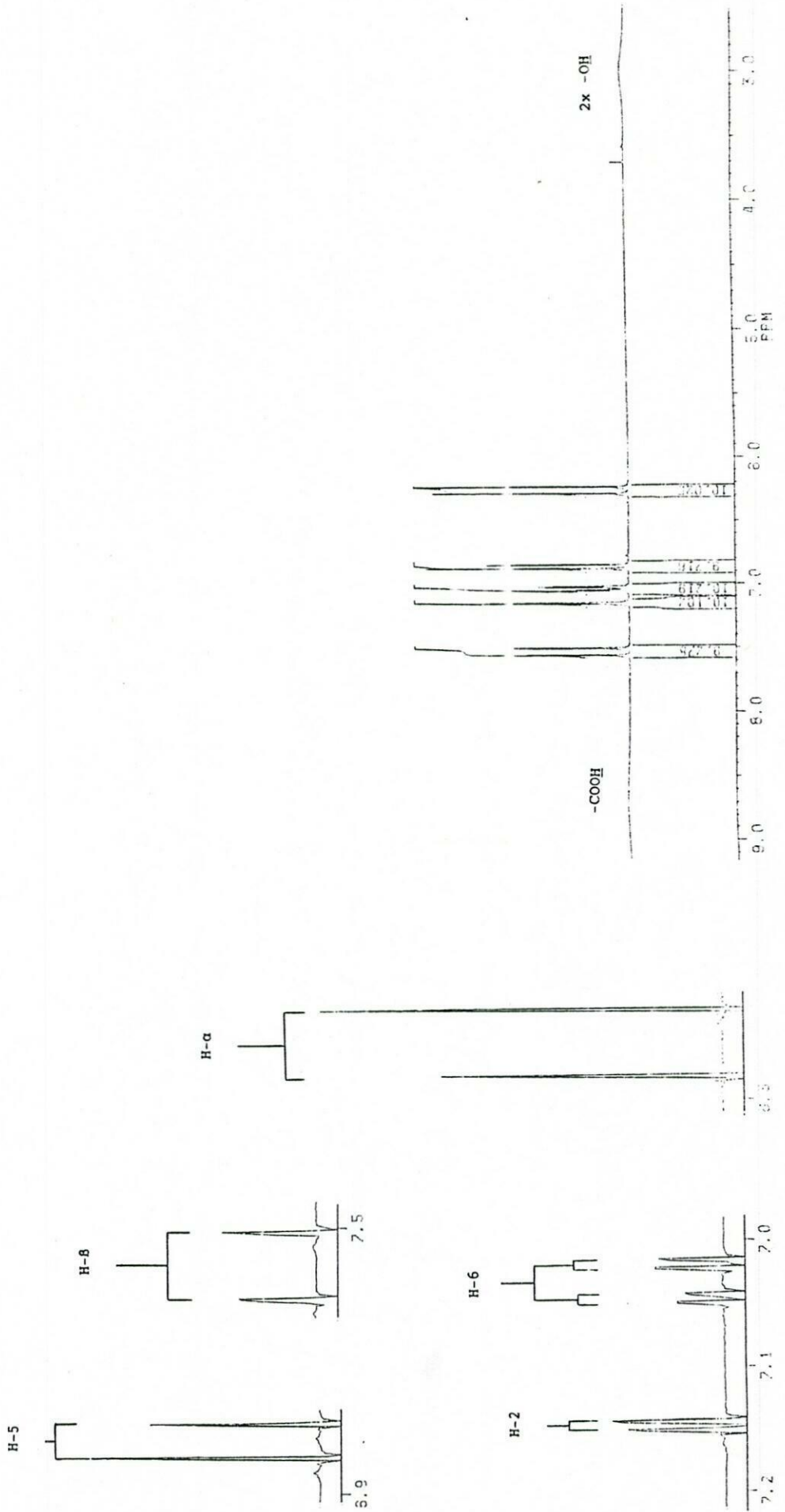
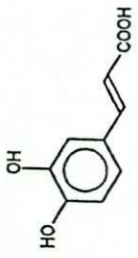


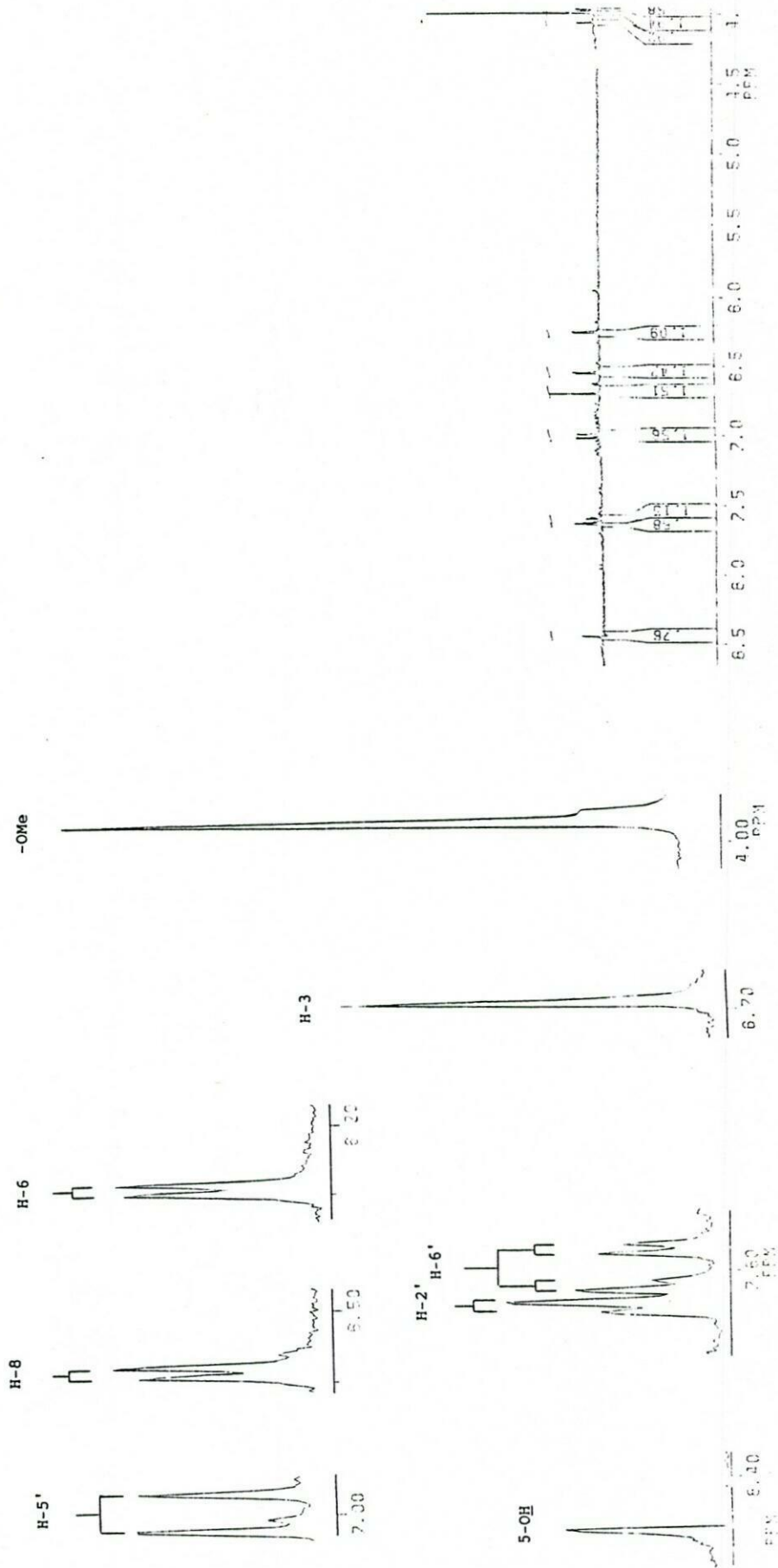
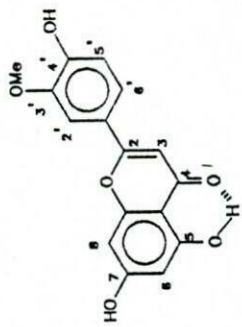




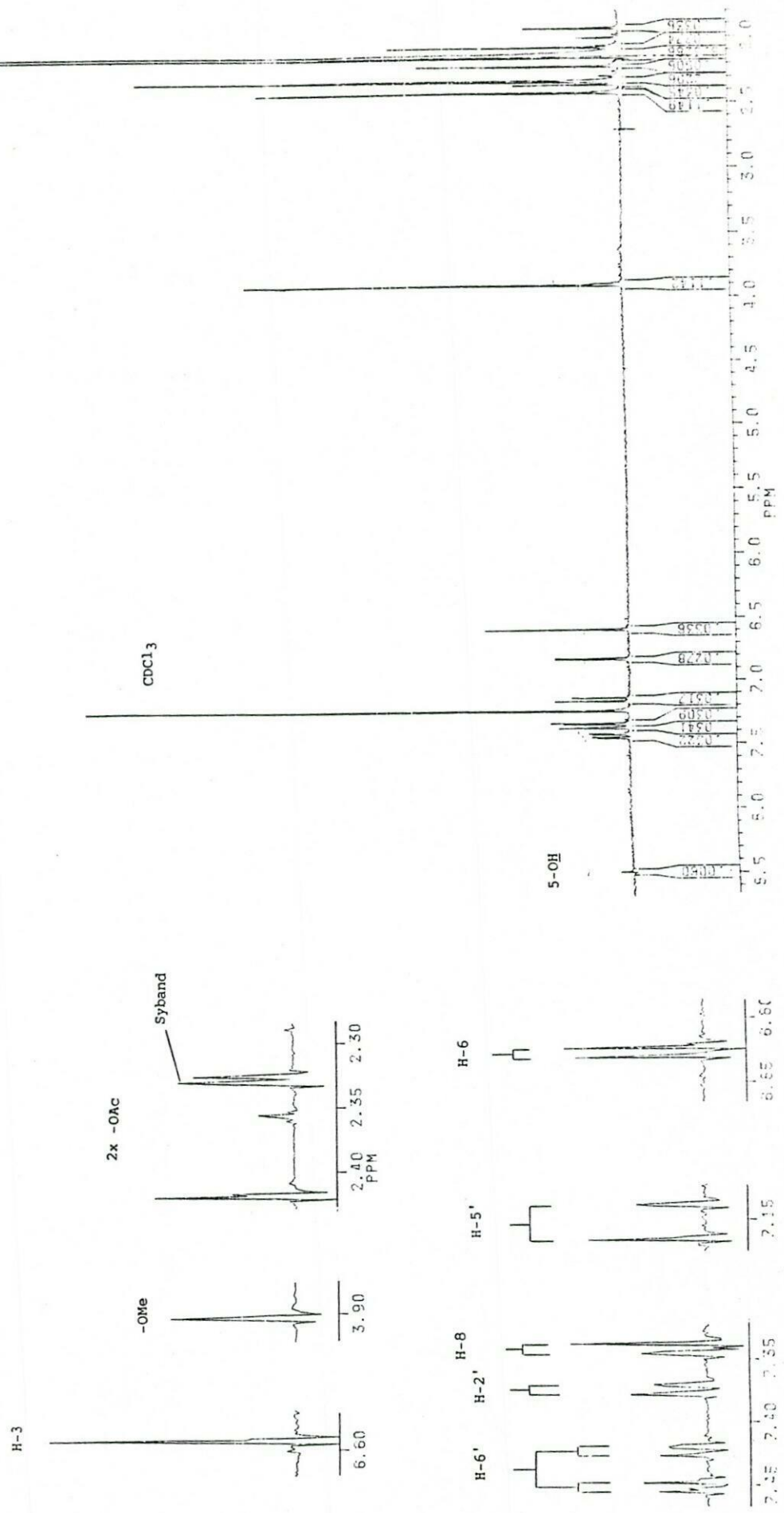
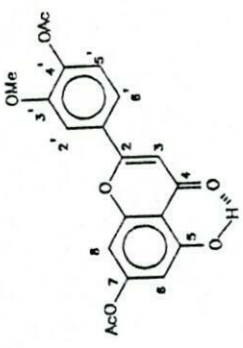


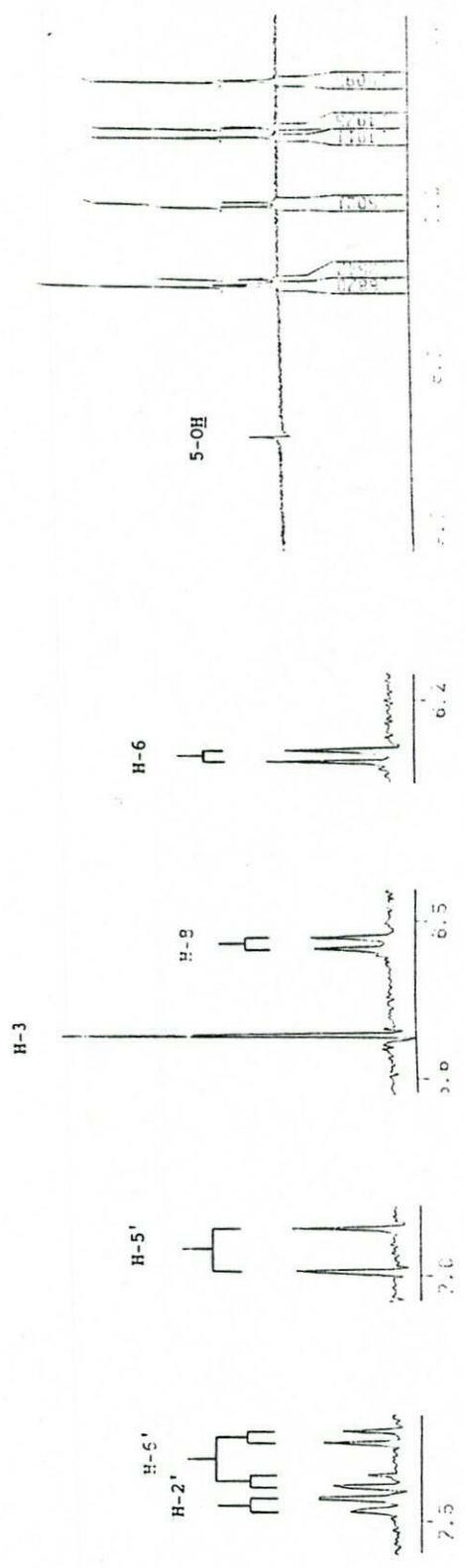
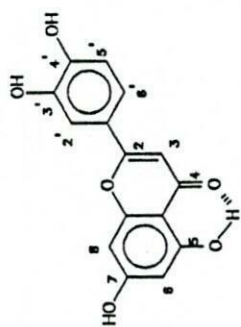






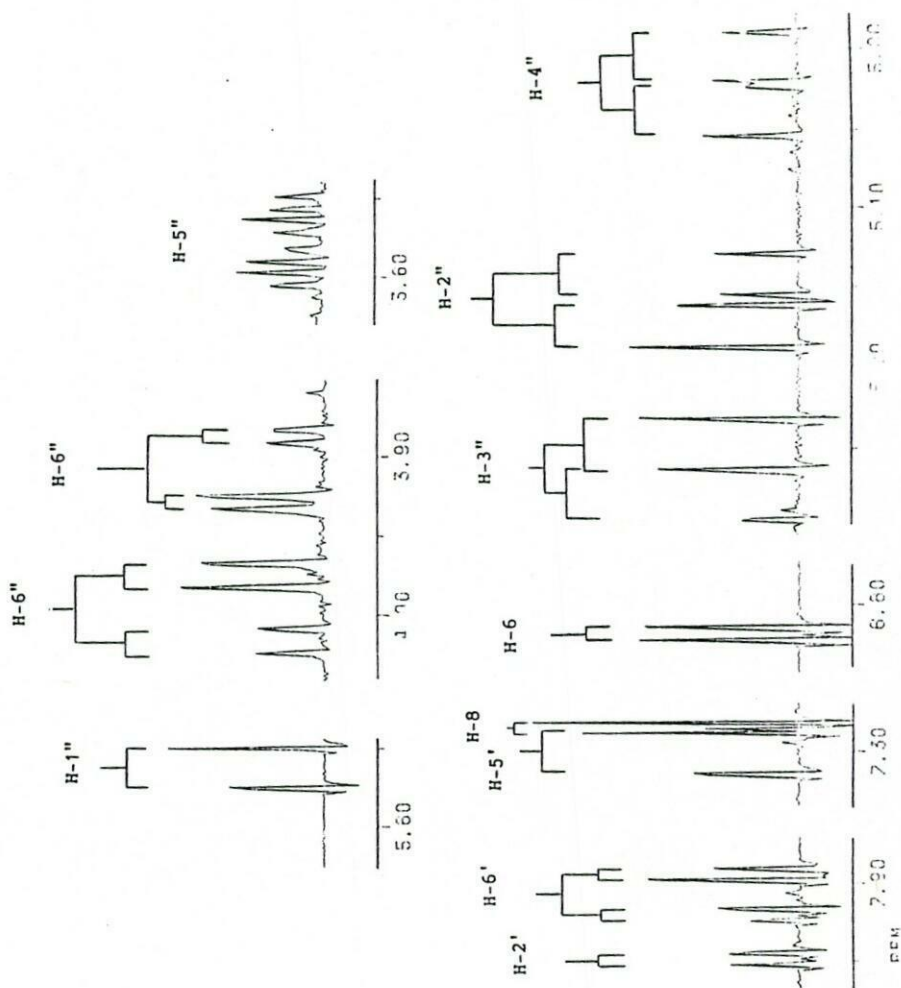
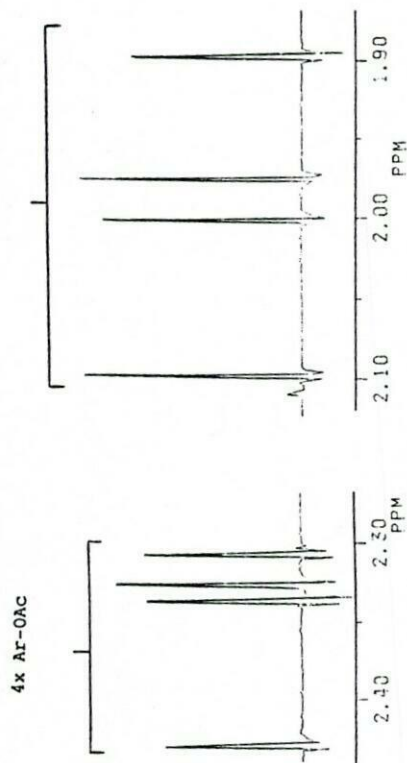
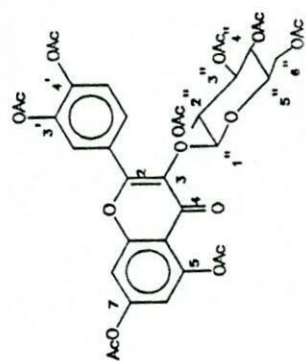
Plaat 8: 4',7-Di-asetoksi-5-hidroksi-3'-metoksiflavoön (4',7-di-O-asetielchrysoeriol) [40a]; CDCl₃, 296 K



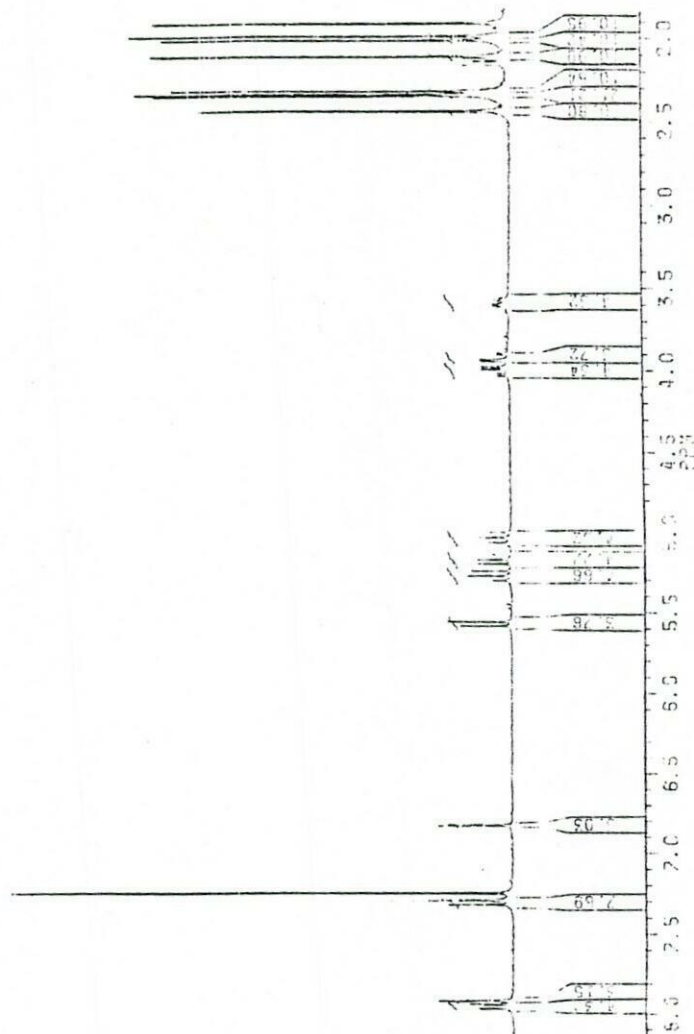


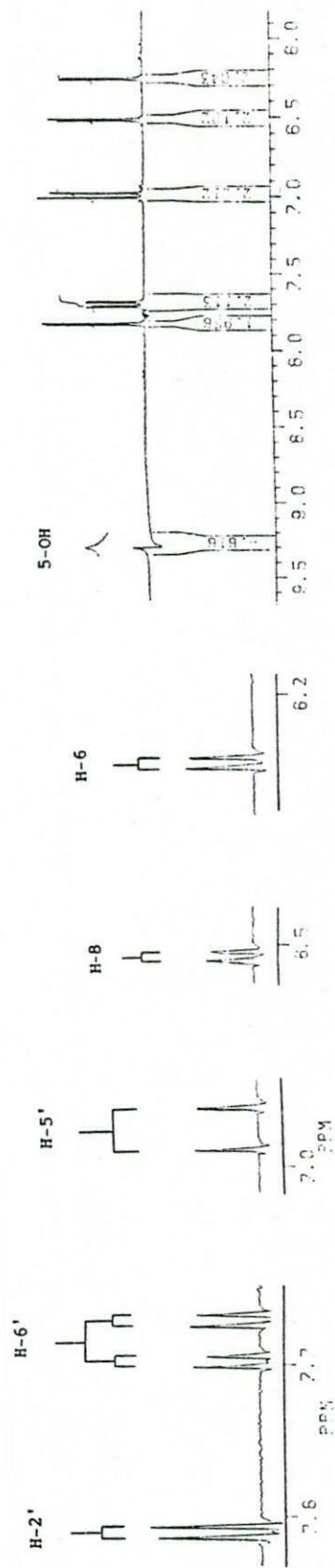
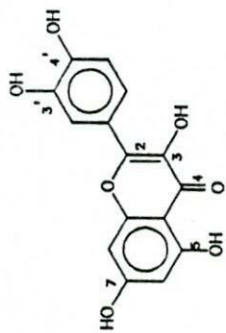
4x Alif.-OAc

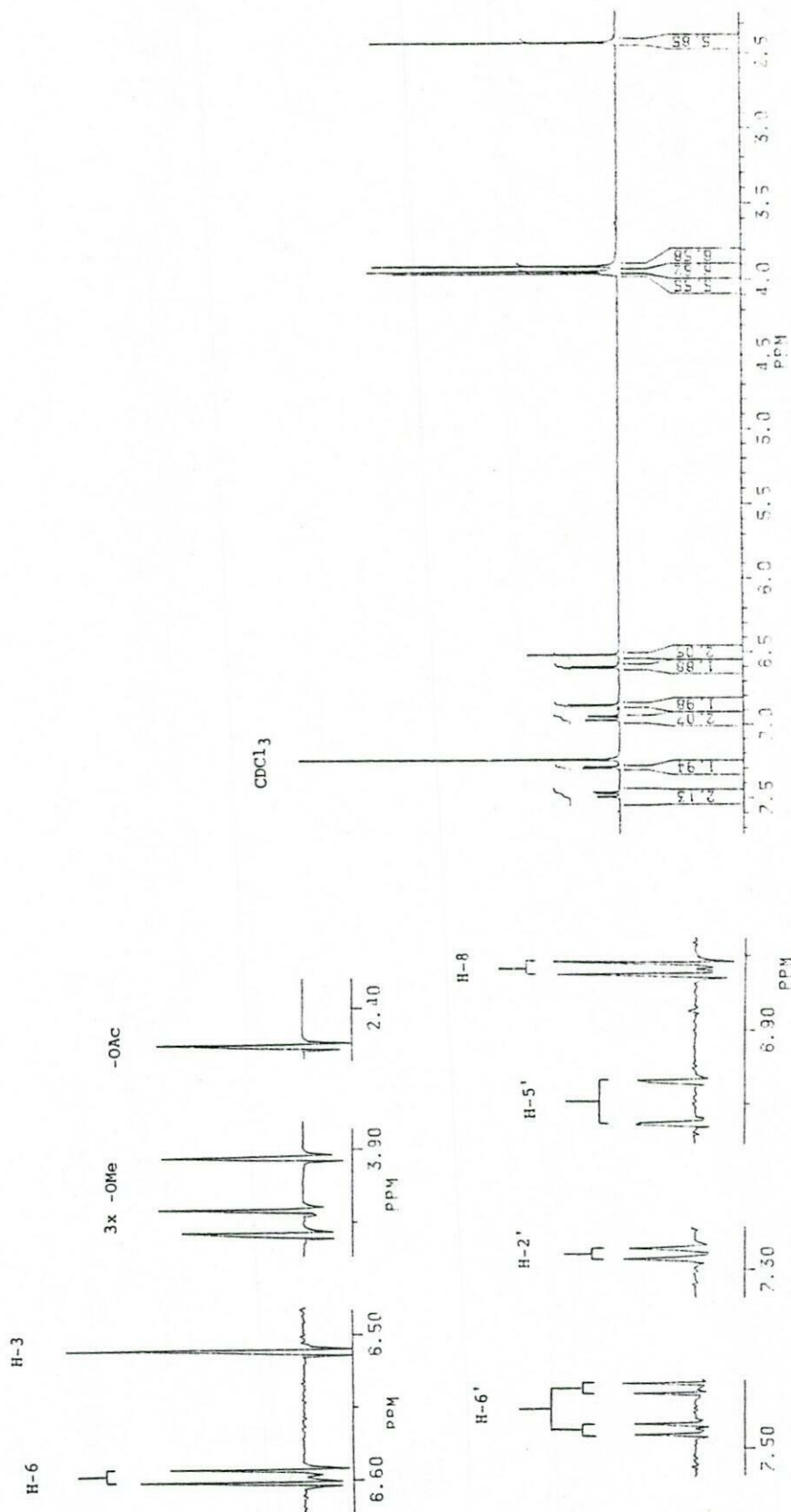
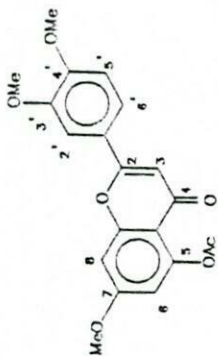
4x Ar-OAc

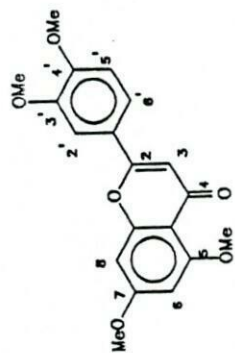


CDCl₃

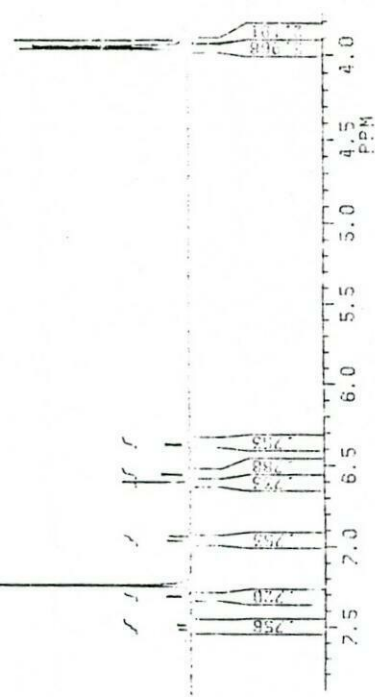
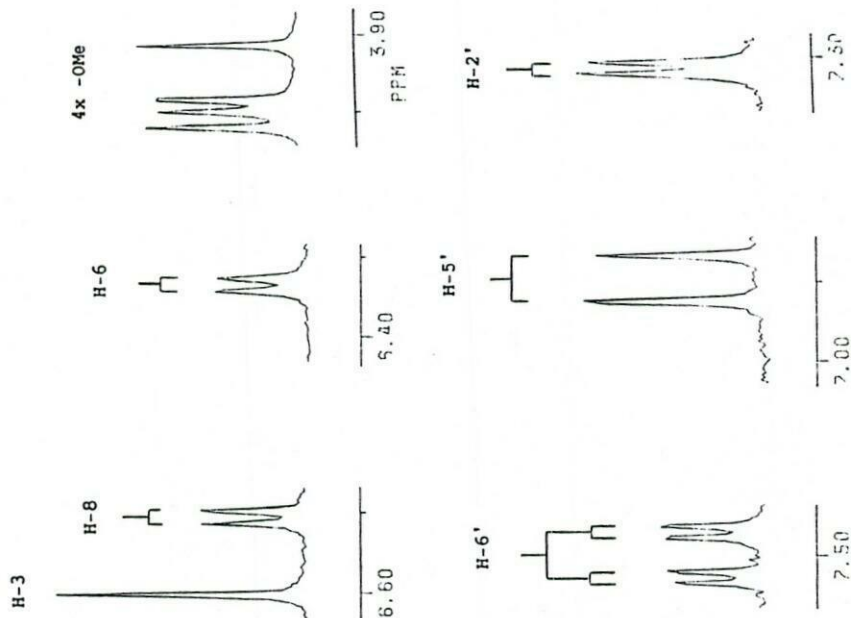




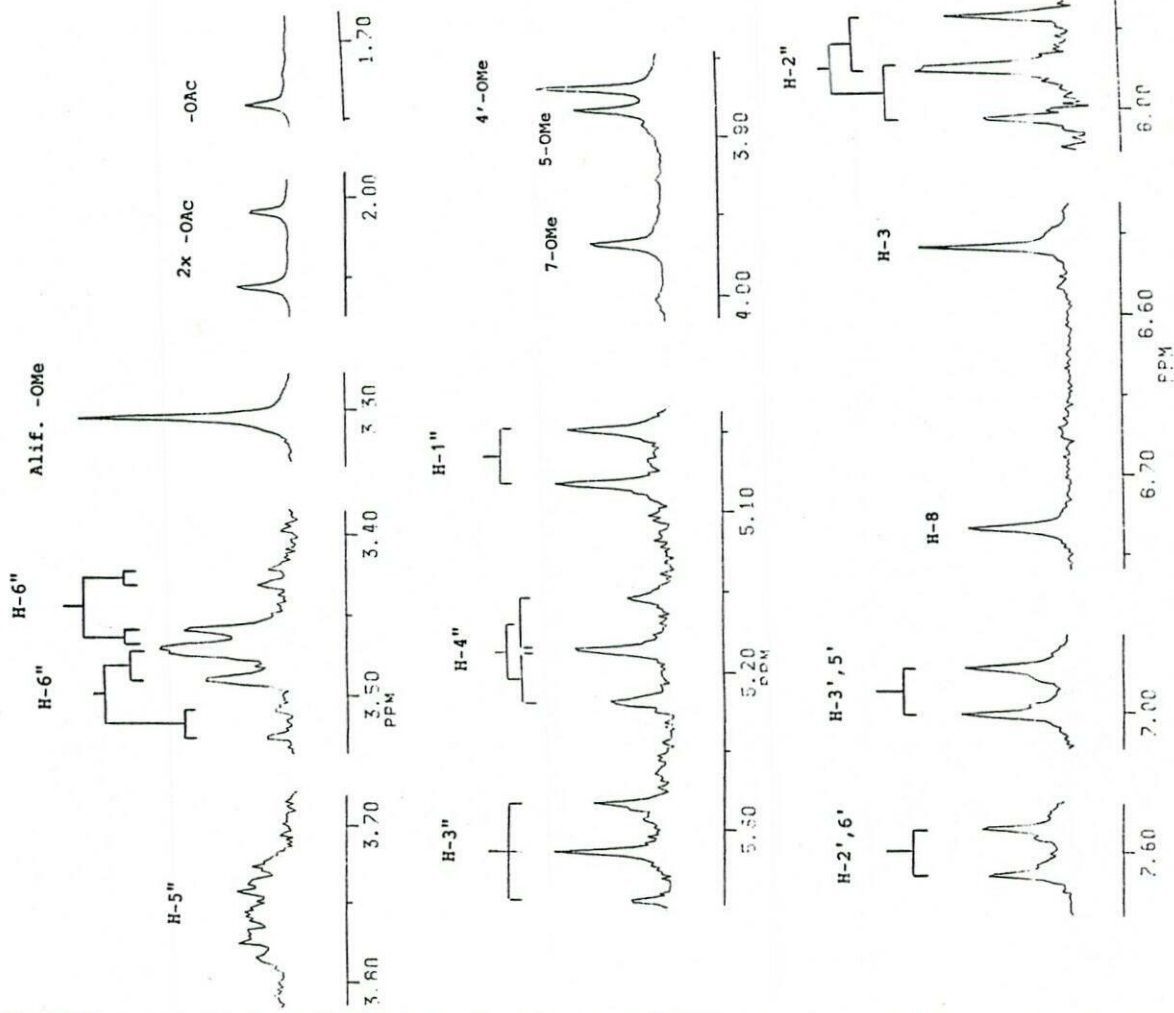
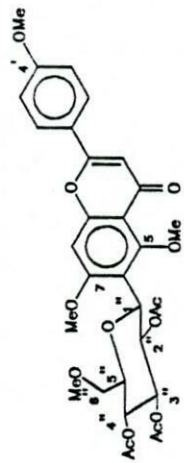




CDCl₃



glukopiranosiel)flavoon (2'',3'',4''-tri-O-asetiel-4',5,6'',7-tetra-O-
metielisovitexin) [41a]; CDCl₃, 296 K



—CDCl₃

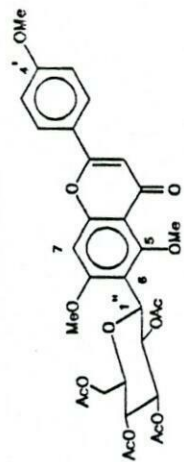
Asetoon

7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
PPM

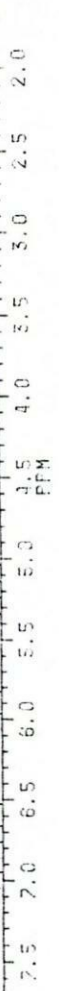
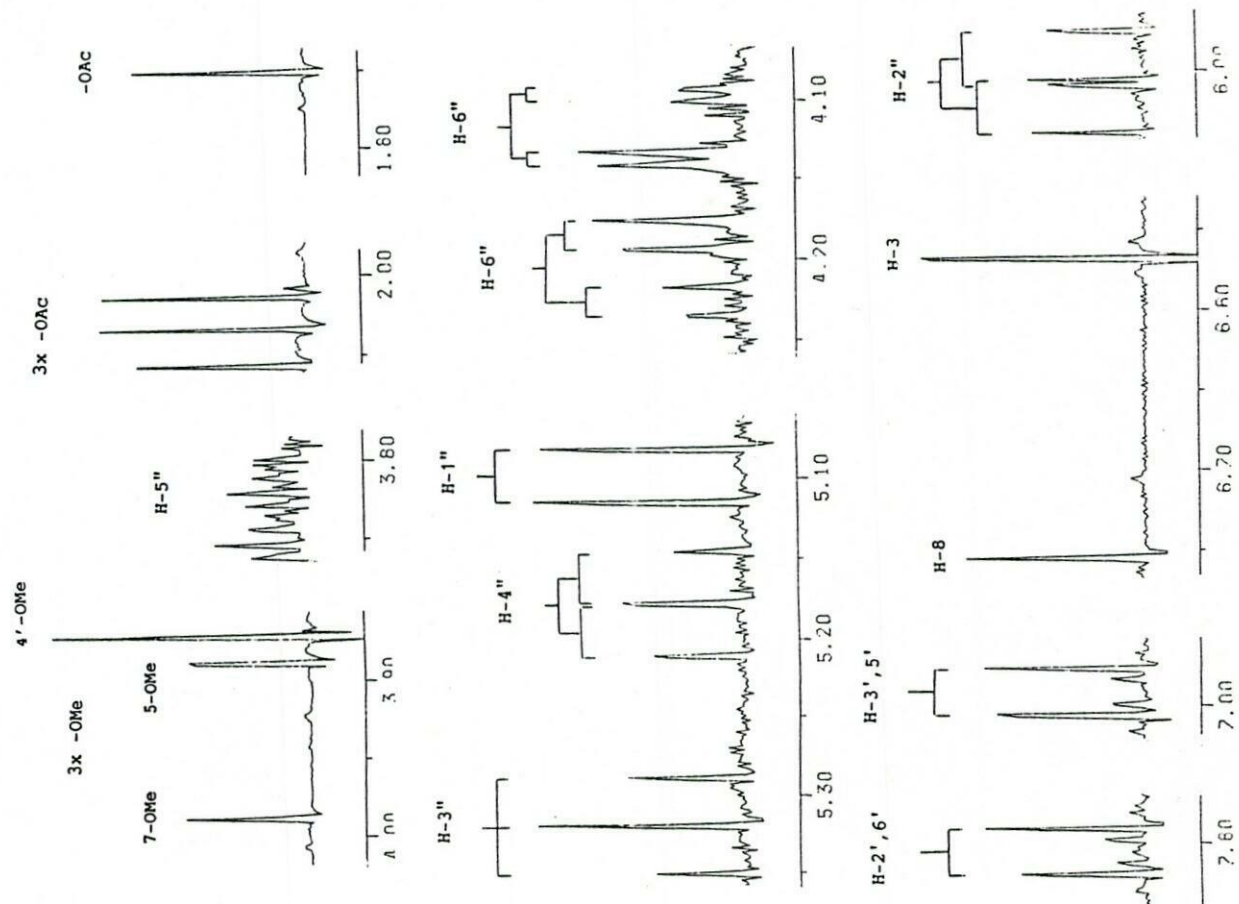
3.80 3.70 3.50 3.40 3.30 3.20 3.10 3.00 2.90 2.80 2.70 2.60 2.50 2.40 2.30 2.20 2.10 2.00 1.90 1.80 1.70
PPM

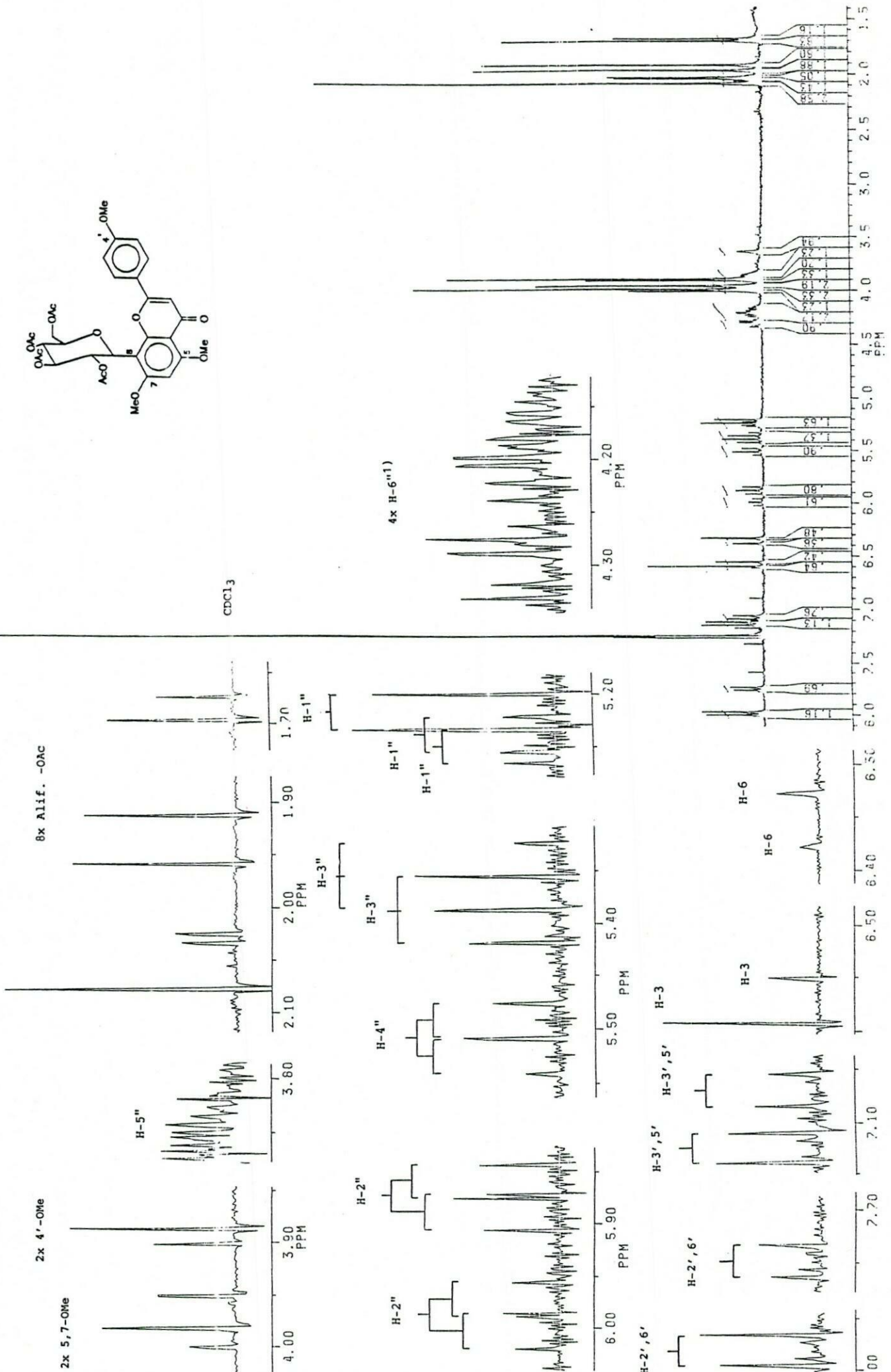
5.50 5.20 5.10 5.00 4.90 4.80 4.70 4.60 4.50 4.40 4.30 4.20 4.10 4.00 3.90 3.80 3.70 3.60 3.50 3.40 3.30 3.20 3.10 3.00 2.90 2.80 2.70 2.60 2.50 2.40 2.30 2.20 2.10 2.00
PPM

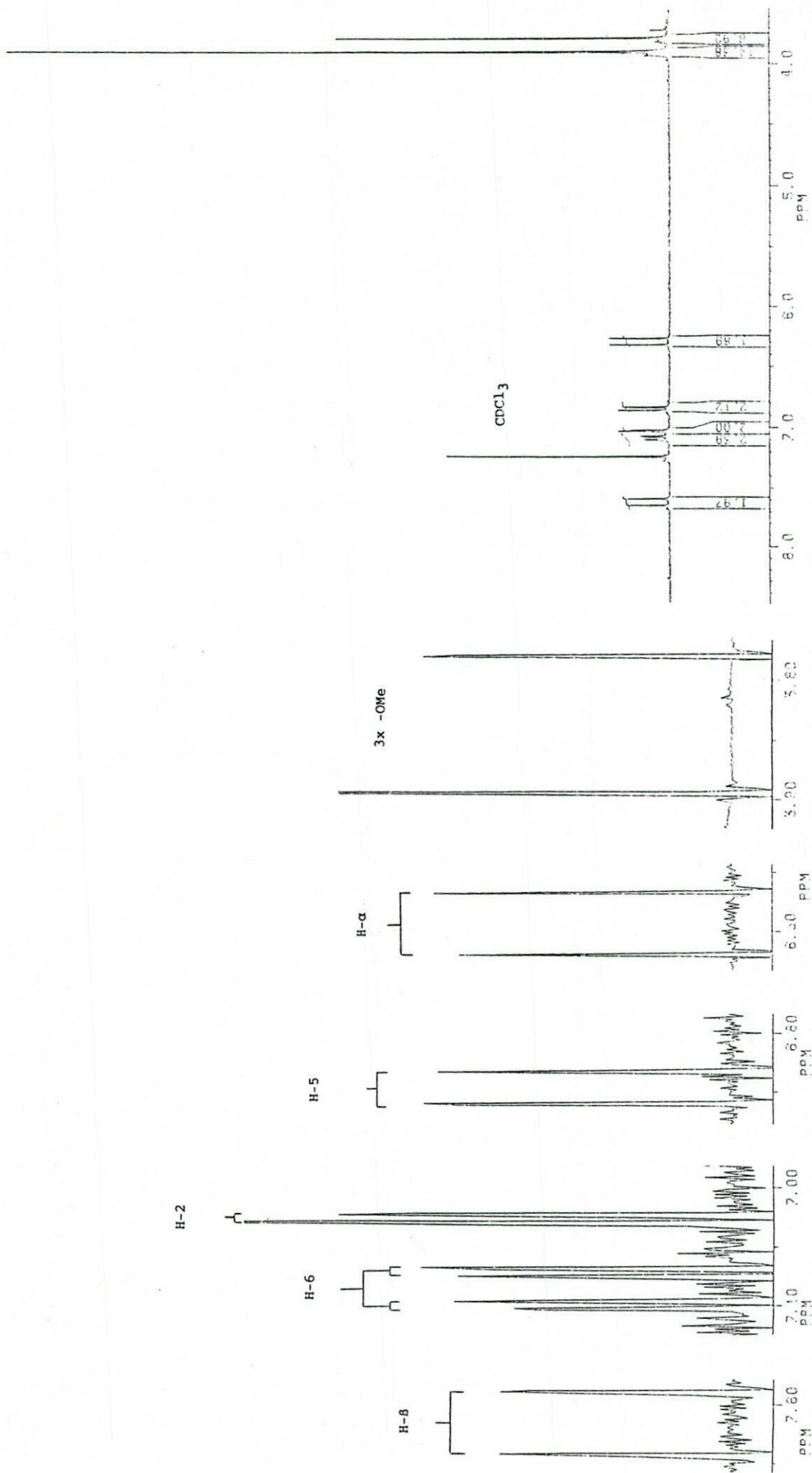
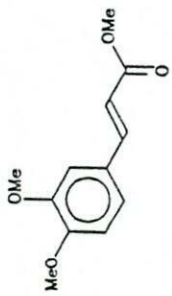
7.60 7.50 7.40 7.30 7.20 7.10 7.00 6.90 6.80 6.70 6.60 6.50 6.40 6.30 6.20 6.10 6.00
PPM

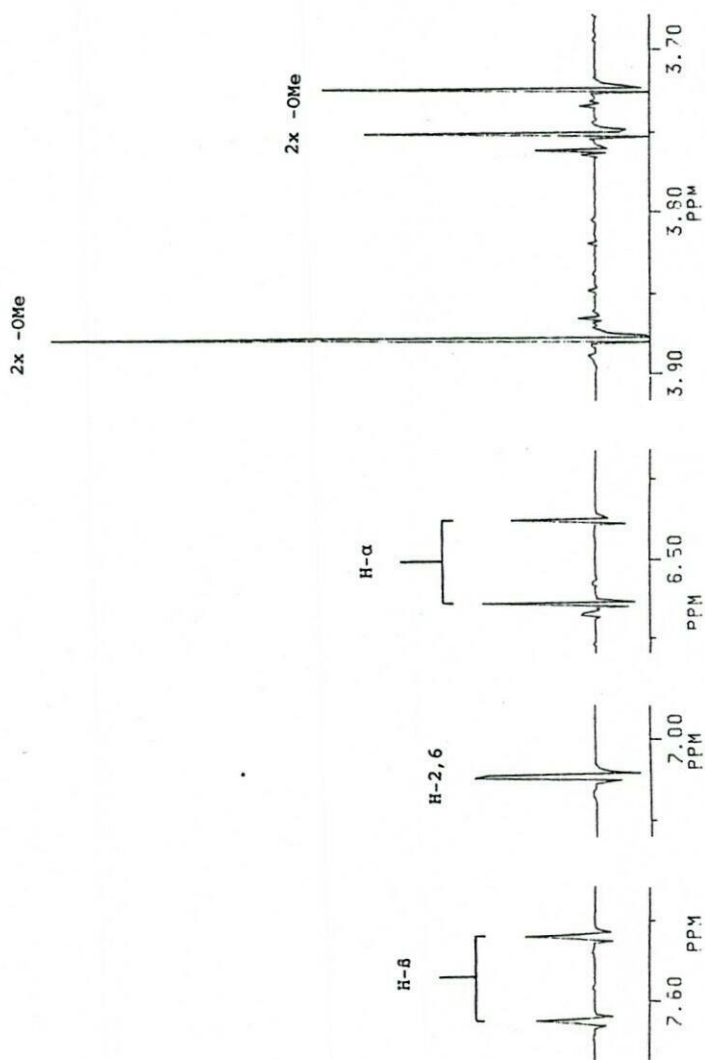
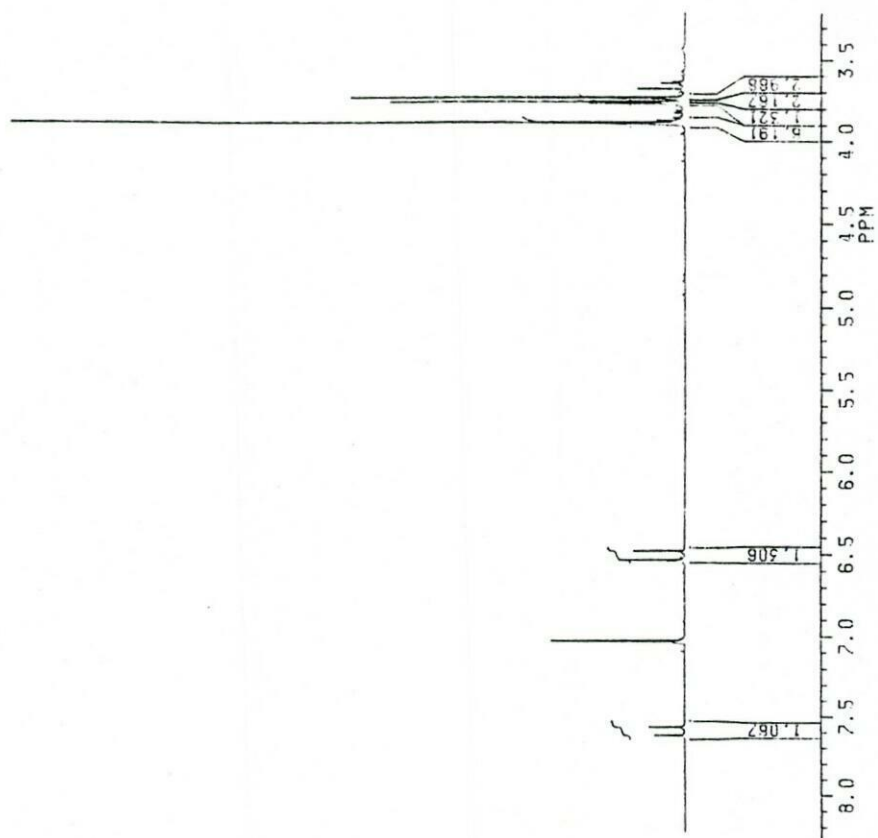
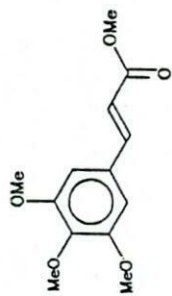


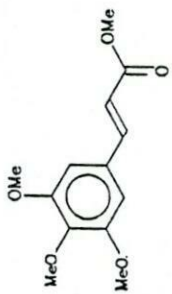
CDCl₃



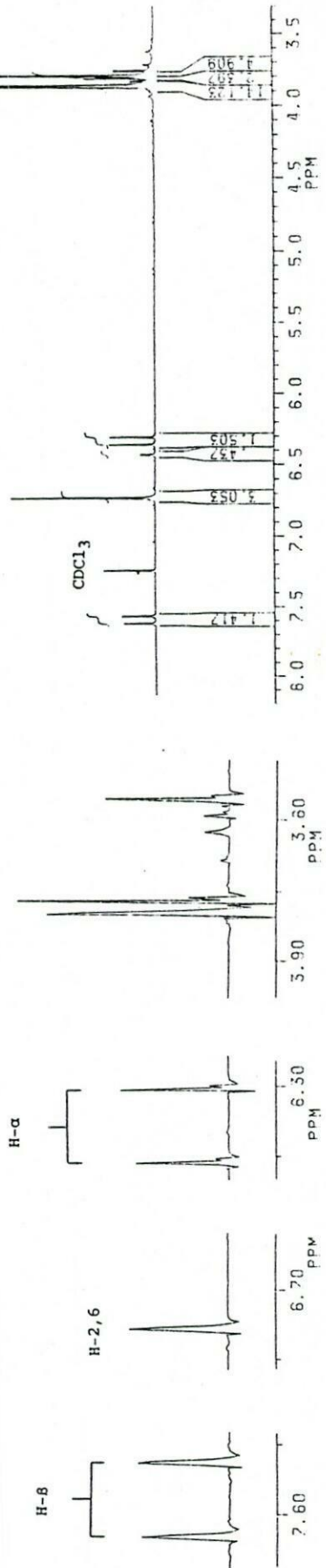


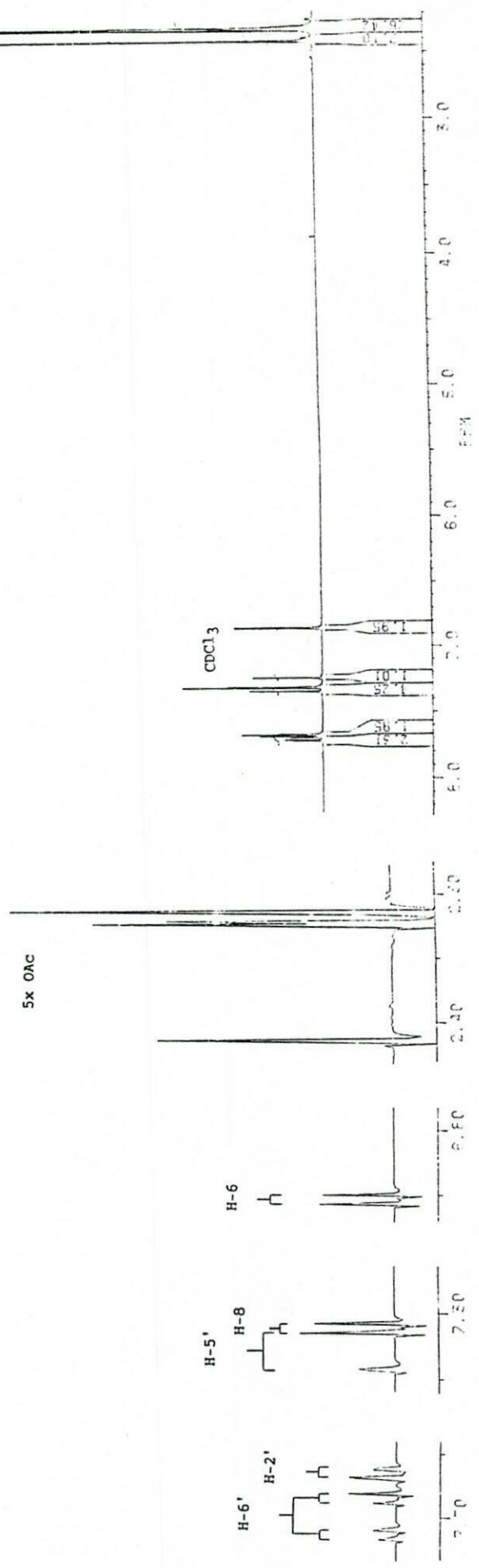
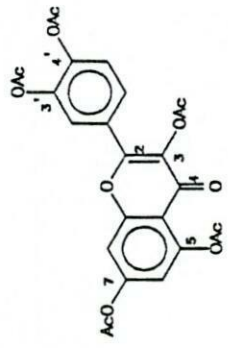




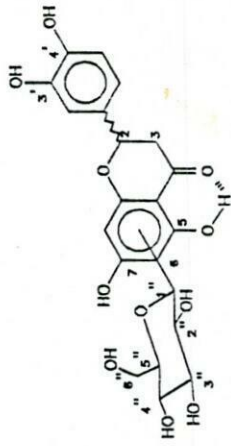


4x -OMe

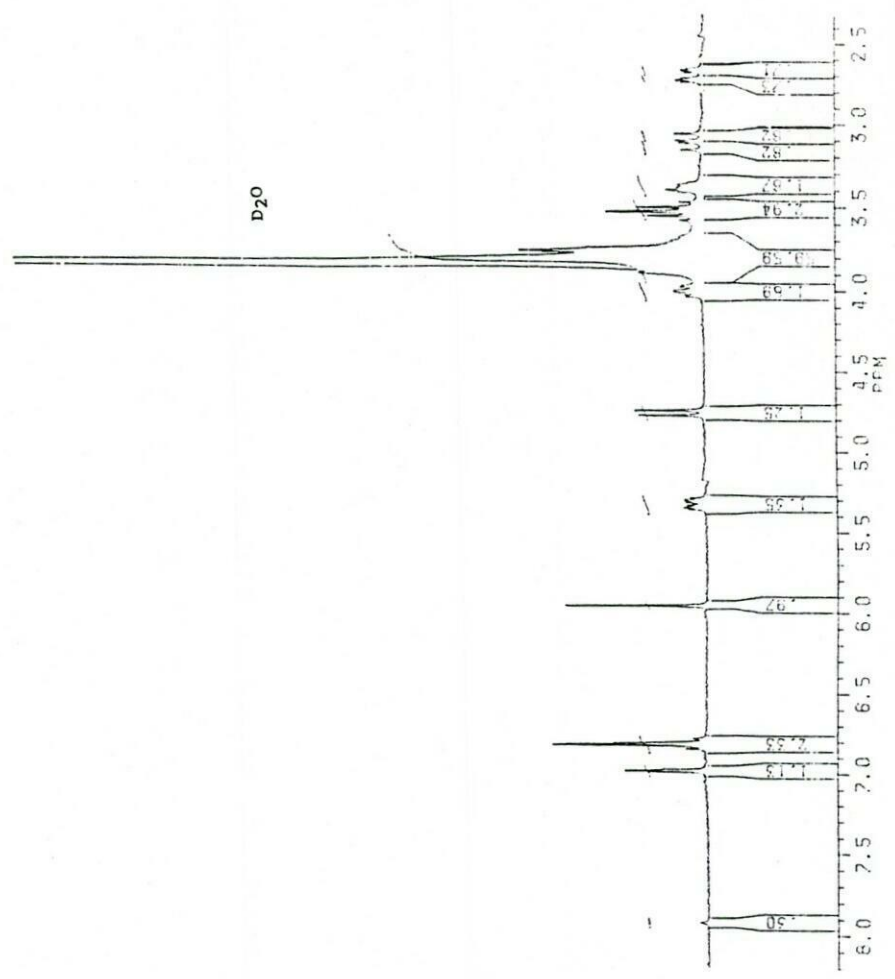
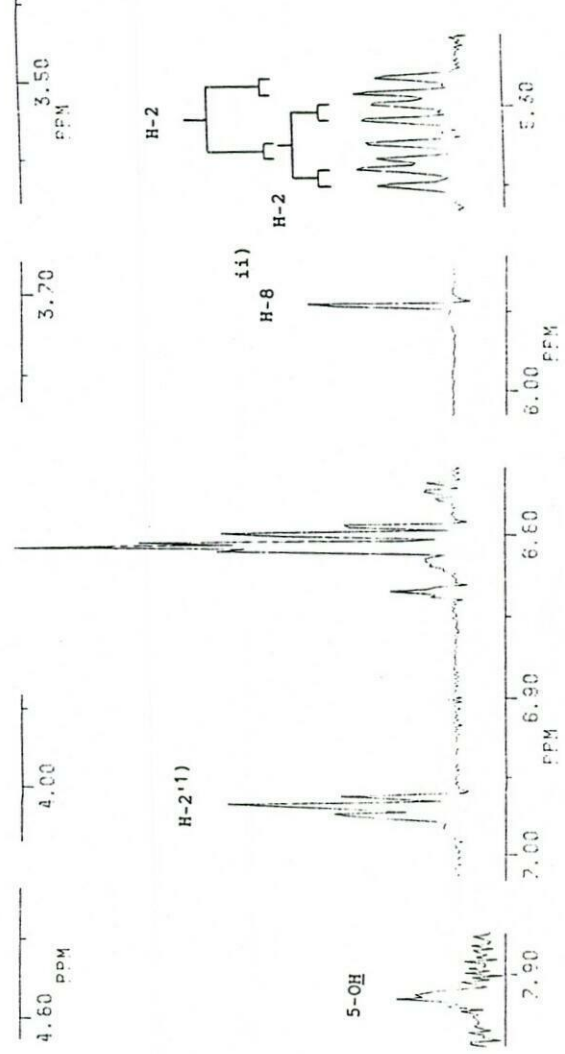
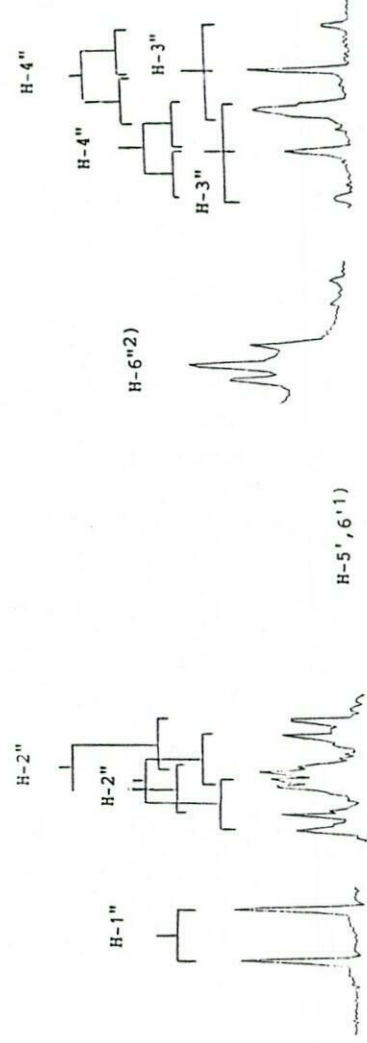
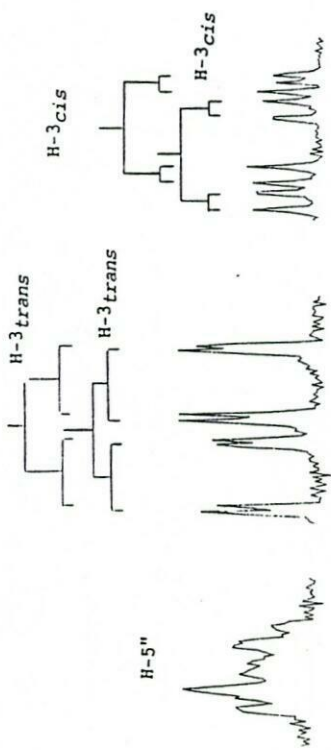




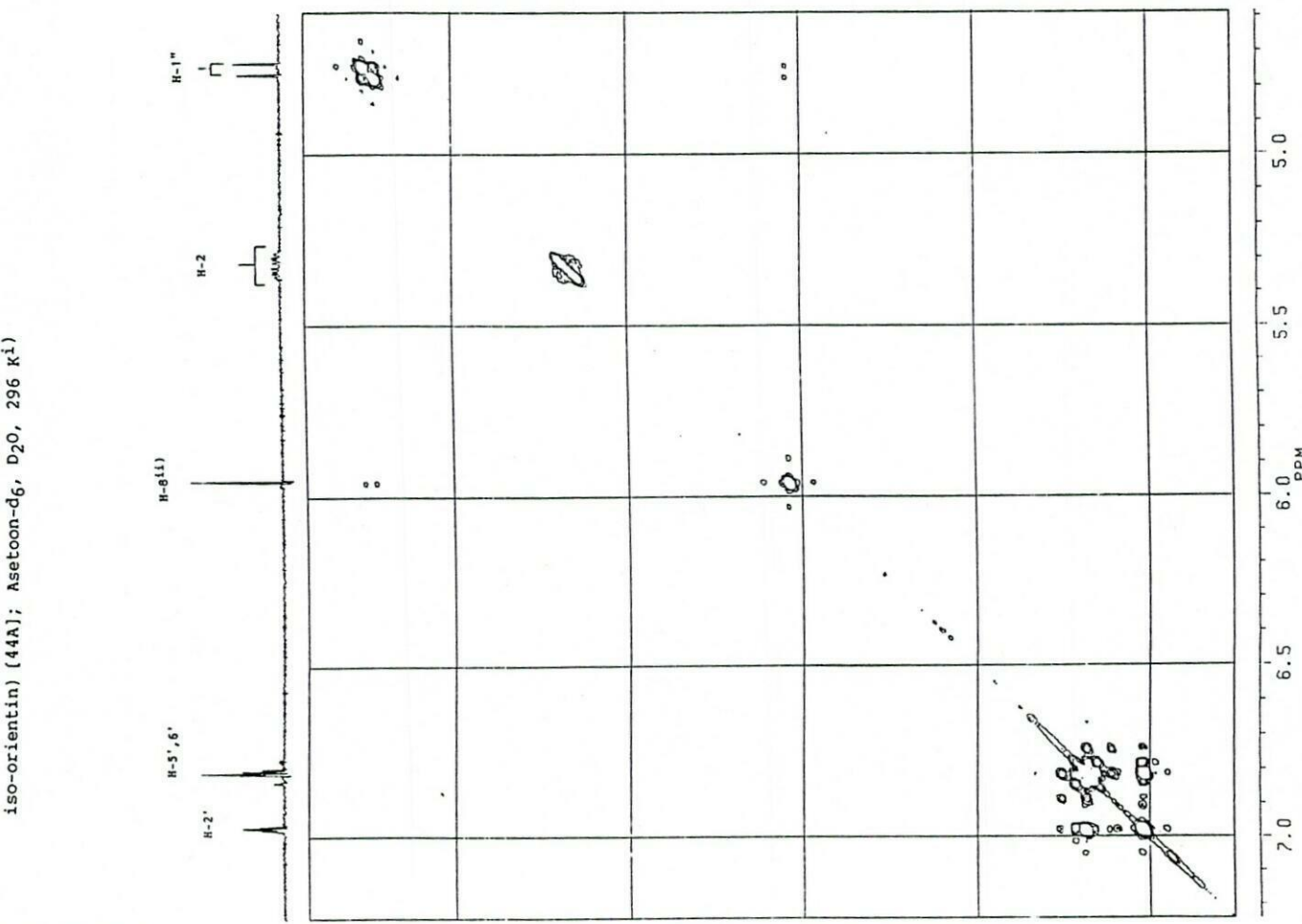
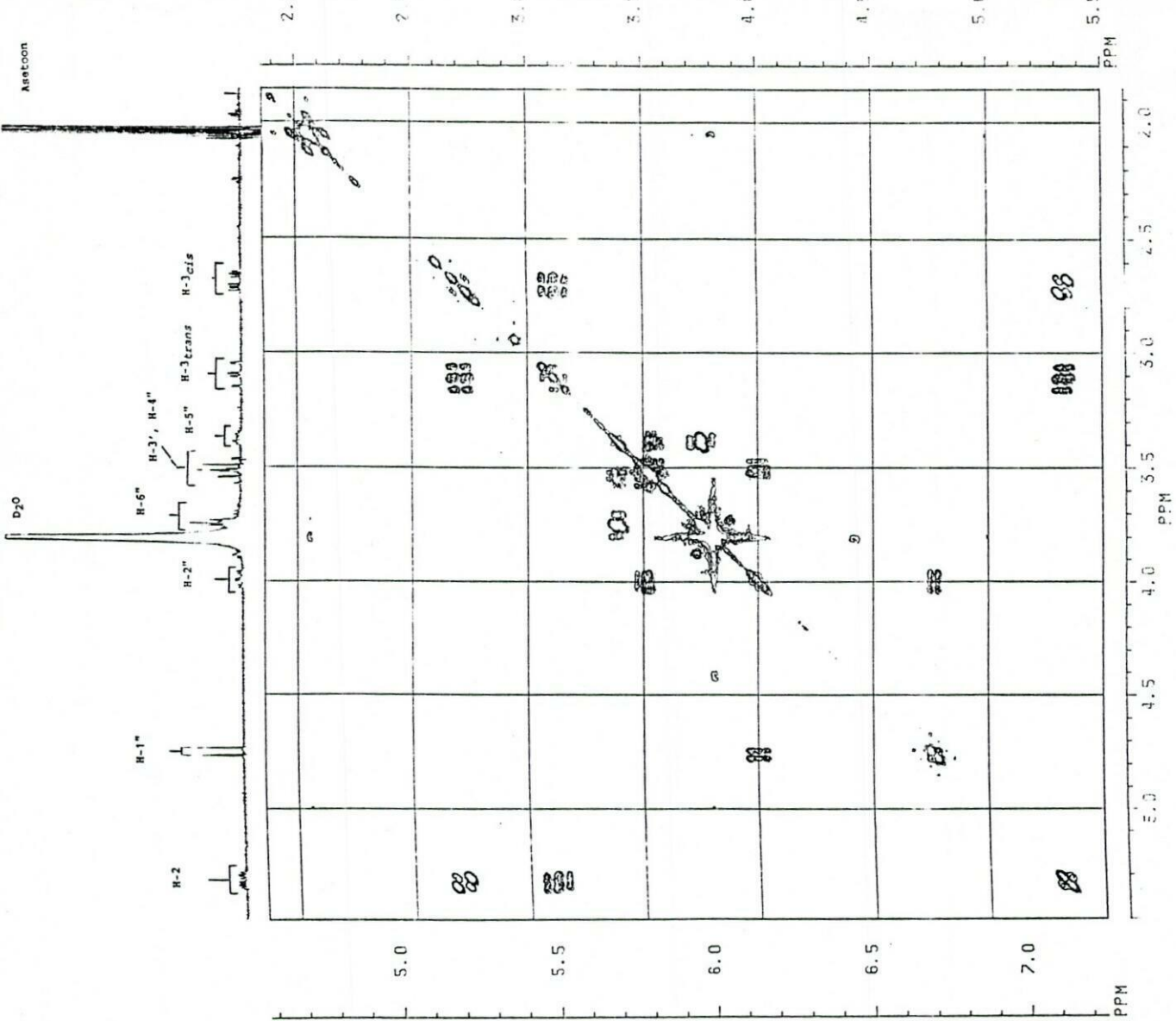
ii) Mag ook H-6 wees.



44A/B

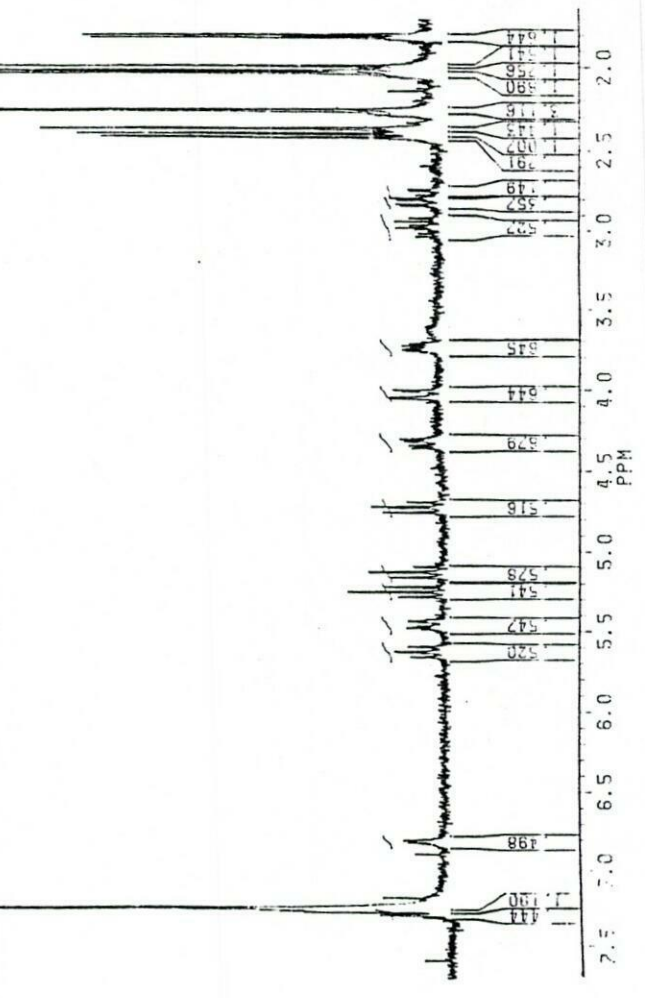
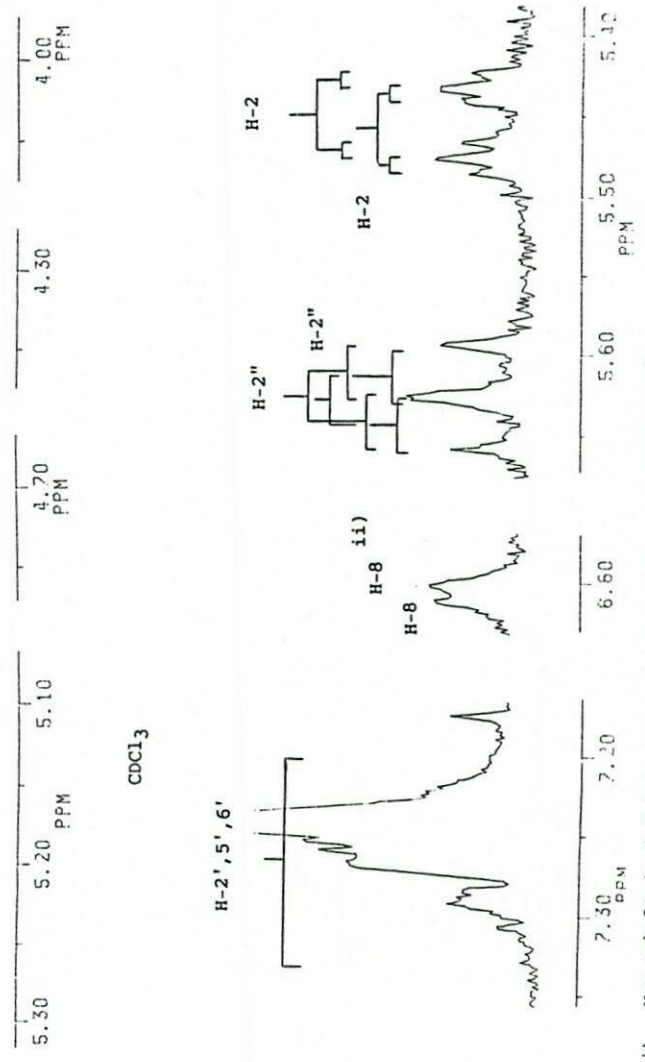
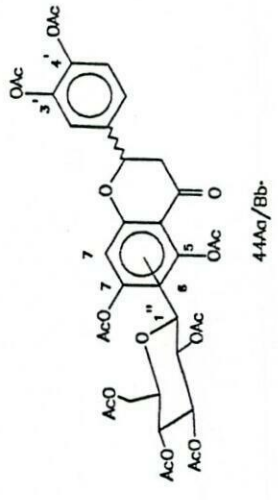
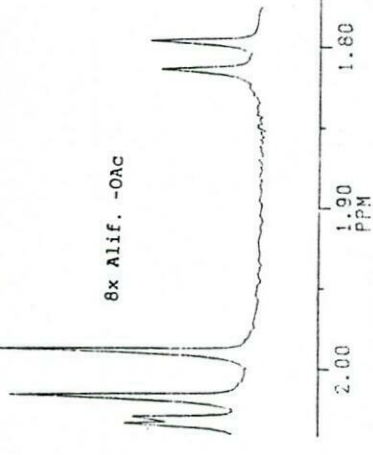
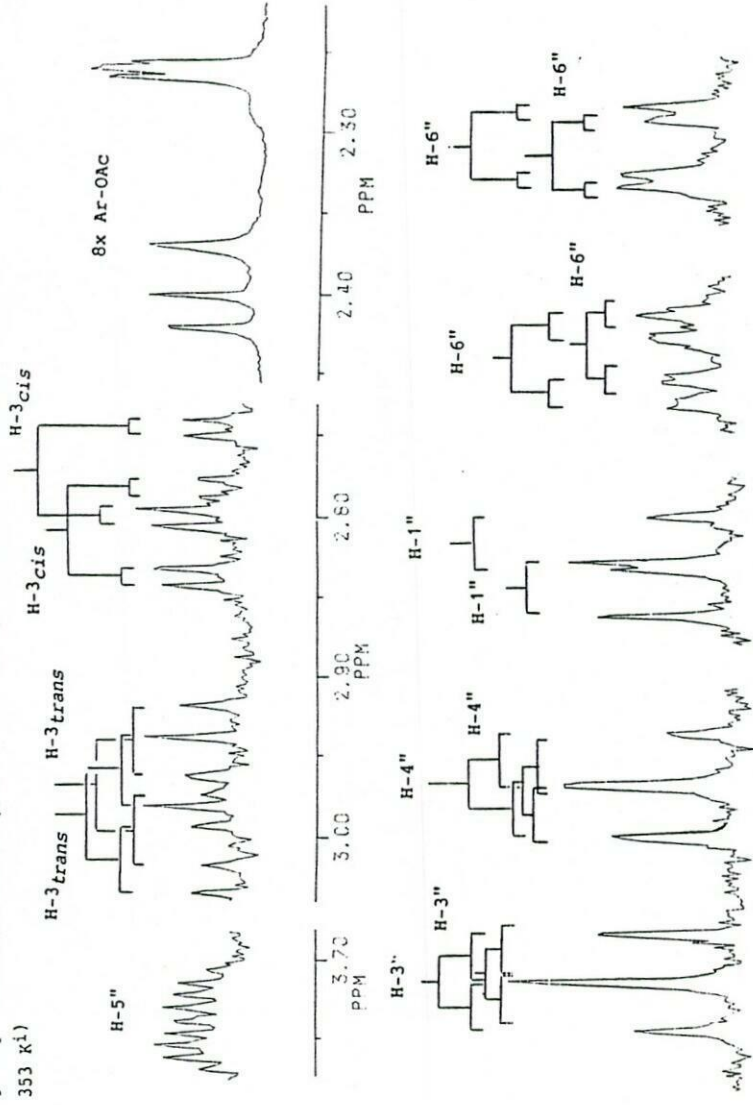


iso-orientin) [44A]; Asetoon-d₆, D₂O, 296 K(i)



i) Mag ook 3',4',5,7-Tetrahydroksi-8-β-D-glukopiranosielflavanoon (2,3-dihydro-orientin) [44B] wees.

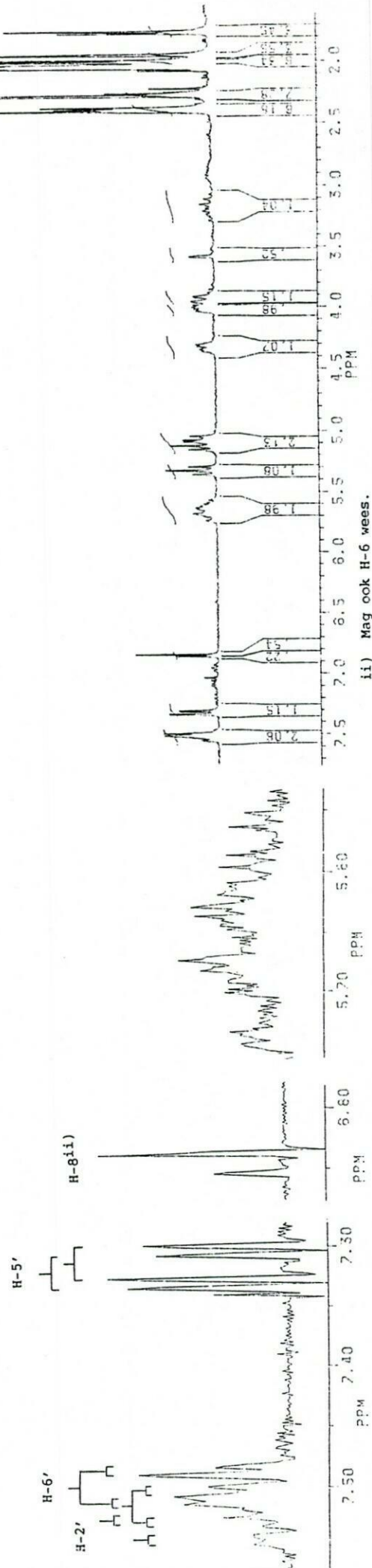
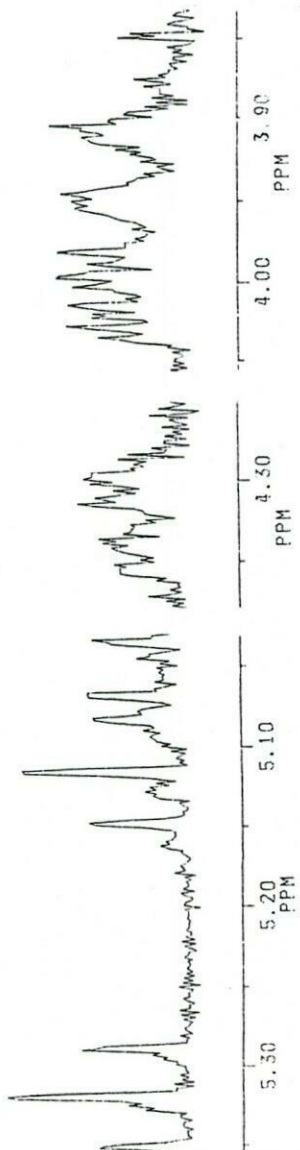
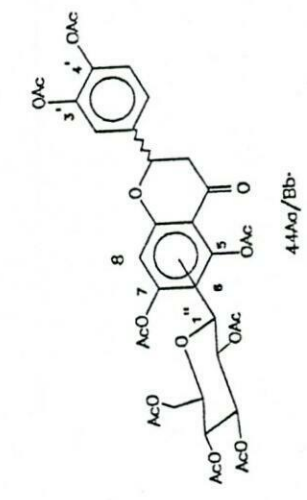
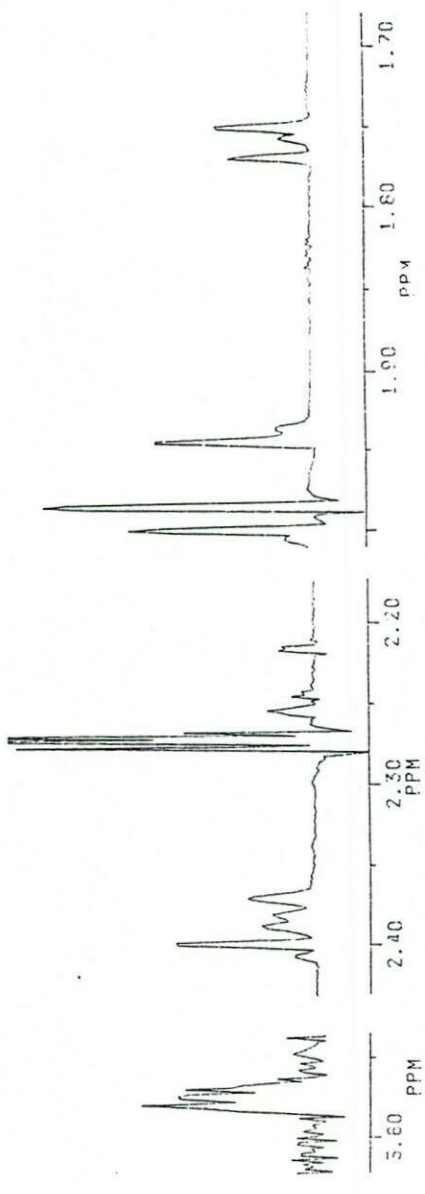
353 ki)



i) Mag ook 3', 4', 5, 7-tetra-asetoksi-8-(2, 3, 4, 6-tetra-O-asetiel)-8-

ii) Mag ook H-6 weers.

* Verdubbeling van seine a.g.v. dinamiese rotasie-isomerie

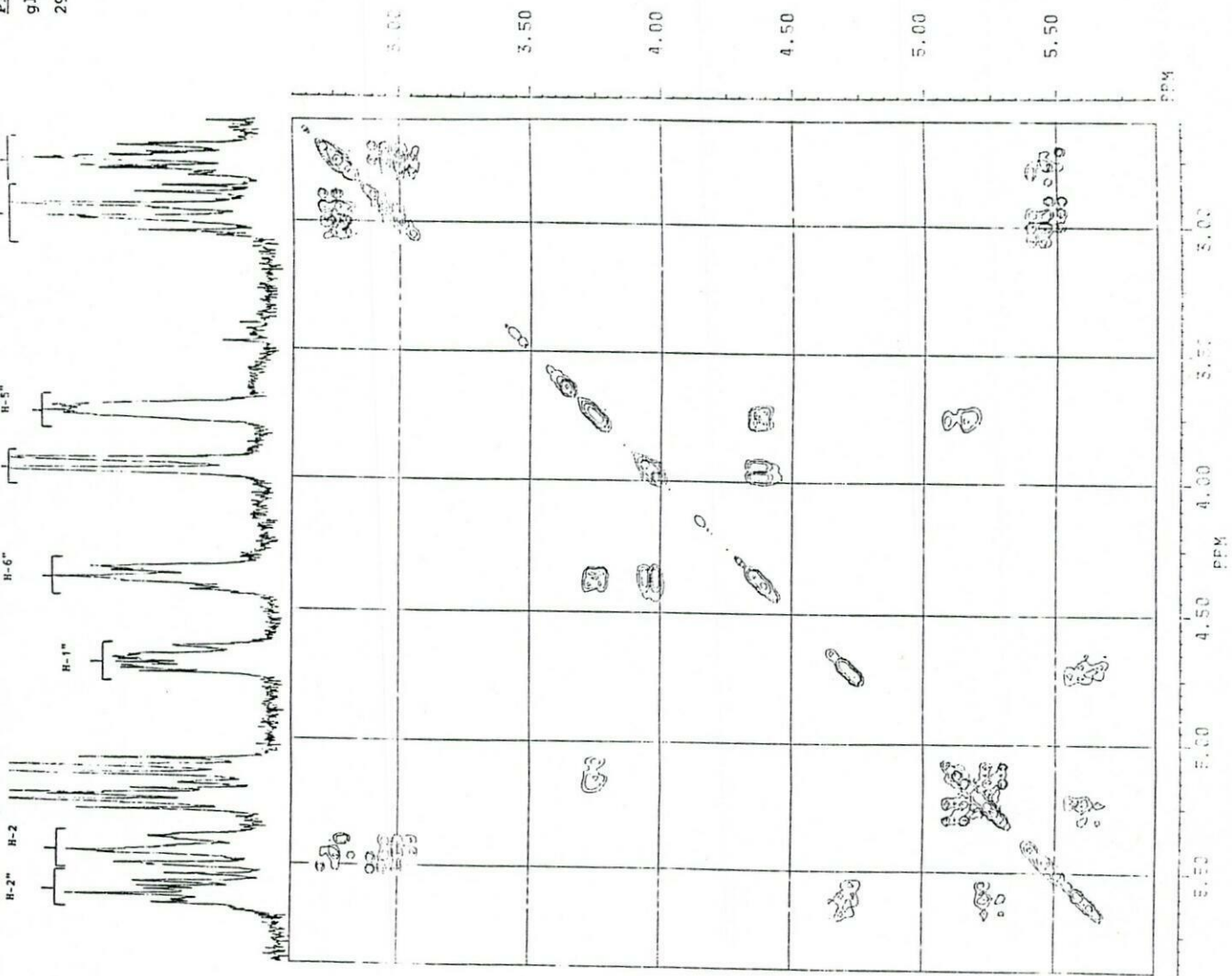


ii) Mag ook H-6 wees.

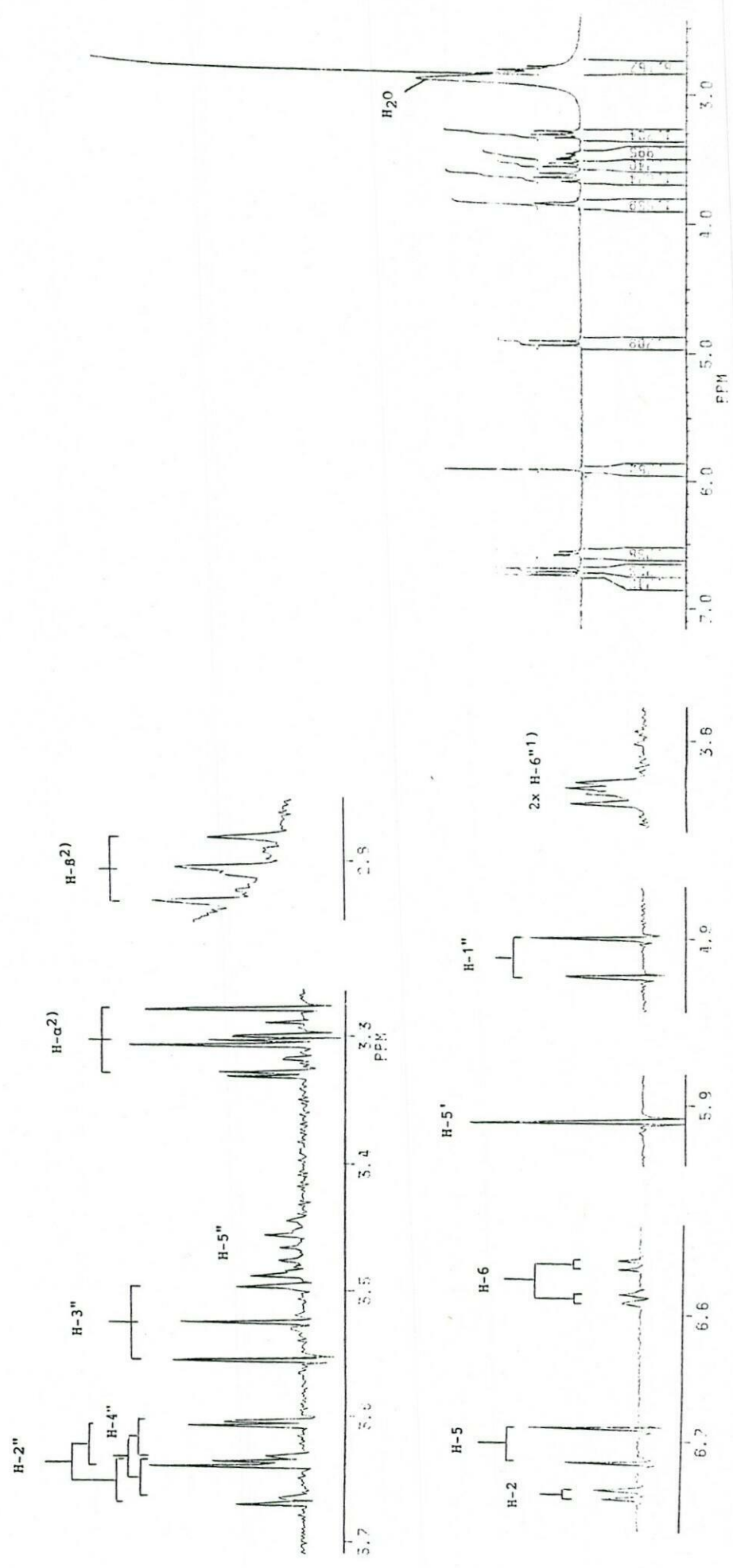
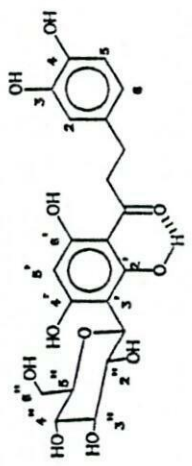
* Die heterosikliese gebied is in CDCl₃ volledig geanaliseer

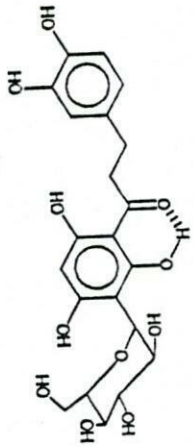
...ok 3/ 4/ 5 7-tetra-asetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-8-

glukopiranosielflavanoon (okta-O-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin) (44Aa); CDCl₃, 296 Kⁱ)

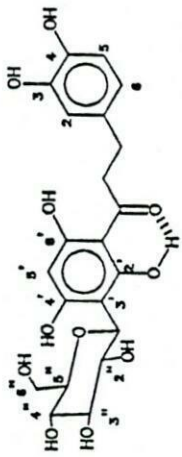


i) Mag ook 3',4',5,7-tetra-asetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-O-asetiel-β-D-glukopiranosielflavoon (okta-O-asetiel-2,3-dihidro-orientin)

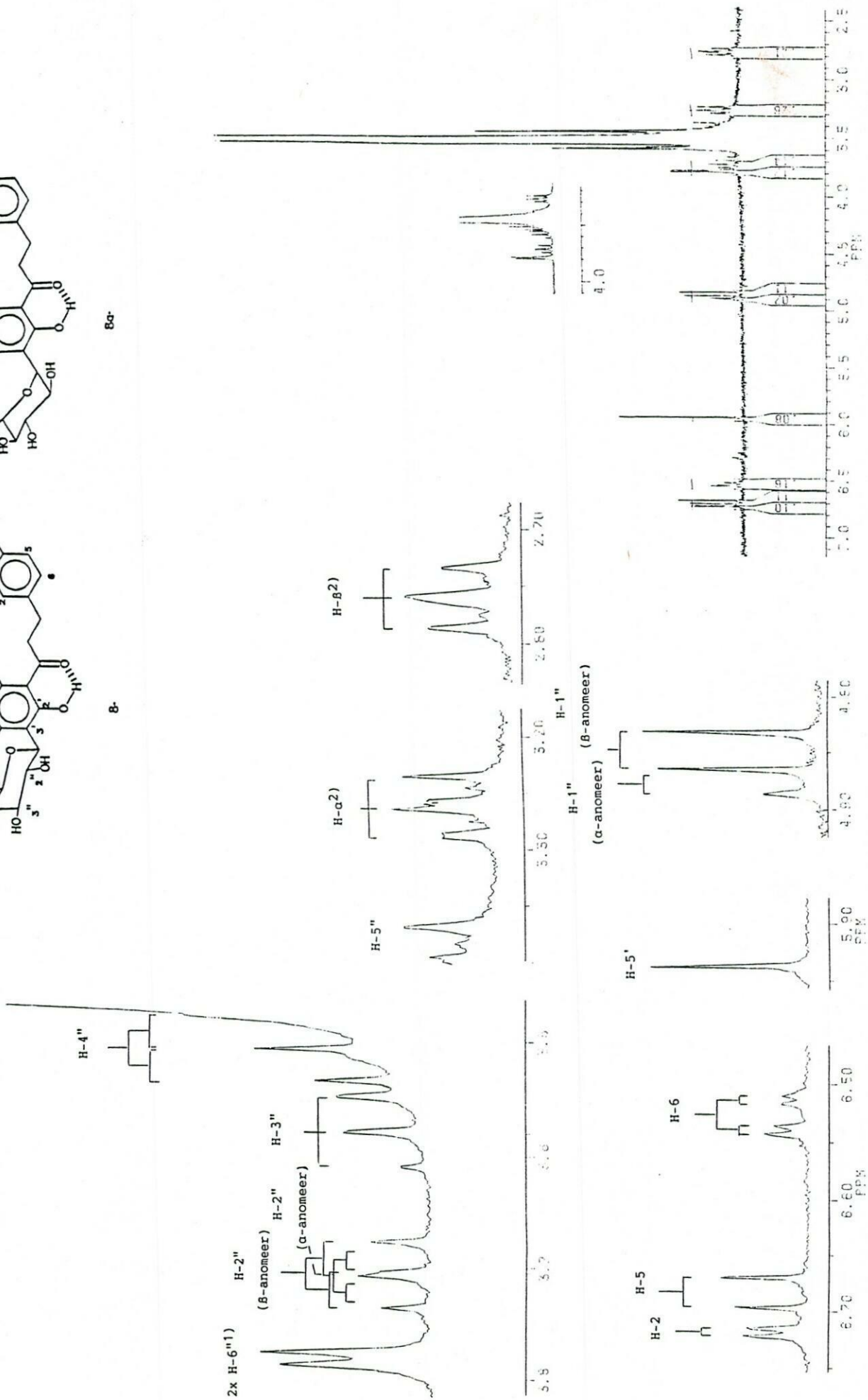


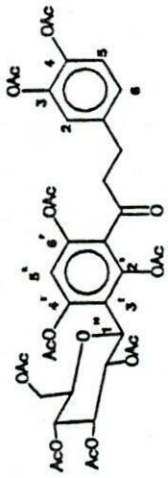


8a

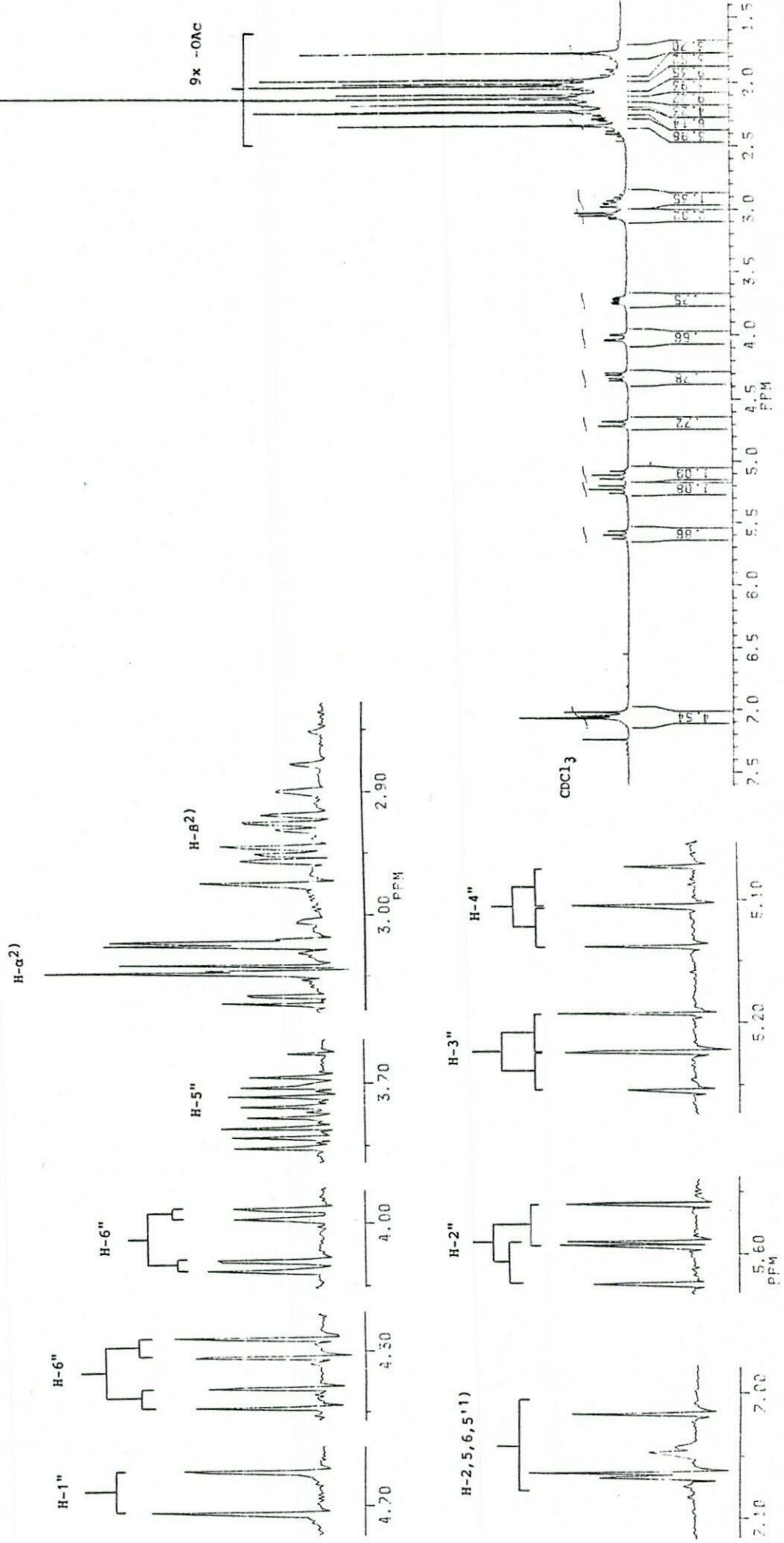


8



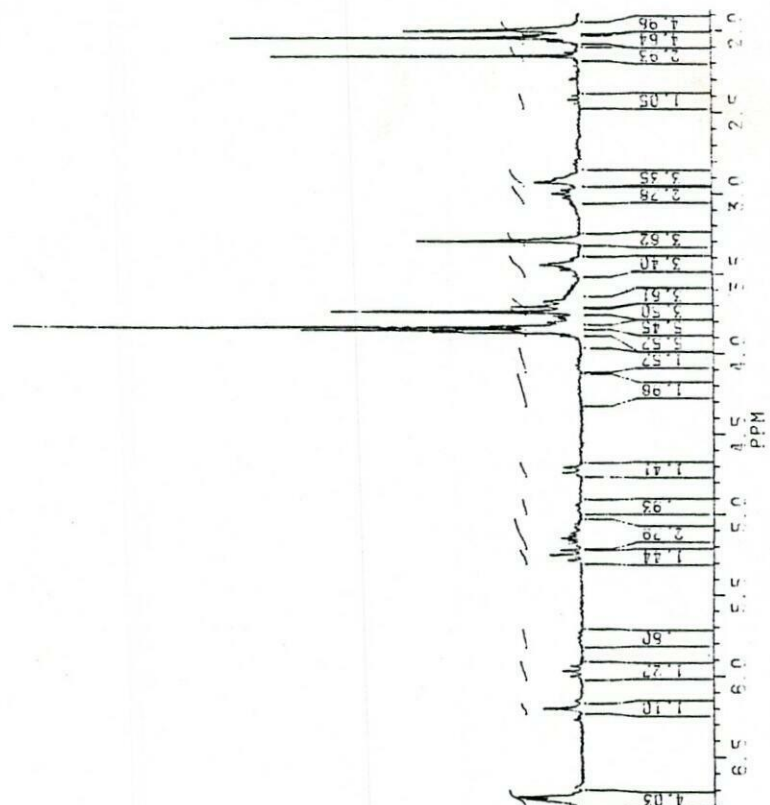
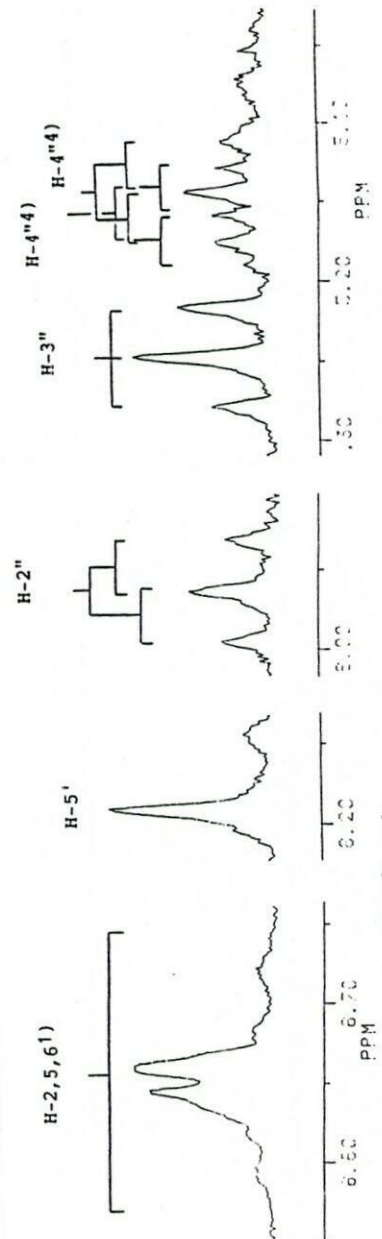
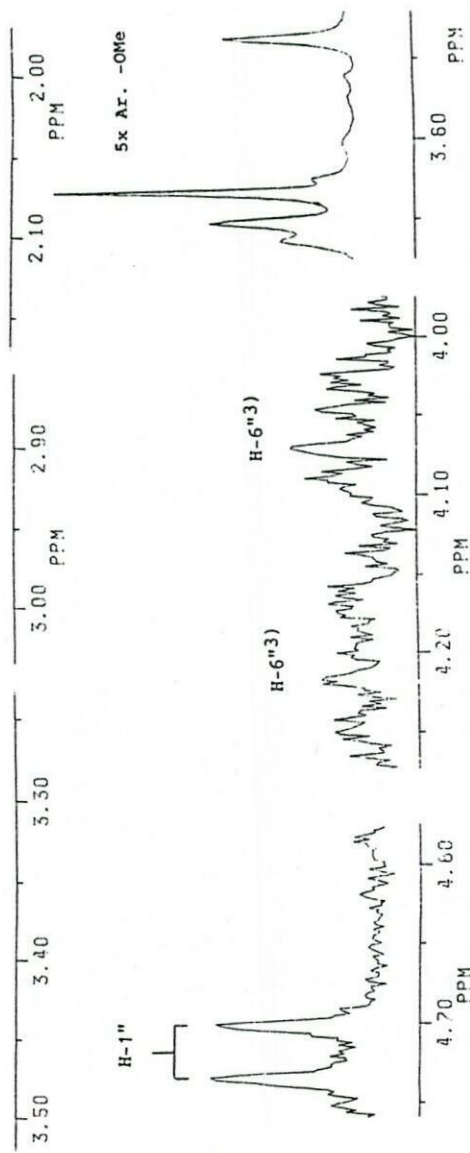
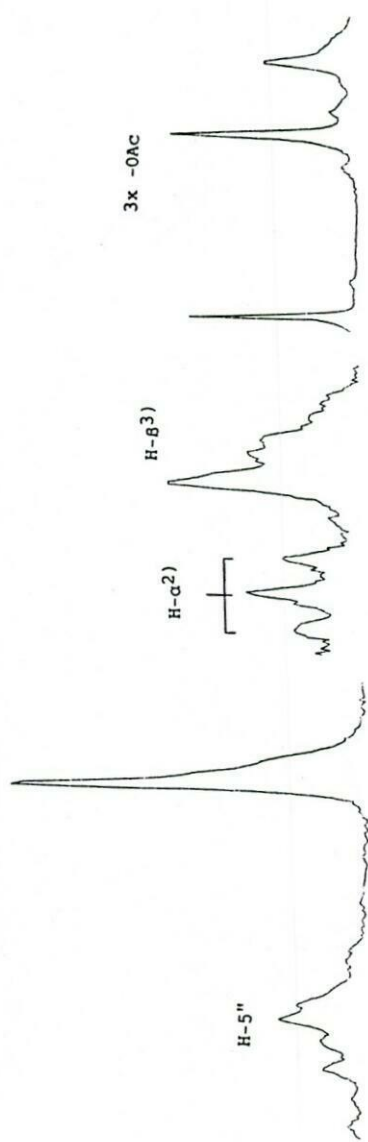
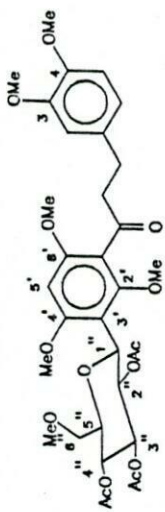


Asetoon

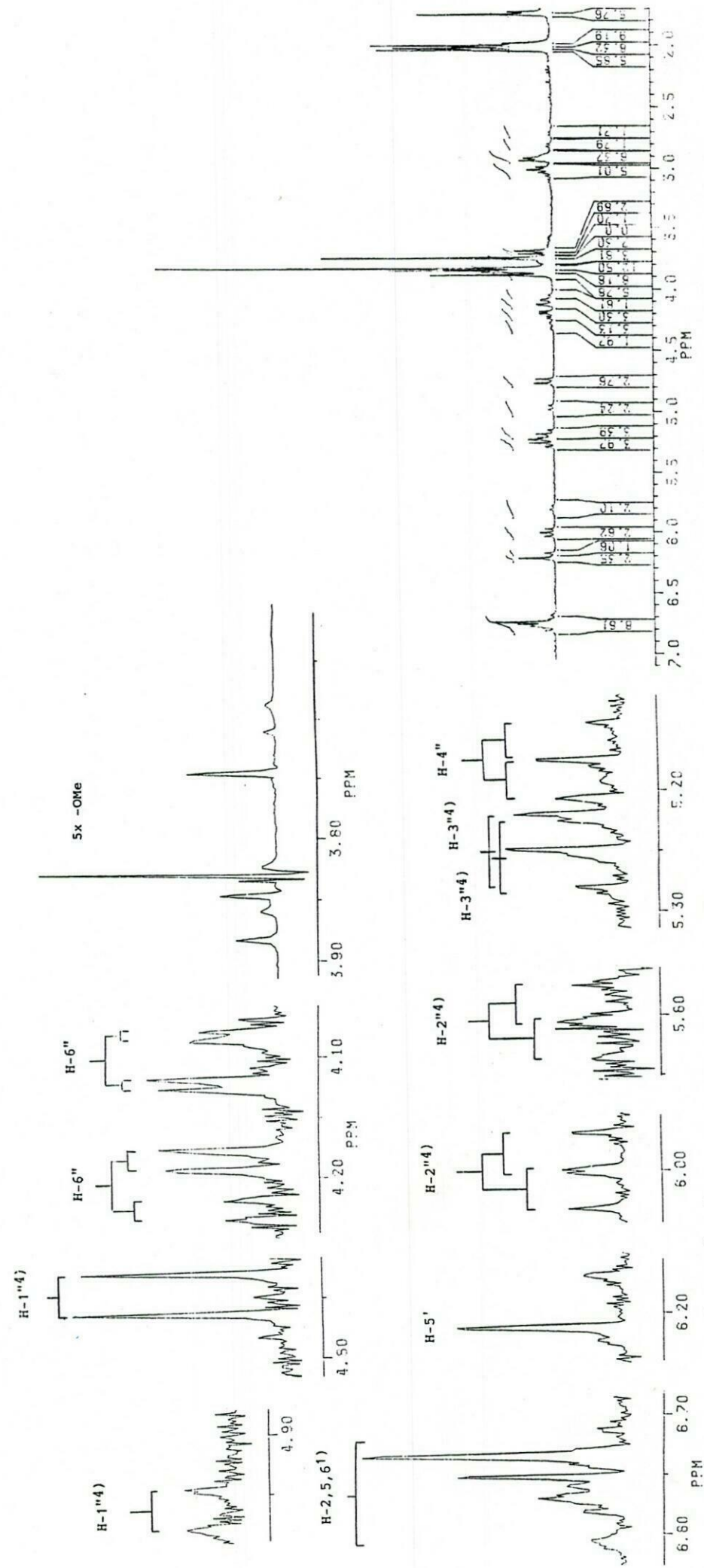
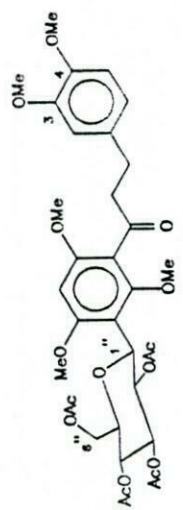
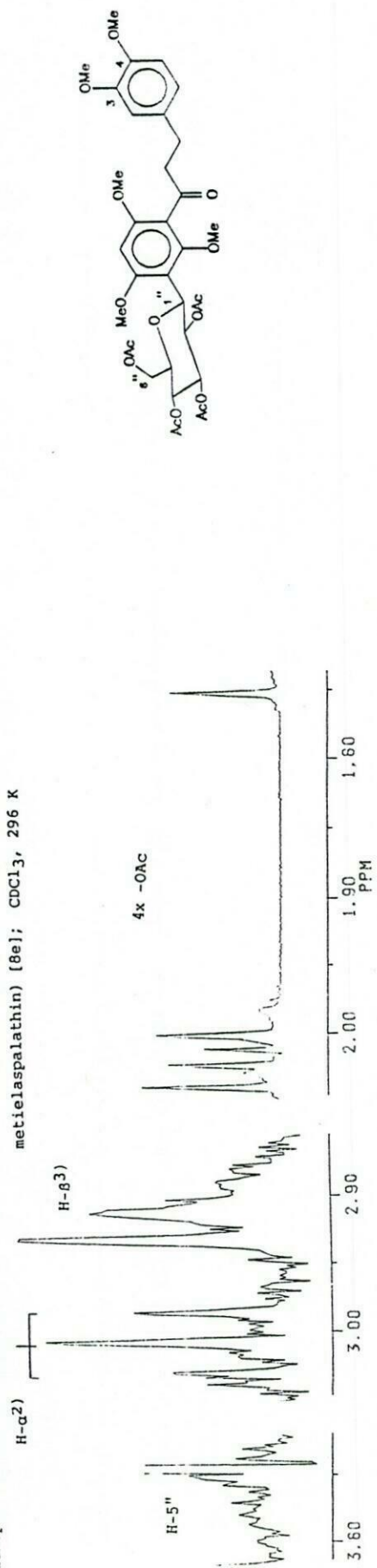


glucopiranosier/dihydroacetaldoon (2,3,4-tri-O-acetaat-2,3,4,6-O-meksa-0-
 metielaspalathin) (8d); CDCl₃, 296 K

Alif. -OMe

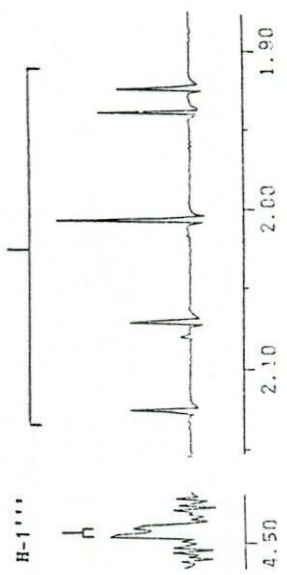
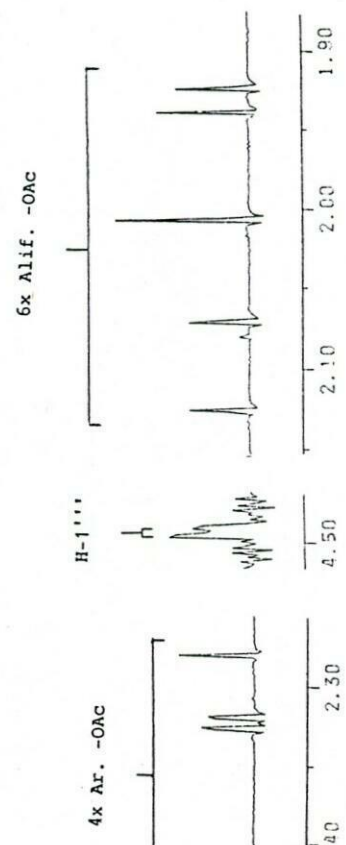
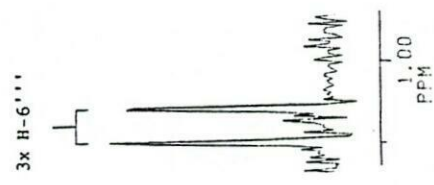
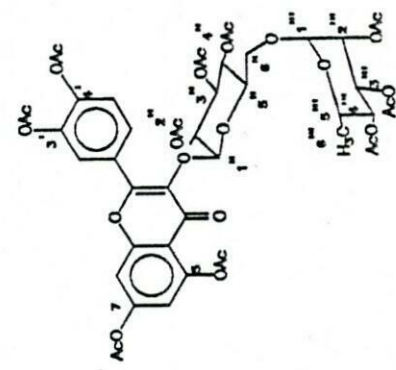


1. Tweede orde.
 2. Swak gedefinieerde triplet (of doeblot van doeblotte).
 4. Verdubbeling van seine weens dinamiese rotasie-isomerie.
 * "Stoep" spektrum weens dinamiese rotasie-isomerie.

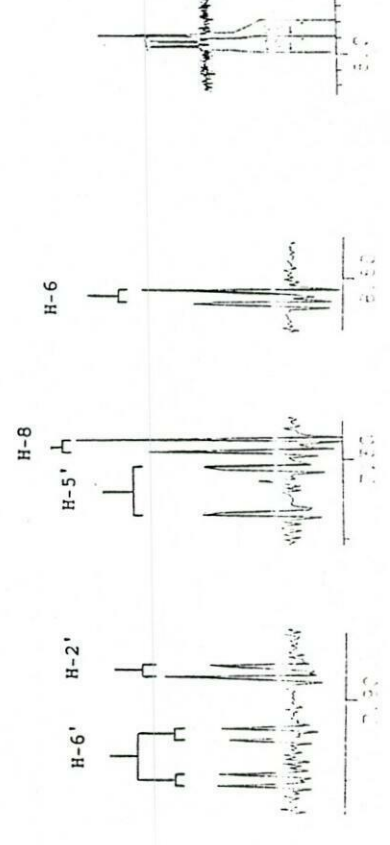
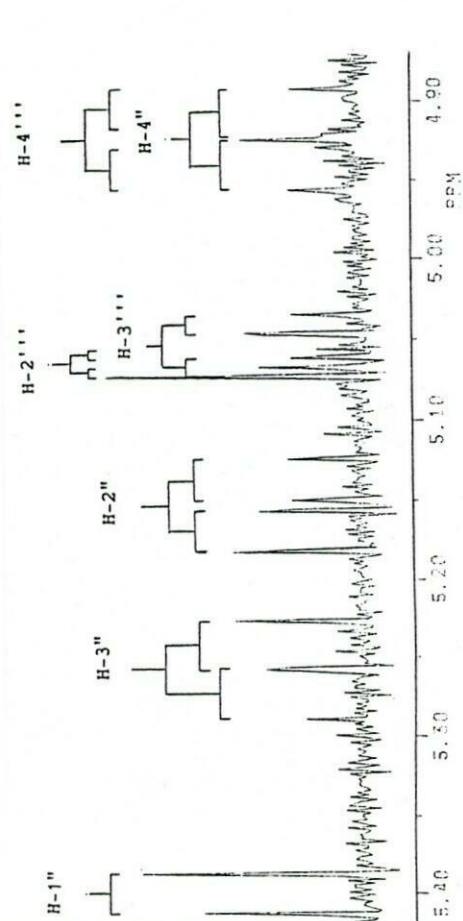


4. Verdubbeling van seine a.g.v. dynamiese rotasie-isomerie.
* "steno" spectrum vanseer dynamiese rotasie-isomerie.

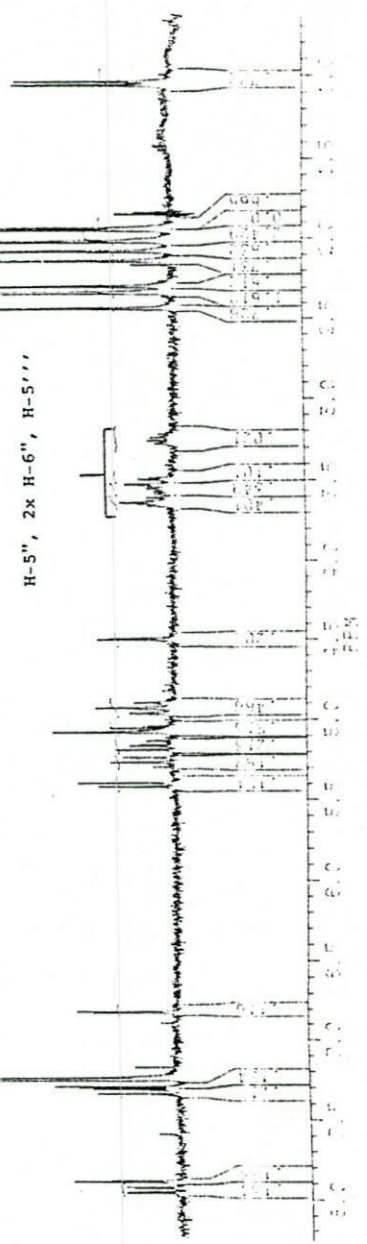
1. Tweede orde.
2. Swak gedefinieerde triplet (of doeblet van doeblette).



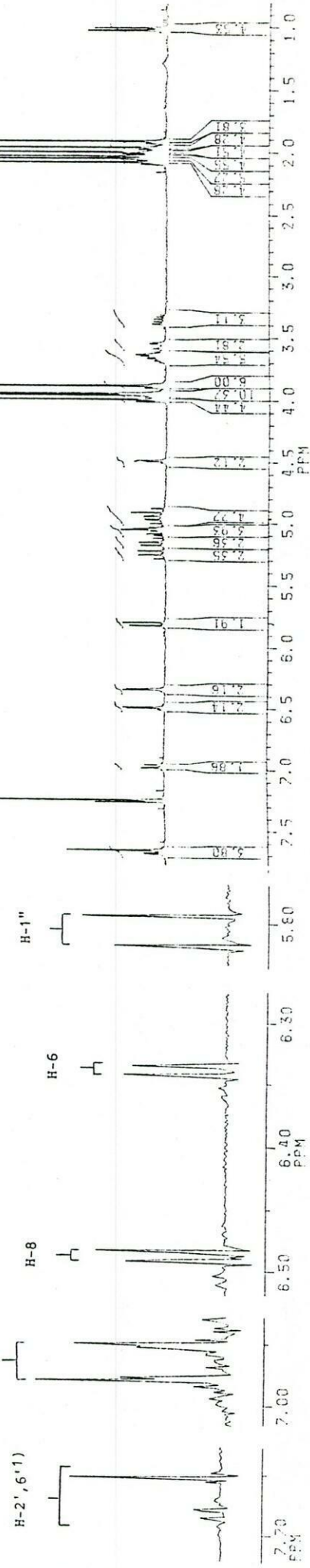
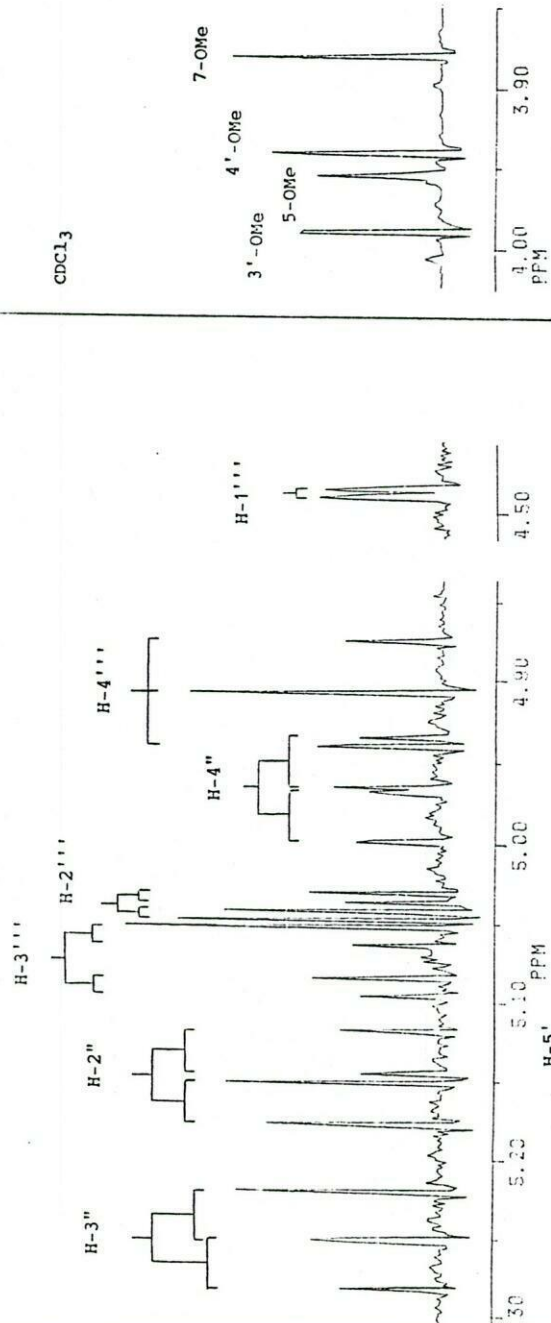
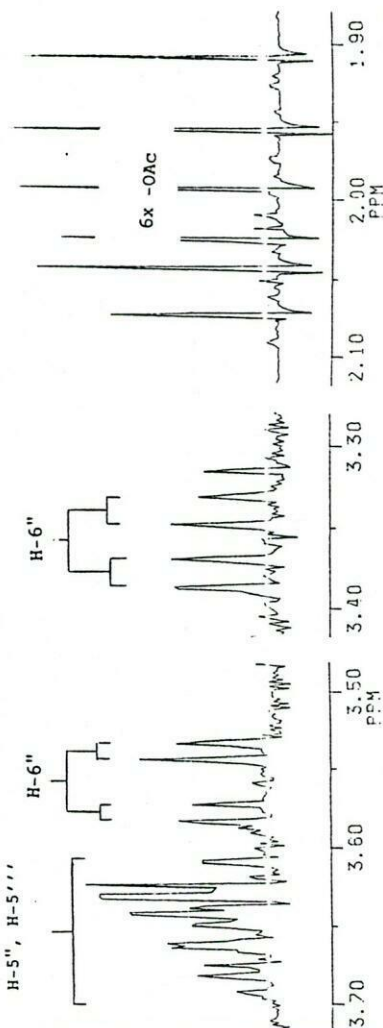
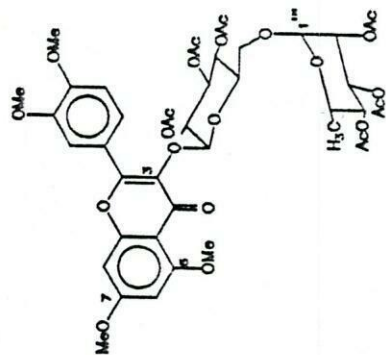
6x Alif. -OAc



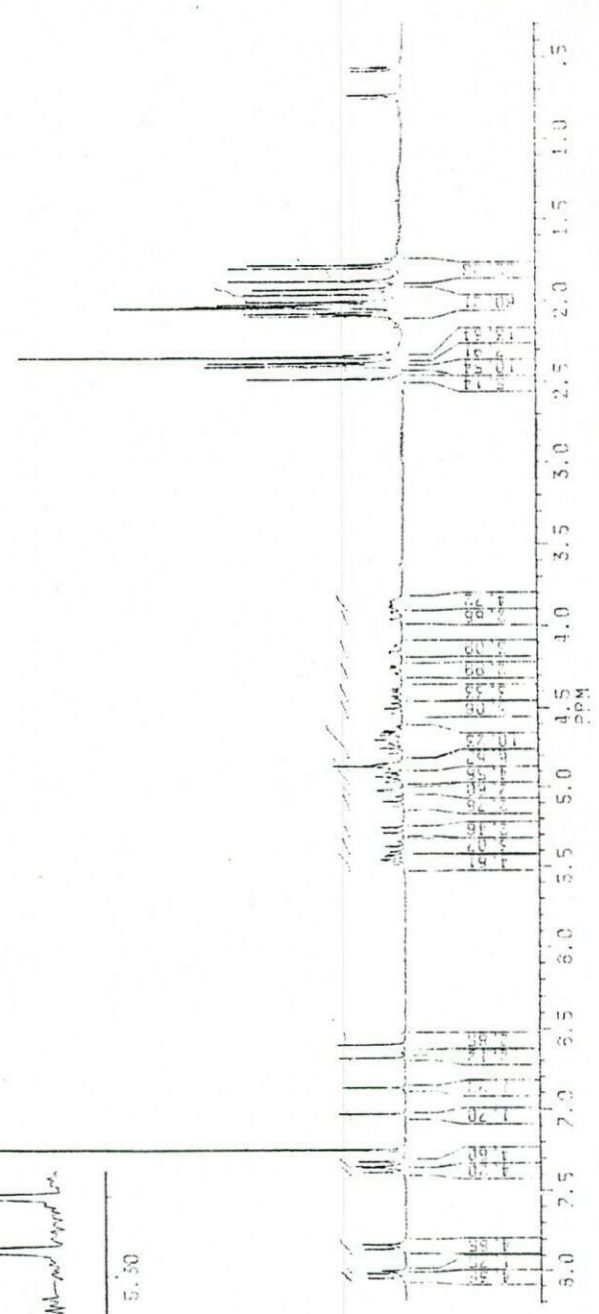
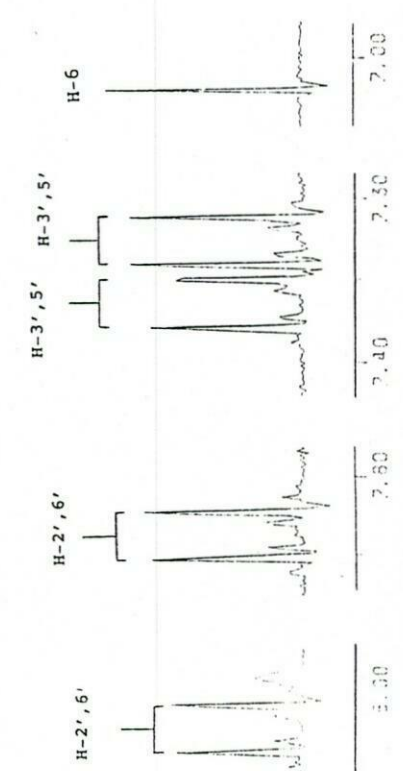
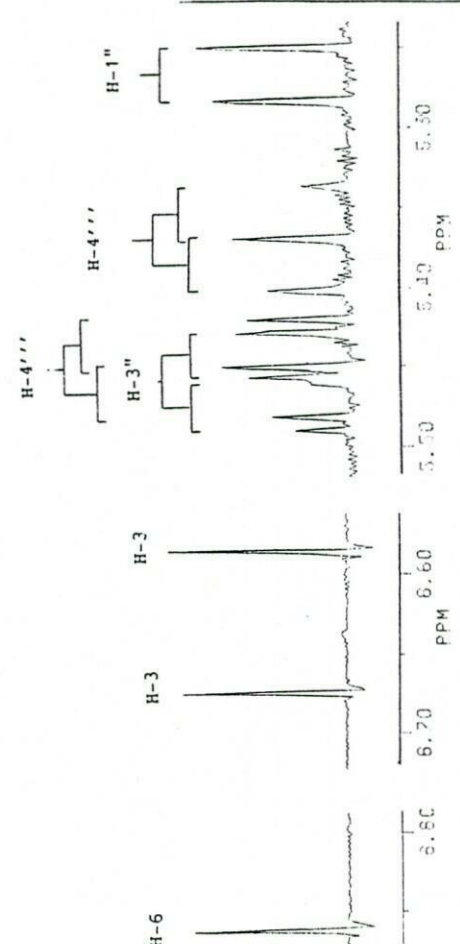
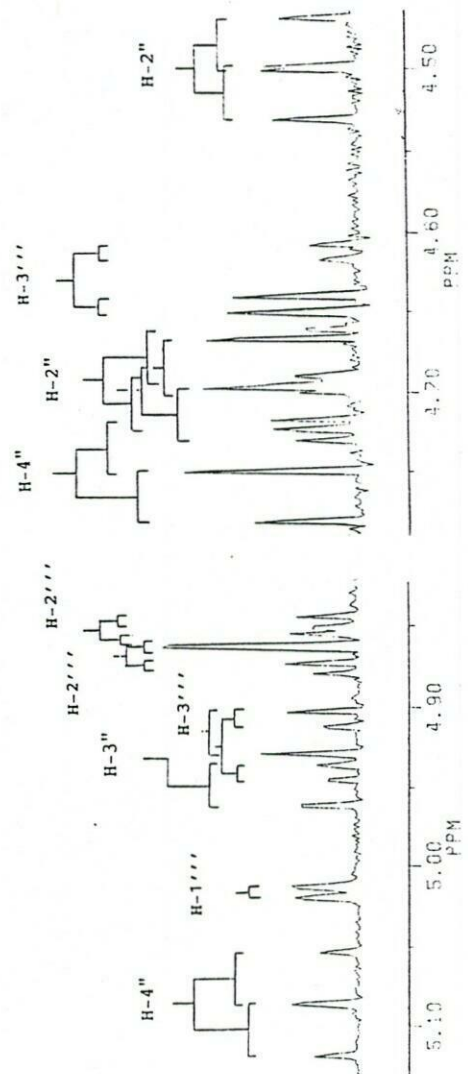
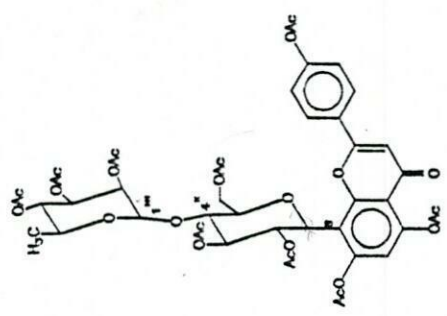
H-5'', 2x H-6'', H-5'''



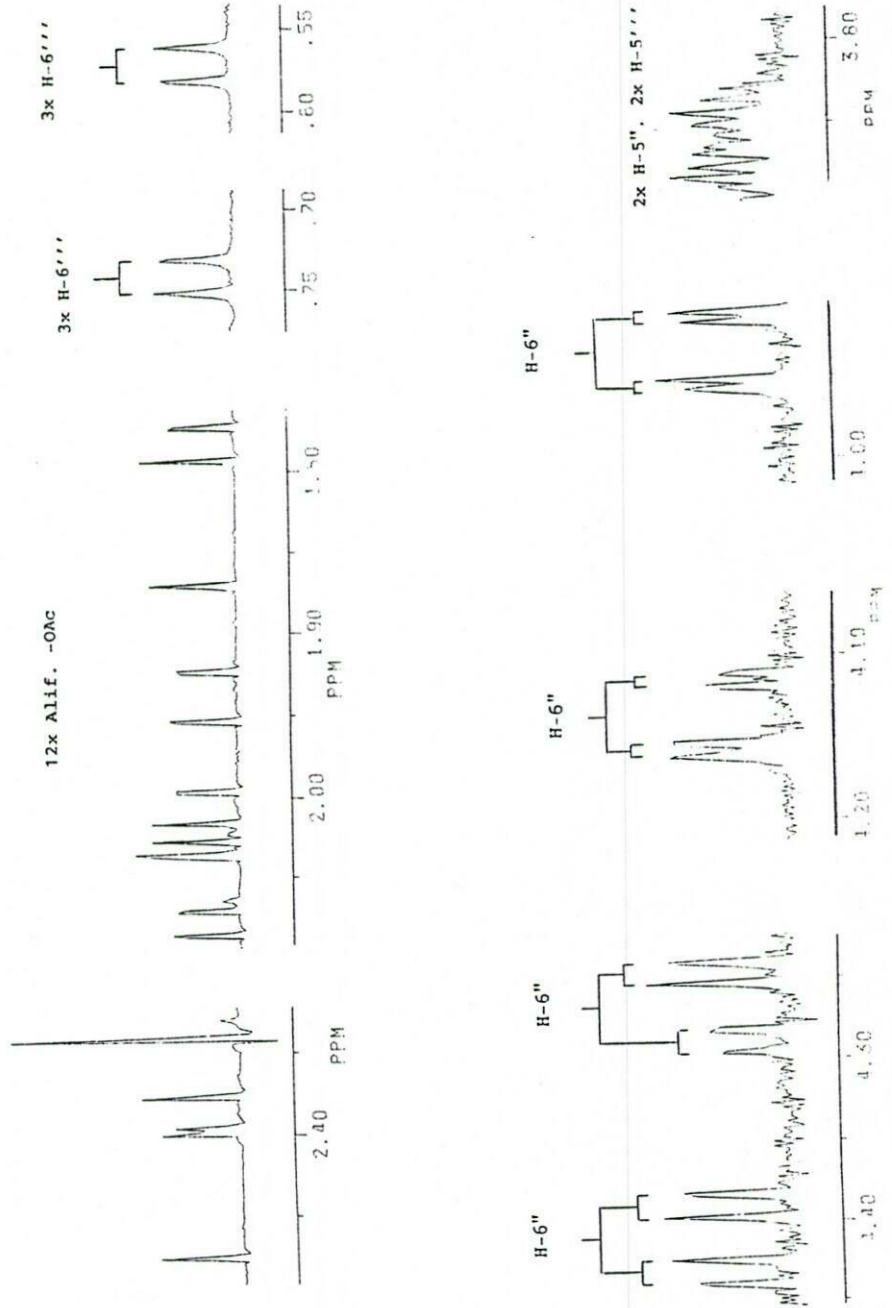
(2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4''', 4''''-heksa-O-asetiel-3', 4', 5, 7-tetra-O-metielrutin)
 [7b]; CDCl₃, 296 K

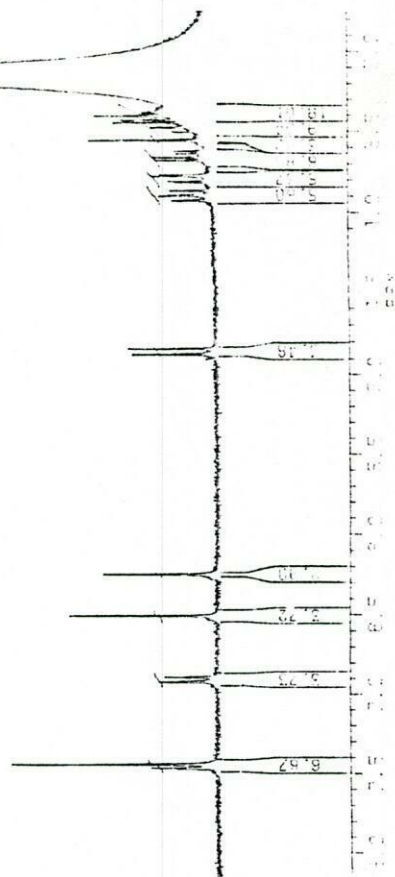
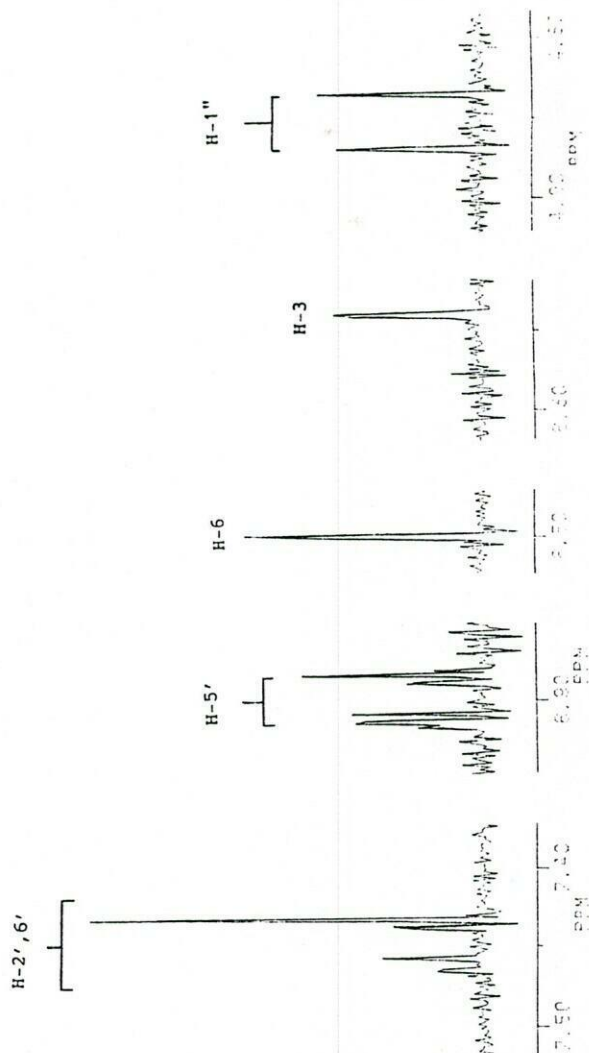
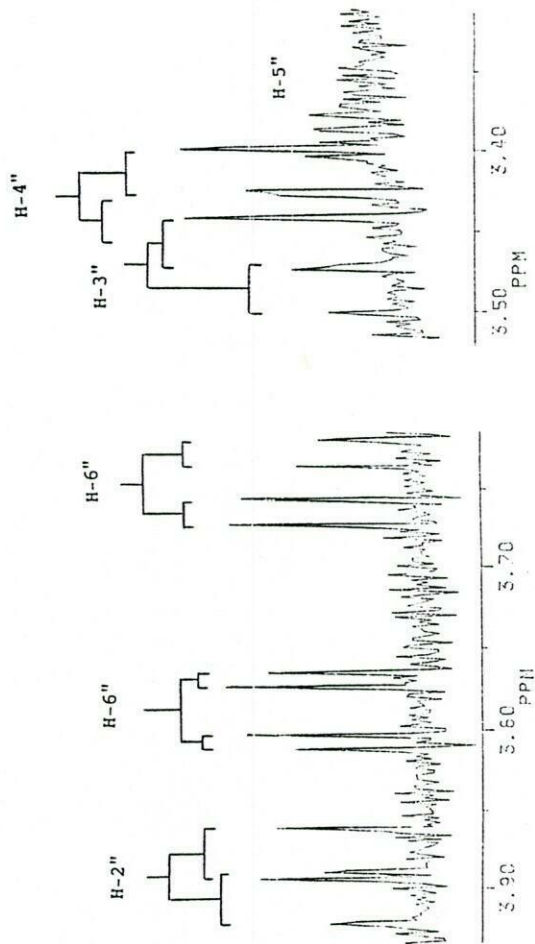
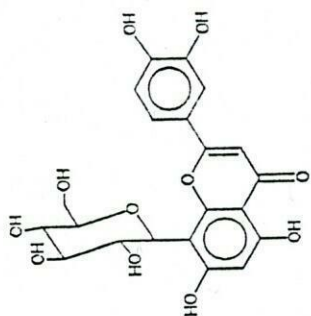


CDCl₃

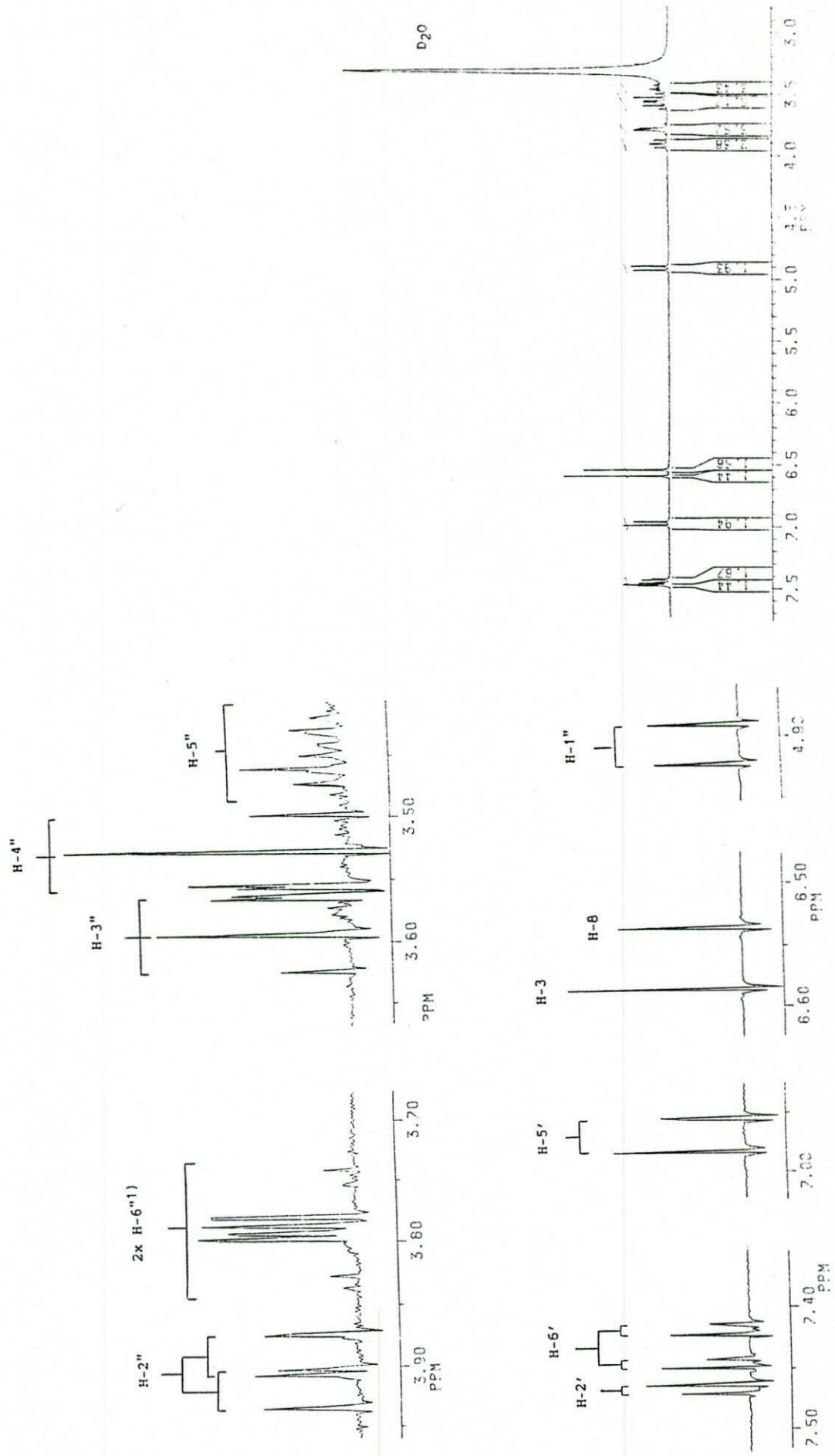
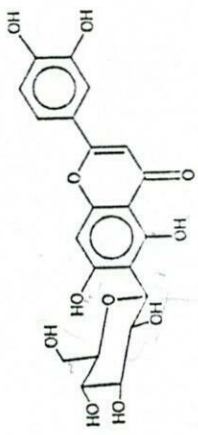


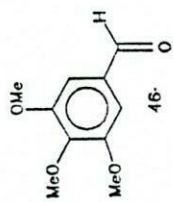
6x ALF. -OAC





[4]: Asetoon-d₆/D₂O, 296 K

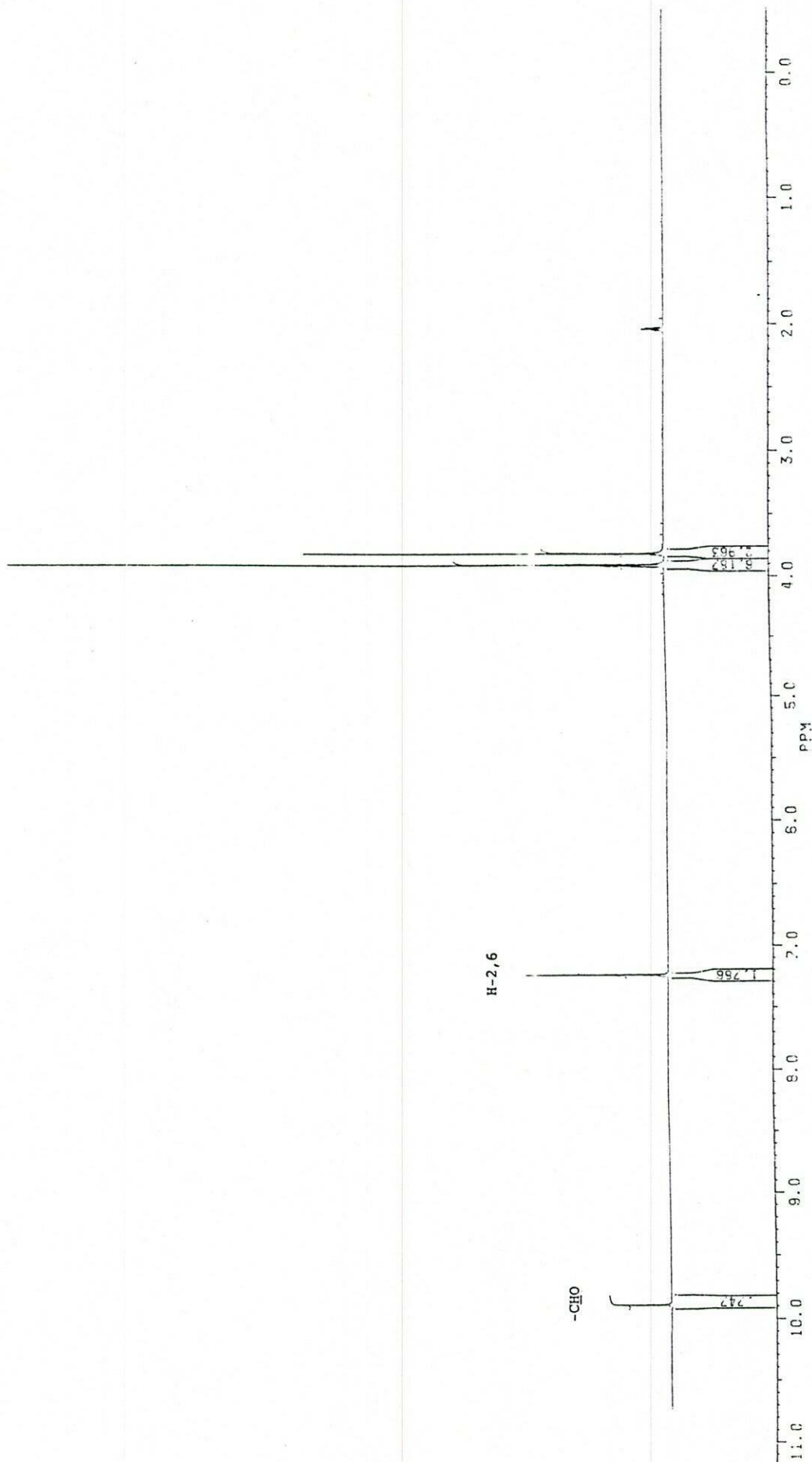


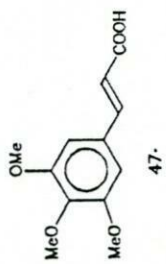


3x -OMe

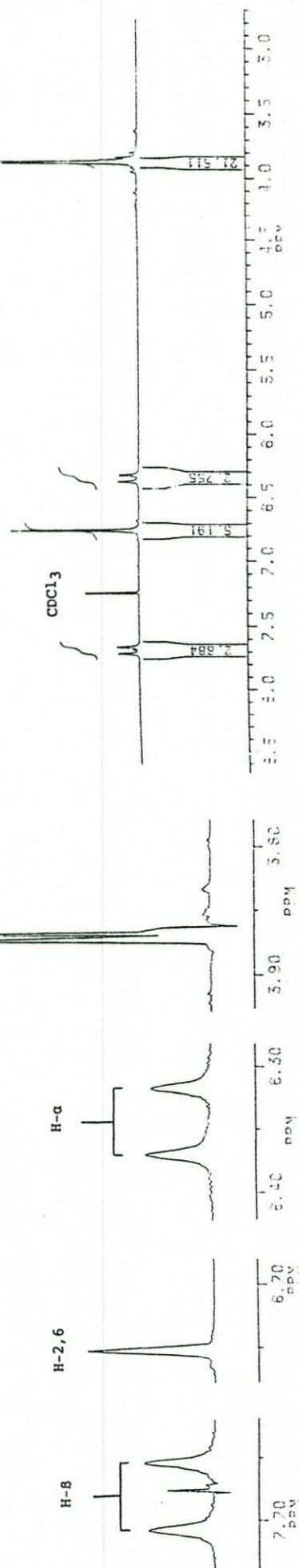
H-2,6

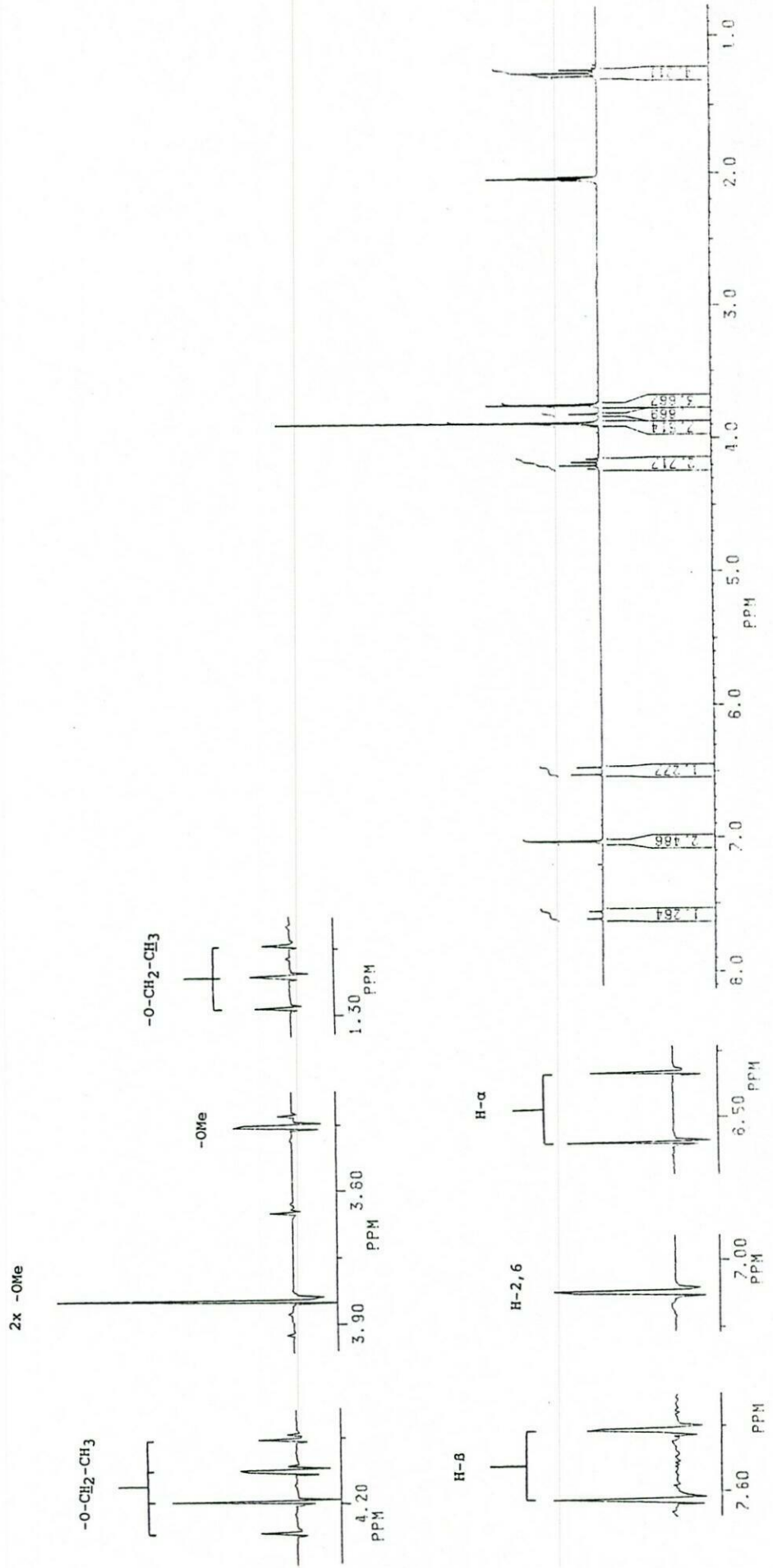
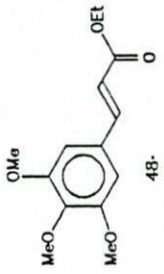
-CHO

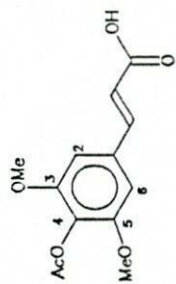




3x -OMe





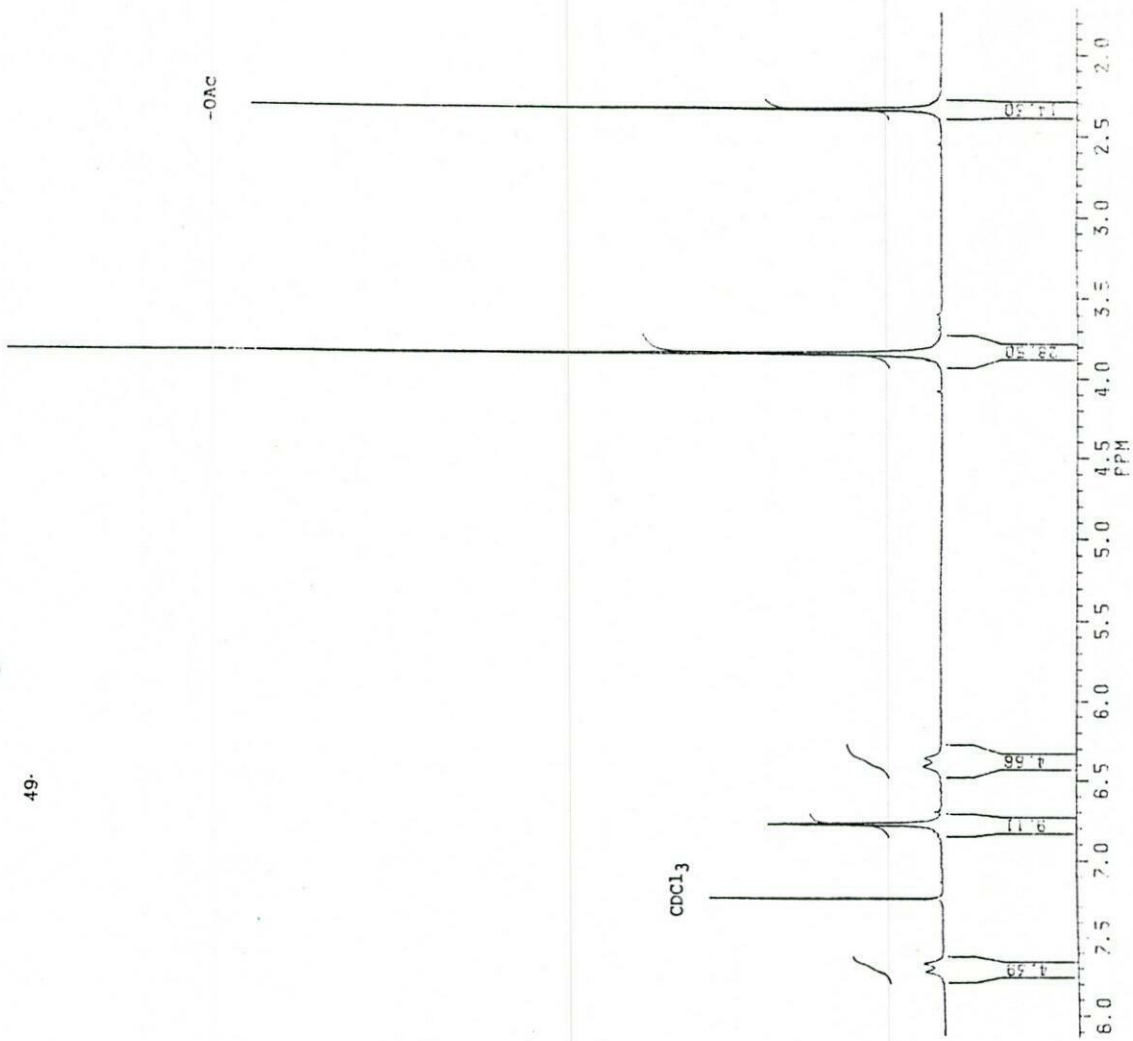
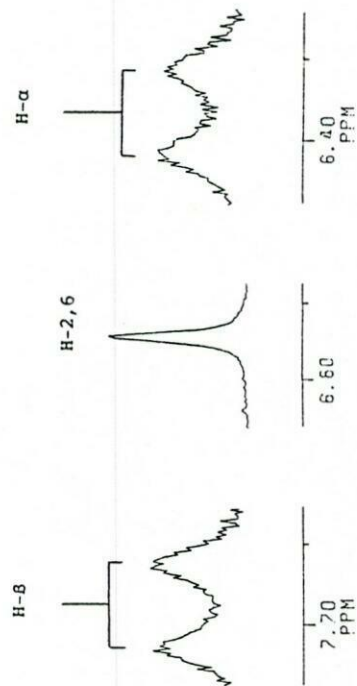


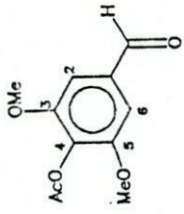
49.

2x -OMe

-OAc

CDCl₃





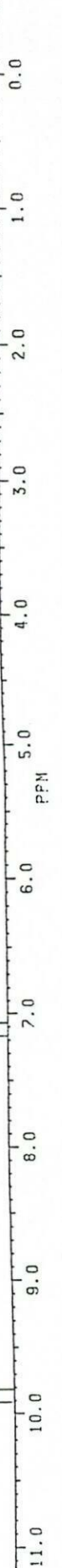
2x -OMe

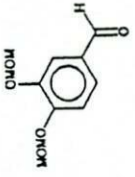
-OAc

H-2,6

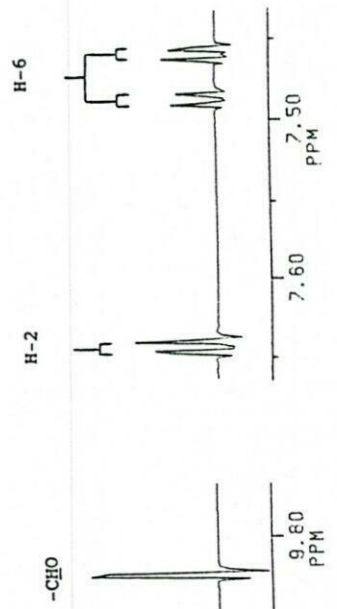
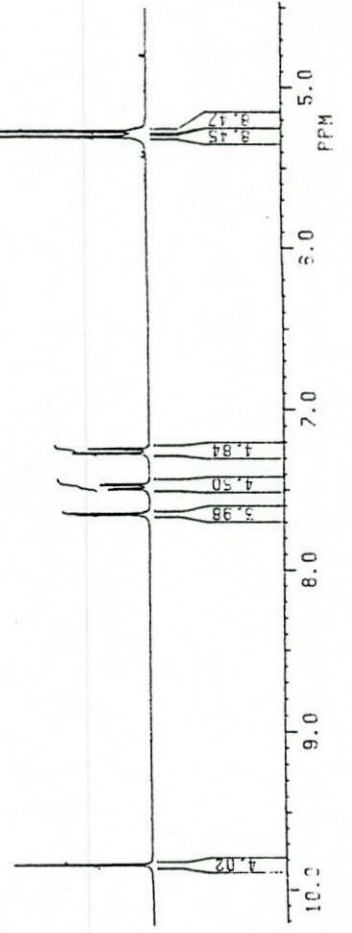
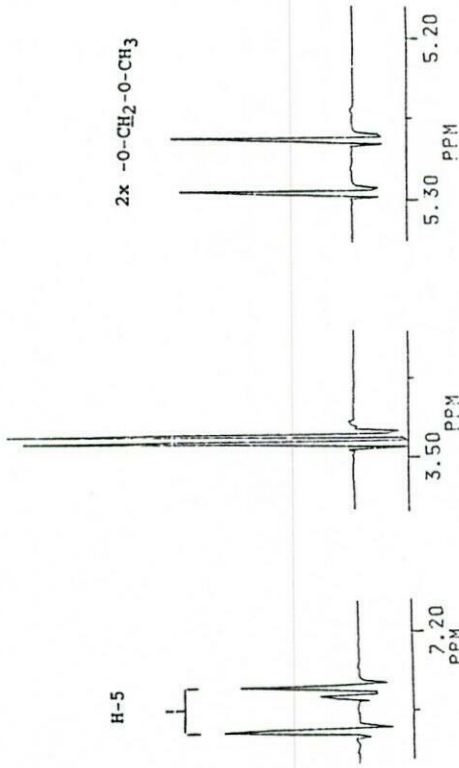
-CHO

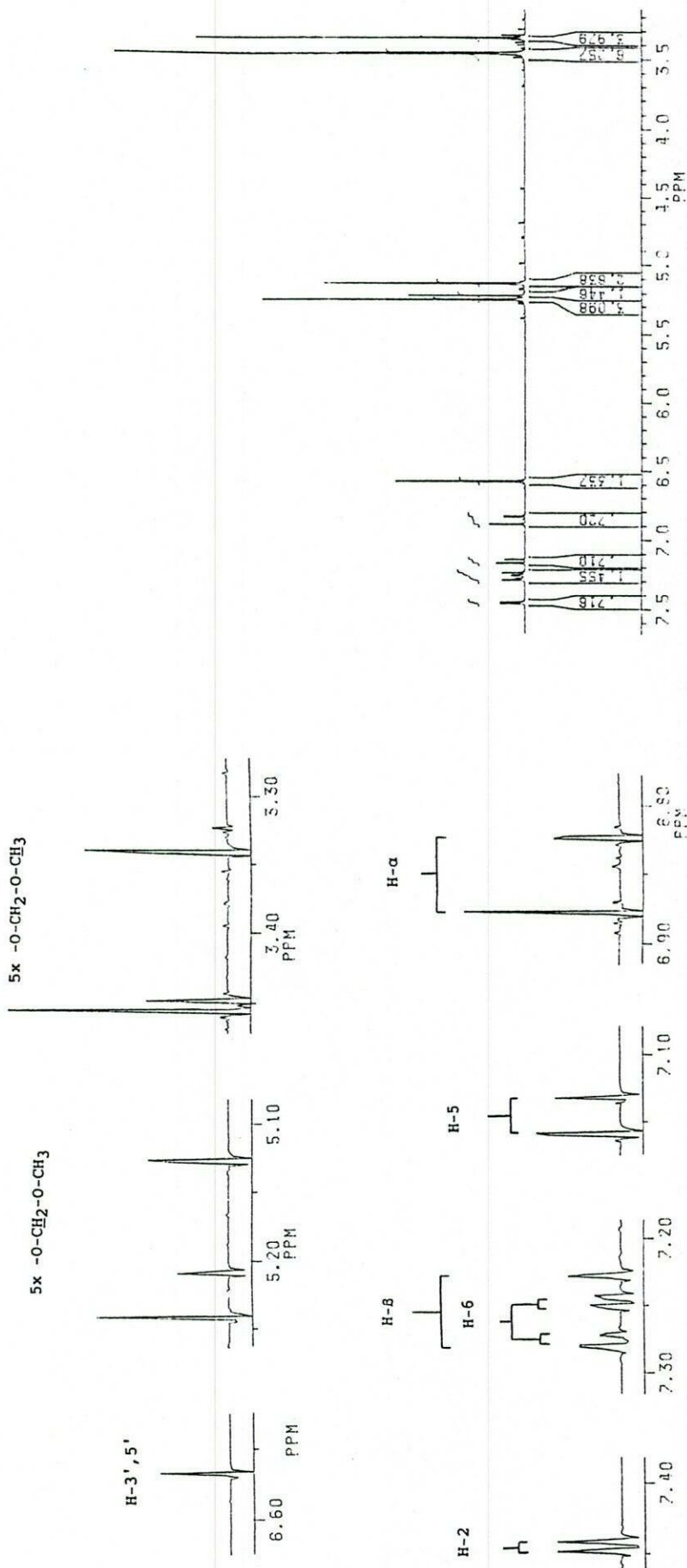
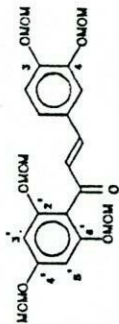
CDCl₃

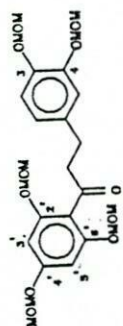




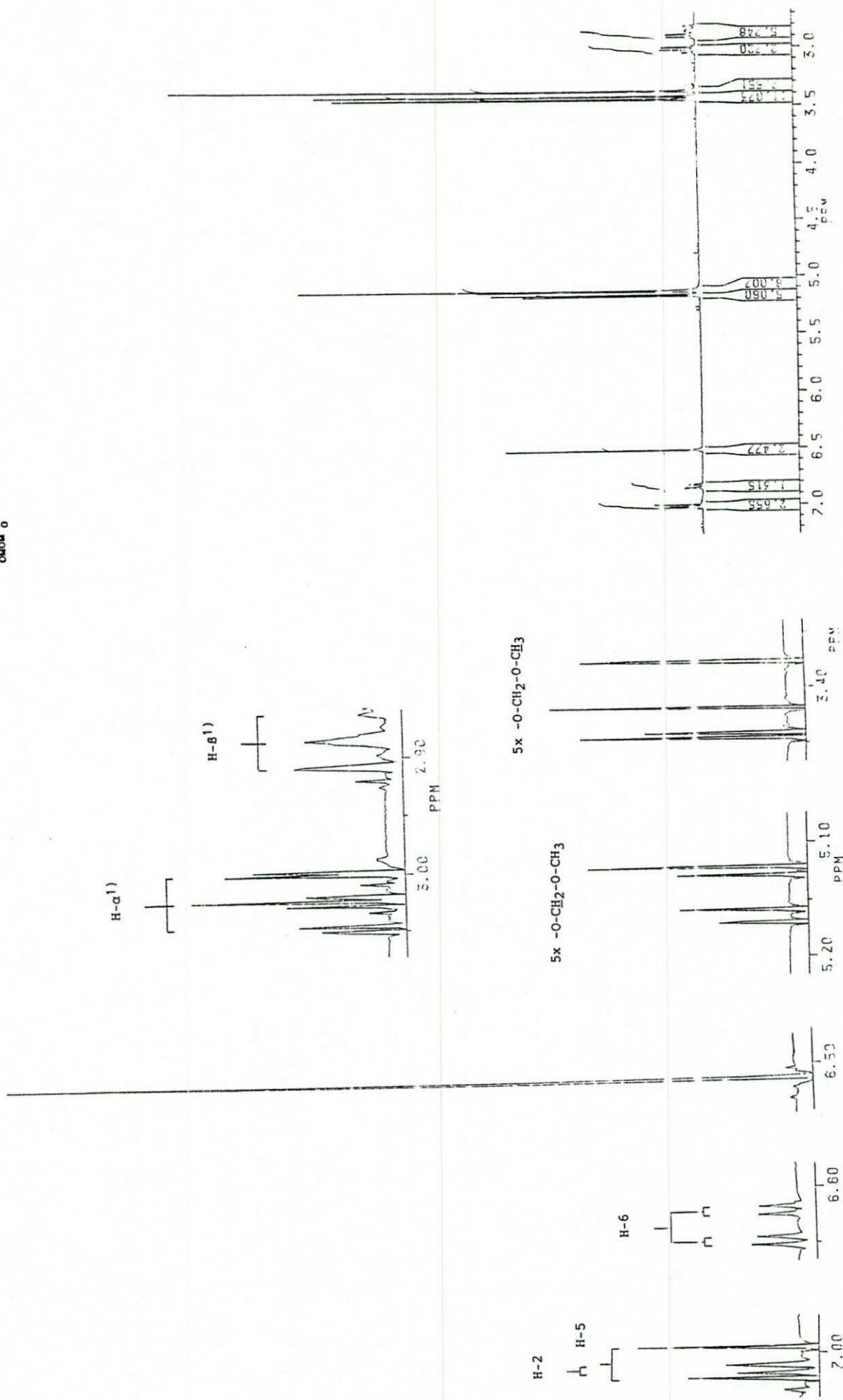
2x -O-CH₂-O-CH₃

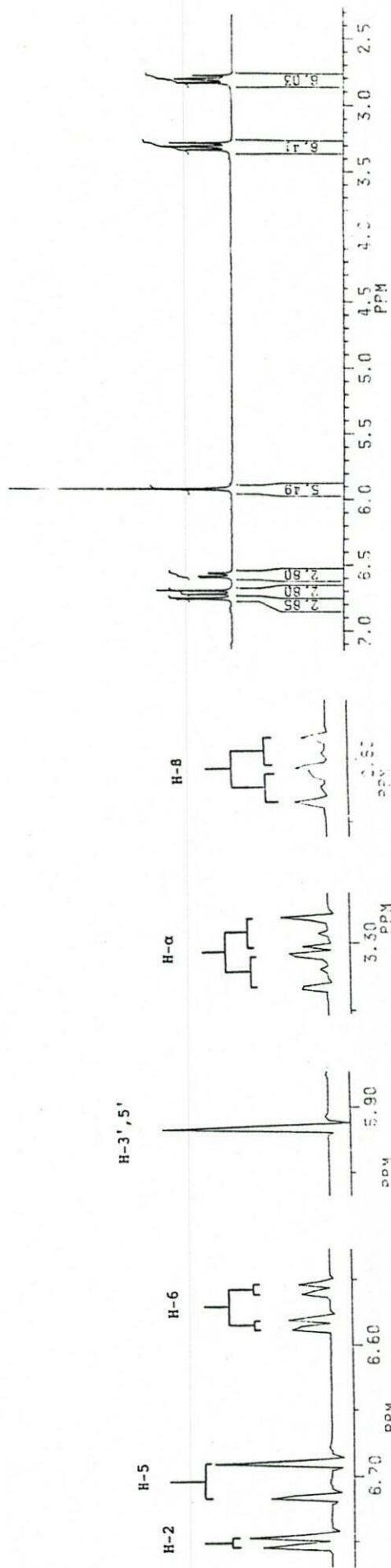
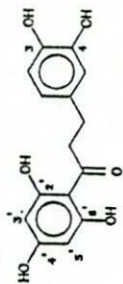


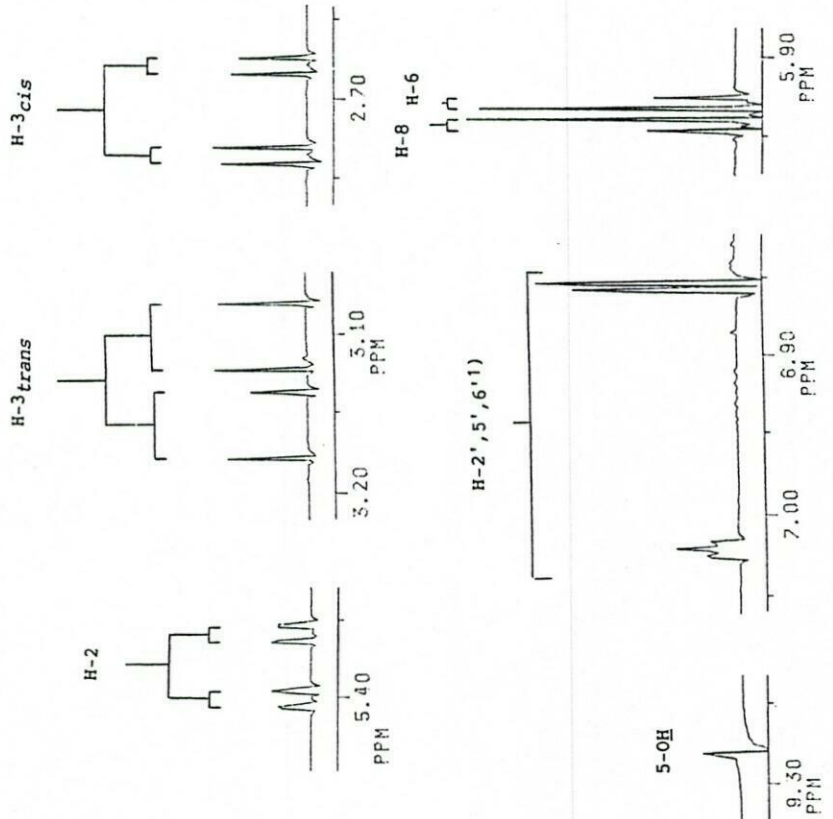
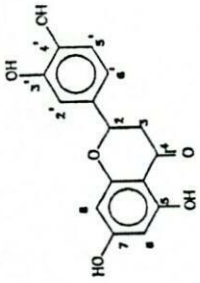




H-3', 5'







TABELLE¹⁾

1. Waar seine verdubbel is, word die multiplisiteit en J-waarde slegs een maal aangetoon. In die geval van metoksi- en asetoksigroepe word die aantal protone slegs aangedui waar 'n sein vir meer as een -OMe of -OAc integreer.

TABEL 1

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 4-hidroksi-3-metoksibensoësuur (vanillien-
ur) [34], *p*-hidroksibensoësuur [35] en 3,4-dihidroksibensoësuur [38] in
etoon-d₆ by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	34	35	38
2	7.55 (d, 2.1)		7.49 (d, 2.1)
3,5		6.89 (2H, d, 8.9)	
5	6.90 (d, 8.0)		6.89 (d, 8.1)
6	7.58 (dd, 2.1, 8.0)		7.46 (dd, 2.1, 8.1)
2,6		7.90 (2H, d, 8.9)	
-OH		3.47 (br. s)	2.92 (2H, br. s)
-COOH			8.50 (br. s)
-OMe	3.89 (s)		

TABEL 2

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 4-hidroksi-3-metoksikaneelsuur (feruliensuur) [36], 4-droksikaneelsuur (*p*-kumaarsuur) [37], 3,4-dihidroksikaneelsuur (kaffeïensuur) [39] en tiel(3,4-dimetoksi)sinnamaat [39a] by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	36 (Asetoon-d ₆)	37 (Asetoon-d ₆)	39 (Asetoon-d ₆)	39a (CDCl ₃)
2	7.33 (d, 2.1)		7.15 (d, 2.1)	7.03 (d, 2.1)
3,5		6.89 (2H, d, 9.0)		
5	6.86 (2H, d, 8.2)		8.1 (d, 8.1)	6.84 (d, 9.0)
6	7.13 (dd, 2.1, 8.2)		7.03 (dd, 2.1, 8.1)	7.09 (dd, 2.1, 9.0)
2,6		7.54 (2H, d, 9.0)		
α	6.36 (d, 16.0)	6.32 (d, 16.0)	6.25 (d, 16.1)	6.29 (d, 16.0)
β	7.58 (d, 16.0)	7.60 (d, 16.0)	7.53 (d, 16.1)	7.62 (d, 16.0)
-OH	2.92 (br. s)	2.93 (br. s)	3.00 (2H, br. s)	
-COOH	8.16 (br. s)	8.90 (br. s)	8.70 (br. s)	
OMe	3.91 (s)			3.89 (6H,s), 3.78(s)

TABEL 3

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 4',5,7-trihidroksi-3'-metoksiflavoon (chrysoeriol) [40] en 4',7-di-asetoksi-5-hidroksi-3'-metoksiflavoon (4',7-di-*β*-asetielchrysoeriol) [40a] by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	40 (Asetoon-d ₆)	40a (CDCl ₃)
2'	7.63 (d, 2.1)	7.37 (d, 2.1)
5'	7.00 (d, 8.1)	7.15 (d, 8.2)
6'	7.60 (dd, 2.1, 8.1)	7.44 (dd, 2.1, 8.2)
3	6.69 (s)	6.59 (s)
6	6.25 (d, 2.1)	6.83 (d, 2.1)
8	6.54 (d, 2.1)	7.34 (d, 2.1)
5-OH	8.44 (s)	8.50 (s)
-OMe	3.99 (s)	3.90 (s)
-OAc		2.326 (s), 2.419 (s)

TABEL 4

¹H KMR (300 MHz) pieke van 3',4',5,7-tetrahydroksiflavoon (luteolin) [2], 5-asetoksi-3',4',7-trimetoksiflavoon (5-*O*-asetiel-3',4',7-tri-*O*-metielluteolin) [2a] en 3',4',5,7-tetrametoksiflavoon (3',4',5,7-tetra-*O*-metielluteolin) [2b] by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	2 (Asetoon-d ₆)	2a (CDCl ₃)	2b (CDCl ₃)
2'	7.49 (d, 2.1)	7.29 (d, 2.1)	7.31 (d, 2.1)
5'	6.98 (d, 8.0)	6.95 (d, 9.0)	6.95 (d, 8.8)
6'	7.46 (dd, 2.1, 8.0)	7.47 (dd, 2.1, 9.0)	7.50 (dd, 2.1, 8.8)
3	6.57 (s)	6.51 (s)	6.60 (s)
6	6.23 (d, 2.1)	6.60 (d, 2.8)	6.37 (d, 2.5)
8	6.51 (d, 2.1)	6.86 (d, 2.8)	6.55 (d, 2.5)
5-OH	8.43 (s)		
-OMe		3.96, 3.89, 3.91, (almal s)	3.96, 3.95, 3.94, 3.91 (almal s)
-OAc		2.42 (s)	

TABEL 5

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 3',4',5,7-tetra-asetoksi-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel- β -D-glukopiranosieloksi)flavonol [okta-*O*-asetielisoquercetrin] [6a], 3',4',5,7-tetrahidroksiflavonol (quercetin) [1] en penta-*O*-asetielquercetin [1a] by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	6a (CDCl ₃)	1 (Asetoon-d ₆)	1a (CDCl ₃)
2'	7.95 (d, 2.1)	7.81 (d, 2.1)	7.67 (d, 2.1)
5'	7.30 (d, 8.0)	6.97 (d, 8.5)	7.33 (d, 8.5)
6'	7.91 (dd, 2.1, 8.0)	7.68 (dd, 2.1, 8.5)	7.70 (dd, 2.1, 8.5)
6	6.82 (d, 2.1)	6.24 (d, 2.1)	6.86 (d, 2.1)
8	7.28 (d, 2.1)	6.51 (d, 2.1)	7.31 (d, 2.1)
Ar. -OAc	2.43, 2.34, 2.33, 2.31 (almal s)		2.41, 2.33, 2.32, 2.31 (6H) (almal s)
Alif. -OAc	2.10, 2.00, 1.98, 1.90 (almal s)		
5-OH		9.30 (s)	
Glukose protone			
1''	5.56 (d, 7.9)		
2''	5.16 (dd, 7.9, 9.9)		
3''	5.26 (dd, 9.9, 9.0)		
4''	5.02 (dd, 9.0, 10.1)		
5''	5.58 (m)		
6''	3.99 (dd, 4.8, 12.9)		
6''	3.91 (dd, 2.5, 12.9)		

TABEL 6

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4-tri-*o*-asetiel-6-*o*-tiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [41a], 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*o*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2'',3'',4''-tri-*o*-asetiel-4',5,6'',7-tetra-*o*-tielisovitexin [41a], 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*o*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2'',3'',4'',6''-tetra-*o*-asetiel-4',5,7-tri-*o*-metielisovitexin [41b] 4',5,7-trimetoksi-8-(2,3,4,6-tetra-*o*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)flavoon [2'',3'',4'',6''-tetra-*o*-asetiel-4',5,7-tri-*o*-metielvitexin] [42a] by 296 K [Multiplisiteit en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	41a (CDCl ₃)	41b (CDCl ₃)	42a (CDCl ₃)
6',5'	7.80 (d, 9.0) 6.99 (d, 9.0) 6.56 (s) 6.73 (s)	7.80 (d, 9.0) 6.99 (d, 9.0) 6.57 (s) 6.76 (s)	7.98, 7.75 (d, 8.9) 7.12, 7.07 (d, 8.9) 6.59, 6.55 (s)
r. -OMe	3.97, 3.88, 3.87 (almal s)	3.99, 3.89, 3.85 (almal s)	6.38, 6.33 (s) 4.00, 3.98, (6H), 3.95, 3.90, 3.89 (almal s)
lif. -OMe	3.30 (s)		
OAc	1.74, 2.51, 2.01 (almal s)	2.51, 2.48, 2.01 1.75 (almal s)	2.08 (6H), 2.03, 2.025, 1.96, 1.91, 1.70, 1.68, (almal s)
glukose rotone			
"	5.07 (d, 10.1)	5.10 (d, 10.1)	5.22, 5.24, 5.25 (d, 10.1)
"	5.97 (dd, 10.1, 9.4)	6.01 (dd, 10.1, 9.4)	5.99, 5.87 (dd, 10.1, 9.2)
"	5.31 (t, 9.4)	5.32 (t, 9.4)	5.39, 5.36 (t, 9.2)
"	5.18 (dd, 5.8, 11.1)	5.18 (dd, 9.4, 10.2)	5.51 (dd, 9.2, 10.0)
"	3.78 (m)	3.83 (m)	3.85 (m)
"	3.50 (dd, 5.8, 11.1)	4.20 (dd, 5.5, 12.8)	
"	3.44 (dd, 2.8, 11.1)	4.12 (dd, 2.8, 12.8)	4.12 - 4.33 ¹

TABEL 7¹

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 3',4',5,7-tetrahydroksi-6-β-D-glukopiranosiel-avanon (2,3-dihidro-iso-orientin) [44A] en okta-β-asetiel-2,3-dihidro-iso-orientin [44Aa] [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies].

Proton	44A (Asetoon-d ₆ /D ₂ O)	44Aa (CDCl ₃)	44Aa (Asetoon-d ₆) ²
3',6'	6.97 ³		
4',5',6'	6.77 - 6.82 ³	7.31 - 7.20 ⁴	7.55, 7.53, (d, 2.2) 7.32 (2H, d, 8.5) 7.66, 7.50 (dd, 2.2, 8.5)
5	5.33, 5.31 (dd, 3.0, 12.8)	5.46, 5.45 (dd, 3.1, 13.1)	
trans	3.10 (2H, 12.8, 17.5)	2.99, 2.97 (dd, 13.1, 17.0)	
cis	2.70, 2.68 (dd, 3.0, 17.5)	2.81, 2.77 (dd, 3.1, 17.0)	
-OH	5.95 (s)	6.81, 6.80 (s)	6.854, 6.84 (s)
r. -OAc	7.90 (br. s)		
lif. -OAc		2.42, 2.40, 2.37 (6H) 2.26 (12H) (almaal s) 2.34 (18H), 1.81, 1.80 (almaal s)	
glukose			
rotone			
"	4.75 (d, 10.0)	4.74, 4.71 (d, 10.0)	
"	4.00, 3.99 (dd, 10.0, 8.9)	5.63 (2H, 10.0, 9.1)	
"	3.54, 3.49 (t, 8.9)	5.25, 5.24 (dd, 9.1, 10.0)	
"	3.54, 3.50 (dd, 8.9, 9.9)	5.13, (2H, dd, 10.0, 9.0)	
"	3.37 (m)	3.74 (m)	
"	3.75, 3.70 ⁴	4.33, 4.32 (dd, 5.2, 12.8)	
"		4.03, 4.02 (dd, 2.8, 12.8)	

verdubbeling van seine a.g.v. dinamiese rotasie-isomerie
die heterosikliese gebied is in CDCl₃ volledig geanaliseer
tweede orde

Multiplisiteit nie-toekenbaar

Wens 'n defekte SD-apparaat kon die optiese rotasie van verbindings [44A] en [44Aa]
nie bepaal word nie

TABEL 8¹

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'- β -D-glukopiranosiedi-
drochalkoon (aspalathin) [8], 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosiedi-
drochalkoon [8a], nona-*o*-asetielaspalathin [8b] en deka-*o*-asetielaspalathin [8c]
multiplisiteit en J-waardes (Hz) in hakies]

proton	8 (Asetoon-d ₆) 296 K	8 en 8a (Asetoon- d ₆ , D ₂ O) 296 K	8b (CDCl ₃) 353 K	8b en 8c (CDCl ₃) 353 K
5,6 5,6,5' : Keto : Enol : Keto : Enol OAc	6.74 (d, 2.1) 6.71 (d, 8.0) 6.57 (dd, 2.1, 8.0) 5.91 (s) 3.31 (2H, t, 8.0) ³ 2.81 (2H, t, 8.0) ³	6.72 (d, 2.1) 6.68 (d, 7.9) 6.53 (dd, 2.1, 7.9) 5.94 (s) 3.26 (2H, t, 8.0) ³ 2.76 (2H, t, 8.0) ³	7.01-7.07 ² 3.05 (2H) ⁴ 2.93 (2H) ⁴ 1.77-2.33 (almal s, 9x - OAc)	6.94 (s) 7.02-7.12 ² 3.05 (4H, t, 7.4) ³ 5.51 (t, 8.0) 2.96, 2.92 (2H, t, 7.4) ³ 3.38 (2H, d, 8.0) 1.76-2.34 (almal s, 19x - OAc)

erdubbeling van seine a.g.v. dinamiese rotasie-isomerie.

weede orde

wak gedefinieerde triplet (of doeblet van doeblette)

multiplisiteit nie-toekenbaar

TABEL 9

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-(2,3,4-tri-*l*-asetiel-6-*l*-metiel- β -D-glukopiranosiel)dihydrochalkoon (2'',3'',4''-tri-*l*-asetiel-2',3,4,4',6',6''-heksa-*l*-metielaspalathin) [8d] en 2',3,4,4',6'-pentametoksi-3'-(2,3,4,6-tetra-*l*-asetiel- β -D-glukopiranosiel)dihydrochalkoon (2'',3'',4'',6''-tetra-*l*-asetiel-2',3,4,4',6'-penta-*l*-metielaspalathin) [8e] in CDCl₃ by 296 K [Multiplisiteit en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	8d ¹	8e
2,5,6	6.66 ²	6.72-6.81 ²
5'	6.19 (s)	6.21 (s)
α	3.00 (t, 7.2) ³	3.01 (t, 7.2) ³
β	2.91 ⁴	2.91 ⁴
-OMe	3.30, 3.87, 3.86, 3.84, 3.74, 3.62 (almal s)	3.63, 3.75, 3.83 (6H), 3.85, 3.88 (almal s)
-OAc	2.16, 2.04, 2.00 (almal s)	2.04, 2.02, 2.01, 2.00 (almal s)
Glukose protone		
1''	4.72 (d, 10.2)	4.75, 4.96 (d, 10.2) ⁵
2''	5.60 (dd, 10.2, 9.0)	6.00, 5.81 (dd, 10.2, 9.0) ⁵
3''	5.25 (t, 9.0)	5.25, 5.26 (t, 9.0) ⁵
4''	5.16, 5.14 (dd, 9.0 10.2) ⁵	5.17 (dd, 9.0, 10.0)
5''	3.45 (m)	3.75 (m)
6''	4.20 ⁴	4.21 (dd, 5.0, 12.5)
6''	4.15 ⁴	4.10 (dd, 2.3, 12.5)

¹"Stomp" spektrum weens dinamiese rotasie-isomerie

²Tweede orde

³Swak gedefinieerde triplet (of doeplet van doebllette)

⁴Multiplisiteit nie-toekenbaar

⁵Verdubbeling van seine weens dinamiese rotasie-isomerie

TABEL 10

KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 3',4',5,7-tetra-asetoksi-3-[2,3,4-tri-*O*-asetiel-6-*O*-3,4-tri-*O*-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosieloksi]flavonol [deka-*O*-tielrutin] [7a], 3',4',5,7-tetrametoksi-3-[2,3,4-tri-*O*-asetiel-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-asetiel-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosieloksi]flavonol (2'',2''',3'',3''',4'',4'''-heksa-*O*-tiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metielrutin) [7b], 5-asetoksi-3',4',7-trimetoksi-3-[2,3,4-tri-*O*-tiel-6-(2,3,4-tri-*O*-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosieloksi]flavonol (2'',2''',3'',3''',4'',4''',5-hepta-*O*-asetiel-3',4',7-tri-*O*-metielrutin) [7c] en 4',5,7-tri-*O*-metoksi-8-[2,3,6-tri-*O*-asetiel-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-asetiel- α -L-rhamnopyranosiel)- β -D-glukopyranosiel]flavon [45a]

oton	7a	7b	7c	45a
6', 5'	7.88 (d, 2.1) 7.32 (d, 8.9) 7.94 (dd, 2.1, 8.9)	6.96 (d, 9.1) 7.67 ¹	7.59 (d, 2.1) 6.97 (d, 8.8) 7.65 (dd, 2.1, 8.8)	8.03, 7.84 (d, 9.0) 7.36, 7.33 (d, 9.0) 7.02, 6.86 (s)
Ac	6.81 (d, 2.1) 7.30 (d, 2.1)	6.34 (d, 2.8) 6.49 (d, 2.8)	6.58 (d, 2.5) 6.80 (d, 2.5)	6.68, 6.59 (s) 2.48, 2.40, 2.395, 2.38, 2.34 (6H), 2.09, 2.07, 2.06, 2.04, 2.03, 2.015, 2.00, 1.95, 1.92, 1.87, 1.80, 1.78, (almal s)
Me	2.42, 2.33, 2.32, 2.28, 2.08, 2.07, 2.01 (6H), 1.94, 1.92, (almal s)	2.08, 2.05, 2.03, 1.99, 1.96, 1.91 (almal s)	2.07, 2.06, 2.03, 2.01, 1.95, 1.92, (almal s)	
iker otone		3.99, 3.95, 3.94, 3.88 (almal s)	3.97, 3.93, 3.88, (almal s)	
	5.40 (d, 7.8) 5.15 (dd, 7.8, 9.8)	5.81 (d, 7.8) 5.15 (dd, 7.8, 9.8)	5.62 (d, 8.0) 5.13 (dd, 8.0, 9.8)	5.27 (d, 10.0) 4.70, 4.69 (dd, 10.0, 8.6)
	5.26 (dd, 9.8, 9.3)	5.25 (dd, 9.8, 9.9)	5.29 (t, 9.8)	4.93, 5.46 (dd, 8.6, 10.2)
	4.92 (dd, 9.3, 10.0)	4.96 (dd, 9.9 10.0) 3.56 (dd, 2.8, 11.5) 3.36 (dd, 5.1, 11.5)	4.98 (dd, 9.8 9.5) 3.30-3.39 ²	5.09, 4.75 (dd, 10.2, 9.5) 4.41, 4.23 (dd, 4.2 12.9) 4.14, 3.93 (dd, 2.0, 12.9)
6'', 6'', , 5''''	3.17-3.73		3.54-3.67	
		3.61-3.69 ²		3.91-3.81 ²
	1.04 (d, 6.2)	1.01 (d, 6.8)	1.01 (d, 6.8)	0.74, 0.57 (d, 6.2)
	4.92 (dd, 7.8, 11.8)	4.91 (t, 9.9)	4.92 (dd, 8.4, 9.5)	5.45, 5.37 (dd, 10.2, 9.4)
	5.05 (dd, 3.2, 7.8)	5.52 (dd, 3.2, 9.9)	5.53 (dd, 3.2, 8.4)	4.925, 4.63 (dd, 10.2, 3.2)
	5.07 (dd, 1.8, 3.2)	5.49 (dd, 2.0, 3.2)	5.52 (dd, 2.0, 3.2)	4.87, 4.855 (dd, 2.1, 3.2)
	4.49 (d, 1.8)	4.49 (d, 2.0)	4.49 (d, 2.0)	5.02 (d, 2.1)

eeede orde.

ltipilisiteit nie-toekenbaar.

TABEL 11

¹H KMR pieke (300 MHz) in d.p.m. van 3',4',5,7-tetrahidroksi-8-β-D-glukopiranosielflavoon (orientin) [3] en 3',4',5,7-tetrahidroksi-8-β-D-glukopiranosielflavoon (iso-orientin) [4] [Multiplisiteite en J-waardes in hakies].

Proton	³ DMSO-d ₆ , 393 K	⁴ Asetoon, D ₂ O, 296 K
3	6.24 (s)	6.59 (s)
6	6.50 (s)	
8		6.54 (s)
2'		7.47 (d, 2.2)
5'	6.90 (d, 8.9)	6.97 (d, 8.1)
6		7.43 (dd, 2.2, 8.1)
2', 6'	7.45 ¹	
Glukose protone		
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)	
6''	3.65 (dd, 11.5, 5.0)	
2x H-6''		3.79 ²

¹Tweede orde.

²Multiplisiteit nie-toekenbaar.

TABEL 12

KMR pieke (d.p.m.) van 3,4,5-trimetoksibensaldehyd [46], 3,4,5-trimetoksikaneelsuur [47], etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [43] en etiel(3,4,5-trimetoksi)sinnamaat [48] by 296 K. Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	46 (Asetoon-d ₆)	47 (CDCl ₃)	43 (CDCl ₃)	43 (Asetoon-d ₆)	48 (Asetoon-d ₆)
6 CHO	7.24 (2H,s) 9.90 (s)	6.75 (2H, s)	6.73 (2H, s)	7.02 (2H, s)	7.02 (2H, s)
O-CH ₂ -CH ₃		6.34 (d, 16.1) 7.68 (d, 16.1)	6.33 (d, 16.0) 7.59 (d, 16.0)	6.50 (d, 16.0) 7.58 (d, 16.0)	6.49 (d, 16.0) 7.58 (d, 16.0)
O-CH ₂ -CH ₃					4.18 (k, 7.1) 1.27 (t, 7.1)
OMe	3.92 (6H), 3.83 (almal s)	3.87 (9H, s)	3.87 (6H), 3.86 3.79 (almal s)	3.88 (6H), 3.75 3.73 (almal s)	3.88 (6H), 3.75 (almal s)

TABEL 13

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 4-asetoksi-3,4-dimetoksi-bensaldehyd [50] en 4-asetoksi-3,4-dimetoksikaneelsuur (4-*O*-asetielsinapiensuur) [49] in CDCl₃ by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	49	50
2, 6	6.77 (2H, s)	7.13 (2H, s)
α	6.38 (d, 16.0)	
β	7.69 (d, 16.0)	
-CHO		9.82 (s)
-OMe	3.83 (6H, s)	3.86 (6H, s)
-OAc	2.34 (s)	2.33 (s)

TABEL 14

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van 3,4-dimetoksimetiëlbensaldehyd [52] en 2,4,6-trimetoksimetiëlasetofenoon [51] in CDCl₃ by 296 K [Multiplisiteit en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	52	51
3, 5		6.52 (2H, s)
2	7.64 (d, 2.0)	
5	7.25 (d, 9.0)	
6	7.48 (dd, 2.0, 9.0)	
-O-CH ₂ -O-CH ₃	5.29, 5.26 (s)	5.14 (6H, s)
-O-CH ₂ -O-CH ₃	3.49, 3.48 (s)	3.40 (6H, s)
-CH ₃		2.47 (s)
-CHO	9.82 (s)	

TABEL 15

¹H KMR (300 MHz) pieke (d.p.m.) van *trans*-2',3,4,4',6'-pentametoksimetielchalkoon [53], 2',3,4,4',5'-pentametoksimetieeldihydrochalkoon [54], 2',3,4,4',6'-pentahidroksidihydrochalkoon (3-hidroksifloretin) [55] en 3',4',5,7-tetrahydroksiflavanoon (eriodictyol) [56] by 296 K [Multiplisiteite en J-waardes (Hz) in hakies]

Proton	53 (Asetoon-d ₆)	54 (Asetoon-d ₆)	55 (Asetoon-d ₆)	Proton	56 (Asetoon-d ₆)
2	7.45 (d, 2.2)	7.02 (d, 2.1)	6.75 (d, 2.2)	2'	
5	7.15 (d, 8.1)	7.01 (d, 8.2)	6.71 (d, 8.2)	5'	
6	7.26 (dd, 2.2, 8.1)	6.83 (dd, 2.1, 8.2)	6.57 (dd, 2.2, 8.2)	6'	
3', 5'	6.57 (2H, s)	6.51 (2H, s)	5.92 (2H, s)	2', 5', 6'	7.02-6.85 ¹
α	6.85 (d, 16.1)	3.02 (2H, t, 7.2) ²	3.31 (dd, 6.5, 9.0)	6	5.93 (d, 2.1)
β	7.26 (d, 16.1)	2.89 (2H, t, 7.2) ²	2.81 (dd, 6.5, 9.0)	8	5.94 (d, 2.1)
-O-CH ₂ -O-CH ₃	5.24 (4H), 5.21,	5.17, 5.16, 5.13,		2	3.38 (dd, 3.0, 13.0)
	5.13 (4H) (almaal s)	5.12 (2H) (almaal s)		3 ^{trans}	3.13 (dd, 13.0, 17.3)
-O-CH ₂ -O-CH ₃	3.45 (6H), 3.40	3.44 (6H), 3.42,		3 ^{cis}	2.71 (dd, 13.0, 17.3)
	3.34 (6H) (almaal s)	3.37 (6H) (almaal s)		5-OH	9.28 (s)

¹Tweede orde.

²Swak gedefinieerde triplet (of doeblet van doeblette)

Samebatting

SAMEVATTING

'n Onderzoek na die chemiese samestelling van rooibos, 'n unieke produk van Suid-Afrika, is geloods met die oog op verwerkingsprosesaanpassings en wetenskaplike grond vir rooibos se alombekende gesondheidseienskappe.

Vorige ondersoeke het tot die isolasie van slegs sewe fenoliese verbindings gelei. Die huidige ondersoek het 'n belangrike addisionele bydrae tot die kennis van die samestelling van die metaboliese poel van rooibos gelewer. Verskeie bensoë- en kaneelsure, flavone, flavonole, flavonolglikosiese, C-glikosidiese flavone, dihidrochalkone en 'n C-glikosidiese flavanone is geïsoleer. 'n Duidelike biosintetiese verband kan tussen hierdie tipes verbindings afgelei word en kan as basis dien vir voorspellings van verbindings moontlik teenwoordig in rooibos. Drie klasse verbindings, nl. die bensoë- en kaneelsure, asook die flavanone, is vir die eerste keer uit rooibos geïsoleer.

Aanpassings tot die klassieke derivatiseringsmetodes was nodig om skeiding en struktuuropklarings van verskeie verbindings moontlik te maak, terwyl n.O.e-eksperimente op elegante wyse aangewend is om die strukture van verskeie verbindings te bewys. 'n N.O.e-assosiasie van die twee H-6"-protone van glukose met H-1'" van rhamnose het byvoorbeeld in die geval van 2",2'",3",3'",4",4'"-heksa-*O*-asetiel-3',4',5,7-tetra-*O*-metielrutin (7b) die (C-1'"')-*O*-(C-6'')-interglikosiedbinding bevestig, terwyl n.O.e-assosiasie ook op 'n 1,3-diaksiale interaksie tussen H-1", H-3" en H-5" van glukose in beide 4',5,7-trimetoksi-6-(2,3,4,6-tetra-*O*-asetiel-β-D-glukopiranosiel)flavoon (41b) en iso-orientin (4) gedui en die piranosiedvorm van glukose in hierdie verbindings bevestig het.

Vergelyking van resultate uit hierdie ondersoek met dié in die literatuur, het dit moontlik gemaak om 'n empiriese reël vir die onderskeid tussen O- en C-gebonde β -D-glukopiranoses daar te stel, nl. $^3J_{\text{HH}} = 7-8$ Hz tussen H-1" en H-2" van glukose vir O- glukosiede en 9.9-10.2 Hz vir C-glukosiede.

Gevalle is ook gevind waar die 6-OH van glukose met diasmetaan gemetileer het (par. 9.7 en 9.11.3). Hierdie verskynsel is buitengewoon aangesien diasmetaan gewoonlik selektief vir fenoliese hidroksigroepe is.

'n Nuwe flavonoïed, 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'- α -D-glukopiranosiel-dihydrochalkoon (8a) van buitengewone akademiese belang is geïsoleer. Hierdie verbinding behoort nie alleen tot 'n klas flavonoïede wat relatief skaars in die natuur is nie, maar is ook een van die min C-glikosidiese flavonoïede met 'n α -glukopiranosielsubstituent.

Dit is ook gevind dat 2',3,4,4',6'-pentahidroksi-3'- β -D-glukopiranosieldihydrochalkoon (aspalathin) (8) tydens asetilering volgens die standaardmetode ge-enoliseer het om nie net die verwagte nona-O-asetienderivaat (8b) nie, maar ook die deka-O-asetienderivaat van die enoltoutomeer (8c) te lewer. Hierdie unieke verskynsel is totaal onbekend aan flavonoïedchemie.

Verskeie verbindings is gesintetiseer om strukture te bevestig. 2',3,4,4',6'-Pentahidroksichalkoon (3-hidroksifloretin) (55) is vir die eerste maal gesintetiseer. Drastiese afwykings van konvensionele hidrolisemetodes vir die verwydering van beskermende metoksimetielgroepe in die geval van *trans*-2',3,4,4',6'-pentametoksimetielchalkoon (53) en 2',3,4,4',6'-pentametoksimetioldihydrochalkoon (54) het die unieke reaktiwiteit van hierdie

verbindings en hulle analoë in rooibos bevestig.

Derwysings

VERWYSINGS

1. Morton, J.F., *Economic Botany*, 1983, **37**,164-173.
2. Dahlgren, R., *Bot. Notiser*, 1968, **121**,165-208.
3. Stassen, P.J.C., *Aspalathus linearis* (Rooibostee): Die invloed van oespraktyke op sekere vegetatiewe en fisiologiese aspekte, D.Sc. (Agric.)-tesis; UOVS, 1987, p. 1-8.
4. Joubert, E., Tuinbougewasse, invloed van fisiese veranderlikes tydens fermentasie en droging op die kwaliteit van rooibostee, faset VV 24111/52/3/1, 1990, p. 1-7.
5. Du Plessis, H.J. en Roos, I.M.M., *Phytophylactica*, 1986, **18**, 177-181.
6. Holzapfel, W.H. en Niemand, J.G., Proceedings of SAFFOST, 1985, **2**, 443-451.
7. Roberts, J.J. en Engelbrecht, A.M.M., *Supplement to FOOD REVIEW*, 1988, 26-27.
8. Booyens, J., Rapport, 24 November 1991.9. Coetzee, J., *Finansies en Tegniek*, 11 Oktober 1991, p. 22.
10. Niwa, Y. en Okamura, K., The Japanese Food Science and Technology Academy, 1985, 1-6.
11. Niwa, Y., Kanoh, T., Kasama, T. en Negishi, M., *Drugs exptl. clin. res.*, 1988, **XIV**(5), 361-372.
12. Shindo, Y. en Kato, K., Proceedings of the International Symposium on Tea Science, Kurofune Printing Co. Ltd., 1991, 385.
13. Ito, A., Shinohara, K. en Kator, K., Proceedings of the International Symposium on Tea Science, Kurofune Printing Co. Ltd., 1991, 381.
14. Yoshikawa, T., Naito, Y., Oyamada, H., Ueda, S., Tanigawa, T., Takemura, T., Suoino, S. en Kondo, M., *Antioxidants in Therapy and*

- Preventive Medicine*, 1990, 171-174.
15. Habu, T., Flath, R.A., Mon, T.R. en Morton, J.F., *J. Agric. Food Chem.*, 1985, **33**(2), 249-254.
 16. Snyckers, F.O. en Salemi, G., *Joernaal van die Suid-Afrikaanse Chemiese Instituut*, 1974, **XXVII**, 5-7.
 17. Koeppen, B.H., The Flavonoid constituents of *Aspalathus acuminatus*, D.Sc.-tesis, Universiteit van Stellenbosch, 1961, 169 pp.
 18. Koeppen, B.H. en Roux, D.G., *Biochem. J.*, 1965, **97**, 444-448.
 19. Koeppen, B.H., The ethyl acetate soluble polyphenols of rooibos tea, M.Sc.-tesis, Universiteit van Stellenbosch, 1959, 132 pp.
 20. Koeppen, B.H., *Journal of laboratory and clinical medicine*, 1963, **9**, 141-142.
 21. Koeppen, B.H. en Roux, D.G., *Tetrahedron Letters*, 1965, **39**, 3497-3503.
 22. Koeppen, B.H. en Roux, D.G., *Food Industries of South Africa*, April 1970, 49.
 23. Koeppen, B.H. en Roux, D.G., *Biochem. J.*, 1966, **99**, 604-609.
 24. Harborne, J.B., Mabry, T.J. en Mabry, H., *The flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975, 1204 pp.
 25. Da Silva, J.M.R., Darmon, N., Fernandez, Y. en Mitjavila, S., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1549-1552.
 26. Robak, J. en Gryglewski, R.J., *Biochemical Pharmacology*, 1988, **37**(5), 837-841.
 27. Torel, J., Cillard, J. en Cillard, P., *Phytochemistry*, 1986, **25**(2), 383-385.
 28. Dziedzic, S.Z. en Hudson, B.J.F., *Food Chemistry*, 1983, **12**, 205-212.
 29. Cilliers, J.J.L. en Singleton, V.L., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1298-1303.
 30. Hamama, A.A. en Nawar, W.W., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1063-

1069.

31. Cilliers, J.J.L. en Singleton, V.L., *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 1789-1796.
32. Kohno, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. en Yoshikawa, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, **64**, 1447-1453.
33. Cilliers, J.J.L. en Singleton, V.L., *Am. J. Enol. Vitic.*, 1990, **41**(1), 84-86.
34. Worthy, W., New York Chemical Congress, C & EN, 16 September 1991, 27-29.
35. Cole, J.R., Torrance, S.J. en Wiedhopf, R.M., *J. Org. Chem.*, 1976, **41**(10), 1852-1855.
36. Lasswell, W.L. Jr. en Hufford, C.D., *J. Org. Chem.*, 1977, **42**(8), 1295-1302.
37. Carver, J.H., Carrano, A.V. en Mac Gregor, J.T., *Mutation Research*, 1983, **113**(1), 45-60.
38. Mac Gregor, J.T., Wehr, C.M., Manners, G.D., Jurd, L., Minkler, J.L. en Carrano, A.V., *Mutation Research*, 1983, **124**, 255-270.
39. Mizuta, M. en Kanamori, H., *Mutation Research*, 1983, **122**, 287-291.
40. Elliger, C.A., Henika, P.R. en Mac Gregor, J.T., *Mutation Research*, 1984, **135**, 77-86.
41. Dorange, J.L., Remeuf, F. en Dupuy, P., *Mutation Research*, 1984, **130**(3), 238-239.
42. Ogawara, H., Akiyama, T., Watanabe, S., Ito, N., Kobori, M. en Seoda, Y., *The Journal of Antibiotics*, 1989, **XL11**(2), 340-343.
43. Cunningham, B.D.M., Threadgill, M.D. en Hickman, J.A., *British Journal of Cancer*, 1987, **56**(2), 207.
44. Inouye, Y., Yamaguchi, K., Take, Y. en Nakamura, S., *The Journal of Antibiotics*, 1989, **XL11**(10), 1523-1525.

45. Watson, W.A.F., *Mutation Research*, 1982, **103**, 145-147.
46. Pamukcu, A.M., Yalciner, S., Hatcher, J.F. en Bryan, G.T., *Cancer Research*, 1980, **40**, 3468-3472.
47. Sahu, R.K., Basu, R. en Sharma, A., *Mutation Research*, 1981, **89**, 69-74.
48. Brown, J.P. en Dietrich, P.S., *Mutation Research*, 1979, **66**, 223-240.
49. Barzilai, A. en Rahamimoff, H., *Israel Journal of Medical Sciences*, 1982, **18**(6), 2.
50. Skjevrak, I. Solheim, E. en Scheline, R.R., *Xenobiotica*, 1986, **16**(1), 35-45.
51. Bär, A., Borrego, F., Benavente, O., Castillo, J. en Del Rio, J.A., *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 1990, **23**, 371-376.
52. Du Bois, G.E., Crosby, G.A. en Stephenson, R.A., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1981, **24**(4), 408-428.
53. Chinn, L.J., Walters, D.E., Williams, K. en Mazur, R.H., *J. Agric. Food Chem.*, 1987, **35**, 409-411.
54. Fomum, Z.T. en Ayafor, J.F., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1986, 33-37.
55. Fomum, Z.T. en Ayafor, J.F., *Tetrahedron Letters*, 1983, **24**(38), 4127-4130.
56. Hufford, C.D. en Oguntimein, B., *Phytochemistry*, 1980, **19**(9), 2036-2038.
57. Hufford, C.D. en Oguntimein, B., *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 5286-5288.
58. Ravn, H., Nishibe, S., Sasahara, M. en Xuebo, L., *Phytochemistry*, 1990, **29**(11), 3627-3631.
59. Singh, U.P., Pandey, V.B., Singh, K.N. en Singh, R.D.N., *Can. J. Bot.*, 1988, **66**, 1901-1903.
60. Eklund, T., *International Journal of Food Microbiology*, 1985, **2**, 159-167.
61. Bui, L.V. en Cooper, C., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1987, **70**(5), 892-896.
62. Warth, A.D., *Journal of Food Protection*, 1985, **48**, 564-569.

63. Bate-Smith, E.C., *Nature*, 1948, **161**, 835.
64. Saayman, H.M. en Roux, D.G., *Biochem J.*, 1965, **96**, 36.
65. Patridge, S.M., *Biochem. J.*, 1948, **42**, 238.
66. Lindstedt, G., *Acta Chem. Scand.*, 1940, **4**, 65.
67. Roux, D.G. en Maihs, E.A., *J. Chromatog.*, 1960, **4**, 65.
68. Vogel, A.I., "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry including Qualitative Organic Analysis", Hersien deur Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Rogers, V., Smith, P.W.G. en Tatchell, A.R., Longman Scientific and Technical, London, Vierde uitgawe, 1978, p. 292.
69. Kametani, T. en Kano, S., *J. Pharmac. Soc. Jpn.*, 1962, **82**, 1059.
70. Edwards, B.E. en Rao, P.N., *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 324-327.
71. Vogel, A.I., "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry including Qualitative Organic Analysis", Hersien deur Furniss, B.S. et. al., Longman Scientific and Technical, London, Vierde uitgawe, 1978, p. 627.
72. Vogel, A.I., *Ibid.*, p. 798-800.
73. Roberts, R.M., Gilbert, J.C., Rodewald, L.B. en Wingrove, A.S., Modern experimental organic chemistry, Holt-Saunders International Editions, New York, Vierde uitgawe, 1985, p. 501-506.
74. Roberts, R.M., Gilbert, J.C., Rodewald, L.B. en Wingrove, A.S., *Ibid.*, p. 511-515.
75. Vogel, A.I., "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry including Qualitative Organic Analysis", Hersien deur Furniss, B.S. et. al., Longman Scientific and Technical, London, Vierde uitgawe, 1978, p. 64-67.
76. Harborne, J.B., The Flavonoids, advances in research since 1980, Chapman and Hall, London, 1988, p. 399-425.
77. Harborne, J.B. en Mabry, T.J., The Flavonoids, advances in research,

- Chapman and Hall, London, 1982, p. 641-679.
78. Harborne, J.B., Mabry, T.J. en Mabry, H., *The Flavonoids*, Chapman and Hall. London, 1975, pp. 868-911, 950-951.
 79. Balogh-Hergovich, E., Speier, G. en Argay, G., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 551-552.
 80. Brieskorn, C.H. en Riedel, W., *Planta med.*, 1977, **31**,308.
 81. Achari, B., Chowdhury, U.S., Dutta, P.K. en Pakrashi, S.C., *Phytochemistry*, 1984, **23**(3), 703-704.
 82. Ahmed, M., Khaleduzzaman, M. en Islam, M.S., *Phytochemistry*, 1990, **29**(6), 2009-2011.
 83. Drewes, S.E. en Hudson, N.A., *Phytochemistry*, 1983, **22**(12), 2823-2825.
 84. Koeppen, B.H. en Roux, D.G., *Biochem. J.*, 1965, **97**, 444-448.
 85. Finger, A., Engelhardt, U.H. en Wray, V., *Phytochemistry*, 1991, **30**(6), 2057-2060.
 86. Finger, A., Engelhardt, U.H. en Wray, V., *J. Sci. Food Agric.*, 1991, **55**, 313-321.
 87. De Simone, F., Dini, A., Pizza, C., Saturnino, P. en Schettino, O., *Phytochemistry*, 1990, **29**(11), 3690-3692.
 88. Budzianowski, J., *Phytochemistry*, 1990, **29**(11), 3643-3647.
 89. Kokubo, T., Nakamura, M., Yamakawa, T., Noguchi, H. en Kodama, T., *Phytochemistry*, 1991, **30**(3), 829-831.
 90. Bézanger-Beauquèsne, L., Debray, M., Pinkos, M. en Trotin, M.F., *C.R. Habd. Seances Acad. Sci. Ser. D*, 1975, **281**, 2025.
 91. Perkin, A.G., *J. Chem. Soc.*, 1901, **95**, 2183.
 92. Sekine, T., Arita, J., Yamaguchi, A., Saito, K., Okonogi, S., Morisaki, N., Iwasaki, S. en Murakoshi, I., *Phytochemistry*, 1991, **30**, 991-995.
 93. Carté, B.K., Carr, S., DeBrosse, C., Hemling, M.E., MacKenzie, L.,

- Oflen, P. en Berry, D.E., *Tetrahedron*, 1991, **47**(10/11), 1815-1822.
94. Kende, A.S. en Fujii, Y., *Tetrahedron Letters*, 1991, **32**(20), 2199-2202.
95. Webby, R.F., *Phytochemistry*, 1991, **30**(7), 2443-2444.
96. Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K., Osajima, Y., *Phytochemistry*, 1990, **29**(11), 3686-3687.
97. Shoyama, Y., Nishioka, I., Herath, W., Uemoto, S., Fujieda, K. en Okubo, H., *Phytochemistry*, 1990, **29**(9), 2999-3001.
98. Terahara, N., Toki, K., Saito, N., Honda, T., Isono, T., Furumoto, H. en Kontani, Y., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1990, 3327-3332.
99. Kondo, T., Ueda, M. en Goto, T., *Tetrahedron*, 1990, **40**(13/14), 4749-4756.
100. Nishimura, H., Sasaki, H., Morota, T., Chin, M. (Zhenyíxiong, C.) en Mitsuhashi, H., *Phytochemistry*, 1990, **29**(10), 3303-3306.
101. Steynberg, J.P., Brandt, E.V., Burger, J.F.W., Bezuidenhoudt, B.C.B. en Ferreira, D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1988, 37-41.
102. Tschesche, R. en Struckmeyer, K., *Chem. Ber.*, 1976, **109**, 2901.
103. Billeter, M., Meier, B. en Sticher, O., *Phytochemistry*, 1991, **30**(3), 987-990.
104. Harborne, J.B. en Mabry, T.J., *The Flavonoids, Advances in Research*, Chapman and Hall, London, 1982, p. 208, 457.
105. Baczko, K. en Plusquellec, D., *Tetrahedron*, 1991, **47**(23), 3817-3828.
106. Williams, C.A. en Harborne, J.B., *Phytochemistry*, 1971, **10**, 1059.
107. Bär, A., Borrego, F., Benavente, O., Castillo, J. en Del Rio, J.A., *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1990, **23**, 371-376.
108. Temussi, P.A., Lelj, F. en Tancredi, T., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1978, **21**(11), 1154-1158.
109. Ciajolo, M.R., Lelj, F., Tancredi, T., Temussi, P.A. en Tuzi, A., *ibid.*,

- 1983, **26**, 1060-1065.
110. Castiglione-Morelli, M.A., Lelj, F., Naider, F., Tallon, M., Tancredi, T. en Temussi, P.A., *ibid.*, 1990, **33**, 514-520.
111. Arnoldi, A., Bassoli, A., Merlini, L. en Ragg, E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1991, 1399-1406.
112. DuBois, G.E., Crosby, G.A. en Saffron, P., *Science*, 1977, **195**, 397-399.
113. DuBois, G.E., Crosby, G.A., McGarraugh, G.V., Y.-W.Ng, S., Stephenson, R.A., Wang, P.C. en Wingard, R.E. Jr., *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 1319-1323.
114. DuBois, G.E. en Stephenson, R.A., *J. Agric. Food Chem.*, 1982, **30**, 676-681.
115. Wong, R.Y. en Horowitz, R.M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1986, 843-848.
116. Daniel, J.R., Whitelaw, M.L. en Chung, H., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 663-667.
117. Kasai, R., Hirono, S., Chou, W., Tanaka, O. en Chen, F., *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**(7), 1871-1872.
118. Ito, K., Itoigawa, M., Haruna, M., Murata, H. en Furukawa, H., *Phytochemistry*, 1980, **19**, 476.
119. Steynberg, J.P., Sintese en konformasie van natuurlike flobatanniene. Die meganisme van basisgekataliseerde piraanherrangskikkings, Ph.D.-tesis, UOVS, 1988, p. 41-42.