

**CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AROMA VAN DIE  
HEUNINGBOSSPESIE *Cyclopia genistoides***

Deur

**Christel Cronje**

Tesis ingelewer ter voldoening  
aan die vereistes vir die graad van

**Magister**

in Chemie

aan die

**Universtiteit van Stellenbosch.**

Studieleier: Dr. M. le Roux

Mediastudieleier: Prof. B.V. Burger

Stellenbosch

April 2006

## VERKLARING

Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die werk in hierdie tesis vervat, my eie oorspronklike werk is en dat ek dit nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê het nie.

Handtekening: .....

Datum: .....



## OPSOMMING

Heuningbos (*Cyclopia spp.*), waarvan meer as 20 spesies in Suid-Afrika voorkom, word gebruik vir die maak van 'n kruietee met 'n unieke aroma en soet smaak. Die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbostee verskil merkbaar van mekaar, wat beteken dat daar gedurende die fermentasieproses sekere veranderinge in die chemiese samestelling van die aroma plaasvind. Deur gebruik te maak van 'n "sample enrichment probe" (SEP) en gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS), is die chemiese samestelling van die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde *C. genistoides* geanaliseer en die voortspruitende aromaprofiel vergelyk. 'n Totaal van 74 verbindings is in die ongefermenteerde heuningbosaroma geïdentifiseer, wat onder andere 'n groot aantal versadigde en onversadigde alkohole, aldehyde en metielketone insluit wat óf afwesig óf in laer relatiewe konsentrasies teenwoordig is in die gefermenteerde heuningbos. Die meeste van hierdie verbindings, insluitende 6-metiel-5-hepten-2-oon, wat een van die hoofkomponente in die ongefermenteerde heuningbos is, is waarskynlik verantwoordelik vir die grasagtige, hooiagtige en groen aroma. In die aroma van gefermenteerde heuningbos is 70 verbindings geïdentifiseer, waarvan 36 terpenoïede is. Hierdie terpenoïede is waarskynlik verantwoordelik vir die aangename soet aroma van die gefermenteerde heuningbos. Die hoofaromakomponent in die gefermenteerde heuningbos wat as  $\alpha$ -terpineol geïdentifiseer is, het byvoorbeeld 'n baie delikate blomagtige en soet geur. Die ander belangrike terpenoïede wat voorkom, sluit in linaloöl, *cis*- en *trans*-linaloöloksied, nerol, geraniol, 2,6-dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol, heksahidrofarnesielasetoon en fitol. Die meeste van hierdie verbindings het soet, soet-houtagtige of blomagtige geure wat moontlik bydra tot die algehele soet aroma van gefermenteerde heuningbos. In die aroma van die ongefermenteerde heuningbos is daar 25 terpenoïede gevind, waarvan geranielasetoon,  $\beta$ -jonoon en dihidroaktinidiolied waarskynlik die drie belangrikstes is aangesien hulle hier in baie groter relatiewe konsentrasies voorkom as in die aroma van die gefermenteerde heuningbos. Hierdie drie terpenoïede het oorheersend houtagtige tot selfs groen aromas wat weer bydra tot die groen, grasagtige en hooiagtige aroma van die ongefermenteerde heuningbos.

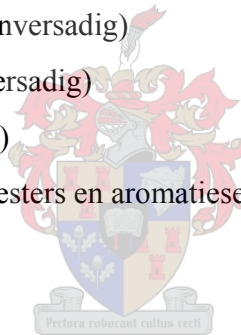
Die terpenoïede in die aroma van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos kan in die volgende klasse ingedeel word:

- Terpene

- Terpeenalkohole
- Terpeenaldehiede
- Ketoterpene
- Terpeeneters
- Terpeenlaktone

Behalwe vir die terpenoïede maak die volgende groepe verbindings ook deel uit van die samestelling van verbindings teenwoordig in die aroma van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos :

- Alifatiese koolwaterstowwe (versadig)
- Alifatiese alkohole (versadig en onversadig)
- Fenole
- Alifatiese aldehiede (versadig en onversadig)
- Alifatiese ketone (versadig en onversadig)
- Alifatiese karboksiesure (versadig)
- Esters (metielesters, etiel- en hoër esters en aromatiese esters)
- Furaanverbindings
- Laktone



Die huidige navorsing is gedoen om die chemiese samestelling van die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos van een spesifieke spesie, naamlik *C. genistoides*, te vergelyk ten einde 'n begrip te verkry van die ontwikkeling en/of verdwyning van vlugtige verbindings tydens fermentasie om sodoende die verbindings of verbindingstipes en hul voorlopers te kan identifiseer wat moontlik verantwoordelik is vir heuningbos se unieke soet aroma.



## SUMMARY

Honeybush (*Cyclopia spp.*) is indigenous to South Africa and consists of more than 20 species of which only a few are used to make a herbal tea with a unique aroma and sweet taste. The aroma of unfermented and fermented honeybush tea differs considerably, indicating that changes take place in the chemical composition of the aroma during the fermentation process. Using a sample enrichment probe (SEP) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), the chemical composition of the aroma of unfermented and fermented *C. genistoides*, was analyzed and the resulting aroma profiles were compared. A total of 74 compounds were identified in the unfermented honeybush aroma, comprising, *inter alia*, a large number of saturated and unsaturated alcohols, aldehydes and methyl ketones that were found to be either absent, or present in lower relative concentrations, in the aroma of fermented honeybush. Most of these compounds, including 6-methyl-5-hepten-2-one, identified as one of the major constituents of unfermented honeybush, are probably responsible for its grassy, hay-like aroma. In the aroma of fermented honeybush 70 compounds were identified, of which 36 were found to be terpenoids. These compounds are probably responsible for the pleasant sweet aroma of the fermented honeybush. For instance, the major aroma constituent in the fermented honeybush,  $\alpha$ -terpineol, is known to have a delicately floral and sweet odour. Other terpenoids occurring in significant quantities in the fermented honeybush, are linalool, *cis* and *trans* linalool oxide, nerol, geraniol, 2,6-dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol, hexahydrofarnesyl acetone and phytol. These terpenoids are known to have sweet, sweet-woody en floral odours that probably contribute to the overall sweet aroma of the fermented honeybush. In the aroma of the unfermented honeybush a total of 25 terpenoids was identified, of which geranyl acetone,  $\beta$ -ionone, and dihydroactinidiolide are the most significant, since they are present in higher relative concentrations compared to the same terpenoids in the fermented honeybush. These three terpenoids have overall woody and even slightly green odours which contribute to the typical aroma of the unfermented honeybush. The terpenoids present in the aroma of unfermented and fermented honeybush belong to the following compound classes:

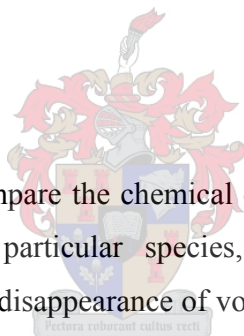
- Terpenes
- Terpene alcohols
- Terpene aldehydes
- Ketoterpenes

- Terpene ethers
- Terpene lactones

Apart from the terpenoids present in the aroma of unfermented and fermented honeybush, the following classes of compounds are also present:

- Aliphatic hydrocarbons (saturated)
- Aliphatic alcohols (saturated and unsaturated)
- Phenols
- Aliphatic aldehydes (saturated and unsaturated)
- Aliphatic ketones (saturated and unsaturated)
- Aliphatic carboxylic acids (saturated)
- Esters (methyl esters, ethyl and higher esters and aromatic esters)
- Furane compounds
- Lactones

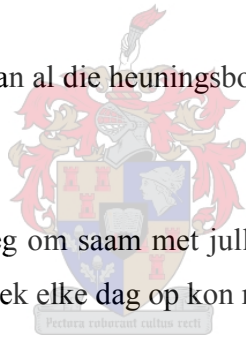
The present research was done to compare the chemical composition of the aroma of unfermented and fermented honeybush of one particular species, namely *C. genistoides*, to obtain an understanding of the evolution and/or disappearance of volatile compounds during fermentation that ultimately could help to identify compounds or compound types and their precursors responsible for its unique sweet aroma.



## BEDANKINGS

Ek wil net graag die volgende persone bedank, want sonder al hulle leiding en ondersteuning sou ek nie die tesis kon voltooi het nie.

- Dr. le Roux wat nie net my promotor is nie, maar ook my mentor – dankie vir al die leiding, hulp, ondersteuning en geselsies. Dr. is voorwaar iemand na wie ek opkyk.
- Prof. Burger wat my medestudieleier is – dankie vir al prof. se leiding en hulp. Dit is ‘n voorreg om een van prof. se studente te mag wees.
- Tannie Wiena – dankie dat tannie so mooi na ons almal kyk en vir al die kolomme wat tannie met soveel sorg vir ons maak.
- Dr. E Joubert vir die verskaffing van al die heuningsbosplantmateriaal en ook vir haar instette en kennis tydens die studie.
- Marlize en Brenda – dis ‘n voorreg om saam met julle in die lab te kan wees. Dankie vir julle vriendskap, hulp en geselskap wat ek elke dag op kon reken.
- My ma en pa – dankie vir al mamma en pappa se ondersteuning deur al die jare. Dankie dat mamma en pappa nog altyd daar was vir my in goeie en in slegte tye.
- Laaste maar nie die minste nie wil ek vir my Hemelpa dankie sê – ek kan niks sonder Pa doen nie en sou nooit hierdie tesis kon gedoen het sonder Pa by my nie. DANKIE



# Inhoudsopgawe

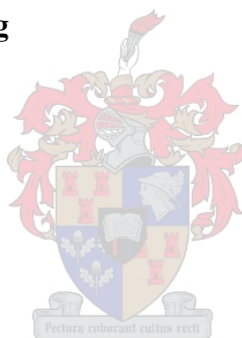
## Hoofstuk 1

### INLEIDING EN DOELSTELLING

<b>1.1</b>	<b>Algemene inleiding</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Die olfaktoriese sisteem van die mens</b>	2
1.2.1	Anatomie	3
1.2.2	Reseptormeganisme	6
1.2.3	Kodering	7
<b>1.3</b>	<b>Die klassifikasie van verskillende smake en geure</b>	8
1.3.1	Vrugtegeure	9
1.3.2	Groentegeure	10
1.3.3	Speserygeure	10
1.3.4	Drankgeure	11
1.3.5	Vleisgeure	11
<b>1.4</b>	<b>Chemiese verbindings verantwoordelik vir aromas, geure en smake</b>	12
1.4.1	Vlugtige aromaverbindings	14
1.4.1.1	Aldehiede	14
1.4.1.2	Ketone	15
1.4.1.3	Alkohole	15
1.4.1.4	Organiese sure	15



1.4.1.5	Laktone	16
1.4.1.6	Esters	16
1.4.1.7	Fenole	16
1.4.1.8	Terpenoïede	17
1.4.2	Nie-vlugtige verbindings	18
1.4.2.1	Aminosure en peptiede	18
1.4.2.2	Suikers	18
1.4.2.3	Soute	19
1.4.2.4	Flavanoïede en alkaloidede	19
1.4.2.5	Fenole	20
1.4.2.6	Isotiosianate	20
<b>1.5</b>	<b>Terpenoïede onder die soeklig</b>	<b>20</b>
1.5.1	Monoterpenoïede	21
1.5.2	Seskwiterpenoïede	23
1.5.3	Diterpenoïede	24
<b>1.6</b>	<b>Heuningbostee</b>	<b>25</b>
1.6.1	Inleiding	25
1.6.2	<i>Cyclopia</i> spesies en hulle habitat	26
1.6.3	Beskrywing van heuningbos	28
1.6.4	Prosessering	29
1.6.5	Ontwikkeling van die heuningbosteebedryf	30
<b>1.7</b>	<b>Gesondheidseienskappe van heuningbostee</b>	<b>31</b>
1.7.1	Polifenoliese verbindings	32
1.7.1.1	Flavonole	32
1.7.1.2	Flavanone	32



1.7.1.3	Isoflavone	32
1.7.1.4	Flavone	33
1.7.1.5	Koemestans	33
1.7.1.6	Xantone	33
<b>1.8</b>	<b>Doelstelling van die navorsing</b>	<b>34</b>
<b>1.9</b>	<b>Verwysings</b>	<b>36</b>

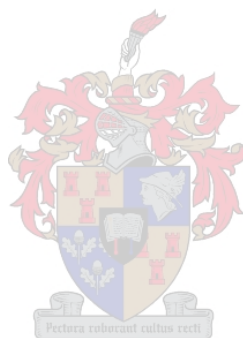
## Hoofstuk 2

### **CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AROMA VAN HEUNINGBOS,**

#### *Cyclopia genistoides*

<b>2.1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Struktuurbeplating van verbindings teenwoordig in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos</b>	<b>44</b>
2.2.1	Alifatiese koolwaterstowwe (versadig)	44
2.2.2	Alifatiese alkohole (versadig)	45
2.2.3	Alifatiese alkohole (onversadig)	47
2.2.4	Fenole	48
2.2.5	Alifatiese aldehyede (versadig)	54
2.2.6	Alifatiese aldehyede (onversadig)	58
2.2.7	Alifatiese ketone (versadig)	59
2.2.8	Alifatiese ketone (onversadig)	61
2.2.9	Alifatiese karboksielsure (versadig)	67
2.2.10	Metielesters	71
2.2.11	Etiel- en hoër esters	72

2.2.12	Aromatiese esters	74
2.2.13	Furaanverbindings	76
2.2.14	Laktone	77
2.2.15	Terpenoïede	78
2.2.15.1	Terpene	79
2.2.15.2	Terpeenalkohole	87
2.2.15.3	Terpeenaldehiede	92
2.2.15.4	Ketoterpene	95
2.2.15.5	Terpeeneters	109
2.2.15.6	Terpeenlaktone	113
2.2.16	Ander	114
<b>2.3</b>	<b>Toekomstige studies</b>	115
<b>Addendum A</b>		122
<b>2.4</b>	<b>Verwysings</b>	180



### Hoofstuk 3

## RESULTATE EN BESPREKING

<b>3.1</b>	<b>Oorsig oor monsterverrykingstegnieke</b>	183
<b>3.2</b>	<b>Vergelyking van die verbindings teenwoordig in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos</b>	185
<b>3.3</b>	<b>Verwysings</b>	194

## Hoofstuk 4

### **EKSPERIMENTEEL**

<b>4.1</b>	<b>Algemeen</b>	195
<b>4.2</b>	<b>Versameling van heuningbos plantmateriaal vir bodamp GC-MS</b>	195
<b>4.3</b>	<b>Voorbereiding van heuningbosekstrakte</b>	196
<b>4.4</b>	<b>Analitiese tegnieke</b>	196
4.4.1	Gaschromatografiese analises (GC)	196
4.4.2	Gaschromatografie-massaspektrometriese analises (GC-MS) met die SEP	197
<b>4.5</b>	<b>Verwysingsverbindings</b>	199
4.5.1	Bereiding van heksahidrofarnesielasetoon	199
4.5.2	Bereiding van sintetiese mengsels vir retensietydvergelyking	199
<b>4.6</b>	<b>Verwysing</b>	200



## Hoofstuk 1

### INLEIDING EN DOELSTELLING

#### 1.1 Algemene Inleiding

Alles wat ons weet omtrent die wêreld waarin ons leef, word moontlik gemaak deur ons sintuie. Ons sig-, smaak-, gehoor-, tas- en reuksintuie help ons om elke dag nuwe dinge te ontdek en te ervaar [1]. Ons sintuie stel ons in staat om enige situasie op te som, sodat ons dienooreenkomstig kan reageer. Soms vereis 'n situasie dat ons moet hardloop of stilstaan, soms moet ons stilbly en luister, ander kere moet ons praat, soms moet ons oë oop wees, ander kere toe. Soms moet ons iets vertroetel en soms iets vernietig, soms is ons liefdevol en ander kere is ons kwaad.

Alhoewel ons sintuie 'n baie belangrike rol speel gedurende elke sekonde van ons lewens, is ons geneig om ons sintuie as vanselfsprekend te aanvaar. Aangesien ons dikwels vergeet hoe belangrik ons sintuie werklik is, is dit juis die rede hoekom ons lewe so totaal ontwrig word wanneer ons een van ons sintuie verloor. Skielik is jy in 'n ander wêreld en aanvanklik sukkel 'n mens om aan te pas, maar die mens is baie aanpasbaar, selfs in uiterste omstandighede. Ongelukkig, ten spyte van ons vermoë om te kan aanpas, kan niks ooit vergoed vir die verlies van 'n sintuig nie.

In die samelewing waarin die mens homself bevind, is ons veral nonchalant ten opsigte van ons reuksintuig [1]. Die mens neem die wêreld grotendeels waar met die oë en ore [2]. Ons gebruik ons oë en ore aaneenlopend en onwetend (passief) om ons omgewing en situasies op te som en ons reageer in 'n omgewing of situasie meestal op grond van wat ons sien en hoor. Smaak- en reuksintuie word net soms gebruik en dit gaan altyd gepaard met passie, want reuke en smake het die vermoë om emosies van genot of afgryse aan te wakker wat vir ewig ingeprent word in ons geheue [2].

Ons het nie die vermoë om mense bewustelik aan hulle eie unieke reuke uit te ken nie, hoewel reuke ons moontlik onbewustelik kan beïnvloed. Ons ken mense gewoonlik uit aan hulle eie unieke voorkoms en stemme. In die diereryk werk dinge egter baie anders. Vir diere is die vermoë om te

kan ruik dikwels baie meer belangrik as om te kan sien of hoor, want hulle is omring deur 'n osean van chemikalieë [2]. Die gedrag van die meeste diere word beheer deur chemiese seine; of dit nou is om hulle te help kos vind, om hulle gebied af te baken of om 'n maat te soek vir voortplanting. Selfs die sosiale gedrag van insekte soos bye en miere, word beheer deur die uitruiling van chemiese seine, sodat elke individu presies kan weet wat om te doen [1].

Hoekom is dit dan so belangrik vir die mens om te kan ruik? Dit is belangrik, want vir ongeveer 80-90% van wat ons kan proe is ons afhanklik van die vermoë om verskillende aromas te kan ruik. Die mens se smaakreseptore kan slegs onderskei tussen vier basiese smake, naamlik soet, sout, suur en bitter [3]. Hierdie basiese smake gekombineer met tekstuur, temperatuur, aroma en sensasie van algemene chemiese sintuie, produseer 'n spesifieke smaak. Die enigste manier waarop ons byvoorbeeld kan onderskei tussen fyngemaakte appels en uie, is deur ons vermoë om te kan ruik [4]. As dit nie was vir ons vermoë om te kan ruik nie, sou ons glad nie waardering gehad het vir al die verskillende geure en kwaliteit van voedsel- en drankprodukte nie.

Die Franse skrywer, Marcel Proust het die volgende geskryf oor smaak en reuke in sy boek *The Remembrance of Things Past* : “ When nothing else subsists from the past after people are dead, after the things are broken or scattered... the smell and taste of things remain poised a long time, like souls... bearing resiliently, on tiny and almost impalpable drops of their essence, the immense edifice of memory”.

As die reuk van kaneel herinneringe en emosies kan oproep van iemand spesiaal van lank gelede, en as aromas so belangrike rol speel in ons vermoë om kos ten volle te kan geniet, moet ons dit nie meer koester en waardeer nie?

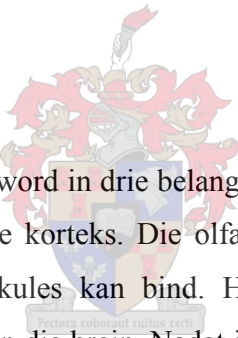
## **1.2 Die olfaktoriese sisteem van die mens**

Die smaak- en reuksintuie van die mens staan ook bekend as sy chemiese sintuie. Hierdie sintuie funksioneer deur intense emosies van plesier of walging aan te wakker, en sulke emosies bly ons vir 'n hele leeftyd by [5].

Soos wat die menslike beskawing meer en meer ontwikkel het, het die mens al hoe meer krities geword. Ons is krities wanneer dit kom by mense, ons is krities ten opsigte van enigiets wat ons eet, drink of vir onself koop, want ons het gewoon geraak aan 'n sekere mate van kwaliteit. Bowenal het ons uiters sensitiewe sintuie wat ons gebruik vir hierdie doel. Hierdie toenemende kritiese aard van die mens kan baie probleme veroorsaak vir vervaardigers. Dit dwing vervaardigers om produkte van hoogstaande gehalte vir die verbruiker te vervaardig. Die meeste vervaardigers sal na die uithoeke van die aarde gaan om die verbruiker gelukkig te hou, en juis om hierdie rede word soveel moontlik navorsing gedoen voor 'n produk die rakke haal, en selfs daarna om die produk nog verder te verbeter.

Wanneer ons iets koop is dit meestal iets wat ons kan eet, drink of gebruik, in en om die huis of werkplek. Wanneer ons die kwaliteit van 'n produk waarneem, gebruik ons ons sintuie om vas te stel hoe dit voel, ruik, proe of lyk.

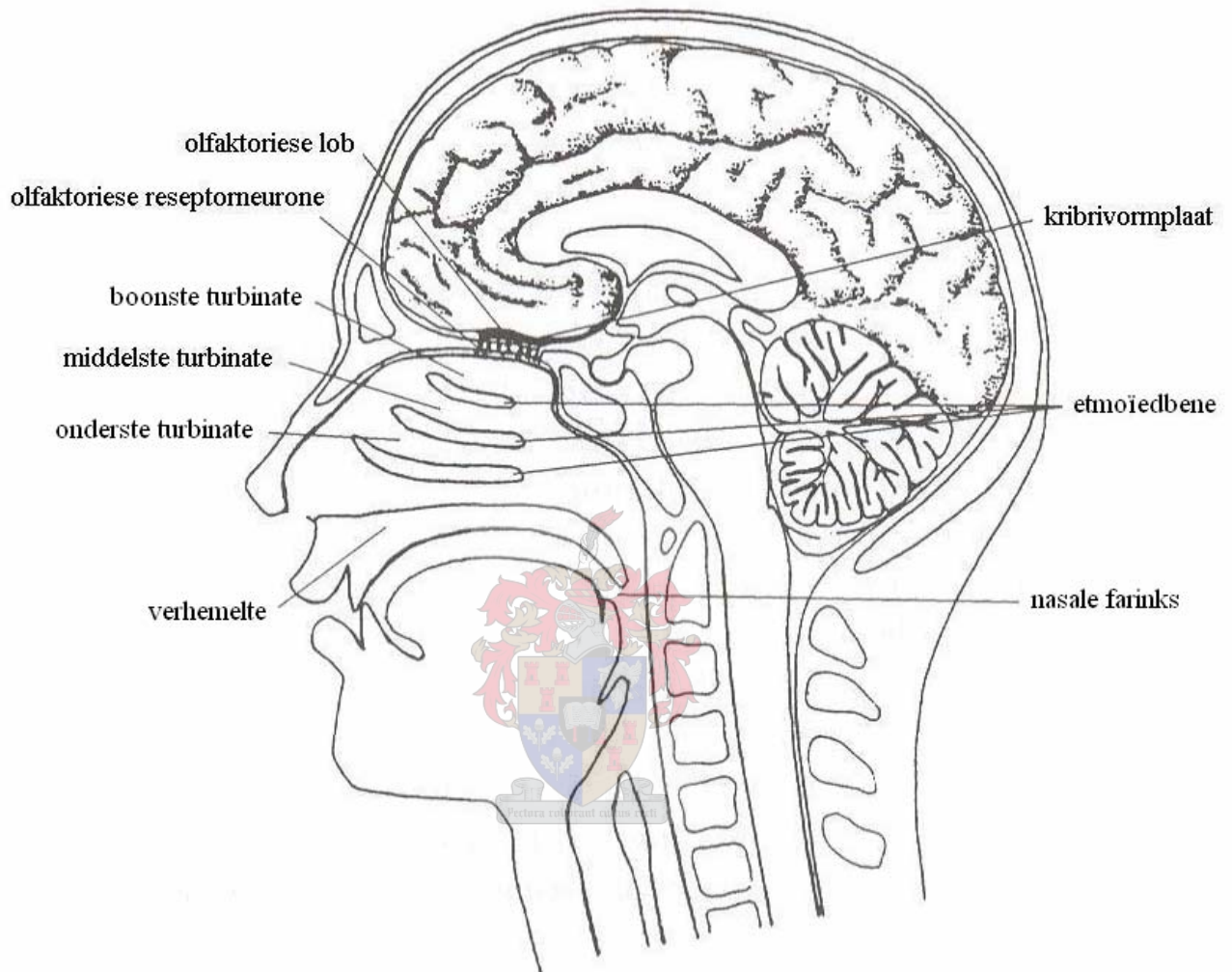
### 1.2.1 Anatomie



Die olfaktoriese sisteem kan opgedeel word in drie belangrike dele, naamlik die olfaktoriese epiteel, die olfaktoriese lob en die olfaktoriese korteks. Die olfaktoriese epiteel is die oppervlak wat die reseptore bevat waaraan aroma-molekules kan bind. Hierdie selle se aksons lei direk na die olfaktoriese lob wat 'n verlenging is van die brein. Nadat intense prosessering in die olfaktoriese lob plaasgevind het, word hierdie olfaktoriese informasie gestuur na die olfaktoriese korteks [5].

Die olfaktoriese epiteel kom voor langs die bokant van die nasale holte, in die septum en in dele van die boonste turbinat, en dit bestaan uit drie tipiese selle, naamlik reseptorneurone, basale selle en ondersteunende selle [6]. Reseptorneurone het 'n 2-maande leefsiklus vandat hulle gevorm word by die basis van die epiteel, tot wanneer hulle uiteindelik migreer na die oppervlak. Die dendriete van hierdie selle kronkel deur die epiteel tot by die oppervlak en by hierdie kontakpunte vorm knoppe waardeur duisende cilia steek om oor die hele oppervlak van die epiteel te versprei [6]. Die cilia aan die oppervlak van hierdie olfaktoriese reseptorneurone bevat reseptorproteïene vir die binding van aroma-molekules [6]. Aan die teenoorgestelde kant van die olfaktoriese neurone kom aksons voor wat strek tot by die olfaktoriese lob. Die aksons word gepak in bondels soos wat dit die epiteel

verlaat en die bondels vorm klein senuwees wat deur die kribrivormplaat strek voor dit by die olfaktoriese lob uitkom [6].

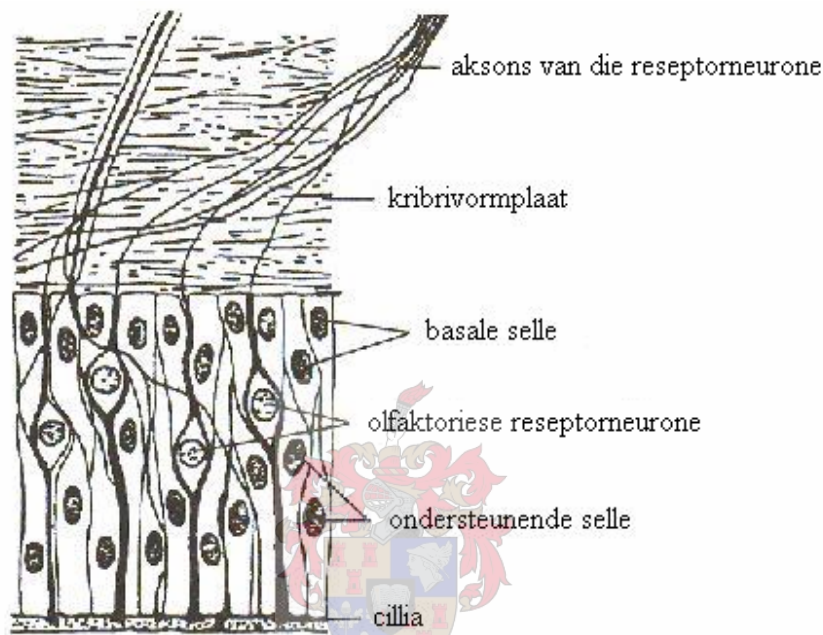


**Fig. 1.1:** Laterale aansig van die kop van 'n mens om die posisies van die belangrikste strukture in die nasale area aan te dui [6].

Die olfaktoriese lob is 'n verlenging van die brein wat uit 6 verskillende lae bestaan, naamlik die olfaktoriese senuweelaag, glomerulêre laag, eksterne pleksievormlaag, mitrale sellaag, interne pleksievormlaag en die granulêre sellaag. Tussen hierdie verskillende lae word daar ook 5 verskillende tipes neurone aangetref. Twee van hierdie tipes neurone ontvang inligting vanaf die

olfaktoriese epiteel en dra dit oor aan die korteks. Die res van die neurone is betrokke by plaaslike verwerking in die lob self [7].

Die grootste neuron wat voorkom in die olfaktoriese lob is die mitrale sel. Glomeruli is sirkelvormige strukture wat saamgestel is uit 2-9 sekondêre dendriete en hierdie liggaampies kom al langs die eksterne pleksievormlaag voor.



**Fig. 1.2:** Dwaarsnit van die olfaktoriese epiteel, wat die basale en ondersteunende selle asook die reseptorneurone aandui [6].

Nog 'n belangrike neuron wat in die lob voorkom is die kwasagtige sel. Komplekse interaksies wat plaasvind in die glomeruli word gereguleer deur periglomerulêre selle by die basis van die glomeruli. Die vierde groep neurone is die granulêre selle wat die sesde laag van die olfaktoriese lob uitmaak. Laastens is daar 'n groep kort aksonselle wat verspreid voorkom deur die eksterne pleksievormlaag en die granulêre sell laag [7, 8].

Hoofsaaklik twee prosesse vind plaas in die olfaktoriese lob: interaksies tussen die perifere sensuêre en die mitrale en kwasagtige selle, en die modulering van hierdie interaksies. Aksons vanaf die olfaktoriese epiteel strek tot in die lob waar 'n sinaps ontstaan op die dendriete van mitrale,

kwasagtige en periglomerulêre selle. Terselfdertyd vorm die dendriete van mitrale en kwasagtige selle resiproke sinapse met die dendriete van periglomerulêre selle. Daar ontstaan dus 'n hele reeks sinapse op 'n spesifieke gedeelte van 'n glomerulus. Inhibitorprosesse tree egter ook dadelik in werking om die mate van onderskeiding van die inkomende seine te verskerp, aangesien die ontstaan van 'n sinaps in een glomerulus, die aktiwiteit van die ander glomeruli rondom hom verminder. Tydens inhibitorprosesse vorm inhibitorsinapse *via* 'n konneksie wat ontstaan tussen die aksons van periglomerulêre selle en glomeruli. Hierdie sinapse word oorgedra na die apikale dendriete van mitrale en kwasagtige selle [8].

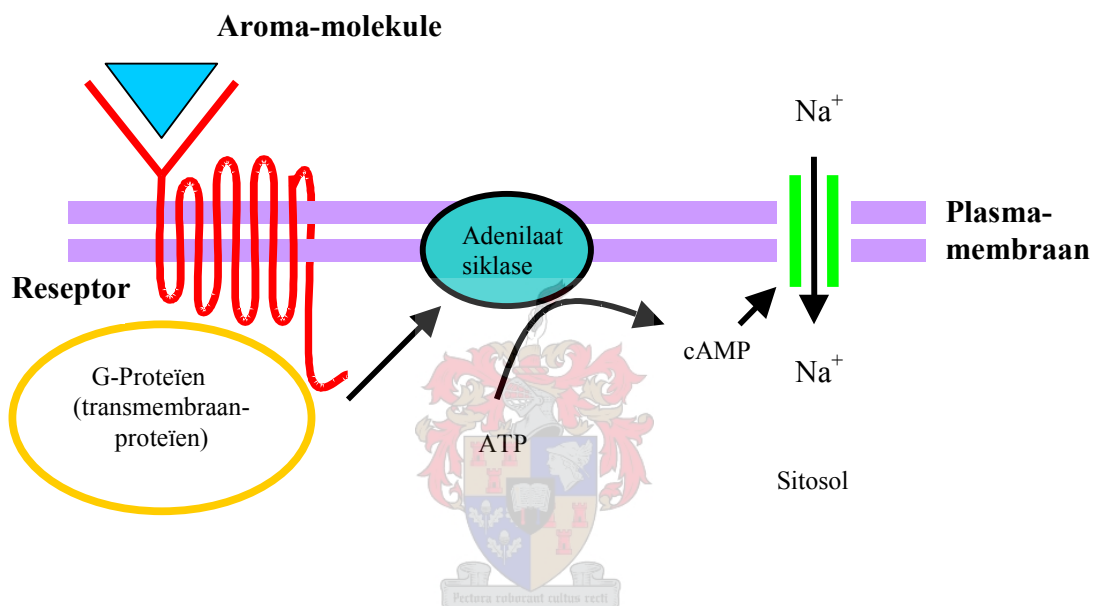
Die tweede setel van interaksie, waar sinapse ontstaan, is in die eksterne pleksievormlaag. Die opgewekte apikale dendriete van granulêre selle vorm resiproke sinapse met die sekondêre dendriete van mitrale en kwasagtige selle. Die interaksies wat in hierdie laag plaasvind is uiters kompleks omdat daar nog twee addisionele prosesse is wat terselfdertyd ook plaasvind. Vertakkings vanaf die aksons van mitrale en kwasagtige selle gaan terug na die lob om sinapse te vorm met klein dendriete wat uitspruit vanaf die basale kant van granulêre selle. Tweedens word sentrifugale aksons vanaf neurone in die brein gestuur na die drie plekke in die lob waar sinaptiese interaksie plaasvind: die glomeruli, die eksterne pleksivormlaag en die granulêre sellalaag [8, 9].

Die olfaktoriese korteks in die brein is die laaste struktuur wat deel vorm van die mens se olfaktoriese sisteem. Dit bestaan uit drie lae waarvan laag 2 en 3, wat bestaan uit piramidale selle, die grootste deel uitmaak van die korteks. Die korteks ontvang inligting vanaf die olfaktoriese lob *via* laag 1 waarna dit dan aangestuur word na laag 2 en 3 [9].

### 1.2.2 Reseptormeganisme

Die cilia op die oppervlak van die olfaktoriese epiteel strek tot in 'n laag mukus wat ook op die oppervlak aanwesig is [1, 10]. Wanneer aroma-molekules die neus binnegaan word hulle gekanaliseer na die oppervlak van die olfaktoriese epiteel waar die molekules dan oplos in die mukuslaag [10]. Nadat aroma-molekules opgelos het in die mukuslaag bind dit aan reseptore op die cilia. Hierdie reseptore staan bekend as transmembraanproteïene, en na binding van aroma-molekules word G-proteïene geaktiveer om aan die transmembraanproteïene se sitoplasmiese kant te bind. Binding van die G-proteïen aan die reseptor aktiveer 'n ensiem in die plasmamembraan van

die cilia, naamlik adenilaat siklase, om ATP om te skakel na cAMP in die sitosol. cAMP is verantwoordelik vir die opening van ligand-beheerde natriumkanale sodat diffusie van  $\text{Na}^+$ -ione van buite na binne die sel kan plaasvind. Die invloei van  $\text{Na}^+$ -ione verminder die potensiaal oor die plasmamembraan en hierdie depolarisering hou aan todat 'n aksiepotensiaal ontstaan. Hierdie aksiepotensiaal word dan *via* die reseptorneurone se aksons oorgedra na die neurone in die olfaktoriese lob, wat lei tot die ontstaan van sinapse en ander komplekse prosesse soos reeds bespreek in die anatomie gedeelte [10, 11, 12].



**Fig. 1.3:** Skematiese voorstelling van die reseptormeganisme van die olfaktoriese sisteem [11].

### 1.2.3 Kodering

Die gebruik van ons reuksintuie stel ons nie net in staat om te kan ruik nie. Die seine wat ons ontvang bemiddel ons geheue, emosies, motiverings, dit maak ons bedag en beïnvloed ons besluite om 'n voorwerp of iemand te nader of te vermy. Omdat stimuli gekodeer moet word onder omstandighede waar al hierdie bogenoemde aksies ook funksioneer, is hierdie kode baie kompleks en baie moeilik om te verstaan [13].

Die vraag wat dus ontstaan is hoe die brein die stimuli, wat sy oorsprong in die reseptorneurone het en wat dan oorgedra word na die olfaktoriese lob, interpreteer?



Elke reseptorneuron in die olfaktoriese epiteel kan net een spesifieke reseptor uitdruk, maar elke reseptor kan verskeie molekules, sterker of swakker bind [11, 12]. Daar kom meer as een van dieselfde tipe reseptorneuron voor in die olfaktoriese epiteel, en dus is daar meer as een reseptortipe. 'n Spesifieke reseptor word nie gereserveer om 'n spesifieke molekule te herken, wat dan aanleiding gee tot 'n spesifieke reuk nie [13]. Die kode vir elke reuk word eerder gekenmerk deur 'n patroon van aktiwiteit oor 'n groot aantal reseptore [14]. In die oorgang vanaf die reseptore tot by die lob is daar ook 'n mate van topografiese organisasie [14]. Dit vind plaas as die aksons van reseptorneurone, alhoewel teenwoordig in verskillende posisies in die epiteel, dieselfde reseptor verteenwoordig, juis omdat daar 'n groot aantal van dieselfde reseptorneurone verspreid voorkom. Hierdie aksons konvergeer dan op dieselfde plek in die olfaktoriese lob [15, 1, 12]. Wat die brein dus eintlik waarneem is die volgende: die brein sien byvoorbeeld aktiwiteit in posisies 1, 15 en 54 van die olfaktoriese lob, wat ooreenstem met reseptore 1, 15 en 54 gevind in die betrokke reseptorneurone en dit word gesien as aroma X [1]. Ander kombinasies sal oorsprong gee aan 'n ander aroma.

### **1.3 Die klassifikasie van verskillende smake en geure**

Geure word deur die mens geklassifiseer op grond van algemene sensasies wat ervaar word wanneer verskillende kossoorte geëet word. Die vermoë om te kan proe, word moontlik gemaak deur die mens se smaak- en trigeminale sensasies asook deur aroma. Aroma speel 'n baie belangrike rol by die mens se vermoë om verskillende smake te kan ervaar, aangesien die mens se smaakreseptore slegs kan onderskei tussen sout, soet, suur en bitter. Trigeminale sensasies is nodig vir die gewaarwording van vrank-, skerp- en verkoelende effekte wat sommige kossoorte kan veroorsaak. Smaak en trigeminale sensasies tree onmiddellik in werking nadat kontak gemaak word met voedsel in die mond, aangesien nie-vlugtige, polêre en wateroplosbare stowwe verantwoordelik is vir hierdie sensasies. Tabel 1.1 bevat 'n beskrywing van die tipiese sensasies wat deur spesifieke sintuie waargeneem kan word. 'n Aroma-sensasie ontstaan wanneer aroma-molekules vlugtig genoeg is om oor 'n afstand deur die neus waargeneem te kan word. Hierdie vlugtige aroma-molekules bind dan aan reseptore in die neusgange, sodat die spesifieke aroma deur die brein waargeneem en geïdentifiseer kan word [3].



Die geure van voedsel word geklassifiseer na aanleiding van die voedselbron wat verantwoordelik is vir die spesifieke geur, aangesien meer as een geursensasie aangewakker kan word deur 'n spesifieke voedselgeurstof [3].

**Tabel 1.1:** Beskrywing van die verskillende sensasies soos waargeneem deur die reseptororgane [16].

<b>Liggaamsdeel</b>	<b>Tipe sensasie</b>	<b>Beskrywing van die sensasie wat waargeneem word</b>
Neus	Aroma/reuk	Suur Esteragtig Groen Terpenoïedagtig Speseryagtig Blomagtig Bruin Hout Laktoonagtig Swawelagtig
Mond	Trigeminaal	Skerp Vrank Koel
Tong	Smaak	Sout Soet Bitter Suur Pikant (“umami”)

### 1.3.1 Vrugtegeure

Die smaak van vrugte is 'n mengsel van soet as gevolg van suikers (glukose, sukrose en fruktose) en suur as gevolg van organiese sure (sitroensuur en maloonsuur). Dit is egter die aroma van die verskillende vlugtige verbindings in vrugte wat versoorzaak dat 'n onderskeiding gemaak kan word tussen al die verskillende soorte vrugte wat daar is. Sonder die vermoë om te kan ruik sal dit baie moeilik wees om te kan onderskei tussen peersap en appelsap. Oor 'n honderd verskillende vlugtige verbindings kan voorkom in 'n tipiese vrug, maar tog maak dit slegs 'n paar dele per miljoen uit van

die hele vrug. Die aromas van vrugte varieer baie. Sitrusvrugte soos pomelos, lemoene en suurlemoene is ryk aan terpenoïede, terwyl nie-sitrusvrugte soos appels, framboos, rooibosbessie en piesang gekarakteriseer word deur esters en aldehyede [4, 16].

### 1.3.2 Groentegeure

Die ware geur van die meeste groentesoorte kan eers werklik geproe word wanneer die rou groente opgekap of gekook word. As die groente nie opgekap of gekook word nie, sal die aromaverbindings vasgevang bly in die groente as glukosiede of glukosinolate, wat nie-vlugtige verbindings is en wat dus geen bydrae maak tot die smaak van die groente nie. Glukosied- en glukosinolaatbindings kan maklik gekloof word deur ensieme of deur die kookproses, waarna die aroma-molekules dan vrygestel word. Die “groen” smaak van baie groente (ertjies, boontjies, aspersies en wortels) word toegeskryf aan die aanwesigheid van alkielalkokspirasiene. Die aardse aroma van aartappels word veroorsaak deur ‘n ander tipe alkielalkokspirasien [4, 17].

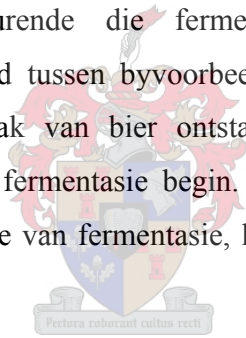
### 1.3.3 Speserygeure

Alhoewel uie en knoffel geklassifiseer word as groente kan hulle ook beskou word as speserye. Die ensiem LF sintase (“lachrymatory factor”) word vrygestel wanneer die ui gesny word en skakel 1-propeniel-L-sisteïensulfoksied in die ui om na propaanitiaal-S-oksied wat dan in die lug vrygestel word, en veroorsaak dat die traankliere tranne begin afskei [18]. Die ui word dus op grond hiervan geklassifiseer as traanwekkend. Die uitwerking van die ui op die traankliere is egter van korte duur en is heeltemal afwesig by knoffel. Aromatiese speserye is afkomstig van die droë vrugte van plante terwyl aromatiese kruie afkomstig is van die blare van plante. Vlugtige verbindings soos eugenol (naeltjies), kaneelaldehyd (kaneel) en mentol (kruisement), is verantwoordelik vir die karakteristieke aromas van sekere speserye asook vir die prikkelende sensasie soos waargeneem deur die trigeminale senuwees. Sterk speserye sluit in brandrissie of rooipeper, swart peper en gemmer. Alhoewel al hierdie speserye aromatiese karakter besit, is die prikkelende sensasie in die mond baie meer oorweldigend. Soms word knoffel, neutmuskaat en kaneel ook beskou as sterk speserye. Die verskil by hierdie speserye is dat trigeminale sensasies hoofsaaklik in die neus plaasvind. Speserye word dikwels in die vorm van essensiële olies tydens die prosessering van

voedsel gebruik. Essensiële olies word vervaardig deur stoomdistillasie van die droë gemaalde speserye en bevat baie vlugtige verbindings [17].

#### 1.3.4 Drankgeure

Drankgeure word gewoonlik onderverdeel in drie verskillende groepe, naamlik ongefermenteer, gefermenteer en saamgesteld. Melk, vrugte- en groentesap is ongefermenteerde drank. Koffie kan ook geklassifiseer word as ongefermenteerde drank aangesien dit nie gefermenteer word nie. Die koffiebone word slegs gerooster sodat geurontwikkeling kan plaasvind. Tee word geklassifiseer as 'n gefermenteerde geur, maar hierdie klassifikasie is eintlik foutief, omdat fermentasie verwys na mikrobiëse groei (soos by die gebruik van gis), terwyl die fermentasie van tee hoofsaaklik 'n proses is waartydens fenoliese verbindings geoksideer word deur ensieme in die vars teeblare. Alkoholiese drank word vervaardig met behulp van mikrobies, en die smaak ontwikkel tydens die chemiese transformasie wat plaasvind gedurende die fermentasieproses. Die unieke geure wat verantwoordelik is vir die onderskeid tussen byvoorbeeld bier en wyn, ontwikkel tydens nie-fermentasieprosesse. Die bitter smaak van bier ontstaan wanneer hops getransformeer word gedurende die kookproses, net voor fermentasie begin. Die smaak van wyn ontwikkel weer as gevolg van interaksies tussen produkte van fermentasie, lank na fermentasie reeds plaasgevind het [17, 19].



Saamgestelde drankgeure kom voor in gaskoeldrank en vrugtesappe wat deur geurdeskundiges geformuleer word om 'n spesifieke geursensasie by die gebruiker te ontlok [17, 19].

#### 1.3.5 Vleisgeure

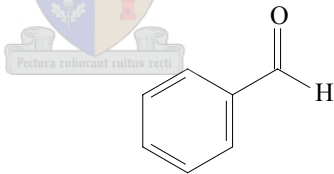
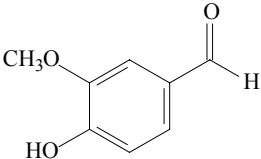
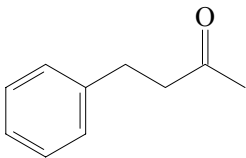
Vleis ontwikkel smaak wanneer dit gekook, gedroog of gerook word, want tydens die toevoeging van hitte vind komplekse reaksies plaas tussen aminosure en suikers in die vleis. Hierdie reaksies staan bekend as Maillard reaksies. Die lengte van, sowel as die temperatuur tydens die kookproses het 'n invloed op die tipe verbindings wat vorm en dus die spesifieke smaak van die vleis. Benewens die verskillende kookmetodes wat verskillende geure tot gevolg het, het elke dier sy eie unieke verhouding van aminosure, vetsure, en suikers wat ook 'n unieke smaak tot gevolg het. Die lipiede van bees-, lam- en varkvleis bevat hoofsaaklik versadigde vetsure wat baie moeiliker afgebreek

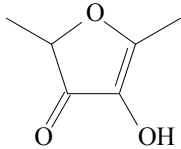
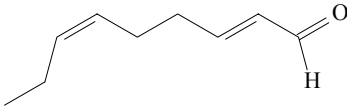
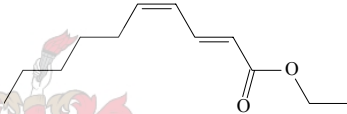
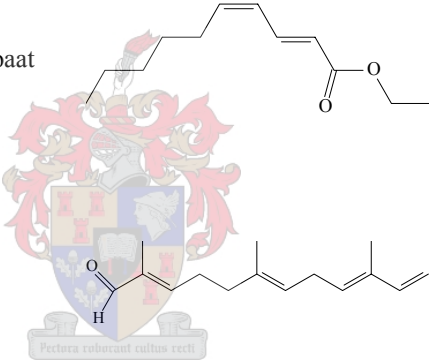
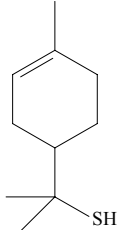
word as onversadigde vetsure, wat weer voorkom in vis en pluimvee. Die aanwesigheid van onversadigde vetsure in vis en pluimvee het ook tot gevolg dat hierdie kossoorte vinniger bederf raak [19].

## 1.4 Chemiese verbindings verantwoordelik vir aromas, geure en smake

'n Spesifieke smaak ontstaan wanneer verskeie chemiese verbindings kontak maak met smaak-, trigeminale- en aromareseptors. Die kenmerkende smaak van 'n spesifieke kossoort is afkomstig van 'n enkele klas van verbindings, maar 'n aroma is 'n kombinasie van vlugtige verbindings wat elk hulle eie reuk het. Variasies in die konsentrasie van die verbindings verantwoordelik vir 'n spesifieke aroma, gee aanleiding tot die ontstaan van nuwe aromas. Daar bestaan egter wel vlugtige verbindings wat die essensie vorm van 'n sekere aroma. Hierdie verbindings staan bekend as karakter-impakverbindings. Tabel 1.2 bevat 'n paar voorbeelde van karakter-impakverbindings [20].

**Tabel 1.2:** Karakter-impakverbindings gevind in sommige vrugte [20].

Voedsel waarin die verbinding voorkom	Karakter-impak verbinding	Struktuur van die verbinding	Klas waaraan die verbinding behoort
Amandel	Bensaldehyd		Aldehyd
Vanilla	Vanillien		Fenol, aldehyd
Framboos	4-Feniel-2-butanoon		Ketoon

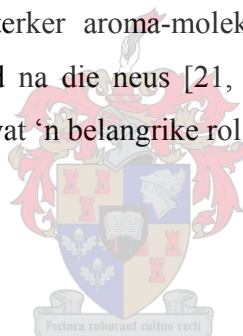
Voedsel waarin die verbinding voorkom	Karakter-impak verbinding	Struktuur van die verbinding	Klas waaraan die verbinding behoort
Aarbeie, pynappel	Furanol		Alkohol, ketoon
Komkommer	(2E)- (6Z)-nonadiënaal		Aldehyd
Barlett peer	Etiel-2,4-dekadiënoaat		Ester
Mandaryn lemoen	$\alpha$ -Sinesaal		Aldehyd, terpeen
Pomelo	1-p-Menteen-8-tiol		Terpeen, tiol

Chemiese verbindings wat verantwoordelik is vir geure, word geklassifiseer as vlugtige of nie-vlugtige verbindings. Die verbindings word so geklassifiseer aangesien vlugtige aromaverbindings deur die neus of oesofagale weë beweeg tot by die olfaktoriese neurone (reseptore) waar 'n respons ontstaan. Nie-vlugtige verbindings kan nie deur die neus waargeneem word nie, maar wel deur smaakreseptore op die tong en binnewande van die mond, sodat 'n respons kan ontstaan [21].

### 1.4.1 Vlughtige aromaverbindings

Daar word beraam dat die mens kan reageer op 5 000 - 10 000 aromatiese verbindings. Hierdie verbindings is gedeeltelike lipied-oplosbare organiese molekules met lae molekulêre massas (laer as 300 Da). Baie van hierdie vlughtige aroma-molekules is al geïdentifiseer sedert gaschromatografiese en massaspektrometriese analyses gedoen kon word. Alhoewel beide hierdie metodes baie doeltreffend is om verbindings te kan skei en moontlik te identifiseer, kan dit geen aanduiding gee van die individuele bydraes wat al die verbindings lewer tot die algehele geur of aroma van 'n produk nie. Dikwels word gevind dat die grootste pieke in 'n gaschromatogram nie noodwendig verteenwoordigend is van die geur of algehele aroma van 'n spesifieke kossoort nie. Van die verbindings wat die grootste impak het op die smaak en aroma van kossoorte en ander produkte, is die suurstofbevattende terpene wat in baie klein hoeveelhede voorkom. Koolwaterstowwe soos limoneen, tree op as 'n vlughtige "oplosmiddel" of draer vir meer kragtiger aroma-molekules. Sulke vlughtige oplosmiddels help ander sterker aroma-molekules om meer effektief te verdamp en sodoende deur die lug gedra te word na die neus [21, 22]. Die volgende groepe verbindings is voorbeelde van vlughtige verbindings wat 'n belangrike rol speel in sekere aromas.

#### 1.4.1.1 Aldehyede



Aldehyede speel 'n belangrike rol om karakteristieke geure aan voedsel te gee. Onversadigde alifatiese aldehyede het sterker aromas as die versadigde analoë. In groente is die groen geur afkomstig van (*E*)-3-heksenaal terwyl dieselfde groen geur in blare veroorsaak word deur (*E*)-2-heksenaal. Kort-ketting versadigde alifatiese aldehyede vorm 'n baie belangrike deel van die geur van tamaties en oor die algemeen is aldehyede verantwoordelik vir baie vrugtearomas. Daar is gevind dat verskille in die geure van appels ontstaan as gevolg van kwantitatiewe variasies in die vorming van (*E*)-2-heksenaal en (*E*)-3-heksenaal en dieselfde word waargeneem vir die ooreenstemmende alkohole. Bensaldehyd is verantwoordelik vir 'n amandelgeur en dit word dikwels geassosieer met bessie-geure. Die aroma van sitrus word toegeskryf aan alifatiese aldehyede soos dekanaal en ander suurstofbevattende terpene soos terpineol en sitraal [22].

#### 1.4.1.2 Ketone

Alhoewel ketone oor die algemeen baie hoë reukdrumpelwaardes het, is daar tog 'n handjievol ketone, soos alkan-2-one met verskillende kettinglengtes in suiwelprodukte, wat 'n belangrike rol speel in sekere geure [22].

#### 1.4.1.3 Alkohole

Die drumpel waarby alkohole geruik kan word is baie hoër as die drumpel vir die ooreenstemmende aldehyede. As gevolg van hierdie hoër aroma-drumpel van alkohole, speel hulle 'n minder belangrike rol as geurstowwe. (*E*)-3-heksenol het 'n groen aroma en kom voor in verskeie hoër plante, dikwels saam met (*E*)-3-heksenaal. (*E*)-3-heksenol is in 1895 ontdek in gefermenteerde teeblare. Een van die hoofverbindings wat deel uitmaak van die samestelling van vlugtige verbindings van grenadella, is 1-heksanol. Die geur van die vrug word egter nie bepaal deur die alkohol nie, maar deur spoor-hoeveelhede van swavel-bevattende verbindings [22].

#### 1.4.1.4 Organiese sure

Alhoewel vlugtige sure verantwoordelik is vir 'n suur smaak in die mond, het hulle ook karakteristieke aromas. So byvoorbeeld veroorsaak botter- en kaproësuur 'n bottergeur wanneer hulle voorkom in sekere konsentrasies. 'n Baie belangrike komponent van Switserse kaas is ook 'n suur, naamlik propioonsuur. Die verhitting van groente- en dierolies in die teenwoordigheid van lug gee aanleiding tot die vorming van 2- en 3-heksenoësuur wat 'n belangrike bydrae lewer tot die smaak van framboos. Verskeie alkiel-vertakte vetsure is belangrike komponente van verskeie voedselgeure. 'n Goeie voorbeeld hiervan is 2-metielbutanoësuur wat 'n baie belangrike deel uitmaak van die aroma van rooibosbessie. Die kenmerkende aroma van Turkse tabak kan tot 'n groot mate toegeskryf word aan 2-metielpentanoësuur en 3-metielbutanoësuur. 2-Metielpentanoësuur het die laagste geurdrumpel van al die versadigde vetsure en die geur is soos dié van Limburgse kaas. Die reuk van rou skaapvleis kan toegeskryf word aan die teenwoordigheid van vertakte en onversadigde vetsure wat 8-10 koolstowwe bevat [22].

Sitroensuur kom voor in sitrusvrugte en is verantwoordelik vir die vrang/suur smaak van hierdie vrugte. Die vars vrang smaak van appels en tamaties is afkomstig van sitroensuur en appelsuur terwyl wynsteensuur en appelsuur hoofsaaklik voorkom in druie. Melkprodukte soos karringmelk en jogurt bevat hoofsaaklik melksuur [25].

#### 1.4.1.5 Laktone

Laktone het baie lae reukdrumpelwaardes in die omgewing van 0,1 dpm en om hierdie rede speel hulle 'n groot rol in sekere geure. Laktone word gevorm deur interne verestering van die ooreenstemmende hidroksisure en daar bestaan 'n ewewig tussen die laktoon en die betrokke hidroksisuur wat bepaal word deur die ringgrootte van die laktoon. 4-Hidroksisure vorm  $\gamma$ -laktone en 5-hidroksisure  $\delta$ -laktone. Tydens die stoortydperk van etiel-5-hidroksi-oktanoaat en etiel-5-hidroksidekanoaat verander die soet, pynappel aroma na 'n intense kokosneutaroma wanneer die hidroksi-esters gehidroliseer word om 'n oop karboksielsuurgroep te gee wat sikliseer om die ooreenstemmende  $\delta$ -laktone te vorm.  $\delta$ -Laktone gee aan baie suiwelprodukte die kenmerkende romerige en melkerige smaak. Die meeste  $\delta$ -laktone word aangetref in dierprodukte terwyl  $\gamma$ -laktone meestal voorkom in plante. Verskillende  $\delta$ -butirolaktoonderivate is al geïdentifiseer as deel van die vlugtige verbindings wat voorkom in verskeie kossoorte, en alhoewel dit aanleiding gee tot baie individuele geure, is die algehele effek 'n soet, geroosterde aroma. Die geur van perske bevat talle laktone [23].

#### 1.4.1.6 Esters

Alifatiese esters speel 'n baie belangrike rol by die geure van vrugte en moontlike verskille in vrugtegeure word waargeneem as gevolg van 'n verskil in die kombinasies en konsentrasies waarin hierdie esters voorkom in die verskillende vrugte. Appels, pynappels, pere en aarbeie is van die vrugte wat baie esters bevat [23].

#### 1.4.1.7 Fenole

Etiel-, viniel- en metoksifenole word beskou as van die belangrikste molekules wat bydra tot die slegte aromas in wyn. Vlugtige fenole is nie teenwoordig in vrugtesap nie, wat beteken dat hulle



ontstaan *via* die metabolisme van sekere voorloper-molekules. Daar is twee verskillende paaie moontlik, naamlik 1) die biochemiese afbreking van fenoliese sure tydens fermentasieprosesse met gis en 2) die chemiese afbreking van lignien wat afkomstig is van die houtvate waarin die wyn verouder word. Fenole in gerookte produkte is ook afkomstig van lignien en hulle ontstaan wanneer hout stadig verbrand word. Gerookte ham en spekvleis bevat dus fenole en metoksifenole wat verantwoordelik is vir die gerookte smaak van hierdie produkte. Fenole is ook dikwels die karakterimpak-verbindings van spesifieke speserye, soos byvoorbeeld eugenol (alkohol en fenol), wat afkomstig is van naeltjies, en vanillien (aldehyd en fenol) vanaf vanilla [23].

#### 1.4.1.8 Terpenoïede

Terpenoïede ontstaan in die natuur vanaf 'n metaboliese tussenproduk genaamd mevaloonsuur. Hierdie verbinding vorm die basiese strukturele eenheid van alle terpenoïede, naamlik die isopreen-eenheid  $[(C_5H_8)_n]$ . Terpenoïede kan onderverdeel word as hemi-, mono-, seskwi-, di-, tri- en tetraterpenoïede wat onderskeidelik een, twee, drie, vier, ses en agt isopreen-eenhede besit. Alhoewel hierdie terpenoïede bekend is, is dit veral die monoterpenoïede wat verantwoordelik is vir die kenmerkende geure van baie kruie, speserye en sitrusvrugte [23].

Die benaming *terpene* verwys na terpenoïede wat koolwaterstofverbinding is. Terpene kom voor in die essensiële olies van die meeste plante en dikwels is hulle aroma-eienskappe nie so indrukwekkend soos dié van ander terpenoïede nie, want hulle aroma-drumpelwaardes is oor die algemeen hoër as dié van ander terpenoïede. Dikwels tree die terpene op as oplosmiddels vir ander terpenoïede, en verbeter die vermoë van die terpenoïede om die reseptors in die neus te bereik. Die geoksideerde monoterpene wat die vollopste voorkom in die natuur is linalool, geraniol, nerol en sitronellol. Hierdie laasgenoemde verbindinge en alle ander verbindinge, soos die ooreenstemmende esters en aldehyede afkomstig van hierdie verbindinge, is opties aktief en die verskillende enantiomere het verskillende aromas en aroma-kwaliteite. Limoneen word geklassifiseer as 'n monosikliese monoterpeen en daar is twee opties aktiewe vorms. (+)-Limoneen word hoofsaaklik gevind in sitrusspesies, terwyl (-)-limoneen voorkom in *Mentha*- en *Pinus*-spesies. Bisikliese monoterpene soos  $\alpha$ -pineen,  $\beta$ -pineen en kamfeen kom baie algemeen voor in vlugtige plantprodukte [23].

Die konsentrasies van seskwiterpene in essensiële olies is baie laag, maar hierdie verbindings is baie belangrike geurverbindings, wat soms selfs karakter-impakverbindings kan wees. Die seskwiterpeen kariofilleenoksied, wat 'n komponent is van die aroma van dagga, maak dit vir opgeleide honde moontlik om dagga te kan uitken. Aangesien die drumpel waarby honde aromas kan waarneem  $10^6$  keer laer is as die aroma-drumpel van mense, kan hulle so min as  $1\mu\text{g}$  kariofilleenoksied waarneem. Ander seskwiterpene soos humuleenepoksied dra by tot die hop-karakter van bier en (+)- $\beta$ -bisabol en bisaboleenoksied in die botsels van katoenplante gee aan die botsels die aroma van appelbloeisels [23, 24].

#### 1.4.2 Nie-vlugtige verbindings

Baie min vlugtige verbindings kan deur die smaakbekertjies op die tong waargeneem word, terwyl nie-vlugtige verbindings juis deur die tong geproe word. Nie-vlugtige verbindings behoort nie 'n aroma te hê nie, maar hulle kan tot so 'n mate afgebreek word dat hulle wel vlugtige verbindings vrystel. Omdat nie-vlugtige verbindings hoofsaaklik net deur die tong waargeneem word, kan hulle eintlik net vier sensasies veroorsaak, naamlik soet, sout, suur of bitter [25].

##### 1.4.2.1 Aminosure en peptiede

'n Dipeptied soos aspartaam word kommersieël gebruik as 'n lae-kalorie versoeter wat geen bitter of metaalagtige nasmaak het nie. Aminosure soos prolien en alanien is soet met 'n effense bitterheid, terwyl ander aminosure soos fenielalanien, isoleusien en triptofaan baie bitter is. Aminosure en peptiede wat vorm tydens die afbreking van melkproteïene, is verantwoordelik vir die bitter smaak in melkprodukte [25].

##### 1.4.2.2 Suikers

Suikers kom voor in alle groen plante, en van al die koolhidrate is die disakkaried sukrose een van die belangrikstes. Wanneer vrugte ryp word, word sukrose deur 'n ensiem omgeskakel na fruktose en glukose. In plante soos aartappels word sukrose weer omgeskakel na stysel. Die sap van sitrusvrugte bevat groot hoeveelhede sukrose, glukose en fruktose [25].

#### 1.4.2.3 Soute

Soute word geklassifiseer as ioniese verbindings omdat hulle in water dissosieer in anioniese (-) en kationiese (+) spesies. Dit is hoofsaaklik die katione wat verantwoordelik is vir die sout smaak van soute, terwyl die anioon tot 'n mindere mate bydra. MSG (mononatrium glutamaat) en 5' nukleotiede word gebruik in baie southappies as middels wat 'n spesifieke geur help versterk. MSG en IMP (inosien 5'-monofosfaat) is van die belangrikste geurversterkers van vleisgeure. IMP vorm gedurende die veroudering van vleis vanaf ATP, en is die hoofnukleotiedverbinding wat aangetref word in dooie spiere. 5' Nukleotiedes versterk spesifieke goeie kwaliteite van voedselgeure en onderdruk ongunstige kwaliteite [25, 26].

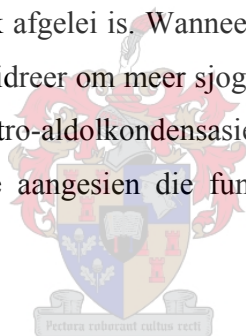
#### 1.4.2.4 Flavonoïede en alkaloiëde

Flavonoïede en alkaloiëde is verbindings met heterosikliese ringsisteme met suurstof as die heteroatoom in flavonoïede en stikstof as die heteroatoom in alkaloiëde. Flavonoïede en alkaloiëde gee bitter en selfs skerp geure aan sekere produkte. Nikotien in tabak en kaffeïen in koffie en tee is alkaloiëde wat 'n bitter smaak veroorsaak, terwyl naringien en limonien dieselfde effek het in pomelos. Flavonoïede soos katesjiene, is belangrike geurkomponente in tee en dit verskaf die vrang en bitter smaak wat so kenmerkend is van tee. Die verskil in smaak tussen groen en swart tee kan toegeskryf word aan die verskillende katesjiene wat aanwesig is in die groen en swart tee. Groen tee bevat monomeriese katesjiene wat, as die tee gefermenteer word, polimeriseer om dimere, trimere en ander groter polifenole te vorm om 'n ander smaak aan swart tee te gee [26, 27].

Polimeriese flavonoïedfenole dra by tot die bitter en vrang smaak van wyne, maar aangesien die polimeriese verbindings meer vrang is as die bitter monomeriese flavonoïede, is verouderde wyn wat hoofsaaklik uit die polimere bestaan, minder bitter maar effens meer vrang as jonger wyn wat minder polimere besit [26, 27]. Die vrangheid van verouderde wyn raak egter met verloop van tyd meer "sag" as verdere polimerisasie plaasvind, omdat daar minder interaksie met die smaakreseptore is.

#### 1.4.2.5 Fenole

Die warm sensasie wat deur brandrissies veroorsaak word, is afkomstig van verbindings wat behoort aan 'n familie van vanillielamiede wat bekend staan as kapsaïsinoïede. Hierdie verbindings besit 'n fenol, 'n amiedbinding en 'n langketting-vetsuur, en al drie hierdie kenmerkende groepe in die verbinding veroorsaak die warm sensasie. Die prikkelsensasie wat swart peper tot gevolg het, kan toegeskryf word aan die verbinding piperien. Piperien is nie 'n fenol soos die kapsaïsinoïede nie, want aan die aromatiese ring is 'n metileendioksigroep gekoppel in plaas van 'n hidroksigroep. As gevolg van die afwesigheid van die fenol funksionaliteit asook die groter afstand tussen die aromatiese ring en die waterstofbindende groep (N), is piperien minder prikkelend as die kapsaïsinoïede, maar veroorsaak dit 'n soortgelyke sensasie. Die prikkelsensasie van gemmer word veroorsaak deur twee fenolfamilies, naamlik die gingerole en sjogaole. Die strukture van die verbindings in hierdie families is soortgelyk aan dié van die ware verbindings, gingerol en sjogaol, waarvan die families se name dan ook afgelei is. Wanneer gemmer verouder, is die prikkelsensasie gewoonlik sterker omdat gingerol dehidreer om meer sjogaol te vorm wat verantwoordelik is vir die sterker sensasies. Gingerol kan *via* retro-aldolkondensasie singeroon en heksanaal vorm, en dan is die prikkelsensasie heeltemal verlore aangesien die funksionele groepe wat die prikkelsensasie veroorsaak, afwesig is [28].



#### 1.4.2.6 Isotiosianate

Isotiosianate kom voor in radysplante, en dit is hierdie verbindings wat gebruik word om aan mosterd die bekende smaaksensasie te gee [28].

### 1.5 Terpenoïede onder die soeklig

Terpene en terpenoïede is van die mees interessante groepe chemiese verbindings wat wyd verspreid in die natuur voorkom, veral in die planteryk. Dit is merkwaardig dat terpenoïede soveel strukturele en funksionele diversiteit vertoon as in ag geneem word dat hierdie verbindings lipofilies van aard is en almal gevorm word vanaf mevalonaat en isopenteniël pirofosfaat [29]. In plante het terpenoïede verskeie funksies soos om groei te reguleer, om te dien as aanvullende pigmente tydens fotosintese,

om sekere diere te lok vir bestuiwing en om as afweermiddel te dien teen herbivore wat die plante vreet [30]. Sommige van hierdie verbindings in plante kan toksies wees vir diere, dit kan insekte se hormone beïnvloed tydens metamorfose en selfs die normale groei en voortplanting van diere versteur. Terpenoïede is unieke verbindings wat vlugtig is en soms intense aromas het wat dit vir plante moontlik maak om met mekaar, met diere en selfs met mikroörganismes te kommunikeer [29, 31].

### 1.5.1 Monoterpenoïede

Monoterpenoïede is hoofsaaklik plantprodukte en is die hoofkomponente van olies wat verkry word deur die stoomdistillasie van plantmateriaal [32]. Verskeie geledpotiges maak ook gebruik van monoterpenoïede as komponente van afskeidings wat dien as afweermiddels teen predatore of as feromone [33]. Mevaloonsuur (MVA) gee aanleiding tot die vorming van isopreen-eenhede, wat die basiese strukturele eenheid van terpenoïede is. Die kondensasie van twee isopreen-eenhede op verskillende wyses, lei tot die vorming van monoterpenoïede [32]. Asikliese (geraniol), monosikliese ( $\alpha$ -terpineol), bisikliese (kamfer), en onreëlmatige (aktinidien) monoterpenoïede is verskillende onderverdelings wat in hierdie groep van terpenoïede voorkom [33].

Monoterpenoïede kom in baie klein hoeveelhede voor in die geure van blomme en hulle teenwoordigheid hou direk verband met die aantrekking van insekte wat help met die bestuiwing van die plant [34]. Weens die kenmerkende geure van monoterpenoïede word hierdie verbindings baie in die parfuumbedryf gebruik. Hoë konsentrasies monoterpenoïede kom voor in die blaarweefsel van verskeie plante, soos byvoorbeeld die lipblommiges. By houtagtige plante, veral die gimnosperme, akkumuleer monoterpenoïede in die blaarnaalde en in die oleohars van die bas. Laasgenoemde stoorplek van monoterpenoïede kan moontlik die afweringstegniek van plante teenoor sekere herbivore verklaar, maar die bewyse vir hierdie verskynsel is nog redelik onvolledig [34]. Die effek wat monoterpenoïed-toksiteit op soogdiere het, is nie baie groot nie en het dikwels net tot gevolg dat die dier minder of glad nie van 'n spesifieke plant sal eet nie. Aangesien monoterpenoïede redelik vlugtig is, gaan die meeste van die verbindings in elk geval verlore voordat dit die maag bereik. Sou van die monoterpenoïede wel die maag bereik, inhibeer dit die werking van die mikroörganismes wat in die rumen voorkom. Die mikroörganismes help om die verteringsproses te optimaliseer om sodoende soveel moontlike voedingswaarde uit die kos te verkry. Daarom, as die

mikroorganismes beskadig word deur die monoterpenoïede, daal die voedingswaarde van die kos en sal die dier minder of glad nie van die plant eet nie. Sommige herbivore het glad nie 'n probleem met plante wat ryk is aan terpenoïede nie, maar dit is 'n baie ongewone verskynsel. Hierdie diere se mikroorganismes kom nie in die maag voor waar die monoterpenoïede dit kan beskadig nie, maar heelwat verder in die spysverteringstelsel. Die monoterpenoïede word dan uit die maag geabsorbeer en gaan na die lewer vir detoksifisering [35].

Die effek wat monoterpenoïede op plantetende insekte het, is baie veranderlik en kompleks, maar oor die algemeen dien hierdie verbindings as afweermiddels teen insekte. Die meeste insekte het egter alreeds aangepas by die toksiese effek van monoterpenoïedverbindings. Die konsentrasies van die monoterpenoïede in die plant kan egter as gevolg van omgewingsfaktore varieer en dit kan veroorsaak dat die insekte 'n spesifieke plant vir 'n tyd lank sal vermy. Sommige insekte word na plante gelok, want hulle gebruik juis die monoterpenoïede vir feromoondoeleindes of, soos reeds genoem, speel sommige insekte 'n belangrike rol by die bestuiwing van sekere plante [36].

**Tabel 1.3:** Voorbeelde van die funksies van plantaardige monoterpenoïede [34].

<b>Ekologiese rol</b>	<b>Voorbeeld</b>
Beskerming teen herbivore	Kamfer uit wit sparplante dien as afweermiddel teen springhase [37].
Aantrekking vir bestuiwing	Terpenoïede in orgideë trek manlike bye aan vir bestuiwing deur middel van pseudokopulasie [38].
Feromoon produksie	Mirseen wat in die oleohars van dennebome voorkom, word deur 'n sekere baskewer as 'n seksferomoon gebruik [39].
Chemiese beskerming	<i>Eyphdryas</i> skoenlappers stoor iridoïede (monoterpenoïed-laktone) wat hulle kry vanaf <i>Plantago</i> as afweermiddel teen voëls [40].
Plant-plant allelopatie	Terpenoïede van <i>Calamintha</i> verhoed dat sekere grassoorte rondom die struik groei [41].

### 1.5.2 Seskwiterpenoïede

Seskwiterpenoïede kom ook hoofsaaklik in plante voor, maar is al aangetref in die diereryk, veral by insekte, en ook in diergroepe soos *Coelenterata* (see anemone, korale, jellievisse) en *Mollusca* (slakke) [42]. Seskwiterpenoïede bevat drie isopreen-eenhede en farnesielpirofosfaat is die algemene biosintetiese tussenproduk vir die vorming van hierdie verbindings. In die natuur kom baie meer seskwiterpenoïede as monoterpenoïede voor en hulle is minder vlugtig as gevolg van hulle hoë molekulêre massas [43]. Die funksies van seskwiterpenoïede is baie omvattend en toon baie ooreenkomste met die funksies van monoterpenoïede. Tabel 1.4 bevat 'n opsomming van die rol wat seskwiterpenoïede in veral plante speel. Baie merkwaardig is die voorkoms van die hormoon JH3 (jeughormoon III) in sipergras, *Cyperus iria*. Hierdie hormoon het 'n radikale invloed op die ontwikkeling van geslagsorgane van veral vroulike insekte; tot so mate dat opgehoopde hoeveelhede van hierdie hormoon daartoe kan lei dat die insekte steriel raak [44]. Sommige plante besit seskwiterpenoïede met antimikrobiële aktiwiteit om die plant te beskerm teen plantetende insekte. Twee voorbeelde van bogenoemde verbindings wat sekere plantetende miere afweer, is kariofilleen en kariofilleenepoksied, wat die vermoë het om die fungus waarvan die miere leef, te beskadig [44]. Bome bevat ook seskwiterpenoïede, veral in die hars en kan insekte soos termiete afweer [45]. Die geure van seskwiterpenoïede is oor die algemeen nie baie prominent nie as gevolg van hul lae vlugtigheids, maar sommige seskwiterpenoïede word tog in die parfuumindustrie gebruik vir hulle speseryagtige geure. Farnesol en nerolidol het blomagtige geure en sekere essensiële olies soos sandelhoutolie en kuskusgrasolie se geure is te danke aan die seskwiterpenoïede wat in hierdie olies voorkom [46].

**Tabel 1.4:** Sommige van die funksies van plantaardige seskwiterpenoïede. [44]

<b>Ekologiese rol</b>	<b>Voorbeeld</b>
Beskerming teen herbivore	Seskwiterpenoïedlaktone van sigorei-plante [47].
Aantrekking vir bestuiwing	Seskwiterpene in orgideë trek manlike bye aan vir bestuiwing deur middel van pseudokopulasie [38].
Feromoon-mimiek	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseen in <i>Solanum</i> weer aanvalle van plantluise af [39].

Ekologiese rol	Voorbeeld
Antivoeding-aktiwiteit	Kariofilleenepoksied in <i>Atta cephalotes</i> verhoed dat plaaginsekte die plant se blare vreet [48].
Fitoaleksienbeskerming van plante teen infeksies wat deur fungus veroorsaak word.	Risjitien en ander verwante seskwiterpenoïede wat aangetref word in <i>Solanaceae</i> [49], [50].
Hormonale beskerming teen insekte	Jeughormoon III sintese in <i>Cyperus iria</i> [51].

### 1.5.3 Diterpenoïede

Diterpenoïede word *via* die C<sub>20</sub> voorloper geranielgeraniolpirofosfaat gevorm [52], en kan asiklies, bisiklies, trisiklies, tetrasiklies of makrosiklies wees, en besit dikwels addisionele ringsisteme in sykettings of in estersubstitusies [53]. Geranielgeraniol en sy isomeer geraniellinalool is asikliese diterpenoïede, en so ook fitol, wat deel uitmaak van die chlorofielmolekuul en die sykettings van vitamien A en K1 [54]. Diterpenoïede kom hoofsaaklik voor in fungi en plante en kan verder in twee groepe verdeel word, naamlik die harssure en die gibberellien-plantgroeihormone [53, 52]. Abiëtiensuur en pimaarsuur is twee voorbeelde van harssure wat voorkom in veral keëldraende plante en peulplante [53]. Hierdie harssure dien as beskerming vir die bome teen infeksies en aanvalle deur insekte. Gibberellien-plantgroeihormone kom universeel voor in plante om plantgroeit te stimuleer [53]. Verskeie diterpenoïede is baie giftig, soos byvoorbeeld grajanotoksien I in *Rhododendron* en verskeie ander plante van die erika-familie. Grajanotoksien I kom voor in die nektar van hierdie plante en die heuning wat bye van hierdie nektar maak is giftig [53]. Behalwe vir grajanotoksien I, is daar ook ander toksiese diterpenoïede soos die reeks forbol-esters van *Croton*-olie en *Euphorbia*-rubbermelk, wat irriterend van aard is en ko-karsinogeniese eienskappe toon [53]. Diterpenoïede kan plante help beskerm teen insekte deur tydens larwe-ontwikkeling in te meng met normale hormoonprosesse. Sommige plante met diterpenoïede het antivoedingsaktiwiteit, wat veroorsaak dat insekte nie veel voedingswaarde uit die spesifieke plant kan kry nie, en die plant dan eerder vermy [55]. Tabel 1.5 gee 'n opsomming van die rol wat diterpenoïede in plante speel.



**Tabel 1.5:** Sommige van die funksies van plantaardige diterpenoïede [55].

<b>Ekologiese rol</b>	<b>Voorbeeld</b>
Beskerming teen herbivore	Abiëtiensuur in die hars van dennebome [56].
Inmenging met normale hormoon-werking van insekte	Kourenoësuur in sonneblomme [57].
Antivoedingsaktiwiteit	Ajugarien in die blare van <i>Ajuga remota</i> [58].
Fitoaleksienbeskerming van plante teen infeksies wat deur fungus veroorsaak word.	Momilaktone in rys, <i>Oryza sativa</i> [49].
Antifungusbeskerming	Duvatriënole in <i>Nicotiana spp</i> [50], [59].

## 1.6 Heuningbostee

### 1.6.1 Inleiding

Heuningbostee is 'n kruietee eie aan Suid-Afrika, wat gemaak word van die blare en takkies van die heuningbosplant (*Cyclopia spp.*). Heuningbostee, wat ook bekend staan as “Suid-Afrika se soetste tee”, het, soos die beskrywing impliseer, 'n baie aangename soet smaak en aroma, wat herinner aan dié van warm appelkooskonfyt, blomme, heuning en droë vrugte, met 'n effense speseryonderton [60].

Internasionale belangstelling in heuningbostee het reeds ontstaan in die dae toe die Kaap in 1652 gekoloniseer is, en die Nederlandse en Britse teehandel 'n florerende bedryf geword het. Die Kaapkolonie was 'n belangrike voorraad-basis vir die Nederlands-Oos-Indiese Maatskappy wat handel gedryf het in Indiese tee en Suidoos-Asiese speserye. Kort na die stigting van die Kaapkolonie het botaniste begin om die flora van die Kaap aan te teken, en dit is in hierdie botaniese literatuur van 1705 wat daar vir die eerste keer melding gemaak is van die heuningbosplant [61], maar die *Cyclopia* geslag is egter eers in 1808 taksonomies beskryf [62]. Alhoewel daar geen geskrewe dokumente bestaan dat inheemse groepe soos die Khoisan heuningbos as 'n tee gebruik het nie, word dit algemeen aanvaar vanweë die gesondheidsvoordele van die tee. Koloniste aan die

kolonie het op hulle beurt weer die praktyke van inheemse groepe waargeneem, en is op hierdie manier bekendgestel aan heuningbostee en verskeie bewyse hiervoor is bekend.

Tydens 'n plantversamelingstog in die Kaap in 1772 word die naam “honigtee” aangeteken vir heuningbostee deur 'n Sweedse plantkundige, genaamd Thundberg en in 1815 verwys Latrobe in 'n reisverhaal na die algemene gebruik van “tee-water” in die Langkloof-area waar heuningbos veral volop voorkom [62]. Latrobe verwys ook na die altyd-gevulde trekpot wat die besoeker opval. James Holman maak melding van 'n “infusion of a wild herb that is used for tea” tydens sy reis deur die Langkloof in 1829 en in 1830 word die gebruik van heuningbostee as 'n aansterkmiddel aangeteken [62]. In 1881 word die resultate van 'n anatomiese en chemiese studie op *C. genistoides* in 'n oorsese farmaseutiese joernaal gepubliseer met die vermelding van die volksnaam “honigthee” [62]. In die 1890's word “blommetjies” geoes naby Riversdal waar *C. sessiflora*, *C. subternata*, *C. intermedia* en *C. maculata* verspreid voorkom [62]. Gedurende die 1930's oes George Nortjé bergtee (*C. intermedia*) in die oostelike deel van die Kougaberge en bied dit te koop aan. Vanaf 1940 en tydens die oorlogsjare was daar 'n verhoogde aanvraag na die produk, maar geleidelik is minder daarvan benut en is dit slegs gemaak deur individue vir eie gebruik en soms is dit by padstalletjies en in winkels op die platteland verkoop [62]. Gedurende die tydperk van 1940-1990 was daar sporadies 'n toename in die teeproduksie in die Langkloof en bemarkingspogings is ook in hierdie tydperk geloods, maar nie met groot sukses nie [62].

Vanaf 1992 het 'n dekade van snelle ontwikkeling gevolg vir die heuningbosteebedryf sodat die uitvoer van heuningbostee vandag 'n baie groot bedryf geword het [62]. Die geurindustrie toon ook belangstelling in die vlugtige fraksie van gefermenteerde heuningbostee as hulpmiddel om die geure van sekere voedselsoorte te versterk.

### 1.6.2 *Cyclopia* spesies en hulle habitat

Heuningbos is 'n struik van die *Fabaceae* familie (peulplante) wat behoort aan die genus *Cyclopia* wat verder ingedeel is onder die tribus *Podalyrieae* [63, 64]. 'n Tribus is 'n intermediêre rang tussen 'n familie en 'n genus. Daar is alreeds meer as 20 *Cyclopia* spesies beskryf [65, 61, 64] en hulle kom verspreid voor in die fynbosbium van Suid-Afrika, veral in die kusstreke van die Wes- en Oos-Kaap vanaf Darling tot by Port Elizabeth [64]. Die groeisone van heuningbos word in die

Noorde begrens deur verskeie bergreekse soos die Sederberg, Koue Bokkeveldberge, Klein Swartberg, Groot Swartberg en die Kougaberge [64].

Die meeste heuningbosplante groei aan die koel skadukant van die suidelike hange van bergreekse [64] en verkies grond met 'n lae pH (suur grond), wat arm is aan fosfaat, wat goed gedreineer is, en 'n lae klei-inhoud het [66].

Anders as in die geval van rooibos- en swart tee, word heuningbostee gemaak deur verskeie spesies te gebruik wat in die verskillende klimaatstreke van die Suidelike Provinsie van Suid-Afrika voorkom. Om hierdie rede het die plaaslike inwoners verskillende beskrywende name aan die tee gegee na aanleiding van die habitat en die voorkoms van die tee [64].

Daar is tans ongeveer vyf heuningbosspesies waarvan daar geoes word:

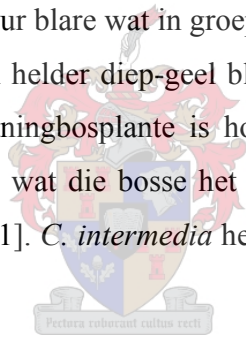
- *Cyclopia genistoides* (kustee of heuningtee) kom die wydste verspreid voor van al die spesies en wel vanaf Malmesbury aan die Weskus, tot by Albertinia in die Suidwes-Kaap. Die spesie se blomtyd is van September tot Oktober. *C. genistoides* is 'n herspruiter, wat beteken dat die plant weer uitloop nadat dit gesny is, of na 'n brand [67].
- *C. maculata* (Genadendaltee of vleitee) groei hoofsaaklik naby waterstrome en kom voor vanaf Bainskloof tot by Riversdal. *C. maculata* het 'n kort blomtyd vroeg in die lente. Hierdie spesie is nie 'n herspruiter nie, maar 'n hersaaier, wat beteken dat die spesie nie maklik uitloop as hy gesny word nie, maar saad in die grond sal wel ontkiem na 'n brand [67].
- *C. intermedia* (Kougabergtee of bergtee) kom voor in die hoë pieke van die Witteberg en Langeberg tot by die Van Stadensberge in die ooste. Blomtyd is van September tot November, en die spesie is ook 'n herspruiter [67].
- *C. sessiliflora* (Heidelbergtee) kom voor in die Langeberg en Warmwaterberge. Blomtyd is in Mei of Junie en die spesie is 'n herspruiter [67, 64].

- *C. subternata* (vleitee) is 'n hersaaier wat voorkom in gebiede wat klam is, veral in die Langeberg tot Tsitsikamaberge. Blomtyd is baie kort en vroeg in die lengte [67].

Ten spyte van die feit dat daar meer as 20 heuningbosspesies in die natuur voorkom, word net 'n paar spesies kommersieel gebruik vir die vervaardiging van heuningbostee. *C. intermedia* is die belangrikste spesie wat gebruik word vir die maak van heuningbostee vir Duitsland, een van die grootste verbruikers. Ongelukkig groei hierdie spesie nie baie vinnig nie en word spesies soos *C. genistoides* en *C. subternata* ook geplant vir die vervaardiging van heuningbostee. Die gebruik van *C. genistoides* neem tans toe, aangesien al hoe meer van hierdie spesie aangeplant word in meer gebiede.

### 1.6.3 Beskrywing van heuningbos

Heuningbosplante word gekenmerk deur blare wat in groepies van drie rondom die takke gerangskik is [68, 69, 64], enkelblombloeisels en helder diep-geel blomme met karakteristieke groewe op die kroonblaar. Die stamme van die heuningbosplante is houtagtig, en daar is relatief min blare in vergelyking met die hoeveelheid takke wat die bosse het [64]. Die vorms en grootte van die blare verskil van spesie tot spesie [64, 65, 61]. *C. intermedia* het byvoorbeeld plat blare en *C. genistoides* smaller lineêre blare [63].



Bobbejaan kewertjies is hoofsaaklik verantwoordelik vir die bestuiwing van heuningbosplante, aangesien hulle baie maklik aangetrek word deur die soet aroma van die blommetjies. Die sade vorm in klein peule wat later bruin word. Wanneer die sade ryp is, raak die peule droog, en breek sodat die sade op die grond val, versprei en ontkiem. Die enigste probleem met die ontkieming van die sade is dat die harde dop rondom die saad eers effens beskadig moet word sodat vog by die saad kan uitkom vir ontkieming om te kan plaasvind [70]. In die natuur vind hierdie proses baie stadig plaas wanneer mikroorganismes en ander faktore in die grond die harde dop beskadig. Wanneer heuningbosplantasies gekweek word deur van die sade te gebruik, kan die doppe van die sade meganies beskadig word deur byvoorbeeld gebruik te maak van swawelsuur. Net soos baie ander fynbosplante, is die heuningbosplant ook aangepas om besonder goed te ontkiem na 'n brand. Eksperimente wat hierdie verskynsel ondersoek, het getoon dat die rook van die vuur

verantwoordelik is vir die stimulering van die ontkieming van sade. Die ontkieming van heuningbossade kan dus aangehelp word deur die sade te behandel met 'n rookekstrak [71].

#### 1.6.4 Prossering

Heuningbosplantmateriaal is tradisioneel versamel tydens die blomtyd van die plante, vanaf Augustus tot September, maar deesdae word materiaal oor 'n langer tyd geoes as gevolg van die groeiende belangstelling in heuningbostee [72]. Versameling van materiaal in die natuur kan baie tyd in beslag neem aangesien die gebiede waar die plante groei soms onbegaanbaar is, en daar nog net 'n paar kommersiële plantasies, waar materiaal makliker versamel kan word, bestaan. Die herspruiters word so kort as moontlik bo die grond afgesny. Hierdie spesies loop weer uit nadat hulle gesny is, sodat hulle later weer geoes kan word. Die oespraktyke van die hersaaiers word nog tans ondersoek. Bosse wat reeds geoes is, gee beter materiaal, omdat die takke sagter is en daar meer blare as takke voorkom [64]. As ou bosse nie gereeld gesny word nie, is daar te veel growwe materiaal teenwoordig as gevolg van die dikker takke van die bos [64]. Normaalweg word die bosse in 'n spesifieke area elke 2 tot 3 jaar geoes [64].

Nadat plantmateriaal versamel is, word dit in meganiese voersnyermasjiene in stukkies gekerf, waartydens die plantselle gebreek en die daaropvolgende “fermentasie”-proses bevorder word [64].

Fermentasie word in oonde gedoen en gee 'n goeie gehalte reproduseerbare en homogene produk, omdat daar beheer oor die temperatuur van die fermentasieproses is. Die fermentasietyd is relatief kort en sodoende word die voorkoms van muf op die plantmateriaal beperk. In die plek van gewone bakoonde kan groot dromme wat vooraf verhit is deur vuur daarin te maak, of dromme met verhittingselemente, ook gebruik word [64].

Die tee neem gewoonlik 1-2 dae om in die son droog te word afhangende van die dikte van die laag en die weerkondisies [64]. Uiteindelik word die finale produk meganies gesif om alle stukke wat groter as 'n vuurhoutjie is, te verwyder [73].

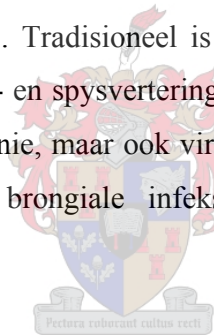
### 1.6.5 Ontwikkeling van die heuningbosteebedryf

Navorsing oor heuningbostee is in 1992 begin deur die NBI (Nasionale Botaniese Instituut), met die doel om die moontlikheid van kommersiële aanplantings te ondersoek [74]. Vanaf hierdie beginpunt het die heuningbosteebedryf stadig maar seker begin ontwikkel. In 1993/1994 is daar 4 ton heuningbostee uitgevoer na Japan en in die 95/96 seisoen 20 ton. In daardie tydperk het lande soos Engeland, Italië en die VSA ook belangstelling begin toon in heuningbostee. Teen 1996 was die plaaslike mark vir heuningbostee nog baie klein, omdat die tee hoofsaaklik slegs by padstalletjies verkoop is. Dit het wel gelyk of daar tog potensiaal sou wees vir die plaaslike mark om meer uit te brei, aangesien daar reeds 1,25 ton heuningbostee verkoop is by die paar afsetpunte waar die tee wel beskikbaar was [75]. Teen 2003 was die gemiddelde jaarlikse produksie van heuningbostee 150 ton, waarvan 90 % na oorsese lande uitgevoer en die res plaaslik verkoop is [76]. Die verkope vir 2005 word geskat op tussen 250-300 ton. Tans is Duitsland die grootste invoerder van heuningbostee (>60 %), gevolg deur die VSA, Nederland en Brittanje [77].

Die meeste van die heuningbosplantmateriaal word nog in die natuur geoes, maar as gevolg van die groeiende industrie en vir die beskerming van die heuningbosspesie in die natuur, is dit noodsaaklik dat kommersiële aanplantings wel aangemoedig word. Daar is al verskeie kommersiële aanplantings gevestig en die bedryf is veral aangehelp deur die stigting van 'n Heuningbostee Producentevereniging (SAHPA) in 1998. Die stigting van hierdie vereniging het veral gehelp met die organisasie van hierdie bedryf en om bestaande inligting en navorsing rondom hierdie bedryf algemeen beskikbaar te stel vir opkomende boere [74]. Heuningbosaanplantings is in 1995 gevestig op plekke soos Genadendal en Haarlem en in latere jare is aanplantings ook gevestig op Friemersheim, Zuurbraak en Kawyderskraal [62]. In Oktober 2001 is die eerste kommersiële oes van 'n kleinboer in die Friemersheim-nedersetting naby Groot-Brakrivier gelewer aan 'n verwerkingsaanleg [62]. Baie boere het tot dusver heuningbosplantasies as 'n vertakking van hul boerderye begin, want die plantasies kan sonder te veel moeite onderhou word, en met 'n toenemende mark vir hierdie produk, bied dit 'n ekstra inkomste aan boere.

## 1.7 Gesondheidseenskappe van heuningbostee

Met Jan van Riebeeck se aankoms aan die Kaap in 1652, het die meeste van die mense gedurende sy bewind (1652-1662) naby aan die fort gebly en gewerk. Hulle hoofdoel was om die Kaap te vestig as 'n basis wat die Nederlands-Oos-Indiese Maatskappy van voorrade moes voorsien, en niks anders was aanvanklik van belang nie. Op daardie stadium was daar dus geen uitbreiding na ander dele in die omgewing nie en gevolglik was die mense se kennis oor die plantegroei en kultuur van inheemse groepe baie beperk. Jan van Riebeeck het as't ware die mense beveel om nie verder weg te beweeg as die nabye omgewing nie, en om nie met die "vreemde" mense van die gebied te onderhandel nie. Met verloop van tyd, en veral tydens Simon van der Stel se bewind, kon sommige amptenare op versoek 'n stuk grond bekom om op te boer. Sodoende het die mense in aanraking gekom met die ryk flora van die Kaap en ook met die kultuur en gebruike van inheemse groepe soos die Khoisan [78]. Daar word beweer dat hierdie inheemse groepe heuningbostee gedrink het, veral as hulle verkoue was en baie gehoes het [79]. Tradisioneel is heuningbostee ook gebruik vir kwale soos slaaploosheid en vir mense met maag- en spysverteringsprobleme [80]. Die plant word vandag nog gebruik, nie net vir die maak van tee nie, maar ook vir die maak van 'n kruiemengsel wat help om hoerserigheid op te klaar en wat brongiale infeksies soos tuberkulose, longontsteking en slymvliesontsteking help verlig [81].



Omdat heuningbostee soveel gesondheidsvoordele inhou, het navorsers verbindings in die tee begin identifiseer wat die gesondheidswaarde van die tee kan verklaar. Van die algemene gesondheidsvoordele van die tee is die lae tannien-inhoud en die feit dat die tee geen kaffeïen bevat nie [81]. Navorsing oor die verbindings teenwoordig in heuningbos is gedoen op *C. intermedia* [81] en *C. subternata* [82]. Die verskillende spesies verskil baie min van mekaar, sodat daar verwag word dat die hoofverbindings algemeen teenwoordig is in meeste van die spesies [83, 84]. Verskeie groepe polifenoliese verbindings is in *Cyclopia* spesies geïdentifiseer, en dit is juis hierdie verbindings wat grootliks bydra tot die gesondheidseenskappe van die tee [81].



## 1.7.1 Polifenoliese verbindings:

### 1.7.1.1 Flavonole

Vyf flavonol glikosiede is in *C. intermedia* geïdentifiseer. Onder hierdie vyf flavonole is daar twee kaempferol monoglikosiede, twee  $\beta$ -D-glikopiranosiel flavonole en 'n onlangs geïdentifiseerde flavonolglukosied [81]. In *C. subternata* is 'n sekere derivaat van 'n kampferol glikosied geïdentifiseer [82]. Flavonole is fisiologies baie aktief en toon antioksidant- [85], antikanker- [86], antitumor-, anti-allergiese, antivirale, antitoksiese en antihistamien-aktiwiteite [87]. Flavonole besit ook die vermoë om lipiedperoksidase, asook die vorming van oksiradikale te inhibeer. Lipiedperoksidase en oksiradikaalvorming veroorsaak kondisies soos veroudering, artereosklerose, inflammasie, lewervergiftiging en ystervergiftiging [88, 89]. Die versameling, vashegting en afskeiding van bloedplaatjies word verhoed of geïnhibeer deur die werking van flavonole [87].

### 1.7.1.2 Flavanone

Vier flavanone, naamlik naringenien, eriodiktiol, hesperetien, en hesperidien is in *C. intermedia* geïdentifiseer [90]. Hesperidien is ook in *C. subternata* geïdentifiseer tesame met twee ander flavanone narirutien en eriositrien [82]. Flavanone besit antimikrobiese, antivirale en anti-inflammatoriese eienskappe en het vitamien aktiwiteit in die vorm van sitrien, wat in werklikheid 'n mengsel van eriodiktiol en hesperidien is [90, 91, 87]. Die voorkoms van flavanone in die *Fabaceae*-familie (peulplantfamilie) is baie beperk. Spesifieke flavanone soos byvoorbeeld hesperetien kom glad nie voor in die genusse van die tribusse *Podalyrieae* en *Liparieae* nie [92], behalwe in die genus *Cyclopia*, wat deel vorm van die *Podalyrieae* tribus, en daarom is hulle baie nuttige chemotaksonomiese merkers vir *Cyclopia* [83]. 'n Interessante verskynsel wat by die *Cyclopia*-spesies waargeneem is, is die afwesigheid van alkaloiëde, terwyl ander genusse van dieselfde familie groot hoeveelhede kinolisidien- en piperidielalkaloïede bevat [92].

### 1.7.1.3 Isoflavone

Verskeie isoflavone is al in die heuningbosspesie *C. intermedia* geïdentifiseer, naamlik wistien, 'n digeglikoliseerde isoflavoon, formononetien, afrormosien, kalikosien, pseudobaptigeen en



fujikinetien [81, 90], terwyl slegs een isoflavoon nog in *C. subternata* geïdentifiseer is [82]. In plante speel isoflavone 'n baie belangrike rol as fitoaleksiene wat die plante beskerm teen infeksies wat veroorsaak word deur fungi [93]. Isoflavone is van fisiologiese belang vir die mens omdat dit antikanker- [86], estrogeniese [94] en antimikrobiiese eienskappe besit [95].

#### 1.7.1.4 Flavone

Twee flavone is in *C. intermedia* [81] gevind en drie in *C. subternata* [82]. Luteolien in *C. subternata* toon antispasmodiese [96] en antioksidant-aktiwiteit [85, 97]. Flavone besit in die algemeen antivirale- [97], antispasmodiese- [98] en antioksidant-eienskappe, dien as diuretikum [87] en toon kardiobeskerende eienskappe [99].

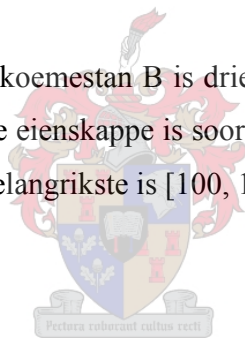
#### 1.7.1.5 Koemestans

Medikagol, flemichapparrien en soforakoemestan B is drie koemestans wat gevind is in heuningbos (*C. intermedia*) [90]. Hulle fisiologiese eienskappe is soortgelyk aan die van isoflavone met die fito-estrogeniese eienskappe wat van die belangrikste is [100, 101].

#### 1.7.1.6 Xantone

Mangiferien en isomangiferien is in *C. intermedia* geïdentifiseer [83, 90], terwyl slegs mangiferien voorkom in *C. subternata* [82]. Mangiferien toon baie potensiaal as antioksidant en antivirale middel en is al gebruik vir melancholie [102]. Onlangs is ook bevind dat mangiferien optree as vrye radikaalvanger [103], dat dit potensiaal toon in die behandeling van diabetes [104] en dat dit as 'n middel gebruik kan word om liggaamsmassa te verminder [105]. In die algemeen besit xantone baie verskillende eienskappe wat verskeie siektekondisies kan help verlig [106, 107, 108, 109].

Heuningbostee bevat ook 'n inisitol genaamd pinitol [90], wat 'n gemodifiseerde suiker is, waar een van die waterstowwe in glukose vervang is deur 'n metielgroep. Pinitol kom hoofsaaklik voor in dennebome, maar verskeie peulplante se blare bevat ook pinitol. Navorsing het getoon dat pinitol, net soos insulien, bloedsuikervlakke in laboratoriumdiere kan verlaag. Pinitol kan dus veral van



belang wees vir diabetes, omdat hulle juis nie insulien kan vervaardig om bloedsuikervlakke normaal te hou nie [81, 110].

Ekstrakte van gefermenteerde en ongefermenteerde heuningbostee het antimutageen-aktiwiteit getoon teenoor verskeie mutagene in 'n *Salmonella typhimurium* mutageen toetsstelsel [76]. Navorsers het gevind dat veral die volgende twee meganismes verantwoordelik is vir die antimutageen-aktiwiteit van heuningbostee. Volgens die eerste meganisme het die teekomponente 'n direkte invloed op die sitochroom P450-aangedrewe metaboliese aktivering van die mutagene. Volgens die tweede meganisme vind daar 'n direkte interaksie plaas tussen die nukleofiliese komponente van die tee (waarskynlik die polifenoliese verbindings) en die promutagene en/of die aktiewe metaboliete van die mutagene, om sodoende die mutageniese potensiaal van hierdie genotoksiese verbindings te verlaag. Heuningbostee induiseer ook die vrystelling van verskeie Fase-2 ensieme in die lewer. Hierdie ensieme is weer betrokke by die detoksifisering van karsinogene in sekere selle [76].

Heuningbostee se gesondheidswaarde word al vanaf die agtiende eeu deur die mens benut. Soos wat tegnologie gevorder het, en die mens se drang om alles te wil weet, toegeneem het, is dit nou moontlik om iets te verstaan omtrent die werking van verskeie verbindings in heuningbostee. Heuningbostee kan beskou word as 'n aanvullende gesondheidsdrankie wat kan bydra tot 'n gesonde lewenstyl.

## 1.8 Doelstelling van die navorsing

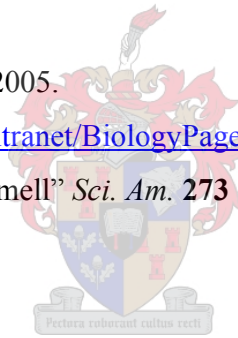
Heuningbostee het 'n baie kenmerkende aroma wat baie verskil van die meer bekende rooibostee wat ook inheems is in Suid-Afrika. Hierdie kenmerkende aroma van heuningbostee ontwikkel tydens die fermentasieproses en die verskil in aroma tussen die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbostee kan baie duidelik waargeneem word. Tydens die studie sal soveel moontlik van die verbindings teenwoordig in die aroma van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbostee van die spesie *C. genistoides* geïdentifiseer en met mekaar vergelyk word om vas te stel watter verbindings in die algemene verantwoordelik kan wees vir die groen, grasagtige en hooiagtige aroma van die ongefermenteerde tee, en die baie aangename soet blomagtige en heuningagtige

aroma van die gefermenteerde tee. Die huidige navorsing is gedoen om die chemiese samestelling van die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos van een spesifieke spesie, naamlik *C. genistoides*, te vergelyk ten einde 'n begrip te verkry van die ontwikkeling en/of verdwyning van vlugtige verbindings tydens fermentasie om sodoende die verbindings of verbindingstipes en hul voorlopers te kan identifiseer wat moontlik verantwoordelik is vir heuningbos se unieke soet aroma.

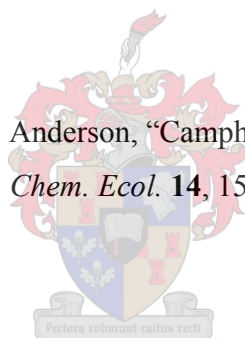


## 1.9 Verwysings

1. M. Pines, "It's all in the brain: Sensing change in the environment." *Seeing, hearing and smelling the world*. 2005. <http://www.hhmi.org/senses/aizo.html> Julie 2005.
2. C. Fisher, T.R. Scott, "Food Flavours: Biology and Chemistry", The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 56 (1997).
3. Verwysing 2, p. 2.
4. Verwysing 2, p. 4.
5. Verwysing 2, p. 57.
6. Verwysing 2, pp. 58-59.
7. Verwysing 2, p. 60
8. Verwysing 2, pp. 61-62.
9. Verwysing 2, pp. 63-64.
10. Verwysing 2, pp. 75-76.
11. "The sense of smell." 22 Oktober 2005. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/O/Olfaction.html> Julie 2005.
12. R. Axel, "The molecular logic of smell" *Sci. Am.* **273** (4), 154-160 (1995).
13. Verwysing 2, pp. 81-82.
14. Verwysing 2, p. 83.
15. Verwysing 2, p 84.
16. Verwysing 2, p. 3.
17. Verwysing 2, p. 5
18. S. Imai, N. Tsuge, M. Tomotake, Y. Nagatome, H. Sawada, T. Nagata en H. Kumagai, "An enzyme that makes the eyes water", *Nature* **419**, 685 (2002).
19. Verwysing 2, p. 6.
20. Verwysing 2, p. 8-9.
21. Verwysing 2, p. 15.
22. Verwysing 2, p. 16-17.
23. Verwysing 2, p. 18-19.
24. Verwysing 2, p. 20.
25. Verwysing 2, p. 21.



26. Verwysing 2, p. 22.
27. Verwysing 2, p. 23.
28. Verwysing 2, p. 24-25.
29. J.B. Harborne, F.A. (ed.), Tomas-BarBeran (ed.), "Proceedings of the Phytochemical Society of Europe: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids", Clarendon Press, Oxford, p. 399 (1991).
30. Verwysing 29 Introduction, p. 11.
31. Verwysing 29, p. 400.
32. T.W. Goodwin (ed.), "Proceedings of the Phytochemical Society Symposium (Liverpool): Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry", Academic Press, London and New York, p. 31 (1971).
33. Verwysing 32, p. 30.
34. Verwysing 29, p. 401.
35. Verwysing 29, p. 403.
36. Verwysing 29, p. 404.
37. A.R.E. Sinclair, M.K. Jagia en R.J. Anderson, "Camphor from juvenile white spruce as an antifeedant for snowshoe hares", *J. Chem. Ecol.* **14**, 1505-1514 (1988).
38. Verwysing 29, p. 287-296.
39. Verwysing 29, p. 297-313.
40. Verwysing 29, p. 314-330.
41. N.H. Fisher, N. Tanriser en G.B. Williamson, "Allelopathy in the Florida Scrub Community or a Model for Natural Herbicide Actions", ACS Books, Washington DC, pp. 1-17 (1988).
42. Verwysing 32, p. 54.
43. Verwysing 29, p. 405.
44. Verwysing 29, pp. 407-408.
45. Verwysing 29, p. 409.
46. Verwysing 32, pp. 79-80.
47. S.B. Rees en J.B. Harborne, "The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant", *Phytochemistry* **24**, 2225-2231 (1985).
48. S.P. Hubbel, D.F. Wiemer en A. Adejore, "Antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants", *Oecologia* **60**, 321-327 (1983).



49. J.B. Harborne, "The Role of Phytoalexins in Natural Plant Resistance" in: "Natural Resistance of Plants to Pests" (ed. M.B. Green en P.A. Hedin), American Chemical Society, Washington DC, pp. 22-35 (1986).
50. J.B Harborne, "Systematic Significance of Variation in Defense Chemistry in the Solanaceae" in: "Solonaceae, Biology and Systematics" (ed. W.G. D'Arcy), Columbia University Press, New York, pp. 328-344 (1986).
51. Y.C. Tang, D.A. Schooley en F.C. Baker, "Isolation of insect juvenile hormone III from a plant", *Nature* **333**, 170-171 (1988).
52. A.A. Newman, "Chemistry of Terpenes and Terpenoids", Academic Press, London and New York p. 155 (1972).
53. Verwysing 29, p. 411.
54. Verwysing 52, p. 156.
55. Verwysing 29, pp. 413-415.
56. T. Eisner, J.S. Johnessee, J. Carvell, L.B. Hendry en J. Meinwald, "Defensive use by an insect of a plant resin", *Science* **184**, 996-999 (1974).
57. C.A. Elliger, D.F. Zinkel, B.G. Chan en A.C. Weiss, "Diterpene acids as larval growth inhibitors", *Experientia* **32**, 1365-1365 (1976).
58. I. Kubo, Y.W. Lee, V. Balagh-Nair, K. Nakanishi en A. Chapya, "Structure of Ajugarins", 949-950 (1976).
59. M.N. Rao, M.R. Siegel, R.S. Ferris, W.C. Nesmith en J. Kuc, "Relationship between susceptibility of field grown barley tobacco to blue mould and contents of duratrienediols", *Phytopathology* **79**, 267-76 (1989).
60. "Honeybush tea: Honeybush (*Cyclopia intermedia*).” *Montego Rooibos Herbal Tea*. <http://www.montegotea.com/honeybush.htm> Augustus 2005.
61. P. Kies, "Revision on the genus *Cylclopia* and notes on some other sources of bush tea", *Bothalia* **6**, 161-173 (1952).
62. H. de Lange, "Geskiedenis en Ontwikkeling van Heuningbostee", Gepubliseer in SAHTA nuusbrieff no. **6**, Junie 2002.
63. A.L. Schutte, "A Taxonomic Study of the Tribes *Podalyrieae* and *Liparieae* (*Fabaceae*)", Ph.D. Thesis, Rand Afrikaans University, Johannesburg, South Africa (1995).
64. J. Du Toit, E. Joubert en T.J. Britz, "Honeybush Tea- a rediscovered indigenous South African herbal tea", *J. Sustain. Agric.* **12**, 67-84 (1998).

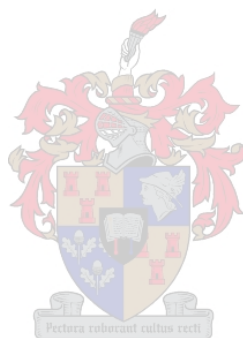
65. P. Bond en P. Goldblatt, “Plants of the Cape Flora. A descriptive Catalogue”, CTP Book Printers, Cape Town, pp. 285-286 (1984).
66. J. Coetsee, “Heuningbostee sprei sy soet geur”, *Landbouweekblad*, 37-38 (Januarie **2000**).
67. L. Jones (Indigenous Vegetation Consultancy). “An introduction to sustainable harvesting of some commercially utilised indigenous plant species in the Cape floristic region”, 12 Desember, [http://www.cepf.net/ImageCache/cepf/content/pdfs/final\\_2esappex\\_2etool\\_2epdf/v1/final.sappex.tool.pdf](http://www.cepf.net/ImageCache/cepf/content/pdfs/final_2esappex_2etool_2epdf/v1/final.sappex.tool.pdf) Augustus 2005.
68. M.R. Levyns, “A Guide to the Flora of the Cape Peninsula”, Juta & Co (Ltd), Cape Town, p. 147 (1920).
69. R. Marloth, “The Flora of South Africa with Synoptical Tables of the Genera of the Higher Plants”, Darter Bros & Co, Cape Town, pp. 69-72 (1925).
70. Z. Welgemoed, “Heuningtee straks kommersieel verbou”, *Landbouweekblad* **792**, 52-55 (1993).
71. L. van der Walt (SANBI-South African National Biodiversity Institute), “*Cyclopia genistoides* (L) Vent.”, September 2000, <http://www.plantzafrica.com/plantcd/cyclopiagenistoides.htm> Oktober 2005.
72. J. Du Toit, E. Joubert, “Optimization of the fermentation parameters of honeybush tea (*Cyclopia*)”, *J. Food Qual.* **22**, pp. 241-256 (1999).
73. B. Viljoen, “Honeybush Tea for extra income”, *Farmer’s Weekly* **4**, 24-25 (1994).
74. J. Coetsee, “Heuningbos word ‘n volwaardige bedryf”, *Landbouweekblad*, 40-41 (**1999**).
75. Z. Welgemoed, “Heuningbos: Eerste kommersiële aanplantings”, *Landbouweekblad*, 28-30 (**1996**).
76. J. L. Marnewick, E. Joubert, P. Swart, F. van der Westhuizen en W.C. Gelderblom, “Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes and oxidative status by rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cylopia intermedia*), green and black (*Camellia sinensis*) teas in rats”, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 8113-8119 (2003).
77. Mondelinge kommunikasie met dr. Lizette Joubert van ARC Infruitec, Stellenbosch.
78. C. A. Smith, “Common Names of South African Plants”, The Government Printer, Pretoria pp. 2-3 (1966).
79. Verwysing 78, p. 247.
80. L. Joubert, “Coffee tea or honeybush?”, *Food industries of South Africa*, 29-30, (April 1996).
81. B. I. Kamara, E. V. Brandt, D. Ferreira en E. Joubert, “Polyphenols from honeybush tea (*Cyclopia intermedia*)”, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3874-3879 (2003).

82. B.I. Kamara, D.J. Brand, E.V. Brandt en E. Joubert, "Phenolic metabolites from honeybush tea (*Cyclopia subternata*)", *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5391-5395 (2004).
83. A. M. de Nysschen, B. van Wyk, F. R. van Heerden en A. L. Schutte, "The major phenolic compounds in the leaves of *Cyclopia* species (Honeybush tea)", *Bioch. Sys. and Ecol.* **24**, 243-246 (1996).
84. E. Joubert, F. Otto, S. Grüner en B. Weinreich, "Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in *Cyclopia* and the effect of harvesting date on the phenolic composition of *C. genistoides*", *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 270-273 (2003).
85. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller en G. Paganga, "Antioxidant properties of phenolic compounds", *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159 (1997).
86. H. Adlercreutz, T. Fotsis, C. Bannwart, K. Mäkelä, K. Wähälä, G. Brunow en T. Hase, "Determination of urinary ligands and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets", *J. Steroid Biochem.* **25**, 791-797 (1986).
87. E. Middleton en C. Kandaswami, "The Impact of Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer in *The Flavonoids-Advances in Research Since 1986*; J.B. Harborne (Ed), Chapman and Hall, London, pp. 619-652 (1999).
88. H. Wang en J.A. Joseph, "Structure activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells", *Free Radical Biol. Med.* **27**, 683-694 (1999).
89. M. Man-Ying Chan, J.A. Mattiacci, H.S. Hwang, A. Shah en D. Fong, "Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway", *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1539-1548 (2000).
90. D. Ferreira, B. I. Kamara, E. V. Brandt en E. Joubert, "Phenolic compounds from *Cyclopia intermedia* (Honeybush tea)", *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3406-3410 (1998).
91. R.E. Hughes en H.K. Wilson, "Flavonoids: some physiological and nutritional considerations", *Prog. Med. Chem.* **14**, 285 (1977).
92. B.E. van Wyk en A.L. Schutte, "Phylogenic Relationships in the Tribes *Podalyrieae*, *Liparieae* and *Crotalarieae*", In *Advances in Legume Systematics 7* (J.J. Doyle en M. Crisp; ed.), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 283-308 (1995).
93. P.E. Laks en M.S. Pruner, "Flavonoid biocides: structure/activity of flavonoid phytoalexin analogues", *Phytochemistry* **28**, 87-91 (1989).



94. S. Smolenski, A.D. Kinghorn en M.F. Belandrin, "Toxic constituents of legume forage plants", *Econ. Bot.* **35**, 321-355 (1981).
95. D.R. Perrin en I.A.M. Cruickshank, "The antifungal activity of pterocarpan towards *Monilinia fructicola*", *Phytochemistry* **8**, 971-978 (1969).
96. A.K. Ratty, "Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship", *Bioch. Med. Metab. Biol.* **39**, 67-97 (1988).
97. K. Hayashi, T. Hayashi, M. Arisawa en N. Morita, "In vitro inhibition of viral disease by flavonoids", *Antiviral Chem. Chemother.* **4**, 49-58 (1993).
98. F.O. Snyckers en G. Salemi, "Study of South African medicinal plants. 1. Quercetin as the major in vitro active component of Rooibos Tea", *S. Afr. J. Chem.* **27**, 5-7 (1974).
99. B.C.P. Huesken, J. Dejong, B. Beekman en R.C.A. Onderwater, "Flavonoids as cardio protective agents", *Cancer Chemother. Pharmacol.* **37**, 55-62 (1995).
100. E.M. Bickhoff, R.R. Spencer, S.C. Witt en B.E. Knuckles, "Studies on Chemical and Biological Properties of Coumestrol and Related Compounds", Technical Bulletin 1408, US Department of Agriculture: Washington DC (1969).
101. P.M. Martin, K.B. Horowitz, D.S. Ryan en W.L. McGuire, "Phytoestrogen interaction with oestrogen receptors in human breast cancer cells", *Endocrinology* **103**, 1860 (1978).
102. S.K. Bhattacharya, A.K. Sanyal en S. Ghosal, "Monoamine oxidase-inhibiting activity of mangiferin isolated from *Canscora decussata*", *Naturwissenschaften* **59**, 651 (1972).
103. T. Sato, A. Kawamoto, A. Tamura, Y. Tatsumi en T. Fujii, "Mechanism of antioxidant action of peurariaglycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthone)", *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 721-724 (1992).
104. H. Ichiki, T. Miura, M. Kubo, E. Ishihara, K. Komatsu, K. Tanigawa en M. Okada, "New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside", *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1389-1390 (1998).
105. N. Yoshimi, K. Matsunaga, M. Katayama, Y. Yamada, T. Kuno, Z. Qiao, A. Hara, J. Yamada en H. Mori, "The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosyl xanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats", *Cancer Lett.* **163**, 163-170 (2001).
106. S. N.-u.-H. Kazmi, Z. Ahmed en A. Malik, "Sapxanthone, a pentasubstituted xanthone from *Saponaria vaccaria*", *Phytochemistry* **28**, 3572-3574 (1989).
107. V. Peres, T.J. Nagem en F.F. Oliveira, "Tetraoxygenated naturally occurring xanthones", *Phytochemistry* **55**, 683-710 (2000).

108. M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka en S. Yonemori, "Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry* **35**, 527-532 (1994).
109. K. Balasubramanian en K. Rajagopalan, "Novel xanthenes from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B", *Phytochemistry* **27**, 1552-1554 (1988).
110. S.H. Bates, R.B. Jones en C.J. Baily, "Insulin-like effect of pinitol", *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1944-1948 (2000).



## Hoofstuk 2

# CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE AROMA VAN HEUNINGBOS, *Cyclopia genistoides*

## 2.1 Inleiding

Plantmateriaal van *C. genistoides* is in die omgewing van Albertinia in die Suidwes-Kaap geoes en 'n gedeelte daarvan is gedroog, terwyl die orige gedeelte eers gefermenteer en daarna gedroog is. Die vlugtige organiese verbindings aanwesig in die aroma van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos is met behulp van die monsterverrykingstegniek ("sample enrichment probe", SEP) gekonsentreer en aan gaschromatografies-massaspektrometriese (GC-MS) analise onderwerp. Die vlugtige organiese verbindings is ook met behulp van dichlorometaan geëkstraheer ten einde die gaschromatografiese retensietye van die geïdentifiseerde komponente te vergelyk met dié van sintetiese verbindings.

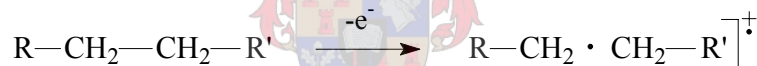
Die totale ionchromatogramme (TICs) van die vlugtige verbindings aanwesig in die aroma van die ongefermenteerde (Fig. 2.1) en gefermenteerde (Fig. 2.2) heuningbos dien as basis vir die bespreking van die identifikasie van hierdie verbindings. Die strukture van soveel van hierdie verbindings as moontlik is bevestig deur kommersieel beskikbare verbindings en 'n verbinding wat in die laboratorium gesintetiseer is te gebruik om mengsels op te maak wat verteenwoordigend is van die oorspronklike ongefermenteerde en gefermenteerde aromaprofiële. Die gaschromatografiese retensietye van individuele verbindings is vergelyk met die retensietye van die betrokke verbindings in die ekstrakte van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, wat indirek verteenwoordigend is van die aromaprofiële van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos. Die strukture van sommige verbindings wat nie verkry en bevestig kon word op bogenoemde wyse nie, is bevestig met behulp van chemiese ionisasie (CI) GC-MS en deur die ontleding van die lae-resolusie elektron-impak (EI) massaspektra van die verbindings.

## 2.2 Struktuurbeplating van verbindings teenwoordig in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos

Aangesien baie van die verbindings in beide die ongefermenteerde heuningbos(U) (Fig. 2.1) en die gefermenteerde heuningbos (F) (Fig. 2.2) voorkom en sommige verbindingstipes deur verskeie komponente in hierdie plantmateriale verteenwoordig word, is slegs verteenwoordigende spektra van die betrokke verbindings as figure in hierdie tesis aangebied en bespreek. Al die verbindings met hulle betrokke totale ioonstroom (TIC)-nommers word wel gegee en die letters U en F dui aan dat die verbindings in die ongefermenteerde en/of gefermenteerde materiaal onderskeidelik aanwesig is. 'n Volledige lys van al die geïdentifiseerde verbindings verskyn in Tabel 2.2 aan die einde van hierdie hoofstuk.

### 2.2.1 Alifatiese koolwaterstowwe (versadig)

Versadigde koolwaterstowwe word geïoniseer deurdat 'n elektron verwyder word uit 'n  $\sigma$ -binding:



Die massaspektra van onvertakte koolwaterstowwe bestaan uit groepies ione wat 14 massa-eenhede ( $\text{CH}_2$ ) van mekaar verskil, en die intensiteit van die fragmente neem af soos die massa van die fragmente toeneem [1]. Die piek met die grootste intensiteit in elk van hierdie groepies stem ooreen met die algemene formule  $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$  ( $m/z$  29, 43, 57...) en verder kom pieke van laer intensiteite met formule  $[\text{C}_n\text{H}_{2n-1}]^+$  ( $m/z$  27, 41, 55...) voor, maar die grootste intensiteit kom voor rondom die C3 of C4 fragmente [2]. Die molekulêre ioon kan gewoonlik gesien word, hoewel met 'n baie lae intensiteit\* [2]. Altesaam 9 verskillende onvertakte langketting-alkane is in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos gevind. Die EI-massaspektra van komponente F3985 (Fig. 2.3), U4496 (Fig. 2.4) en U4813 (Fig. 2.5) toon kenmerkende groepies ione wat 14 massa-eenhede van mekaar verskil. As gevolg van hierdie kenmerkende eienskap en die voorkoms

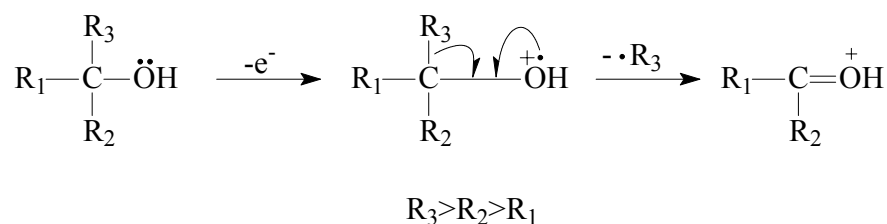
---

\* Die terme "intensiteit", "intens" en "sterk" word gebruik om aan te toon dat 'n groot aantal van die betrokke ioon in die ioonbron gevorm word. Vergelyk met die terme "abundant" en "abundance" in die Engels.

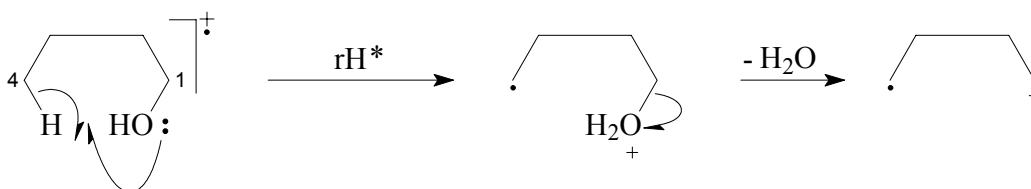
van lae intensiteit molekulêre ione by onderskeidelik  $m/z$  240, 268 en 282, is hierdie drie verbindings geïdentifiseer as die alkane heptadekaan, nonadekaan en eikosaan. Die EI-massaspektra van komponente U4167 (Fig. 2.6), U5115 (Fig. 2.7), U5405 (Fig. 2.8), U5684 (Fig. 2.9), U5953 (Fig. 2.10), en U6212 (Fig. 2.11) het ook die kenmerkende groepies ione wat 14 massa-eenhede van mekaar verskil met intensiteite wat geleidelik toeneem, maar die molekulêre ione kan in hierdie gevalle nie waargeneem word nie. Met behulp van 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] en die relatiewe retensietye van die verbindings in die totale ionchromatogram, is komponent U4167 geïdentifiseer as oktadekaan en komponente U5115, U5405, U5684, U5952 en U6212 onderskeidelik as die onvertakte alkane heneikosaan, dokosaan, trikosaan, tetrakosaan en pentakosaan. Die identifikasie van komponent U5684 (trikosaan) is bevestig deur retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese verbinding. In die totale ionchromatogram van die ongefermenteerde heuningbos is die onvertakte alkaan heptadekaan (U3822) ook aangetref en in die gefermenteerde heuningbos die alkane nonadekaan (F4660), eikosaan (F4976), heneikosaan (F5279), dokosaan (F5569), trikosaan (F5848), tetrakosaan (F6117), en pentakosaan (F6376).

### 2.2.2 Alifatiese alkohole (versadig)

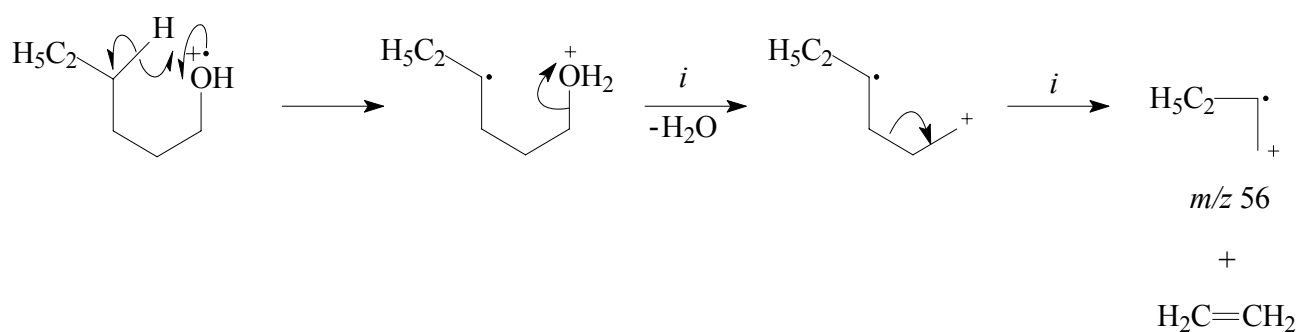
Die EI-massaspektrum van komponent U418 (Fig. 2.12) in die totale ionchromatogram van die aroma van ongefermenteerde heuningbos (Fig. 2.1), vertoon kenmerkende ione wat voorkom by  $m/z$  41, 55, 69... en  $m/z$  43, 57, 71, ens. Die algemene formules vir hierdie twee ionreekse wat tipies voorkom in die spektra van langketting onvertakte 1-alkanole en 1-alkene, is onderskeidelik  $[C_nH_{2n-1}]^+$  en  $[C_nH_{2n+1}]^+$  en die intensiteite van die reekse neem af soos wat die massa van die fragmente toeneem [4]. Die molekulêre ione van primêre en sekondêre alkohole is gewoonlik baie swak, en dié van tersiêre alkohole is gewoonlik nie waarneembaar nie. Aangesien die massaspektrum van komponent U418 nie 'n molekulêre ion vertoon nie, maar wel die kenmerkende ionreekse vir 1-alkanole, is vermoed dat die verbinding 'n 1-alkanol kon wees. Die belangrikste algemene fragmenteringsproses behels klowing van die binding  $\beta$  tot die suurstofatoom en word  $\alpha$ -klowing genoem. Die grootste groep word die maklikste geëlimineer [5, 6]:



Eliminasie van water vanaf die molekulêre ioon van alkohole vind maklik plaas en gee aanleiding tot die vorming van die  $[\text{M}-18]^+$ -ioon. Die verlies van water vind hoofsaaklik plaas deur 'n 1,4-eliminasië *via* 'n seslid-ringsisteen [7]:



'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het aangedui dat komponent U418 moontlik 1-heksanol kan wees met 'n molekulêre massa van 102 Da. Die ioon by  $m/z$  84 in die massaspektrum is dus die  $[\text{M}-18]^+$ -ioon. Die agtereenvolgende eliminasië van water en etileen kan waargeneem word by alkohole wat vier of meer koolstofatome besit. Afhangende van die kettinglengte, kan hierdie eliminasië herhaal word [8]. Die basispiek in die massaspektrum van komponent U418 kom voor by  $m/z$  56, wat die fragment verteenwoordig wat oorbly na die verlies van water en etileen. Die skema hieronder dui aan hoe die reaksie verloop [9]:



\*Herrangskikkingsreaksie wat gepaardgaan met die oordrag van 'n waterstofatoom.

Die identifikasie van komponent U418 as die verbinding 1-heksanol is bevestig deur retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese verbinding.

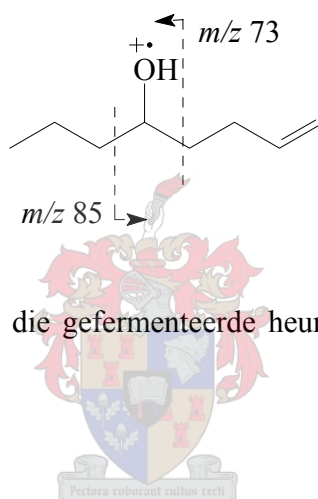
### 2.2.3 Alifatiese alkohole (onversadig)

Komponent U37 (Fig. 2.13) in die totale ionchromatogram van die aroma van die ongefermenteerde heuningbos, is deur die NBS biblioteek [3] gegee as 1-penten-3-ol of moontlik 2-penten-1-ol. Die spektra van hierdie twee verbindings het dieselfde algemene voorkoms en dit is moeilik om die verbinding te identifiseer slegs op grond van die EI-massaspektra. Aangesien die alkohol nie in die ekstrak van die ongefermenteerde heuningbos aanwesig was nie en dus nie vir retensietydvergelyking beskikbaar was nie, kon die verbinding slegs op grond van die resultaat van die biblioteeksoektog en moontlike verskille in die massaspektra, geïdentifiseer word. Die enigste merkbare verskil tussen die massaspektra van 1-penten-3-ol en 2-penten-1-ol, is die intensiteit van die molekulêre ioon. Die molekulêre ioon van 1-penten-3-ol is baie swakker as dié van 2-penten-1-ol, omdat eersgenoemde 'n sekondêre alkohol is. Op grond van bogenoemde bewyse is komponent U37 geïdentifiseer as 1-penten-3-ol.

In die EI-massaspektrum van komponent U373 (Fig. 2.14) is daar 'n molekulêre ioon by  $m/z$  100, wat net twee massa-eenhede verskil van die molekulêre massa van 1-heksanol (102 Da). Dit is 'n aanduiding dat hierdie verbinding 'n heksanol is. Komponent U373 se massaspektrum het 'n kenmerkende  $[M-18]^+$ -ioon by  $m/z$  82, wat ontstaan deur die verlies van water. Die ioon by  $m/z$  67 ontstaan deur die verlies van water en 'n metielgroep, wat baie kenmerkend is van alkohole [10]. Die NBS biblioteek [3] het voorgestel dat die verbinding moontlik (*Z*)-3-heksen-1-ol kan wees, en die identiteit van komponent U373 is verder bevestig deur retensietydvergelyking met sintetiese (*Z*)-3-heksen-ol. Die basispiek by  $m/z$  41 ontstaan waarskynlik deurdat die dubbelbinding migreer sodat 'n gunstige allielklowing kan plaasvind om 'n  $C_3H_5^+$ -ioon te lewer. Komponent F535 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos, is op grond van sy massaspektrum en relatiewe retensietyd ook as (*Z*)-3-heksen-1-ol geïdentifiseer.

In die EI-massaspektrum van komponent U821 (Fig. 2.15) is daar nie 'n molekulêre ioon teenwoordig nie, en chemiese ionisasie is gebruik om te bepaal dat die molekulêre massa van die verbinding 128 Da is (sien Fig. 2.15a). Volgens die biblioteeksoektog [3], kan hierdie verbinding

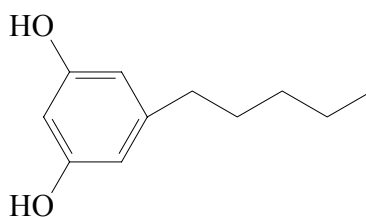
moontlik 7-okten-4-ol wees. Volgens die biblioteek is 3-okten-1-ol 'n ander verbinding waarvan die massaspektrum baie ooreenstem met dié van 7-okten-4-ol. Van die twee alkohole was net 3-okten-1-ol kommersieel beskikbaar, en vergelyking van die retensietyd met dié van die sintetiese verbinding, het aangedui dat komponent U821 nie 3-okten-1-ol is nie. Die beste moontlikheid bly dus steeds 7-okten-4-ol. Die basispiek van hierdie verbinding kom voor by  $m/z$  57, wat ontstaan deur die verlies van  $C_5H_{11}$  uit die molekulêre ioon ná delokalisasie van die dubbelbinding, terwyl die ioon by  $m/z$  110 die kenmerkende  $[M-18]^+$ -ioon is wat ontstaan weens die verlies van water. Die ione by  $m/z$  85 en  $m/z$  73 ontstaan onderskeidelik wanneer een van die  $\alpha$ -bindings aan weerskante van die koolstofatoom wat die OH-groep besit, gekloof word:



Komponent F980 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos, is op soortgelyke wyse as 7-okten-4-ol geïdentifiseer.

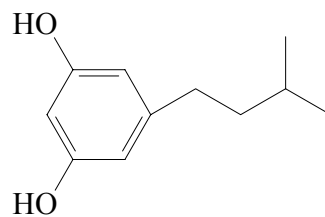
## 2.2.4 Fenole

Die EI-massaspektrum van komponent U3092 (Fig. 2.16) vertoon kenmerkende ione by  $m/z$  55, 81, 109, 124 (basispiek), 137, 165 en 180 (molekulêre ioon). Opvallend in hierdie massaspektrum is die voorkoms van die ione by  $m/z$  152, wat 'n  $[M-28]^+$ -ioon is, en  $m/z$  153, wat 'n  $[M-29]^+$ -ioon is. Hierdie ioonpaar is baie kenmerkend van verbindinge met 'n hidroksielgroep gebind aan 'n aromatiese ring [11]. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het die verbinding 5-pentielresorsinol as moontlikheid gelewer:

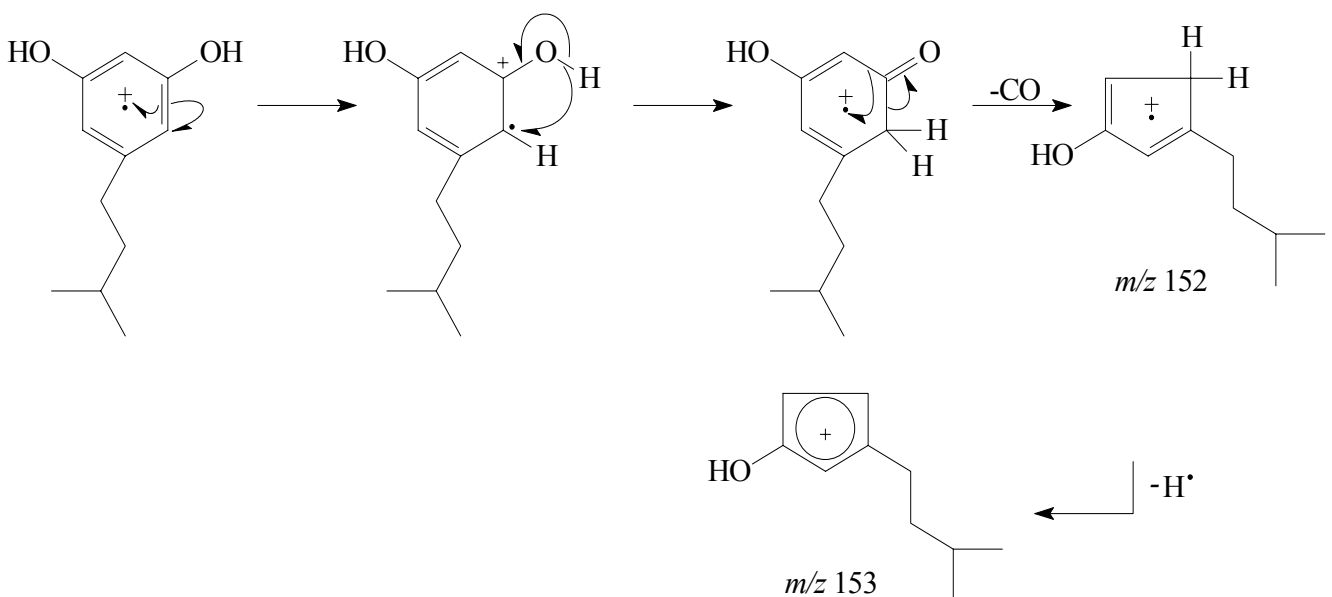




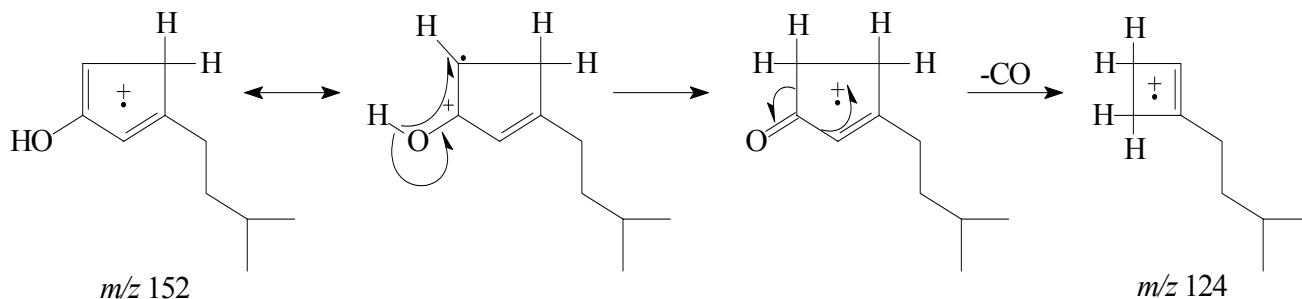
5-Pentielresorsinol is kommersieel beskikbaar en retensietydvergelyking met die sintetiese verbinding het getoon dat komponent U3092 nie 5-pentielresorsinol kan wees nie. Die massaspektrum van komponent U3092 toon 'n prominente ioon by  $m/z$  137, wat nie verwag sou word in die spektrum van 5-pentielresorsinol nie. Laasgenoemde sal eerder 'n prominente ioon by  $m/z$  109 vertoon as gevolg van die verlies van die pentielgroep. Die massaspektrum gee dus ook 'n aanduiding dat die biblioteekvoorstel moontlik nie korrek is nie. Komponent U3092 kan egter moontlik 'n 5-pentielresorsinol wees, en aangesien die ioon by  $m/z$  137 deur 'n kenmerkende verlies van 43 massa-eenhede ontstaan, is vermoed dat die alkielgroep eerder 'n isopentielgroep moet wees:



Die ioon by  $m/z$  137 kan volgens hiërdie verbinding wel verklaar word aan die hand van die verlies van die isopropielgroep. Die meganisme vir die vorming van die ione by  $m/z$  152 en 153 kan verklaar word in terme van die verlies van 'n CO-groep gevolg deur die verlies van 'n waterstofatoom [11]:

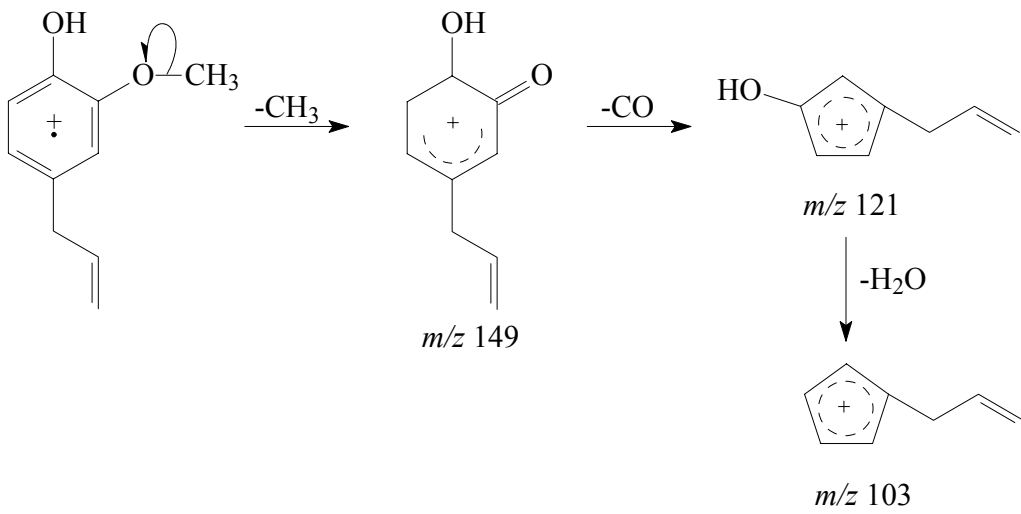


Die vorming van die basispiek in hierdie spektrum by  $m/z$  124 kan moontlik verklaar word aan die hand van die verlies van 'n verdere CO-groep:

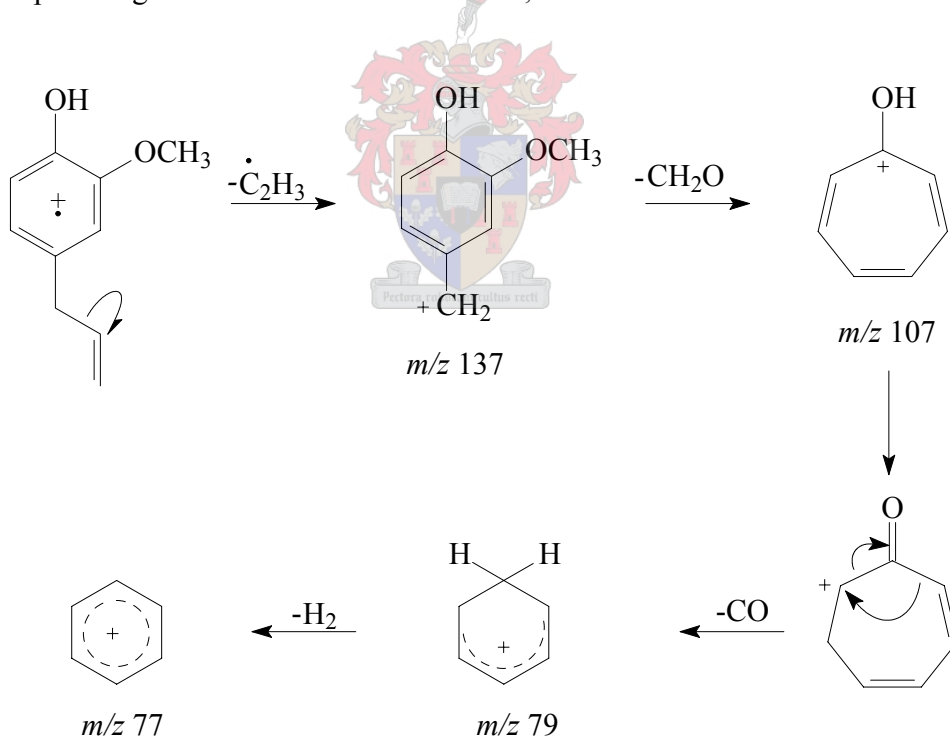


Daar is wel 'n ioon by  $m/z$  109, wat vorm as gevolg van die verlies van die isopentielgroep vanaf die aromatiese ring, maar die intensiteit van die ioon is laag, omdat verlies van die isopropielgroep gunstiger is. Die ioon by  $m/z$  165 ontstaan weens die verlies van 'n metielgroep. Op grond van die bogenoemde argumente is komponent U3092 geïdentifiseer as 1,3-dihidroksi-5-isopentielbenseen en hierdie verbinding kom ook voor in die aroma van die gefermenteerde heuningbos (komponent F3254).

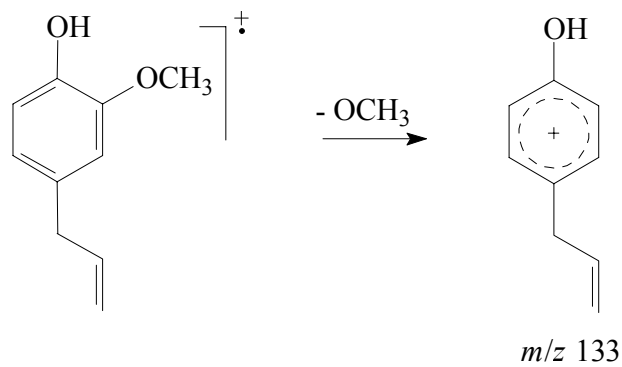
Die ione by  $m/z$  77 en  $m/z$  91 in die EI-massaspektrum van komponent F2590 (Fig. 2.17), is kenmerkend van aromatiese verbindings. Met behulp van chemiese ionisasie (Fig. 2.17a) is die molekulêre massa van hierdie komponent, naamlik 164 Da, bevestig. Volgens 'n gerekenariseerde soektog met behulp van die NBS biblioteek [3], is die verbinding moontlik eugenol. Die verlies van 'n metielgroep om die ioon by  $m/z$  149 te vorm, gevolg deur die verdere verlies van 'n CO-groep en van 'n watermolekuul om die ione by  $m/z$  121 en  $m/z$  103 onderskeidelik te vorm, vind moontlik soos volg plaas [12]:



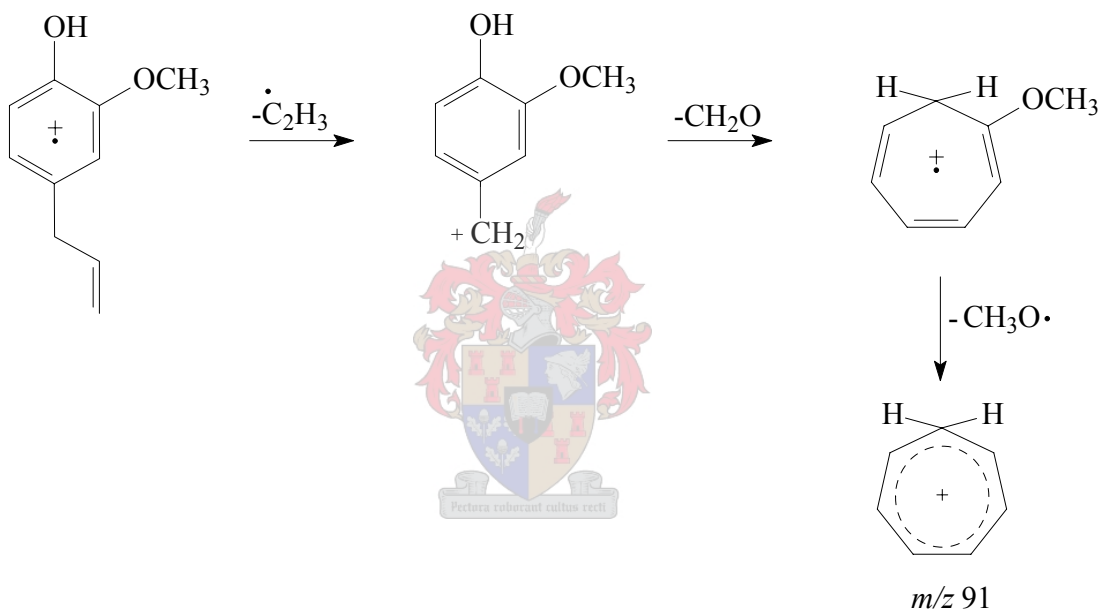
Die ion by  $m/z$  137 ontstaan weens die verlies van etileen uit die molekulêre ion en die onderstaande skema dui ook aan hoe die ion by  $m/z$  77 uiteindelik ontstaan vanuit die ion by  $m/z$  137 deur die opeenvolgende verlies van formaldehyd, koolstofmonoksied en 2 waterstofatome [13]:



Die ion by  $m/z$  133 ontstaan weens die verlies van die metoksigröep:

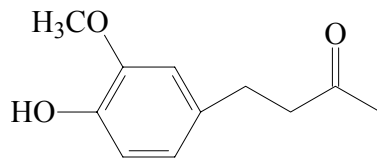


Die tropiliumioon by  $m/z$  91 vorm volgens die onderstaande meganisme [14]:



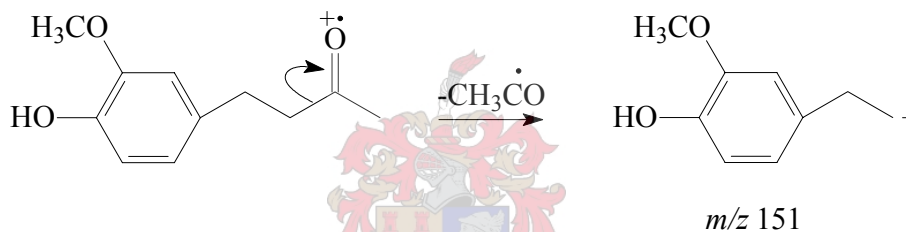
Retensietydvergelyking met sintetiese eugenol het bevestig dat die identifikasie van komponente F2590 en U2427 as eugenol korrek is.

Die massaspektrum van komponent F3688 (Fig. 2.18) vertoon 'n molekulêre ioon by  $m/z$  194 en basispiek by  $m/z$  137. Die ione by  $m/z$  77 en  $m/z$  91 is kenmerkend van die teenwoordigheid van 'n benseenring [10]. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], kan die verbinding moontlik vanillielasetoon wees:

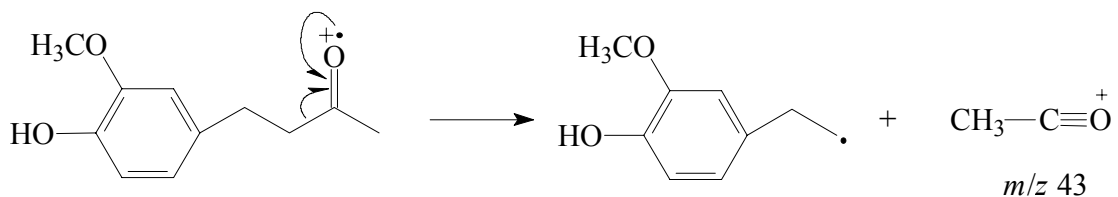


Vanillielasetoon het 'n benseenring, wat by die vorming van die ione by  $m/z$  91 (tropiliumioon) en  $m/z$  77 betrokke kan wees. Na verlies van die 2-butanoon-gedeelte van die molekule, ontstaan die  $m/z$  77-ioon op dieselfde wyse as by eugenol.

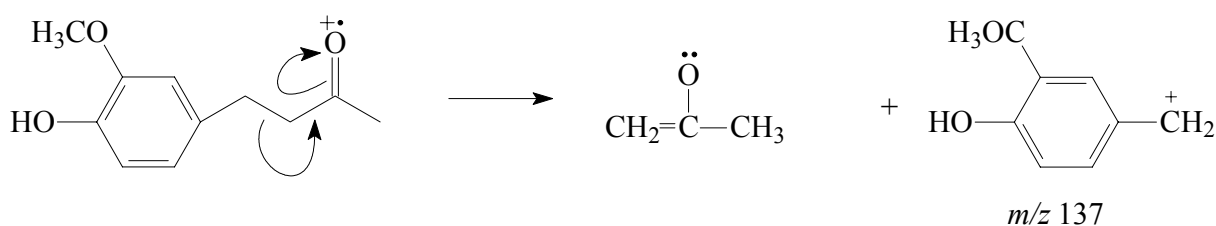
Die ioon by  $m/z$  151 verskil met 43 massa-eenhede van die molekulêre ioon van die verbinding, en aangesien vermoed is dat die verbinding vanillielasetoon is, wat 'n metielketoon-gedeelte besit, sou hierdie ioon *via*  $\alpha$ -klowing kon ontstaan:



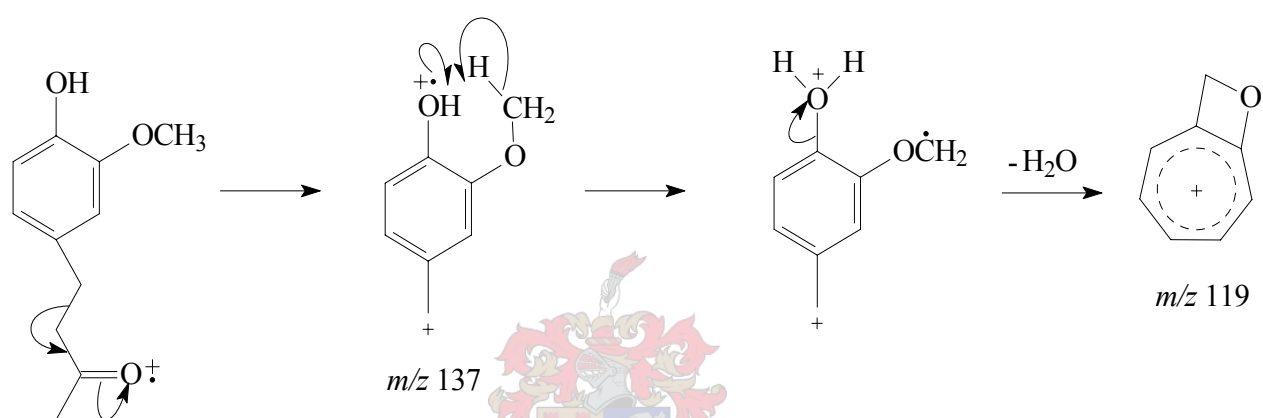
$\alpha$ -Klowing met die behoud van die positiewe lading op die metielkarboniel-gedeelte gee aanleiding tot die ioon by  $m/z$  43, wat kenmerkend is van metielketone [15]:



Klowing van die bensielbinding in komponent F3688 kan moontlik aanleiding gee tot die vorming van die ioon by  $m/z$  137 wat ontstaan deur die verlies van 57 massa-eenhede:



Verlies van 'n watermolekuul vanuit die ioon by  $m/z\ 137$  lei tot die vorming van die ioon by  $m/z\ 119$  [16]:



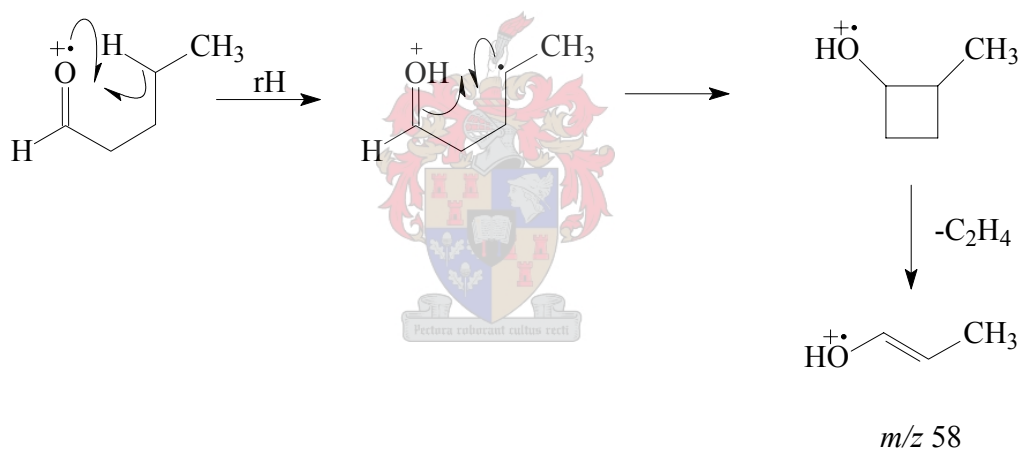
Sintetiese vanillielasetoon was nie beskikbaar vir retensietydvergelyking nie en komponent F3688 is dus geïdentifiseer as vanillielasetoon deur die komponent se massaspektrum te bestudeer soos hierbo uiteengesit, en op grond van die goeie ooreenkoms (90%) tussen die komponent se massaspektrum en die ooreenstemmende spektrum in die gerekenariseerde biblioteek van massaspektra. Die relatiewe retensietyd waarteen komponent F3688 in die gaschromatografiese skeiding elueer, is ook in ooreenstemming met wat verwag sou word vir hierdie verbinding. Bogenoemde is ook van toepassing op die identifikasie van komponent U3525 as vanillielasetoon in die ongefermenteerde heuningbos.

### 2.2.5 Alifatiese aldehyde (versadig)

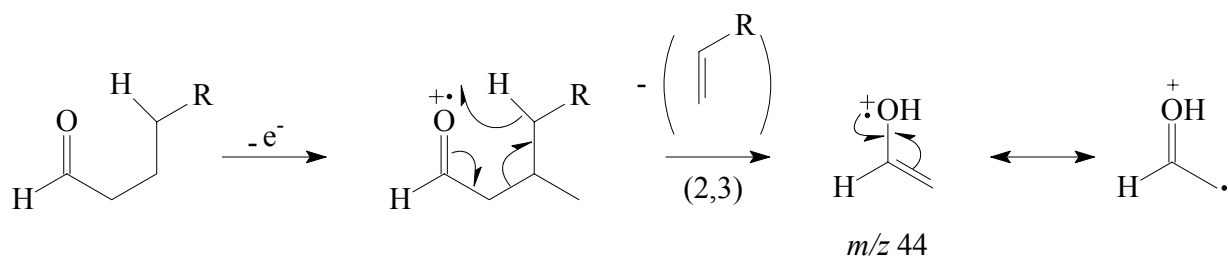
Die EI-massaspektra van komponente U48 (Fig. 2.19), U218 (Fig. 2.20) en U507 (Fig. 2.21) vertoon basispieke by  $m/z\ 44$  wat kenmerkend is van onvertakte alifatiese aldehyde wat 4 tot 7 koolstofatome besit [17]. Die molekulêre ione van al die bogenoemde verbindings is baie swak en

word nie in die EI-massaspektra waargeneem nie. Volgens die NBS gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], kan komponent U48 moontlik pentanaal of 3-metielbutanaal wees, maar dit is moeilik om slegs op grond van die massaspektra tussen die twee te onderskei. Retensiydvergelyking met sintetiese pentanaal het egter bevestig dat komponent U48 pentanaal en nie 3-metielbutanaal is nie.

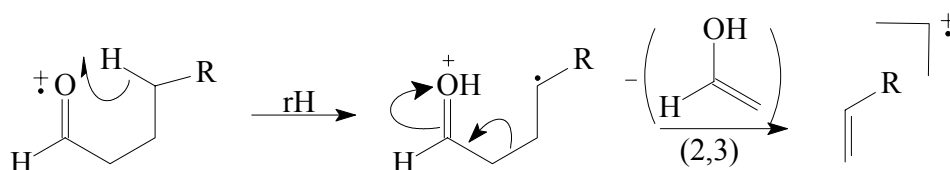
Die massaspektra van komponente U48, U218 en U507 besit groepies ione wat 14 massa-eenhede van mekaar verskil by  $m/z$  29,  $m/z$  43 en  $m/z$  57, wat toegeskryf kan word aan  $[C_nH_{2n+1}CO]^+$ - en  $[C_nH_{2n+1}]^+$ -ione. Die ioon by  $m/z$  58 in die spektrum van komponent U48, ontstaan as gevolg van 'n herrangskikkingsreaksie met die eliminasië van 'n etileenmolekuul, soos in die skema hieronder aangedui [18]. Dieselfde reaksie vind ook plaas in komponente U218 en U507 en gee aanleiding tot die vorming van ione by onderskeidelik  $m/z$  72 en  $m/z$  86:



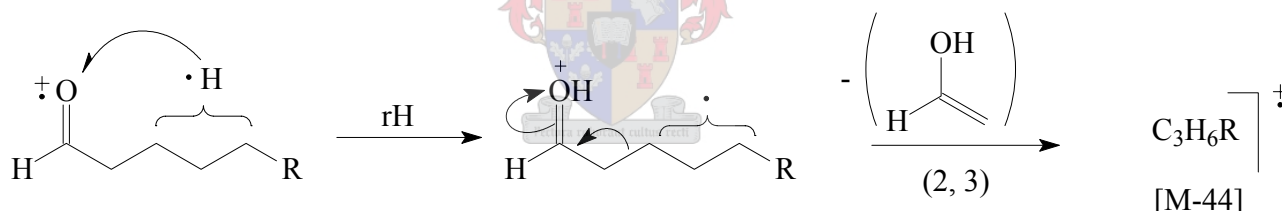
Die basispiek by  $m/z$  44, wat in al drie die verbindings voorkom, word deur 'n McLafferty herrangskikking gevorm:



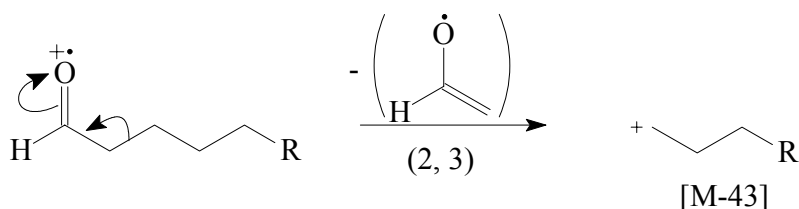
Aldehiede wat geen  $\alpha$ -vertakking het nie, vertoon 'n  $[M-44]^+$ -ioon en in die massaspektra van komponente U48, U218 en U507 is hierdie ioon wel teenwoordig by onderskeidelik  $m/z$  42,  $m/z$  56 en  $m/z$  70. Eksperimente met  $O^{18}$ -gemarkte aldehiede het getoon dat fragmente wat ontstaan vanweë hierdie verlies, die algemene formule  $[C_nH_{2n}]^+$  het. Dit beteken dat  $\beta$ -klowing met oordrag van 'n waterstofatoom plaasvind soos in 'n McLafferty herrangskikking, met die verskil dat die lading behoue bly op die alkeenfragment [19]:



Addisionele data is verkry met heksanale wat gedeutereer is, en die resultate het getoon dat die bogenoemde reaksie nie setel-spesifiek is soos in 'n McLafferty-tipe herrangskikking nie [20]. Van die totale aantal waterstofatome was 81% afkomstig van die  $\beta$ -,  $\gamma$ - of  $\delta$ -posisies. Dit is dus meer korrek om die reaksie soos volg voor te stel:

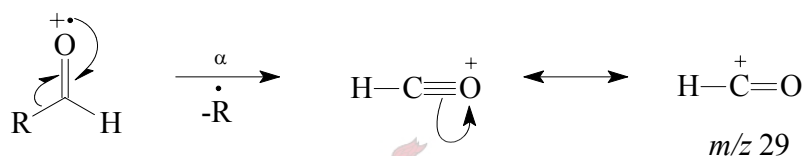
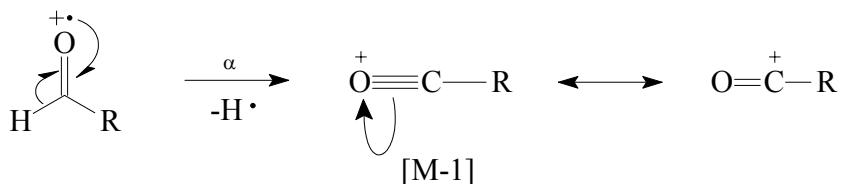


Nog 'n tipe  $\beta$ -klowingsreaksie kan plaasvind, maar in hierdie reaksie vind geen oordrag van 'n waterstofatoom plaas nie en die positiewe lading bly behoue op die alkielfragment met 'n algemene formule van  $[C_nH_{2n+1}]$  [21]:

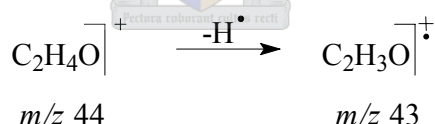




Die EI-massaspektra van die drie komponente U48, U218 en U507 vertoon wel hierdie  $[M-43]^+$ -ione by onderskeidelik  $m/z$  43,  $m/z$  57 en  $m/z$  71. Die produkte van twee moontlike  $\alpha$ -klowingsreaksies wat kan voorkom by aldehyede word altwee waargeneem in die massaspektra van hierdie drie komponente. Die  $\alpha$ -klowing behels die eliminasië van óf 'n waterstofatoom óf 'n alkielradikaal:



Nog 'n belangrike ioon kom by  $m/z$  43 in die spektrum van onvertakte aldehyede voor. Daar is bevind dat hierdie ioon 'n suurstof-bevattende fragment is wat ontstaan wanneer 'n waterstofatoom verloor word vanaf die  $m/z$  44-ioon [22].



Die verlies van water gee aanleiding tot die vorming van die ione by  $m/z$  82 en  $m/z$  86 in die massaspektra van onderskeidelik komponente U218 en U507. Die twee verbindings is op grond van die betrokke massaspektrometriese data en die gerekenariseerde voorstel deur die NBS biblioteek [3], as onderskeidelik heksanaal en heptanaal geïdentifiseer. Retensietydvergelyking met die sintetiese verbindings het die identifikasie van die komponente as heksanaal en heptanaal bevestig. Dieselfde metode van identifikasie is ook gebruik om komponente F380 en F666 te identifiseer as onderskeidelik heksanaal en heptanaal.

Nog verbindings soortgelyk aan die drie aldehyede wat reeds bespreek is, is gevind, maar hulle het nie  $m/z$  44 as 'n basispiek nie, wat beteken dat die verbindings meer as sewe koolstofatome besit, want dit is bekend dat slegs aldehyede met 4-7 koolstofatome  $m/z$  44 as basispiek het. Die massaspektra van komponente U900, U1347 en U1803 het kenmerkende groepies ione wat 14 massa-eenhede van mekaar verskil by  $m/z$  29, 43, 57... soos in die eerste groep kortkettingaldehyede. Dieselfde tipe hooffragmentasies kom ook voor by hierdie aldehyede met langer kettinglengte soos wat reeds aangedui is. Komponente U900, U1347 en U1803 is op grond van hulle massaspektra en die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] onderskeidelik geïdentifiseer as oktanaal, nonanaal en dekanaal. Komponent F1058 is teenwoordig in die aroma van die gefermenteerde heuningbos en is op dieselfde wyse as komponent U900, geïdentifiseer as oktanaal.

### 2.2.6 Alifatiese aldehyede (onversadig)

Die EI-massaspektra van komponente U348 (Fig. 2.22), F858 (Fig. 2.23) en U1583 (Fig. 2.24) vertoon prominente ione by  $m/z$  41, 55, 69, 70, 83 en 97. As voorbeeld van hierdie groep verbindings is gekyk na die massaspektrum van komponent U348. Die molekulêre massa van hierdie verbinding is 98 Da, wat twee massa-eenhede laer is as dié van heksanaal, 'n aanduiding dat die verbinding 'n mono-onversadigde aldehyd kan wees. Die EI-massaspektrum van hierdie verbinding bevat  $M^+$ -,  $[M-1]^+$ -,  $[M-15]^+$ -,  $[M-18]^+$ - en  $[M-29]^+$ -ione. Komponent U348 en komponent F509 is op grond van die betrokke data en die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] geïdentifiseer as 2-heksanaal en op soortgelyke wyse is komponente F858 en U1583 onderskeidelik geïdentifiseer as (*E*)-2-heptenaal en 2-dekanaal. Retensietydvergelyking is net gedoen met sintetiese (*E*)-2-heptenaal wat beskikbaar was, en daarvolgens is die identifikasie van komponent F858 as (*E*)-2-heptenaal bevestig. Komponent U700 is op grond van sy massaspektrum en relatiewe retensietyd ook as (*E*)-2-heptenaal geïdentifiseer.

Die massaspektra van komponente U859, U912 (Fig. 2.25) en F1071 lyk op die oog af dieselfde en komponent U1816, wat ook later voorkom in die totale ionchromatogram van die ongefermenteerde heuningbos, het 'n soortgelyke massaspektrum. Wat opvallend is van die massaspektra van hierdie verbindings, is die teenwoordigheid van die basispiek by  $m/z$  81. As voorbeeld van hierdie groep verbindings sal gekyk word na die massaspektrum van komponent U912. Uit die CI-spektrum (Fig. 2.25a) van komponent U912 kan afgelei word dat die molekulêre

massa van die verbinding 110 Da is. Met die molekulêre massa bekend en die retensietyd in ag geneem, is afgelei dat die verbinding moontlik 'n dubbel-onversadigde aldehyd kan wees. Die belangrikste ione in die massaspektrum kom voor by [M-29], [M-43], [M-57] en [M-71]. In die massaspektra van al die bogenoemde verbindings, is dit baie opvallend dat geen  $m/z$  44-ioon teenwoordig is nie. Die afwesigheid van hierdie ioon onderstreep die feit dat geen McLafferty herrangskikking kan plaasvind soos by versadigde aldehyde nie. Die feit dat daar ook geen ander ione met ewe massas teenwoordig is in die massaspektra van hierdie verbindings nie, dui aan dat daar geen substituent teenwoordig kan wees in die  $\alpha$ -posisie nie. Met al die bogenoemde inligting in ag geneem, is dit dus moontlik dat McLafferty herrangskikking verhoed word deur die aanwesigheid van 'n dubbelbinding tussen C2 en C3 in hierdie verbindings. Volgens die biblioteeksoektog [3] is komponente U859, U912 en F1071 2,4-heptadiënaal en eersgenoemde twee komponente is dus klaarblyklik geometriese isomere aangesien hulle op verskillende tye elueer maar tog soortgelyke massaspektra het. Kommersiële (*E,E*)-2,4-heptadiënaal was beskikbaar, en retensietydvergelyking met hierdie monster het getoon dat komponente U912 en F1071 wel (*E,E*)-2,4-heptadiënaal is, sodat met sekerheid aanvaar kan word dat komponent U859 'n isomeer met ten minste een dubbelbinding met *Z*-stereochemie moet wees. Komponent U1816 is volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] geïdentifiseer as 2,4-nonadiënaal (stereochemie onbekend, en nie bepaal nie), wat bevestig is deur kritiese inspeksie van die komponent se massaspektrum.

### 2.2.7 Alifatiese ketone (versadig)

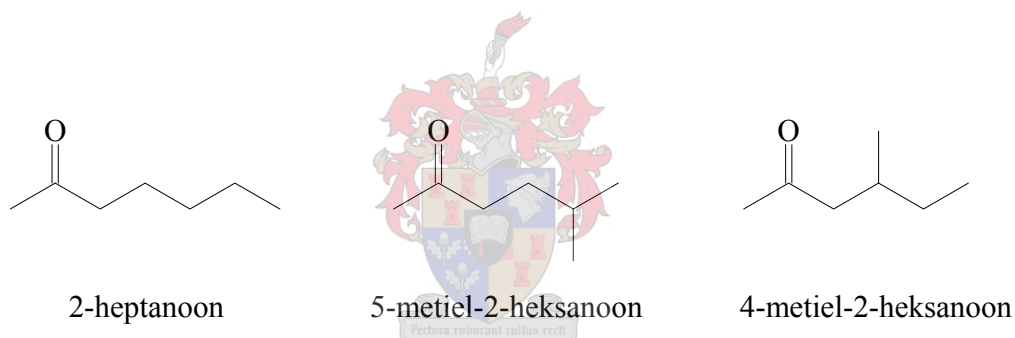
Die EI-massaspektrum van komponent U473 (Fig. 2.26) vertoon 'n basispiek by  $m/z$  43 en 'n molekulêre ioon by  $m/z$  114. Die ioon by  $m/z$  43  $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$  kom algemeen voor in die massaspektra van vertakte en onvertakte metielketone [23], en aangesien die molekulêre ione van ketone, soos ook in hierdie geval, gewoonlik waargeneem kan word [15], kan aanvaar word dat hierdie komponent wel 'n metielketoon is. As die alkielgedeelte bestaan uit meer as 3 koolstofatome, raak McLafferty herrangskikking ( $\beta$ -klowing met die oordrag van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom) meer belangrik [24], maar vir ketone is die situasie meer kompleks as vir aldehyde en daar is twee belangrike redes daarvoor:

Die eerste rede het te make met die feit dat ongeag of 'n ketoon vertak of onvertak is, die massa van die herrangskikking-ioon bepaal word deur die grootte van die alkielgroep wat nie betrokke is by die

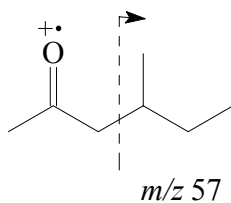
herrangskikking nie. Onvertakte metielketone en metielketone wat vertak is na die C3-koolstofatoom gee aanleiding tot die vorming van 'n ioon by  $m/z$  58.

In die tweede plek kan die teenwoordigheid van 3 of meer koolstofatome in elke alkielgroep 'n tweede McLafferty herrangskikking tot gevolg hê, omdat die enoliese produk van die eerste herrangskikking weer kan fragmenteer deur 'n sesladringsstelsel, om 'n ioon by  $m/z$  58 te gee.

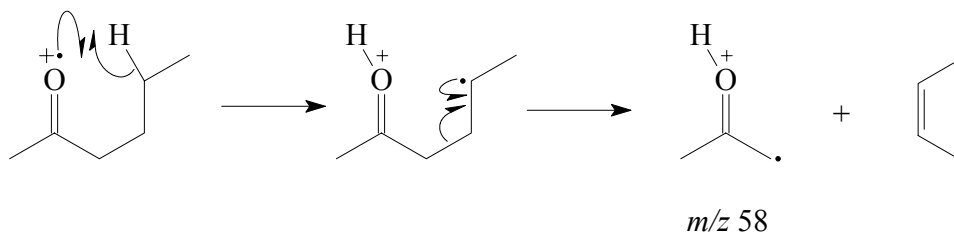
Die EI-massaspektrum van komponent U473 het 'n prominente ioon by  $m/z$  58 wat aandui dat hierdie metielketoon 'n R-groep het van drie of meer koolstofatome en dat moontlike vertakkings slegs kan voorkom op koolstof C4 en daarna. Aangesien die ioon by  $m/z$  114 die molekulêre ioon van komponent U473 is, is aanvaar dat die verbinding 'n 2-heptanoon is en die volgende drie verbindings is as moontlikhede gegee deur die rekenaarbiblioteek [3], wat versoenbaar is met bogenoemde afleidings in verband met die invloed van kettingvertakking op die massaspektra van ketone:



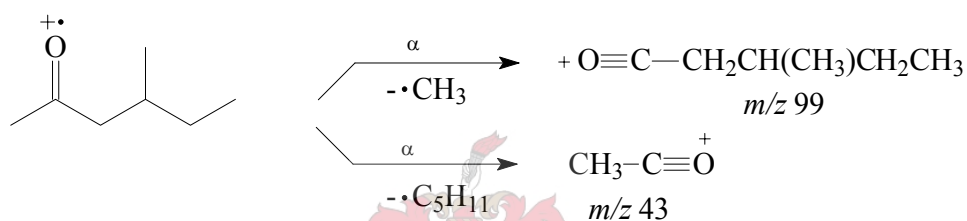
Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] is die beste voorstel vir hierdie spektrum die verbinding 2-heptanoon. Nadere bestudering van die massaspektrum het aan die lig gebring dat die ioon by  $m/z$  57 meer prominent is as wat verwag sou word vir 2-heptanoon. Hierdie meer prominente  $m/z$  57-ioon is meer kenmerkend van 4-metiel-2-heksanoon, aangesien fragmentasie by die vertakking in die molekule, met behoud van die lading op die alkielgedeelte, aanleiding gee tot 'n sterker  $m/z$  57-ioon as in die onvertakte 2-heptanoon of in 5-metiel-2-heksanoon:



Op grond van die verskil in die EI-massaspektra van die drie verbindings is komponent U473 geïdentifiseer as 4-metiel-2-heksanoon. Die ioon by  $m/z$  58 vorm soos volg:

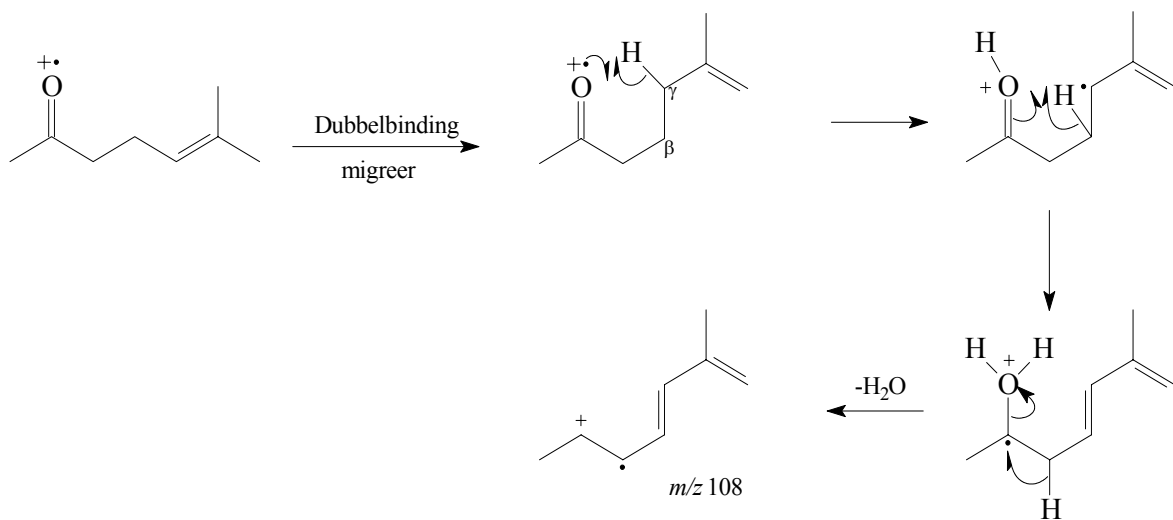


$\alpha$ -Klwing lei tot die vorming van die ione by  $m/z$  99 en 43:

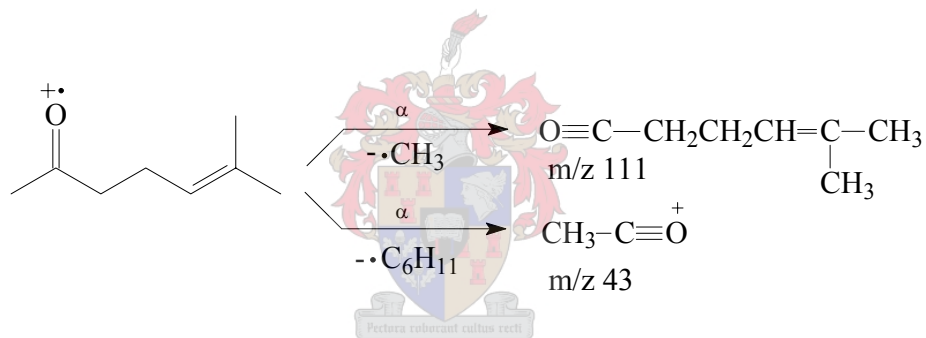


### 2.2.8 Alifatiese ketone (onversadig)

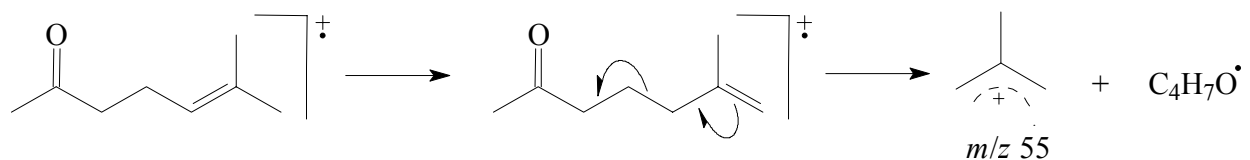
Die massaspektrum van komponent U834 (Fig. 2.27) het prominente ione by  $m/z$  43 (die basispiek), 55, 58, 68, 69, 108, 111 en 126 (die molekulêre ioon). Volgens die literatuur is 'n prominente  $[M-58]^+$ -ioon baie kenmerkend van onversadigde ketone met ten minste 4 koolstofatome tussen die karbonielgroep en die dubbelbinding [25]. Die lae intensiteit van die  $[M-58]^+$ -ioon in die massaspektrum van komponent U834, gee in hierdie geval 'n aanduiding dat die dubbelbinding nie verder as 4 koolstofatome van die karbonielgroep is nie. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan die komponent moontlik 6-metiel-5-hepten-2-oon wees. Retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese monster het bevestig dat komponent U834, en so ook komponent F991 wat in die aroma van die gefermenteerde heuningbos voorkom, wel die voorgestelde verbinding is. Die ioon by  $m/z$  108 ontstaan weens die verlies van water uit die molekulêre ioon, eers nadat die dubbelbinding moontlik na 'n meer gunstige posisie migreer het [26]. Waterstof word vir hierdie proses hoofsaaklik van die  $\beta$ -en  $\gamma$ -posisies gedoneer en 'n moontlike meganisme vir hierdie proses kan soos volg voorgestel word [27]:



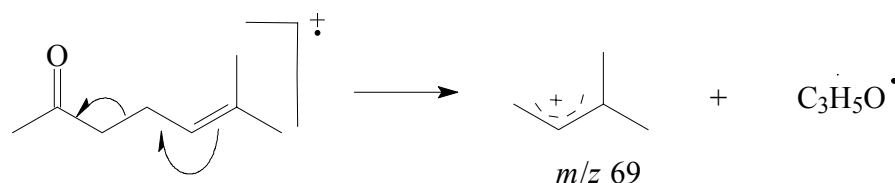
Die teenwoordigheid van die dubbelbinding beïnvloed nie die verloop van  $\alpha$ -klowingsreaksies wat die ione by  $m/z$  43 en  $m/z$  111 lewer nie:



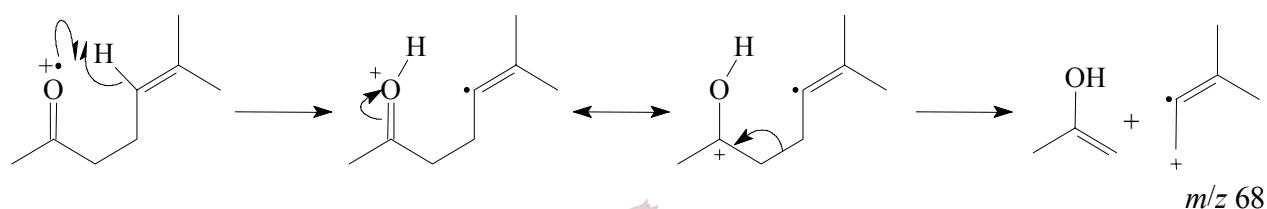
Die ioon by  $m/z$  55 ontstaan moontlik ook eers nadat die dubbelbinding van 6-metiel-5-hepten-2-oon na 'n ander posisie in die molekule migreer het, soos die geval ook was met die verlies van water. Die volgende skema illustreer hoe die  $m/z$  55-ioon in die EI-massaspektrum van 6-metiel-5-hepten-2-oon ontstaan:



Allielklowing lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  69 in die massaspektrum van 6-metiel-5-hepten-2-oon:



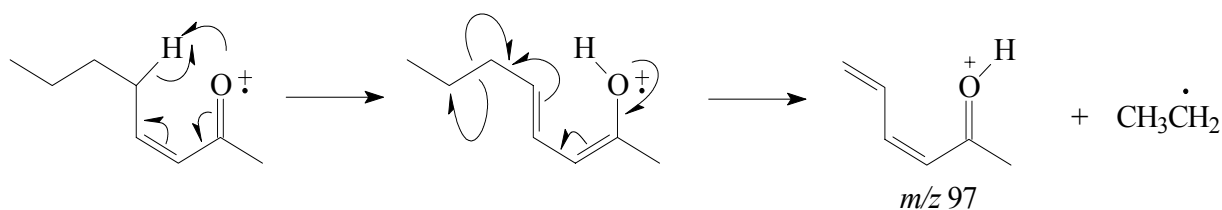
Die ioon by  $m/z$  58 in die massaspektrum van 6-metiel-5-hepten-2-oon ontstaan op dieselfde wyse as wat beskryf is vir 4-metiel-2-heksanoon (afdeling 2.2.7). 'n Soortgelyke reaksie as die een wat aanleiding gegee het tot die vorming van die ioon by  $m/z$  58, maar met behoud van die lading op die nie-suurstofgedeelte, lewer die ioon by  $m/z$  68 [28]:



Die EI-massaspektrum van komponent F1208 (Fig. 2.28) vertoon prominente ione by  $m/z$  43, 55 (basispiek), 97, 111 en 126 (molekulêre ioon). Aangesien die molekulêre ioon dieselfde is as dié van komponent U834, is vermoed dat hierdie verbinding ook 'n oktenoon kan wees. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan die verbinding moontlik 3-okten-2-oon wees. Die  $m/z$  43-ioon is relatief sterk, wat kenmerkend is van metielketone, en ontstaan deur  $\alpha$ -klowing. Die ioon by  $m/z$  111 ontstaan ook deur  $\alpha$ -klowing, soos reeds aangedui by 6-metiel-5-hepten-2-oon (komponent U834). Die massaspektrum van komponent F1208 het nie 'n baie prominente\*  $[M-58]^+$ -ioon nie, wat 'n aanduiding is dat die verbinding 'n olefiniese ketoon is met minder as 4 koolstofatome tussen die karbonielgroep en die dubbelbinding [25]. Die meganisme van vorming van die ione by  $m/z$  68 en  $m/z$  58, is reeds bespreek vir 6-metiel-5-hepten-2-oon (komponent U834).

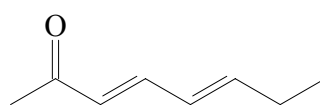
Kenmerkend van  $\alpha,\beta$ -onversadigde ketone soos 3-okten-2-oon, is die verlies van 'n  $\delta$ -alkielgroep *via* 'n herrangskikkingsreaksie soos hieronder geformuleer [29]. Die verlies van die  $\delta$ -alkielgroep gee aanleiding tot die vorming van die ioon by  $m/z$  97 in die EI-massaspektrum van komponent F1208:

\* Met prominent word bedoel 'n intensiteit van ongeveer 30% of meer.



Die ioon by  $m/z\ 55$  ( $C_4H_7^+$ ) ontstaan weens die verlies van 71 massa-eenhede en sodanige fragmentasie word moontlik gemaak deur migrasie van die dubbelbinding voor klowing tussen C4 en C5. Komponente F1208 en U1049 is op grond van hul massaspektra, asook die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], geïdentifiseer as 3-okten-2-oon. Die relatiewe GC retensietye van hierdie komponente het ook gestrook met die gemelde identifikasie.

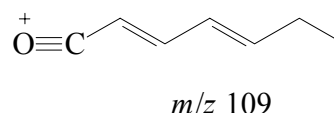
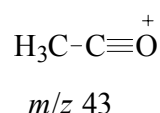
Komponente U1180, U1278 en F1341 se massaspektra het dieselfde algemene voorkoms en as voorbeeld word die massaspektrum van komponent U1180 (Fig. 2.29) bespreek. Komponente U1180 en U1278 in die ongefermenteerde heuningbos is vermoedelik isomere van mekaar. Daar is vermoed dat komponent U1180 'n dubbel-onversadigde ketoon is, want die molekulêre ioon by  $m/z\ 124$  is twee massa-eenhede laer as dié van 3-okten-2-oon (komponent F1208). Prominente ione in die EI-massaspektrum van komponent U1180 kom voor by  $m/z\ 43$ , 53, 81, 95 (basispiek), 109 en 124 (molekulêre ioon). Chemiese ionisasie bevestig dat die molekulêre massa van komponente U1180 (Fig. 2.29a) en U1278 (Fig. 2.29b) wel 124 Da is. Volgens die gerekenariseerde soektog wat gedoen is [3], kan komponent U1180 moontlik 3,5-oktadiën-2-oon wees:



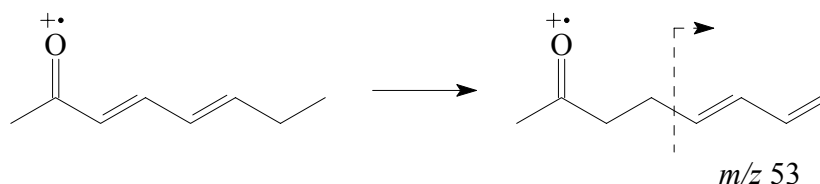
$m/z\ 124$

Aan die hand van die bogenoemde struktuur kan die vorming van die ione in die EI-massaspektrum verklaar word. Die ione by  $m/z\ 109$  en  $m/z\ 43$  ontstaan weens  $\alpha$ -klowing, waartydens verlies van die metielgroep en die groter alkielgroep met die twee dubbelbindings, aanleiding gee tot die onderstaande suurstofbevattende fragmente:

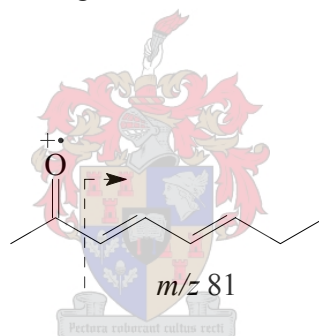




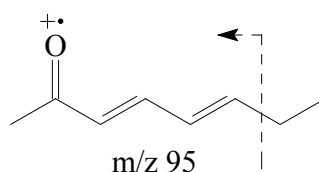
Die enigste manier waarop die ioon by *m/z* 53 ( $\text{C}_4\text{H}_5^+$ ) uit die voorgestelde verbinding kan ontstaan, is deur migrasie van dubbelbindings:



Die ioon by *m/z* 81 ontstaan deur 'n verlies van 43 massa-eenhede, wat verteenwoordigend is van 'n  $\text{CH}_3\text{CO}$ -groep. Dit is dus ook 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie maar in hierdie geval bly die lading behoue op die alkielfragment:



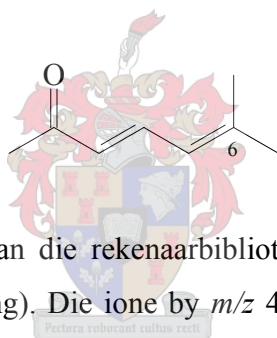
Die basispiek van komponent U1180 by *m/z* 95, verskil 29 massa-eenhede van die molekulêre ioon by *m/z* 124 en kan ontstaan deur die verlies van 'n etielgroep:



Volgens die massaspektrum van komponent U1180, die gerekenariseerde biblioteeksoektog, en chemiese ionisasie kan, met redelike sekerheid aanvaar word dat 3,5-oktadiën-2-oon die korrekte struktuur is vir die komponent. Komponente U1278 en F1341 is op soortgelyke wyse geïdentifiseer

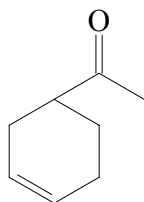
as 3,5-oktadiën-2-oon en komponent U1180 en U1278 is dus twee isomere van 3,5-oktadiën-2-oon wat in die ongefermenteerde heuningbos voorkom.

Die massaspektrum van komponent U1329 (Fig. 2.30) stem in baie opsigte met dié van 3,5-oktadiën-2-oon ooreen. Dieselfde molekulêre ioon en prominente ione by  $m/z$  109, 81, 53 en 43 kom byvoorbeeld daarin voor. Die massaspektra van die twee verbindings verskil egter van mekaar ten opsigte van die basispiek wat by 3,5-oktadiën-2-oon by  $m/z$  95 voorkom en in die massaspektrum van komponent U1329 by  $m/z$  109. Dit dui daarop dat laasgenoemde verbinding nie gereedelik 'n etielgroep verloor nie, maar dat die verlies van 'n metielgroep hier die belangrikste fragmentasie is. Die ontstaan van die ioon by  $m/z$  109 *via* die verlies van 'n metielgroep, en die afwesigheid van die ioon by  $m/z$  95 wat ontstaan *via* die verlies van 'n etielgroep, kan moontlik verklaar word indien komponent U1329 'n metielvertakking op C6 het in plaas van 'n onvertakte struktuur. Daar is dus vermoed dat die verbinding die volgende struktuur het:



Die verbinding is ook met behulp van die rekenaarbiblioteek [3] geïdentifiseer as 6-metiel-3,5-heptadiën-2-oon (92% ooreenstemming). Die ione by  $m/z$  43 en 81 ontstaan op dieselfde wyse as wat reeds bespreek is vir komponent U1180.

Die EI-massaspektrum van komponent U471 (Fig. 2.31) stem in verskeie opsigte ooreen met dié van komponent U1329, maar verskil grootliks wat betref die basispieke van die twee spektra. Hoewel ione by  $m/z$  43 en  $m/z$  109 by albei komponente voorkom, is  $m/z$  43 die basispiek by komponent U471 en  $m/z$  109 weer die basispiek by komponent U1329. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], kan komponent U471 moontlik 1-(3-siklohekseniel)-1-etanon wees:

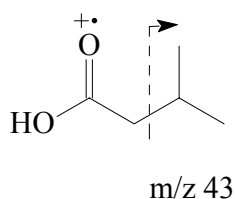


Die ione by  $m/z$  43 en  $m/z$  109 ontstaan weens  $\alpha$ -klowing met behoud van die lading op die suurstof-bevattende fragmente, en  $m/z$  81 ontstaan weens  $\alpha$ -klowing met behoud van die lading op die alkielfragment. Omdat komponent U471 'n sikliese verbinding is met die metielketoon-gedeelte as 'n substituent van die ringsisteem, kan verwag word dat, in hierdie geval, anders as by die vorige metielketone, die ioon by  $m/z$  43 die basispiek moet wees. Komponent F630 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos is ook op grond van bogenoemde data geïdentifiseer as 1-(3-siklohekseniel)-1-etanoon.

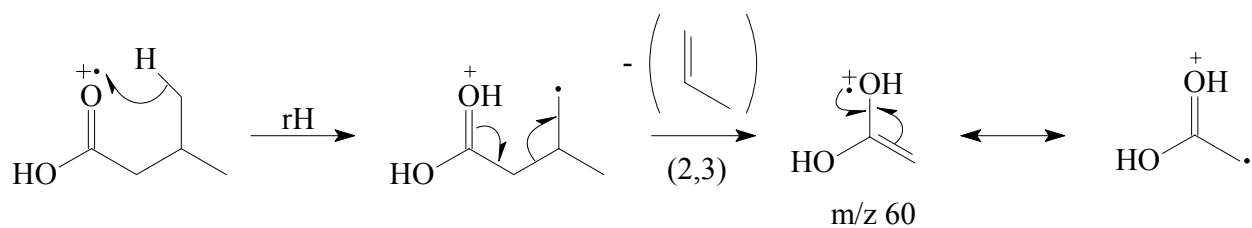
Komponente U834 en U1329, onderskeidelik 6-metiel-5-hepten-2-oon en 6-metiel-3,5-heptadiën-2-oon, is twee verbindings met strukturelemente wat ook in asikliese terpenoïede voorkom, maar is eerder in hierdie afdeling bespreek as in die terpenoïedafdeling omdat hulle massaspektra meer ooreenkomste toon met die massaspektra van die gewone onversadigde ketone en die besprekings van hulle massaspektra in hierdie afdeling dus meer logies en makliker is.

### 2.2.9 Alifatiese karboksiesure (versadig)

Die massaspektrum van komponent F540 (Fig. 2.32) vertoon prominente ione by  $m/z$  43,  $m/z$  60 (basispiek) en  $m/z$  87. Die ioon by  $m/z$  60 is kenmerkend van alifatiese sure [30] en daarom is aanvaar dat hierdie verbinding 'n alifatiese suur kon wees. Volgens die gerekenariseerde soektog [3] kan die verbinding moontlik 3-metielbutanoësuur (isovaleriaansuur) wees. Retensietydvergelyking met sintetiese 3-metielbutanoësuur het die identifikasie bevestig. Die ioon by  $m/z$  43 ontstaan *via* 'n eenvoudige klowingsreaksie:

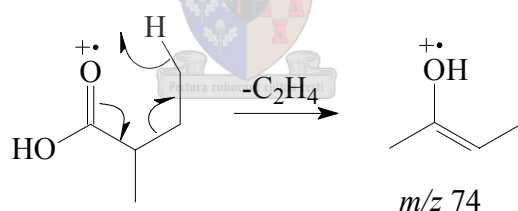


Die ioon by  $m/z$  60 ontstaan *via* 'n McLafferty herrangskikkingsreaksie [31]:



Die verlies van enige van die twee metielgroepe van die isopropielgroep kan lei tot die ontstaan van die ion by  $m/z\ 87$ .

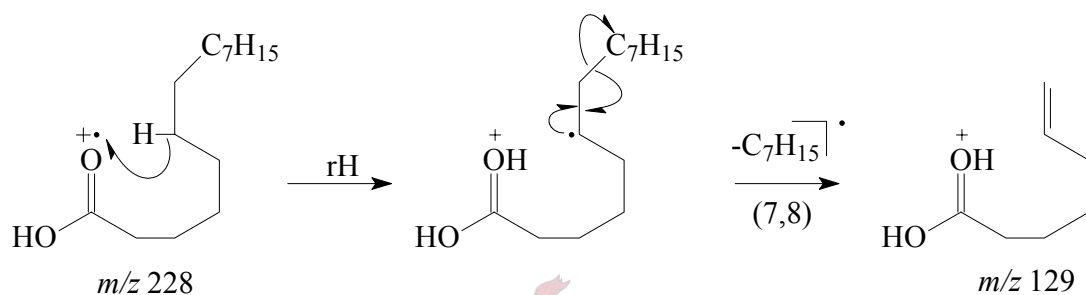
Die massaspektrum van komponent F564 (Fig. 2.33) het 'n basispiek by  $m/z\ 74$  en ander belangrike ione by  $m/z\ 45$  en  $m/z\ 87$ . Die ion by  $m/z\ 45$  is kenmerkend van karboksiesure met 'n lae molekulêre massa en besit die samestelling  $\text{CO}_2\text{H}^+$  [30]. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan die verbinding moontlik 2-metielbutanoësuur wees en retensiedyvergeelyking met die ooreenstemmende sintetiese verbinding het die identifikasie bevestig. Alhoewel komponent F564 'n karboksiesuur is, kom die kenmerkende  $m/z\ 60$ -ioon nie in die EI-massaspektrum voor nie, omdat 2-metielbutanoësuur  $\alpha$ -gesubstitueer is en die McLafferty herrangskikking lei tot die vorming van die basispiek by  $m/z\ 74$  in plaas van  $m/z\ 60$ :



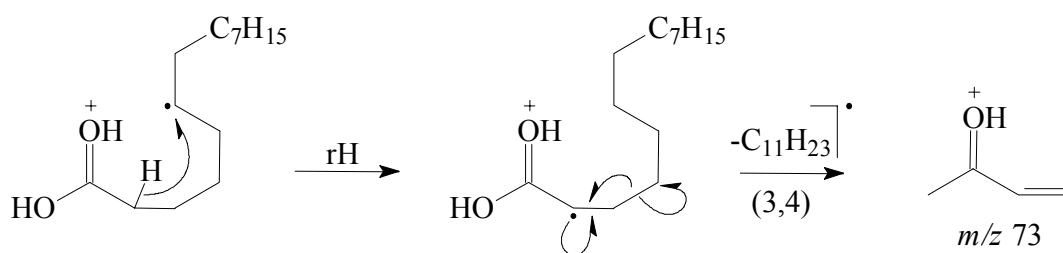
Die ion by  $m/z\ 87$  ontstaan soos in die geval van 3-metielbutanoësuur weens die verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ion.

Die EI-massaspektra van komponente U876, U4015 (Fig. 2.34), U4343 en U4668 besit almal die kenmerkende ion by  $m/z\ 60$  wat aandui dat al die verbindings alifatiese sure is [30] wat waarskynlik tot dieselfde homoloë reeks behoort. Die EI-massaspektrum van komponent U4015 sal bespreek word as voorbeeld van hierdie reeks verbindings. Die molekulêre ione van onvertakte alifatiese sure met meer as ses koolstofatome is redelik prominent en neem geleidelik toe soos wat die molekulêre massa toeneem [32]. Weens hierdie verskynsel is aanvaar dat die ion by  $m/z\ 228$  die

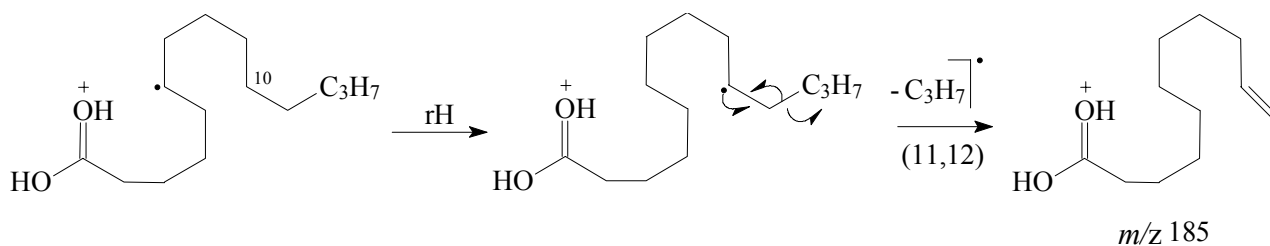
molekulêre ioon van komponent U4015 is, en daarvolgens kan afgelei word dat die verbinding tetradekanoësuur is ( $C_{14}H_{28}O_2$ , 228 Da). Die ioon by  $m/z$  60 word gevorm deur McLafferty herrangskikking op soortgelyke wyse soos reeds hierbo vir 3-metielbutanoësuur (F540) geformuleer is. 'n Kenmerkende reeks ione wat voorkom in die EI-massaspektrum van komponent U4015 is die ione by  $m/z$  73, 115, 129, ens. Hierdie ione vorm deur waterstofoordrag in die koolstofketting van die suur, gevolg deur klowing van een van die bindings  $\beta$  tot die waterstofarm koolstofatome. Die reaksie hieronder illustreer die vorming van die ioon by  $m/z$  129:



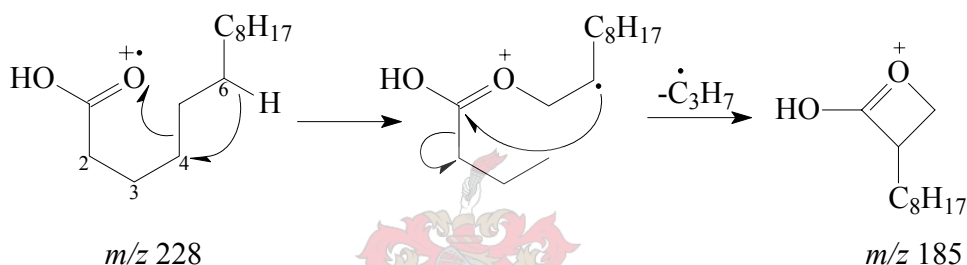
Die gunstigste van hierdie reaksies gee aanleiding tot die vorming van die ioon by  $m/z$  73 deur die oordrag van 'n waterstofatoom van die koolstofatoom wat  $\alpha$  geïsonneer is ten opsigte van die karbonylgroep, en daaropvolgende  $\beta$ -klowing. Die hoë stabiliteit van die  $\alpha,\beta$ -onversadigde geprotoneerde karbonylsisteem is die dryfveer vir dié reaksie. Hierdie ioon staan ook bekend as die [McLafferty + 13]-ioon, en die klowingsreaksie verloop soos volg:



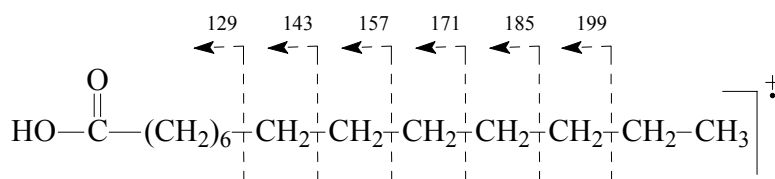
Op soortgelyke wyse gee waterstofmigrasie vanaf C10, gevolg deur  $\beta$ -klowing, aanleiding tot die ioon by  $m/z$  185:



Aangesien die ion by  $m/z$  185 ook ooreenstem met die verlies van 43 massa-eenhede uit die molekulêre ion, kan dit verduidelik word aan die hand van 'n herrangskikkingsreaksie waar 'n waterstofatoom oorgedra word van C6, sodat 'n gedeelte van die verbinding, wat C2, C3 en C4 insluit, geëlimineer word:



Die reeks ione by  $m/z$  199  $[M-29]^+$ , 185  $[M-43]^+$ , 171  $[M-57]^+$ , 157  $[M-71]^+$ ..., kan ook verklaar word aan die hand van eenvoudige  $\alpha$ -klowingsreaksies, waar die lading behoue bly op die suurstofbevattende fragmente.

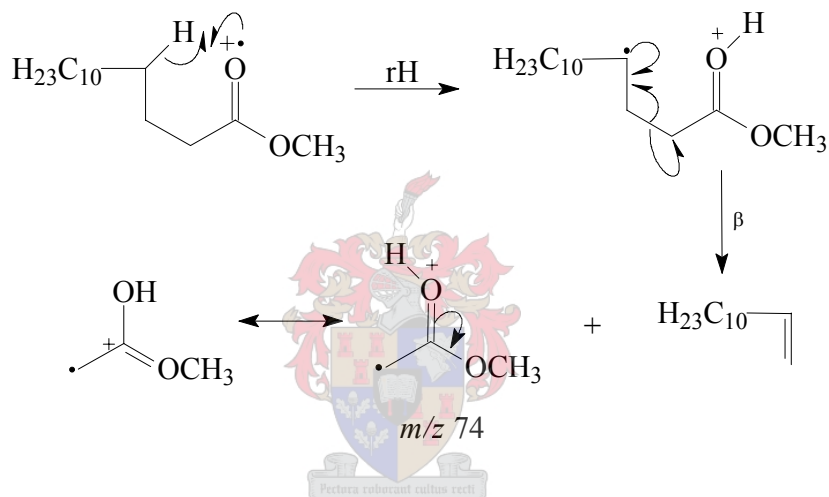


$\alpha$ -Klowing met behoud van lading op die alkielfragmente gee aanleiding tot die ontstaan van baie van die ione in die laer massagebied van die spektrum. Komponente U876, U4343 en U4668 is op soortgelyke wyse geïdentifiseer as onderskeidelik heksanoësuur, pentadekanoësuur en heksadekanoësuur. Retensietydvergelyking met sintetiese monsters van tetradekanoësuur en heksadekanoësuur het die identifikasie van onderskeidelik komponente U4015 en U4668 bevestig.

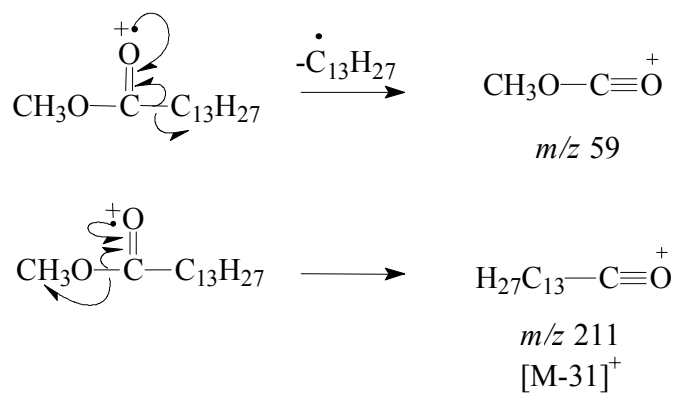
Tetradekanoësuur en heksadekanoësuur kom ook voor in die aroma van die gefermenteerde heuningbos as komponente F4187 en F4848 en is op soorgelyke wyse geïdentifiseer.

### 2.2.10 Metielesters

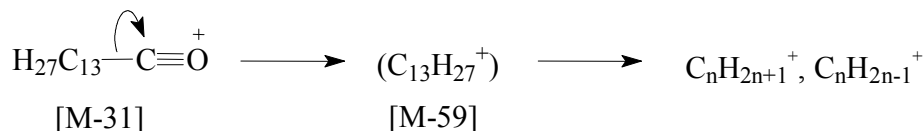
Die EI-massaspektrum van komponent U3879 (Fig. 2.35) vertoon 'n molekulêre ioon by  $m/z$  242 en 'n basispiek by  $m/z$  74 wat karakteristiek is van metielesters van onvertakte C6- tot C26-karboksiësure, en op grond hiervan is komponent U3879 geïdentifiseer as metieltetradekanoaat (metielmeristaat). Die ioon by  $m/z$  74 ontstaan *via* 'n McLafferty herrangskikking [33]:



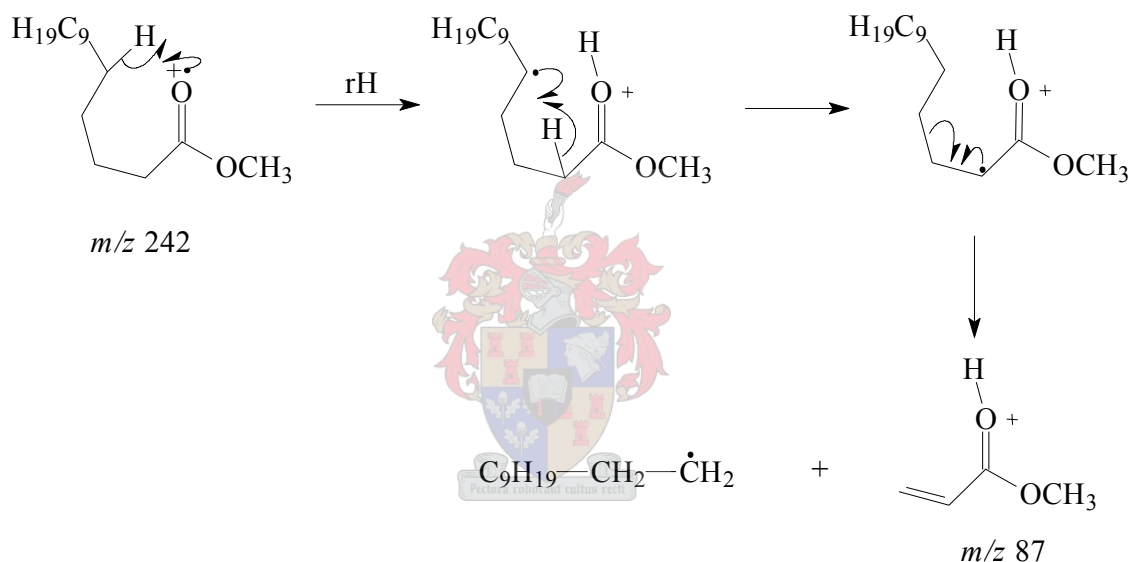
Gewone  $\alpha$ -klowing gee aanleiding tot die vorming van die ione by  $m/z$  211 en  $m/z$  59 wat karakteristiek is van metielesters, en waarvan die intensiteit afneem met 'n toename in die molekulêre massa van die metielesters [34]. Die ione vorm soos volg:



Die  $[M-31]^+$ -ioon kan ook, soos aangedui in die volgende diagram, verder fragmenteer om die kenmerkende  $C_nH_{2n+1}$ - en  $C_nH_{2n-1}$ -ioonreekse te vorm [34]:



Die ione by  $m/z$  87, 101, 115... vorm deel van die  $\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_n^+$  ionone. Die ioon by  $m/z$  87 ontstaan wanneer die  $\delta$ - (of  $\epsilon$ -) waterstofatoom migreer, gevolg deur klouwing van die  $\beta$ - $\gamma$ -binding terwyl daar terselfdertyd ook 'n 1,4- (of 1,5-) waterstofverskuiwing plaasvind [35]:



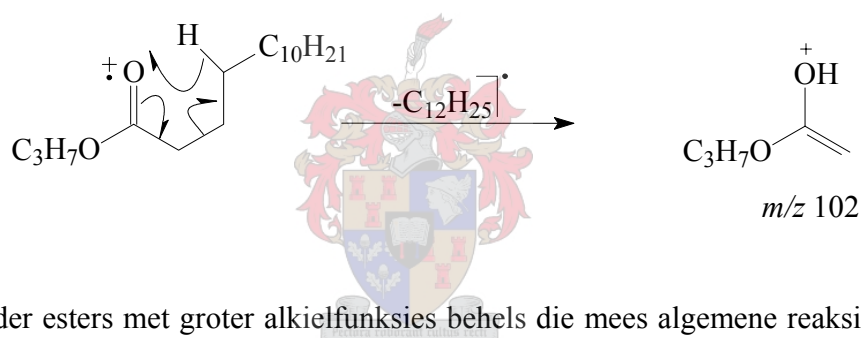
Ander ione in hierdie reeks wat ook redelik prominent is in die EI-massaspektrum van komponent U3879, kom voor by  $m/z$  143 en  $m/z$  199 wat vier metileeneenhede van mekaar verskil. Hierdie prominente ione ontstaan heel waarskynlik deur verplasingsreaksies of gunstige resiproke 1,4-waterstofmigrasies wat die aangrensende koolstof-koolstof bindings aktiveer vir klouwing [35].

### 2.2.11 Etil- en hoër esters

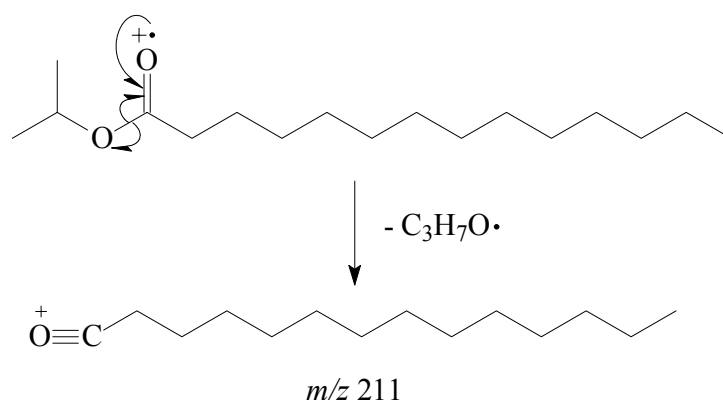
Die EI-massaspektrum van komponent U4232 (Fig. 2.36) vertoon prominente ione by  $m/z$  60, 102, 129, 211 en 228. Die ioon by  $m/z$  102 kom algemeen in die spektra van  $\alpha$ -metielgesubstitueerde etiel-,  $\alpha$ -etielgesubstitueerde metiel-, ongesubstitueerde propiel- en isopropielesters voor. Aangesien



vermoed is dat komponent U4232 een van die bogenoemde tipes esters kan wees wat ná komponent U3879 (metielmeristaat,  $M^+$  242) elueer, is dit moontlik dat die ioon met hoogste massa by  $m/z$  228 in die EI-massaspektrum van komponent U4232, nie die molekulêre ioon is nie. In die massaspektra van  $\alpha$ -metielgesubstitueerde etielesters en ongesubstitueerde propielesters is die ioon by  $m/z$  102 selfs die basispiek, wat nie die geval is in die spektrum van komponent U4232 nie. Metiel-2-etielesters besit ook 'n prominente ioon by  $m/z$  102 en wanneer hierdie fragment 'n metielradikaal verloor, vorm 'n prominente ioon by  $m/z$  87, wat ook nie die geval is in die EI-massaspektrum van komponent U4232 nie [36]. Die lae intensiteit van die ioon by  $m/z$  87 dien dus as addisionele bewys dat die ester onder bespreking nie 'n vertakking in die karboksielgedeelte bevat nie, en daar kon dus met sekerheid aanvaar word dat komponent U4232 die ester isopropieltetradekanoaat is (isopropielmeristaat, 270 Da), soos die rekenaarbiblioteek voorgestel het [3]. Die ioon by  $m/z$  102 word gevorm deur 'n McLafferty herrangskikking:



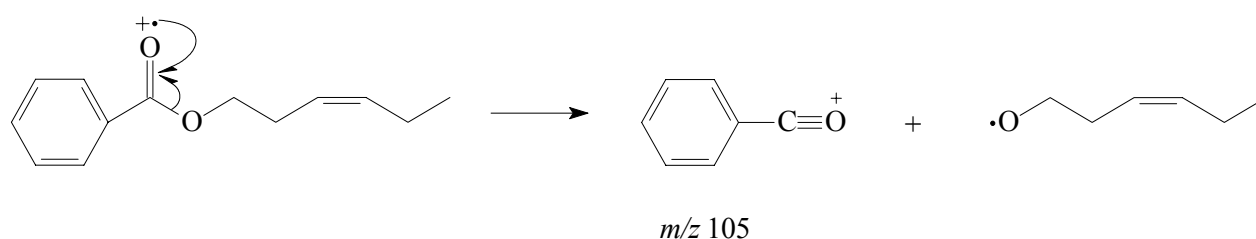
By etiel- en ander esters met groter alkielfunksies behels die mees algemene reaksie die eliminasië van die alkielfragment van die alkoholgedeelte, met die gelyktydige oordrag van een of twee waterstofatome om 'n karboksiesuurioon of 'n geprotoneerde karboksiesuurioon te vorm. Die metielgroepe van isopropielesters dien gewoonlik as waterstofdonors, en hierdie reaksie gee aanleiding tot die vorming van die ione by  $m/z$  228 en  $m/z$  229 in die EI-massaspektrum van komponent U4232 [37]. Baie van die ione, bv. dié by  $m/z$  60, 73, 129 en 185 wat in die massaspektrum van die ester voorkom, stem ooreen met dié wat waargeneem word in die massaspektrum van tetradekanoësuur (komponent 4015) en ontstaan dus op dieselfde wyse as vir die karboksiesuur [38]. Die ioon by  $m/z$  211 in die massaspektrum van isopropielmeristaat ontstaan *via* die verlies van die alkoksiedeelte van die ester deur  $\alpha$ -klowing:



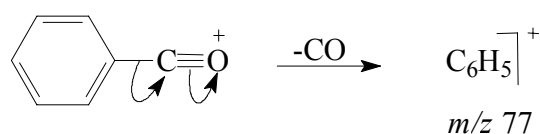
Isopropielmeristaat (komponent F4396) is op dieselfde wyse ook in die gefereamenteerde heuningbos geïdentifiseer.

### 2.2.12 Aromatiese esters

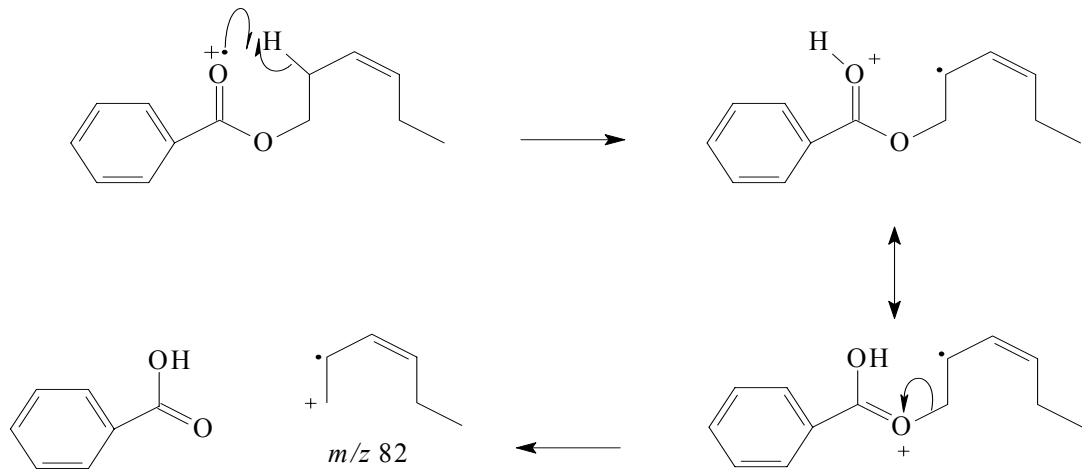
Prominente ione kom by  $m/z$  67, 77, 82, 105 (basispiek) en 123 voor in die EI-massaspektrum van komponent U3281 (Fig. 2.37). Die CI-massaspektrum (Fig. 2.37a) vertoon 'n  $[M+1]$ -ioon by  $m/z$  205 wat dui op 'n molekulêre massa van 204 Da. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], kan die verbinding moontlik (Z)-3-heksenielbensoaat wees. Retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster van die verbinding het hierdie afleiding bevestig. Die basispiek by  $m/z$  105 in die betrokke massaspektrum ontstaan as gevolg van  $\alpha$ -kloning:



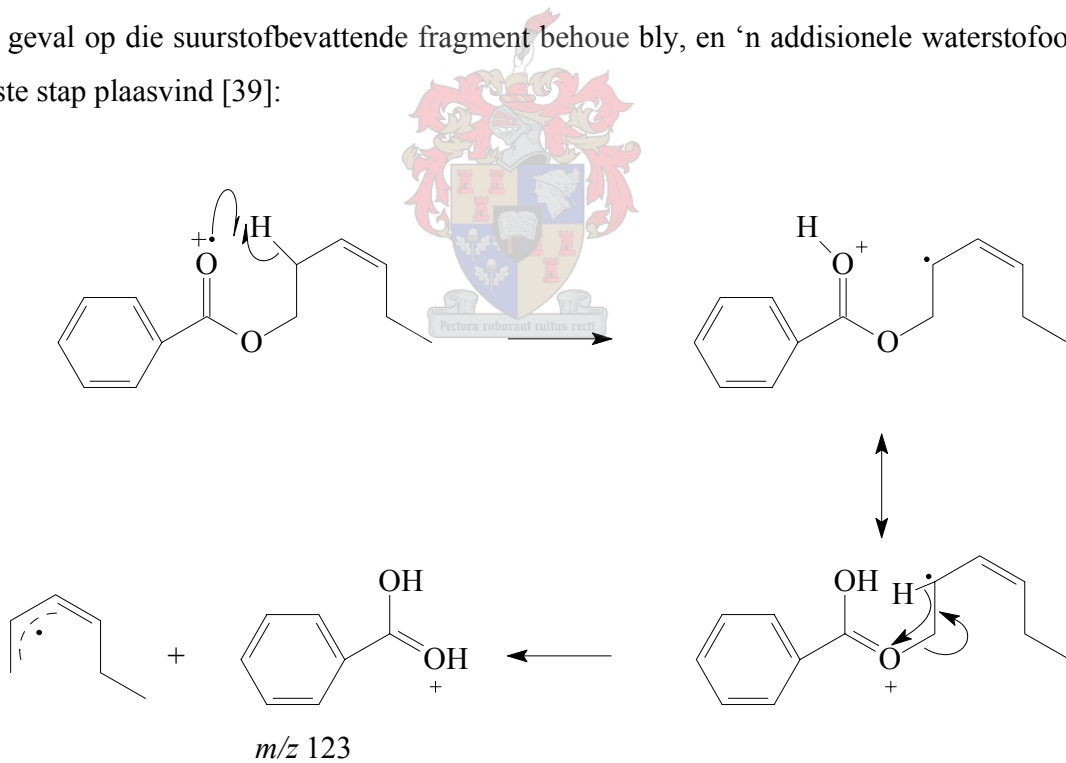
Die ioon by  $m/z$  77 is baie kenmerkend van benseenverbindinge, en ontstaan moontlik *via* die verlies van CO uit die  $m/z$  105-ioon:



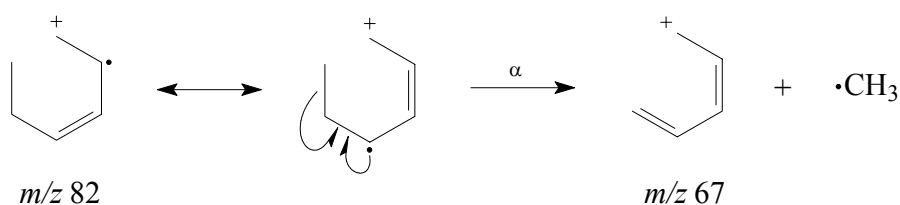
‘n Herrangskikkingsreaksie is verantwoordelik vir die vorming van die ioon by  $m/z$  82 [39]:



Die ioon by  $m/z$  123 ontstaan op soortgelyke wyse as die ioon by  $m/z$  82, behalwe dat die lading in hierdie geval op die suurstofbevattende fragment behoue bly, en ‘n addisionele waterstofoordrag in die laaste stap plaasvind [39]:



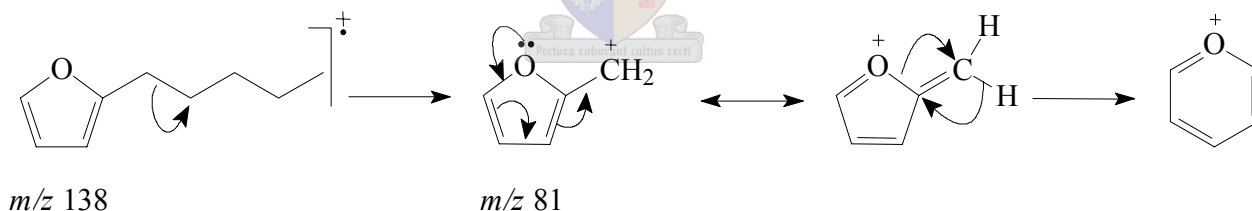
Migrasie van die dubbelbinding en verlies van ‘n metielgroep uit die ioon by  $m/z$  82, kan moontlik die vorming van die ioon by  $m/z$  67 verklaar:



(*Z*)-3-Heksenielbensoaat (komponent F3444) is in die gefermenteerde heuningbos geïdentifiseer, op dieselfde wyse as vir komponent U3281.

### 2.2.13 Furaanverbindinge

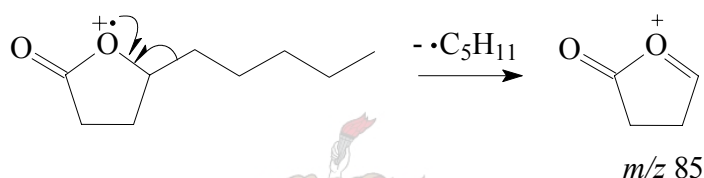
Komponent U871 (Fig. 2.38) het 'n molekulêre massa van 138 Da wat vasgestel is deur waarneming van 'n  $[M+1]^+$ -ioon in die CI-spektrum (Fig. 2.38a). Ander belangrike ione kom in die EI-massaspektrum voor by  $m/z$  123, 109, 95 en 81 (basispiek). Die ioon by  $m/z$  81 kan 'n  $[\text{C}_6\text{H}_9]^+$ -ioon of  $[\text{C}_5\text{H}_5\text{O}]^+$ -ioon wees. Laasgenoemde ioon vorm onder andere deur die  $\beta$ -klowing van alkielfurane [40]. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3], kan die verbinding moontlik 2-pentielfuraan wees en retensiedyvergeelyking met sintetiese 2-pentielfuraan het bevestig dat hierdie identifikasie wel korrek is. Die vorming van die ioon by  $m/z$  81 kan soos volg voorgestel word:



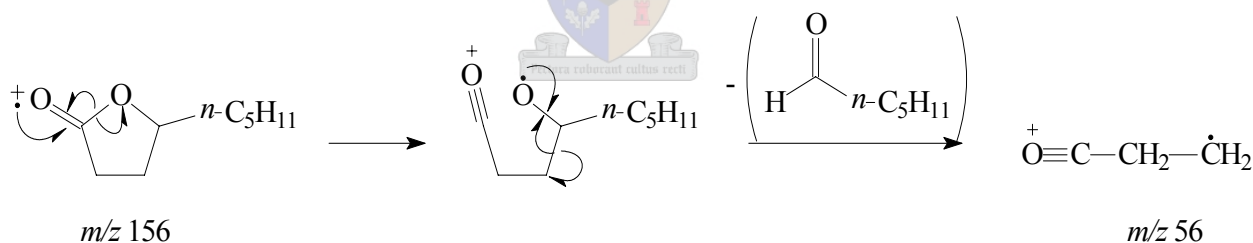
Die ioon by  $m/z$  123 ontstaan as gevolg van die verlies van 'n metielgroep, en die opeenvolgende verlies van metileengroepe lei tot die vorming van die ione by  $m/z$  109 en  $m/z$  95. Komponent F1028 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos is op dieselfde gronde geïdentifiseer as 2-pentielfuraan.

## 2.2.14 Laktone

Die massaspektrum van komponent U2415 (Fig. 2.39) het 'n prominente basispiek by  $m/z$  85 wat baie kenmerkend is van  $\gamma$ -gesubstitueerde  $\gamma$ -laktone. Aangesien die intensiteit van die  $m/z$  85-ioon soveel sterker is as dié van die ander ione in die massaspektrum, kan aanvaar word dat die laktoon onvertak is. Die molekulêre ioon is nie waargeneem nie, en dit is nie ongewoon vir sulke  $\gamma$ -laktone nie, aangesien slegs 'n klein fraksie van die totale ioonstroom gedra word deur die molekulêre ioon [41]. Volgens die CI-massaspektrum (Fig. 2.39a) is die molekulêre massa van die verbinding egter 156 Da. Die verlies van die fragment wat lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  85 stem ooreen met die verlies van 'n pentielgroep *via*  $\alpha$ -klowing:



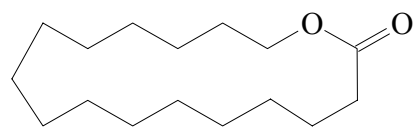
Die ioon by  $m/z$  56 word soos volg gevorm:



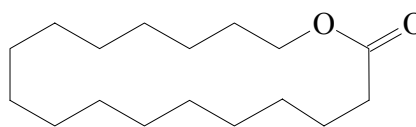
Uit bogenoemde is afgelei dat komponent U2415 die verbinding  $\gamma$ -nonalaktone is en dieselfde struktuur kon ook toegeken word aan komponent F2575 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos.

Die massaspektra van komponente U4202 (Fig. 2.40), U4533 (Fig. 2.41) en U4848 (Fig. 2.42) stem in baie opsigte ooreen met kenmerkende groepies ione rondom sterker ione by  $m/z$  55, 69, 83, ens. Die molekulêre ioon van komponent U4533 kom voor by  $m/z$  254, en dié van komponent U4848 by  $m/z$  268, maar geen molekulêre ioon word vir U4202 waargeneem nie. Eersgenoemde twee

komponente is dus homoloë. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] wat gedoen is, is die twee verbindings (U4533 en U4848) die volgende makrosikliese laktone, onderskeidelik 16-heksadekanolied en 17-heptadekanolied:



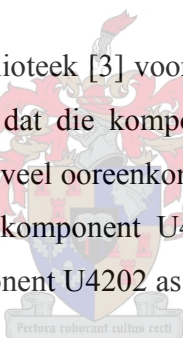
16-heksadekanolied



17-heptadekanolied

Retensietydvergelyking met sintetiese 16-heksadekanolied het die identifikasie van komponent U4533 bevestig en op grond van die ooreenstemming van die twee verbindings se massaspektra en die molekulêre ioon van komponent U4848 by  $m/z$  268, is laasgenoemde komponent as 17-heptadekanolied geïdentifiseer.

Alhoewel deur die gerekenariseerde biblioteek [3] voorgestel is dat komponent U4202 moontlik 'n hidroksilaktoon kon wees, is vermoed dat die komponent eerder 15-pentadekanolied kan wees, aangesien die komponent se spektrum baie ooreenkomstig toon met dié van komponente U4533 en U4848. Die relatiewe retensietyd van komponent U4202 ten opsigte van hierdie twee laktone bevestig ook die identifikasie van komponent U4202 as 15-pentadekanolied.

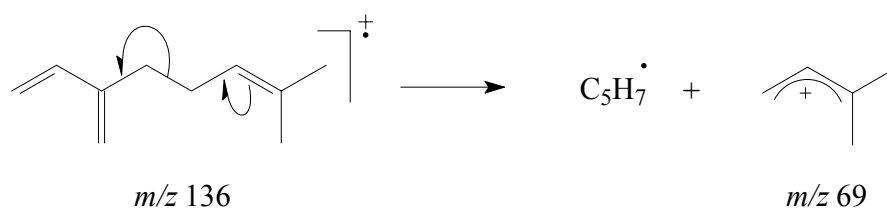


### 2.2.15 Terpenoïede

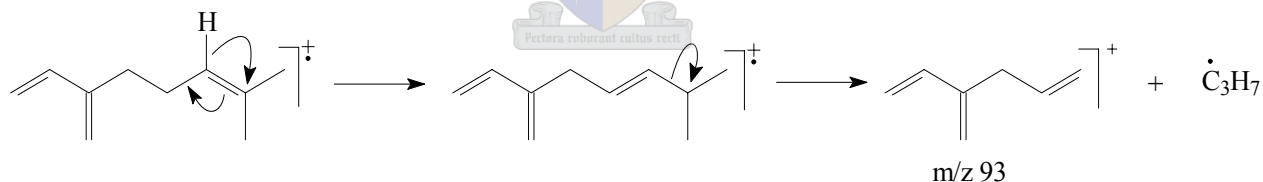
Terpenoïede maak 'n belangrike deel uit van die verbindings teenwoordig in die aroma van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, en alhoewel daar tog in baie gevalle ooreenkomste en karakteristieke ione teenwoordig is in die massaspektra van hierdie verbindings, is die massaspektra oor die algemeen moeilik om te interpreteer. As gevolg hiervan is daar veral gebruik gemaak van twee verskillende rekenaarbiblioteke met massaspektra om van hierdie verbindings te probeer identifiseer. Die identifikasie van sommige van die terpenoïede is verder ook bemoeilik deurdat standarde van hierdie verbindings moeilik bekombaar en sintetiseerbaar is en dus nie in alle gevalle beskikbaar was vir retensietydvergelyking nie.

### 2.2.15.1 Terpene

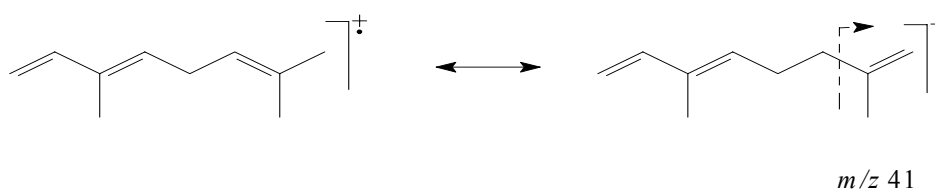
Die massaspektrum van komponent F1038 (Fig. 2.43) toon prominente ione by  $m/z$  41 (basispiek), 69, 91, 93 en 136 (molekulêre ion). Hierdie kombinasie van ione is kenmerkend van terpenoïede, en het die vermoede laat ontstaan dat komponent F1038 moontlik 'n terpenoïed kan wees. Die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het mirseen as 'n moontlikheid voorgestel, en vervolgens is gekyk of die massaspektrum wel met die struktuur van mirseen versoenbaar is. Die ion by  $m/z$  69 ontstaan *via* klowing van die dubbele allielbinding [42]:



Dubbelbindings in onversadigde koolwaterstowwe kan in die ionbron van die massaspektrometer migreer en die vorming van die ion by  $m/z$  93 deur die verlies van 'n isopropielgroep ( $C_3H_7$ ), kan aan hierdie verskynsel toegeskryf word:

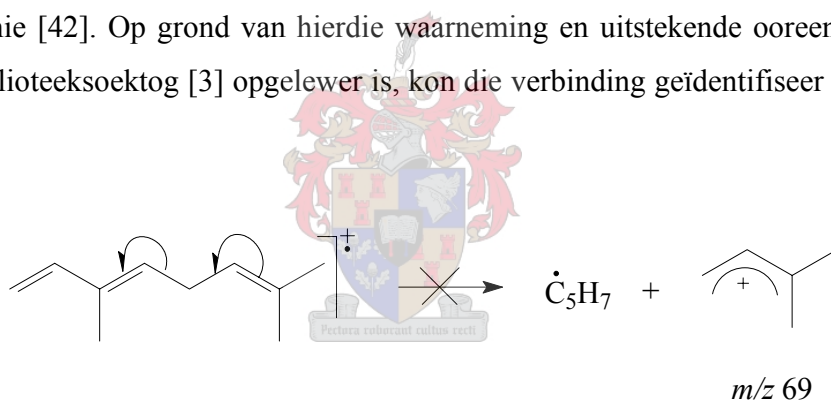


Die ion by  $m/z$  93 kan egter ook uit die  $[M-15]^+$ -ioon vorm *via* die verlies van  $C_2H_4$  [43]. Die ion by  $m/z$  91 ontstaan uit die  $m/z$  93-ioon deur die verlies van twee waterstofatome of 'n waterstofmolekuul, terwyl die ion by  $m/z$  41 ooreenstem met 'n  $[C_3H_5]^+$ -ioon wat slegs kan vorm indien die dubbelbindings in mirseen soos volg herrangskik [43, 44]:



Teen hierdie agtergrond kan met redelike sekerheid aanvaar word dat komponent F1038 wel mirseen is. Komponent U880 in die aroma van die ongefermenteerde heuningbos, is ook op soorgelyke wyse geïdentifiseer as mirseen.

Die EI-massaspektrum van komponent F1235 (Fig. 2.44) stem in baie opsigte ooreen met dié van mirseen, en toon prominente ione by  $m/z$  41, 77, 79, 93 (basispiek), 105, 121, en 136 (molekulêre ioon). Die belangrikste verskil tussen die massaspektrum van komponent F1235 en dié van mirseen, is die laer intensiteit van die ioon by  $m/z$  69 in komponent F1235, wat 'n goeie aanduiding gee van die moontlike struktuur van die komponent. Gewoonlik is die massaspektra van alkene (en veral poliëne) onafhanklik van die posisie van die dubbelbindings tensy die dubbelbindings gesubstitueer is of byvoorbeeld tot bensiel- of allielklowing aanleiding gee. Daar is dus afgelei dat komponent F1235 nie, soos mirseen, 'n dubbele allielbinding besit wat aanleiding kan gee tot 'n prominente ioon by  $m/z$  69 nie, maar eerder 'n alliel-vinielbinding wat nie tot 'n gunstige klowingsreaksie aanleiding gee nie [42]. Op grond van hierdie waarneming en uitstekende ooreenstemming (93%) wat deur die biblioteeksoektog [3] opgelewer is, kon die verbinding geïdentifiseer word as *trans*- of (*E*)-osimeen:

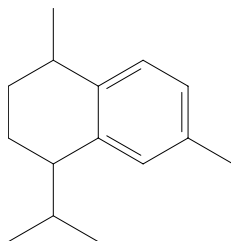


Die ioon by  $m/z$  121 in die massaspektrum van hierdie komponent vorm deur die verlies van 'n metielgroep en die ione by  $m/z$  93,  $m/z$  91 en  $m/z$  41 ontstaan volgens die fragmenteringsprosesse wat vir mirseen geformuleer is. Aangesien die verbinding nie waargeneem is in die ekstrak van die heuningbos nie, was retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese monster nie moontlik nie. (*E*)-Osimeen (U1077) is op dieselfde wyse ook in ongefermenteerde heuningbos geïdentifiseer.

Die EI-massaspektrum van komponent F3282 (Fig. 2.45) het prominente ione by  $m/z$  202, 160 en 159 (basispiek), 144, 128 en 129. Die ioon by  $m/z$  159 ontstaan weens die verlies van 43 massa-eenhede wat dui op die verlies van 'n isopropiel- of asielgroep. Volgens die gerekenariseerde

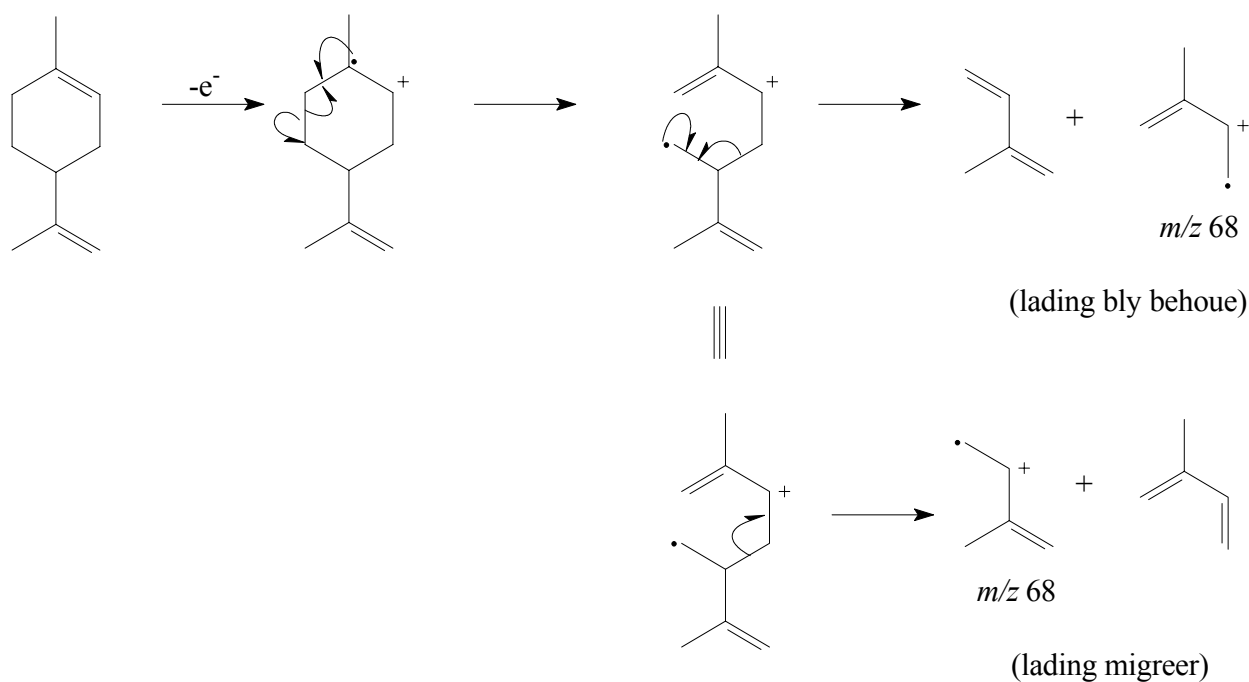


soektog, kan komponent F3282 moontlik kalameneen wees (88% ooreenstemming) [3], wat 'n bisikliese, aromatiese koolwaterstofverbinding met 'n molekulêre massa van 202 Da is:

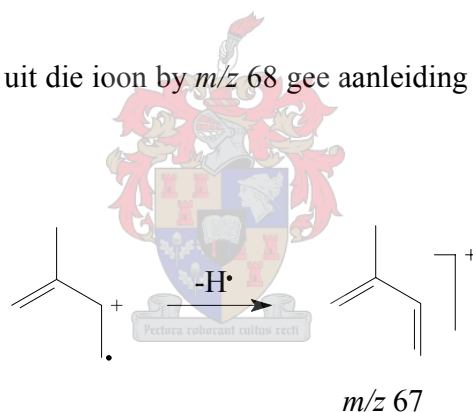


Die ioon by  $m/z$  159 kan verklaar word aan die hand van die verlies van die isopropielgroep. Die ione by  $m/z$  144 en  $m/z$  129 kan moontlik ontstaan vanaf die ioon by  $m/z$  159 deur die agtereenvolgende verlies van twee metielgroepe. Daar kan dus met redelike sekerheid aanvaar word dat komponent F3282 wel kalameneen is, en so ook komponent U3119 in die ongefermenteerde heuningbos.

Die EI-massaspektra van komponente F1187 (Fig. 2.46) en F1317 (Fig. 2.47) toon soortgelyke prominente ione met verskillende relatiewe intensiteite by  $m/z$  53, 67, 77, 79, 91, 93, 107 en 121. Komponent F1187 het 'n basispiek by  $m/z$  68, terwyl hierdie ioon heeltemal afwesig is in die massaspektrum van komponent F1317. Die ione by  $m/z$  136,  $m/z$  121 en  $m/z$  93 dui daarop dat hierdie komponente terpenoïede kan wees. Volgens die gerekenariseerde soektog [3] kan komponent F1187 moontlik limoneen wees en komponent F1317  $\gamma$ -terpineen. Retensietydvergelyking met sintetiese limoneen het bevestig dat die identifikasie van komponent F1187 korrek is. Die ioon by  $m/z$  68 ontstaan waarskynlik *via* 'n retro-Diels-Alderreaksie [45]:

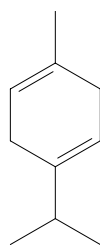


Verlies van 'n waterstofatoom uit die ioon by  $m/z$  68 gee aanleiding tot die vorming van die ioon by  $m/z$  67:



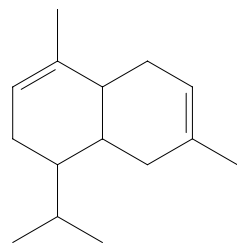
Die ioon by  $m/z$  121 ontstaan deur die verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ioon en die daaropenvolgende verlies van 'n  $\text{CH}_2$ -groep gee aanleiding tot die vorming van die ioon by  $m/z$  107. Die ioon by  $m/z$  93 ontstaan deur die verlies van 'n  $\text{C}_3\text{H}_7$ -groep uit die molekulêre ioon, wat moontlik gemaak word deur die migrasie van die dubbelbinding in die isopropielgedeelte van die molekule. Komponent U1029 in die ongefermeteerde heuningbos is ook op bogenoemde wyse geïdentifiseer as limoneen.

Aangesien komponent F1317 moontlik  $\gamma$ -terpineen kon wees, is die massaspektrum vir verdere ondersteunende inligting ondersoek.  $\gamma$ -Terpineen het die volgende struktuur:

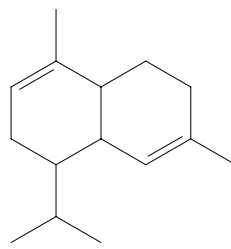


Soos reeds genoem, is een van die verskille wat waargeneem kon word in die spektra van limoneen en komponent F1317, die afwesigheid van die  $m/z$  68-ioon in komponent F1317. Die rede vir die afwesigheid van hierdie ion is die twee dubbelbindings in die 6-lidring van die molekule, wat 'n retro-Diels-Alderreaksie bemoeilik. Nog 'n belangrike verskil tussen die twee spektra is die teenwoordigheid van die ion by  $m/z$  134 in komponent F1317 en die afwesigheid daarvan in limoneen. Die ion by  $m/z$  134 ontstaan weens die verlies van twee waterstofatome vanuit die molekulêre ion, as gevolg van termiese ontbinding. Die dryfkrag van hierdie reaksie is die vorming van 'n aromatiese ring en dit vind makliker plaas in komponent F1317 as in limoneen, omdat daar reeds twee dubbelbindings in die 6-lidring aanwesig is [46]. Die ion by  $m/z$  121 ontstaan, soos in limoneen, weens die verlies van 'n metielgroep en die ion by  $m/z$  93 as gevolg van die verlies van die isopropielgroep. Op grond van hierdie bewyse kan dus met redelike sekerheid aanvaar word dat die verbinding wel  $\gamma$ -terpineen is. Komponent U1159 is op soortgelyke wyse as hierbo geïdentifiseer, en addisionele retensietydvergelyking met sintetiese  $\gamma$ -terpineen kon ook gedoen word om die identifikasie van die verbinding in die ongefermenteerde heuningbos te bevestig.

Die EI-massaspektrum van komponent F3295 (Fig. 2.48) het prominente ione by  $m/z$  91, 105, 134, 161 (basispiek), 189 en 204 (molekulêre ion). Die massaspektrum van komponent F3208 (Fig. 2.49) toon sekere ooreenkomste met dié van komponent F3295 en het prominente ione by  $m/z$  93, 105 (basispiek), 119, 161, 189 en 204 (molekulêre ion). Die ion by  $m/z$  189 in beide komponente F3295 en F3208 ontstaan weens die verlies van 'n metielgroep. In komponent F3295 is die basispiek die ion by  $m/z$  161 wat ontstaan deur die verlies van  $C_3H_7$  (isopropielgroep). Dieselfde ion kom ook voor in komponent F3208, maar die basispiek is in hierdie geval by  $m/z$  105. Nog 'n belangrike verskil wat waargeneem kan word in die massaspektra van hierdie komponente, is die hoë intensiteit van die ion by  $m/z$  134 in komponent F3295 teenoor die lae intensiteit van dieselfde ion in komponent F3208. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het die volgende twee bisikliese onversadigde koolwaterstofverbindinge as moontlikhede voorgestel:



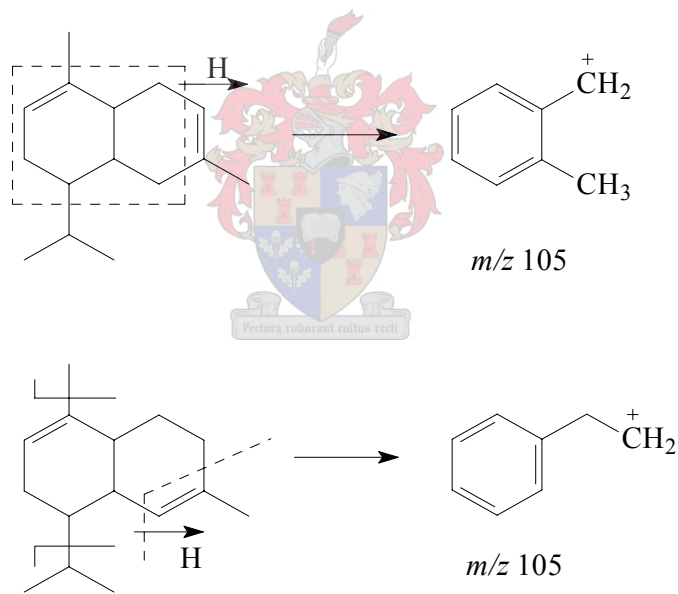
1-β-kadineen



α-muuroleen

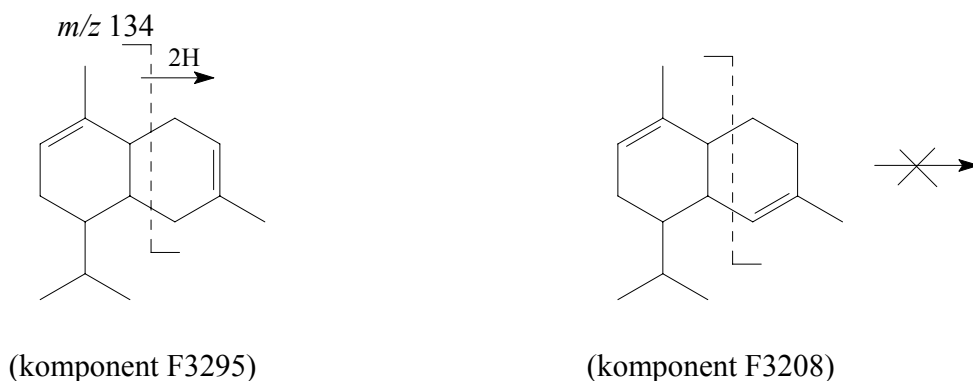
Vervolgens is gekyk na hoe die die bogenoemde strukture aanleiding kan gee tot die ione in die massaspektra, om te bevestig dat die twee verbindings wel 1-β-kadineen en α-muuroleen is.

Beide komponente F3295 en F3208 het 'n ioon by  $m/z$  105 en die onderstaande skema dui aan hoe hierdie ioon moontlik in die onderskeie komponente se massaspektra kan ontstaan:

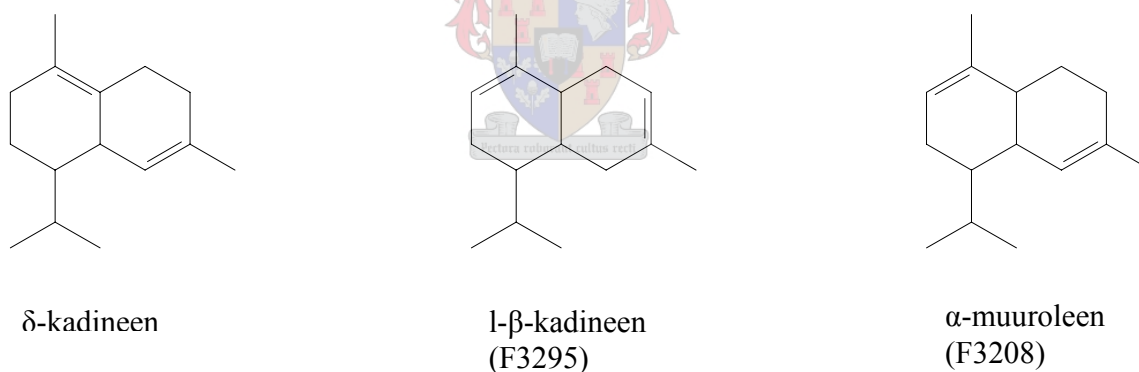


In die massaspektrum van komponent F3208, wat moontlik α-muuroleen kan wees, is die ioon by  $m/z$  105 die basispiek, want die bensiliumion wat vorm, word beter gestabiliseer as die  $[M-43]^+$ -ioon. Die situasie is egter omgekeerd in die massaspektrum van komponent F3295, wat moontlik 1-β-kadineen kan wees. In hierdie komponent is die  $[M-43]^+$ -ioon se vorming naamlik gunstiger as die vorming van die ioon by  $m/z$  105 as gevolg daarvan dat die klowing in die tweede geval nie die besonder stabiele bensiliumioon lewer nie.

Die vorming van die prominente ion by  $m/z$  134 in die massaspektrum van komponent F3295 kan toegeskryf word aan die klowing van twee allielbindings, maar nie in die geval van komponent F3208 nie:



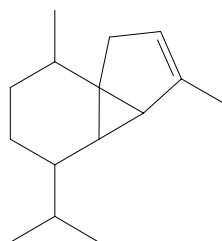
Die  $m/z$  134-ioon kom wel ook voor in 'n gepubliseerde massaspektrum van  $\delta$ -kadieneen en kan toegeskryf word aan verskuiwing van die betrokke dubbelbindings na posisies soortgelyk aan dié in l- $\beta$ -kadieneen [47].



Komponente F3295 en F3208 is op grond van die bewyse hierbo onderskeidelik geïdentifiseer as l- $\beta$ -kadieneen en  $\alpha$ -muuroleen en hierdie twee verbindings kom ook voor in die ongefermenteerde heuningbos as komponente U3132 en U3047.

Die EI-massaspektrum van komponent U2555 (Fig. 2.50) bevat ook baie van die prominente ione wat in die massaspektra van die vorige twee verbindings aanwesig is, byvoorbeeld die ione by  $m/z$

91, 93, 105, 119 (basispiek), 161, 189 en 204 (molekulêre ioon). 'n Trisikliese terpeen,  $\alpha$ -kubebteen, is as 'n moontlikheid oorweeg op grond van 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog [3]:



$\alpha$ -kubebteen

Die ioon by  $m/z$  189 ontstaan, soos in die vorige twee verbindings, deur die verlies van 'n metielgroep en die ioon by  $m/z$  161 as gevolg van die verlies van 'n isopropielgroep. Die ione by  $m/z$  119 en  $m/z$  105 ontstaan moontlik deur verlies van onderskeidelik ses en sewe koolstofatome met gepaardgaande waterstofoordrag wat aanleiding gee tot 'n aromatiese ringsisteem. Retensietydvergelyking met die sintetiese verbinding het bevestig dat komponent U2555 wel  $\alpha$ -kubebteen is en komponent F2718 in die gefermenteerde heuningbos is op soortgelyke wyse ook as  $\alpha$ -kubebteen geïdentifiseer.

Die massaspektrum van komponent U2723 (Fig. 2.51) het ook die kenmerkende ione by  $m/z$  105, 120, 133, 147, 161, 175, 189 en 204 (molekulêre ioon). Vir die identifikasie van komponent U2723 is gebruik gemaak van twee verskillende biblioteke wat komponent U2723 as kariofilleen voorgestel het en waarvan die NBS biblioteek 'n ooreenstemming van 91% met die spektrum van komponent U2723 getoon het [3, 48].

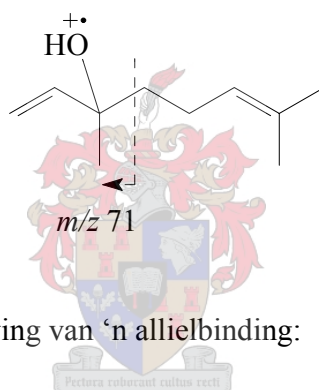
**Tabel 2.1:** Vergelyking van die relatiewe sterktes van die koolwaterstofione in die massaspektra van die bogenoemde vyf verbindings.

Terpene	Relatiewe intensiteite <sup>a</sup>								
	$m/z$ 204 ( $M^+$ )	189 ( $M-15$ )	175	161	147	133	119	105	91
$\alpha$ -Muuroleen	20	8	3	58	6	15	28	100	16
l- $\beta$ -Kadineen	38	13	2	100	0	21	70	50	25
$\delta$ -Kadineen	73	18	0	100	2	8	30	38	37
$\alpha$ -Kubebteen	12	4	1	95	6	14	100	80	30
Kariofilleen	5	15	12	35	35	100	49	61	78

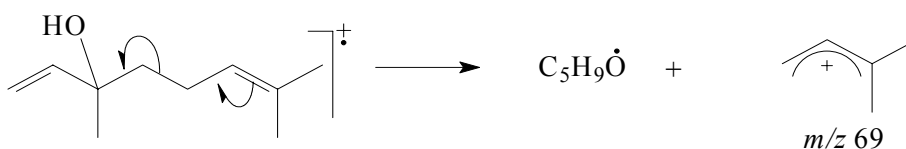
<sup>a</sup>Genormaliseerde persentasie

## 2.2.15.2 Terpeenalkohole

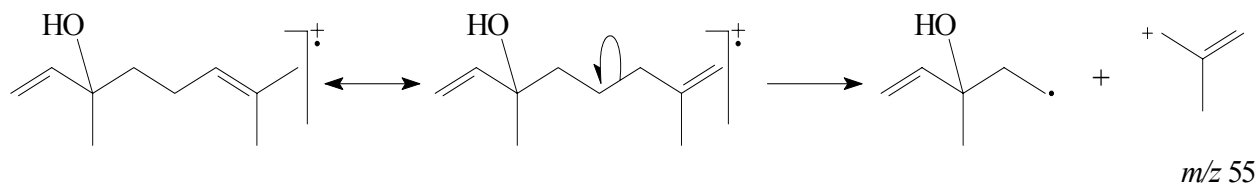
In die EI-massaspektrum van komponent F1524 (Fig. 2.52) verskyn die ioon met die hoogste massa by  $m/z$  136. Chemiese ionisasie het egter aangedui dat die molekulêre massa van die komponent 154 Da is, wat beteken dat die ioon by  $m/z$  136 ontstaan weens die verlies van water. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan die verbinding moontlik linalool wees. Retensietydvergelyking met sintetiese linalool het bevestig dat die identifikasie wel korrek is. Die vorming van die belangrikste ione in die EI-massaspektrum van hierdie komponent kan soos volg verklaar word. Die ioon by  $m/z$  121 ontstaan deur die verlies van 'n metielgroep asook 'n molekule water. Die basispiek by  $m/z$  71 ontstaan weens  $\alpha$ -klowing, met verlies van die grootste alkielfragment:



Die ioon by  $m/z$  69 ontstaan *via* klowing van 'n allielbinding:



Die ioon by  $m/z$  55 ontstaan moontlik ná migrasie van 'n dubbelbinding gevolg deur die gunstige klowing van 'n allielbinding:

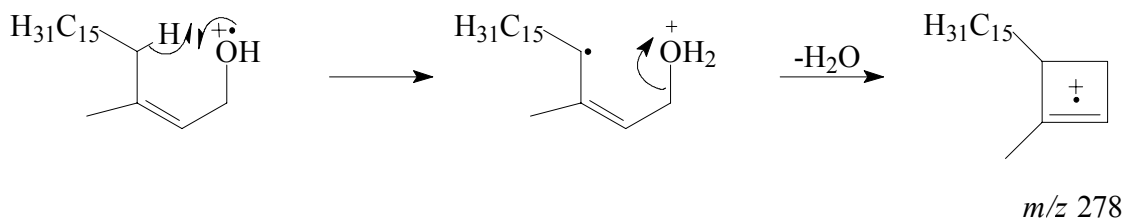


Die ioon by  $m/z$  93 in die EI-massaspektrum van linalool ontstaan weens die verlies van 'n  $C_3H_7$ -groep sowel as 'n molekule water. Verlies van water en 'n  $C_4H_9$ -fragment vanuit komponent F1524 tesame met die oordrag van een waterstofatoom, is moontlik verantwoordelik vir die vorming van die ioon by  $m/z$  80, en bogenoemde reaksie vind waarskynlik ook eers plaas nadat dubbelbindings migreer het. Komponent U1340 in die ongefermenteerde heuningbos is op dieselfde wyse as hierbo geïdentifiseer as linalool.

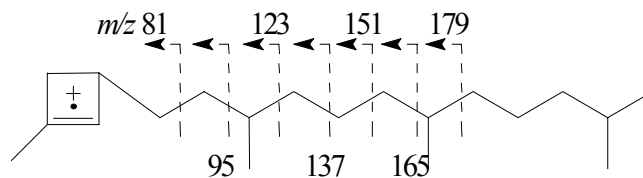
Die EI massaspektra van komponente F2074 (Fig. 2.53) en F2192 (Fig. 2.54) lyk op die oog af identies, en daar is vermoed dat die twee verbindings isomere is. Die spektra toon 'n basispiek by  $m/z$  41 en molekule ioon by  $m/z$  154. Die ioon by  $m/z$  139 ontstaan weens die verlies van 'n metielgroep, terwyl die ioon by  $m/z$  136 ontstaan weens die verlies van 'n watermolekule. Die ioon by  $m/z$  121 kan toegeskryf word aan die verlies van beide 'n metielgroep en 'n watermolekule, en die ioon by  $m/z$  93 aan die verlies van 'n  $C_3H_7$ -fragment en 'n watermolekule. Die  $m/z$  69-ioon vorm deur klowing van 'n allielbinding soos vir linalool (komponent F1524). Volgens 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog kan komponente F2192 en F2074 moontlik onderskeidelik geraniol en sy *Z*-isomeer (nerol) wees [3]. Slegs een van hierdie isomere (die *E*-isomeer) is op soortgelyke wyse in die ongefermenteerde heuningbos geïdentifiseer (komponent U2022). Retensietydvergeelyking met geraniol het bevestig dat komponent F2192 wel geraniol is, terwyl met redelike sekerheid aanvaar kan word dat komponente U2022 en F2074 nerol is. Soos genoem, is die spektra van die twee isomere feitlik identies. 'n Klein maar moontlik beduidende verskil is egter waargeneem in die relatiewe intensiteite van die twee ione by  $m/z$  121 en 123. Dit blyk dat die  $m/z$  121-ioon (14%) 'n effens hoër intensiteit het as die  $m/z$  123-ioon (10%) in die massaspektrum van nerol, terwyl die ione met omgekeerde intensiteite in die spektrum van geraniol aanwesig is.

Die ioon met die hoogste  $m/z$ -waarde in die EI-massaspektrum van komponent F5293 (Fig. 2.55) kom by  $m/z$  278 voor, maar volgens die CI-massaspektrum is die molekule massa van hierdie komponent 296 Da, wat beteken dat die ioon by  $m/z$  278 ontstaan deur die verlies van 'n molekule water. Volgens die voorstel wat die gerekenariseerde biblioteeksoektog opgelewer het, is die verbinding moontlik fitol [3]. Die termiese 1,2-eliminasië van water dra net 10% by tot die intensiteit van die ioon by  $m/z$  278, terwyl die grootste bydraë afkomstig is van die verlies van water deur 'n 1,4-eliminasië wat soos volg plaasvind [49, 50, 51, 52, 53]:

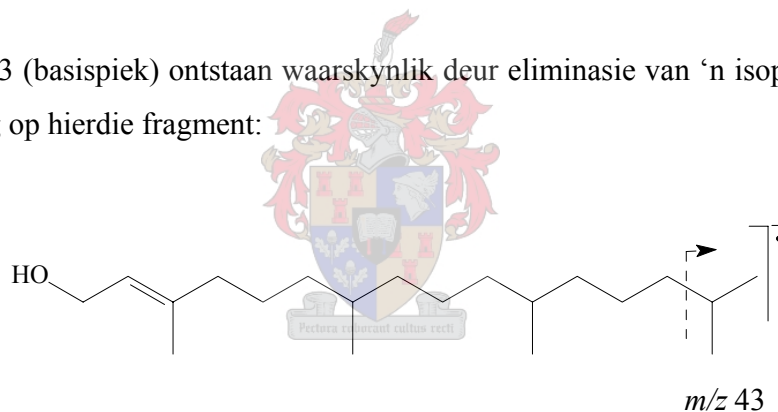




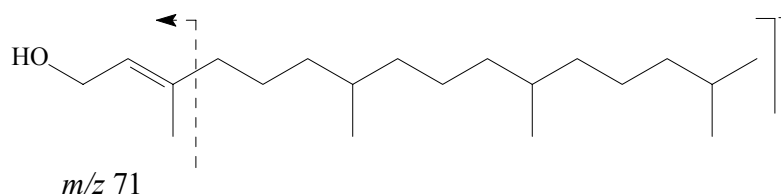
Retensietydvergelyking met sintetiese fitol het getoon dat die identifikasie korrek is. Die ione by  $m/z$  179, 165, 151, 137, 123, 95 en 81 ontstaan moontlik as gevolg van die volgende fragmentasies wat plaasvind na die verlies van water:



Die ioon by  $m/z$  43 (basispiek) ontstaan waarskynlik deur eliminasië van 'n isopropielfragment met behoud van lading op hierdie fragment:

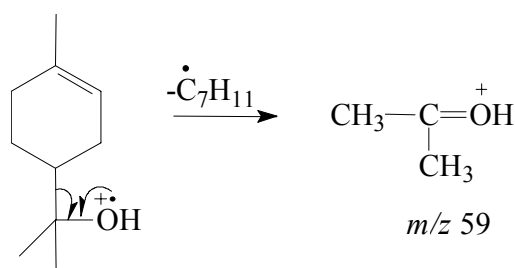


Die vorming van die ioon by  $m/z$  71 kan waarskynlik soos volg voorgestel word:

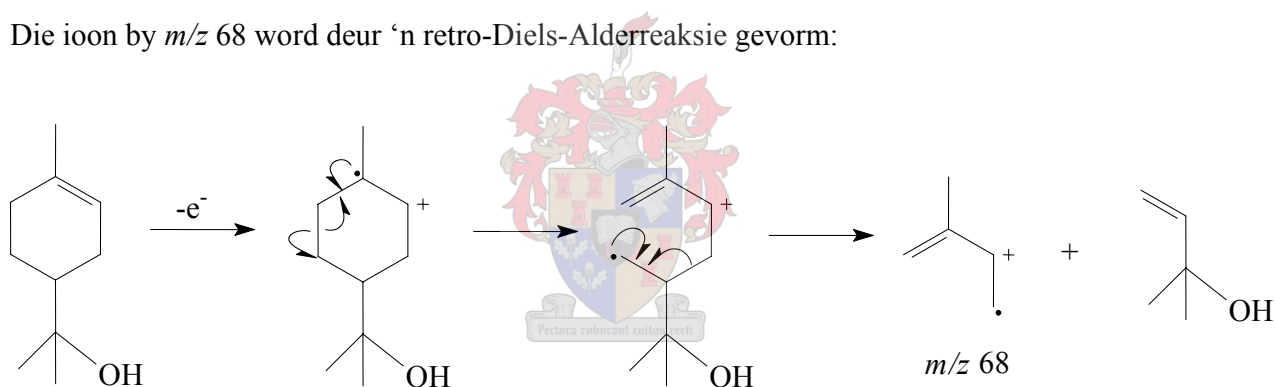


Die massaspektrum van komponent F1905 (Fig. 2.56) het prominente ione by  $m/z$  59 (basispiek), 93, 121, 136 en 139. Daar is vermoed dat die ioon by  $m/z$  139 nie die molekulêre ioon van die verbinding is nie, en daar is met behulp van chemiese ionisasie vasgestel dat die molekulêre massa

van die komponent 154 Da is. Die ioon by  $m/z$  136 ontstaan dus deur die verlies van water en die ioon by  $m/z$  139 deur die verlies van 'n metielgroep. Die verlies van water laat die vermoede ontstaan dat die verbinding moontlik 'n alkohol kan wees, en die gerekenariseerde soektog het dan ook 'n tersiêre alkohol, naamlik  $\alpha$ -terpineol as moontlikheid voorgestel [3]. Die ontstaan van die basispiek by  $m/z$  59 kan verklaar word aan die hand van  $\alpha$ -klowing met verlies van die grootste alkielgroep:



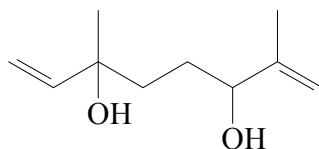
Die ioon by  $m/z$  68 word deur 'n retro-Diels-Alderreaksie gevorm:



Die ioon by  $m/z$  93 ontstaan soos by baie van die ander terpenoïede deur die verlies van water en 'n  $C_3H_7$ -fragment, en die ioon by  $m/z$  121 vorm *via* die verlies van water en 'n metielgroep.  $\alpha$ -Terpineol, wat kommersieel beskikbaar is, is vir retensietydvergelyking gebruik en daar is gevind dat komponent F1905, asook komponent U1724 in die ongefermenteerde heuningbos, wel hierdie verbinding is.

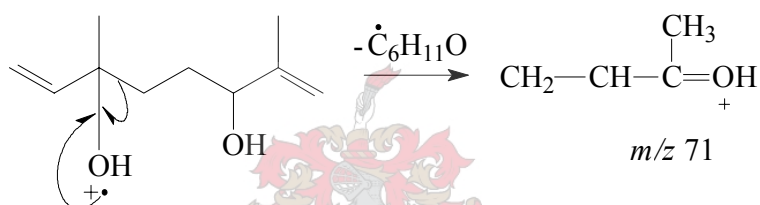
Die EI-massaspektrum van komponent F2262 (Fig. 2.57) in die aroma van die gefermenteerde heuningbos vertoon kenmerkende ione by  $m/z$  43, 67 (basispiek), 71, 82, 96, 110, 123 en 137. Onsekerheid oor die molekulêre ioon is uit die weg geruim deur die chemiese ionisasie (Fig. 2.57a)

wat getoon het dat die molekulêre massa van die komponent 170 Da is. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog is gedoen en die volgende verbinding is as voorstel verkry [48]:



2,6-dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol

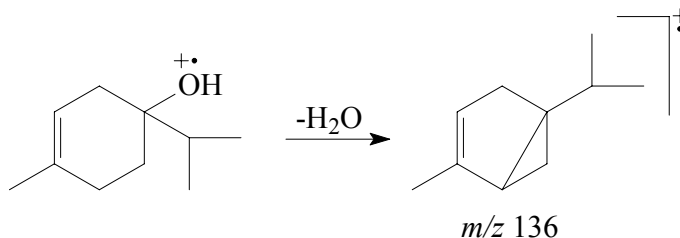
Aan die hand van die bogenoemde struktuur kan die ontstaan van die ioon by  $m/z$  71 verklaar word deur klowing van die binding  $\beta$  tot die suurstofatoom, op so manier dat die grootste fragment verloor word. Hierdie fragmentasie vind algemeen plaas by sekondêre en tersiêre alkohole [5, 6]:



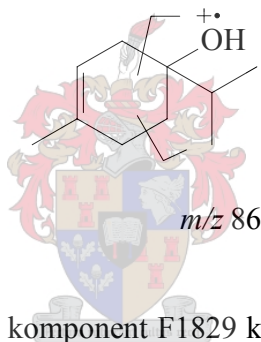
Hierdie ioon by  $m/z$  71 vorm ook indien bogenoemde reaksie by die posisie van die ander alkoholgroep in die verbinding plaasvind. Die ioon by  $m/z$  137 ontstaan as gevolg van die verlies van water en 'n metielgroep en hierdie ioon kom algemeen voor in die massaspektra van alkohole [10]. Die basispiek by  $m/z$  67 ontstaan waarskynlik deur verlies van water uit die molekulêre ioon gevolg deur fragmentasie om 'n  $C_5H_7^+$ -ioon te gee wat deur konjugasie van twee dubbelbindings gestabiliseer is.

Die massaspektrum van komponent F1829 (Fig. 2.58) het 'n basispiek by  $m/z$  71 en molekulêre ioon by  $m/z$  154. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan die verbinding 4-karvomentenol wees. Retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster is gedoen en identifikasie van komponent F1829 as 4-karvomentenol is bevestig. Die ione by  $m/z$  111,  $m/z$  121 en  $m/z$  136 ontstaan onderskeidelik weens die verlies van 'n isopropielgroep, die gesamentlike verlies van water en 'n metielgroep en die verlies van slegs 'n watermolekuul. Die ioon by  $m/z$  93 ontstaan weens die verlies van 'n watermolekuul en 'n isopropielgroep. Die verlies van water vind normaalweg

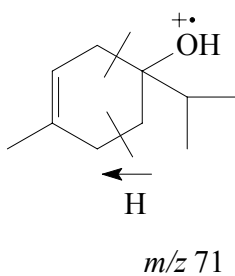
hoofsaaklik plaas deur die verlies van 'n hidroksielgroep en 'n waterstofatoom van C3 of C4, maar aangesien daar in hierdie molekule net 'n waterstofatoom by posisie C3 is, sal net C3 in hierdie geval betrokke wees by die eliminasië van water [54]:



Die ioon met 'n ewe massa by  $m/z$  86 is moontlik 'n  $C_5H_{10}O$ -fragment wat ontstaan nadat 'n  $\alpha$ - en allielklowing in hierdie verbinding plaasgevind het:



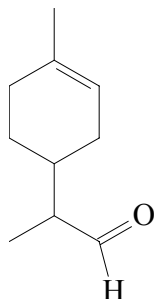
Twee agtereenvolgende  $\alpha$ -klowings in komponent F1829 kan die vorming van die basispiek by  $m/z$  71, wat vermoedelik 'n  $C_4H_7O$ -fragment is, verklaar:



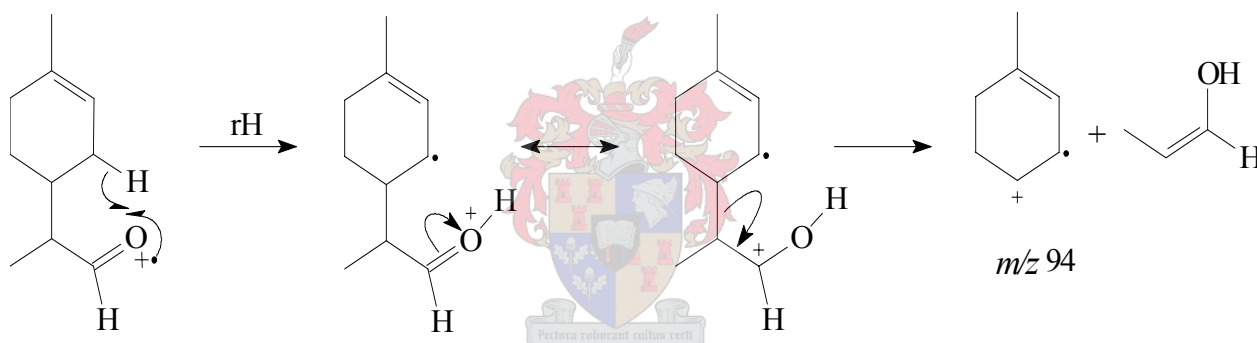
### 2.2.15.3 Terpeenaldehiede

In die massaspektrum van komponent F1980 (Fig. 2.59) kom prominente ione by  $m/z$  79 en  $m/z$  94 (basispiek) voor, en die molekulêre massa is met behulp van chemiese ionisasië vasgestel as 152 Da

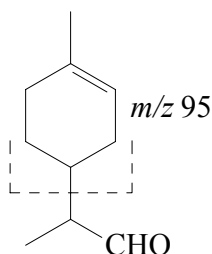
(Fig. 2.59a). Volgens die rekenaarsoektoeg (90% ooreenstemming) wat gedoen is, kan die verbinding moontlik 2-metiel-2-(4'-metiel-3'-sikloheksen-1'-iel) etanaal wees [3]:



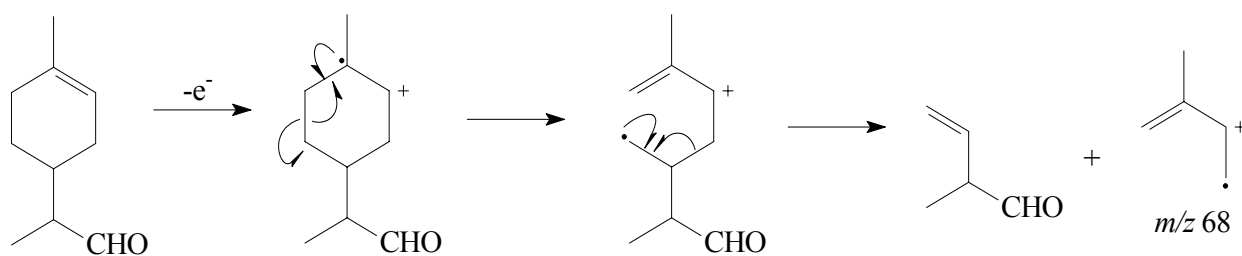
Die vorming van die ioon met 'n ewemassa by  $m/z$  94, behels die oordrag van 'n  $\gamma$ -waterstofatoom gevolg deur klosing van die  $\beta$ -binding [15]:



Die ioon by  $m/z$  79 ontstaan moontlik uit die  $m/z$  94-ioon deur die verlies van die metielgroep. Verlies van die aldehydedeelte van die komponent kan aanleiding gee tot die vorming van die ioon by  $m/z$  95:

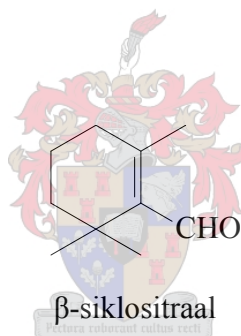


'n Retro-Diels-Alderreaksie lewer die ioon by  $m/z$  68:



Deur die ione in die massaspektrum met die voorgestelde struktuur te vergelyk en moontlike fragmentasies te verklaar met behulp van die struktuur, is gevind dat komponent F1980 moontlik die voorgestelde verbinding kan wees.

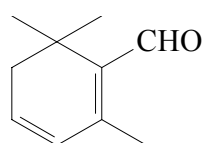
Die EI-massaspektrum van komponent F2002 (Fig. 2.60) het prominente ione in die hoë massagebied by  $m/z$  109, 123, 137 (basispiek) en 152 (molekulêre ioon). Volgens die gerekenariseerde soektoeg kan komponent F2002 moontlik  $\beta$ -siklositraal met die onderstaande struktuur wees [3]:



Retensietydvergelyking met kommersieel-beskikbare  $\beta$ -siklositraal het die identifikasie bevestig. Die basispiek in die spektrum van hierdie verbinding by  $m/z$  137 ontstaan deur die verlies van 'n metielgroep, 'n proses waarvan die waarskynlikheid verhoog word deur die moontlike verlies van een van die drie metielgroepe. Vermoedelik sal die metielgroep naaste aan die dubbelbinding bydra tot die grootste deel van die intensiteit van hierdie ioon, terwyl die ander twee metielgroepe se afsplyting tot 'n mindere mate ook daartoe mag bydra. Die ioon by  $m/z$  123 ontstaan weens die verlies van 29 massa-eenhede en dit kan toegeskryf word aan die verlies van die aldehydedeelte van die molekule. In die ongefermenteerde heuningbos is komponent U1841 op dieselfde gronde as  $\beta$ -siklositraal geïdentifiseer.

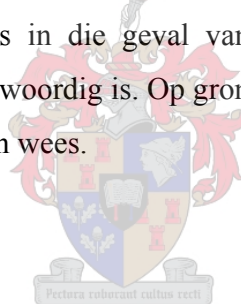
Die massaspektrum van komponent U1744 (Fig. 2.61) toon 'n molekulêre ioon by  $m/z$  150 en ione by  $m/z$  107,  $m/z$  121 en  $m/z$  135 wat almal met twee massa-eenhede verskil van die prominente ione

in die hoë massagebied van  $\beta$ -siklositraal ( $m/z$  109,  $m/z$  123 en  $m/z$  137), wat dus beteken dat komponent U1744 moontlik dieselfde basiese struktuur kan hê as  $\beta$ -siklositraal, maar met nog 'n dubbelbinding. Die ioon by  $m/z$  135 dui op die verlies van 'n metielgroep en die een by  $m/z$  121 op die verlies van 'n aldehiedgroep. In die geval van komponent U1744 is die  $[M-43]^+$ -ioon by  $m/z$  107 die basispiek in die spektrum en nie die  $[M-15]^+$ -ioon by  $m/z$  135 nie. 'n Verdere verskil tussen die twee massaspektra is dat die ioon by  $m/z$  91 meer prominent is in die massaspektrum van komponent U1744 as in die massaspektrum van  $\beta$ -siklositraal. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog kan die verbinding moontlik safranaal wees [3]:

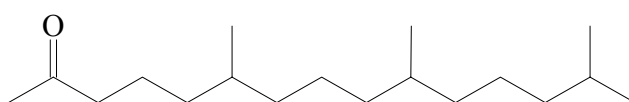


Die ioon by  $m/z$  91 kan moontlik toegeskryf word aan die vorming van 'n tropiliumioon wat hier meer geredelik sou kon plaasvind as in die geval van  $\beta$ -siklositraal, omdat hier alreeds twee dubbelbindings in die ringsisteem teenwoordig is. Op grond van hierdie oorwegings wil dit voorkom of komponent U1744 wel safranaal kan wees.

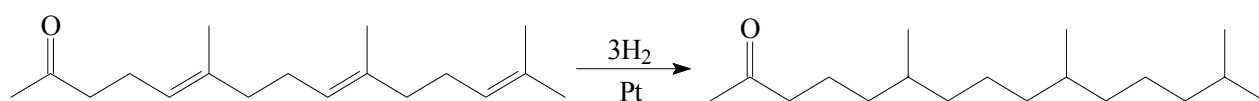
#### 2.2.15.4 Ketoterpene



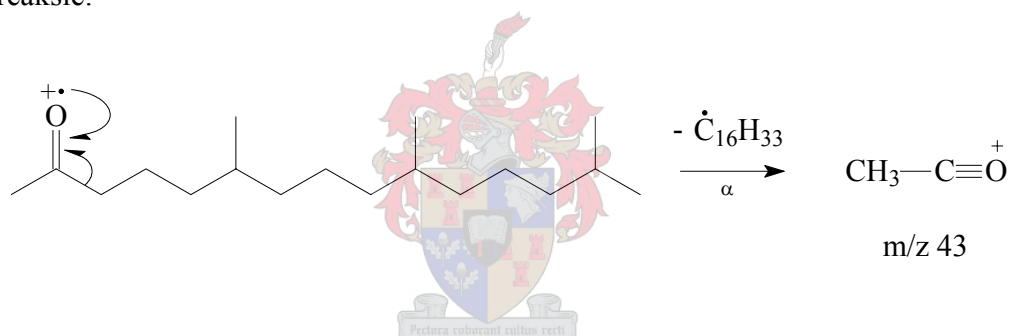
Die ioon met hoogste  $m/z$ -waarde in die EI-massaspektrum van komponent F4456 (Fig. 2.62) kom by  $m/z$  250 voor. Die molekulêre massa van die verbinding is egter met behulp van chemiese ionisasie vasgestel as 268 Da (Fig. 2.62a), wat beteken dat die ioon by  $m/z$  250 ontstaan weens die verlies van 'n molekule water. Die basispiek by  $m/z$  43 is kenmerkend van metielketone, tesame met die prominente ioon by  $m/z$  58, wat verdere inligting verskaf oor die aard van die alkielgroep aan die metielketoon, naamlik dat die alkielgroep uit drie of meer koolstofatome bestaan en dat dit vertak of onvertak kan wees, met die voorwaarde dat die vertakking nie aanwesig kan wees op C3 nie [16]. Volgens 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] is die verbinding waarskynlik heksahidrofarnesielasetoon, 'n langketting metielketoon met 'n basiese terpenoïedstruktuur:



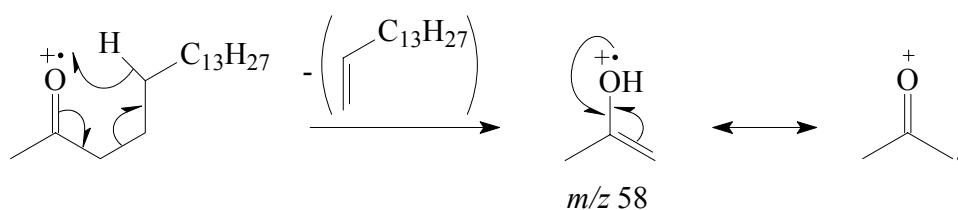
Heksahidrofarnesielasetoon is gesintetiseer deur die katalitiese hidrogenering van farnesielasetoon volgens die onderstaande reaksieskema. Onder die betrokke reaksiekondisies is die karbonielgroep nie gereduseer nie, maar slegs die drie dubbelbindings. Retensietydvergelyking van die sintetiese verbinding met die ekstrak het getoon dat komponent F4456 wel heksahidrofarnesielasetoon is.



Die ioon by  $m/z$  43 in die EI-massaspektrum van hierdie verbinding ontstaan *via* 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie:

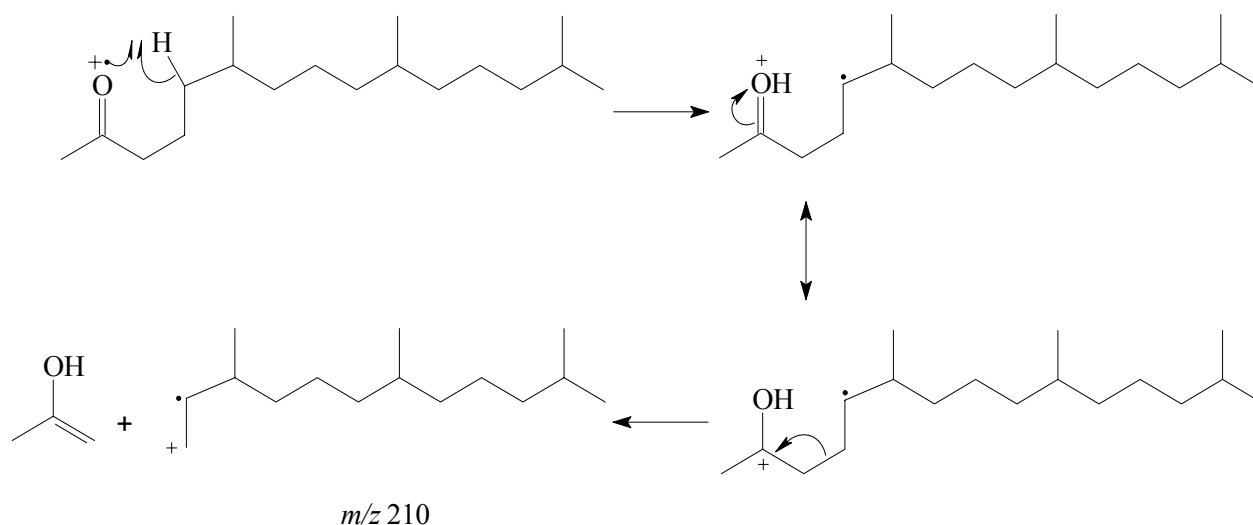


'n McLafferty herrangskikking gee aanleiding tot die ioon by  $m/z$  58:

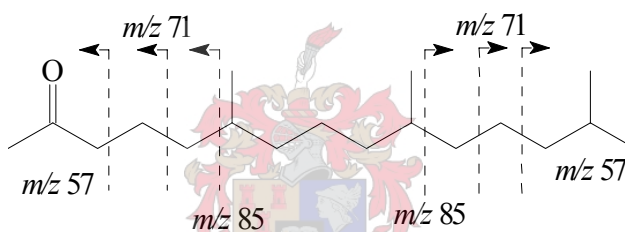


Die ioon by  $m/z$  210 vorm ook deur  $\beta$ -klowing soos by die vorming van die ioon by  $m/z$  58, maar in hierdie geval bly die lading behoue op die alkylfragment en nie die suurstofbevattende fragment nie:





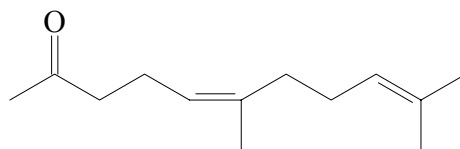
Die ione by  $m/z$  57,  $m/z$  71 en  $m/z$  85 kan óf alkielfragmente óf suurstofbevattende fragmente wees:



Die ione by  $m/z$  95, 109, 123, 137, 165 en 179 vorm deur die verlies van water en agtereenvolgende alkielfragmente en besit die algemene formule  $[M-H_2O-C_nH_{2n+1}]^+$ . Komponent U4287 in die ongefermenteerde heuningbos is ook op die bogenoemde wyse as heksahidrofarnesielasetoon geïdentifiseer.

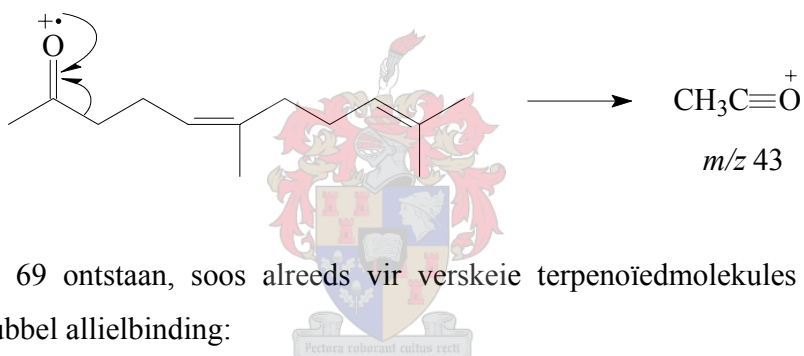
Die EI-massaspektrum van komponent F3003 (Fig. 2.63) in die gefermenteerde heuningbos toon prominente ione by  $m/z$  43, 107, 136, 161, 151 en 176. Die molekulêre ioon is nie in die genormaliseerde massaspektrum sigbaar nie, maar kom tog met 'n baie lae intensiteit ( $< 1\%$ ) by  $m/z$  194 in die massaspektrum van hierdie komponent voor. Die basispiek by  $m/z$  43 is kenmerkend van metielketone, maar die gepaardgaande kenmerkende ioon by  $m/z$  58, wat wel in die EI-massaspektrum van heksahidrofarnesielasetoon aanwesig is, is hier afwesig. Daar moet dus 'n belangrike strukturele verskil wees tussen komponent F3003 en heksahidrofarnesielasetoon, wat veroorsaak dat die ioon by  $m/z$  58 nie in die spektrum van komponent F3003 aanwesig is nie.

Volgens die gerekenariseerde soektog kan die verbinding moontlik (*E*)- of (*Z*)-geranielasetoon wees [3]. Retensietydvergelyking met sintetiese (*E*)- en (*Z*)-geranielasetoon het getoon dat hierdie komponent (*Z*)-geranielasetoon is:

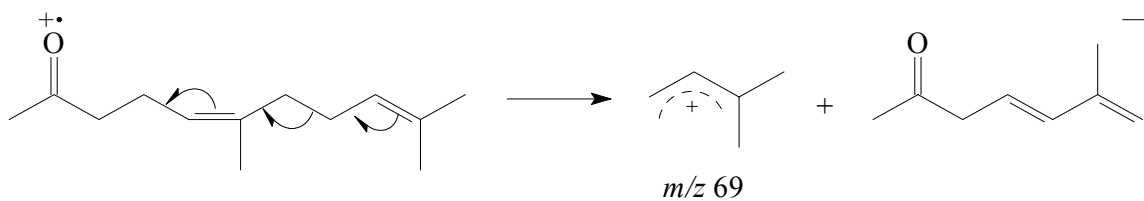


(*Z*)-Geranielasetoon

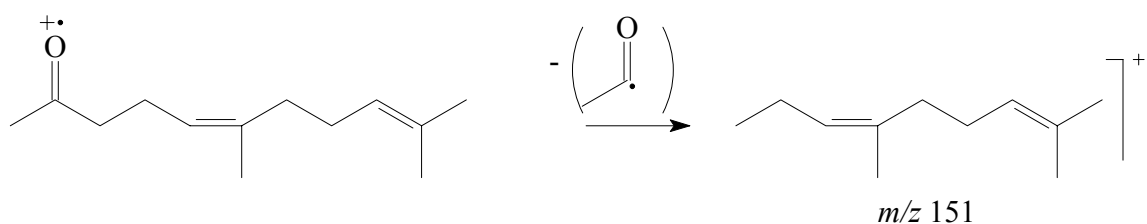
Die ioon by  $m/z$  43 in die betrokke spektrum ontstaan weens  $\alpha$ -klowing met verlies van die alkylfragment:



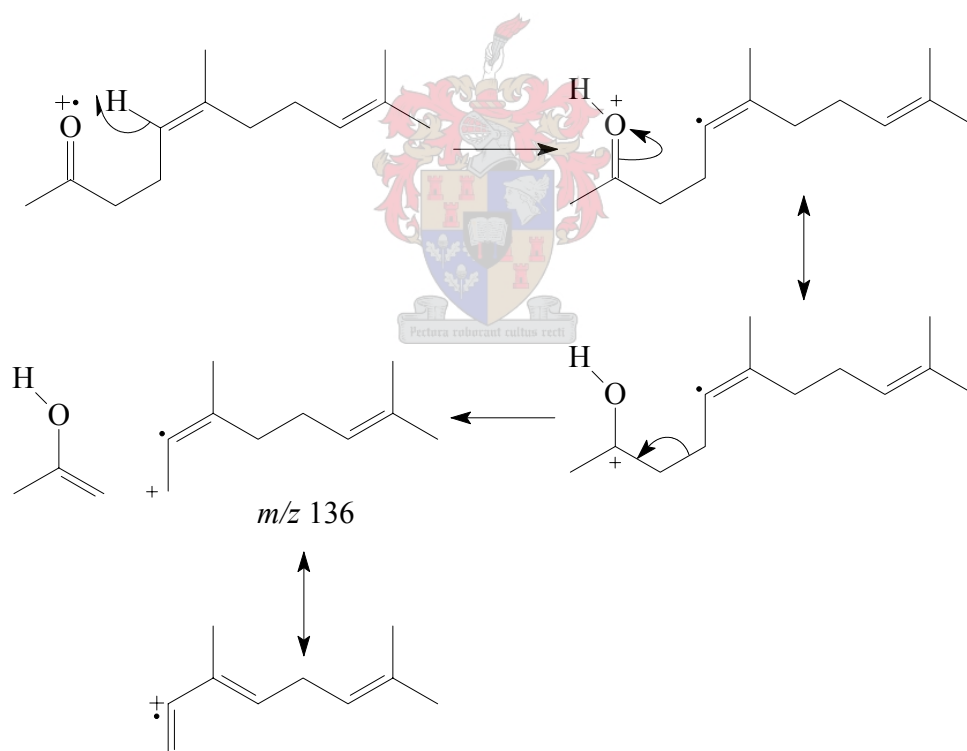
Die ioon by  $m/z$  69 ontstaan, soos alreeds vir verskeie terpenoïedmolekules verduidelik, deur klowing van 'n dubbel allielbinding:



Die ioon by  $m/z$  161 ontstaan weens die verlies van water en 'n metielgroep, en die ioon by  $m/z$  151 wanneer  $\alpha$ -klowing plaasvind soos in die vorming van die ioon by  $m/z$  43, maar met behoud van die lading op die alkylfragment:



Die ioon by  $m/z$  151 kan ook ontstaan *via* die agtereenvolgende verlies van 'n metiel- en 'n CO-groep. Soos reeds genoem, word daar nie 'n ioon by  $m/z$  58 waargeneem in die massaspektrum van komponent F3003 nie, want die herrangskikking van die  $\gamma$ -waterstofatoom en gevolglike  $\beta$ -klowing met behoud van die lading op die suurstofbevattende fragment is onwaarskynlik omdat die  $\gamma$ -waterstofatoom vinielgebonde is. Indien  $\beta$ -klowing egter plaasvind met behoud van die lading op die alkielfragment, vind delokalisering van die dubbelbinding plaas wat lei tot die stabiliteit van hierdie ioon by  $m/z$  136 [28]:



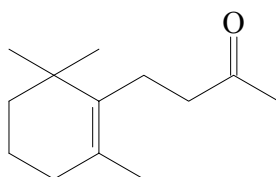
Komponent U2842 in die ongefermenteerde heuningbos is op soortgelyke wyse as (*Z*)-geranielasetoon geïdentifiseer.

In die EI-massaspektrum van komponent U4506 (Fig. 2.64) kan die molekulêre ioon nie waargeneem word nie en die molekulêre massa van 262 Da is met chemiese ionisasie vasgestel. Die kenmerkende basispiek by  $m/z$  43 dui aan dat die verbinding moontlik 'n metielketoon is en die afwesigheid van 'n ioon by  $m/z$  58 dien as bewys dat komponent U4506 'n soortgelyke struktuur het as geranielasetoon, met 'n vinielgebonde  $\gamma$ -waterstofatoom. Soos in die geval van geranielasetoon vind  $\beta$ -klowing ook plaas met behoud van lading op die gestabiliseerde alkielfragment, maar die verwagte ioon by  $m/z$  204 word egter nie waargeneem nie aangesien dié ioon verdere fragmentasie ondergaan met verlies van 'n  $C_5H_9$ -fragment en oordrag van twee waterstofatome om die ioon by  $m/z$  136 te gee. Die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het aangedui dat die verbinding farnesielasetoon kan wees en retensietydvergelyking met 'n sintetiese mengsel van farnesielasetoon het getoon dat komponent U4506 (*E,E*)-farnesielasetoon is:



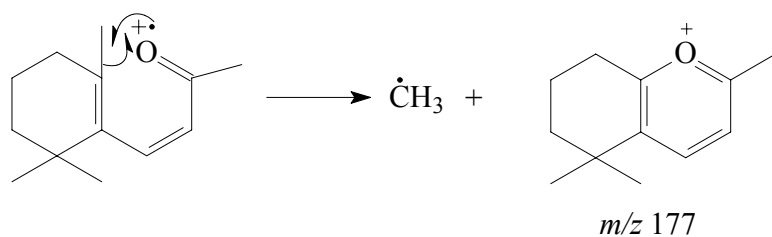
Komponent F4669, wat voorkom in die gefermenteerde heuningbos, is op soortgelyke gronde geïdentifiseer as (*E,E*)-farnesielasetoon.

'n Opvallende kenmerk van die EI-massaspektrum van komponent F3126 (Fig. 2.65) is dat daar slegs twee ione is met intensiteite hoër as 20%, naamlik  $m/z$  177 (basispiek) en  $m/z$  43 (35%). Die molekulêre ioon kom by  $m/z$  192 voor. Om 'n idee te kon kry watter tipe verbinding komponent F3126 is, is 'n gerekenariseerde soektog gedoen en  $\beta$ -jonoon is as voorstel verkry [7]:

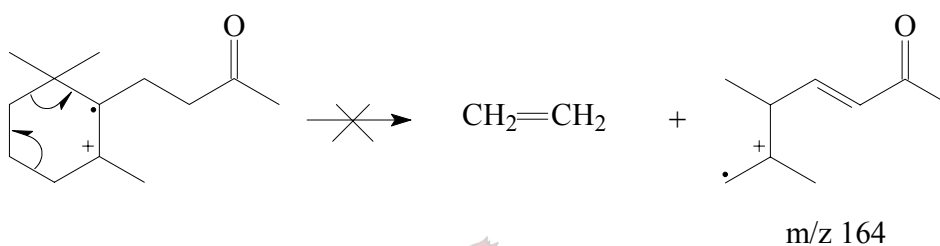


$\beta$ -jonoon

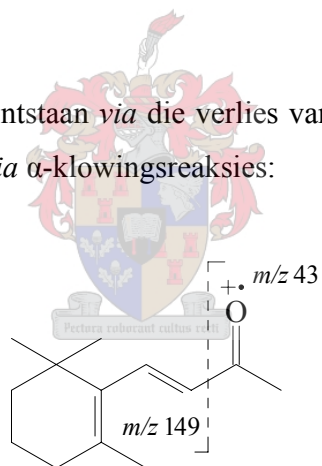
Retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster van  $\beta$ -jonoon het bevestig dat komponent F3126 wel  $\beta$ -jonoon is. Die basispiek van komponent F3126 vorm as gevolg van die verlies van 'n metielgroep en dit vind *via* 'n verplasingreaksie by die karbonielgroep plaas [55]:



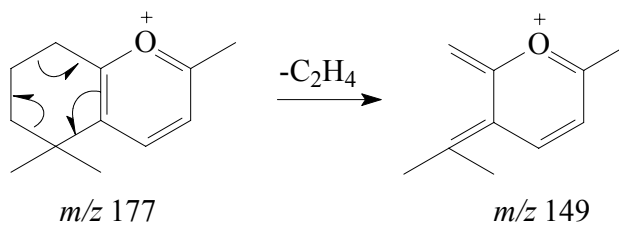
Hierdie reaksie kompeteer met die verwagte retro-Diels-Alderreaksie en is verantwoordelik daarvoor dat daar nie 'nioon by  $m/z$  164 waargeneem word nie:



Die ion by  $m/z$  159 kan moontlik ontstaan via die verlies van water en 'n metielgroep, terwyl die ion by  $m/z$  149 en  $m/z$  43 ontstaan via  $\alpha$ -klowingsreaksies:

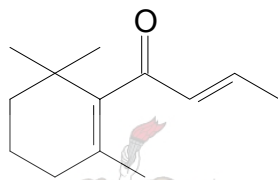


Die ion by  $m/z$  149 kan ook moontlik vorm uit die ion by  $m/z$  177 via 'n tipe retro-Diels-Alderreaksie [56]:



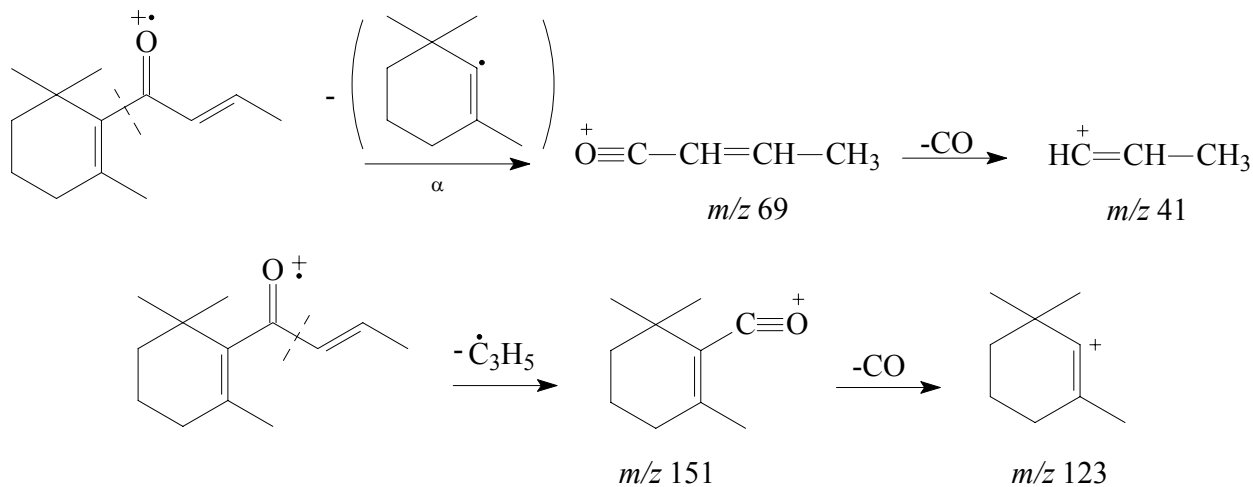
Die verlies van 'n metileengroep uit die ioon by  $m/z$  149 kan moontlik die ioon by  $m/z$  135 lewer.  $\beta$ -Jonoon (U2963) is op dieselfde wyse ook in ongefermenteerde heuningbos geïdentifiseer.

Komponent F2841 (Fig. 2.66) kom slegs voor in die aroma van die gefermenteerde heuningbos, en die EI-massaspektrum toon heelwat ooreenkomste met dié van  $\beta$ -jonoon, soos die ione by  $m/z$  192 (molekulêre ioon) en  $m/z$  177 (basispiek). Opvallende verskille is egter die hoër intensiteite van die ione by  $m/z$  41 en  $m/z$  123 in die spektrum van komponent F2841. Anders as in die geval van  $\beta$ -jonoon, het hierdie verbinding ook nie 'n prominente ioon by  $m/z$  43 nie, wat beteken dat dit heel moontlik nie 'n metielketoon is nie. Die verbinding  $\beta$ -damaskoon is as voorstel verkry in 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog [48]:

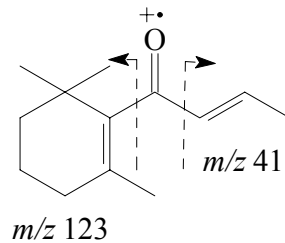


$\beta$ -damaskoon

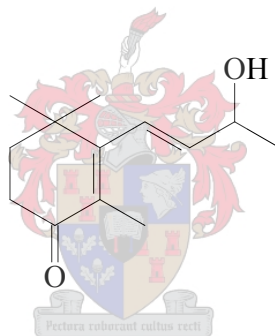
Sintetiese  $\beta$ -damaskoon is gebruik om te bevestig dat komponent F2841 wel reg geïdentifiseer is. Die ioon by  $m/z$  177 ontstaan, soos by  $\beta$ -jonoon, as gevolg van die verlies van 'n metielgroep. Die  $\alpha$ -klowingsreaksies van die karbonielgroep gee aanleiding tot die vorming van die ione by  $m/z$  69 en  $m/z$  151 en verlies van CO uit albei hierdie fragmente lewer die ione by  $m/z$  41 en  $m/z$  123:



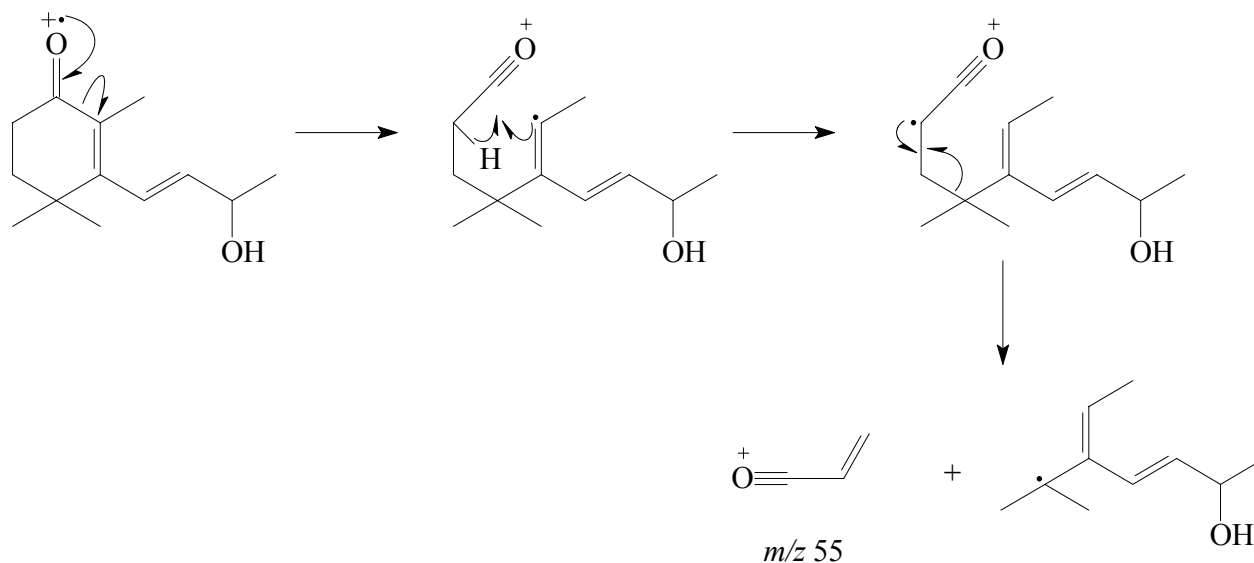
Die ione by  $m/z$  41 en  $m/z$  123 kan ook direk *via*  $\alpha$ -klowing soos die ione by  $m/z$  69 en  $m/z$  151 vorm, maar met behoud van die lading op die alkielfragmente:



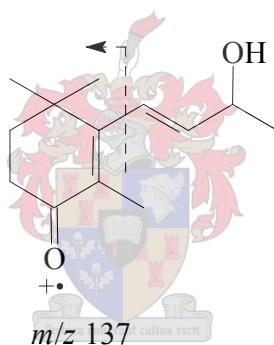
Die EI-massaspektrum van komponent F3826 (Fig. 2.67) in die aroma van die gefermenteerde heuningbos toon 'n basispiek by  $m/z$  165 en molekulêre ioon by  $m/z$  208. Volgens twee onafhanklike gerekenariseerde biblioteeksoektogte, kan die verbinding moontlik 2,4,4-trimetiel-3-(3'-hidroksi-1'-buten-1'-iel)-2-sikloheksen-1-oon wees [3, 48]:



Verlies van 'n metielgroep uit die molekulêre ioon van komponent F3826 lewer die ioon by  $m/z$  193, terwyl die basispiek by  $m/z$  165 moontlik kan ontstaan weens die verlies van 'n metiel- en CO-groep. Die ioon by  $m/z$  175 ontstaan weens die verlies van water en 'n metielgroep, wat kenmerkend is van alkohole.  $\alpha$ -Klowing gevolg deur die oordrag van 'n waterstofatoom kan aanleiding gee tot die vorming van die ioon by  $m/z$  55 [55]:



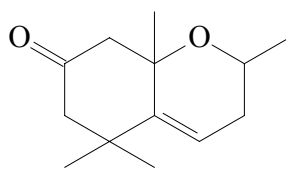
Verlies van die alkoholbevattende gedeelte van die molekule lewer die ioon by  $m/z$  137:



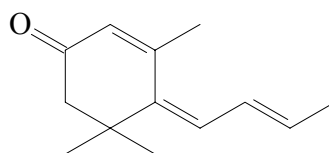
Daar is tot die gevolgtrekking gekom dat komponent F3826 wel moontlik -(3'-hidroksi-1'-buten-1'-iel)-2-sikloheksen-1-oon kan wees en komponent U3663 in die ongefermenteerde heuningbos is op soortgelyke wyse geïdentifiseer.

Volgens die EI-massaspektrum van komponent F3091 (Fig. 2.68) in die aroma van die gefermenteerde heuningbos het die komponent 'n molekulêre massa van 208 Da en die ioon met hoë intensiteit by  $m/z$  193 ontstaan dus weens die verlies van 'n metielgroep. Met behulp van 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog is daar gevind dat die komponent moontlik oksoëdulaan I/II (1,3,7,7-tetrametiel-9-okso-2-oksabisiklo[4.4.0]dek-5-eeen) kan wees [48]:

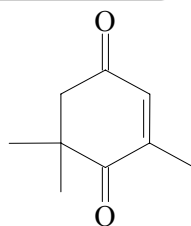




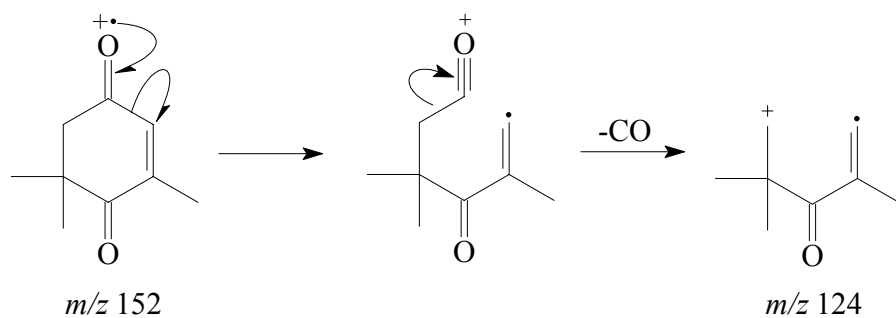
Die EI massaspektra van F3469 (Fig. 2.69) en F3634 (Fig. 2.70) is op die oog af identies en vertoon prominente ione by  $m/z$  41, 55, 69, 77 en 190 (molekulêre ion), wat die vermoede laat ontstaan het dat die twee komponente moontlik isomere van dieselfde verbinding is. Met behulp van 'n gerekenariseerde biblioteeksoektog is die twee verbindings tentatief geïdentifiseer as twee isomere van megastigma-4,6,8-triën-3-oon (megastigmatriënoon) [48]:



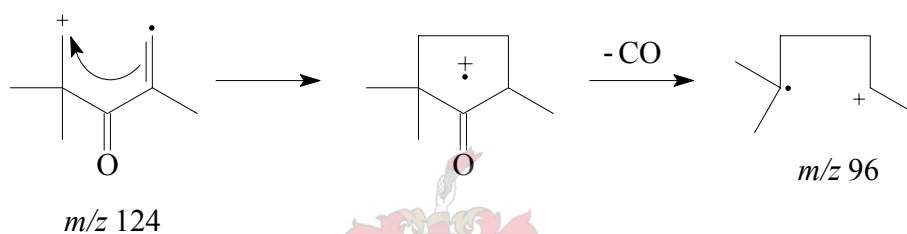
Die EI-massaspektrum van komponent F1634 (Fig. 2.71) is interessant in die opsig dat die vier ione met die hoogste intensiteit in die spektrum al vier ewe massas het, naamlik die ione by  $m/z$  152 (molekulêre ion),  $m/z$  96,  $m/z$  68 (basispiek) en  $m/z$  40. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog kan die komponent moontlik ketoïsoforoon wees [3]:



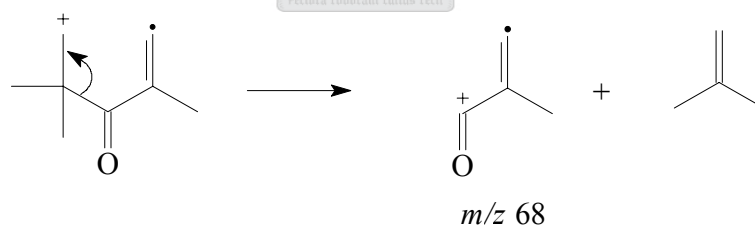
Retensietydvergelyking met die ooreenstemmende sintetiese monster het getoon dat die identifikasie wel korrek is. Vervolgens is daar gekyk of die belangrikste pieke in die EI-massaspektrum van komponent F1634 in terme van die voorgestelde struktuur gerasionaliseer kan word. Die ione by  $m/z$  134 en  $m/z$  119 ontstaan onderskeidelik weens die verlies van water en deur die verlies van water en 'n metielgroep.  $\alpha$ -Klowing, gevolg deur verlies van 'n CO-groep, kan moontlik die ione by  $m/z$  124 verklaar [55]:



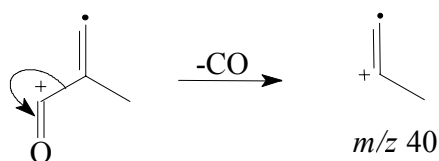
Verlies van nog 'n CO-groep vanuit die ioon by  $m/z$  124, kan moontlik lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  96:



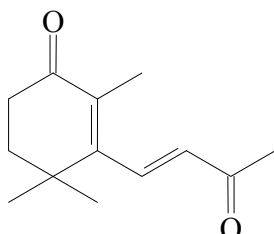
Die ioon by  $m/z$  68 ontstaan moontlik uit die  $m/z$  124-ioon deur 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie wat plaasvind by die oorblywende karbonielverbinding:



Verlies van die karbonielgroep uit die bostaande ioon by  $m/z$  68 sou lei tot die ontstaan van die ioon by  $m/z$  40:



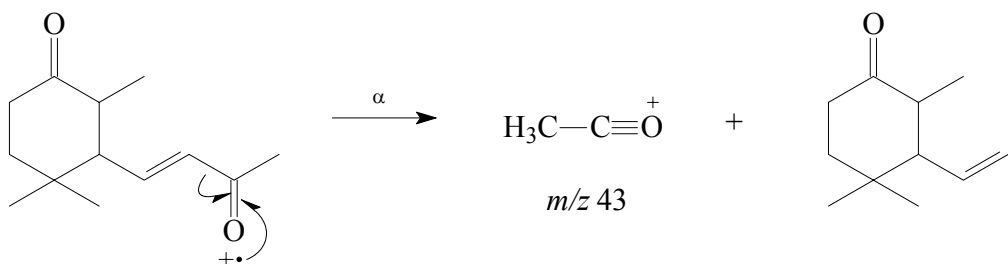
In die ongefermenteerde heuningbos is komponent U1472 ook as ketoïsoforoon geïdentifiseer. 'n Gerekenariseerde massaspektrum-biblioteeksoektog het 3-okso- $\beta$ -jonoon voorgestel as 'n moontlikheid vir komponent F3779 in die aroma van die gefermenteerde heuningbos [48]:



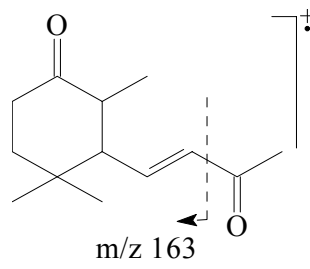
Dieioon by  $m/z$  191 in die EI-massaspektrum (Fig. 2.72) ontstaan deur die verlies van 'n metielgroep:



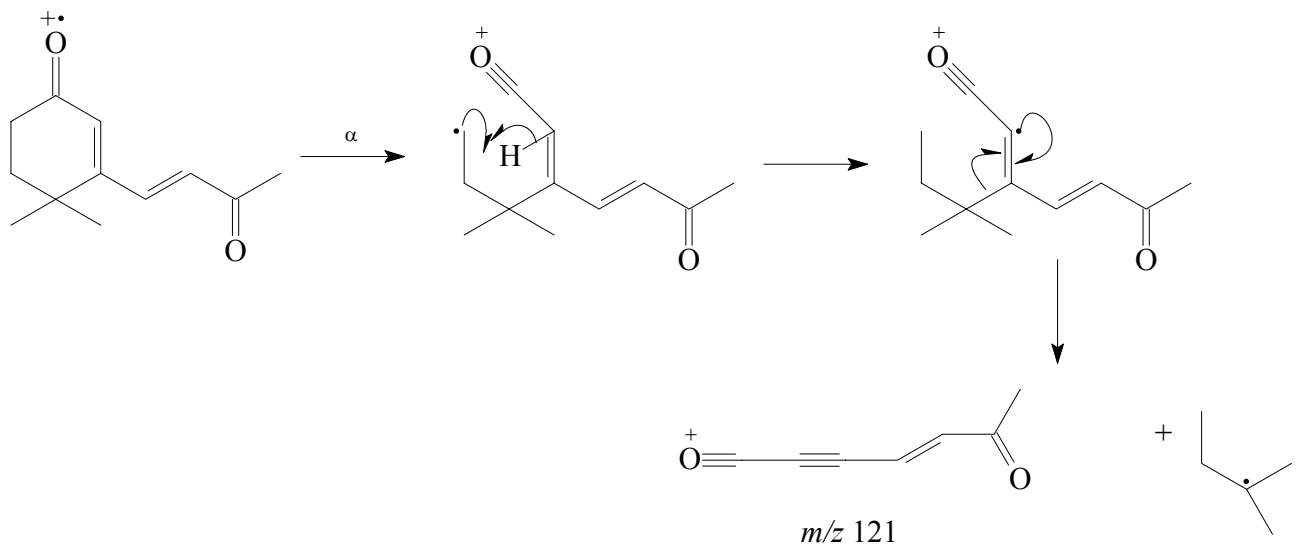
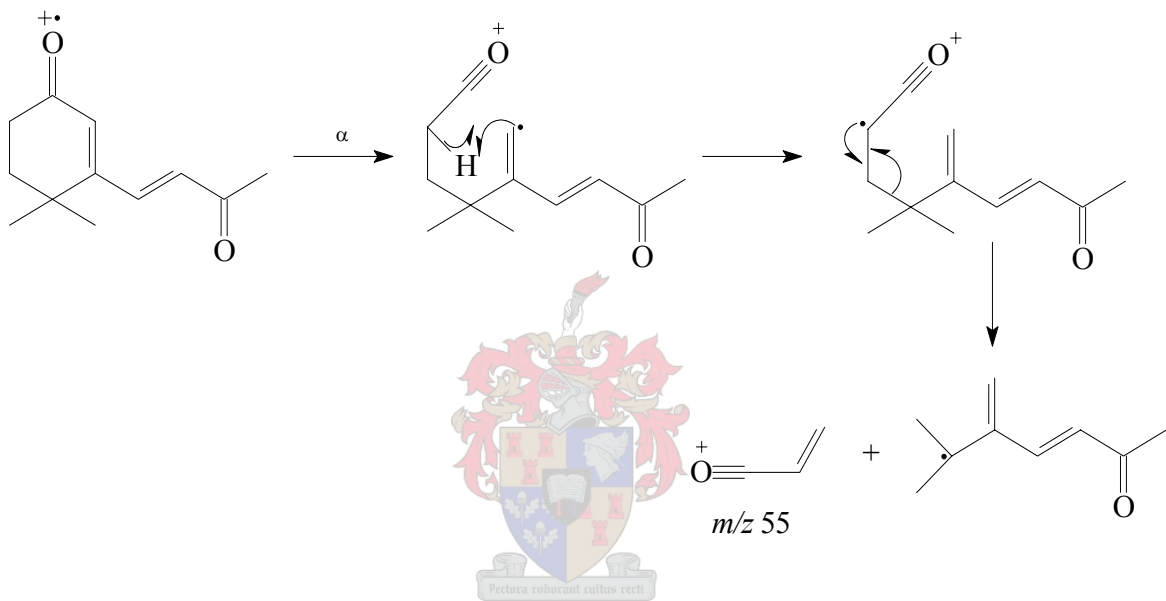
Dieioon by  $m/z$  43 dui daarop dat komponent F3779 'n metielketoon kan wees:



Die vorming van die basispiek by  $m/z$  163 kan weer toegeskryf word aan die verlies van die asielgroep:

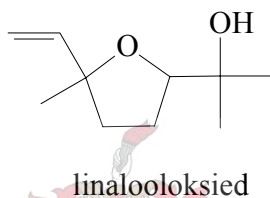


Die ione by  $m/z$  55 en  $m/z$  121 kan moontlik soos volg ontstaan:

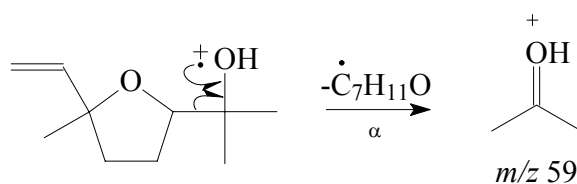


## 2.2.15.5 Terpeeneters

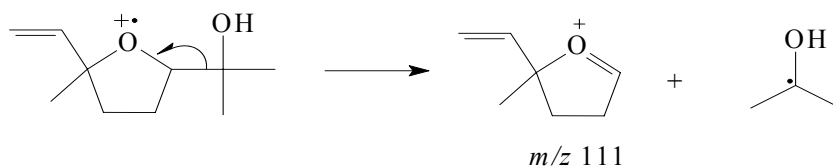
Komponente F1372 (Fig. 2.73) en F1439 (Fig. 2.74) is vermoedelik isomere van dieselfde verbinding, omdat die massaspektra op die oog af identies is. Komponent F1372 se EI-massaspektrum vertoon prominente ione by  $m/z$  59 (basispiek), 67, 68, 93, 94, 111, 137 en 155. Chemiese ionisasie het getoon dat die molekulêre massa van die verbinding 170 Da is, en dus ontstaan die ioon by  $m/z$  155 deur die verlies van 'n metielgroep terwyl die ioon by  $m/z$  137 vermoedelik ontstaan deur die verlies van 'n molekule water en 'n metielgroep. Die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] het die volgende furaanderivaat voorgestel as 'n moontlikheid vir komponent F1372:



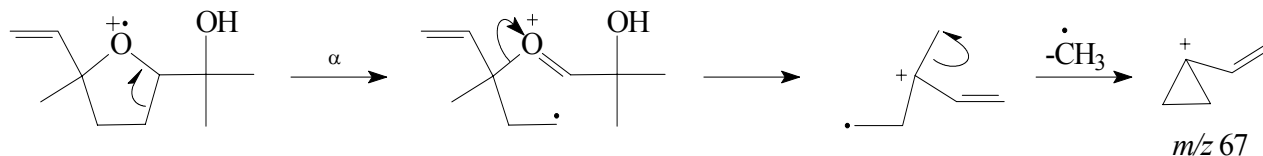
Retensietydvergelyking met 'n sintetiese mengsel van linalooloksied het aangedui dat die identifikasie van komponente F1372 en F1439 as isomere van linalooloksied korrek is, en dat dit wel onderskeidelik die *trans*- en *cis*-isomere is. Die basispiek in die massaspektrum van hierdie verbinding by  $m/z$  59 ontstaan *via* 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie wat plaasvind by die alkoholgroep:



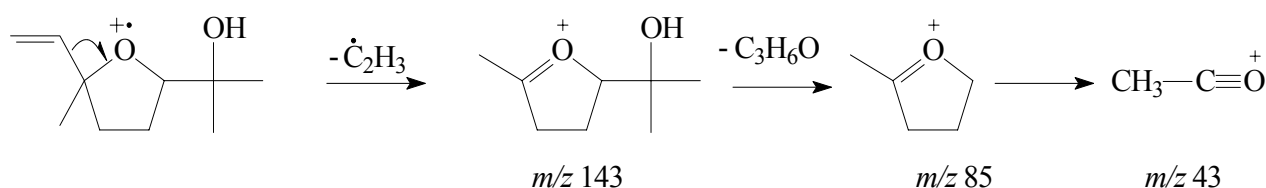
Die verlies van die alkoholbevattende R-groep kan moontlik lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  111 [57]:



Die volgende meganisme gee 'n moontlike verklaring vir die vorming van die ion by  $m/z$  67. Die reaksie behels  $\alpha$ -klowing met gevolglike ringopening:

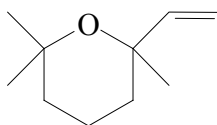


Die ion by  $m/z$  43 kan moontlik soos volg ontstaan [57]:

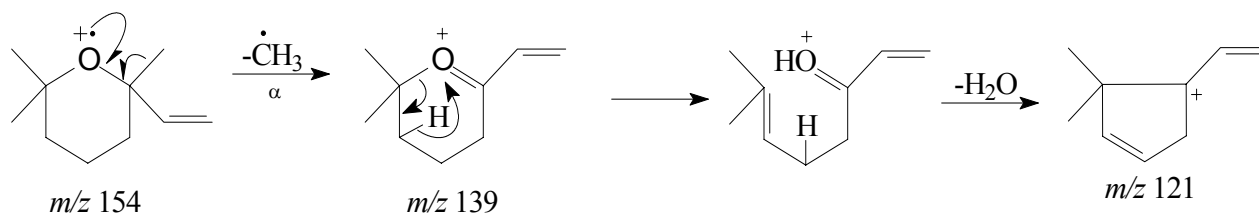


Komponent U1211 in die ongefermenteerde heuningbos is ook op grond van die bogenoemde oorwegings as *cis*-linalooloksied geïdentifiseer.

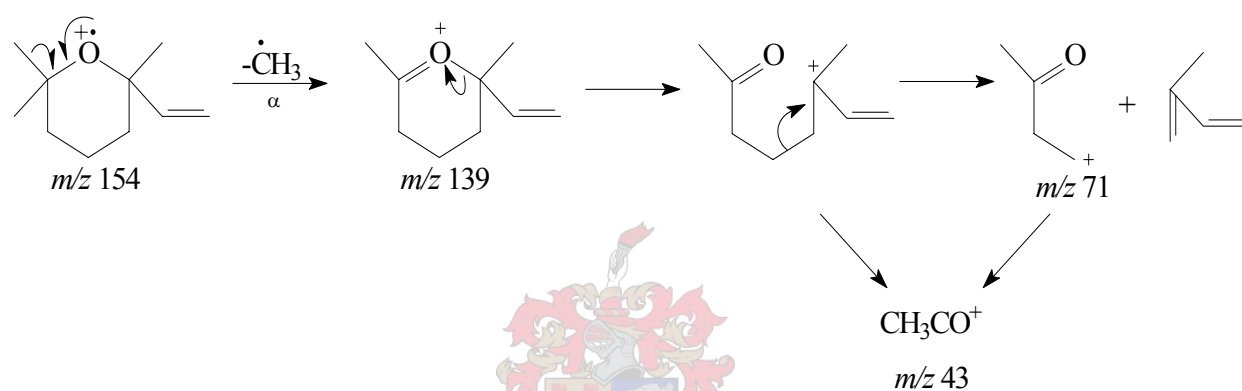
Die EI-massaspektrum van komponent F951 (Fig. 2.75) in die aroma van die gefermenteerde heuningbos vertoon prominente ione by  $m/z$  41, 43, 55, 56, 57, 68, 71, 81, 109, 121 en 139. Chemiese ionisasie het getoon dat die molekulêre massa van komponent F951 154 Da is. 'n Gerekenariseerde biblioteeksoektog het 2,6,6-trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan as moontlikheid vir komponent F951 voorgestel [3]:



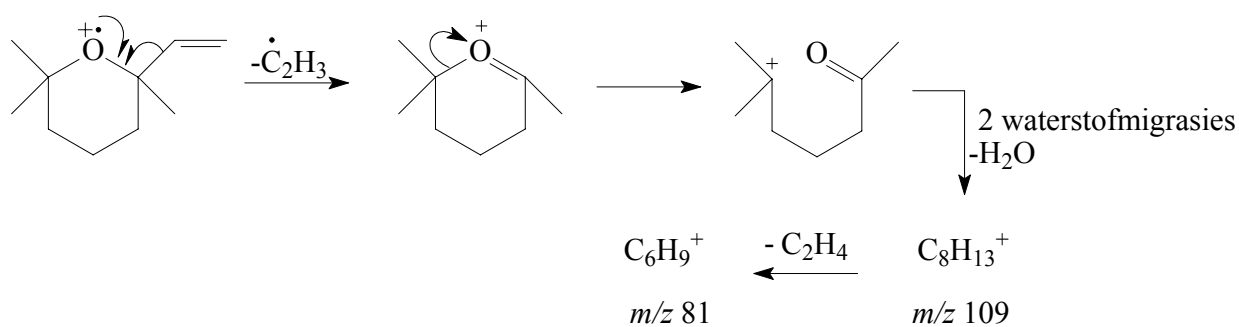
Die prominente ion by  $m/z$  139 ontstaan wanneer  $\alpha$ -klowing verlies van 'n metielgroep bewerkstellig en vanaf hierdie fragment kan die ion by  $m/z$  121 ná die migrasie van 'n waterstofatoom en verlies van water ontstaan [58]:



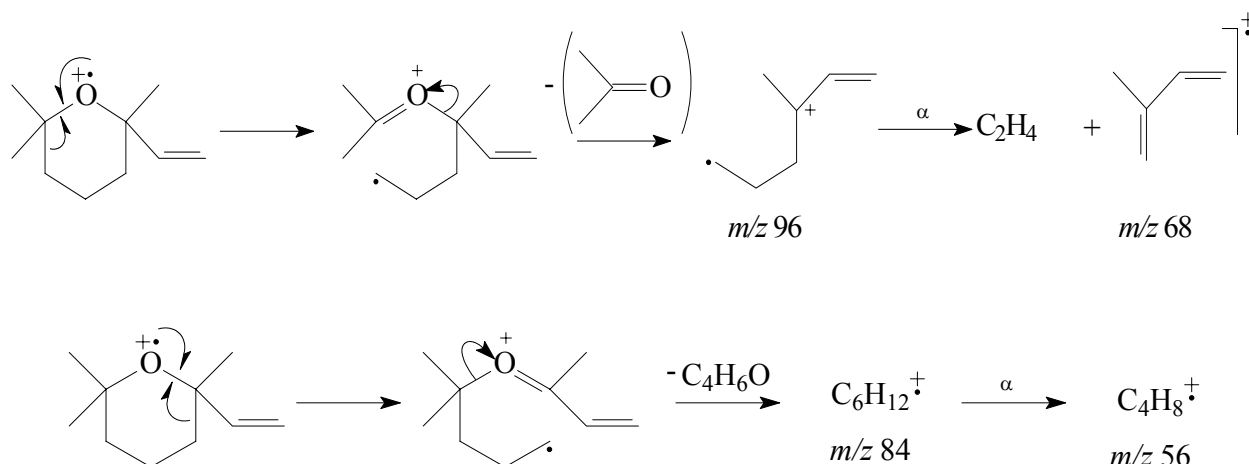
In die volgende skema word 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie wat ook lei tot die vorming van die ioon by  $m/z$  139, geformuleer. Verdere fragmentasie van hierdie ioon gee aanleiding tot die vorming van ione by  $m/z$  71 en  $m/z$  43 [58]:



Nog 'n  $\alpha$ -klowingsreaksie lei tot die verlies van die vinielgroep en uit die gevormde fragment ontstaan die ione by  $m/z$  109 en  $m/z$  81 [58]:

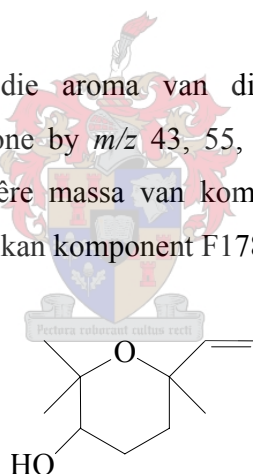


Die volgende  $\alpha$ -klowingsreaksie, gee aanleiding tot die vorming van die belangrikste ewemassa-fragmente in die EI-massaspektrum van 2,6,6-trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan [58]:



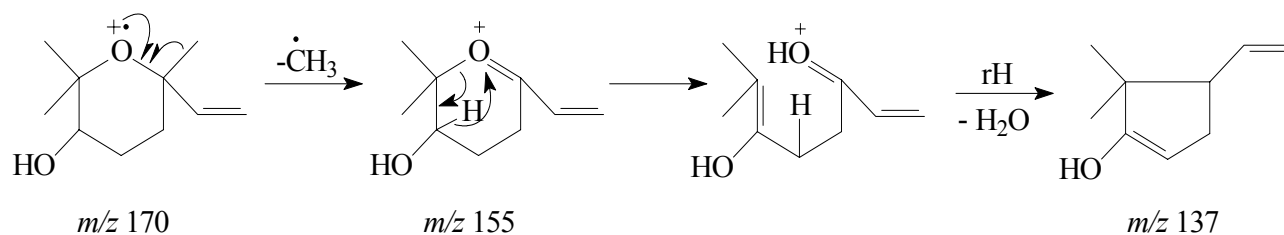
Die voorafgaande oorwegings oor die vorming van die belangrikste ione in die EI-massaspektrum van komponent F951 bevestig dat die identifikasie as 2,6,6-trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan korrek is.

Komponent F1788 (Fig. 2.76) in die aroma van die gefermenteerde heuningbos se EI-massaspektrum vertoon prominente ione by  $m/z$  43, 55, 59, 67, 68, 94, 137 en 155. Chemiese ionisasie het getoon dat die molekulêre massa van komponent F1788 170 Da is. Volgens die gerekenariseerde biblioteeksoektog [3] kan komponent F1788 moontlik epoksilinalool wees:

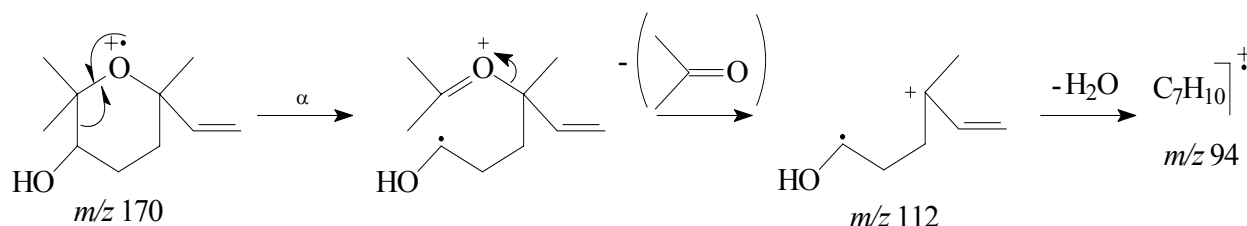


Komponent F1788 is ook 'n piraanverbinding en verwant aan 2,6,6-trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan, maar met 'n alkoholgroep wat laasgenoemde verbinding nie het nie. Die ion by  $m/z$  155 ontstaan weens die verlies van 'n metielgroep, en verdere verlies van water gee die fragment by  $m/z$  137 [58]:



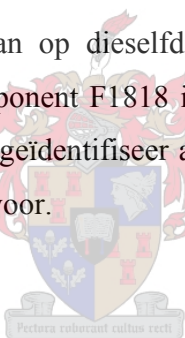


Die ioon by  $m/z\ 94$  kan moontlik soos volg ontstaan:

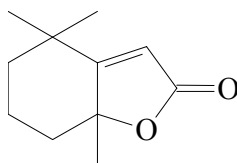


Die ione by  $m/z\ 43$  en  $m/z\ 68$  ontstaan op dieselfde wyse as wat reeds vir 2,6,6-trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan bespreek is. Komponent F1818 in die gefermenteerde heuningbos is ook op grond van die bogenoemde oorwegings geïdentifiseer as epoksilinalool. Hierdie twee isomere kom albei in die gefermenteerde heuningbos voor.

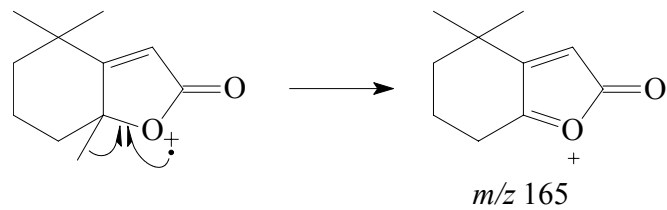
#### 2.2.15.6 Terpeenlaktone



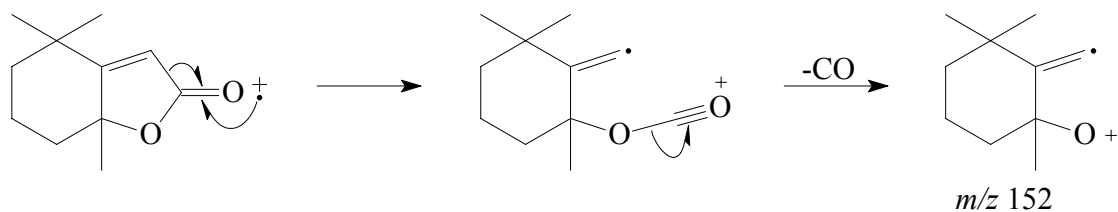
Prominente ione in die EI-massaspektrum van komponent F3237 (Fig. 2.77) kom voor by  $m/z\ 43$ , 67, 109, 111 (basispiek), 124, 137, 152, 165 en 180. Met behulp van chemiese ionisasie is bevestig dat die molekulêre massa van komponent F3237 180 Da is (Fig. 2.77a). Die gerekenariseerde biblioteksoektog [3] het dihidroaktinidiolied as moontlikheid voorgestel:



Vervolgens is probeer om die pieke in die massaspektrum te verklaar aan die hand van hierdie struktuur.  $\alpha$ -Klwing met gevolglike verlies van 'n metielgroep, lewer die ioon by  $m/z\ 165$ :



Die ion by  $m/z$  152 ontstaan moontlik deur die verlies van 'n CO-groep:



Verlies van beide 'n metiel- en CO-groep sou dan aanleiding kon gee tot die vorming van die ion by  $m/z$  137, terwyl die verlies van 2 CO-groepe verantwoordelik kan wees vir die vorming van die  $m/z$  124-ion. Komponent U3075 in die ongefermenteerde heuningbos, is op grond van die bogenoemde oorwegings geïdentifiseer as dihidroaktinidiolied.

### 2.2.16 Ander

Komponente U1831 (Fig. 2.78) en U4706 (Fig. 2.79) in die ongefermenteerde heuningbos is onderskeidelik geïdentifiseer as heksametileentetramien (HMTA) en elementêre swawel ( $S_8$ ) deur vergelyking van hulle massaspektra met bekende massaspektra in die NBS biblioteek [3]. Die identifikasie van hierdie twee komponente is verder bevestig deur hulle SEP-GC-MS retensietye te vergelyk met die retensietye van die ooreenstemmende suiwer standaarde.

In die voorafgaande bespreking is komponente F3091, F3469, F3634, U4202 en U4848 reeds genoem sonder 'n uitgebreide bespreking van hulle massaspektra, en tentatief geïdentifiseer deur hulle massaspektra te vergelyk met dié van twee biblioteke en in die geval van die laasgenoemde twee komponente ook op grond van ooreenkomste met die massaspektrum van 'n reeds-geïdentifiseerde verbinding.

Die volgende groepie verbindings is ook tentatief geïdentifiseer, maar is nie in die voorafgaande bespreking genoem nie, en sluit in komponente F1018 (Fig. 2.80), F2021 (Fig. 2.81), U2331 (Fig. 2.82), F2539 (Fig. 2.83), U2515 (Fig. 2.84) en F4701 (Fig. 2.85) wat onderskeidelik as 2,3-dehidro-1,8-sineool, *Ekso*-2-hidroksisineool, pseudojonoon, 2-metiel-3-hidroksi-2,4,4-trimetielpentiel propanoaat en 'n nonadekadiën-1-ol geïdentifiseer is.

Die volgende komponente kon nie geïdentifiseer word nie: F1091 (Fig. 2.86), F1124 (Fig. 2.87), U1128 (Fig. 2.88), F1738 (Fig. 2.89), U2267 (Fig. 2.90), F2388 (Fig. 2.91), U2319 (Fig. 2.92), F2490 (Fig. 2.93), F2716 (Fig. 2.94), F2887 (Fig. 2.95), U2956 (Fig. 2.96), U3013 (Fig. 2.97), F3597 (Fig. 2.98), F4795 (Fig. 2.99), U5182 (Fig. 2.100) en F5410 (Fig. 2.101).

Alhoewel dieselfde verbinding moontlik in die ongefermenteerde sowel as in die gefermenteerde heuningbosaroma kan voorkom, is slegs een van die twee identiese komponente as voorbeeld in die vorige twee paragrawe aangegee.

### 2.3 Toekomstige studies

Die betrokke studie wat gedoen is vorm 'n goeie basis vir verdere studie waarin die chemiese karakterisering van die aroma van ander *Cyclopia* spesies wat ook in die heuningbosteebedryf van belang is, gedoen kan word. Die verskillende spesies kan dan onderling met mekaar vergelyk word om verskille en ooreenkomste uit te lig. In die toekoms sal dit ook belangrik wees om tyd-studies te doen waartydens die fermentasieproses gemonitor kan word deur deurlopende monsterneming en GC-MS-analises van die aromaverbindings, ten einde 'n optimum fermentasietyd, wanneer die geurbydraende verbindings optimaal ontwikkel het, te bepaal. 'n Beter begrip van, en uiteindelijke beheer oor die hoë-temperatuur fermentasieproses kan beduidende implikasies hê ten opsigte van kostefaktore soos tyd- en energieverbruik.

In die verlede is die geel blomme van die heuningbosplante ook geoes en verwerk, omdat verbouers van mening was dat die blomme bydra tot die geur van die heuningbostee. Alhoewel die blomme aanvanklik 'n groot volume en massa het, lewer dit na fermentasie 'n lae opbrengs aan gedroogde materiaal. Voorlopige studies het getoon dat die blomme waarskynlik nie wesenlik bydra tot die aangename heuningbosgeur nie en dat die blomme selfs 'n negatiewe effek op die geur kan hê wanneer die blomme begin verwelk en onaangename vlugtige verbindings begin vorm. Daar sal in toekomstige studies in meer diepte hierna gekyk word.

**Tabel 2.2:** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
1-Penten-3-ol	37 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
Pentanaal	48 (klein)	(nw)	MS, RI	1.8E-01	nw
Heksanaal	218 (groot)	380 (klein)	MS, RI	8.0E-02	1.5E-01
2-Heksenaal <sup>c</sup>	348 (medium)	509 (spore)	MS	nw	nw
(Z)-3-Heksen-1-ol	373 (klein)	535 (spore)	MS, RI	6.3E-03	nw
1-Heksanol	418 (klein)	(nw)	MS, RI	2.7E-04	nw
3-Metielbutanoësuur	(nw)	540 (spore)	MS, RI	nw	7.0E-02
2-Metielbutanoësuur	(nw)	564 (spore)	MS, RI	nw	1.6E-02
1-(3-Siklohekseniel)-1-etanoon	471 (klein)	630 (spore)	MS	nk	nk
4-Metiel-2-heksanoon	473 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
Heptanaal	507 (medium)	666 (spore)	MS, RI	1.2E-01	2.9E-02
(E)-2-Heptenaal	700 (spore)	858 (spore)	MS, RI	nw	1.1E-02
2,6,6-Trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan	(nw)	951 (spore)	MS, CI	nw	nw
7-Okten-4-ol	821 (medium)	980 (klein)	MS, CI	nk	nk
6-Metiel-5-hepten-2-oon	834 (hoofkomp.)	991 (medium)	MS, RI	7.3E-02	7.6E-02
2,3-Dehidro-1,8-sineool <sup>d</sup>	(nw)	1018 (klein)	MS	nw	nw
2,4-Heptadiënaal-isomeer <sup>c</sup>	859 (klein)	(nw)	MS	nk	nw
2-Pentielfuraan	871 (klein)	1028 (klein)	MS, RI, CI	1.7E-03	2.3E-03
Heksanoësuur	876 (spore)	(nw)	MS	nw	nw
Mirseen	880 (spore)	1038 (spore)	MS	nk	nk
Oktanaal	900 (klein)	1058 (spore)	MS	nw	nw

**Tabel 2.2 (vervolg):** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
( <i>E,E</i> )-2,4-Heptadiënaal	912 (klein)	1071 (spore)	MS, RI, CI	1.2E-02	1.7E-02
Ongeïdentifiseer	(nw)	1091 (klein)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	(nw)	1124 (klein)	MS	nw	nw
Limoneen	1029 (medium)	1187 (klein)	MS, RI	6.0E-03	1.6E-03
3-Okten-2-oon <sup>c</sup>	1049 (medium)	1208 (spore)	MS	nw	nw
( <i>E</i> )-Osimeen	1077 (spore)	1235 (spore)	MS	nw	nk
Ongeïdentifiseer	1128 (klein)	1287 (spore)	MS	nk	nk
γ-Terpineen	1159 (spore)	1317 (spore)	MS, RI	5.9E-04	nw
3,5-Oktadiën-2-oon-isomeer <sup>c</sup>	1180 (medium)	1341 (klein)	MS, CI	nw	nw
<i>trans</i> -Linaloöloksied	(nw)	1372 (groot)	MS, RI, CI	nw	5.5E-03
<i>cis</i> -Linaloöloksied	1211 (klein)	1439 (medium)	MS, RI, CI	4.2E-04	5.7E-03
3,5-Oktadiën-2-oon-isomeer <sup>c</sup>	1278 (klein)	(nw)	MS, CI	nw	nw
6-Metiel-3,5-heptadiën-2-oon <sup>c</sup>	1329 (medium)	(nw)	MS	nw	nw
Linaloöl	1340 (medium)	1524 (hoofk.)	MS, RI, CI	5.0E-02	4.2E-01
Nonanaal	1347 (groot)	(nw)	MS	nw	nw
Ketoïsoforoon	1472 (klein)	1634 (klein)	MS, RI	1.3E-03	3.4E-03
Ongeïdentifiseer	(nw)	1738 (klein)	MS	nw	nw
2-Dekenaal <sup>c</sup>	1583 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
Epoksilinaloöl-isomeer <sup>c</sup>	(nw)	1788 (klein)	MS, CI	nw	nk
Epoksilinaloöl-isomeer <sup>c</sup>	(nw)	1818 (klein)	MS	nw	nw
4-Karvomentenol	(nw)	1829 (medium)	MS, RI	nw	2.6E-02

**Tabel 2.2 (vervolg):** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
α-Terpineol	1724 (klein)	1905 (hoofk.)	MS, RI, CI	2.8E-02	5.5E-01
Safranaal	1744 (klein)	(nw)	MS	nk	nw
Dekanaal	1803 (medium)	(nw)	MS	nk	nw
2,4-Nonadiënaal <sup>c</sup>	1816 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
2-metiel-2-(4'-metiel-3'-sikloheksen-1'-iel) etanaal	(nw)	1980 (klein)	MS, CI	nw	nw
Heksametileentetramien (HMTA)	1831 (hoofk.)	(nw)	MS, RT	nw	nw
β-Siklositraal	1841 (klein)	2002 (klein)	MS, RI	1.0E-02	9.9E-03
Ekso-2-hidroksisineool <sup>d</sup>	(nw)	2021 (klein)	MS	nw	nk
Nerol [(Z)-geraniol]	(nw)	2074 (groot)	MS	nw	nk
Geraniol [(E)-geraniol]	2022 (medium)	2199 (groot)	MS, RI	1.1E-02	1.8E-01
2,6-Dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol	(nw)	2262 (medium)	MS, CI	nw	nk
Ongeïdentifiseer	2267 (medium)	(nw)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	(nw)	2388 (klein)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	2319 (medium)	2482 (klein)	MS	nk	nk
1-Metoksi-4-metiel-bisiklo 2.2.2 oktaan <sup>d</sup>	2331 (medium)	(nw)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	(nw)	2490 (klein)	MS	nw	nw
Pseudojonoon <sup>c,d</sup>	(nw)	2539 (medium)	MS	nw	nk
Nonaan-4-olied (γ-nonalaktoon)	2415 (spore)	2575 (spore)	MS	nw	nw

**Tabel 2.2 (vervolg):** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
Eugenol	2427 (klein)	2590 (medium)	MS, RI, CI	3.6E-03	6.0E-03
2-Metiel-3-hidroksi-2,4,4-trimetielpentiel propanoaat <sup>d</sup>	2515 (medium)	2679 (klein)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	(nw)	2716 (medium)	MS	nw	nk
α-Kubebeen	2555 (medium)	2718 (klein)	MS, RI	2.7E-04	8.0E-04
β-Damaskoon	(nw)	2841 (medium)	MS, RI	nw	1.4E-03
Ongeïdentifiseer	(nw)	2887 (klein)	MS	nw	nw
Kariofilleen	2723 (klein)	nw	MS	nw	nw
(Z)-Geranielasetoon	2842 (hoofk.)	3003 (medium)	MS, RI	1.2E-02	7.5E-02
Oksoëdulaan I/II (1,3,7,7-tetrametiel-9- okso-2-oksabisiklo[4.4.0]dek-5-een) <sup>d</sup>	(nw)	3091 (klein)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	2956 (groot)	3118 (klein)	MS	nk	nk
β-Jonoon	2963 (groot)	3126 (medium)	MS, RI	1.3E-02	4.3E-03
Ongeïdentifiseer	3013 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
α-Muuroleen	3047 (spore)	3208 (klein)	MS	nw	nw
Dihidroaktinidiolied	3075 (hoofk.)	3237 (medium)	MS, CI	nk	nk
1,3-Dihidroksi-5-isopentielbenseen	3092 (groot)	3254 (klein)	MS	nk	nk
Kalameneen	3119 (spore)	3282 (klein)	MS	nk	nk
l-β-Kadineen	3132 (klein)	3295 (klein)	MS	nw	nw
(Z)-3-heksenielensoaat	3281 (spore)	3444 (medium)	MS, RI, CI	4.0E-03	3.7E-03

**Tabel 2.2 (vervolg):** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylophia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
Megastigma-4,6,8-triën-3-oon-isomeer <sup>c,d</sup>	(nw)	3469 (medium)	MS	nw	nk
Ongeïdentifiseer	(nw)	3597 (groot)	MS	nw	nk
Megastigma-4,6,8-triën-3-oon-isomeer <sup>c,d</sup>	(nw)	3634 (medium)	MS	nw	nk
Vanillielasetoon	3525 (spore)	3688 (klein)	MS	nk	nk
3-Okso-β-jonoon	3615 (spore)	3799 (klein)	MS	nk	nk
2,4,4-Trimetiel-3-(3'-hidroksi-1'-buten-1'-iel)-2-sikloheksen-1-oon	3663 (spore)	3826 (medium)	MS	nw	nk
Heptadekaan	3822 (klein)	3985 (klein)	MS	nw	nw
Metielmeristaat	3879 (medium)	(nw)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	3911 (medium)	(nw)	MS	nk	nw
Tetradekanoësuur	4015 (medium)	4187 (klein)	MS, RI	7.5E-02	2.4E-02
Oktadekaan	4167 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
15-Pentadekanolied <sup>c</sup>	4202 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
Isopropielmeristaat	4232 (klein)	4396 (spore)	MS	nw	nk
Heksahidrofarnesielasetoon	4287 (groot)	4456 (groot)	MS, RI, CI	1.5E-02	2.7E-02
Pentadekanoësuur	4343 (klein)	(nw)	MS	nk	nw
Nonadekaan	4496 (klein)	4660 (klein)	MS	nw	nw
( <i>E,E</i> )-Farnesielasetoon	4506 (medium)	4669 (spore)	MS, RI, CI	1.9E-01	1.9E-01
16-Heksadekanolied	4533 (medium)	(nw)	MS, RI	1.0E-04	nw
'n Nonadekadiën-1-ol <sup>d</sup>	(nw)	4701 (groot)	MS	nw	nw



**Tabel 2.2 (vervolg):** Verbindings geïdentifiseer in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cylopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering vanaf 'n apolêre kapillêre kolom.

Verbinding	Bodamp			Ekstrak (dichlorometaan)	
	Nr. in TIC (rel konsentrasie) <sup>a</sup>		Metode van identifikasie <sup>b</sup>	Konsentrasie <sup>a</sup> (µl/ml)	
	Fig. 2.1 (ongefermenteer)	Fig. 2.2 (gefermenteer)		Ongefermenteer	Gefermenteer
Ongeïdentifiseer	(nw)	4795 (klein)	MS	nw	nk
Heksadekanoësuur	4668 (groot)	4848 (klein)	MS, RI	1.3E+00	1.4E+00
Swawel (S <sub>8</sub> )	4706 (medium)	(nw)	MS, RT	nw	nw
Eikosaan	4813 (klein)	4976 (klein)	MS	nw	nw
17-Heptadekanolied <sup>d</sup>	4848 (klein)	(nw)	MS	nw	nw
Heneikosaan	5115 (klein)	5279 (spore)	MS	nw	nw
Fitol <sup>c</sup>	(nw)	5293 (medium)	MS, RI, CI	nw	2.1E+01
Ongeïdentifiseer	5182 (medium)	(nw)	MS	nw	nw
Ongeïdentifiseer	(nw)	5410 (klein)	MS	nw	nw
Dokosaan	5405 (spore)	5569 (spore)	MS	nw	nw
Trikosaan	5684 (klein)	5848 (spore)	MS, RI	1.4E-02	2.2E-02
Tetrakosaan	5952 (spore)	6117 (spore)	MS	nk	nk
Pentakosaan	6212 (medium)	6376 (klein)	MS	nk	nk

<sup>a</sup>Verbindings teenwoordig in die bodamp in spoor (<1%); klein (1-5%); medium (5-20%); hoë (20-65%) konsentrasies relatief tot die hoofkomponente (65-100%); nw, nie waargeneem deur GC of GC-MS; nk, nie gekwantifiseer met behulp van standaard nie, maar verbindings wel teenwoordig in die ekstrak en waargeneem deur GC-MS. <sup>b</sup>MS: Verbindings is geïdentifiseer deur MS spektra. RI: Verbindings is geïdentifiseer deur retensietydvergelyking van komponente in betrokke DCM-ekstrakte met suiwer standaard. RT: Verbindings is geïdentifiseer deur retensietydvergelyking van komponente in SEP-GC-MS-analises met suiwer standaard.

<sup>c</sup>Stereochemie onbekend. <sup>d</sup>Tentatief geïdentifiseer.

## Addendum A

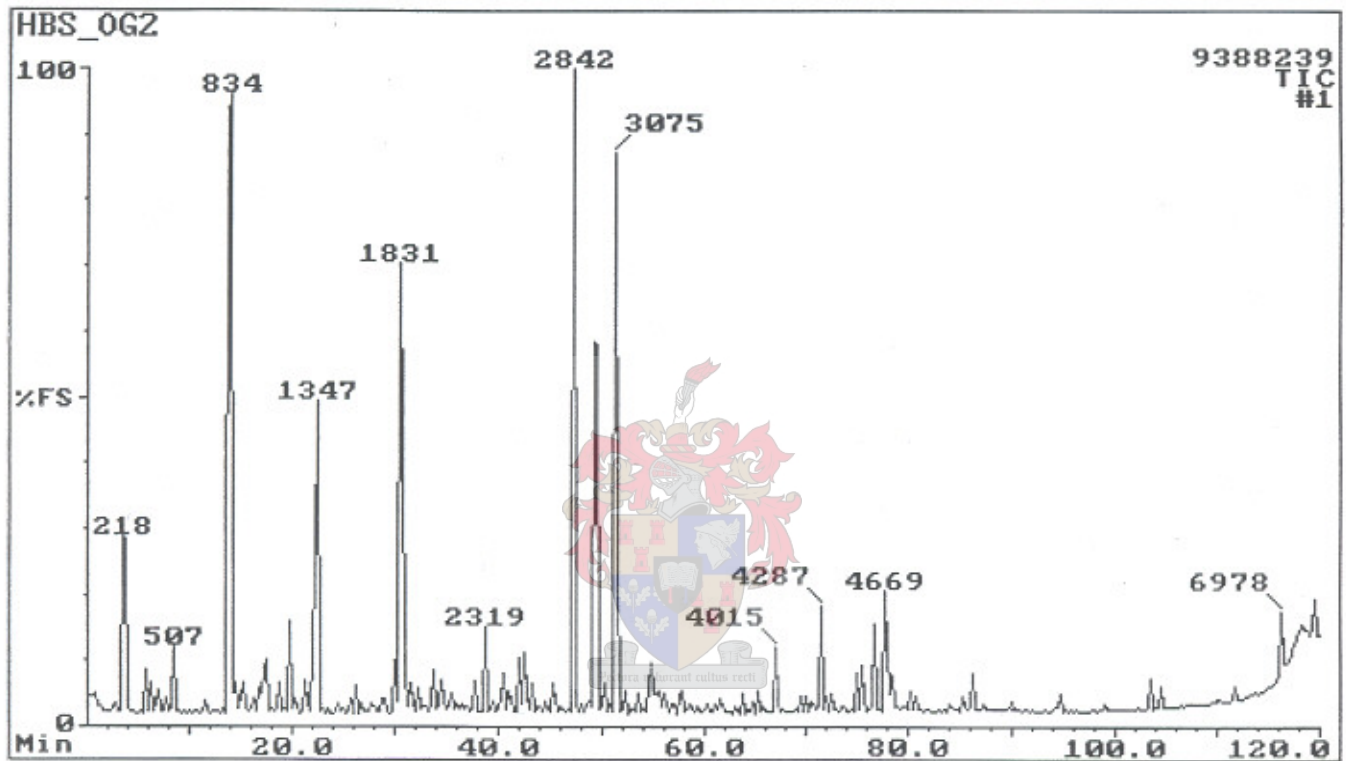


Fig. 2.1: Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die ongefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genisoides*. Die gaschromatografiese en massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.

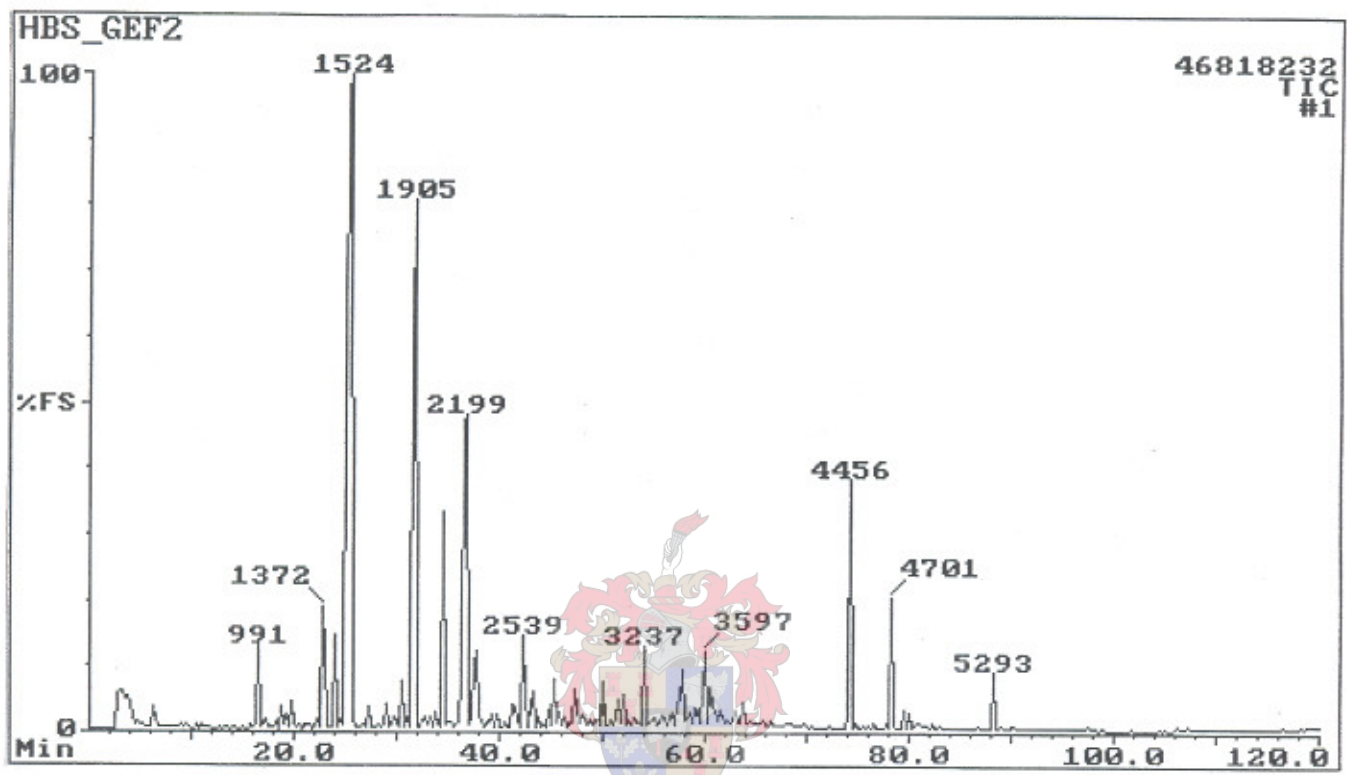


Fig. 2.2: Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die gefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genistoides*. Die gaschromatografiese en massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.

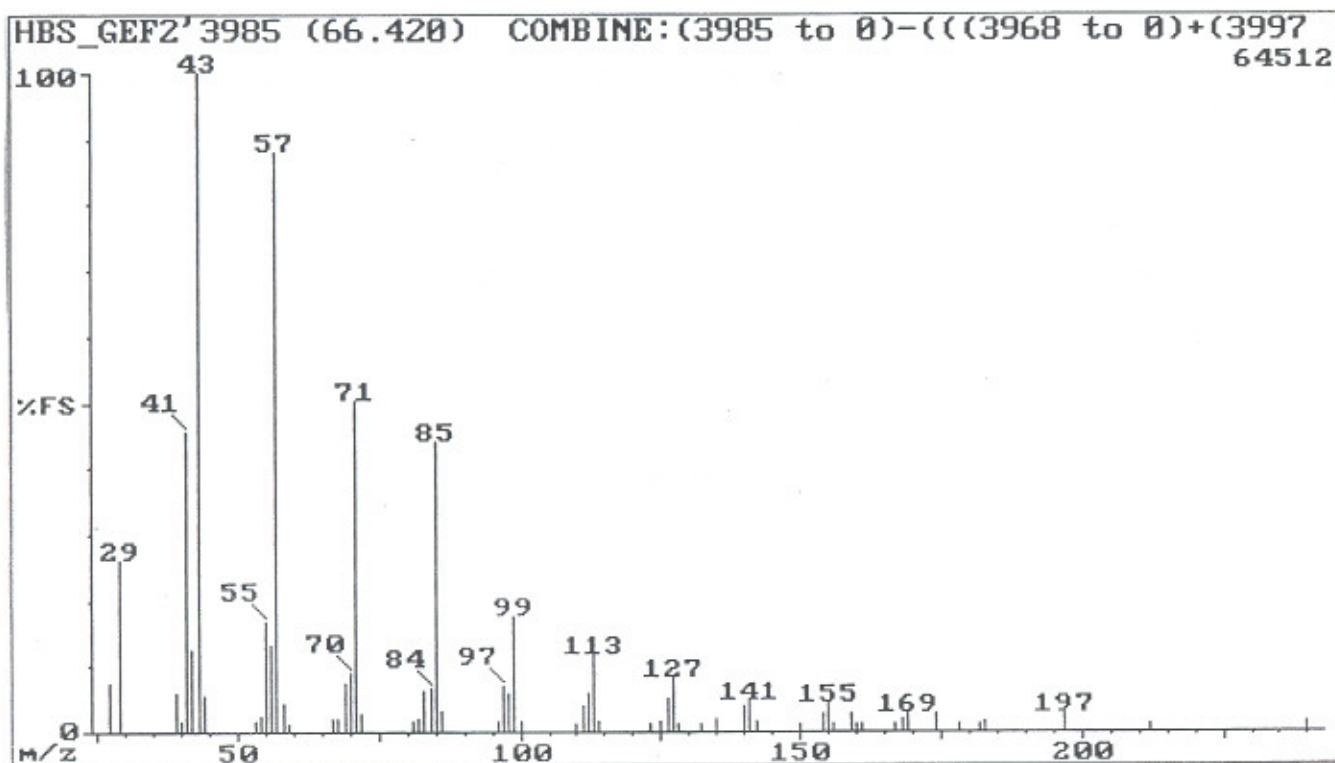


Fig. 2.3: EI-masspektrum van component F3985.

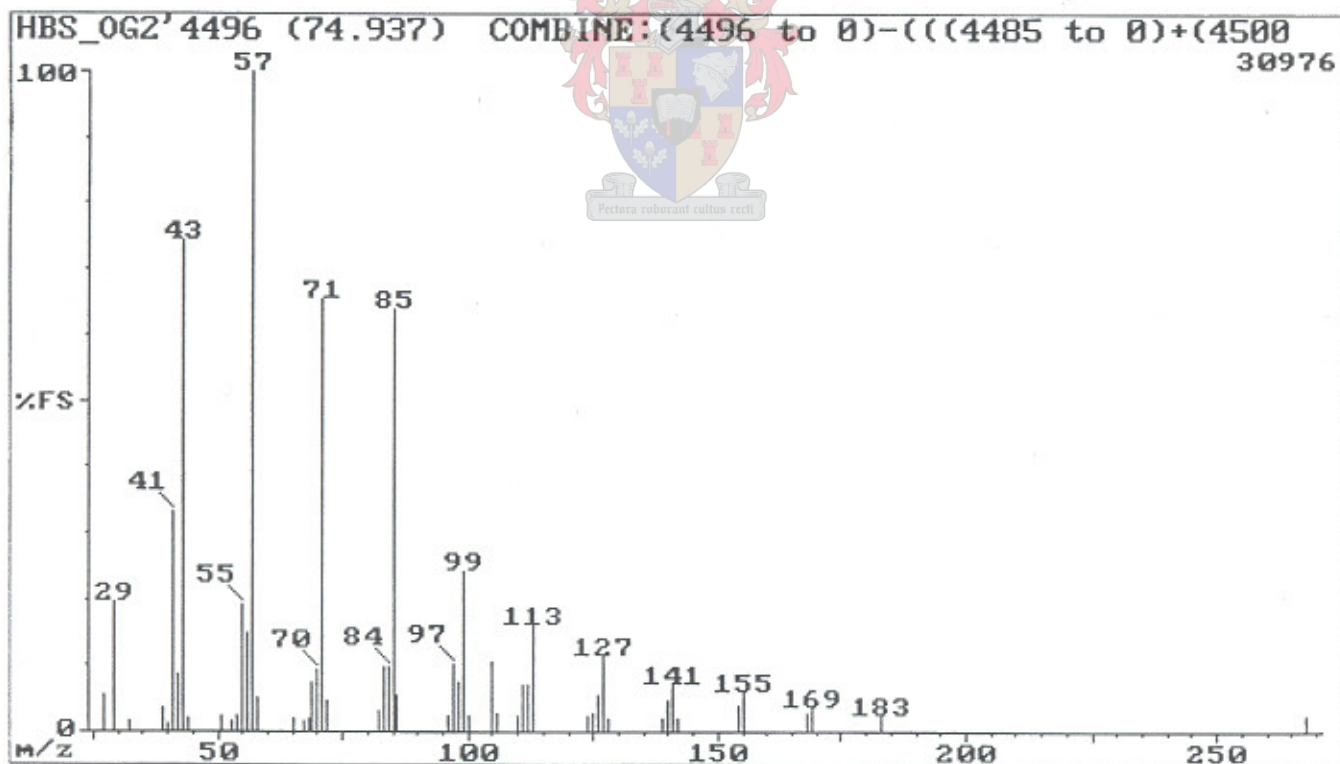


Fig. 2.4: EI-masspektrum van component U4496.

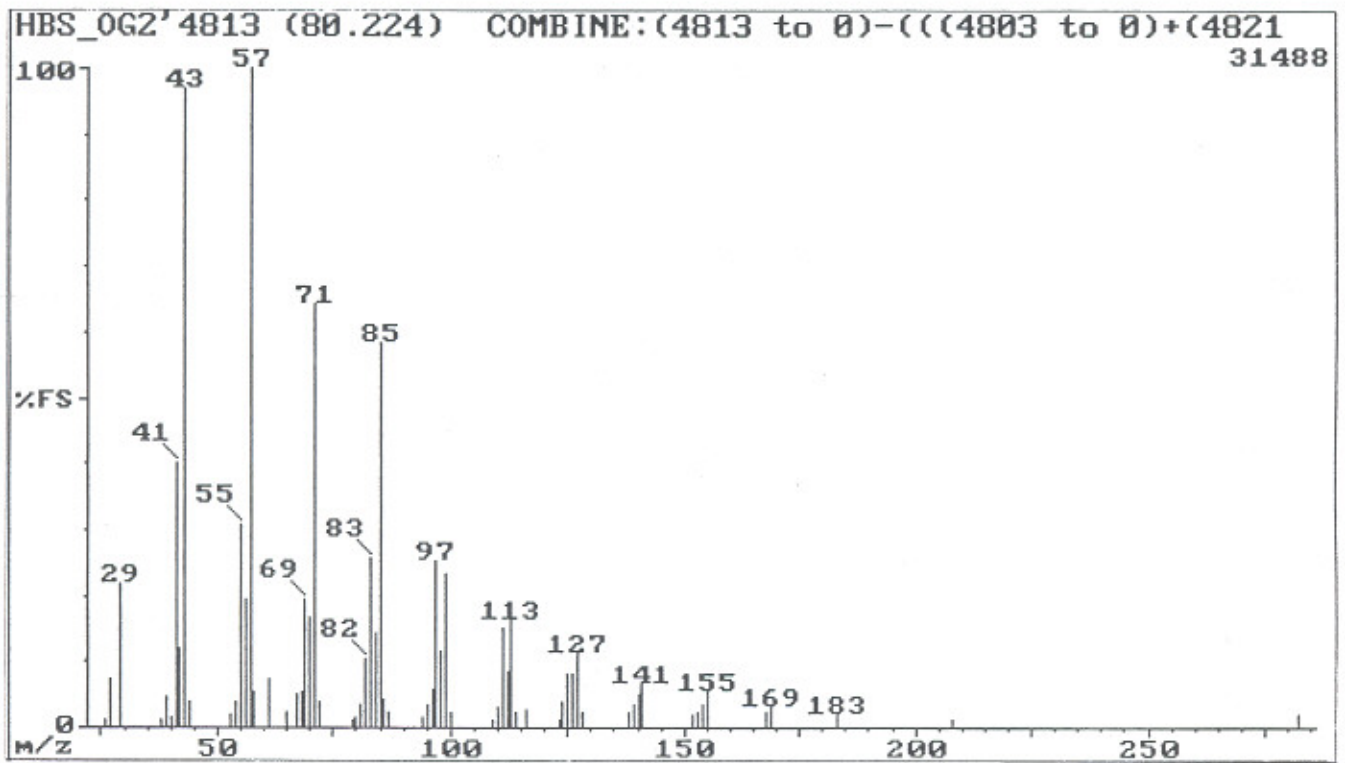


Fig. 2.5: EI-masspektrum van component U4813.

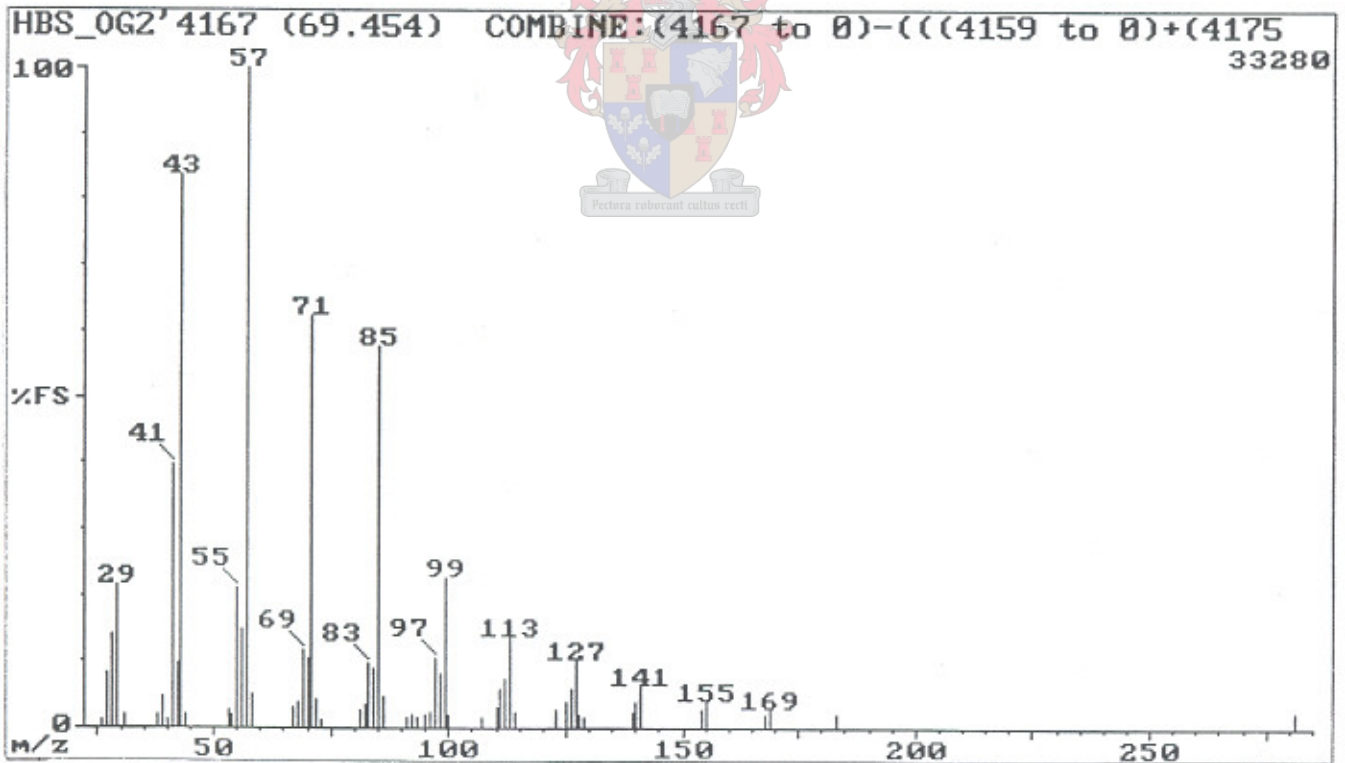


Fig. 2.6: EI-masspektrum van component U4167.



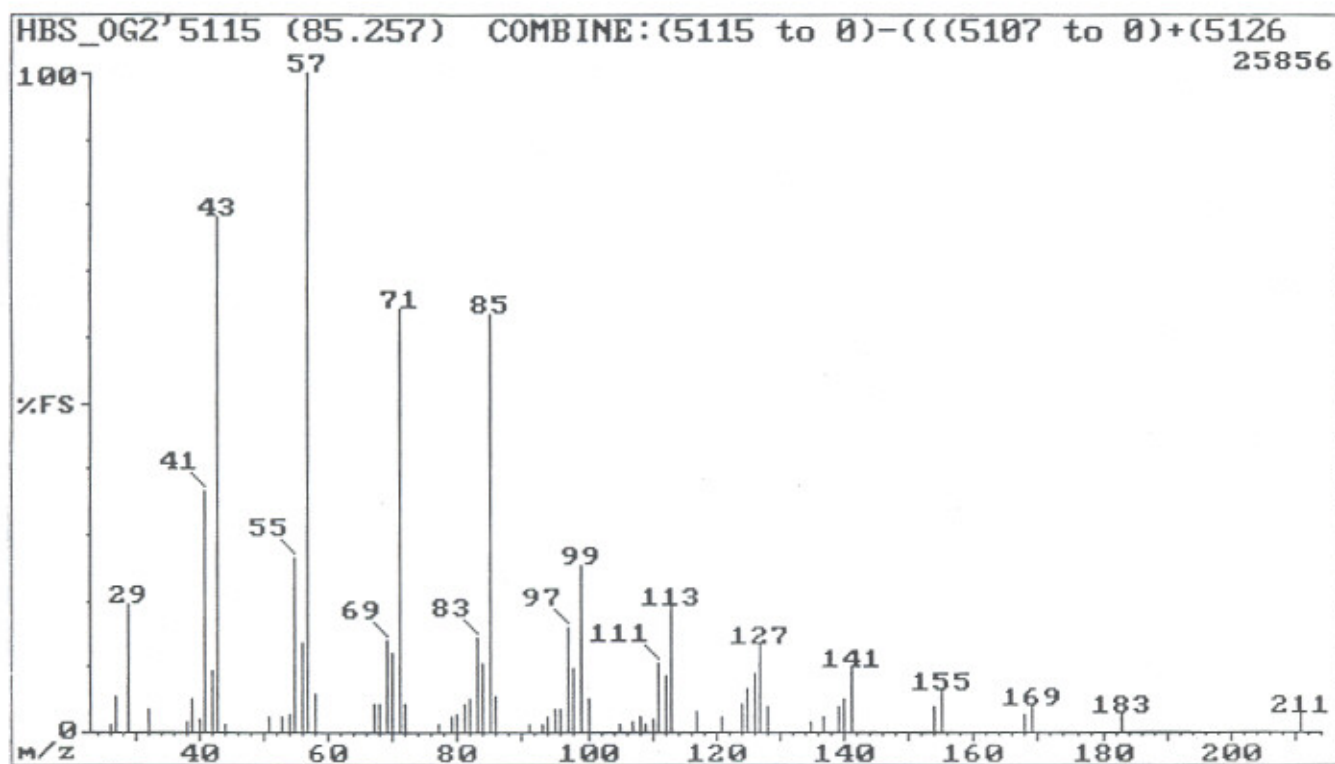


Fig. 2.7: EI-masspektrum van component U5115.

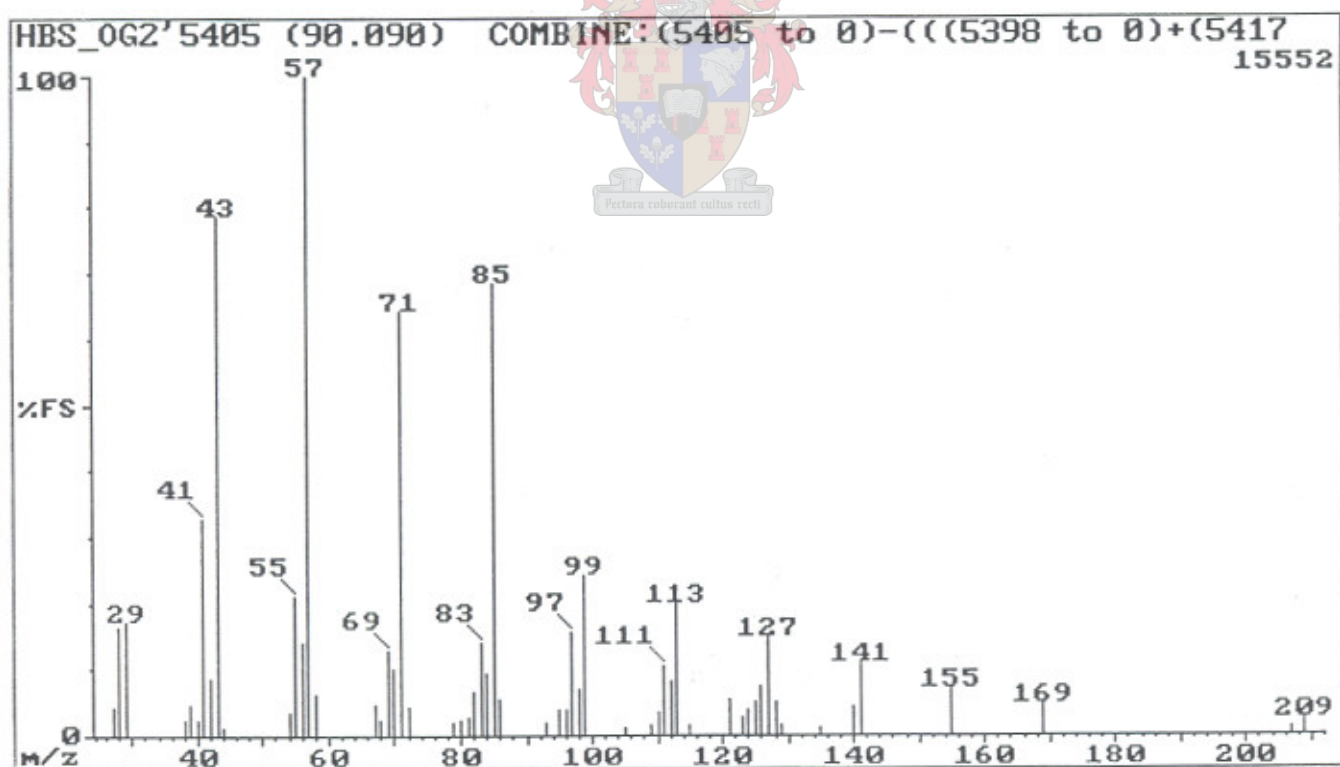


Fig. 2.8: EI-masspektrum van component U5405.

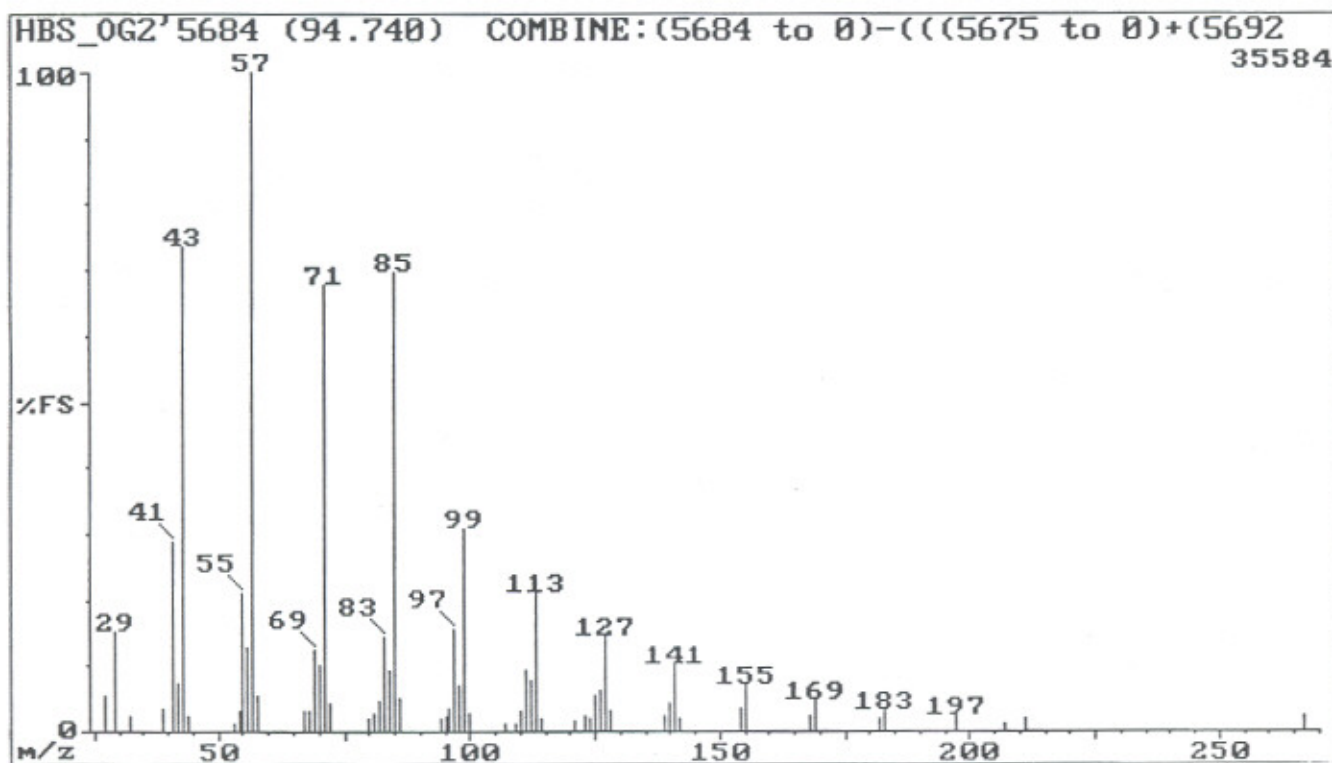


Fig. 2.9: EI-massaspektrum van component U5684 (trikosaan)

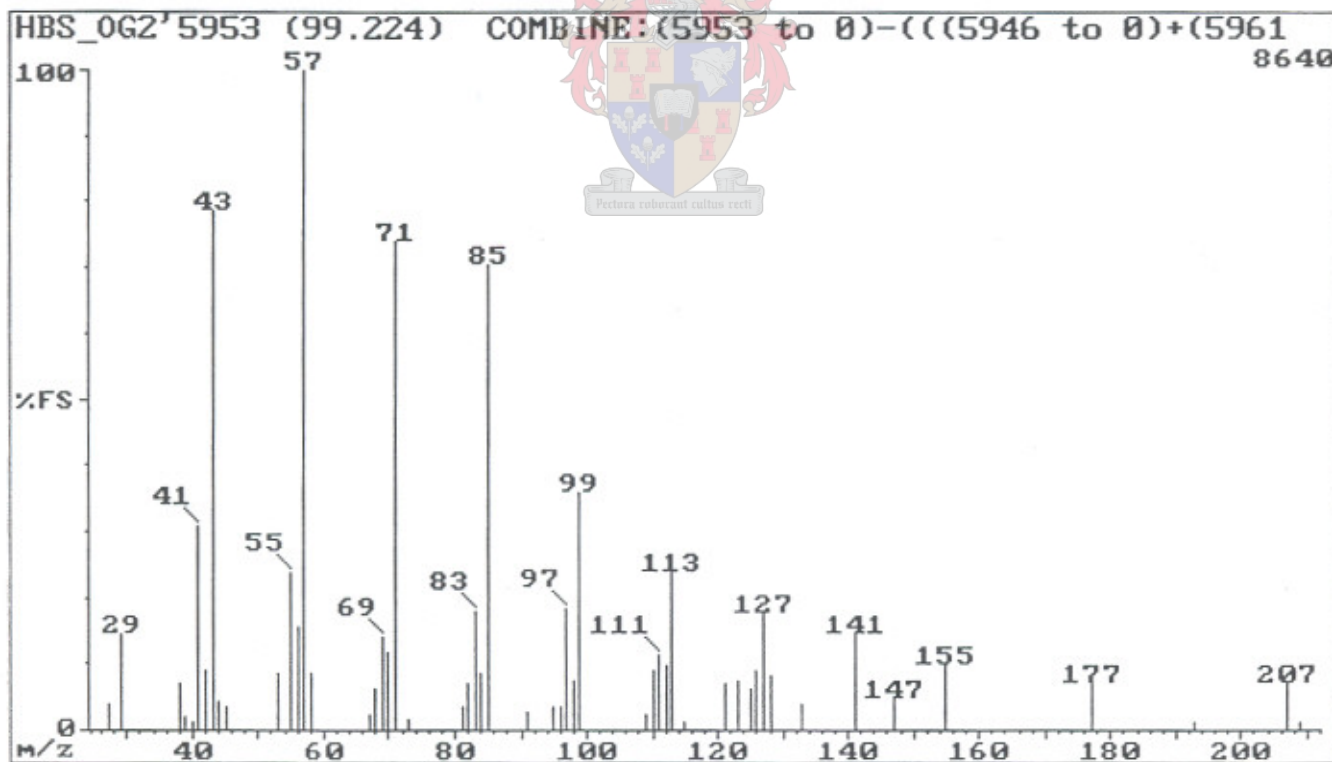


Fig. 2.10: EI-massaspektrum van component U5953.

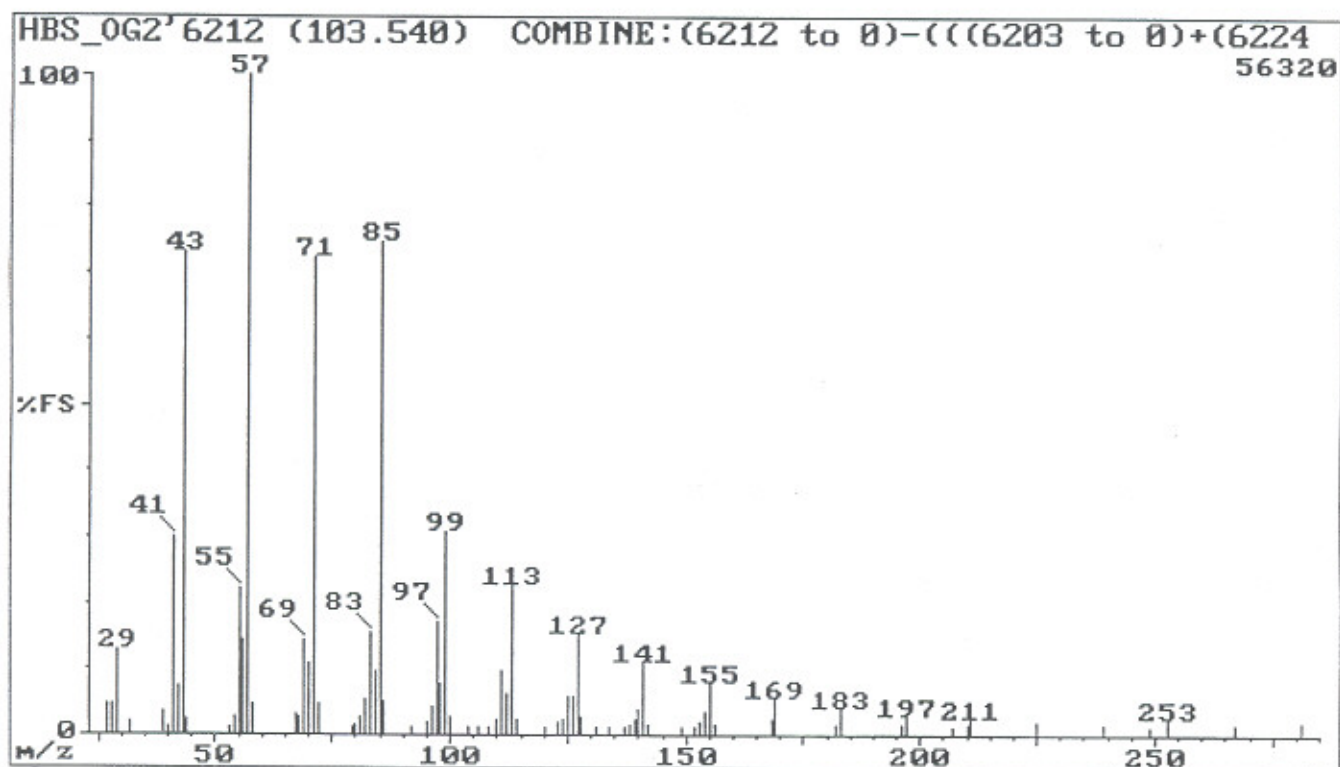


Fig. 2.11: EI-masspektrum van component U6212.

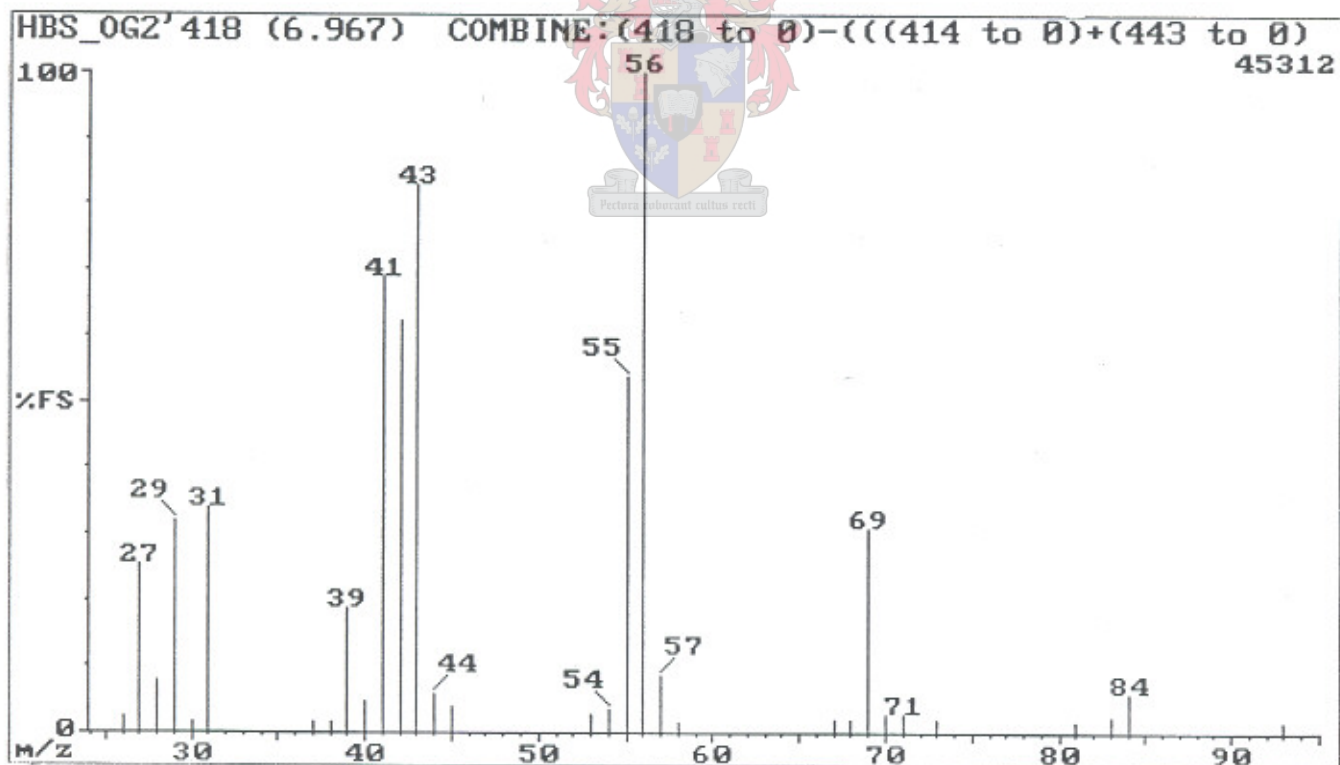


Fig. 2.12: EI-masspektrum van component U418 (1-hexanol).



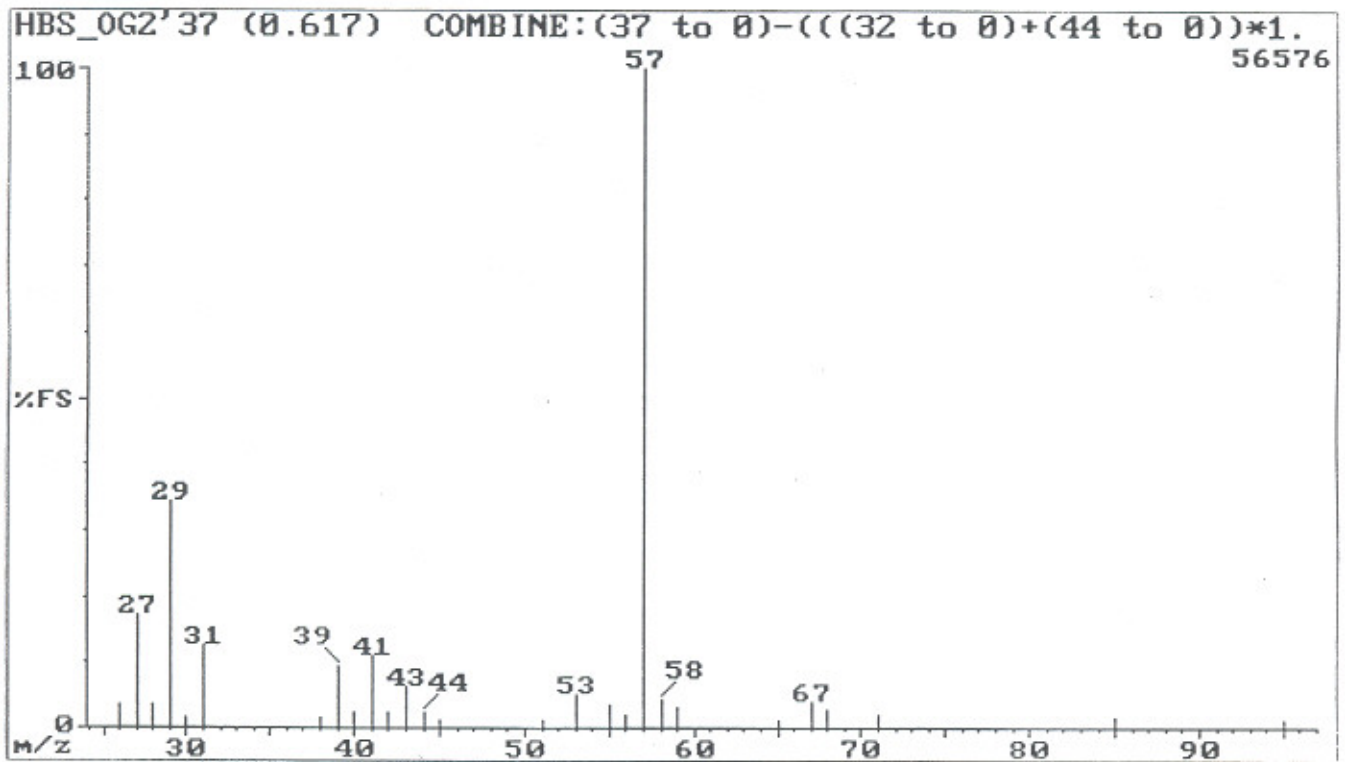


Fig. 2.13: EI-masspektrum van component U37.

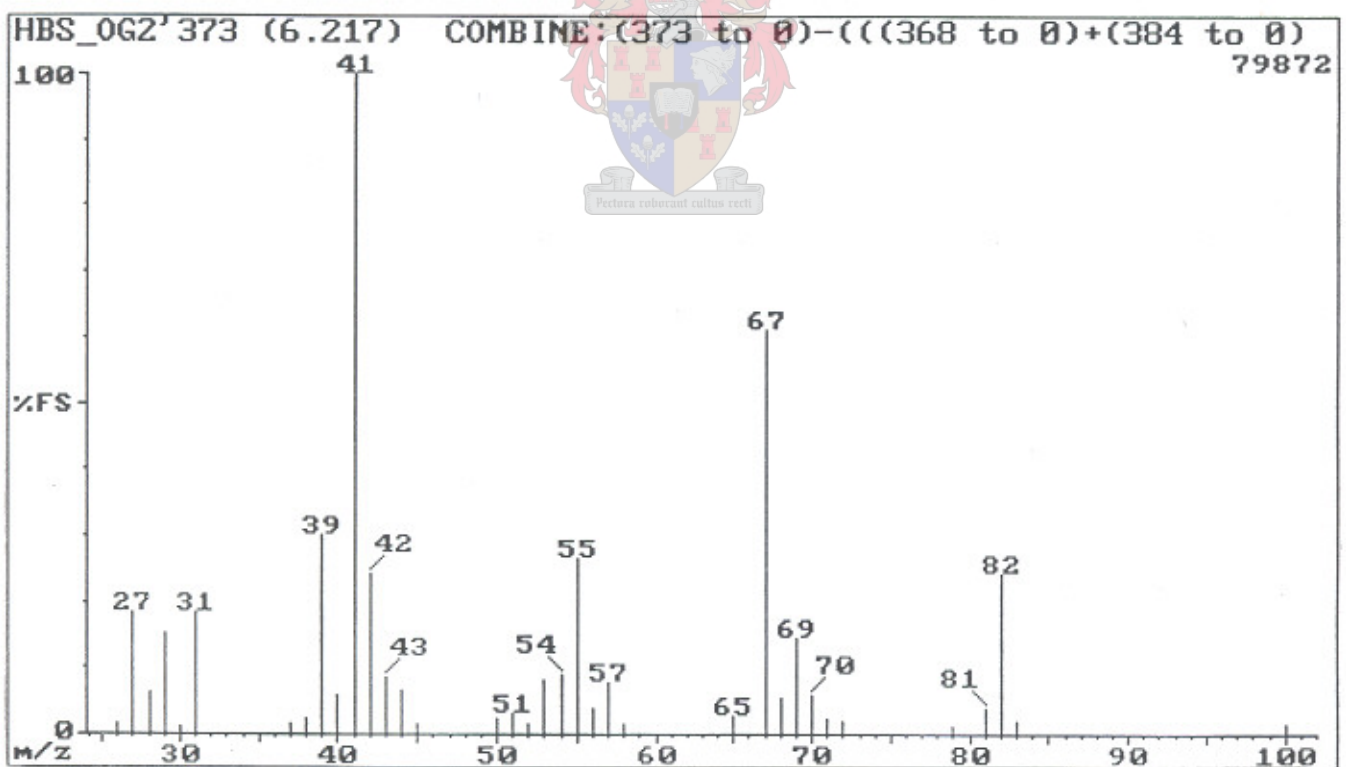


Fig. 2.14: EI-masspektrum van component U373 [(Z)-3-heksen-1-ol].

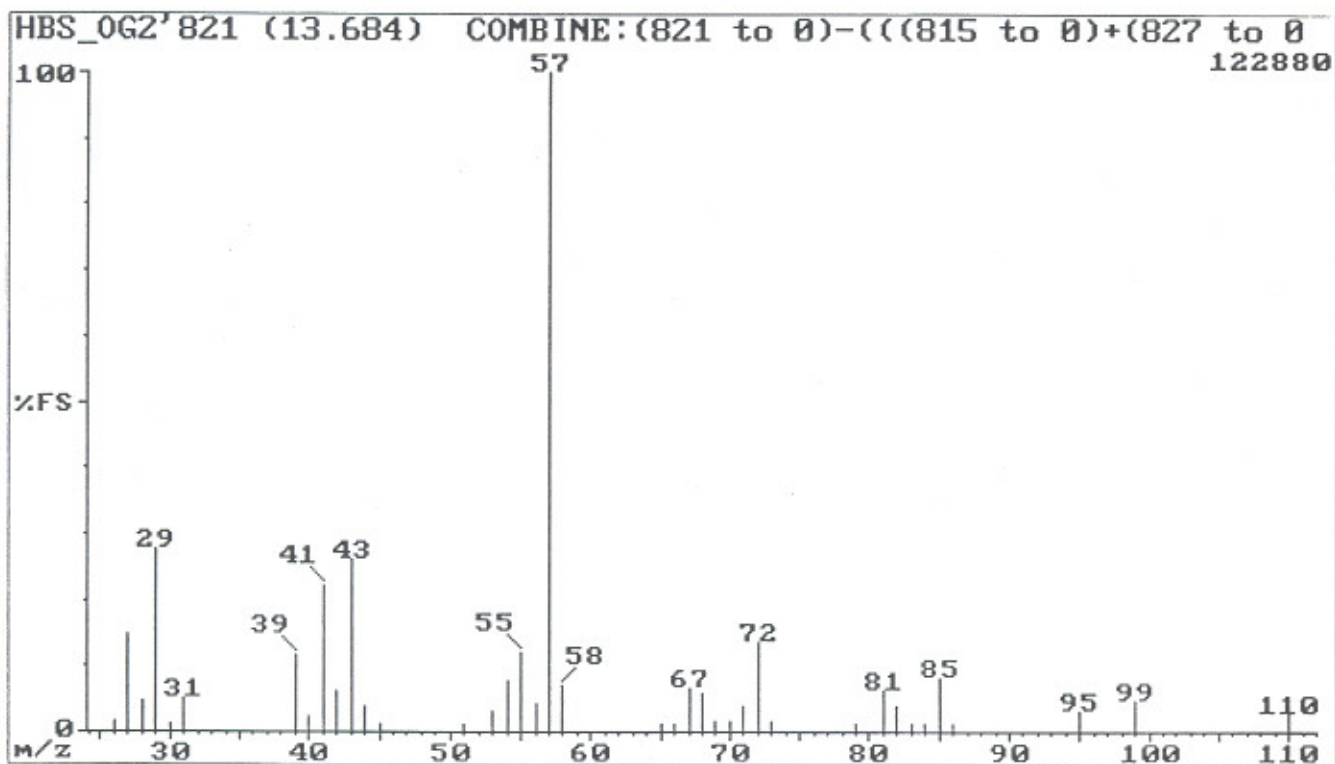


Fig. 2.15: EI-masspektrum van component U821.

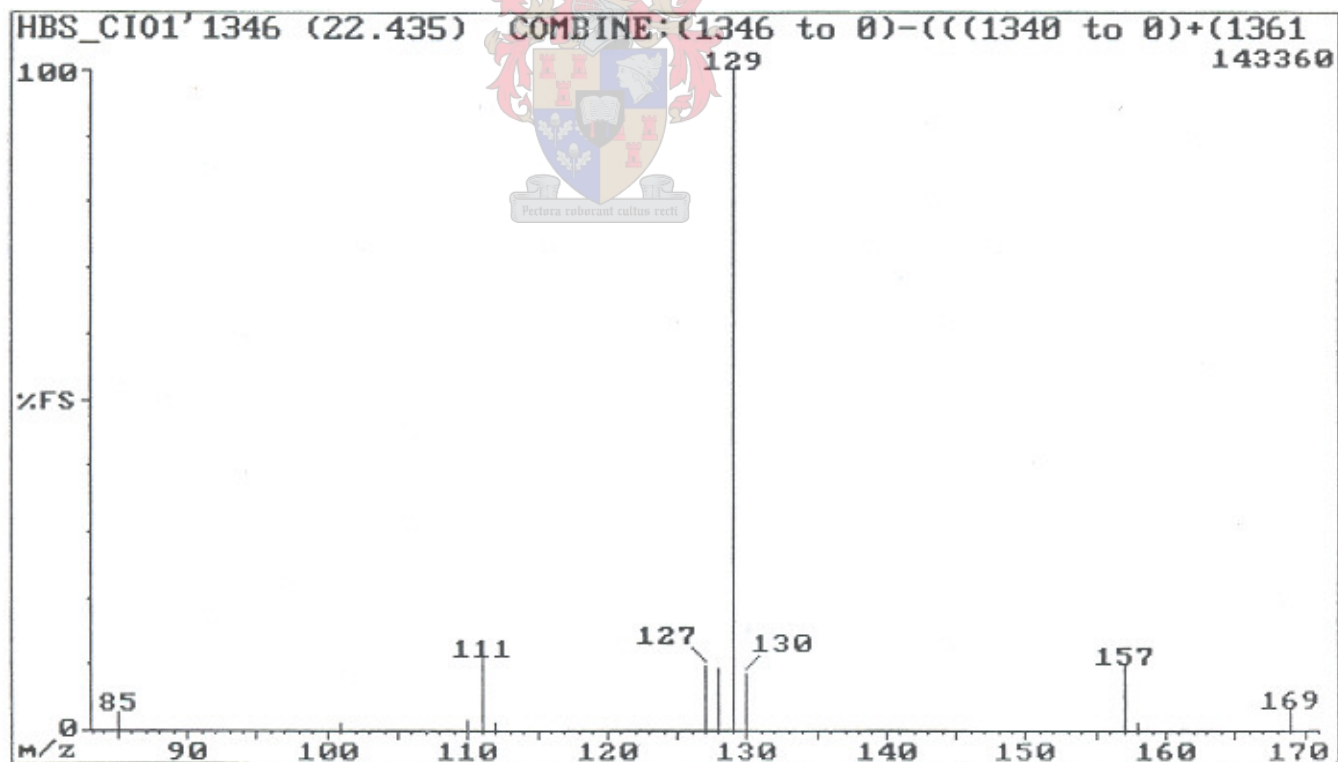


Fig. 2.15a: CI-masspektrum van component U821.

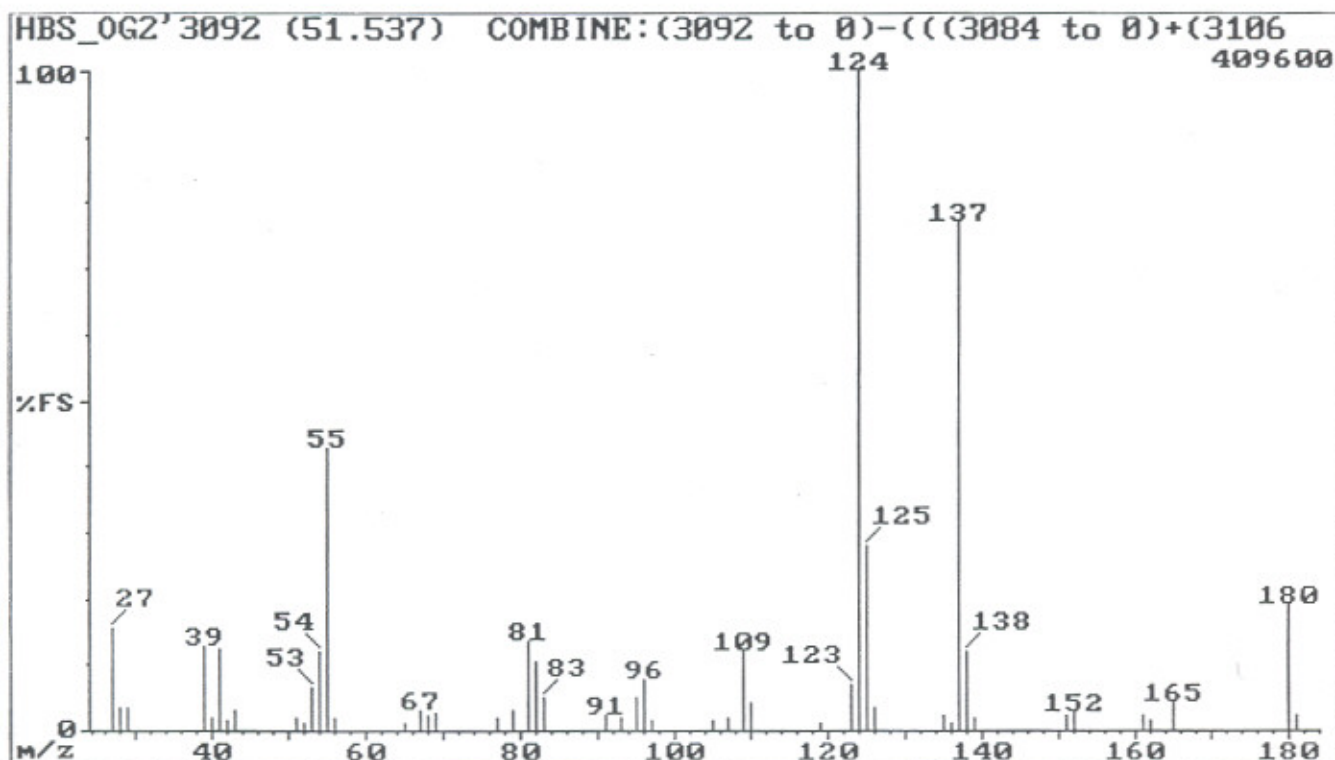


Fig. 2.16: EI-massaspektrum van component U3092.

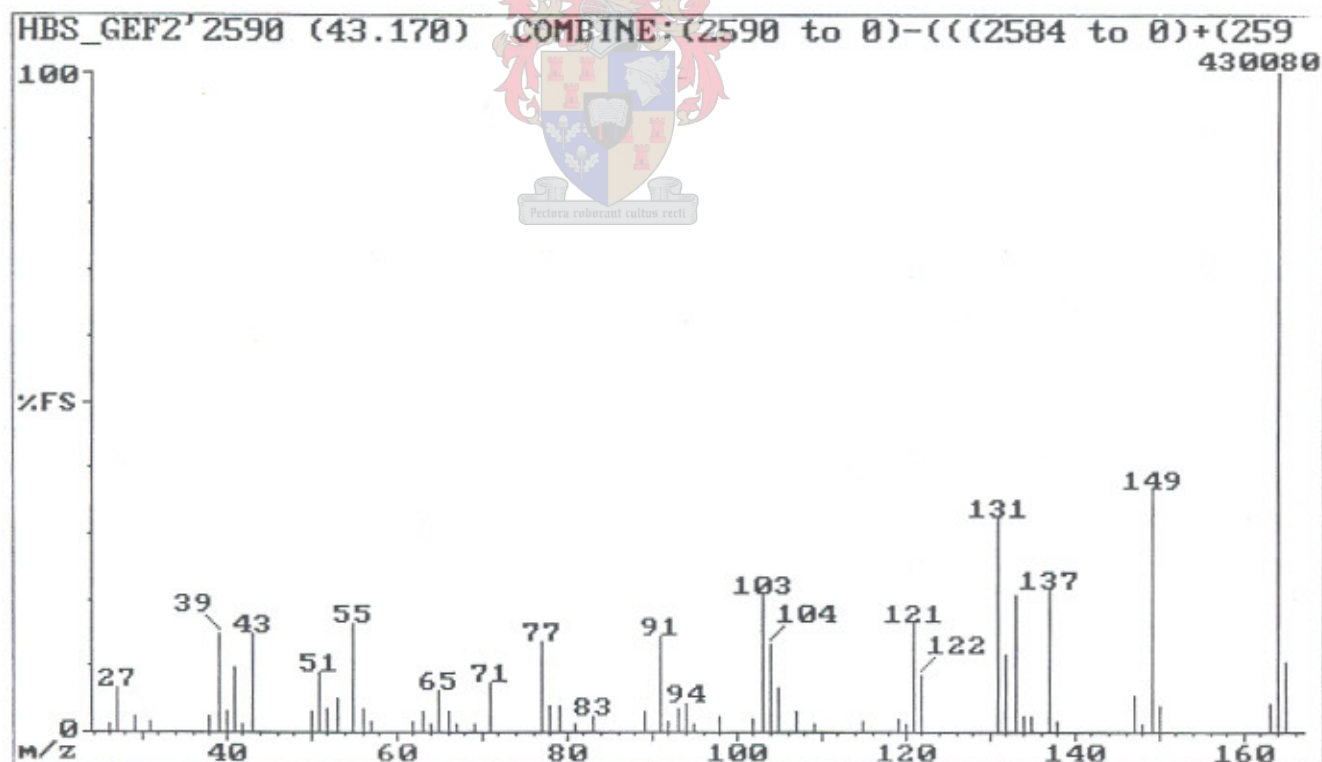


Fig. 2.17: EI-massaspektrum van component F2590 (eugenol)

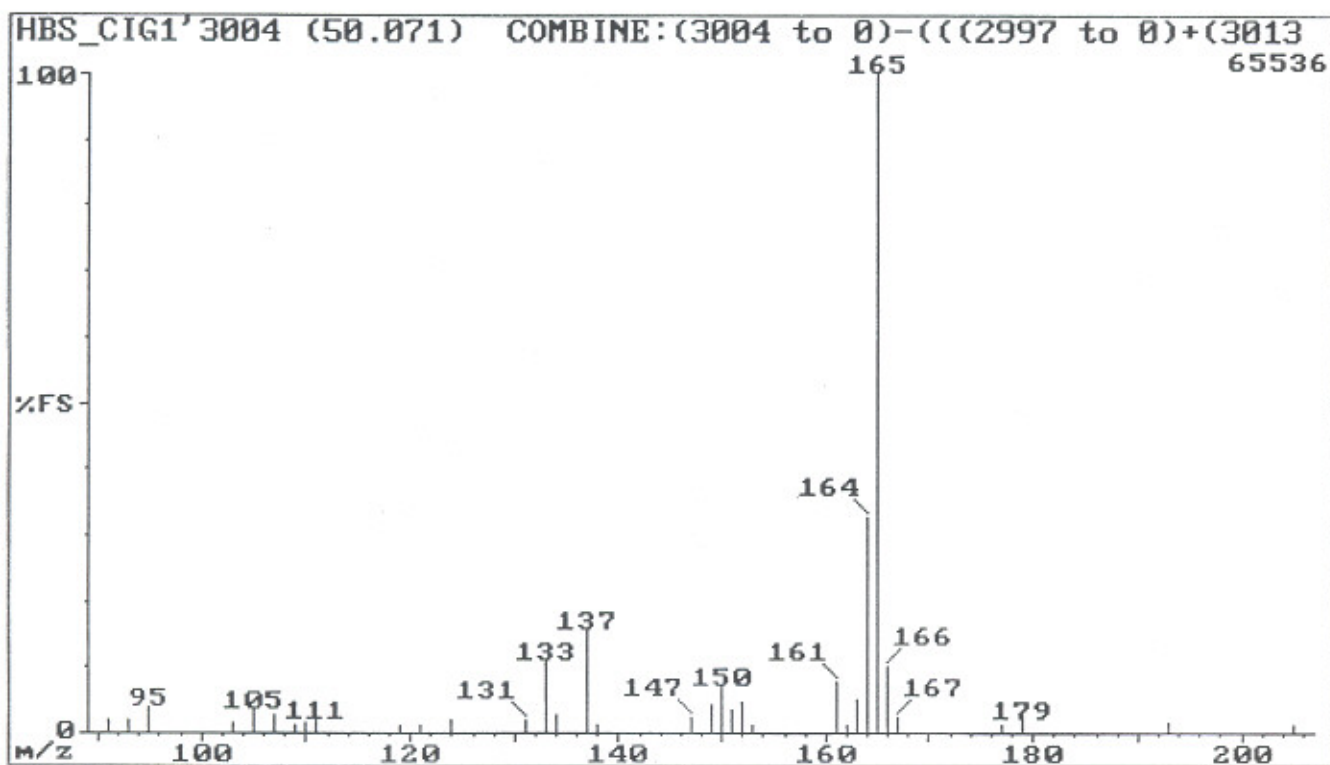


Fig. 2.17a: CI-masspektrum van component F2590 (eugenol).

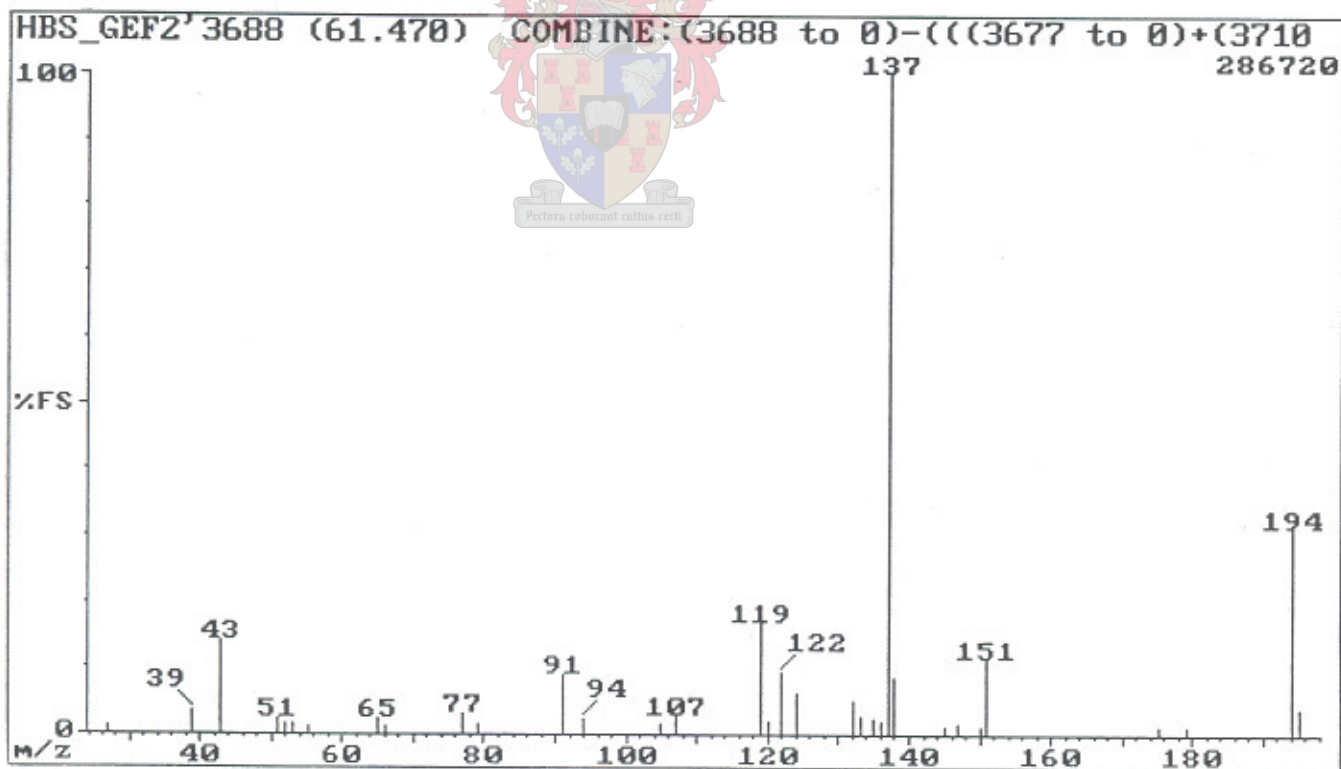


Fig. 2.18: EI-masspektrum van component F3688.

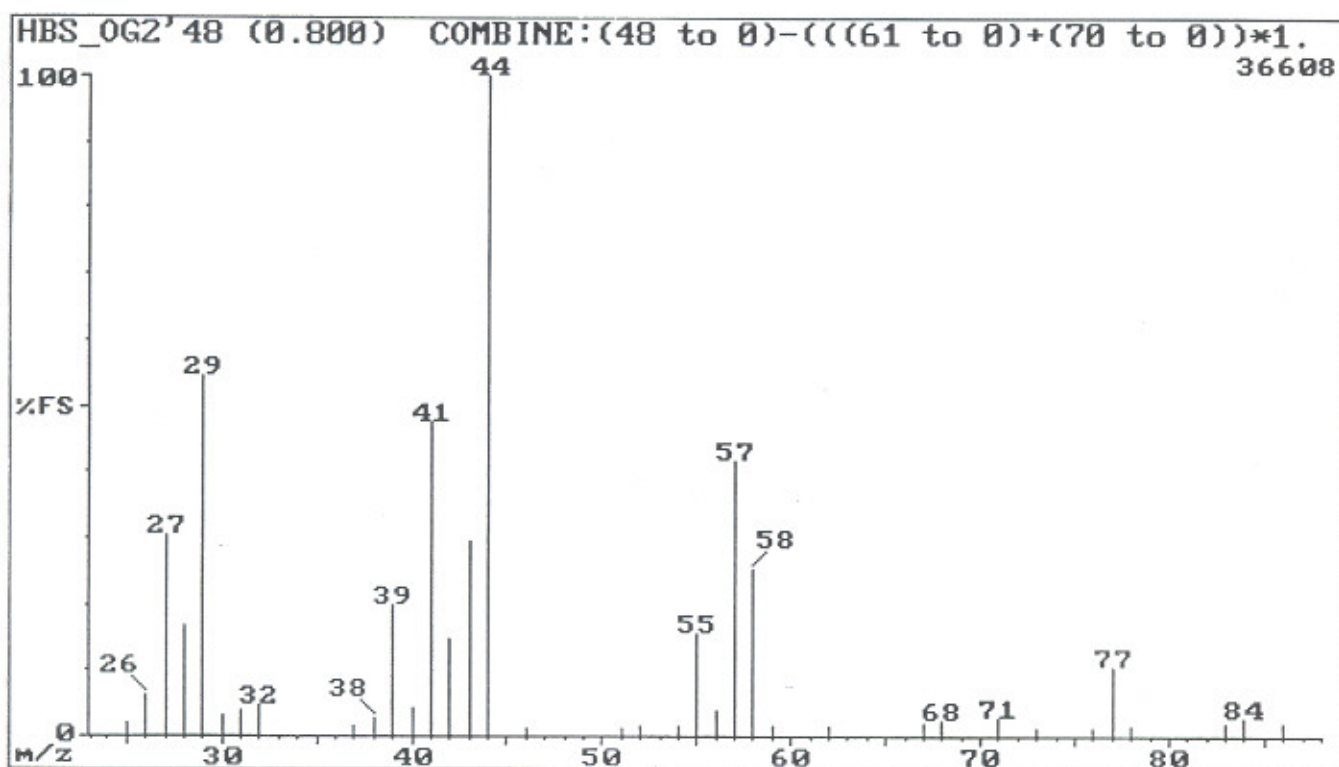


Fig. 2.19: EI-masspektrum van component U48 (pentanaal).

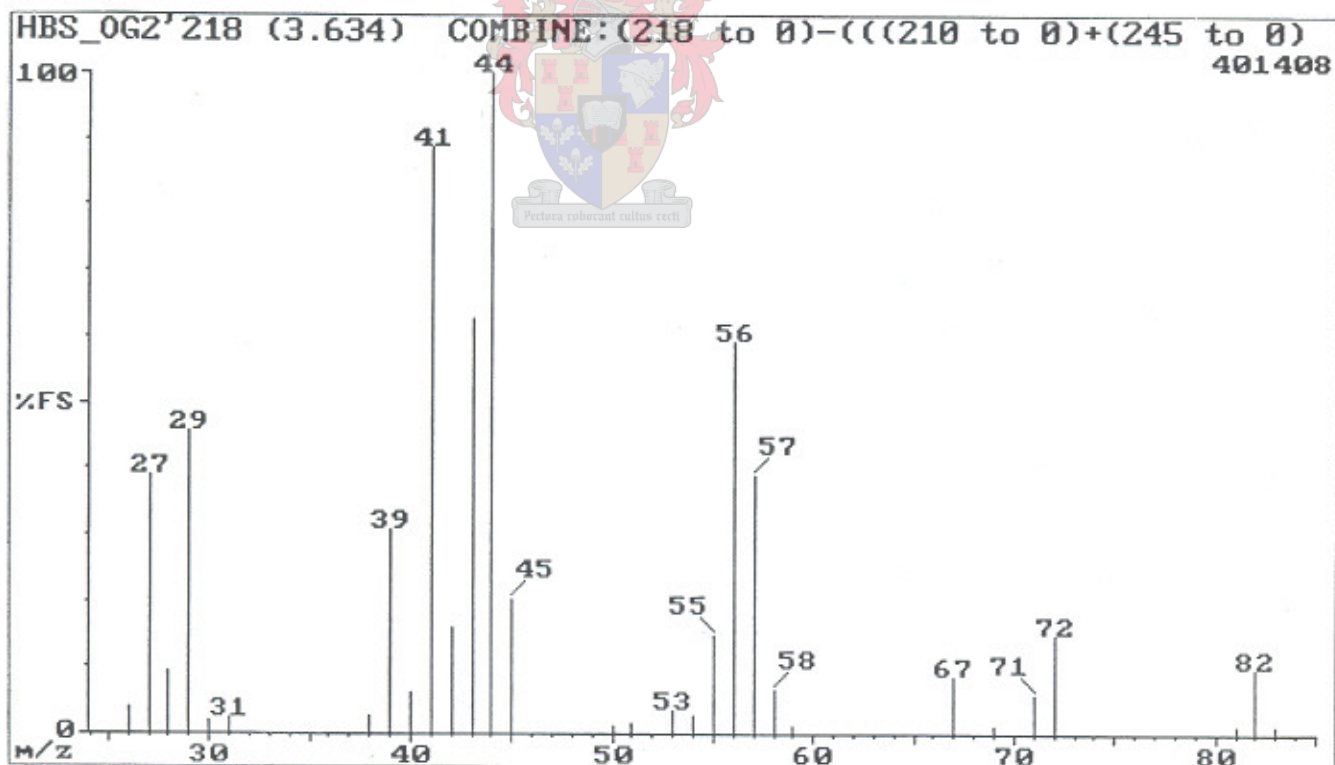


Fig. 2.20: EI-masspektrum van component U218 (hexanaal)



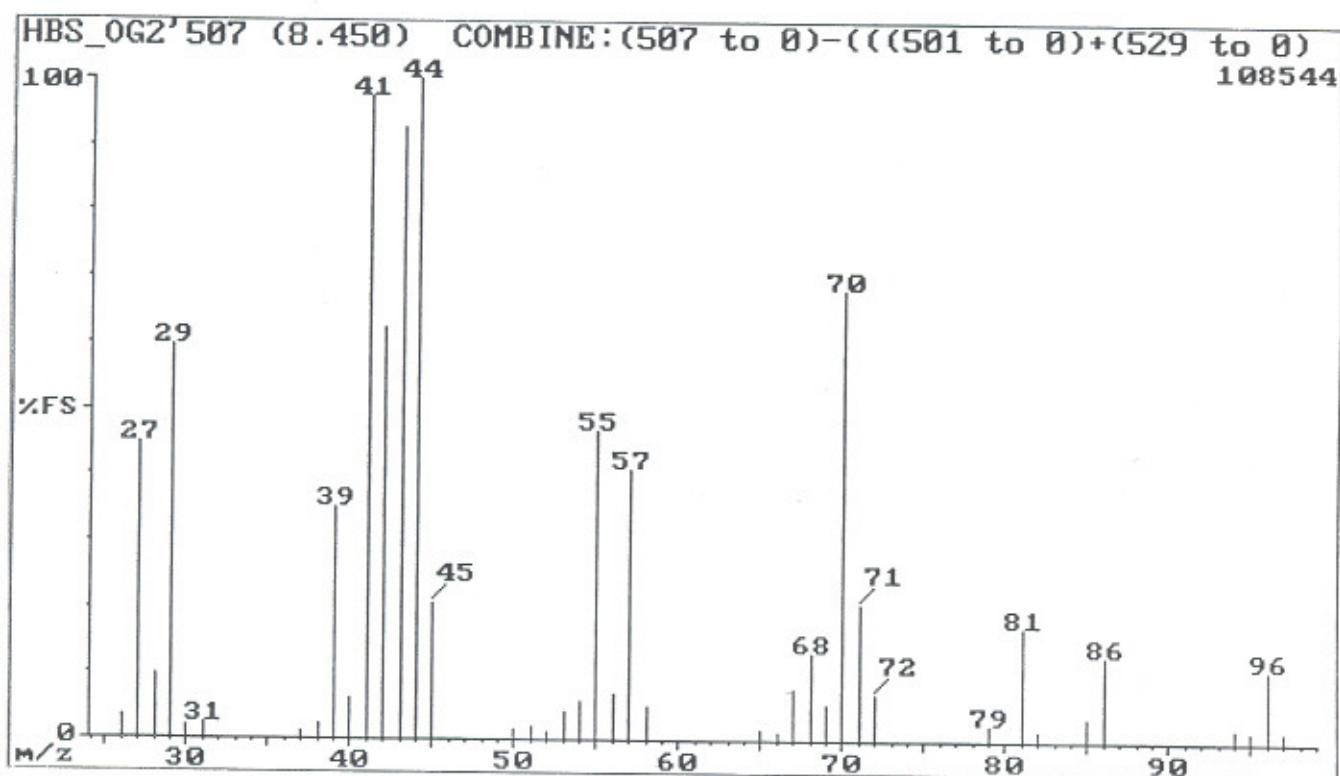


Fig. 2.21: EI-massaspektrum van component U507 (heptanaal).

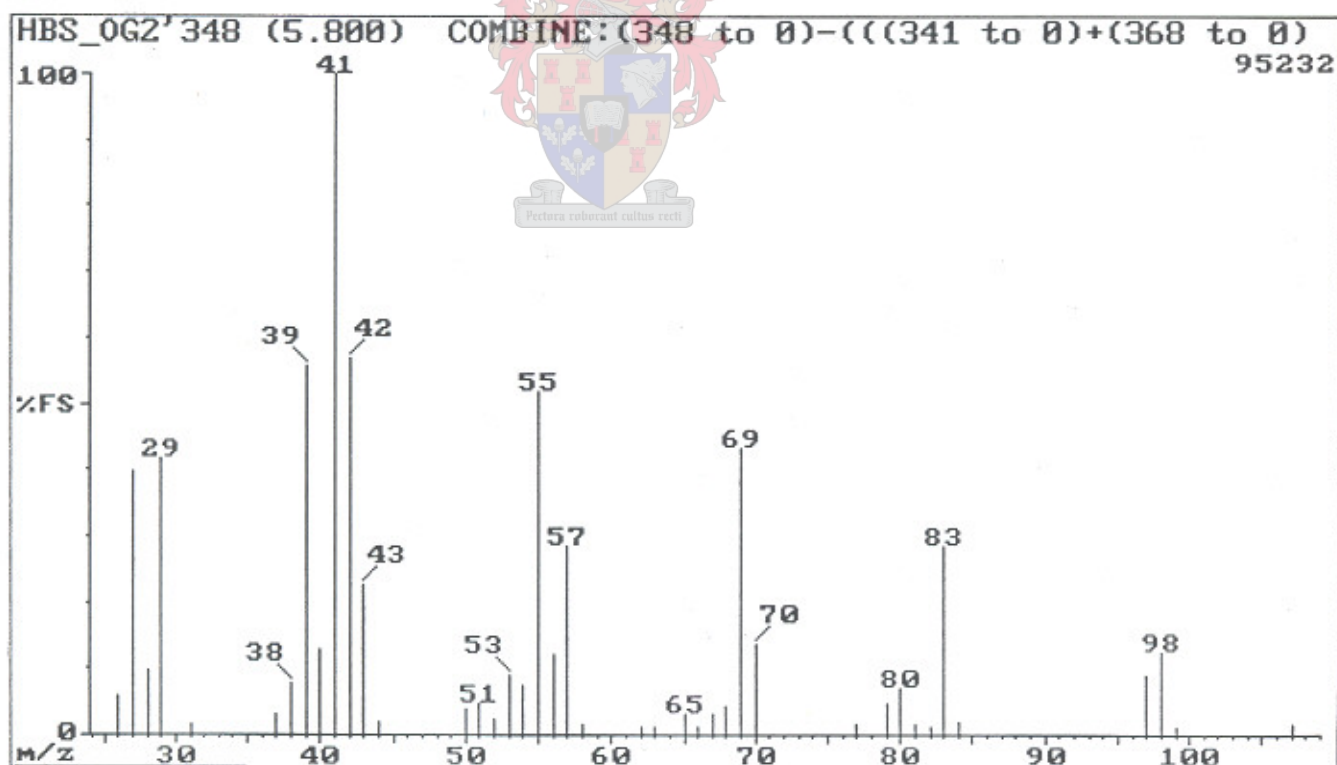


Fig. 2.22: EI-massaspektrum van component U348.

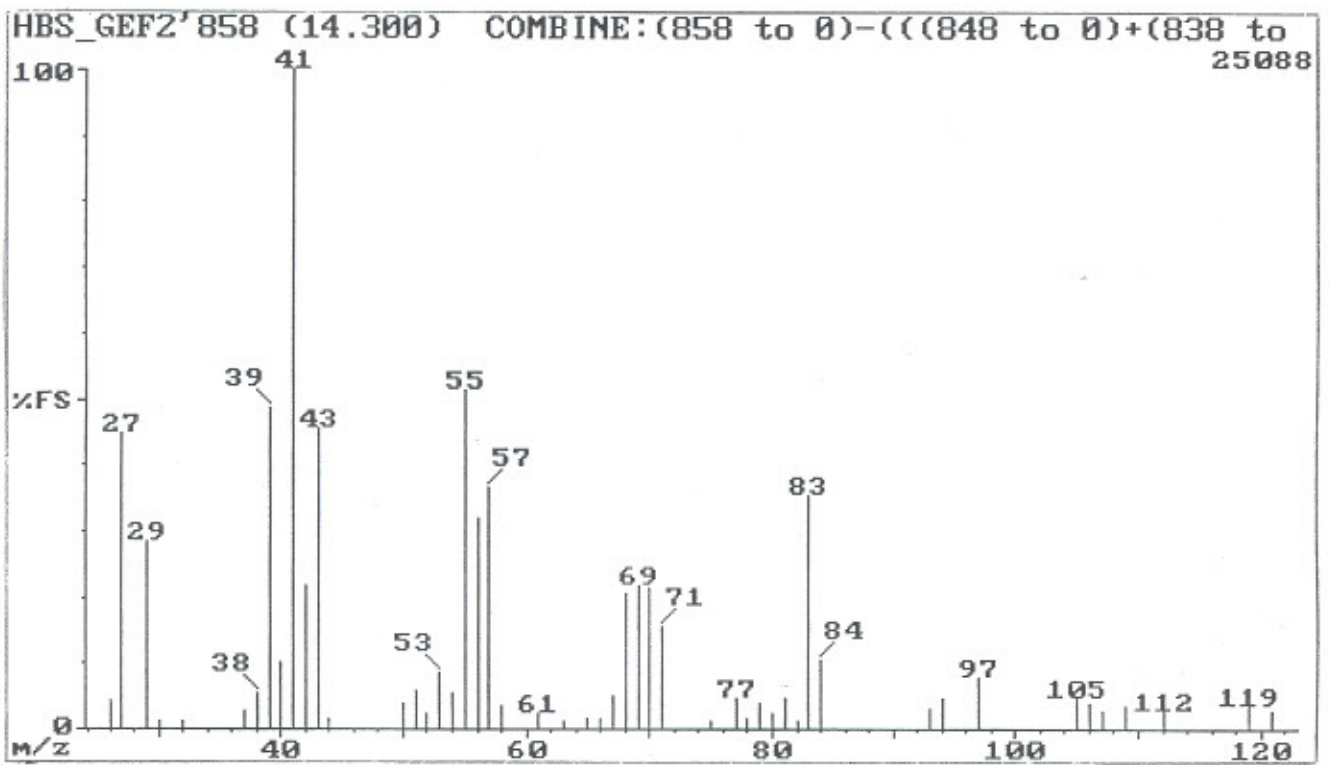


Fig. 2.23: EI-masspektrum van component F858 [(*E*)-2-heptenaal].

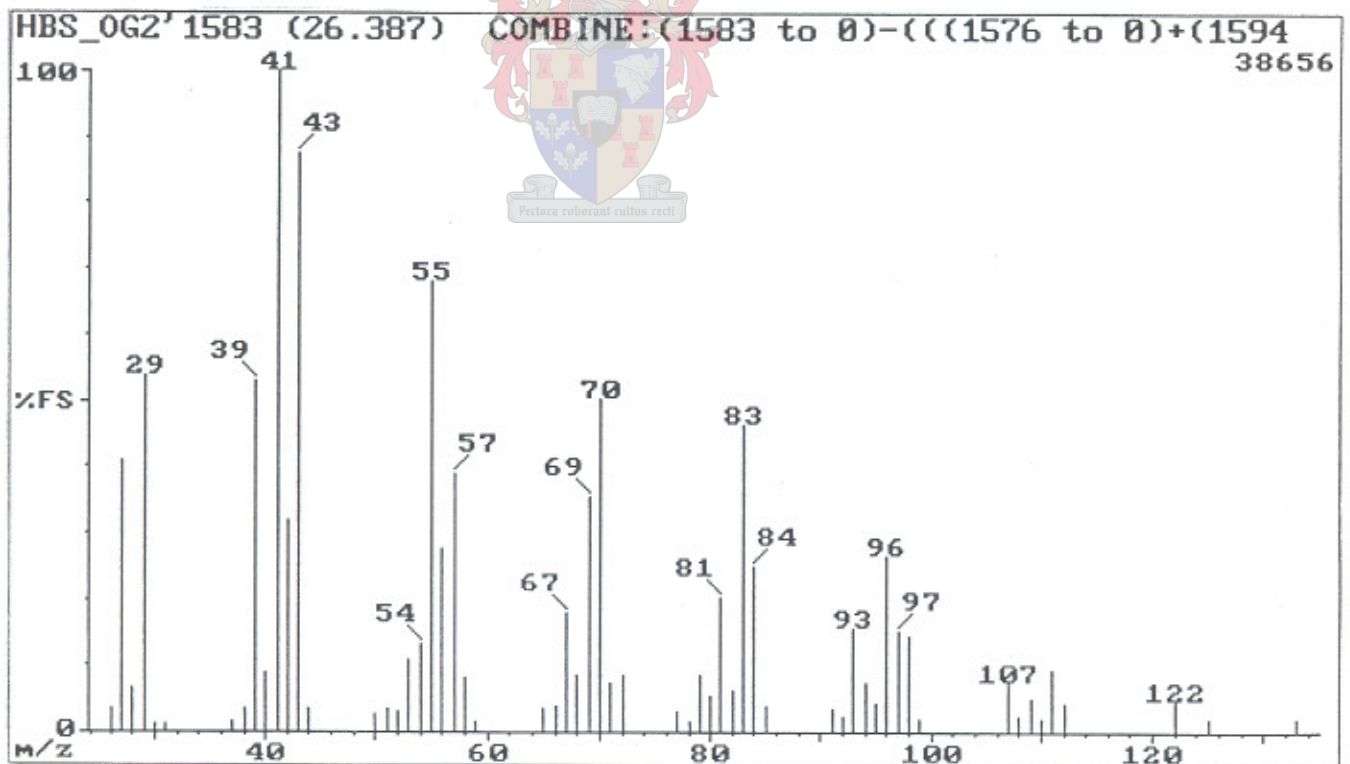


Fig. 2.24: EI-masspektrum van component U1583.

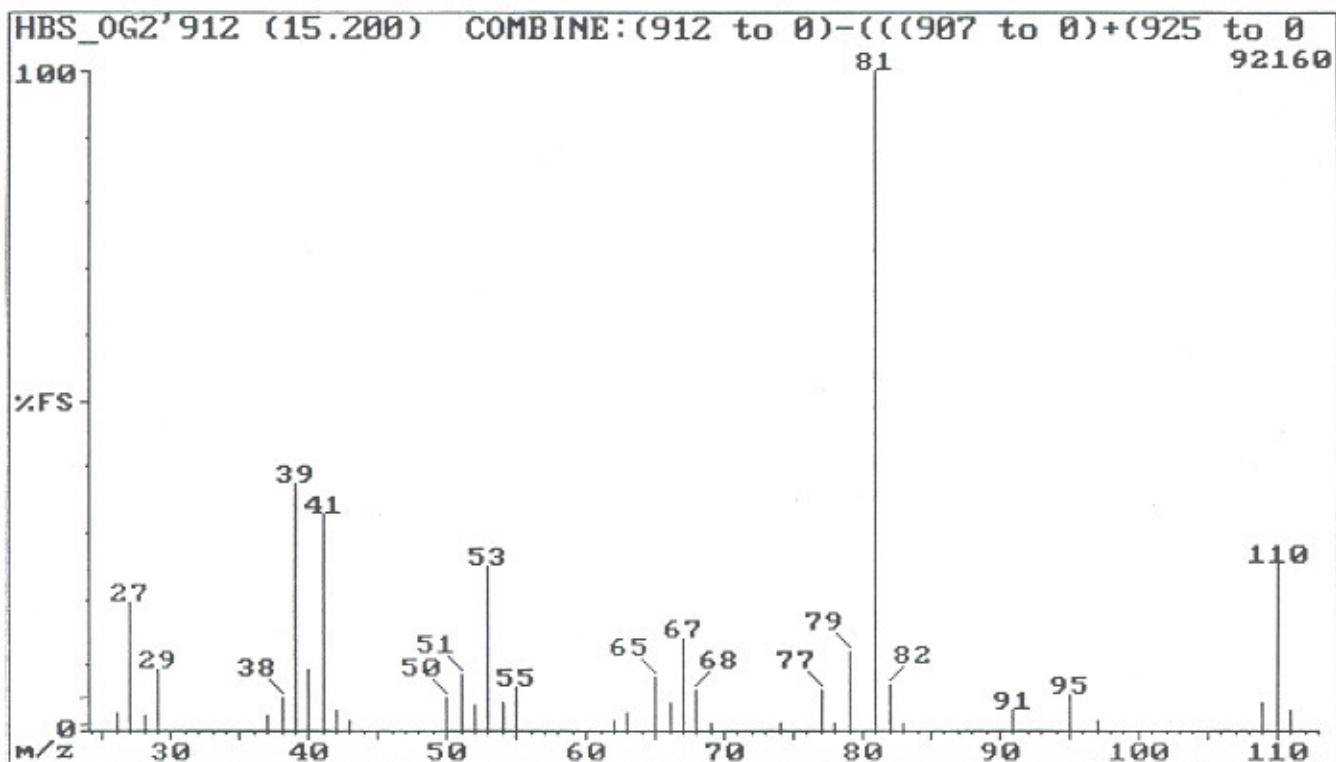


Fig. 2.25: EI-massaspektrum van component U912 [(*E,E*)-2,4-heptadiënaal].

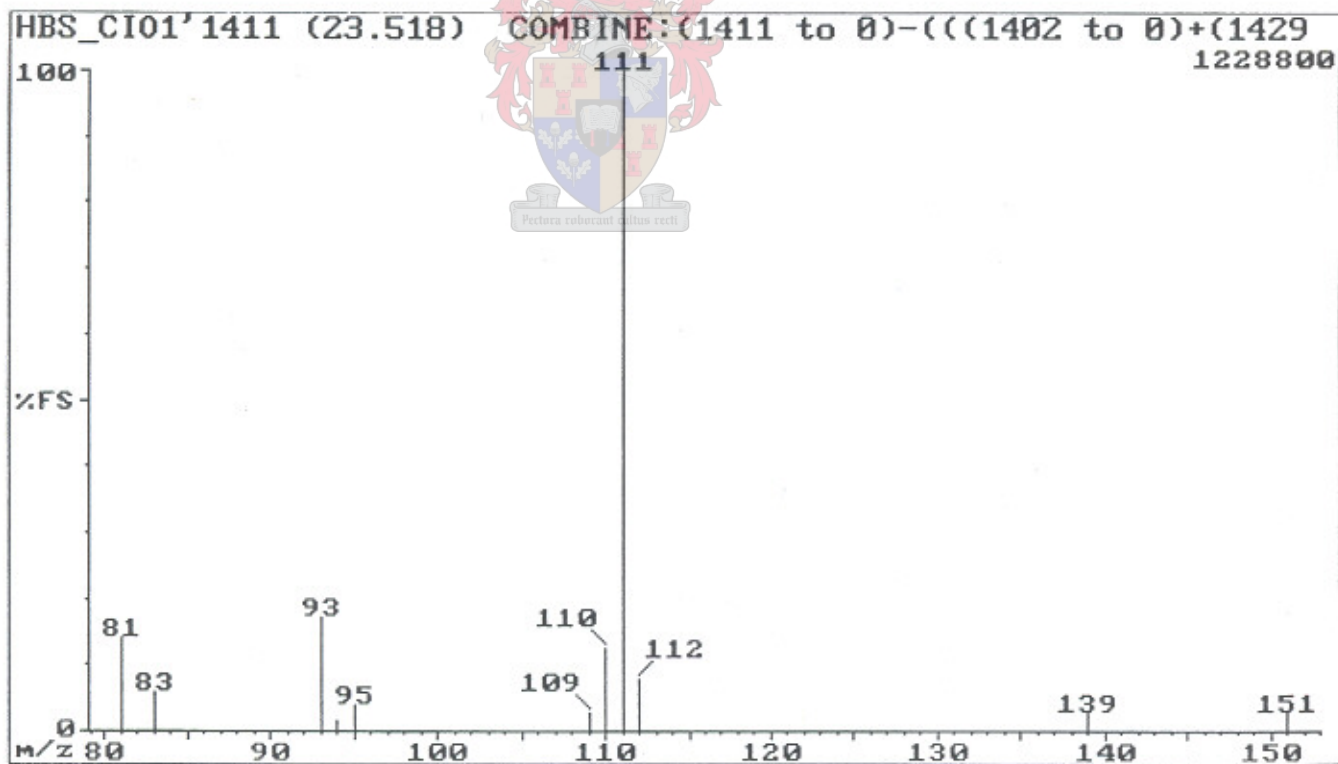


Fig. 2.25a: CI-massaspektrum van component U912 [(*E,E*)-2,4-heptadiënaal].



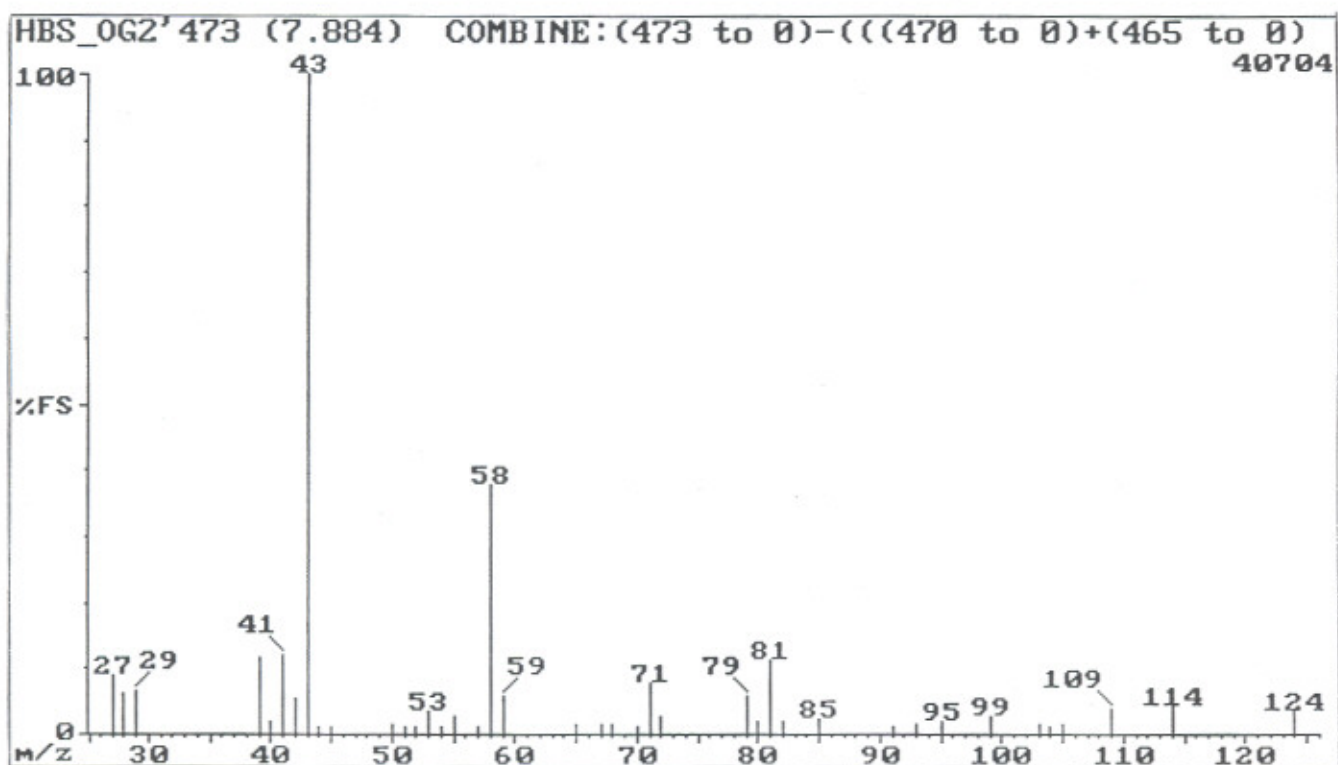


Fig. 2.26: EI-massaspektrum van component U473.

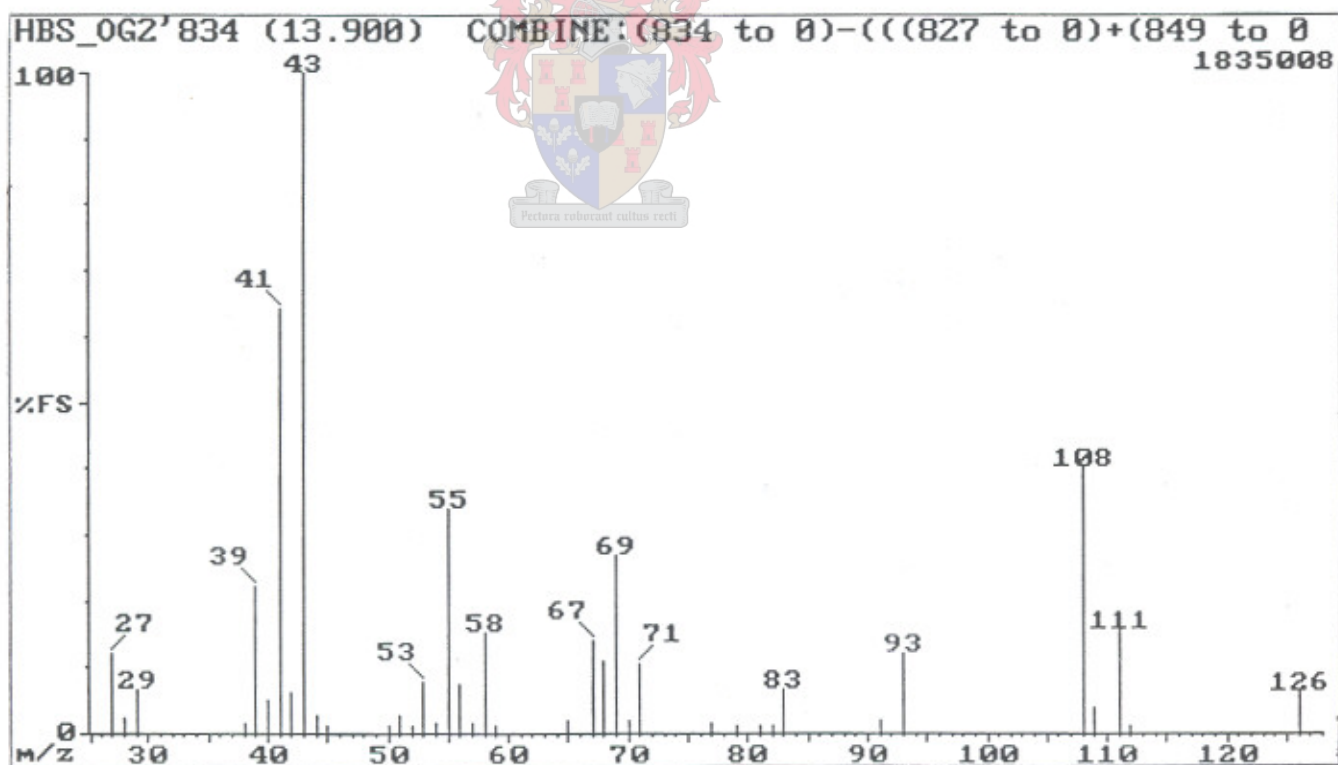


Fig. 2.27: EI-massaspektrum van component U834 (6-metiel-5-hepten-2-oon).

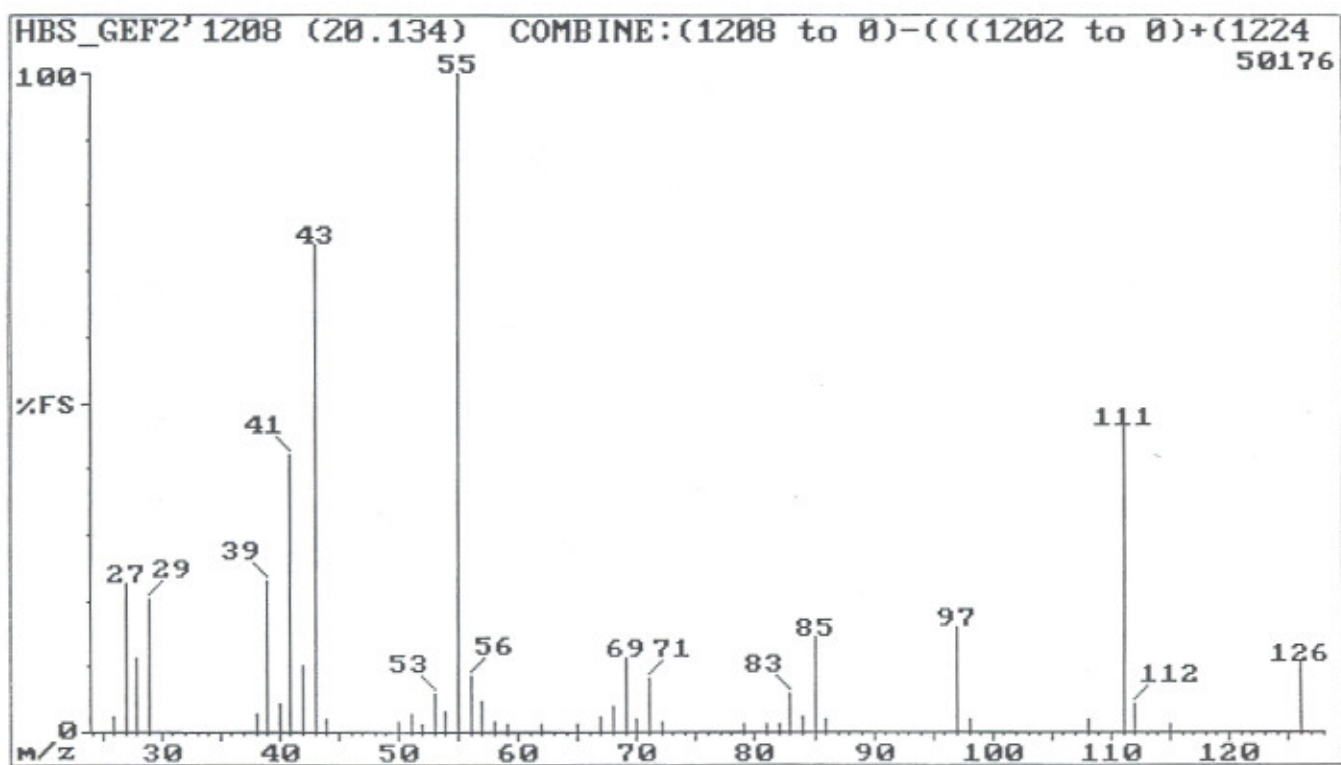


Fig. 2.28: EI-masspektrum van component F1208.

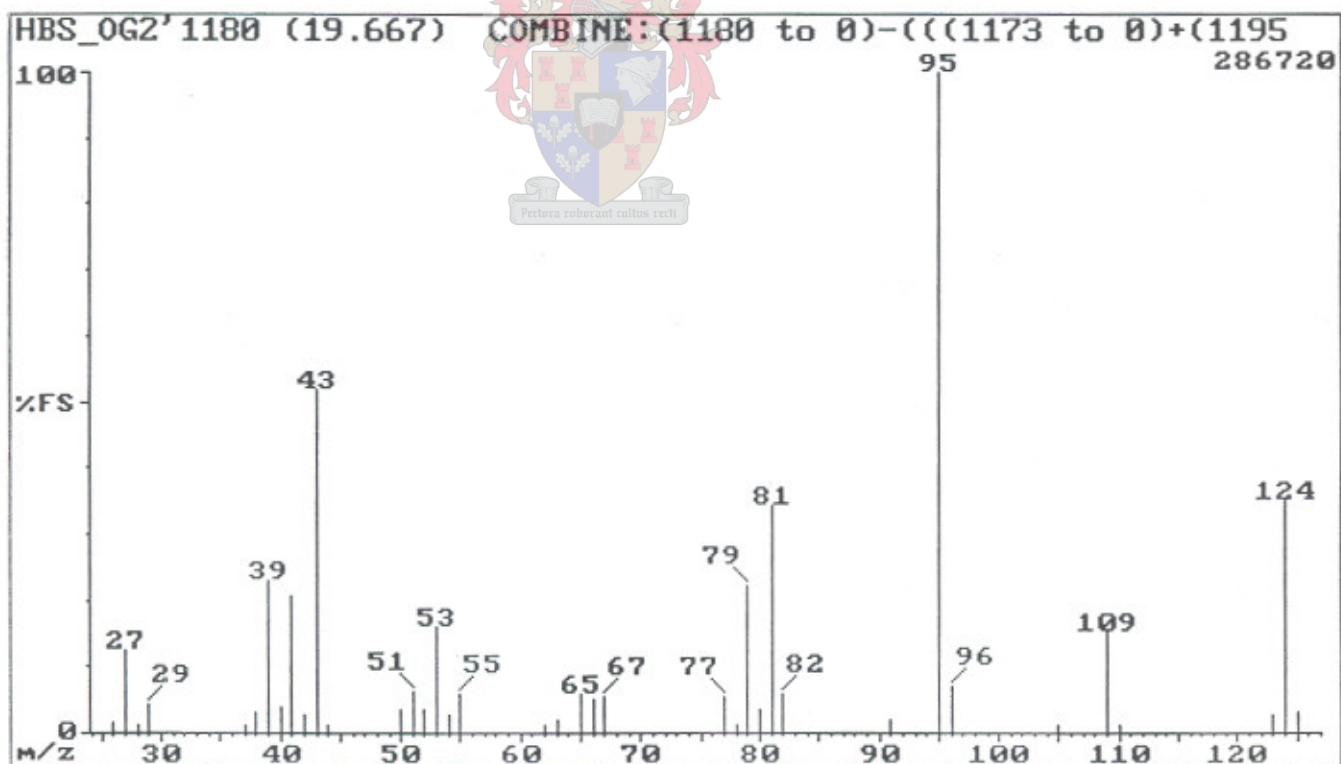


Fig. 2.29: EI-masspektrum van component U1180.

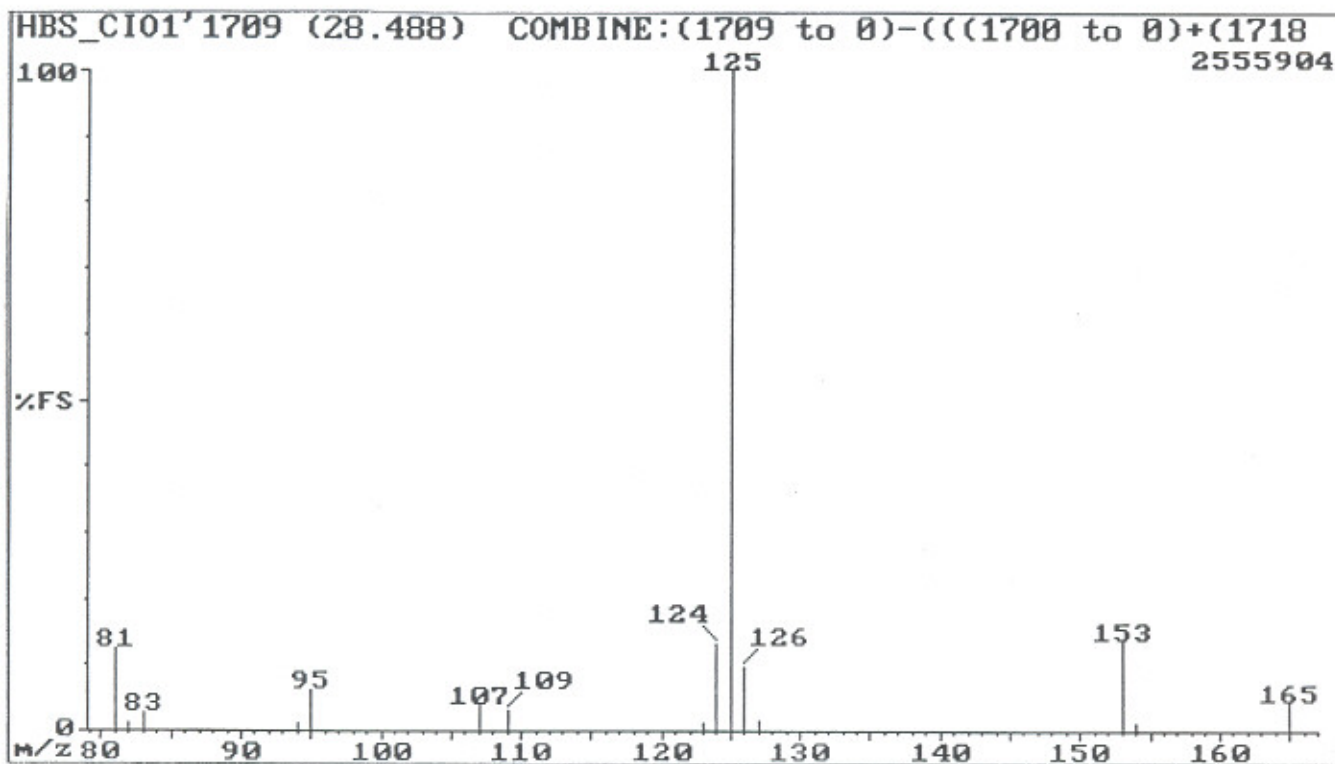


Fig. 2.29a: CI-massaspektrum van component U1180.

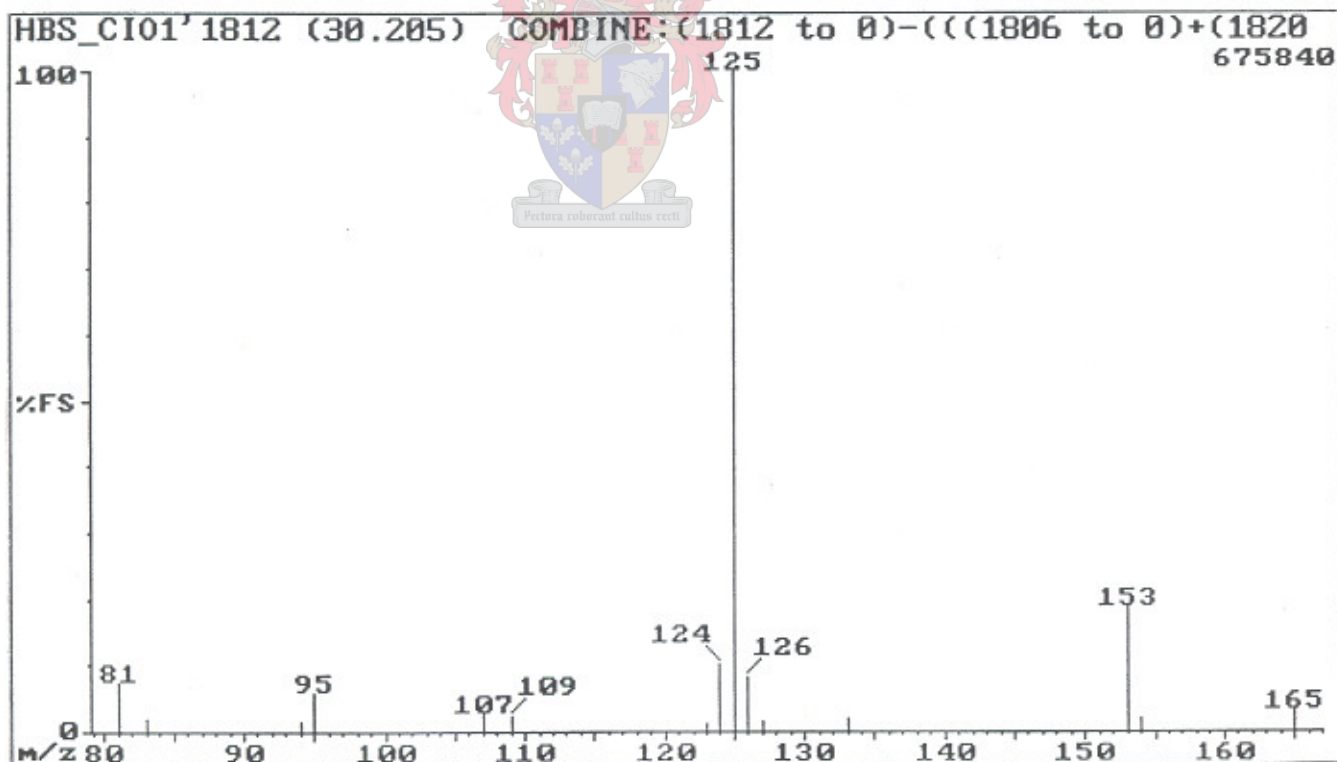


Fig. 2.29b: CI-massaspektrum van component U1278.

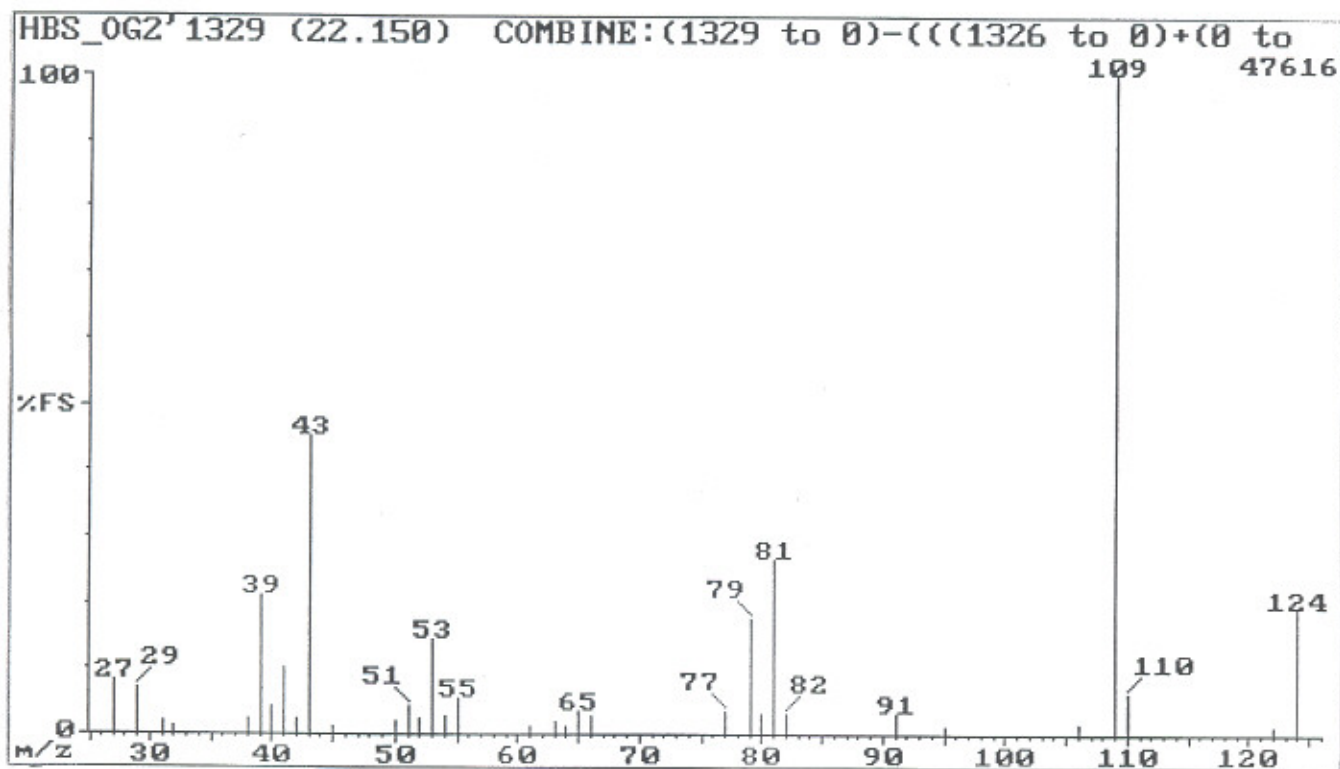


Fig. 2.30: EI-massaspektrum van component U1329.

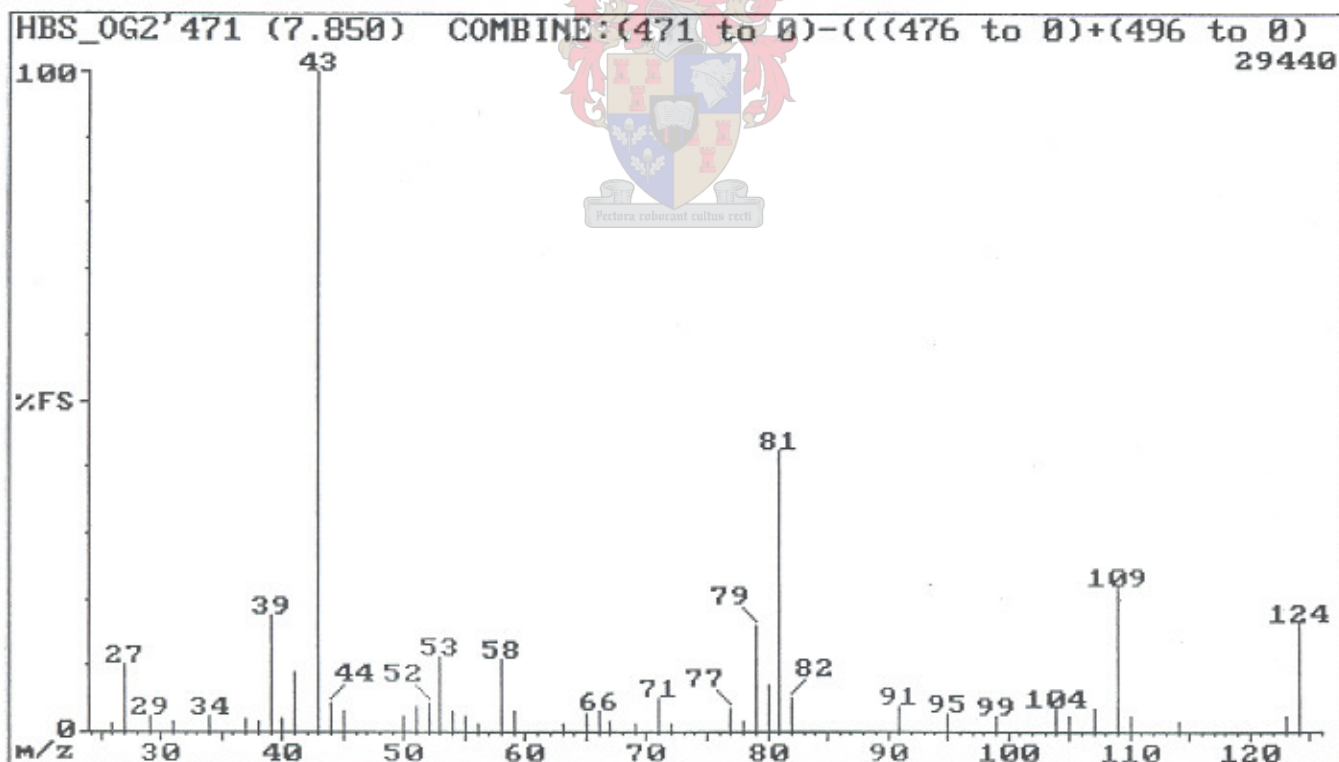


Fig. 2.31: EI-massaspektrum van component U471.

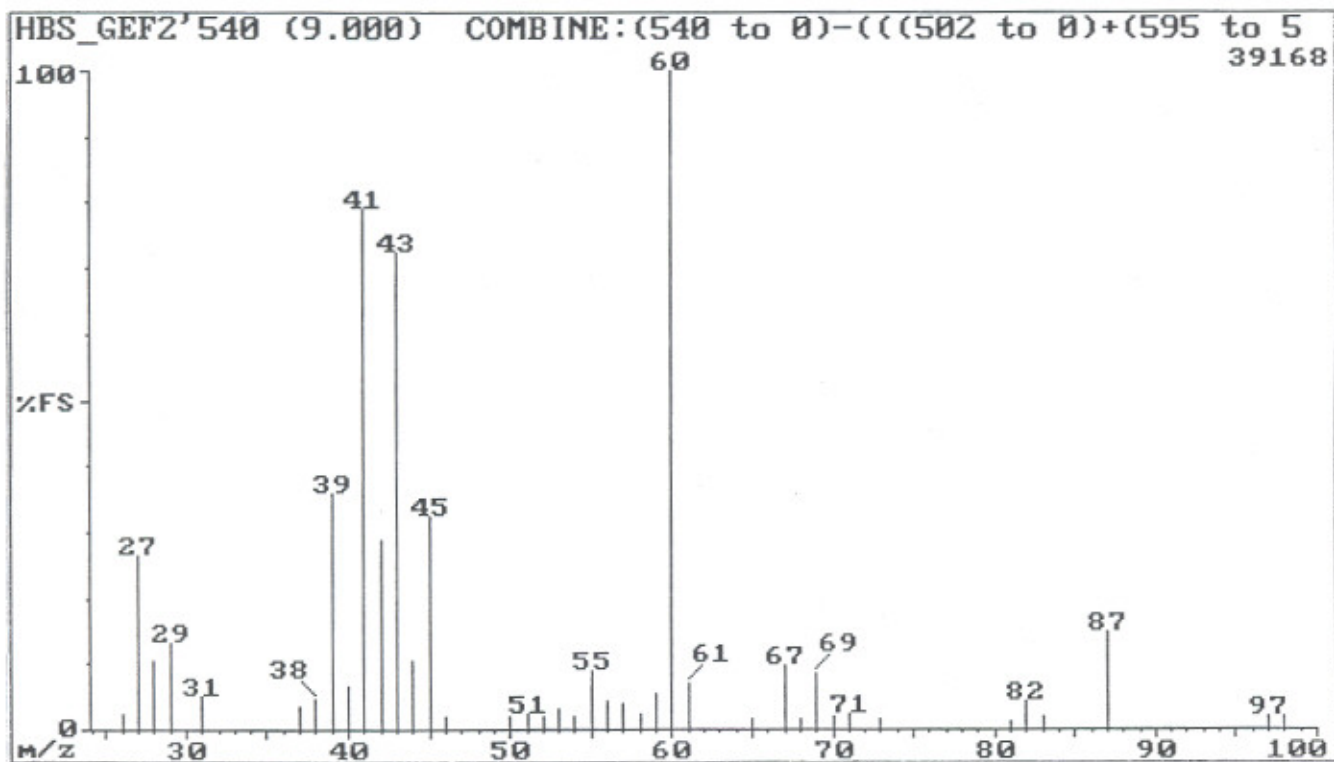


Fig. 2.32: EI-massaspektrum van component F540 (3-metielbutanoësuur).

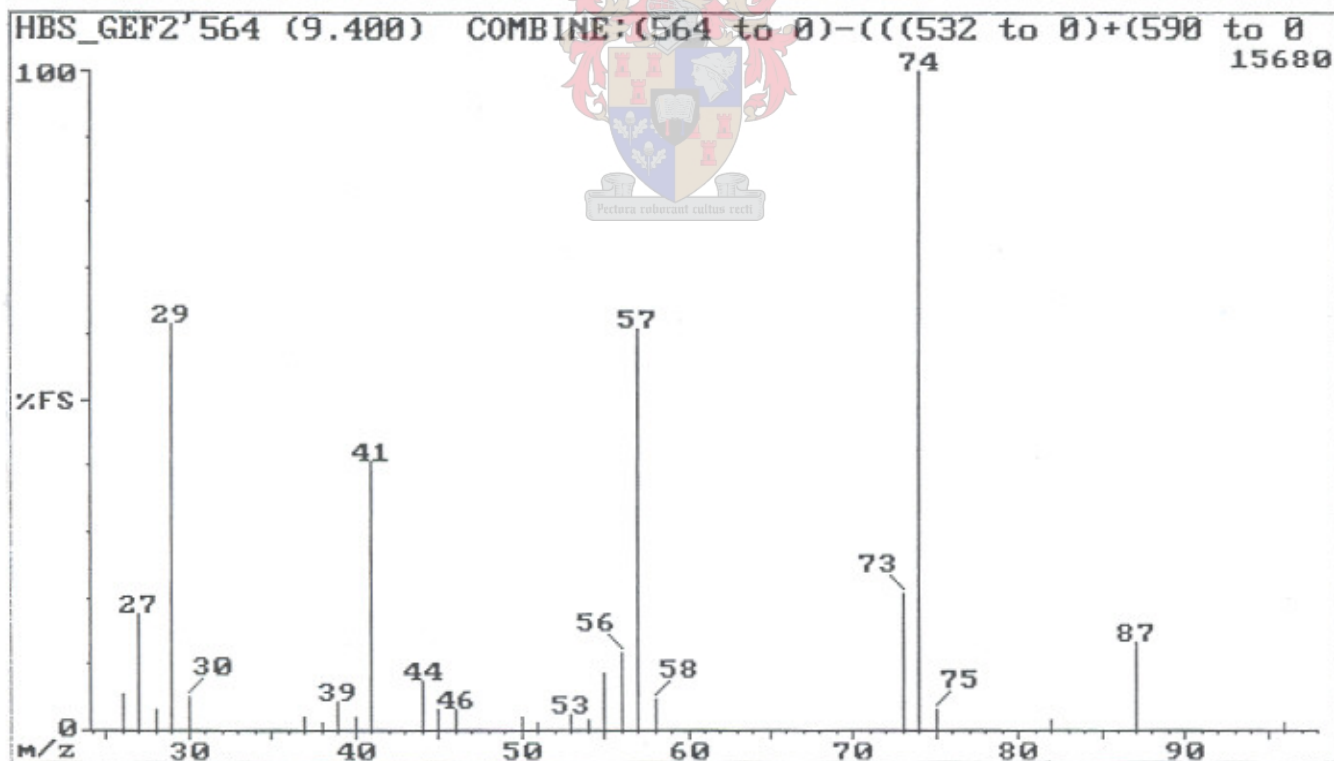


Fig. 2.33: EI-massaspektrum van component F564 (2-metielbutanoësuur).



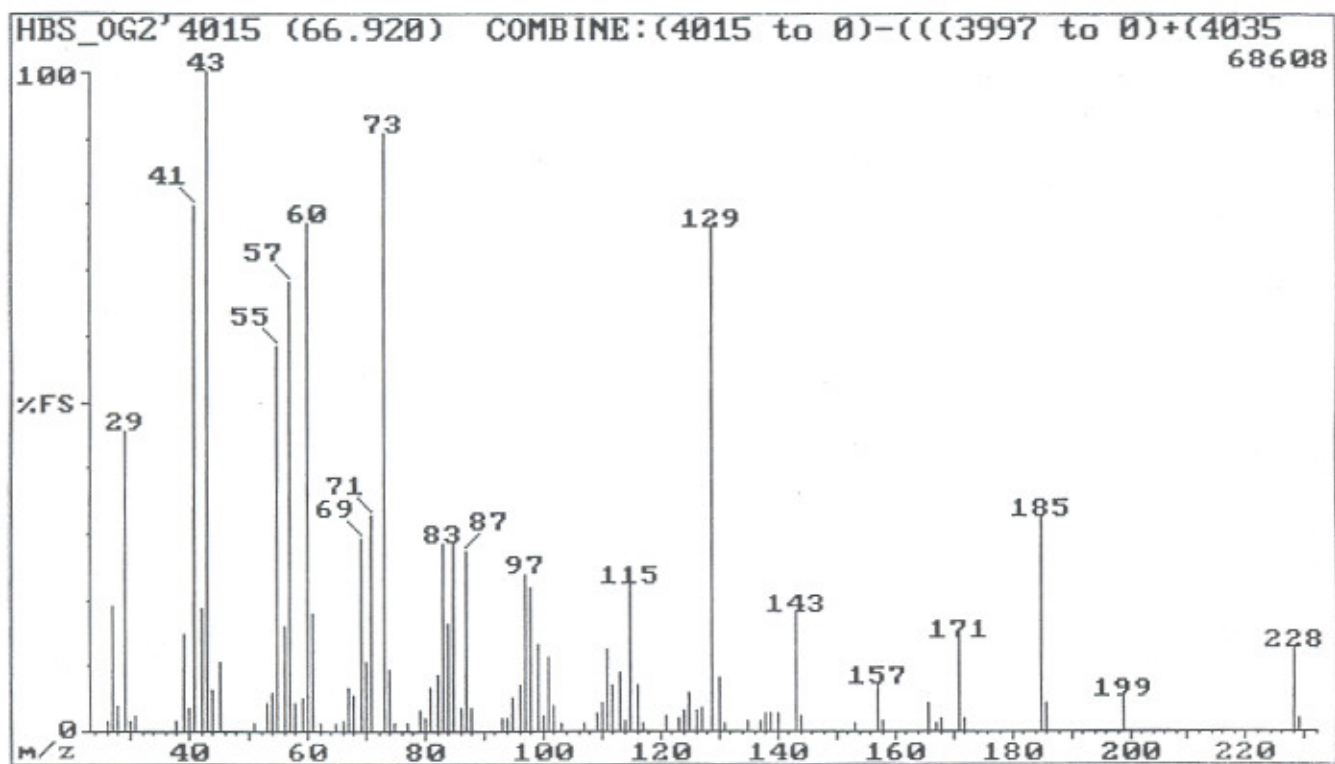


Fig. 2.34: EI-massaspektrum van component U4015 (tetradekanoësuur).

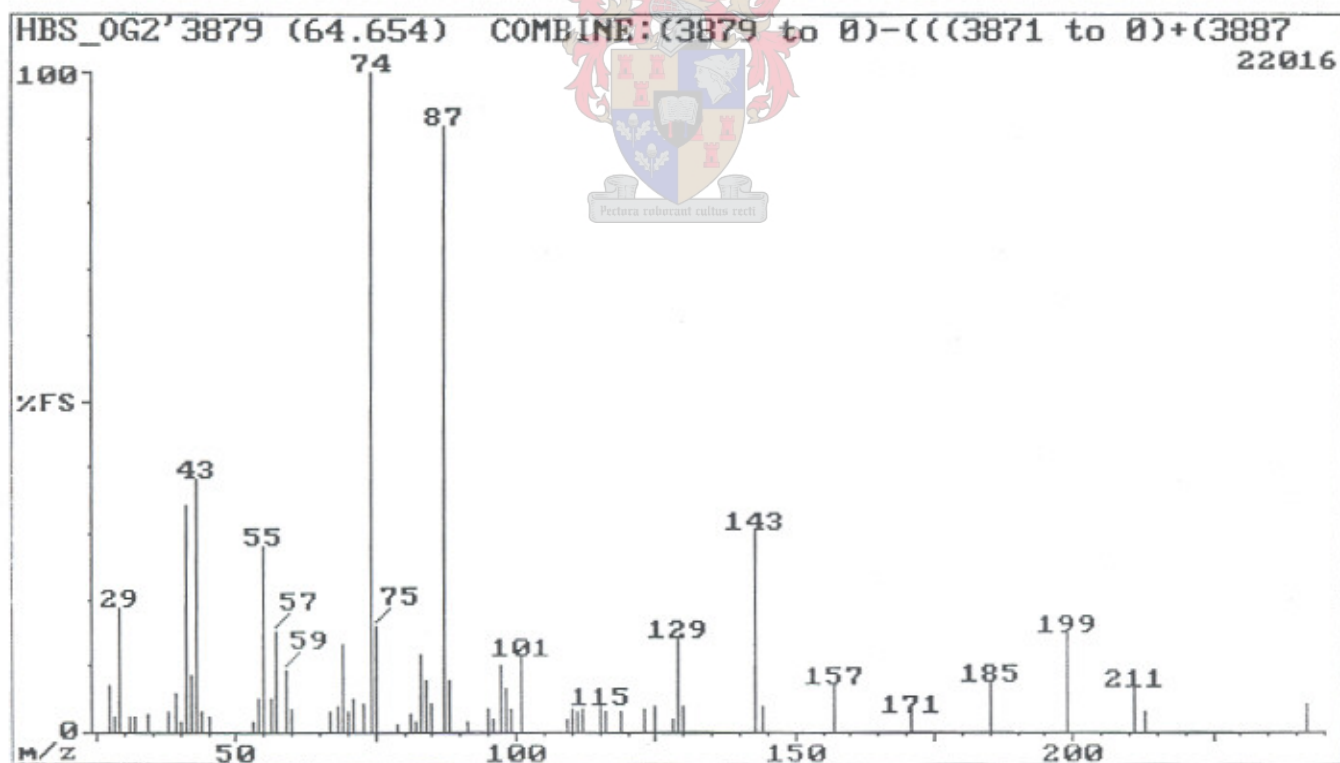


Fig. 2.35: EI-massaspektrum van component U3879.

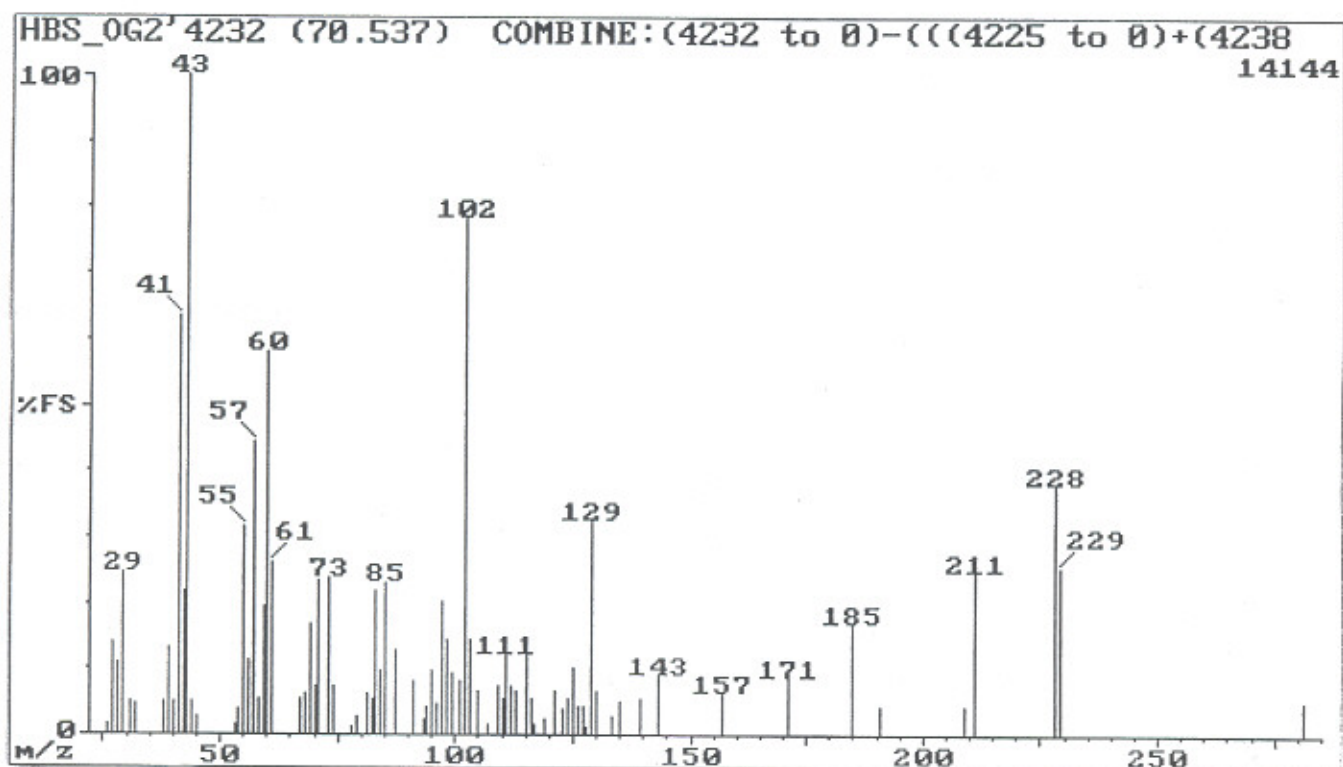


Fig. 2.36: EI-masspektrum van component U4232.

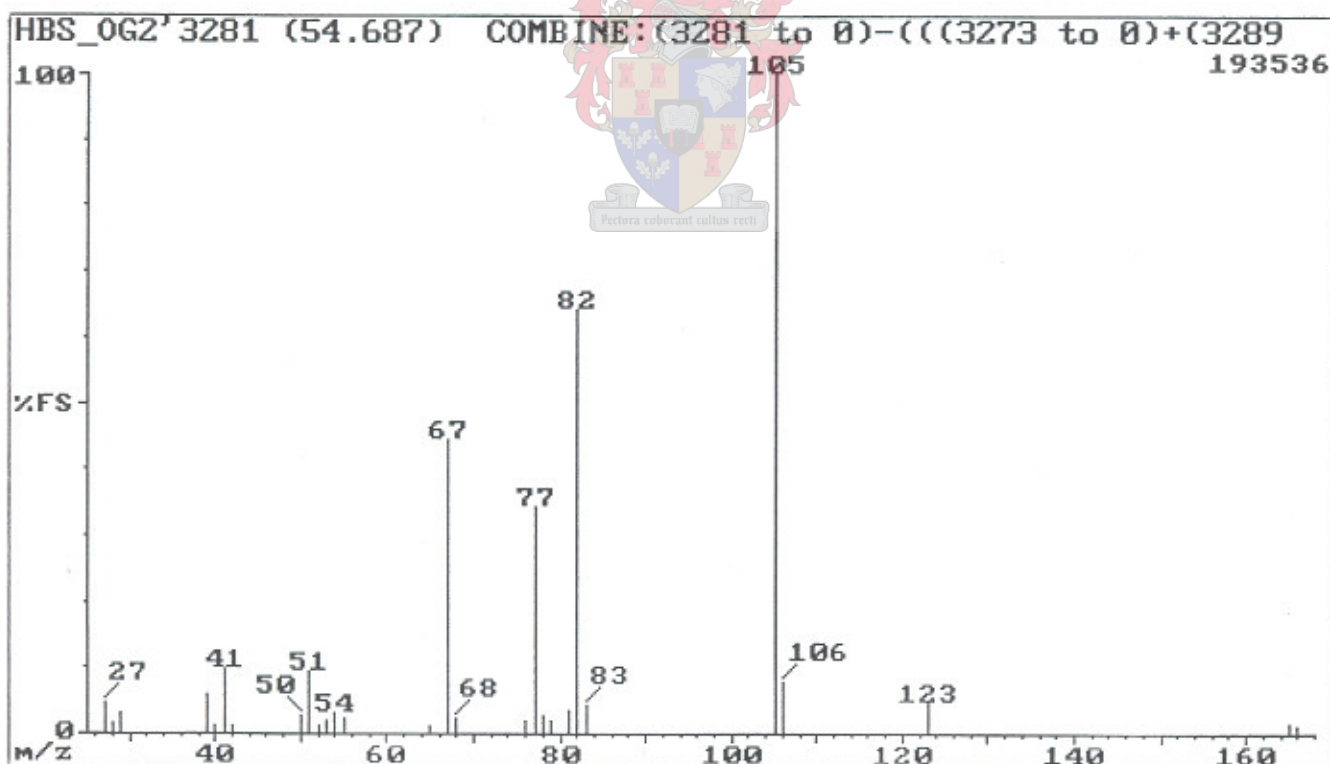


Fig. 2.37: EI-masspektrum van component U3281 [(Z)-3-heksenielbensoaat].

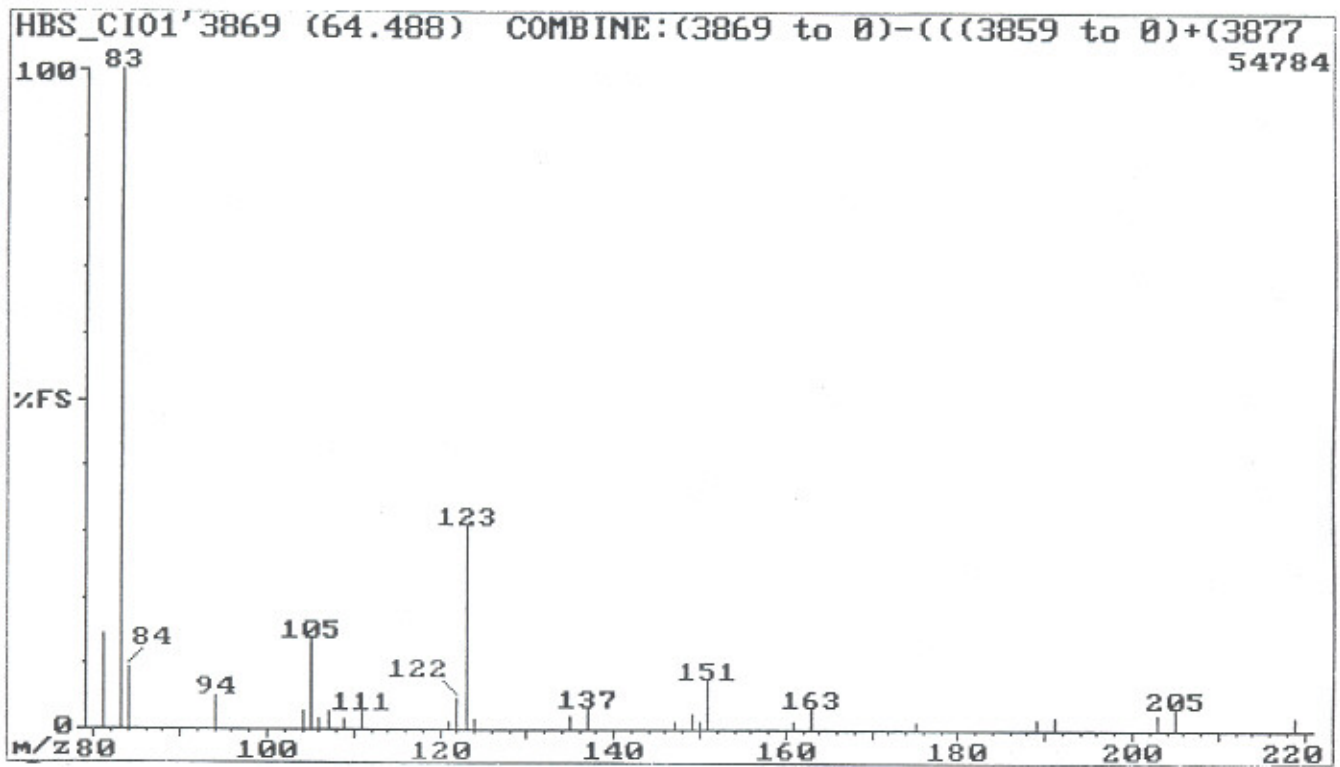


Fig. 2.37a: CI-masspektrum van component U3281 [(Z)-3-hexenyl benzoaat].

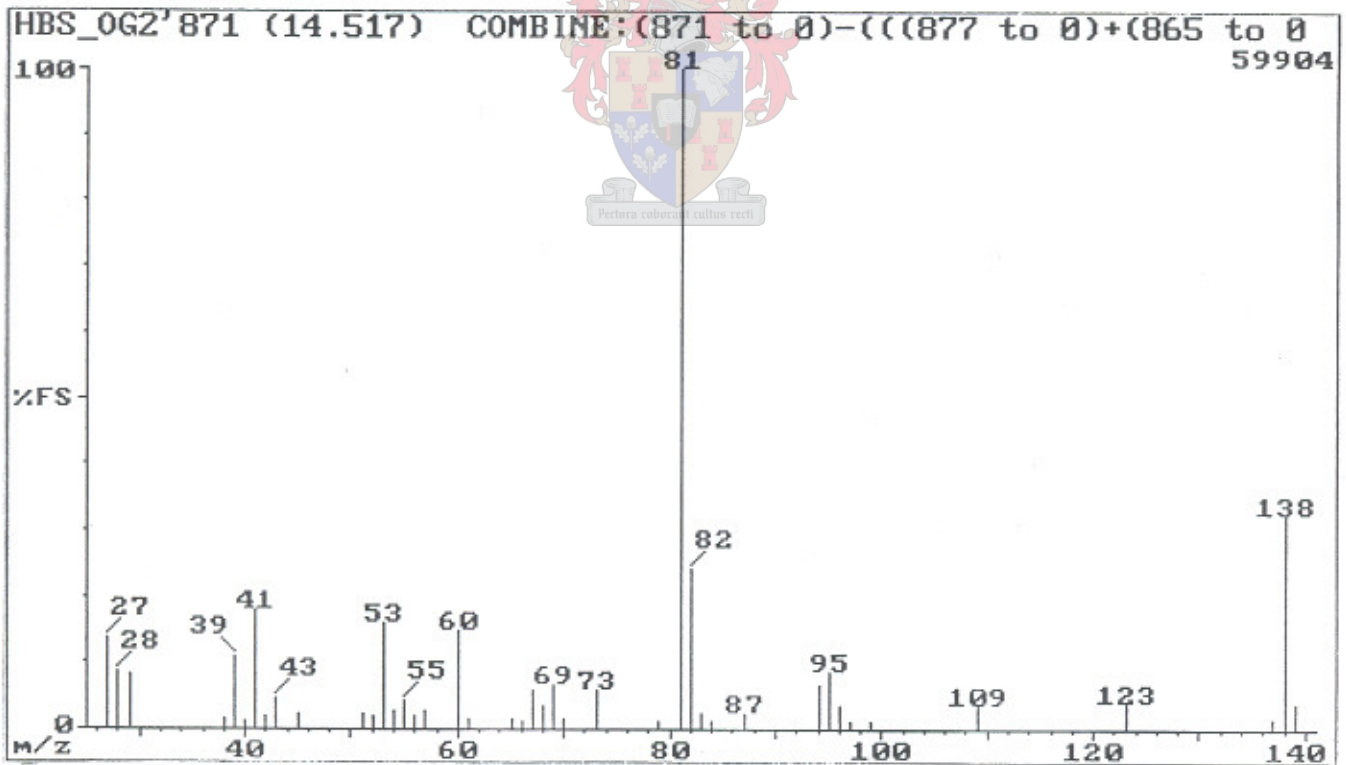


Fig. 2.38: EI-masspektrum van component U871 (2-pentylfuraan).



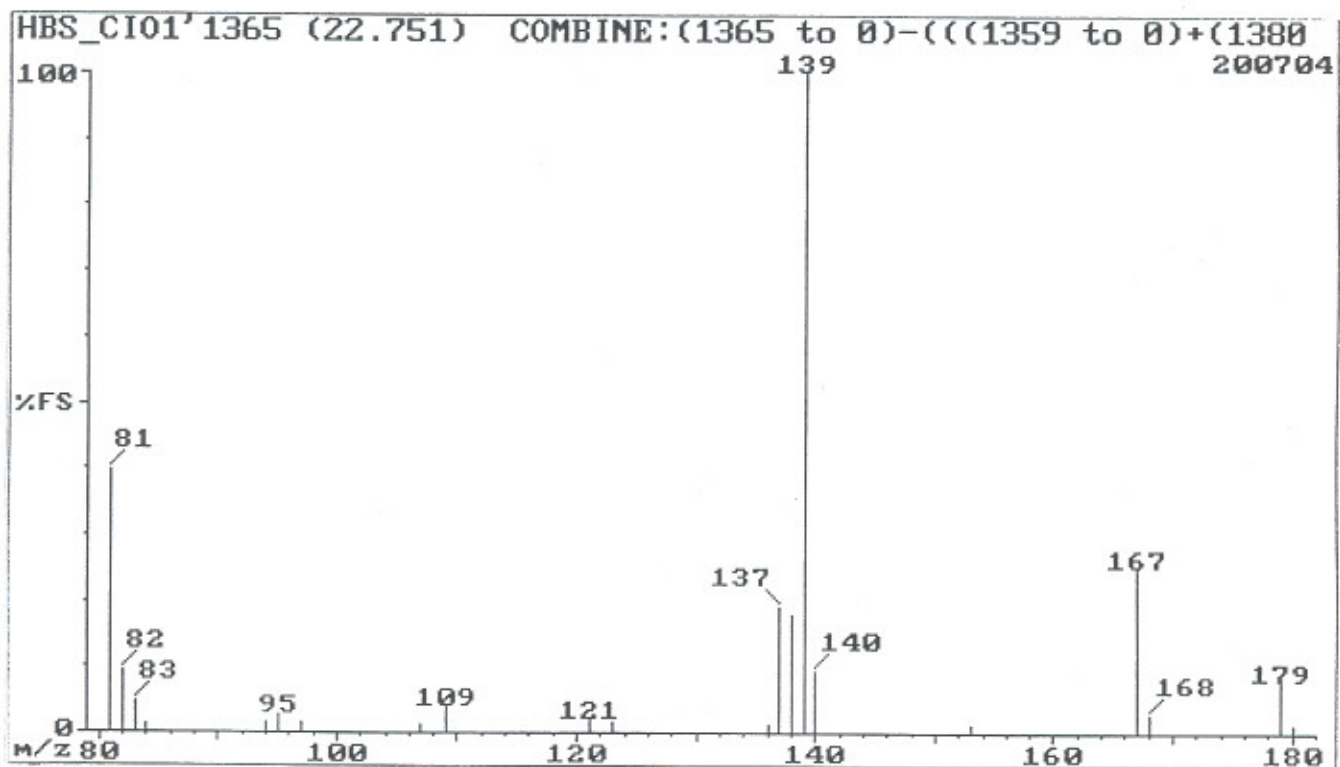


Fig. 2.38a: CI-masspektrum van component U871 (2-pentylfuraan).

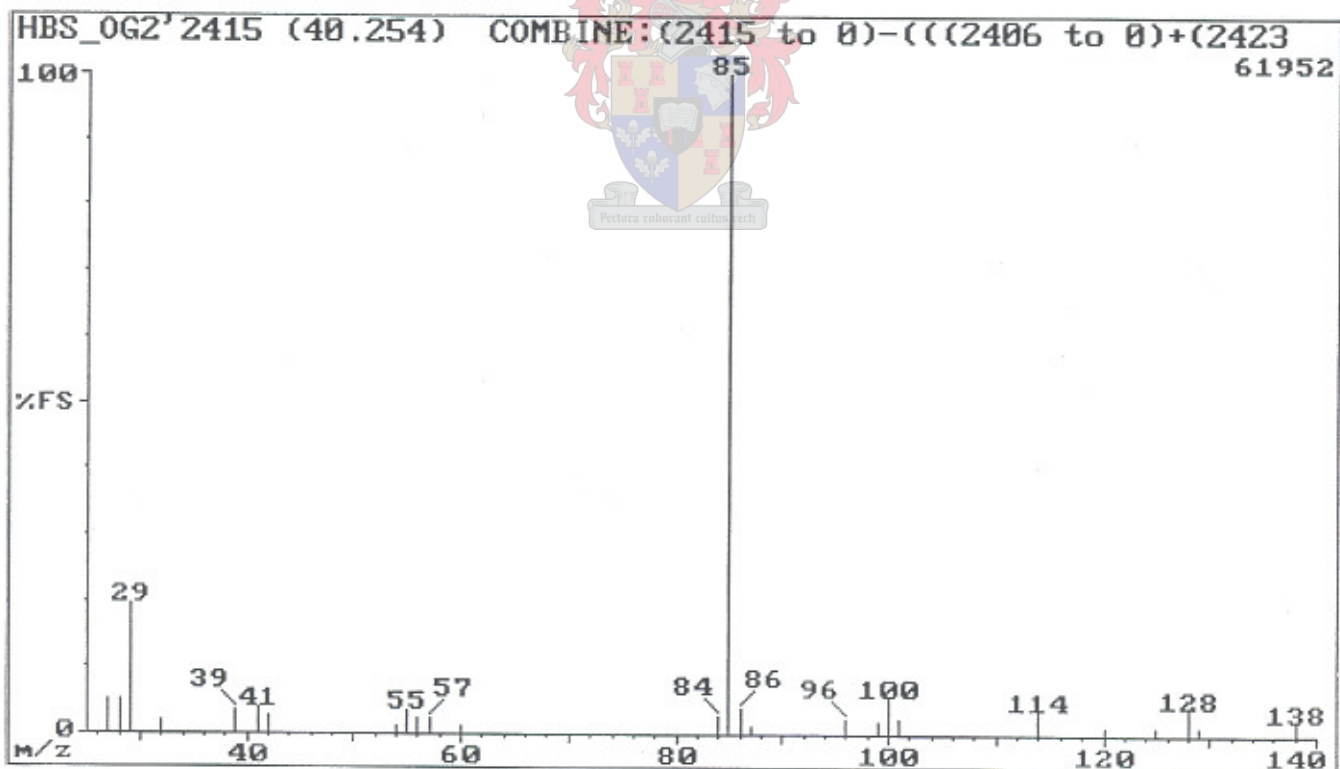


Fig. 2.39: EI-masspektrum van component U2415.

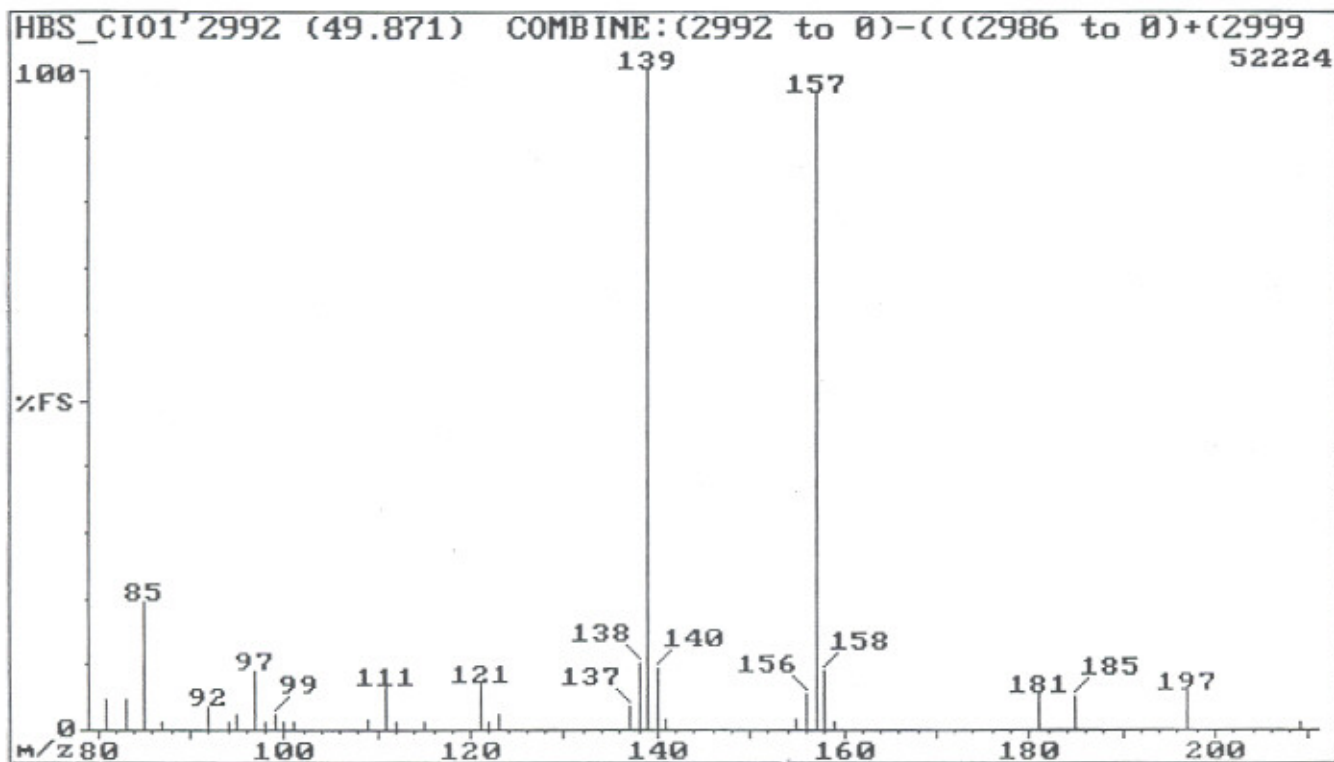


Fig. 2.39a: CI-masspektrum van component U2415.

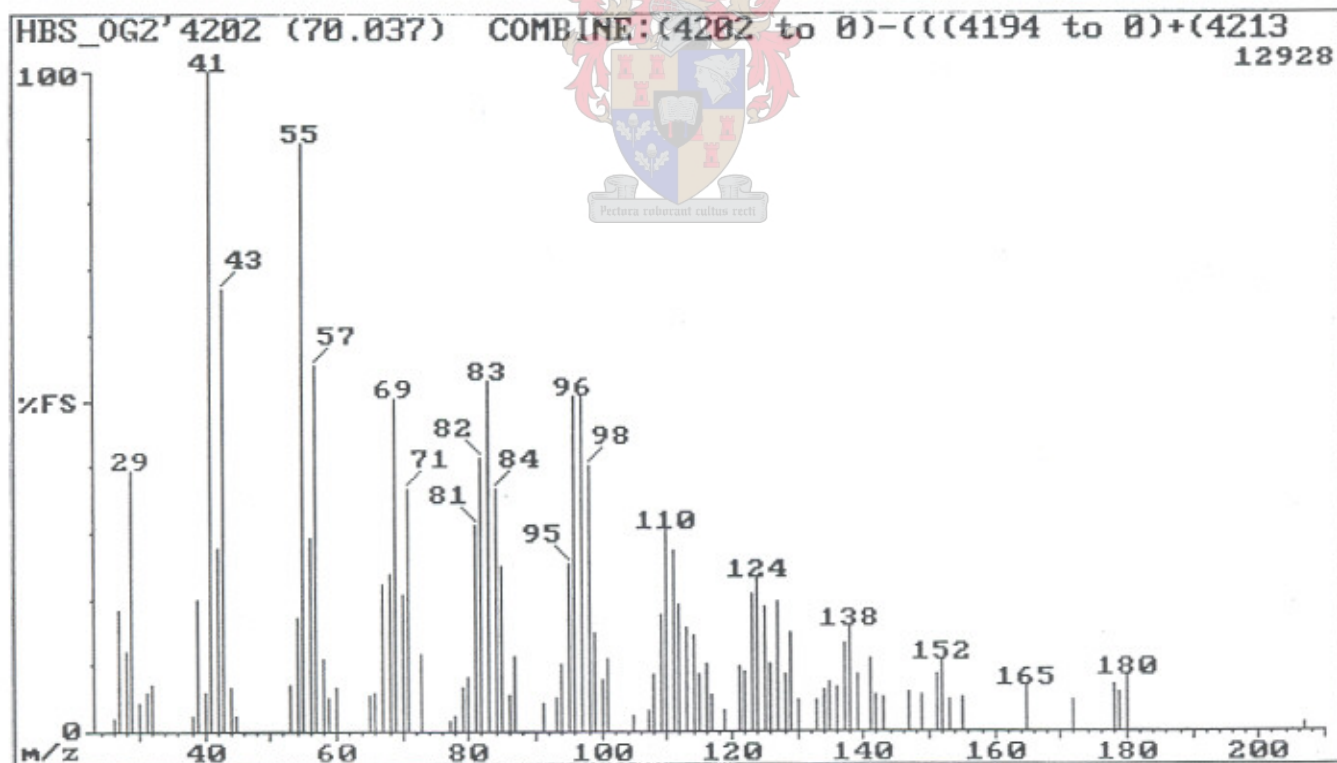


Fig. 2.40: EI-masspektrum van component U4202.

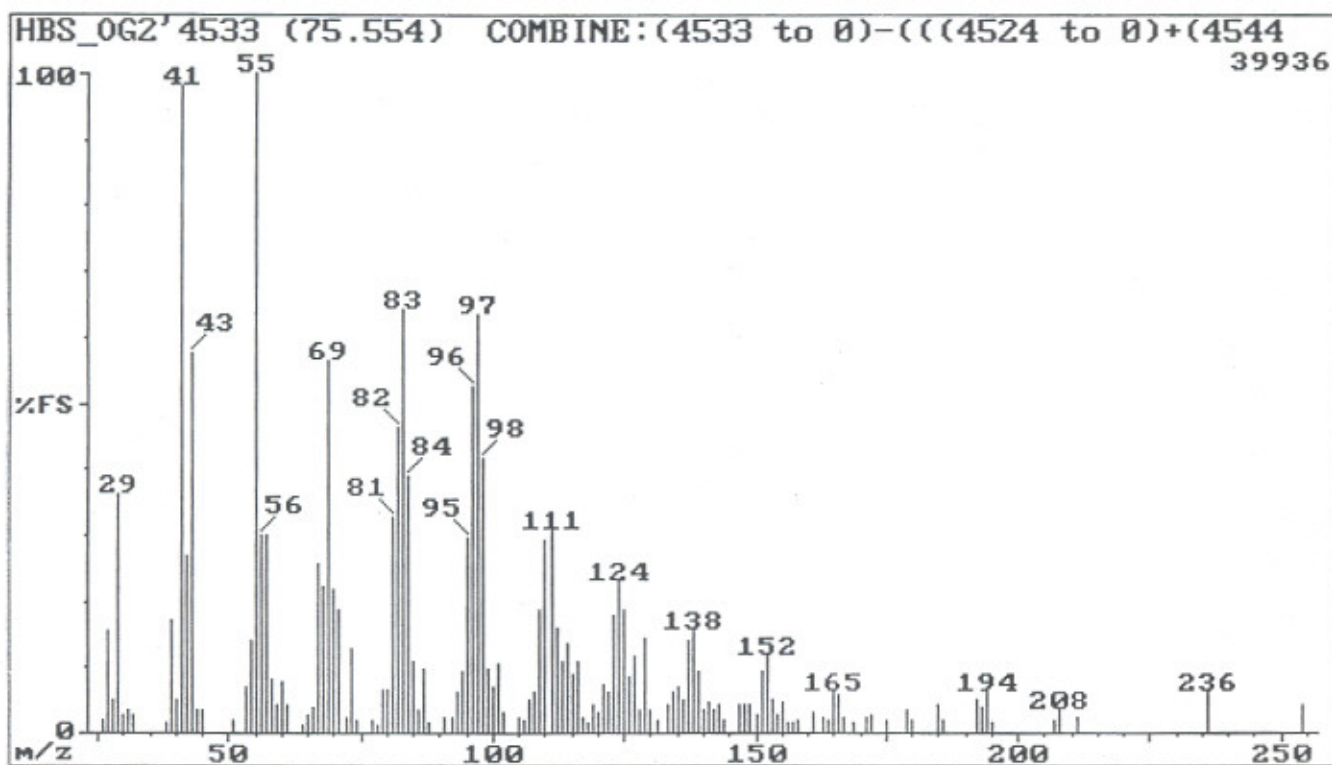


Fig. 2.41: EI-massaspektrum van component U4533 (16-heksadekanolied).

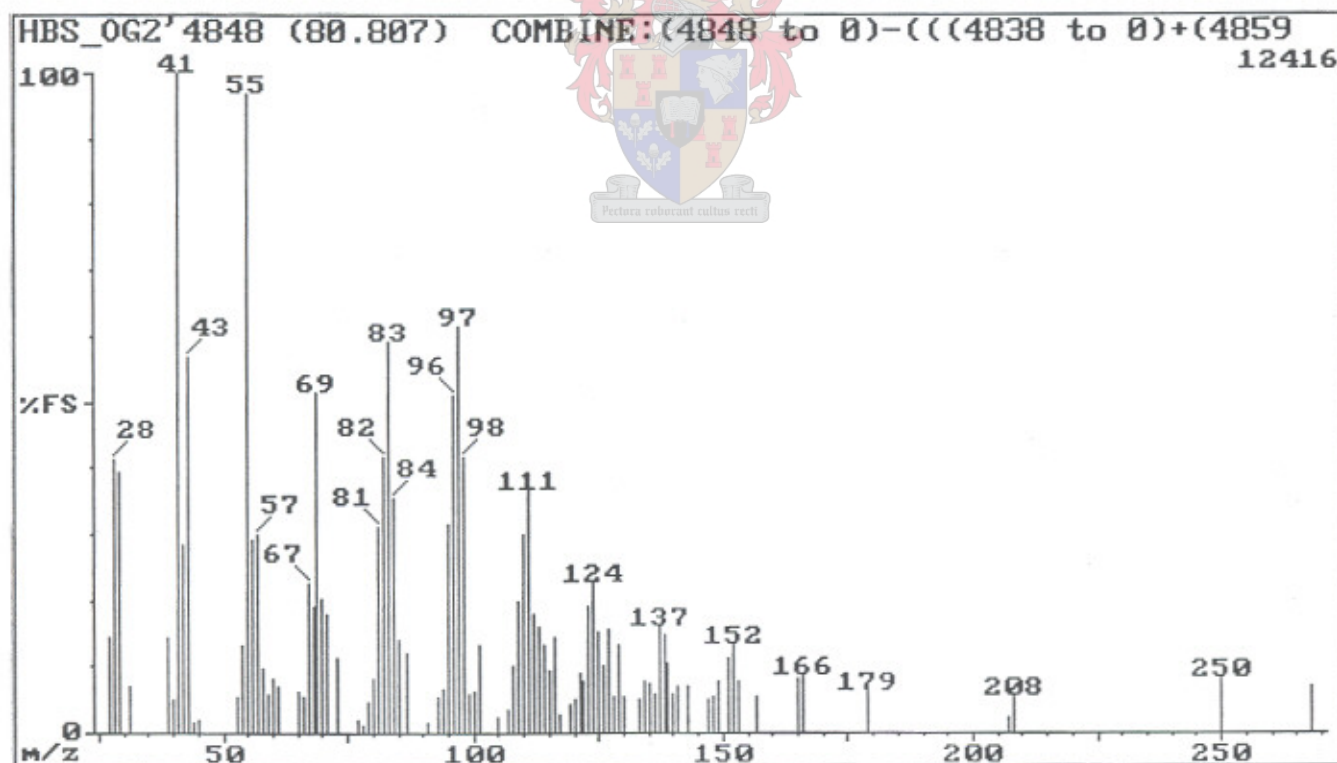


Fig. 2.42: EI-massaspektrum van component U4848.

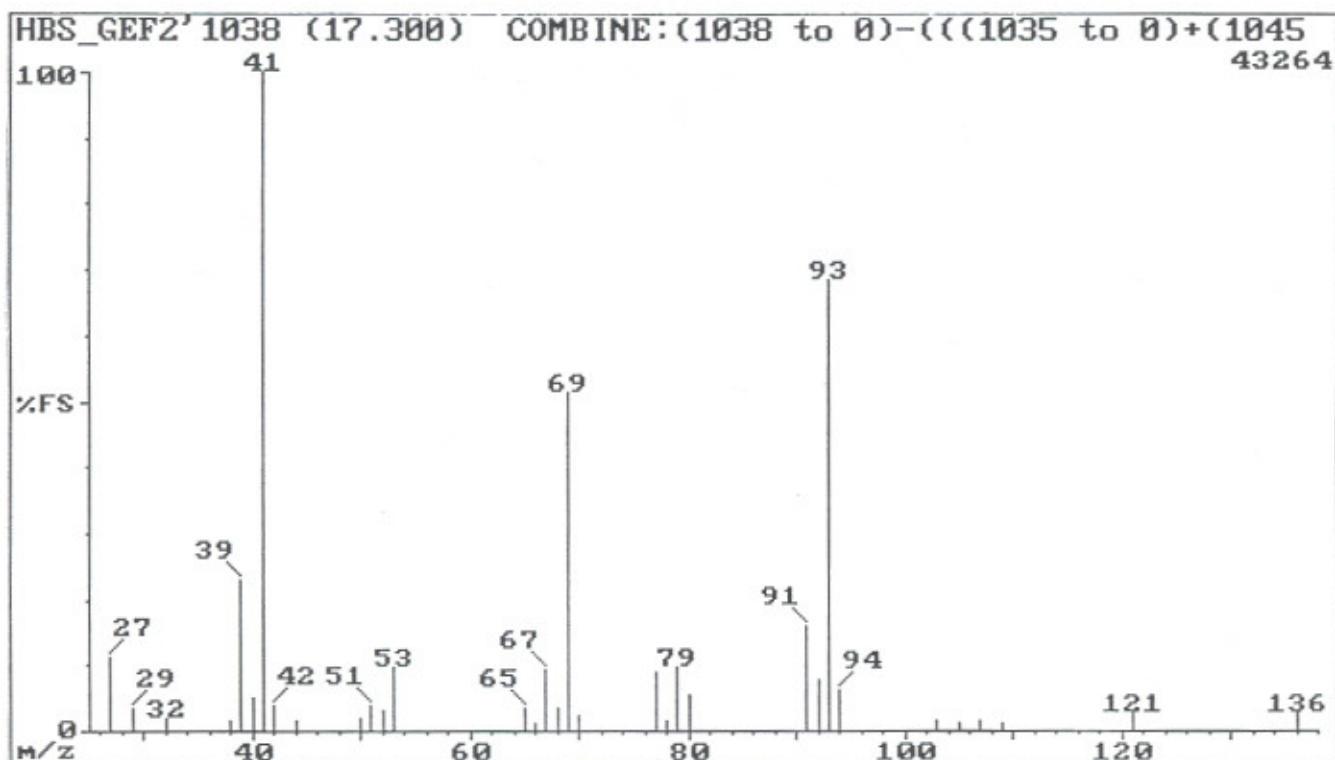


Fig. 2.43: EI-massaspektrum van component F1038.

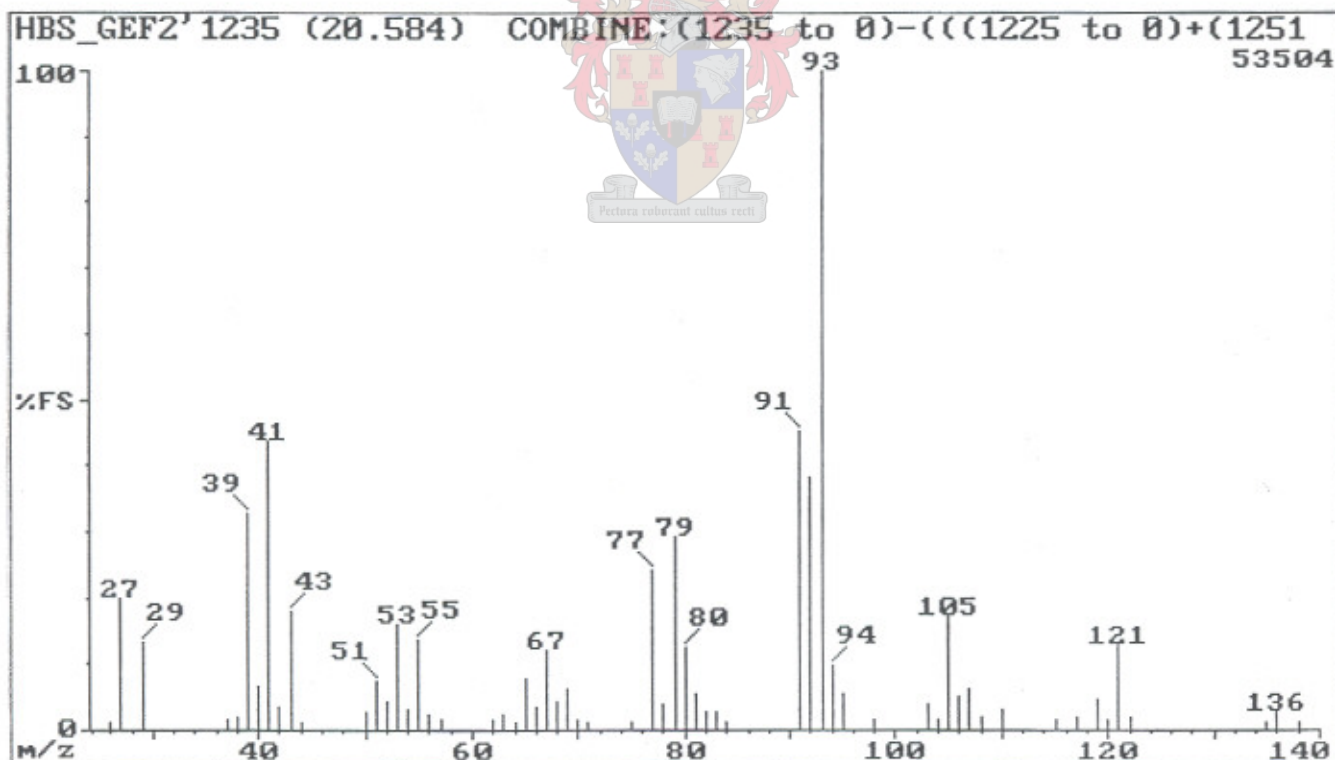


Fig. 2.44: EI-massaspektrum van component F1235.



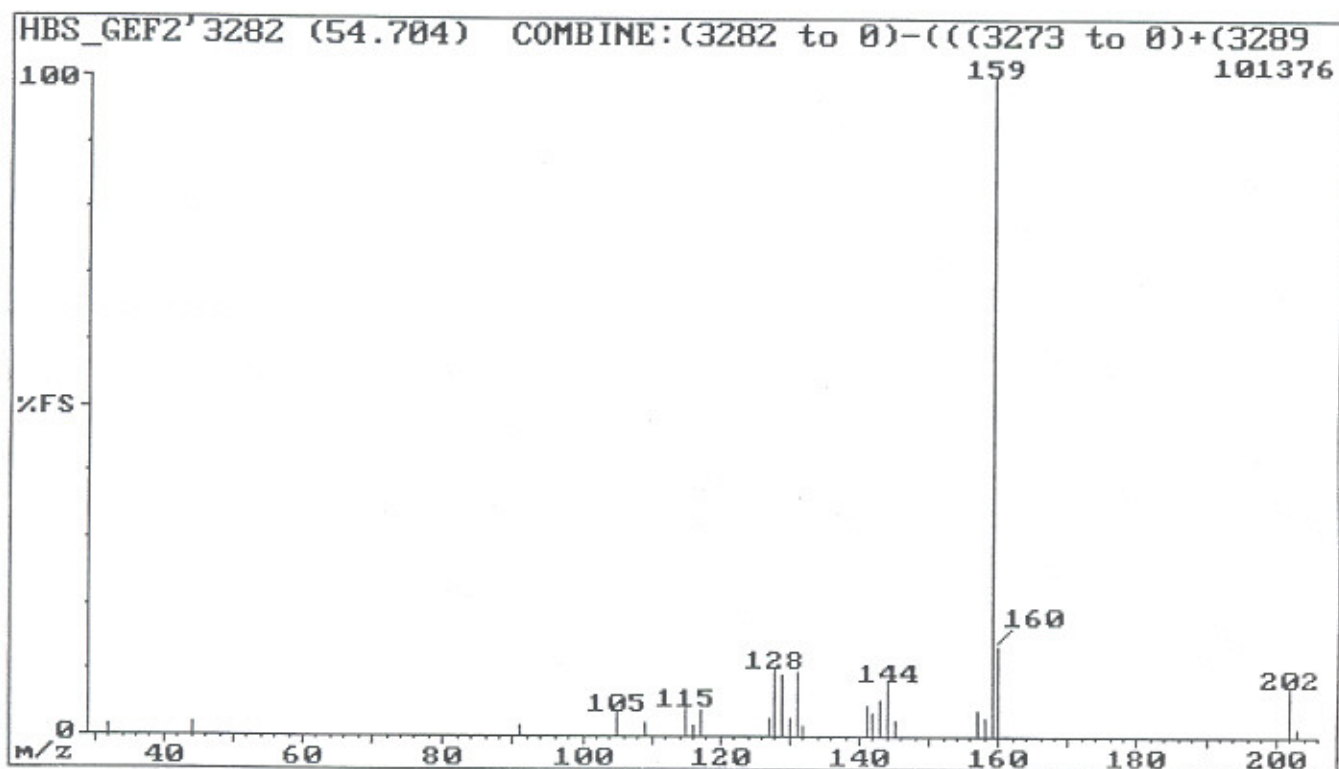


Fig. 2.45: EI-massaspektrum van component F3282.

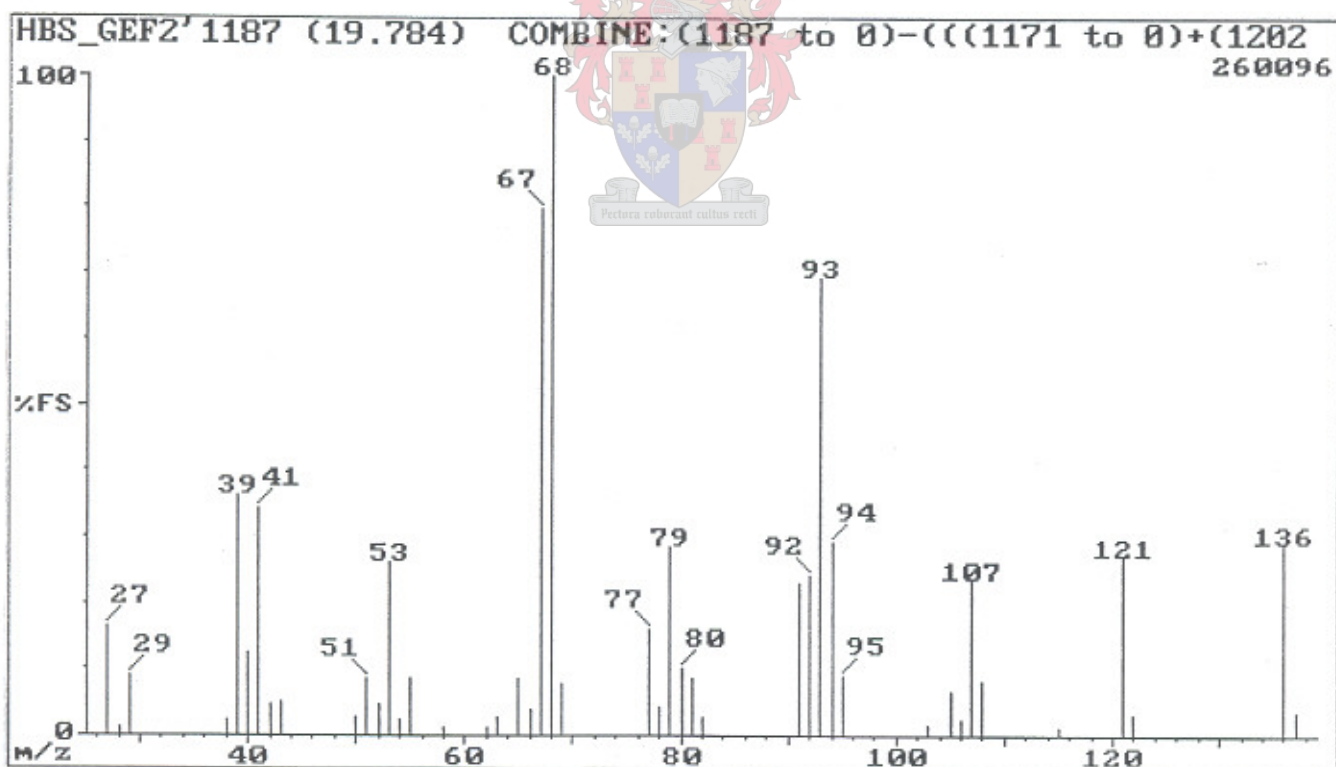


Fig. 2.46: EI-massaspektrum van component F1187 (limoneen).

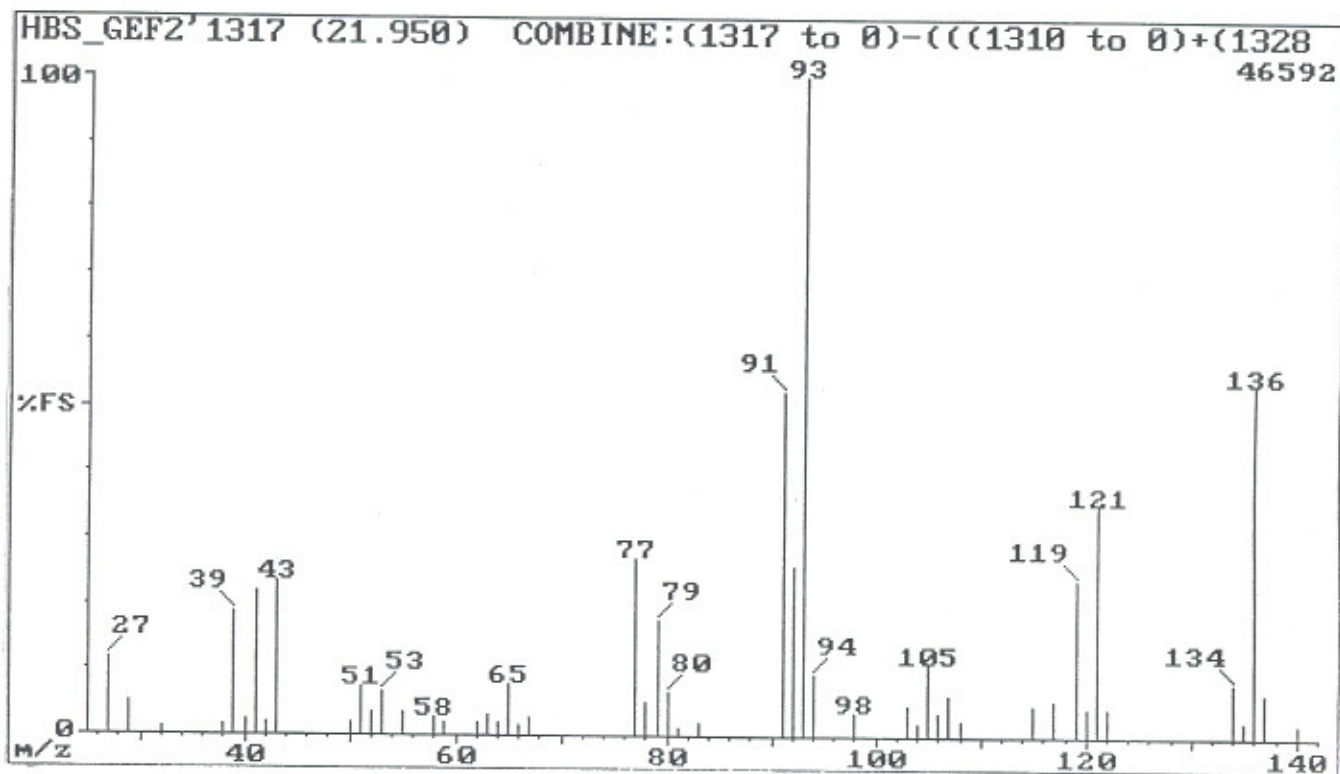


Fig. 2.47: EI-masspektrum van component F1317.

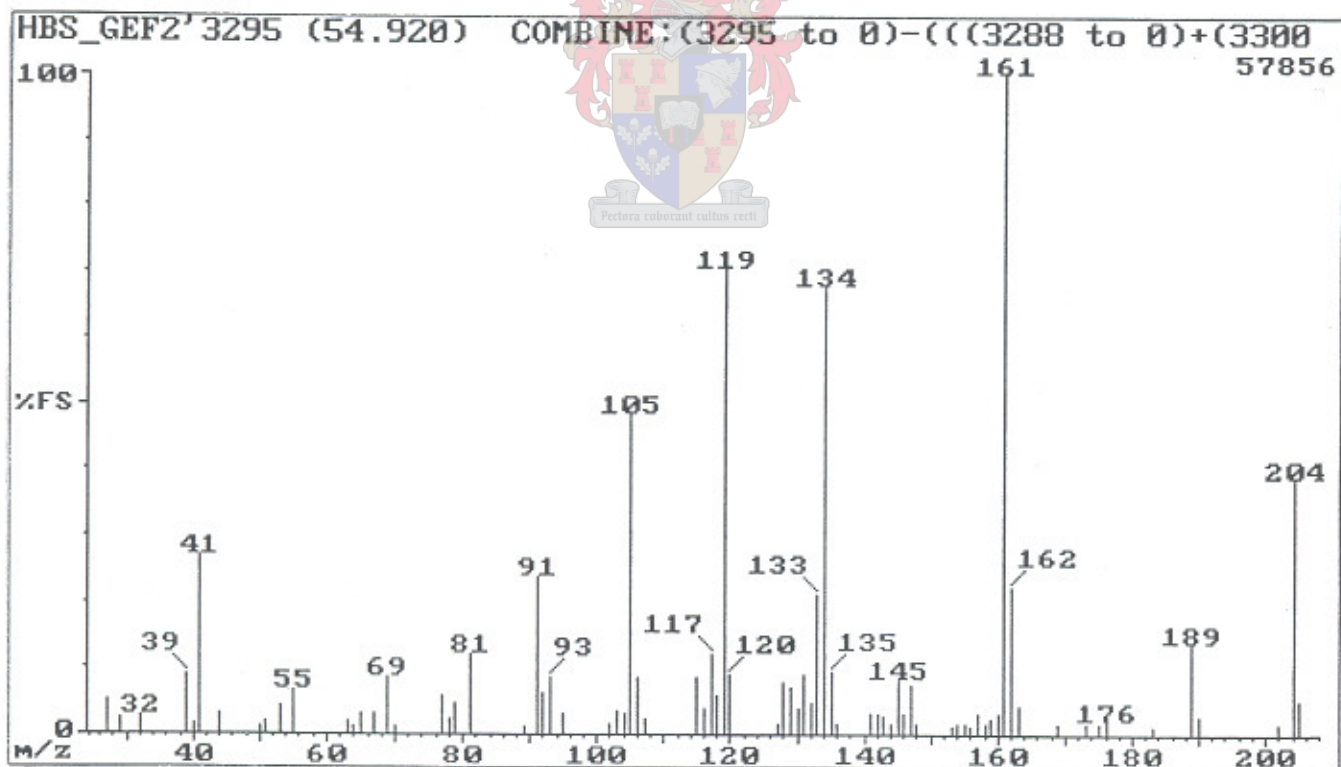


Fig. 2.48: EI-masspektrum van component F3295.

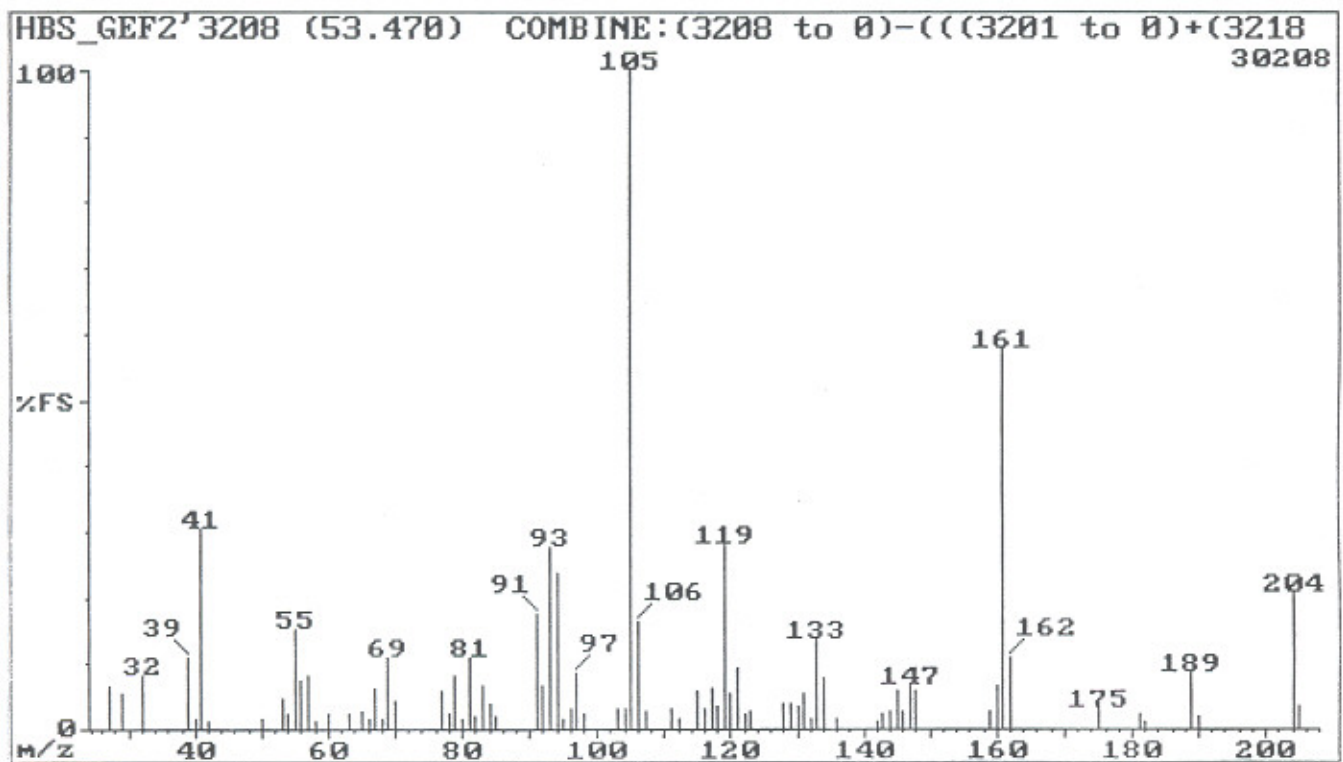


Fig. 2.49: EI-masspektrum van component F3208.

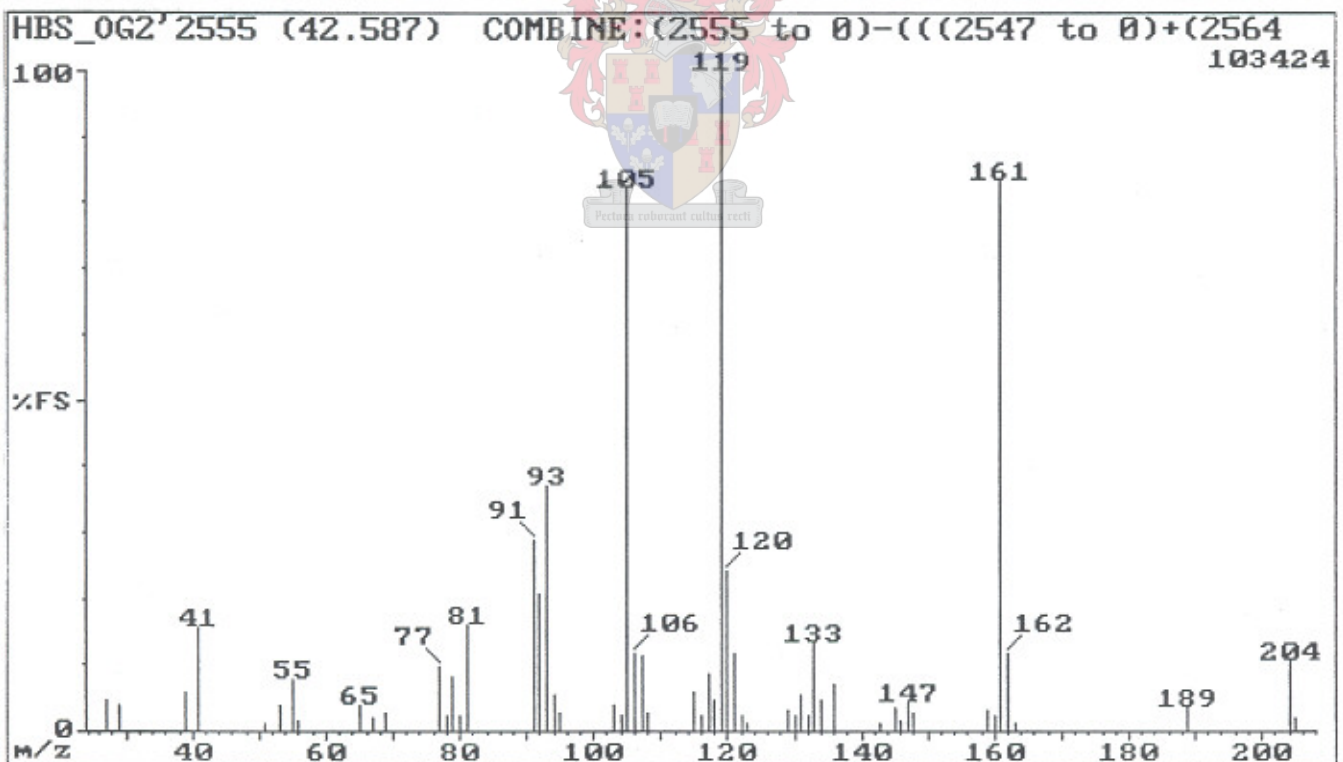


Fig. 2.50: EI-masspektrum van component U2555 ( $\alpha$ -kubebeen).

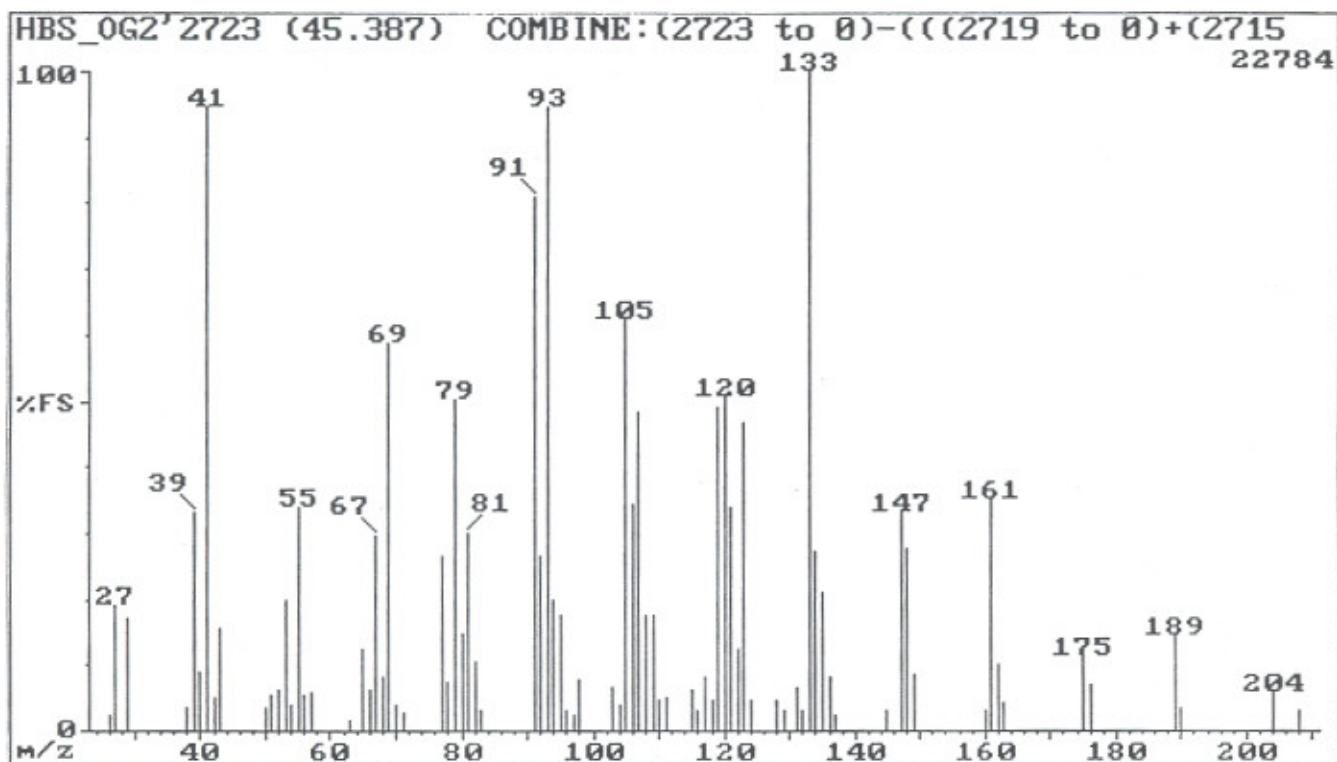


Fig. 2.51: EI-massaspektrum van component U2723.

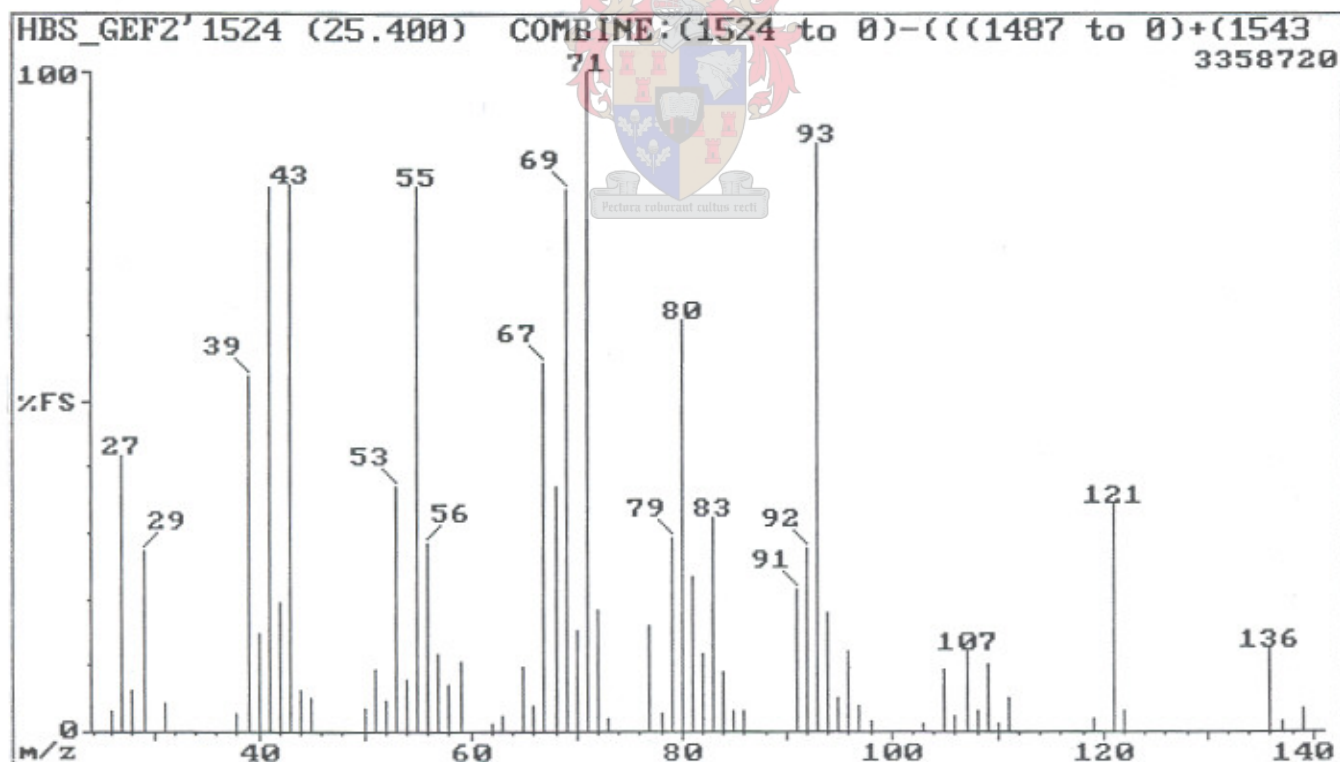


Fig. 2.52: EI-massaspektrum van component F1524 (linalool).



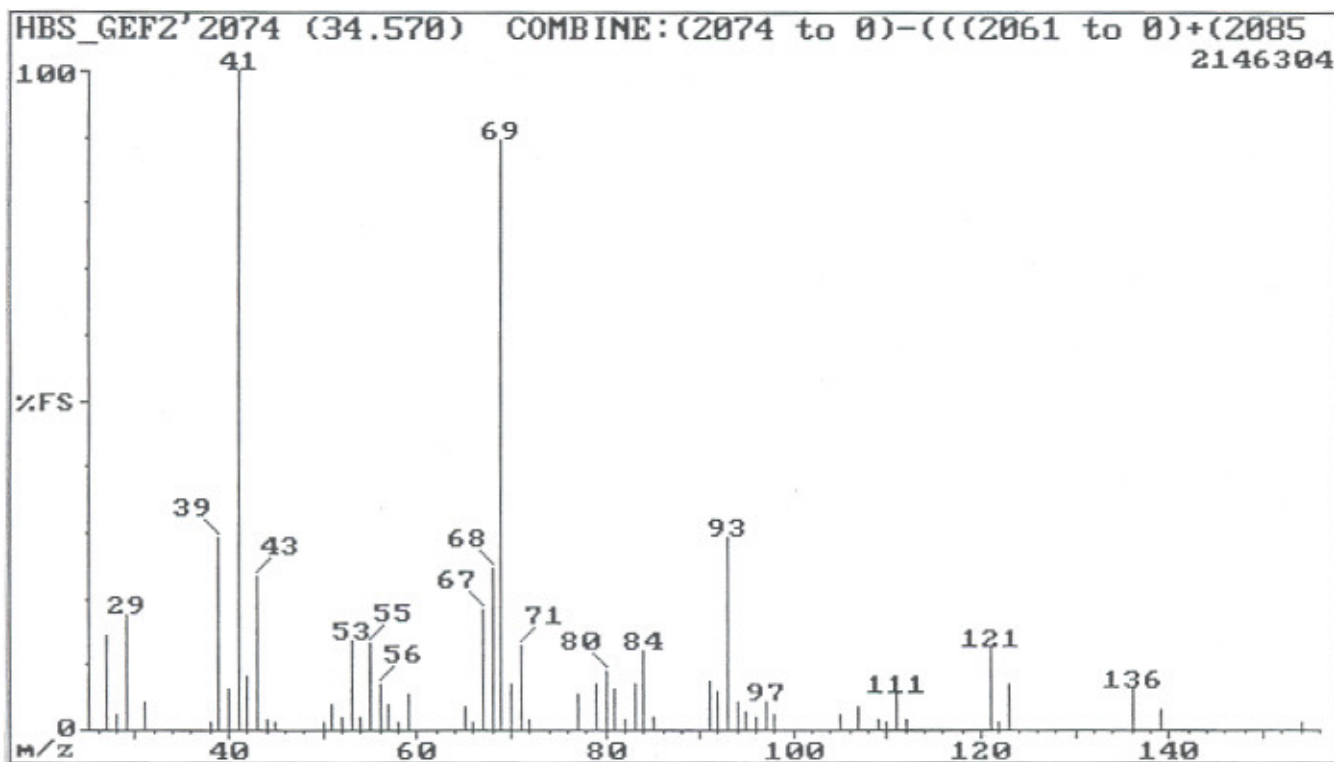


Fig. 2.53: EI-masspektrum van component F2074.

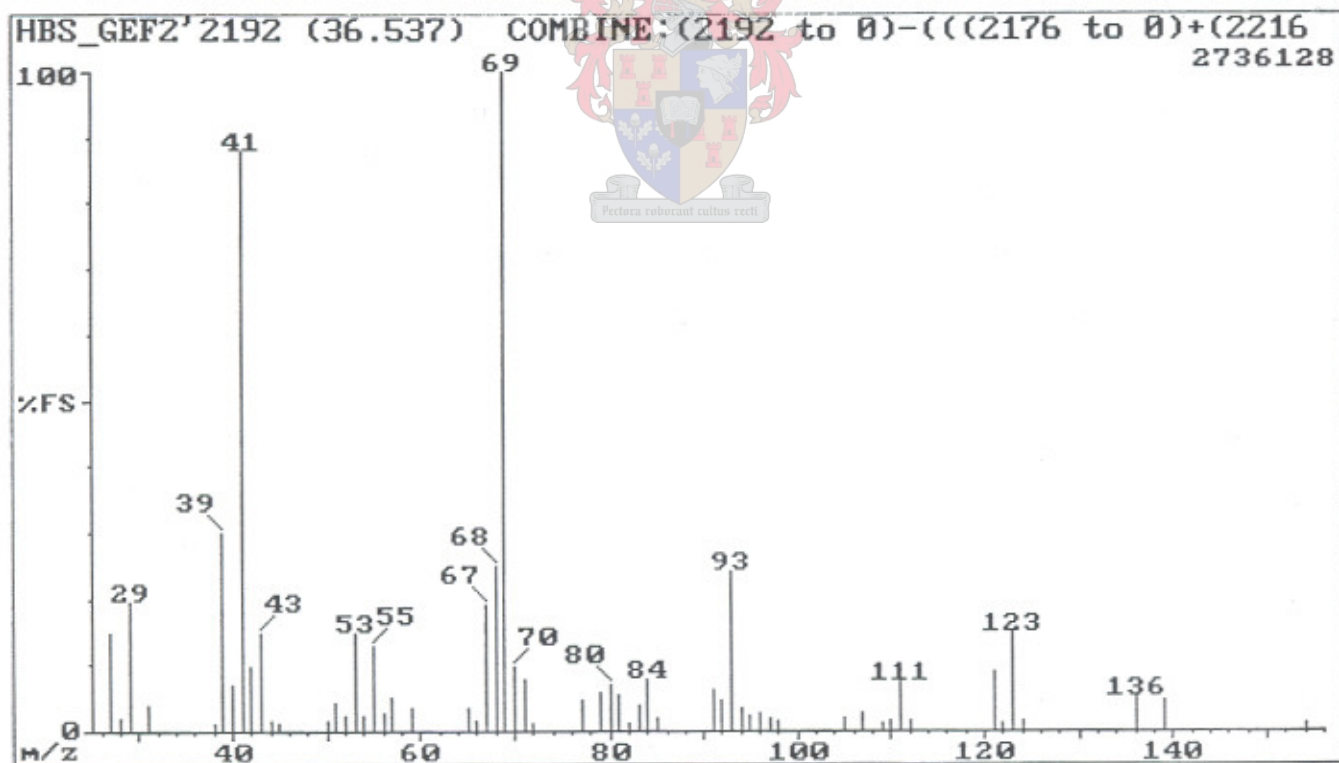


Fig. 2.54: EI-masspektrum van component F2192 [(E)-geraniol].

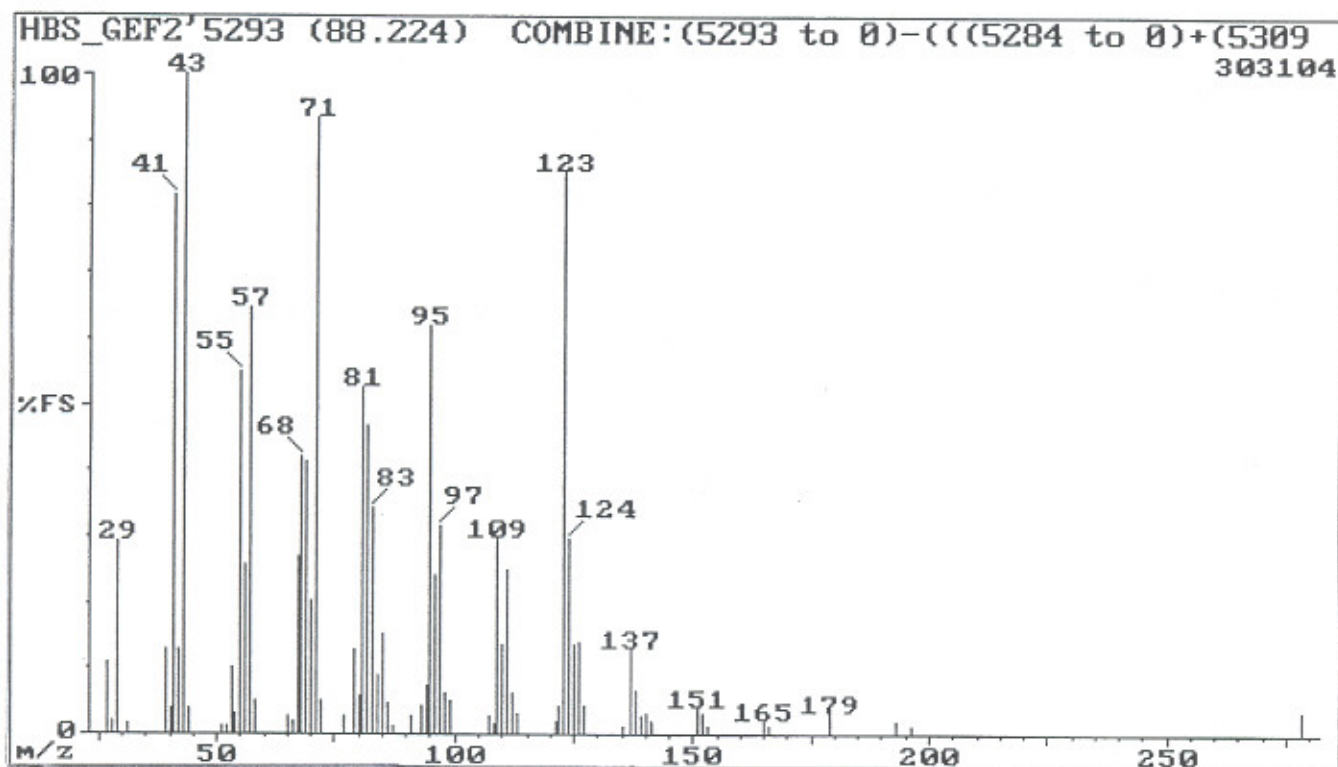


Fig. 2.55: EI-masspektrum van component F5293 (fitol).

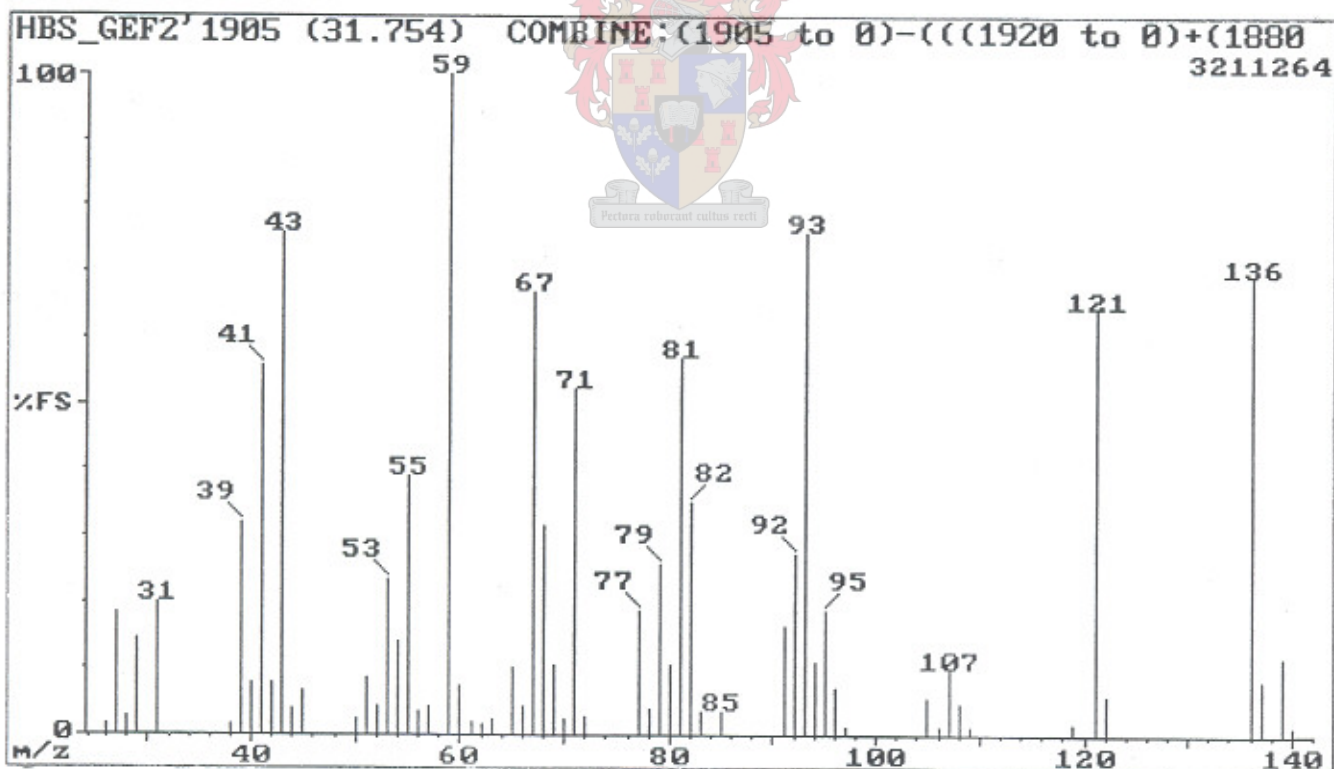


Fig. 2.56: EI-masspektrum van component F1905 ( $\alpha$ -terpineol).

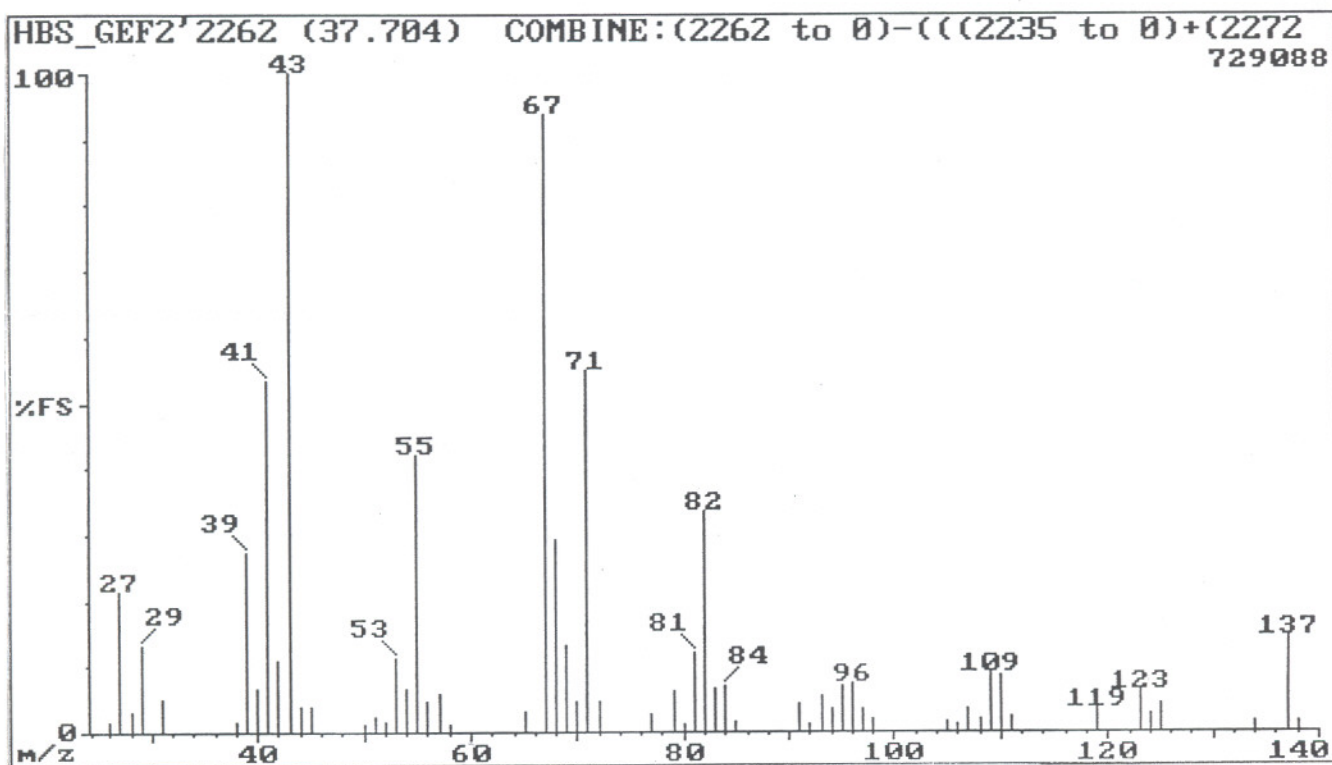


Fig. 2.57: EI-massaspektrum van component F2262.

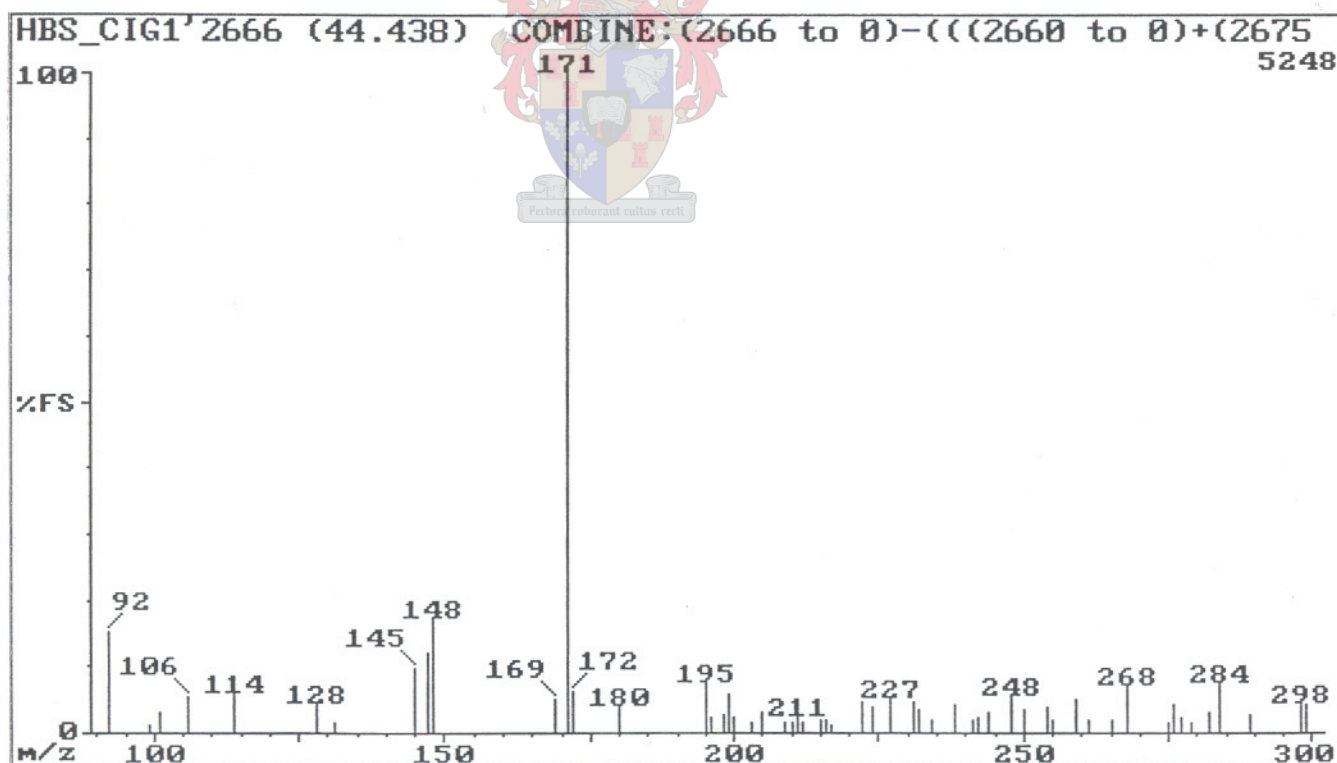


Fig. 2.57a: CI-massaspektrum van component F2262.

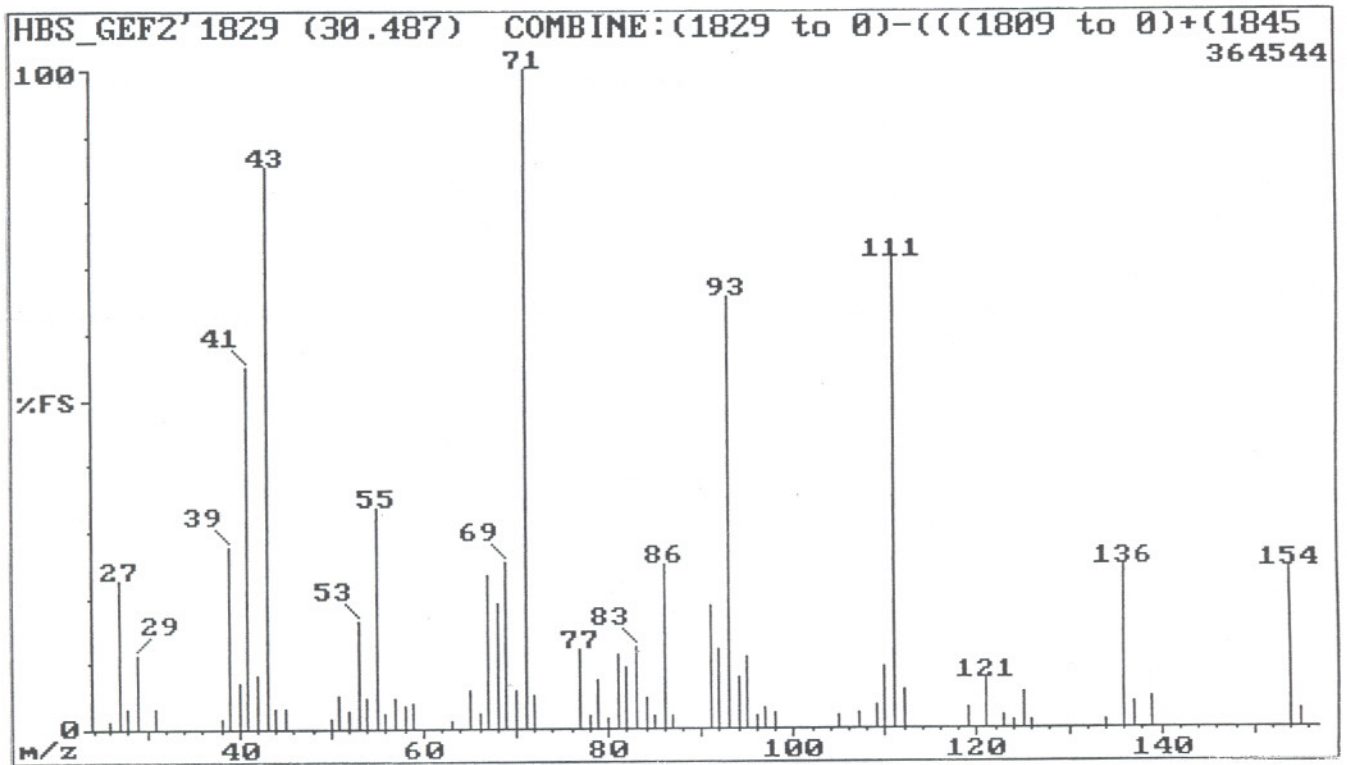


Fig. 2.58: EI-massaspektrum van component F1829 (4-karvomentenol).

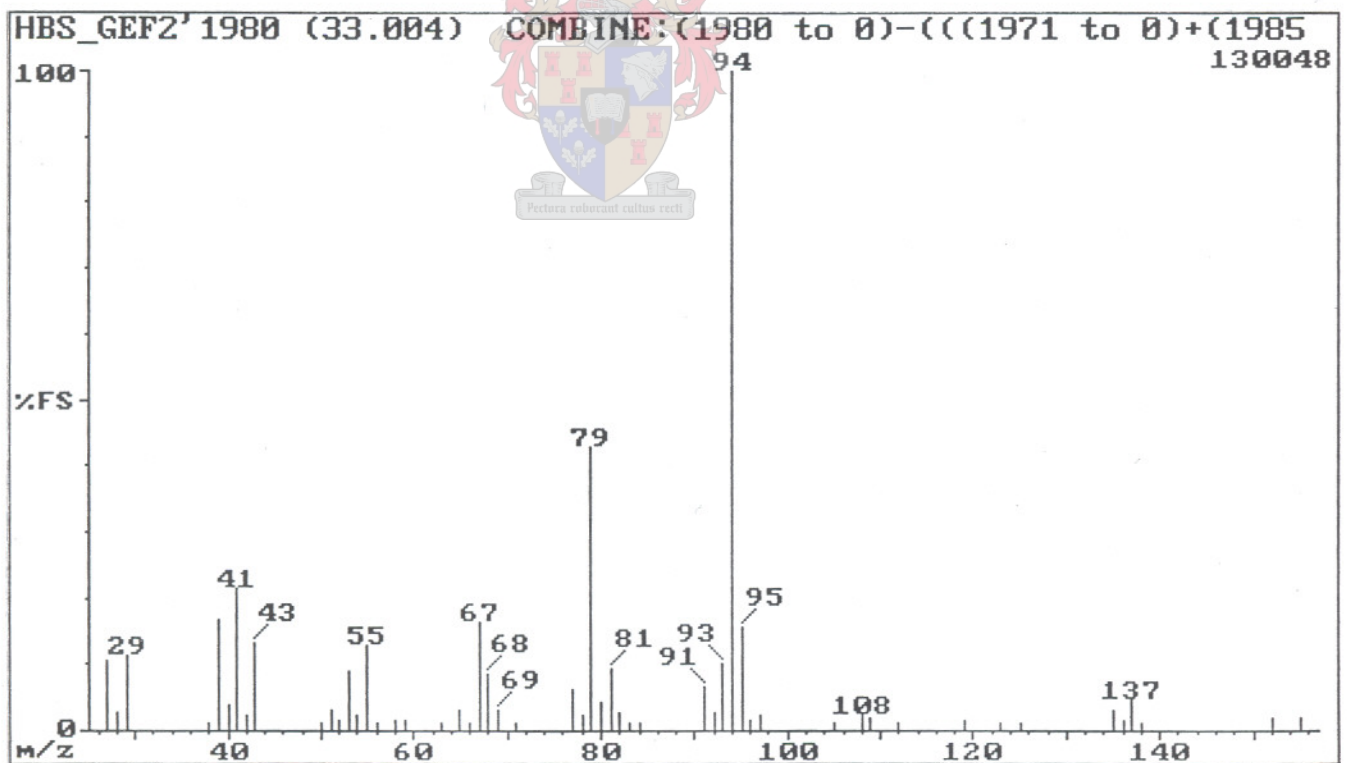


Fig. 2.59: EI-massaspektrum van component F1980.



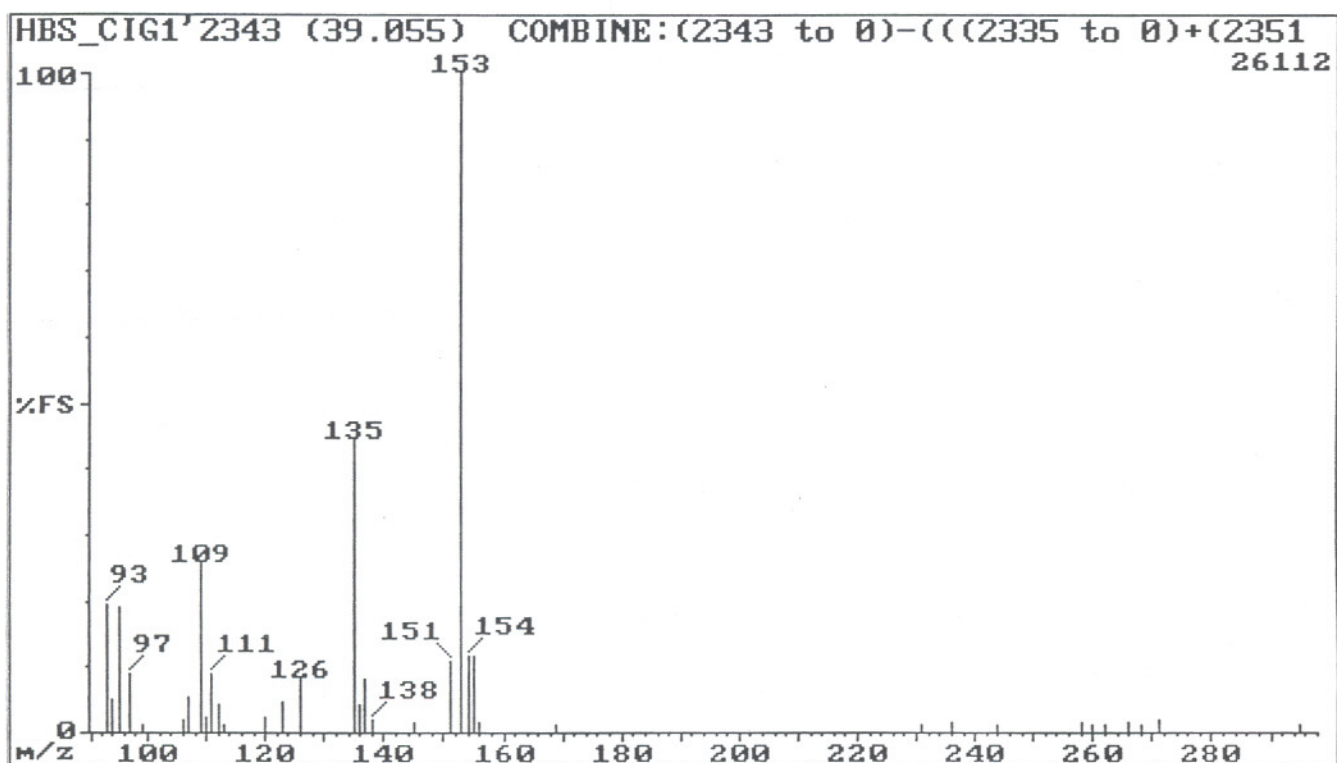


Fig. 2.59a: CI-masspektrum van component F1980.

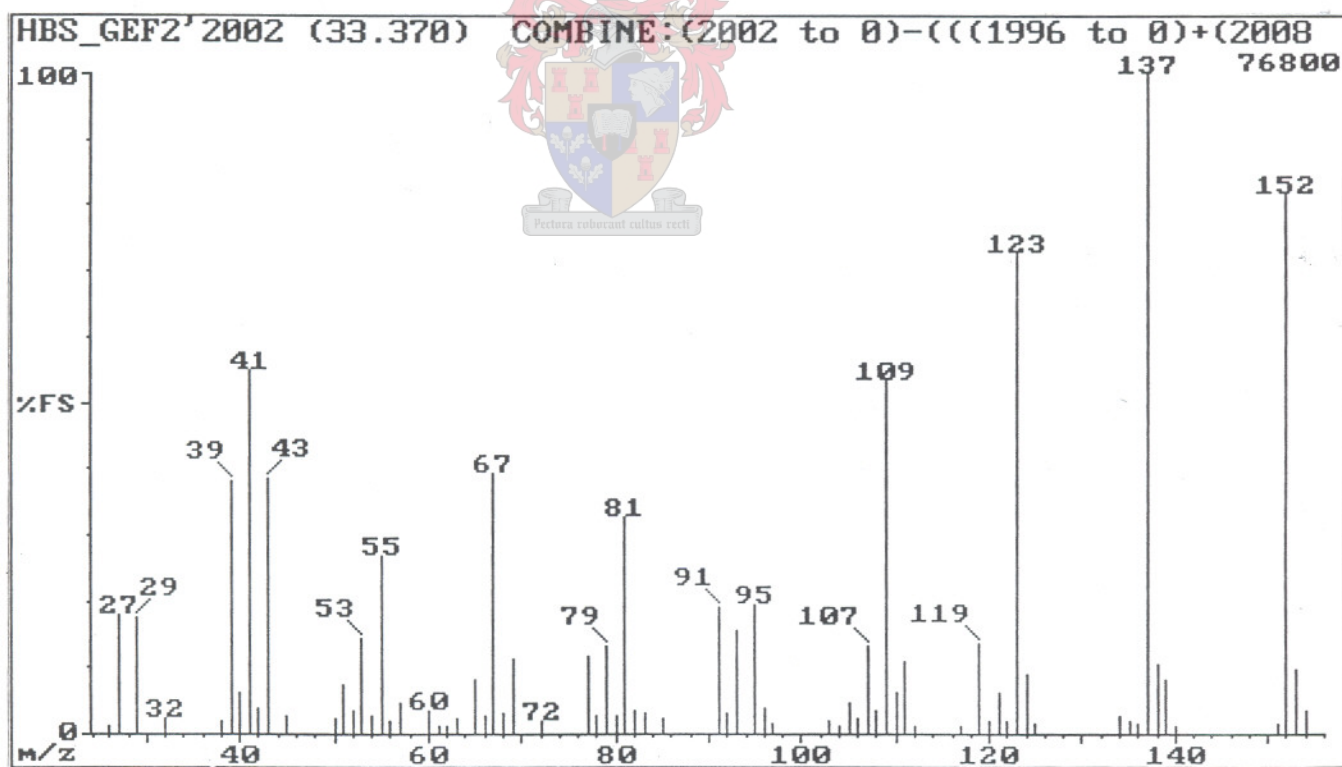


Fig. 2.60: EI-masspektrum van component F2002 ( $\beta$ -siklositraal).

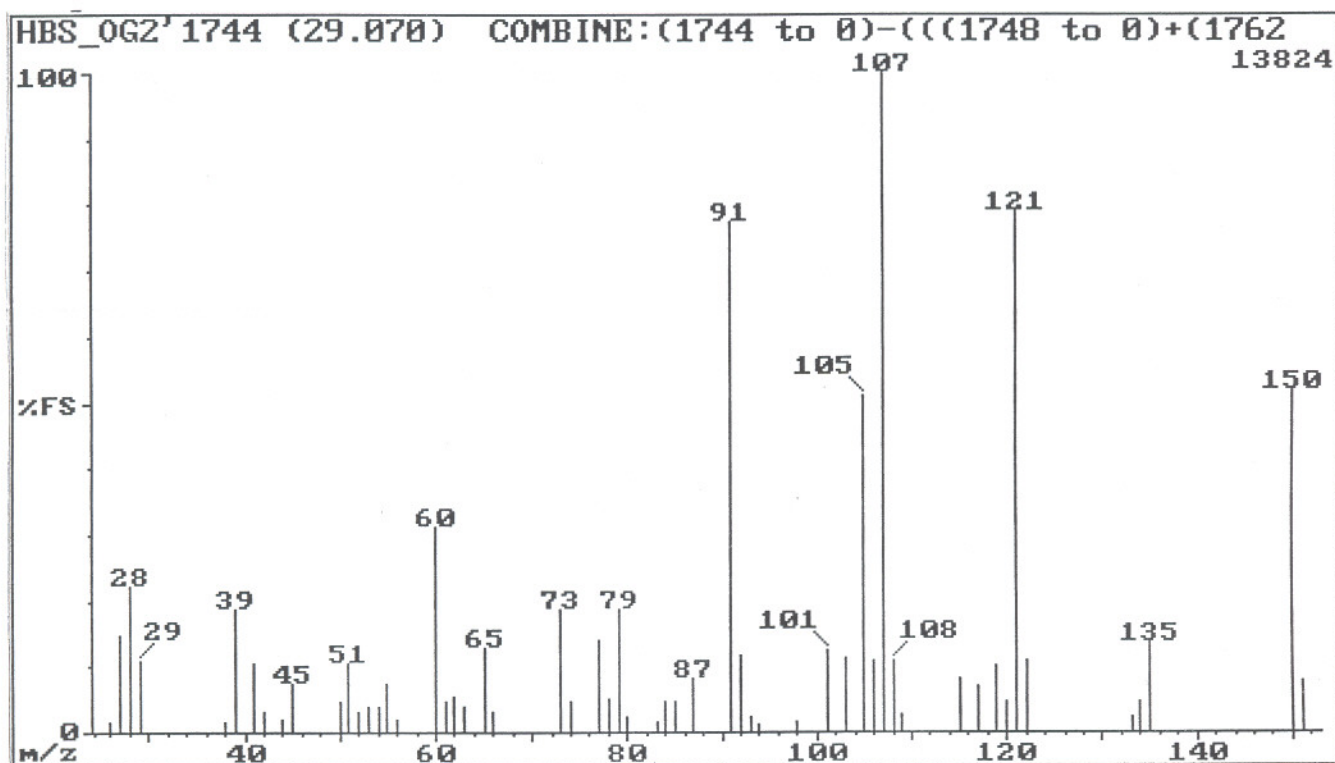


Fig. 2.61: EI-massaspektrum van component U1744.

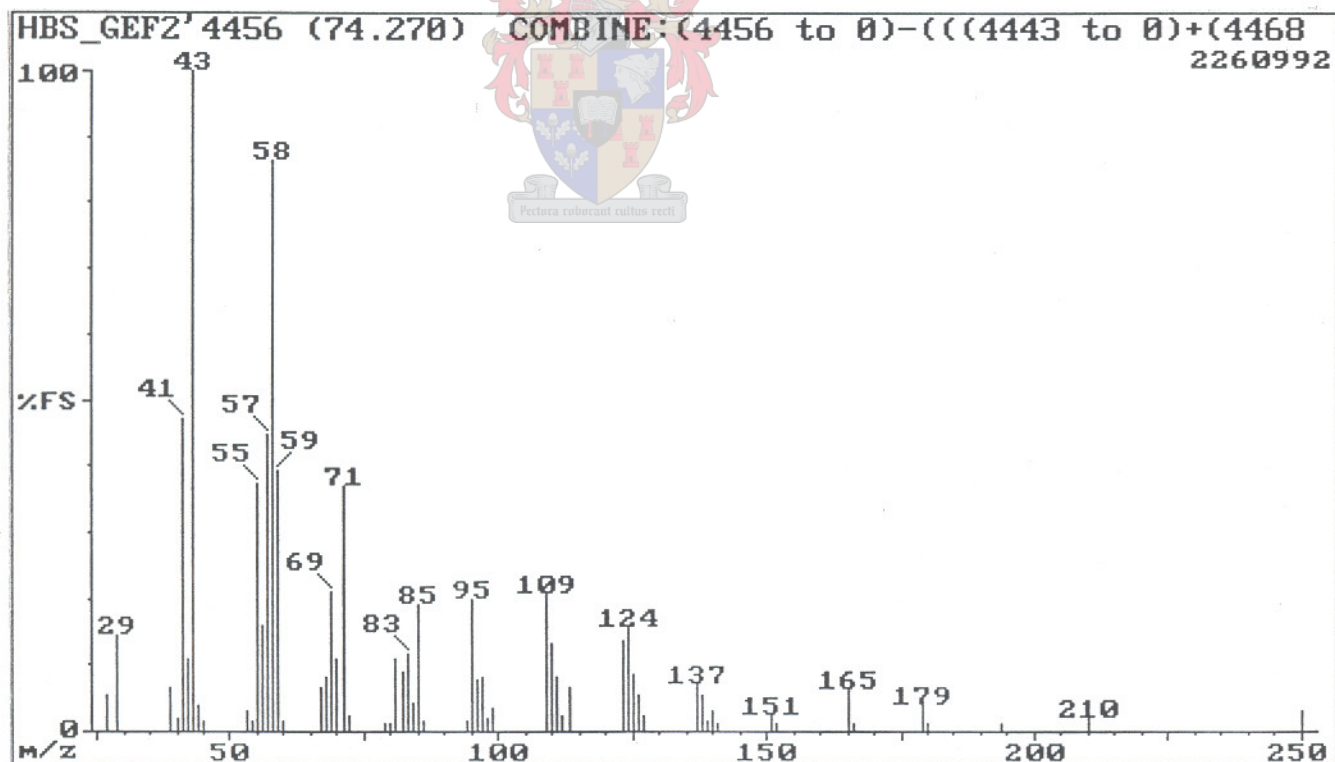


Fig. 2.62: EI-massaspektrum van component F4456 (heksahydrofarnesielasetoon).

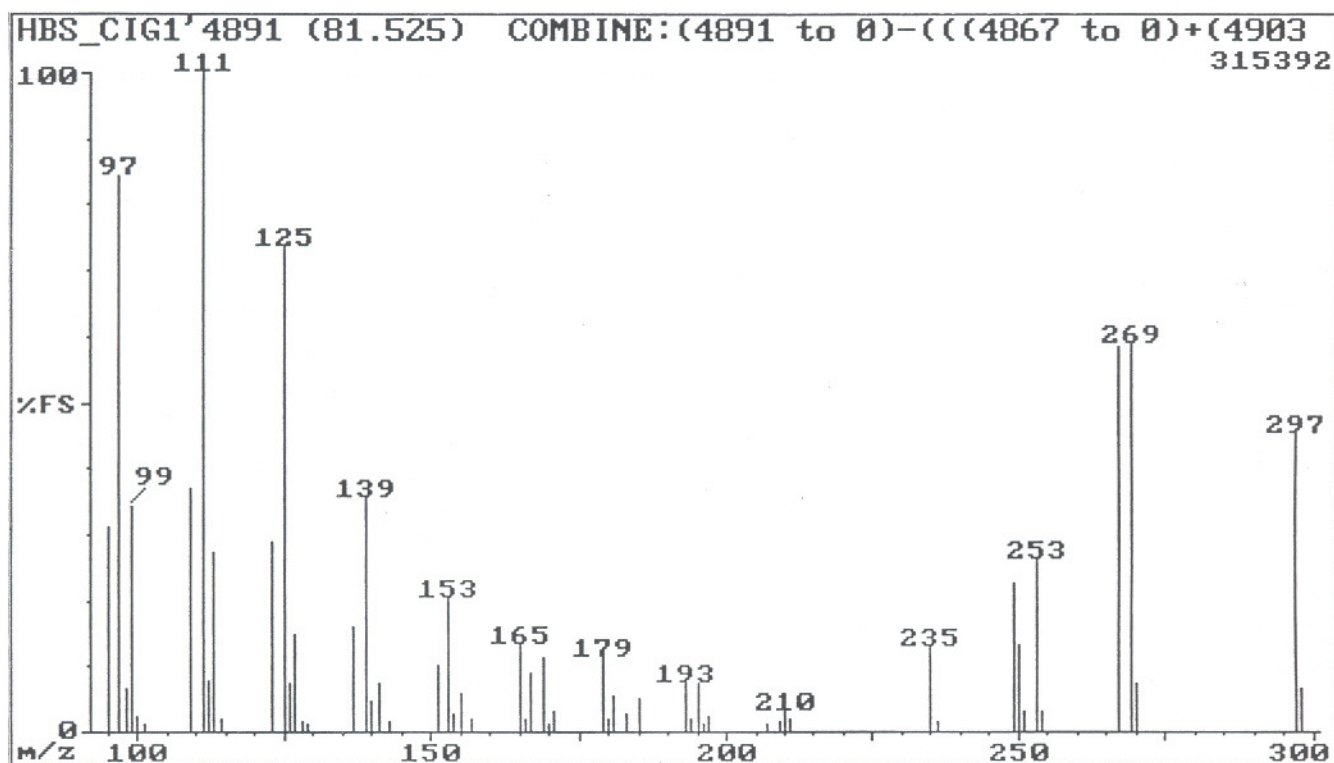


Fig. 2.62a: CI-masspektrum van component F4456 (heksahydrofarnesielasetoon)

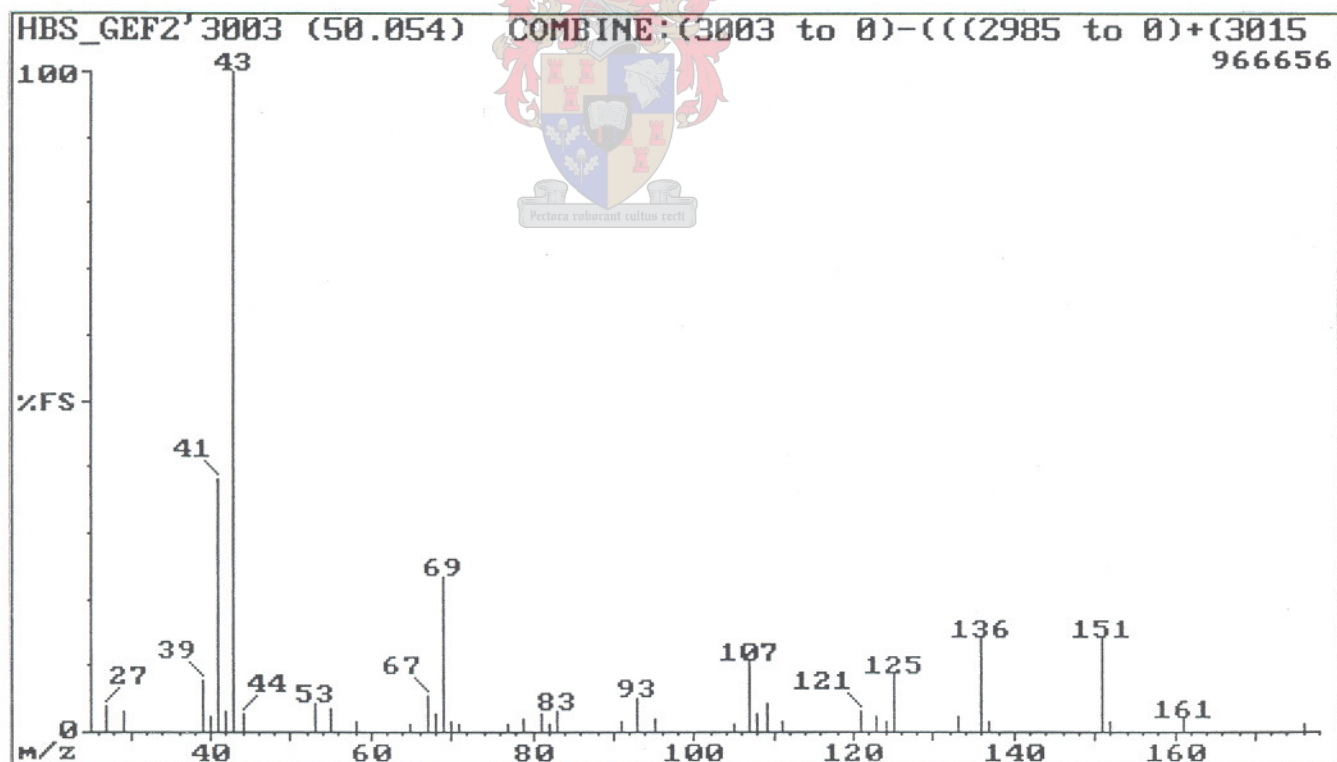


Fig. 2.63: EI-masspektrum van component F3003 [(Z)-geranielasetoon].

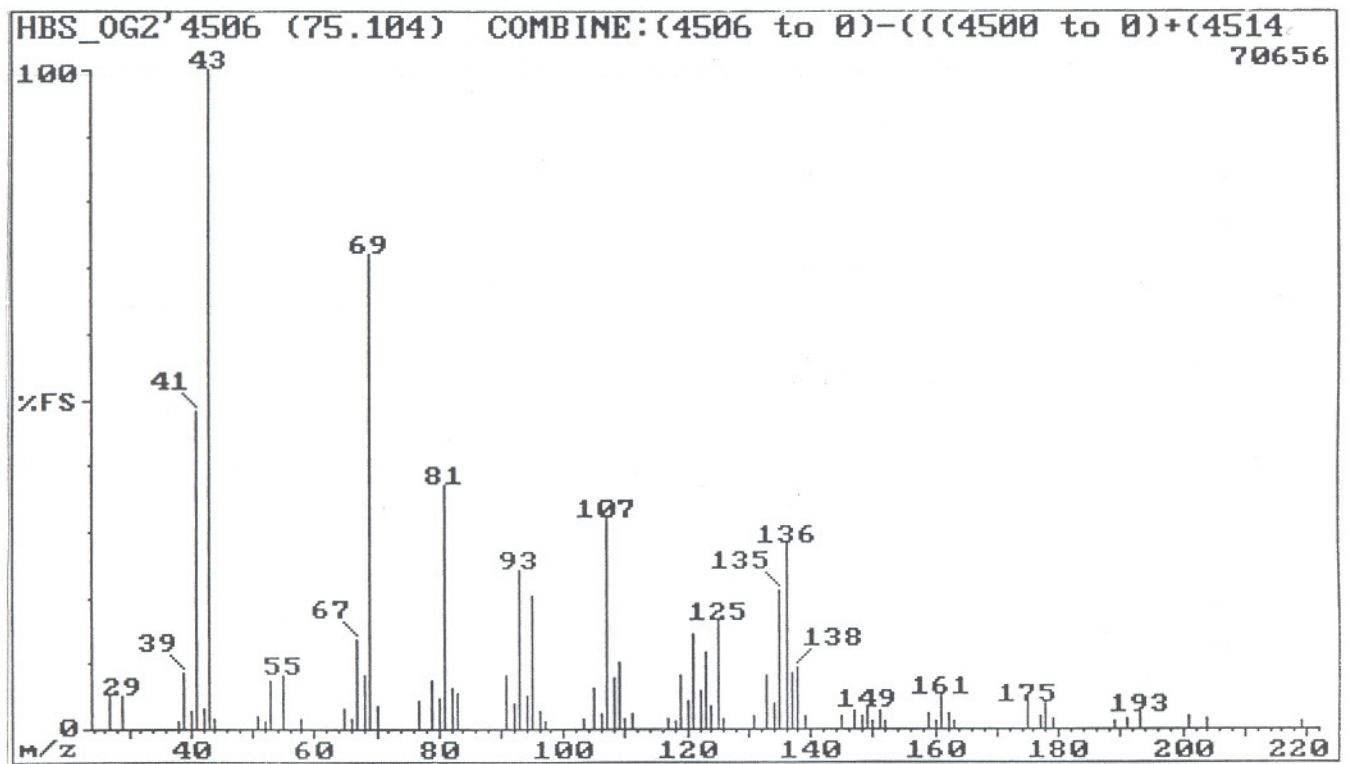


Fig. 2.64: EI-masspektrum van component U4506 [(*E,E*)-farnesielasetoon].

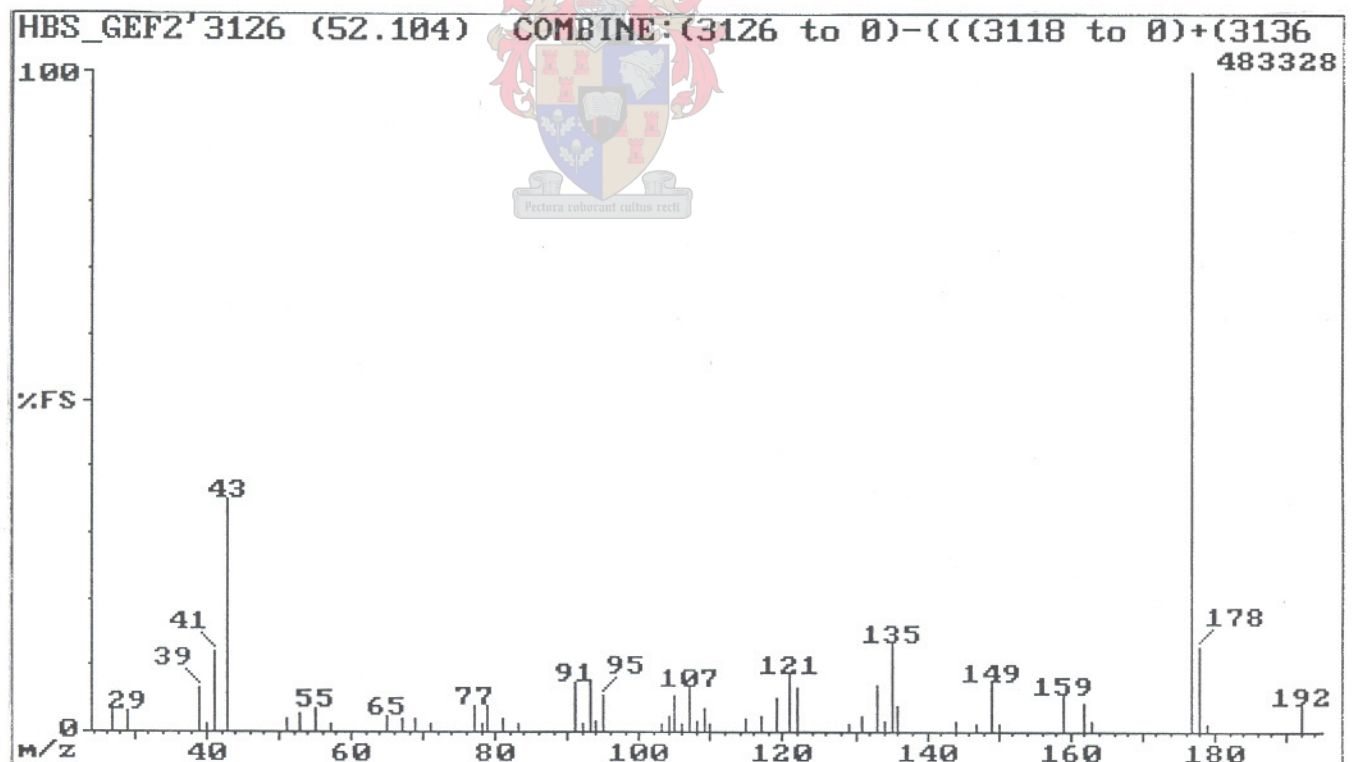


Fig. 4.65: EI-masspektrum van component F3126 ( $\beta$ -jonoon).



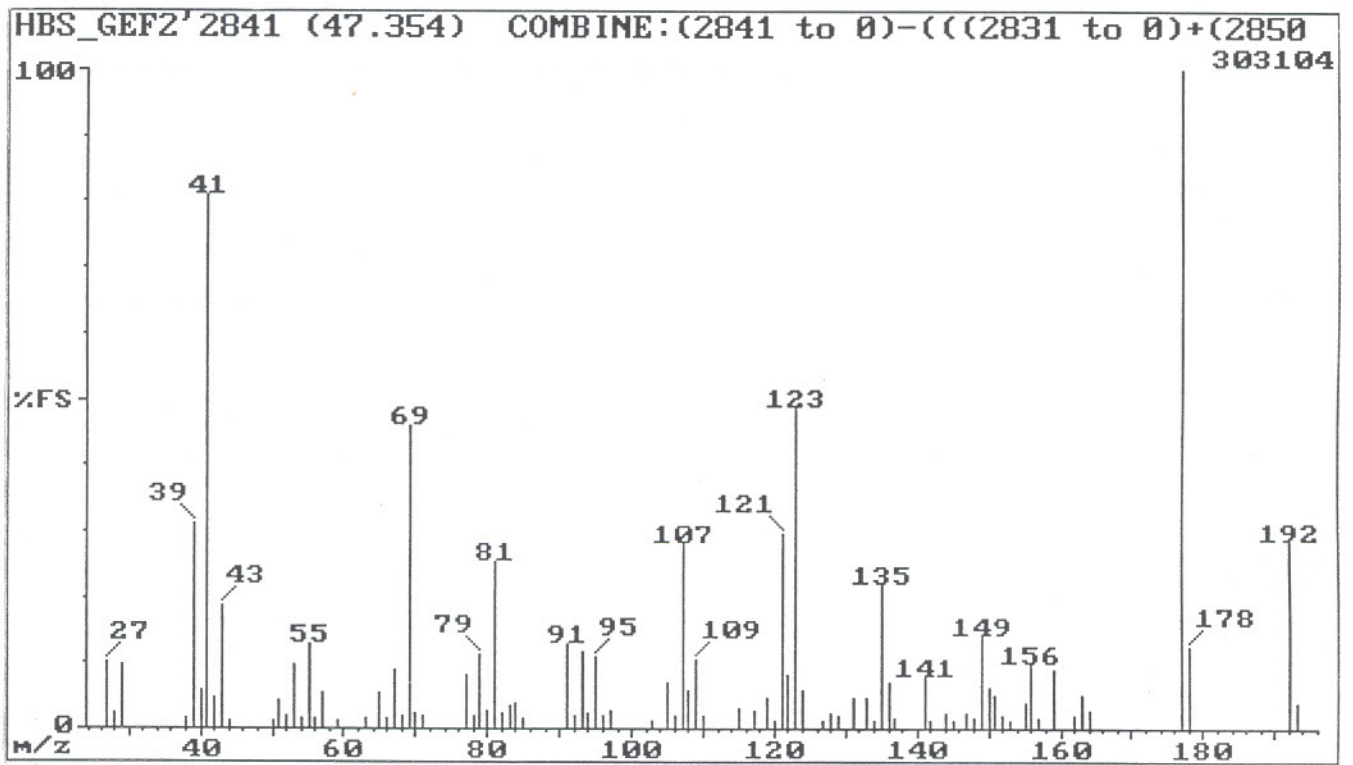


Fig. 2.66: EI-massaspektrum van component F2841 ( $\beta$ -damaskoon).

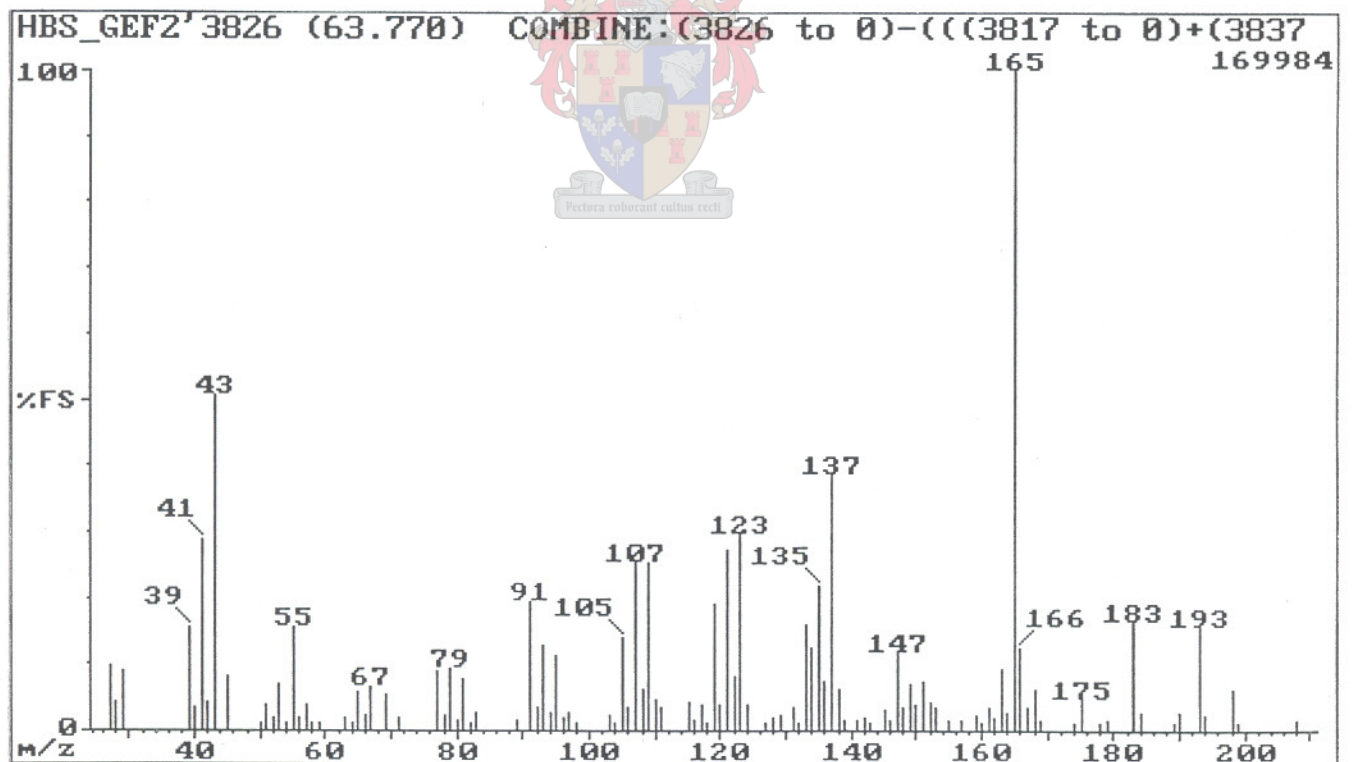


Fig. 2.67: EI-massaspektrum van component F3826.

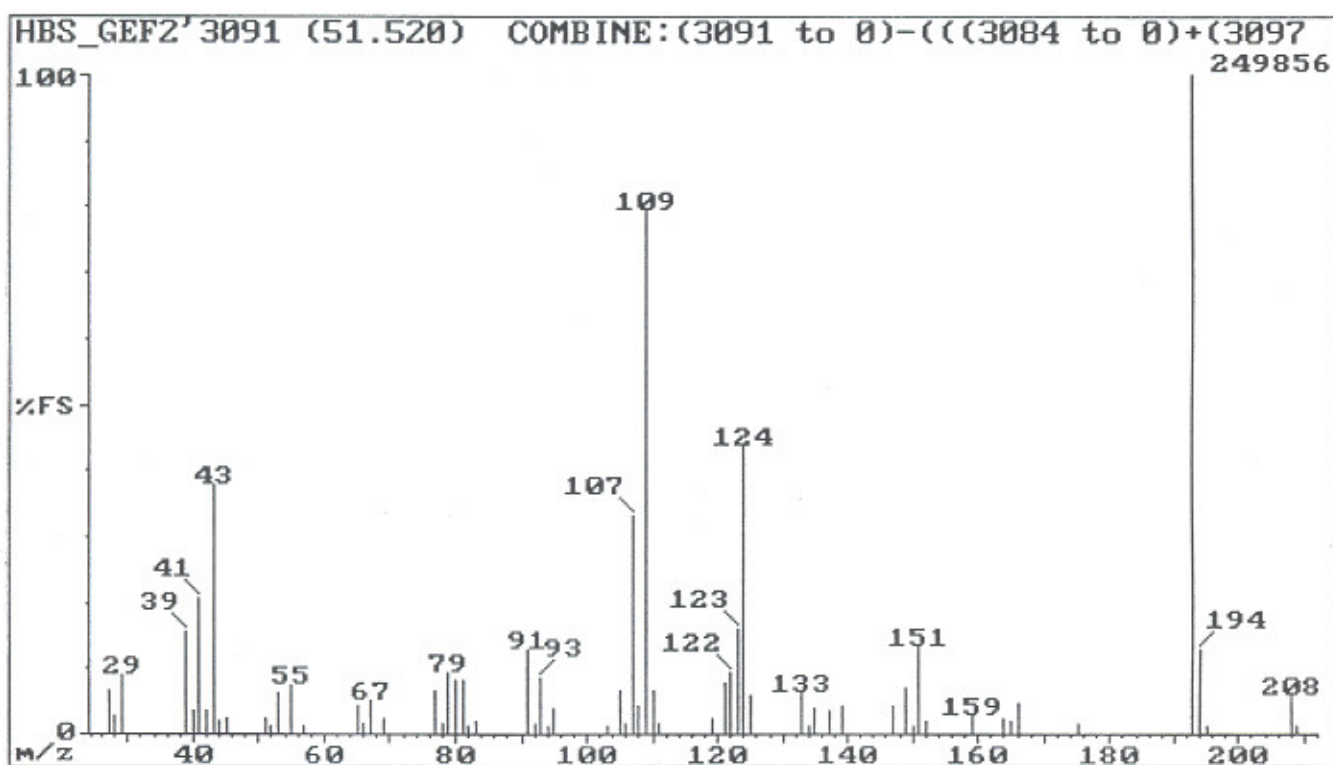


Fig. 2.68: EI-massaspektrum van component F3091.

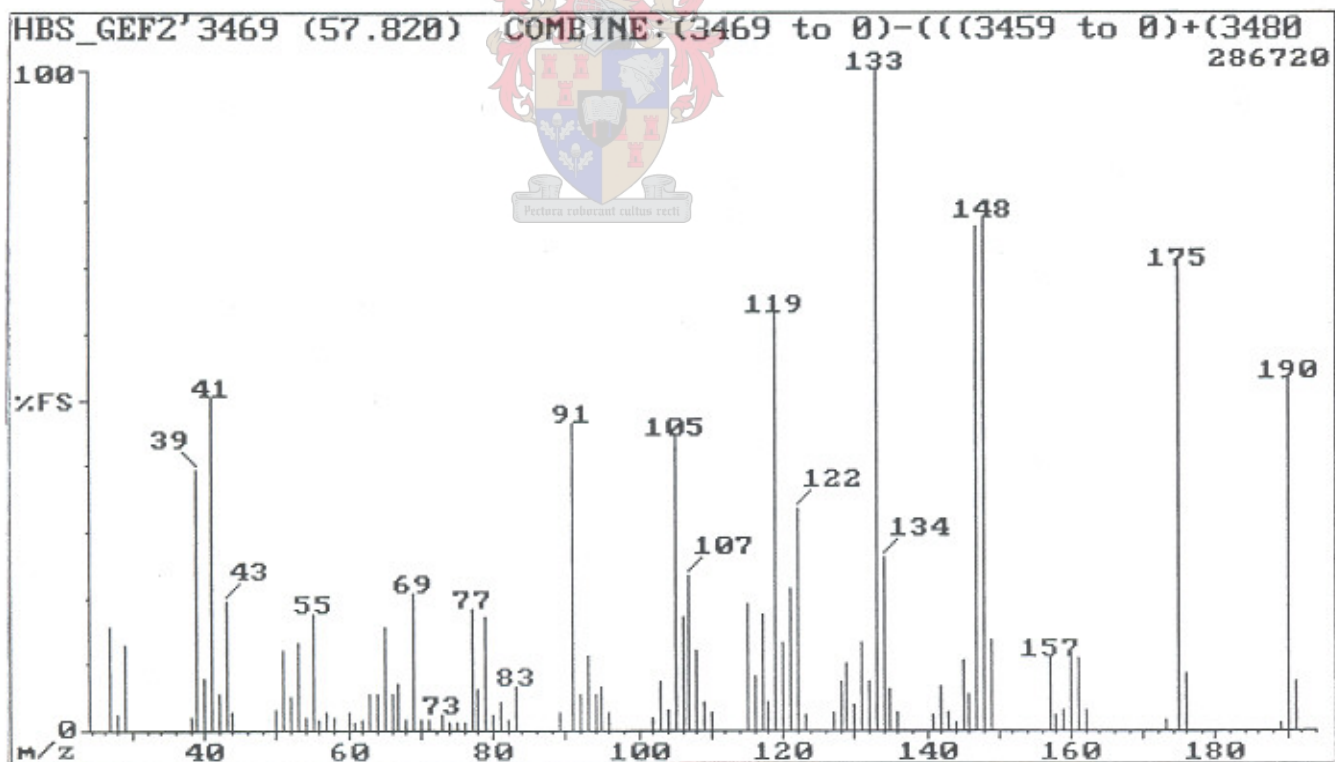


Fig. 2.69: EI-massaspektrum van component F3469.

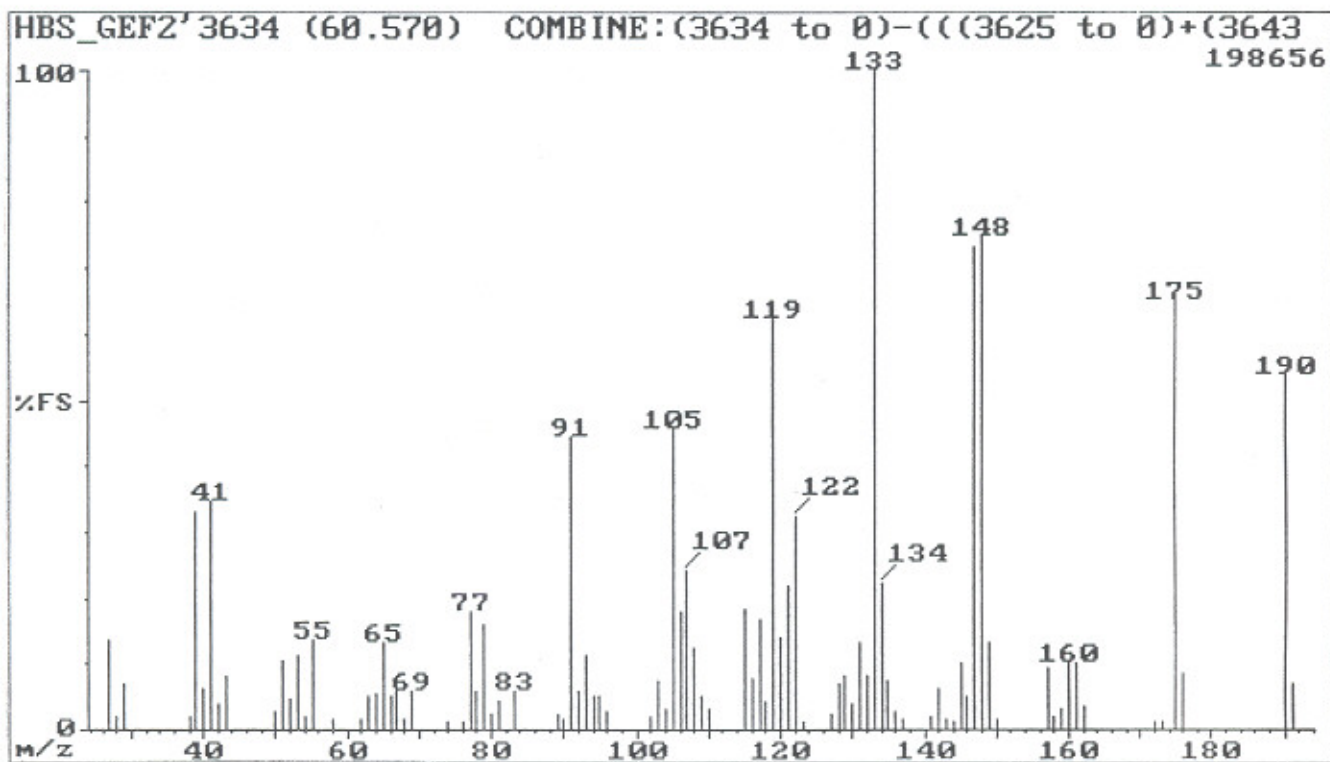


Fig. 2.70: EI-massaspektrum van component F3634.

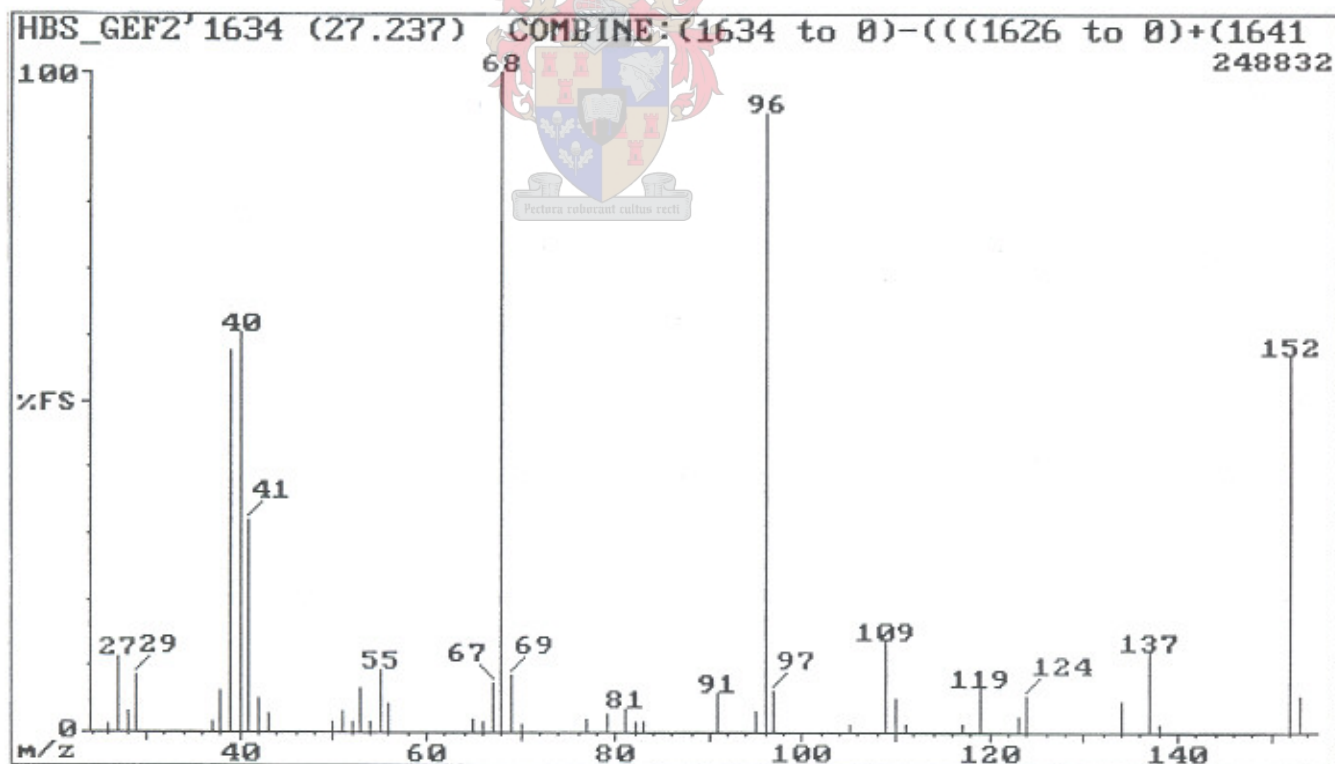


Fig. 2.71: EI-massaspektrum van component F1634 (ketoisoforon).

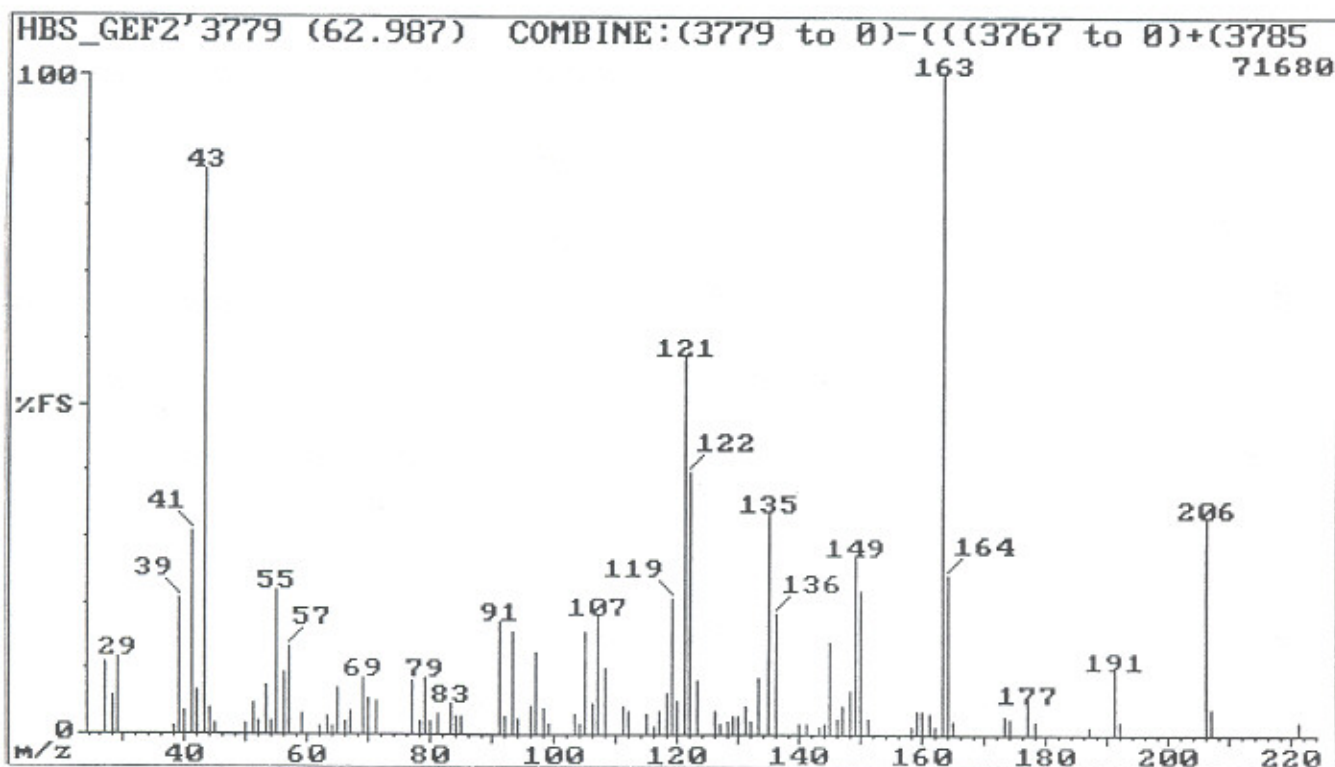


Fig. 2.72: EI-masspektrum van component F3779.

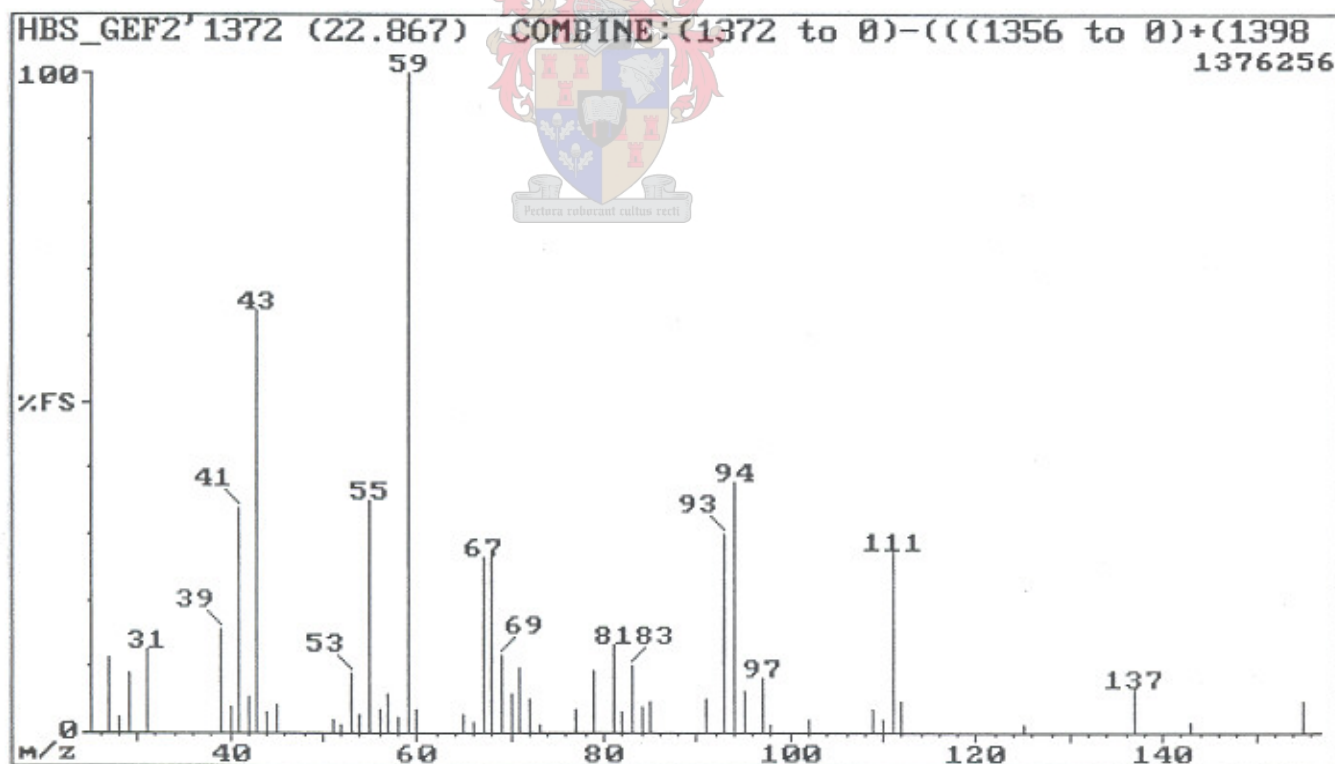


Fig. 2.73: EI-masspektrum van component F1372 (*trans*-linaloöloksied).



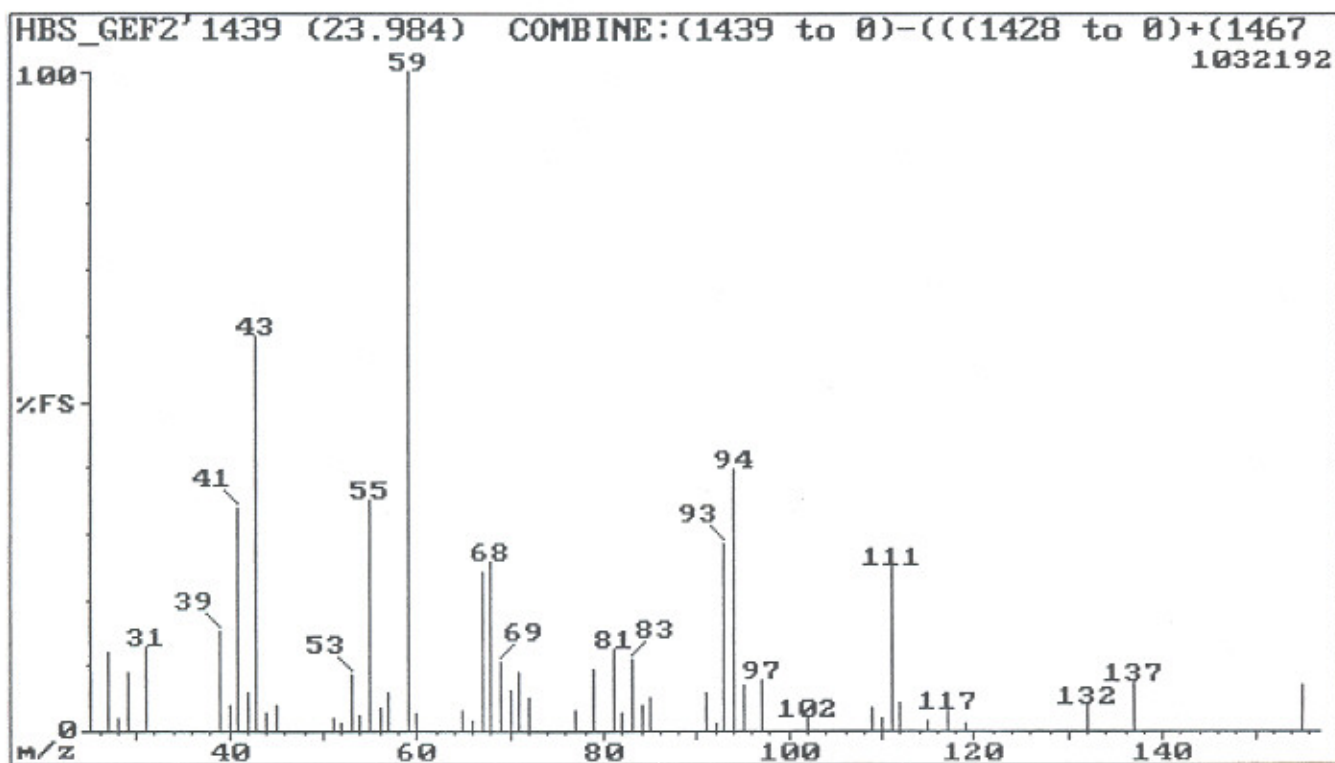


Fig. 2.74: EI-massaspektrum van komponent F1439 (*cis*-linaloöloksied)

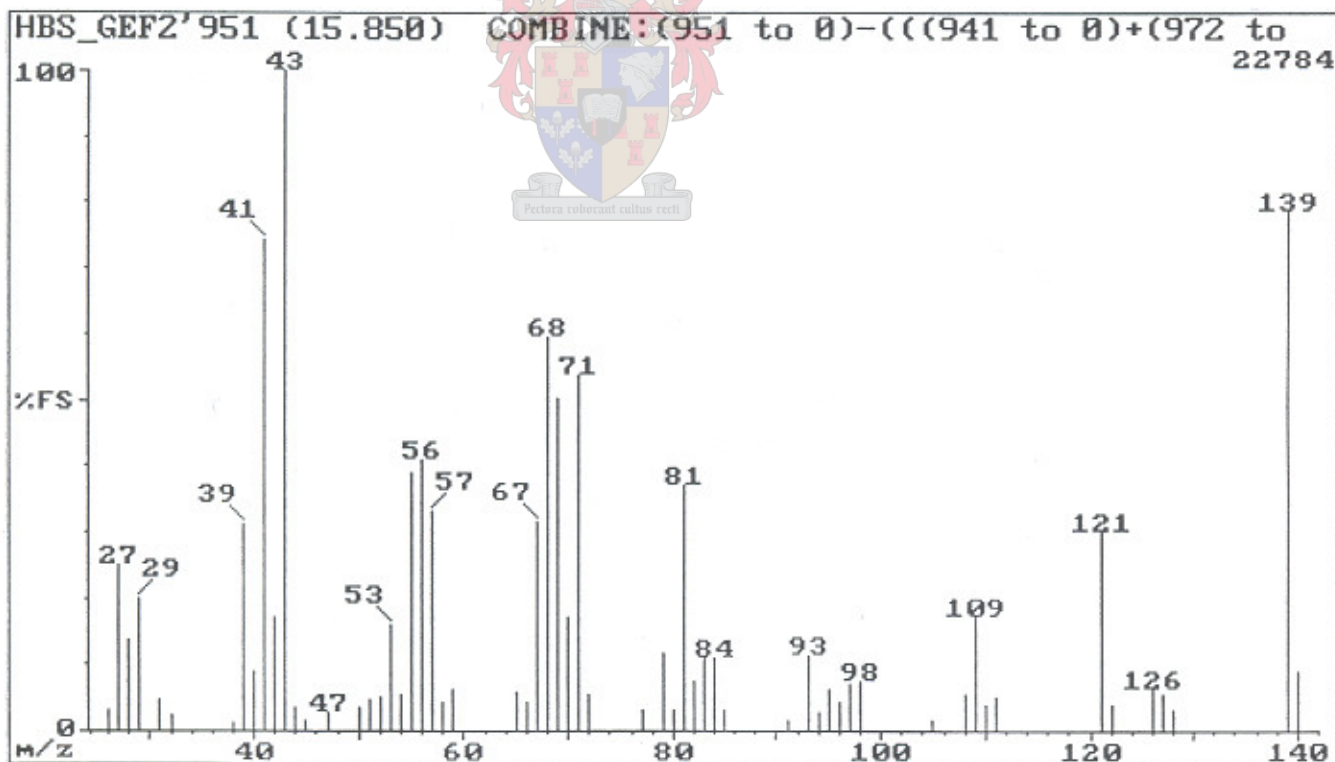


Fig. 2.75: EI-massaspektrum van komponent F951.

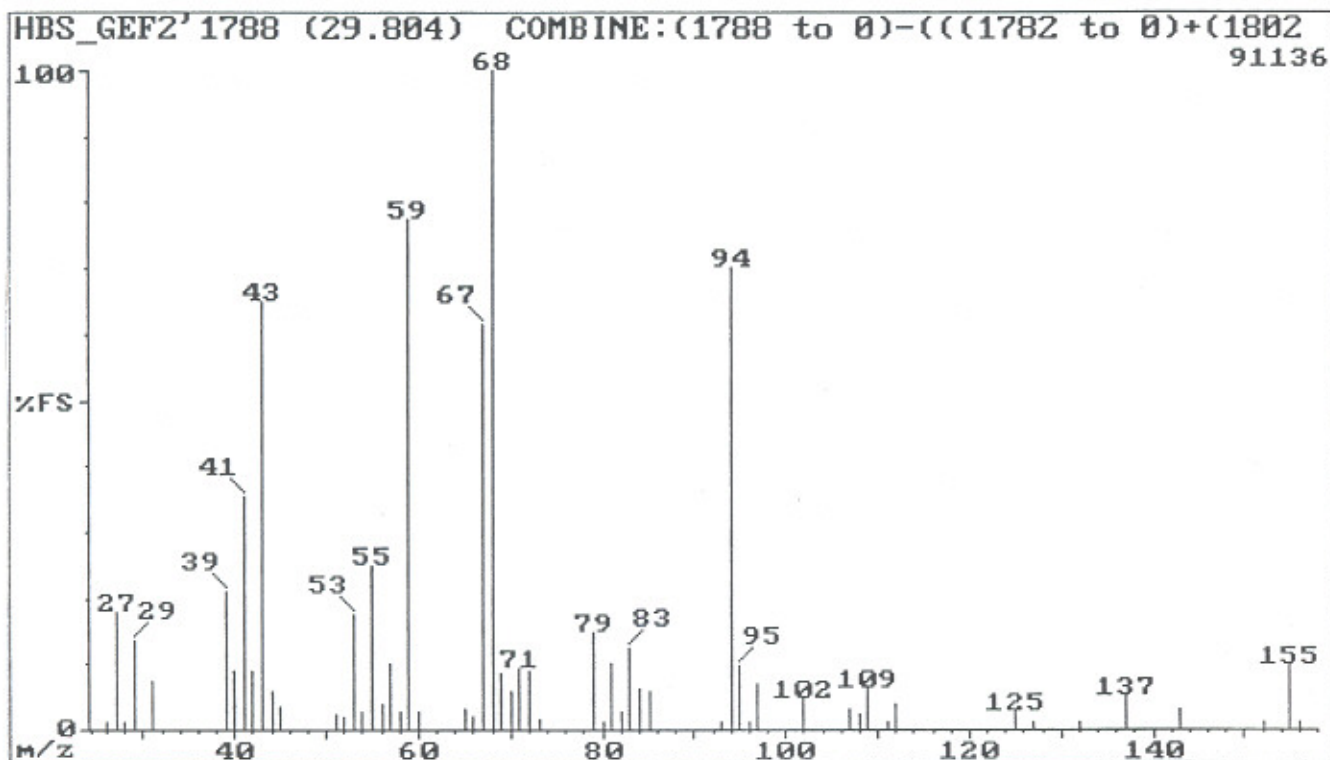


Fig. 2.76: EI-masspektrum van component F1788.

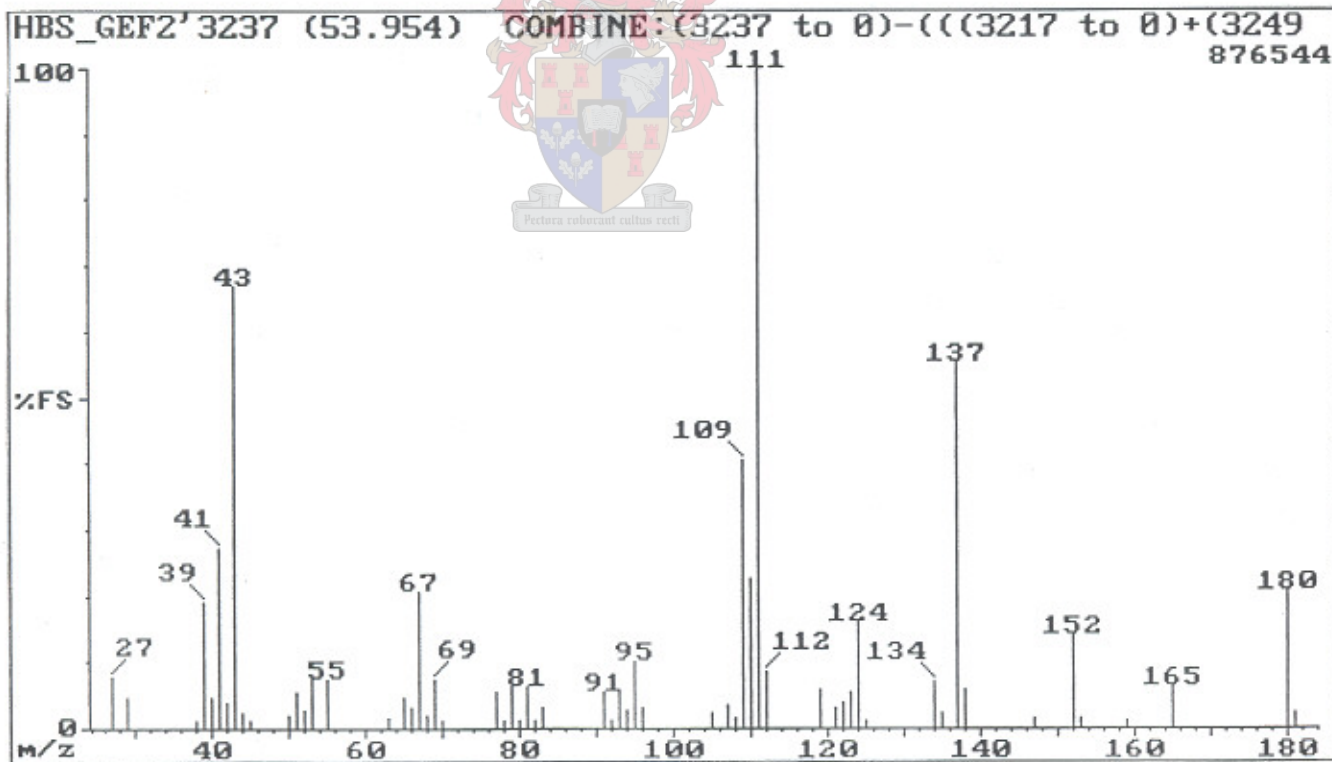


Fig. 2.77: EI-masspektrum van component F3237.

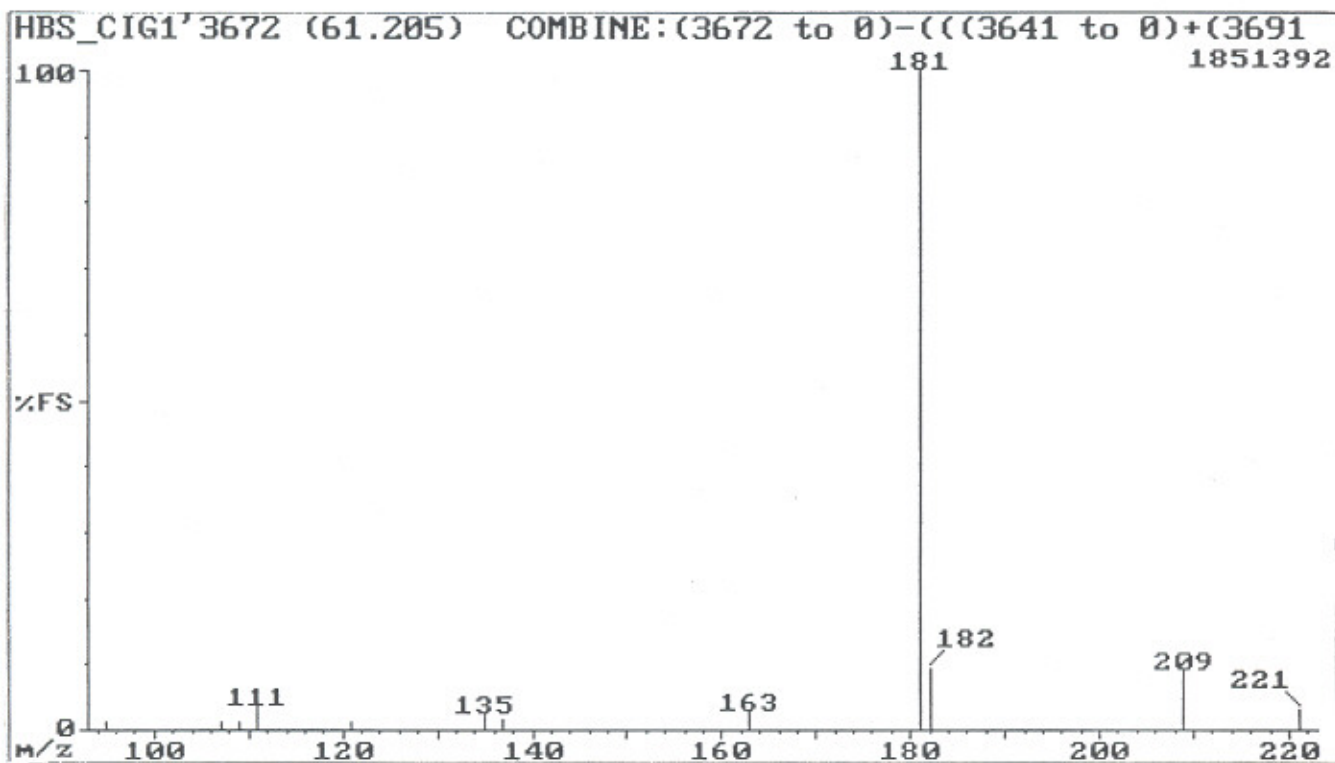


Fig. 2.77a: CI-masspektrum van component F3237.

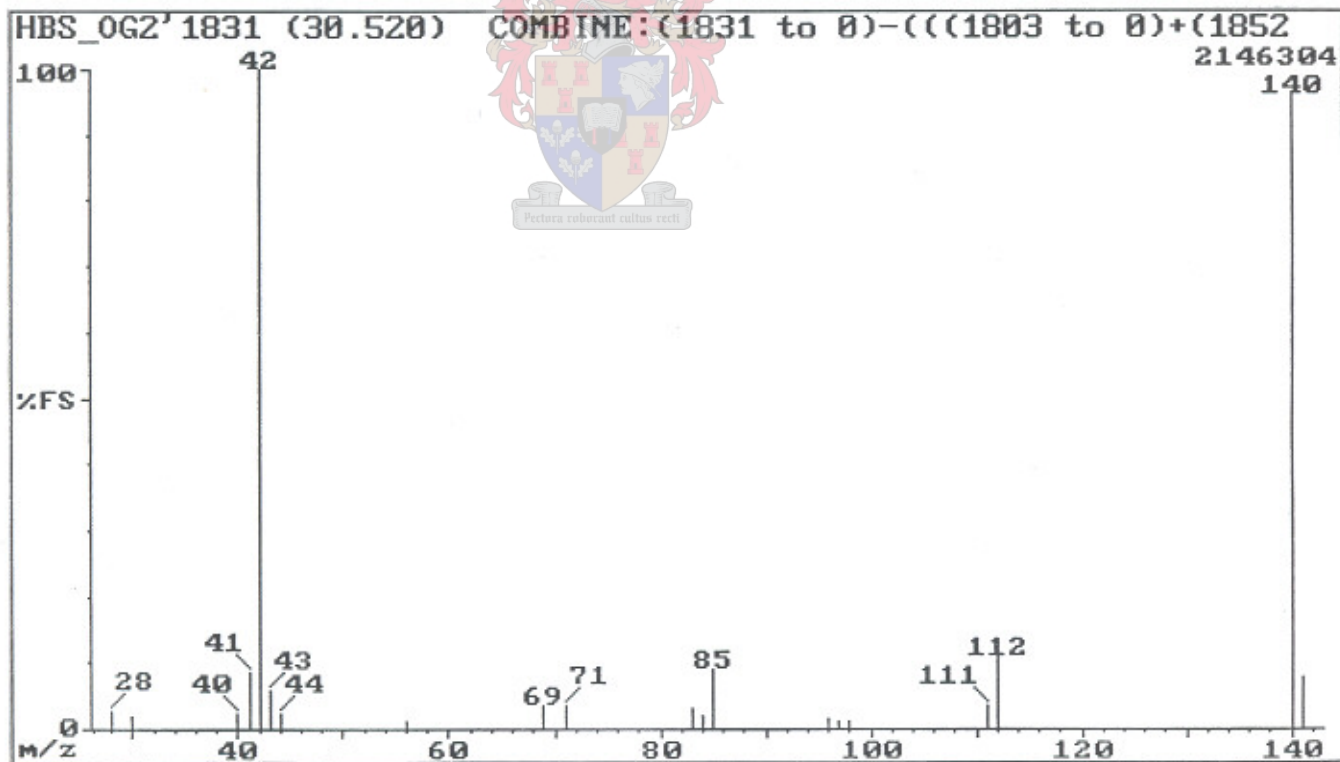


Fig. 2.78: EI-masspektrum van component U1831 (hexamethyleentetramien).



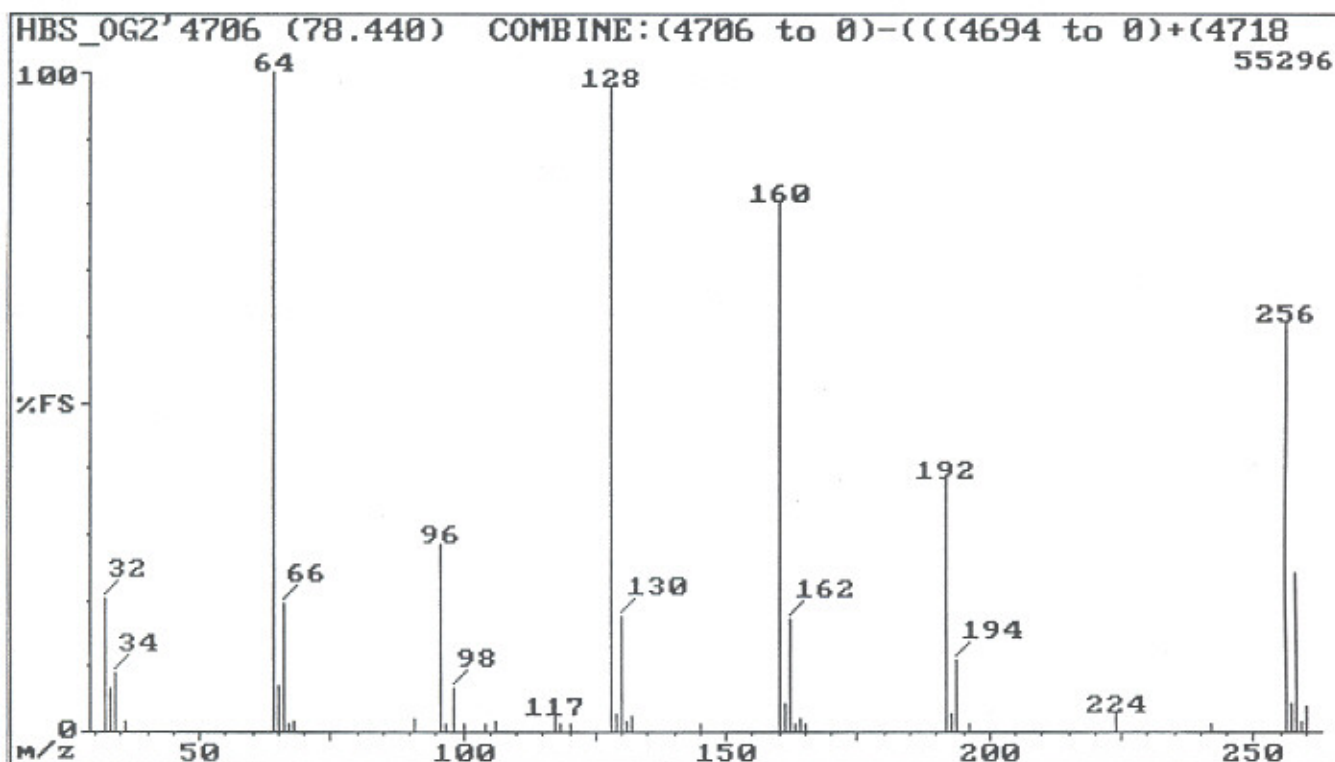


Fig. 2.79: EI-massaspektrum van component U4706 [elementêre swawel ( $S_8$ )].

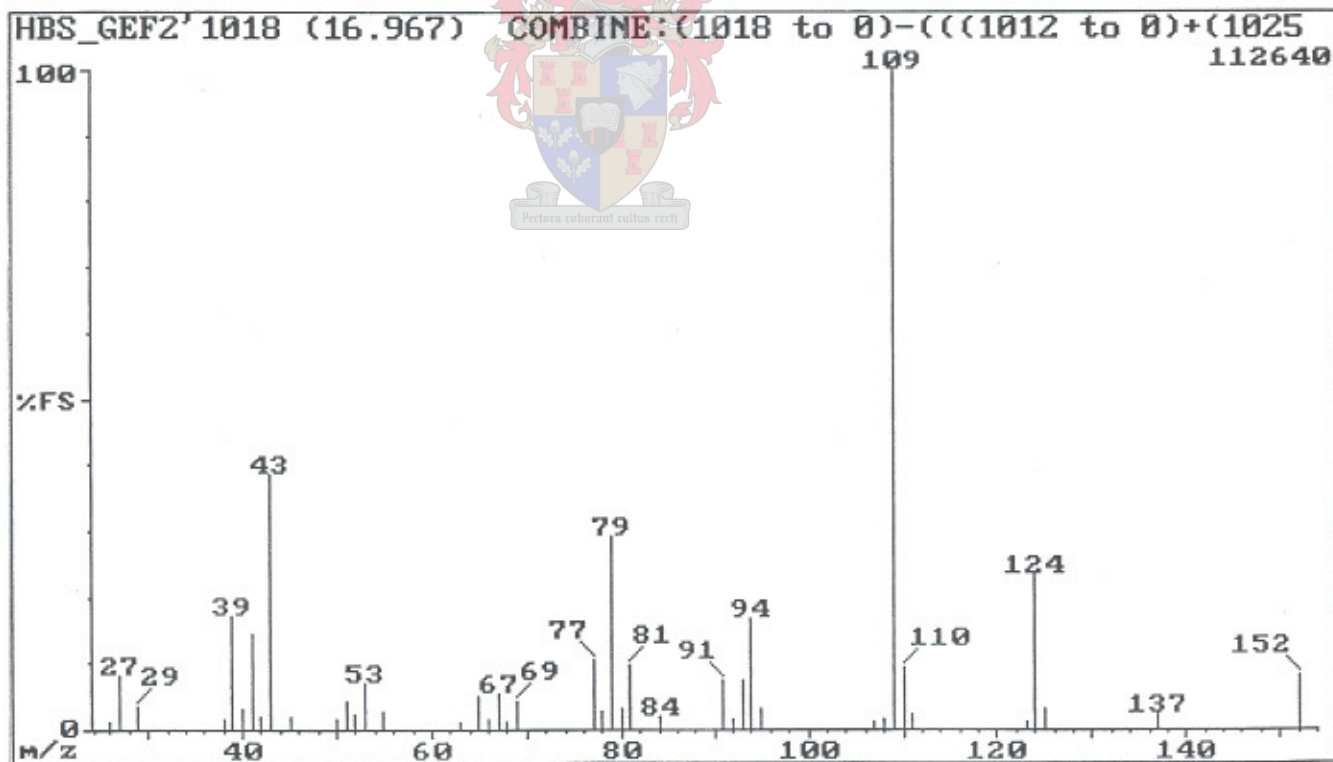


Fig. 2.80: EI-massaspektrum van component F1018

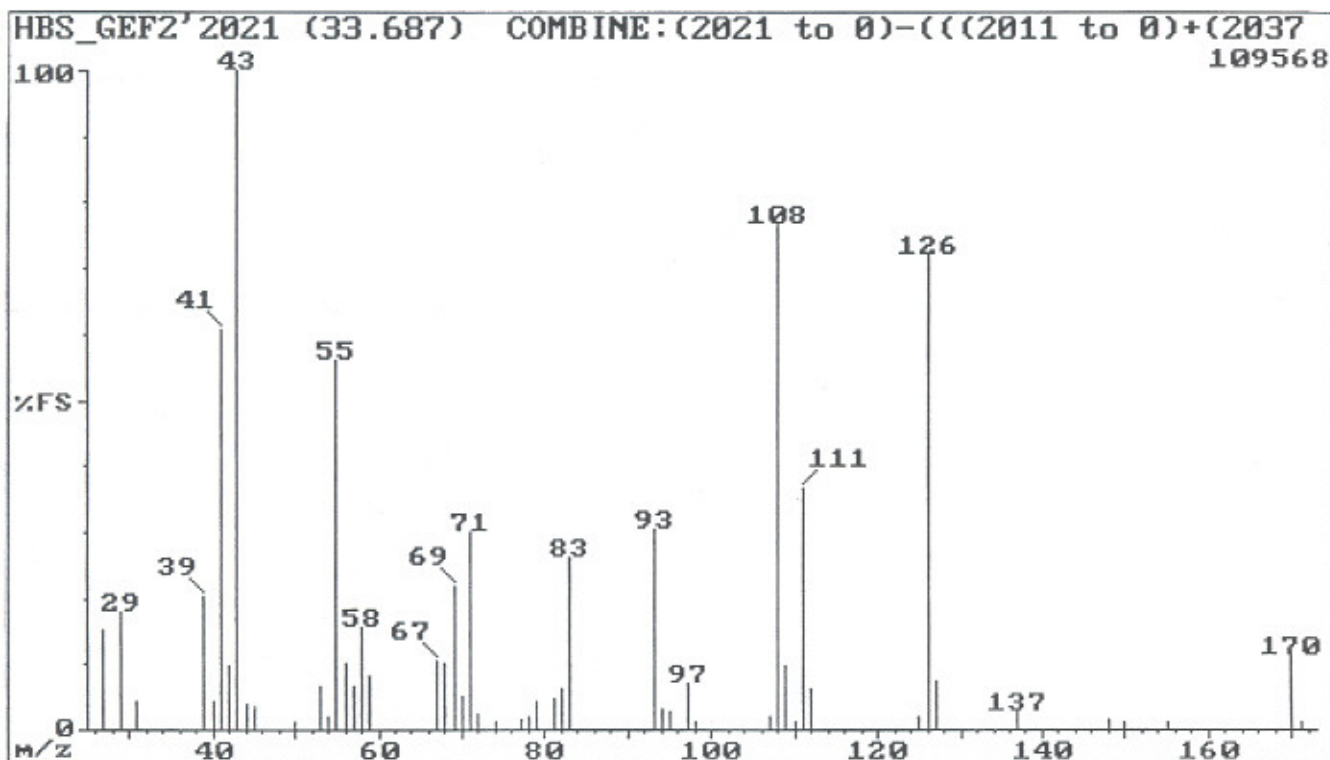


Fig. 81: EI-massaspektrum van component F2021.

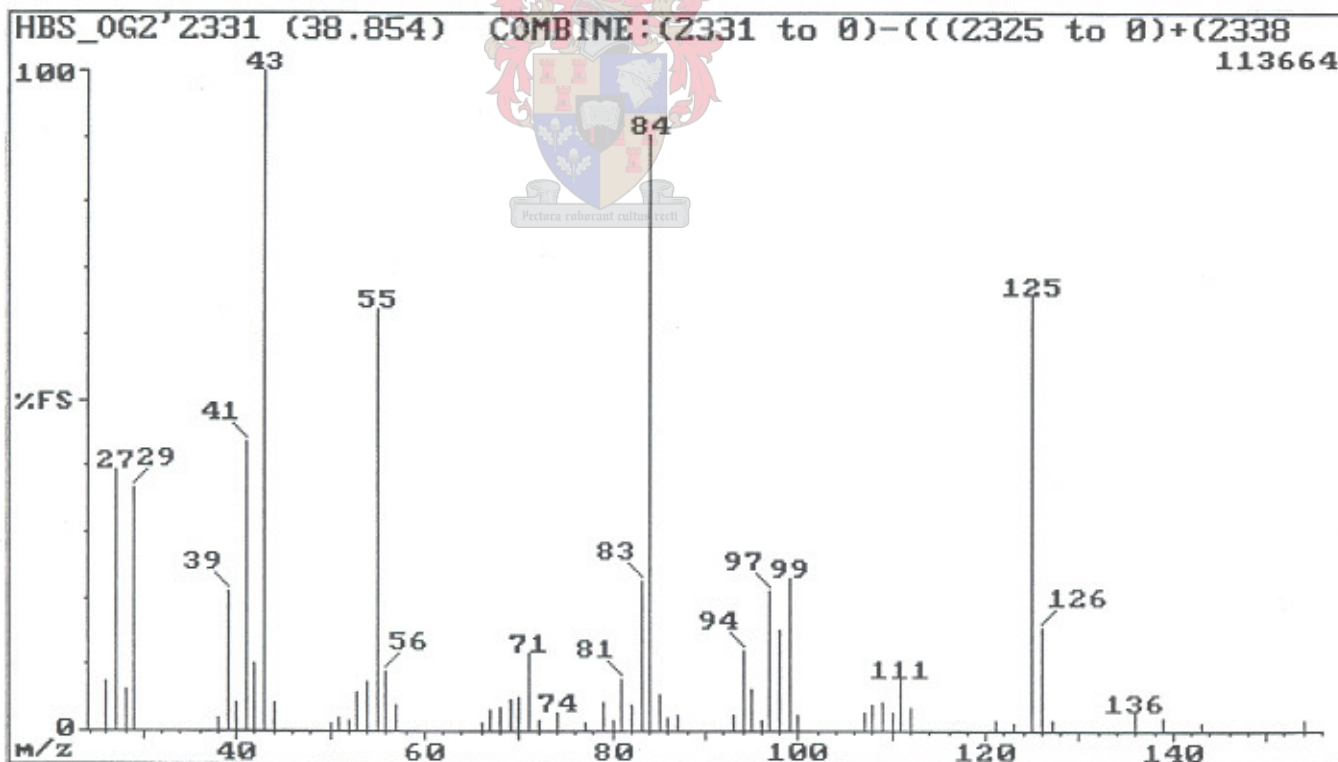


Fig. 2.82: EI-massaspektrum van component U2331.

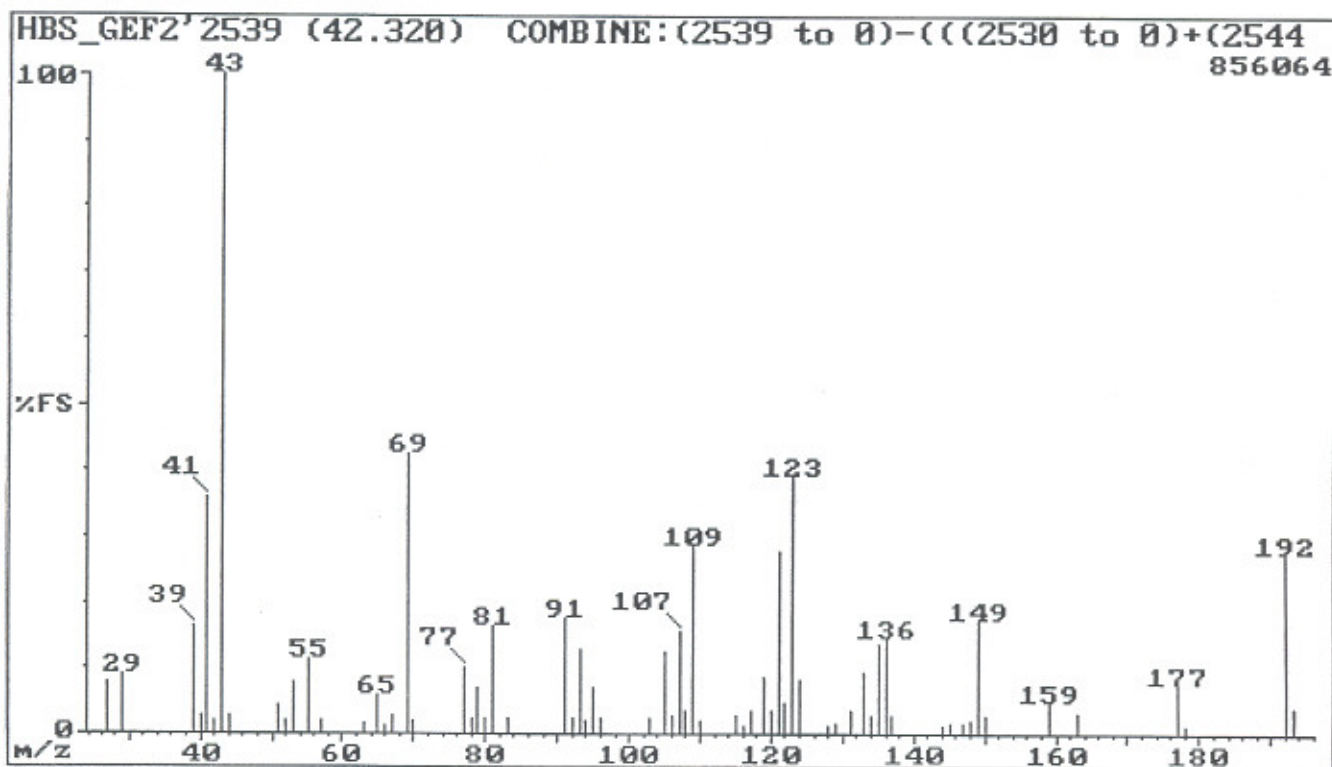


Fig. 2.83: EI-masspektrum van component F2539.

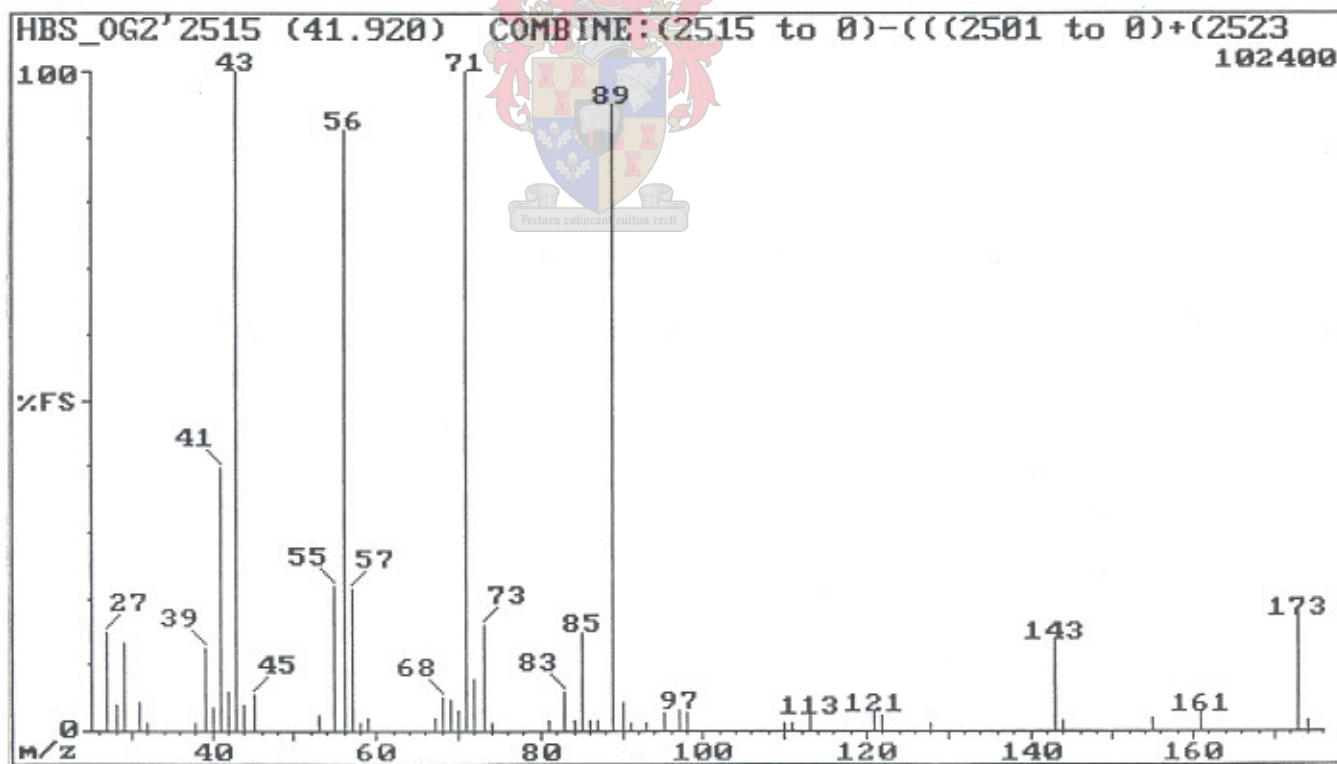


Fig. 2.84: EI-masspektrum van component U2515.

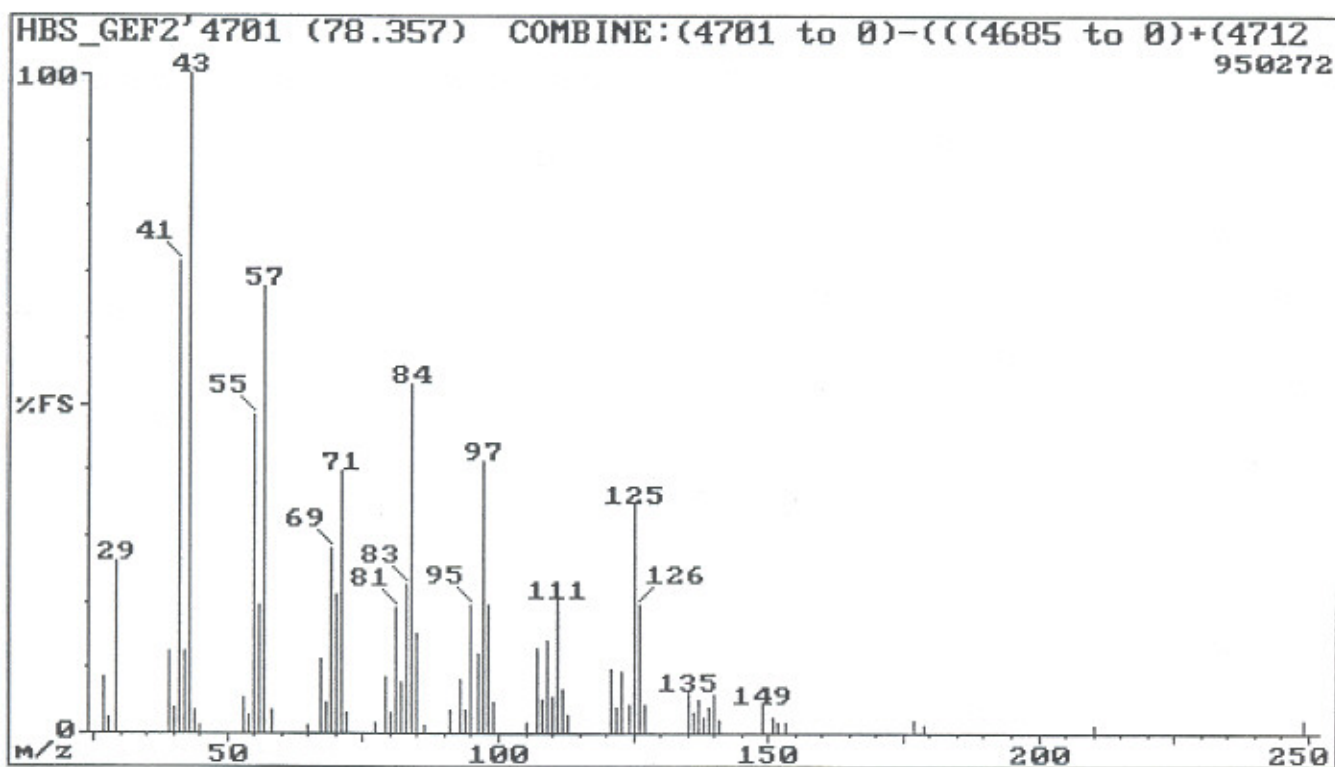


Fig. 2.85: EI-massaspektrum van component F4701.

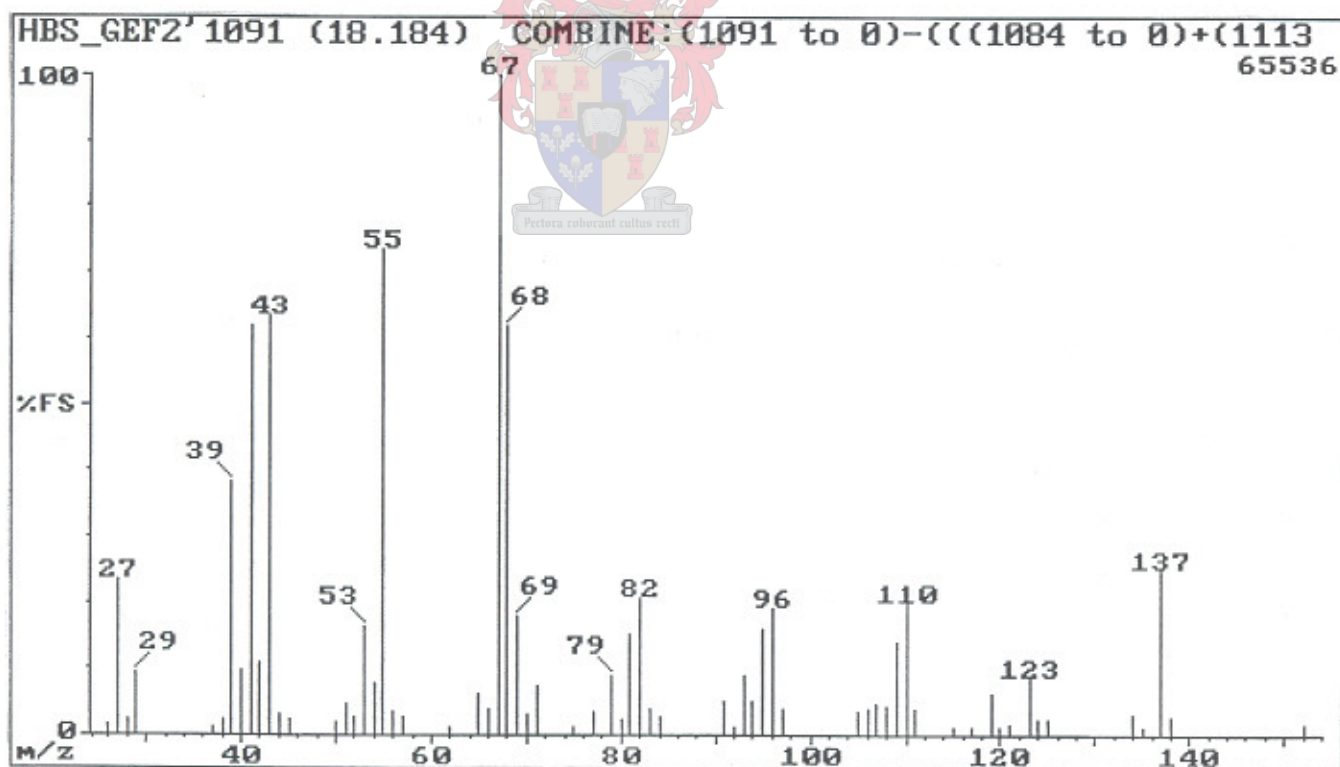


Fig. 2.86: EI-massaspektrum van component F1091.



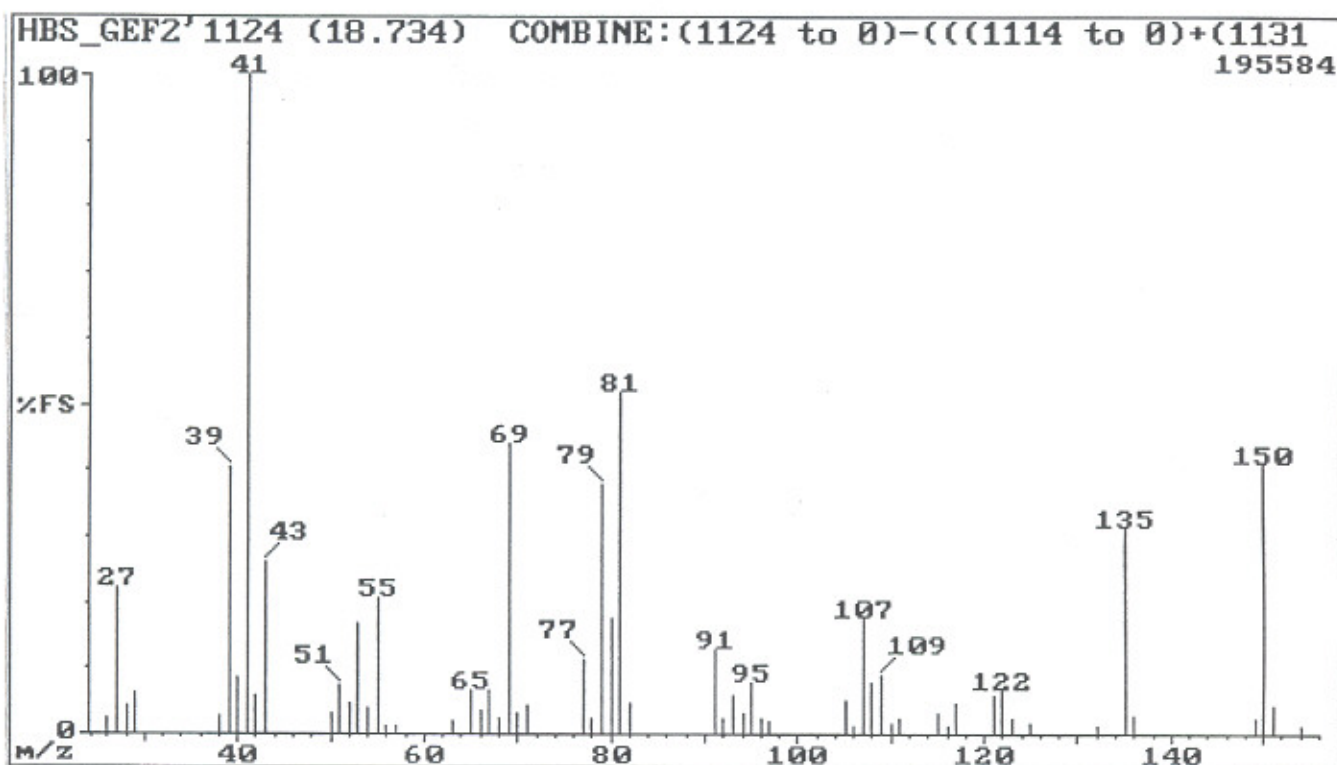


Fig. 2.87: EI-massaspektrum van component F1124.

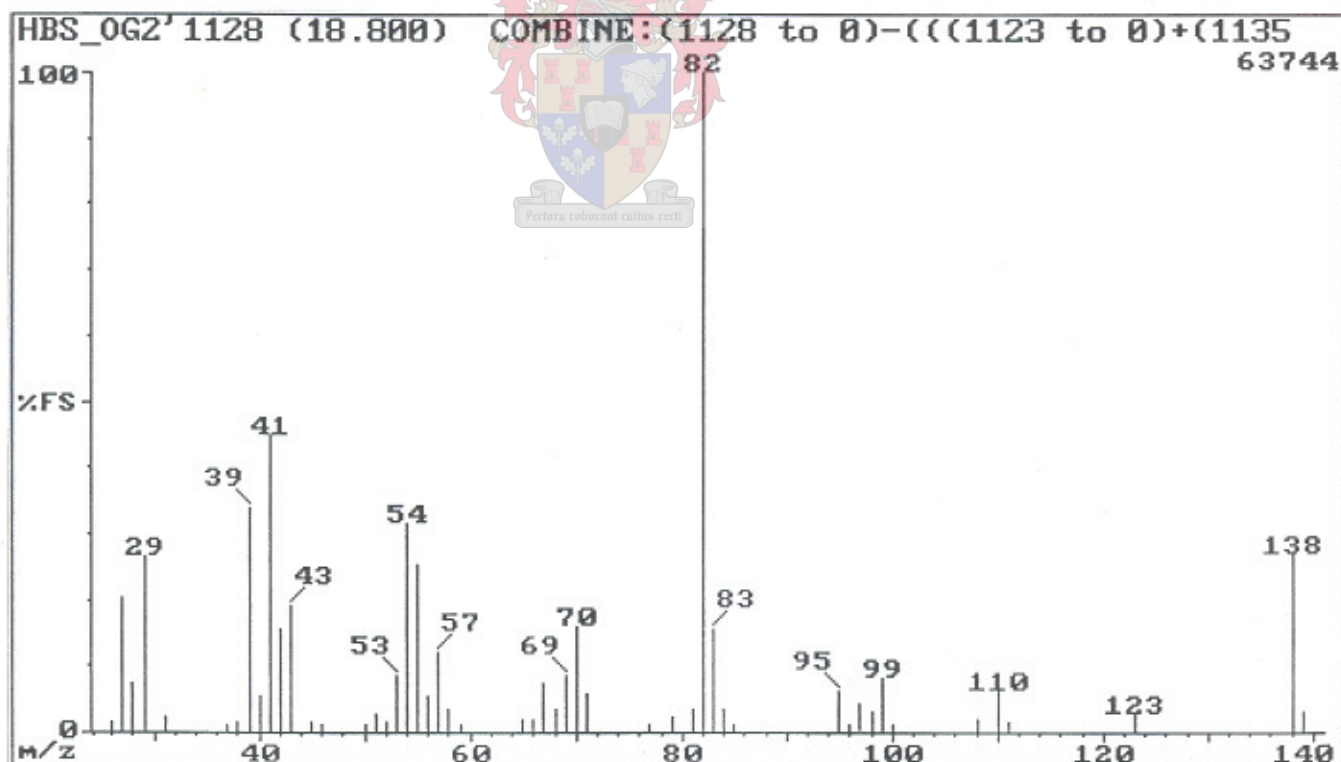


Fig. 2.88: EI-massaspektrum van component U1128.

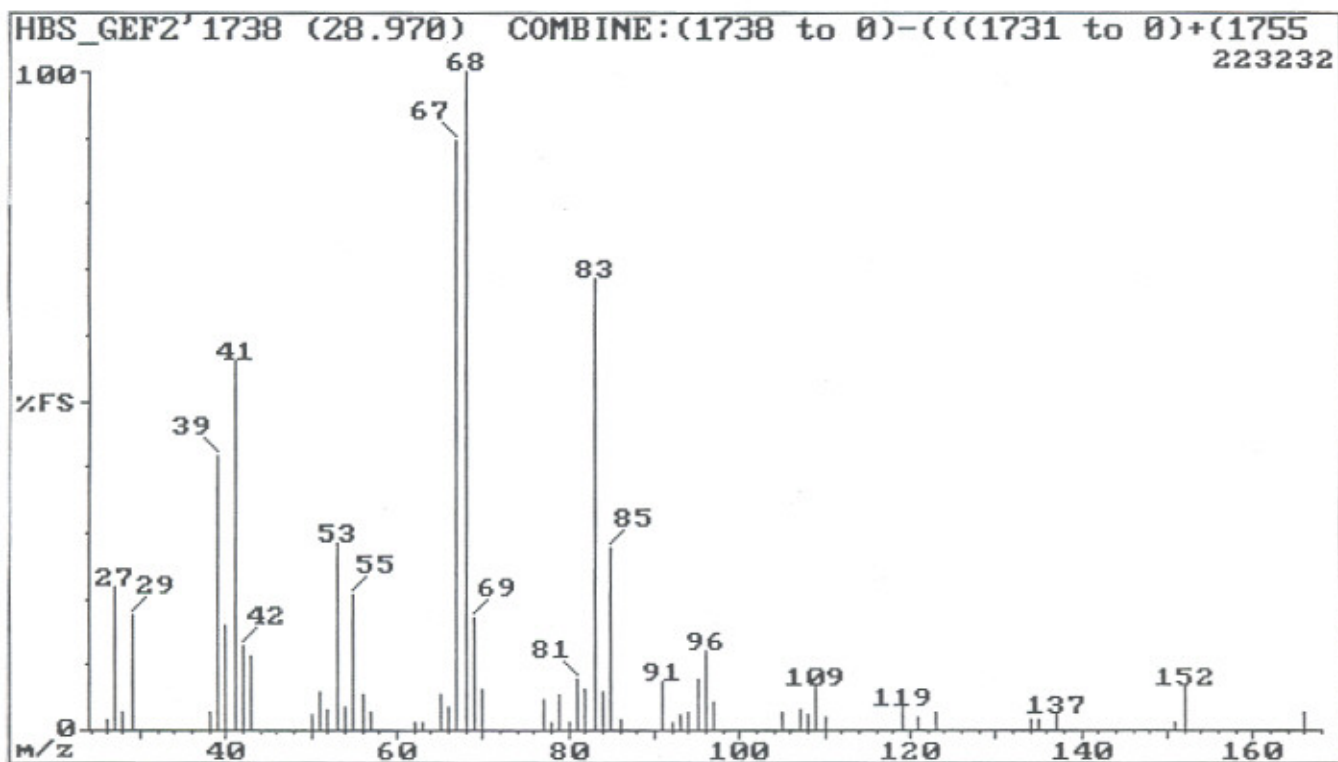


Fig. 2.89: EI-massaspektrum van component F1738.

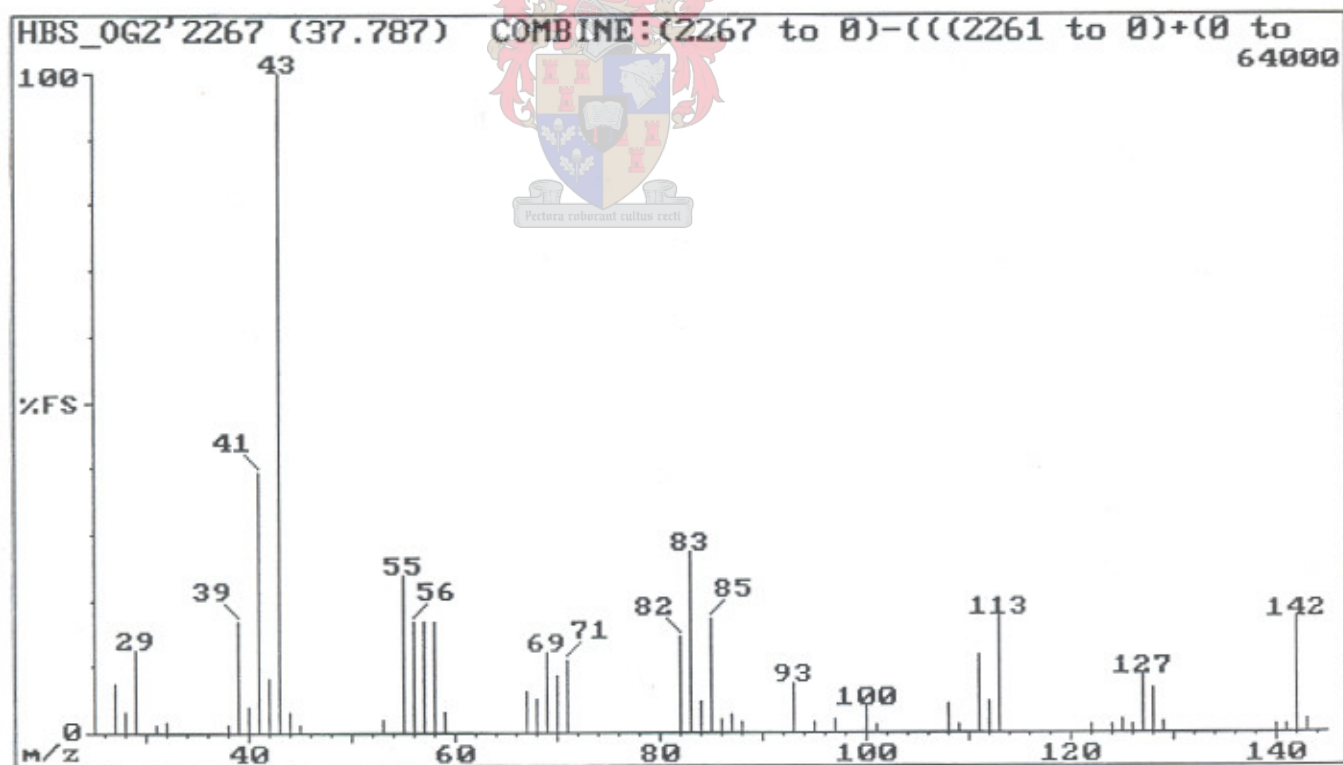


Fig. 2.90: EI-massaspektrum van component U2267.

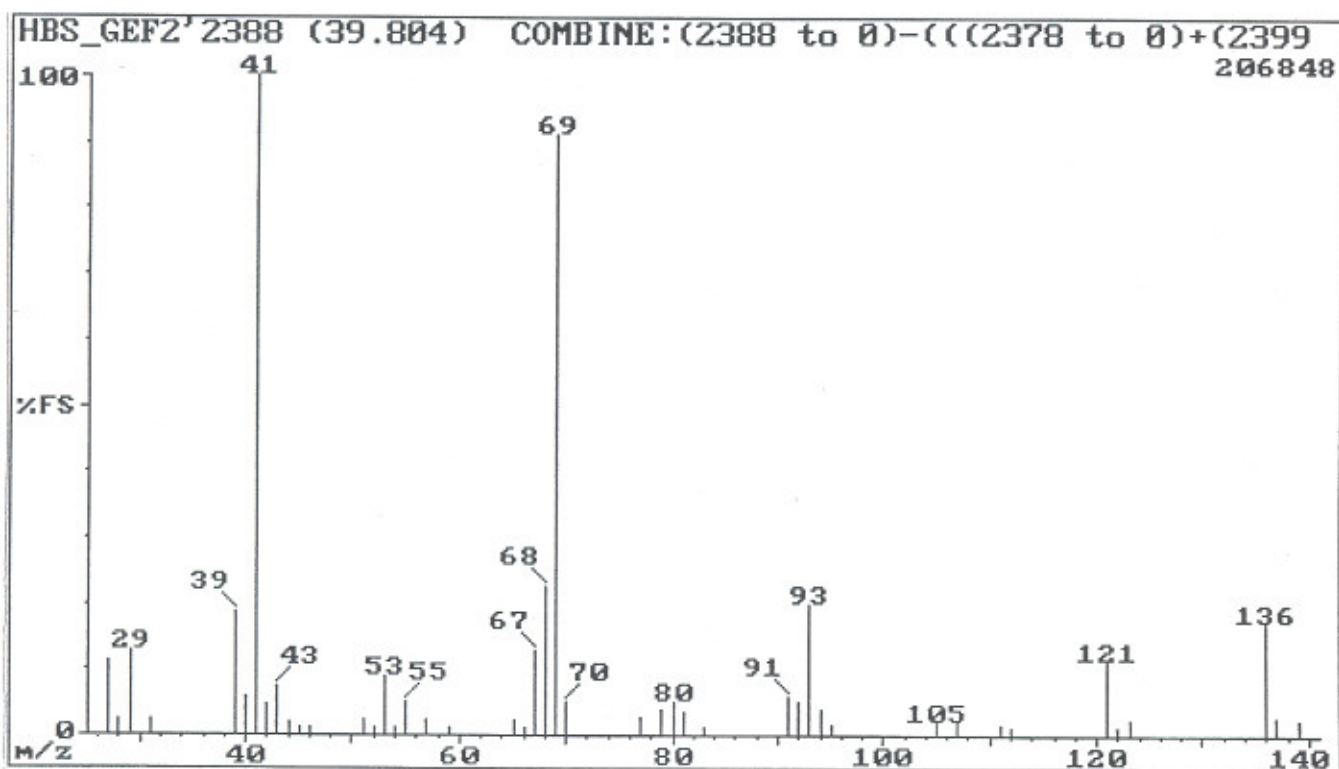


Fig. 2.91: EI-massaspektrum van component F2388.

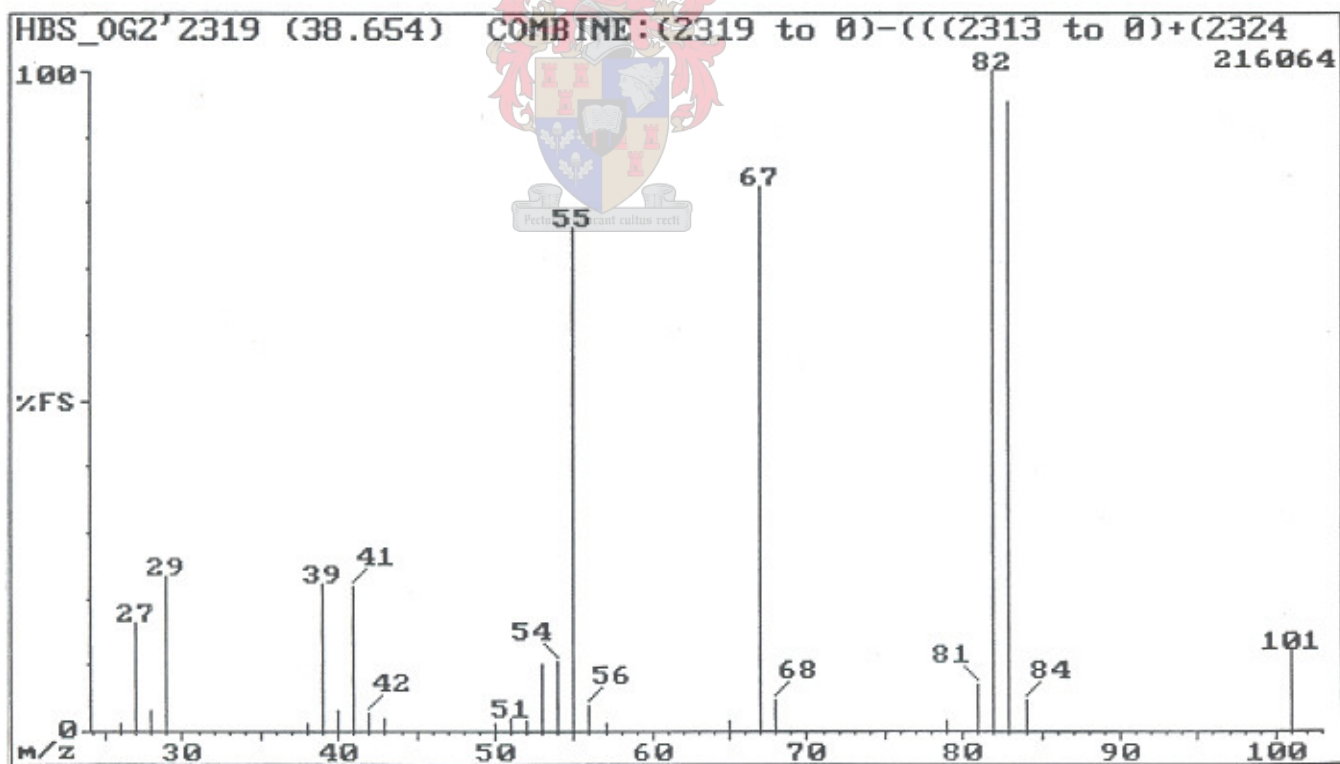


Fig. 2.92: EI-massaspektrum van component U2319.



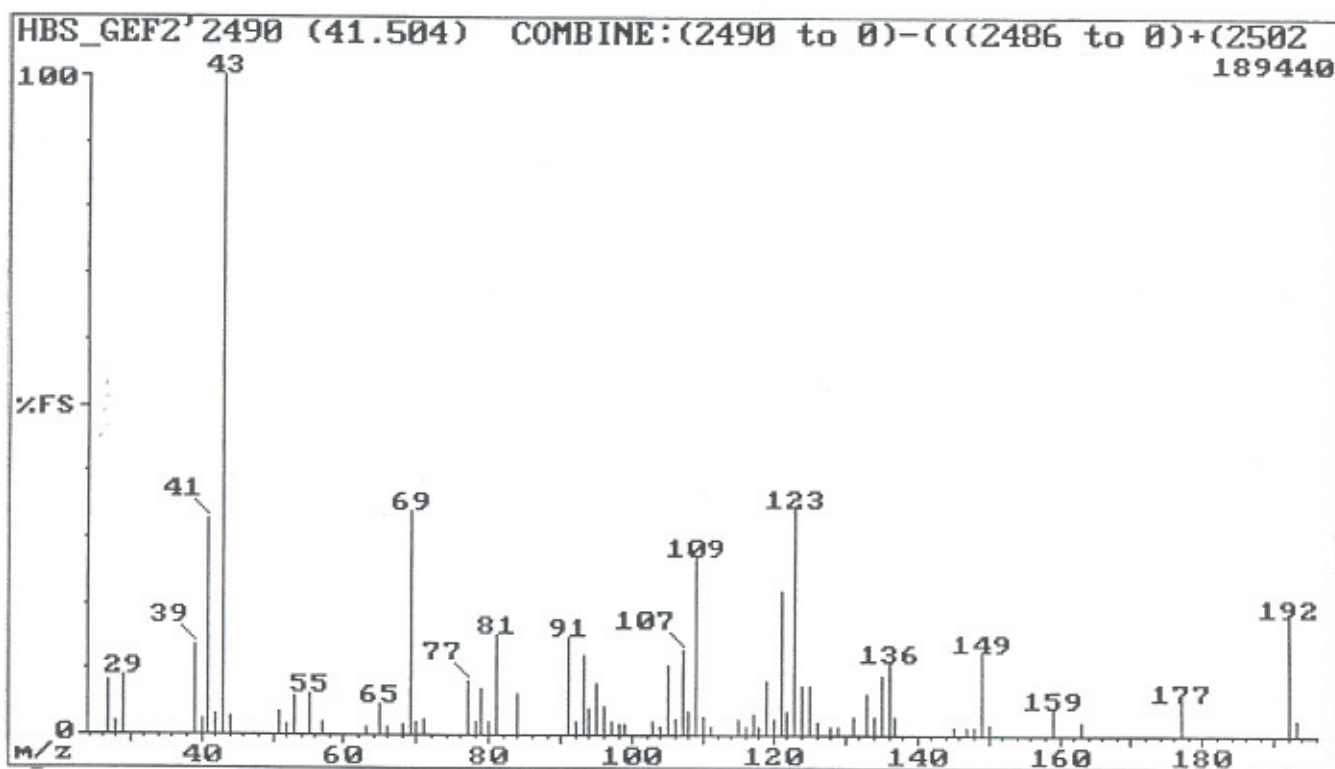


Fig. 2.93: EI-massaspektrum van component F2490.

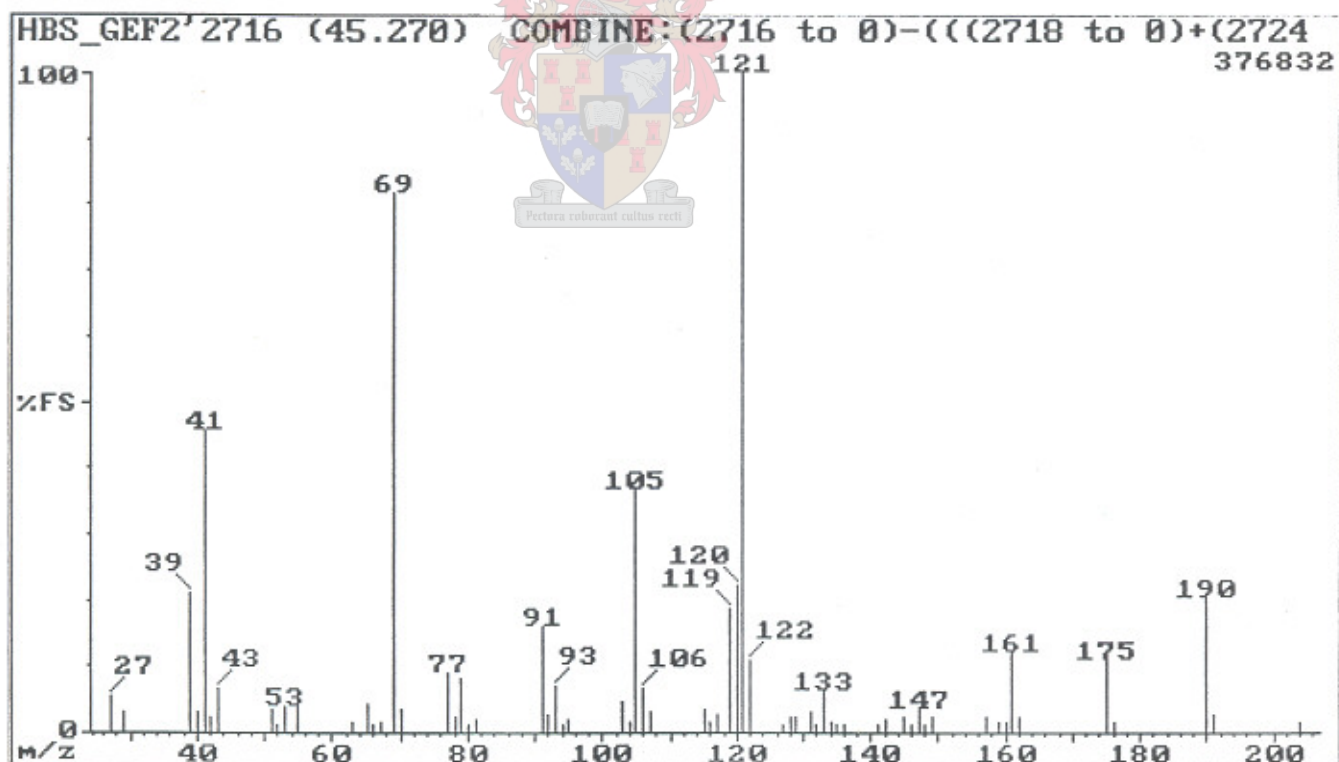


Fig. 2.94: EI-massaspektrum van component F2716

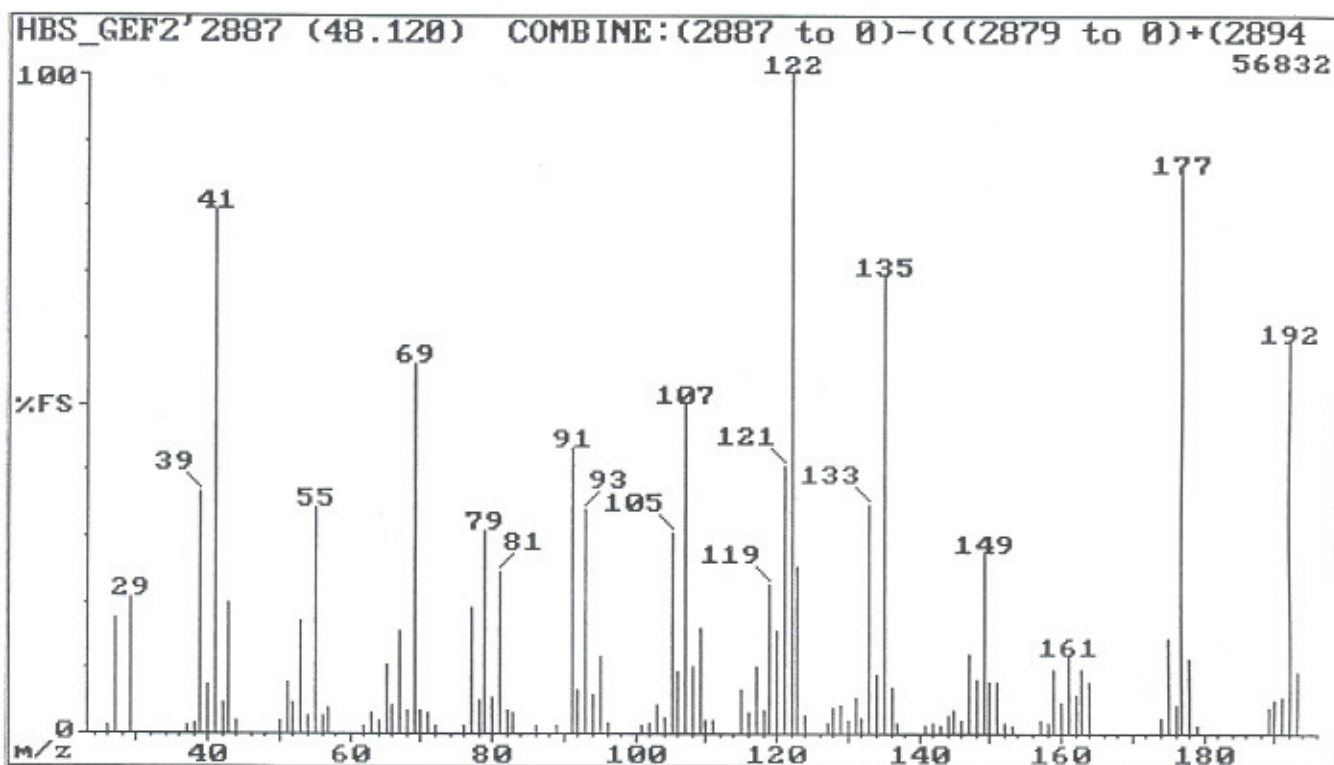


Fig. 2.95: EI-masspektrum van component F2887.

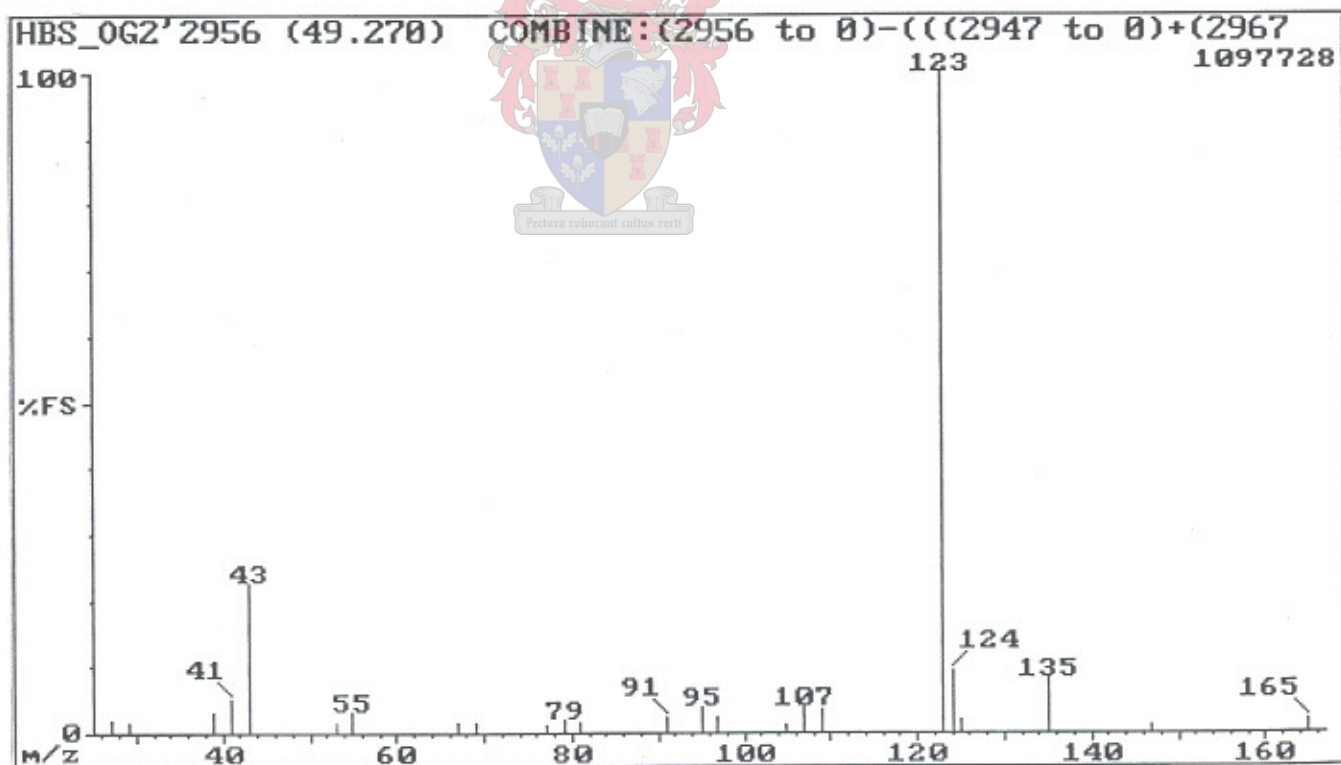


Fig. 2.96: EI-masspektrum van component U2956.

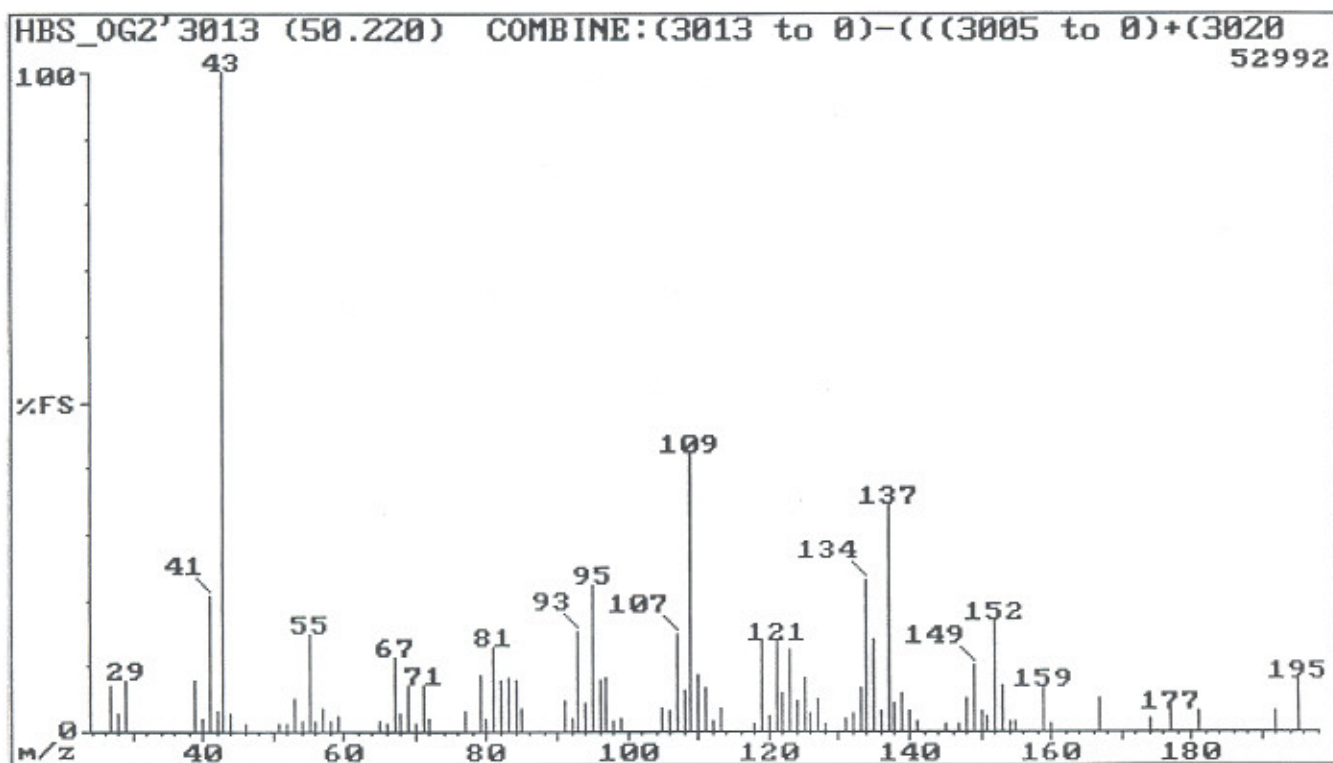


Fig. 2.97: EI-masspektrum van component U3013.

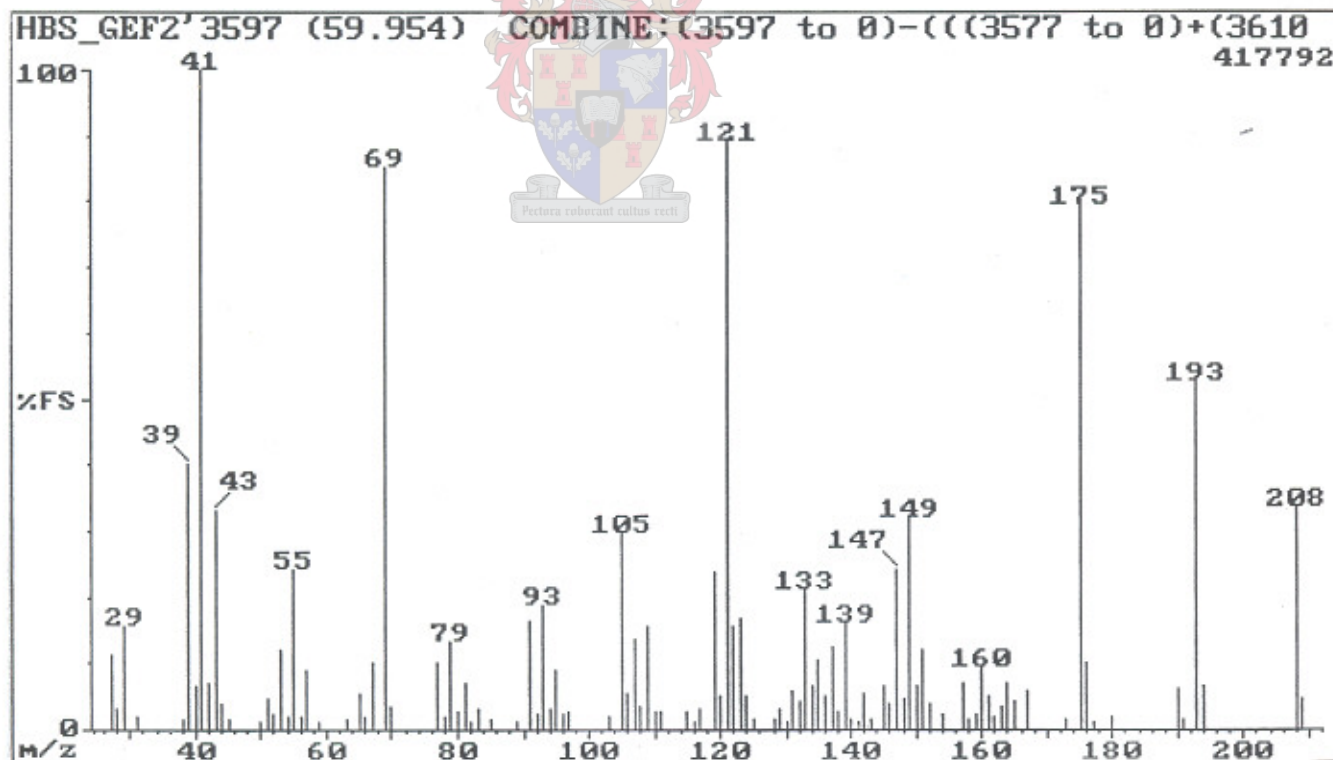


Fig. 2.98: EI-masspektrum van component F3597.

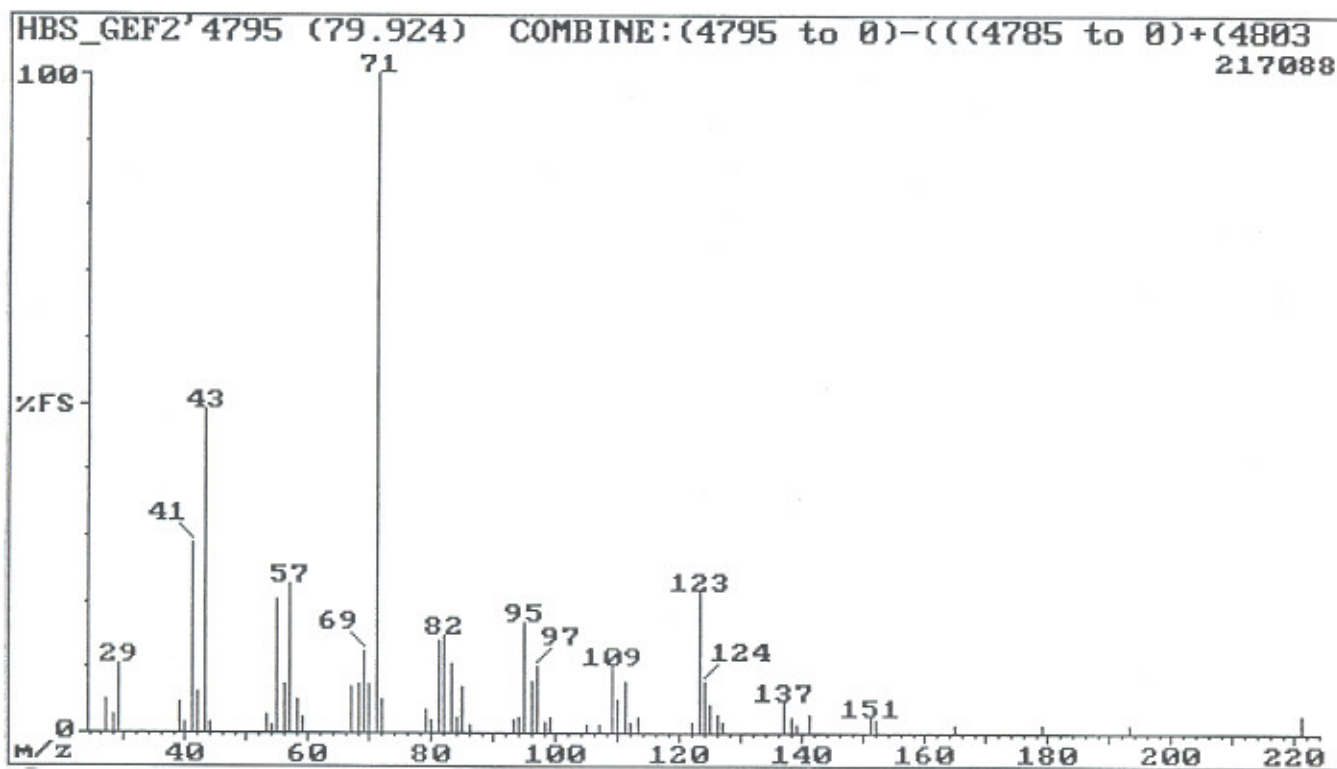


Fig. 2.99: EI-massaspektrum van component F4795.

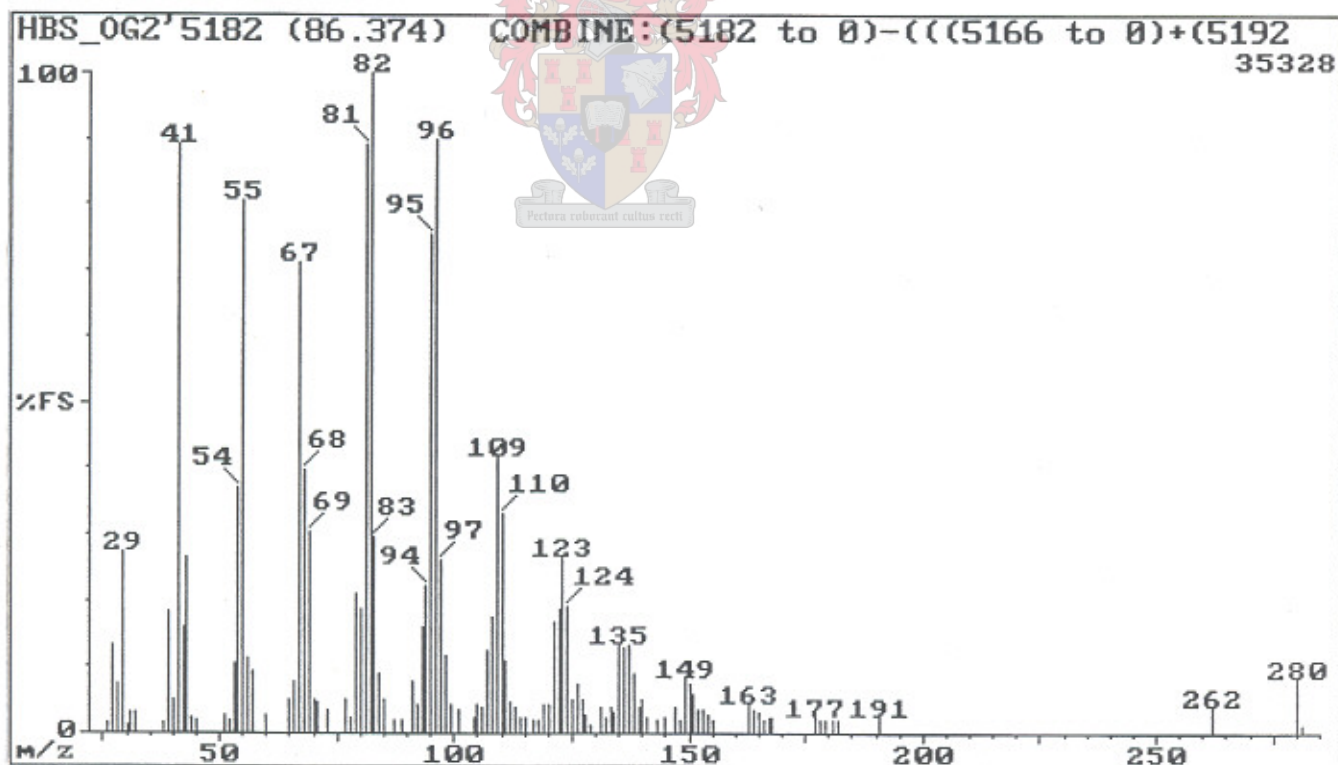


Fig. 2.100: EI-massaspektrum van component U5182.



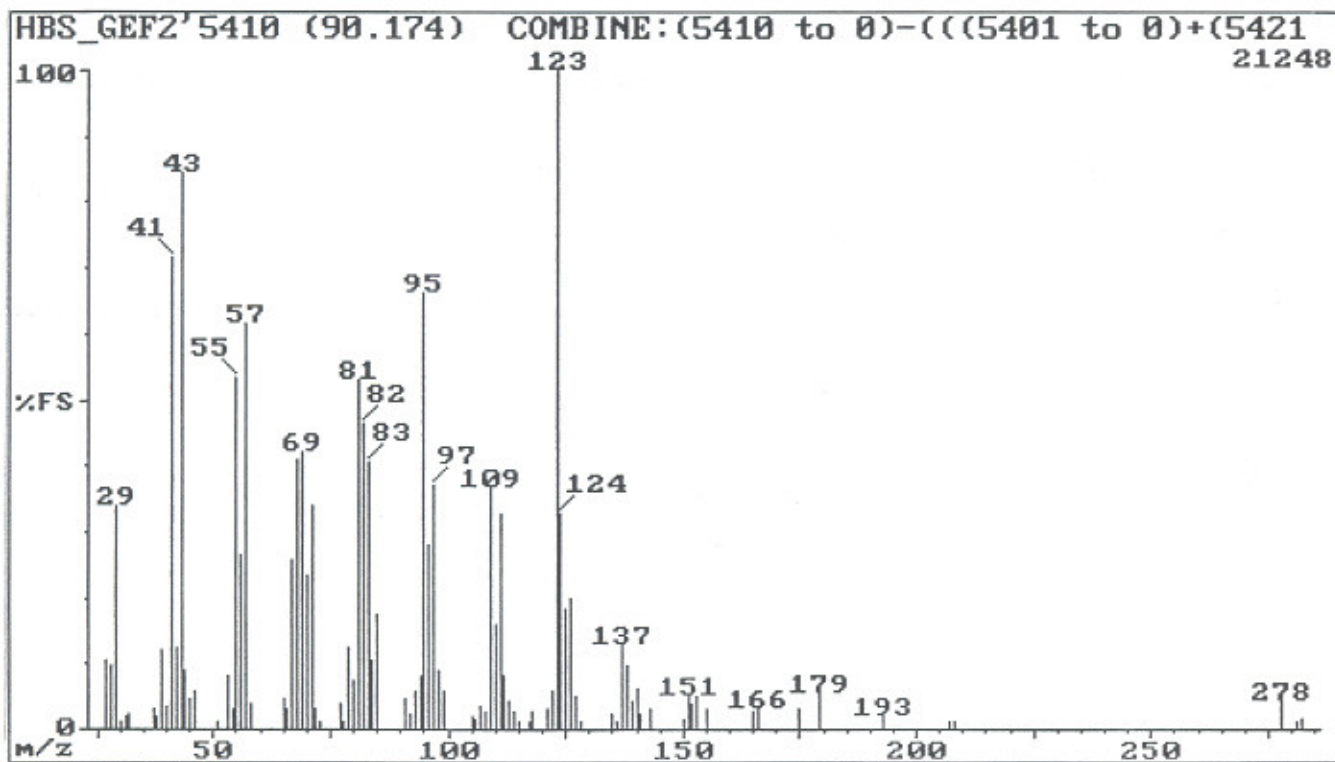


Fig. 2.101: EI-massaspektrum van component F5410.

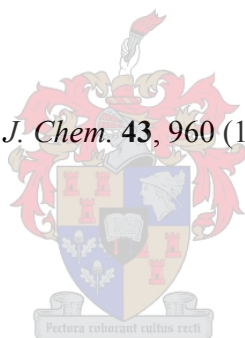


## 2.4 Verwysings

1. D.J. Pasto, C.R. Johnson, "Organic Structure Determination", Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs New Jersey, p. 266 (1969).
2. F.W. McLafferty, F. Tureck, "Interpretation of Mass Spectra", University Science Books, California, p. 226 (1993).
3. NBS Mass Spectrum Library, Lab- Base™ R 02.01, Hampden Data Services Ltd. (1989).
4. G. Holzer, W. Bertsch, "Interpretation of Mass Spectra: Course Manual", Kursus aan die Universiteit van Stellenbosch, p. 34 (1998).
5. Verwysing 1, p. 272.
6. Verwysing 2, p. 241.
7. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc, San Francisco, p. 99 (1967).
8. L. Dolejs, P. Beran en J. Hradec, *Org. Mass Spec.* **1**, 565 (1968).
9. Verwysing 2, p. 76.
10. T.A. Lee, "A beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation", John Wiley and Sons, New York, pp.19-21 (1998).
11. Verwysing 2, pp. 244, 245.
12. Verwysing 7. p.237.
13. Verwysing 7, pp. 238-241.
14. Verwysing 7, p. 247.
15. Verwysing 2, pp. 247-248.
16. D. Slade, "Olfactory communication: Chemical Characterization of the Interdigital Secretion of the Black Wildebeest, *Connochaetes gnou*", Ph.D. Thesis, Stellenbosch University, p. 46 (2000).
17. Verwysing 7, p. 131.
18. Verwysing 2, p. 204.
19. A.G. Sharkey (jr.), J.L. Shultz en R.A. Friedel, *Anal. Chem.* **28**, 934 (1956).
20. R.J. Liedtke en C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 81 (1969).
21. J.H. Beynon, "Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry", Elsevier, Amsterdam, p. 294 (1960).

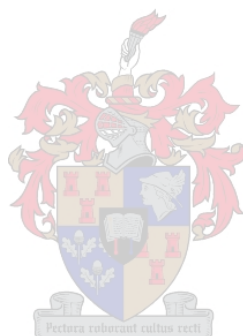


22. A.G. Harrison, *Org. Mass Spectrom.* **3**, 594 (1970).
23. Verwysing 7, p. 134.
24. Verwysing 7, p. 135.
25. C. Fenselau, A. Baum en D. Cowans, *Org. Mass. Spec.* **4**, 226 (1970).
26. Verwysing 2, p. 250.
27. J.R. Dias, M. Sheikh en C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (iss 2), 473 (1972.).
28. Verwysing 2, p. 249.
29. Verwysing 2, p. 146.
30. Verwysing 7, p. 214.
31. A. Macoll, *Org. Mass Spec.* **23**, 381 (1988).
32. Verwysing 4, p. 142.
33. Verwysing 7, p. 176.
34. Verwysing 2, p. 252.
35. Verwysing 2, pp. 195, 254.
36. Verwysing 7, 183.
37. A.G. Harrison en E.G. Jones, *Can. J. Chem.* **43**, 960 (1965).
38. Verwysing 7, p. 184.
39. Verwysing 2, p. 255.
40. Verwysing 7, pp. 617-618.
41. Verwysing 7, p. 205.
42. Verwysing 2, p. 230.
43. H. Budzikiewicz, C. Djerassi en D.H. Williams, "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Holden-Day Inc., San Francisco, p. 141 (1964).
44. Verwysing 43, p. 142.
45. Verwysing 2, p. 70.
46. Verwysing 43, p. 147.
47. M.G. Moshonas en E.D. Lund, "The Mass Spectra of Sesquiterpene Hydrocarbons", *The Flavour Industry*, 375-378, (June 1970).
48. NIST Mass Spectral Search Program, Version 1.5, Standard Reference Data Program of The National Institute of Standards and Technology (1996).
49. W. Benz en K. Biemann, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2375 (1964).
50. S. Meyerson en L.C. Leitch, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2555 (1964).





51. C.G. Macdonald, J.S. Shannon en G. Sydowdz, *Tetrahedron Lett.* 807 (1963).
52. W.H. McFadden, D.R. Black en J.W. Corse, *J. Phys. Chem.* **67**, 1517 (1963).
53. F.W. McLafferty, "Interpretation of Mass Spectra", W.A. Benjamin Inc., Philippines, p. 63 (1973).
54. Verwysing 7, pp. 111-112.
55. Verwysing 2, p. 251.
56. Verwysing 43, p. 265.
57. Verwysing 43, pp. 270-271.
58. Verwysing 2, p. 263.



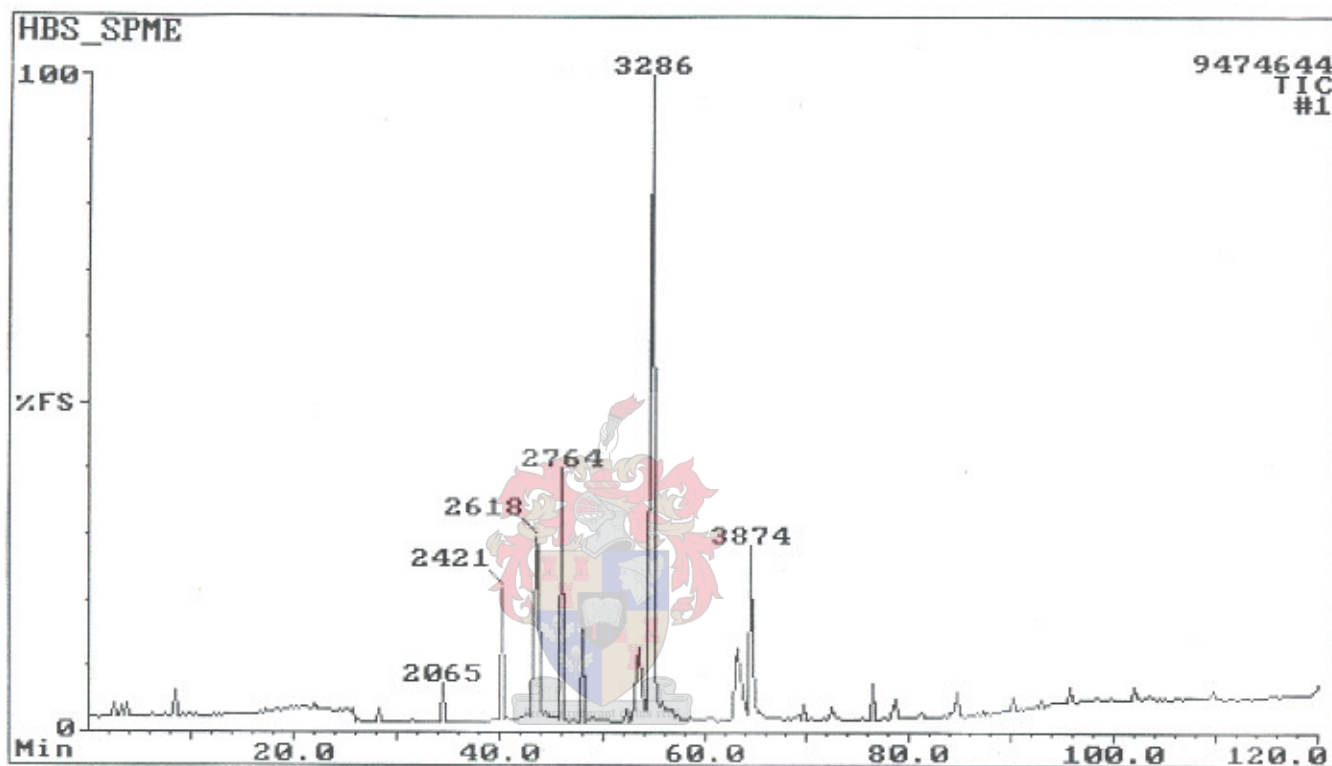
# RESULTATE EN BESPREKING

### 3.1 Oorsig oor monsterverrykingstegnieke

Vastefase-mikroëkstraksie (“solid phase microextraction”, SPME) is ‘n oplosmiddelvrye monsterverrykingstegniek wat gebruik word om die vlugtige organiese verbindings (VOVs) uit die bodamp van gas-, vloeistof- of vastestofmonsters te ekstraheer, waarna die VOVs gedesorbeer word in die inlaat van ‘n GC-of GC-MS-sisteem [1]. Hierdie tegniek word al vir meer as ‘n dekade gebruik om ‘n wye verskeidenheid monstertipes, insluitende voedsel en drank, te analiseer [2]. Die vlugtige verbindings in die bodamp van die droë plantmateriaal van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos is met die SPME-tegniek verryk vir 15 uur by 40° C, maar het TICs gegee met slegs ‘n klein aantal waarneembare pieke met lae intensiteite en swak massaspektra. Hierdie swak resultate, as gevolg van onvoldoende sensitiwiteit, is ‘n tekortkoming van hierdie tegniek en is die gevolg van die ongunstige verhouding van die klein volume sorbeerde materiaal van die klein vesels tot die groot volumes van die matriks waaruit die VOVs geëkstraheer moet word [2]. Die interpretasie van die massaspektra is hierdeur bemoeilik en die gerekenariseerde massaspektra-biblioteek waarmee die eksperimentele data vergelyk word, kon nie suksesvol gebruik word nie. Baltussen *et al.* [3] het ‘n tegniek ontwikkel wat die sensitiwiteit van sorptiewe monsterverrykingstegnieke verhoog. Hierdie “stir-bar sorptive extraction”-tegniek (SBSE) behels die verryking van analiete uit vloeistof- of gasmonsters in ‘n lagie rubber om ‘n magneetroerder. Aangesien die volume van die sorptiewe materiaal waarin die vlugtige verbindings kan sorbeer aansienlik groter is as dié wat in die SPME gebruik word, is die sensitiwiteit van hierdie metode baie hoër as dié van die laasgenoemde tegniek. Die gebruik van ‘n groter volume sorptiewe materiaal het egter ook tot gevolg dat die volledige termiese desorpsie van die vlugtige verbindings nie so vinning plaasvind soos met die SPME-tegniek nie. Om hierdie probleem op te los, moet kriofokussering aangewend word om die analietbande op die kolom te fokus sodat gaschromatogramme met goeie skerp pieke verkry kan word. Ongelukkig dra die gesofistikeerde kriofokusseringsapparaat daartoe by dat dit ‘n baie duur tegniek is om te implementeer en dit is juis om hierdie rede dat die hoëkapasiteit SEP-tegniek (“sample enrichment probe”) in die Laboratorium

vir Ekologiese Chemie (LECUS) ontwikkel is. Hoewel eenvoudig, is dit bekostigbaar, veelsydig en sensitief [4, 5].

Alhoewel monsterverryking van die vlugtige verbindings in die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos met die SEP vir 100 uur by 40° C gedoen is, kan dit ook vir 15 uur by 40° C gedoen word en lewer dit steeds baie beter resultate as die SPME-verrykingstegniek (sien figure 3.1 en 3.2).



**Fig. 3.1:** Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die gefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genistoides*, opgeneem m.b.v die SPME-verrykingstegniek (15h verryking). Massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.

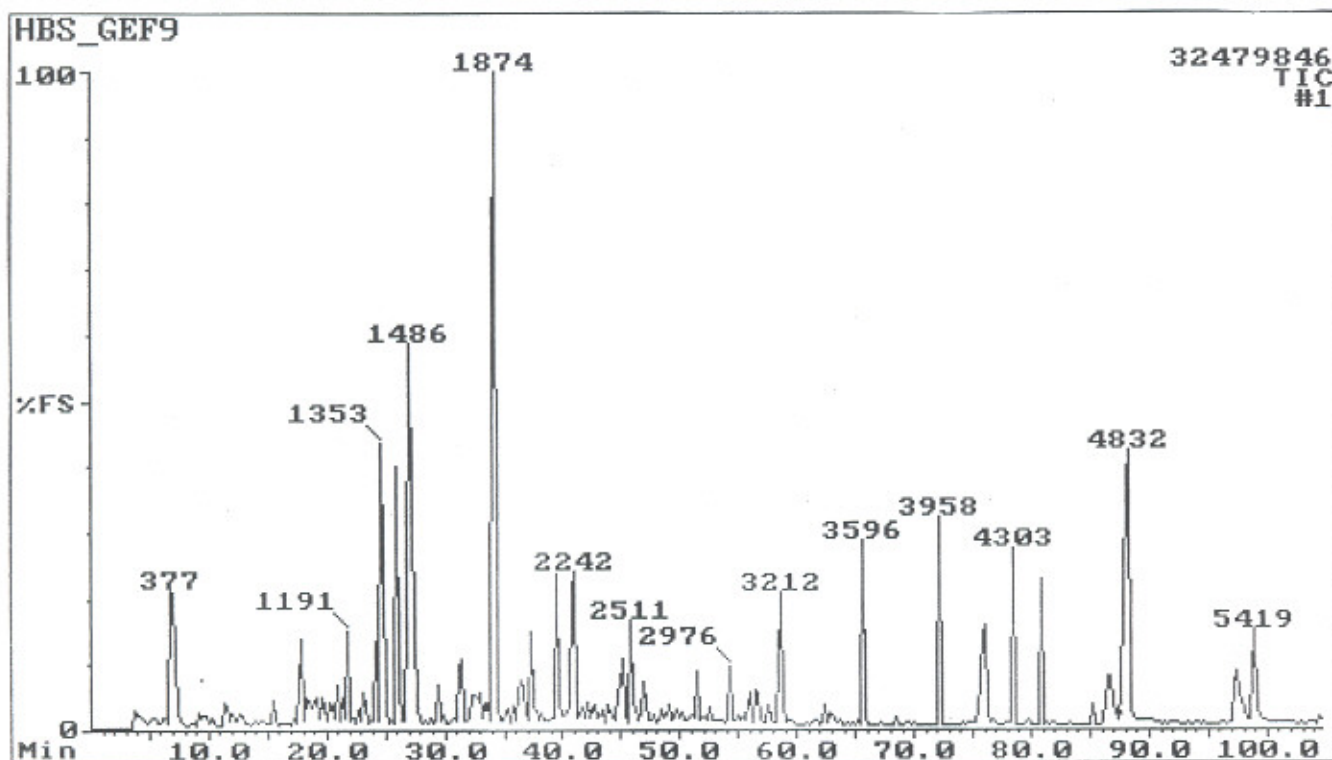


Fig. 3.2: Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die gefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genistoides*, opgeneem m.b.v die SEP-verrykingstegniek (15h verryking). Massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.

### 3.2 Vergelyking van die verbindings teenwoordig in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos

Die verbindings wat in hierdie ondersoek geïdentifiseer is, verskyn in Tabel 2.2 waarna in hierdie bespreking verwys sal word. Die totale ionchromatogramme van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos (Fig. 2.1 en 2.2), wat reeds in Hoofstuk 2 verskyn het, word weer in hierdie hoofstuk ingesluit.

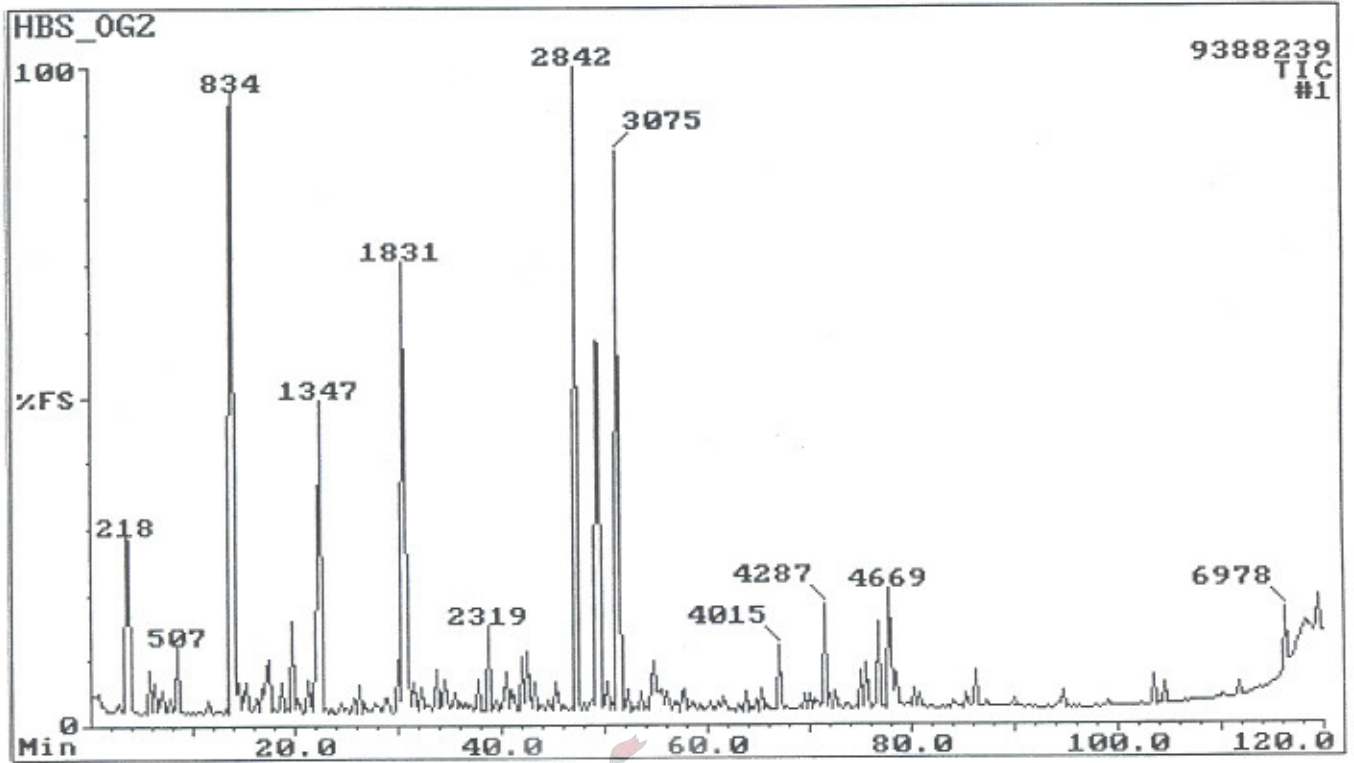


Fig. 2.1: Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die ongefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genisoides*. Die gaschromatografiese en massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.



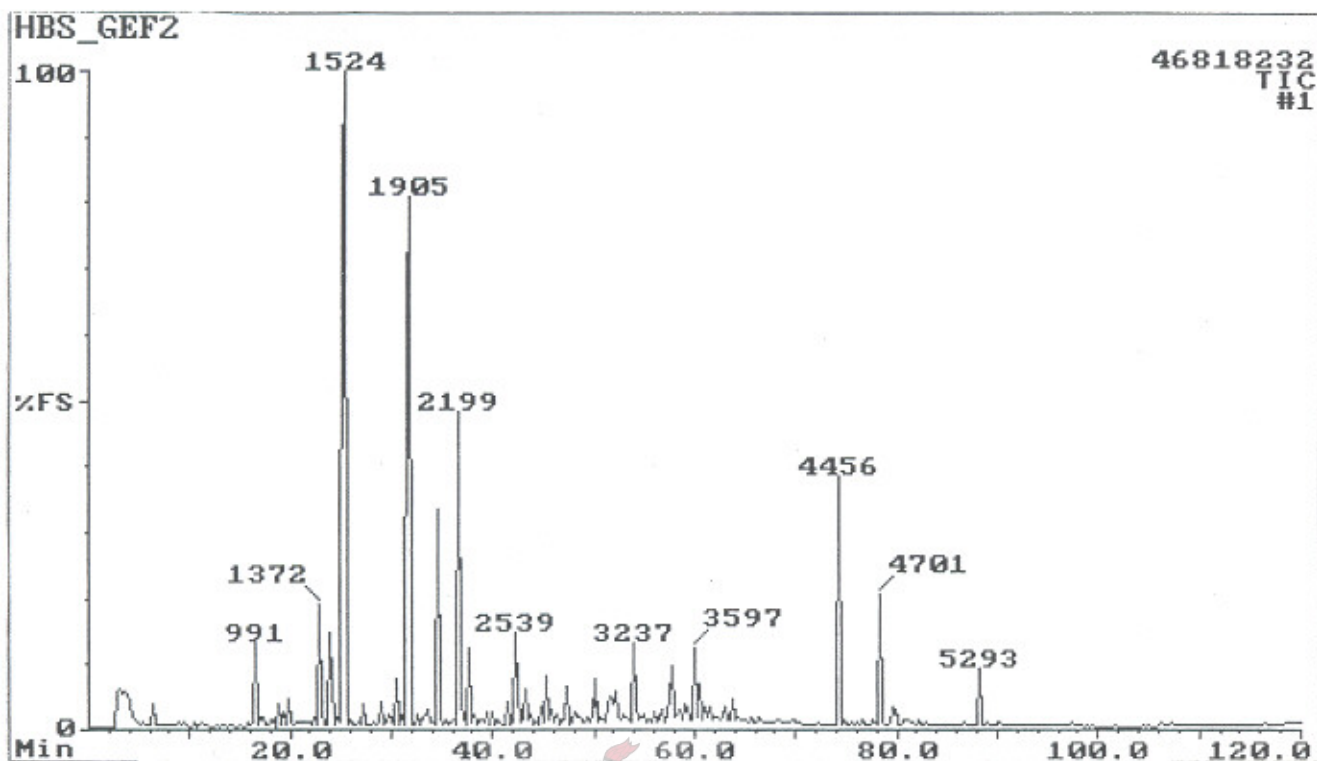
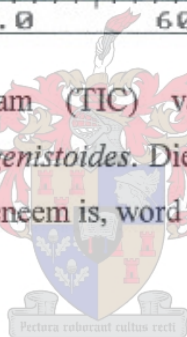


Fig. 2.2: Totale ionchromatogram (TIC) van die bodamp van die gefermenteerde heuningbosplantmateriaal, *Cyclopia genistoides*. Die gaschromatografiese en massaspektrometriese kondisies waaronder hierdie TIC opgeneem is, word in Hoofstuk 4 gegee.



'n Totaal van 74 verbindings is in die aroma van die ongefermenteerde heuningbos geïdentifiseer waarvan 51 hiervan ooreenstem met verbindings in die gefermenteerde heuningbos en 25 van die totale verbindings terpenoïedverbindings is. Verskeie versadigde en onversadigde alkohole soos 1-penten-3-ol, (Z)-3-heksen-1-ol, 1-heksanol en 7-okten-4-ol, wat voorkom in die ongefermenteerde heuningbos, is óf afwesig óf teenwoordig in laer relatiewe konsentrasies in die gefermenteerde heuningbos, soos wat verwag sou kon word op grond van die feit dat die geure van die meeste van hierdie alkohole beskryf word as intens groen en grasagtig [6].

Die relatiewe konsentrasies van 'n groot groep aldehyede, wat in die algemeen bekend is vir hulle sterk groen en grasagtige geure, neem merkbaar af as gevolg van fermentasie. Heksanaal (U218) is een van die aldehyede wat in 'n hoë konsentrasie voorkom in die ongefermenteerde

heuningbosaroma en baie bekend is vir sy penetrerende, groen en grasagtige aroma [6]. Die relatiewe konsentrasie van heksanaal in die gefermenteerde heuningbos is aansienlik laer as in die ongefermenteerde heuningbos.

Nog 'n groep verbindings wat na fermentasie 'n afname toon, is 'n aantal metielketone, waaronder 6-metiel-5-hepten-2-oon en 6-metiel-3,5-heptadiën-2-oon (twee terpenoïed metielketone), 3-okten-2-oon en 3,5-oktadiën-2-oon beslis uitstaan. 6-Metiel-5-hepten-2-oon is een van die hoofkomponente van die ongefermenteerde heuningbos, en hierdie verbinding se aroma word beskryf as groenagtig en speseryagtig met groen vrugagtige ondertone [6]. Die bogenoemde verbindings dra waarskynlik by tot die groen, grasagtige en hooiagtige aroma van die ongefermenteerde heuningbos. Soos wat verwag word, neem die konsentrasies van hierdie verbindings as gevolg van fermentasie af, in sommige gevalle selfs tot nie-waarneembare vlakke, en verdwyn die gepaardgaande aroma om plek te maak vir 'n meer soet en blomagtige aroma.

Twee verbindings wat in die ongefermenteerde heuningbos voorkom en merkbaar verskil van die meeste van die verbindings wat geïdentifiseer is, is 'n stikstofbevattende verbinding, heksametileentetramien (HMTA) (komponent U1831) en molekulêre swawel ( $S_8$ ) (komponent U4706). Hierdie twee komponente se vlugtigheide is relatief laag, wat verklaar hoekom hulle nie voorgekom het in die analise met kort monsternemingstyd met die SEP nie, maar wel in die analise met heelwat langer monsternemingstyd. Hulle afwesigheid in die ekstrak van die ongefermenteerde heuningbos hou verband met hulle swak oplosbaarheide in die oplosmiddel dichlorometaan. HMTA het verskeie toepassings waarvan die gebruik as 'n urinêre antiseptiese middel baie interessant is [7]. Die feit dat elementêre swawel wel gevind is as 'n komponent van die aroma van die ongefermenteerde heuningbos is merkwaardig, aangesien hierdie element baie maklik oorgesien kan word in baie ander biologiese sisteme vanweë die feit dat dit nie waargeneem kan word deur die vlamionisasie detektor van GC-instrumente nie. Swawel word wel deur GC-MS-sisteme waargeneem.

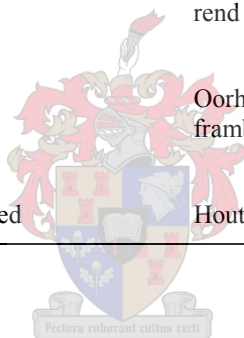
In die aroma van die gefermenteerde heuningbos is 70 verbindings geïdentifiseer waarvan 36 terpenoïedverbindings is wat oor die algemeen bekend is vir hulle aangename geure en wat waarskynlik grootliks bydra tot die unieke aroma van die gefermenteerde heuningbos. Van die belangrikste terpenoïedverbindings wat na fermentasie vir die eerste keer waargeneem kon word of



in 'n groter relatiewe konsentrasie voorkom as in die ongefermenteerde heuningbos, is linaloöl, *cis*- en *trans*-linaloöloksied,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol, 2,6-dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol, pseudojonoon, heksahidrofarnesielasetoon en fitol. Daar is egter ook van die terpenoïedverbindings wat in laer relatiewe konsentrasies in die gefermenteerde heuningbos as in die ongefermenteerde heuningbos voorkom en (*Z*)-geranielasetoon,  $\beta$ -jonoon en dihidroaktinidiolied insluit. Aangesien hierdie verbindings nie toegeneem het tydens fermentasie nie, speel hulle moontlik 'n minder belangrike rol in die aroma van die gefermenteerde heuningbos as in die aroma van die ongefermenteerde heuningbos. Tabelle 3.1 en 3.2 gee beskrywings van die aromas van bogenoemde terpenoïedverbindings, waar bekend.

**Tabel 3.1:** Aromas van die belangrikste terpenoïedverbindings in ongefermenteerde heuningbos.

Terpenoïedverbinding	Aroma
Geranielasetoon	Ligte blomagtige aroma wat redelik penetre- rend is en selfs effens groenerig kan wees [6].
$\beta$ -Jonoon	Oorheersend houtagtige aroma, met 'n baie ligte framboosagtige onderton [6].
Dihidroaktinidiolied	Houtagtige vrugagtige aroma [8].



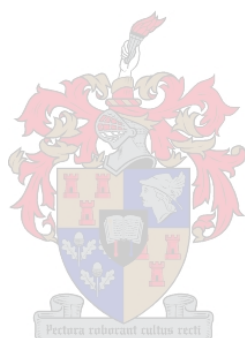
**Tabel 3.2:** Aromas van die belangrikste terpenoïedverbindings in gefermenteerde heuningbos.

Terpenoïedverbinding	Aroma
Linaloöloksied	Soet-houtagtig, blomagtig [6]
Linaloöl	Blomagtig, houtagtig met sitrus onderton [6].
$\alpha$ -Terpineol	Blomagtig en soet [6]
Nerol en Geraniol	Soet, blomagtige en roostipe aroma [6]
2,6-Dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol	-
Pseudojonoon	Warm, blomagtige aroma met jasmyn en violet karakter [6]
Heksahidrofarnesielasetoon	-
Fitol	Blomagtige balsamiese aroma en die verbinding word beskryf as 'n baie goeie fikseermiddel vir ander verbindings [6].

Die belangrikste terpenoïedverbindings in die aroma van die ongefermenteerde heuningbos het hoofsaaklik houtagtige geure met variasies tussen blom- en vrugagtige aromas. Die terpenoïed wat in die hoogste konsentrasie in die ongefermenteerde heuningbos voorkom, naamlik (*Z*)-geranielasetoon, het selfs 'n groenerige aroma, wat moontlik bydra tot die algehele groen, grasagtige en hooiagtige aroma van die ongefermenteerde heuningbos.

Die aangename soet aroma van die gefermenteerde heuningbos kan waarskynlik toegeskryf word aan die soet en blomagtige geure van die belangrikste terpenoïede in die heuningbos, terwyl verbindings soos eugenol en vanillielasetoon moontlik ook bydrae tot die speseryagtige ondertone in die heuningbos. Sommige terpenoïede waarvan die aroma-beskrywings die term tee-agtig bevat, word ook aangetref in die heuningbos, byvoorbeeld  $\beta$ -damaskoon en ketoïsoforoon. As aan ketoïsoforoon geruik word, herinner die reuk 'n mens aan die reuk van tee en heuning.

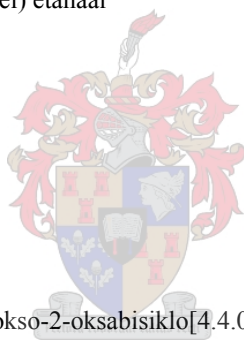
Die histogram (Fig. 3.1) (p. 186) gee 'n visuele voorstelling van hoe die relatiewe konsentrasies van die terpenoïede in die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos van mekaar verskil. Die genormaliseerde relatiewe konsentrasies is bereken deur die hoogtes van die pieke in die bodamp-TICs van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos te meet en uit te druk as 'n persentasie van die hoogte van die hoofkomponent, wat in die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos onderskeidelik (*Z*)-geranielasetoon en linaloöl is. Tabel 3.3 lys die terpenoïede in die volgorde waarin hulle geëlueer het met dieselfde nommers as wat in die histogram gebruik is.

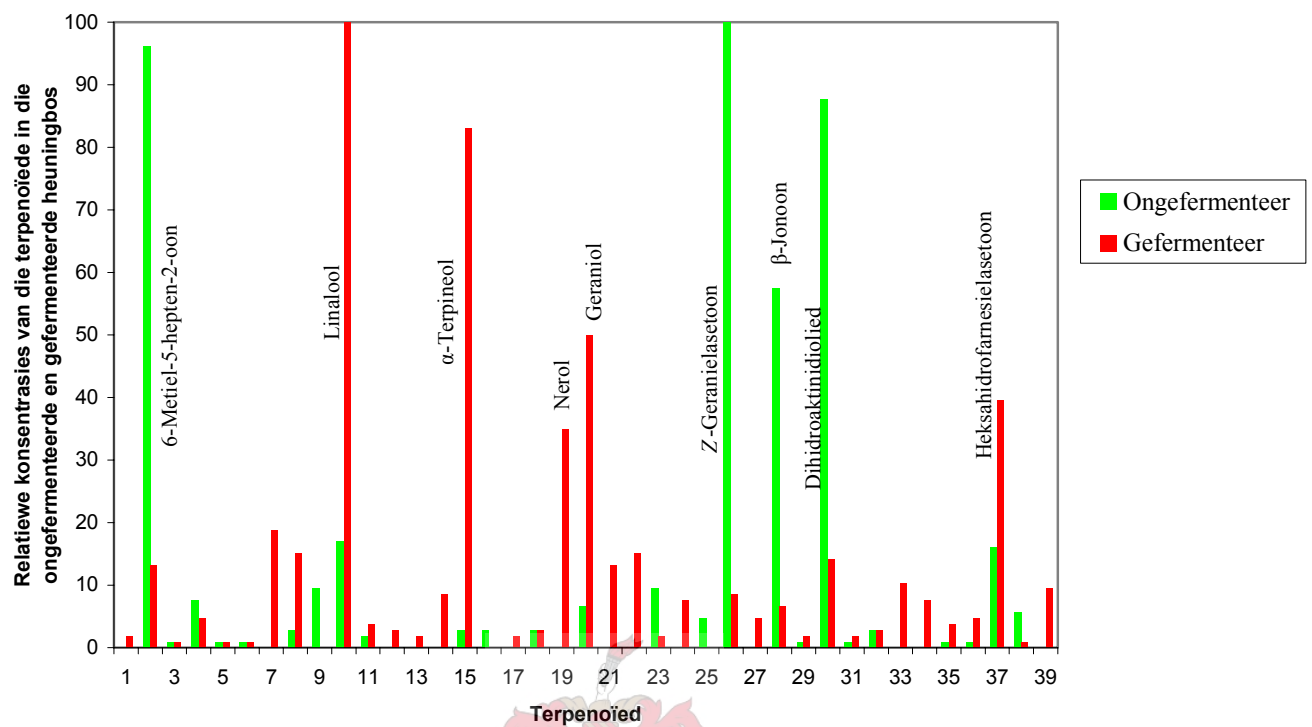


**Tabel 3.3:** Terpenoïede in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, *Cyclopia genistoides*, gelys in volgorde van eluering van 'n apolêre kolom.

Nrs. Terpenoïede

1	2,6,6-Trimetiel-2-vinieltetrahidropiraan
2	6-Metiel-5-hepten-2-oon
3	Mirseen
4	Limoneen
5	( <i>E</i> )-Osimeen
6	$\gamma$ -Terpineen
7	<i>Trans</i> -linaloöloksied
8	<i>Cis</i> -linaloöloksied
9	6-Metiel-3,5-heptadiën-2-oon
10	Linaloöl
11	Ketoïsofooron
12	Epoksilinaloöl-isomeer
13	Epoksilinaloöl-isomeer
14	4-Karvomentenol
15	$\alpha$ -Terpineol
16	Safranaal
17	2-metiel-2-(4'-metiel-3'-sikloheksen-1'-iel) etanaal
18	$\beta$ -Siklositral
19	Nerol [( <i>Z</i> )-geraniol]
20	Geraniol [( <i>E</i> )-geraniol]
21	2,6-Dimetiel-1,7-oktadiën-3,6-diol
22	Pseudojonoon (tentatief)
23	$\alpha$ -Kubebeen
24	$\beta$ -Damaskoon
25	Kariofilleen
26	( <i>Z</i> )-Geranielasetoon
27	Oksoëdulaan I/II (1,3,7,7-tetrametiel-9-okso-2-oksabisiklo[4.4.0]dek-5-ee) (tentatief)
28	$\beta$ -Jonoon
29	$\alpha$ -Muuroleen
30	Dihidroaktinidiolied
31	Kalameneen
32	Megastigma-4,6,8-trieen-3-oon-isomeer (tentatief)
33	1- $\beta$ -Kadineen
34	Megastigma-4,6,8-trieen-3-oon-isomeer (tentatief)
35	3-Okso- $\beta$ -jonoon
36	2,4,4-Trimetiel-3-(3'-hidroksi-1'-buten-1'-iel)-2-sikloheksen-1-oon
37	Heksahidrofarnesielasetoon
38	Farnesielasetoon
39	Fitol





**Fig. 3.3:** Vergelyking van die relatiewe konsentrasies van die terpenoïede in die aroma van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos (kyk Tabel 3.3).



### 3.3 Verwysings

1. C.L. Arthur en J. Pawliszyn, “Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148 (1990).
2. H. Kataoka, H.L Lord en J. Pawliszyn, “Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr.* **880**, 35-62, (2000).
3. E. Baltussen, P. Sandra, F. David en C.A. Cramers, “Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles”, *J. Microcol. Sep.* **11**, 737-747, (1999).
4. B.V. Burger, Sample enrichment probe and method, SA patent 2003/4696, 2003.
5. B.V. Burger, B. Marx, M. le Roux en W.G. Burger, “Simplified analysis of volatile organic compounds in headspace and aqueous samples by high-capacity sample enrichment probe”. Ingedien vir publikasie in *J. Chromatogr. A*
6. S. Arctander, “Perfume and flavor chemicals Volume I and II”, Montclair, New York (1969).
7. S. Budavari, M.J. O’Neil, A. Smith en P.E. Heckelman, “The Merck Index”, Merck & Co. Inc., Rahway NJ, p. 5888 (1989).
8. <http://ingredients.givaudan.com/appl/fib/flavour.nsf/0/2b084124ff3010a9c1256a4f00440de3?OpenDocument>.



## Hoofstuk 4

### EKSPERIMENTEEL

#### 4.1 Algemeen

Pyrex glasware wat vir die hantering van heuningbosplantmateriaal gebruik is, is vooraf deeglik gewas en in 'n muffeloond by 500°C verhit om enige organiese materiaal te verwyder. Vir ekstraksiedoeleindes is dichlormetaan (Merck Residue Analysis Grade, Darmstadt, Germany) gebruik. Mikroliter-spuite is voor elke analise skoongemaak deur dichlormetaan (Riedel de Haën, Pesticide Analysis Grade) deur die spuit te suig en die buitekant van die naalde en die suierstafies deeglik met dieselfde oplosmiddel af te spoel.

#### 4.2 Versameling van heuningbos plantmateriaal vir bodamp GC-MS

Aangeplante *C. genistoides* is in Februarie 2004 geoes op ReinsFarm, geleë aan die kus, naby Albertinia, in die Suidwes-Kaap. Die bosse is tot teen die grond afgesny en die takke opgesny met behulp van 'n meganiese voersnyermasjien om 2-3 mm-lange stukkie te lewer. Die opgesnyde plantmateriaal is in twee dele wat elk 3.6 kg geweeg het, verdeel. Die een deel is dadelik gedroog tot 'n vogtigheidsinhoud van ongeveer 10 %, deur die takkies in dun lae te pak op 30 maas vlekvrystaaldroograkke wat vir 6 uur by 40 °C geplaas is in 'n temperatuurbeheerde eksperimentele dehidrasietunnel (Continental Fan Works, Parow, Suid-Afrika) met 'n kruis-lugvloei van 3 m/s. Gedeïoniseerde water is by die oorblywende plantmateriaal gevoeg om die blare en takkies kunsmatig te benat, wat daarna vir 16 uur by 90 °C in 'n laboratoriumoond gefermenteer is in 'n vlekvrystaalhouer wat met aluminiumfoelie bedek is. Na afloop van die fermentasieproses is die materiaal op dieselfde wyse gedroog as die ongefermenteerde heuningbos. Die droë heuningbos is in glasflesse geplaas waarvan die skroefdeksels met aluminiumfoelie bedek is om direkte kontak tussen die metaal en die tee te vermy.



### 4.3 Voorbereiding van heuningbosekstrakte

Om die identifikasie van soveel as moontlik van die verbindings teenwoordig in die bodamp van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos te bevestig, is ekstrakte van die heuningbos gemaak en vergelyk met sintetiese verbindings. Vir die ekstraksie van die vlugtige organiese verbindings in die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, is 35 ml dichlorometaan en 14 g van die verwerkte heuningbosplantmateriaal in 'n 100-ml rondbolfles geplaas en vir 14 dae laat staan, waarna die dichlorometaan met 'n pasteurpipet uitgesuig is totdat die nat plantmateriaal feitlik droog was. Daarna is die materiaal in die 100-ml fles uitgespoel met 2 porsies 1.4 ml dichlorometaan, wat gekombineer is met die vorige ekstrak. Die gekombineerde ekstrakte is verder in 'n 2-ml Reacti-Vial gekonsentreer deur die Reacti-Vial in 'n 2-l glasbeker te plaas, die beker met aluminiumfoelie te bedek en 'n swak stroom suiwer stikstof (vloeiempo van ongeveer 0.1 kPa/cm<sup>2</sup>) in die beker in te lei om die dichlorometaandampe daaruit te verwyder. Hierdie metode word effektief gebruik om die oplosmiddel af te damp sonder dat die vlugtige organiese verbindings ook afgedamp word. Die stikstof is langs die Reacti-Vial in die beker ingelei en nie direk op die oplossing in die Reacti-Vial geblaas nie. Die gekombineerde ekstrak is ingedamp tot 'n finale volume van 0.5 ml en 1 µl van hierdie ekstrak is gebruik vir GC-MS- en GC-analises. 'n Soortgelyke ekstraksie is gedoen deur die dichlorometaan-benatte plantmateriaal vir 2 uur te roer en dit te hanteer soos hierbo genoem is. Hierdie ekstraksie neem aansienlik minder tyd in beslag as die eersgenoemde, maar minder verbindings was in die TIC waarneembaar en daarom is die laasgenoemde ekstrak nie verder vir retensietydwerk gebruik nie.

### 4.4 Analitiese tegnieke

#### 4.4.1 Gaschromatografiese analises (GC)

GC-analises is uitgevoer met 'n Carlo Erba HRGC 5300 Mega gaschromatograaf met 'n vlamionisasie detektor en 'n Grob "split/splitless" inlaat. Die GC-kolom (40 m × 0.25 mm) is vervaardig deur die laboratorium vir Ekologiese Chemie (Stellenbosch) en is belaag met 0.25 µm PS089 apolêre stasionêre fase. Alle analises is gedoen met waterstof as draergas teen 'n liniêre vloeisnelheid van 50 cm/sekonde. Die temperatuur van die vlamionisasie detektor en inlaat was

onderskeidelik 280 °C en 220 °C. Monsters is ingespuut met stroomverdeling en is termies gefokusseer op die kolom (40 °C). 'n Temperatuurprogram vanaf 40 °C tot 280 °C teen 2 °C/min, is gebruik om die heuningbosekstrakte en sintetiese monsters, wat gebruik is vir die bepaling van retensietye, te analiseer. Retensietye van verbindings is bepaal en kwantitatiewe gaschromatografiese analyses is gedoen met bogenoemde gaschromatograaf gekoppel aan 'n rekenaar met Jasco-Borwin Version 1.50 chromatografie-sagteware.

#### 4.4.2 Gaschromatografie-massaspektrometriese analyses (GC-MS) met die SEP

Die vlugtige organiese verbindings teenwoordig in die bodamp van die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos, is deur middel van monsterverryking met die SEP vasgevang, en geanaliseer met behulp van GC-MS. Die SEP (Fig. 4.1) is ontwerp en vervaardig in die Laboratorium vir Ekologiese Chemie (LECUS, Stellenbosch, Suid-Afrika), en is 'n 125 mm-lange stafie met 'n deursnit van 1.5 mm, gemaak van glas of vlekvrystaal.



**Fig. 4.1:** Foto van die SEP en die hardware wat vir die gebruik daarvan vervaardig is.

Aan die onderpunt van hierdie stafie is 'n 15 mm-lange lagie PDMS (polydimethylsiloxane) waarin die vlugtige verbindings gesorbeer word. Om gebruik te kan maak van hierdie monsterverrykingstegniek, was dit nodig om twee klein veranderings aan die inlaat van die gaschromatograaf aan te bring. Die sentrale openinge van die septumondersteunende insetsel en die septumskroefkop is oopgeboor tot ongeveer 2.2 mm. Vir die SEP-verryking van die vlugtige

komponente in die bodamp van die plantmateriaal, is die ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbosplantmateriaal (8 g) in 25-ml glasbottels met aangepaste skroefkoppe (Fig. 4.1 en 4.2) geplaas. Die skroefdraad van die metaalinsetsel in die skroefkoppe van hierdie bottels is identies aan dié van die inlaat van die GC.



**Fig. 4.2:** Monsterneming deur middel van die SEP.

Die gebruik van hierdie spesiale skroefkoppe het verseker dat die SEP so vinnig as moontlik in die inlaat van die gaschromatograaf geplaas kan word na monsterverryking. Die vlugtige organiese komponente is vir 100 uur by 40 °C uit die bodamp van ongefermenteerde en gefermenteerde heuningbos in die PDMS van die SEP gesorbeer (Fig. 4.2), waarna die SEP verwyder is en in die inlaat van 'n Carlo Erba QMD 1000 GC-MS instrument (Milaan, Italië), geplaas is. Die gesorbeerde verbindings is gedesorbeer by 'n inlaat-temperatuur van 230 °C sonder kriefokussering en is geanaliseer op 'n kapillêre kolom met dieselfde spesifikasies as die kolom wat vir die GC-analises gebruik is. Dieselfde temperatuurprogram is gebruik. Die inlaat is vir inlaatverdeling ingestel en helium, met 'n liniêre vloeisnelheid van 28.6 cm/sekonde by 40 °C, is gebruik as draergas. Massaspektra is opgeneem teen 70 eV, met 'n skandeertempo van 0.9 s/spektrum met 'n 0.1-sekonde interval tussen die spektra. Die druk in die ionbronkamer was ongeveer  $2 \times 10^{-5}$  Torr by 'n

kolomtemperatuur van 40 °C, en het afgeneem tot ongeveer  $1 \times 10^{-5}$  Torr teen die einde van die temperatuurprogram.

## 4.5 Verwysingverbindings

Alle chemikalieë wat gebruik is vir die bevestiging van die identifikasie van die vlugtige heuningboskomponente, is verkry vanaf Aldrich Chemical Co. en Sigma Chemical Co. Een van die verbindings is vir vergelykingsdoeleindes gesintetiseer.

### 4.5.1 Bereiding van heksahidrofarnesielasetoon

‘n Oplossing van farnesielasetoon (0.53 g, 0.0002 mol) in 15 ml absolute etanol is met 0.04 g 10 % Pt op geaktiveerde koolstof in ‘n konvensionele hidrogeneringsapparaat gehidrogeneer [1]. ‘n Totale volume van 138.6 ml waterstof (0.0062 mol) is tydens die hidrogeneringsreaksie opgeneem. Na afloop van die hidrogeneringsreaksie is die oplosmiddel grotendeels met behulp van ‘n swak stroom suiwer stikstof afgedamp van die produk en die katalisator, waarna die oorblywende materiaal met petroleumeter verdun en deur ‘n laag magnesiumsulfaat gefiltreer is. Hierdie prosedure is gevolg om te verhoed dat van die droogmiddel in die etanol oplos en dus in die eindproduk sou beland. Die finale filtraat is met rotasieverdamping ingedamp en het die verlangde heksahidrofarnesielasetoon as bruinerige produk gelewer (0.42 g, 79 %).

### 4.5.2 Bereiding van sintetiese mengsels vir retensietydvergelyking

Vier mengsels is voorberei en gebruik vir retensietydvergelyking en hul samestelling word in Tabel 4.1 aangedui.

**Tabel 4.1:** Verbindings teenwoordig in die vier sintetiese mengsels wat gebruik is vir retensietydvergelyking.

Sintetiese mengsel 1		Sintetiese mengsel 3	
Verbinding	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Verbinding	Volume ( $\mu\text{l}$ )
Heksanaal	30	Heptanaal	30
2-Metielbutanoësuur	30	2-Pentiefuraan	30
( <i>E</i> )-2-Heptanaal	30	Ketoïsoforoon	30
6-Metiel-5-hepten-2-oon	40	$\beta$ -Siklositraal	30
Limoneen	30	$\beta$ -Jonoon	30
Linaloöl	0.4 (u)	Heksahidro-farnesielasetoon	0.1 (u)
4-Karvomentenol	30	Fitol	3.0 (u)
( <i>E</i> -en <i>Z</i> )-Geraniol	0.4 (u)	Trikosaan	30
Eugenol	30		
Geranielasetoon (isomeermengsel)	40	Sintetiese mengsel 4	
( <i>Z</i> )-3-hekseniëlbensoaat	30	Pentanaal	30
Tetradekanoësuur	30	( <i>Z</i> )-3-Heksen-1-ol	30
Heksadekanoësuur	1.0 (u)	1-Heksanol	30
		$\gamma$ -Terpineen	30
		$\alpha$ -Kubebeen	30
		16-Heksadekanolied	30
Sintetiese mengsel 2			
3-Metielbutanoësuur	30		
( <i>E,E</i> )-2,4-Heptadiënaal	30		
<i>cis</i> - en <i>trans</i> -Linaloöloksied	30		
$\alpha$ -Terpineol	0.3 (u)		
$\beta$ -Damaskoon	30		
Farnesielasetoon (isomeermengsel)	30		

Al vier die bogenoemde mengsels is opgemaak tot 'n finale volume van 1  $\mu\text{l}$  deur dichlorometaan as oplosmiddel te gebruik. (u): Dui aan dat die verbinding onverdund by die mengsel gevoeg is. Al die ander verbinding is verdun tot 'n konsentrasie van 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  voor byvoeging by die mengsel.

## 4.6 Verwysing

1. B.S Furniss, A.J. Hannaford, P.W. Smith en A.R. Thatchell, "Vogel's textbook of practical organic chemistry", Longman Scientific & Technical, United States, pp. 89-91 (1989).