

Die verbindings en biologiese aktiwiteit van *Thamnosma africana*

HF MAKOFANE^a, N POTGIETER^b & T VAN REE^a

^aDepartement Chemie, ^bDepartement Mikrobiologie, Universiteit van Venda, Privaat sak X5050, Thohoyandou, 0950 Republiek van Suid-Afrika
tvr@univen.ac.za

UITTREKSEL

Die bogrondse dele en vrugte van Thamnosma africana is ontleed vir chemiese bestanddele. Die vlugtige olie van T. africana is verkry deur stoomdistillasie van die blare, blomme en takkies, en deur middel van GC-MS gekarakteriseer. Die olie is vir biologiese aktiwiteit teen E. coli, B. subtilis en S. aureus getoets en het B. subtilis en S. aureus teen 0.1% verdunning geïnhibeer. Die olie was ook aktief in mikromolare konsentrasies teen Plasmodium falciparum. Chromatografiese skeiding van die etielasetaatekstrak van die bogrondse dele het twee metoksipsoralenisomere (xanthotoxin en bergapten) en 6-(1',2'-dihidroksi-3'-metiel-3'-buteniel)-7-metoksichromen-2-oon (thamnosmonin) opgelewer. Die epoksied van thamnosmonin, 6-(1',2'-epoksi-3'-metielbut-3'-en-1'-iel)-7-metoksichromen-2-oon (thamnosmin), en metiel-p-isopentenielsinnamaat is uit die heksaaneekstrak van die vrugte geïsoleer, terwyl nog 'n furanokumarien, 4,9-dimetoksi-7H-furo[3,2-g]bensopiran-7-oon (isopimpinellin) uit 'n dichloormetaanekstrak van die bogrondse dele geïsoleer is.

ABSTRACT

The compounds and biological activity of Thamnosma africana

The aerial parts and fruits of Thamnosma africana were investigated for chemical compounds present in them. The volatile oil of T. africana was prepared by hydrodistillation of leaves, flowers and stems, and characterized by GC-MS. The oil was tested for antimicrobial activity on cultures of E. coli, B. subtilis and S. aureus, and found to inhibit Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus at 0.1% dilution. The oil was also active against Plasmodium falciparum in micromolar concentrations. Chromatographic separation of the ethyl acetate extract of the aerial parts yielded two isomers of methoxyorsalen (xanthotoxin and bergapten) and 6-(1',2'-dihydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-7-methoxychromen-2-one (thamnosmonin). The epoxide of thamnosmonin, 6-(1',2'-epoxy-3'-methylbut-3'-en-1'-yl)-7-methoxychromen-2-one (thamnosmin), and methyl p-isopentenylcinnamate were isolated from the hexane extract of the fruits, while another furanocoumarin, 4,9-dimethoxy-7H-furo[3,2-g]benzopyran-7-one (isopimpinellin) was isolated from a dichloromethane extract of the aerial parts.

1 INLEIDING

In die deurlopende navorsing op en identifisering van aktiewe bestanddele van tradisionele geneesmiddels uit Afrika is talle plante reeds getoets en geanaliseer vir hulle doeltreffendheid teen malaria en menige ander siektes.^{1,2} Gedurende ons studie van Suider-Afrikaanse medisinale plante³ het ons 'n plant opgemerk wat algemeen in 'n dorpie in Limpopo benut word. *Thamnosma africana* word in die Makofane-nedersetting en ook elders as hoësmiddel en insekdoder of insekwerende middel benut.⁴ Vir gebruik as hoësmiddel word die wortels in water gekook om 'n donker alkaloidbevattende⁵ aftreksel te maak wat dan deur die pasiënt gedrink word. 'n Baie effektiewe middel vir die verwydering van vlieë (vandaar die Noord-Sotho naam 'matsetsane') en ander insekte van diere, veral honde, word berei deur die vars bogrondse dele te maal en dan in koue water te week. Die mengsel word ook aangewend op plekke waar hulle hul eiers lê om "hoendervlieë" te verwyder. Hierdie artikel beskryf die samestelling van die vlugtige olie van *T. africana* en sy *in vitro* aktiwiteit teen enkele algemene organismes, insluitend *Plasmodium falciparum*.

2 RESULTATE EN BESPREKING

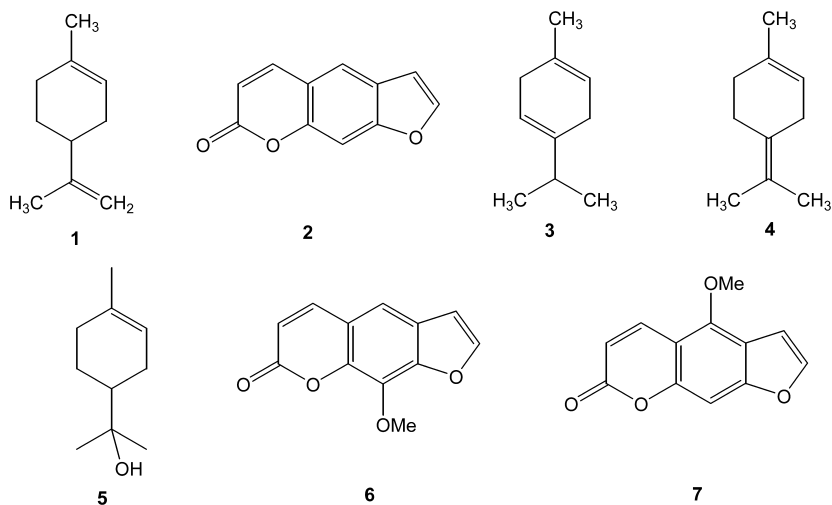
Stoomdistillasie van die vars plantmateriaal, wat blomme en sade ingesluit het, het 'n donker, geurige olie gelever in 0.2% tot 0.4% (w/w) opbrengs. Die olie is deur middel van gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS) gekarakteriseer (Tabel 1). Twaalf komponente is geïdentifiseer en gekwantifiseer. In teenstelling tot *T. texana* en *T. montana*^{6,7,8,9} is die olie gekarakteriseer deur 'n hoë monoterpeen-inhoud, insluitende limoneen (**1**, 23.0%), γ -terpineen (**3**, 5.8%), α -terpinoleen (**4**, 5.0%), en α -terpineol (**5**, 5.0%), maar dit het ook 'n beduidende hoeveelheid psoralen (**2**, 6.0%) bevat.

TABEL 1: Identifiseerbare vlugtige bestanddele van *T. africana*

t_R (min:sec)	Identifikasie	Persentasie van totale olie
04:20	α -Terpinoleen (4)	5.0
09:47	α -Pineen	2.3
13:38	α -Fellandreen	1.0
15:19	Limoneen (1)	23.0
17:03	γ -Terpineen (3)	5.8
22:18	Kamfer	4.5
25:26	α -Terpineol (5)	5.0
28:44	Sitronellol	1.5
40:31	Isolongifoleen	1.5
44:25	β -Kubebeen	2.5
45:18	Aristolen	2.0
60:48	Psoralen (2)	6.0

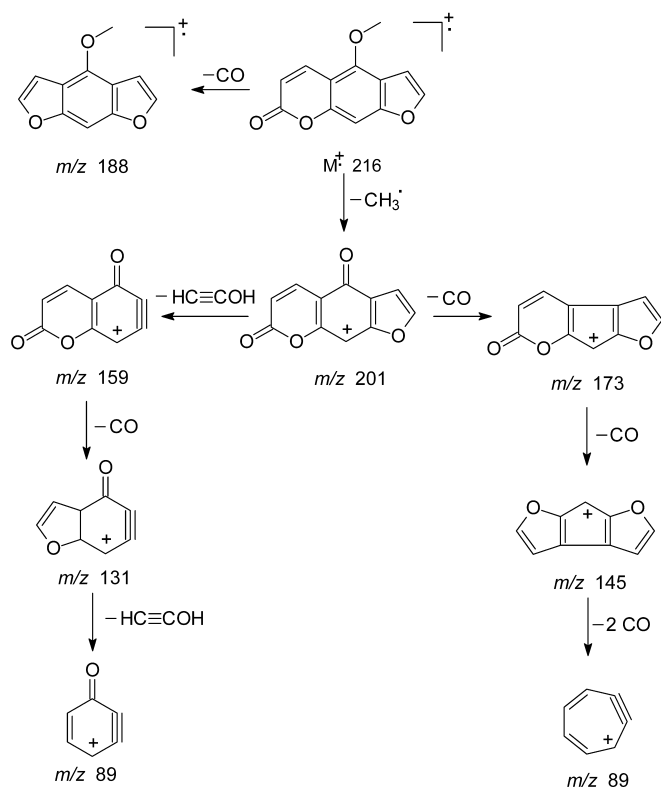
2.1 Isolasië van xanthotoxin (**6**) en bergapten (**7**)

Die bogrondse dele van *T. africana* is vir twee weke gedroog en toe tot 'n fyn poeier gemaal. Ekstrasie met warm etielasetaat, gevolg deur indamping van die oplosmiddel, het 'n donker residu gelever wat op silikagel (73-230 maas ASTM) met 'n heksaan:etielasetaat polariteitsgradiënt gechromatografeer is. Drie kumariene is geïsoleer, die lineêre furanokumariene xanthotoxin (**6**) en bergapten (**7**), en die minder bekende kumarien thamnimonin (6-(1',2'-dihidroksi-3'-metiel-3'-buteniel)-7-metoksichromen-2-oon, **8**). Die ^1H -KMR en ^{13}C -KMR spektra van die mins-polare verbinding stem ooreen met die literatuurdata^{10,11} vir xanthotoxin (**6**). Die infrarooispektra asook die ^1H - ^1H en ^1H - ^{13}C gekorreleerde spektra bevestig hierdie resultaat. Die ^1H -KMR en ^{13}C -KMR spektra van die meer polare bergapten (**7**) is vergelykbaar met literatuurdata^{11,12} en die struktuur is verder bevestig deur analise van die infrarooispektra asook die ^1H - ^1H en ^1H - ^{13}C gekorreleerde data.



Figuur 1: *Strukture van limoneen (1), psoralen (2), γ -terpineen (3), α -terpinoleen (4), α -terpineol (5), xanthotoxin (6) en bergapten (7).*

Die laeresolusie massaspektra van hierdie verbindings bevestig verder die toegekende strukture. Die fragmentering van metoksigesubstitueerde kumariene begin gewoonlik met die verlies van CO, CO₂, CH₃, of CH₃O.^{13,14} Die xanthotoxin en bergapten massafragmenterings volg blykbaar twee paaie. Een pad behels slegs die verlies van CO om 'n ioon te vorm met m/z 188 (20%) vir xanthotoxin en m/z 188 (38%) vir bergapten. Hierdie fragmentering is meer waarskynlik vir bergapten as vir xanthotoxin, soos die relatiewe intensiteite van die pieke aandui. Die tweede roete behels die verlies van CH₃ om 'n ioon met m/z 201 (38%) vir bergapten te gee, wat verder langs twee alternatiewe paaie kan fragmenteer. Een roete begin met splyting van C₂H₂O gevolg deur verlies van CO van die laktoon en dan splyting van die furiaanring om ione met m/z 159 (3%), 131 (1%), en 89 (23%) te vorm. Die tweede roete, wat begin met CO-verlies, lewer 'n ioon met m/z 173 (55%) wat ook weer langs twee alternatiewe paaie fragmenteer, een wat begin met C₂H₂O-verlies, gevolg deur verlies van CO om ione met m/z 131 en 103 onderskeidelik te gee, terwyl die ander moontlik begin met verlies van CO, wat 'n ioon met m/z 145 (30%) lewer, gevolg deur verdere fragmentering (Figuur 2).



Figuur 2: Voorgestelde massafragmenteringspatroon vir furanokumariene soos bergapten (7).^{13,14}

2.2 Isolasië en identifikasie van thamnisonin (8)

Die meer polare fraksie van die etielasetaat-ekstrak wat met heksaan:etielasetaat (35:65, v/v) geëluëer het, het die kumarien thamnisonin (8) opgelewer. Hierdie verbinding is geïdentifiseer deur vergelyking met deels-bekende¹⁵ laeresolusie kmr-data, smeltpunt en massaspektrum. Die ¹H-KMR bevat 'n intense singulet by δ 3.84 wat toegeskryf word aan OCH₃ protone, 'n hidroksiel gebind aan C-1' by δ 5.00 (1H, d, OH, *J* = 5.7 Hz, uitgeruil met D₂O), 'n proton langs hierdie hidroksiel by δ 4.87 (1H, br d, *J* = 5.0 Hz, 1'-H) wat met D₂O skerper word, nog 'n hidroksiel gebind aan C-2' by δ 4.69 (1H, d, OH, *J* = 5.0 Hz, uitgeruil met D₂O), 'n naburige proton by δ 3.94 (1H, br d, *J* = 4.9 Hz, 2'-H) wat met D₂O skerper word, metileenprotone by δ 4.66 (2H, 2xd, 4'a-H en 4'b-H), metielprotone by δ 1.70 (3H, s, CH₃) en die volgende seine vir die kumariensistiem: δ 8.00 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 4-H) langs 6.20 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 3-H), 7.67 (1H, s, 8-H) en 6.99 (1H, s, 5-H). Die ¹H-¹H-gekorreleerde spektrum toon aan dat die metielprotone by δ 1.70 met beide 4'-H en 2'-H by δ 4.66 en 3.94, onderskeidelik, koppel en dat 2'-H ook met 1'-H by δ 4.87 en met 1'-OH by δ 5.00 koppel. Nog 'n paar gekoppelde protone wat by δ 6.20 en 8.00 verskyn, word onderskeidelik aan 4-H en 3-H toegeskryf, terwyl 5-H en 8-H by δ 6.99 en 7.67, onderskeidelik, nie duidelik koppel nie. Die ¹³C-KMR spektrum van thamnisonin dui op twee metielgroepe

(CH₃ en OCH₃), een =CH₂ (bevestig deur die DEPT spektrum), ses CH (bevestig deur die ¹H-¹³C-gekorreleerde spektrum), een C=O en vyf niegeprotoneerde koolstofatome. Die ¹H-¹³C-gekorreleerde spektrum bevat seine wat die protonseine by δ 1.70, 3.84, 3.94, 4.66, 4.87, 6.20, 6.99, 7.67, en 8.00 koppel aan die koolstofseine by δ 18.5, 56.0, 77.4, 111.1, 67.9, 115.5, 98.1, 111.5, en 144.6, onderskeidelik.

Die molekulêre formule, C₁₅H₁₆O₅, word deur die massaspektrum bevestig. Kenmerkende kumarienpieke verskyn by *m/z* 189 (100%), 159 (30%) en 131 (32%). Watervlies van die syketting word ook deur die piek by *m/z* 258 (19%) bevestig. Die fragmentasie verloop waarskynlik deur aanvanklike verlies van 'n watermolekuul, *m/z* 258 (20%), gevolg deur afsplyting van C₃H₅, CO en CH₂O om onderskeidelik ione met *m/z* 217 (3%), 189 (100%) en 159 (20%) te vorm. Die ioon met *m/z* 159 kan volgens minstens twee paaie verder fragmenteer, een roete wat lei tot die ioon met *m/z* 131 (27%), terwyl 'n ander roete begin met verlies van CO₂ om 'n ioon met *m/z* 115 (2%) te vorm. Die IR absorpsieband bo 3200 cm⁻¹ bevestig die teenwoordigheid van intermolekulêre waterstofgebonde O-H strekkingsvibrasie. Die band by 1584 cm⁻¹ kan aan die kumarien C=C dubbelbinding strekkingsvibrasie toegeskryf word. Alkiel- en arieleter C-O absorpsiebande by 1332 en 1152 cm⁻¹ bevestig die teenwoordigheid van 'n metoksisubstituent, terwyl die absorpsie by 1718 cm⁻¹ die teenwoordigheid van 'n laktoon bevestig.

2.3 Isolasie en identifisering van xanthotoxin (6), metiel-4-(3'-metiel-2-buteniel)oksisinnamaat (9) en thamnosmin (10)

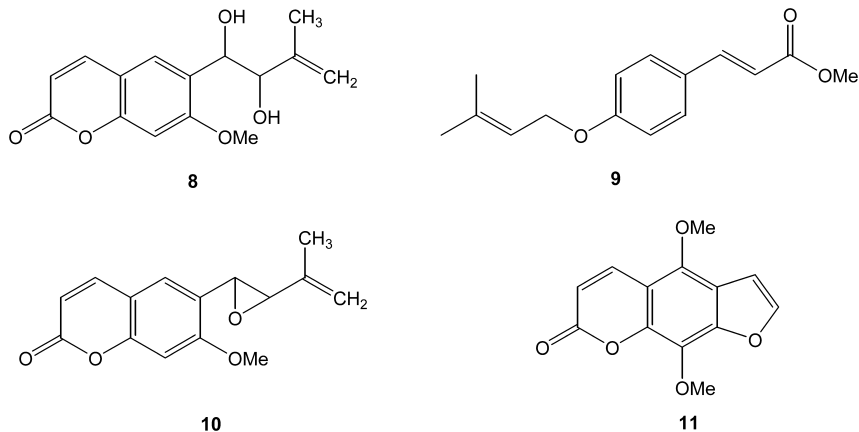
Heksaanekstraksie van die bogrondse dele, insluitende blomme en vrugte, van *T. africana* het 'n donker mengsel opgelewer wat 'n wit neerslag bevat het. Die wit neerslag is van die oplossing geskei deur dekantering en gewas met hekasaan. Omkristallisering uit dichloormetaan het 'n suiwer wit kristallyne verbinding opgelewer wat deur KMR spektroskopie as bergapten (7) geïdentifiseer is. Konsentrasie van die oplossing het 'n geurige donker residu opgelewer wat met 'n hekasaan: etielasetaat gradiënt op silikagel gechromatografeer is om metiel-4-(3'-metiel-2-buteniel)oksisinnamaat (9), xanthotoxin (6), en die epoksied, thamnosmin (10) (voorheen deels gekarakteriseer⁷), op te lewer.

Verbinding 9 is uit fraksies wat met hekasaan:etielasetaat (9:1, v/v) geëluëer is, geïsoleer. Dit het uit 'n geurige oranje fraksie gekristalliseer en is verkry deur dekantering en was met hekasaan. Die ¹H-KMR en ¹³C-KMR spektra van 9 bevestig die struktuur as metiel-4-(3'-metiel-2-buteniel)oksisinnamaat. Verdere bevestiging is verkry uit die DEPT en ¹H-¹³C gekorreleerde spektra asook die IR spektrum.

Verbinding 10 is geïsoleer uit 'n fraksie van die heksaanekstrak wat met hekasaan:etielasetaat (4:1, v/v) geëluëer het. Die ¹H-KMR data stem ooreen met die van thamnosmin wat voorheen uit *T. montana* geïsoleer is.⁷ Die ¹³C-KMR spektrum vertoon 15 koolstofseine. Dit sluit 'n metielgroep (δ 16.9), 'n metileen-koolstof (C-4') by δ 114.9, wat deur die DEPT spektrum bevestig is, 'n metoksigroep (δ 56.0) en 'n laktoonkarboniel (δ 161.9) in. Daar is ook twee niegeprotoneerde suurstofgebonde koolstofatome, een by δ 155.5 (C-8a) wat die fenielring aan die kumarienchromofoor bind en nog een by δ 160.8 (C-7) waardeur die fenielring aan die suurstofatoom van die metoksigroep gebind is. Die oorblywende koolstofatome sluit die volgende in: twee olefiniese koolstofatome by δ 113.4 (C-3) en 143.4 (C-4), twee epoksied koolstofatome by δ 64.7 (C-1') en 53.4 (C-2'), aromatiese koolstofatome by δ 98.7 (C-5) en 124.2 (C-8), en nog drie niegeprotoneerde koolstofatome by δ 145.0, 112.2 en 146.9 (C-3', C-4a, en C-6, onderskeidelik). Die IR spektrum bevestig verder die teenwoordigheid van die laktoon en epoksied, met absorpsiebande by 1734 cm⁻¹ en 872 cm⁻¹, onderskeidelik. Die metoksigroep se alkiel- en arieleter C-O strekkings is by 1131 cm⁻¹ en 1282 cm⁻¹, onderskeidelik, waargeneem, terwyl die kumarien se gekonjugeerde C=C dubbelbinding deur die absorpsie by 1617 cm⁻¹ bevestig is.

2.4 Isolasië van isopimpinellin (11)

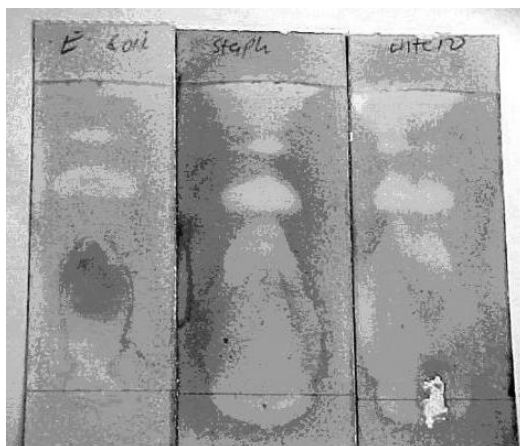
Fraksies van die dichloormetaanekstrak wat met hekasaan:dichloormetaan (3:7, v/v) geëlueer het, het 'n liggeel poeier opgelewer wat as isopimpinellin (11) geïdentifiseer is met behulp van IR, ^1H -KMR en ^{13}C -KMR data.



Figuur 3: Strukture van thamosmonin (8), metiel-4-(3'-metiel-2-buteniel)oksisinnamaat (9), thamosmin (10), en isopimpinellin (11).

2.5 Antibakteriële aktiwiteit

As voorlopige toets is 'n klein monster van die vlugtige olie op drie dunlaagplaatjies aangebring en met hekasaan:etielasetaat (9:1, v/v) geëlueer. Hierna is die plaatjies met waterige suspensies van *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* en *Enterococcus faecalis* bespuit, waarna hulle 24 uur by 38 °C geïnkubeer is. Die resultate (Figuur 4) dui daarop dat die olie bestanddele bevat wat die groei van al drie hierdie mikroörganismes inhibeer. Daar is dus 'n verdere inhibisietoets uitgevoer wat aangetoon het dat die vlugtige olie van *T. africana* matig aktief is *in vitro* teen die Gram-positiewe *Bacillus subtilis* en *Staphylococcus aureus* teen 'n konsentrasie van 0.1 mg/ml (inhibisiesone 17-18 mm, sien Tabel 2).



Figuur 4: Dunlaagplaatjies wat met mikroörganismes bespuit is. Inhibisiesone verskyn as ligte kolle op 'n donker agtergrond, by $R_f \approx 0.6$.

TABEL 2: Plaattoetse van *Thamnosma africana* vlugtige olie (mm inhibisiesones)

Toetsmateriaal	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Imipenem	26	28	28
Cephazolin	19	20	18
Ampicillin	-	-	-
Vlugtige olie	18	17	-

Malaria, een van die wêreld se dodelikste en tog voorkombare siektes, is pandemies in meer as 100 lande in Suid-Amerika, Suidoos-Asië en Afrika.¹⁶ Terwyl malaria skaars is in ontwikkelde lande weens doeltreffende gebruik van insekdoders en profilakse, tas die siekte jaarliks minstens 300 miljoen mense aan in tropiese ontwikkelende lande. Die meeste slagoffers is die armste inwoners van Sub-Sahara Afrika, waar 90% van alle sterfgevälle wêreldwyd voorkom. Die malaria-pandemie in Afrika word vererger deur die toenemende voorkoms van weerstandige stamme van die parasiet, wat die doeltreffendheid van die huidige generasie geneesmiddels sterk verminder.¹⁷ Al ons plantekstrakte word daarom vir antimalaria-aktiwiteit getoets. In hierdie geval is die vlugtige olie teen die D10 chlorokien-sensitiewe stam van *Plasmodium falciparum* getoets, met die volgende IC₅₀ waardes:

Chlorokien	20 ng/ml
<i>Thamnosma africana</i> olie	45 µg/ml

Aangesien 'n waarde in die mikromolare gebied algemeen as beduidend beskou word,¹⁸ regverdig hierdie resultaat verdere ondersoek op individuele komponente van die olie.

3 EKSPERIMENTEEL

3.1 Plantmateriaal

Die bogrondse dele, insluitende blomme en vrugte van *Thamnosma africana*, is in Limpopo by 'n plek genaamd Phefong in die Makofane-nedersetting versamel. Een helfte van die materiaal is oor twee weke gedroog, terwyl die ander helfte aan stoomdistillasie onderwerp is. Die plant is 'n struik wat tot 60 cm hoog word, met enkelvoudige, alternerende blare. Die kleur van die klein blommetjies wissel van geel tot pers met 'n geel sentrum (Figuur 5). Die plant blom tydens lente en somer (November tot April), het 'n sterk aromatiese geur wanneer dit gehanteer word en groei in klipperige leemgrond.



Figuur 5: *Thamnosma* blomme.

3.2 Algemene kondisies: Isolasië en analise van die vlugtige olie

Die vlugtige olie is verkry deur stoomdistillasie, gewoonlik met 200g vars plantmateriaal en 1.5 l water vir 8 h in 'n Clevenger-apparaat. GC-MS-analise is op 'n Finnigan GCQ uitgevoer onder die volgende kondisies: RTX-5MS kolom (5% difeniel- 95% dimetielpolisiloksaan, 30m x 0.25mm), splytinlaat by 250°C. Draergas was He (hoofdruk 500 kPa, lineêre vloeisnelheid 40 cm/s); oordralyntemp. 275°C, ionbrontemp. 200°C, kolom-begintemp. 50°C, gehou vir 3 min, daarna verhit teen 10°C/min tot 150°C, dan verhit teen 5°C/min tot 290°C en laastens by 290°C gehou vir 10 min. Pieke is geïdentifiseer deur middel van retensietye en spektrumvergelyking met die NIST (40 000 verwysingspektra), Wiley (60 000 verwysingspektra) en eie biblioteke. KMR spektroskopie: 300 MHz (75 MHz) Bruker AMX-300 spektrometer in CDCl₃.

3.3 Antimikrobiële bepalings

Die bakterieë is in Mueller Hinton agar¹⁹ gekweek en die olie is getoets met imipenem, cephazoline en ampicillin as positiewe kontroles. Twee verdunnings (0.1 ml ekstrak in 100 ml diëtleter en 0.1 ml ekstrak in 10 ml diëtleter) is voorberei.

Die antimalaria-bepalings is deur prof. Peter Smith (UK) uitgevoer. 'n Chlorokiensensitiewe stam van *P. falciparum* (D10) kontinu gekweek en parasiet melksuurdehidrogenase (pLDH) aktiwiteit is gebruik om parasietoorlewing te meet. Chlorokiendifosfaat is as positiewe kontrole gebruik in millipore water en verdun met medium om die verlangde konsentrasies te verkry. Een mg/ml voorraadoplossings van die olie is opgemaak in metanol en water, en met medium verdun kort voor gebruik. Die hoogste metanolkonsentrasie waaraan die parasiete onderwerp is, was 0.5 %, wat nie parasietoorlewing beïnvloed het nie. Die antiplasmodiale bepaling is in duplikaat uitgevoer.¹⁸ Die 50% inhiberende konsentrasie (IC₅₀) is verkry vanaf die dosis-responskurwe deur middel van nielineêre dosis-responslynpassings met GraphPad Prism v.3.00 programmatuur.

3.4 Data vir 9-metoksi-7H-furo[3,2-g]chromen-7-oon (xanthotoxin) (6)

Wit naalde, 30 mg, s.p. 133.4-134.7 °C (Lit. 144-145 °C).⁷ IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3086 (ariel), 2975 (CH), 2950 (CH), 1734 (CO), 1577 (C=C), 1458, 1361 (ariel-O), 1156 (OMe), 1077 (furaan). ¹H KMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.28 (3H, s, OCH₃), 6.33 (1H, d, J = 9.7 Hz, 3-H), 6.78 (1H, d, J = 2.0 Hz, 3'-H), 7.31 (1H, s, 5-H), 7.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, 2'-H), 7.73 (1H, d, J = 9.7 Hz, 4-H). ¹³C KMR (75 MHz, CDCl₃): δ 61.3 (q, O-CH₃), 106.5 (d, C-3'), 112.9 (d, C-5), 114.7 (d, C-3), 116.5 (s, C-4a), 126.1 (s, C-6), 133.0 (s, C-8), 143.0 (s, C-8a), 144.3 (d, C-4), 146.6 (d, C-2'), 147.5 (s, C-7), 160.4 (s, C-2). MS (EI, 70 eV): m/z 216 (100%, M⁺, C₁₂H₈O₄), 201 (39%, C₁₁H₅O₄), 173 (90%, C₁₀H₅O₃), 145 (40%, C₉H₅O₂), 117 (5%, C₈H₅O), 89 (19%, C₇H₅), 51 (5%, C₄H₃).

3.5 Data vir 4-metoksi-7H-furo[3,2-g]chromen-7-oon (bergapten) (7):

Wit naalde, s.p. 196.9-197.9 °C (Lit. 184-185 °C).⁷ IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3080 (ariel), 2975 (CH), 2950 (CH), 1732 (CO), 1575 (C=C), 1458, 1355 (ariel-O), 1152 (OMe), 1075 (furaan). ¹H KMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.23 (3H, s, OCH₃), 6.23 (1H, d, J = 9.8 Hz, 3-H), 6.98 (1H, d, J = 2.6 Hz, 3'-H), 7.08 (1H, s, 8-H), 7.55 (1H, d, J = 2.6 Hz, 2'-H), 8.90 (1H, d, J = 9.8 Hz, 4-H). ¹³C KMR (75 MHz, CDCl₃): δ 60.1 (q, OCH₃), 93.8 (d, C-8), 105.0 (d, C-3'), 106.4 (s, C-6), 106.4 (s, C-4a), 112.5 (s, C-6), 139.2 (d, C-4), 144.8 (d, C-2'), 149.6 (s, C-5), 152.7 (s, C-8a), 158.4 (s, C-7), 161 (s, C-2). MS (EI, 70 eV): m/z 216 (100%, M⁺, C₁₂H₈O₄), 201 (30%, C₁₁H₅O₄), 173 (60%, C₁₀H₅O₃), 145 (23%, C₉H₅O₂), 117 (5%, C₈H₅O), 89 (27%, C₇H₅), 51 (2%, C₄H₃).

3.6 Data vir 6-(1,2-dihidroksi-3-metiel-3-buteniel)-7-metoksichromen-2-oon (thamnosmonin) (8)

Bros wit naalde (6.3 mg) uit etielasetaat, s.p. 181-183 °C (Lit. 162-164 °C)¹⁵ na verdere reiniging dmv preparatiewe DLC (SiO₂; heksaan:etielasetaat 3:7). IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3200 (OH), 3126 (ariel), 3115 (ariel), 2975 (CH), 2950 (CH), 1718 (CO), 1584 (C=C), 1400, 1332 (ariel-O), 1152 (OMe), 1025 (furaan). ¹H KMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.70 (3H, s, CH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.94 (1H, br d, J = 4.9 Hz, 2'-H), 4.66 (2H, 2xd, J = 4.0 Hz, 4'a-H en 4'b-H), 4.69 (1H, d, J = 5.7 Hz, 2'-OH), 4.87 (1H, br d, J = 5.0 Hz, 1'-H), 5.00 (1H, d, J = 5.7 Hz, 1'-OH), 6.20 (1H, d, J = 9.6 Hz, 3-H), 6.99 (1H, s, 5-H), 7.67 (1H, s, 8-H), en 8.00 (1H, d, J = 9.6 Hz, 4-H). ¹³C KMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 18.5 (q, CH₃), 56.0 (q, OCH₃), 67.9 (d, C-1'), 77.4 (d, C-2'), 98.1 (d, C-8), 111.1 (t, C-4'), 111.5 (s, C-4a), 112.2 (d, C-3), 115.5 (s, C-6), 129.1 (d, C-5), 144.6 (d, C-4), 146.0 (s, C-3'), 154.3 (s, C-8a), 159.2 (s, C-7), 160.4 (s, C-2). MS (EI, 70 eV): m/z 276 (M⁺), 189 (100%), 159 (30%), 131 (32%), en 258 (19%).

3.7 Data vir metiel-4-(3'-metiel-2-buteniel)oksisinnamaat (9)

Helder prisma (60 mg), s.p. 66-70 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3082 (ariel), 2916 (CH), 2848 (CH), 1700 (CO), 1653 (ariel), 1559 (C=C), 1123 (ariel-O), 1062 (OMe). ¹H KMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.71 (3H, s, 1-Hb), 1.77 (3H, s, 1-Ha), 3.76 (3H, s, 12-H), 4.51 (2H, d, J = 7 Hz, 4-H), 5.48 (1H, t, J = 7 Hz, 3-H), 6.27 (1H, d, J = 16.0 Hz, 10-H), 6.78 (2H, d, J = 8.8 Hz, 6-H en 6'-H), 7.43 (2H, d, J = 8.8 Hz, 7-H en 7'-H), 7.62 (1H, d, J = 16.0 Hz, 9-H). ¹³C KMR (75 MHz, CDCl₃): δ 18.2 (q, C-1b), 25.7 (q, C-1a), 51.5 (q, C-12), 64.9 (t, C-4), 115.1 (d, C-6/6'), 115.1 (d, C-10), 119.2 (d, C-3), 126.9 (s, C-2), 129.7 (d, C-7/7'), 138.5 (s, C-8), 144.9 (d, C-9), 160.7 (s, C-5), en 167.7 (s, C-11).

3.8 Data vir 6-(3-isopropenieloksiraniel)-7-metoksichromen-2-oon (thamnosmin) (10)

Roomkleurige poeier (10 mg), s.p. 134-144 °C (Lit: 101-104 °C).⁷ IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3065 (aryl), 2919 (CH), 1734 (CO), 1617 (C=C), 1559 (ariel), 1382, 1282 (ariel-O), 1215, 1131 (OMe), 1017, 872 (epoksied). ¹H KMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.75 (3H, s, Me), 3.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 2'-H), 3.89 (3H, s, O-Me), 4.08 (1H, dd, $J = 0.5$ en 1.9 Hz, 1'-H), 5.05 (1H, s, 4'-H_b), 5.17 (1H, s, 4'-H_a), 6.22 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 3-H), 6.77 (1H, s, 8-H), 7.25 (1H, s, 5-H), 7.59 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 4-H). ¹³C KMR (75 MHz, CDCl₃): δ 16.9 (q, Me), 53.4 (d, C-2'), 56.0 (q, O-Me), 64.7 (d, C-1'), 98.7 (d, C-8), 112.2 (s, C-4a), 113.4 (d, C-3), 114.9 (t, C-4'), 140.8 (d, C-5), 143.4 (d, C-4), 146.9 (s, C-3'), 146.9 (s, C-9), 155.5 (s, C-8a), 160.8 (s, C-7), en 160.9 (s, C-2).

3.9 Data vir 4,9-dimetoksi-7H-furo[3,2-g]bensopiran-7-oon (isopimpinellin) (11)

Liggeel poeier (10 mg), s.p. 148-149 °C (Lit.147-148 °C).²⁰ IR (KBr, cm⁻¹): ν_{\max} 3141 (ariel), 3116 (ariel), 2950 (CH), 1708 (CO), 1585 (C=C), 1400, 1332, 1298 (ariel-O), 1153 (OMe), 1023 (furaan). ¹H KMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.15 (6H, s, 2x O-Me), 6.27 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, 3-H), 6.97 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 3'-H), 7.60 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 2'-H), en 8.10 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, 4-H). ¹³C KMR (75 MHz, CDCl₃): δ 60.9 (q, OMe'), 61.7 (q, OMe''), 105.1 (d, C-3'), 106.4 (s, C-4a), 112.5 (s, C-6), 112.9 (d, C-3), 133.0 (s, C-8), 139.4 (d, C-4), 143.0 (s, C-8a), 145.1 (d, C-2'), 147.5 (s, C-7), 149.6 (s, C-5), 160.6 (s, C-2).

Dankbetuiging

Hierdie werk is ondersteun deur die Nasionale Navorsingstigting. Ons bedank ook graag prof. Robert Vlegaar (Universiteit van Pretoria) vir sy hulp met die KMR spektra en prof. Peter Smith (Universiteit Kaapstad) vir die antimalaria-toetsing. Die keurders het ons op twee minder-toeganklike artikels^{5,11} gewys, waarvoor hulle bedank word.

BIBLIOGRAFIE

1. Govere, J., Durrheim, D.N., du Toit, N., Hunt, R.H., Coetzee, M. (2000). Local plants as repellents against *Anopheles arabiensis*, in Mpumalanga Province, South Africa, *Central African Journal of Medicine*, 46, 213-216.
2. O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. (1985). Plants as sources of antimalarial drugs. Part 1. In vitro test method for the evaluation of crude extracts from plants, *Planta Medica*, 51, 394-398.
3. Manenzhe, N.J., Potgieter, N., Van Ree, T. (2004). Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*, *Phytochemistry*, 65, 2333-2336, en verwysings daar aangehaal.
4. Lesele, S.M., Mnisi, D. (2001). Persoonlike mededeling.
5. Roos, G., Guse, J.-H., Klaiber, I., Vogler, B., Walter, C.U., Kraus, W. (1998). Phytochemical analysis of *Thamnosma africana* Engl. (Rutaceae) roots. In Schreier, P., Herderich, M., Humpf, H.-U., Schwab, W. (eds.). *Natural Product Analysis* (Wiesbaden, Vieweg) p. 239-242 (*Chem. Abstr.*, 1999, 131, 269556).
6. Dreyer, D.L. (1966). Constituents of *Thamnosma montana*, *Tetrahedron*, 22, 2923-2927.
7. Kutney, J.P., Young, R.N., Verma, A.K. (1969). Novel epoxides from *Thamnosma montana* Torr. and Frem., *Tetrahedron Letters*, 10, 1845-1847.

8. Kutney, J.P., Inaba, T., Dreyer, D.L. (1970). Further studies on constituents of *Thamnosma montana* Torr. and Frem. The structure of thamnosin, a novel dimeric coumarin system, *Tetrahedron*, 26, 3171-3184.
9. Baumert, A., Maier, W., Matern, U., Schmidt, J., Schumann, B.D. (1994). *Planta Medica*, 60, 143-145.
10. Pouchert, C.J., Behnke, J. (1993). *Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra, Vol. III* (Aldrich, Boston) p. 173.
11. Duddeck, H., Kaiser, M. (1982). ¹³C NMR Spectroscopy of coumarin derivatives, *Organic Magnetic Resonance*, 20, 55-72.
12. Oertl, E.H., Beier, R.C., Ivie, G.W., Rowel, L.D. (1984). *Phytochemistry*, 23, 439-441.
13. Bonsignore, L., Loy, G., Podda, G. (1992). Comparison of ion trap and sector instruments in the study of fragmentation patterns of coumarins, *Org. Mass Spec.*, 22, 1220-1224.
14. Gonzalez, J.C., Dedola, T., Santana, L., Uriarte, E., Begala, M., Copez, D., Podda, G. (2000). Inverse Electron Demand Diels-Alder Reactions of Psoralens. Synthesis and Mass Spectra of Novel Pyridazinocoumarins, *J. Heterocyclic Chem.*, 37, 907-910.
15. Chang, P.T.O., Cordel, G.A., Aynilian, G.H., Fong, H.H.S., Frasworth, N.R. (1976). *Lloydia*, 39, 134-140.
16. Nchinda, T.C. (1998). Malaria: A reemerging disease in Africa, *Emerging Infectious Diseases*, 4, 398-403. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no3/nchinda.htm> [2005-10-01]
17. Kriner, S. (2005). Malaria: Africa's "Silent Tsunami". http://www.worldandi.com/subscribers/feature_detail.asp?num=24583 [2005-10-01]
18. Clarkson, C., Campbell, W.E., Smith, P. (2003). In vitro antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (devil's claw), *Planta Medica*, 69, 720-724.
19. Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. (1995). *Microbiological Methods*, 7th Ed (Butterworth-Heinemann, Oxford) pp. 178-205.
20. Djerassi, C. (1994). *Dictionary of Natural Products, Vol. 3* (Chapman and Hall, London) p. 3384.

CURRICULA VITAE

Teuns van Ree is sedert 1984 professor in die Departement Chemie aan die Universiteit van Venda. Hy het sy doktorsgraad in 1980 aan die Universiteit van Pretoria behaal. Sy navorsingsbelangstellings behels die chemiese aspekte van inheemse medisyne, asook die ontwikkeling van sintesemetodologie. Hy is outeur of mede-outeur van 30 wetenskaplike publikasies en meer as 30 kongresbydraes, waarvan baie in die buiteland.



Natasha Potgieter is lektrese in die Departement Mikrobiologie aan die Universiteit van Venda, waar sy sedert 1997 werksaam is. Sy het onlangs haar PhD-studies voltooi en is outeur of mede-outeur van 19 wetenskaplike publikasies, die meeste daarvan op die terrein van gesondheidsaspekte van water.



Herman Finos Makofane is lektor in die UNIFY-program van die Universiteit van Limpopo, waar hy in 2005 aangestel is. Hy het onlangs sy MSc-studie in Organiese Chemie voltooi.