



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Мр Тања С. Милошевић-Ифантис

ХЕМИЈСКИ САСТАВ И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ
НЕКИХ СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉАКА
***Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) И**
***Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор

Име и презиме: **Тања С. Милошевић-Ифантис**

Датум и место рођења: **25.07.1979. Крагујевац**

Садашње запослење: **Фармацеутски факултет, Универзитет у Атини**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Хемијски састав и антимикуробна активност неких секундарних метаболита биљака *Centaurea rannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) и *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae)**

Број страница: **273**

Број слика: **140**, Број схема: **11**, Број табела: **61**

Број библиографских јединица: **364**

Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац;
Фармацеутски факултет, Атина**

Научна област: (УДК): **577.1, Хемија-Биохемија**

Ментор: **др Хелен Скалтса**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: **1050/IX-2, 17.11.2010**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: **930/V-3, 20.10.2010; 03-1050/3-1, 10.11.2010.**

1. Др Славица Солујић, редовни професор

Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу

Научна област: Биохемија и хемија природних производа

2. Др Хелен Скалтса, редовни професор

Фармацеутски факултет, Универзитет у Атини

Научна област: Фармакогнозија и хемија природних производа (ментор)

3. Др Љиљана Чомић, ванредни професор

Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу

Научна област: Микробиологија

Комисија за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације: **350/VII-1, 15.05.2013**

1. Др Хелен Скалтса, редовни професор

Фармацеутски факултет, Универзитет у Атини

Научна област: Фармакогнозија и хемија природних производа (ментор)

2. Др Славица Солујић, редовни професор

Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу

Научна област: Биохемија и хемија природних производа

3. Др Мирослав М. Врвић, редовни професор

Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Научна област: Биохемија

4. Др Влатка Вајс, научни саветник

Катедра за органску хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду и ИХТМ-у

Научна област: Хемија природних производа и органска хемија

Датум одбране дисертације:

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је на Фармацеутском факултету, Универзитета у Атини и у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и део су програма пројеката, који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије и Грчке државне фондације за стипендије ИКУ.

Тему за докторску дисертацију предложили су проф. др Хелен Скалтса и проф. др Славица Солујић.

Изражавам посебну захвалност др Хелен Скалтса, редовном професору Фармацеутског факултета, Универзитета у Атини, ментору рада и др Славици Солујић редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на стручној помоћи и драгоценим сугестијама које су омогућиле несметани ток и завршетак овог рада. Посебно се захваљујем др Хелен Скалтса, на отворености и помоћи током израде овог рада.

Захваљујем се проф. др Мирославу Врвићу и др. Влатки Вајс са Хемијског факултета, Универзитета у Београду на корисним саветима и сугестијама у току писања дисертације, као и за учешће у комисији за оцену и одбрану докторске дисертације.

Захвалност дугујем проф. др Ј. Хеилману (Jorg Heilmann) и његовим сарадницима са Хемијског и Фармацеутског факултета, Универзитета у Регенсбургу, Немачка (Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie Naturwissenschaftliche, Fakultat IV – Chemie und Pharmazie, Universitat Regensburg) који су снимили масене спектре (HREIMS) супстанци и значајно допринели интерпретацији резултата који се односе на структуру ново изолованих супстанци.

Хвала др Т. Константиnidису (Theophanis Constantinidis) са Биолошког факултета, Универзитета у Атини, проф. др Драгани Павловић-Муратспахић са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на стручној помоћи и уложеном напору око сакупљања, проналажења литературе и фотографија описаних врста биљака, и др К. Кукулица (Catherine Koukoulitsa) са Хемијског факултета, Универзитета у Атини на помоћи око формирања 3D структуре супстанци.

Искрену захвалност изражавам свим сарадницима из лабораторије проф. Х. Скалтса и проф. С. Солујић за корисне дискусије и пријатне часове дружења током израде ове докторске дисертације. Захваљујем се свим колегама који су ми на било који начин помогли у изради овог рада, а нарочито другарици и колегиници Јелени Степановић, лабораторија за Аналитичку хемију, на несебечној помоћи око техничког дела израде докторске дисертације и др Марији Живковић на несебичним саветима и подршци у току израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима, оцу Слободану, мајци Мири, супругу Христосу и пријатељима на разумевању и стрпљењу које су ми пружали током израде ове докторске дисертације.

ИЗВОД

Предмет докторске дисертације је изоловање и идентификација секундарних метаболита из екстраката надземних делова биљака *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) и *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae), као и испитивање обима њихове антимикуробне активности и хемотаксономски значај. Такође, предмет испитивања је хемијски састав етарског уља *Centaurea pannonica* и антимикуробна активност.

Применом хроматографских метода изоловања једињења и спектроскопских метода идентификације структура, из неполарног екстракта биљке *Centaurea pannonica* са подручја Србије, изоловано је и идентификовано 25 једињења: 14 сесквитерпенских лактона, 7 флавоноида, 3 лигнана и 1 фенилпропаноид глукозид. Наведена једињења по први пут су изолована из наведене биљке док су гермакранолид 2 α -хидрокси 8-дехидрокси-15-О-метакрилат салонитенолид и гвајанолиди: 2 α ,8 α -дихидрокси дехидрокостунолид лактон и панонин нови природни производи, први пут изоловани из природног ресурса. Испитивањем есенцијалног уља наведене биљке, идентификовано је укупно 45 једињења, што је 82,2% укупног састава есенцијалног уља. Квантитативно најзаступљеније групе једињења чине вишемасне киселине са 43,7% и кисеонични деривати сесквитерпена 18,7%.

Из поларног екстракта биљке *Origanum scabrum* која је ендемска врста Грчке, изоловано је и идентификовано 8 једињења: 3 фенолне киселине из групе депсида, 2 монотерпенска гликозида, 2 алициклична деривата и 1 лигнан. Сва једињења су по први пут изолована из биљке, док су дериват рузмаринске киселине, 3-О-метил рузмаринска киселина и неолигнан, глочидиобозид први пут изоловани из рода *Origanum*.

Резултати антимикуробне активности применом микродилуционе методе потврђују да сва изолована једињења показују антимикуробну активност. Испитивани грам (+) сојеви осетљивији су у односу на грам (-). Код биљке *C. pannonica* најбољу активност показују сесквитерпенски лактони са кисеоничним групама док су код биљке *O. scabrum* најактивнији метил дериват рузмаринске киселине и неолигнан. Од тестираних

микроорганизама, најосетљивији сој је грам (-) бактерија *A. baumannii*, а најотпорнији стандардни сој квасца *C. albicans* на свим испитаним узорцима.

Резултати антимикуробне активности есенцијалног уља биљке *C. pannonica* указују да уље показује значајну активност. Уље изоловано из *C. pannonica* показује јаку бактерицидну активност на метил-резистентан сој *S. aureus* (МВС је 0,63 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Екстракти и фракције биљака показале су израженију антимикуробну активност од појединачних супстанци, док су у поређењу са комерцијалним антибиотцима, сви испитивани узорци показали слабију антимикуробну активност.

Поред антимикуробне активности испитиван је хемотаксономски значај изолованих једињења обе биљке унутар фамилија Asteraceae и Lamiaceae.

Заправо, изоловани метаболити из биљке *C. pannonica*, која припада „*Centaurea jacea*” групи, упоређивани су са метаболитима изолованим из *Centaurea* врста које припадају истој групи у циљу доказивања филогенетичке релације унутар групе. С друге стране, *O. scabrum* припада потфамилији Nepetoideae и ово је једина врста која припада секцији *Anatolicon* Bentham, рода *Origanum*, која је испитивана до сада. Због тога, извршено је упоређивање изолованих метаболита из биљке *O. scabrum* са метаболитима осталих врста које припадају роду *Origanum* тј. потфамилији Nepetoideae у циљу откривања потенцијалног хемотаксономског маркера.

Резултати изоловања и идентификације секундарних метаболита из биљака *C. pannonica* и *O. scabrum* и испитивање њихове антимикуробне активности тј. хемотаксономског значаја до сада су први публиковани научни резултати.

Кључне речи: *Centaurea pannonica*, *Origanum scabrum*, сесквитерпенски лактони, флавоноиди, лигнани, неолигнани, фенолне киселине-депсиди, монотерпениски гликозиди, алициклични деривати, антимикуробна активност

SUMMARY

Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) and *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their antimicrobial activities

In the present thesis, the secondary metabolites of two different plant species, namely *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) growing wild in Serbia and *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) growing wild in Greece, were isolated and identified. Moreover, the antimicrobial activities of the total plant extracts and the isolates were evaluated. In addition, the chemical composition and the antimicrobial activity of the essential oil of *C. pannonica* were investigated.

The chemical composition of the plant extracts was investigated by means of standard chromatographic (VLC, MPLC, HPLC, CC, TLC) and spectroscopic methods (UV, IR, HREIMS and 1D & 2D NMR). The lipophilic extract of *C. pannonica* afforded twenty-five compounds including fourteen sesquiterpene lactones, seven flavonoids, three lignans and one phenylpropanoid glycoside. All compounds were isolated for the first time from *C. pannonica*. Among them, one germacranolide, 2 α -hydroxy, 8-dehydroxy 15-O-methacrylate salonitenolide and two guaianolides, i.e. 2 α , 8 α -dihydroxy-dehydrocostus lactone and pannonin are new natural products. Forty-five compounds were identified, representing 82.2% of the total *C. pannonica* essential oil. Unsaturated and aliphatic acids (43.7%) and oxygenated sesquiterpenes (18.7%) are the major groups of components.

The polar extract of *Origanum scabrum* yielded eight compounds, namely three depsides, two monoterpene glucosides, two alicyclic derivatives and one neolignan. All compounds were found in *O. scabrum* for the first time, while 3-O-methyl rosmarinic acid and the neolignan glochidioboside were isolated from the first time from the genus *Origanum* L.

The *in vitro* antimicrobial activities of all obtained extracts and isolated compounds were evaluated using the microdilution method. The extracts of both plants showed better antimicrobial activity than the isolated compounds, which exhibited moderate antimicrobial

activity. Sesquiterpene lactones bearing oxygenated functions were the most active compounds of *C. pannonica*, while the most active substances of *O. scabrum* were 3-O-methyl rosmarinic acid and glochidioboside. Gram-positive bacteria were proved more sensitive than Gram-negative; among all tested microorganisms, *A. baumannii* was the most sensitive strain, while *C. albicans* proved the most resistant strain against all isolated compounds.

The essential oil of *C. pannonica* exhibited significant activity against all tested strains. Moreover, it was found that the oil has strong bactericidal effects against methicillin-resistant *S. aureus* (MBC of 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$). The antibacterial potential of all samples was lower than the commercial antibiotics.

Furthermore, the chemical profile of *C. pannonica*, which belongs to the “*Centaurea jacea*” group, was compared to previously studied taxa of the same group and used to assess the phylogenetic relationships in the group. *O. scabrum* belongs to the subfamily Nepetoideae within Lamiaceae family and this is the only taxon from section Anatolicon Bentham of the genus *Origanum* studied so far; its chemical profile was compared to other taxa belonging to the subfamily Nepetoideae.

This is the first investigation concerning the isolation and the identification of the secondary metabolites from the aerial parts of *C. pannonica* and *O. scabrum* and their antimicrobial activities, as well as their chemotaxonomic significance.

Key words: *Centaurea pannonica*, *Origanum scabrum*, sesquiterpene lactones, flavonoids, lignans, neolignans, phenolic acids, monoterpene glucosides, alicyclic derivatives, antimicrobial activity

САДРЖАЈ

1	ОПШТИ ДЕО	
1.1	Значај и употреба активних метаболита добијених из лековитог биља	1
1.2	Преглед хемијских структура и биосинтетичких путева неких секундарних метаболита биљака	3
1.2.1	Терпеноиди	4
1.2.1.1	Сесквитерпенски лактони и биосинтеза	7
1.2.2	Фенолна једињења	10
1.2.2.1	Фенолне киселине. Биосинтеза рузмаринске киселине	13
1.2.2.2	Флавоноиди	16
1.2.2.3	Лигнани. Биосинтеза лигнана	19
1.3	Антибиотички ефекат секундарних метаболита биљака	21
1.4	Хемотаксономски значај секундарних метаболита биљака	35
1.5	Основне карактеристике испитиваних биљних врста	36
1.5.1	Фамилија Asteraceae (Compositae) – главчике	36
1.5.2	Фамилија Lamiaceae (Labiatae) – уснатице	59
	ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	73
2	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
2.1	Методе изоловања и идентификације активних супстанци из биљног материјала	74
2.1.1	Методе екстракције	74
2.1.2	Хроматографске методе	76
2.1.3	Спектроскопске методе	79
2.2	Хроматографско раздвајање екстракта	81
2.2.1	<i>S. rannonica</i>	81
2.2.2	<i>O. scabrum</i>	94
2.3	Испитивање антимикуробне активности	101
2.3.1	Тестирани микроорганизми	101
2.3.2	Одређивање антимикуробне активности методом микродилуције	103

3	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	
3.1	Сесквитерпенски лактони	106
3.2	Лигнани	166
3.3	Флавоноиди	181
3.4	Есенцијално уље <i>C. rannonica</i>	205
3.5	Фенолне киселине	208
3.6	Неолигнан	219
3.7	Алициклични деривати	224
3.8	Монотерпенски гликозиди	229
3.9	Антимикробна активност	236
3.9.1	Антимикробна активност екстракта, фракција и чистих једињења биљке <i>Centaurea rannonica</i>	236
3.9.2	Антимикробна активност екстракта, фракција и чистих једињења биљке <i>O. scabrum</i>	241
3.10	Хемотаксономски значај изолованих метаболита	245
4	ЗАКЉУЧАК	249
	ЛИТЕРАТУРА	252
	БИОГРАФИЈА	
	ПРИЛОГ	

Табеле

Табела 1.1	Неке групе природних једињења са механизмом деловања	24
Табела 1.2	Ботаничка карта <i>Centaurea pannonica</i> (Heuffel) Simonkai	40
Табела 1.3	Гвајанолиди рода <i>Centaurea</i>	42
Табела 1.4	Структуре гвајанолида изолованих из рода <i>Centaurea</i>	46
Табела 1.5	Флавоноиди изоловани из секције <i>Jacea</i> , род <i>Centaurea</i>	54
Табела 1.6	Структуре флавоноида изолованих из биљних врста секције <i>Jacea</i> , род <i>Centaurea</i>	55
Табела 1.7	Лигнани изоловани из биљних врста рода <i>Centaurea</i>	56
Табела 1.8	Ботаничка карта <i>Origanum scabrum</i> Boiss. & Heldr. in Boiss.	62
Табела 1.9	Секундарни метаболити изоловани из рода <i>Origanum</i>	64
Табела 1.10	Структуре флавона и флавонола изолованих из биљних врста рода <i>Origanum</i>	71
Табела 1.11	Структуре дихидрофлавона и дихидрофлавонола изолованих из биљних врста рода <i>Origanum</i>	72
Табела 2.1	Фракције добијене раздвајањем неполарног екстракта биљке <i>C. pannonica</i> VLC методом	82
Табела 2.2	Фракције добијене раздвајањем неполарног екстракта биљке <i>O. scabrum</i> VLC методом	94
Табела 3.1	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 1 (CDCl ₃ ; 400,0 MHz)	107
Табела 3.2	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 2 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	113
Табела 3.3	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 3 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	118
Табела 3.4	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 4 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	121
Табела 3.5	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 5 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	125
Табела 3.6	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 6 (CDCl ₃ ; 400,0 MHz)	128
Табела 3.7	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 7 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	131
Табела 3.8	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 8 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	135
Табела 3.9	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 9 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	140
Табела 3.10	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 10 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	146
Табела 3.11	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 11 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	150
Табела 3.12	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 12 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	154
Табела 3.13	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 13 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	158
Табела 3.14	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 14 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	161
Табела 3.15	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 15 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	167
Табела 3.16	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 16 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	171
Табела 3.17	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 17 (CDCl ₃ ; 400,0; 50,3 MHz)	174
Табела 3.18	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 18 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	179
Табела 3.19	UV-Vis спектар супстанце 19 (λ_{\max} у nm)	182
Табела 3.20	¹ H-NMR супстанце 19 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	182
Табела 3.21	UV-Vis спектар супстанце 20 (λ_{\max} у nm)	183
Табела 3.22	¹ H-NMR супстанце 20 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	185
Табела 3.23	UV-Vis спектар супстанце 21 (λ_{\max} у nm)	187
Табела 3.24	¹ H-NMR супстанце 21 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	188
Табела 3.25	UV-Vis спектар супстанце 22 (λ_{\max} у nm)	189
Табела 3.26	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 22 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	191
Табела 3.27	UV-Vis спектар супстанце 23 (λ_{\max} у nm)	193
Табела 3.28	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 23 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	195
Табела 3.29	UV-Vis спектар супстанце 24 (λ_{\max} у nm)	197
Табела 3.30	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 24 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	199
Табела 3.31	UV-Vis спектар супстанце 25 (λ_{\max} у nm)	201
Табела 3.32	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 25 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	203

Табела 3.33	Хемијски састав (изражено у %) есенцијалног уља изолованог из биљке <i>C. pannonica</i>	207
Табела 3.34	UV-Vis спектар метанолног раствора супстанце 26	209
Табела 3.35	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR супстанце 26 (CD ₃ OD; 400,0 MHz; 50,3 MHz)	211
Табела 3.36	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR супстанце 27 (CD ₃ OD; 400,0 MHz; 50,3 MHz)	214
Табела 3.37	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR супстанце 28 (CD ₃ OD; 400,0 MHz; 50,3 MHz)	217
Табела 3.38	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 29 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	220
Табела 3.39	¹ H-NMR супстанце 30 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	225
Табела 3.40	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR супстанце 31 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	227
Табела 3.41	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 32 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	230
Табела 3.42	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR* супстанце 33 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	233
Табела 3.43	Антимикробна активност сесквитерпенских лактона (1-14) изолованих из биљке <i>C. pannonica</i> (MIC и MBC µg/mL)	238
Табела 3.44	Антимикробна активност лигнана (15-18), флавоноида (19-25) екстракта и фракције биљке <i>C. pannonica</i> (MIC и MBC µg/mL)	239
Табела 3.45	Антимикробна активност есенцијалног уља биљке <i>C. pannonica</i> (MIC и MBC µL/mL)	240
Табела 3.46	Антимикробна активност секундарних метаболита изолованих из биљке <i>O. scabrum</i> (MIC и MBC µg/mL)	242
Табела 3.47	Антимикробна активност антибиотика на G(-) сојеве бактерија (MIC µg/mL)	243
Табела 3.48	Антимикробна активност антибиотика на G(+) сојеве бактерија (MIC µg/mL)	244

Схеме

Схема 1.1	Интрацелуларна локација IPP/DMAPP у биљци, два биосинтетичка пута у којима учествују као и потенцијално место повезаности метаболичких путева (означено стрелицама)	5
Схема 1.2	Формирање (+)-костунолида	9
Схема 1.3	Предложени метаболички пут формирања еудасманолида и гвајанолида од костунолида код биљке водопија	10
Схема 1.4	Биосинтеза фенолних једињења путем шикимске киселине	12
Схема 1.5	Биосинтеза рузмаринске киселине	15
Схема 1.6	Биосинтетички пут флавоноида	18
Схема 1.7	Биосинтеза лигнана	20
Схема 2.1	Екстракција биљке <i>C. pannonica</i>	75
Схема 2.2	Реакција Натустроф реагенс-флавоноид	79
Схема 2.3	Хроматографско раздвајање неполарног екстракта биљке <i>C. pannonica</i>	93
Схема 2.4	Хроматографско раздвајање поларног екстракта биљке <i>O. scabrum</i>	100

Слике

Слика 1.1	Основне групе секундарних метаболита и проценат њихове заступљености	3
Слика 1.2	Основне структуре флавоноидних представника	16
Слика 1.3	Механизам дејства есенцијалног уља и компоненти које улазе у његов састав на ћелију бактерије (a-f)	23
Слика 1.4	Структуре терпеноида: (1) ксанторхизол; (2) цинамодин; (3) ент-каур-16(17)-енска киселина; (4) олеанска киселина; (5) урсулна киселина	27
Слика 1.5	Структуре сесквитерпенских лактона: (6) хеленалин; (7) бис(хеленалил)малонат; (8) артемисин	28
Слика 1.6	Структуре сесквитерпенских лактона: (9) кницин; (10) 4'-ацетил кницин (11) центаурепенсина; (12) хлоројанерина; (13) 13-ацетил солститиалина А	29
Слика 1.7	Различити механизми дејства лактона артемисина, партенолида и тхасигаргина на ћелије тумора	30
Слика 1.8	Структуре фенолних једињења: (14-18) псоракорифоле А-Е	32
Слика 1.9	Структура лабуртенин	33
Слика 1.10	Структуре лигнана: (19) (+)-лионирезинол-3 α -О- β -D-глюкопиранозид; (20) хејнеанол А	35
Слика 1.11	Распрострањеност рода <i>Centaurea</i>	38
Слика 1.12	Распрострањеност врсте <i>C. pannonica</i>	40
Слика 1.13	Опште структуре гвајанолида	53
Слика 1.14	Општа структура флавоноида	55
Слика 1.15	Структуре дибензилбутиролактонске групе лигнана	57
Слика 1.16	Структуре фуурофуранска група лигнана	58
Слика 1.17	Распрострањеност рода <i>Origanum</i> :.....; подручје свих секција изузев секције <i>Origanum</i> :-----.	60
Слика 1.18	Распрострањеност врсте <i>O. scabrum</i>	62
Слика 1.19	Основне структуре монотерпена и монотерпенских гликозида	67
Слика 1.20	Основне структуре тритерпена	67
Слика 1.21	Основне структуре стерола	68
Слика 1.22	Основне структуре алицикличних деривата	68
Слика 1.23	Основне структуре фенолних једињења/ фенолни гликозиди	68
Слика 1.24	Основне структуре фенолних једињења/ фенолне киселине	69
Слика 1.25	Структура хинона/тимохинона	70
Слика 1.26	Структура дихидробензодиокан дериват/оригалигнанола	70
Слика 1.27	Основне структуре флавоноида/ флаволи и флавоноли	70
Слика 1.28	Основне структуре флавоноида/ дихидрофлаволи и дихидрофлавоноли	72
Слика 1.29	Основне структуре алкалоида	72
Слика 2.1	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-DCH	84
Слика 2.2	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-DCK	85
Слика 2.3	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-EN	87
Слика 2.4	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-EV	87
Слика 2.5	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-F	88
Слика 2.6	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-G	89
Слика 2.7	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-IB'	90
Слика 2.8	HPLC хроматограм суб-фракције PAV-IK	91
Слика 2.9	HPLC хроматограм суб-фракције ORI-CEJ	96
Слика 2.10	HPLC хроматограм суб-фракције ORI-CEI	97
Слика 2.11	HPLC хроматограм суб-фракције ORI-CFD'F	98
Слика 2.12	HPLC хроматограм суб-фракције ORI-CFD'I	99
Слика 3.1	1. Бабилин А	106

Слика 3.2	^1H -NMR спектар супстанце 1 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	107
Слика 3.3	^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC и NOESY спектри супстанце 1	111
Слика 3.4	2. Хлорохисопифолин Ц	112
Слика 3.5	^1H -NMR спектар супстанце 2 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	114
Слика 3.6	^1H - ^1H COSY, HMBC и ^{13}C -NMR спектри супстанце 2	116
Слика 3.7	3. Репин	117
Слика 3.8	^1H -NMR спектри супстанце 2 (црвени) 2 и 3 (плави) (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	118
Слика 3.9	^{13}C -NMR спектар смеше супстанце 2 и 3	119
Слика 3.10	4. Јанерин	120
Слика 3.11	^1H -NMR спектар супстанце 4 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	121
Слика 3.12	^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 4	123
Слика 3.13	5. 19-Деооксијанерин	124
Слика 3.14	^1H -NMR спектар супстанце 5 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	126
Слика 3.15	^1H - ^1H COSY, HSQC и ^{13}C -NMR спектри супстанце 5	126
Слика 3.16	6. Бабилин Б	127
Слика 3.17	^1H -NMR спектар супстанце 6 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	128
Слика 3.18	HMBC, HSQC и COSY спектри супстанце 6	129
Слика 3.19	7. Цебелин Ј	130
Слика 3.20	^1H -NMR спектар супстанце 7 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	131
Слика 3.21	^1H - ^1H COSY, NOESY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 7	132
Слика 3.22	8. Рхапосерин	134
Слика 3.23	^1H -NMR спектар супстанце 8 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	135
Слика 3.24	HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^{13}C -NMR спектри супстанце 8	137
Слика 3.25	9. 2α,8α-Дихидрокси дехидрокостунолид	139
Слика 3.26	Масени спектар супстанце 9	139
Слика 3.27	^1H -NMR спектар супстанце 9 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	140
Слика 3.28	HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR/DEPT, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце 9	142
Слика 3.29	10. Хлорорепдиолид	145
Слика 3.30	^1H -NMR спектар супстанце 10 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	146
Слика 3.31	COSY и HMBC спектар супстанце 10	148
Слика 3.32	11. Панонин	149
Слика 3.33	Масени спектар супстанце 11	149
Слика 3.34	^1H -NMR спектар супстанце 11 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	151
Слика 3.35	HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце 11	152
Слика 3.36	12. Епоксирепдиолид	153
Слика 3.37	^1H -NMR спектар супстанце 12 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	155
Слика 3.38	^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 12	155
Слика 3.39	13. Репдиолид	156
Слика 3.40	^1H -NMR спектар супстанце 13 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	158
Слика 3.41	HSQC, COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 13	159
Слика 3.42	14. 2α-Хидрокси 8-дехидрокси 15-О-метакрилат салонитенолид	160
Слика 3.43	Масени спектар супстанце 14	160
Слика 3.44	^1H -NMR спектар супстанце 14 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	162
Слика 3.45	HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR/DEPT, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце 14	164
Слика 3.46	15. Матересинол	166
Слика 3.47	^1H -NMR спектар супстанце 15 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)	168
Слика 3.48	^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 15	169
Слика 3.49	16. Арктигенин	170
Слика 3.50	^1H -NMR спектар супстанце 16	171
Слика 3.51	^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 16	172

Слика 3.52	17. Арктин	173
Слика 3.53	¹ H-NMR спектар супстанце 17 (CDCl ₃ ; 400,0 MHz)	175
Слика 3.54	¹ H- ¹ H COSY и ¹³ C-NMR спектри супстанце 17	176
Слика 3.55	18. Сирингин	177
Слика 3.56	¹ H-NMR спектар супстанце 18 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	179
Слика 3.57	¹ H- ¹ H COSY, HSQC и ¹³ C-NMR спектри супстанце 18	180
Слика 3.58	19. Апигенин	181
Слика 3.59	¹ H-NMR спектар супстанце 19 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	182
Слика 3.60	20. Диосметин	183
Слика 3.61	¹ H-NMR спектар супстанце 20 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	185
Слика 3.62	21. Хиспидулин	186
Слика 3.63	¹ H-NMR спектар супстанце 21 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	188
Слика 3.64	22. Непетин	189
Слика 3.65	Хипохромно померање (око 30-50 nm) траке I на спектру AlCl ₃ након додатка раствора HCl	190
Слика 3.66	¹ H-NMR спектар супстанце 22 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	192
Слика 3.67	HSQC и HMBC спектри супстанце 22	192
Слика 3.68	23. Хиспидулин-7-О-β-D-глюкопиранозид	193
Слика 3.69	¹ H-NMR спектар супстанце 23 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	195
Слика 3.70	HSQC, HMBC, ¹³ C-NMR и ROESY спектари супстанце 23	196
Слика 3.71	24. Непетин-7-О-β-D-глюкопиранозид	197
Слика 3.72	¹ H-NMR спектар супстанце 24 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	200
Слика 3.73	HSQC и ROESY спектри супстанце 24	200
Слика 3.74	25. 6-Метоксикаемферол	201
Слика 3.75	¹ H-NMR спектар супстанце 25 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	203
Слика 3.76	¹³ C-NMR спектар супстанце 25 (CD ₃ OD; 50,3 MHz)	204
Слика 3.77	Графички приказ основних група хемијских једињења изолованих из есенцијалног уља биљке <i>C. rannonica</i>	206
Слика 3.78	26. Рузмаринска киселина	209
Слика 3.79	¹ H-NMR спектар супстанце 26 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	211
Слика 3.80	¹³ C-NMR и HSQC спектар супстанце 26 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	212
Слика 3.81	27. Метилестар рузмаринске киселине	213
Слика 3.82	¹ H-NMR спектар супстанце 27 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	214
Слика 3.83	HMBC и ¹³ C-NMR спектри супстанце 27 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	215
Слика 3.84	28. 3-О-Метил рузмаринска киселина	216
Слика 3.85	¹ H-NMR спектар супстанце 28 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	218
Слика 3.86	HSQC и ¹³ C-NMR спектари супстанце 28	218
Слика 3.87	29. Глочидиобозид	219
Слика 3.88	¹ H-NMR спектар супстанце 29 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	221
Слика 3.89	HMBC, COSY и HSQC спектри супстанце 29	223
Слика 3.90	30. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина	224
Слика 3.91	¹ H-NMR спектар супстанце 30 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	225
Слика 3.92	31. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина 12-О-β-глюкопиранозид	226
Слика 3.93	¹ H-NMR и ¹³ C-NMR спектри супстанце 31 (CD ₃ OD; 400,0; 50,3 MHz)	228
Слика 3.94	32. Тимохинол-5-О-β-глюкопиранозид	229
Слика 3.95	¹ H-NMR спектар супстанце 32 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	230
Слика 3.96	HMBC, HSQC и ROESY спектри супстанце 32	232
Слика 3.97	33. Тимохинол-2-О-β-глюкопиранозид	232
Слика 3.98	¹ H-NMR спектар супстанце 33 (CD ₃ OD; 400,0 MHz)	234
Слика 3.99	HSQC и HMBC спектри супстанце 33	235

1. ОПШТИ ДЕО

1.1 Значај и употреба активних метаболита добијених из лековитог биља

Употреба лековитог биља документована је кроз историју свих цивилизација. Пре проналаска и употребе синтетичких дрога, људски род је потпуно зависио од употребе медицинског биља. Биљке су коришћене за лечење и превенцију различитих обољења, затим као зачини у исхрани, а због пријатног, специфичног мириса ароматичне биљке су употребљаване и у козметици. Биљке су коришћене у сировој форми, као прах или екстракт. Сматра се да је више од 20000 биљних врста коришћено кроз историју у традиционалној медицини (Namatouchi, 2002).

Древно знање о употреби биљака, пре свега у лечењу различитих обољења, омогућило је у модерном времену откривање активних супстанци код којих је потврђено да су заслужне за лековито дејство биља. Заправо, вишевековним истраживањима која су и данас актуелна, а употребом различитих хемијских техника, данас је познато да се у биљној ћелији одвијају два међусобно повезана метаболитичка пута. Примарни метаболитички пут односи се на добијање примарних биомолекула (угљенихидрати, масти, протеини, витамини и минералне материје), док секундарни метаболитички пут синтетише секундарне метаболите различите хемијске структуре у оквиру којих је велики број физиолошки активних једињења (феноли, танини, кумарини, флавоноиди, алкалоиди, Mann, 1987). Почетком деветнаестог века научници изолују и идентификују прве секундарне метаболите из биљака, да би се током двадесетог века открило да су управо секундарни метаболити (или природни производи) активне супстанце одговорне за лековита и токсична дејства биљака. Заправо, утврђено је да ове супстанце показују значајну биолошку активност и да су потенцијални извори за нове фармацеутске лекове (антибиотици, цитостатици, антиинфламативи итд).

Током двадесетог века изражена је потреба модерне медицине за добијањем лекова са дефинисаним и циљним дејством. Употреба биљака и

њихових активних компоненти у лечењу потпуно је замењена хемијском синтезом у развијеним земљама.

Међутим, недавне публикације базиране на клиничким испитивањима екстраката биљака и изолованих секундарних метаболита потврђују њихово лековито дејство и предлажу интензивнију употребу у модерној медицини (Butler, 2008; Harvey, 2008). Данас се више од 30% свих познатих лековитих и ароматичних биљака користи у медицинске сврхе, а њихова употреба и даље расте. Од када је светска здравствена организација (WHO) објавила да 80% социјално угрожене популације у развијеним земљама зависи од биљака и/или од алтернативне медицине и затражила од земаља чланица да истражују безбедне домаће лекове за њихову националну здравствену заштиту, раст примене биља у модерној медицини је у сталном порасту. Тако, у сагласности са овом чињеницом забележено је да 1984. године, најмање 25% лекова произведених у западним земљама базирано је на природним производима (издато у Америци и Канади). Најновија истраживања показују да су 28% лекова произведено и међународно признато у периоду 01. 1981. – 06. 2006. природни производи или њихови деривати и да је чак 50-80% антибактеријских и антиканцерогених медикамената заправо базирано на природним производима (Newman & Cragg, 2007, 2010).

Биљни и природни производи данас су у широкој употреби пре свега због мање штетности на људско здравље и околину у односу на синтетичке дроге, а притом су и јефтинији и доступнији. На тржишту, биљке су присутне у облику сирове дроге, тинктуре или екстракта, док се неки секундарни метаболити могу наћи у облику пилула. Поред биљака, нови фармаколошки препарати испитују се у микробима, инсектима, лишајевима, морском биљном и животињском свету, због чега су истраживања ових природних ресурса у сталном развоју.

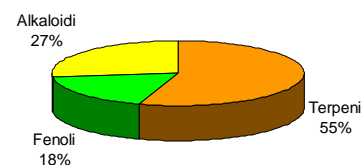
1.2 Преглед хемијских структура и биосинтетичких путева неких секундарних метаболита биљака

До сада је идентификовано и изоловано више хиљада различитих секундарних метаболита биљака. Секундарни метаболити су мали молекули, обично присутни у ограниченим количинама у биљној ћелији. При том, за разлику од примарних метаболита, немају хранљиве карактеристике али имају значајну функцију за биљку, као биљни хормони, у заштити биљке од пестицида, патогена, хербивора. Такође, задужени су за боју и мирис биљке (Rosenthal & Berenbaum, 1991, Schafer & Wink, 2009). Свака фамилија, род и врста продукује карактеристичну смешу ових једињења (Walton & Brown, 1999). Секундарни метаболити биљака могу се сврстати на основу:

- хемијске структуре (садрже прстен, шећер...),
- састава (садрже хетеро атом),
- растворљивости у различитим растварачима,
- на основу биосинтетичког метаболичког пута.

На основу биосинтетичког пута, најпростија класификација укључује три основне групе секундарних метаболита као природних производа:

- Терпени и терпеноиди (биосинтетички прекурсор је мевалонска киселина и 1-деокси- D-ксилоулозо-5-фосфат). Молекули су изграђени од угљеника, водоника и кисеоника, и идентификовано је око 30000 различитих једињења ове групе.
- Фенолна једињења (биосинтетички прекурсор су једноставни шећери и аминокиселина фенилаланин). Молекул ових једињења садржи бар један бензенов прстен, а елементарна анализа указује на присуство водоника и кисеоника. Из ове групе идентификовано је око 8000 различитих једињења.
- Једињења која садрже азот (биосинтетички прекурсор су аминокиселине, различити молекули који могу да садрже и сумпор). До сада, из ове групе природних производа изоловано је око 12000 једињења (Croteau et al., 2000).



Слика 1.1 Основне групе секундарних метаболита и проценат њихове заступљености

Предмет овог рада је испитивање секундарних метаболита одређених биљних врста из прве две наведене групе, стога ће њихова биосинтеза и биолошка активност, посебно антимикуробна, бити детаљно описана.

1.2.1 Терпеноиди

Терпени (терпеноиди) су структурно различита и широко распрострањена група природних производа која садржи око 30000 дефинисаних једињења изолованих из биљних и животињских извора (Davis & Croteau, 2000). Велики број терпеноида је изолован из биљака и откривено је да имају више значајних улога пре свега везано за примарни метаболизам (неколико биљних хормона као и најзаступљенији биљни терпеноид, фитол, који је бочни ланац фотосинтетичког пигмента хлорофила), затим у еколошким интеракцијама (као хемијски заштитници од хербивора и патогена, опрашивачи, алелопатски агенси, итд.). Многи терпени имају економски значај, укључујући есенцијална уља, каротеноидне пигменте и природну гуму. Основна градивна јединица молекула терпена је изопрен, угљоводоник са 5C атома. Изопренске јединице могу се везивати на различите начине и због тога су терпени, међу природним производима, најраспрострањенија и структурно најразноврснија група једињења. Изопрен је најједноставнији терпен познат као хемитерпен. Повезан са другим изопреном даје терпенску јединицу, монотерпен (C_{10}). Сесквитерпени садрже три изопренске јединице (C_{15}), дитерпени (C_{20}) и тритерпени (C_{30}) садрже четири, односно шест изопренских јединица. Тетратерпени садрже четири терпенске јединице док политерпени више од четири терпенске јединице или више од осам изопренских јединица (Davis & Croteau, 2000; Drew et al., 2009).

Бисинтетички прекурсор свих терпена су активне изопренске јединице изопентил-дифосфат (IPP) и диметилалил-пирофосфат (DMAPP) (Схема 1). Биосинтеза терпена у биљној ћелији може се посматрати на више нивоа. Први ниво је биосинтеза горе наведених активних изопренских јединица. Следећи корак је њихова кондезација при чему се добија геранил-дифосфат (GDP). Кондезацијом још једног молекула изопентил-дифосфата са геранил-

дифосфатом добија се фарнезил дифосфат (FPP), који везивањем још једног молекула (IPP) даје велики изопреноидни прекурсор.

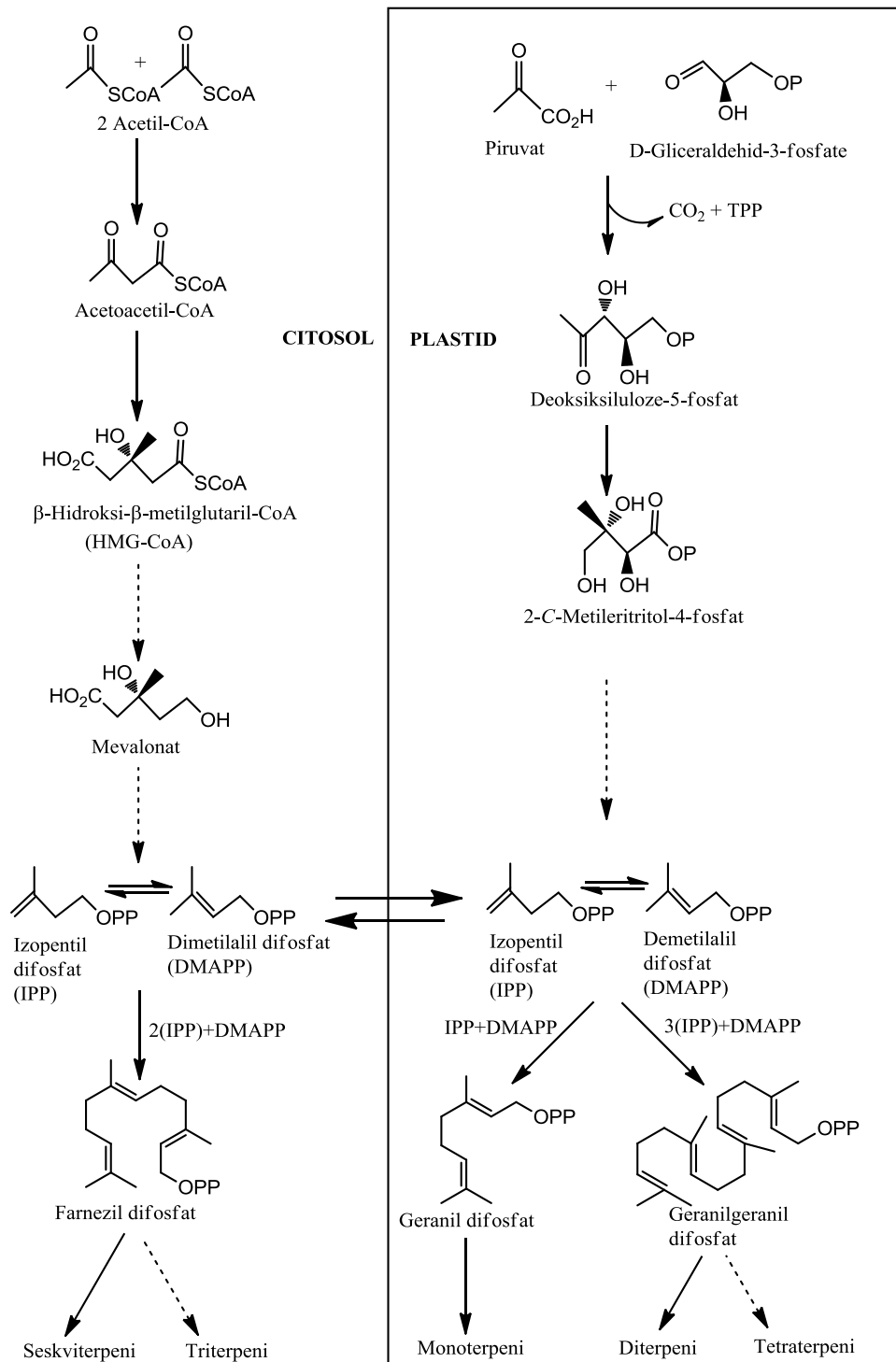


Схема 1.1 Интрацелуларна локација IPP/DMAPP у биљци, два биосинтетичка пута у којима учествују као и потенцијално место повезаности метаболичких путева (означено стрелицама)

Биосинтетички пут преко мевалонске киселине (MVA)

Биосинтеза IPP и DMAPP започиње у цитосолу у присуству NADPH као енергетског извора. Механизмом Клајзенове, а затим и алдолне кондензације, једине се три молекула ацетил-СоА, и дају β -хидрокси- β -метилглутарил-СоА (HMG-СоА) (Berg et al., 2007; Drew et al., 2009). Наведена реакција катализована је ензимима ацетоацетил-СоА синтетазом и β -хидрокси- β -метилглутарил-СоА синтетазом. Значајно је напоменути да је код неких биљака откривено да поседују ензиме који катализују добијање HMG-СоА директно из ацетил-СоА, без претходног добијања ацетоацетил-СоА као интермедијера. Затим се HMG-СоА редукцијом са NADPH+H⁺ претвара у мевалонску киселину, прекурсор изопреноида у цитосолу. Помоћу АТФ мевалонска киселина се активира у пирофосфат мевалонску киселину а затим се декарбоксилацијом, елиминацијом и изомеризацијом добијају примарни прекурсори у биосинтези терпеноида: IPP/DMAPP (Схема 1.1).

Биосинтетички пут преко 1-деокси-D-ксилозо-5-фосфата (DXP пут)

Овај биосинтетички пут откривен је крајем XX века и за сада је нађен у свега неколико биљака и микроорганизама. Финални продукти су IPP/DMAPP, али интермедијер није мевалонска киселина (Rohmer et al., 1993). На основу биосинтетичких интермедијера 1-деокси-D-ксилозе-5-фосфата и 2-метил-D-еритритол-4-фосфата пут је познат као DXP или MEP пут. Поред разлике у интермедијерима, најважнија разлика ових путева биосинтезе је различита локација ензима у ћелији. Откривено је да се DXP пут одвија у пластициду ћелије (хлоропласт, леукопласт, итд.) и да се овим путем формирају каротеноиди, хлорофил, дитерпени и токофероли за разлику од MVA пута који се одвија у цитосолу и продукује IPP/DMAPP за добијање сесквитерпена, стерола и убихинона (Okada et al., 2008). DXP пут започиње помоћу TPP који иницира декарбоксилацију пирогрођане киселине и кондензацију са D-глицералдехид-3-фосфатом у 1-деокси-D-ксилозо-5-фосфат (Схема 1.1). У молекулу се одвија премештање типа-пинакола, праћено редукцијом уз формирање 2-метил-D-еритритол-4-фосфат (MEP), који активира помоћу СТР

и АТР даје неколико интермедијера који се одједном конвертују у IPP/DMAPP (Withers and Keasling, 2007).

Када су у питању биљке код којих се одвијају оба метаболичка пута, методом изотопног обележавања атома, потврђен је индиректан прелаз активног протона са пластицида у цитоплазму на оба прекурсора, IMP и DMAPF. Верује се да је ово можда разлог због чега је DXP пут дуго година био непознат (Bick & Lange 2003).

Ензими који катализују стварање фарнезил дифосфата и већих терпена

IMP и DMAPF су прекурсори за све групе терпеноида, а даље реакције трансформације су катализоване различитим пренил-синтетазама (трансферазама). Наведене трансферазе, према степену специфичности и везивању броја изопреноидних јединица (Barton Sir et al., 1999), сврстане су у четири групе.

Група I: кратко ланчани ензим пренил-дифосфат синтетаза која учествује у формирању изопреноидних јединица до 20 угљеникових атома у молекулу. Ензим је активан у присуству Mg^{2+} или Mn^{2+} као кофактора (Barton Sir et al., 1999).

Групе II и IV: средњи и дуго-ланчани ензими пренил-дифосфат синтетазе који учествују у синтези терпеноида са 20 и више угљеникових атома.

Група III: пренил трансфераза која учествује у изградњи FPP, прекурсора свих сесквитерпена. Ензим FPP синтетаза је обимно проучавана (Barton Sir et al., 1999), а резултати су показали да добијање различитих производа зависи од врсте ћелије (прокариота или еукариота), као и да активни део ензима, специфична фенил група аминокиселина, одређује величину створеног пренил-дифосфата.

1.2.1.1 Сесквитерпенски лактони и биосинтеза

Сесквитерпенски лактони (Sls) припадају групи терпеноида који садрже три изопренске јединице и чија је молекулска формула $C_{15}H_{24}$. До сада је изоловано и идентификовано више од 5000 супстанци које припадају овој групи (Fraga, 1992-2012). Сесквитерпенски лактони изоловани су из различитих

фамилија биљака Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae, Hepatideae, итд. али највећи број сесквитерпенских лактона пронађен је у фамилији Asteraceae (Compositae). На основу C-скелета лактони су подељени на псеудогвајанолиде, гвајанолиде, гермакранолиде, еудесманолиде, хелианголиде и хиптокретеннолиде. Гермакранолиди, гвајанолиди и еудасманолиди су најзаступљенији у природи. Суфикс "олид" означава да је лактонски прстен везан за сесквитерпен. Представник сесквитерпенских лактона је гермакранолид костунолид чији је биосинтетички прекурсор сесквитерпен гермакрон који садржи карбоциклични прстен са десет угљеникових атома. Лактони се у највећој количини налазе у лишћу и цвету биљке.

Испитивањем биосинтезе сесквитерпена утврђено је да FPP, прекурсор сесквитерпена, учествује у више различитих реакција циклизације, што за последицу има откривање више од 300 различитих цикличних сесквитерпенских структура. Циклизација, изомеризација а затим јонизација *trans*- FPP омогућавају добијање различитих циклохексаноида, циклодеканоида, циклодеканида или бициклохесаноидних структура. Добијени циклични молекули су активни тако да даље лако подлежу многим хемијским реакцијама: Wagner-Meerwein премештању, миграцији група, адицији на двоструке везе (Bohlmann et al., 1998).

Од свих сесквитерпенских лактона изолованих до сада, највише испитиван па самим тим и најбоље окарактерисан је гермакранолидни лактон костунолид. Овај сесквитерпенски лактон изолован је из биљне фамилије Asteraceae и на њему су вршена и прва испитивања биосинтезе лактона.

Утврђено је да почетни корак у биосинтези костунолида јесте циклизација FPP у (+)-гермакрена А. Добијање гермакрена А је катализовано помоћу ензима гермакрена А синтетазе (I), која садржи Mg^{2+} као кофактор. Због присуства двоструких веза у структури FPP, две (*E*)-оријентисане двоструке везе су инкорпориране у добијеном десеточланом прстену. Оксидацијом изопренилног бочног ланца у примарни алкохол у присуству ензима (+)-гермакрена А-хидроксилазе, а затим даљом оксидацијом помоћу $NAD(P)^+$ -зависне дехидрогеназе (II) добија се гермакренска киселина (III).

Хидроксилацијом на положају С-6 (IV), а затим лактонизацијом, добија се као крајњи производ лактон (+)-костунолид (Схема 1.2) (De Kraker et al., 2001).

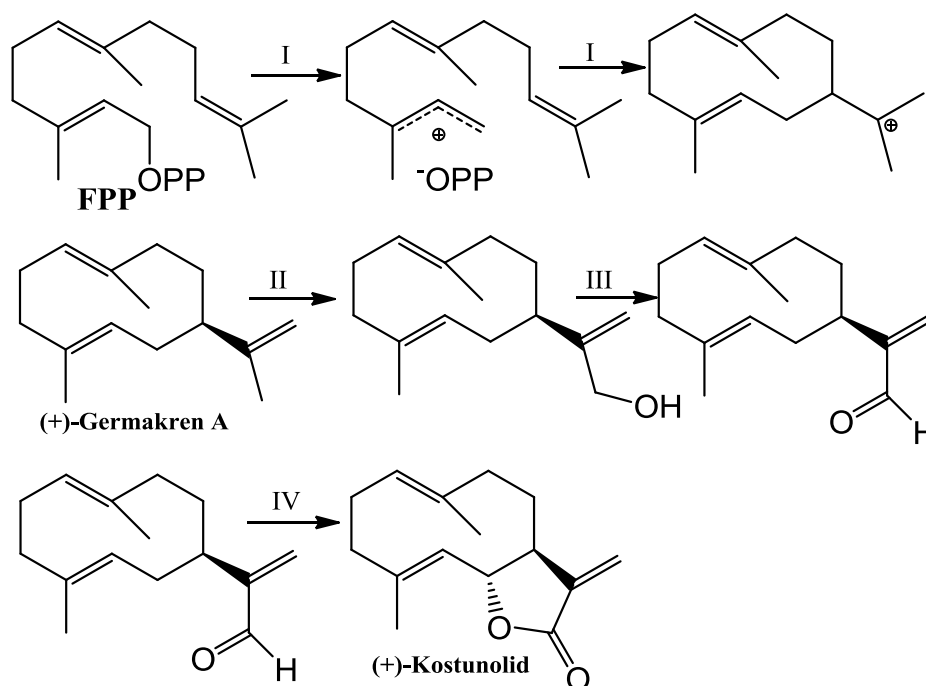


Схема 1.2 Формирање (+)-костунолида

Велики број стереоспецифичних трансформација гермакранолида и њихових деривата у еудезманолиде и гвајанолиде истражено је и публиковано. Међутим, у периоду 1998. – 2002. године, Бујмастер (Bouwmeester) и његови сарадници издали су серију публикација у којима су презентовали резултате истраживања ензима који учествују у реакцији биосинтезе костунолида и његових деривата код биљке водопија (Asteraceae). На основу ових истраживања, гвајанолидни скелет настаје епоксидацијом или хидроксилацијом костунолида. Заправо, ензимска епоксидација костунолида на положају С-4/С-5 директно даје партенолид (De Kraker et al., 2002; Drew et al., 2009) од кога се *trans*-ануларном циклизацијом извијеног прстена добија интермедијер (1). Елиминацијом молекула воде са интермедијера (1) добија се директно гвајанолидни скелет. Међутим, ензими који учествују у последњој реакцији формирања гвајанолида код фамилије Asteraceae до данас нису изоловани и идентификовани (Схема 1.3).

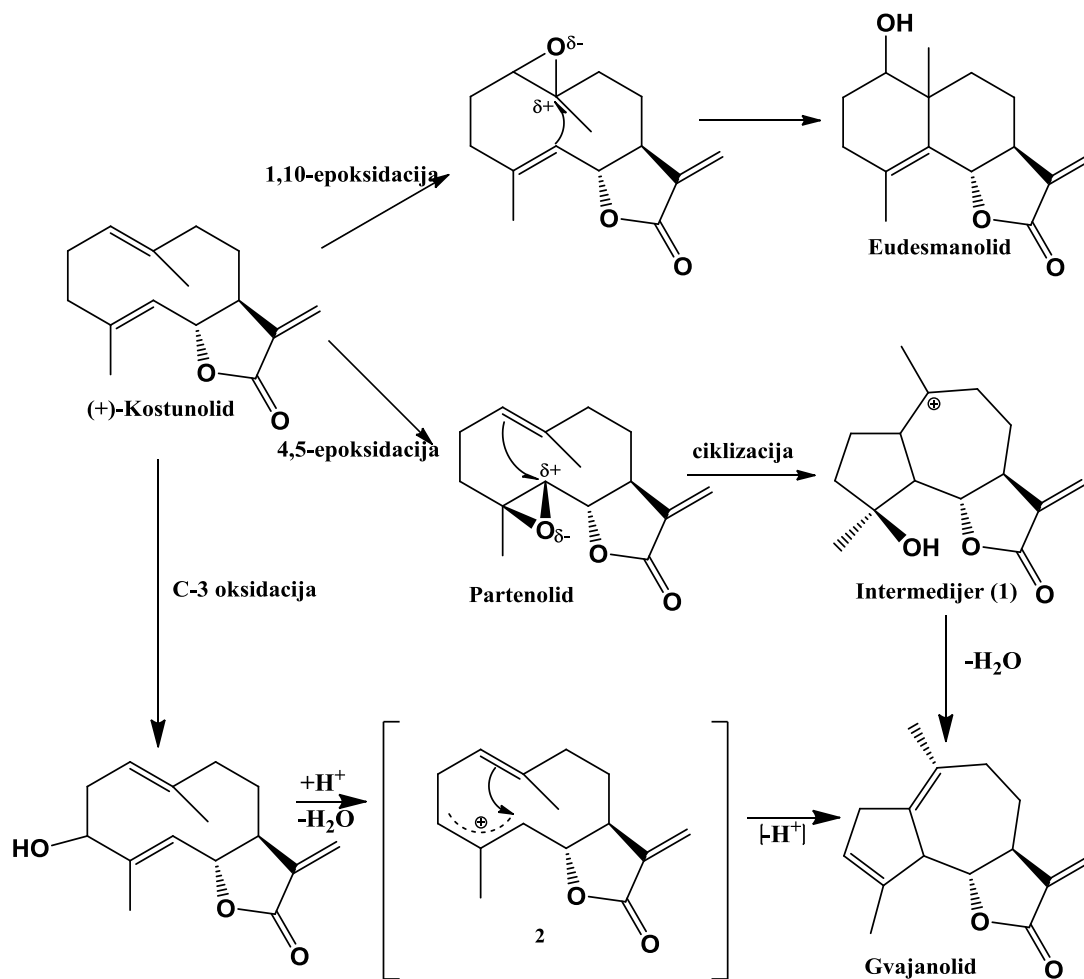


Схема 1.3 Предложени метаболички пут формирања еудесманоида и гвајанолида од костунолида код биљке водопија

У наставку предложеног биосинтетичког пута описаног на **схеми 1.3**, наведен је и алтернативни пут: ензимска хидроксилација на положају C-3 (+)-костунолида при чему се добија интермедијер (**2**), који након дехидрогенизације и циклизације, даје скелет гвајанолида (De Kraker et al., 1998, 2002).

1.2.2 Фенолна једињења

Фенолна једињења представљају велику и значајну групу секундарних метаболита. До сада, изоловано је и идентификовано више од 8000 фенолних једињења која су претежно лоцирана у вакуолама биљке. Изолована су у слободној форми или као супституисани деривати при чему су најчешћи

супституенти шећери: глукоза, галактоза, рамноза, маноза, рутиноза и други. Једноставна фенолна једињења врло су ретка у природи. Подељена су у више група (приказ ниже) у зависности од броја угљеникових атома који чине основни фенолни скелет (Pietta, 2000):

- Основни феноли, бензохинони (C_6),
- Хидробензенске киселине (C_6-C_1),
- Ацетофенони, фенилсирћетне киселине (C_6-C_2),
- Хидроксициметна киселина, кумарини, фенилпропани, хромони (C_6-C_3),
- Нафтохинони (C_6-C_4),
- Ксантони ($C_6-C_1-C_6$),
- Стилбени, антрахинони ($C_6-C_2-C_6$),
- Флавоноиди (флавоноли, флаволи, флаванони, изофлаволи и антоцианини) ($C_6-C_3-C_6$),
- Лигнани, неолигнани (C_6-C_3)₂,
- Бифлавоноиди ($C_6-C_3-C_6$)₂,
- Лигнини (C_6-C_3)_n,
- Катехол меланини (C_6)_n,
- Кондезовани танини ($C_6-C_3-C_6$)_n.

Ова једињења имају веома важну улогу у метаболизму биљака и битна су за раст и репродукцију биљних врста. Сматра се да ове супстанце имају улогу заштите биљака од природних (патогени и предатори) и хемијских (UV-радијације, суше, итд.) агенаса (Parr & Bolwell, 2000). Фенолна једињења одређују карактеристичну боју и мирис код различитих биљних врста (Alasalvar et al., 2001).

Феноли или полифеноли могу бити уопштено дефинисани као једињења која у свом саставу садрже ароматични прстен са хидроксилном групом (феноли) или више њих (полифеноли), при чему у структуру могу бити укључене и различите функционалне групе (естри, метил етри, гликозиди, итд.). Прецизнија дефиниција међутим, дефинише феноле и полифеноле као секундарне метаболите који се биосинтетички добијају тзв. шикимско-фенилпропаноидно-флавоноидним путем (пут шикимске киселине). Они се углавном добијају из циметне киселине, која се формира из фениланина, у присуству l-фенилаланин амонијум-лиазе (PAL). Овај биосинтетички пут у току нормалног развоја биљке, обезбеђује јој око 20% угљеника (**Схема 1.4**).

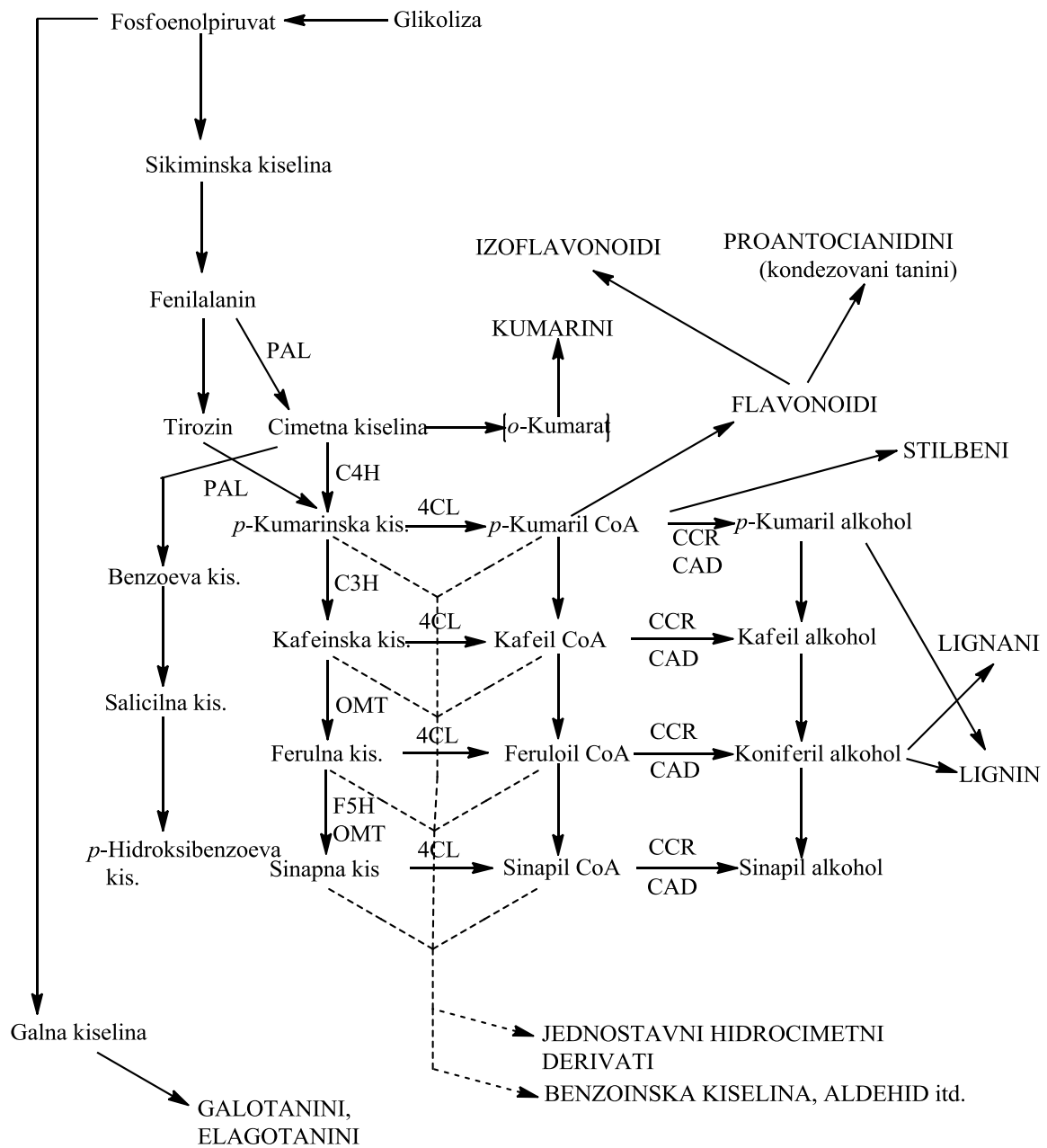


Схема 1.4 Биосинтеза фенолних једињења путем шикимске киселине (Parr & Bolwell, 2000; Dicko, et al., 2006)

Фенилаланин се деаминује помоћу фенилаланин амониум лиазае при чему се добија циметна киселина која се хидроксилиује помоћу цимет 4-хидроксилазе

(C4H) у *p*-кумаринску киселину. Помоћу 4-кумарат-CoA лигазе (4CL) *p*-кумаринску киселину активира се у *p*-кумарил-CoA. Ово једињење је прекурсор у синтези флавоноида, стилбена и осталих фенилпропаноида као и монолигнола *p*-кумарил алкохола. Даља хидроксилација на положају 3 помоћу кумарат-3-хидроксилазе (C3H) даје кофеинску киселину или кофеил-CoA. Додата хидроксилна група може бити метилована помоћу O-метилтрансферазе (OMT) при чему се добија ферулна киселина или ферулил-CoA. Кофеинска и ферулна киселина могу се накнадно активирати у одговарајући CoA тиоестар помоћу 4-кумарат-CoA лигазе; ферулил-CoA је прекурсор за синтезу кониферил алкохола монолигнола. Такође, ферулат може бити хидроксилован у присуству ферулат 5-хидроксилазе (F5H) у 5-хидроксиферулат који је субстрат за 4CL. Хидроксилна група на положају 5 код 5-хидроксиферулата може се накнадно метиловати помоћу OMT и дати синапате; одговарајуће метиловање 5-хидроксиферулил-CoA у синапил-CoA је потврђено и највероватније се дешава у присуству ензима кофеил-CoA 3-O-метилтрансферазе (CCoA-OMT). Директна активација синапата у синапоил-CoA је теоретски могућа, али није потврђена. Експериментално је доказано да редукција CoA до одговарајућих алдехида и алкохола као коначних производа катализована је одговарајућом алдехид-CoA редуктазом (ACR) и алкохол дехидрогеназом (ADH).

1.2.2.1 Фенолне киселине. Биосинтеза рузмаринске киселине

Фенолне киселине се код биљака могу добити преко шикимске киселине, фенилпропаноидним путем (Схема 1.4) или као продукти разлагања лигнина или полифенола који су акумулирани у ћелијском зиду васкуларног биља (Carpita & McCann, 2000; Croteau et al., 2000; Harborne, 1980). Фенолне киселине добијене на овај начин су једноставне хемијске структуре C₆-C₃ (фенилпропаноидног типа) и обавезни су секундарни метаболити, нарочито код ароматичног биља. Међу многобројним фенолним киселинама акумулираним у биљној ћелији, рузмаринска киселина привлачи посебну пажњу научника и припада групи молекула од посебног интереса. Заправо, поједине биљке је акумулирају у количини много већој од саме биљке (до 36% од суве масе ћелије), па се из тог разлога предлаже биотехнолошка производња рузмаринске

киселине из култивисаних биљних ћелија. По хемијском саставу рузмаринска киселина је естар кофеинске и 3,4-дихидроксифениллактонске киселине. Обично се налази у биљкама фамилије Boraginaceae и Lamiaceae (ограничено на субфамилију Nepetoideae), али је изолована и из многи других фамилија. До сада су изоловани и многи деривати рузмаринске киселине. Аминокиселине L-фенилаланин и L-тирозин су прекурсори у биосинтези рузмаринске киселине. Свих осам ензима који катализују реакцију биосинтезе су изоловани и идентификовани као и cDNA која је одговорна за кодирање тј. синтезу наведених ензима (Petersen and Simmonds, 2003). Ензими су изоловани из ћелијских суспензија биљних врста *Anchusa officinalis* (Boraginaceae) и *Coleus blumei* (Lamiaceae). Фенилаланин се трансформише на начин описан код биосинтезе фенолних једињења (Схема 1.5). Први метаболички корак код L-тирозина је трансминација са 2-оксоглутаратом при чему се добија 4-хидроксифенилпируват и глутамат. Ензим који катализује ову реакцију је пиродоксалфосфат зависна трансминаза или тирозин аминотрансфераза (ТЕТ). Ензим као и ген cDNA помоћу ког се синтетизује ензим су изоловани из биљке *Coleus blumei*. Како 4-хидрокси-фенилпируват није идентификован као интермедијер приликом биосинтезе аминокиселина, представљени пут из тирозина је логичан. 4-Хидрокси-фенилпируват се затим редукује до 4-хидроксифениллактата помоћу хидроксифенилпируватне редуктазе (HPPR) (Petersen et al., 1993). Ензим је NADH и NADPH зависан и није специфичан с обзиром да редукује и 3,4-дихидроксифенилпируват са смањеном активношћу. Цео ланац cDNA од HPPR је изолован из *Coleus blumei*. Као крајњи производ добија се хидроксифениллактат R (+)-стереоизомер, једини могући изомер у реакцији коју катализује хидроксифениллактат хидроксиманил трансферазе (синтетаза рузмаринске киселине, RAS). У присуству овог ензима одвија се реакција естерификације 4-кумаринске киселине и хидроксилне групе 4-хидроксифениллактата уз формирање 4-кумарил-4'-хидроксифениллактата који може накнадно бити хидроксилизован на положају 3 и 3' помоћу цитохром P450 монооксигеназе. Ензим, као и ген помоћу ког се синтетизује, изоловани су из *Lithospermum erythrorhizon* (Схема 1.5).

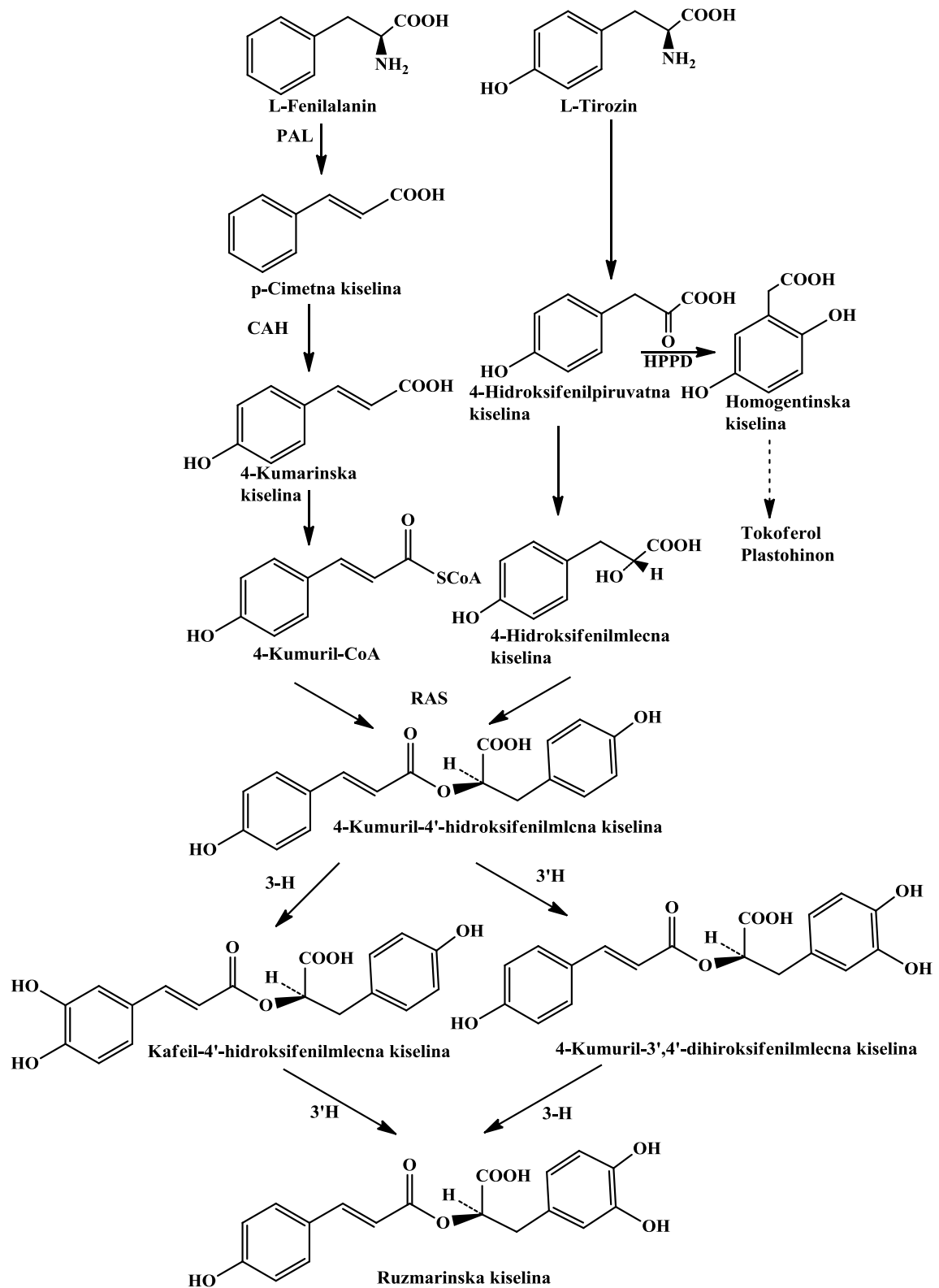
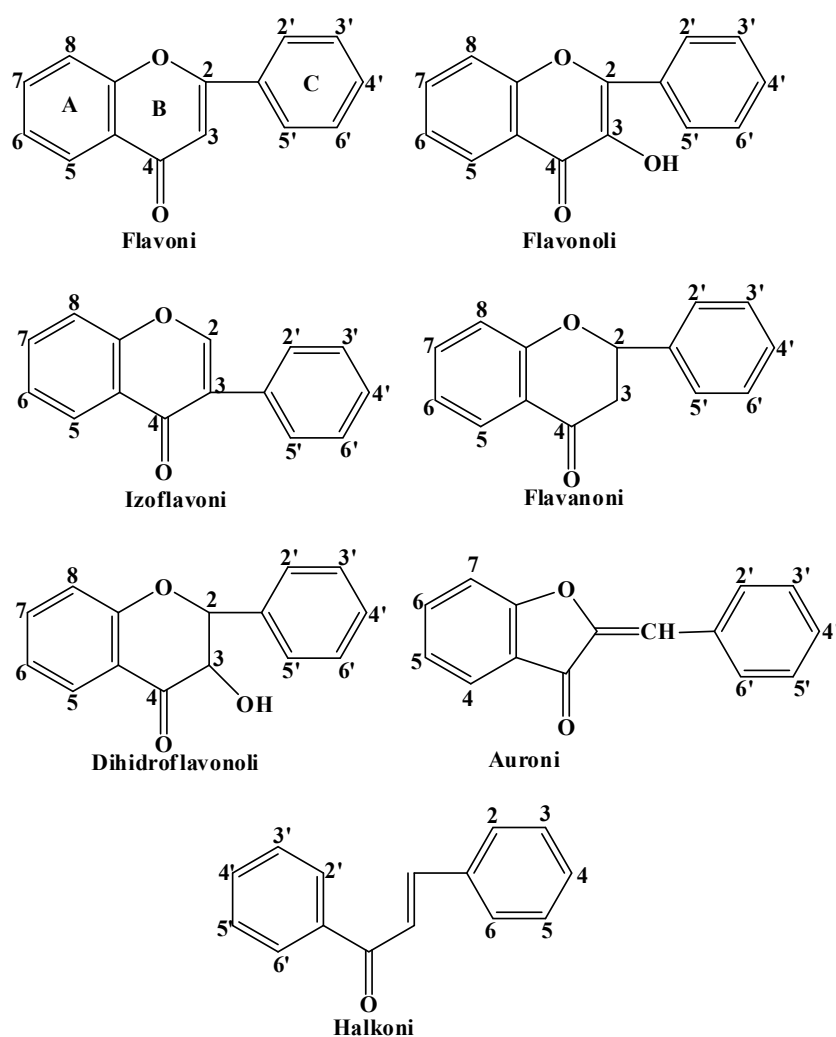


Схема 1.5 Биосинтеза рузмаринске киселине

1.2.2.2 Флавоноиди

Флавоноиди припадају групи природних једињења са различитим фенолним структурама, широко распрострањени у биљном свету. Изоловани су из воћа, поврћа, житарица. Налазе се у кори, корену, стаблу и цвету биљака (Nijveldt et al., 2001). Више од 4000 различитих флавоноида је изоловано до сада од којих су многи одговорни за боју цвета, плода и листа биљке. Подељени су у више група, према основној хемијској структури (Слика 1.2).



Слика 1.2 Структуре флавоноидних представника

Флавоноиди се у природи налазе у облику агликона, гликозида и метилованих деривата. Флавоноид агликон садржи бензенски прстен (A) који је кондезован

за шесточлани прстен (C), који на позицији C-2 садржи фенил групу (B) као супституент (**Слика 1.2**). Шесточлани прстен кондезован са бензенским прстеном је или α -пирон (флаваноли и флаванони) или његов дихидродериват (дихидрофлавонол и дихидрофлавонон). Позиција фенилне групе раздваја флавоноиде у две основне групе: флавоноиди (позиција C-2) и изофлавоноиди (позиција C-3). Флаваноли се разликују од флавонона по хидроксилној групи на положају C-3 и двострукој вези на положају C-2/C-3. Аурони садрже бензофурански елемент који је повезан са фенолном групом на позицији C-2. Код аурона, халкон група је затворена у облику петочланог прстена у односу на шесточлане прстенове који су типични за флавоноиде. Флавоноиди су често хидроксиловани на положајима 3,5,7,2',3',4',5'. Метиловање и ацетиловање алкохолних група је такође често код флавоноида изолованих из биљака. Шећери су најчешће лоцирани на позицији C-3 или C-7 и од шећера су до сада идентификовани L-рамноза, D-глокоза, галактоза и арабиноза (Raj Narayana et al., 2001). Халкон је ароматични кетон са енонском групом у централном делу молекула и они су најчешће интермедијери у биосинтези флавоноида.

Биосинтеза флавоноида почиње конdezацијом једног молекула 4-кумарил-СоА са три молекула малонил-СоА дајући нарингенин халкон. Ова реакција се одвија у присуству ензима халкон синтетазе (CHS). Два непосредна прекурсора халкона су директни или индиректни продукти два различита биосинтетичка пута примарног метаболизма:

- Кумарил-СоА је синтетизован од аминокиселине фенилаланина (**Схема 1.4**).
- Малонил-СоА је добијен карбоксилацијом ацетил-СоА, који је централни интермедијер у Кребсовом циклусу.

Добијени халкон затим, реакцијом изомеризације, у присуству ензима халкон флаванон изомеразе (CHI) даје флаванон - централни интермедијер од кога се метаболички пут грана, дајући горе наведене класе флавоноида (**Схема 1.6**).

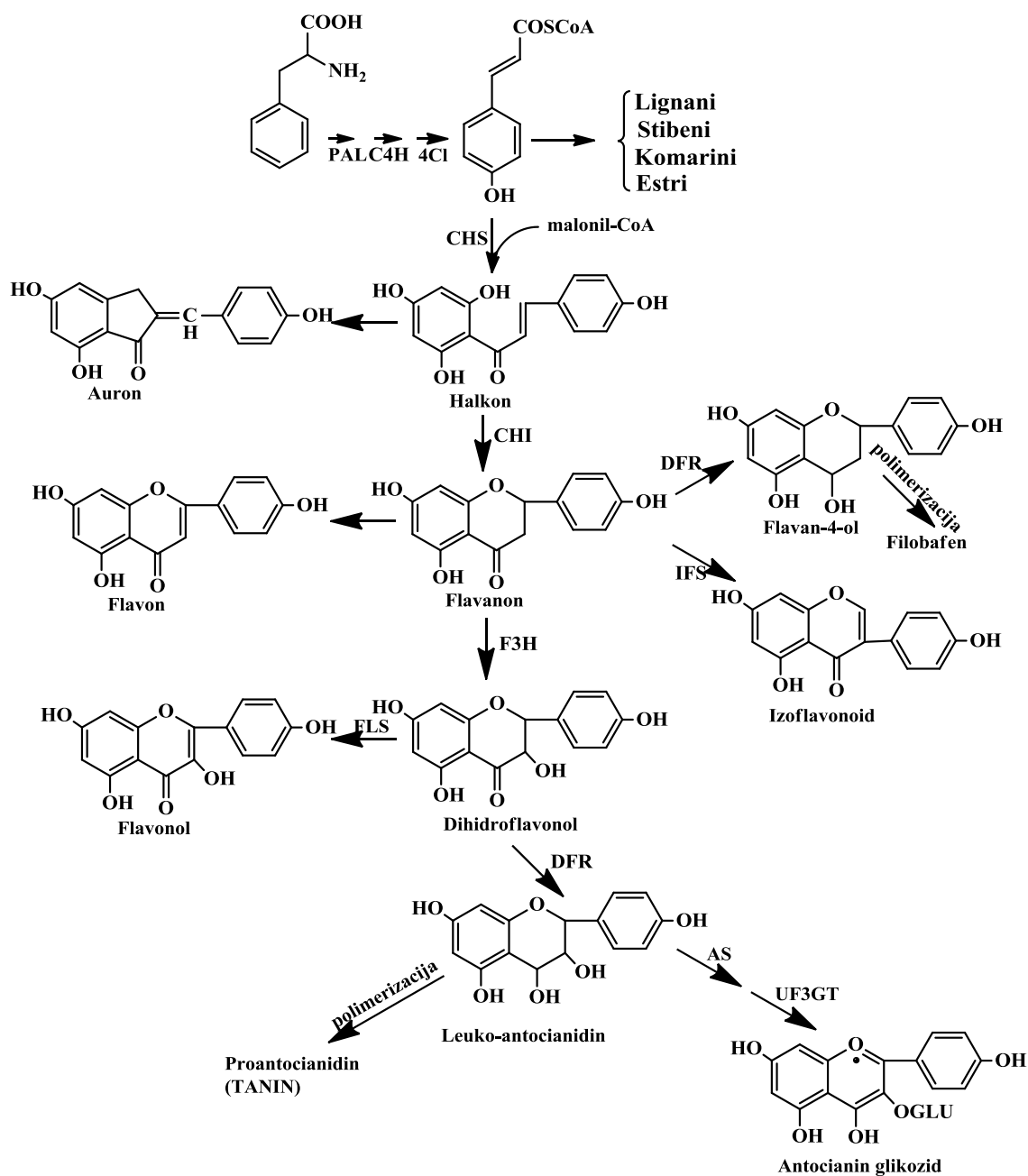


Схема 1.6 Биосинтетички пут флавоноида
 (Ензими: фенил амониум-лиаза (PAL); цимет 4-хидроксилазе (C4H); 4-кумурил-коензим А лигазе (4CL); халкон синтаза (CHS); халкон флаванон изомераза (CHI); флаванон-3F-хидроксилазе (F3H); ди hidroflavonol 4-редуктазе (DFR); флавонол синтазе (FLS); изо флавоноид синтазе (IFS); антоцианин синтазе (AS); флавоноид 3-0-глукозилтрансферазе (F3GT); UDP глукозе (UDP-Glc))

1.2.2.3 Лигнани. Биосинтеза лигнана

Лигнани и неолигнани су група природних производа добијених купловањем два молекула C_6-C_3 . Израз лигнан користи се код оних једињења код којих су две јединице C_6-C_3 повезане β,β' -везом за разлику од неолигнана када су две јединице купловане на други начин (m,m' ; γ,γ' ; β,m' , итд.).

Концепт да су лигнани деривати добијени полимеризацијом кониферил алкохола датира још с краја XIX и почетком XX века (Freudenberg, 1965). Потврда оваквог метаболичког пута, да су кониферил алкохол и остали монолигноли прекурсори, добијена је пре око тридесет година (Freudenberg, 1965; Freudenberg and Neish, 1968; Higuchi & Brown, 1963). Међутим, још увек није потпуно разјашњено на који начин је фаворизован одређени биосинтетички пут у ћелији код различитих биљака или у различитим ћелијама исте биљне врсте. Три монолигнола, који се разликују по остатку на ароматичном прстену, могу бити полимеризовани у лигнан (**Схема 1.7**). Релативна количина различитих монолигнола у лигнану зависи од биљне врсте као и од тоталног садржаја лигнана. Механизам који контролише ове варијације није у потпуности познат. Такође, механизам као и ензими који катализују реакције биосинтезе лигнана још увек нису познати (Dean and Eriksson, 1994; O'Malley et al., 1993; Savidge et al., 1994, Whetten & Sederoff, 1995).

Недавно истраживање (DeMartino, 2005) указало је на учешће неколико стереоспецифичних ензима у процесу биосинтезе. Претпоставља се да купловање фенилпропаноидних јединица може бити започето у присуству пероксидаза, при чему настају слободни радикали који се димеризују слободно-радикалским механизмом дајући рецемску смешу куплованих производа. Иако прихватљиво, ово истраживање ипак нема одговор на добијање енантиомерних смеша директним купловањем и/или добијање даљих деривата, изолованих из биљака (**Схема 1.7**).

SIKIMAT-FENILPROPANOIDNI PUT

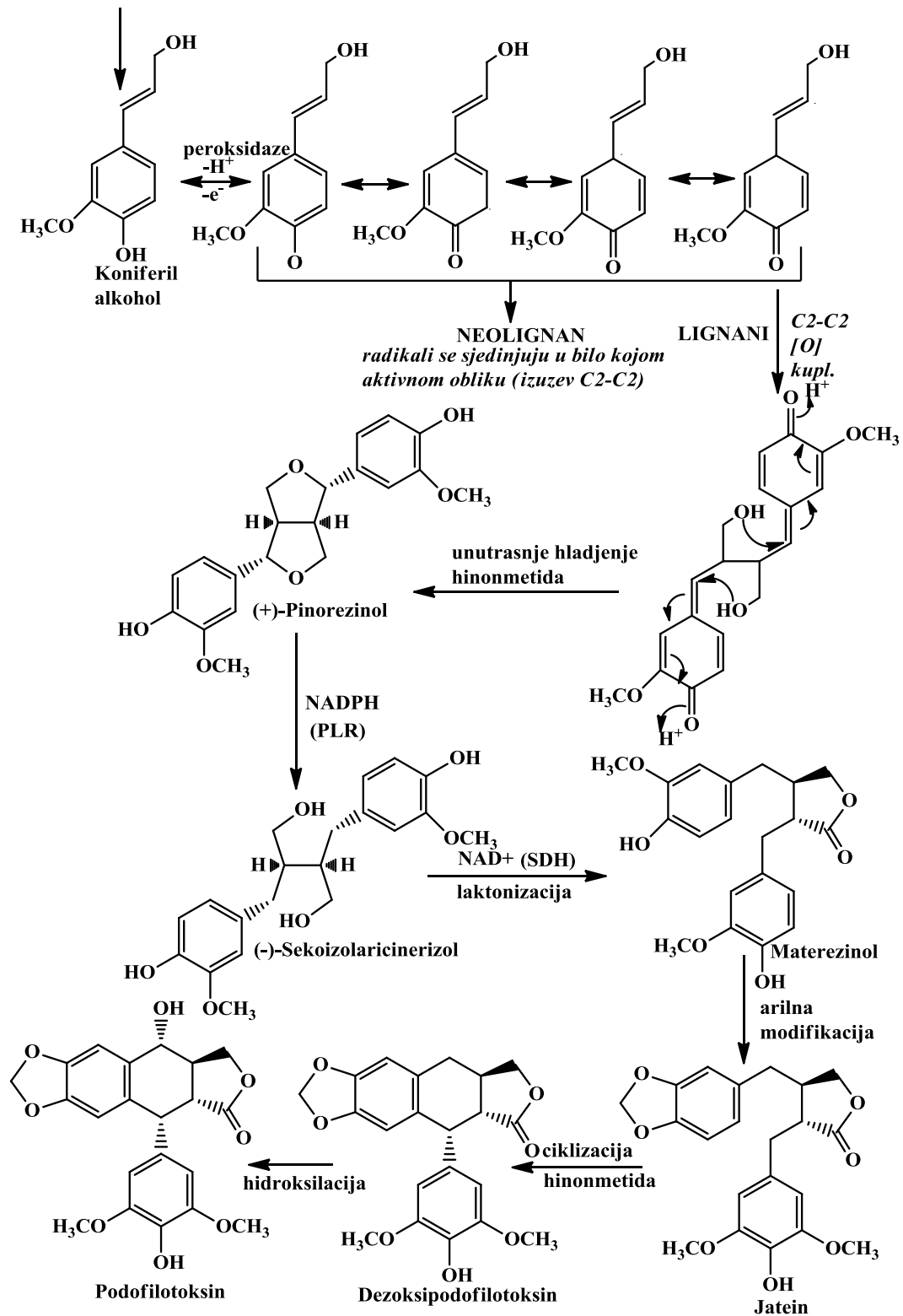


Схема 1.7 Биосинтеза лигнана

Како се у биљним ћелијама одвијају различити метаболички процеси истовремено, јасно је да једна биљка може произвести више секундарних метаболита, као и да различите биљне врсте имају карактеристичне метаболичке путеве као и специфичне метаболите. Секундарни метаболити међусобно се разликују по хемијском саставу, садрже различите функционалне групе, имају врло значајне функције у биљци и показују изражену биолошку активност.

1.3 Антибиотички ефекат секундарних метаболита биљака

У прошлом веку доказано је да су за медицинска својства многих биљних врста заслужни секундарни метаболити, и да показују разноврсну биолошку активност: антиоксидативну, антиинфламаторну, антимуtagenу, антиканцерогену као и антимикуробну активност (Aaby et al., 2004; Luo et al., 2004).

Током последње деценије постало је очигледно да антибиотици који су у широкој употреби, губе ефикасност као последица резистентности патогених микроорганизама на њихову активност. Бактерије могу стећи отпорност на више различитих начина, при чему неке постају и потпуно резистентне на дејство антибиотика, попут тзв. метицилин резистентне *Staphylococcus aureus* (MRSA). Решавање питања резистентности микроорганизама тј. повећање активности антибиотика или проналазак нове супстанце која показује ефикасније дејство, мање штетно за човека, стално је актуелно. Многа испитивања данас усмерена су ка добијању нових ефикаснијих антибиотика широког спектра дејства (Amabile-Cuevas, 2010, Newman & Cragg, 2010).

У сагласности са наведеним, истраживања базирана на антимикуробној активности секундарних метаболита (природних производа), који су широко доступни, а притом структурно и хемијски врло различити, је фундаментално. Заправо, у циљу добијања супстанци које ће имати потенцијал за добијање ефикаснијег, а по људско здравље мање токсичног антибиотика, истраживања природних једињења нагло се развијају. Тако је у периоду 2000. – 2008. године за више од 300 секундарних метаболита изолованих из биљака доказана

активност на испитиване микроорганизме, при чему готово половина показује активност бољу или једнаку актуелном антибиотику који је коришћен као стандард у испитивању. У прошлости, основни извор антибиотика били су микроорганизми и очекује се да ће они заједно са биљкама бити основни антибиотички извор у будућности (Behal 2001; Saleem et al., 2009).

Механизам антимицробне активности природних једињења

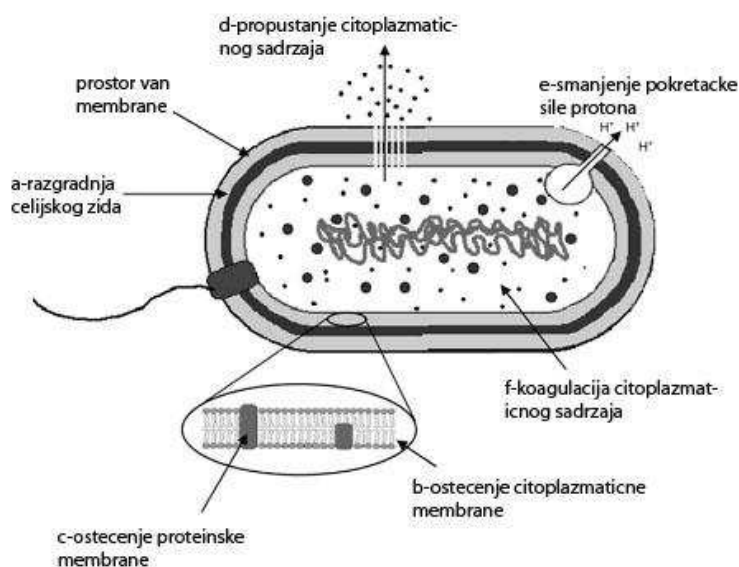
Сматра се да постоји пет основних механизма дејства природног производа на ћелију микроорганизма:

- дезинтеграција мембране цитоплазме,
- дестабилизација проласка протона кроз мембрану ћелије (PMF),
- проток електрона,
- активни транспорт и
- коагулација ћелијског садржаја.

Најчешћи механизам дејства је нарушавање ћелијског зида микроорганизма, при чему се сâм механизам може одвијати на више различитих начина и на више нивоа, у зависности од хемијске природе супстанце. Хидрофобне супстанце изазивају таложење липида ћелијске мембране, нарушавају организацију ћелијске мембране бактерије која постаје знатно пермеабилнија. Са друге стране, неке супстанце везују се за протеине ћелијске мембране (најчешћа реакција је интеракција липофилних једињења са хидрофобним деловима протеина). Одређене супстанце могу директно нарушити липид-протеинску интеракцију ћелијског зида или реагују са ензимима који се налазе унутар цитоплазматичне мембране и на тај начин нарушавају њену стабилност тј. потпуно деградирају ћелијски зид. Познато је, такође, да неки циклични угљоводоници делују на АТР-азе, ензиме лоциране унутар цитоплазматичне мембране окружене липидним молекулима и на тај начин нарушавају енергентски биланс ћелије као и структуру ћелије микроорганизма (Sikkema, 1995).

Механизам есенцијалних уља одвија се каскадно. Због своје хидрофобности, у додиру са ћелијском мембраном микроорганизма есенцијална уља нарушавају липидну структуру, при чему ћелијски зид постаје пермеабилнији. Одређене компоненте есенцијалног уља дифундују кроз

нарушену структуру мембране и реагују са основним ћелијским компонентама при чему каскадно долази до заустављања осталих виталних биохемијских процеса у ћелији: попут нарушавања енергетског баланса битног за регенерацијске процесе ћелије (утицај на АТФ); нарушавање синтезе структурних молекула или прекид секреције витално важних ензима (Faleiro, 2011; Raybaudi-Massilia et al., 2009). Механизам дејства есенцијалног уља приказан је на **слици 1.3**.



Слика 1.3 Механизам дејства есенцијалног уља и компоненти које улазе у његов састав на ћелију бактерије (a-f). Илустрован је механизам дејства унутар мембране (Burt 2004a)

Са друге стране, код одређених бактеријских сојева, као у случају бактерије *Helicobacter pylori*, активност једињења или њихове смеше (биљни екстракти или есенцијална уља) могу се повезати са механизмом антиинфламативне активности. Наведена бактерија развија се у слузавом слоју желуца и сматра се основним изазивачем хроничног гастритиса, једне од болести савременег доба као и полазном основом за добијање канцера желуца. Истраживања су показала да *H. pylori* у контакту са епителним ћелијама изазива стварање високе концентрације неутрофил-везаног хемокина, интерлеукина (IL)-8 преко активације нуклеарног фактора (NF)- κ B (Lamb et al., 2009). Према томе, смањење концентрације тј. прекид пораста нивоа цитокина представља

место за интервенцију активне супстанце и евентуално спречавање *H. pylori* инфламације. Природна једињења сматрају се потенцијалним инхибиторима транскрипционог фактора NF-κB, супротно од широко употребљаваних синтетичких антибиотика који су инхибитори упумпавања протона тј. смањења киселости у желуцу (Bork et al., 1997). Због тога су испитивања активности разних секундарних метаболита на *H. pylori* у последњој декади XXI века врло актуелна и стално се интензивирају (Chun et al., 2005; Fukai et al., 2002; Keenan et al., 2012; Toyoda et al., 2007).

Табела 1.1 Неке групе природних једињења са механизмом деловања

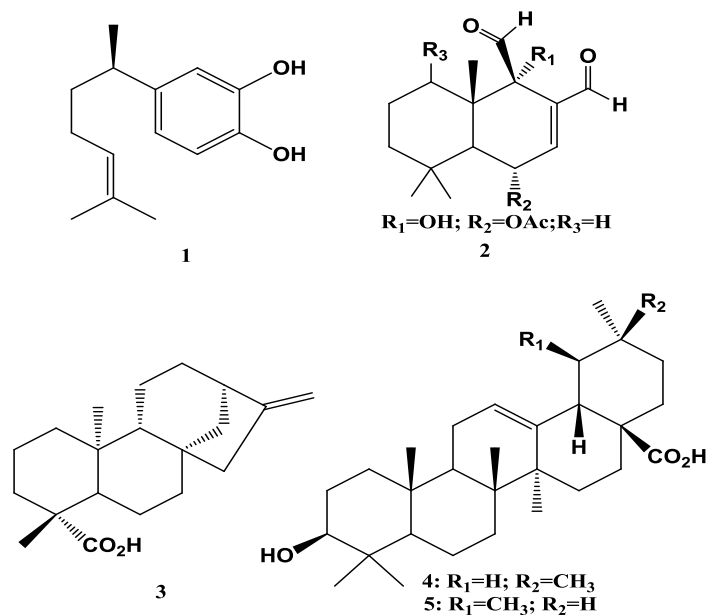
Група	Подгрупа	Једињење	Механизам	
Феноли	Обични феноли	Катехоол	Смањење субстрата	
		Епикатехин	Нарушавање мембране	
	Фенолне киселине	Цинаминска киселина	?	
		Хинони	Хиперицин	Комплекс са ћелијском мембраном, инактивација ензима
	Флавоноиди	Хрисин	Адхезионо везивање	
		-	Ћелијск мембрански комплекс	
	Флаволи	Абисинон	Инактивација ензима	
		Флавоноли	Тотарол	Реверзна инхибиција HIV транскриптазе
	Танини	Кумарини	Елагитанин	?
			Варфарин	Везивање за протеине Везивање за адхесин Инхибиција ензима Смањење субстрата Комплекс са ћелијом мембране Нерушавање ћелије мембране Метал-јон комплекс
Терпеноиди	-	Капсаицин	Интеракција са еукаротском DNA (антивирална активност)	
Есенцијална уља	-	Берберин	Нерушавање ћелије мембране	
Алкалоиди	-	Пиперин	Интеракција са ћелијским зидом и/или DNA	
Лектини и полипептиди	-	Манозе-специфични аглутинин	Блокирање вирусне футије или адсорпције	
		фалксатин	Формирање дисулфидних веза	

Како се крајем прошлог и почетком овог века интензивно истраживала антимикуробна активност различитих група природних једињења, у овом раду издвојићемо само најактивније и најпознатије представнике групе терпеноида и флавоноида.

Терпеноиди. Терпени су многобројна група једињења, потпуно различита међу собом по хемијској и физичкој активности, па је самим тим врло тешко извршити категоризацију њихове разноврсне биолошке активности, изузев за групу сесквитерпенских лактона, за које је доказано да су цитотоксични природни производи. Међу биоактивним дитерпенима познати су: гинколиди - РАФ инхибитори, гиберлини - биљни хормони раста као и антиканцероген дитерпен паклитаксел. Од тритерпена издваја се биолошка активност бетулинске киселине. Заправо, откривено је да ова киселина инхибира развој вирус HIV-а и да је активна на злоћудном тумору-меланому. Затим, босвелинска киселина показује антиинфламаторно дејство као и потенцијална заштита од артритиса док је брусатол познат у превенцији од канцера (Tolstikov et al., 2005). Антимикуробно дејство есенцијалних уља која представљају смешу монотерпена и сесквитерпена познато је од античког доба. Последњих деценија, њихово антимикуробно дејство, које је синергично дејство више компоненти, научно је доказано и данас се сматра да 60% хемијских деривата присутних у есенцијалним уљима показују антифунгално дејство док 30% показује антибактеријско. И поред наведеног, пронађено је да су есенцијална уља изолована из појединих биљака као што је бели тимус, лимун и цимет врло активна на неколико сојева MRSA, *Streptococcus* и *Candida* и сматрају се потенцијалним заменама за познате антибиотике (Warnke et al., 2009). Такође, запажа се да показују израженију активност на грам (+) бактерије, што се објашњава чињеницом да је код грам (-) бактерија ћелијски зид састављен од хидрофилних липополисахарида (LPS), што представља баријеру за макромолекуле и хидрофобна једињења. Наведена генерална претпоставка мора се узети са резервом јер као што је претходно описано (стр. 23), механизам дејства есенцијалних уља одвија се на више начина и тешко је предвидети осетљивост испитиваног микроорганизама (Huldgaard et al., 2012).

Од појединачних супстанци из групе терпена издвајају се (Слика 1.4):

- Сесквитерпен ксанторхизол (1) изолован из етанолног екстракта *Curcuma xanthorrhiza*, показује МИС од 8,0 – 16,0 $\mu\text{g/mL}$ на следеће сојеве *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, и *Vibrio parahaemolyticus* (Lee et al., 2008).
- Дитерпен цинамодин (2) показује изражену антифунгалну активност на: *Alternaria alternata* (MFC 3,9 $\mu\text{g/mL}$), *Candida albicans* D10 и *Wangiella dermatitidis* (MFC 15,6 $\mu\text{g/mL}$) као и кауран дитерпен, ент-каур-16(17)-енска киселина (3) показује потенцијалну активност на оралне патогене *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* и *Lactobacillus casei*. са МИС 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (Amiguet et al., 2006; Ghisalberti, 1997; Slimestad, 1997). С обзиром на то да врло мали број природних производа показује значајну активност на оралне патогене изазиваче зубног каријеса ово је врло значајан податак који указује на примену каурана за производњу лекова који спречавају каријес.
- Значајну антимикуробну активност показали су и пентациклични терпени од којих се издвајају олеинска (4) и урсолна киселина (5), изоловани из различитих биљних фамилија. Хориучи (Horiuchi) и сарадници су у свом рад тврде да наведени тритерпени показују значајну активност на ванкомицин резистентни сој *Enterococcus* са минималном инхибиторном концентрацијом (MIC) 8,0 и 4,0 $\mu\text{g/mL}$, појединачно; такође су оба терпена показала активност на *Streptococcus pneumoniae* и MRSA, са МИС 16,0 и 8,0 $\mu\text{g/mL}$. Наведене супстанце већ се дуги низ година налазе у слободној продаји у Кини као лекови за обољења јетре са врло малом дозом токсичности. У сагласности са овом чињеницом верује се да су корисна једињења у лечењу инфекција изазваних ванкомицин резистентним сојем *Enterococcus* (Horiuchi et al., 2007; Liu, 1995).

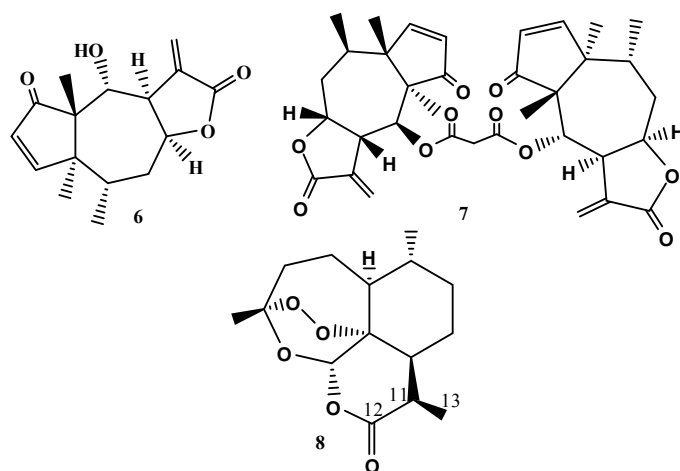


Слика 1.4 Структуре терпеноида: (1) ксанторхизол; (2) цинамодин; (3) ент-каур-16(17)-енска киселина; (4) олеанска киселина; (5) урсулна киселина

Механизам деловања терпена није у потпуности разјашњен али сматра се да утичу на разградњу ћелијског зида, нарочито липофилни терпени. Мендоза (Mendoza) је нашао да повећање броја хидроксилних група код каурен дитерпеноида значајно смањују њихову активност (Mendoza et al., 1997).

Сесквитерпенски лактони-група терпеноида која су и поред тога што показују различите биолошке активности пре свега познати по својој израженој цитотоксичној и антиинфламаторној активности (Muhammad et al., 2003; Bruno et al., 2005; Ren et al., 2012). Поред многобројних испитивања антиканцерогене активности издваја се *in vitro* и *in vivo* активност на P388 ћелије леукемије где су нарочиту активност показали хеленалин (6) и дериват бис(хеленалил)малонат (7), који инхибирају DNA и протеинске синтетазе малигних ћелија, инхибирајући синтезу пурина (Hall et al., 1987; Williams et al., 1988). Такође, по биолошкој активности међу сесквитерпенским лактонима издвајају се артемисин (8) и његови деривати који се налазе на листи Светске здравствене организације за лечење маларије (Слика 1.5). Овај лактон са врло карактеристичним пероксидним прстеном понаша се као инхибитор соја *P. falciparum*, изазивача маларије вероватно реакцијом са атомима азота

протеина. Лактон је активан у наномоловима на *P. falciparum* сојеве и није штетан за људско здравље, па је незаменљив лек више од деценије (Chaturvedi, 2011). Будући да је врло активна супстанца и лако реагује са другим лековима а како се недавно појавио сој *P. falciparum* на Тајланду и Камбоџи, отпоран на артемисин, ради се на његовој дериватизацији, да би се добио пре свега стабилнији производ подједнако или више активан од артемисина (O'Brien et al., 2011, Amaratunga et al., 2012).



Слика 1.5 Структуре сесквитерпенских лактона: (6) хеленалин; (7) бис(хеленалил)малонат; (8) артемисин

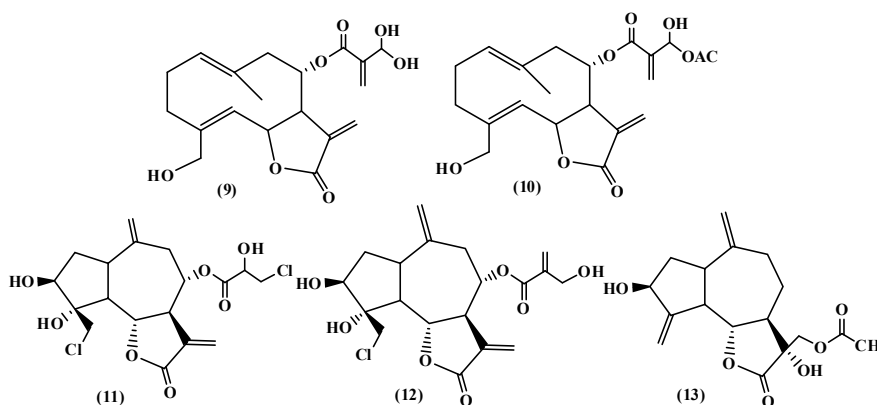
Поред појединих сесквитерпенских лактона који се користе у медицинске сврхе и корисни су за људско здравље, постоје и они који су штетни, врло токсични изазивачи алергија. Тако се сматра да гвајанолид репин изолован из биљке *C. repens* изазива неуролошке поремећаје код животиња нарочито код коња, сличне Паркинсоновој болести при чему долази до грчење мишића па и до потпуне парализе мишићног система животиње (Hamburger, 1993).

С обзиром на изражену биолошку активност, у литаратури постоји велики број резултата истраживања лактона као антибиотичких једињења. Откривено је да ова група једињења показује средње јаку активност код бактерија као и да су много осетљивији грам (+) сојеви у односу на грам (-). Такође, доказано је да сесквитерпенски лактони показују јаку антифунгалну активност (Vajs et al., 1999, Barero et al., 2000, Karioti et al., 2002; Saroglu et al., 2005; Djeddi et al., 2007; Cartagena et al., 2008, Ćirić, 2009; Duraipandiyar et al. 2012).

Из групе гермакранолида (Ćirić, 2009) кницин (9) и дериват 4'-ацетил кницин (10) показали су најбоље антимикуробно дејство на широк спектар испитиваних бактерија и гљива. Минимална инхибиторна концентрација је у опсегу 13,2 – 52,8 $\mu\text{mol/mL}$ код бактерија и 6,6 – 52,8 $\mu\text{mol/mL}$ код гљива. На основу наведеног рада показано је да најбоље антифунгално дејство имају гермакранолиди, елеманолиди па гвајанолиди (Слика 1.6).

Од гвајанолида недавно је урађено испитивање антимикуробне активности centaурепенсина (11), хлоројанерина (12) и 13-ацетил солститиалина А (13) изолованих из *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* (Слика 1.6). Наведени гвајанолиди показали су јаку активност на сој *Staphylococcus aureus* са минималном инхибиторном активношћу 16 $\mu\text{g/mL}$, на друге испитиване сојеве активност је била знатно слабија, укључујући и квасац *Candida albicans* код којег је одређена минимална инхибиторна концентрација 64 $\mu\text{g/mL}$ (Özçelik et al., 2009).

За разлику од слабе антибактеријске активности на грам (+) и грам (-) бактерије многи сесквитерпенски лактони изоловани из различитих биљака показују значајну активност на *Helicobacter pylori* *in vitro* и *in vivo* (Konstantinopoulou et al., 2003). Између осталих, испитивана је активност неполарног екстракта наведене *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* као и изолованих фракција које садрже наведене гвајанолиде на *Helicobacter pylori*, и забележена је значајна активност (Yesilada et al., 2004).

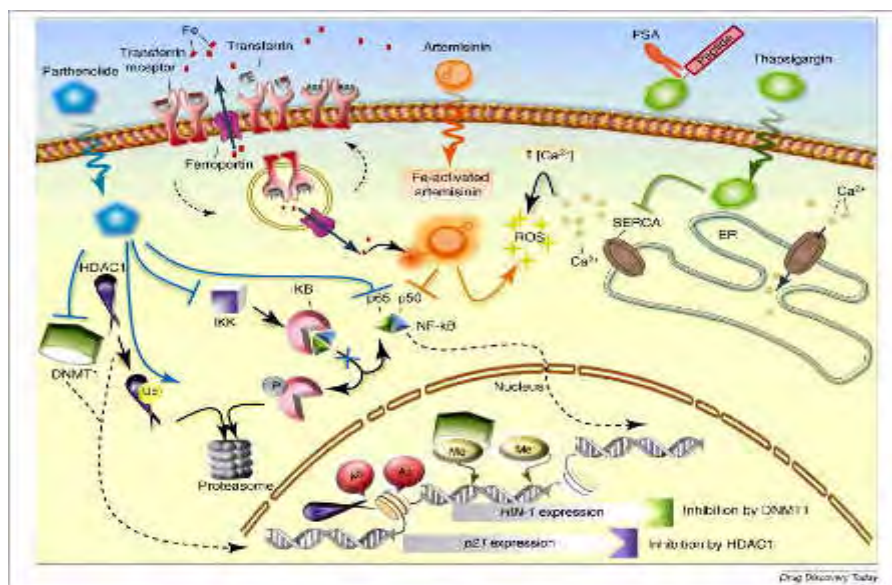


Слика 1.6 Структуре сесквитерпенских лактона: (9) кницин; (10) 4'-ацетил кницин (11) centaурепенсин; (12) хлоројанерин; (13) 13-ацетил солститиалин А

Испитивањем механизма деловања сесквитерпенских лактона који као група једињења показују различите биолошке активности, изводи се закључак да следеће структурне карактеристике утичу на активност:

- (1) Присуство егзоцикличне метиленске групе која је коњугована са γ -лактоном.
- (2) Присуство разних функционалних група у молекулу, епоксид, хидроксил, хлорхидрин, незасићени кетон или О-ацил група који могу појачати активност α -метилен- γ -лактонског прстена према биолошким нуклеофилима (Rodrigeuz et al., 1976; Hoffmann & Rabe 1985).

Изразита цитотоксична активност сесквитерпенских лактона објашњава се управо присуством α -метилен- γ -лактонског прстена који селективно алкилује тиолне групе у протеинима и ензимима типом Michael адиције и то једним од механизма приказаних на **Слици 1.7**.



Слика 1.7 Различити механизми дејства лактона артемисина, партенонида и тхаспигаргина на ћелије тумора (Ghantous et al., 2010)

Michael адиција α -метилен- γ -лактонског прстена на тиолне групе цитокина и разних упалних ензима могу се применити као објашњење и за активност сесквитерпенских лактона на *Helicobacter pylori*. Сматра се да сесквитерпенски лактони показују значајну активност на ову бактерију која изазива упални

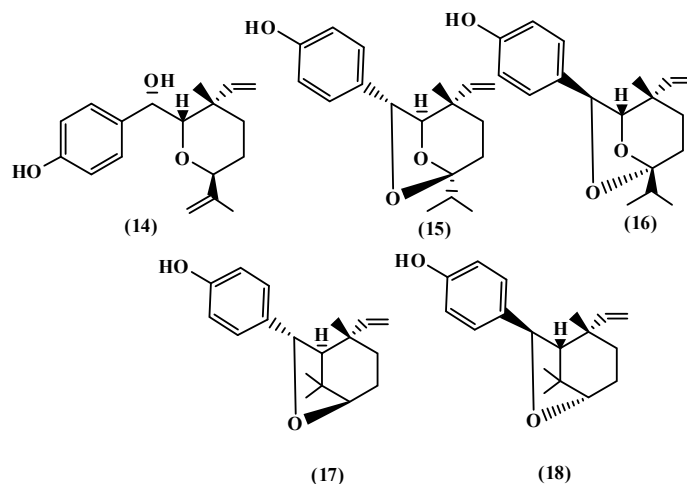
процес и повећава концентрацију упалних медијатора цитокина. Сесквитерпенски лактони с друге стране, као изразито антиинфламаторне супстанце, директно утичу на смањење концентрације упалних медијатора као и на ефикасност ензима који активирају упални процес и заустављају везивање транскрипционог фактора NF-κB за DNA, самим тим спречавају развијање *Helicobacter pylori* (Al-Saghir et al., 2009; Rüngeler et al., 1998; Tornhamre et al., 2001).

Када је у питању антимикробна активност, не постоји много информација о вези између структуре сесквитерпенских лактона и активности. Претпоставља се да, слично као код цитотоксичности, долази до реакције егзоцикличне двоструке везе лактонског прстена са тиолним групама ензимских протеина који чине ћелијски зид бактерија (Picman & Towers, 1983). Међутим, због разноврсности резултата добијених испитивањем антимикробне активности као и структура сесквитерпенских лактона, претпоставља се да је сам механизам скуп више хемијских реакција које утичу на резултате активности.

Као потврда горе наведеног, Монслав (Monslave) и сарадници су објавили да је гермакранолид кницин јак иреверсни инхибитор који делује на систем бактеријских ензима Мур А (MurA), одговорних за биосинтезу пептидогликана у цитоплазми, и од виталног су значаја за даљи метаболизам бактерије (Monslave et. al., 2009). Са друге стране, код антифунгалне активности, претпоставља се да активност појединих сесквитерпенских лактона, пре свега гермакранолида потиче од њихове високе липофилности што им омогућава лакшу и бржу пенетрацију кроз ћелијски зид гљива (Barreroa et al., 2000; Ćirić, 2009). Све наведено указује да су даља истраживања у овој области неопходна.

Фенолна једињења. Слично терпенима, фенолна једињења показују широк спектар биолошких дејстава. Једна од основних је антиоксидативна активност (везивање слободних радикала) због које се фенолна једињења сматрају супстанцама које могу утицати превентивно и у знатној мери редуковати различите болести: канцер, атеросклерозу, остеопорозу, Алцхајмерову болест, итд. (Fukai et al., 2002; Shi et al., 2001). По антиоксидативној активности нарочито се издваја група полифенола који су заступљени у воћу, многим зачинским биљкама, вину, маслиновом уљу (Wojdyło et al., 2007).

Антимикробна активност биљних фенола је такође интензивно истраживана, с обзиром на то да су ова једињења заслужна за контролу ширења и раста биљних патогена. Интезивна истраживања активности фенола на хумане патогене има за циљ добијање нових здравих хранљивих супстанци, медицинских супстанци и лекова, пре свега сигурних за људско здравље. До данас постоји много литературних података о антимикробној активности фенола и полифенола на патогене *Staphylococcus aureus*, сојеве *Streptococcus*-а, *Enterobacter*, *Proteus*, *Bacillus* са врло интезивном активношћу MIC 0,78 – 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (Cueva et al. 2010; Jayaprakasha et al., 2003; Özkan et al., 2004). Нађено је да обични феноли као што су катехол (две хидроксилне групе) и пирогалол (три хидроксилне групе) показују антимикробну активност, при чему је показано да присуство више хидроксилних група повећава активност према микроорганизмима. Фенолне киселине показују значајну антимикробну активност, па је испитивањем активности протокатехинске, кофеинске, ферулне и кумаринске киселине откривено да оне инхибирају раст следећих бактеријских сојева *Lactobacillus* spp. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* при концентрацији од 0,04 – 3,75 g/L. Од многих активних фенолних једињења (Saleem et al., 2010) нарочито су значајни псоракорифоле А-Е (14-18) изоловане из семена Кинеске биљке *Psoralea corylifolia* (Слика 1.8). Свих пет супстанци показало је значајну инхибиторну активност на два соја *Helicobacter pylori* (SS1 и ATCC 43504) са минималном инхибиторном концентрацијом 12,5 – 25,0 $\mu\text{g/mL}$ што је пет/десет пута активније од стандардног лека метродиназола.

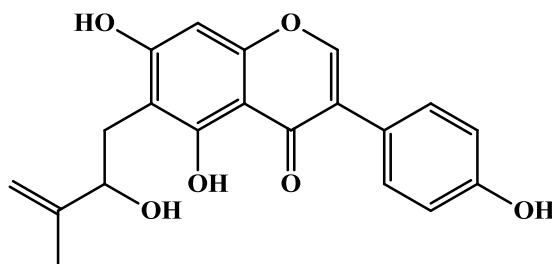


Слика 1.8 Структуре фенолних једињења: (14-18) псоракорифоле А-Е.

Флавоноиди су једна од највећих група секундарних метаболита који су изоловани из различитих биљних врста. Налазе се у воћу, поврћу, орасима, семену, стаблу, прополису и меду. Због разноликости хемијске структуре вршена су многа испитивања њихове биолошке активности и утврђено је да су јаки антиоксиданти али да поседују средње јаку биолошку активност. Сматрају се и потенцијалним антимикробним агенсима (Cushnie & Lamb, 2005).

Међу многобројним биљним флавоноидима који инхибирају раст микроорганизама издвојићемо неколико најзначајниих:

- Апигенин, показује запажену активност 3,9 – 15,6 $\mu\text{g/mL}$ на 20 различитих сојева *Staphylococcus aureus*. Други широко заступљени биљни флавоноид каемферол инхибира раст две G(–) и четири G(+) бактерије са минималном инхибиторном активношћу 2,6 $\mu\text{g/mL}$ а показује и запажену активност на квасац *Candida glabrata* 4,8 – 9,7 $\mu\text{g/mL}$. Флаворин гликозид је такође потенцијални антимикробни агенс, показујући активност на гљиве *Trichophyton mentagrophytes* и *C. neoformans* (MIC на обе 6,25 $\mu\text{g/mL}$), у поређењу са стандардом антигљивичним антибиотиком флуконазолом (MIC 2,0 $\mu\text{g/mL}$).
- Лабуртенин (**Слика 1.9**), изолован из метанолног екстракта *Ficus chlamydocarpa*, показује потенцијалну антимикробну активност на *Mycobacterium smegmatis* и *M. tuberculosis*, са MIC 0,61 и 4,88 $\mu\text{g/mL}$ (Kuetze et al., 2007, 2008; Sato et al., 2000; Sathiamoorthy et al., 2007).



Слика 1.9 Структура лабуртенин

Битно је напоменути да се у литературним изворима јавља велика разлика у антимикробној активности појединих флавоноида, што се објашњава пре свега различитим условима приликом извођења експеримента (Cushnie & Lamb, 2005).

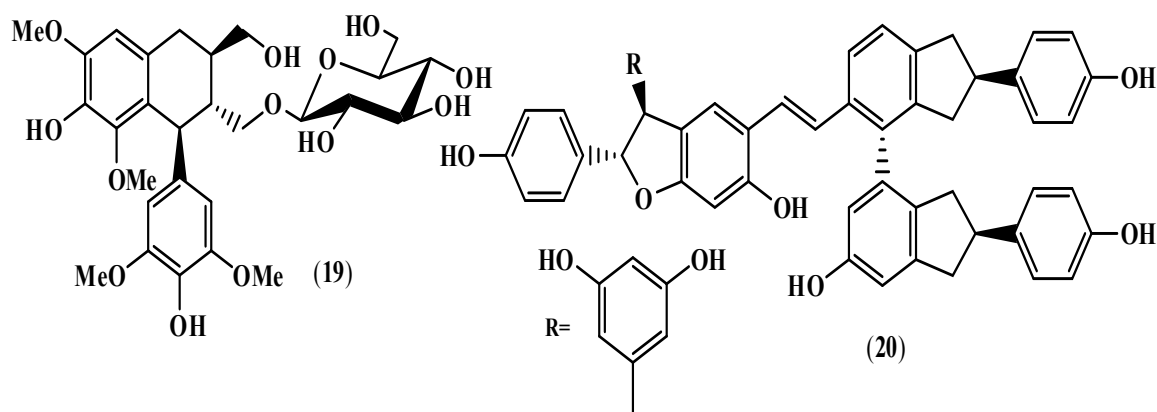
Иначе, претпоставља се да флавоноиди делују на ћелијски зид микроорганизама тј. блокирају наелектрисање аминокиселина које су лоциране у порамма ћелијског зида патогена. Као доказ ове претпоставке, нађено је да флавоноиди (као и феноли) са више хидроксилних група, показују израженију антимикуробну активност, при чему су нарочито активни флавоноиди који садрже хидроксилне групе на положајима С-5 и С-7 прстена А. Такође је могуће да флавоноиди стварају комплексе са екстрацелуларним и растворним протеинима, а затим се, као комплекс, везују за ћелијски зид микроорганизама; као и да липофилнији флавоноиди могу нарушити мембрану микроорганизама (Cushnie & Lamb, 2005).

Досадашња испитивања показала су врло ограничену активност флавоноида на *Helicobacter pylori* (Fukai et al., 2002).

Лигнани као фенолна једињења имају широк спектар биолошке активности. Међутим, у литератури се истичу антиоксидативна активност и лечење и превенција од рака као најзначајније и најосновније биолошке активности (Pan et al., 2009; Saleem et al., 2005; Yousefzadi et al., 2010).

Иако се у многим радовима где је испитивана антимикуробна активност лигнана наводи не тако изражена активност, неколико лигнана је показало врло ниске инхибиторне концентрације. Такође, поједини семисинтетички деривати показали су значајну микробиолошку активност. Због свега наведеног, ова група једињења се сматра потенцијалним новим антимикуробним агенсима (Silva et al., 2007, 2009).

Од лигнана изолованих из биљака, лигнан (+)-лионирезинол-3 α -О- β -D-глукопиранозид (**19**), изолован из корена биљке *Lycium chinense* је један од најактивнијих. Забележено је да показује антимикуробну активност на сој *Staphylococcus aureus* при MIC 2,5 – 5,0 $\mu\text{g/mL}$, као и антифунгалну активност на три патогене гљиве *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Trichosporon beigeli* при MFC 5,0, 5,0 и 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (Lee et al., 2005). За лигнан хејнеанол А (**20**), изолованог из екстракта корена биљке *Vitis* sp. (винова лоза), нађено је да поседује изражену антимикуробну активност на грам (+) патогене. Употребом диск-дифузионе методе, нађено је да спречава раст MRSA на 2,0 $\mu\text{g/mL}$, док при концентрацији од 2,0 – 4,0 $\mu\text{g/mL}$ спречава развој *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes* (Peng et al., 2008).



Слика 1.10 Структуре лигнана: (19) (+)-лионирезинол-3 α -O- β -D-глюкопиранозид; (20) хејнеанол А

Тачан механизам активности лигнана на ћелију микроорганизама још увек није познат. Претпоставља се да инактивиријају ензиме микробне ћелије или ћелијске транспортне протеине везивањем помоћу неспецифичних веза као што су водоничне везе. На антимикуробну активност лигнана, нарочито бутирлактонског типа знатно утиче стереохемија тј. просторни положај ароматичних прстенова везаних за лактонски прстен лигнана (Kawaguchi et al., 2009).

1.4 Хемотаксономски значај секундарних метаболита биљака

Поред изражене примене у медицинске сврхе, секундарни метаболити користе се у хемотаксономији која врши систематику биљних врста према броју, врсти и количини секундарних метаболита. Велики број истраживања показао је заправо да различите биљне врсте које припадају једном роду-фамилији најчешће биосинтетишу исту групу хемијских једињења (Marin, 2003). Ова чињеница користи се за поређење хемијског састава једне биљке са осталим врстама које припадају роду (фамилији), да се одреди карактеристична хемијска група за те врсте и потврди њена ботаничка припадност групи као и за

евентуално одређивање хемотаксономског маркера тј. једињења које је заступљено у већини биљних врста истог рода (фамилији).

1.5 Основне карактеристике испитиваних биљних врста

1.5.1 Фамилија Asteraceae (Compositae) – главчике

Asteraceae (Compositae) је једна од најбројнијих фамилија, која садржи 1600 родова са око 24000 биљних врста, са различитим животним формама и широким распрострањењем. Најчешћи представници фамилије су зељасте једногодишње и двогодишње биљке, мада су познати и вишегодишњи представници. Главна карактеристика врста ове фамилије је да су цветови организовани у главчасте цвасти. Цветну главицу (*capitulum*) чини проширена осовина цвасти која носи већи број цветова и налази се на врху дршке цвасти (*skapus*). Цвасти су обавијене заштитним листовима (*involucrum*) који штите цваст током развоја цветова. Цвасти могу бити појединачне или организоване у сложене цвасти различитог типа. У главицама се најчешће налазе различити типови цветова. Тако, неке главице поседују цевасте цветове, друге по ободу имају језичасте (или двоуснате) цветове који су обично женски или стерилни, а у центру се налазе цевасте. Постоје и такве главице које садрже само језичасте (или двоуснате) цветове. Изданци су негранати или гранати, а код појединих родова у виду скапуса (безлисна стабла са приземном лисном розетом). Листови су спирално, наспрамно или чешће пршљенасто (наизменично) распоређени (Dostál, 1976). Цветови су петочлани, двополни (хермафродитни), једнополни или стерилни. Многе врсте фамилије Asteraceae користе се у исхрани, као и лековите биљке. Фамилија има веома важан економски значај, јер се поједине врсте већ дуго користе и прерађују у индустрији хране, затим у фармацеутској и козметичкој индустрији, као и у медицини. Многе врсте, такође користе се као баштанско украсно биље.

Група *Cardueae* (*Carduoideae*) је једна од највећих у фамилији Asteraceae. У њу је уврштено 73 рода и 2400 врста (Funk et al., 2009). Подељена је у четири

подгрупе: *Carlininae*, *Echinopsinae*, *Carduinae* и *Centaureinae*. Подгрупа *Centaureinae* садржи један од највећих, таксономски врло захтевних родова *Centaurea* (García-Jacas, 2001).

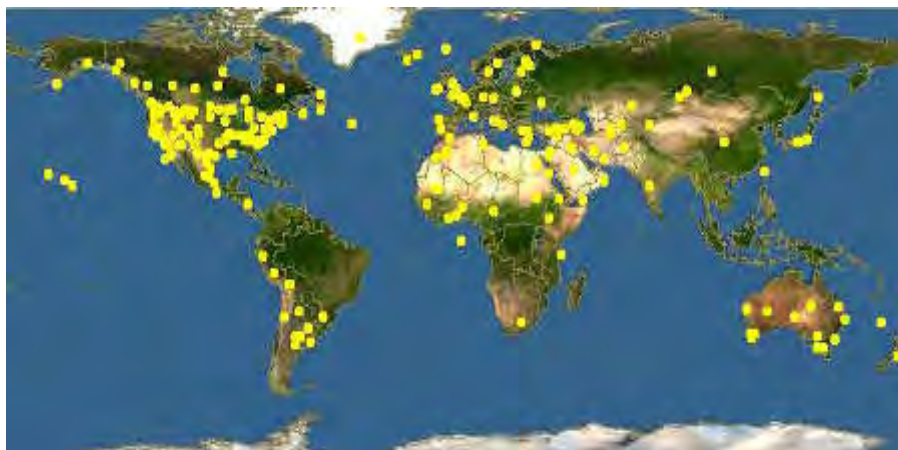
Род *Centaurea* укључује око 250 различитих врста, које су углавном заступљене на подручју Медитерана и Западне Азије (Mabberlay, 1997; Susanna & García-Jacas, 2007). Три неформалне групе су дефинисане унутар рода (*Acrocentron*, *Cyanus*, *Jacea*). Род чине најчешће једногодишње, двогодишње или вишегодишње зељасте биљке, ређе мали жбунови са бодљикавим изданцима или велики зелени жбунови. Таксономија рода је врло компликована и ова комплексност потиче од широке разноликости таксономских карактера (García-Jacas, 2001, 2006).

Традиција употребе врста које припадају роду *Centaurea* протеже се далеко у прошлост. Заправо, први пут се помиње у античкој Грчкој митологији када је Ахилов учитељ мудрости Хирон Кенатура (*Chiron the Centaur*) (пола човек-пола коњ) рањен Херкуловом отровном стрелом а затим излечен биљком са љубичасто-плавим цветом чудноватог лековитог дејства. И данас, врсте овог рода су у широкој употреби у народној медицини нарочито на Средњем Истоку где су и најзаступљеније Традиционално, *Centaurea cyanus* и *C. scabiosa* се користе против прехладе, за отпорност јетре, отклањање свраба као и за лечење офтамолошких обољења; *C. calcitrapa*, *C. solstitialis* и *C. melitensis* имају хипогликемијски док *Centaurea calcitrapa*, *Centaurea iberica* антипируетски ефект (Talhok et al., 2008).

Са друге стране, познато је да су поједине врсте овог рода као *Centaurea solstitialis* L. (жута бодља) и *C. repens* L. (*syn. Acroptilon repens*) поред доказане јаке цитотоксичности, заправо врло токсичне (Hamburger et al., 1993). Оне могу изазвати тровање стоке, а нарочито је опасна по коње јер изазива неповратно оштећење мозга код ових животиња тј. болест познату као „болест жвакања” (*equine nigropallidal encephalomalacia*). Такође, обе врсте су познате као опасне коровске биљке у Америци. Заправо, на природним стаништима у Малој Азији, Средњем Истоку, Северно-Централној Европи и Русији ове врсте расту у балансираним еколошким условима, тј. њихов раст и распрострањеност су контролисани присуством многих природних биљних штеточина, инсеката и другим биљкама које расту у близини. Без овог природног еколошког баланса

наведене биљне врсте неконтролисано расту и представљају штетне коровске биљке.

У Србији врсте рода *Centaurea* познате су под називом „различак”. На простору Србије расте 32 врсте од којих су *C. kosaninii* Hayek и *C. derwentana* Vis et. Panč. ендемске врсте (Josifović, 1975).



Слика 1.11 Распрострањеност рода *Centaurea* (извор: <http://www.discoverlife.org>)

Секција *Jacea - Lepteranthus*. [Секција *Jacea* (Mill.) DC. (укључена секција *Lepteranthus* DC.) (Garcia-Jacas et al., 2006)].

Врсте које припадају секцији су вишегодишње зељасте биљке, са гранатим врховима изданака, са по неколико главичастих цвасти средње величине. Листови су цели или умерено усечени, овалног или кружног облика. Цветови су розе-љубичасти, стабло је најчешће средње величине а код неких врста веома редуковано. Поједине врсте се могу наћи у облику малог жбуна. Секција садржи 24 врсте (26 са подврстама) (Dostál, 1976). Међутим, секцију карактеришу бројни хибриди. Хибридизација међу врстама је један од основних узрока врло компликоване таксономије, па самим тим и класификације биљака унутар секције *Jacea*. Тринаест хибрида рода *Centaurea* у Централној Европи утврђено је у оквиру секције *Jacea*, од којих су два троструки хибриди. Нађено је да врсте из ове секције често подлежу хибридизацији са врстама других секција као што је *Acrolophus* (Koutecký, 2008).

Врсте које припадају секцији користе се у народној медицини као дируетици, против високе температуре, за заштиту обољења јетре и бубрега, за лечење запаљења очију. *Centaurea jacea* L. је представник по коме секција носи назив и најпознатија је лековита биљка унутар секције. Користи се код главобоље, стомачних тегоба и против високе температуре, као и код дерматолошких проблема (Forgo et al., 2012; Kumarasamy et al., 2003).

Врсте рода *Centaurea* које припадају секцији *Jacea-Lepteranthus* су: *C. haynaldii* Borbás ex Vuk; *C. bracteata* Scop.; *C. weldeniana* Reichenb.; *C. rocheliana* (Heuff.) Dostál; *C. pannonica* (Heuff.) Simonk.; *C. vinyalsii* Sennen; *C. dracunculifolia* Dufour; *C. jacea* L.; *C. debeauxii* Gren. & Godron; *C. nigra* L.; *C. phrygia* L.; *C. stenoleppis* A. Kerner; *C. idurata* Janka; *C. uniflora* Turra; *C. kernerana* Janka; *C. pectinara* L., *C. antennata* Dufour; *C. trichocephala* Bieb. ex Willd., *C. janeri* Graells, *C. linifolia* L., *C. hyssofolia* Vahl; *C. parilica* Stoj. & Stefanov, *C. procumbens* Balbis; *C. rhaetica* Mortizi (Dostál, 1976).

Група Garcia-Jacas et al., је 2006 године, на основу упоредних анализа DNA секвенци у секцију укључила и врсте: *C. exarata* Boiss. ex. Coss; *C. inexpectata* Wagenits; *C. patula* Boiss.

Врста : *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai

Базионим: *Centaurea amara* var. *angustifolia* DC.

Хомотипски синоним: *Centaurea angustifolia* Schrank [non Mill. 1768]
Centaurea amara var. *angustifolia* DC.

Хетеротипски синоним: *Centaurea duboisii* Boreau
Centaurea pannonica (Heuff.) Simonk.
Jacea pannonica (Heuff.) Soják
Centaurea jacea subsp. *pannonica* (Heuff.) Hayek
Centaurea amara var. *pannonica* Heuff.

Погрешна употреба имена: "*Centaurea amara*" sec. Bouchard, J. - Flore pratique de la Corse, Ed. 3 Bastia 1978.

"*Centaurea amara*" sec. Boissier, E. - Flora orientalis 3 Genève, Basel & Lyon 1875.


"*Centaurea jacea* subsp. *amara*" sec. Rothmaler, W. - Exkursionsflora von Deutschland, 4. Gefäßpflanzen: Kritischer Band, Ed. 8 Jena, Stuttgart 1994.

Извор: The Euro+Med PlantBase (биљне врсте са подручја Европско-Медитеранске регије).

Вишегодишња је биљка са једним усправним изданком, висине 30 – 100 cm, који је интензивно гранат у првој трећини (Табела 1.2). Ахенија 3 mm дугачка, гола или фино длакава, белосива до светлосмеђа слабо избраздана, јако сјајна. Листови прекривени сивим длакама. Главице појединачне (ретко 2 – 3 заједно) на врху изданака. Инволукрум јајаст или јајасто лоптаст док су наставци листића инволукрума широко округласти или јајасте, недељени или само спољни неправилно исцепкани. Цветови пурпурни. Природна станишта су сунчана, каменита или делимично каменита подручја као и ливаде са сланим земљиштем (Josifović, 1975, Vojňanský & Fargašová, 2007).

Биљка је распрострањена у Централној и Јужној Европи (Dostál, 1976) (Слика 1.12). Медоносна је и лековита биљка (Vojňanský & Fargašová, 2007).

Табела 1.2 Ботаничка карта *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai

Царство:	Plantae	
Подела:	Spermatophyta	
Подподела:	Angiosperms	
Раздео:	Magnoliophyta	
Класа:	Magnolopsida	
Ред:	Asterales	
Фамилија:	Asteraceae	
Подфамилија:	Cardueae Cass.	
Подгрупа:	Centaureinae	
Род:	<i>Centaurea</i> L.	
Секција	<i>Jacea</i>	



Al (Albanija), *Bu* (Bugarska), *Fr* (Francuska), *Ju* (Jugoslavija), *Hu* (Madjarska),
Au (Austrija), *Cz* (Češka Republika), *Ge* (Nemačka), *Po* (Poljska), *Ro* (Rumunija).

Слика 1.12 Распрострањеност врсте *C. pannonica* (Извор: Dostál, 1976)

Хемотаксономија рода *Centaurea*. Род *Centaurea* (Asteraceae), групе Cardueae, који садржи велики број врста више од 40 година изазива пажњу научника, како са биолошког, тако и са хемијског аспекта. Велики број истраживања урађен је а многа су и данас у току (García-Jacas, 2000, 2001, 2006, Susanna & García-Jacas, 2007). Изоловање хемијских једињења из биљака има два основна циља: да се објасни лековито и/или токсично дејство појединих врста са једне стране и пронађе спона између једињења и сложене таксономије рода, са друге стране.

Многи секундарни метаболити су до данас изоловани и идентификовани из биљних врста, рода *Centaurea*: полиацетилени, сесквитерпени, кумарини, индоли, алкалоиди, фенолне киселина, индол алкалоиди, антоцианини, флавоноиди и њихови гликозиди (Cooper et al., 2002; Fernandez et al., 1989; Flamini et al., 2002a,b; Formisano et al., 2012; Janackovic et al., 2004; Kaij-a Kamb et al., 1992; Tešević et al., 1997; Vajs et al., 1999).

Међу њима, основни (најчешће изоловани) секундарни метаболити су: сесквитерпенски лактони, флавоноиди и полиацетилени (Bruno et al., 2005; Djeddi et al., 2008; Gousiadou and Skaltsa, 2003; Karioti et al., 2002; Koukoulitsa et al., 2005; Nowak, 1992; Panagouleas et al., 2003; Saroglou et al., 2005; Ćirić et al., 2012).

С обзиром на обилну литературу везану за секундарне метаболите изоловане из биљних врста рода *Centaurea* у овом раду смо се ограничили на литературу везану за сесквитерпенске лактоне-групе гвајанолиди, на лигнане изоловане из врста рода *Centaurea*, као и на флавоноиде који су изоловани из врста које припадају секцији *Jacea- Lepteranthus* (Табеле 1.3 - 1.7).

Табела 1.3 Гвајанолиди рода *Centaurea*

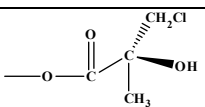

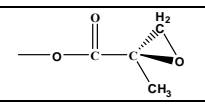
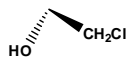
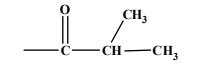
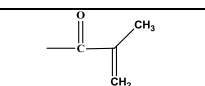
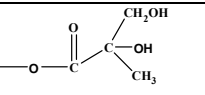

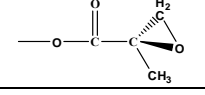
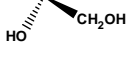
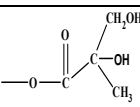
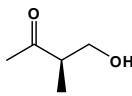


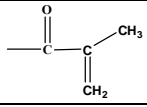
Име врсте	Сесквитерпенски лактони	Литература
<i>C. americana</i> Nutt.	Цинаропицрин	Ohno et al., 1973
<i>C. adjarica</i> Alb. син. <i>C. koenigii</i> Sosn.	Акроптилин, Дезоксирепин, Јанерин, Репдиолид, Репин, Центаурепенсин, Цинаропицрин, Хлоројанерин, Цебелин Д, Е, Ф, И, Ј	Nowak, 1992; Nowak et al., 1989
<i>C. aegyptica</i> L.	8-Деацилрепин, 8-Деацилсауприн, 19-Дезоксихлоројанерин, 11 α ,13-Дихидросаупирин, Епоксирепдиолид, Јанерин, Репинхлорохисопифолин А, Б, Е, Хлоројанерин, Саупирин, 17,18-Епокси-19-десоксихлоројанерин	El Dahmy et al., 1985; Sarg et al., 1987
<i>C. arguta</i> Nees	Агуерин Б, Цинаропицрин	Gadeschi et al., 1989
<i>C. acaulis</i> L.	Залузанин Д, Кандаванолид 14-хлоро-10 β -хидрокси-10(14)-дихидрозалузалин Д,	Bentamène et al., 2005
<i>C. babylonica</i> (L.) L.	Бабилин А, Бабилин Б, Јанерин, Репин, Хлорохисопифолин Ц, Цебелин Ј	Bruno et al., 2005
<i>C. bella</i> Trautv.	Акроптилин, 8-Деацилокси-8 α -[2-метилакрилоксил]-сублутеолид, 19-Дезоксихлоројанерин, 15-Деокирепин, 17,18-Епокси-10-десоксихлоројанерин, Јанерин, Репдиолид, 8 α ,4'-(хидроксил)тиглинате-8-деацетилсублутеолиде, Хлоројанерин, Цебелин А, Б, Г, Д, Е [=Хлорорепдиолид], И, Ј, К, Л, Н, О, Ф Х, Центаурепенсин, Цинаропицрин,	Daniewski & Nowak 1993; Nowak, 1992; Nowak 1993
<i>C. behen</i> L.	Агуерин Б, Гросхеми, 4 β ,15-Дихидро-3-дехидро солститиалин А, 4 β ,15-Дихидро-3-дехидро солститиалин А-13 ацетат, Десацилцинаропицрин, Цинаропицрин	Rustaiyan et al., 1981a; Öksüz et al., 1982
<i>C. canariensis</i> Brouss (var. <i>subexpinnata</i> Burch).	Агуерин А, Агуерин Б, Деацилцинаропицрин, 3-Десоксицинаропицрин, 11,13-Дихидродеацилцинаропицрин, 3-Епи-11,13-дихидродеацилцинаропицрин, 8 α -Метакрилокси дехидрокостунолид, 8 α -Хидрокси-11 β ,13Н-дехидрокостус лактон, Субексипинатин, Субексипинатин Ц, Цинаропицрин,	Bohlmann & Gupta, 1981; González et al., 1978a; Gonzalez et al., 1982 Collado Gonzalez et al., 1985
<i>C. clementei</i> Boiss. ex DC	Деацил-цинаропицрин, Клементин, Клементин Б,Ц, Цинаропицрин	Massanet et al., 1983; Collado Gonzalez et al., 1986
<i>C. chilensis</i> Hook & Arn	8 α -Ацетоксидехидрокостунолид, Дехидрокостунолид, 11 β Н-11,13-Дихидродесацилцинаропицрин-8- β -D-глукозид, 8 α -Хидроксидехидрокостус лактон,	Negrete et al., 1984, 1988a,b
<i>C. collina</i> L.	Десацилцинаропицрин, 11 β ,13-Дихидродеацилцинаропицрин, 3 β -Хидрокси-8 α -епоксиметил акрилокси-4(15),10(14),11(13)-триен-(1 α Н), (5 α Н)-гвајан-6,12-олид и његов 11 β ,13-Дихидродериват	Fernandez et al., 1989

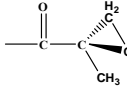
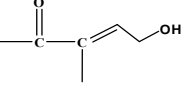
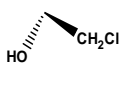
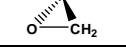
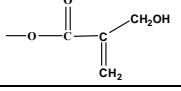
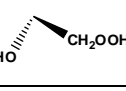
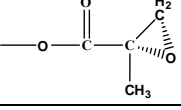
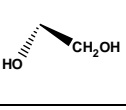
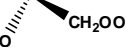
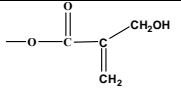
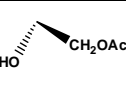
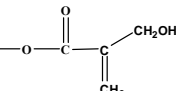
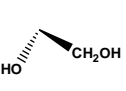
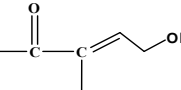
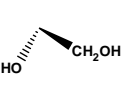
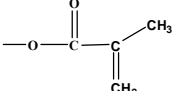
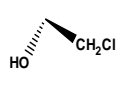
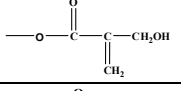
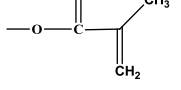
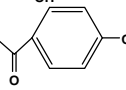
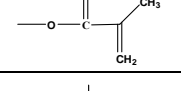
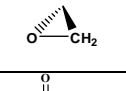
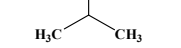
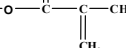
<i>C. confera</i> L.	Хлоројанерин, Хлорохисопифолин А, 17-Епи хлорохисопифолин А, смеша Сублутеолид и Репин, Јанерин, смеша Бабилин Б и Бабилин Б С 17-епимер, 15-Дехлоро 15-хидрокси хлоројанерин	Nowak et al., 1989 Bruno et al., 1998
<i>C. deflexa</i> Wagenitz	Агуерин Б, 8-Деацилцинароциприн, 15-Нор-гвајанолид, Цинаропицрин	Chicca et al., 2011
<i>C. glastifolia</i> L.	Агуерин Б, Акроптилин, 15-Дехлоро-15-хидрокси еписолстиолид, 19-Дезокси пикролид А, 17,18-дезоксирепин, 15-Дехлоро-15-хидропероксихлоројанерин, 19-Дезокси-15-хлоројанерин, Епицебелин Ј, Еписолстиолид, Епицентаурепенсин, Јанрин, Репин, Репдиолид триол, Хлоројанерин, Цебелин Д, Ј, Ф, Центауропенсин, Цинаропицрин	Nowak, 1992; Oksuz & Topcu 1994
<i>C. hermanii</i> F. Herm.	15-Дехлоро-15-хидропероксихлоројанерин, 15-Дехлоро-15-хидроперокси-хлорохисопифолин Б, 15-Дехлоро-3β-ацетил-15-хидрокси хлоројанерин, 15-Дехлоро-15-ацетоксихлоројанерин, 19-Дезоксихлоројанерин, 15-Дехлоро-15-ацетоксихлоројанерин, Јанерин, Хлоројанерин, Цинаропицрин	Öksüz et al., 1994
<i>C. hyssopifolia</i> Vahl	Акроптилин, Јанерин, Репин Хлорохисопифолин А, Б, Ц, Д, Центаурепенсин	Gonzáles et al., 1974, 1972a; Geppert et al., 1983
<i>C. hyrcanica</i> Bornm.	Акроптилин, Јанерин, Репин	Evstratova et al., 1969; Geppert et al., 1983
<i>C. imperialis</i> Hauffk. ex Bornm.	3-Дезоксисолститиалин А, 15-Дехлоро-15-Хидрокси-8-десацетилцентауререпин-8-О-(4-хидрокси)тиглинат, 8-Десацетилцентаурепенсин-8-О-(4-хидрокси)-тиглинат, Солститиалин А, Солститиалин А-ацетат, Центаурепенсин,	Rustaiyan et al., 1984
<i>C. incana</i> Desf	Акроптилин, Акроптилин-4,15-региоизомер [=Солститиолид], Дезоксирепин, Јанерин, Репин, Репдиолид триол	Massiot et al., 1986
<i>C. isaurica</i> Hub. Mor.	Јанерин	Flamini et al., 2004
<i>C. janeri</i> Graells	Хлорохисопифолин Ц, Јанерин, Хлоројанерин	González et al., 1977; Geppert et al., 1983
<i>C. kandavanensis</i> Rechinger	Кандаванолид, 9β-Хидрокси-кандаванолид [=Салогравиолид А]	Rustaiyan & Ardebili 1984
<i>C. kotschyi</i> Boiss.	Десацилцинаропицрин, Дериват линихлорина В, Линихлорин Б, Цинаропицрин	Öksüz & Putun 1983
<i>C. linifolia</i> L.	Агуерин Б, Акроптилин, Линихлорин А, В, С, Јанерин, Репин, Хлорохисопифолин А, Б, Ц, Д, Е, Центаурепенсин, Цинаропицрин	Gonzáles et al., 1978; Geppert et al., 1983
<i>C. marchaliana</i> Spreng.	Акроптилин, Јанерин, Хлоројанерин, Цебелин Д,	Nowak, 1992 Nowak et al., 1989

<i>C. musimonum</i> Maire	Агуерин Б, 4β, 15-Дихидро-3-дехидросолститиалин А моноацетат, 4β, 15-Дихидро-3-дехидросолститиалин А, Линихлорин Б, Центаурепенсин, Центаурепенсин С-17 епимер, Хлоројанерин, Цинаратриол, 17, 18-дезоксирепин, 19-Дезокси-15-хлоројанерин, Цинаропицрин, 3-Оксо-4α-ацетокси-15-хидрокси-1αН, 5αН, 6βН, 7αН, 11βН-гваи-10(14)-ен-6,12-олид, 3-оксо-4α-хидрокси-15-хидрокси-1α Н, 5αН, 6βН, 7αН, 11βН-гваи-10(14)-ен-6,12-олид, репин	González-Platas et al., 1999; Medjroubi et al., 1997; Medjroubi et al., 2003 ; Medjroubi et al., 2005; López-Rodríguez et al., 2009
<i>C. nigra</i> L.	Хлорохисопифолин А	Kaij-a-Kamb et al., 1992
<i>C. nicolai</i> Bald.	9-О-Ацетилсалвогравиолид А, 3-Деацетил-9-О-ацетилсалогравиолид А, Кандаванолид, Салогравиолид А, Б	Vajs et al., 1999
<i>C. ornata</i> Will.	Гросхемин α,β-дихидроксиизобутират, 3α-Дихидро-4(15)-дехидрогросхемин α,β-дихидроксиизобутарат	Navarro et al., 1990
<i>C. pabotii</i> Wagenitz	Агуерин А, 11,13-Дихидродеацилцинаропицрин, деацилцинаропицрин-8-О-[(S)-3-хидрокси-2-метилпропионат]	Marco et al., 1992
<i>C. ptosimopappa</i> Hayek	Деацилцинаропицрин, 11α, 13-Дихидро деацилцинаропицрин, 11β, 13-Дихидро-деацилцинаропицрин, 4β, 15-Дихидро-3-дехидро-солститиалин А, Залузанин Д, Ц, Јанерин, Хлоројанерин, Цинаропицрин,	Çelik et al., 2006
<i>C. ptosimopappoides</i> Wagenitz	Цинаропицрин, 11,13-Дихидро-десацетилцинаропицрин	Oksuz & Serin 1997
<i>C. phaeopappoides</i> Bordz	Јанерин, Хлоројанерин, Цинаропицрин	Nowak et al., 1989
<i>C. repens</i> L. (<i>Acrtilton repens</i> DC.)	Акрорепдиолид, Агуерин Б, 2,3-Дихидрокси-8α-метакрилоилоксихидрокостуслакрон, Епоксирепдиолид, Јанерин, Репдиолид, Репин, Репенсолид, Хлорорепдиолид, Хлорохисопифолин А, Ц, Цинаропицрин	Evstratova et al., 1967; Jakupović et al., 1986; Rustaiyan et al., 1981b; Stevens & Wong, 1986 Stevens, 1982
<i>C. salonitana</i> Vis.	Агуерин А, Кандаванолид, Салигравиолид А, Б, Ц	Daniewski et al., 1992; Daniewski et al., 1993
<i>C. sinaica</i> DC.	Амбербоин, Синаинин, Хлорохисопифолин А, Хлорорепдиолид [=Цебелин Е]	Al-Easa et al., 1990; Sarg et al., 1988
<i>C. solstitialis</i> L.	Акроптилин, 8-Дезацетилцентаурепенсин-8-О-(4-хидрокси)тиглате, 19-Дезоксихлоројанерин, 11β, 13-Дихидро-деацилцинаропицрин, 17-Епицентаурепенсин, Еписолститиолид јанерин, Солститиалин А, Солститиалин А 13-ацетат, Центаурепенсин, Репин, Солститиолид, Сублутеолид, Цинаропицрин	Merrill & Stevens, 1985; Jakupovic et al., 1986; Tešević et al., 1998
<i>C. solstitialis</i> L. subsp. <i>Schouwii</i> (DC.) Dostál (DC.) Dostál	Агуерин Б, 4β, 15-Дихидро-3-дехидро солститиалин А ацетат, Цинаропицрин	Bruno et al., 1991

<i>C. scoparia</i> Sieb.	(1S,3S,5R,6R,7R,8S)-8-ангелилокси-3- гидроксигвай-3(15),10(14),11(13)-триен- 6,12-олид, 8-Десацетилцентаурепенсин-8-0- (4-гидрокситиглинат), 8-Десацилрепин, Десацилцинаропицрин, Диаин, Жанерин, Линихлорин А, 3β-Хидрокси-8α-(3,4- диметоксибезоилокси)-11β,13-дихидро- 1αН,5αН,6βН,7αН-гвай-4(15),10(14)-диен-6,12- олид, 8α,4'- (гидрокситиглинате)-8 десацилоксисублутеолид, 8α-Хидрокси-11α,13- дихидрозалузанин, Хлорохисопифолин А, Б, С, Хлороскопарин, (1R,3S, 4S,5S,6S,7R,8S)-4β- (хлорометил)-3β,4α-дихидрокси-8α-(3-формил- 2-метил-пропеноилокси)-1αН,5αН,6βН,7αН- гвай-10(14),11(13)-диен-6,12-олид, (1R,3S,4S, 5S,6S,7R,8S)-4β-(хлорометил)-3β,4α- дихидрокси-8α-(сараценоилокси)- 1αН,5αН,6βН,7αН-гвай-10(14),11(13)-диен- 6,12-олид, 8α-Хидрокси-3β-(бензоилокси)- 1αН,5αН,6βН,7αН-гвай-4(15),10(14),11(13)- триен-6,12-олид, цебелин F, цинаропицрин	Helal et al., 1997; Youssef & Frahm, 1994a,b; Youssef 1998
<i>C. thracica</i> (Janka) Hayek	Жанерин, Хлорожанерин, Цинаропицрин	Nowak, 1992; Nowak et al., 1989
<i>C. tagananensis</i> Svent.	Деацилцинаропицрин, Цинаропицрин	González et al., 1984
<i>C. uniflora</i> Turra <i>subsp. nervosa</i> (Willd.)	Жанерин, 8α-Тиглоилокси-2α,3β-дихидрокси-4α- -епоксидехидрокостуслактон	Appendino et al., 1986
<i>C. webbiana</i> Sch. Bip.	Дихидроестафione I	González, 1972b

Табела 1.4 Структуре гвајанолида изолованих из рода *Centaurea*

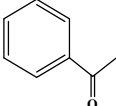
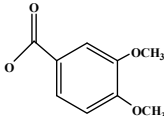
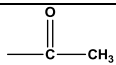
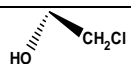
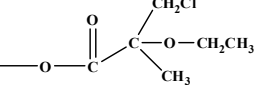
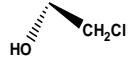
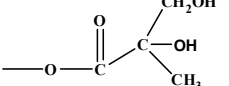
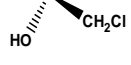
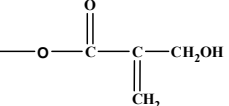
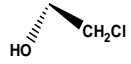
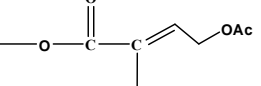
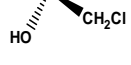
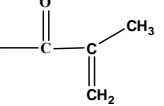

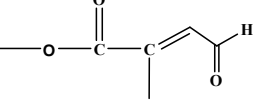
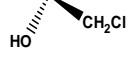
		Хемијска структура			
Сесквитерпенски лактон	Структура	Супституција			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Акропитин (Хлоро-хисопифолин Ц)	I	H	OH		
Акропитин-4,15-региоизомер	I	H	OH		
Агуерин А	III	H	H		H
Агуерин Б	III	H	H		H
Амбербоин (1S,3S,5R,6R,7R,8S)-8-Ангелилокси-3-хидроксигваи-3(15),10(14),11(13)-триен-6,12-олид	VI	H	H	CH ₃	-
Бабилин А	I	H	OH		
Бабилин Б	I	H	OH		
Гросхемин	V	H	H	-	-
Гросхемин α,β-дихидрокси изобугират	V	H		-	-
Деацил-цинаропицрин	III	H	H	H	H
Деацил цинаропицрин 8-О- [(S)-3-хидрокси-2- метилпропионат]	III	H	H		H
3-Деацил-9-О-ацетил салогравиолид А	III	H	H	H	
8-Деацилокси-8α-[2-метил акрилокси]-сублугеолид	II	H	H		

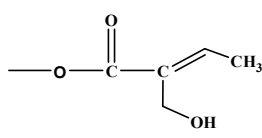
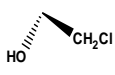
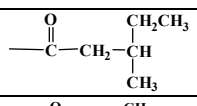
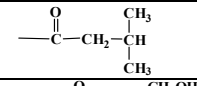
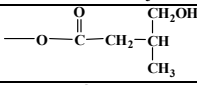
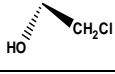
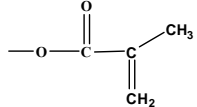
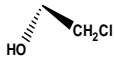
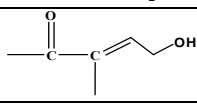
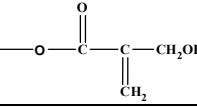
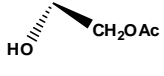
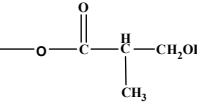
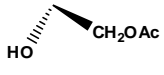
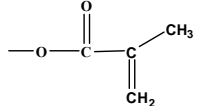

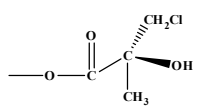
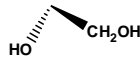
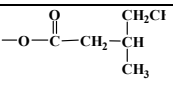
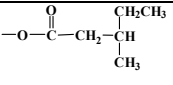
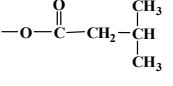
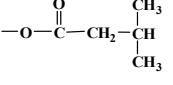
15-Деокирепин	III	H	H		H
8-Десацетил центаурепенсин- 8-О-(4-хидрокси тиглинат)	I	H	ОН		
8-Деацилрепин	I	H	ОН	ОН	
15-Дехлоро-15- хидроперокси хлоројанерин	I	H	ОН		
15-Дехлоро- 15-хидрокси еписолстиолид	I	H	ОН		
15-Дехлоро- 15-хидроперокси хлорохисопифолин Б	I	H	ОН	ОН	
15-Дехлоро- 15-ацетокси хлоројанерин	I	H	ОН		
15-Дехлоро- 3β-ацетил- 15-хидрокси хлоројанерин	I	H	OAc		
15-Дехлоро- 15-хидрокси-8- десацетилцентаурепен син-8-О-(4- хидрокси)тиглинат	I	H	ОН		
19-Дезокси хлоројанерин	I	H	ОН		
3-Дезокси цинароциприн	I	H	H		CH ₂
19-Дезокси пикролид А	I	H	ОН		
17, 18-Дезокси репин	I	H	ОН		
Диаин	IX	ОН	H		
11α, 13-Дихидро- деацил цинаропицрин	IX	β-ОН	H	α-CH ₃	ОН
11β, 13-Дихидро- деацил цинаропицрин	IX	β-ОН	H	β-CH ₃	ОН
3-епи 11,13- Дихидродеацил- цинаропицрин	IX	α-ОН	H	α-CH ₃	ОН

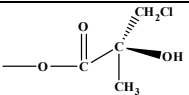
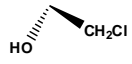
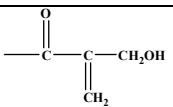
11βН 11, 13- Дихидродесациллина ропицрин- 8-β-D-глюкозид	IX	ОН	Н	α-CH ₃	
Дехидро костунолид	I	Н	Н	Н	CH ₂
11β, 13-Дихидро-8α- епоксиметил акрилоилокси- 4(15),10 (14),11(13)-триен- (1αН), (5αН)- гвайи-6,12-олид	IX	ОН	Н	CH ₃	
Дихидро естафетон I	X	CH ₃	Н	ОН	ОН
11β,13- Дихидросаупирин	IX	ОН	Н	CH ₃	
3α-Дихидро- 4(15)дехидро гросхимин-α.β- дихидрокси изобутарат	III	Н	Н		Н
15-Дехлоро- 15-хидрокси-8- десацетилцентаурепен син-8-О-(4- хидрокси)тиглинат	I	Н	ОН		
19-Дезоксхлоро јанерин	I	Н	ОН		
3-Дезокси цинароциприн	I	Н	Н		CH ₂
Еписолститиолид	I	Н	ОН		
Епицебелин	I	Н	ОН		
Епи- центауреапенсин (=17-епихлоро хисоифолин А)	I	Н	ОН		
17,18-Епокси- 19-дезокси хлоројанерин	I	Н	ОН		
Еписолститиолид	I	Н	ОН		
Залузанин Ц	I	Н	ОН	Н	CH ₂
Залузанин Д	I	Н	ОAc	Н	CH ₂

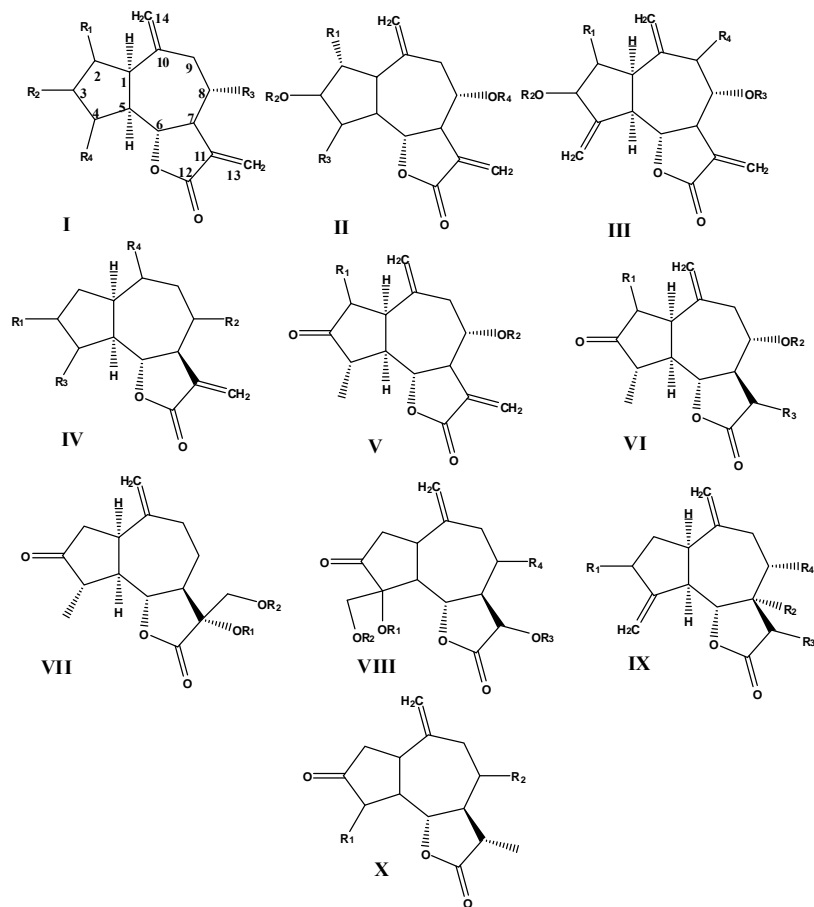
Јанерин	II	H	H		
Кандаванолит	III	H		H	H
Клементин	IX	OH	H		
Линихлорин А	I	H	OH		
Линихлорин В	III	H	H		H
Дериват линихлорин Б	III	H	H		H
Линихлорин Ц	I	H			
8α-Мета-крилоилоксид хидрокостуснолит	I	H	H		CH ₂
15-Нор-гвајанолит	X	H	OH	-	-
3-Оксо-4α-хидрокси-15-хидрокси-1αН,5αН,6βН,7αН,11βН-гваи-10(14)-ен-6,12-олид	VIII	H	H	CH ₃	H
3-Оксо-4 α-ацетокси-15-хидрокси-1αН,5αН,6βН,7αН,11βН-гваи-10(14)-ене-6,12-олид	VIII		H	CH ₃	H
Репдиолид	III	OH	H		H
Репдиолид триол	I	H	OH		
4,15-Епокси-репдиолид	II	OH	H		
Репин (сублутеолид)	II	H	H		
Репин монохлорхидрин	II	H	H		

Репенсолид	I	H	ОН		
Салогравиолид А (=9β-хидроксикандаванолид)	III	H		H	ОН
Салогравиолид А-9-О-ацетил	III	H		H	
Салогравиолид Б* (*10β 4β-епокси)	III	H		H	H
Салогравиолид Ц	III	H	H		H
Сауприн	III	H	ОН		H
Солститиалин А	IX	ОН	H		H
Солститиалин А 13-ацетил	IX	ОН	H		H
4β,15-Дихидро-3-дегидро солститиалин А	VII	H	H	-	-
Солститиолид	I	H	ОН		
Субекспинатин	I	H	H		CH2
Субекспинатин Б	IX	H	H		
Субекспинатин Ц	IX	H	H		ОН
8α-Тиглоилокси-2α, 3β-дихидрокси-4α-епоксидехидро костуслактон	I	ОН	ОН		
8α-Хидроксидехидрокостуслактон	I	H	H	ОН	CH2
8α-Хидрокси-11β13Н-дегидроксикостуслактон (синаинин)	IX	H	H	α-CH3	ОН
8α,4'-Хидрокси тиглинат)-8-десацилокси сублугеолид	I	H	ОН		
8α-Хидрокси-11α,13-дихидро залузанин Ц	IX	ОН	H	CH3	ОН
3β-Хидрокси-8α-епоксиметил акрилоилокси-4(15),10(14),11(13)-триен-(1αН), (5αН)-гвајан-6,12-олид	III	H	H		H

8 α -Хидрокси-3 β - (бензоилокси)- 1 α H,5 α H,6 β H,7 α H- гвай-4(15),10(14), 11(13)-триен-6,12- олид	III	H		OH	H
3 β -Хидрокси-8 α -(3,4- диметокси бензоиллокси)- 11 β ,13-дихидро- 1 α H,5 α H,6 β H,7 α H- гвай-4(15),10(14)- диен-6,12-олид	IX	OH	H	CH ₃	
9 β -Хидрокси- кандаванолд	III	H		H	OH
8 α -Хидрокси- дехидрокостус лактон	I	H	H	OH	CH ₂
Хлорохисопилолин Б	I	H	OH	OH	
Хлорохиспилолин Д	I	H	OH		
Хлорохисопилолин Е	I	H	OH		
Хлоројанерин	I	H	OH		
Хлороскопарин	I	H	OH		
Хлорорепдиолид	III	OH	H		H
14-Хлоро- 10 β -хидрокси- 10(14)-дихидро залузалин Д (1R,3S,4S, 5S,6S,7R,8S)- 4 β -(Хлорометил)- 3 β ,4 α -дихидрокси-8 α - (3-формил- 2-метил- пропенолиокси)- 1 α H,5 α H,6 β H,7 α H- гвай-10(14),11(13)- диен-6,12-окид	IV	OAc	H	CH ₂	
	I	H	OH		

(1R,3S,4S, 5S,6S,7R,8S)- 4β-(Хлорометил)- 3β,4α-дихидрокси-8α- (саракеноилокси)- 1αН,5αН,6βН,7αН- гвай-10(14),11(13)- диен-6,12-олид	I	H	ОН		
Цебелин А	III	ОН	H		H
Цебелин В	III	ОН	H		H
Цебелин D	I	H	ОН		
Цебелин E	I	ОН	ОН		
Цебелин Ф	III	H	H		H
Цебелин Г	I	H	ОН		
Цебелин X	I	H	ОН		
Цебелин И *1-αОН	I*	H	ОН		
Цебелин J	I	H	ОН		
Цебелин K	I		H	ОН	CH ₂
Цебелин Л	I		ОН	H	CH ₂
Цебелин Н	I		H	ОН	CH ₂
Цебелин O	I		ОН	H	CH ₂

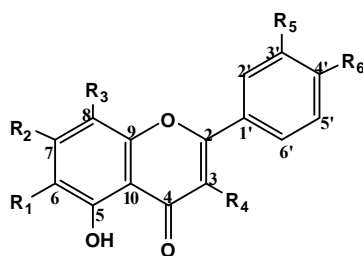
Центаурепенсин (хлоро хиспофолин А)	I	H	OH		
Цинаропицрин	III	H	H		H



Слика 1.13 Опште структуре гвајанолида.

Табела 1.5 Флавоноиди изоловани из секције *Jacea*, род *Centaurea*

Биљна врста	Флавоноиди	Литература
<i>C. jacea</i> L.	Центауреидин, Центауреин, Жацеин, Жацеозид, Жацеозидин, 4',5,7-Трихидрокси 3,6-диметоксифлавоон, 4',5-Дихидрокси-3,6-диметокси-7-О-глюкозилфлавоон, 3',4',5,7-Тетрахидрокси-3-метоксифлавоон, 7-Рутинозил-3-О-метилкаемферол, Апигенин, Цирсилиол, Хиспидулин, Еупаторин, Изокаемферид, Аксиларин, 3, 6-Диметоксикаемферол	Wagner et al., 1969 Rosler et al., 1971 Forgo et al., 2011
<i>C. nigra</i> L.	Апигенин, Центауреин, Жацеин	Kaij-a-Kamb et al., 1992
<i>C. phyrigia</i> L.	Деметокси-центауреидин	Kaij-a-Kamb et al., 1992
<i>C. phyrigia</i> ssp. <i>pseudophrya</i>	Кварциметрин (=кварцетин 7-О-β-D-глюкопиранозид), Деметоксицентауридин	Formisano et al., 2012
<i>C. hyssopifolia</i> Vahl	Жацеидин (=5,7,4'-трихидрокси-3,6,3'-триметоксифлавоон), Жацеин (=5,7,4'-трихидрокси-3,6,3'-триметоксифлавоон-7-β-D-глюкозид), Скутеларин	Formisano et al., 2012 Formisano et al., 2012
<i>C. pannonica</i> Heuff. Simonk.	(=скутелареин 7-β-D-глюкуронид), Цинарозид (=лутеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид), Ксиперозид (кварцетин 3-О-β-галактозид), Центауроцианин (=3-О-(6"-О-суцинил-β-D-глюкозил)-5-О-(β-D-глюкозил)цианидин)	
<i>C. pannonica</i> Heuff. Simonk. ssp. <i>semifrimbiata</i>	Центауроцианин (=3-О-(6"-О-суцинил-β-D-глюкозил)-5-О-(β-D-глюкозил)цианидин)	Formisano et al., 2012



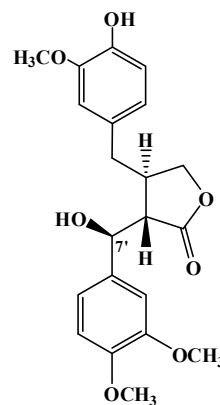
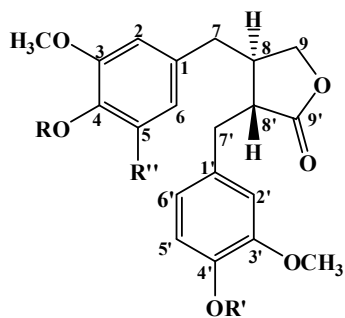
Слика 1.14 Општа структура флавоноида

Табела 1.6 Структуре флавоноида изолованих из биљних врста секције *Jacea*, род *Centaurea*

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Апигенин	H	OH	H	H	H	OH
Аксиларин	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OH
Центауреидин	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Центауренин	OCH ₃	O-Glu	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Цирсилиол	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OH
Деметокси-центауреидин	H	OH	H	H	OH	H
3,6-Диметоксикаемферол	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	OH
4',5-Дихидрокси-3,6-диметокси-7-О-глукозилфлавонон	OCH ₃	O-Glu	H	OCH ₃	H	OH
Еупаторин	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃
Хиспидулин	OCH ₃	OH	H	H	H	OH
Изокамферид	H	OH	H	OCH ₃	H	OH
Јацеин	OCH ₃	O-Glc	H	OCH ₃	H	OCH ₃
Јацеидин	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH
Јацеозид	OCH ₃	O-Glc	H	H	OH	OH
Јацеозидин	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	OH
Кварциметрин	H	O-Glc	H	OH	OH	OH
Скутеларин	OH	O-Glu	H	H	H	OH
4',5,7-Трихидрокси 3,6-диметоксифлавонон	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH
3',4',5,7-Тетрахидрокси,3-метоксифлавонон	H	OH	H	OCH ₃	OH	OH
7-Рутинозил-3-О-метилкаемферол	H	O-Rut	H	OCH ₃	OH	OH
Хиперозид	H	OH	H	O-Gal	OH	OH
Цинарозид	H	O-Glc	H	H	OH	OH

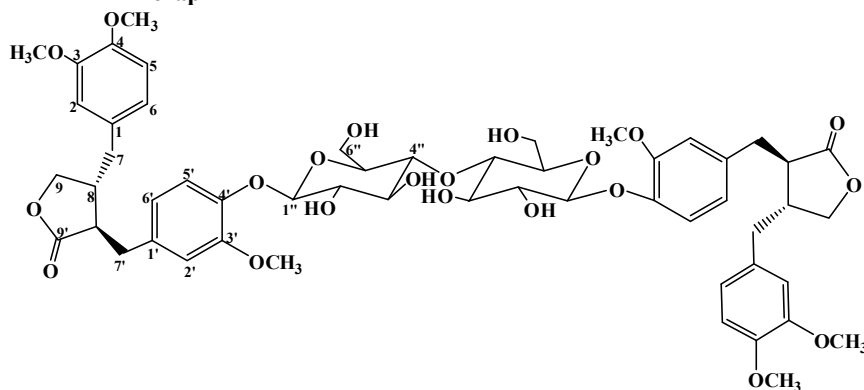
Табела 1.7 Лигнани изоловани из биљних врста рода *Centaurea*

Биљна врста	Лигнани	Литература
<i>C. affinis</i> Friv.	Артигенин, Матеренизол	Janackovic et al., 2004
<i>C. americana</i> Nutt.	Американин, Арктин, Артигенин, Матеренизол, Матерезинозид, Лапаол А	Shoeb et al., 2006
<i>C. americana</i> Nutt.	Матерезинозид, Арктин	Cooper et al., 2002
<i>C. calcitrapa</i> L.	Артигенин, Матеренизол, Пинорезинол, 7'(S)-Хидроксиарктигенин	Dawidar et al., 1989 Marco et al., 1992
<i>C. cuneifolia</i> Sm.	(-)-Арктигенин	Aslan & Öksüz, 1999
<i>C. dealbata</i> Willd.	Арктигенин	Christensen & Lam, 1991b
<i>C. deflexa</i> Wagenitz	Арктигенин, Арктин	Chicca et al., 2011
<i>C. dimorpha</i> Viv.	Арктин	Damak et al., 2000
<i>C. glomerata</i> Valh.	Арктин	Zaghloul et al., 1990
<i>C. iberica</i>	Лигнан гликозидни димер	Nisar Khan et al., 2011
<i>C. macrocephala</i> Muss. Puschk. ex Willd.	Арктигенин	Ribeiro et al., 2002
<i>C. macrocephala</i> Muss- Puschk ex Willd	Арктин, Лапаол А, Матерезинол, Матерезинозид	Shoeb et al., 2004
<i>C. melitensis</i> L.	Арктин	Negrete et al., 1989
<i>C. montana</i> L.	Арктигенин	Christensen et al., 1991b
<i>C. napifolia</i> L.	Лапаол А, ИзолапаолА	Bruno et al., 1995
<i>C. nervosa</i> Willd.	Арктигенин	Christensen & Lam, 1991a
<i>C. nicaensis</i> All. Fl. Pedem.	Лапаол А, Изолапаол А	Bruno et al., 1996
<i>C. nigra</i> L.	Арктигенин, Арктин, Матерезинол, Матерезинозид, Тујапликатин метил етар	Middleton et al., 2003
<i>C. orphanidea</i> Heldr.	Диметилматерезинол, Пинорезол	Gousiadou & Skaltsa, 2003
<i>C. paui</i> Loscos ex Willk.	Арктигенин, Пинорезинол	Cardona et al., 1997
<i>C. persica</i> Boiss.	Матерезинол	Sanz et al., 1990
<i>C. phrygia</i> L.	Арктигенин, Матерезинол, Пинорезинол, 7'(S)-Хидроксиарктигенин	Christensen & Lam., 1991a
<i>C. raphanina</i> Sm. ssp. <i>mixta</i> (DC.) Runemark	(-)-Матерезинол	Panagouleas et al., 2003
<i>C. regia</i> Boiss.	Арктигенин	Ulubelen et al., 1988
<i>C. scoparia</i> Sieber ex DC.	(-)-Матерезинол, Арктигенин	Youssef & Frahm, 1995
<i>C. solstitialis</i> L.	Арктигенин, Лириорезинол Б	Tesevic et al., 1998b
<i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>schouwii</i>	Арктигенин, Матерезинол	Bruno et al., 1991
<i>C. sphaerocephala</i> L. ssp. <i>polyacantha</i>	(-)-Арктигенин, Матерезинол (-)-Арктин, Лапаол А, Изолапаол А	Bastos et al., 1990
<i>C. tweediei</i> Hook.EtArn.	Арктигенин, Матерезинол	Fortuna et al., 2001

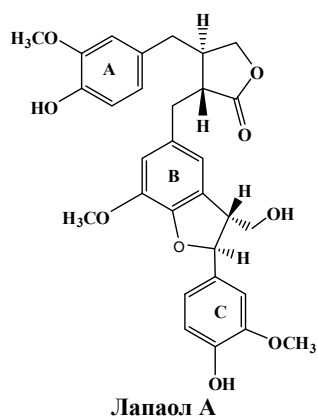


R=H; R'=H; R''=H Матерезинол
 R=CH₃; R'=CH₃; R''=CH₃ Диметилматерезинол
 R=CH₃; R'=H; R''=H Арктигенин
 R=H; R'=Glu; R''=H Матерезинозид
 R= CH₃; R'=Glu; R''=H Арктин
 R= H; R'=H; R''=OCH₃ Тујапликатин метил
 етар

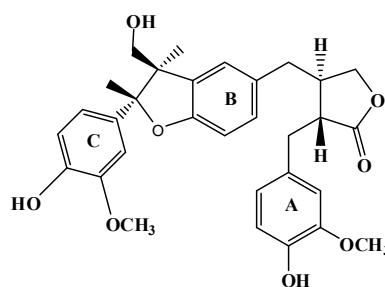
7'(S)-Хидроксиарктигенин



Лигнан гликозидни димер: (3*R*, 4*R*)-4-(3, 4-диметоксибензил)-3-(4-{5-[6-(4-{[(3*R*, 4*R*)-4-(3, 4-диметоксибензил)-2-оксотетарто-3-фуранил]метил}-2-метоксифенокси)-4, 5-дихидрокси-2-(хидрокси-метил)тетрахидро-2*H*-пиран-3-ил]окси}-3, 4-дихидрокси-6-(хидрокси метил)тетрахидро-2*H*-пиран-2-ил]окси}-3-метоксибензил)дихидро-2-(3*H*)-фуранон

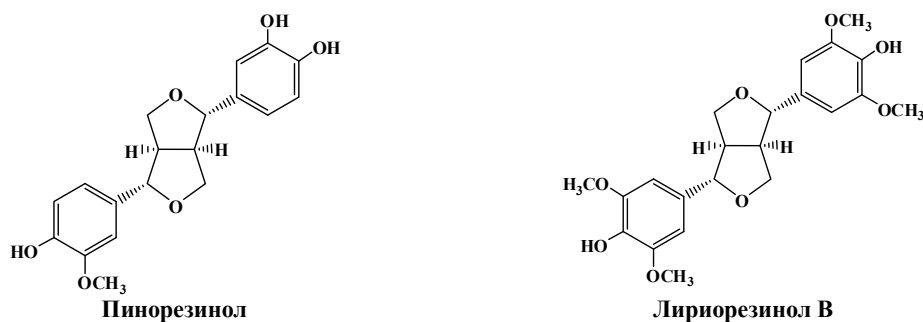


Лапаол А



Изолапаол А

Слика 1.15 Структуре дибензилбутиролактонске групе лигнана



Слика 1.16 Структуре фуурофуранске група лигнана

Поред разноврсних неиспарљивих компонента, врсте које припадају роду *Centaurea* такође су богате испарљивим компонентама тј. есенцијалним уљима. Сесквитерпени и њихови оксидовани деривати као и вишемасне киселине су основни састојци есенцијалних уља изолованих из врста рода *Centaurea*. Међутим, испитивањем хемијског састава нађено је да присутност поједних компоненти зависи од географског подручја на коме је биљка сакупљана. Тако је нпр. гермакрен Д, основна испарљива компонента есенцијалног уља врста са подручја Турске, док није идентификован (или у врло малом проценту) код врста рода *Centaurea* са подручја Грчке (Flamini et al., 2002; Dural et al., 2003; Karamenderes et al., 2008). Кариофилен оксид је основна компонента врста са овог подручја (Lazari et al., 1999, 2000) док је из есенцијалних уља добијених из врста *Centaurea* са подручја Бугарске β -еудесмол и спатуленол (Roselli et al., 2008).

Интересантно је напоменути да је код свих врста нађен значајан проценат вишемасних засићених киселина за које се пак сматра да нису прави конституенти есенцијалних уља већ да су типични конституенти епикутикларног воска (Lazari et al., 2000).

1.5.2 Фамилија Lamiaceae (Labiatae) – уснатице

Фамилија Lamiaceae (Labiatae) садржи од 233 до 263 рода и 6900 – 7200 врста. Родови са највише врста су: *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus*, и *Nepeta* (Harley et al., 2004).

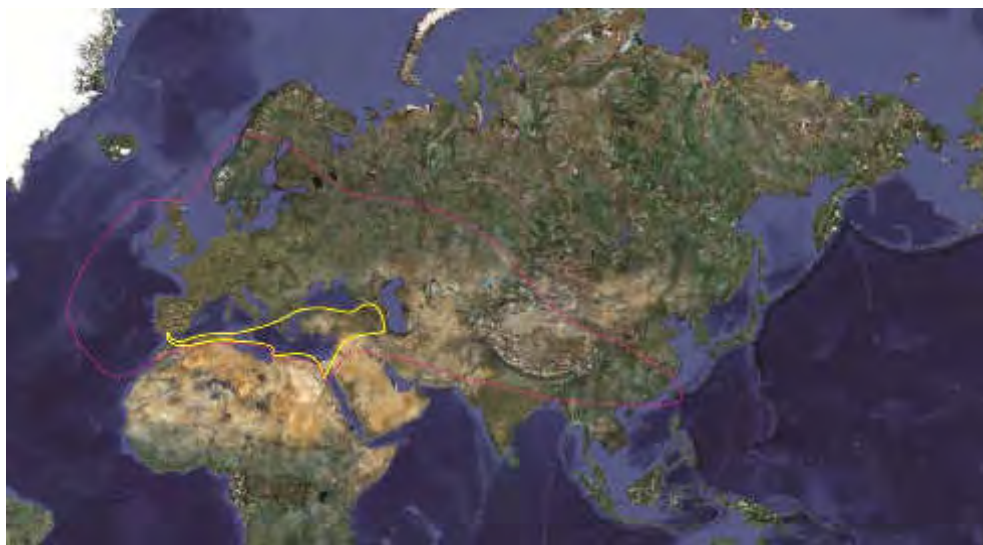
Биљке су једногодишње и вишегодишње, жбунасте или полужбунасте. Стабло и изданци обично су четвороугаони. Листови су наспрамни а ређе пршљенасти или наизменични, са усеченим или целим ободом, без залистака (Fernades & Neuywood, 1972).

Фамилија Lamiaceae је позната и као „фамилија мента”, с обзиром на то да фамилију чине биљне врсте које су у широкој употреби у кулинарству: босиљак, нана, рузмарин, жалфија, планински чај, мајорам, оригано, мајчина душица, лаванда. Од античког доба ове биљке су познате као ароматичне, богате есенцијалним уљима па су због тога током векова коришћене као зачини и природни конзерванси, али и за производњу парфема. Наведене врсте су такође познате лековите биљке. Због пријатног мириса и етеричних компоненти есенцијална уља биља користе се пре свега за опуштање приликом нервне напетости, док се чајеви користе за опуштање, затим за стомачна обољења и разне инфекције. Данас се биљке из породице Lamiaceae употребљавају у индустрији хране, фармацеутској индустрији и козметици и имају велики економски значај.

Род *Origanum*. На основу морфолошких карактеристика врста род *Origanum* је диференциран на 3 групе, 10 секција, 38 врста, 6 подврста и 17 хибрида. Врсте су обично распрострањене дужином Медитеранске регије, док је 75% нађено на источном Медитерану (Ietswaart, 1980). Биљке су једногодишње, двогодишње и вишегодишње. Најчешће су патуљасте жбунови, са цветовима (један или више) привидно груписаним у класове тј. удружени у компактне округласте цвасти. Чашица звонаста, са 13 нерава, ждрело чашице чекињаво, чашичних зубаца 5. Крунична цев нешто дужа од чашице, прашника 4, од којих су два дужа а два краћа, вире из круничне цеви, плодићи су јајасте глатке орашице. Листови неназубљени или умерено назубљени, већином јајасте. Врсте рода *Origanum* претежно насељавају сува станишта као што су стеновите литице планинских и брдских масива. У погледу животне форме, најчешће су патуљасте жбунови

висине 20 – 80 cm са бројним црвено љубичастим цветовима организованим у збијене цвасти. Цветају током пролећа и лета (Diklić, 1974; Fernades & Heywood, 1972).

Реч „*origanum*” потиче од грчких речи „*oros*” што значи планина и „*ganos*” радост. Тако да, у буквалном преводу, биљке представљају радост планине. Роду *Origanum* припадају најзначајније кулинарске биљке као што је мајорам и оригано, незаобилазни зачини за рибу и месо у Медитеранској кухињи (Aligiannis et al., 2001). Врсте рода *Origanum* богате су етеричним уљима па се користе и као лековите биљке. *Origanum vulgare* L. је најраспрострањенија биљка овога рода и налази се у Европи, Западној и Централној Азији све до Тајвана. Најбољи европски оригано производи се у Грчкој, где се сакупља у дивљини или се гаји под специјалним условима, користи се као зачин, у козметици и производњи вермута и битера (Fleishera and Snee, 1982).



Слика 1.17 Распрострањеност рода *Origanum*:.....; подручје свих секција изузев секције *Origanum*:----- (извор Ietswaart, 1980)

Надземни делови врста ове секције су умерено гранати са изданцима првог, веома ретко другог реда. Цветови су организовани у оборене класолике цвасти средње величине. Листови су овални, умерено длакави, наспрамно постављени, преклопљени, са зеленом до љубичастом кутикулом, глатке површине. Цветови средње величине, обично двополни по два заједно, вертикално оријентисани. Чашични листићи међусобно делимично срасли чинећи двосунату чашицу. Крунични листићи, такође, међусобно срасли у круницу која је диференцирана на горњу и доњу усну. Прашнички конци неравномерне дужине.

Секцију сачињава осам врста: *O. akhdarensis* Ietswaart et Boulos (Либија); *O. syrenaicum* Béguinot et Vaccari (Либија); *O. hypericifolium* Schwarz et Davis (Турска), *O. libanoticum* Boissier (Либан); *O. scabrum* Boiss & Heldr. in Boiss (Грчка); *O. sipyleum* Linnaeus (Грчка, Турска); *O. vetteri* Briquet and Barbey (Грчка), *O. pampaninii* (Brullo et Furnari) Ietswaart, *O. sipyleum* L. (Либија) (Ietswaart, 1980).

Међу наведеним врстама надземни делови биљке *O. sipyleum* L. се користе као чај за стомачне проблеме и природни адитиви у храни (Oluk et al., 2009).

Врста: *Origanum scabrum* Boiss & Heldr. in Boiss.

Хомотипски синоним: *Amaracus scaber* (Boiss. & Heldr.) Briq.

Хетеротипски синоним: *Amaracus pulcher* (Boiss. & Heldr.) Briq.

Origanum pulchrum Boiss. & Heldr.

Origanum scabrum subsp. *pulchrum* (Boiss. & Heldr.) P. H. Davis


Извор информација: сајт The Euro+Med PlantBase за Европско-Медитеранску биљну распрострањеност.

Вишегодишња жбунаста биљка са двополним цветовима, понекад само женским. Стабло до 45 cm дужине, усправљено, глатко, на горњој површини разгранато. Корен пречника до 1,5 cm (**Табела 1.8**). Величина листа 11 – 30 x 11 – 20 mm, јајсти-полујајсти најчешће глатки. Листићи величина 8 – 10 x

7 – 8 mm, упадљиви, јајасте, јајасто елиптичне, пурпурне. Цвет је љубичаст, душло већи од чашице (Ietswaart, 1980).

O. scabrum је ендемска биљка Грчке, налази се на планинама Тајгетос и Малево на Пелопонезу као и на планинама Кандилион и Делфи на острву Евиа. Обично се налази на надморској висини 1000 – 1800 m. Цвета од јануара до септембра. *O. scabrum* формира хибрид са врстом *O. vulgare* ssp. *hirtum*, који је познат под називом *O. liriium* (Ietswaart, 1980; Fernandes and Heywood, 1972). За сада не постоје литературни подаци о употреби биљке *Origanum scabrum*.

Табела 1.8 Ботаничка карта *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. in Boiss.

Царство:	Plantae	
Подела:	Spermatophyta	
Подподела:	Angiospermae	
Класа:	Dicotyledones	
Ред:	Lamiales	
Породица:	Lamiaceae Lindl.	
Род:	<i>Origanum</i> L.	
Секција:	<i>Anatolicon</i> Bentham	



Слика 1.18 Распрострањеност врсте *O. scabrum* (Извор: Ietswaart, 1980)

Хемотаксономија рода *Origanum*. Биљне врсте рода *Origanum* богате су есенцијалним уљима која се користе више хиљада година. Хемијски састав различитих *Origanum* врста испитиван је до сада (Bendahou et al. 2008; Karioti et al., 2006; Şahin et al., 2004). Утврђено је да састав уља умногоме зависи од географског подручја са кога потиче наведена врста, али карактеристична хемијска група за род су поједини монотерпени: карвакрол, тимол, линалоол, терпинен-4-ол, γ -терпинен и сабинен (Deans & Svoboda, 1990; Russo et al., 1998). Карвакрол и тимол су основна једињења идентификована у есенцијалним уљима готово свих врста *Origanum* испитиваних до сада (Kokkini, 1997). Због тога су врсте рода *Origanum* подељене у две хемотипске групе: 1. тимол и 2. карвакол група (Russo et al., 1998). За групу карвакрол се знало још у античко доба. Заправо, назив hyssop (грчка форма од јеврјске речи 'ezov'), позната и као 'za'atar' у арапском свету и *origanum* на латинском, први пут се помиње у Библији (Друга књига Мојсијева 12: 22 опис Ускршњег ритауала) (Fleisher and Fleisher, 1988). Упоредна студија о традиционалној употреби oregano-у исхрани Медитеранских народа доказује да је библијски hyssop, карвакрол биљке *Majorana syriaca* (L.) Feinbr. (синоним: *Origanum maru* L., *Origanum syriacum* L.) (Fleisher and Fleisher, 1988).

Због лековитог дејства и карактеристичног укуса, поред есенцијалних уља годинама се испитује и хемијски састав екстракта биљака *Origanum*. Међу различитим хемијским групама идентификованим до сада, најзаступљенији су терпени и фенолни деривати (**Табела 1.9**). Међу терпенима највише има монотерпена док су из групе фенолних једињења нарочито заступљене фенолне киселине, (рузмаринска киселина и деривати) као и флавоноиди.

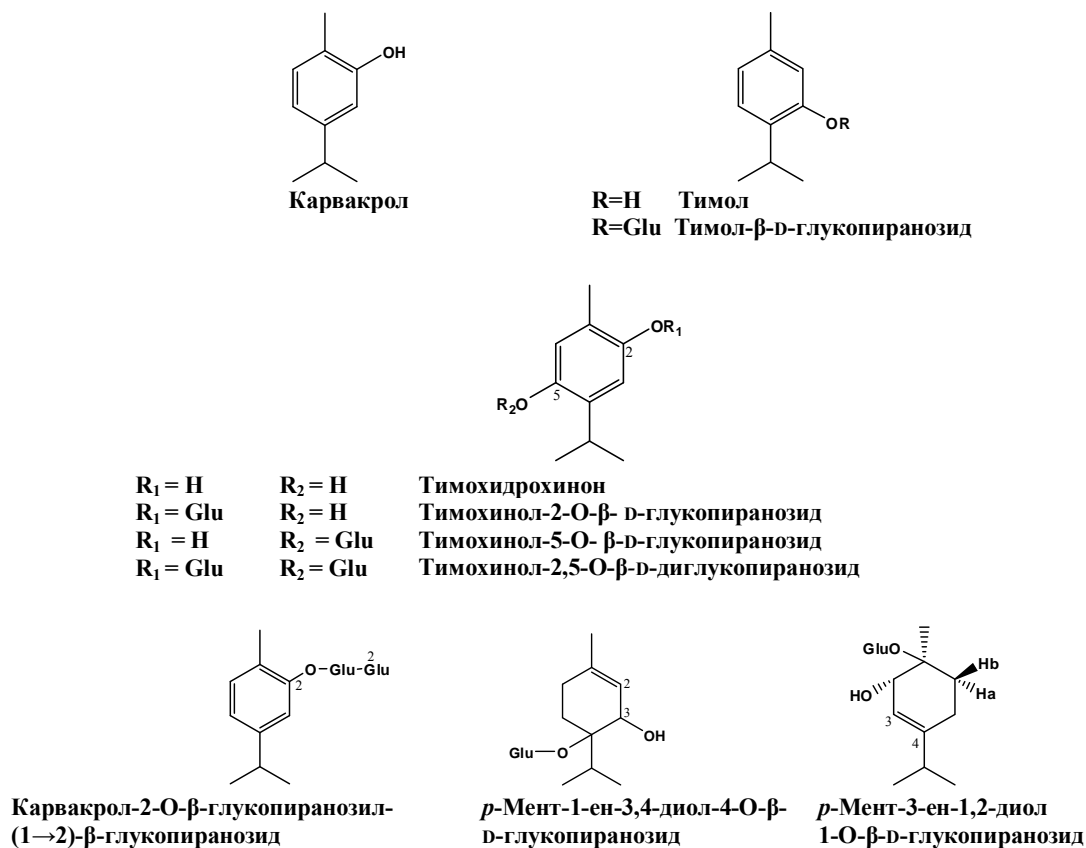
Табела 1.9 Секундарни метаболити изоловани из рода *Origanum**

Билна врста	Географско порекло врсте	Изоловане супстанце	Литература
<i>O. compactum</i> Benth.	Мароко	β -Амирин, Бетулин, Бетулинска киселинаid, 21- α -Хидрокси олеанолинска киселина, 21- α -Хидроксиурсолна киселина, Аромадендрин, Тимохидрохинон	Bellankhdar et al., 1988
<i>O. dictamnus</i> L.	Грчка	Апигенин, Ериодиктиол, Кварцетин, Лутеолин	Harvala & Skaltsa, 1986
	Грчка	Апигенин-7-О-глукозид, Ериодиктиол-7-О-глукозид, Лутеолин-7-О-глукозид, Витексин, Изовитексин, Изоориентин, Ориентин, Рузмаринска киселина, Метил естар рузмаринске киселине, Салвианолинска киселина Р	Skaltsa & Harvala, 1987
	Грчка	Тимохинон, Тимохинол-2-О- β -глукопиранозид, Оресбиусин А, Е-кафеинска киселина, Апигенин, Каемферол, Кварцетин, Ериодиктиол, Таксифолин, Нарингенин, 12-Хидроксијасмонична киселина, 12-Хидроксијасмонична киселина 12-О- β -D-глукопиранозид	Chatzopoulou et al., 2010
<i>O. dubium</i> Boiss.	Грчка	Апигенин-4'-метилетер, Каемферол-3,6,7-триметилетар, Кварцетин-3,6-диметилетар, Кварцетин-3,6, 7-триметилетар	Souleles et al., 1990
<i>O. intercedens</i> Rech.	Крит Грчка	Кафеинске киселина, Рузмаринска киселина, Карвакрол	Pizzale et al., 2002
<i>O. x intercedens</i> Rech. (= <i>O. onites</i> x <i>vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>)	Грчка Технолошко-образовани институт Солун	Тимусин, 5,6,4'-Трихидрокси-7,3'-диметоксифлаване, Тимонин, Кирсимаритин, Генкванин	Bosabalidis et al., 1998
<i>O. majorana</i> L.	Египат	Арбутин, Метиларбутин, Хидрохинон, Хидрохинон-монометил етар	Assaf et al., 1987
	-	Апигенин, Каемферол, Лутеолин	Yadav et al., 2000
	Јапан Локални маркет	6-Хидроксиапигенин, 6-Хидроксиапигенин-7-О- β -D-глукопиранозид, 6-Хидрокси-лутеолин-7-О- β -D-глукопиранозид, 6-Хидроксиапигенин-7-О-(6"-О- ферулоил)- β -D-глукопиранозид, 6-Хидрокси-лутеолин-7-О-(6"-О-ферулоил)- β -D-глукопиранозид	Kawabata et al., 2003
<i>O. majoricum</i> Camb. (= <i>O. majorana</i> x <i>vulgare</i> ssp. <i>virens</i>)	Шпанија	Апигенин, Лутеолин, Нарингин, Рутин, Хризоериол	Palomino et al., 1997
<i>O. onites</i> L.	Крит Грчка	Кафеинска киселина, Рузмаринска киселина, Карвакрол	Pizzale et al., 2002

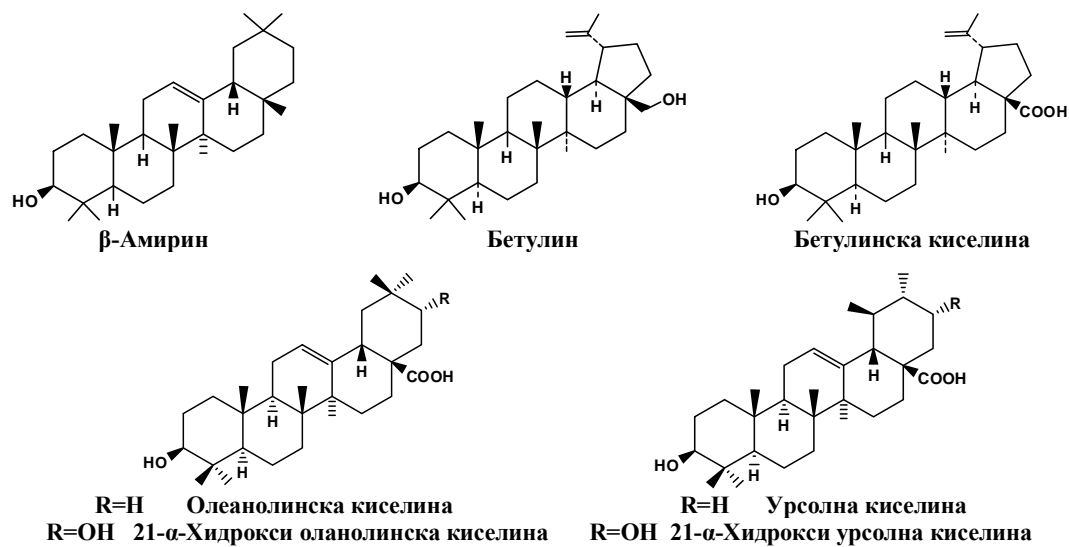
<i>O. syriacum</i> L.	Египат	Тимохинол-2-О-β-глюкопиранозид, Тимохинол-5-О-β-глюкопиранозид, Тимохинол-2,5-О-β-дигликопиранозид, Карвакрол-2-О-β-гликопиранозил-(1→2)-β гликопиранозид, <i>p</i> -мент-1-ен-3,4-диол-4-О-β-глюкопиранозид	Kamel et al., 2001
<i>O. tyttanthum</i> Gontsch.	Узбекистан	4-О-β-D-Гликопиранозил-3'-хидроксил- -4'-метоксибензоат, Тимол, Карвакрол тимол-β-D-глюкопиранозид, Нарингенин, Ериодиктиол, 4-О-β-D-глюкопиранозилбензил-3',4'-дихидроксибензоат, Тимохинол-5-О-β-глюкопиранозид, Тимохинол-2-О-β-глюкопиранозид, Ацетин-7-О-β-D-метилглюкуронат, Рузмаринска киселина, 4-О-β-D-глюкопиранозилбензил-4'- хидрокси бензоат, 4-О-β-D-Глюкопиранозилбензил-4'- хидрокси-3'-метокси-бензоат	Takeda et al., 2008
<i>O. vulgare</i> L.	Руска провинција Новосибирск	Космосид, Лутеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид	Peshkova & Mirovich, 1984
	Јапан Ботаничка башта	4-[(3,4)-Дихидроксибензоилокси]метил]фенил- β-глюкопиранозид	Natakani & Kikuzaki, 1987
	Јапан Ботаничка башта	<i>E</i> -Кафеинска киселина, Рузмаринска киселина, Протокатехинска киселина	Kikuzaki & Natakani, 1989
	Русија	Ванилна киселина, <i>E</i> -Кафеинска киселина, Циметна киселина, Прокатехинска киселина, Сиригинска киселина, <i>p</i> -Хидроксибензоева киселина, Хлорогенична киселина	Mirovich et al., 1989
	-	Апигенин, Лутеолин	Segiet-Kujawa & Michalowsa, 1990
	-	5-Хидрокси-7-метокси-6-О-[α-L-рамнопиранозил(1→2)-β-D- фукопиранозил]флавоон, 5,6-Дихидрокси-7-метоксифлавоон, 5-Хидрокси-6,7-диметоксифлавоон, Изосакуранетин 7-О-β-D-неохесперидозид, 3',4',5'-Триметокси-фуранофлавоон	Zheng et al., 1997
	Пољска	<i>E</i> -кофеинска киселина, Рузмаринска киселина	Zgórkа et al., 1997
	-	Прокатехинска киселина, Урсолна киселина, Олеанолинска киселина, Сагитатозид А, β-Ситостерол, Стигмастерол, Тилианин	Wu et al., 2000
	БФР Македонија	Апигенин, Диосметин, Лутеолин, Хрисоериол	Kulevanova et al., 2001
	Русија	Аристолохична киселина I, Аристолохична киселина II, D-(+)- рафинозе, Урсолна киселина	Goun et al., 2002
Јапан Ботаничка башта	4'-О-β-D-Глюкопиранозил-3',4'-дихидроксибензилпрокатехиат, 4'-О-β-D-Глюкопиранозил-3',4'-дихидроксибензил, 4-О- метилпрокатехинат	Matsuura et al., 2003	

	Таиван	Салвианолична киселина А, Салвианолична киселина Ц Литосперминска киселина, Рузмаринска киселина, Прокатехинска киселина, Кофеинска киселина, Апигенин-7-О- β -D-глукуронид, Апигенин-7-О- β -D-(6''-метил) глукуронид, Лутеолин, Лутеолин-7-О- β -D-глукопиранозид, Лутеолин-7-О- β -D-глукуронид, Лутеолин-7-О- β -D-ксилопиранозид, 4-Хидроксibenзил алкохол-4-О- β -D-глукопиранозид, 4-(3,4-дихироксибензилоксиметил), фенил-О- β -D- глукопиранозид, Оригалигнанол	Lin et al., 2003
	Литванија Ботаничка башта	Рузмаринска киселина, Хлорогенична киселина, Кофеинска киселина, Хиперозид, Нарингин+Рутин, Лутеолин, Астрагалин, Витексин, Изовитексин, Ериодиктол, Кверцетин, Нарингенин, Диосметин	Radušienė et al., 2008
	Кина Апотека	Метилестар рузмаринске киселине	Ding et al., 2010
	Египат	Апигенин, Лутеолин, Салвагинин, Кирсимартин, Диосметин, Десметоксицентауридин, 5-Хидрокси-6,7,3',4'-тетраметокси апигенин, Апигенин-7-О-глукопиранозид, Лутеолин 7-О- глукопиранозид, Лутеолин-7-О-глукозид-6''-метилестар, Лутеолин-7-О- α -L-рамнозид-4'- β -D-глукопиранозид, Кверцетин-3-О- β -D-глукозид-4'-О- α -L-рамнозид	Hawas et al., 2008
	Индија	Ориганол А, Ориганол В, Урсулна киселина, Олеанолинска киселина, β -ситостерол, Триаконтанол	Venkateswara Rao et al., 2011
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i> (Link) Ietswaart	Грчка	Апигенин, Лутеолин, Хризоеириол, Диосметин, Кверцетин, Ериодиктиол, Космозид, Виценин-2, Кафеинска киселина, р-мент-3-ене-1,2-диол 1-О- β -D-глукопиранозид, Тимохонол-2-О- β -гликопиранозидтим, Тимохинол-5-О- β -гликопиранозид, Тимохинол-2,5-О- β -дигликопиранозид, 12-О-Хидроксијасмонишна киселина, 12-О-Хидроксијасмонишна киселина 12-О- β -глукопиранозид, Литоспермична киселина В, рузмаринска киселина, 10- <i>epi</i> - Литоспермична киселина, <i>epi</i> -литоспермична киселина В	Koukoulitsa et al., 2006

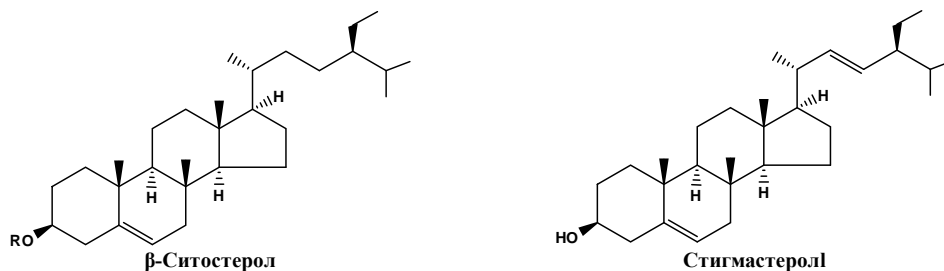
*Аутори биљака су наведени на основу рефернце Ietswaart, 1980.



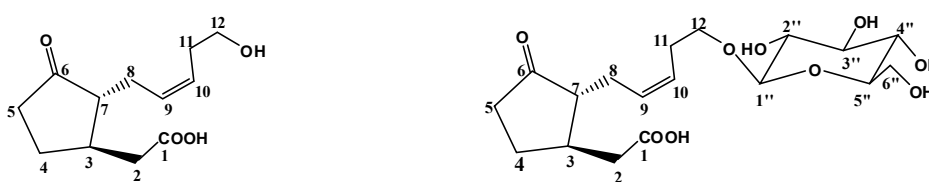
Слика 1.19 Основне структуре монотерпена и монотерпенских гликозида



Слика 1.20 Основне структуре тритерпена

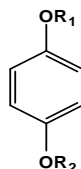


Слика 1.21 Основне структуре стерола



12-О-Хидроксијасмонична киселина 12-О-Хидроксијасмонична киселина 12-О- β -глюкопиранозид

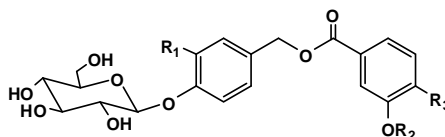
Слика 1.22 Основне структуре алицикличних деривата



$R_1 = H$
 $R_1 = CH_3$
 $R_1 = H$
 $R_1 = CH_3$

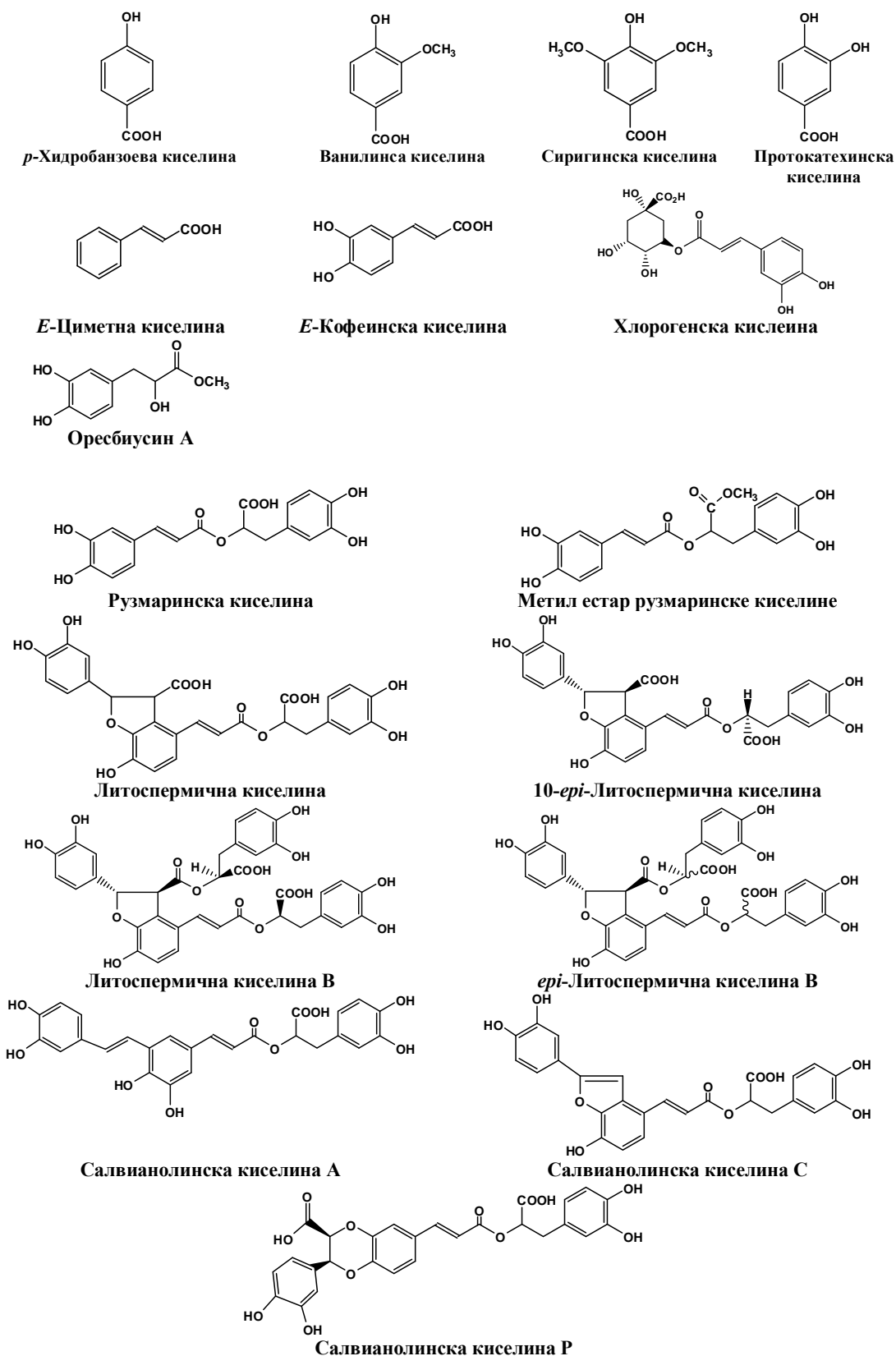
$R_2 = Glu$
 $R_2 = Glu$
 $R_2 = H$
 $R_2 = H$

Арбутин
 Метиларбутин
 Хидрохинон
 Хидрохинон-монометил етар

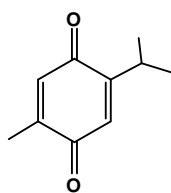


$R_1 = OH$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	4'-O- β -D-Глукопиранозил-3',4'-дихидроксибензил прокатехинат
$R_1 = OH$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = OH$	4'-O- β -D-Глукопиранозил-3',4'-дихидроксибензил, 4-О-метилкатехин ат
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	4'-[(3,4)-Дихидроксибензилокси]метил]фенил-3'- β -D-глюкопиранозид, 4-О- β -D-Глукопиранозилбензил-3',4'-дихидроксибензоат
$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = OH$	4-О- β -D-Глукопиранозилбензил-3'-хидроксил-4'-метоксибензоат
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = H$	4-О- β -D-Глукопиранозилбензил-4'-хидроксилбензоат
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	4-О- β -D-Глукопиранозилбензил-4'-хидрокси-3'-метоксибензоат

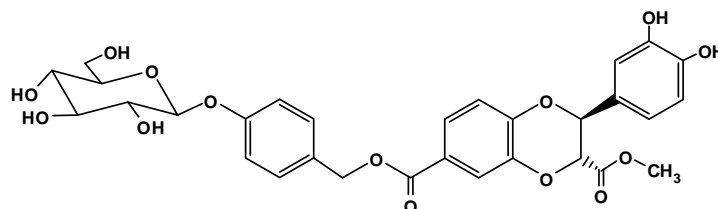
Слика 1.23 Основне структуре фенолних једињења/фенолни гликозиди



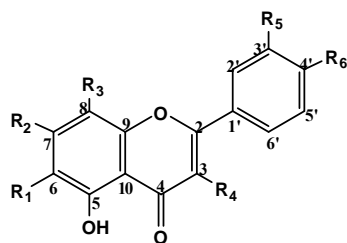
Слика 1.24 Основне структуре фенолних једињења/фенолне киселине



Слика 1.25 Структура хинона/тимохинона



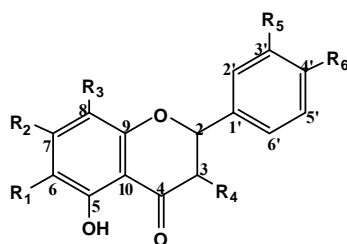
Слика 1.26 Структура дихидробензодииокан деривата/оригалигнанола



Слика 1.27 Основне структуре флавоноида/флавоени и флавоноли

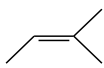
Табела 1.10 Структуре флавона и флавонола изолованих из биљних врста рода *Origanum*

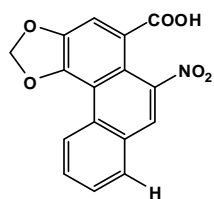
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Апигенин	H	OH	H	H	H	OH
Апигенин-4'-метилетер	H	OH	H	H	H	OCH ₃
6-Хидроксиапигенин	OH	OH	H	H	H	OH
6-Хидроксиапигенин-7-О-β-D- глюкопиранозид	OH	O-Glu	H	H	H	OH
6-Хидроксиапигенин-7-О-(6'''-О- feruloyl)-β-D-глюкопиранозид	OH	O-Glu-(6- ферулил)	H	H	H	OH
Апигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид	H	O-Glc	H	H	H	H
Апигенин-7-О-β-D-(6''-метил) глюкуронид	H	O-Glc метил естер	H	H	H	H
Апигенин-7-О-β-D-глюкуронид	H	O-Glc	H	H	H	H
5-хидрокси-6,7,3',4'- тетраметокси-апигенин	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃
Ахриосериол	H	OH	H	H	OCH ₃	OH
Витексин	H	OH	C-Glu	H	H	OH
Диосметин	H	OH	H	H	OH	OCH ₃
Изовитексин	C-Glu	OH	H	H	H	OH
Изоориентин	C-Glu	OH	H	H	OH	OH
Каемферол	H	OH	H	OH	H	OH
Каемферол-3,6,7-триметилетер	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH
Кверцетин	H	OH	H	OH	OH	OH
Кверцетин-3,6-диметилетар	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OH
Кверцетин-3,6,7-триметилетар	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OH
Кверцетин 3-О-β-D-глюкозид-4'-О- α-L-рамнозид	H	OH	H	O-Glu	OH	α-L-Rha
Космосид	H	O-Glu	H	H	H	OH
Лутеолин	H	OH	H	H	OH	OH
Лутеолин 7-О-β-D-глюкопиранозид	H	O-Glu	H	H	OH	OH
Лутеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид	H	O-Glc	H	H	OH	OH
Лутеолин-7-О-β-D-ксилопиранозид	H	α-D-Xy	H	H	OH	OH
Лутеолин-7-О-α-L-рамнозид-4'-β-D- глюкозид	H	α-L-Rha	H	H	OH	O-Glu
Лутеолин-7-О-глюкозид- 6''-метилестер	H	O-Glc метил естер	H	H	OH	OH
6-Хидроксилутеолин-7-О-β-D- глюкопиранозид	OH	O-Glu	H	H	OH	OH
6-Хидроксилутеолин-7-О-(6''-О- ферулоил)-β-D-глюкопиранозид	OH	O-Glu-(6- ферулоил)	H	H	OH	OH
5-Хидрокси-7-метокси-6-О-[α-L- рамнопиранозил(1→2)-β-D- фукопиранозил]флавоон	α-L-rha (1→2)-β-D- fuco	OCH ₃	H	H	Ph	H
Ориентин	H	OH	C-Glu	H	OH	OH
Рутин	H	OH	H	Glu (1→6) rha	OH	OH
Тилианин	H	O-Glu	H	H	H	OCH ₃
Хрисоериол	H	OH	H	H	OCH ₃	OH
Тимонин	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
Цирисмаритин	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H
5,6,4'-Трихидрокси-7,3'- диметоксифлавоон	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
Генкванин	H	OCH ₃	H	H	H	OH
Хиперозид	H	OH	H	O-Glu	OH	OH
Астрагалин	H	OH	H	O-Glu	H	OH
Виценин-2	C-Glu	OH	C-Glu	H	H	OH
Акацетин-7-О-β-D- метилглюкуронат	H	O-GlcA Метил естер	H	H	H	OCH ₃



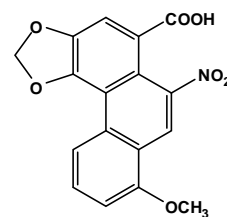
Слика 1.28 Основне структуре флавоноида/дихидрофлавони и дихидрофлавоноли

Табела 1.11 Структуре дихидрофлавона и дихидрофлавонола изолованих из биљних врста рода *Origanum*

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Аромадендрин	H	OH	H	OH	H	OH
Ериодиктиол	H	OH	H	H	OH	OH
Ериодиктиол-7-О-глюкопиранозид	H	O-Glu	H	H	OH	OH
Нарингенин	H	Glu (1→2) rha	H	H	H	OH
Сагитатозид А	H	OH		Glu (1→2) rha	H	OCH ₃
Таксифолин	H	OH	H	OH	OH	OH



Аристолохична киселина I



Аристолохична киселина II

Слика 1.29 Основне структуре алкалоида

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Увидом у научну литературу може се закључити да су биљни ресурси предмет испитивања у неколико праваца:

1. испитивање биосинтезе секундарних метаболита,
2. помоћу хемијског састава биљке у њеној прецизној класификацији тј. хемотаксономији,
3. примена биљака као извора биолошки активних једињења или као извор структура за модификацију у циљу профилисања и повећања активности.

Имајући у виду горе наведено ова докторска дисертација конципирана је као прилог општих принципа изучавања биљака са циљем да се испита:

- Хемијски састав есенцијалног уља и неполарног екстракта надземног дела биљке *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai са подручја Србије.
- Хемијски састав поларног екстракта надземних делова биљке *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. in Boiss. са подручја Грчке.
- Испитивање антимикуробне активности екстраката испитиваних биљака и компарација са активношћу чистих једињења.
- Класификација биљака унутар рода *Centaurea* и *Origanum* на основу изолованих једињења.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

2.1 Методе изоловања и идентификације активних супстанци из биљног материјала

2.1.1 Методе екстракције

C. rannonica (Heuffel) Simonkai

Биљни материјал: Надземни делови биљке сакупљени су током цветног периода (Септембар, 2008.) у Дивостину (Шумарице, Крагујевац, Централна Србија), 200 – 250 m надморске висине. Ваучер врсте налази се у хербаријуму Института за ботанику, Биолошког факултета, Универзитета Београд. Број ваучера: 16387 (*C. rannonica*). Идентификацију биљног материјала извршила је професор Драгана Муратспахић-Павловић (Природно-математички факултет, Институт за Биологију, Крагујевац, Србија).

Осушени надземни делови (0,61 kg) екстраховани су следећом смешом растварача: циклохексан:етил-етар:метанол 1:1:1; метанол:вода 5:1, сукцесивно, на собној температури. Неполарни екстракт је екстрахован засићеним раствором NaCl; а затим је водена фаза ре-екстрахована са етил-ацетатом (EtOAc). Органска фаза (**Схема 2.1**) подвргнута је даљим испитивањима.

Екстракција есенцијалног уља: За добијање есенцијалног уља коришћена је модификована Claevenongel-ова апаратура. 500 mL H₂O додато је у претходно иситњене надземне делове биљке (70,0 g), есенцијално уље је добијено хидро-дестилацијом након 2 h (Hellenic Pharmacopeia, 2002). Уље је сакупљено у 2 mL *n*-хептана аналитичке чистоће и осушено помоћу безводног натријум-сулфата. Чувано је у фрижидеру на - 4°C до анализе на гасном хроматограму и гасном хроматограму-масеном спектрометру. Принос је изражен као запремина уља добијена од релативне тежине биљног материјала.

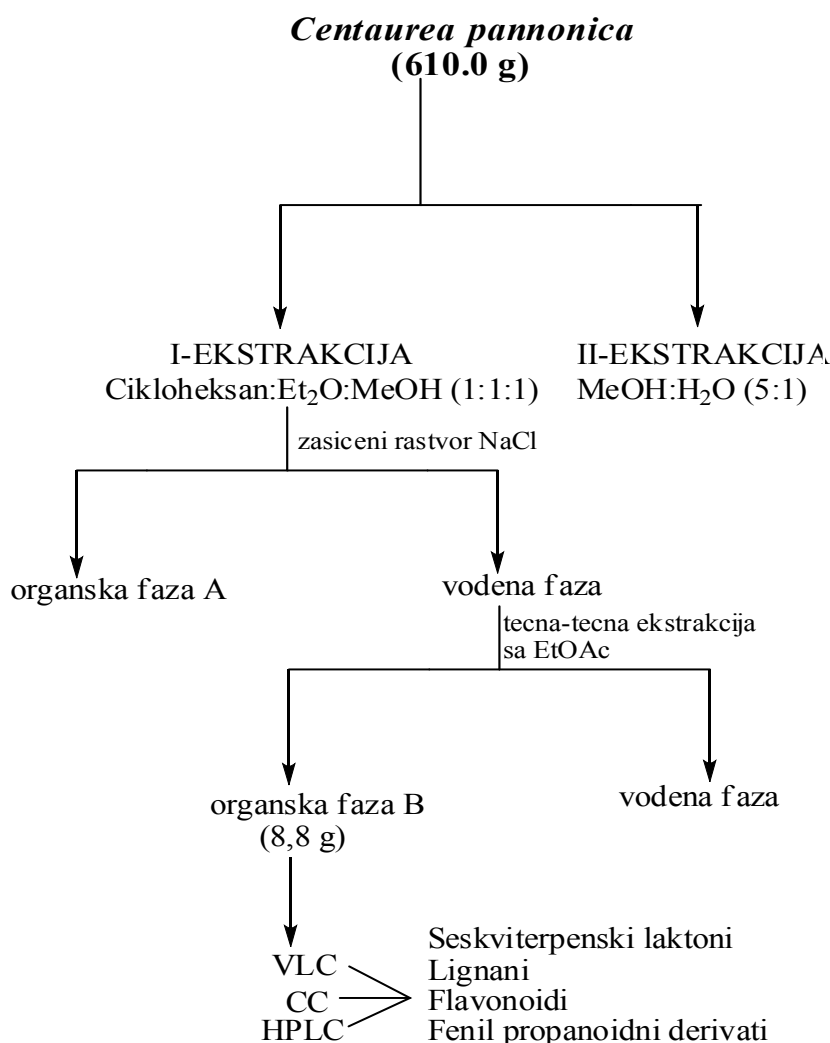


Схема 2.1 Екстракција биљке *C. pannonica*

Origanum scabrum Boiss. & Heldr.

Биљни материјал: Надземни делови биљке сакупљани су на планини Дирфис (острво Евиа, Грчка) током цветног периода, јун 2007. године. Ваучер *Origanum scabrum* са истог локалитета налази се у хербаријуму, Универзитета Патра. (Phitos 3938, UPA).

Осушени надземни делови биљке (0,240 kg) екстраховани су користећи сукцесивну хладну екстракцију помоћу следећих растварача: дихлорметан, метанол, и смеша растварача метанол:вода 5:1.

Добијени су следећи екстракти:

- Дихлорметан (5,7 g): **ORI_A**
- Метанол (9,1 g): **ORI_B**

- Метанол-вода 5:1 (6,8 g): **ORI_C**

Последњи екстракт је изабран за даљу анализу на основу $^1\text{H-NMR}$ спектра и TLC анализе свих наведених екстраката.

Сви екстракти и фракције добијени током процеса изоловања су упаравани на ниским температурама (40°C) на ротационом вакуум упаривачу и чувани у ексикатору који садржи дифосфор-пентоксид, високе чистоће (P_2O_5 , Merck, Art. 540).

2.1.2 Хроматографске методе

Танкослојна хроматографија

За микро-аналитичку танкослојну хроматографију коришћене су:

- алуминијумске плоче прекривене танким слојем силика гела са флуоресцентним индикатором, 20×20 cm, дебљине абсорбенса (стационарне фазе) 0,1 mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5554),
- алуминијумске плоче прекривене танким слојем целулозе без флуоресцентног индикатора, 20×20 cm, дебљине абсорбенса (Merck, Art. 5552).

За препаративну танкослојну хроматографију коришћене су:

- стаклене плоче прекривене силика гелом са флуоресцентним индикатором, 20×20 cm, дебљине абсорбенса 0,25 mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5715),
- стаклене плоче са силика гелом без флуоресцентног индикатора, 20×20 cm, дебљине абсорбенса 0,25 mm (Kieselgel F₂₅₄, Merck, Art. 5721).

Код препаративне танкослојне хроматографије након развијања хроматограма одговарајућом мобилном фазом (смеша растварача), на стакленој плочи, уочава се више трака које представљају различите супстанце. Често је за уочавање трака потребна употреба UV-лампе или прскање једног краја плоче одговарајућим реагенсом. Након обележавања трака оне се стружу са плоча и пребацују у одговарајуће лабораторијске судове. Додатком растварача, најчешће метанола, супстанца се одваја од абсорбенса. Након 24 часа, филтрирањем се уклони абсорбент (силика гел, целулоза) а растварач са супстанцом пренесе у претходно измерен балон. Упаривањем до сува се уклони растварач, а затим се понови мерење да би се утврдила тачна маса супстанце, пре NMR анализе.

Хроматографија на колони

За хроматографију на колони коришћени су следећи абсорбенци:

- силика гел 60Н (Kieselgel 60Н, Merck, Art.7736); с обзиром на малу величину пора силика гела, за бржи проток елуента је коришћен вакуум,
- силика гел 60, 230 – 400 мрежа ASTM, за хроматографију на колони (Kieselgel 60Н, Merck, Art. 9385),
- сефадекс LH-20 (Sephadex LH-20-хидроксипропилен декстран; величина пора 25 – 100 μm) (Pharmacia Fine Chemicals).

Припрема и паковање колоне: Sephadex LH-20 се испоручује као суви прах и пре употребе потребно је активирање. За активирање сефадекса се сједини са елуентом 24 часа пре коришћења. Треба избегавати мешање, магнетном мешалицом јер може доћи до оштећења.

Течна хроматографија под средње јаким притиском (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)

Раздвајање фракција течном хроматографијом под средње јаким притиском извођено је на апарату Büchi који се састоји од пумпе модел C-605 капацитета 250 mL/min и максималног притиска 50 бара. Експеримент је извршен на Büchi стакленој колони 230 x 25 mm, која је пуњена силика гелом 60-реверзна (Merck, Art. 10167)

Течна хроматографија под високим притиском (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Ова техника користи се за изоловање чистих супстанци, или за њихово преишћавање. За хроматографију под високим притиском коришћен је апарат JASCO-HPLC који се састоји од следећих компоненти:

- течна хроматографска пумпа: PU-2080 plus, са колоном Kromasil RP-18 (реверзна фаза, 250 × 10 mm, 10 μm)

- рефрактив индекс детектор: RID-10A, Shimadzu. Софтверски програм Clarity.

Проток растварача: 1,5 – 2,0 mL/min. Концентрација узорка: 5,0 mg/mL; 7,0 mg/mL.

Биљка C. rannonica

Као мобилна фаза код течне хроматографије под високим притиском коришћена је смеша растварача метанол:вода (MeOH:H₂O) у различитим пропорцијама. Свакој сакупљеној фракцији додата је иста запремина zasiћеног раствора NaCl, а затим је вршена екстракција са дихлорметаном (CH₂Cl₂). Добијена органска фаза филтрирана је преко безводног Na₂SO₄ а затим концентрована до сувоте.

Биљка O. scabrum

Као мобилна фаза код течне хроматографије под високим притиском коришћена је смеша: 5 – 15% сирћетна киселина:метанол (AcOH:MeOH) у различитим пропорцијама. Сакупљене фракције директно су упараване до сува под вакумом на умереној температури.

Гасна хроматографија

Анализе су вршене на Perkin Elmer 8500 гасном хроматограму са FID детектором (FID detector), опремљеном са Supelcowax-10 капиларном колоном (топљени силика, 30 m x 0,32 mm I.D.; дебљина слоја: 0,25 µm). Температура колоне је програмирана у опсегу 75 – 250°C са порастом од 2,5°C/min. Температура ињектора и детектора је програмирана на 230°C и 300°C, појединачно. Запремина узорка је 2 µL.

Реагенси коришћени за идентификацију код танкослојне хроматографије**1. Ванилин**

Раствор I: 4% ванилин у метанолу

Раствор II: 4% H₂SO₄ у метанолу

Реагенс се припрема мешањем исте запремине свеже припремљених раствора. Плоче се након прскања загревају неколико минута на температури од 105°C за визуелизацију мрља (тачака).

2. *p*-Анисалдехид/сумпорне киселина

Свеже припремити 0.5 mL *p*-анисалдехид у 50 mL глацијалне сирћетне киселине и 1 mL концентроване сумпорне киселине. Загревати на 105°C до визуелизације мрља.

3. Натустроф реагенс (*Neu's Reagent*)

2-аминоетил естер дифенилборне киселине, 1% раствор у метанолу (Neu, 1957). Плоче испрскане спрејом анализирају се под UV лампом на 366 nm и 254 nm. Различите флуоресцентне боје уочавају се услед формирања комплекса између хидроксилне групе/група флавоноида и реагенса по следећој реакцији:

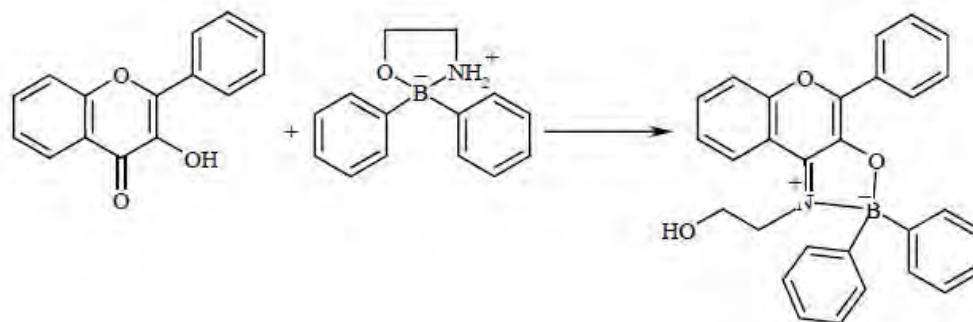


Схема 2.2 Реакција Натустроф реагенс-флавоноид

- Деривати апигенина: жута флуоресценција; на дневном светлу након 24 часа добија се браон-црвена боја,
- Деривати лутеоилна: жута флуоресценција,
- Деривати каемферола: жуто-зелена флуоресценција,
- Деривати кварцетина: из жуте у светло оранџ флуоресценцију.

2.1.3 Спектроскопске методе

Инфрацрвена спектроскопија (IC)

За инфрацрвену спектроскопију коришћен је Perkin-Elmer FT-IR спектрометар Paragon 500; CHCl₃ лабораторијски код A3505E (Lab-Scan Code no. A3505E).

Нуклеарна магнетна резонанца (NMR)

За нуклеарну магнетну спектроскопију коришћени су:

- Спектрометар Bruker AC 200 (200,13 MHz за ¹H-NMR и 50,3 MHz за ¹³C-NMR).

- Спектрометар Bruker Advance 400 (399,95 MHz за $^1\text{H-NMR}$ и 100,58 MHz за $^{13}\text{C-NMR}$).

За снимање спектра коришћени су следећи растварачи:

- CDCl_3 (7,24 ppm за $^1\text{H-NMR}$ и 77,0 ppm за $^{13}\text{C-NMR}$).
- CD_3OD (3,31 ppm за $^1\text{H-NMR}$ и 49,0 ppm за $^{13}\text{C-NMR}$).

Хемијска померања су изражена у δ (ppm) а константа купловања (J) у херцима (Hz).

Следеће 2D технике су коришћене:

- DEPT (Distorsionless Enhancement by Polaritation Transfer),
- COSY (Correlation Spectroscopy),
- HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence),
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation),
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy),
- ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy).

Гасна хроматографија-масена спектроскопија

Анализа састава есенцијалних уља вршена је гасном хроматографијом-масеном спектроскопијом. У раду је коришћен апарат Hewlett-Packard 5973 – 6890 са електројонизатором (70 eV) који се састоји од сплит/сплитлес ињектор (220°C), сплит проток 1/10. Две капиларне колоне су коришћене: неполарна HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, дебљина филма: 0,25 μm); и поларна HP-Innowax (30 m x 0.25 mm, дебљина филма: 0,50 μm). Температура колоне HP-5 MS је програмирана у опсегу од 60°C (5 min) до 280°C са скоком од 4°C/min док је температурни опсег за HP-Innowax колону од 60°C до 260°C са скоком од 3°C/min. Као носећи гас је коришћен хелијум са протоком 1,0 mL/min. Запремина узорка 2 μL .

Идентификација супстанци: Ретенциони индекс за све супстанце је одређен у сагласности са Van den Dool методом (Van den Dool et al., 1963), употребом *n*-алкана (C9-C24) као стандарда. Идентификација супстанци је утврђена упоређивањем њихових масених спектра са спектрима у Wiley Library (Massada, 1976) и оним доступним у литератури (Davies, 1990; Adams, 2007).

Ултразубичаста-видљива спектрофотометрија (UV-Vis)

Спектри су снимани на Shimadzu UV-160 А спектрофотометру. UV-Vis спектри су снимани пре свега у циљу утврђивања структуре флавоноида. Додатком различитих реагенаса а на основу UV-Vis спектра могуће је у потпуности одредити групе и предвидети степен супституције код флавоноида (Mabry et al., 1970).

Масена спектроскопија

Масени спектри снимљени су на апарату Agilent Q-TOF 6540 UHD.

Оптичка ротација

Вредност $[\alpha]_D^{20}$ је одређена на 20°C; $\lambda=589$ nm у *n*-хептану или CHCl_3 (g/100 mL) [Lab-Scan Code no. A3505E) употребом Perkin-Elmer 341 полариметра. Запремина кивете: 1 mL; дужина кивете: 10 cm.

Растварачи

Сви растварачи су дестиловани пре употребе изузев етил-етра (Lab-Scan Code no. A3509E) и метанола (Reag. Ph. Eur, PA-ACS-ISO, 131091.0716).

За RP₁₈ HPLC су коришћени следећи растварачи: HPLC високо пречишћени метанол ([Lab-Scan Code no. C2517]; Scharlau ref. 11-23/25), дејонизована и бидестилована вода и сирћетна киселина. Пре употребе раставарачи су филтрирани помоћу регенерисаног целулозног филтра (Agilent 3150-0576; величина пора 0,45 μm).

2.2 Хроматографско раздвајање екстракта

2.2.1 *C. rannonica*

За сепарацију неполарног екстракта биљке *C. rannonica* (8,53 g) коришћена је вакуум течна хроматографија (VLC., 10,0 cm x 8,0 cm). Као стационарна фаза коришћен је силика гел (Merck, Art. 7736), док је као еуелент коришћена смеша растварача циклохексан, етил-ацетат, ацетон (Me_2CO), метанол и вода.

Табела 2.1 Фракције добијене раздвајањем неполарног екстракта биљке *C. rannonica* VLC методом

1.	PAV-A (0,09 g)	циклохексан 100%
2.	PAV-B (0,37 g)	циклохексан: EtOAc 75:25
3.	PAV-C (0,56 g)	циклохексан: EtOAc 50:50
4.	PAV-D (1,24 g)	циклохексан: EtOAc 25:75
5.	PAV-E (0,99 g)	EtOAc 100%
6.	PAV-F (0,59 g)	EtOAc: Me ₂ CO 90:10
7.	PAV-G (0,11 g)	EtOAc: Me ₂ CO 75: 25
8.	PAV-H (0,29 g)	Me ₂ CO 100%
9.	PAV-I (1,74 g)	Me ₂ CO:MeOH 50:50
10.	PAV-J (0,48 g)	MeOH 100%
11.	PAV-K (0,23g)	MeOH:H ₂ O 50:50

Добијено је једанаест фракција (Табела 2.1). Урађена је танкослојна хроматографија на силика гелу (Merck, Art. 5554), за визуелизацију мрља коришћен је *p*-анизалдехид:сумпорна киселина реагенс. На основу TLC анализе у комбинацији са ¹H-NMR спектрима фракција, следеће фракције су изабране за даљу анализу: PAV-C, PAV-D, PAV-E, PAV-F, PAV-G, PAV-I, PAV-J, PAV-K. Протон спектри фракција PAV-A, PAV-B и PAV-C су показали да не садрже супстанце од значаја за даље истраживање, док је ¹H-NMR спектар фракције PAV-H био готово идентичан фракцији PAV-G, због тога није даље вршено испитивање.

Фракција PAV-D (1.24 g)

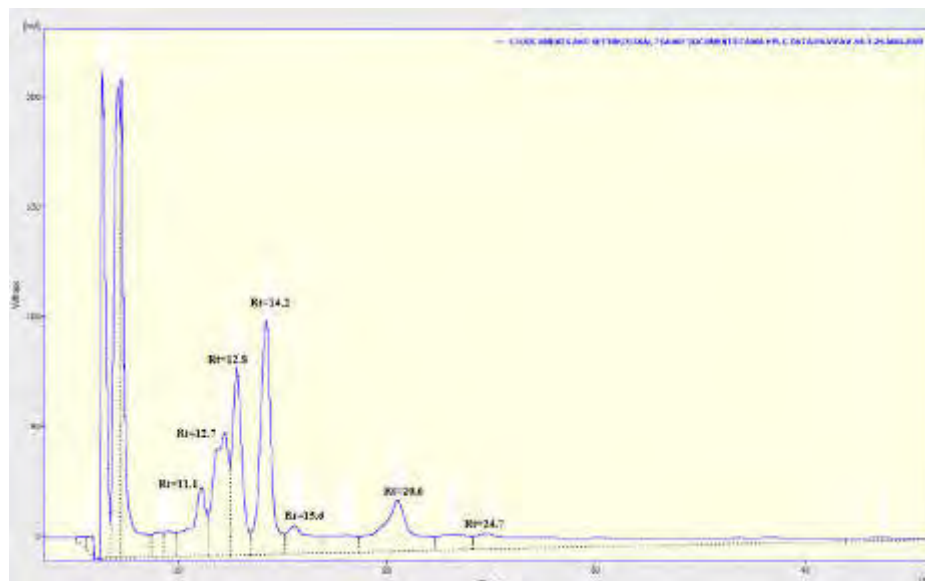
Фракција је раздвојена вакуум течноом хроматографијом (VLC, 10,0 cm x 8,0 cm), а као стационарна фаза коришћен је силика гел (Merck, Art. 7736), док је као елуент коришћена смеша растварача дихлорметан:метанол:вода уз пораст поларности. Добијено је осам фракција: PAV-DA (1; 16,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 100:0:0-95:5:0,5}, PAV-DB (2; 19,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 90:10:1}, PAV-DC (3; 1009,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 85:15:1,5}, PAV-DD (4; 21,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2}, PAV-DE (5; 20,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3}, PAV-DF (6; 11,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5}, PAV-DG (7; 10,3 mg), {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 30:70:7}, PAV-DH (8; 8,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O

0:100:0}. Након аналитичке TLC фракције PAV-DD и PAV-DE су сједињене у PAV-DD' (37,6 mg).

Суб-фракција **PAV-DD' (37,6 mg)** је аплицирана у облику танких линија на плоче препаративне TLC са силика гелом (Merck, Art. 5721); као елуент коришћена је смеша растварача CH₂Cl₂:Me₂CO:HCOOH 9:2:1. Фракције су истругане са плоче при чему је сакупљено пет фракција. PAV-DD'A (10,7 mg); PAV-DD'B (6,1 mg); PAV-DD'C (9,3 mg); PAV-DD'D (3,7 mg); PAV-DD'E (2,4 mg). Фракција PAV-DD'C је идентификована као супстанца **21 (хиспидулин)**.

Вакуум течна хроматографија (VLC, 10,0 cm x 8,0 cm) на силика гелу (Merck, Art. 7736) је коришћена за раздвајање суб-фракције **PAV-DC (1009,6 mg)**. Фракција је елуирана CH₂Cl₂:MeOH смешом са порастом поларности. Четрнаест фракција је сакупљено: PAV-DCA (1; 11,2 mg) {циклохексан 100%}, PAV-DCB (2; 3,7 mg) {CH₂Cl₂ 100%}, PAV-DCC (3; 9,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 99:1}, PAV-DCD (4; 6,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 98:2}, PAV-DCE (5; 6,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3}, PAV-DCF (6; 7,0 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 96:4}, PAV-DCG (7; 29,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 95:5}, **PAV-DCH (8; 101,9 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 93:7}**, **PAV-DCI (9; 670,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 90:10}**, PAV-DCJ (10; 143,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 87:13}, **PAV-DCK (11; 35,9 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 84:16}**, PAV-DCL (12; 16,0 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 80:20}, PAV-DCM (13; 12,9 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 50:50}, PAV-DCN (14; 27,4 mg) {MeOH 100%}. Након ТЛС анализе фракције **PAV-DCH, PAV-DCI, PAV-DCK** су подвргнуте даљем истраживању.

Суб-фракција **PAV-DCH (101,9 mg)** је раздвојена течном хроматографијом под високим притиском (RP₁₈-HPLC). Смеша MeOH:H₂O 2:1 (PAV-H₅) је коришћена као елуент; проток 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Следеће супстанце су изоловане: **15 (метересинол)** (Rt=11,1 min, 2,3 mg), **25 (6-метоксикаемферол)** (Rt=12,7 min, 2,1 mg), **(2 и 3) (хлорохисопифолин Ц и репин)** (Rt=12,8 min, 13,8 mg), **16 (арктигенин)** (Rt=14,2 min, 16,3 mg), **14 (2α-хидрокси, 8-дехидрокси 15-О-метакрилат салонитенолид)** (Rt=15,6 min, 3,1 mg), **20 (диосметин)** (Rt=20,6 min, 3,3 mg), **5 (19-деоксијанерин)** (Rt=24,7 min, 1,5 mg).



Слика 2.1 HPLC хроматограм суб-фракције **PAV-DCH**

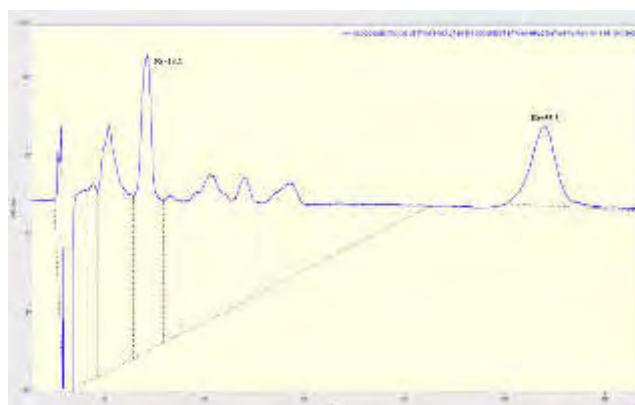
Суб-фракција **PAV-DCI (670,7 mg)** је раздвојена помоћу хроматографије на колони **CC (12,0 cm x 3,5 cm)**. Коришћен је силика гел (Merck, Art. 9385) као стационарна фаза док је смеша растварача циклохексан:дихлорметан:метанол растуће поларности коришћена као елуент. Добијене су 42 фракције, **и оне су** регруписане након TLC анализе: **PAV-DCIA (1→13; 6,7 mg)** {циклохексан 100% -CH₂Cl₂:MeOH 95:5}, **PAV-DCIB (14→19; 480,8 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 94,5:5,5}, **PAV-DCIC (20→23; 123,8 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 94,5:5,5}, **PAV-DCID (24→26; 13,1 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 94,5:5,5}, **PAV-DCIE (27→28; 11,2 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 94:6}, **PAV-DCIF (29; 3,1 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 94:6}, **PAV-DCIG (30→35; 7,0 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 90:10}, **PAV-DCIH (36→41; 2,5 mg)** {CH₂Cl₂:MeOH 80:20}, **PAV-DCIO (42; 6,6 mg)** {MeOH 100%}.

Хроматографијом на колони **CC (9,0 cm x 2,5 cm)** је раздвојена и суб-фракција **PAV-DCIB (480,8 mg)**. Силика гел (Merck, Art. 9385) је коришћен као стационарна фаза, док је као елуент коришћена смеша растварача циклохексан:дихлорметан:етил-ацетат:метанол растуће поларности. Сакупљено је 60 фракција и након TLC анализе регруписано у следеће суб-фракције: **PAV-DCIBA (1→7; 5,2 mg)** {циклохексан 100%-CH₂Cl₂:EtOAc 99:1}, **PAV-DCIBB (8→9; 5,6 mg)** {CH₂Cl₂:EtOAc 99:1}, **PAV-DCIBC (10; 11,4 mg)** {CH₂Cl₂:EtOAc 99:1}, **PAV-DCIBD (11→15; 14,5 mg)** {CH₂Cl₂:EtOAc 99:1-98:2}, **PAV-DCIBE**

(16→17; 10,8 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 98:2-97:3}, PAV-DCIBF (18→33; 25,1 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 97:3-90-10}, PAV-DCIBG (34; 6,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 90:10}, PAV-DCIBH (35→39; 60,6 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 80:20} PAV-DCIBI (40; 14,1 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 70:30} PAV-DCIBJ (41→43; 129,3 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 70:30}, **PAV-DCIBK** (44; 17,8 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 60:40}, PAV-DCIBL (45; 18,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 60:40}, PAV-DCIBM (46→51; 25,1 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 60:40-40:60}, PAV-DCIBN (52→60; 2,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 20:80-EtOAc-MeOH 50:50}. Фракција PAV-DCIBK је идентификована као супстанца **2** (хлорохисопифолин Ц).

Суб-фракција **PAV-DCIC (123,7 mg)** је раздвојена хроматографијом на колони СС (20,0 cm x 2,5 cm) Sephadex LH-20 као стационарном фазом. Као елуент је коришћена смеша MeOH:CH₂Cl₂ 80:20. Добијено је 26 фракција. На основу аналитичке TLC анализе, фракције 22-24 су спојене (PAV-DCIK', 1,7 mg) и идентификоване као супстанца **19** (апигенин).

За раздвајање суб-фракције **PAV_DCK (33,6 mg)** коришћена је течна хроматографија под високим притиском са колоном обрнутих фаза (RP₁₈-HPLC). Као елуент је коришћена смеша MeOH:H₂O 4:3 (PAV-H₄); проток 1,5 mL/min; концентрација узорка 5,0 mg/mL. Добијене су супстанце: **7** (цебелин Ј) (Rt=14,2 min, 1,5 mg) и **21** (хиспидулин) (Rt=53,3 min, 2,3 mg).



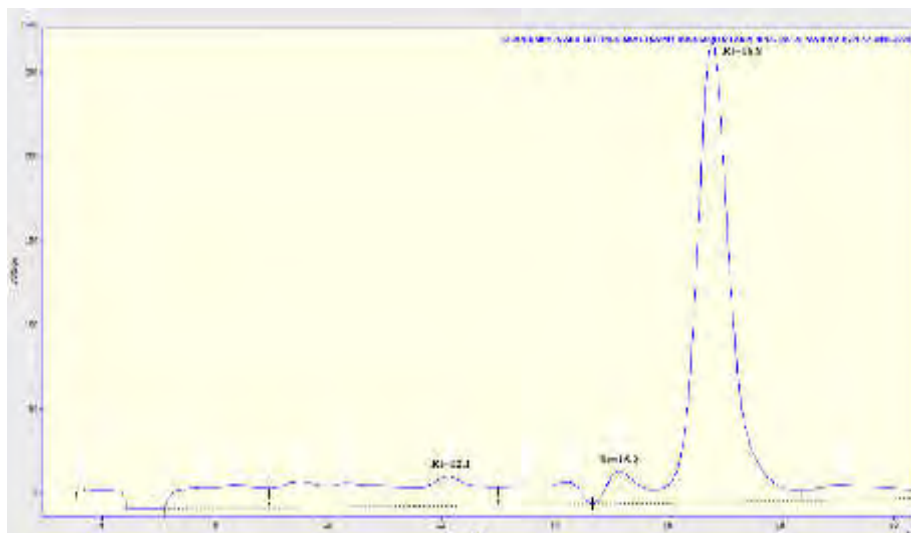
Слика 2.2 HPLC хроматограм суб-фракције PAV-DCK

Фракција PAV-E (995,3 mg)

Фракција је раздвојена хроматографијом на колони СС (15,0 cm x 3,0 cm) са силика гелом као стационарном фазом (Merck, Art. 9385). Као мобилна фаза коришћена је смеша растварача циклохексан:дихлорметан:етил-ацетат:метанол са порастом поларности. 137 фракција запремине од 10-30 mL је сакупљено и регруписано у сагласности са TLC резултатима: PAV-EA (1; 35,9 mg) {циклохексан 100%}, PAV-EB (2→5; 4,7 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 100:0-99:1}, PAV-EC (6→13; 1,3 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 97:3-95:5}, PAV-ED (14→15; 0,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 95:5}, PAV-EE (16→18; 1,1 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 95:5-90:10}, PAV-EF (19→24; 1,7 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 90:10}, PAV-EG (25→36; 4,3 mg), {CH₂Cl₂:EtOAc 80:20-70:30}, PAV-EH (37→44; 17,7 mg) (CH₂Cl₂:EtOAc 70:30-60:40}, PAV-EI (45→47; 8,2 mg){CH₂Cl₂:EtOAc 60:40}, PAV-EJ (48→54; 44,9 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 60:40-50:50}, PAV-EK (55→58; 39,6 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 50:50}, PAV-EL (59→62; 70,4 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 50:50}, PAV-EM (63→66; 108,1 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 40:60}, **PAV-EN** (67→69; 95,2 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 40:60}, PAV-EO (70→72; 69,9 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 40:60}, PAV-EP (73; 11,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 30:70}, PAV-EQ (74-75; 28,8 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 30:70}, PAV-ER (75-82; 75,3 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 30:70-20:80}, PAV-ES (83; 5,5 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 20:80}, PAV-ET (84-85; 17,0 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 20:80}, PAV-EU (86-91; 53,3 mg){CH₂Cl₂:EtOAc 20:80}, **PAV-EV** (92-99; 80,0 mg) {CH₂Cl₂:EtOAc 0:100}, PAV-EW (100; 9,0 mg) {EtOAc:MeOH 90:10}, PAV-EX (101-103; 9,6 mg){EtOAc:MeOH 90:10}, PAV-EY (104-106; 7,4 mg) {EtOAc:MeOH 90:10}, PAV-EZ (107-109; 17,5 mg) {EtOAc:MeOH 90:10-80:20}, PAV-EZ₁ (110-111; 30,1 mg) {EtOAc:MeOH 80:20}, PAV-EZ₂ (112-116; 8 mg) {EtOAc:MeOH 80:20}, PAV-EZ₃ (117-123; 5,8 mg) {EtOAc:MeOH 70:30}, PAV-EZ₄ (124-137; 40,5 mg) {EtOAc:MeOH 70:30-0:100}.

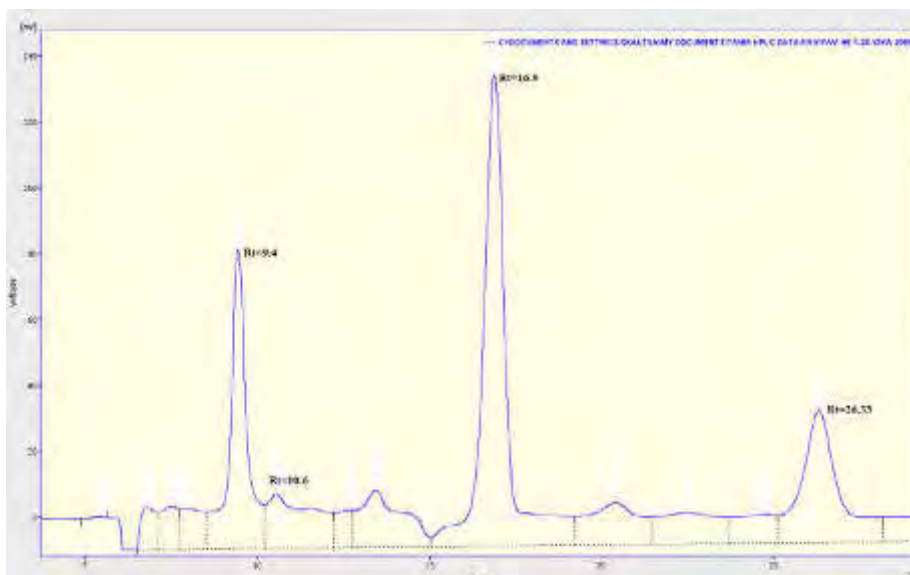
Суб-фракција PAV-ES (5,5 mg) је идентификована као супстанца **4 (јанерин)**.

Суб-фракција **PAV-EN (95,2 mg)** раздвојена је течном хроматографијом под високим притиском. Елуент MeOH:H₂O 2:1 (PAV-H₂); проток 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Следеће супстанце су изоловане: **8 (рапосерин)** (Rt=12,1 min, 1,2 mg), **2 (хлорохисопифолин II)** (Rt=5,2 min, 2,9 mg), **10 (хлорорептиолид)** (Rt=16,8 min, 30,5 mg).



Слика 2.3 HPLC хроматограм суб-фракције PAV-EN

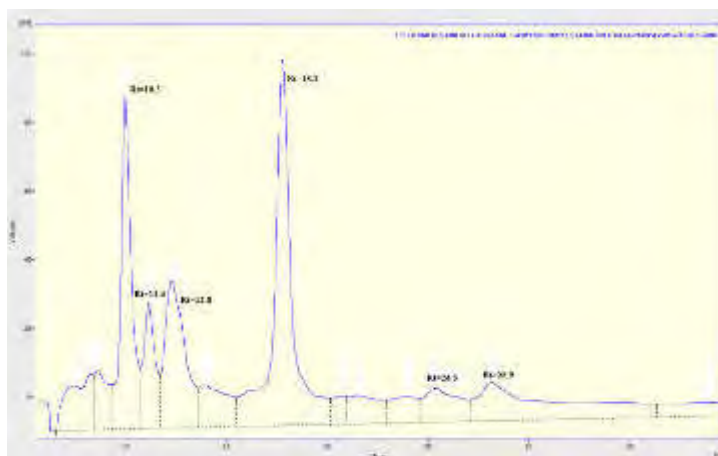
Суб-фракција PAV-EV (80,0 mg) је такође раздвојена HPLC обрнутих фаза. Као елуент коришћен је MeOH:H₂O 3:2 (PAV-H₆); проток 2,0 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Изоловане су следеће супстанце: **1 (бабилин А)** (Rt=9,4 min, 5,4 mg), **9 (2α, 8α-дихидрокси-дехидрокостус лактон)** (Rt= 10,6 min, 1,1 mg), **12 (епоксирепдиолид)** (Rt=16,9 min, 18,7 mg), **13 (репдиолид)** (Rt=26,3 min, 6,3 mg).



Слика 2.4 HPLC хроматограм суб-фракције PAV-EV

Фракција PAV-F (594,4 mg)

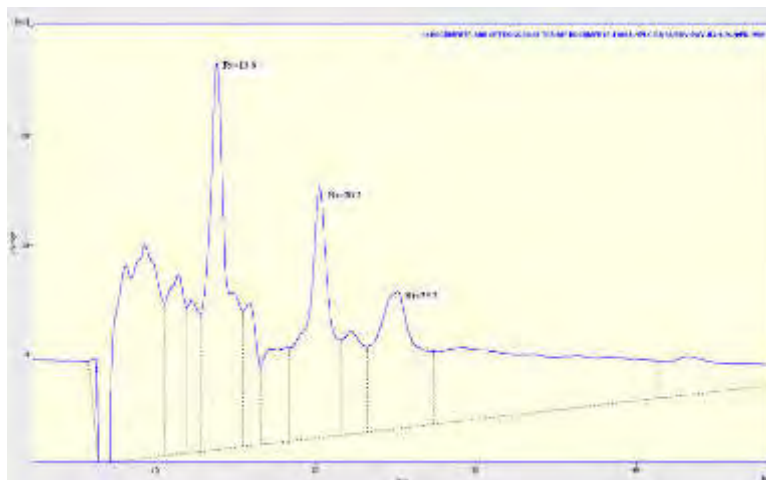
Део фракције (100,5 mg) раздвојен је течном хроматографијом под високим притиском. Као елуент коришћена је смеша MeOH:H₂O 3:2 (PAV-H₁); проток елуента 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Шест супстанци је изоловано и идентификовано: **1 (бабилин А)** (Rt=10,3 min, 9,0 mg); **9 (2α, 8α-дихидрокси-дехидрокостус лактон)** (Rt=11,4 min, 2,6 mg); **7 (цебелин Ј)** (Rt=12,8 min, 0,9 mg); **12 (епоксирепдиолид)** (Rt=18,2 min, 15,6 mg), **22 (непетин)** (Rt=26,5 min, 2,1 mg), **13 (репдиолид)** (Rt=28,9 min, 1,9 mg).



Слика 2.5 HPLC хроматограм суб-фракције PAV-F

Фракција PAV-G (109, 5 mg)

Течна хроматографија под високим притиском је коришћена за раздвајање фракције. Смеша MeOH:H₂O 9:11 је коришћена као елуент (PAV-H₃); проток растварача је 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Следеће супстанце су изоловане: **7 (цебелин Ј)** (Rt=13,8 min, 6,2 mg), **11 (панонин)** (Rt= 20,2 min, 4,3 mg), **6 (бабилин Б)** (Rt=25,2 min, 1,2 mg).

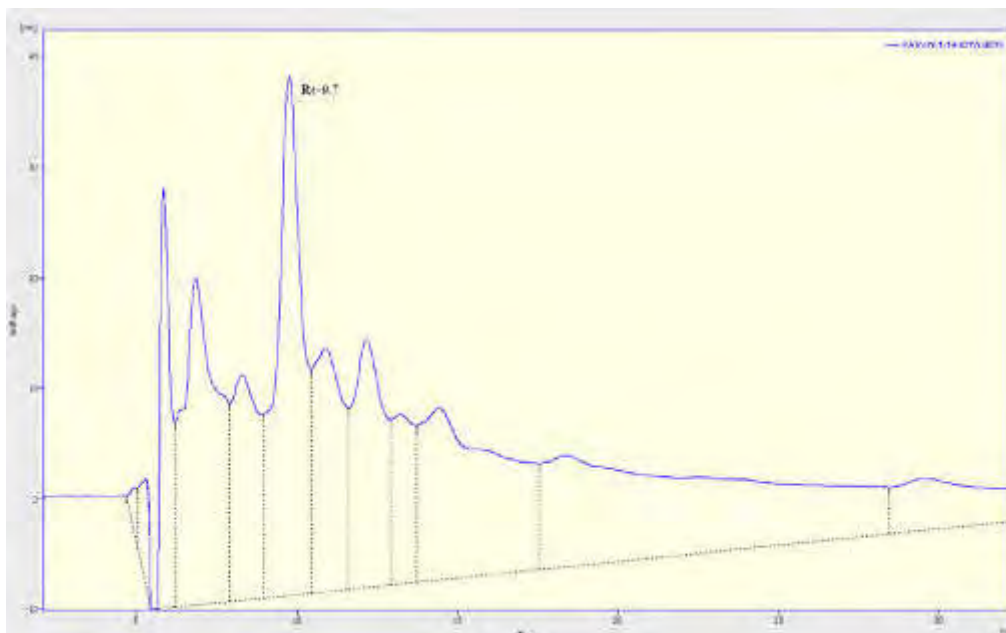


Слика 2.6 HPLC хроматограм суб-фракције PAV-G

Фракција PAV-I (1,7483 g)

За раздвајање фракције коришћена је вакуум течна хроматографија (VLC, 10,0 cm x 8,0 cm) на силика гелу (Merck, Art. 7736). Смеша CH₂Cl₂:MeOH са порастом поларности коришћена је као елуент. 12 фракција је сакупљено и оне су помоћу TLC регруписане на следећи начин: PAV-IA' (1; 11,1 mg) {циклохексан 100% - CH₂Cl₂:MeOH 99:1}, PAV-IB' (2; 52,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3-90:10}, PAV-IC' (3; 142,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 85:15}, PAV-ID' (4; 497,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 80:20-70-30}, PAV-IE' (5; 486,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 50:50-MeOH 100%}, PAV-IF' (6; 159,3 mg) {MeOH:H₂O 50:50}.

Суб-фракција PAV-IB' (52,5 mg) је раздвојена помоћу RP₁₈-HPLC са мешом MeOH:H₂O 3:2 (PAV-H₉) као елуентом; проток растварача 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Супстанца **17 (арктин)** (Rt=10,3 min, 9,0 mg) је изолована и идентификована.



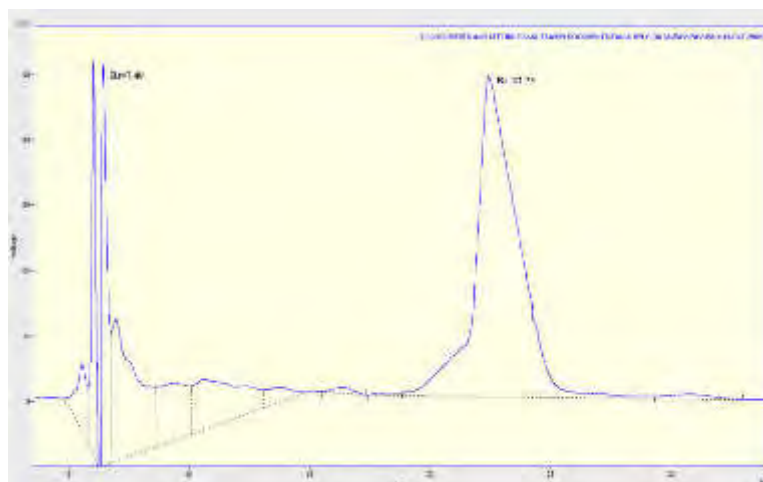
Слика 2.7 HPLC хроматограм суб-фракције **PAV-IB'**

Фракција **PAV-J** (233,9 mg)

Фракција је раздвојена на колони СС (15,0 cm x 2,5 cm). Силика гел је коришћен као стационарна фаза (Merck, Art. 9385), док је као елуент коришћена смеша растварача растуће поларности. Сакупљено је 92 фракције, које су на основу аналитичке TLC регруписане: PAV-JA (1→8; 5,4 mg) {циклохексан 100%-CH₂Cl₂:MeOH 95:5}, PAV-JB (9→12; 7,2 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 95:5-93:7}, PAV-JC (13→15; 2,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3}, **PAV-JD** (16→18; 7,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3}, PAV-JE (19→22; 4,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 90:10}, PAV-JF (23→25; 23,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 90:10}, PAV-JG (26→27; 12,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 90:10}, PAV-JH (28→30; 7,5 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 87:13}, PAV-JI (31; 2,3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 87:13}, PAV-JJ (32; 9,0 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 87:13}, **PAV-JK** (33→38; 56,3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 87:13-85:15}, PAV-JL (39→55; 150,9 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 85:15-70:30}, **PAV-JM** (56→59; 18,9 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 70:30}, PAV-JN (60→63; 61,2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 60:40}, PAV-JO (64→67; 33,2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 50:50}, **PAV-JP** (68; 1,7 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 50:50}, **PAV-JQ** (69; 2,2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 50:50}, **PAV-JR** (70→77; 11,9 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 30:70}, PAV-JS (78→81; 7,2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 30:70-20:80}, PAV-JT (82→90; 6,3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 20:80-10:90}, PAV-JU (91→92; 56,2 mg) {MeOH 100%-MeOH:H₂O 50:50}.

Суб-фракције PAV-JP, PAV-JQ, PAV-JR су груписане у **PAV-JP'** (**13,5 mg**), која је идентификована као супстанца **24 (непетин-7-O- β -D-глюкопиранозид)**, док је **PAV-JD** идентификована као **22 (непетин)**.

Суб-фракција **PAV-JK (56,3 mg)** раздвојена је употребом течне хроматографије под високим притиском RP₁₈-HPLC. MeOH:H₂O у односу 1:1 (PAV-H₈) коришћен је као растварач; проток растварача 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Супстанце **18 (сирингин)** (Rt=7,4 min, 1,2 mg) и **23 (хиспидулин 7-O- β -D-глюкопиранозид)** (Rt=22,7 min, 11,8 mg) изоловане су и идентификоване.



Слика 2.8 HPLC хроматограм суб-фракције **PAV-К**

Фракција PAV-K (233,9 mg)

За раздвајање фракције коришћена је хроматографија на колони СС (15,0 cm x 3,0 cm) са силика гелом (Merck, Art. 9385) као стационарном фазом и мешом растварача растуће поларности. 112 фракција је сакупљено, запремине 10-30 мил, које су на основу аналитичке TLC анализе регруписане: PAV-КА (1; 0,4 mg) {циклохексан 100%}, PAV-КВ (2→4; 1,1 mg) {CH₂Cl₂ 100%}, PAV-КС (5→12; 2,0 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3}, PAV-КД (13→14; 1,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 97:3}, PAV-КЕ (15→19; 1,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 95:5}, PAV-КФ (20→21; 1,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 95:5}, PAV-КГ (22→30; 4,4 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5-90:10}, PAV-КН (31→32; 2,1 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5}, PAV-КИ (33→34; 3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 90:10}, PAV-КЈ (35→40; 15,6 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 90:10}, PAV-КК (41→42; 3,0 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5}, **PAV-КЛ** (43→44; 3,6 mg)

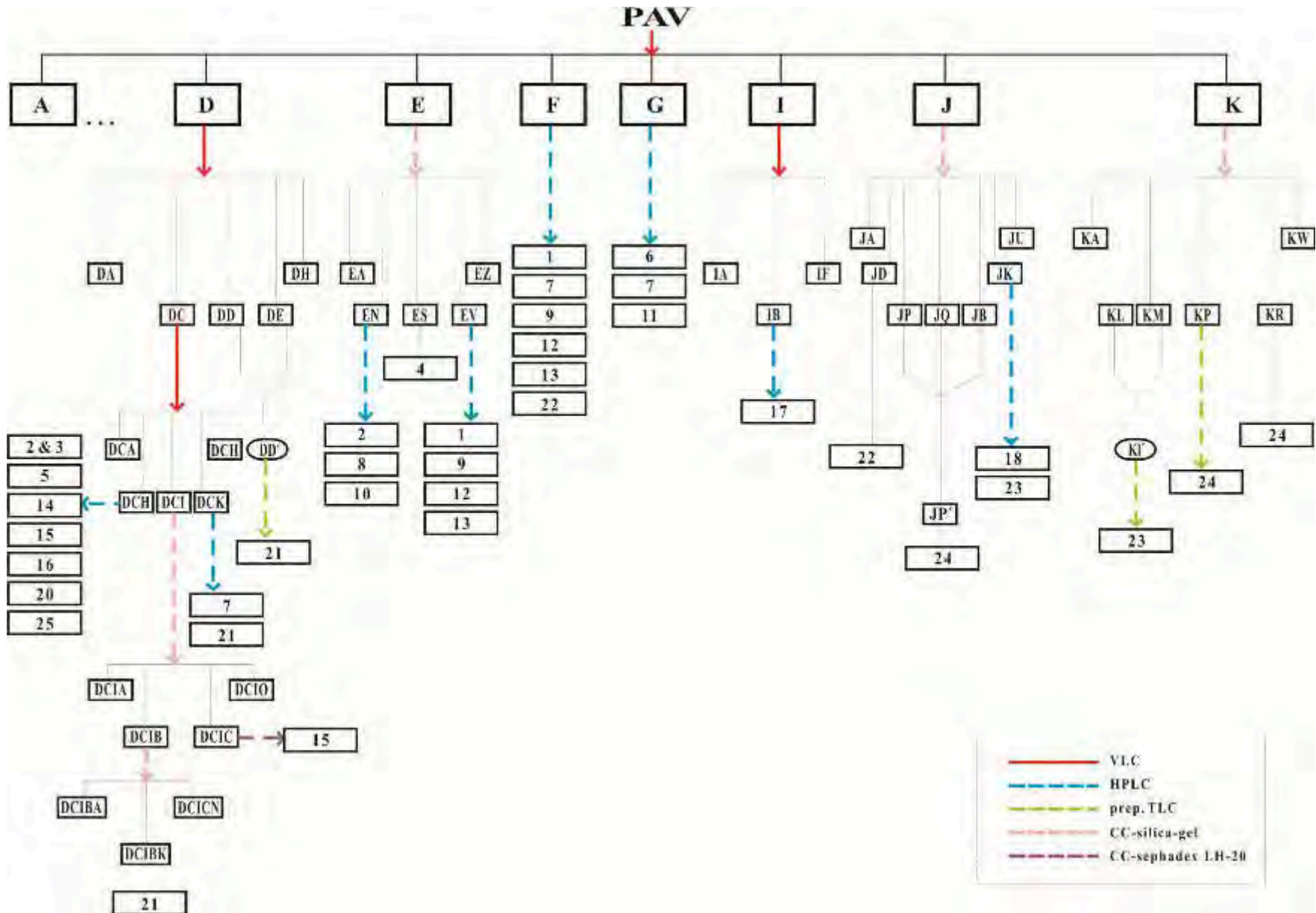
{CH₂Cl₂:MeOH 85:15}, **PAV-KM** (45→46; 5,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 85:15}, PAV-KN (47→51; 9,7 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 85:15}, PAV-KN' (52→54; 4,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 85:15}, PAV-KO (55→57; 3,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 85:15-80:20}, **PAV-KP** (58→69; 8,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 80:20}, PAV-KQ (70→76; 8,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 70:30}, **PAV-KR** (77→83; 4,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 70:30-50:50}, PAV-KS (84→88; 5,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 50:50}, PAV-KT (89→103; 10,0 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 50:50-30:70}, PAV-KU (104→103-6; 4,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 30:70-20:80}, PAV-KV (107-109; 3,0 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 20:80}, PAV-KW (110; 0,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 20:80}, PAV-KX (111; 0,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH 20:80}, PAV-KY (112; 10,1 mg) {MeOH 100% }.

PAV-KR (5,5 mg) је идентификована као супстанца **24 (непетин-7-О-β-D-глукопиранозид)**.

За раздвајање суб-фракција **PAV-KP (8,1 mg)** коришћена је препаративна TLC хроматографија на танком слоју целулозе (Merck, Art. 5716). Екстракт је нанесен као танка линија на TLC плоче а као елуент је коришћен 30% раствор сирћетне киселине. Добијене линије су истругане са плоча и четири фракције је сакупљено: **PAV-KPA** (3,2 mg); **PAV-KPB** (1,0 mg); **PAV-KPC** (1,1 mg); **PAV-KPD** (0,8 mg). **PAV-KPA** је идентификована као супстанца **24 (непетин-7-О-β-D-глукопиранозид)**.

На основу аналитичке TLC, суб-фракције PAV-KL и PAV-KM су груписане као **PAV-KL' (37,6 mg)**, која је аплицирана на плоче препаративне TLC које садрже целулозу као стационарну фазу (Merck, Art. 5716) под условима већ описаним у претходном пасусу. Четири линије је истругано са плоча: PAV-KL'A (10,7 mg); **PAV-KL'B** (6,1 mg); PAV-KL'C (9,3 mg); PAV-KL'D (3,7 mg). Линија **PAV-KL'B** је идентификована као супстанца **23 (хиспидулин 7-О-β-D-глукопиранозид)**.

Схема 2.3 Хроматографско раздвајање неполарног екстракта биљке *C. rannonica*



2.2.2 *O. scabrum*

Поларни осушени екстракт (MeOH:H₂O 5:1; **ORI-C**) биљке *O. scabrum* (6,8 g) је раздвојен вакуум течном хроматографијом (VLC, 10,0 cm x 8,0 cm) на силика гелу (Merck, Art. 7736). Као елуент коришћена је следећа смеша раставарача: дихлорметан, метанол и вода.

Табела 2.2 Фракције добијене раздвајањем неполарног екстракта биљке *O. scabrum* VLC методом

1.	ORI-CA (0,04 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 97:3:0.3
2.	ORI-CB (0,05 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 95:5:0.5
3.	ORI-CC (0,16 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 90:10:1.0
4.	ORI-CD (0,07 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 80:20:2.0
5.	ORI-CE (0,63 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 70:30:3.0
6.	ORI-CF (1,50 g)	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O 50:50:5.0
7.	ORI-CG (2,29 g)	MeOH 100%
8.	ORI-CH (1,01 g)	MeOH: H ₂ O 80:20
9.	ORI-CI (0,35 g)	MeOH: H ₂ O 50:50
10.	ORI-CJ (0,17 g)	MeOH: H ₂ O 20:80

У **Табели 2.2** приказане су раздвојене фракције које су груписане након аналитичке танкослојне хроматографије на силика гелу (Merck, Art. 5554), употребом ванилина као реагенса за визуелизацију мрља. На основу добијених резултата следеће фракције су изабране за даљу анализу: ORI-CB, ORI-CC, ORI-CD, ORI-CE, ORI-CF, при чему су фракције ORI-CB, ORI-CC уједињене као ORI-CB'.

Фракција ORI-CB' (213,6 mg)

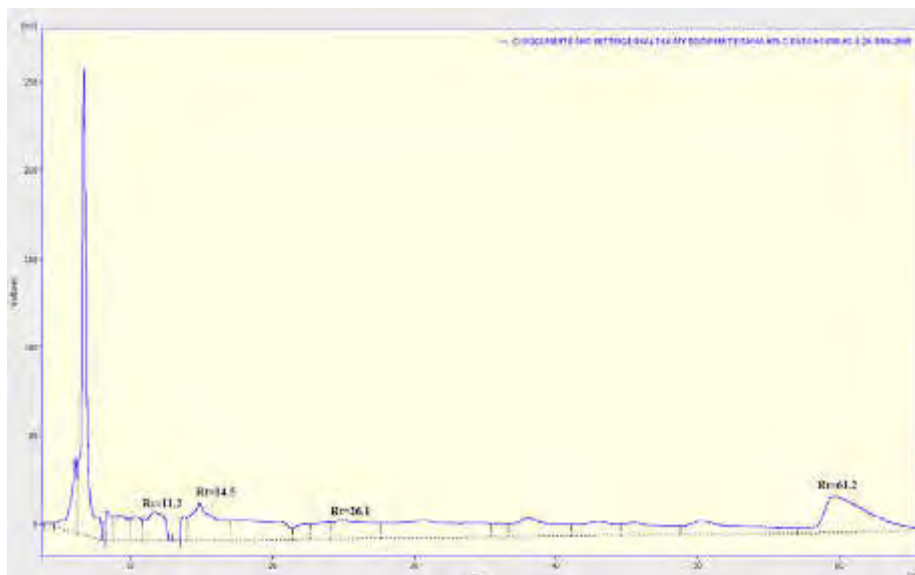
За раздвајање фракције је коришћена хроматографија на колони CC (20,0 cm x 2,5 cm) употребом Sephadex LH-20. Као елуент је коришћена смеша MeOH:CH₂Cl₂ 90:10. 41 суб-фракција од 30 mL је сакупљено и на основу аналитичке TLC, фракције су рекомбиноване у основних девет суб-фракција: ORI-

CB'A-ORI-CB'K. Суб-фракције **ORI-CB'G** (1,6 mg) и **ORI-CB'H** (1,5 mg) су идентификоване као супстанца **26** (рузмаринска киселина).

Фракција ORI-CE (631,3 mg)

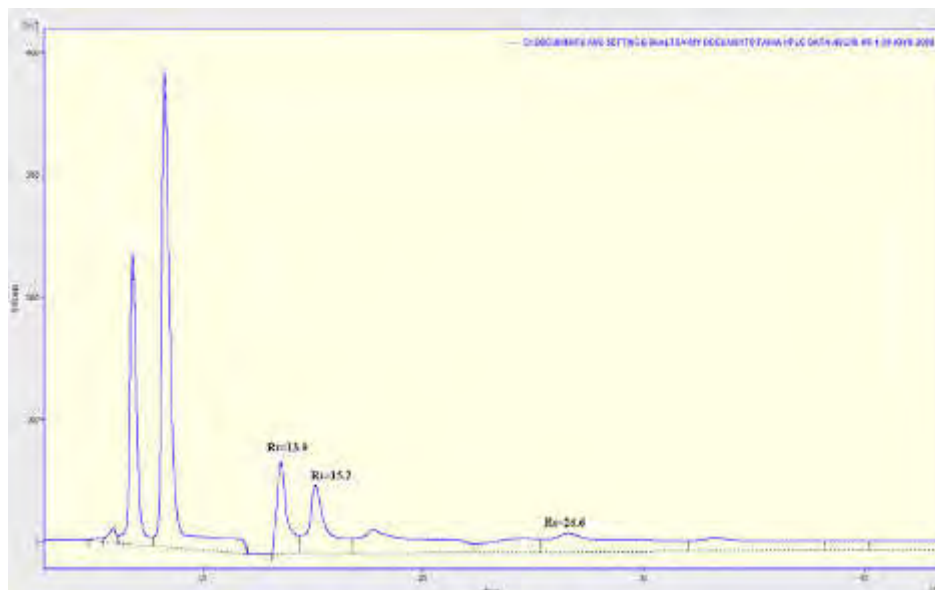
Хроматографијом на колони СС (10,0 cm x 3,0 cm) раздвојена је фракција ORI-CE (631,3 mg). Силика гел (Merck, Art. 9385) је коришћен као стационарна фаза док је као елуент коришћена смеша растварача CH₂Cl₂:MeOH:H₂O растуће поларности. 109 фракција је сакупљено, и оне су на основу аналитичке TLC регруписане: ORI-CEA (1→4; 1,6 mg) {циклохексан 100%-CH₂Cl₂ 100%}, ORI-CEB (5→8; 0,5 mg) {CH₂Cl₂ 100%-CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 98:2:0,2}, ORI-CEC (9→18; 0,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 98:2:0,2-95:5:0,5}, ORI-CED (19→29; 5,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 95:5:0,5-90:10:1,0}, ORI-CEE (30→35; 3,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 85:15:1,5}, ORI-CEF (36→45; 22,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 85:15:1,5-80:20:2,0}, ORI-CEG (46→47; 16,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2,0}, ORI-CEH (48→52; 173,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2,0}, **ORI-CEI** (53→60; 82,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3,0}, **ORI-CEJ** (61→67; 84,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3,0-60:40:4,0}, ORI-CEK (68→73; 40,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 60:40:4,0}, ORI-CEL (74→76; 40,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 60:40:4,0-50:50:5,0}, ORI-CEM (77→78; 0,9 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 40:60:6,0}, ORI-CEN (79→109; 5,2 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 40:60:6,0-MeOH 100%}.

Суб-фракција **ORI-CEJ (84,5 mg)** је раздвојена течном хроматографијом под високим притиском обрнутих фаза RP₁₈-HPLC. Као елуент је коришћена смеша MeOH:AcOH (5%) 35:65 (ORI-H₃); проток растварача 1,5 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/ml. Следеће супстанце су изоловане: **30 (12-О-хидрокси јасмонична киселина)** (Rt=11,2 min, 2,5 mg), **31 (12-О-хидроксијасмонична киселина 12-О-β-глукопиранозид)** (Rt=14,5 min, 4,3 mg), **33 (тимохинол-2-О-β-глукопиранозид)** (Rt=26,1 min, 1,1 mg), и **26 (рузмаринска киселина)** (Rt=61,2 min, 8,5 mg).



Слика 2.9 HPLC хроматограм суб-фракције **ORI-CEJ**

Суб-фракција **ORI-CEI (82,6 mg)** је раздвојена помоћу RP₁₈-HPLC. Као елуент је коришћена смеша MeOH:AcOH (5%) 35:65 (ORI-H₅); проток растварача 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Супстанце **31 (12-O-хидроксијасмонићна киселина 12-O-β-гликопиранозид)** (Rt=13,9 min, 10,1 mg), **32 (тимохинол-5-O-β-глукопиранозид)** (Rt=15,2 min, 9,2 mg), и лигнан **29 (глочидиобозид)** (Rt=26,6 min, 2,8 mg), су изоловане.



Слика 2.10 HPLC хроматограм суб-фракције **ORI-CEI**

Фракција ORI-CF (1504, 8 mg)

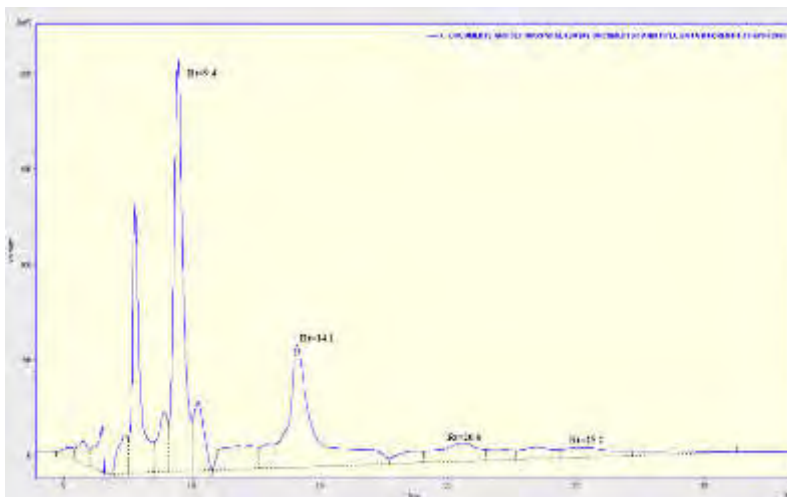
Фракција је раздвојена употребом вакуум течне хроматографије (VLC, 10,0 cm x 8,0 cm) са силика гелом (Merck, Art. 7736) као стационарном фазом. Смеша CH₂Cl₂:MeOH:H₂O са растућом поларношћу коришћена је као елуент и 9 фракција је сакупљено: ORI-CFA (1; 5,2 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 97:3:0,3}, ORI-CFB (2; 1,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 95:5:0,5}, ORI-CFC (3; 6,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 90:10:1,0}, **ORI-CFD** (4; 128,6 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 85:15:1,5}, **ORI-CFE** (5; 52,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2,0}, **ORI-CFF** (6; 142,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3,0}, ORI-CG (7; 88,4 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5,0}, ORI-CH (8; 50,2 mg) {MeOH 100%}, ORI-CI (9; 70,9 mg) {MeOH:H₂O 50:50}.

Након аналитичке танкослојне хроматографије на силика гелу (Merck, Art. 5554), суб-фракције ORI-CFD, ORI-CFE, ORI-CFF груписане су као **ORI-CFD'** (323,6 mg).

За раздвајање суб-фракције **ORI-CFD'** (323,6 mg) коришћена је хроматографија на колони CC (15,0 cm x 3,0 cm) на силика гелу (Merck, Art. 9385). За елуирање је коришћена смеша растварача растуће поларности. 31 фракција је сакупљена и

регруписана након аналитичке TLC (Merck, Art. 5554) на следећи начин: ORI-CFD'A (1→4; 0,7 mg) {циклохексан 100%-CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 97:3:0,3}, ORI-CFD'B (5→7; 0,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 97:3:0,3}, ORI-CFD'C (8→9; 0,5 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 95:5:0,5}, ORI-CFD'D (10→1; 0,9 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 95:5:0,5-90:10:1,0}, ORI-CFD'E (15→18; 3,2 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 90:10:1,0-80:20:2,0}, **ORI-CFD'F** (19→21; 99,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2,0}, **ORI-CFD'G** (22→23; 101,8 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2,0-70:30:3,0}, ORI-CFD'H (24→25; 54,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3,0}, **ORI-CFD'I** (26→28; 42,7 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3,0}, ORI-CFD'J (29; 3,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5,0}, ORI-CFD'K (30; 2,1 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5,0}, ORI-CFD'L (31; 1,3 mg) {CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5,0}.

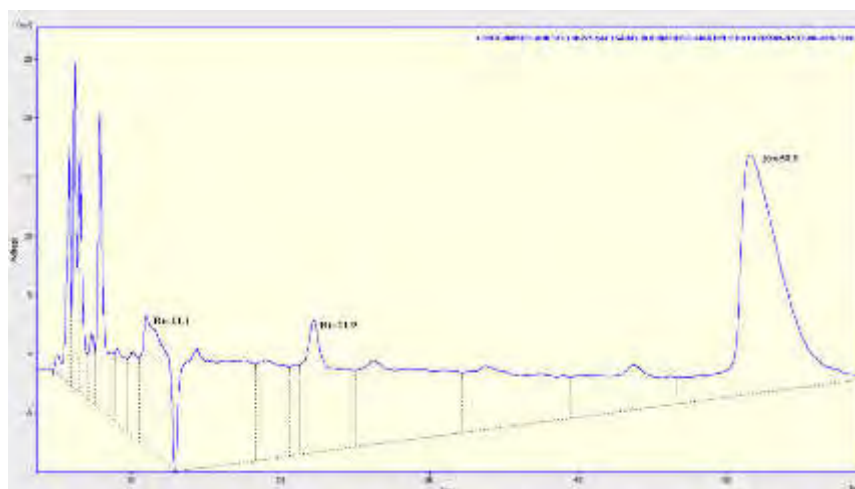
Суб-фракција **ORI-CFD'F** (99,1 mg) је раздвојена RP₁₈-HPLC. Као елуент коришћена је смеша MeOH:AcOH (5%) 50:50 (ORI-H₄); проток растварача 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Следеће супстанце су изоловане и идентификоване: **32** (тимохинол-5-О-β-глукопиранозид) (Rt=9,4 min, 20,1 mg), **28** (3-О-метил рузмаринска киселина) (Rt=20,6 min, 3,6 mg) и **27** (метилестар-рузмаринске киселине) (Rt=25,2 min, 2,7 mg).



Слика 2.11 HPLC хроматограм суб-фракције **ORI-CFD'F**

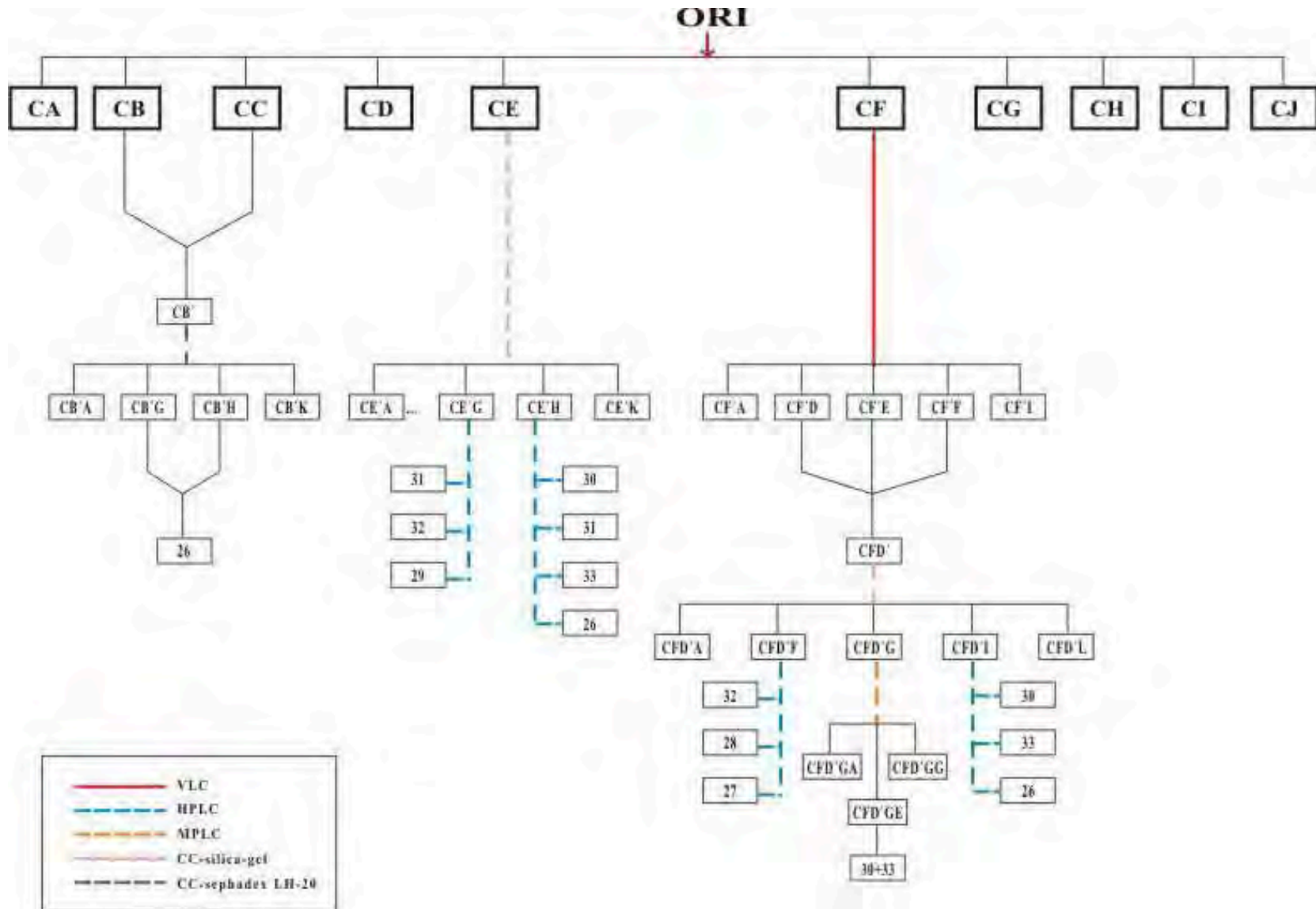
Суб-фракција **ORI-CFD'G (101,8 mg)** је раздвојена течном хроматографијом умереног притиска и обрнутих фаза RP₁₈-MPLC. Као елуент коришћена је смеша H₂O:MeOH опадајуће поларности. 20 фракција је сакупљено и регруписано у 9 основних фракција у сагласности са резултатима аналитичке TLC: ORI_CFD'GA (1; 3,9 mg) {H₂O:MeOH 100,0:0,0}, ORI_CFD'GB (2; 5,6 mg) {H₂O:MeOH 95,0:5,0}, ORI_CFD'GC (3; 4,6 mg) {H₂O:MeOH 90,0:10,0}, ORI_CFD'GD (4; 10,6 mg) {H₂O:MeOH 85,0:15,0}, ORI_CFD'GE (5; 20,6 mg) {H₂O:MeOH 80,0:20,0}, ORI_CFD'GF (6; 12,5 mg) {H₂O:MeOH 75,0:25,0}, ORI_CFD'GG (7; 15,6 mg) {H₂O:MeOH 70,0:30,0}, ORI_CFD'GH (8; 3,8 mg) {H₂O:MeOH 60,0:40,0}, ORI_CFD'GI (9; 6,5 mg) {H₂O:MeOH 50,0:50,0}, ORI_CFD'GJ (10; 2,4 mg) {MeOH 100%}. Суб-фракција ORI_CFD'GE (20,6 mg) је идентификована као смеша две супстанце **30 (12-О-хидрокси јасмонична киселина)** и **33 (тимохинол-2-О-β-глукопиранозид)**.

Течном хроматографијом под високим притиском RP₁₈-HPLC раздвојена је фракција **ORI-CFD'I (42,7 mg)**. Као елуент коришћен је MeOH:AcOH (5%) 35:65 (ORI-H₂); проток растварача 1,8 mL/min; концентрација узорка 7,0 mg/mL. Пикови на Rt=11,1 min; 21,9 min; 50,9 min су сакупљени као основни и идентификовани као супстанце: **30 (12-О-хидрокси јасмонична киселина)** (3,5 mg), **33 (тимохинол-2-О-β-глукопиранозид)** (3,8 mg) и **26 (рузмаринска киселина)** (28,7 mg).



Слика 2.12 HPLC хроматограм суб-фракције **ORI-CFD'I**

Схема 2.4 Хроматографско раздвајање неполарног екстракта биљке *O. scabrum*



2.3 Испитивање антимикробне активности

2.3.1 Тестирани микроорганизми

У раду је коришћено укупно 20 микроорганизама. Испитивања су вршена на микроорганизмима који се налазе у микотекама лабораторије за Биохемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и микробиолошким лабораторијама, болницама Патисион и Света Олга у Атени (GENIKO NOSOKOMEIO PATHSION и AGIA OLGA).

- Из лабораторије Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу тестиране су следеће врсте микроорганизама:

грам-негативне бактерије, G(-): стандардни сој *Escherichia coli* (ATCC 25922), два клиничка изолата *Klebsiella pneumoniae* (FSB 26), и *Pseudomonas aeruginosa* (FSB 37),

грам-позитивне бактерије, G(+): *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), и *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),
квасац *Candida albicans* (ATCC 10259).

Клинички изолати појединих бактеријских сојева потичу из Института за јавно здравље у Крагујевцу.

- Из микробиолошке лабораторије болнице Патисион у Атени тестиране су следеће врсте бактерија:

грам-негативне бактерије: стандардни сојеви – *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); клинички изолати-*Escherichia coli* (2020/09), *Klebsiella pneumoniae* (2645/09), *Pseudomonas aeruginosa* (2503/09), *Acinetobacter baumannii* (53/10), *Citrobacter amalonaticus* (6168/13),

грам-позитивне бактерије: стандардни сој – *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); клинички изолати *Enterococcus faecalis* (2049/13), *Staphylococcus aureus* (0801/13),

стандардни сој **квасца** *Candida albicans* (ATCC 164279) узет је из микробиолошке лабораторије болнице Света Олга у Атени.

Припрема тест микроорганизама за испитивање подразумева њихово пресејавање на хранљиве подлоге, при чему су бактеријске културе пресејане на коси хранљиви агар (НА); *Candida albicans* пресејана је на Sabouraud декстрозни агар (SDA). Пресејани микроорганизми инкубирани су на 37°C током 24 h. Након тога, ћелије испитиваних микроорганизама суспендоване су у стерилном физиолошком раствору (0,9% NaCl), при чему је фотоколориметријском методом број ћелија микроорганизама стандардизован на 0,5 јединица на McFarland скали. Коначна концентрација бактеријског инокулума и инокулума за *C. albicans* износила је $5,6 \times 10^6$ CFU/mL (Colony Forming Unit). За постизање 0,5 јединица на McFarland скали, апсорбанција суспензија мерена је или помоћу фотоколориметра Iskra MA 9507 на 550 nm (зелени филтер) мерењем оптичке густине припремљене суспензије, уз додавање стерилног физиолошког раствора у циљу постизања оптичке густине $O.D._{550\text{ nm}} = 0,045$ за бактерије и *C. albicans*, и 0,03, или је McFarland коефицијент директно одређен на аутоматском фотоколориметру.

Антибиотици: Као стандарди код антибактеријске активности коришћена је серија антибиотика из групе пеницилина (инхибиција ћелијског зида); тетрациклина (инхибиција синтезе протеина), антибиотици који инхибирају синтезу нуклеинских киселина и метаболизма (**Табела 3.47 – 3.48**).

Хранљиве подлоге

Подлоге за гајење бактерија:

Mueller-Hinton подлога

-Mueller-Hinton агар	38 g
-дестилована вода	1000 mL

Готова Mueller-Hinton подлога (Torlak, Beograd, Srbija) сипа се у хладну дестиловану воду и кува до потпуног растварања. Стерилише се на температури од 121°C, 15 min.

Подлога за гајење *Candida albicans*:

Sabouraud-Dekstroza-агар (SDA)

-глукоза	40 g
-пептон	10 g
-агар	18 g
-дестилована вода	1000 mL

У 1000 mL хладне дестиловане воде додају се: глукоза, пептон и агар. Кува се до потпуног растварања и стерилише на температури од 121°C, 25 min. рН = 5.6 се регулише уз помоћ 1M NaOH.

За одређивање МВС коришћена је Mueller-Hinton подлога са 7% крвног агара за *Staphylococcus aureus*, Sabouraud-Dekstroza-агар за *Candida albicans* и Mac Conkey No2 за остале микроорганизме.

2.3.2 Одређивање антимикробне активности методом микродилуције

Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) вршено је микродилуционом методом у бујону (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999). Ова метода је модификација дилуционе методе, уместо епрувета користе се микротитарске плоче са 96 конусних удубљења запремине 200 μ L. Испитивани екстракти и једињења претходно су растворени у 5-10% физиолошком раствору DMSO, помоћу течног бујона је добија серија двоструких разблажења; а након тога је додаван инокулум одређене концентрације. Микроплоче су затим инкубиране на 37°C у трајању од 24 часа. Најмања концентрација на којој није било раста микроорганизма узимана је за MIC тј. MIF. Минималне бактерицидне концентрације (MBC) и минималне фунгицидне концентратије (MFC) одређиване су пипетирањем 10 μ L суспензије MIC или оних концентрација на којима се запажа да нема раста, а затим су наносене на чврсте подлоге са индикатором у Петри кутије. Уколико није било развоја микроорганизма у наредних 24 часа те концентрације су узимане за MBC или MFC.

Минимална инхибиторна концентрација антибиотика одређена је микродилуционом методом у микротитарским плочама са индикатором Panel за Грам (+) PBC29 и Panel за Грам (-) NBC42. Резултати су читани помоћу микротитрационог читача MicroScan auto Scan4 (Pade Behring) на 450 и 650 nm таласне дужине.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У овом поглављу докторске дисертације приказани су и дискутовани експериментални резултати:

1. Хемијске анализе биљних врста *C. pannonica* и *O. scabrum*.
2. Антимикробне активности екстракта, изолованих једињења наведених биљака, као и есенцијалног уља биљке *C. pannonica*.
3. Хемотаксономски значај изолованих једињења.

Поступком екстракције неполарног екстракта биљке *C. pannonica* изоловано је **25** једињења из следећих група секундарних метаболита: сесквитерпенски лактони (**14**), флавоноиди (**7**), лигнани (**3**) и фенилпропаноид глукозид (**1**). Сва наведена једињења по први пут су изолована из биљке, док су три сесквитерпенска лактона нови природни производи. Такође, по први пут је изоловано и окарактерисано по хемијском саставу есенцијално уље биљке *C. pannonica*.

Из поларног екстракта биљке *O. scabrum* изоловано је укупно **8** једињења из групе фенолних киселина (**3**), алицикличних деривата (**2**), неолигнана (**1**) и монотерпенских гликозида (**2**). Сва једињења су новоизолована из биљке *O. scabrum*. Њихове структуре су одређене применом спектроскопских метода попут UV/VIS, IC, 1 и 2D NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR/DEPT}$, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY, GC/GC-MS и MS).

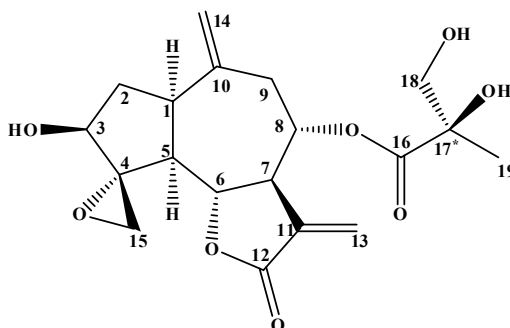
Антимикробна активност на једанаест различитих микроорганизама одређивана је микродилуционом методом на екстрактима (**2**), појединим фракцијама екстракције (**1**) и чистим компонентама изолованим из екстракта биљака (**33**). Такође, испитана је и антимикробна активност етарског уља биљке *C. pannonica*.

Иоловани и идентификовани секундарни метаболити биљака *C. pannonica* и *O. scabrum* разматрани су као потенцијални хемотаксономски маркери рода *Centaurea*, група „*Centaurea jacea*“ (секција *Jacea*), и рода *Origanum*.

3.1 Сесквитерпенски лактони

1. Бабилин А

Супстанца је по први пут изолован из биљке *Centaurea babylonica* (Bruno et al., 2005). У нашем експерименталном раду супстанца је изолована као жуто уље из неполарног екстракта биљке *C. rannonica* и одређена јој је хемијска структура приказана на **слици 3.1**.



Слика 3.1 1. Бабилин А

Хлороформски раствор супстанце **1** има вредност оптичке ротације:

$$[\alpha]_D^{20} + 75,5 \text{ (} c=1,06; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

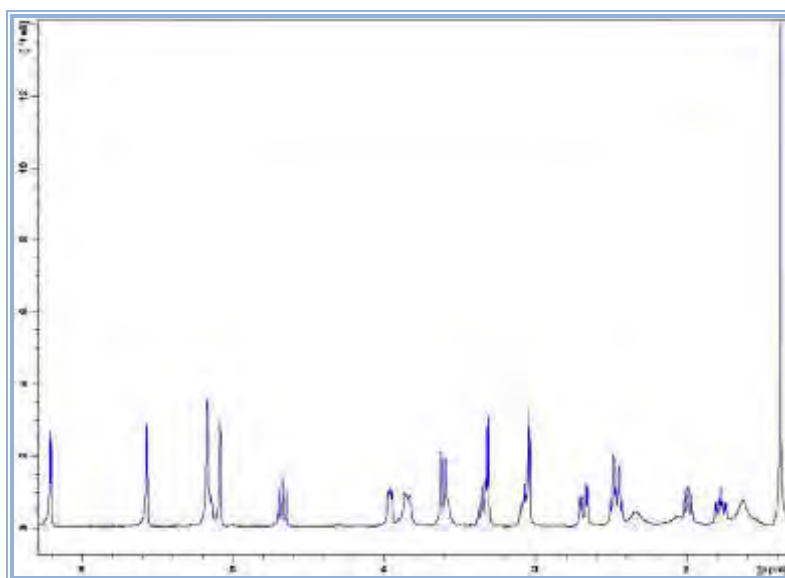
У IR (CaF₂) спектру запажају се следеће траке: ν_{\max} 3445 cm⁻¹ (ОН), 1765 cm⁻¹ (γ -лактон), 1745 cm⁻¹ (естарска група), 1665 и 1635 cm⁻¹ (двострука веза), 1240 cm⁻¹ (естарска група), 1150 cm⁻¹ трака фрагмента -O-C=O).

На основу сигнала који се уочавају на ¹H-NMR спектру (**Табела 3.1**; **Слика 3.2**) изводи се закључак да супстанца **1** припада групи сесквитерпенских лактона-типа гвајанолида:

Табела 3.1 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце 1 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	45,9	H-1	3,36	<i>t</i> (J=9,5)	1
C-2	CH ₂	37,6	H-2a	2,46	<i>ddd</i> (J=14,7; 9,5; 7,0)	2
			H-2b	1,77	<i>ddt</i> (J=14,7; 10,1; 3,9)	
C-3	CH	76,2	H-3	3,95	<i>dd</i> (J=7,0; 3,9)	1
C-4	C	67,7	-	-	-	-
C-5	CH	53,6	H-5	1,99	<i>dd</i> (J=11,2; 9,5)	1
C-6	CH	76,1	H-6	4,67	<i>dd</i> (J=11,2; 9,3)	1
C-7	CH	47,3	H-7	3,08	<i>tt</i> (J=9,3; 3,2)	1
C-8	CH	75,5	H-8	5,17	<i>ddd</i> (J=9,3; 5,1; 3,2)	1
C-9	CH ₂	35,1	H-9a	2,68	<i>dd</i> (J=15,0; 5,1)	2
			H-9b	2,46	<i>dd</i> (J=15,0; 3,2)	
C-10	C	140,4	-	-	-	-
C-11	C	137,1	-	-	-	-
C-12	C=O	170,3	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,1	H-13a	6,20	<i>d</i> (J=3,4)	2
			H-13b	5,57	<i>d</i> (J=3,2)	
C-14	CH ₂	118,9	H-14a	5,17	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,09	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	48,3	H-15a	3,31	<i>d</i> (J=4,2)	2
			H-15b	3,04	<i>d</i> (J=4,2)	
C-16	C=O	174,6	-	-	-	-
C-17	C	75,4	-	-	-	-
C-18	CH ₂	68,3	H-18a	3,85	<i>d</i> (J=11,6)	2
			H-18a	3,61	<i>d</i> (J=11,6)	
C-19	CH ₃	21,2	CH ₃ -19	1,38	<i>s</i>	3

*Вредности су одређене коришћењем HSQC и HMBC података.

Слика 3.2 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце 1 (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

- Триплет на δ 3,36 ($J=9,5$ Hz) и двоструки дублет са хемијским померањем на δ 1,99 ($J=11,2; 9,5$ Hz) као два метинска протона у алифатичној регији спектра карактеристични су за протоне Н-1 и Н-5 гвајанолида.
- Двоструки дублет на δ 4,67 ($J=11,2; 9,5$ Hz) је карактеристичан за протон Н-6. Налази се у делу спектра оксидованих метинских група, јер је везан за кисеоников атом α -метилен γ -лактонског прстена.
- Троструки дублет са хемијским померањем од δ 5,15 ($J=9,3; 5,1; 3,2$ Hz) је сигнал карактеристичан за протон Н-8, гвајанолида. Протон Н-8 припада групи оксидованих метинских протона као и Н-6, па би се сходно томе очекивало да се налазе један поред другог. Овде, због естерификације бочног ланца, протон на позицији С-8 има више хемијско померање (налази се у области олефинских протона) у односу на протон Н-6.

Сигнали карактеристични за α -метилен γ -лактонски прстен:

- Два дублета на δ_{H} 6,20 ($J=3,4$ Hz) и δ_{H} 5,57 ($J=3,2$ Hz) ($\Delta^{11(13)}$) карактеристични за протоне егзометиленске двоструке везе лактонског прстена, Н-13а и Н-13б.
- Двоструки триплет на δ_{H} 3,08 ($J=9,3; 3,2$ Hz) је карактеристичан за протон Н-7 (Слика 3.2).

У алифатичној регији $^1\text{H-NMR}$ спектра су идентификоване две метиленске групе:

- Два двострука дублета на позицијама δ_{H} 2,68 ($J=15,1; 5,1$ Hz) и δ_{H} 2,46 ($J=15,0; 3,2$ Hz) који одговарају геминалним протонима Н-9а и Н-9б.
- Троструки дублет на δ_{H} 2,46 ($J=14,7; 9,5, 7,0$ Hz) и дублет дублет триплета на δ 1,77 ($J=14,5; 10,1; 3,9$ Hz) карактеристични су за геминалне протоне Н-2а и Н-2б.

Двоструки дублет на позицији δ_{H} 3,95 ($J=7,0; 3,9$ Hz) карактеристичан је за протон Н-3. Хемијско померање ка вишим вредностима овог метинског протона који се налази на петочланом прстену гвајанолида објашњава се присуством хидроксилне групе на позицији С-3.

Два јасна синглета у области олефинских протона δ_{H} 5,17 и δ_{H} 5,09, карактеристични су за протоне егзо-метиленске двоструке везе Н-14а и Н-14b, ($\Delta^{10(14)}$).

Типичан АВ систем, два дублета на δ_{H} 3,85 и δ_{H} 3,61 са константом спрезања од $J=11,0$ Hz, као и синглет на δ_{H} 1,38 који интеграцијом даје три протона, карактеристичан за метил групу, указују на присуство бочног ланца у молекулу. Наведени сигнали су карактеристични за 2-метил-2-хидроксил пропаноилокси [= метакрилат] бочни ланац који је естарски везан за С-8 (Слика 3.2).

Поред свега наведеног, на $^1\text{H-NMR}$ спектру се уочавају и два дублета δ_{H} 3,31 ($J=4,4$ Hz) и δ_{H} 3,04 ($J=4,2$ Hz) који, у сагласности са литературним подацима, одговарају геминалним протонима Н-15а и Н-15b епоксидног прстена који се налази на позицији С-4 (Bruno et al., 2005).

Основна структура гвајанолида **1** потврђена је помоћу COSY спектра (Слика 3.3):

Спин систем А: Н-7/Н-13а,b

Спин систем Б: Н-1/Н-5/Н-6/Н-7/Н-8/Н-9а,b

Спин систем Ц: Н-1/Н-2а,b/Н-3.

На основу HSQC (корелација угљеник-протон) спектра дефинисани су следећи угљеникови атоми супстанце **1** (Слика 3.3):

- три метинска угљеника С-1, С-5 и С-7 (δ_{C} 45,9; δ_{C} 53,6; δ_{C} 47,3),
- три оксиметинска угљеника С-3, С-6 и С-8 (δ_{C} 76,2; δ_{C} 76,1 и δ_{C} 75,5),
- два алифатична метиленска угљеника С-2 и С-9 (δ_{C} 37,6 и δ_{C} 35,1),
- два олефинска угљеника карактеристична за егзо-метиленску двоструку везу С-14 и С-13 (δ_{C} 118,9 и δ_{C} 122,1),
- један метиленски угљеник епоксидног прстена С-15 на δ_{C} 48,3,
- један метиленски угљеник бочног ланца С-18 на δ_{C} 68,3,
- један угљеник метил групе бочног ланца С-19 на δ_{C} 21,2.

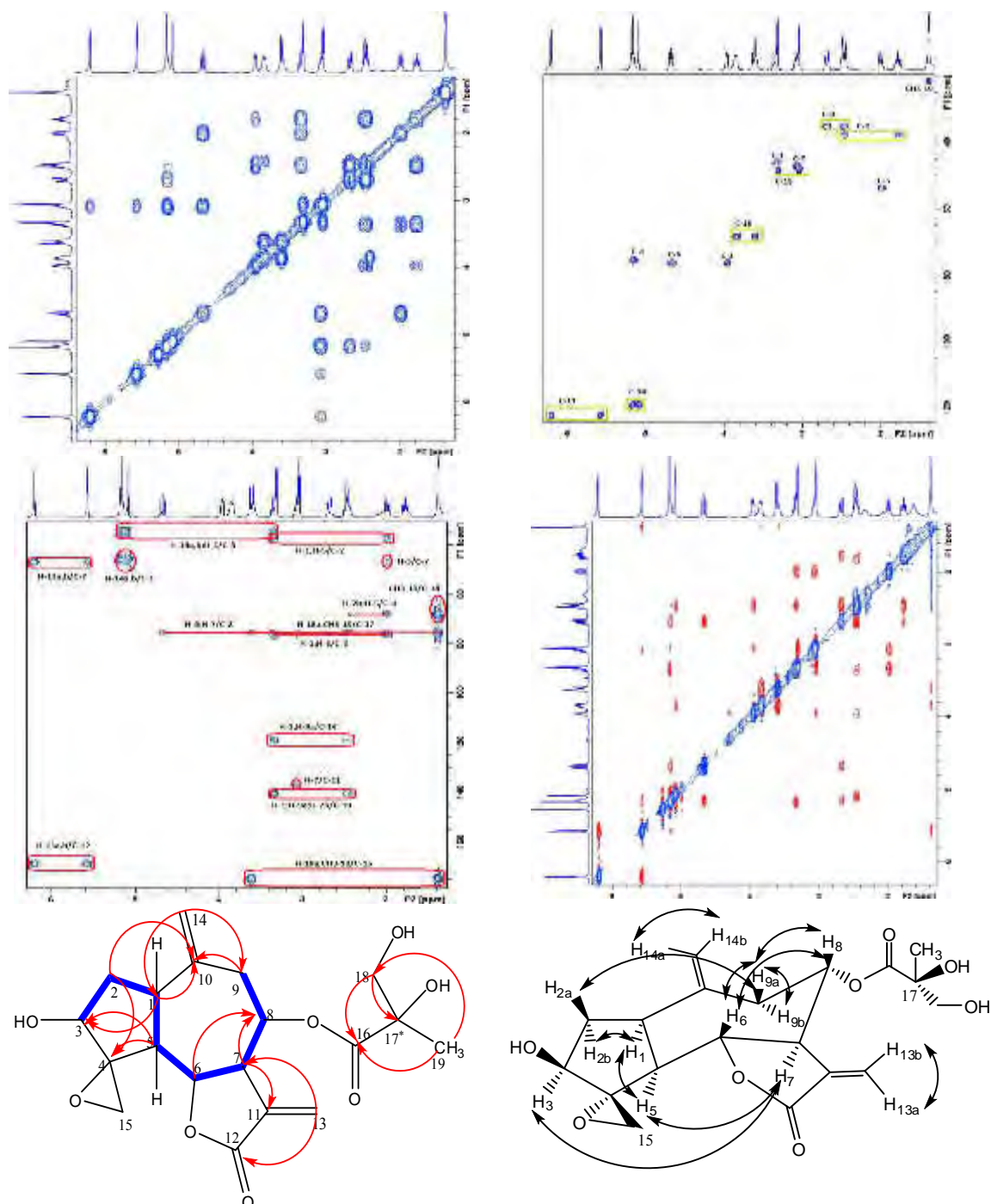
Помоћу спектра ^1H - ^{13}C корелације НМВС, који омогућава дефинисање положаја удаљених атома (нпр. атома угљеника који је за три или четири везе удаљен од протона), одређена су хемијска померања следећих кватернерних угљеникових атома (**Слика 3.3**):

- C-12 (δ_{C} 170,3) на основу повезаности сигнала H-13a,b/C-12,
- C-16 (δ_{C} 174,6) - H-18b, CH₃-19/C-16,
- C-10 (δ_{C} 140,4) - H-1/C-10,
- C-4 (δ_{C} 67,7) - H-5/C-4,
- C-11 (δ_{C} 137,1) - H-7/C-11,
- C-17 (δ_{C} 75,4) - H-18b, CH₃-19/C-17.

Релативна конформација сесквитерпенског лактона **1** добијена је упоређивањем константи купловања вициналних протона са публикованим вредностима, за одговарајуће гвајанолиде (Bruno et al., 2005).

Поред тога, помоћу хомонуклеарног ^1H - ^1H NOESY спектра одређени су сви хирални центри супстанце **1**. Јака ρ_{Oe} повезаност између H-1 и H-5 потврђује *cis* полагај петочланог и седмочланог прстена гвајанолида; *trans*-диаксијална расподела протона на позицијама C-5 (α), C-6 (β) и C-7 (α) карактеристична за α -метилен γ -лактонски прстен гвајанолида изолованих из биљака фамилије Astereaceae утврђена је ρ_{Oe} корелацијом између H-5 и H-7, као H-6 са H-8. Интезиван, јасно уочљив ρ_{Oe} сигнал између H-8 са H-6 и H-9b потврђује α -оријентацију естарског бочног ланца на позицији C-8, док ρ_{Oe} сигнал између H-7 и H-3 потврђује β -оријентацију хидроксилне групе на положају C-3. Одсуство ρ_{Oe} сигнала између метилених протона на позицији C-15 и H-5, указује на њихову β -оријентацију на положају C-4 (**Слика 3.3**).

Стереохемија група на угљенику C-17 обележена је R^* у случају да се ради о супротној стереохемији на угљениковом атому. У сагласности са литературним подацима уколико је протон H-13b на нижим вредностима хемијских померања, што је и овде случај, сматра се да су групе на угљенику распоређене у простору на начин приказан код супстанце **1** (Bruno et al., 2005; Merrill and Stevens, 1985).

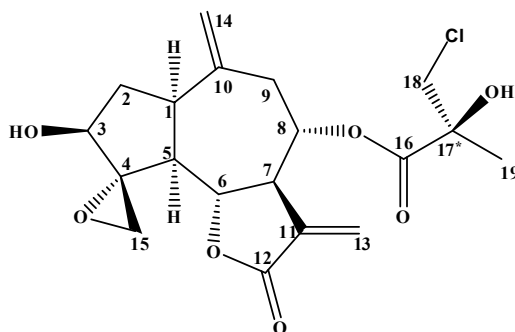


Слика 3.3 ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC и NOESY спектри супстанце **1** (CDCl_3 ; 400,0 MHz); Корелације добијене на основу HMBC спектра (црвене стрелице од ^1H ка ^{13}C) и ^1H - ^1H COSY корелација (плаве линије); Предложена конформација супстанце **1** добијена на основу ^1H -NMR и ^1H - ^1H NOESY спектра

2. Хлорохисопифолин Ц (акроптилин)

Супстанца је по први пут изолована 1967. године из биљке *Acroptilon repens* (*Centaurea repens*), (Evstratova et al., 1967). Касније је супстанца изолована и из других биљних врста, пре свега из врста рода *Centaurea* (Табела 1.5). Супстанца је још изолована из рода *Rhaponticum* врсте *R. cerratuloides* (Berdin et al., 1999). Поред биљне фамилије Asteraceae изолована је и из фамилије Jurinea: *J. suffruticosa* Rgl. (Zakirov et al., 1982).

У нашем раду, супстанца је изолована у облику белих кристала и помоћу спектроскопских метода одређена је следећа хемијска структура приказана на слици 3.4.



Слика 3.4 2. Хлорохисопифолин Ц

Измерена оптичка ротација хлороформског раствора супстанце је:

$$[\alpha]_D^{20} + 79,0 \text{ (} c=1,00; \text{CHCl}_3 \text{)}.$$

Резултати IR (CaF₂) спектра указују на присуство следећих функционалних група: ν_{\max} 3470 cm⁻¹ (ОН група) и 1743 cm⁻¹ (C=O, карбонилна група), и слабе траке на 1665 и 1630 cm⁻¹ (C=C, двоструке групе).

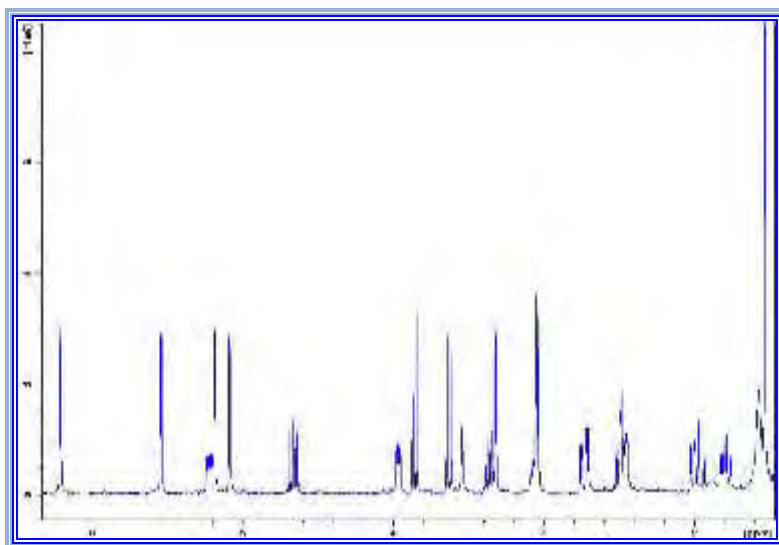
Као што је приказано у Табели 3.2 и на Слици 3.5, хемијска померања сигнала протона на ¹H-NMR спектру супстанце 2 готово су идентична као код претходно описане супстанце бабилин А (1), са изузетком сигнала карактеристичног за H-8 (δ_{H} 5,22 vs 5,17) и метил групе бочног ланца CH₃-19 (δ_{H} 1,53 vs 1,38). На основу ових промена може се закључити да се две супстанце мађусобно разликују по хемијском саставу бочног ланца.

У сагласности са литературним подацима, два дублета на δ_{H} 3,86 и δ_{H} 3,63, H-18a,b и оштар, јасан синглет који интеграцијом даје три протона на δ_{H} 1,53 CH₃-19 а који се уочавају на ¹H-NMR спектру супстанце **2**, указују да је естарски везана 2-хлорометил-2-хидрокси пропионатна група као бочни ланац који се налази на позицији C-8 супстанце **2** (Bruno et al., 2005).

Табела 3.2 ¹H-NMR и ¹³C-NMR* супстанце **2** (CDCl₃; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	46,1	H-1	3,36	<i>t</i> (J=9,6)	1
C-2	CH ₂	37,8	H-2a	2,49	<i>ddd</i> (J=14,4, 9,6; 7,2)	2
			H-2b	1,77	<i>ddt</i> (J=14,4; 9,8; 3,7)	
C-3	CH	76,2	H-3	3,97	<i>dd</i> (J=7,2; 3,7)	1
C-4	C	68,1	-	-	-	-
C-5	CH	53,7	H-5	1,99	<i>dd</i> (J=11,3; 8,7)	1
C-6	CH	76,4	H-6	4,66	<i>dd</i> (J=11,7; 9,4)	1
C-7	CH	47,7	H-7	3,07	<i>td</i> (J=9,7; 3,3)	1
C-8	CH	75,8	H-8	5,22	<i>m</i>	1
C-9	CH ₂	35,5	H-9a	2,68	<i>dd</i> (J=15,3; 4,9)	2
			H-9b	2,47	<i>dd</i> (J=14,8, 2,3)	
C-10	C	140,9	-	-	-	-
C-11	C	137,3	-	-	-	-
C-12	C=O	168,7	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,4	H-13a	6,21	<i>d</i> (J=3,5)	2
			H-13b	5,54	<i>d</i> (J=3,2)	
C-14	CH ₂	119,3	H-14a	5,18	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,02	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	48,6	H-15a	3,34	<i>d</i> (J=4,4)	2
			H-15b	3,04	<i>d</i> (J=4,4)	
C-16	C=O	173,2	-	-	-	-
C-17	C	74,7	-	-	-	-
C-18	CH ₂	51,2	H-18a	3,86	<i>d</i> (J=10,8)	2
			H-18a	3,63	<i>d</i> (J=10,8)	
C-19	CH ₃	23,5	CH ₃ -19	1,53	<i>s</i>	3

* Вредности су одређене коришћењем ¹³C-NMR и HMBC података.



Слика 3.5 ^1H -NMR спектар супстанце **2** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Потврда присуства наведеног бочног ланца који у свом саставу садржи халоген добијена је помоћу НМВС спектра на коме се уочава укрштање сигнала метил групе CH_3 -19 са угљениковим атомима на следећим хемијским померањима δ_{C} 173,2 (C-16), δ_{C} 74,7 (C-17) и δ_{C} 51,2 (C-18) (Слика 3.6). Наведена хемијска померања угљеникових атома су у сагласности са литературним подацима бочног ланца који садржи атом хлора (Fernandez et al., 1995). У случају када се у бочном ланцу уместо хлора налази хидроксилна група, сигнал C-18 се налази на δ_{C} 68,3 (бабилин А, стр. 107).

Основна структура гвајанолида **2** потврђена је помоћу COSY спектра (Слика 3.6):

Спин систем А: H-7/H-13a,b

Спин систем В: H-1/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9a,b

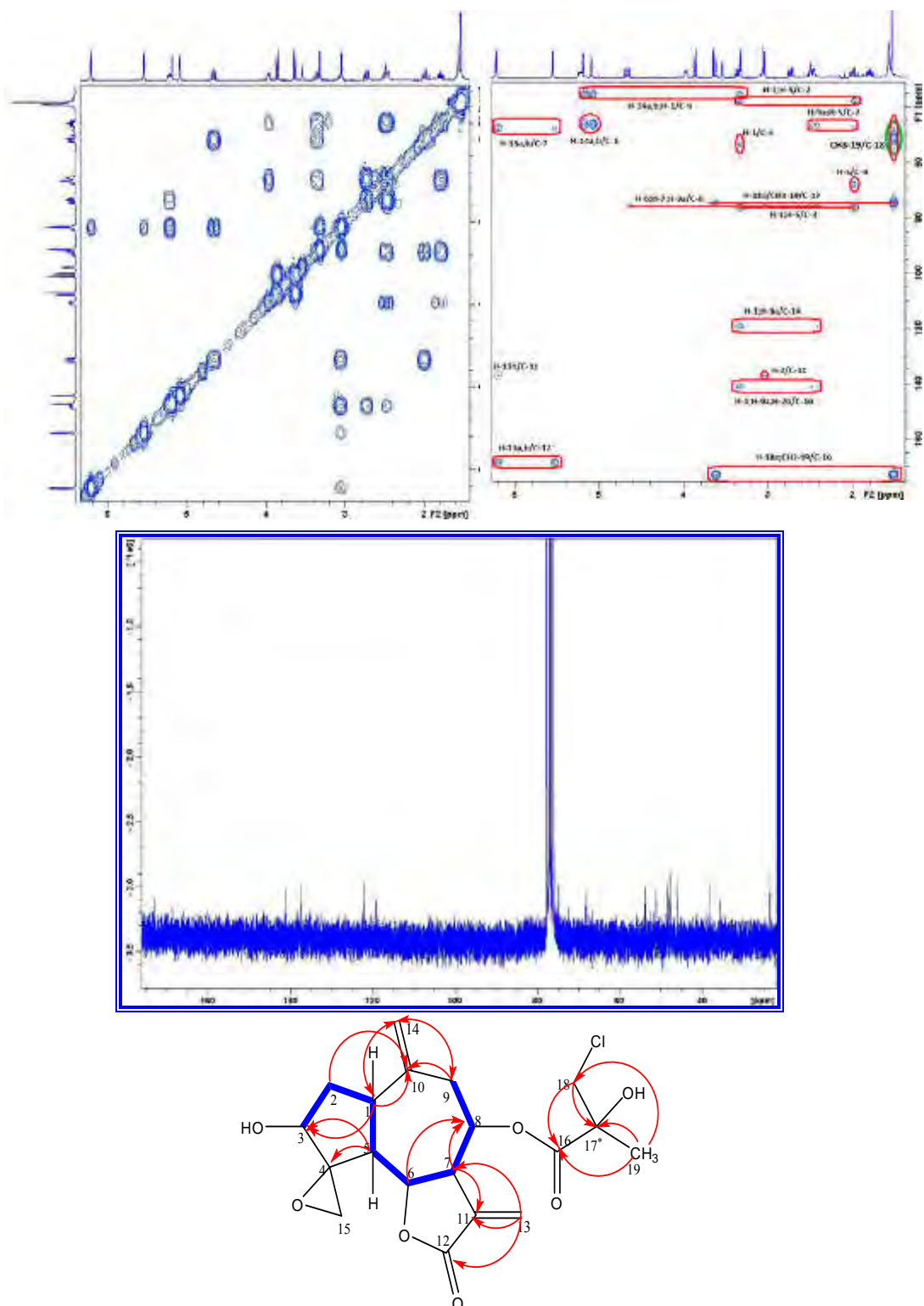
Спин систем С: H-1/H-2a,b/H-3.

На основу ^{13}C -NMR спектра одређени су положаји следећих сигнала (Табела 3.2; Слика 3.6):

- у регији карбоксилних угљеникових атома уочавају се два пика: C-16 (δ_{C} 173,2; бочни ланац), C-12 (δ_{C} 168,7; лактонски прстен),
- у регији олефинских угљеникових атома присутна су четири различита сигнала:
 - два кватернерна угљеникова атома на позицијама: C-10 (δ_{C} 140,9); C-11 (δ_{C} 137,3),
 - два угљеникова атома егзоцикличних двоструких веза: C-13 (δ_{C} 122,4); C-14 (δ_{C} 119,3),
- у регији угљеника везаних за кисеоников атом уочава се укупно пет сигнала: C-3 (δ_{C} 76,2); C-6 (δ_{C} 76,4); C-8 (δ_{C} 75,8); C-17 (δ_{C} 74,7); C-4 (δ_{C} 68,1),
- у регији алифатичних угљеника налазе се следећи сигнали: C-1 (δ_{C} 46,1); C-2 (δ_{C} 37,1); C-5 (δ_{C} 53,7); C-7 (δ_{C} 47,7); C-9 (δ_{C} 35,5); C-15 (δ_{C} 48,5) и метил C-19 (δ_{C} 23,5).

Позиције кватернерних угљеникових атома су потврђене помоћу НМВС спектра (Слика 3.6).

Релатива стереохемија супстанце **2** потврђена је упоређивањем вредности константи купловања као и хемијским померањима угљеникових атома са већ публикованим вредностима за, по хемијском саставу, сличне гвајанолиде (Merrill and Stevens, 1985, Bruno et al., 2005).

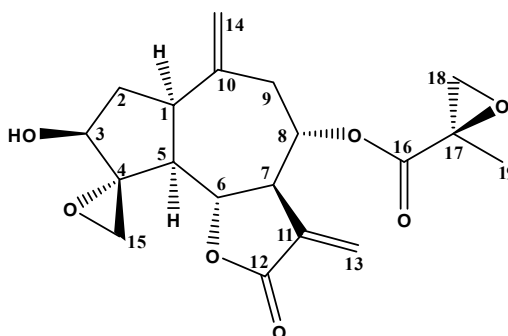


Слика 3.6 ^1H - ^1H COSY, HMQC и ^{13}C -NMR спектри супстанце супстанце **2** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Најважније укрштања добијена помоћу HMQC спектра (црвене стрелице од ^1H ка ^{13}C) и ^1H - ^1H COSY корелације (означене плавим болд линијама)

3. Репин

Изолована је први пут из биљке *Acroptilon repens* L. (Evstratova, 1969). Супстанца је изолована и из других биљних врста из рода *Centaurea* (Табела 1.5).

Из испитиваног екстракта супстанца је изолована у облику беле кристалне супстанце и одређена је следећа хемијска структура приказана на слици 3.7.



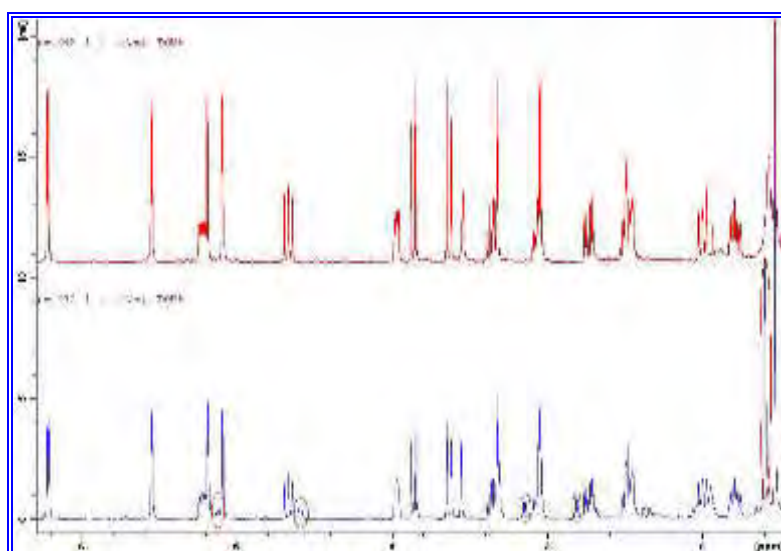
Слика 3.7 3. Репин

Супстанца **3** изолована је у меши, заједно са хлорохисопифолином **С** (**2**) у односу 1:3, што је одређено помоћу $^1\text{H-NMR}$ спектра (Табела 3.3; Слика 3.8). Упоредјујући ^1H и $^{13}\text{C-NMR}$ спектре са спектрима чисте супстанце **2** уочава се присуство још једне супстанце. На основу спектроскопских података, закључено је да су централни скелети гвајанолида идентични и да се две супстанце разликују једино по структури бочног ланца.

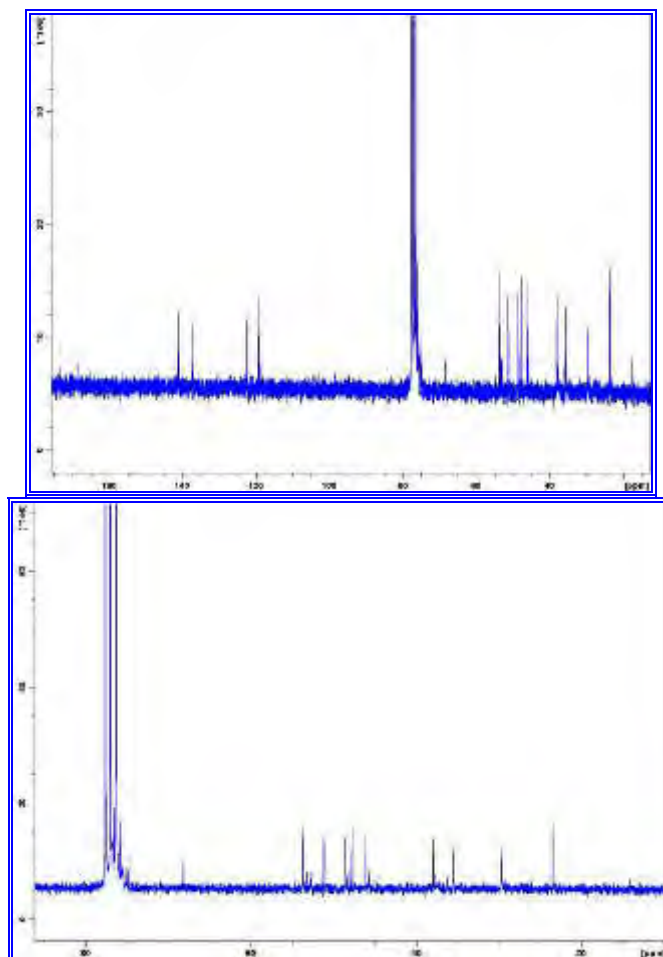
На $^1\text{H-NMR}$ спектру поред карактеристичних пикова за хлорохисопифолин **С**, присуство два дублета на δ_{H} 3,14 ($J=5,8$ Hz) и δ_{H} 2,80 ($J=5,8$ Hz), као и једног синглета на δ_{H} 1,59 који интегрисањем даје укупно три протона тј. метил групе CH_3 -19 указује на присуство епоксидног прстена у бочном ланцу (Bruno et al., 2005).

Табела 3.3 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **3** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	45,7	H-1	3,36	<i>t</i> (J=9,6)	1
C-2	CH ₂	37,5	H-2a	2,49	<i>ddd</i> (J=14,4; 9,6; 7,2)	2
			H-2b	1,77	<i>ddt</i> (J=14,4; 9,8; 3,9)	
C-3	CH	75,5	H-3	3,97	<i>dd</i> (J=7,2; 3,9)	1
C-4	C	68,2	-	-	-	-
C-5	CH	53,7	H-5	1,99	<i>dd</i> (J=11,3; 8,7)	1
C-6	CH	76,7	H-6	4,64	<i>dd</i> (J=11,7; 9,4)	1
C-7	CH	48,0	H-7	3,07	<i>td</i> (J=9,7; 3,3)	1
C-8	CH	75,5	H-8	5,12	<i>m</i>	1
C-9	CH ₂	36,3	H-9a	2,72	<i>dd</i> (J=15,3; 4,9)	2
			H-9b	2,47	<i>dd</i> (J=14,8; 2,3)	
C-10	C	140,9	-	-	-	-
C-11	C	137,3	-	-	-	-
C-12	C=O	168,7	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,4	H-13a	6,21	<i>d</i> (J=3,5)	2
			H-13b	5,54	<i>d</i> (J=3,2)	
C-14	CH ₂	119,3	H-14a	5,18	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,02	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	48,5	H-15a	3,34	<i>d</i> (J=4,4)	2
			H-15b	3,04	<i>d</i> (J=4,4)	
C-16	C=O	173,2	-	-	-	-
C-17	C	53,2	-	-	-	-
C-18	CH ₂	52,8	H-18a	3,14	<i>d</i> (J=5,8)	2
			H-18a	2,80	<i>d</i> (J=5,8)	
C-19	CH ₃	17,5	CH ₃ -19	1,59	<i>s</i>	3

Слика 3.8 $^1\text{H-NMR}$ спектри супстанце **2** (црвени) **2** и **3** (плави) (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Присуство следећих угљеникових атома на ^{13}C -NMR спектру: C-17 (δ_{C} 53,2), C-18 (δ_{C} 52,8) и C-19 (δ_{C} 17,5) потврђује горе наведену претпоставку да се епоксидни прстен налази у бочном ланцу (**Слика 3.9**).



Слика 3.9 ^{13}C -NMR спектар смеше супстанце **2** и **3** (CDCl_3 ; 50,3 MHz);
деталј ^{13}C -NMR спектра смеше супстанце **2** и **3**

Стереохемија супстанце **3** добијена је упоређивањем константи купловања и вредности хемијских померања пикова са претходно публикованим подацима за сесквитерпенске аналоге. Узет је у обзир и потенцијални биосинтетички пут гвајанолида изолованих из фамилије *Astereaceae*, рода *Centaurea*.

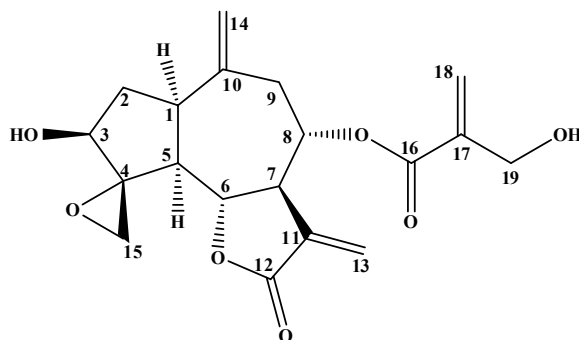
Репин је сесквитерпенски лактон изолован из *C. solstitialis* и *C. repens*, биљака које изазивају коњску нигропалидалну енцефаломацију или болест жвакања (equine nigropallidal encephalomalacia-ENE), фаталну неуродегеративну болест коња, сличну Паркинсоновој болести. Активност сесквитерпенског

лактона репина објашњава се присуством метиленбутирлактонске и епоксидне групе које су јаки електрофили и могу реаговати са различитим биолошким нуклеофилима, као што су протеини, DNK, и глутатион (GSH). Откривено је да репин изазива промене нивоа глутатиона GSH у функцији митохондрија што за последицу има смањење концентрације допамина у ћелији. Како се зна да Перкинсонова болест зависи од концентрације допамина у ћелијама организма, претпоставља се да је репин неуротоксичан гвајанолид одговоран за ENE код коња (Tukov et al., 2004; Robles et al., 1998). Такође је откривено да репин изазива хипотермију код пацова. С обзиром на то да ниједан познати медикамент као што су атропин сулфат, атропин метилбромид, пропранолол, метерголин, кетансерин, дифенхидрамин и апоморфин не умањују хипотермички ефекат репина, механизам изазивања хипотермије у присуству репина се и даље истражује (Akbar et al., 1995).

4. Јанерин

Први пут супстанца је изолована из *Centaurea janeri* (Gonzales et al., 1977). До сада је изолована из различитих врста које припадају роду *Centaurea* (Табела 1.5). Супстанца је изолована и из других родова биљака: *Rhaponticum*: *R. pulchrum* (Cis et al., 2006), *Pleiotaxis*: *P. rugosa* (Zdero & Bohlmann, 1989) и *Centaurothamnus*: *C. maximus* (Muhammad et al., 2003).

Наведено једињење изоловано је у облику жуте аморфне супстанце и на основу спектроскопске анализе одређена је следећа хемијска структура приказана на слици 3.10.



Слика 3.10 4. Јанерин

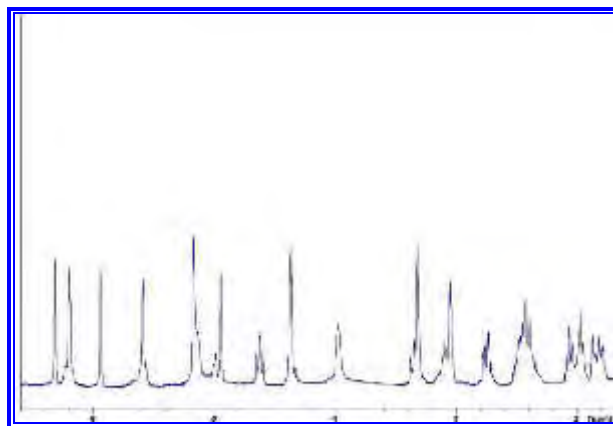
Вредност измерене оптичке ротације је:

$$[\alpha]_D^{20} + 42,0 \text{ (} c=1,00; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

На основу $^1\text{H-NMR}$ спектра, закључује се да супстанца **4** припада истој подгрупи гвајанолида као и претходно описане супстанце са епоксидним прстеном на C-4 (Табела 3.4; Слика 3.11).

Табела 3.4 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **4** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	48,2	H-1	3,34	<i>t</i> (J=10,4)	1
C-2	CH ₂	37,8	H-2a	2,45	<i>dd</i> (J=14,7; 7,0)	2
			H-2b	1,83	<i>ddt</i> (J=14,7; 10,4; 4,3)	
C-3	CH	76,7	H-3	3,98	<i>t</i> (J=7,0)	1
C-4	C	68,3	-	-	-	-
C-5	CH	53,2	H-5	2,06	<i>t</i> (J=10,4)	1
C-6	CH	77,2	H-6	4,61	<i>dd</i> (J=10,4; 9,2)	1
C-7	CH	45,9	H-7	3,10	<i>t</i> (J=9,2)	1
C-8	CH	74,3	H-8	5,13	<i>m</i>	1
C-9	CH ₂	36,6	H-9a	2,73	<i>dd</i> (J=15,1; 5,5)	2
			H-9b	2,41	<i>dd</i> (J=15,1; 3,3)	
C-10	C	141,5	-	-	-	-
C-11	C	137,1	-	-	-	-
C-12	C=O	165,3	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,8	H-13a	6,20	<i>d</i> (J=3,0)	2
			H-13b	5,60	<i>d</i> (J=2,8)	
C-14	CH ₂	118,8	H-14a	5,17	<i>brs</i>	2
			H-14b	4,94	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	48,6	H-15a	3,32	<i>d</i> (J=3,3)	2
			H-15b	3,05	<i>d</i> (J=3,3)	
C-16	C=O	168,8	-	-	-	-
C-17	C	139,4	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,9	H-18a	6,32	<i>d</i> (J=10,8)	2
			H-18a	5,94	<i>d</i> (J=10,8)	
C-19	CH ₃	62,5	CH ₃ -19	4,32	<i>s</i>	3



Слика 3.11 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **4** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Сви сигнали за гвајанолидни тип скелета су очигледни на протонском спектру као и два дублета на δ_{H} 3,32 и δ_{H} 3,05 са константом спрезања $J=3,5$ Hz која одговарају геминалним протонима епоксидног прстена, H-15a and H-15b.

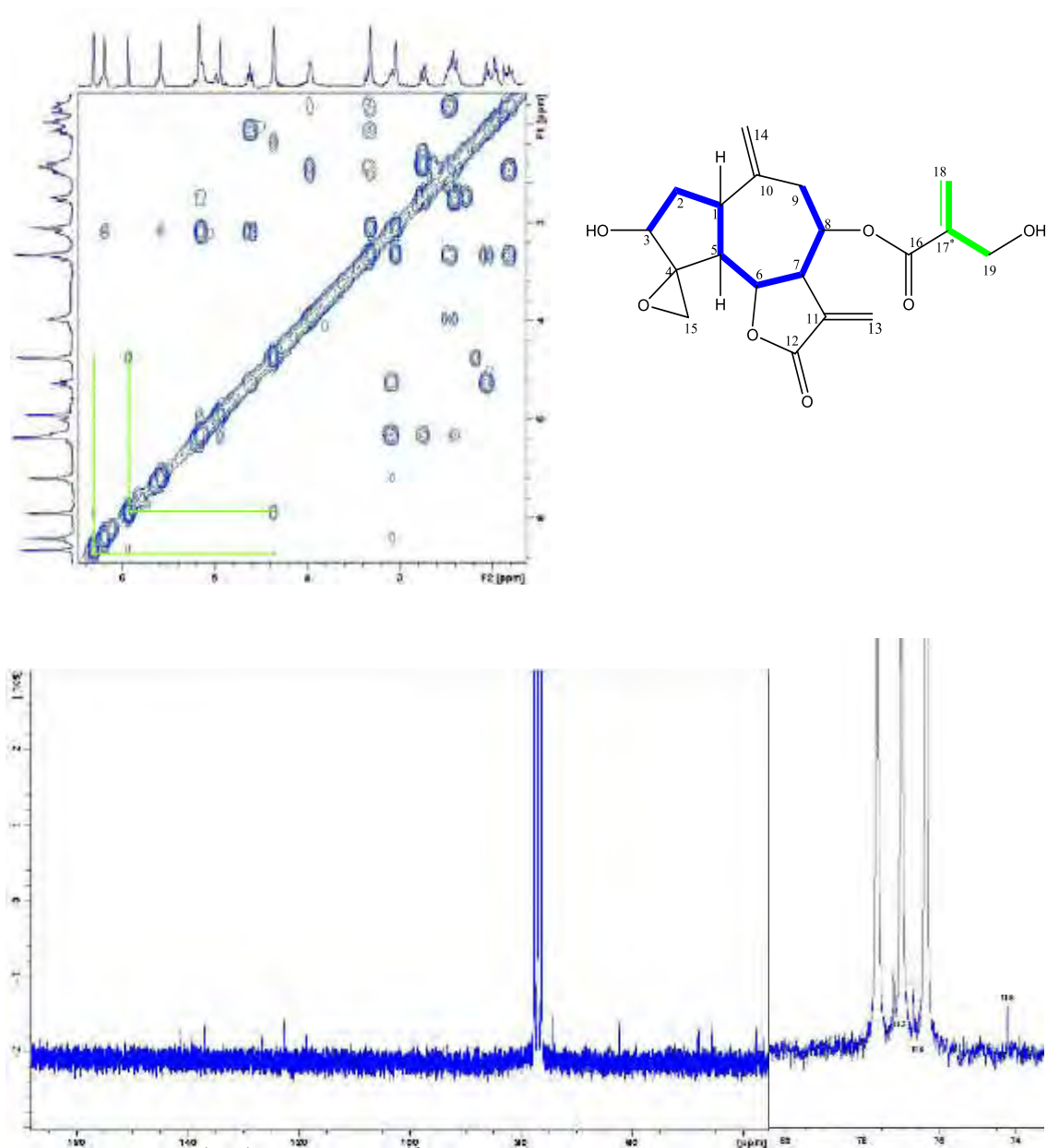
Са $^1\text{H-NMR}$ спектра евидентно је да је једина разлика између супстанце 4 и претходно описаних гвајанолида у хемијској природи бочног ланца. На $^1\text{H-NMR}$ спектру два широка синглета на δ_{H} 6,32 и δ_{H} 5,94 као и синглет на вишим померањима (δ_{H} 4,32), који интеграцијом даје два протона, одговарају бочном низу 4-хидроксиметакрилату, естарски везаном за C-8.

Даља потврда предложене структуре добијена је помоћу COSY и $^{13}\text{C-NMR}$ спектра (Слика 3.12).

Као и код претходних гвајанолида централни скелет супстанце 4 потврђен је помоћу COSY спектра док су хемијска померања свих угљеникових атома супстанце 4 добијена анализом $^{13}\text{C-NMR}$ спектра.

Релативна стереохемија супстанце 4 добијена је упоређивањем константи спрезања између вициналних протона и хемијским померањима угљеника са одговарајућим гвајанолидима чија структура је утврђена анализом X-зрака (Mattern et al., 1996). Константа спрезања H-6 ($J=10,4$; 8,5 Hz) са H-5 и H-7 указује на *trans*-диаксијалну расподелу протона на C-5 (α), C-6 (β) и C-7 (α) лактонског прстена што је најчешћа карактеристика сесквитерпенских лактона. Константа спрезања H-1 од 10,4 Hz са H-5 потврђује да су два прстена (петочлани и седмочлани) гвајанолида, који чине основну структуру, међусобно *cis*-повезани. Константа спрезања од 9,3 Hz између H-7 и H-8 потврђује њихову супротну оријентацију као и β оријентацију протона H-8.

Прелиминарна истраживања цитотоксичне активности јанерина показују његову активност на ћелије рака SKMEL, KB, BT-549 и SK-OV-3 (Muhammad et al., 2003).

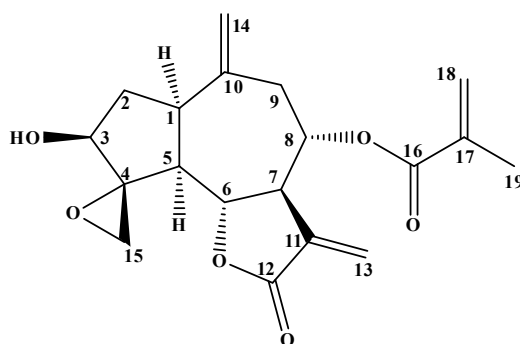


Слика 3.12 ^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце **4** (CDCl_3 , 400,0; 50,3 MHz); најважније корелације добијене COSY спектром (обележене плавом и зеленом болд линијом)

5. 19-Деоксијанерин; деоксирепин

Болман и Зајце (Bohlmann & Ziesche) су први пут изоловали супстанцу из биљне врсте *Ptilostemon chamaepeuce* 1980. године (Bohlmann & Ziesche, 1981). До данас, супстанца је изолована из неколико биљних врста које припадају фамилији Asteraceae: *Ptilostemmon gnaphaloide* (Menichini et al., 1996), *Rhaponticum pulchrum* (Cis et al., 2006), *Cousinia canescens* (Alberto Marco et al., 1993), *Pleiotaxis cf. rugosa* Hoffm. (Bohlmann & Zdero, 1982b). Из рода *Centaurea*, идентификована је код *C. bella* (Daniewski & Nowak, 1993) и *C. incana* (Massiot et al., 1986).

Супстанца је изолована у облику наранџастог уља, а предложена хемијска структура приказана је на **слици 3.13**.



Слика 3.13 5. 19-Деоксијанерин

Оптичка ротација хлороформског раствора супстанце је:

$$[\alpha]_D^{20} + 19,2 \text{ (} c=1,30; \text{CHCl}_3 \text{)}$$

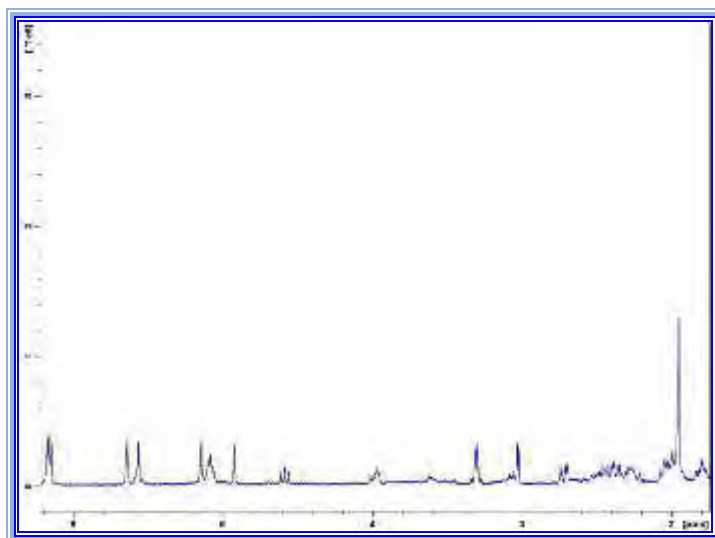
Упоредивањем 1 и 2D NMR спектралних података супстанце **5** (**Табела 3.5**; **Слике 3.14 – 3.15**) са спектрима супстанце **4** (стр.121), уочава се да две супстанце имају идентичан скелет-гвајанолида и да је једина разлика у структури бочног низа који се налази на положају C-8 (**Слика 3.10**). Два дублета на δ_H 6,15 и δ_H 5,63 са константом спрезања 1,8 Hz одговарају геминалним протонима H-18a и H-18b, бочног ланца. Наведени дублети заједно са метил групом која се у облику синглета уочава на δ_H 1,95 одговарају метил метакрилатној групи.

Сигнал на δ_{H} 5,08 као двоструки триплет ($J_{7,8}=8,8$; $J_{8,9a}=4,7$; $J_{8,9b}=3,5$ Hz) одговара H-8. Слично осталим гвајанолидима сматра се да бочни ланац заузима α -положај на C-8, на основу хемијског померања и вредности константи спрезања.

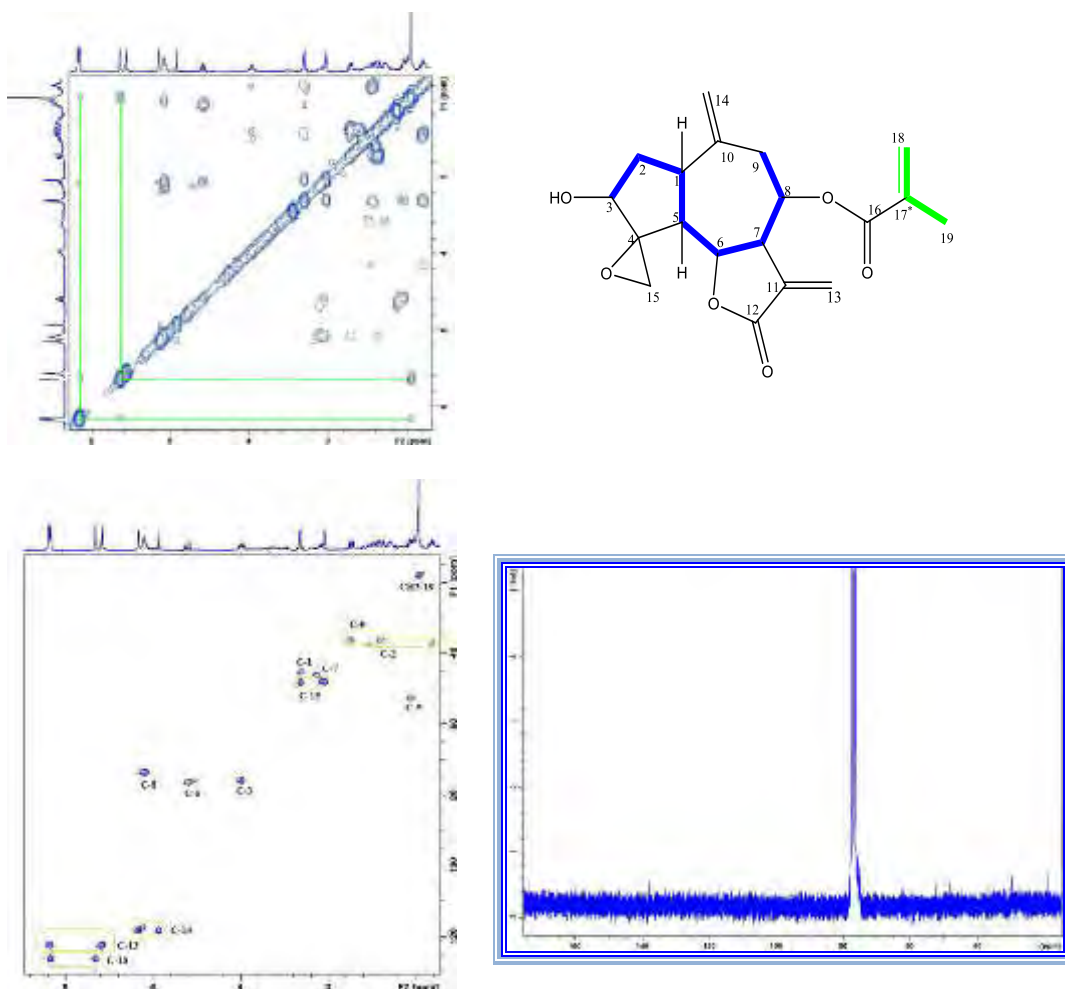
Табела 3.5 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **5** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	45,5	H-1	3,32	*	1
C-2	CH ₂	37,1	H-2a	2,50	<i>m</i>	2
			H-2b	1,82	<i>m</i>	
C-3	CH	76,0	H-3	3,89	<i>dd</i> (J=6,2; 3,8)	1
C-4	C	62,3	-	-	-	-
C-5	CH	52,9	H-5	2,05	<i>dd</i> (J=10,8; 9,2)	1
C-6	CH	76,8	H-6	4,64	<i>t</i> (J=9,2)	1
C-7	CH	47,1	H-7	3,10	<i>tt</i> (J=9,0; 3,5)	1
C-8	CH	73,8	H-8	5,08	<i>tt</i> (J=9,0; 5,0; 3,5)	1
C-9	CH ₂	36,3	H-9a	2,73	<i>dd</i> (J=15,0; 4,7)	2
			H-9b	2,41	<i>dd</i> (J=15,0; 3,5)	
C-10	C	137,5	-	-	-	-
C-11	C	137,3	-	-	-	-
C-12	C=O	165,2	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,1	H-13 ^a	6,17	<i>d</i> (J=3,6)	2
			H-13b	5,56	<i>d</i> (J=3,3)	
C-14	CH ₂	119,3	H-14a	5,14	<i>brs</i>	2
			H-14b	4,92	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	48,6	H-15a	3,31	<i>d</i> (J=3,9)	2
			H-15b	3,02	<i>d</i> (J=3,9)	
C-16	C=O	174,1	-	-	-	-
C-17	C	133,9	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,5	H-18a	6,15	<i>d</i> (J=1,8)	2
			H-18a	5,63	<i>d</i> (J=1,8)	
C-19	CH ₃	18,1	CH ₃ -19	1,95	<i>s</i>	3

* Преклопљен сигнал са H-15a.



Слика 3.14 ^1H -NMR спектар супстанце **5** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

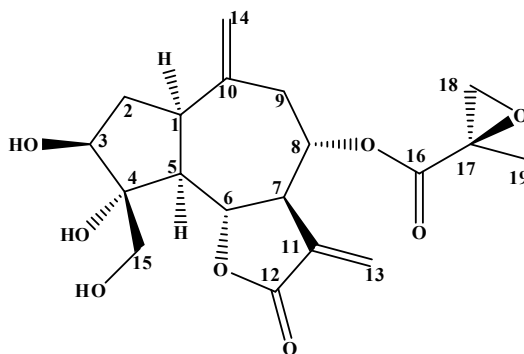


Слика 3.15 ^1H - ^1H COSY, HSQC и ^{13}C -NMR спектри супстанце **5** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); ^1H - ^1H COSY корелација (означено плавом и зеленом болд линијом)

6. Бабилин Б

До сада, супстанца је изолована из две врсте рода *Centaurea*: *C. conifera* L. (Bruno et al., 1998) и *C. babylonica* L. (Bruno et al., 2005).

Супстанца је изолована у облику наранџастог уља и спектроскопском анализом је одређена следећа структура приказана на **слици 3.16**.



Слика 3.16 6. Бабилин Б

Оптичка ротација супстанце је:

$$[\alpha]_D^{20} + 32,7 \text{ (} c=1,10; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

На основу хемијских померања сигнала на $^1\text{H-NMR}$ спектру супстанце закључује се да је супстанца **6** изомер бабилина А (стр.106).

Упоређујући $^1\text{H-NMR}$ спектралне податке (**Табела 3.6**; **Слика 3.17**) супстанце **6** и бабилина А, уочава се разлика у природи бочног ланца код супстанце **6** и бабилина А. Заправо два дублета на δ_{H} 3,15 ($J=5,8$ Hz) и δ_{H} 2,81 ($J=5,8$ Hz) и једна метил група CH_3 -19 која се као синглет јавља на δ_{H} 1,59 одговарају епоксидном прстену у бочном ланцу као што је случај код репина (стр.118).

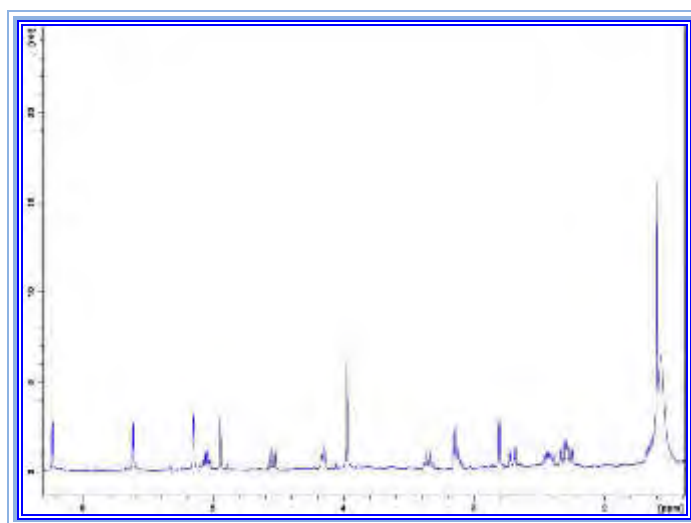
Међутим, поред наведене разлике за бочни ланац, код супстанце **6** уочава се одсуство епоксидног прстена на позицији C-4, а који се јавља и описан је код бабилина А и репина. Заправо синглет на δ_{H} 3,97 (H-15a,b) који интеграцијом даје два протона као и триплет померен ка вишим вредностима хемијских померања δ_{H} 2,30 (H-5; $J=9,8$) и двоструки дублет на δ_{H} 4,15 (H-3; $J=6,0$; 4,8) указују на присуство диолне групе на позицији C-4 (Öküz and Torcu, 1994).

Табела 3.6 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **6** (CDCl_3 , 400,0 MHz)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	43,9	H-1	3,34	q (J=9,4)	1
C-2	CH ₂	37,8	H-2a	2,43	ddd (J=14,2; 10,2; 6,6)	2
			H-2b	1,63	ddd (J=14,2; 8,8; 4,8)*	
C-3	CH	78,2	H-3	4,15	dd (J=6,0; 4,8)	1
C-4	C	84,5	-	-	-	-
C-5	CH	55,1	H-5	2,30	t (J=9,4)	1
C-6	CH	76,9	H-6	4,54	dd (J=11,6; 9,4)	1
C-7	CH	47,1	H-7	3,12	tt (J=9,6; 3,5)*	1
C-8	CH	75,3	H-8	5,06	m	1
C-9	CH ₂	37,5	H-9a	2,70	dd (J=14,8; 5,2)	2
			H-9b	2,27	dd (J=14,8; 3,7)*	
C-10	C	141,5 [‡]	-	-	-	-
C-11	C	137,5	-	-	-	-
C-12	C=O	168,2	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,1	H-13a	6,23	d (J=3,6)	2
			H-13b	5,51	d (J=3,3)	
C-14	CH ₂	117,6	H-14a	5,15	brs	2
			H-14b	4,98	brs	
C-15	CH ₂	64,2	H-15a,b	3,97	brs	2
C-16	C=O	172,5	-	-	-	-
C-17	C	53,3	-	-	-	-
C-18	CH ₂	52,6	H-18a	3,15	d (J=5,8)	2
			H-18a	2,81	d (J=5,8)	
C-19	CH ₃	17,0	CH ₃ -19	1,59	s	3

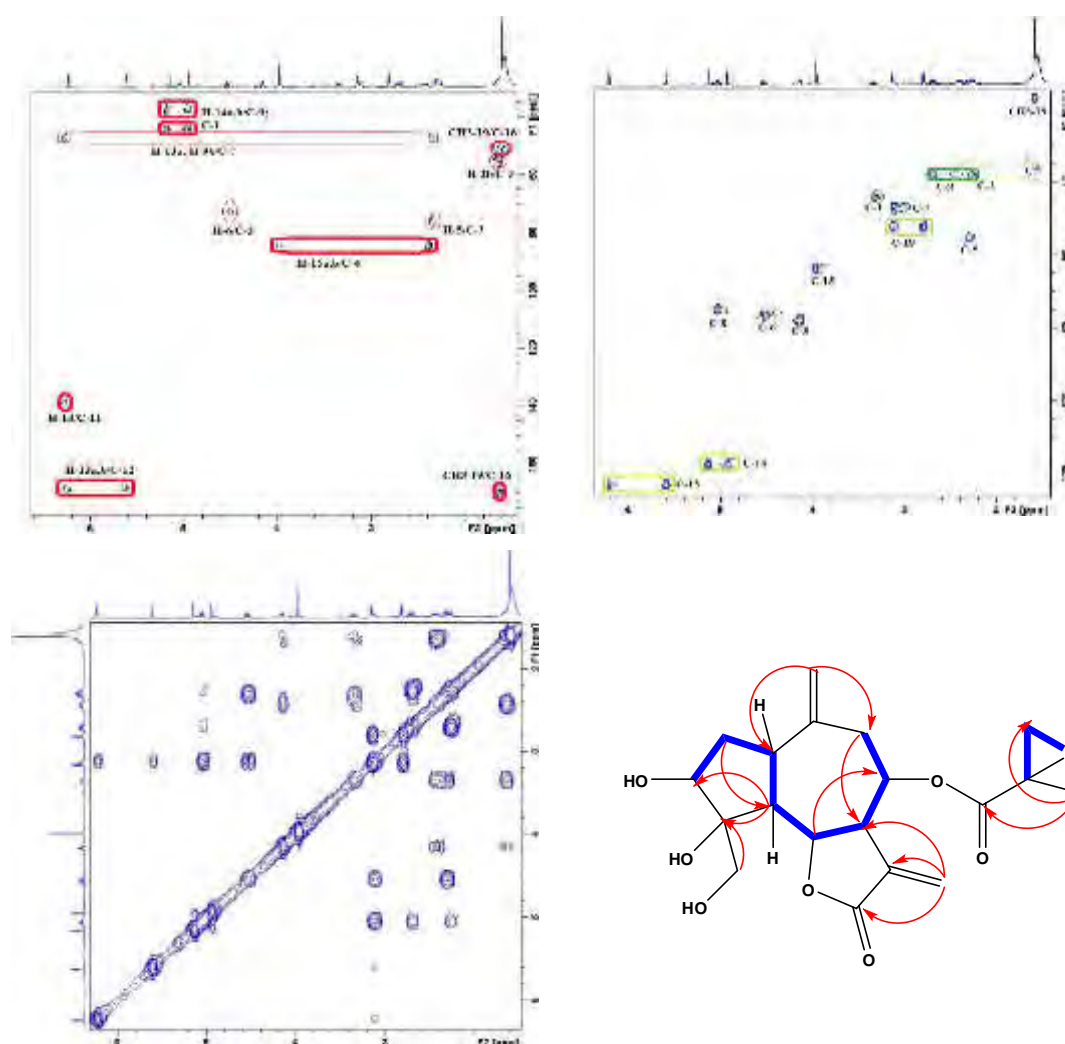
* Вредности су добијене на основу вредности добијених на HSQC и HMBC спектру.

* Преклопљени сигнали: H-2b/ H-9b; H-2b/H-5; [‡] литературни податак (Bruno et al. 2005).

Слика 3.17 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **6** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Даља потврда структуре добијена је помоћу 2D-NMR спектра (Слика 3.18). Основна структура гвајанолида **6** утврђена је помоћу COSY спектра, док је помоћу HSQC спектра утврђен положај протонованих угљеникових атома супстанце **6**.

На HMBC спектру корелација између синглета који одговара метил групи CH₃-19 са угљениковим атомима на δ_C 172,5 (C-16), δ_C 53,3 (C-17) и δ_C 52,6 (C-18), недвосмислено потврђује присуство епоксидног прстена у бочном низу (Bruno et al., 2005).



Слика 3.18 HMBC, HSQC и COSY спектри супстанце **6** (CDCl₃; 400,0 MHz); Корелације добијене на основу HMBC спектра (црвене стрелице) и ¹H-¹H COSY корелације (плаве болд линије)

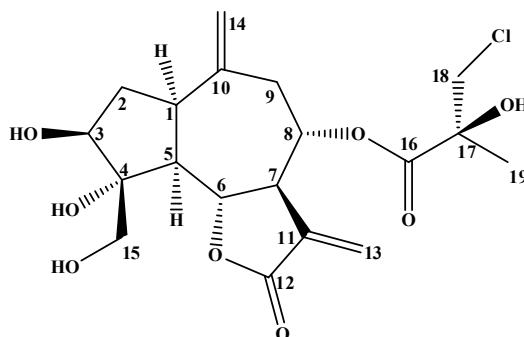
Такође, корелација између H-15a,b са угљеником на δ_C 84,5 (C-4) потврђује присуство метил хидроксилне групе на C-4. Хемијско померање C-4 (> 80 ppm) је карактеристично за присуство још једне хидроксилне групе за исти угљеников атом (диол) (Bruno et al., 2005).

Релативна стереохемија супстанце **6** потврђена је упоређивањем вредности константи спрезања вициналних протона и хемијских померања пикова угљеникових атома са претходно публикованим резултатима (Öküz & Торсу, 1994, Bruno et al., 2005).

7. Цебелин Ј

До сада је супстанца изолована из неколико врсти рода *Centaurea*: *C. bella* Trautv., (Nowak et al.; 1989, Nowak, 1993); *C. glastifolia* L., (Öküz & Торсу, 1994); *C. babylonica* L., (Bruno et al., 2005).

Супстанца је изолована у облику жуто-наранџастог уља и одређена јој је следећа структура приказана на **слици 3.19**.



Слика 3.19 7. Цебелин Ј

Оптичка ротација супстанце је:

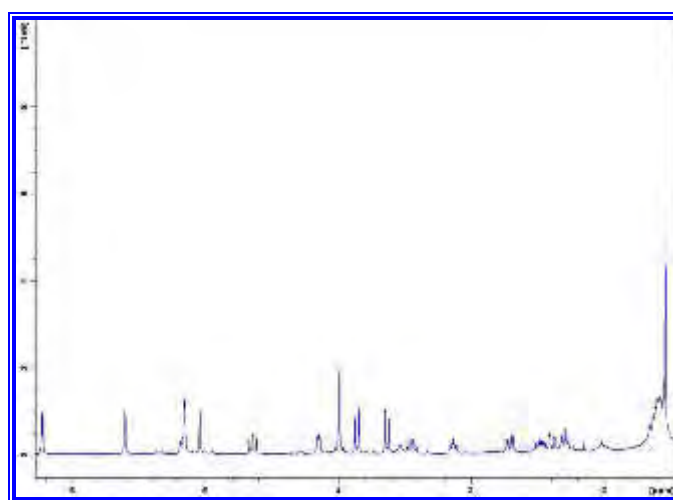
$$[\alpha]_D^{20} + 60,7 \text{ (} c=1,00; \text{CHCl}_3 \text{)}.$$

Супстанца **7** је диастероизомер Бабилина Б.

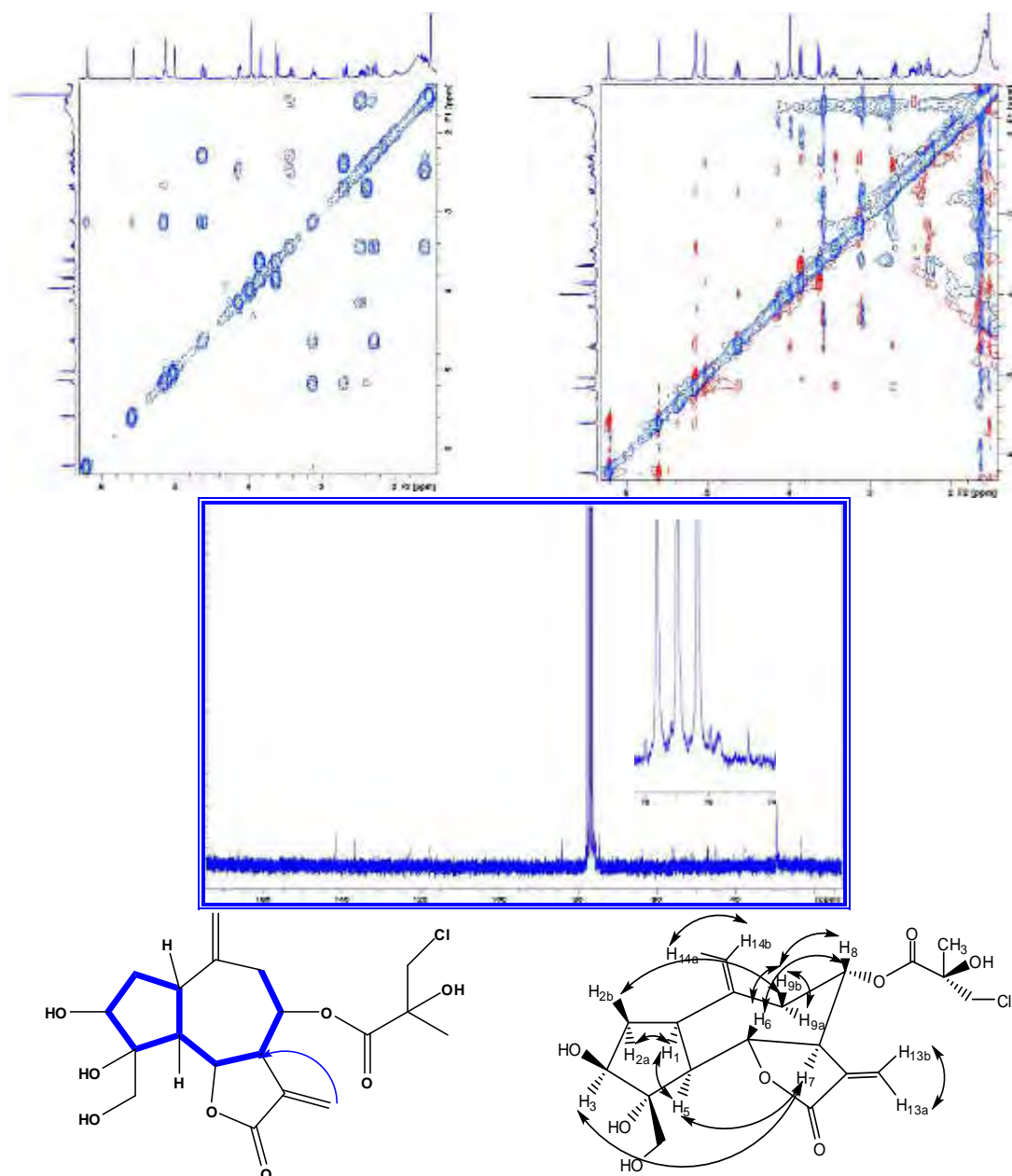
Упоређивањем $^1\text{H-NMR}$ спектра уочава се сличност у структури две наведене супстанце (**Табела 3.7**; **Слика 3.20**). Једина разлика је присуство структурно другачијег бочног ланца на позицији C-8 код супстанце **7**.

Табела 3.7 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце 7 (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	45,2	H-1	3,44	<i>q</i>	1
C-2	CH ₂	37,8	H-2a	2,47	<i>ddd</i> (J=14,3; 10,2; 6,5)	2
			H-2b	1,61	<i>ddd</i> (J=14,3; 9,2; 3,4)	
C-3	CH	77,2	H-3	4,14	<i>dd</i> (J=6,5; 3,4)	1
C-4	C	84,3	-	-	-	-
C-5	CH	56,0	H-5	2,28	<i>t</i> (J=9,4)	1
C-6	CH	77,9	H-6	4,64	<i>dd</i> (J=11,4; 9,4)	1
C-7	CH	47,1	H-7	3,10	<i>ttt</i> (J=10,8; 9,4; 3,3)	1
C-8	CH	75,9	H-8	5,18	<i>dd</i> (5,3; 3,3)	1
C-9	CH ₂	36,6	H-9a	2,70	<i>dd</i> (J=15,0; 4,8)	2
			H-9b	2,40	<i>dd</i> (J=15,0; 3,5)	
C-10	C	141,8	-	-	-	-
C-11	C	136,8	-	-	-	-
C-12	C=O	166,2	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,9	H-13a	6,22	<i>d</i> (J=3,5)	2
			H-13b	5,60	<i>d</i> (J=3,3)	
C-14	CH ₂	118,1	H-14a	5,15	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,03	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	63,4	H-15a,b	3,99	<i>brs</i>	1
C-16	C=O	173,1	-	-	-	-
C-17	C	74,8	-	-	-	-
C-18	CH ₂	51,2	H-18a	3,86	<i>d</i> (J=11,3)	2
			H-18a	3,63	<i>d</i> (J=11,3)	
C-19	CH ₃	23,5	CH ₃ -19	1,55	<i>s</i>	3

Слика 3.20 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце 7 (CDCl_3 , 400,0 MHz)

Уместо епоксидног прстена који се налази у бочном ланцу бабилина Б, присуство два дублета на δ_{H} 3,86 и δ_{H} 3,63 (H-18a,b) и једног оштарог синглета на δ_{H} 1,53 (CH₃-19) са хемијским померањима угљеникових атоми на δ_{H} 51,2 (C-18) и δ_{H} 23,5 (C-19) добијених са ¹³C-NMR спектра (Слика 3.21), указују на присуство 2-хлорметил-2-хидрокси пропионата као бочног низа на C-8, који је такође идентификован код хлорохисопифолина С (стр.112).



Слика 3.21 ¹H-¹H COSY, NOESY и ¹³C-NMR спектри супстанце 7 (CDCl₃; 400,0; 50,3 MHz); Шематски приказ ¹H-¹H COSY корелација (плава болд линија); Конформација супстанце 7 на основу ¹H-NMR и ¹H ¹H-NMR и NOESY спектра

Што се тиче супституције на позицији С-4, присуство широког синглета на δ_{H} 3,99, триплета на δ_{H} 2,38 ($J=9,5$ Hz; H-5), као и двоструког дублета на δ 4,14 ($J=3,5$; 6,2 Hz; H-3) указују на присуство једне метил хидроксилне и једне хидроксилне групе (диол) на С-4 као код бабилина Б (стр. 128) (Öküz and Torcu, 1994). Такође, на основу ^{13}C -NMR спектра хемијска померања за: С-4 на δ_{C} 84,3 и С-15 на δ_{C} 63,4 потврђују ову чињеницу.

Структура основног скелета гвајанолида **7** потврђена је помоћу COSY спектра (Слика 3.21):

Спин систем А: H-7/H-13a,b

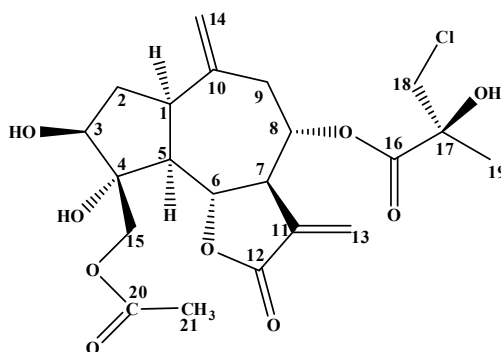
Спин систем Б: H-1/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9a,b

Спин систем Ц: H-1/H-2a,b/H-3.

Релативна конформација свих хиралних центара супстанце **7** добијена је на основу ^1H - ^1H NOESY спектра. $n\text{Oe}$ корелација између H-1 и H-5 потврђује *cis* везивање између петочланог и седмочланог прстена гвајанолида *trans*-диаксијална орјентација протона С-5 (α), С-6 (β) и С-7 (α) добијена је на основу $n\text{Oe}$ крос пикова између H-5 и H-7, као и H-6 са H-8. $n\text{Oe}$ корелација између H-8 са H-6 и H-9b потврђује α -оријентацију естарског бочног ланца на положају С-8, док $n\text{Oe}$ крос-пик између H-7 и H-3 потврђују β -позицију хидроксилне групе на С-3. Одсуство $n\text{Oe}$ крос-пика између метиленеских протона на С-15 и H-5, указује на могућу β -орјентацију метил хидроксилне групе на положају С-4 (Слика 3.21). Релативна стереохемија С-18 (бочног низа), потврђена је на основу хемијских померања протона: H-13a,b; (δ_{H} 6,22 и δ_{H} 5,60); H-14a,b (δ_{H} 5,15 и δ_{H} 5,03), као и присуства протона H-8 на δ_{H} 5,18. У случају С-18 епимера, хемијска померања H-13a,b су много ближа док су пикови H-14a,b одвојени (Öküz and Torcu, 1994, Merrill and Stevens, 1985).

8. Рхапосерин

До сада, супстанца је изолована из биљних врста *Rhaponticum serratuloides* (Berdin et al., 1999) (род *Rhaponticum* Hill; син. *Stemmacantha* Cass.). Супстанца је сада први пут изолована из врсте рода *Centaurea*, што је у сагласности са досада публикованим једињењима из ове биљне врсте. Супстанца је изолована у облику белих кристала и на основу спектроскопских података одређена је следећа структура прикатана на **слици 3.22**.



Слика 3.22 8. Рхапосерин

Оптичка ротација хлороформског раствора овог једињења има вредност:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 75,0 \text{ (} c=1,20; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

У IR (CaF₂) спектру идентификоване су следеће функционалне групе: 3540 cm⁻¹ (OH), 3095 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹ (C=CH₂), 1765 cm⁻¹ (γ-лактон), 1715 cm⁻¹ (C=O), 1215 cm⁻¹, 1140 cm⁻¹, 1060 cm⁻¹ (C-O).

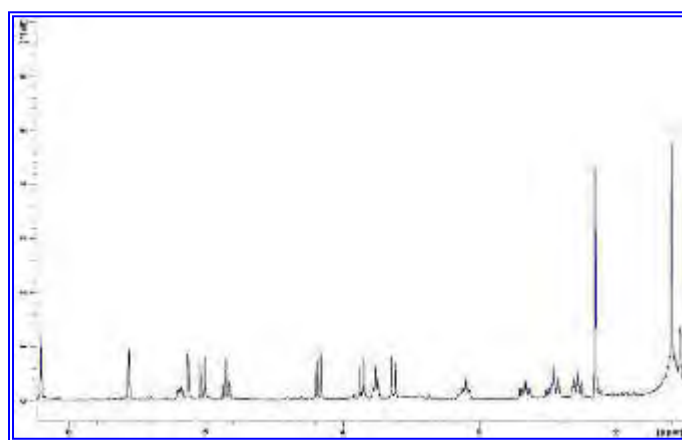
На ¹H-NMR спектру супстанце **8** снимљеном у CDCl₃ уочавају се следећи карактеристични пикови (**Табела 3.8**; **Слика 3.23**): два метинска протона: H-1 као двоструки триплет на δ_H 3,54 и H-5 као триплет на δ_H 2,28 (J=10,4 Hz), три оксиметинска протона H-3 као триплет на δ_H 3,75 (J=7,2), H-6 као двоструки дублет на δ_H 4,83 (J=10,4; 9,2 Hz) и H-8 као двоструки дублет на δ_H 5,20 (J=10,2; 5,0 Hz). У алифатичном делу спектра налазе се сигнали који одговарају протонима H-2a, H-2b на (δ_H 2,46 и δ_H 1,77) као и H-9a, H-9b на (δ_H 2,66 и δ_H 2,43). Наведени сигнали су део скелета гвајанолида. Поред наведених, на ¹H-NMR спектру се уочавају егзоциклични метиленски протони H-13a и H-13b у облику два дублета на δ_H 6,20 (J=3,0 Hz) и δ_H 5,57 (J=2,8 Hz) као

и протон H-7 у облику триплета на δ_{H} 3,10 (J=9,2 Hz) потврђујући присуство α -метилен γ -лактонског прстена.

Табела 3.8 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **8** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	45,7	H-1	3,52	<i>dt</i> (J=9,2; 7,2)	1
C-2	CH ₂	37,0	H-2a	2,46	<i>ddd</i> (J=14,9; 9,9; 6,3)	2
			H-2b	1,62	<i>dd</i> (J=14,9; 7,2)	
C-3	CH	76,1	H-3	3,75	<i>t</i> (J=7,2)	1
C-4	C	84,0	-	-	-	-
C-5	CH	56,5	H-5	2,28	<i>t</i> (J=10,4)	1
C-6	CH	76,4	H-6	4,83	<i>dd</i> (J=10,4; 9,2)	1
C-7	CH	46,3	H-7	3,10	<i>t</i> (J=9,2)	1
C-8	CH	75,7	H-8	5,20	<i>dd</i> (J=10,2; 5,0)	1
C-9	CH ₂	35,0	H-9a	2,67	<i>dt</i> (J=15,4; 5,0)	2
			H-9b	2,43	<i>dd</i> (J=15,4; 3,5)	
C-10	C	141,6	-	-	-	-
C-11	C	137,0	-	-	-	-
C-12	C=O	168,2	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,5	H-13a	6,20	<i>d</i> (J=3,0)	2
			H-13b	5,57	<i>d</i> (J=2,8)	
C-14	CH ₂	118,0	H-14a	5,17	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,09	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	66,0	H-15a	4,98	<i>d</i> (J=12,6)	2
			H-15b	4,20	<i>d</i> (J=12,6)	
C-16	C=O	172,6	-	-	-	-
C-17	C	74,2	-	-	-	-
C-18	CH ₂	51,5	H-18a	3,85	<i>d</i> (J=11,8)	2
			H-18a	3,61	<i>d</i> (J=11,8)	
C-19	CH ₃	23,1	CH ₃ -19	1,54	<i>s</i>	3
C-20	OCO(CH ₃)	172,2	-	-	-	-
C-21	OCO(CH ₃)	20,9	CH ₃ -21	2,16	<i>s</i>	3

* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC спектра.



Слика 3.23 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **8** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

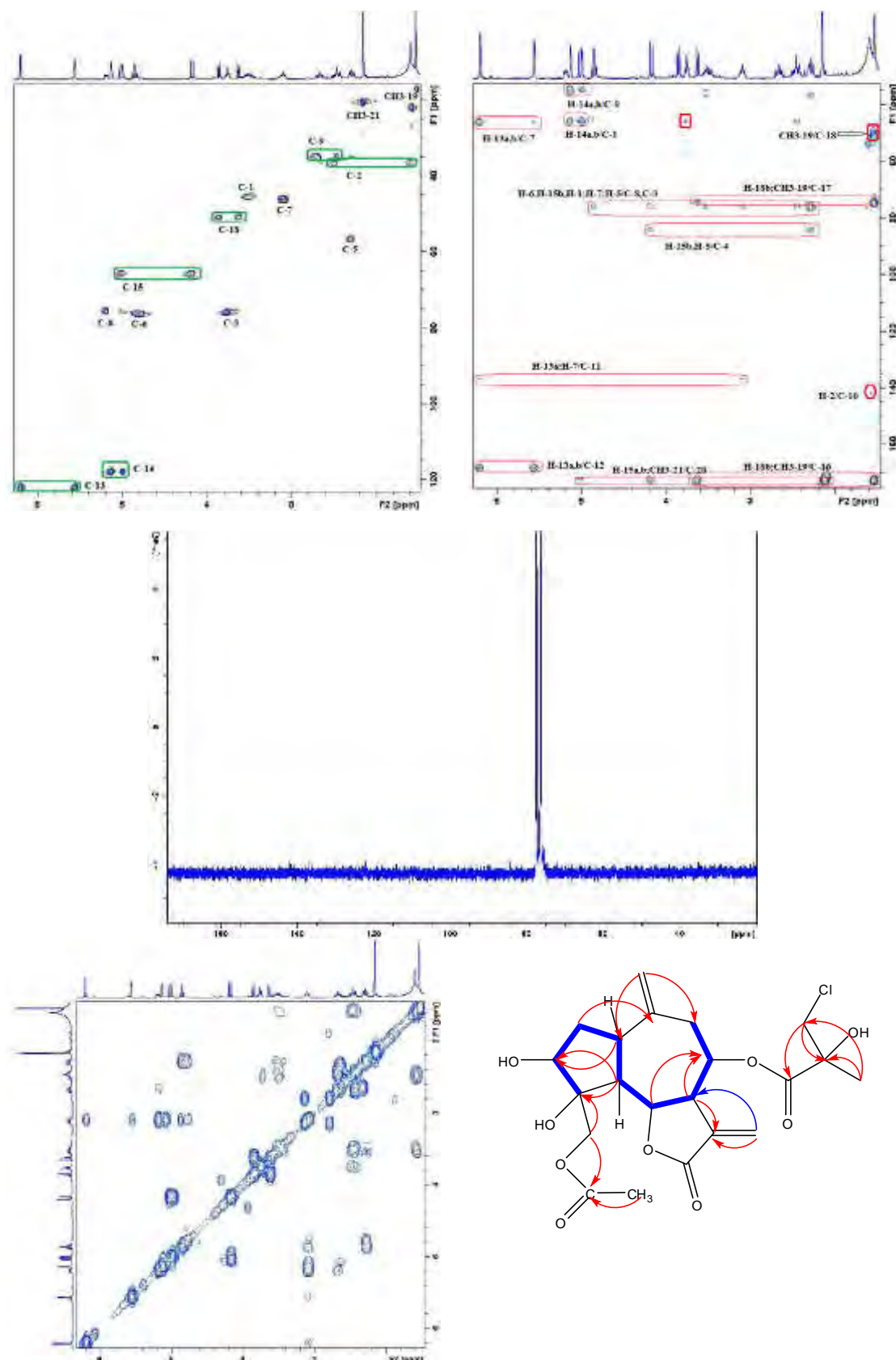
Основна структура представљеног гвајанолида је потврђена помоћу COSY спектра, односно следећих корелација које се на спектру запажају: H-13/H-7; H-7/H-6; H-6/H-5; H-5/H-1; H-1/H-2a/H2b; H-2a/H2b/H-3; H-7/H-8; и H-8/H-9a/H-9b (Слика 3.24).

На $^1\text{H-NMR}$ спектру се такође уочавају сигнали за метил групе. Један од синглета се налази на δ_{H} 1,54 који са два дублета на δ_{H} 3,85 и 3,61 ($J=11,8$ Hz) указује на присуство метиленхлорида у бочном ланцу естарски везаном за положај C-8 (Слика 3.23). Други сигнал карактеристичан за метил групу уочава се у облику оштрог синглета на δ_{H} 2,16. Наведено хемијско померање је карактеристично за метилацетокси групу, везану за угљеников атом C-15 (HMBC спектар, Слика 3.24). Геминални протони H-15a,b уочавају се у облику два дублета на δ_{H} 5,02 и δ_{H} 4,20 а њихово померање ка вишим вредностима поља у односу на померања које се запажају када је присутна хидроксилна група на истој положају (супстанца **6** на позицији δ_{H} 3,95; стр. 128) се објашњава електрофилним карактером ацетокси групе.

Два типична дублета на δ_{H} 5,17 и δ_{H} 5,09 су карактеристична за егзоцикличне протоне двоструке везе H-14a,b.

На основу HSQC спектра одређена су померања угљеникових атома централног скелета гвајанолида (Слика 3.24): три метинска угљеникова атома: два одговарају суседним атомима угљеника C-1 и C-5 (δ_{C} 45,7; δ 56,6), а један угљенику C-7 α -метилен γ -лактонског прстена који се уочава на δ_{C} 46,3. Три оксиметинска угљеника C-3 петочланог прстена на δ_{C} 76,1; C-6 α -метилен γ -лактонског прстена на δ_{C} 76,4 и естерификовани C-8 на δ_{C} 75,7. Два алифатична метиленска угљеника: C-2 и C-9 на δ_{C} 37,0 и δ_{C} 35,0. У олефинском делу спектра два пика који одговарају егзоцикличним метиленским угљениковим атомима C-13 и C-14 на δ_{C} 122,5 и δ_{C} 118,0. Угљеников атом бочног низа који одговара хлорованом метиленском угљенику C-18 налази се на δ_{C} 51,5, као и C-19 метил група на δ_{C} 23,1. Како је за C-15 угљеников атом везана ацетокси група наведени угљеников атом налази се на δ_{C} 66,0, док се метил угљеников атом ацетокси групе (C-21) уочава на δ_{C} 20,9.

На основу HMBC спектра потврђено је позиција ацетокси групе, с обзиром да се уочава укрштање пикова између H-15a,b/C-20 ($\text{OCO}(\text{CH}_3)$) и CH_3 -21/C-20.



Слика 3.24 HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^{13}C -NMR спектри супстанце **8** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Укрштања на HMBC спектру (представљено црвеним стрелицама од ^1H према ^{13}C) и ^1H - ^1H COSY корелација (плава болд линија)

Помоћу НМВС и ^{13}C -NMR спектра идентификовани су кватернерни угљеникови атоми молекула:

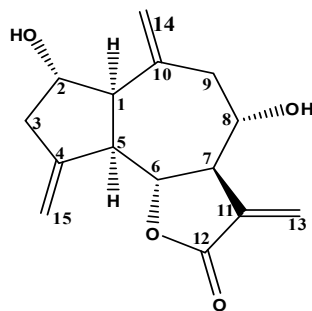
- С-4 помоћу унакрсног пика између Н-15, Н-5/С-4,
- С-11 помоћу корелације између Н-13, Н-7/С-11,
- С-17 бочног ланца помоћу укрштања пикова између CH_3 -19/С-17,
- С-10 корелација између Н-2/С-10,

као и карбонилне групе α -метилен γ -лактонског прстена (С-12 на δ_{C} 168,2) и бочног ланца (С-16 на δ_{C} 172,6) (Слика 3.24).

Релативна стереохемија супстанце **8** добијена је упоређивањем константи спрезања добијеног за сваки протон са вредностима публикованим у литератури за сличне гвајанолиде (Berdin et al., 1999). Константа спрезања од $J_{5,6}=10,4$ и $J_{6,7}=9,5$ потврђује присуство *trans* α -метилен γ -лактонског прстена. Константа купловања од $J_{7,8}=10,2$ одговара β -оријентацији Н-8. У сагласности са ^{13}C -NMR публикованим подацима, конфигурација асиметричног центра С-17 угљениковог атома бочног ланца је идентична бочном ланцу код centaурепенсина и акроптилина (Merrill and Stevens 1985), чија је структура претходно одређена помоћу кристалографске методе X-зрачења (Stevens and Wong 1982). На основу представљених спектралних података тачна конфигурација 4,15-О-ацетокси групе није могла бити одређена. Међутим, посматрајући претходно изоловане и описане гвајанолиде код којих је С-4 хидроксилна група α оријентисана и с обзиром на то да је утврђено да сви слични гвајанолиди изоловани из рода *Centaurea* садрже α -оријентисану С-4 функционалну групу са кисеоником (Stevens and Wong, 1986), закључено је да у сагласности са биосинтетичким путем биљке, и на основу горе наведених литеретурних података, супстанца **8** садржи α -оријентисану хидроксилну групу на положају С-4 (Слика 3.24).

9. 2 α ,8 α -Дихидрокси дехидрокостунолид;3 α 8 α -дихидрокси-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-гвајан-4(15),10(14),11(13)- триен-6,12-олид

Супстанца **9** је нови природни производ, изолована је у облику жутог уља и одређена је следећа структура приказана на **слици 3.25**.



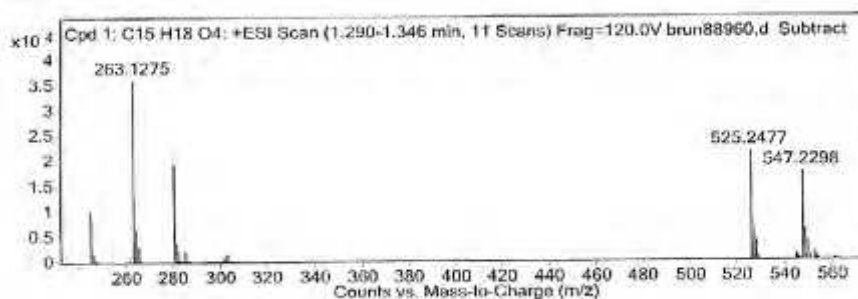
Слика 3.25 9. 2 α ,8 α -Дихидрокси дехидрокостунолид

Супстанца је претходно идентификована као синтетички дериват саурина (Kushnir & Kuzovkov, 1968), али до сада никада није изолована из природног ресурса.

Вредност оптичке ротације хлороформског раствора супстанце **9** је:

$$[\alpha]_D^{20} + 55,56 \text{ (} c=0,54; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

На масеном спектру супстанце **9** уочава се јон пик на m/z 263,1275 (израчунато 263,1283 за $[M+H]^+$), што одговара молекулској формули $C_{15}H_{18}O_4$ (**Слика 3.26**).



Слика 3.26 Масени спектар супстанце **9** {EIMS (проба) 120 eV, m/z (рел. интезитет.) 547,2297 $[2M+Na]^+$ (49,98), 525,2477 $[2M+H]^+$ (62,17), 280,154 $[M+NH_4]^+$ (52,84), 263,1275 $[M+H]^+$ (100), 245,117 $[(M+H)-H_2O]^+$ (27,93)}

На IR (CaF₂) спектру уочава се широк пик карактеристичан за хидроксилну групу на (3600 cm⁻¹), γ-лактон (1700⁻¹ cm⁻¹) и метиленску групу (1665⁻¹ cm⁻¹).

1 и 2D-NMR подаци указују да супстанца **9** припада групи 2-хидрокси гвајанолида (Табела 3.9; Слика 3.27; 3.28).

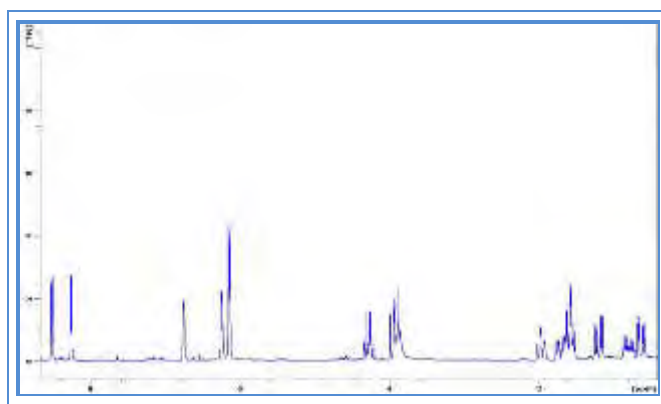
Табела 3.9 ¹H-NMR и ¹³C-NMR* супстанце **9** (CDCl₃; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	57,5	H-1	2,80	<i>dd</i> (J=9,6; 7,8) [#]	1
C-2	CH	71,5	H-2	3,94	<i>ddd</i> (J=7,8; 5,6; 3,5)	1
C-3	CH ₂	41,5	H-3 ^a	2,60	<i>dd</i> (J=14,2; 5,6)	2
			H-3 ^b	2,32	<i>dd</i> (J=14,2; 3,5)	
C-4	C	141,1	-	-	-	-
C-5	CH	50,9	H-5	2,99	<i>dd</i> (J=10,4; 9,6)	1
C-6	CH	78,6	H-6	3,98	<i>dd</i> (J=10,4; 9,0)	1
C-7	CH	50,3	H-7	2,78	<i>dddd</i> (J=9,0; 8,2; 3,2; 2,8) [#]	1
C-8	CH	73,2	H-8	4,15	<i>ddd</i> (J=8,2; [‡] ;3,3)	1
C-9	CH ₂	41,1	H-9 ^a	2,85	<i>qd</i> (J=14,0, 3,3)	1
			H-9 ^b	2,39	<i>qt</i> (J=14,0, 5,6)	1
C-10	C	145,8	-	-	-	-
C-11	C	137,3	-	-	-	-
C-12	C=O	169,2	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,4	H-13 ^a	6,28	<i>dd</i> (J=3.2, 0.7)	2
			H-13 ^b	6,14	<i>dd</i> (J=2.8, 0.7)	
C-14	CH ₂	118,8	H-14 ^a	5,08	<i>d</i> (J=1.4)	2
			H-14 ^b	5,06	<i>d</i> (J=1.4)	
C-15	CH ₂	112,8	H-15 ^a	5,37	<i>d</i> (J=2.2)	2
			H-15 ^b	5,12	<i>d</i> (J=2.2)	

[#] Иако су пикови делимично преклопљени J је јасно одређен на основу ¹H-NMR спектра.

* Вредности су утврђене на основу HSQC и HMBC података.

[‡] Нејасно уочљива вредност спрезања.



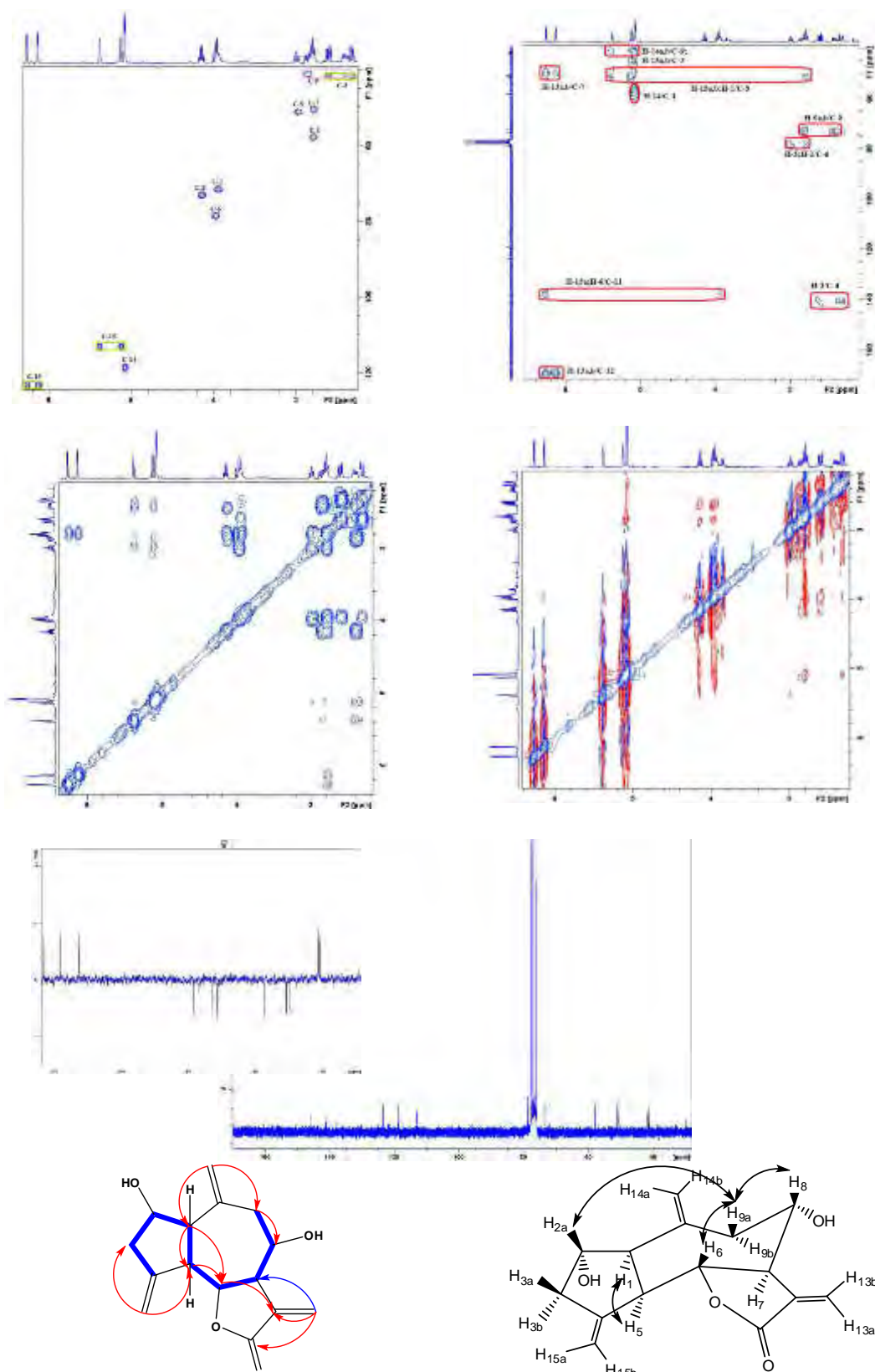
Слика 3.27 ¹H-NMR спектар супстанце **9** (CDCl₃, 400,0 MHz)

На основу ^{13}C NMR и DEPT/ ^{13}C NMR спектралних података супстанце **9** закључује се да супстанца садржи једну карбонилну групу; шест олефинских угљеникових атома и пет алифатичних угљеникових атома. Расподела протонских и угљеникових сигнала омогућила нам је да закључимо да супстанца **9** садржи пет кватернерних угљеникових атома, три sp^2 олефинска угљеникова атома, три оксиметинска угљеника, три алифатичне метинске групе и две алифатичне метиленске групе (Слика 3.28).

На основу ^1H -NMR спектра било је евидентно одсуство сигнала бочног ланца. Помоћу ^1H - ^1H COSY спектра утврђени су пикови протона који чине α -метилен γ -лактонски прстен: два двострука дублета на δ_{H} 6,28 ($J=3,2; 0,7$ Hz) и δ_{H} 6,14 ($J=2,8; 0,7$ Hz) карактеристични за егзоцикличне протоне лактонског прстена. H-13a,b су у корелацији са дублет дублет дублет дублетом на δ_{H} 2,78 ($J=9,0; 8,2; 3,2; 2,8$) карактеристичан за протон H-7. Даље, корелација наведеног сигнала H-7 са двоструким дублетом на δ_{H} 3,98 ($J=10,4; 9,0$ Hz) као и квинтетом на δ_{H} 4,15 ($J=8,2$ Hz), омогућила је идентификацију оксиметинских протона H-6 и H-8 (Слика 3.27; 3.28).

Одсуство сигнала који одговарају бочном ланцу у молекулу као и померање два наведена сигнала оксиметинских протона (H-6, H-8) ка нижим хемијским померањима (више вредности поља) у односу на претходно описане гвајанолиде, наводе да се код супстанце **9** на положају C-8 налази слободна -OH група.

На основу ^1H - ^1H COSY спектра, утврђени су положаји и осталих протона у молекулу. Сигнал протона H-6 је у корелацији са дублет дублетом δ_{H} 2,99 ($J=10,4; 9,6$ Hz) који одговара протону H-5, а који је у корелацији са двоструким дублетом на δ_{H} 2,80 ($J=9,6; 7,8$ Hz), сигналом карактеристичним за протон H-1. Сигнал карактеристичан за протон H-1 је у корелацији са троструким дублетом на δ_{H} 3,94 ($J=7,8; 5,6; 3,5$ Hz) који одговара протону H-2. Померање сигнала протона H-2 ка вишим хемијским померањима указује на присуство хидроксилне групе на позицији C-2. Јасна корелација између сигнала протона H-2 са дублет дублет дублетом дублетом на δ_{H} 2,60 ($J=14,2; 5,6; 3,5$ Hz) и дублет дублетом на δ_{H} 2,32 ($J=14,5; 3,5$), који су међусобно у корелацији указује на присуство метиленске групе на позицији C-3.



Слика 3.28 HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR/DEPT, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце **9** (CDCl_3 , 400,0; 50,3 MHz); Корелације добијене на основу HMBC спектра (означене црвеним стрелицама ^{13}C to ^1H) и ^1H - ^1H COSY корелација (плава болд линија); Предложена конформација **9** добијена на основу ^1H -NMR и ^1H - ^1H NOESY спектра.

Са друге стране, сигнал протона Н-8 је у корелацији са геминалним протонима (Н-9а,б), који се уочавају као квартет дублета на δ_{H} 2,85 ($J=14,0$; 3,3 Hz) и квартет триплета на δ_{H} 2,39 ($J=14,0$; 5,6 Hz).

Потврда основне конфигурације гвајанолида добијена је на основу HSQC и HMBC спектралних података (Слика 3.28).

HSQC спектар супстанце **9** омогућио је евиденцију:

- Три метинска угљеника C-1, C-5 и C-7 (δ_{C} 57,5; δ_{C} 50,9; δ_{C} 50,3),
- Три оксиметинска угљеника C-6, C-8 и C-2 (δ_{C} 78,3; δ_{C} 73,2 и δ_{C} 71,5),
- Два алифатична метиленска угљеника C-3 и C-9 (δ_{C} 41,5 и δ_{C} 41,1),
- Три sp^2 метиленска угљеника C-13, C-14 и C-15 (δ_{C} 123,4, δ_{C} 118,8 и δ_{C} 112,8).

Хетеронуклерана вишеструка кохеренција ^1H - ^{13}C (HMBC) омогућила је одређивање положаја кватернерних угљеникових атома:

- C-12 (δ_{C} 169,2) на основу укрштања Н-13а,б/C-12,
- C-11 (δ_{C} 137,3) на основу укрштања Н-13а, Н-6/C-11,
- C-4 (δ_{C} 141,1) на основу корелације Н-3/C-4.

С обзиром на то да на HMBC спектру није уочено укрштање које би дало вредност кватернерног угљениковог атома на положају C-10, хемијско померање сигнала од δ 145,8 утврђено је на основу ^{13}C NMR спектра.

Релативна стереохемија супстанце **9** добијена је на основу хомонуклераног ^1H - ^1H NOESY спектра, као и поређењем хемијских померања и константи спрезања сигнала вициналних протона и угљеника са вредностима публикованим до сада (Bohlman and Gupta, 1982; Daniewski and Nowak, 1993, Stevens and Wong, 1986).

Корелација nOe између Н-8, Н-6 и Н-2 са Н-3а и Н-9а указује да три наведена протона имају исту оријентацију. Такође, одсуство nOe корелације између Н-6 и Н-7, Н-5, као и вредности константи спрезања $J_{5,6}=10,4$ Hz и $J_{6,7}=9,0$ Hz потврђују *trans*-диаксијалну расподелу протона лактонског прстена C-5 (α), C-6 (β) и C-7 (α). На основу наведеног закључује се да су Н-8 и Н-2 β -оријентисани.

Доле наведени литературни подаци омогућили су утврђивање β -оријентације протона Н-8:

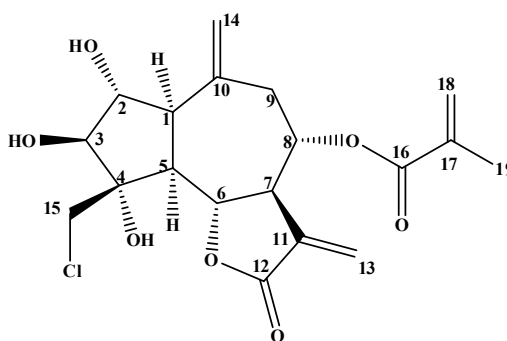
- Велика спин-спин константа спрезања између Н-7 и Н-8 од 8,2 Hz указује на њихов *trans*-положај. Важно је напоменути да код 2-хидрокси гвајанолида, константа спрезања између Н-7 и Н-8 је обично око 2,0 Hz у случају *cis*-оријентације (Bohlman & Gupta, 1982c).
- Сваки од Н-13 протона уочава се у облику двоструких дублета што се објашњава одговарајућим експерименталним спин утицајима и резултат је геминалног купловања Н-13a,b протона, као и алилног купловања између Н-13a,b и 8β -Н; поред тога Н-13b сигнал је померен ка вишим вредностима, што је директан утицај 8α -ОН групе (Yoshioka & Mabry, 1971), док Н-6 није под овим утицајем. У случају 8β -ОН, сигнал Н-6 је померен ка вишим хемијским померањима (нижим вредностима поља) због утицаја 8β -хидроксилне групе, док се код сигнала Н-13b не уочавају промене пошто није под утицајем хидроксилне групе (Bohlman & Gupta, 1982).

Анализа X-зрацима неких 2-хидрокси гвајанолида претходно изолованих из врста рода *Centaurea* потврђује да се седмочлани прстен налази у облику *twist chair* конформације, док је петочлани прстен у суштини планаран. Како је петочлани прстен у равни, константа купловања између *trans*-оријентисаних протона Н-1 и Н-2 није исувише велика, већ око 6-9 Hz (Stevens and Wong, 1986). У сагласности са овим податком добијена константа спрезања $J_{1,2}=7,8$ Hz потврђује *trans*-расподелу Н-1 и Н-2 (Слика 3.28).

10. Хлорорепдиолид

До сада, супстанца је изолована из две врсте рода *Centaurea*: *C. repens* L. (Stevens and Wong, 1986); *C. bella* Trautv. (Nowak et al., 1989; Nowak et al., 1993), као и из биљке *Leuzea carthamoides* (Nowak et al., 1988).

Супстанца је изолована у облику светло-жутих кристала и спектроскопском анализом је одређена следећа структура приказана на **слици 3.29**.



Слика 3.29 10. Хлорорепдиолид

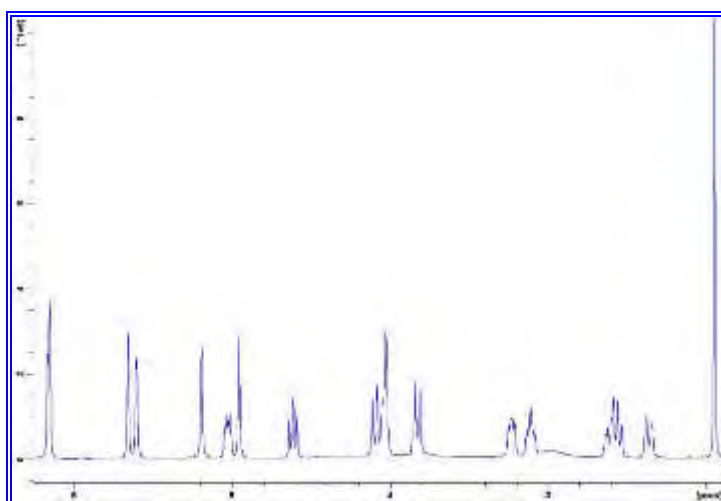
Оптичка ротација супстанце **10** у хлорофорском раствору је: $[\alpha]_D^{20} + 85,00$ ($c=1,00$; CHCl_3).

На $^1\text{H-NMR}$ спектру супстанце **10** уочавају се сигнали карактеристични за гвајанолидни тип скелета (**Табела 3.10**; **Слика 3.30**):

- Два алифатична метин протона: H-1 у облику триплета на δ_{H} 3,23 ($J=7,5$ Hz) и H-5 у облику двоструког дублета на δ_{H} 2,55 ($J=10,8$ Hz), (COSY корелација, **Слика 3.31**).
- Два карактеристична оксиметинска протона: H-6 у облику двоструког дублета на δ_{H} 4,66 ($J=10,8$; 9,8 Hz), и H-8 као триплет на δ_{H} 5,03 ($J=9,2$; 4,3 Hz), значајно померен ка вишим вредносима хемијских померања услед присуства бочног ланца.

Табела 3.10 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **10** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	55,3	H-1	3,23	<i>t</i> (J=7,5)	1
C-2	CH	82,5				
C-3	CH	81,0	H-2,3	4,03	<i>d</i> (J=7,5)	1
C-4	C	82,3	-	-	-	-
C-5	CH	56,7	H-5	2,55	<i>t</i> (J=10,8)	1
C-6	CH	76,7	H-6	4,66	<i>dd</i> (J=10,8; 9,4)	1
C-7	CH	47,2	H-7	3,08	<i>t</i> (J=9,4)	1
C-8	CH	73,7	H-8	5,03	<i>tt</i> (J=9,4; 4,3)	1
C-9	CH ₂	37,8	H-9a	2,60	<i>dd</i> (J=14,8; 4,3)	1
			H-9b	2,35	<i>dd</i> (J=14,8; 2,8)	1
C-10	C	139,6	-	-	-	-
C-11	C	136,5	-	-	-	-
C-12	C=O	169,3	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,4	H-13a	6,17	<i>d</i> (J=3,3)	
			H-13b	5,61	<i>d</i> (J=2,8)	2
C-14	CH ₂	118,9	H-14a	5,20	<i>brs</i>	
			H-14b	4,96	<i>brs</i>	2
C-15	CH ₂	47,8	H-15a	4,11	<i>d</i> (J=12,0)	
			H-15b	3,83	<i>d</i> (J=12,0)	2
C-16	C=O	166,5	-	-	-	-
C-17	C	135,9	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,9	H-18a	6,15	<i>brs</i>	
			H-18a	5,65	<i>brs</i>	2
C-19	CH ₃	18,3	CH ₃ -19	1,96	<i>s</i>	3

Слика 3.30 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **10** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Такође, на $^1\text{H-NMR}$ спектру уочавају се два широка синглета у олефинском делу спектра на δ_{H} 5,17 и δ_{H} 5,09 карактеристичних за геминалне егзометиленске протоне Н-14а и Н-14б на позицији С-10 основног скелета молекула; два дублета на δ_{H} 4,11 и δ_{H} 3,83 ($J=12,0$ Hz), одговарају геминалним протонима Н-15а и Н-15б карактеристичним за 4,15-епихлорхидрин групу (Stevens and Wong, 1986); два широка синглета на δ_{H} 6,15 и δ_{H} 5,65 (Н-18а и Н-18б), и један оштар синглет на δ_{H} 1,96 (CH_3 -19; интеграцијом даје три протона) који указују на присуство метиларилатне групе као бочног ланца на позицији С-8.

На $^{13}\text{C-NMR}$ спектру, сигнал на δ_{C} 47,8 (С-15) потврђује присуство епихлорхидрина (хлорметиленске групе) на позицији С-4. У случају метил хидроксилне групе, С-15 се налази на око δ_{C} 62,0 ppm (погледај Бабилин Б, стр. 128).

Карактеристични пикови за α -метилен γ -лактонски прстен су:

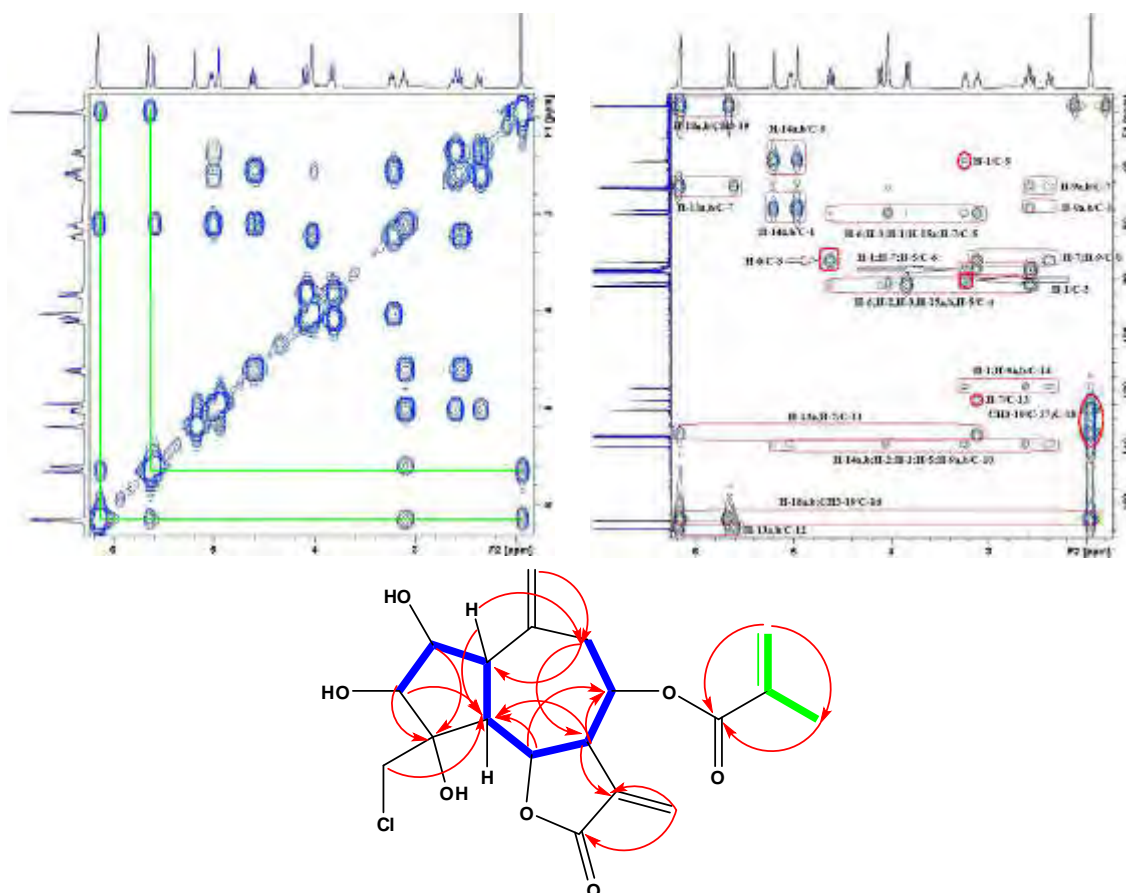
- Егзоциклични метиленски протони Н-13а и Н-13б, који се јављају као два дублета на δ_{H} 6,17 ($J=3,3$ Hz) и δ_{H} 5,61 ($J=2,8$ Hz).
- Н-7 као триплет на δ_{H} 3,08 ($J=9,4$ Hz). Вредност констане спрезања указује на *trans*-диаксијалани положај Н-7 у односу на Н-6 и Н-8.

Основна разлика представљеног гвајанолида и претходно описаних је у томе што:

- у алифатичном делу спектра запажају се два геминална протона Н-9а и Н-9б, који се у облику два двострука дублета јављају на δ_{H} 2,60 ($J=14,8$; 4,5 Hz) и δ_{H} 2,35 ($J=14,8$; 2.8 Hz),
- два метинска протона Н-2 и Н-3, која се налазе заједно у облику дублета на δ_{H} 4,03 ($J=7,5$), померени су ка нижим вредностима хемијских померања с обзиром на то да угљеникови атоми на којим се налазе садрже још и хидроксилну групу.

Као што је приказано на **слици 3.31**, НМВС спектар даје евиденцију о хемијским померањима следећих сигнала угљеникових атома:

- Укрштање H-2, H-3 са угљениковим атомима на δ_C 56,7 (C-5), δ_C 82,5 (C-3) и δ_C 81,0 (C-2) потврђује присуство хидроксилних група на C-2 и C-3 (Stevens and Wong, 1986).
- Корелација CH₃-19 са угљениковим атомима на δ_C 166,5 (C-16), δ_C 135,9 (C-17) и δ_C 126,9 (C-18), потврђује присуство двоструке везе у бочном ланцу (Stevens and Wong, 1986).
- Корелација H-15a и H-15b са угљеником на δ_C 82,3 (C-4).



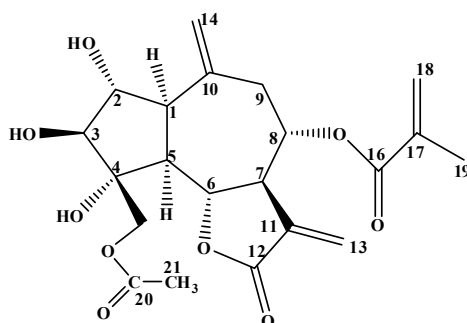
Слика 3.31 COSY и HMBC спектар супстанце **10** (CDCl₃; 400,0 MHz); Корелације добијене помоћу HMBC спектра (означене црвеним стрелицама од ¹H ка ¹³C) и ¹H-¹H COSY корелације (плава и зелена болд линија)

Релативна стереохемија супстанце **10** добијена је упоређивањем вредности константи спрезања вициналних протона као и хемијским померањима угљеника са вредностима добијеним за претходно описане сличне гвајанолиде чија је структура испитана анализом X-зрака (Stevens and Wong, 1986). Такође, и биосинтетички пут указује да вициналне хидроксилне групе на позицијама C-2 и C-3 су *trans*-оријентисане, као и код свих претходних 2 хидрокси гвајанолида, изолованих из рода *Centaurea* (Stevens and Wong, 1986).

11. Панонин;

[2 α 3 β 4 α -трихидрокси-4 β -(ацетоксиметил)-8 α (4-метакрилат)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-гвајан-10(14),11(13)-диен-6,12-олид]

Супстанца **11** је нови природни производ описан први пут. Супстанца је изолована у облику жуто-црвеног уља и одређена јој је следећа структура приказана на слици **3.32**.

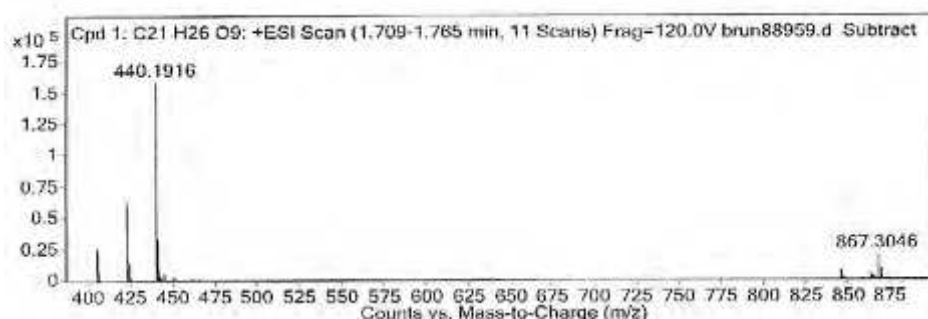


Слика 3.32 11. Панонин

Оптичка ротација хлороформског раствора супстанце је:

$[\alpha]_D^{20} + 17.20$ ($c=1,05$; CHCl₃).

На масеном спектару супстанце **11** уочава се јон пик на m/z 440,1916 [M+NH₄]⁺ (израчунато: 440,1920 за [M+NH₄]⁺), што одговара молекулској формули супстанце C₂₁H₂₆O₉ (Слика 3.33).



Слика 3.33 Масени спектар супстанце **11**; {EIMS (проба) 120 eV, m/z (рел. интензитет) 867,3046 [2M+Na]⁺ (12,59), 440,1916 [M+NH₄]⁺ (100), 423,1648 [M+H]⁺ (39,18), 405,1541 [(M+H)-H₂O]⁺(16,32)}

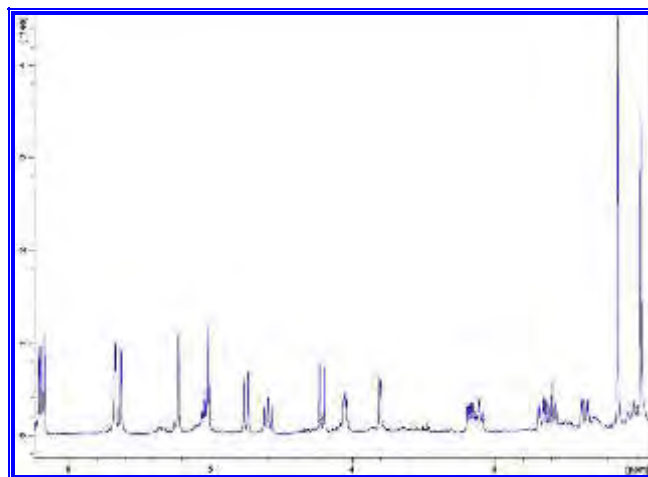
$^1\text{H-NMR}$ спектроскопски подаци супстанце **11** приближно су исти онима описаним за хлорорепдиолид (стр. 146), са изузетком сигнала на позицији C-15 (Табела 3.11; Слика 3.34).

Табела 3.11 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **11** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	55,1	H-1	3,17	<i>dd</i> (J=10,8; 6,2)	1
C-2	CH	79,8	H-2	4,04	<i>dd</i> (J=6,4; 4,6)	1
C-3	CH	81,3	H-3	3,80	<i>brd</i> (J=4,6)	1
C-4	C	82,0	-	-	-	-
C-5	CH	56,5	H-5	2,58	<i>t</i> (J=10,8)	1
C-6	CH	75,9	H-6	4,59	<i>dd</i> (J=10,8; 9,6)	1
C-7	CH	47,8	H-7	3,10	<i>ddt</i> (J=9,6; 3,5; 3,3)	1
C-8	CH	72,9	H-8	5,05	<i>dd</i> (J=9,6; 4,7)	1
C-9	CH ₂	38,9	H-9a	2,67	<i>dd</i> (J=14,0; 4,7)	1
			H-9a	2,36	<i>dd</i> (J=14,0; 4,7)	1
C-10	C	139,6	-	-	-	-
C-11	C	136,5	-	-	-	-
C-12	C=O	168,5	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,0	H-13a	6,20	<i>d</i> (J=3,5)	2
			H-13b	5,62	<i>d</i> (J=3,3)	
C-14	CH ₂	118,0	H-14a	5,22	<i>brs</i>	2
			H-14b	5,02	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	64,7	H-15a	4,74	<i>d</i> (J=12,4)	2
			H-15b	4,22	<i>d</i> (J=12,4)	
C-16	C=O	166,2	-	-	-	-
C-17	C	135,8	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,9	H-18a	6,17	<i>brs</i>	2
			H-18a	5,66	<i>brs</i>	
C-19	CH ₃	18,0	CH ₃ -19	1,97	<i>s</i>	3
C-20	CH ₃ COO	172,3	-	-	-	-
C-21	CH ₃ COO	21,3	CH ₃ -20	2,14	<i>s</i>	3

* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC података.

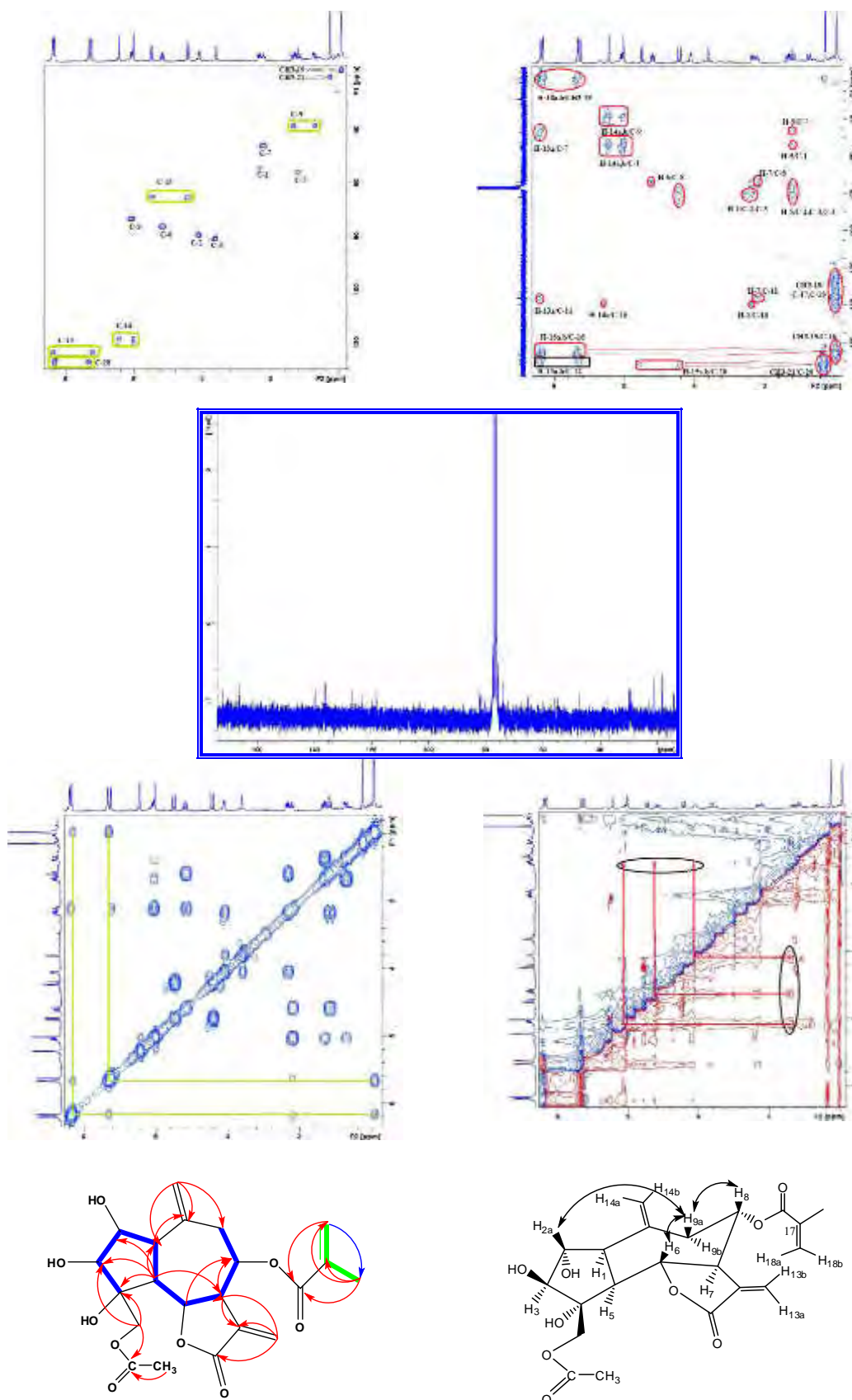
Заправо, на $^1\text{H-NMR}$ спектару супстанце **11** уочавају се два дублета на вишим хемијским померањима δ_{H} 4,74 and 4,22 ($J_{\text{gem}}=12,4$ Hz) карактеристична за АВ система и један оштар синглет на δ_{H} 2,14 који интеграцијом даје три протона.



Слика 3.34 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **11** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

COSY корелација између H-7/H-13a,b; H-1/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9 и H-1/H-2/H-3 указује на основну структуру гвајанолида (Слика 3.35).

У складу са $^1\text{H-NMR}$ подацима, $^{13}\text{C-NMR}$ спектроскопски подаци супстанце **11**, који су сортирани уз помоћ HSQC спектра, указују да молекул садржи четири угљеника са кисеоничном функцијом на δ_{C} 81,3 (C-3), 79,8 (C-2), 75,2 (C-6), 72,9 (C-8), три егзоцикличне двоструке везе на δ_{C} 123,0 (C-13), 136,5 (C-11), 118,0 (C-14), 139,6 (C-10), 126,9 (C-18), 135,8 (C-17), два метил угљеника атома на δ_{C} 18,0 (C-19) и 21,3 ($\text{CH}_3\text{COO-}$). Остали сигнали угљеникових атома који се уочавају на ^{13}C NMR спектру су: два метилenska угљеника, један од њих са кисеоничном групом, два метинска угљеника, један zasiћени кватернерни угљеников атом и две кето групе. Даља карактеризација структуре супстанце утврђена је помоћу HMBC спектра. Снажна и чиста корелација између два дублета на δ_{H} 4,74 и 4,22 (H-15a,b), као и синглета на δ_{H} 2,14 (CH_3 -21) са карбоксилном групом на δ_{C} 172,3 (C-20) потврђују присуство ацетокси групе на позицији C-15. Кључне HMBC корелације: H-13a,b/ C-12 (δ_{C} 168,5); H-18, CH_3 -19/ C-16 (δ_{C} 166,2); H-13a/ C-11 (δ_{C} 137,3); H-1, H-9b/ C-10 (δ_{C} 137,3); H-15b/ C-4 (δ_{C} 82,0) омогућиле су утврђивање свих кватернерних угљеникових атома у молекулу (Слика 3.35).



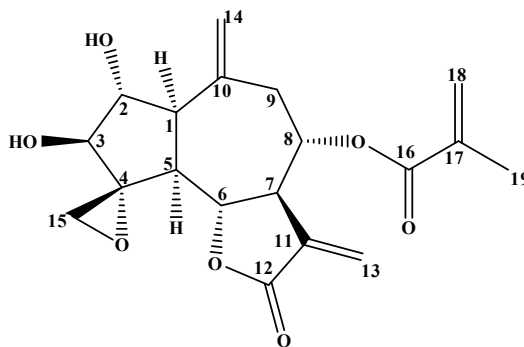
Слика 3.35 HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце **11** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Корелације са HMBC спектра (црвене стрелице од ^1H ка ^{13}C) и ^1H - ^1H COSY корелација (плава линија); Предложена конформација **11** добијена на основу ^1H -NMR и ^1H - ^1H NOESY спектра

Релативна конфигурација супстанце **11** добијена је на основу NOESY NMR експеримента. Добијена ρ Ое корелација Н-8/Н-6/Н-2 са Н-9а указује на њихову идентичну конфигурацију. Хемијска померања и константе спрезања ових протонских сигнала потпуно су у сагласности са оним описаним код хлорорепдиолида. У односу на најраспрострањенију α -конформацију протона Н-7, велика константа купловања од $J_{6,7}=10,8$ и $J_{7,8}=9,6$ потврђује њихову *trans* оријентацију и β -конфигурацију Н-6/Н-8 (Слика 3.35). На основу приложеног, изводи се закључак да је Н-2 такође β -оријентисан, што је у сагласности са литературним подацима и биосинтетичким путем 2-хидрокси гвајанолида претходно изолованих из рода *Centaurea* (Daniewski and Nowak, 1993; Stevens and Wong, 1986).

12. Епоксирепдиолид

Супстанца је претходно изолована из биљке *Centaurea repens* L. (Stevens, 1982).

Супстанца је изолована у облику белих кристала и одређена је следећа структура приказана на слици 3.36.



Слика 3.36 12. Епоксирепдиолид

Вредност оптичке ротације супстанце је:

$$[\alpha]_D^{20} + 115,00 \text{ (} c=1,10; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

$^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **12** је сличан спектру хлорорепдиолида (стр. 146), изузев сигнала метиленске групе на δ_{C} 48,4 који се уочава на $^{13}\text{C-NMR}$ спектру и два дублета на δ_{H} 3,37 ($J=4,8$) и δ_{H} 3,05 ($J=4,8$) на $^1\text{H-NMR}$ спектру (Табела 3.12; Слика 3.37). Наведени сигнали указују на то да је присутан епоксидни прстен у молекулу који је везан за положај С-4 претходно описан код бабилина А (стр.106).

Основна структура гвајанолида потврђена је помоћу COSY спектра (Слика 3.38). Релативна конфигурација хиралних центара супстанце **12** добијена је упоређивањем вредности константи спрезања међу вициналним протонима и хемијским померањима угљеникових атома са сличним гвајанолидима описаним у литератури (Stevens and Wong, 1986).

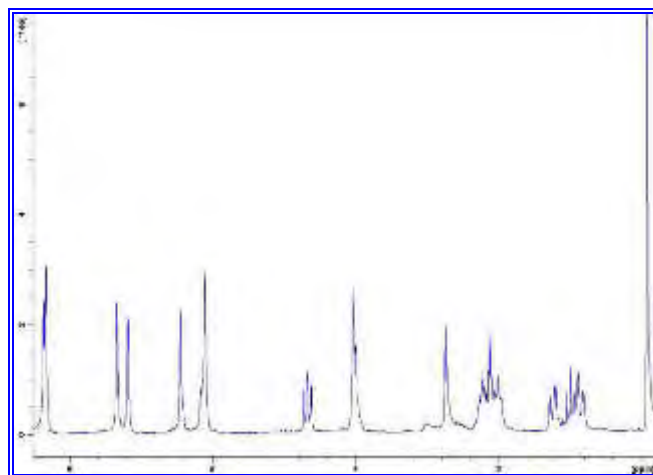
На основу наших сазнања, ово је први пут да су објављене вредности хемијских померања угљеникових атома добијених помоћу $^{13}\text{C-NMR}$ спектра.

Табела 3.12 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **12** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

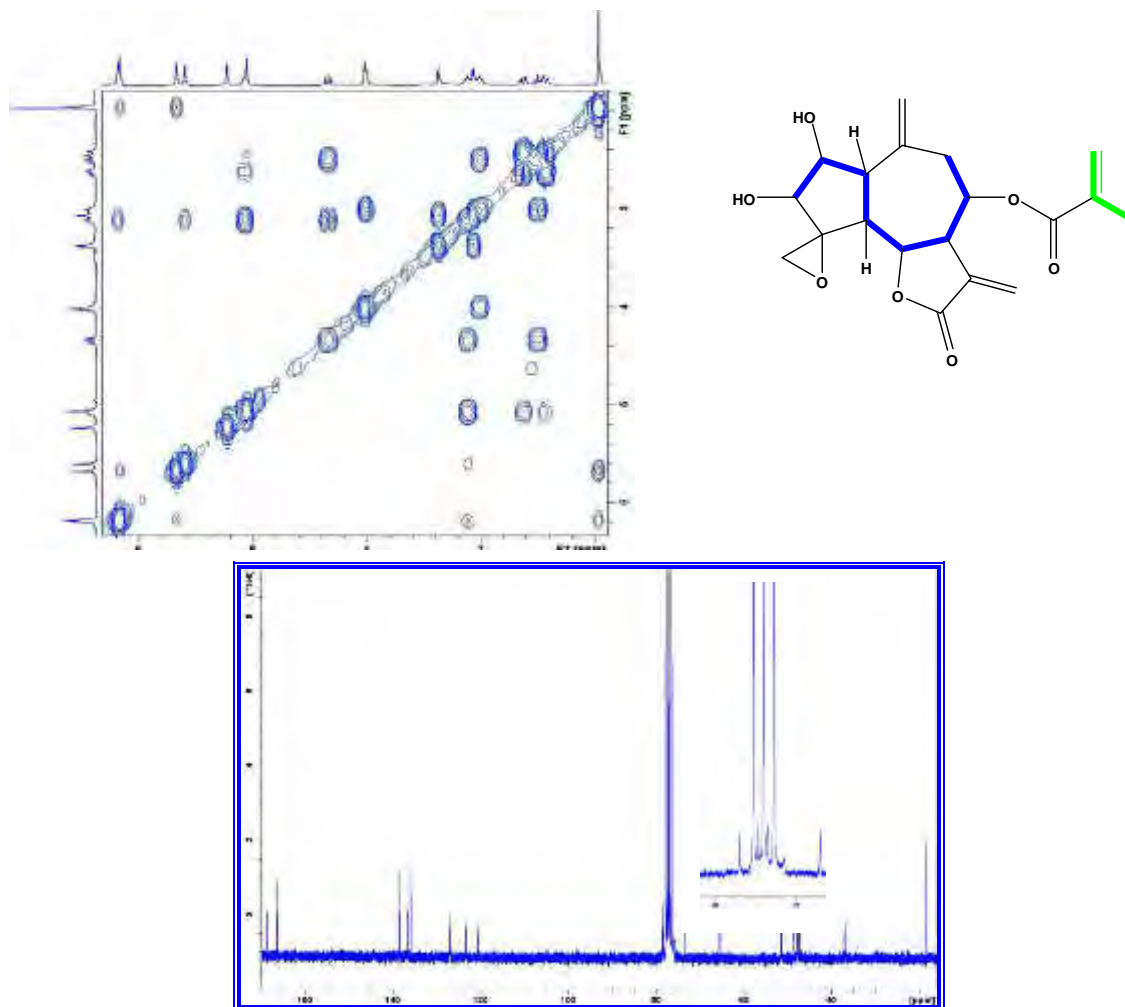
Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	51,5	H-1	2,99	<i>t</i> ($J=10,6$)	1
C-2	CH	76,8	H-2,3	4,00	<i>t</i> ($J=7,5$)	2
C-3	CH	77,3				
C-4	C	65,3	-	-	-	-
C-5	CH	47,2	H-5	2,50	<i>t</i> ($J=10,6$)	1
C-6	CH	78,6	H-6	4,33	<i>dd</i> ($J=11,0; 9,2$)	1
C-7	CH	47,7	H-7	3,11	<i>ttt</i> ($J=11,0; 9,4; 3,3$)	1
C-8	CH	73,6	H-8	5,07	<i>dd</i> ($J=9,4; 4,2$)*	1
C-9	CH ₂	35,3	H-9a, H-9b	2,62 2,43	<i>dd</i> ($J=15,0; 4,8$) <i>dd</i> ($J=15,0; 3,3$)	1 1
C-10	C	138,5	-	-	-	-
C-11	C	136,3	-	-	-	-
C-12	C=O	168,9	-	-	-	-
C-13	CH ₂	123,3	H-13a H-13b	6,19 5,60	<i>d</i> ($J=3,3$) <i>d</i> ($J=3,0$)	2
C-14	CH ₂	120,7	H-14a H-14b	5,22 5,05	<i>brs</i> <i>brs</i>	2
C-15	CH ₂	48,4	H-15a H-15b	3,37 3,05	<i>d</i> ($J=4,8$) <i>d</i> ($J=4,8$)	2
C-16	C=O	166,4	-	-	-	-
C-17	C	135,8	-	-	-	-
C-18	CH ₂	127,0	H-18a H-18a	6,17 5,68	<i>brs</i> <i>brs</i>	2
C-19	CH ₃	18,0	CH ₃ -19	1,96	<i>s</i>	3

* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC података.

* Преклопљено са сигналом H-14.



Слика 3.37 ^1H -NMR спектар супстанце **12** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

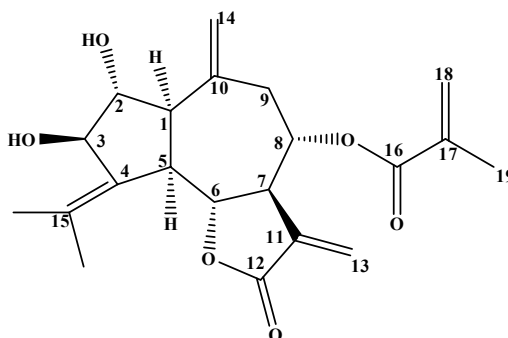


Слика 3.38 ^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце **12** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); ^1H - ^1H COSY корелација (плаве и зелене болд линије)

13. Репдиолид

До сада, супстанца је изолована из неколико врсти рода *Centaurea*: *C. repens* L., (Stevens, 1982), *C. bella* Trautv., (Nowak et al., 1989; Nowak et al., 1993). Такође, изолована је из рода *Rhaponticum* Hill: *R. serratuloides* (Berdin et al., 2001); *R. pulchrum* Fisch. et Mey. (Cis et al., 2006).

Супстанца **13** изолована је у облику жутог уља и одређена јој је следећа структура приказана на **слици 3.39**.



Слика 3.39 13. Репдиолид

Вредност оптичке ротације хлороформског раствора супстанце је:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 86,85 \text{ (} c=1,50; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

Проучавањем $^1\text{H-NMR}$ спектроскопских података уочава се да је супстанца **13** структурно веома слична претходно описаном хлорорепдиолиду (стр.146). Једина разлика уочава се у положају геминалних протона на позицији C-15 (**Табела 3.13**; **Слике 3.40 – 3.41**).

Заправо, на основу $^1\text{H-}/^{13}\text{C-NMR}$ и HSQC спектра супстанце **13** запажа се да поред карактеристичних сигнала гвајанског скелета постоје сигнали који одговарају присуству четири егзометиленске двоструке везе у молекулу (**Слика 3.41**):

- Карактеристични егзоциклични метиленски протони коњуговани са γ -лактонским прстеном, H-13a,b који се уочавају у облику два дублета на δ_{H} 6,20 ($J=3,2$ Hz) и δ_{H} 5,59 ($J=3,4$ Hz), и чији се угљеников атом налази на δ_{C} 122,6 (C-13) на основу HSQC спектра.

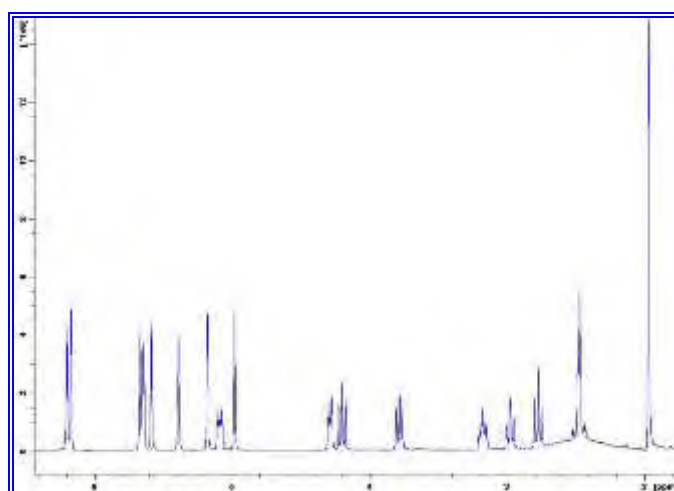
- Егзоциклични метиленски протони Н-14а,б карактеристични за гвајански седмочлани прстен налазе се у облику два широка дублета на δ_{H} 5,18 и δ_{H} 4,99, чији се угљеников атом налази на δ_{C} 120,3 (С-14).
- Коњуговани егзометиленски протони бочног низа са карбонилном групом уочавају се у облику два широка дублета на δ_{H} 6,17 и δ_{H} 5,67 (Н-18а,б), и њихов угљеников атом налази се на δ_{C} 126,7 (С-18).
- Поред наведених на спектру уочавају се два триплета на δ_{H} 5,62 и δ_{H} 5,37 ($J=2,4$ Hz) који указују на присуство егзометиленских протона Н-15а,б на положају С-4 гвајанског петочланог прстена. Мала константа купловања триплета јавља се услед алилног утицаја протона Н-3 на сваки од геминалних протона Н-15а,б. Корелација између Н-15а,б са угљеником на δ_{C} 114,0 (С-15) на основу HSQC спектра, као и присуство још једног сигнала угљеника у незасићеном делу ^{13}C -NMR спектра на δ_{C} 147,2, непобитно доказују присуство двоструке везе на С-4/С-15 (Слика 3.41).

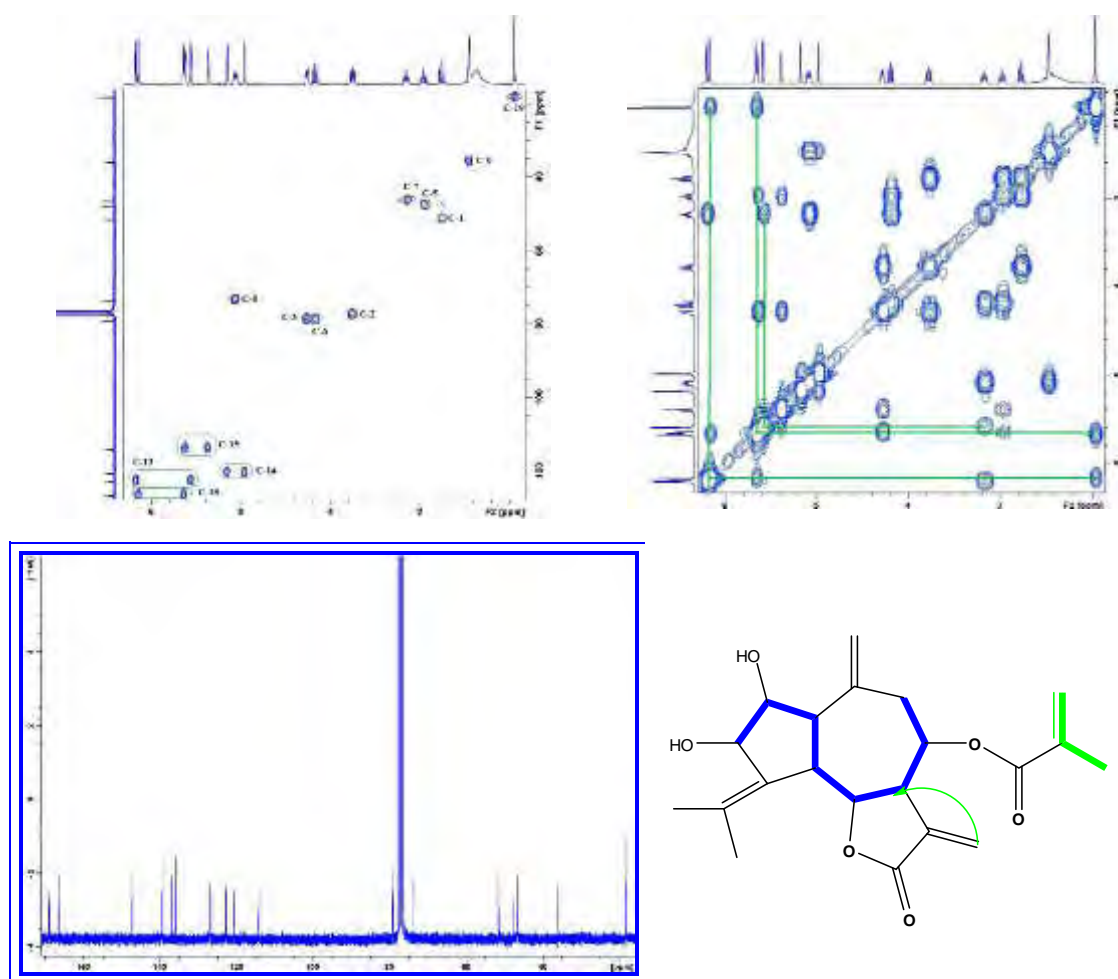
Помоћу COSY спектра потврђена је основна структура молекула.

Релативна стереохемија супстанце **13** објашњена је на основу упоређивања добијених вредности константи спрезања са оним, објављеним за сличне гвајанолиде (Stevens and Wong, 1986). Претпостављајући да је Н-7 α -оријентисан, што је случај код свих гвајанолида описаних до сада а изолованих из рода *Centaurea*, узимајући у обзир вредности константе спрезања између Н-5/Н-6 и Н-6/Н-7 (око 9-11 Hz), потврђује се њихова *trans* стереохемија при чему је протон Н-6 β -оријентисан. Такође, вредност константе спрезања $J_{7,8}=9.6$ указује на β -оријентацију Н-8, што је у доброј сагласности са литературним подацима (Bruno et al., 2005). Константа спрезања ($J_{1,5}=10,3$ Hz) између Н-1/Н-5 потврђује *cis*-везивање два гвајанска прстена. У сагласности са литературним подацима (Stevens and Wong, 1986), оба протона Н-1 и Н-5 су α -оријентисани. Константа спрезања ($J_{1,2}=10,5$ Hz) између Н-1/Н-2 потврђује њихов *trans* положај као и то да хидроксилна група на позицији С-2 има α -оријентацију. Са друге стране, константа спрезања између Н-2 и Н-3 ($J_{2,3}=8,3$ Hz) потврђује β -оријентацију ОН групе на С-3, што је у доброј сагласности са литературним подацима (Stevens and Wong, 1986).

Табела 3.13 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **13** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	CH	51,3	H-1	2,77	<i>t</i> (J=10,3)	1
C-2	CH	77,2	H-2	3,78	<i>dd</i> (J=10,3; 8,3)	1
C-3	CH	78,1	H-3	4,29	<i>tt</i> (J=8,3; 2,4)	1
C-4	C	147,2	-	-	-	-
C-5	CH	47,8	H-5	2,97	<i>t</i> (J=10,3)	1
C-6	CH	78,9	H-6	4,20	<i>dd</i> (J=10,6; 9,2)	1
C-7	CH	46,5	H-7	3,17	<i>ttt</i> (J=10,6; 9,3; 3,3)	1
C-8	CH	73,4	H-8	5,09	<i>tt</i> (J=9,3, 3,0)	1
C-9	CH ₂	35,3	H-9a,b	2,47	<i>m</i>	2
C-10	C	139,3	-	-	-	-
C-11	C	137,0	-	-	-	-
C-12	C=O	168,8	-	-	-	-
C-13	CH ₂	122,6	H-13a	6,20	<i>d</i> (J=3,4)	2
			H-13b	5,59	<i>d</i> (J=3,2)	
C-14	CH ₂	120,3	H-14a	5,18	<i>brs</i>	2
			H-14b	4,99	<i>brs</i>	
C-15	CH ₂	114,0	H-15a	5,62	<i>t</i> (J=2,2)	2
			H-15b	5,37	<i>t</i> (J=2,2)	
C-16	C=O	166,5	-	-	-	-
C-17	C	135,9	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,7	H-18a	6,17	<i>brs</i>	2
			H-18a	5,67	<i>brs</i>	
C-19	CH ₃	18,0	CH ₃ -19	1,96	<i>s</i>	3

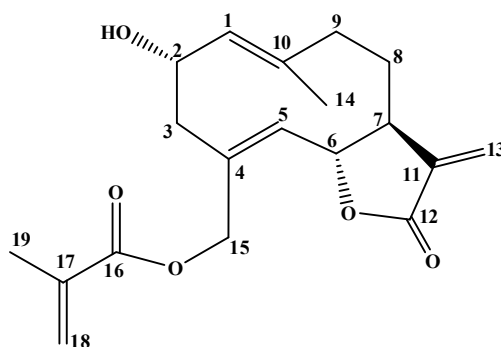
Слика 3.40 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **13** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)



Слика 3.41 HSQC, COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце **13** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3MHz); ^1H - ^1H COSY корелација (плаве и зелене болд линије)

14. 2 α -Хидрокси 8-дехидрокси-15-О-метакрилат салонитенолид

Супстанца **14** изолована је у облику жутог аморфног праха и одређена јој је следећа хемијска структура приказана на **слици 3.42**.



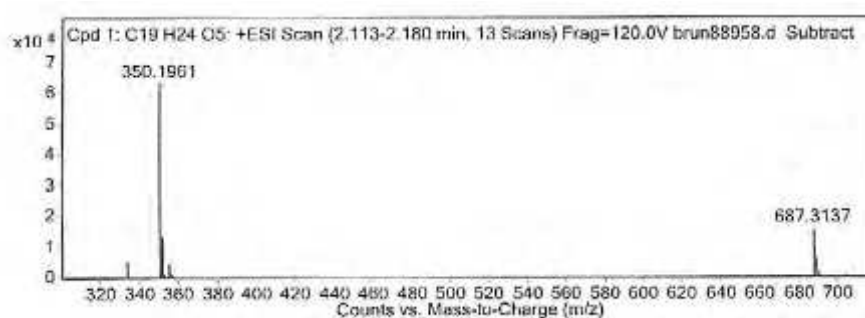
Слика 3.42 14. 2 α -Хидрокси 8-дехидрокси 15-О-метакрилат салонитенолид

Супстанца **14** је нови природни производ.

Оптичка ротација хлороформског раствора супстанце је:

$$[\alpha]_D^{20} + 15,71 \text{ (} c=0,70; \text{CHCl}_3\text{)}.$$

На масеном спектру супстанце **14** уочава се јон пик на m/z 350,1961 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (израчунато 350,1967 за $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), што одговара молекулској формули супстанце $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$ (**Слика 3.43**).



Слика 3.43 Масени спектар супстанце **14** {EIMS (проба) 120 eV, m/z (рел. интез.) 687,3137 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (24,33), 355,1513 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (6,58), 350,1961 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100), 333,1696 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (8,28)}

$^1\text{H-NMR}$ спектар **14** указује на присуство сигнала карактеристичних за основну структуру гермакранолида (Табела 3.14; Слика 3.44):

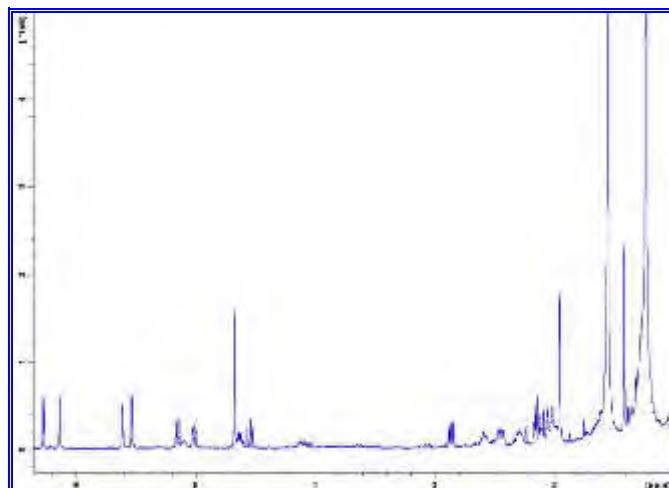
- Два олефинска метинска протона H-1 и H-5 као два дублета на δ_{H} 5,02 ($J=9,8$ Hz) и δ_{H} 5,15 ($J=10,2$).
- H-6 се јавља облику двоструког дублета на δ_{H} 4,67 ($J=9,1$; 10,2), у области кисеоничних метина, с обзиром на то да је везан за угљеник α -метилен γ -лактонског прстена.
- Егзоциклични метиленски протони H-13a и H-13b, који се у облику два дублета уочавају се у олефинском делу спектра на δ_{H} 6,26 ($J=3,5$) и δ_{H} 5,52 ($J=3,3$).
- H-7 као мултиплет на δ_{H} 2,58.

Табела 3.14 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **14** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
C-1	CH	129,8	H-1	5,02	<i>d</i> ($J=9,8$)	1
C-2	CH	69,7	H-2	4,63	<i>tt</i> ($J=10,0$; 5,8)	1
C-3	CH ₂	44,5	H-3 ^a	2,87	<i>dd</i> ($J=11,2$; 5,6)	2
			H-3b	2,09	<i>t</i> ($J=10,8$)*	
C-4	C	139,2	-	-	-	-
C-5	CH	132,6	H-5	5,15	<i>d</i> ($J=10,2$)	1
C-6	CH	79,7	H-6	4,54	<i>dd</i> ($J=10,2$; 9,1)	1
C-7	CH	50,8	H-7	2,58	<i>m</i>	1
C-8	CH ₂	27,5	H-8a	2,16	<i>m</i> *	1
			H-8b	1,63	<i>m</i>	
C-9	CH ₂	40,6	H-9a	2,45	<i>dd</i> ($J=15,0$; 5,1)	1
			H-9b	2,14	<i>dd</i> ($J=15,0$; 2,3)*	
C-10	C	137,6	-	-	-	-
C-11	C	139,1	-	-	-	-
C-12	C=O	169,8	-	-	-	-
C-13	CH ₂	120,1	H-13a	6,26	<i>d</i> ($J=3,5$)	2
			H-13b	5,52	<i>d</i> ($J=3,3$)	
C-14	CH ₃	16,9		1,41	<i>s</i>	3
C-15	CH ₂	62,2	H-15a,b	4,66	<i>s</i>	2
C-16	C=O	166,7	-	-	-	-
C-17	C	135,5	-	-	-	-
C-18	CH ₂	126,4	H-18a	6,12	<i>t</i> ($J=1,2$)	1
			H-18b	5,59	<i>t</i> ($J=1,2$)	
C-19	CH ₃	18,2		1,96	<i>s</i>	3

* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC података.

* Преклопљени сигнали.



Слика 3.44 ^1H NMR спектар супстанце **14** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

У алифатичном делу ^1H -NMR спектра уочавају се сигнали карактеристични за три различите метиленске групе:

- Геминални протони H-9a и H-9b, као два двострука дублета на δ_{H} 2,45 ($J=5,1$; 15,0) и δ_{H} 2,14 ($J=2,3$; 15,0).
- COSY спектар показује да су оба протона CH_2 -9 у корелацији са геминалним протонима H-8a и H-8b, који се уочавају на спектру као два мултиплета на δ_{H} 2,16 и δ_{H} 1,63, при чему су сигнали H-9b и H-8a делимично преклопљени (Слика 3.45).
- Геминални протони H-3a and H-3b уочавају се као двоструки дублет на δ_{H} 2,87 ($J=5,6$; 11,2) и триплет на δ_{H} 2,09 ($J=10,8$), оба су померена ка вишим вредностима хемијских померања, с обзиром на то да су окружени хидроксиметинском групом (CH-OH), који се налази у облику тростуког триплета на δ_{H} 4,63 ($J=5,8$; 10,0), и протонима бочног низа који је естарски везан за метил групу на C-15.

Присуство два триплета на δ_{H} 6,12 и δ_{H} 5,59 (H-18a и H-18b), једног оштрог синглета на δ_{H} 1,96 (CH_3 -19), који интеграцијом даје три протона, указује на присуство метакрилатне групе као бочног низа. Сигнал на HMBC спектру између синглета CH_2 -15 (на δ_{H} 4,66, интеграцијом даје два протона) и карбонилне групе C-16 потврђује положај бочног низа C-15, чији се угљеников атом налази на δ_{C} 62,2, на основу HSQC спектра.

Битно је нагласити да у случајевима када хидроксиметиленска група на С-15 није супституисана, геминални протони (CH₂-15) уочавају се као одвојени дублети на око 4,30 ppm, један, и други на око 4,0 ppm, са великом константом спрезања (J_{gem} = око 10,0 Hz) (Слика 3.45).

¹³C-NMR и DEPT/¹³C-NMR спектар указују на присуство 19 угљеникових атома: шест кватернерних, шест метиленских (засићених и незасићених) и седам CH₃/CH (Слика 3.45).

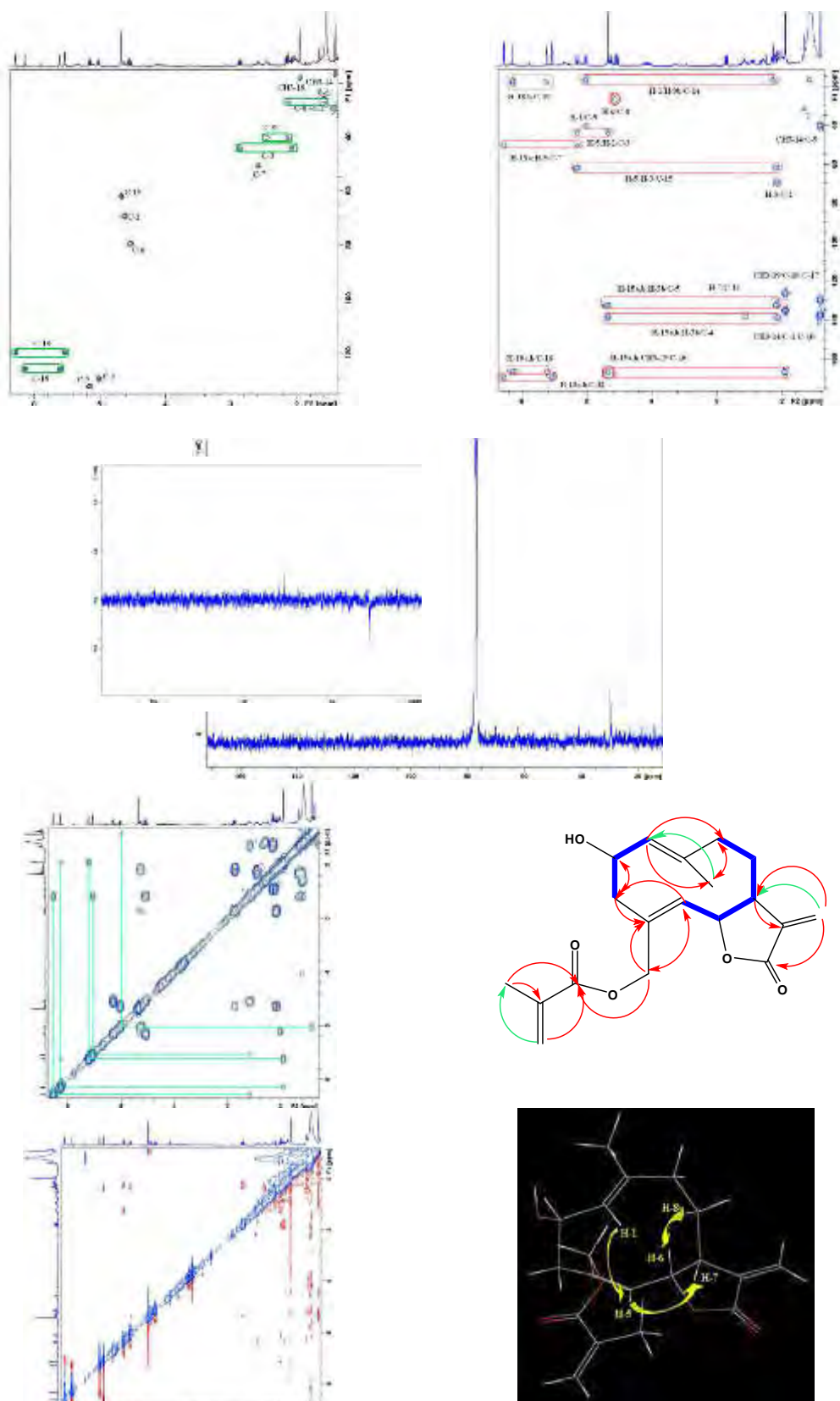
На основу HSQC спектра идентификовани су следећи угљеникови атоми у молекулу:

- Пет метинских угљеника С-1, С-2, С-5, С-6 и С-7 (δ_C 129,8; 69,7; 132,6; 79,7; 50,8),
- Три алифатична метиленска и један кисеонични метиленски угљеник С-3, С-8, С-9 и С-15 (δ_C 44,5; 27,5; 40,6; 62,2), као и два олефинска егзоциклична метиленска угљеника С-13 и С-18 (δ_C 120,1; 126,4),
- Два метил угљеникова атома С-14 и С-19 на δ_C 16,9; 18,2.

¹H-¹³C (HMBC) спектрални подаци дају следеће податке везане за структуру молекула (Слика 3.45):

- С-12 (δ_C 169,8) на основу корелације Н-13a,b/С-12,
- С-16 (δ_C 166,7) - Н-18b, CH₃-19/С-16,
- С-10 (δ_C 137,6) - CH₃-14/С-10,
- С-4 (δ_C 139,2) - Н-5/С-4,
- С-11 (δ_C 139,1) - Н-7/С-11,
- С-17 (δ_C 135,5) - Н-18b, CH₃-19/С-17.

У олефинском делу ¹³C-NMR спектра, присутно је 8 угљеникових атома, што указује на присуство четири двоструке везе: 129,8 (CH); 137,6 (C); 139,2 (C); 132,6 (CH); 139,1 (C); 120,1 (CH₂); 126,4 (CH₂); 135,5 (C). Присуство две двоструке везе $\Delta^{4,5}$ и $\Delta^{1,10}$ може се закључити на основу сигнала (δ_C 129,8 и 132,6) типичних за метинске незасићене групе (HSQC) и на основу 2D COSY спектра (Marco et al., 1997).



Слика 3.45 HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR/DEPT, ^1H - ^1H COSY и NOESY спектри супстанце **14** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Најважније корелације на основу HMBC спектра (црвене стрелице од ^1H ка ^{13}C) и COSY корелација (плаве болд линије); 3D представљена конформација на основу NOE корелација

Релативна стереохемија супстанце **14** потврђена је упоређивањем константи купловања вициналних протона са оним вредностима које су публиковане за сличне гермакранолиде (Karioti et al, 2002). Вредности константи спрезања за вициналне протоне H-1, H-2 и H-5; H-5, H-6 и H-7 у потпуној су сагласности са α - стереохемијом протона H-1 и *trans*-оријентацијом протона H-5/H-6 и H-6/H-7 (Rustaiyan et al., 1986).

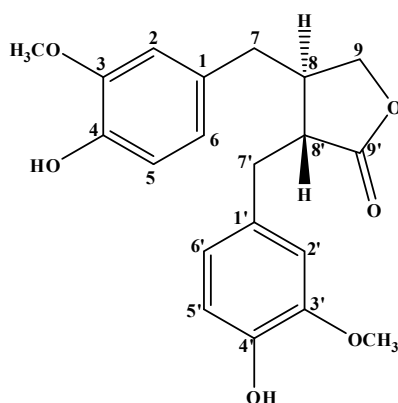
Присуство групе са кисеоником на циклодекадиенском прстену потврђено је постојањем угљениковог атома са хемијским померањем δ_C 69,7, које је у корелацији са протоном H-2 на основу ^1H - ^1H COSY, HSQC спектра. Велика вредност констане купловања ($J_{1,2}=10,0$ Hz) у сагласности је са α -оријентацијом хидроксилне групе на положају C-2 (Bohlmann et al., 1982a; Vasquez et al., 1990). У случају α -оријентације H-2 констана спрезања би имала знатно нижу вредност ($J_{1,2}=6,0$ Hz) (Marco et al., 1997).

Такође, хомонуклеарни ^1H - ^1H NOESY спектар нам је омогућио да утврдимо положај свих хиралних центара супстанце **14** (Слика 3.45). Неке корелације између H-1 и H-5, H-5 и H-7, као и H-6 са H-8а указују на *trans*-диаксијални распоред протона C-5 (α), C-6 (β) и C-7 (α). Такође, велика вредност константе спрезања између H-6 и H-7 ($J_{6,7}=9,1$ Hz), заједно са алилном константом спрезања између H-7 и H-13 ($J_{7,13}=3,5$ Hz), потврђује *trans* везу α -метилена- γ -лактонског прстена са циклодекадиенским прстеном (Bohlmann et al., 1982a).

3.2 Лигнани

15. Матересинол

Супстанца **15** до сада је изолована из различитих врста рода *Centaurea* (Табела 1.7). Матересинол је изолован као жута уљана супстанца, а анализом спектралних података предложена је хемијска структура приказана на слици 3.46.



Слика 3.46 15. Матересинол

На основу резултата $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ и COSY спектра (Табела 3.15; Слика 3.47) и корелацијом са публикованим литературним подацима, закључује се да супстанца припада групи лигнана, подгрупи диарилбутиролактона, чији молекул садржи две фенил пропанил групе, које су преко C8-C8' угљениковог моста везани са лактонским прстеном.

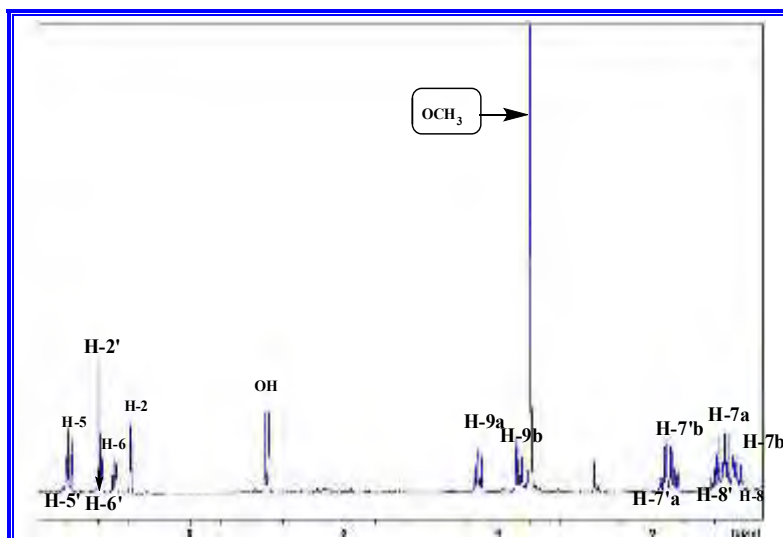
Вредност оптичке ротације износи: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 22,9$ ($c=0,10$; CH_3OH).

На $^1\text{H-NMR}$ спектру се запажају шест сигнала карактеристичних за ароматичне протоне:

- Два дублета на δ_{H} 6,94 ($J=8,1$ Hz) и δ_{H} 6,74 ($J=8,2$ Hz), карактеристична за ароматичне протоне H-5' и H-5; који су у *ortho*-положају у односу на протоне H-6' и H-6.
- Два двострука дублета на δ_{H} 6,58 ($J=8,1; 1,4$ Hz) и δ_{H} 6,53 ($J=8,2; 1,9$ Hz) карактеристична за протоне H-6' и H-6, који су у *meta*-положају са протонима H-2' и H-2, и у *ortho*-положају са протонима H-5' и H-5.
- Два дублета на δ_{H} 6,65 и 6,47 ($J=2,0$ и 1,8 Hz) карактеристични за протоне H-2' и H-2.

Табела 3.15 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **15** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Позиција	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
Бензилски прстен						
C-1	C	129,7	-	-	-	-
C-1'	C	129,5	-	-	-	-
C-2	CH	110,9	H-2	6,38	<i>d</i> ($J=1,8$)	1
C-2'	CH	111,5	H-2'	6,59	<i>d</i> ($J=2,0$)	1
C-3	C	146,7	-	-	-	-
C-3'	C	146,6	-	-	-	-
C-4	C	144,5	-	-	-	-
C-4'	C	144,4	-	-	-	-
C-5	CH	114,1	H-5	6,77	<i>d</i> ($J=7,8$)	1
C-5'	CH	114,4	H-5'	6,80	<i>d</i> ($J=8,2$)	1
C-6	CH	121,3	H-6	6,48	<i>dd</i> ($J=7,8; 1,8$)	1
C-6'	CH	122,1	H-6'	6,57	<i>dd</i> ($J=8,6; 2,0$)	1
C-7	CH ₂	34,6	H-7 ^a	2,55	<i>t</i> ($J=6,8$)	1
			H-7 ^b	2,44	<i>t</i> ($J=7,2$)	1
C-7'	CH ₂	38,3	H-7' ^a	2,93	<i>dd</i> ($J=14,2; 5,4$)	1
			H-7' ^b	2,85	<i>dd</i> ($J=14,2; 7,0$)	1
Лактонски прстен						
C-8	CH	41,0	H-8	2,46	<i>dt</i> ($J=12,8; 6,8$)	1
C-8'	CH	46,6	H-8'	2,54	<i>dt</i> ($J=12,8; 7,2$)	1
C-9	CH ₂	71,3	H-9 ^a	4,13	<i>dd</i> ($J=9,0; 7,0$)	1
			H-9 ^b	3,87	<i>dd</i> ($J=9,0; 7,0$)	1
C-9'	C=O	178,7	-	-	-	-
Метокси група						
OCH ₃	CH ₃	55,8	C-3/CH ₃	3,80	<i>s</i>	3
OCH ₃	CH ₃		C-3'/CH ₃	3,79	<i>s</i>	3
Хидроксилна група						
OH	-	-	C-4'/OH	5,51	<i>brs</i>	1
OH	-	-	C-4/OH	5,48	<i>brs</i>	1



Слика 3.47 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **15** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

Поред сигнала који су описани, а карактеришу два ароматична АВХ система на $^1\text{H-NMR}$ спектру, уочавају се два синглета са хемијским померањима на δ_{H} 3,79 и 3,80, који указују на присуство две метокси групе и два карактеристична хидроксилна синглета на δ_{H} 5,51 и 5,48, што указује на присуство два 1,3,4 трисупституисана ароматична прстена (Слика 3.47).

На основу $^1\text{H-NMR/COSY}$ спектра (Слика 3.48) потврђено је присуство лактонског прстена и молекулу.

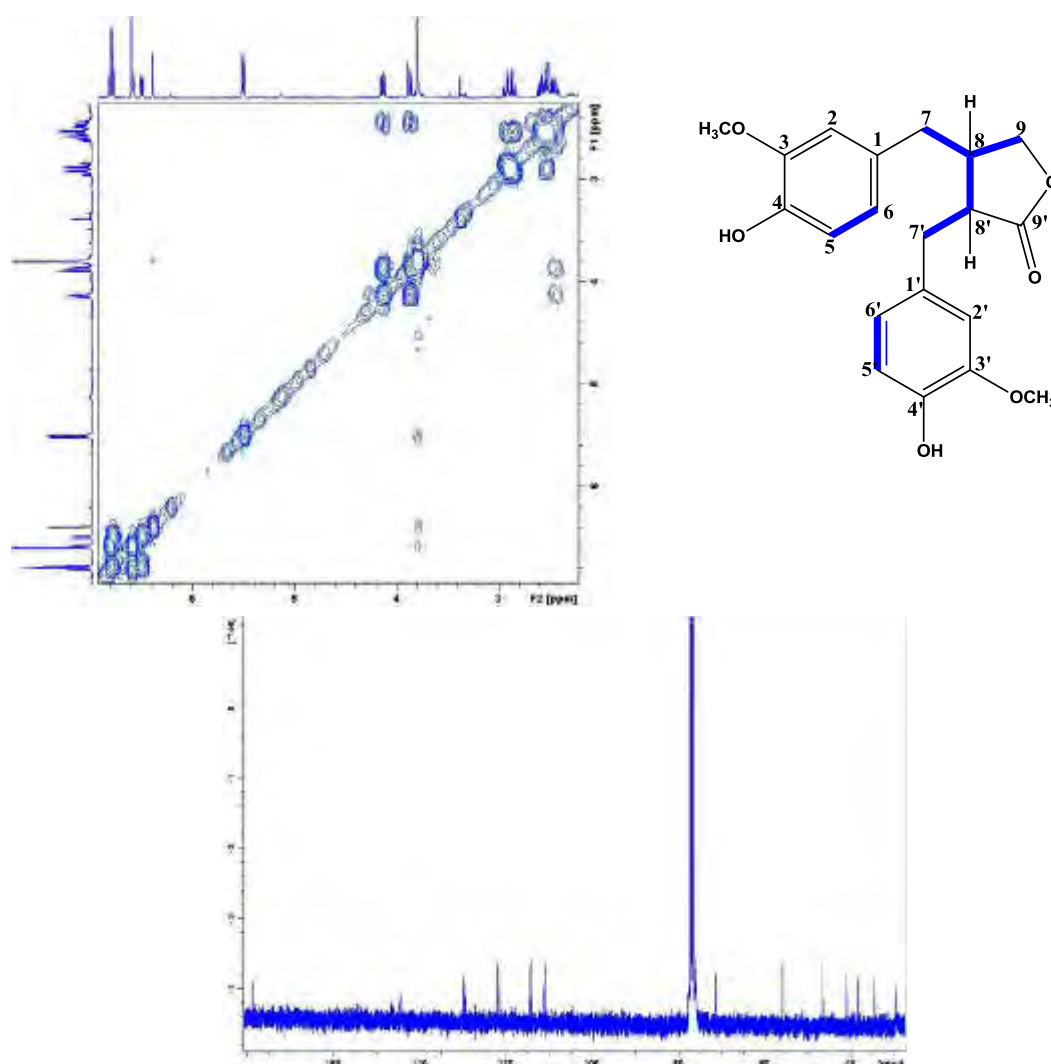
Бензил протони H-7a,b, који се облику два триплета уочавају на δ_{H} 2,55 и 2,44 ($J=6,8$; $J=7,5$ Hz) и H-7'a,b као два двострука дублета на δ_{H} 2,93 и 2,85 ($J=14,2$; 5,4 и $J=14,2$; 7,0) су у COSY корелацији са два двострука триплета на δ_{H} 2,46 и δ_{H} 2,54 ($J=12,8$; 6,8, Hz; $J=12,8$; 7,2,) који су означени као протони H-8, H-8'.

Даље, COSY корелација H-8/H-9a,b указује на положај геминалних протона лактонског прстена H-9a,b, која се уочавају као два двострука дублета на δ_{H} 4,13 ($J=9,0$; 7,0) и δ_{H} 3,87 ($J=9,2$; 7,0 Hz) (Слика 3.47).

На основу свега наведеног, закључује се да молекул садржи два иста 4-хидрокси-3-метокси супституисана ароматична прстена, што се потврђује и помоћу $^{13}\text{C-NMR}$ спектра (Слика 3.48), који садржи дванаест ароматичних угљеникових атома са готово идентичнијм хемијским померањима. Поред угљеникових атома ароматичних прстенова на $^{13}\text{C-NMR}$ спектру се уочавају

сигнали који одговарају присуству два метиленска угљеникова атома C-7, C-7' (δ_C 34,6; 38,3), један оксиметиленски угљеников атом C-9 (δ_C 71,3), два метинска угљеникова атома C-8, C-8' (δ_C 41,0; 46,5), два метокси угљеникова атома на δ_C 55,8 и један лактон карбонилни угљеников атом (δ_C 174,8) (Слика 3.48).

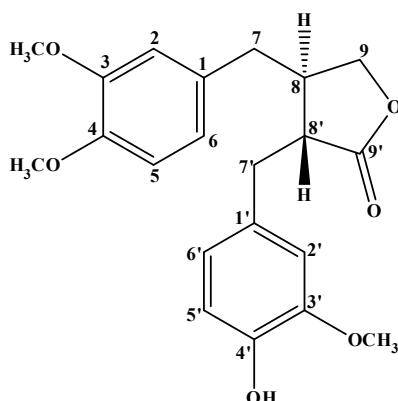
Хемијска померања за угљеникове атоме C-7, C-8, C-9, C-7', C-8' и C-9' карактеристична су и потврђују *trans*-везани петочлани лактонски прстен у молекулу (Ayres & Loike, 1990).



Слика 3.48 ^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце **15** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Најбитније корелације (плавe болд линије)

16. Арктигенин

До сада, арктигенин је изолован из неколико различитих врста рода *Centaurea* (Табела 1.7). Супстанца **16** изолована је у облику жутог уља и на основу резултата спектралне анализе предложена је хемијска структура приказана на слици 3.49.



Слика 3.49 16. Арктигенин

Вредност оптичке ротације метанолског раствора супстанце износи:

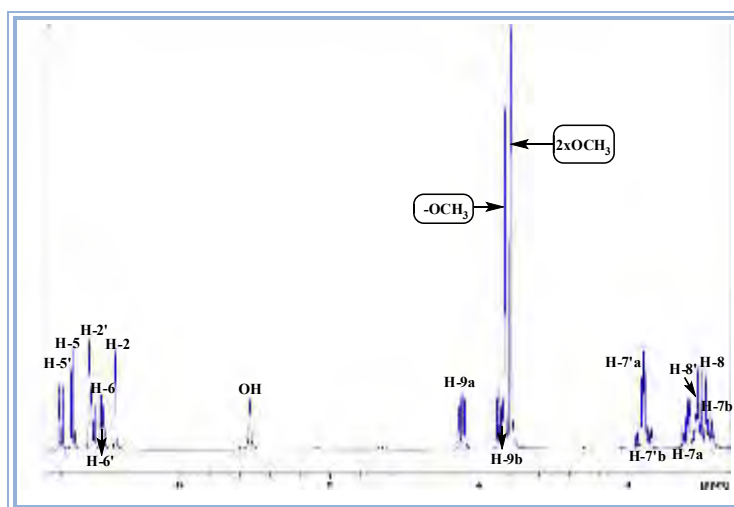
$$[\alpha]_D^{20} - 41,4 (c=0,13; \text{CH}_3\text{OH}).$$

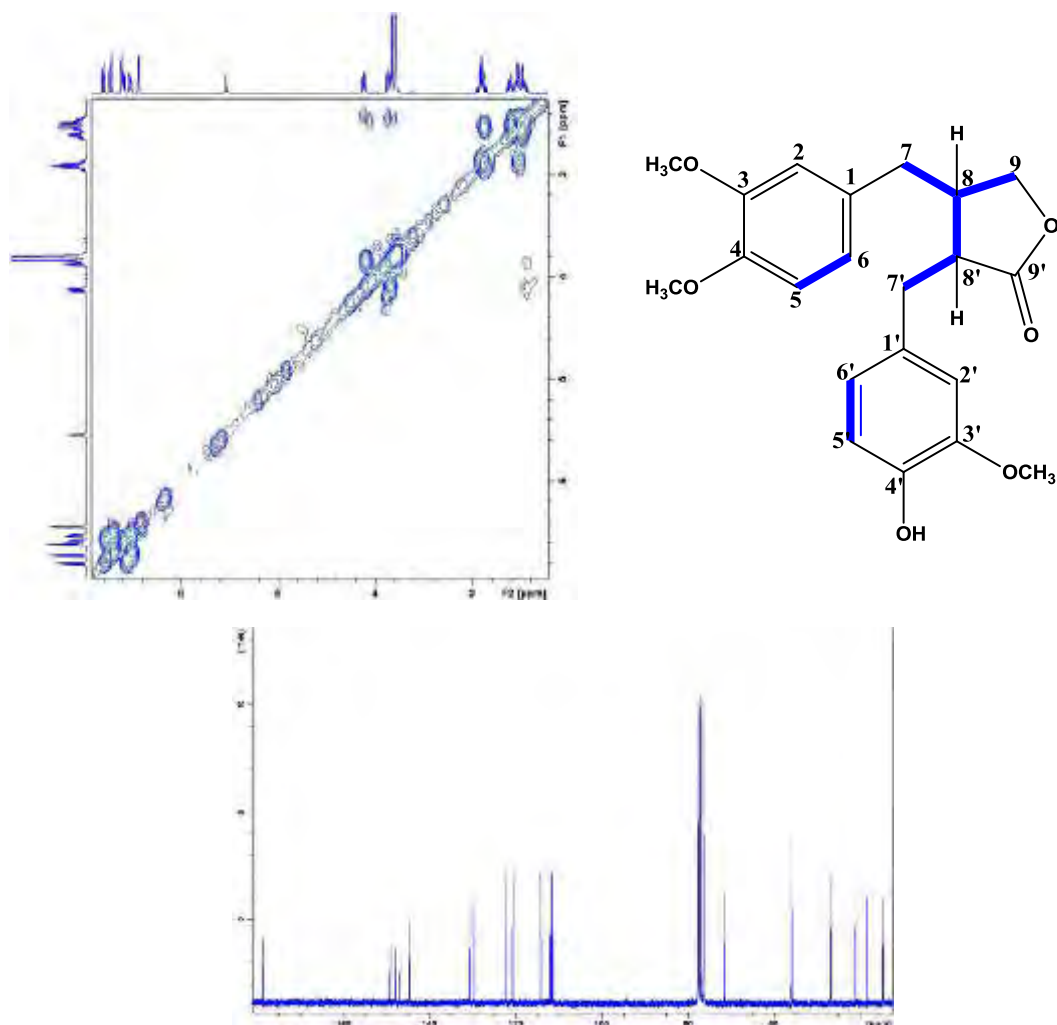
На основу $^1\text{H-NMR}$ спектра супстанце **16** (Табела 3.16; Слика 3.50 – 3.51) уочава се да су хемијска померања сигнала готово аналогна матересинолу (једињење **15**). Једину разлику представљају три сигнала у ароматичном делу спектра Н-6 (δ_{H} 6,52 vs 6,48); Н-5 (δ_{H} 6,77 vs 6,72); Н-2 (δ_{H} 6,43 vs 6,38), као и само један широки синглет на δ_{H} 5,54 од фенолне ОН.

Интеграцијом два синглета на δ_{H} 3,79 и δ_{H} 3,83 која се уочавају на спектру, добија се укупно девет протона, за разлику од шест протона, колико се добија интеграцијом два синглета код матересинола. Ови спектрални подаци указују на то да молекул садржи три метокси групе, од којих су две еквивалентне. Такође, једна хидроксилна група ароматичних прстенова матересинола супституисана је метил групом код супстанце **16** (Слика 3.50).

Табела 3.16 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **16** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Позиција	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
Бензил прстен						
C-1	C	130,5	-	-	-	-
C-1'	C	129,6	-	-	-	-
C-2	CH	111,5	H-2	6,43	<i>d</i> (J=1,8)	1
C-2'	CH	111,8	H-2'	6,61	<i>d</i> (J=2,0)	1
C-3	C	149,1	-	-	-	-
C-3'	C	147,1	-	-	-	-
C-4	C	146,7	-	-	-	-
C-4'	C	144,6	-	-	-	-
C-5	CH	111,4	H-5	6,72	<i>d</i> (J=8,1)	1
C-5'	CH	114,1	H-5'	6,80	<i>d</i> (J=8,1)	1
C-6	CH	120,6	H-6	6,52	<i>dd</i> (J=1,8; 8,0)	1
C-6'	CH	122,1	H-6'	6,58	<i>dd</i> (J=2,0; 8,0)	1
C-7	CH ₂	34,5	H-7a	2,60	<i>t</i> (J=7,4)	1
			H-7b	2,40	<i>t</i> (J=7,4)	1
C-7'	CH ₂	38,2	H-7'a	2,93	<i>dd</i> (J=5,5; 14,1)	1
			H-7'b	2,87	<i>dd</i> (J=6,6; 14,1)	1
Лактонски прстен						
C-8	CH	40,9	H-8	2,50	<i>dt</i> (J=5,9; 12,8)	1
C-8'	CH	46,6	H-8'	2,61	<i>dt</i> (J=5,9; 12,8)	1
C-9	CH ₂	71,3	H-9a	4,11	<i>dd</i> (J=7,2; 9,0)	1
C-9'	C=O	178,8	-	-	-	-
Метокси група						
OCH ₃	CH ₃	-	-	3,83	<i>s</i>	3
2xOCH ₃	CH ₃	55,8	-	3,79	<i>s</i>	6
Хидроксилна група						
OH	-	-	C-4'/OH	5,54	<i>brs</i>	1

Слика 3.50 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **16**



Слика 3.51 ^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце **16** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Најважније корелације COSY спектра (плаве болд везе)

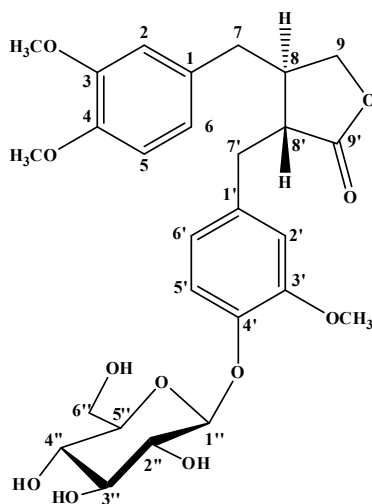
Помоћу ^{13}C -NMR спектра (Слика 3.51) одређена је позиција треће метокси групе. Поређењем ^{13}C -NMR спектра супстанце **16** са спектром матересинола (**15**), уочавају се одређене разлике код хемијских померања појединих угљеникових атома једног ароматичног прстена: C-1 (δ_{C} 130,5 vs 129,7), C-2 (δ_{C} 111,5 vs 110,9), C-3 (δ_{C} 149,5 vs 146,7), C-4 (δ_{C} 146,7 vs 144,5), C-5 (δ_{C} 111,4 vs 114,1) и C-6 (δ_{C} 120,6 vs 121,3). Како се основне разлике уочавају на угљениковим атомима C-4, C-3, C-5 и једна метокси група се налази на положају C-3 матересинола, изводи се закључак да је трећа метокси група везана за положај C-4.

Наведени спектрални подаци су у сагласности са литературним подацима (Nishibe et al., 1984).

Основна структура диарилбутирлактонског лигнана **16** потврђена је помоћу COSY спектра (Слика 3.51): Спин систем А: CH₂-7/H-8/H-8'/CH₂-7'; Спин систем В: CH₂-9/H-8; Спин систем С: H-5/H-6; Спин систем D: H-5'/H-6'.

17. Арктин

Арктин је присутан у многим врстама фамилије Asteraceae, а изолован је из многих врста рода *Centaurea* (Табела 1.7). Супстанца **17** изолована је као уљаста супстанца наранџасте боје. Анализом спектралних података за наведено једињење предложена је следећа хемијска структура приказана на слици 3.52.



Слика 3.52 17. Арктин

Вредност оптичке ротације метанолског раствора једињења је:

$$[\alpha]_D^{20} - 34,6 \text{ (} c=0,09; \text{CH}_3\text{OH)}.$$

Сигнали који се уочавају на ¹H-NMR спектру (Табела 3.17; Слика 3.53) потврђују да супстанца припада бутирлактонској групи лигнана, са два бензил метиленска протона CH₂-7 који се уочавају као триплети на δ_H 2,64 и δ_H 2,52 са идентичним константама спрезања (J=6,8 Hz), и CH₂-7' као дублети на δ_H 2,86 (J=5,7), два метинска протона CH-8 као триплет на δ_H 2,47 (J=7,2) и CH-8' као двоструки триплет на δ_H 2,56 (J=13,4; 5,7). Метиленски протони CH₂-9 уочавају

се као двоструки дублет на δ_{H} 4,13 ($J=8,9; 7,4$) и на δ_{H} 3,85 (преклопљени сигналима шећерне компоненте).

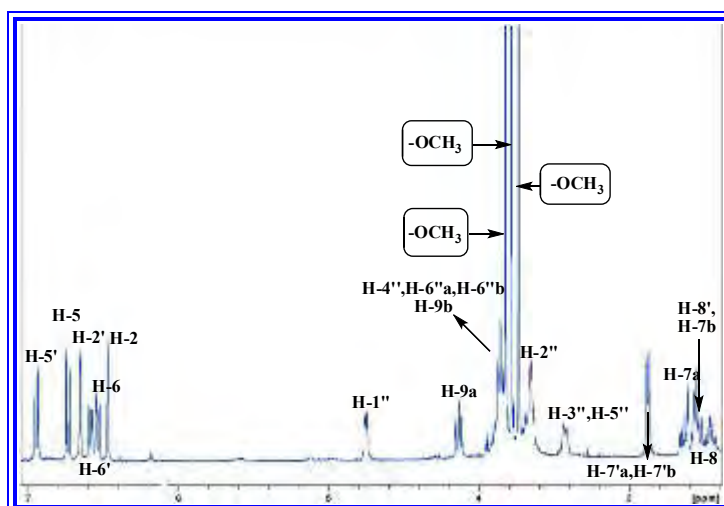
Остали сигнали у спектру указују на присуство шест ароматичних протона, три метокси групе и једне шећерне компоненте.

Поред сигнала карактеристичних за бутирлактонски лигнан, дублет на δ_{H} 4,75 ($J=6,7$ Hz), одговара аномерном протону H-1'' шећерне компоненте.

Табела 3.17 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **17** (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Позиција	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
Бензил прстен						
C-1	C	130,4	-	-	-	-
C-1'	C	133,9	-	-	-	-
C-2	CH	112,0	H-2	6,47	<i>d</i> ($J=2,0$)	1
C-2'	CH	113,2	H-2'	6,65	<i>d</i> ($J=1,8$)	1
C-3	C	149,2	-	-	-	-
C-3'	C	148,2	-	-	-	-
C-4	C	145,3	-	-	-	-
C-4'	C	144,9	-	-	-	-
C-5	CH	111,5	H-5	6,74	<i>d</i> ($J=8,2$)	1
C-5'	CH	115,8	H-5'	6,94	<i>d</i> ($J=8,1$)	1
C-6	CH	120,6	H-6	6,53	<i>dd</i> ($J=8,2; 1,9$)	1
C-6'	CH	121,8	H-6'	6,58	<i>dd</i> ($J=8,1; 1,4$)	1
C-7	CH ₂	34,5	H-7a	2,64	<i>t</i> ($J=6,8$)	1
			H-7b	2,52	<i>t</i> ($J=6,8$)	1
C-7'	CH ₂	38,1	H-7'a	2,86	<i>d</i> ($J=5,7$)	2
			H-7'b			
Лактонски прстен						
C-8	CH	46,5	H-8	2,47	<i>t</i> ($J=7,2$)	1
C-8'	CH	48,9	H-8'	2,56	<i>dt</i> ($J=13,4; 5,7$)	1
C-9	CH ₂	71,2	H-9a	4,13	<i>dd</i> ($J=8,9; 7,4$)	1
			H-9b	3,85	<i>m</i> *	1
C-9'	C=O	178,4	-	-	-	-
Глукоза						
C-1''	CH	102,2	H-1''	4,75	<i>d</i> ($J=6,7$)	1
C-2''	CH	73,5	H-2''	3,66	<i>m</i>	1
C-3''	CH	76,5	H-3'', H-5''	3,43	<i>m</i>	2
C-4''	CH	69,4				
C-5''	CH	75,6	H-4'',	3,85	<i>m</i>	3
C-6''	CH ₂	60,7	H-6''a, H-6''b			
Метокси група						
OCH ₃	CH ₃	55,9	-	3,82	<i>s</i>	3
OCH ₃	CH ₃	55,8	-	3,78	<i>s</i>	3
OCH ₃	CH ₃	55,8	-	3,73	<i>s</i>	3

* Сигнали су преклопљени сигналима протона глукозе.



Слика 3.53 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **17** (CDCl_3 ; 400,0 MHz)

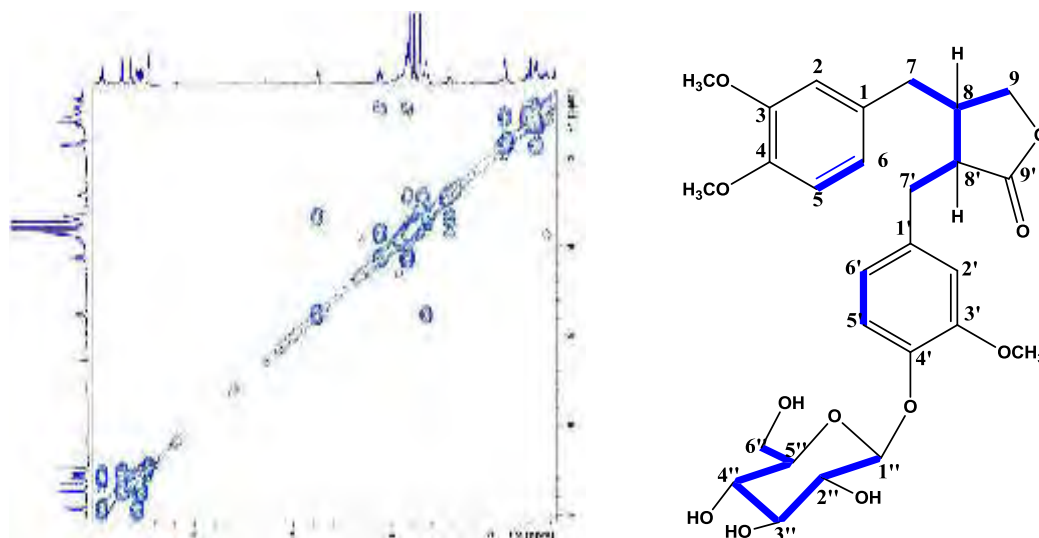
Помоћу COSY спектра (Слика 3.54) одређен је тачан положај свих протона шећера, поред протонских сигнала лактонског прстена.

$^{13}\text{C-NMR}$ спектар потврђује присуство глукозе као шећерне компоненте. Упоредјујући хемијска померања сигнала на $^{13}\text{C-NMR}$ спектру арктигенина (стр. 171) и једињења **16**, уочавају се две основне разлике у хемијским померањима угљеникових атома централног скелета молекула:

- Ароматични угљеник C-1' уочава се на нижим вредностима поља од δ_{C} 129,6 на 133,9,
- C-3' од δ_{C} 147,1 на 148,2.

Разлика од $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4,3 и 1,1 ppm, је већином у сагласности са литературним подацима групе Нишибе (Nishibe) група је публиковала да је разлика од + 3,0 и + 1,4 ppm за C-1' и C-3', карактеристична за постојање гликозидне везе на положају C-4 прстенастог система типа гвајакола Nishibe et al. (1984)

Хемијска померања свих угљеникових атома шећерне компоненте добијена су на основу $^{13}\text{C-NMR}$ спектра (Слика 3.54): C-1'' (δ_{C} 102,2); C-2'' (δ_{C} 73,5); C-3'' (δ_{C} 76,5); C-4'' (δ_{C} 69,4); C-5'' (δ_{C} 75,6); C-6'' (δ_{C} 60,7).



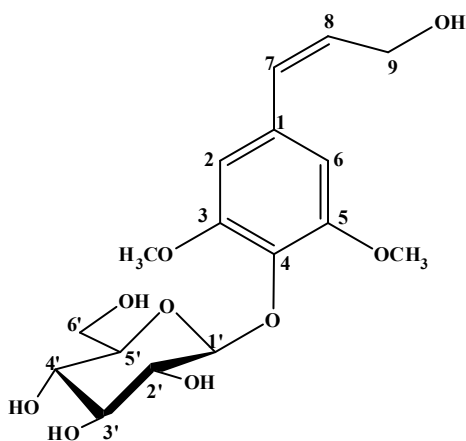
Слика 3.54 ^1H - ^1H COSY и ^{13}C -NMR спектри супстанце 17 (CDCl_3 ; 400,0; 50,3 MHz); Најважније корелације (плаве болд везе)

18. Сирингин;

Синапил алкохол -4'-О-β-D-глюкопиранозид

Први пут супстанцу је изоловао Милет (Meillet) из биљке *Syringa vulgaris* L., 1841 године. До сада, супстанца је изолована из различитих биљних врста, нарочито из фамилије Asteraceae, и предложена је као хемотаксономски маркер унутар наведене фамилије (Cis et al., 2003). Из рода *Centaurea* изолована је из следећих врста: *C. repens* (*Acroptilon repens* (L.) DC.); *C. bella* Trautv; *C. crocodylium* L, (Cis et al., 2003); *C. cineraria* L, (Senatore et al., 2003), *C. jacea* L, (Forgo et al., 2012), *C. ptosimopappoides* (Flamini et al., 2006).

Супстанца **18** изолована је у облику кристала жуте боје, а анализом спектралних података одређена је хемијска структура једињења приказана на **слици 3.55**.



Слика 3.55 18. Сирингин

Вредност оптичке ротације метанолског раствора испитиваног једињења је:
 $[\alpha]_D^{20} - 27,5$ (c=0,12; CH₃OH).

1/2D NMR (**Табела 3.18**; **Слика 3.56**) спектри указују на присуство ароматичног глюкозидног деривата.

На $^1\text{H-NMR}$ спектру се уочавају два синглета типична за симетрично тетра-супституисани ароматични прстен, један који интеграцијом даје два протона налази се на δ_{H} 6,75 (H-2', H-6'); и други на δ_{H} 3,86 који интеграцијом даје шест протона, карактеристичних за две метокси групе. Дублет на δ_{H} 6,55 ($J=15,6$, H-7) и троструки триплет на δ_{H} 6,33 ($J=5,6$; 15,6, H-8) указују на присуство *trans* двоструке везе директно везане за хидрокси-метиленску групу (CH_2 -9), Корелација између хидрокси-метиленске групе и двоструке везе потврђена је помоћу COSY спектра (Слике 3.56 – 3.57).

Хемијска померања протона и угљеникових атома добијена су на основу COSY и HSQC спектра, као и на основу $^{13}\text{C-NMR}$ спектра.

На основу литературних података циметна киселина и алкохоли (добијени редукцијом циметне киселине помоћу коензим А естра и алдехида) учествују у биохемијској синтези осталих метаболита који у свом саставу садрже C6-C3 структурни фрагмент. Биљке гимносперми полимеризују углавном кониферил алкохол, дикотелодини, кониферил и синапил алкохол, док монокотиледони користе сва три алокохола (Dewick, 2001).

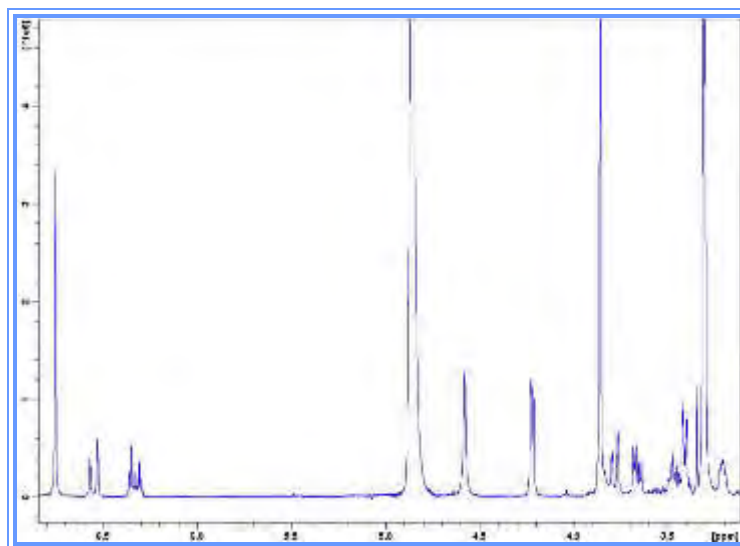
На основу ових чињеница, може се констатовати да је сирингин један од прекурсора у биосинтези изолованих лигнана, с обзиром на то да је синапил алкохол потврђени интермедијер у биосинтези једињења типа лигнана.

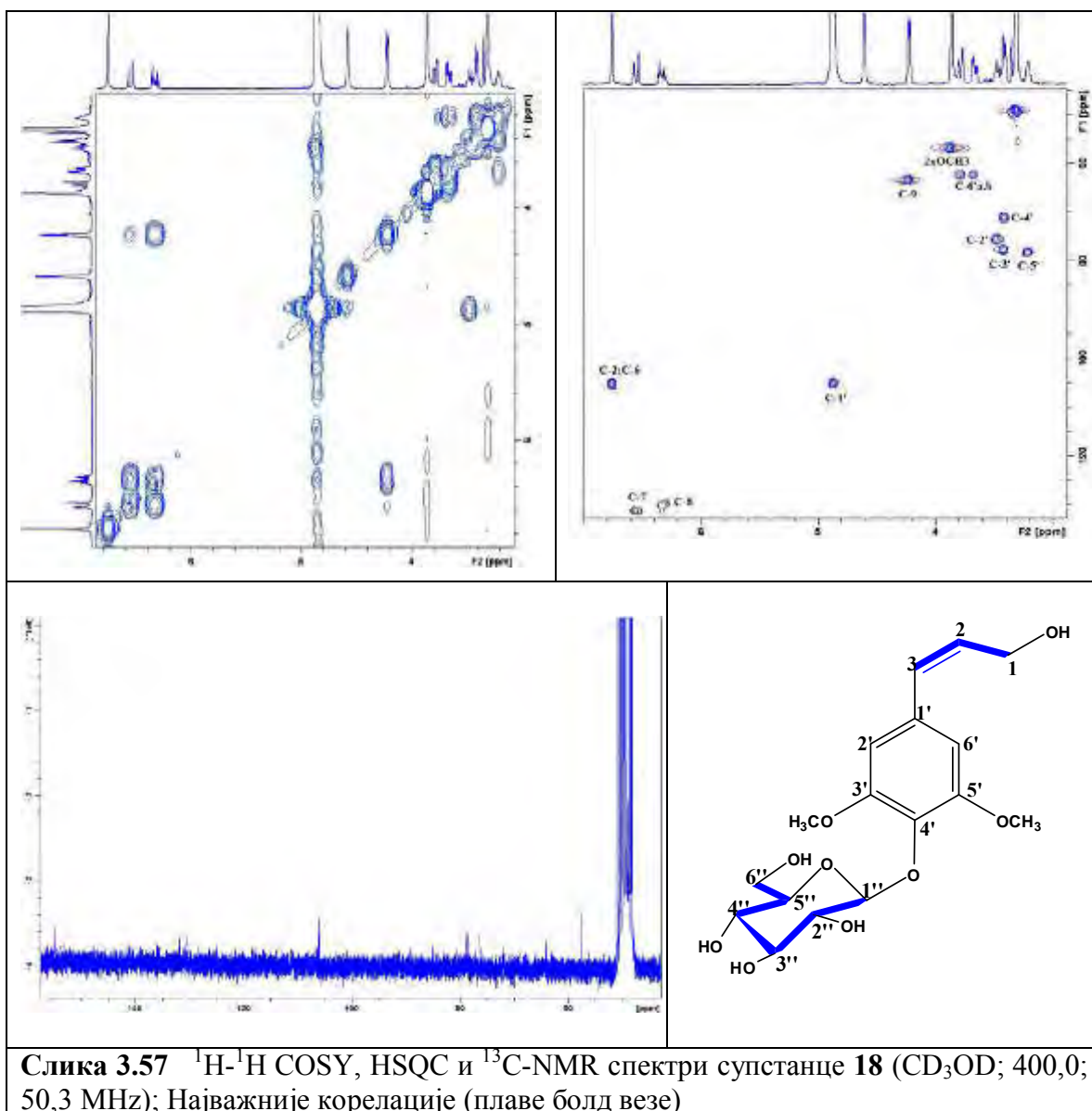
Супстанца је добар антиалергент и хипотензив, показује анти-инфламатору активност, као цитотоксичну активност на неколико ћелија рака (Cis, 2003).

Табела 3.18 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **18** (CD_3OD ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Позиција	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
Синапил остатак						
C-1	C	131,9	-	-	-	-
C-2, C-6	CH	105,1	H-2', H-6'	6,75	brs	2
C-3	C	154,8	-	-	-	-
C-4	C	135,8	-	-	-	-
C-5	C	154,8	-	-	-	-
C-7	CH ₂	63,4	H-1	4,22	<i>d</i> (J=5,6)	2
C-8	CH	129,7	H-2	6,33	<i>tt</i> (J=15,6; 5,6)	1
C-9	CH	130,6	H-3	6,55	<i>d</i> (J=15,6)	1
Глукоза						
C-1'	CH	104,7	H-1''	4,88	*	1
C-2'	CH	75,2	H-2''	3,49-3,42	<i>m</i>	3
C-3'	CH	78,9	H-3'', H-4''			
C-4'	CH	71,8				
C-5'	CH	77,5	H-5''	3,20	<i>m</i>	1
C-6'	CH ₂	62,2	H-6''a	3,78	<i>dd</i> (J=12,0; 1,4)	1
			H-6''b	3,67	<i>dd</i> (J=12,0; 5,3)	1
Метокси група						
OCH ₃	CH ₃	56,7	CH ₃	3,86	<i>s</i>	6
Хидроксил група						
			OH	4,70	<i>s</i>	1

* Преклопљено сигналина растварача.

Слика 3.56 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **18** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



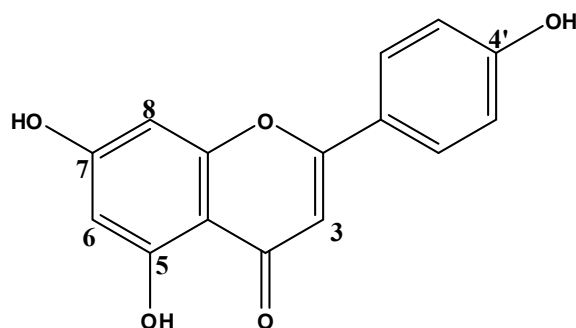
3.3 Флавоноиди

19. Апигенин;

5,7,4'-Трихидроксифлавоон

До данас, апигенин је изолован из многих врста рода *Centaurea* : *C. jacea* L. (Forgo et al., 2012), *C. alexanderina* (Kubacey et al., 2012), *C. urvillei* DC. subsp. *urvillei* (Gülcemal et al., 2010), *C. nicaeensis* all. var. *walliana* M. (Hammoud et al., 2012) и *C. sadleriana* JANKA (Csupor et al., 2012) итд.

Апигенин је један од најзаступљенијих флавона у биљном свету. Изолован је у облику аморфног жутог праха а његова хемијска структура (приказана на **слици 3.58**) потврђена је анализом спектралних података и њиховом корелацијом са до сада, публикованим резултатима (Agrawal, 1989).



Слика 3.58 19. Апигенин

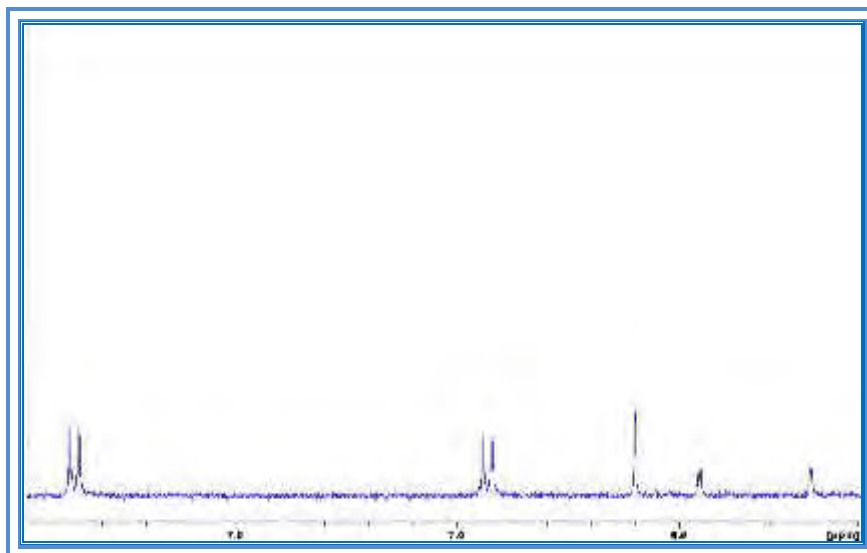
Резултати UV-Vis спектралне анализе приказани су у Табели 3.19.

Табела 3.19 UV-Vis спектар супстанце 19 (λ_{\max} у nm)

	Трака II			Трака I		$\Delta\lambda$ (Ia)
	IIb	Ia		Ib	Ia	
MeOH		270,0			334,0	
MeONa		276,0	320,5		391,0 \uparrow	+57,0
AlCl ₃		276,0	301,5(sh)	350,0	378,0	+44,0
AlCl ₃ /HCl		276,0	301,5(sh)	349,0	379,0	+45,0
NaOAc		276,0 $\Delta\lambda$ (II) +6,0	309,0	325,0	383,5	+49,5
NaOAc/H ₃ BO ₃		270,0			337,5	+3,5

Табела 3.20 ¹H-NMR супстанце 19 (CD₃OD; 400,0 MHz)

Хемијско померање δ (ppm)	Бр. H	Хемијско спрежање J (Hz)	Позиција
7,85	2	<i>d</i> (J=8,6)	H-2', H-6'
6,93	2	<i>d</i> (J=8,6)	H-3', H-5'
6,60	1	brs	H-3
6,46	1	<i>d</i> (J=2,0)	H-8
6,21	1	<i>d</i> (J=2,0)	H-6

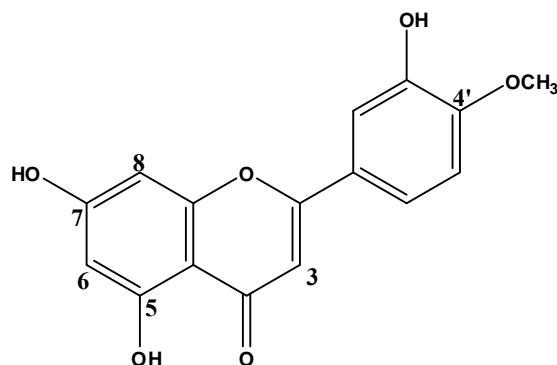


Слика 3.59 ¹H-NMR спектар супстанце 19 (CD₃OD; 400,0 MHz)

20. Диосметин;

3',4',5,7-тетрахидроксифлавоон 4'-метил етар; лутеолин-4'-метил етар

Супстанца **20** изолована је као жути прах и на основу резултата спектроскопских анализа одређена је хемијска структура приказана на **слици 3.60**.

**Слика 3.60** 20. Диосметин

Ово једињење флавоноидне структуре је први пут изоловано из рода *Centaurea*.

Резултати UV-Vis спектралне анализе приказани су у **Табели 3.21**.

Табела 3.21 UV-Vis спектар супстанце **20** (λ_{\max} у nm)

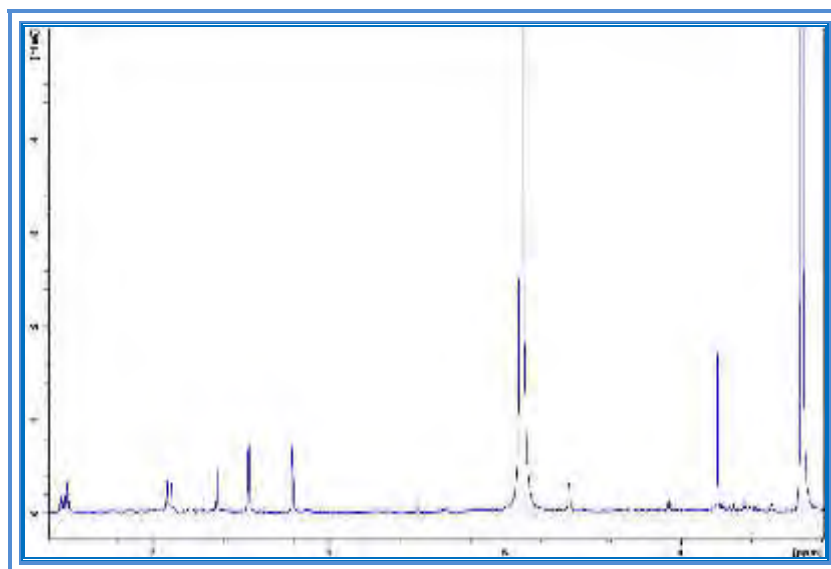
	трака II			трака I		$\Delta\lambda$ (Ia)
	Ib	IIa		Ib	Ia	
MeOH	261,0	273,0			338,0	
MeONa		273,0	305,5(sh)		374,0↓	+36,0
AlCl ₃	261,0	271,0	296,0(sh)	361,0	383,0 (sh)	+45,0
AlCl ₃ /HCl	258,0	273,0	300,5(sh)	354,0	385,0 (sh)	+47,0
NaOAc	277,0 $\Delta\lambda$ (II) +7,0		317,0(sh)		360,5	+22,5
NaOAc/H ₃ BO ₃	268,0				341,5	+3,5

Апсорпциони максимум траке I ($\lambda_{\max}=338$ nm) у метанолском раствору указује, као и претходном случају, да супстанца **20** припада групи флавона. Два апсорпциона пика траке II ($\lambda_{\max}=261, 273$ nm) јављају се на спектру када молекула садржи 3',4' функционалне групе са кисеоником на Б-прстену (**Табела 3.21**). Батохромно померање траке I од +36 nm након додавања NaOMe иницијалном метанолском раствору, индикује одсуство 4'-ОН групе у Б-прстену. Уз то, криве спектра су стабилне неколико минута након додатка NaOMe што потврђује да супстанца **20** не припада флавонолима. Одсуство хипохромног ефекта Траке I, након додатка HCl у раствор AlCl₃, указује да Б-прстен супстанце **20** не садржи *ortho*-дихидроксилне групе. Батохромно померање сва четири апсорпциона пика у односу на метанолни раствор супстанце, која се уочавају на спектру по додатку AlCl₃/HCl, карактеристични су за 5-хидроксифлавоне. Такође, батохромно померање Траке II ($\Delta\lambda= + 7,0$) приликом снимања спектра у раствору NaOAc указује на слободну 7-хидроксилну групу, док батохромно померање мање од 5,0 nm Траке I ($\Delta\lambda= + 3,5$ nm) након додатка H₃BO₃ потврђује одсуство *ortho*-дихидроксилних група на прстеновима А, В у молекулу.

На ¹H-NMR спектару супстанце (**Табела 3.22**, **Слика 3.61**), уочавају се пикови у ароматичном делу спектра карактеристични за АВХ систем. Два дублета на $\delta_{\text{H}} 7,48$ ($J=2,0$) и $\delta_{\text{H}} 6,93$ ($J=8,4$), као и двоструки дублет на $\delta_{\text{H}} 7,50$ ($J=8,0; 1,8$) указују на 3',4' ди-супституисани Б-прстен флавона. Наведени пикови одговарају протонима Н-2', Н-5', Н-6', наведеног прстена. У ароматичној регији спектра се такође налазе и три пика карактеристична за протоне који потичу са А-прстена молекула. Два дублета на $\delta_{\text{H}} 6,44$ и $\delta_{\text{H}} 6,20$ са малом константом купловања (са. 2,0 Hz) одговарају протонима Н-8 и Н-6, док широки синглет на $\delta_{\text{H}} 6,60$ протону Н-3 (**Слика 3.61**). Оштар синглет на $\delta_{\text{H}} 3,80$, који интеграцијом даје три протона, карактеристичан је за метокси групу која се, у сагласности са подацима добијеним на основу UV-Vis спектра, налази на положају С-4'.

Табела 3.22 $^1\text{H-NMR}$ супстанце **20** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Хемијско померање δ (ppm)	Бр. H	Константа спрезања J (Hz)	Позиција
7,50	1	<i>dd</i> (J=8,0;1,8)	H-6'
7,48	1	<i>d</i> (J=2,0)	H-2'
6,93	1	<i>d</i> (J=8,4)	H-5'
6,60	1	brs	H-3
6,44	1	<i>d</i> (J=2,0)	H-8
6,20	1	<i>d</i> (J=2,0)	H-6
3,80	3	s	OCH ₃

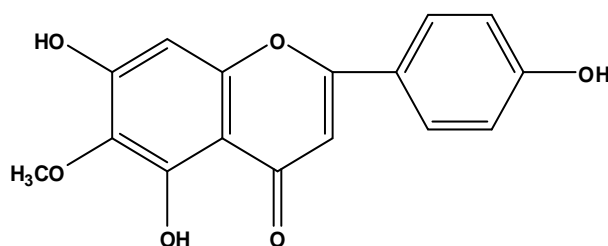
Слика 3.61 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **20** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

21. Хиспидулин;

5,6,7,4'-тетрахидроксифлавон 6-метил етар; 6-метоксиапигенин;
6-метилскутеларин

Према литературним изворима ово једињење изоловано је из следећих врста рода *Centaurea*: *C. jacea* L. (Forgo et al., 2012), *C. sadleriana* JANKA (Csupor et al., 2012), *C. melitensis* L. (Negrete et al., 1989), *Centaurea phyllocephala* Boiss. (Twajj et al., 1983), *C. bracteata* Scop. (Flamini et al., 2001), *C. napifolia* L. (Akkal et al., 2003), *C. collina* L. subsp. *collina* (Fernandez et al., 1989), *C. aspera* L. var. *subinermis* DC. (Cardona et al., 1991).

Супстанца **21** жуте је боје и уљастог изгледа. Према доле приказаним резултатима спектралне анализе одређена јој је следећа хемијска структура приказана на **слици 3.62**.



Слика 3.62 21. Хиспидулин

Спектроскопском анализом супстанце **21** (UV-Vis, **Табела 3.23**) добијене су карактеристичне криве са наведеним вредностима таласних дужина.

Табела 3.23 UV-Vis спектар супстанце **21** (λ_{\max} у nm)

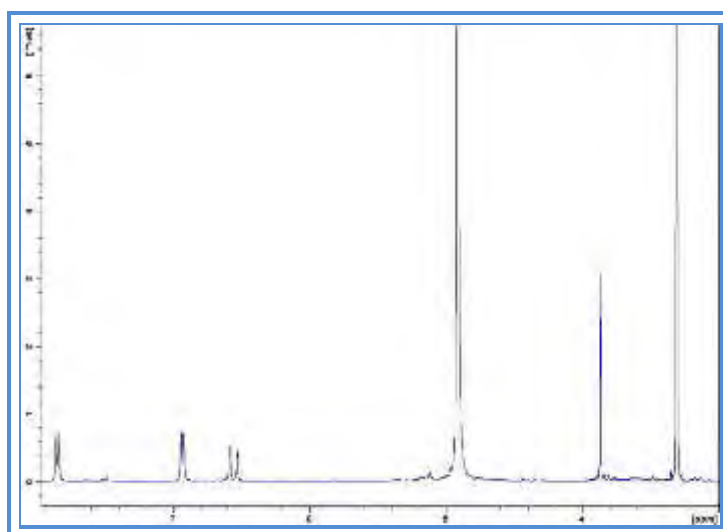
	Трака II	Трака I		$\Delta\lambda$ (I)
MeOH	273,0		334,0	
MeONa	274,5	303,0 (sh)	378,5	+44,0
AlCl ₃	279,0	302,0(sh)	360,5	+26,5
AlCl ₃ /HCl	278,0	302,5	354,0	+20,0
NaOAc	276,0 $\Delta\lambda$ (II) +3,0	305,0(sh)	366,0	+32,0
NaOAc/H ₃ BO ₃	278,0	300,0	338,0	+4,0

Вредност апсорбанце траке I од λ_{\max} 334,0 nm у раствору метанола супстанце **21** класификује је у подгрупу флавана. Апсорпциони пик траке II (λ_{\max} 273 nm) у раствору метанола као и батохромни и хипсохромни ефекат апсорпционог максимума траке I по додатку MeONa указује на присуство слободне 4'- хидроксилне групе Б-прстена (Табела 3.23). Стабилност спектра након додатка NaOMe потврђује одсуство хидроксилне групе на положају С-3. Батохромни ефекат траке I од $\Delta\lambda$ + 20 nm додатком AlCl₃/HCl, у односу на почетни метанолски раствор је карактеристичан за флаване који садрже 5-хидрокси-4-кето-систем, као и присуство метокси или хидрокси групе на положају С-6, али не и на положају С-8 (Mears & Mabry, 1972, Sakakibara & Mabry, 1977). Батохромни ефекат траке II од $\Delta\lambda$ = + 3, чији је апсорпциони пик стабилан неколико минута након додавања NaOAc, потврђује присуство кисеоничне функције на позицији С-6 као и хидроксилних група на позицији С-7 и С-5. Батохромно померање траке I од + 4 nm у присуству NaOAc/H₃BO₃ потврђује да А и Б прстенови не садрже *ortho*-дихидроксилни систем.

Структура супстанце **21** потврђена је помоћу ¹H-NMR спектра (Табела 3.24; Слика 3.63). Два дублета у ароматичној регији спектра од δ_{H} 7,84 (J=8,4; H-2', H-6') и δ_{H} 6,92 (J=8,8; H-3', H-5') потврђују *para*-супституисани Б прстен. Два широка синглета, на δ_{H} 6,53 и δ_{H} 6,58 која интеграцијом дају по један протон, карактеристични су за H-3 и H-8, док је синглет на δ_{H} 3,88 који интеграцијом даје три протона карактеристичан за метокси групу.

Табела 3.24 $^1\text{H-NMR}$ супстанце **21** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

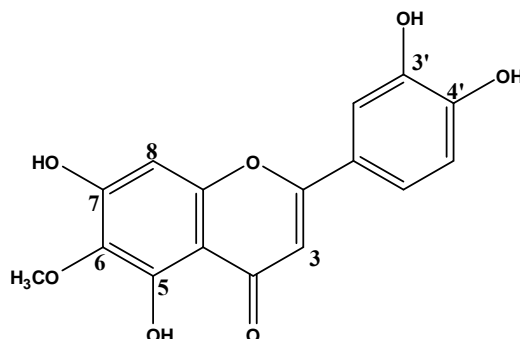
Хемијско померање δ (ppm)	Бр. H	Константа спрењања J (Hz)	Позиција
7,84	2	<i>d</i> (J=8,4)	H-2', H-6'
6,92	2	<i>d</i> (J=8,8)	H-3', H-5'
6,58	1	brs	H-8
6,53	1	brs	H-3
3,88	3	s	-OCH ₃

Слика 3.63 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **21** (CD_3OD ; 400,0 MHz)**22. Непетин;**

5,6,7,3',4'-Пентахидроксифлавоон 6-метил етар; Еупафолин

До сада, супстанца је изолована из различитих врста рода *Centaurea*: *C. sulphurea* Willd. (Kabouche et al., 2011); *C. bracteata* (Flamini et al., 2001); *C. virgata* Lam., *C. inermis* Velen. (Öksüz, et al. 1983); *C. phyllocephala* Boiss. (Twajj et al., 1983), *C. collina* L. subsp. *collina* (Fernandez et al., 1989), *C. aspera* L. var. *subinermis* DC. (Cardona et al., 1991).

Супстанца **22** изолована је у облику жутих кристалних иглица. Структура (приказана на **слици 3.64**) је потврђена анализом спектралних података и њиховом корелацијом са до сада публикованим резултатима (Agrawal, 1989).



Слика 3.64 22. Непетин

Спектроскопском анализом супстанце **22** (UV-Vis, **Табела 3.25**) добијене су карактеристичне криве са наведеним вредностима таласних дужина.

Табела 3.25 UV-Vis спектар супстанце **22** (λ_{\max} у nm)

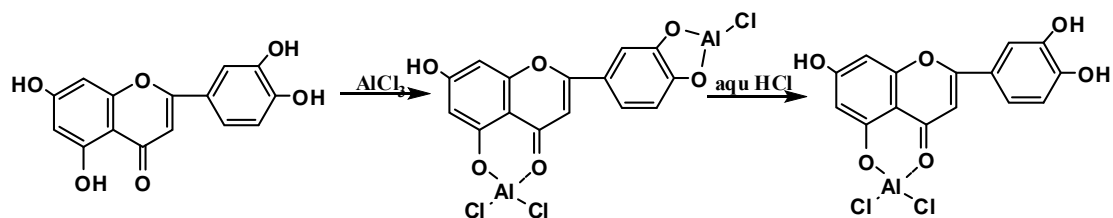
	Трака II			Трака I		$\Delta\lambda$ (Ia)
	IIb	IIa		Ib	Ia	
MeOH	254,0	271,0			347,0	
MeONa		270,0		335,5(sh)	394,0 \uparrow	+47,0
AlCl ₃		274,0	297,0(sh)	332,0(sh)	418,0	+71,0
AlCl ₃ /HCl	260,0	281,0	294,0(sh)		365,0	+18,0
NaOAc		273,0 $\Delta\lambda$ (II) +2,0	305,0(sh)	330,0(sh)	362,5	+15,5
NaOAc/H ₃ BO ₃	264,0		300,0		377,0	+30,0

UV-Vis спектрални подаци (**Табела 3.25**) добијени у метанолском раствору супстанце **22** указују да супстанца припада подгрупи флавана са 3',4' хидроксилним групама на Б прстену: апсорпциони максимум Траке I на $\lambda_{\max}=347,0$ nm; као и дељење траке II (IIb/ $\lambda_{\max}=254,0$ nm; IIa/ $\lambda_{\max}=271,0$ nm). Такође, како је апсорпциони максимум траке IIa ($\lambda_{\max}=271,0$ nm) у метанолском раствору испод 279 nm, супстанца не садржи никакву кисеоничну групу на C-8 (Voinir, 1983). У сагласности са литературним подацима (Voinir,

1983), супституција на С-8 узрокује раздвајање траке I на две траке (Трака Ia и Трака Ib) са интензитетом Траке Ib од око λ 305 nm. трака II се такође раздваја при чему долази до већег батохромног померања трака II код 8-ОН/-ОСН₃ деривата у односу на супстанце без супституције на позицији С-8. Коначно, вредност односа апсорпционих максимума траке Ia и траке II је критеријум за одређивање положаја супституента (С-6 или С-8). У случају супституције на С-8, однос је мањи, док је у случају супституције на С-6 однос знатно већи.

Велики батохроми и хиохромни ефекат траке I од +47 nm у раствору NaOMe у односу на метанолни раствор потврђује присуство слободне 4'-хидроксилне групе. С обзиром на то да је спектар стабилан након неколико минута закључује се да нема слободне хидроксилне групе на С-3.

Хипсохромно померање $\Delta\lambda_{\max}$ [AlCl₃-AlCl₃/HCl] + 53 nm траке I које се запажа на спектру након додатка HCl у раствор AlCl₃ супстанце, указује на разлагање комплекса насталог између AlCl₃ са *ortho*-дихидроксилном групом на Б-прстену. Батохромни ефекат траке I од $\Delta\lambda_{\max}$ + 18.0 nm у раствору AlCl₃/HCl у односу на метанолски раствор потврђује присуство слободне 5-хидроксилне групе у молекулу као и присуство метокси групе на С-6 (Mears & Mabry, 1972, Sakakibara & Mabry, 1977), док батохромни ефекат од $\Delta\lambda_{\max}$ + 2 nm Траке II на спектру по додатку NaOAc указује на слободну хидроксилну групу на С-7. Ово се објашњава тиме да је NaOAc слаб алкални реагенс, а како је киселост хидроксилне групе на положају 7-ОН смањена присуством метокси групе на С-6, није могућа потпуна јонизација, тако да се запажа померање мање од + 5 nm. Батохромно померање од $\Delta\lambda_{\max}$ + 30 nm траке I у присуству NaOAc/H₃BO₃ потврђује присуство *ortho*-дихидроксилне групе на Б прстену.



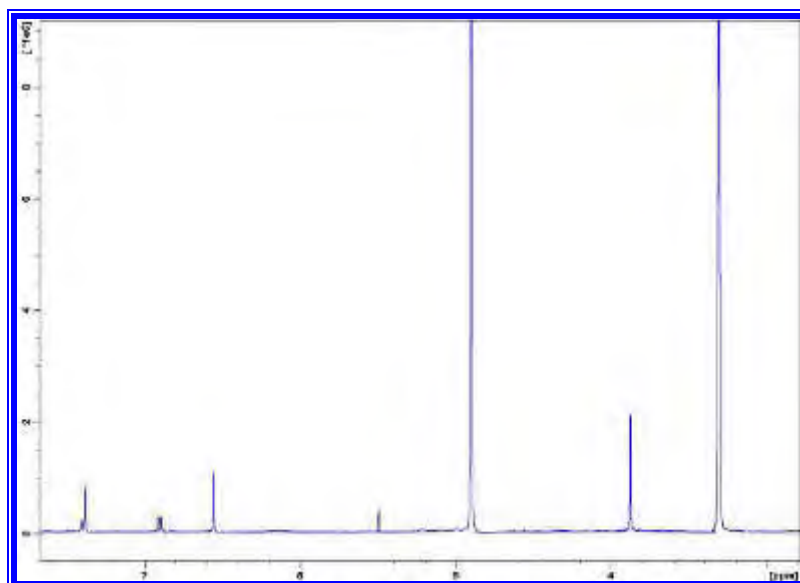
Слика 3.65 Хипохромно померање (око 30-50 nm) траке I на спектру AlCl₃ након додатка раствора HCl

На $^1\text{H-NMR}$ спектру супстанце **22** (Табела 3.26; Слика 3.66 – 3.67) уочавају се сигнали карактеристични за АВХ систем Б-прстена. Два дублета на δ_{H} 7,39 ($J=2,0$ Hz) и δ_{H} 6,92 ($J=8,4$ Hz) као и двоструки дублет на δ_{H} 7,40 ($J=8,4$; 2,0 Hz) одговарају ароматичним протонима Н-2', Н-5' и Н-6'. На спектру се такође уочава један широки синглет на δ_{H} 6,56 који интеграцијом даје два протона. С обзиром на то да се на основу UV-Vis спектра закључује да на положајима С-3 и С-8 нема супституената, наведени пик одговара протонима Н-3 и Н-8. С друге стране, синглет на δ_{H} 3,88 одговара метокси групи на положају С-6. Потврда предложене структуре добијена је помоћу HSQC и HMBC спектра: на HSQC спектру, широки синглет на δ_{H} 6,56 даје два сигнала δ_{C} 103,1 (С-3; HMBC) и δ_{C} 95,1 (С-8; HMBC) што потврђује две метинске групе које се налазе на истом положају у $^1\text{H-NMR}$ спектру (Слика 3.66 – 3.67); вредности су у сагласности са литературним подацима (Flamini et al., 2001). На основу HMBC корелације метокси групе на δ_{H} 3,88 са угљеником на δ_{C} 132,6 потврђује да се наведена група налази на положају С-6 (Agrawal, 1989).

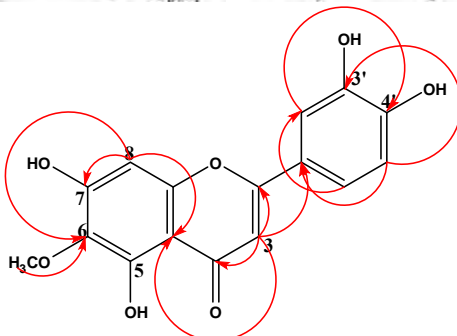
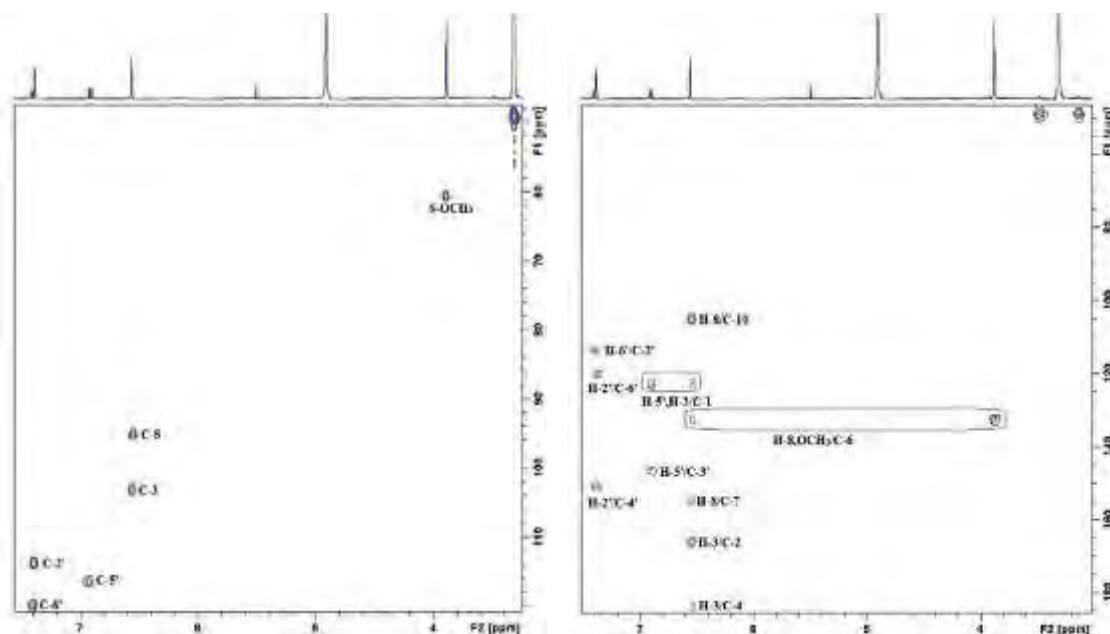
Табела 3.26 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **22** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. Н
Ring A						
C-1	-	-	-	-	-	-
C-2	C	166,0	-	-	-	-
C-3	CH	103,1	H-3	6,56	<i>s</i>	1
C-4	C=O	183,9	-	-	-	-
C-5	C	n.o.	-	-	-	-
C-6	C	132,6	-	-	-	-
C-7	C	154,8	-	-	-	-
C-8	CH	95,1	H-8	6,56	<i>s</i>	1
C-9	C	154,8	-	-	-	-
C-10	C	105,2	-	-	-	-
Ring B						
C-1'	C	122,8	-	-	-	-
C-2'	CH	113,8	H-2'	7,39	<i>d</i> ($J=2,0$)	1
C-3'	C	146,2	-	-	-	-
C-4'	C	151,0	-	-	-	-
C-5'	CH	116,5	H-5'	6,92	<i>d</i> ($J=8,4$)	1
C-6'	CH	119,9	H-6'	7,40	<i>dd</i> ($J=8,4, 2,0$)	1
OCH_3	CH_3	60,2	CH_3	3,88	<i>s</i>	3

* $^{13}\text{C-NMR}$ хемијска померања добијена су на основу HSQC и HMBC експеримента.



Слика 3.66 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **22** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



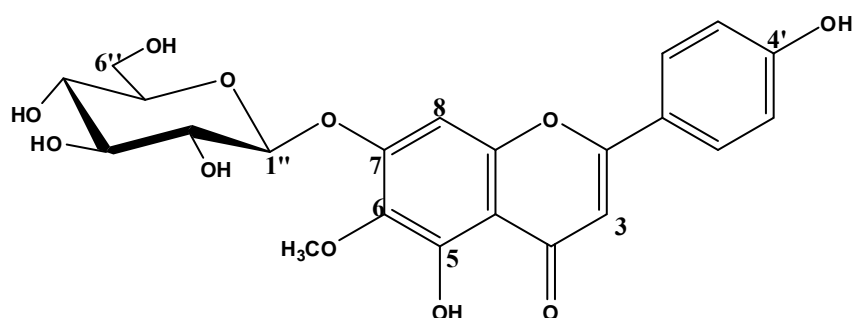
Слика 3.67 HSQC и HMBC спектри супстанце **22** (CD_3OD ; 400,0 MHz); Најважније корелације добијене помоћу HMBC спектра

23. Хиспидулин 7-О-β-D-глюкопиранозид;

5,6,7,4' тетрахидроксифлавоон 6-метил етар 7-О-β-D-глюкопиранозид

Гликозид је већ изолован из следећих врста рода *Centaurea*: *C. microcarpa* (Louaer et al., 2011), *C. bracteata* (Flamini et al., 2001); *C. urvillei* DC. subsp. *urvillei* (Gülcemal et al., 2010).

Супстанца **23** је излована из екстракта биљке као аморфан прах жуте боје и спектроскопском анализом одређена му је хемијска структура приказана на слици **3.68**.



Слика 3.68 **23.** Хиспидулин 7-О-β-D-глюкопиранозид

UV-Vis спектар супстанце **23** (Табела 3.27) је идентичан спектру описаном за агликон тј. хиспидулин (**21**).

Табела 3.27 UV-Vis спектар супстанце **23** (λ_{\max} у nm)

	Трака II	Трака I		$\Delta\lambda$ (Ia)
MeOH	276,0		333,0	
MeONa	276,5	296,0 (sh)	375,0	+42,0
AlCl ₃	283,0	300,0(sh)	354,0	+22,5
AlCl ₃ /HCl	278,0	303,0	350,0	+17,0
NaOAc	272,0 $\Delta\lambda$ (II) -4,0	297,0(sh)	368,0	+33,0
NaOAc/H ₃ BO ₃	278,0	300,0	338,0	+5,0

Потпуна структура супстанце добијена је на основу 1/2D NMR спектра. На ¹H-NMR спектару (Табела 3.28; Слика 3.69) уочава се да је спин систем агликонског дела супстанце **23** карактеристичан за хиспидулин. Два дублета у

ароматичном делу спектра на $\delta_{\text{H}} 7,88$ ($J=8,4$; H-2', H-6') и $\delta_{\text{H}} 6,92$ ($J=8,8$; H-3', H-5') потврђују *para*-супституисани В прстен. Синглет на $\delta_{\text{H}} 6,68$ као и широки синглет на $\delta_{\text{H}} 6,98$, који интеграцијом дају укупно два протона, окарактерисани су као протони H-3 и H-8. Хемијско померање H-8 на вишим вредностима објашњава се присуством 7-О супституента, с обзиром на то да су у случају присуства слободне –ОН групе на C-7, хемијска померања протона H-6 и H-8 око $\delta_{\text{H}} 6,2 - 6,5$ (Mabray, 1970).

Дублет на $\delta_{\text{H}} 5,13$ са константом спрезања $J=7,2$ Hz одговара аномерном протону (H-1'') шећерне компоненте у молекулу. Вредност константе спрезања указује на присуство β -глукопиранозе (Markham, 1989) (Слика 3.69).

На основу HSQC спектра, корелација протона са хемијским померањима на $\delta_{\text{H}} 6,68$ и $\delta_{\text{H}} 6,98$ са угљениковим атомима на $\delta_{\text{C}} 103,4$ и $\delta_{\text{C}} 93,7$ потврђује њихов положај на C-3 и C-8. Помоћу овог спектра идентификована су хемијска померања свих угљеникових атома шећерне компоненте: C-1'' ($\delta_{\text{C}} 101,6$), C-2'' ($\delta_{\text{C}} 74,0$), C-3'' ($\delta_{\text{C}} 78,0$), C-4'' ($\delta_{\text{C}} 70,4$) C-5'' ($\delta_{\text{C}} 77,4$) and C-6''a,b ($\delta_{\text{C}} 62,2$). На основу HMBC спектра и корелације удаљених атома, корелација између протонског сигнала на $\delta_{\text{H}} 6,98$ и угљеникових атома C-7 ($\delta_{\text{C}} 157,8$), и C-9 ($\delta_{\text{C}} 153,7$) потпуно потврђује да наведени сигнал одговара протону H-8. Корелација са угљениковим атомом C-7 са хемијским померањем на $\delta_{\text{C}} 157,8$ уочава се и за сигнал аномерног протона шећера H-1'' на $\delta_{\text{H}} 5,13$, што потврђује позицију шећера, одређену и помоћу ROESY спектра, на коме се уочава корелација H-1'' са H-8 ($\delta_{\text{H}} 6,98$) (Слика 3.70).

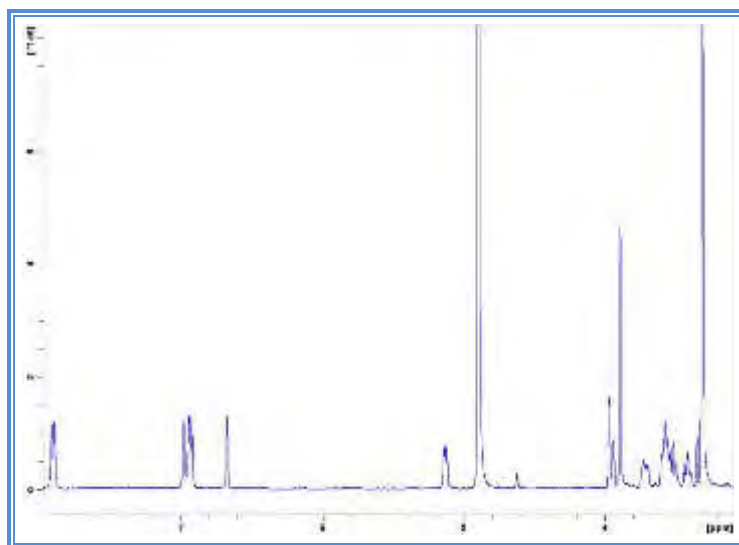
^{13}C -NMR спектар садржи двадесет три сигнала различитих угљеникових атома, чија су хемијска померања потпуно одређена на основу HSQC и HMBC спектра (Слика 3.70).

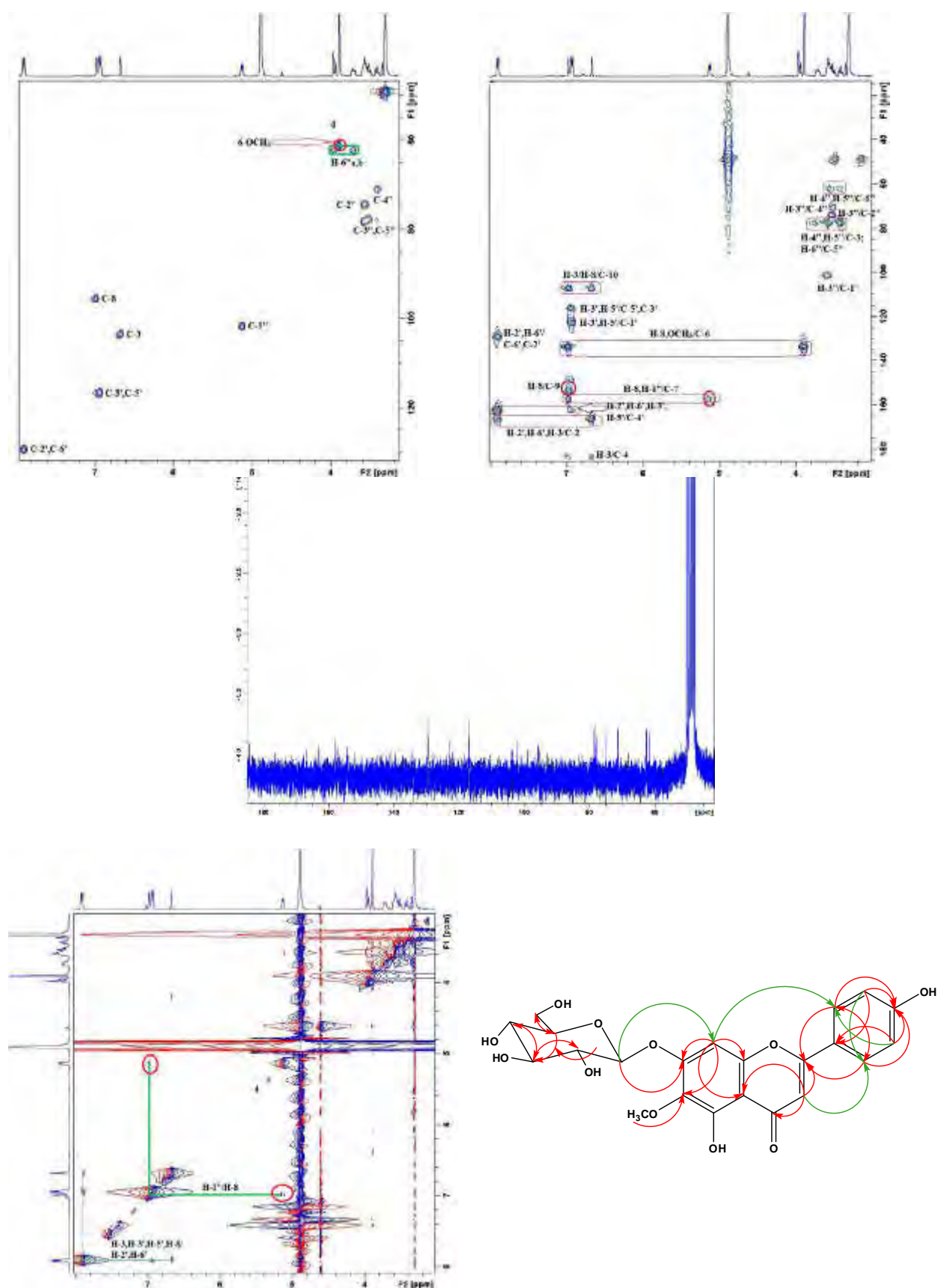
Табела 3.28 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **23** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
Агликонски део						
А-прстен						
C-1	-	-	-	-	-	-
C-2	C	166,7	-	-	-	-
C-3	CH	103,4	H-3	6,67	<i>s</i>	1
C-4	C=O	183,7	-	-	-	-
C-5	C	н.о.	-	-	-	-
C-6	C	133,9	-	-	-	-
C-7	C	157,8	-	-	-	-
C-8	CH	93,7	H-8	6,98	<i>br s</i>	1
C-9	C	153,7	-	-	-	-
C-10	C	107,2	-	-	-	-
OCH ₃	CH ₃	61,2	CH ₃	3,90	<i>s</i>	3
B-Ring						
C-1'	C	122,7	-	-	-	-
C-2'	CH	129,5	H-2', H-6'	7,88	<i>d</i> (J=8,2)	2
C-3'	CH	115,4	-	-	-	-
C-4'	C	162,6	-	-	-	-
C-5'	CH	115,4	H-3', H-5'	6,93	<i>d</i> (J=8,2)	2
C-6'	CH	129,5	-	-	-	-
Шећерни део						
C-1''	CH	101,6	H-1''	5,13	<i>d</i> (J=7,2)	1
C-2''	CH	74,0	H-2''	3,57		
C-3''	CH	78,0	H-3''	3,58	<i>m</i>	2
C-4''	CH	70,4	H-4''	3,41	<i>t</i> (J=8,8)	1
C-5''	CH	77,4	H-5''	3,52	<i>t</i> (J=8,4)	1
C-6a''			H-6a''	3,95	<i>d</i> (J=10,6)	1
C-6b''	CH ₂	62,2	H-6b''	3,72	<i>dd</i> (J=10,2; 4,6)	1

* ^{13}C NMR хемијска померања су одређена на основу HSQC и HMBC експеримента

** н.о. положај сигнала није одређен.

Слика 3.69 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **23** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

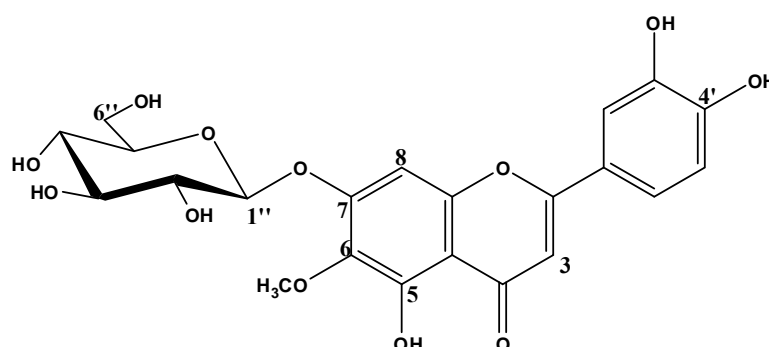


Слика 3.70 HSQC, HMBC, ^{13}C -NMR и ROESY спектри супстанце **23** (CD_3OD ; 400,0 ; 50,3 MHz); најважније корелације добијене помоћу HMBC (црвене стрелице) и ROESY (зелене стрелице)

24. Непетин-7-О-β-D-глюкопиранозид;

5,6,7,3',4'-Пентахидроксифлавоон 6-метилетар 7-О-β-D-глюкозид; Непитрин

Претходно је супстанца изолована из *Centaurea bracteata* Scop. (Flamini et al., 2001). Супстанца **24** изолована је у облику жуто-зеленог праха и спекроскопском анализом одређена јој је следећа структура приказана на **слици 3.71**.

**Слика 3.71** 24. Непетин-7-О-β-D-глюкопиранозид

UV-Vis спекроскопском анализом супстанце **24** добијене су карактеристичне траке са следећим вредностима апсорпционих максимума (**Табела 3.29**).

Табела 3.29 UV-Vis спектар супстанце **24** (λ_{\max} у nm)

	Band II			Band I		$\Delta\lambda$ (Ia)
	Iib	IIa		Ib	Ia	
MeOH	254,0	273,0			342,0	
MeONa		271,0	300,0 (sh)	342,0(sh)	395,0	+53,0
AlCl ₃		275,0	295,0(sh)		417,0	+75,0
AlCl ₃ /HCl	262,0(sh)	279,0	295,0(sh)	342,0(sh)	362,0	+20,0
NaOAc		269.5 $\Delta\lambda$ (II) -3.5		341,0(sh)	396,0	+54,0
NaOAc/H ₃ BO ₃	263,0			343,0(sh)	368,0	+26,0

UV-Vis спектар метанолског раствора супстанце **24** је типичан за флаване који на позицији 3',4'-Б прстена садрже функционалне групе са кисеоником (Табела 3.29). У присуству MeONa, батохромно померање траке I од $\lambda_{\max} = + 53 \text{ nm}$ (у односу на спектар добијен у иницијалном раствору метанола), као и благо повећање апсорпционог максимума указује на присуство слободне С-4'-хидроксилне групе. Раздвајање траке I на спектру добијеном у раствору AlCl_3/HCl , као и хипсохромно померање од $[\Delta\lambda_{\max} = - 55 \text{ nm}]$ у односу на спектар снимљен у раствору AlCl_3 потврђује присуство *ortho*-дихидроксилног система на Б-прстену, као и слободну хидроксилну групу на положају С-5. Такође, присуство дихидроксилног система на Б-прстену потврђено је и батохромним померањем траке I у раствору $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ $[\Delta\lambda_{\max} = + 26 \text{ nm}]$. С друге стране, батохромно померање од $[\Delta\lambda_{\max} = + 20 \text{ nm}$ у односу на спектар добијен у метанолском раствору] које се уочава на спектру добијеном у AlCl_3/HCl раствору супстанце указује на присуство групе са кисеоником на положају С-6 (Sakakibara & Mabry, 1977). Хипсохромно померање $[\Delta\lambda_{\max} = - 3,5 \text{ nm}$ у односу на основни раствор] траке II на спектру снимљеном у NaOAc раствору супстанце потврђује присуство групе са кисеоником на положају С-6 као и одсуство слободне 7-ОН.

На $^1\text{H-NMR}$ спектру (Табела 3.30; Слика 3.72) се уочавају три пика у ароматичном делу, карактеристични за АВХ систем:

- два дублета на δ_{H} 7,42 ($J=2,4$) и δ_{H} 6,91 ($J=8,5$) одговарају протонима Н-2' и Н-5' и
- један двоструки дублет на δ_{H} 7,44 ($J=8,5; 2,4 \text{ Hz}$) карактеристичан за протон Н-6'.

Као и код супстанце **23** (стр. 195), два синглета на δ_{H} 6,67 и δ_{H} 6,98 указују на присуство Н-3 и Н-8. Слично, аномерни протон шећерне компоненте (Н-1'') уочава се у облику дублета на δ_{H} 5,13 ($J=7,2 \text{ Hz}$) што указује на присуство β -глукопиранозе (Markham, 1989).

На основу HSQC спектра (Слика 3.73) утврђени су положаји свих протонаних угљеникових атома. Добијени подаци, у комбинацији са COSY спектром, омогућили су одређивање хемијских померања свих протона и угљеникових атома шећерне компоненте. Корелација протона на хемијским

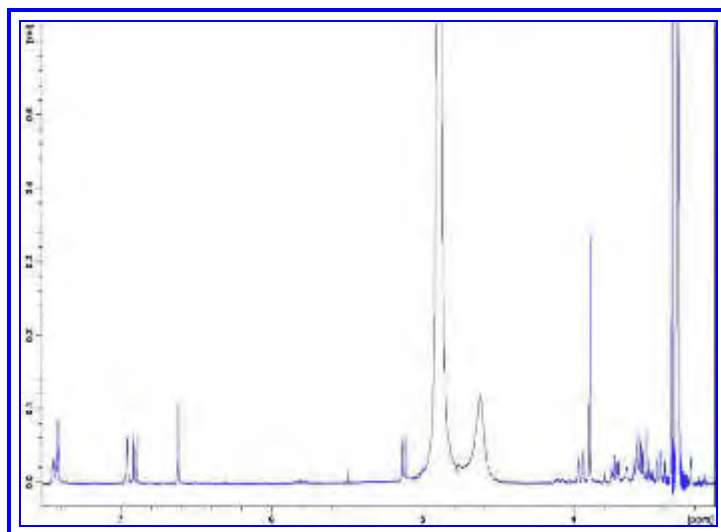
померањима δ_{H} 6,67 и δ_{H} 6,98 и угљеникових атома на δ_{C} 102,2 (C₃) и δ_{C} 94,1 (C₈) потврђују њихову позицију (Agrawal, 1989).

Позиција шећерне компоненте на угљениковом атому C-7 утврђена је помоћу rOe сигнала између H-1'' и H-8 (Слика 3.73).

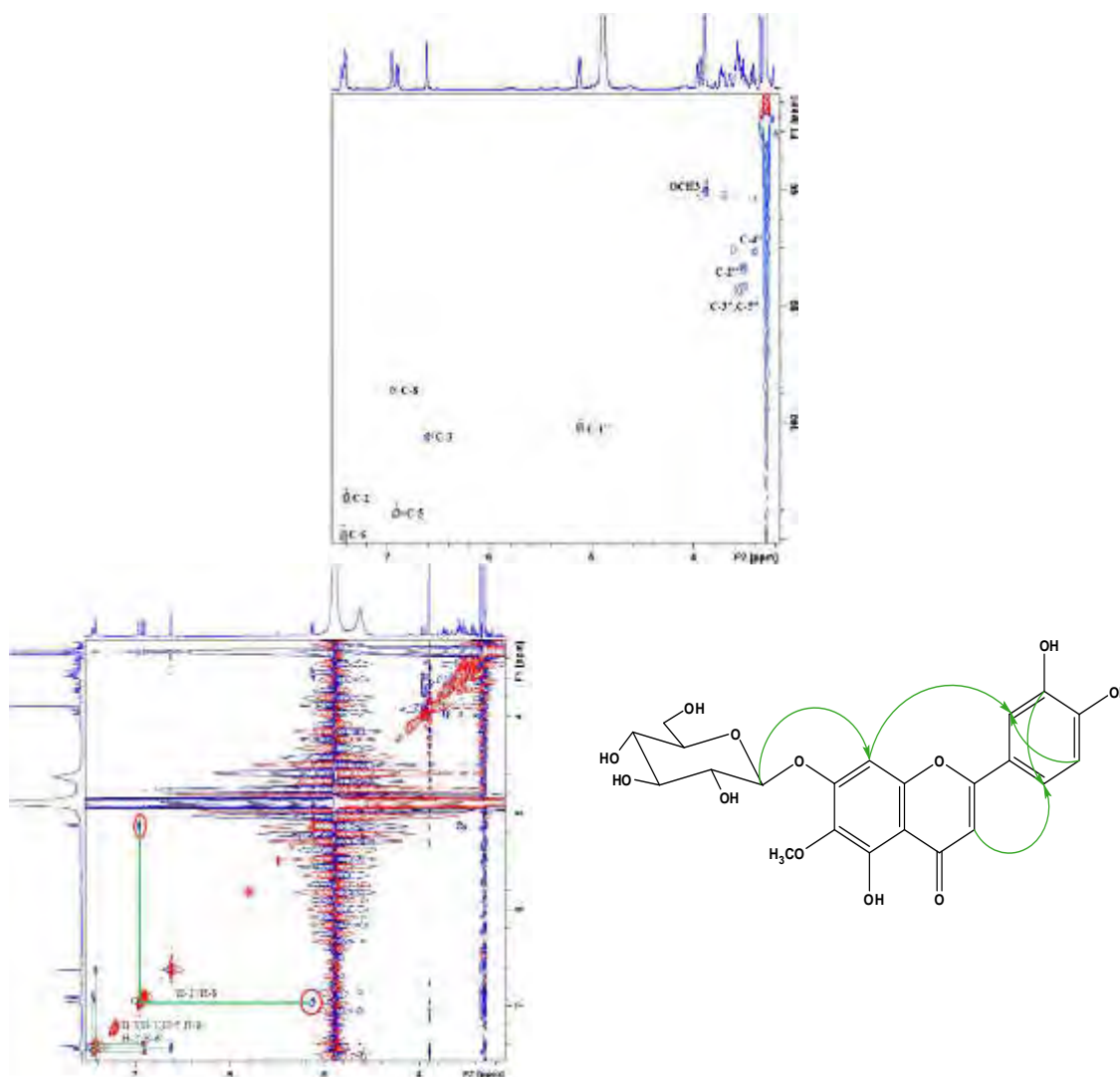
Табела 3.30 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **24** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H	
Агликонски део						
А-прстен						
C-1	-	-	-	-	-	
C-2	C	-	-	-	-	
C-3	CH	102,2	H-3	6,67	<i>s</i>	1
C-4	C=O	-	-	-	-	-
C-5	C	-	-	-	-	-
C-6	C	-	-	-	-	-
C-7	C	-	-	-	-	-
C-8	CH	94,1	H-8	6,98	<i>s</i>	1
C-9	C	-	-	-	-	-
C-10	C	-	-	-	-	-
OCH_3	CH_3	61,2	CH_3	3,90	<i>s</i>	3
Б-прстен						
C-1'	C	-	-	-	-	-
C-2'	CH	112,7	H-2'	7,42	<i>d</i> (J=2,4)	1
C-3'	C	-	-	-	-	-
C-4'	C	-	-	-	-	-
C-5'	CH	115,3	H-5'	6,91	<i>d</i> (J=8,5)	1
C-6'	CH	119,0	H-6'	7,44	<i>dd</i> (J=8,5; 2,4)	1
Шећерна компонента						
Глукозна компонента						
C-1''	CH	101,6	H-1''	5,13	<i>d</i> (J=7,2)	1
C-2''	CH	74,0	H-2''	3,57		
C-3''	CH	78,0	H-3''	3,58	<i>m</i>	2
C-4''	CH	70,4	H-4''	3,41	<i>t</i> (J=8,8)	1
C-5''	CH	77,4	H-5''	3,52	<i>t</i> (J=8,4)	1
C-6a''	CH ₂	62,2	H-6a''	3,95	<i>d</i> (J=10,6)	1
C-6b''			H-6b''	3,72	<i>dd</i> (J=10,2; 4,6)	1

* Положаји су утврђени на основу HSQC спектра.



Слика 3.72 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **24** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



Слика 3.73 HSQC и ROESY спектри супстанце **24** (CD_3OD ; 400,0 MHz) и најважније корелације са ROESY спектра

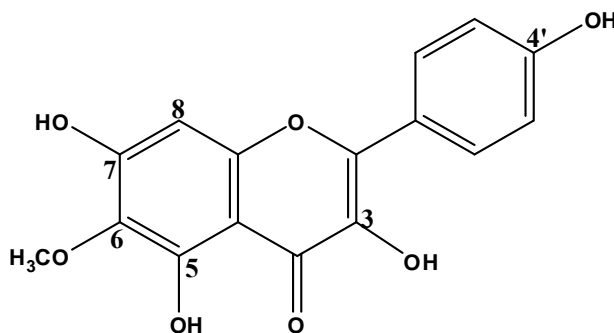
25. 6-Метоксикаемферол;

3,5,6,7,4'-Пентахидроксифлавоон 6-метил етар;

5,6,7,4'-Тетрахидрокси флавонол 6-метил етар.

Метокси дериват каемферола изолован је из следећих врста рода *Centaurea* sp.; *C. senegalensis* DC (Aqil et.al, 1998) и *C. ruthenica* (Mishio et al., 2006).

Супстанца **25** изолована је у облику жутих кристалних иглица, а предложена хемијска структура, приказана на **слици 3.74**, потврђена је анализом добијених спектралних података.



Слика 3.74 25. 6-Метоксикаемферол

UV-Vis спектрална анализа супстанце **25** приказана је у **Табели 3.31**.

Табела 3.31 UV-Vis спектар супстанце **25** (λ_{\max} у nm)

	Трака II		Трака I		$\Delta\lambda$ (Ia)	
	IIb	IIa	Ib	Ia		
MeOH		270,0		365,0		
MeONa		272,0		423,0	+58,0	
AlCl ₃		274,0	303,0(sh)	372,0(sh)	+63,0	
AlCl ₃ /HCl		273,0	295,0(sh)	368,0	+57,0	
NaOAc	273,0 (sh)	288,0 $\Delta\lambda$ (II) +18		312,0(sh)	378,0	+13,0
NaOAc/H ₃ BO ₃		271,0		344,0(sh)	366,0	+1,0

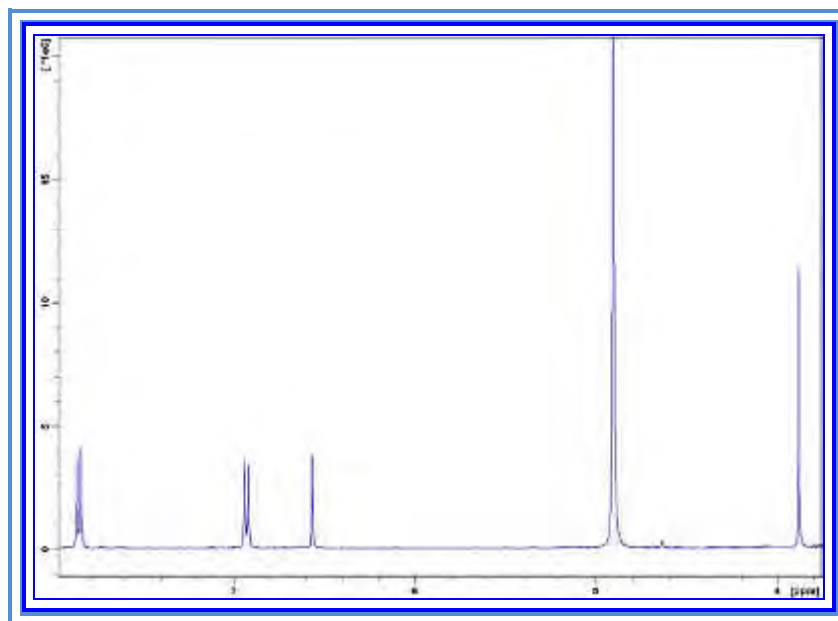
На UV-Vis спектру метанолског раствора супстанце уочавају се два апсорпциона пика на таласним дужинама λ_{\max} =269 и 367 nm. Наведени подаци одговарају подгрупи флавонола који не садрже *ortho*-дихидроксилну групу на Б-прстену. Батохромно померање траке I од $\Delta\lambda$ = + 58 nm (у односу на метанолски раствор) у раствору MeONa указује на присуство слободне 4'-ОН групе на Б-прстену док батохромно померање од $\Delta\lambda$ = + 63 nm и $\Delta\lambda$ = + 57 nm у AlCl₃ и AlCl₃/HCl растворима супстанце, указују на присуство 3-ОН и 5-ОН. Такође, додатком NaOAc у основни метанолски раствор, батохромно померање траке II од $\Delta\lambda$ = + 18 nm је карактеристично за слободне 7-ОН и 3-ОН групе, нарочито за 3-ОН групу. Стабилност пика након неколико минута на спектру добијеном снимањем у раствору NaOAc супстанце, потврђује групу са кисеоником на позицији C-6 и хидроксилну групу на положајима C-7 и C-5. Додатком борне киселине у раствор NaOAc, не запажају се веће разлике у односу на спектар снимљен у метанолском раствору, што потврђује одсуство *ortho*-хидроксилних група у молекулу (**Табела 3.31**).

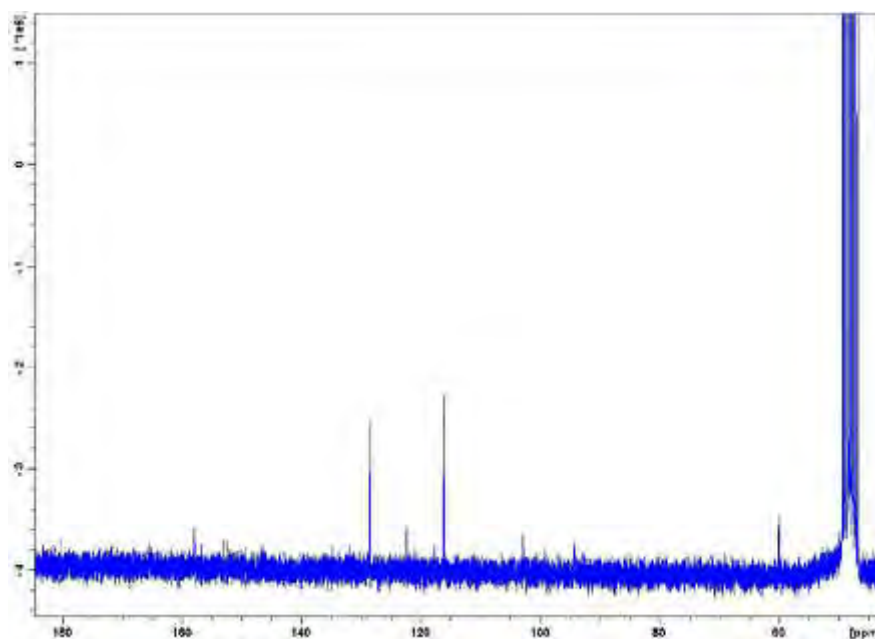
На ¹H-NMR спектру (**Табела 3.32**) уочавају се карактеристични пикови за *p*-супституисани Б-прстен (AA'BB' систем). Два дублета на δ_{H} 7,86 и δ_{H} 6,93 са константом спрезања од J=8,4 Hz одговарају протонима H-2', H-6' и H-3', H-5'. У истој ароматичној регији спектра уочава се један синглет на δ_{H} 6,56 који одговара протону на прстену А (**Слика 3.75**).

Даља потврда структуре супстанце добијена је помоћу ¹³C-NMR спектра (**Слика 3.76**). Спектар садржи шеснаест угљеникових атома, од којих петнаест одговарају основној структури флавоноида и један, са хемијским померањем на δ_{C} 60,0, угљениковом атому метокси групе. ¹³C-NMR спектар потврђује флавонолну структуру скелета молекула с обзиром на разлике у хемијским померањима угљеникових атома C-4 [δ_{C} 183,9 (стр. 191) на δ_{C} 180,5] и C-2 [δ_{C} 166,0 (стр. 191) δ_{C} 156.1] ка нижим вредностима (вишим вредностима поља) у поређењу на флавонима. Такође, и угљеникови атоми који се уочавају на δ_{C} 94,4 и δ_{C} 134,7 су у сагласности са претпоставком о одсуству супституента на позицији C-8 као и на присуство хидроксилне групе на позицији C-3 (**Слика 3.76**).

Табела 3.32 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **25** (CD_3OD ; 400,0; 50,3 MHz)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
А-прстен						
C-1	-	-	-	-	-	-
C-2	C	156,1	-	-	-	-
C-3	C	134,7	-	-	-	-
C-4	C=O	180,5	-	-	-	-
C-5	C	153,2	-	-	-	-
C-6	C	131,6	-	-	-	-
C-7	C	157,9	-	-	-	-
C-8	CH	94,4	H-8	6,56	<i>s</i>	1
C-9	C	153,1	-	-	-	-
C-10	C	103,5	-	-	-	-
OCH_3	CH_3	60,0	CH_3	3,87	<i>s</i>	3
Б-прстен						
C-1'	C	122,3	-	-	-	-
C-2'	CH	128,4	H-2', H-6'	7,86	<i>d</i> (J=8,4)	2
C-3'	C	116,5	-	-	-	-
C-4'	C	157,8	-	-	-	-
C-5'	CH	116,5	H-3', H-5'	6,93	<i>d</i> (J=8,4)	2
C-6'	CH	128,4	-	-	-	-

Слика 3.75 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **25** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



Слика 3.76 ^{13}C -NMR спектар супстанце **25** (CD_3OD ; 50,3 MHz)

3.4 Есенцијално уље *C. rannonica*

Осушени делови биљке (цвет, лист и стабло) *C. rannonica* сакупљени у септембру 2009. године, подвргнути су поступку дестилације воденом паром, применом модификоване Clovenagel-ove апаратуре. Добијено је 0,043% есенцијалног уља (v/w, запремина уља у односу на суву масу биљке).

Уље је анализирано применом GS/MS методе, а резултати добијеног спектра потврдили су присуство 45 једињења, што чини укупно 82,2% есенцијалног уља.

Квантитативно (Табела 3.33) најзаступљенија група једињења су вишемасне киселине са уделом од 43,7%, при чему 9-октадеканске киселине има 34,0% а (Z,Z)-9,12-октадекадиенске киселине 8,6%.

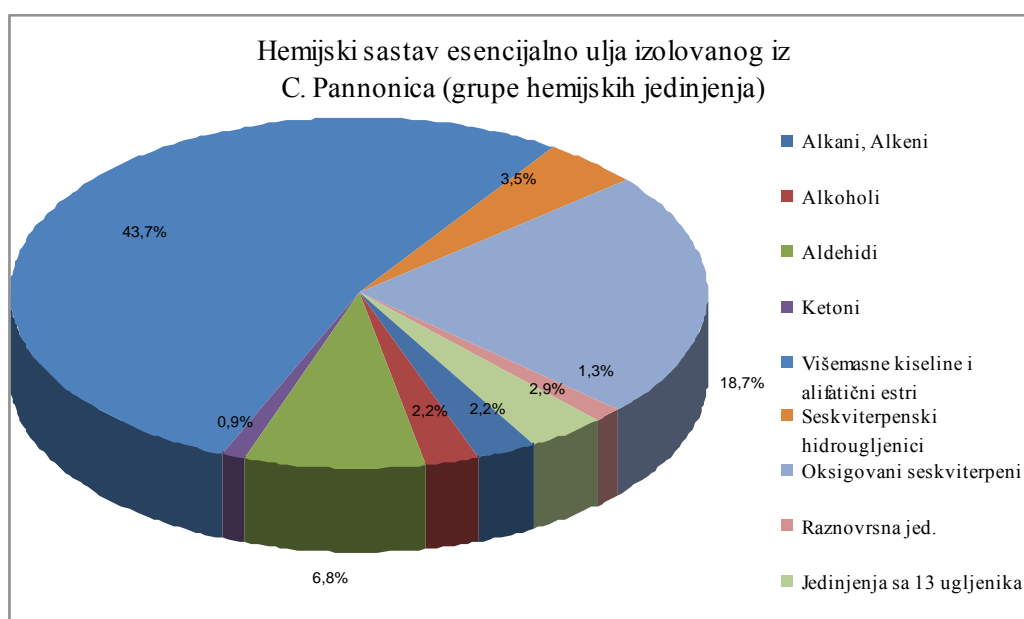
Једињења из групе сесквитерпена који садрже функционалне групе са кисеоником присутна су у количини од 18,7%. Основне супстанце ове групе су кариофилен оксид (8,0%) и спатуленол (6,0%) као и алдехид *n*-нонанал који је присутан у количини 3,2%. Добијени резултати су у доброј корелацији са до сада публикованим резултатима хемијског састава етарског уља биљне врсте *C. rannonica* (Слика 3.77).

Иако се сматра да врсте које припадају роду *Centaurea* нису богате испаривим компонентама у поређењу са етарским уљем ароматичних биљака, ипак су биле предмет опсежних испитивања због њихове примене у медицинске сврхе.

Испитиване су врсте са различитих географских подручја, али пре свега врсте Турске, где се налази и највећи број ендемита, затим Грчке, Бугарске и Италије (Dural et al., 2003; Lazari et al., 1999, 2000; Rosselli et al., 2008; Senatore et al 2003; Yayli et al., 2005). Сесквитерпенски алкохоли, кетони, алдехиди, са једне стране, и вишемасне киселине, са друге стране, хемијски дефинишу карактер есенцијалних уља врста *Centaurea*. Кариофилен оксид и спатуленол идентификовани су у свим есенцијалним уљима (у различитом проценту), независно од порекла испитиване биљке. На основу литературних података, гермакрен Д се појављује у есенцијалним уљима биљака са подручја Турске

(Flamini et al., 2002, Karamenderes, 2008), али је у малом проценту присутан или га нема у уљима добијеним из биљака са подручја Грчке.

Међу вишемасним киселинама идентификованим у есенцијалном уљу врста са различитих подручја, углавном преовлађују засићене масне киселине (Karamenderes, 2008). Вишемасне киселине су идентификоване у значајном проценту и у есенцијалним уљима добијеним из других врста секције *Jacea*: *C. jacea* са подручја Србије, *C. bracteata* и *C. pannonica* var. *pannonica* са подручја Хрватске (Milošević et al., 2010, Formisano et al., 2010). Друга карактеристика наведених врста секције *Jacea* јесте врло мали проценат алифатичних и кисеоничних деривата монотерпена, баш као у случају *C. pannonica*.



Слика 3.77 Графички приказ основних група хемијских једињења изолованих из есенцијалног уља биљке *C. pannonica*

Табела 3.33 Хемијски састав (изражено у %) есенцијалног уља изолованог из биљке *C. rannonica*

Супстанца	RI ₁ ^a	RI ₂ ^a	(%)
(E)-2-Хексанал	851	1210	0,2
2-Пентил-фуран	990	1231	0,5
n-Октанал	996	1289	0,1
(E,E)-2,4-Хептадиенал	1010	1443	0,3
Бензил алкохол	1033		1,1
n-Нонанал	1102	1392	3,2
(E)-2-Ноненал	1163	1528	0,2
n-Деканал	1199	1500	1,3
(E)-2-Деканал	1265	1639	0,4
Дихидроедулан II	1288	1485	0,4
Дихидроедулан I	1291	1512	0,2
Теапиран А	1296		0,3
Теапиран В	1312		0,3
(E,E)-2,4-Декадиенал	1310	1812	0,5
E-β-Демаскенон	1378	1765	0,4
β-Елемен	1391	1572	0,4
β-Кариофилен	1417	1580	1,2
Видрен	1448	1598	0,3
α-Хумулен	1455	1660	0,3
Геранил ацетон	1458	1863	0,7
Гермакрен Д	1482	1701	1,0
β-Јонон	1486	1950	0,6
β-Селинен	1492	1717	0,3
Тридеканал	1507	1817	0,3
1,5-Епоксисалвиал-4(14)-ен	1562	1924	-
Спауленол	1580	2120	6,0
Кариофилен оксид	1585	1987	8,0
Салвиал-4-(14)-ен-1-он	1595	2010	0,7
Нор-копанон	1610	2156	0,5
Вулгарол В	1615	2345	0,6
1,5,5,8-Тетраметил-12-оксибицикло[9.1.0]додека-3,7-диен	1626		1,3
Фоненол	1635		0,8
β-Еудесмол	1652	2238	1,6
Хептадекан	1700	1700	0,2
Октадекан	1800	1800	0,2
1,15-Пентадекандиол	1812		0,2
Хексадеканал	1815	2108	0,3
6,10,14-Триметил-2-пентадеканон	1842	2131	0,9
Хексадеканол	1872	2384	0,9
Етил линолеат	1894		0,2
(E,E)-Фарназил ацетон	1920	2386	-
Хексадеканска киселина	1965	2911	0,7
11,14,17-Метил естар икосантриноичне киселина	2054		0,2
(Z,Z)-9,12-Октадекадиенска киселина	2130	3150	8,6
9- Октадеканска киселина	2140	3154	34,0
Пентакозан	2500	2500	1,0
Хептакозан	2700	2700	0,8
Укупно			82,2

$[\alpha]_D^{20} = -0,98$ (c=2,56; her)

^aRI, ретенциони индекс израчунат је на основу C9-C24 n-алкана на снимљених на HP-5MS колони (1) и HP-11nowax (2) капиларној колони, појединачно.

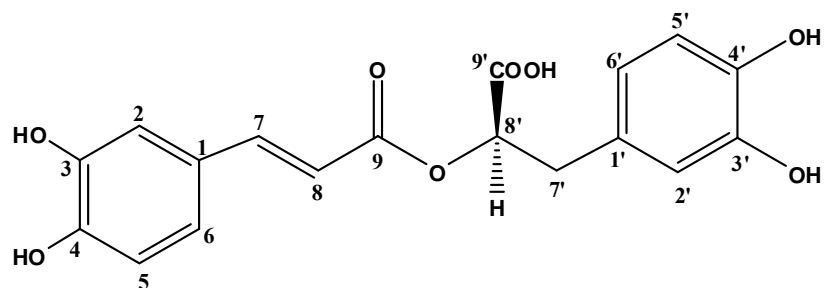
3.5 Фенолне киселине

26. Рузмаринска киселина;

3,4-дихидроксициметна киселина (*R*)-9'-карбокси-8'-(3,4-дихидроксифенил) етил естар

Рузмаринска киселина (и по хемијском саставу сличне супстанце) позната је под називом „Labiatergerbstoff”, чак и пре него што је њена хемијска структура била позната (Hermann, 1960). Сматра се да је рузмаринска киселина дериват танина, мада се данас све чешће описује као депсид кофеинске киселине. По први пут је изолована и идентификована у рузмарину (*Rosmarinus officinalis* L.) (структура је одређена као естер рузмаринске киселине и 3-(3,4-дихидроксицифенил) лактонске киселине (Scarpati & Oriente, 1958). Супстанца је изолована из неколико таксономски различитих биљних фамилија (Holzmanova, 1996; Petersen & Simmonds, 2003). Фамилије *Ariaceae*, *Boeragraceae* и *Lamiaceae* садрже велику количину рузмаринске киселине, више од 3%. Што се тиче фамилије *Lamiaceae*, најчешће је изолована из биљака под фамилије *Nepetoideae* (Litvinenko et al., 1975), којој припадају и врсте рода *Origanum* (стр. 64). Велику пажњу научника привлачи од када је откривено да рузмаринска киселина изолована из матичњака показује антивирусну активност на *Herpes simplex* вирус и да спречава његово ширење. Због наведене, али и због многих других биолошких активности сматра се природном супстанцом од посебног значаја (Vogt et al., 1991; Borkowski 1996).

Супстанца **26** изолована је у облику тамно-црвеног уља и спектроскопским методама је одређена хемијска структура приказана на **слици 3.78**.



Слика 3.78 26. Рузмаринска киселина

Метанолни раствор супстанце **26** показао је следећу вредност оптичке ротације:
 $[\alpha]_D^{20} + 3,44$ ($c=0,8$; MeOH).

Спектроскопском анализом (UV-Vis спектар) супстанце **26** добијене су карактеристичне криве са вредностима апсорпционих максимума приказаним у **Табела 3.34**.

Табела 3.34 UV-Vis спектар метанолног раствора супстанце **26**

	Трака II	Трака I		
		Ib	Ia	$\Delta\lambda$ (Ia)
MeOH	290	328		
MeONa	289,5	346		+18
NaOAc	289,5	345,5		+17,5
NaOAc/ H ₃ BO ₃	293	347		+19

UV-Vis спектар метанолног раствора супстанце садржи два апсорпциона пика на λ_{max} 290 (Трака II) и 328,0 nm (Трака I) карактеристична за фенолне киселина (**Табела 3.34**). Додавањем MeONa у основни раствор долази до батохромног померања траке I од + 18 nm, због брзе јонизације фенолних хидроксилних група. Батохромно померање траке I од само + 17,5 nm након додавања NaOAc указује да је дошло до супституције на карбоксилној групи. Присуство *ortho*-ОН групе потврђено је батохромним померањем траке I од + 19 nm, након додатка NaOAc/ H₃BO₃.

У ароматичној регији $^1\text{H-NMR}$ спектра супстанце **26** (Табела 3.35; Слика 3.79; 3.80) уочавају се сигнали карактеристични за два ароматична АВХ система:

- Два дублета на δ_{H} 7,04 ($J=1,8$ Hz) и δ_{H} 6,78 ($J=8,2$ Hz), као и двоструки дублет на δ_{H} 6,95 ($J=8,2$ Hz; 1,8 Hz) одговарају протонима Н-2, Н-5 и Н-6 ароматичног прстена. Такође, уочавају се два дублета на δ_{H} 7,54 и δ_{H} 6,27 са константом спрезања $J=16,0$ Hz. Ови сигнали су карактеристични за два вицинална метинска протона *trans*-двоструке везе када се налази између ароматичног прстена са једне, и карбоксилне групе са друге стране. Представљени подаци омогућили су нам да окарактеришемо један АВХ систем као 3,4-дихидроксициметна киселина (кофеинска киселина).
- Дублети са нижим вредностима померања на δ_{H} 6,75 ($J=1,8$ Hz) и δ_{H} 6,69 ($J=8,0$ Hz), као и двоструки дублет на δ_{H} 6,61 ($J=8,0$; 1,8 Hz) означени су као протони Н-2', Н-5' и Н-6' другог АВХ система.

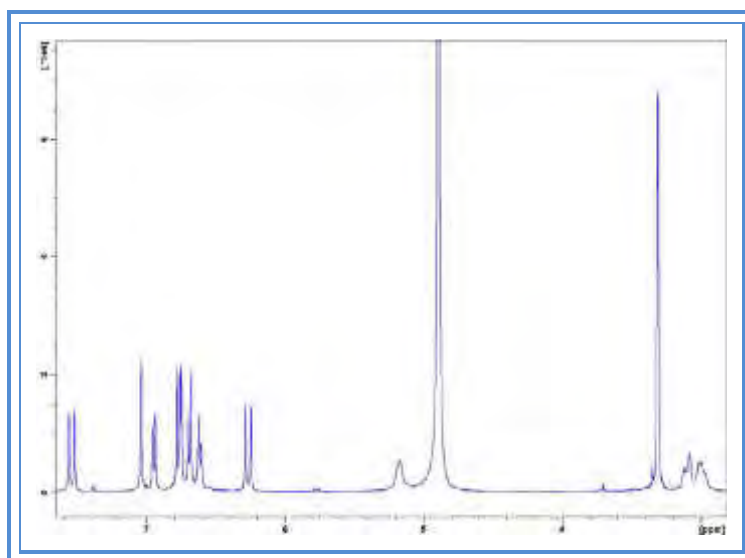
На спектру се још уочавају три сигнала:

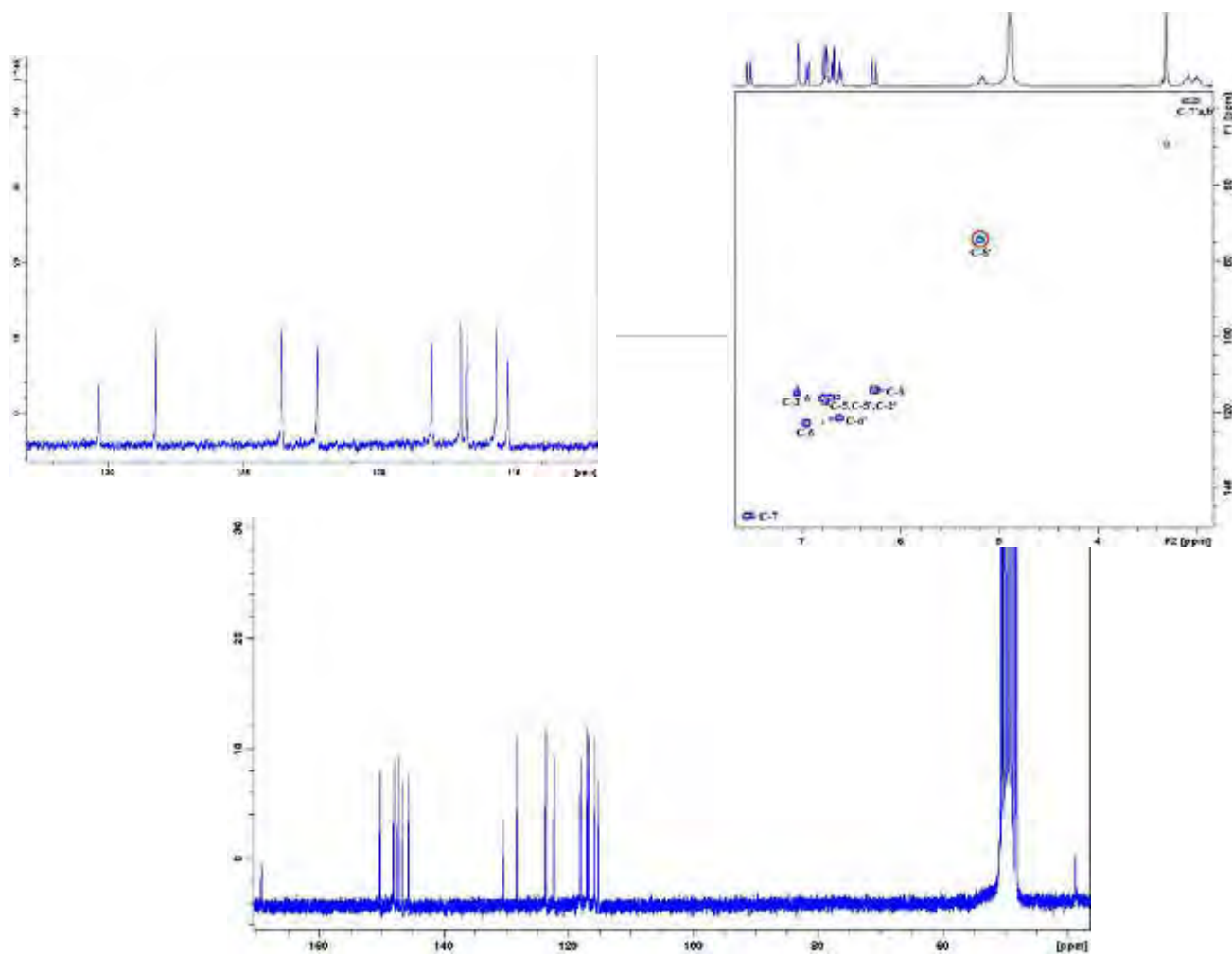
- у алифатичној регији спектра уочавају се два двострука дублета δ_{H} 3,10 ($J=14,0$; 7,3 Hz) и δ_{H} 3,00 ($J=14,0$; 3,8 Hz) који одговарају метиленским протонима на позицији Н-7'a,b, и
- мултиплет са хемијским померањем на δ_{H} 5,17 који одговара окси-метин протону (Н-8').

На основу свега горе наведеног, други АВХ систем је идентификован као 3,4-дихидроксифенил-етил естер кофеинске киселине. Коначно $^{13}\text{C-NMR}$ спектар садржи осамнаест угљеникових атома: девет метинских, један метиленски, шест квартернерних угљеникових атома и две карбонилне групе (HSQC).

Табела 3.35 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **26** (CD_3OD ; 400,0 MHz; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрењања J (Hz)	Бр. H
C-1	C	127,8	-	-	-	-
C-2	CH	114,8	H-2	7,04	<i>d</i> (J=1,8)	1
C-3	C	147,5	-	-	-	-
C-4	C	149,7	-	-	-	-
C-5	CH	116,4	H-5	6,78	<i>d</i> (J=8,2)	1
C-6	CH	123,1	H-6	6,95	<i>dd</i> (J=8,2; 1,8)	1
C-7	CH	146,8	H-7	7,54	<i>d</i> (J=16,0)	1
C-8	CH	115,3	H-8	6,27	<i>d</i> (J=16,0)	1
C-9	C=O	168,6	-	-	-	-
C-1'	C	129,9	-	-	-	-
C-2'	CH	116,5	H-2'	6,75	<i>d</i> (J=1,8)	1
C-3'	C	146,1	-	-	-	-
C-4'	C	145,1	-	-	-	-
C-5'	CH	117,6	H-5'	6,69	<i>d</i> (J=8,0)	1
C-6'	CH	121,8	H-6'	6,61	<i>dd</i> (J=8,0; 1,8)	1
C-7'	CH ₂	38,2	H-7'a	3,10	<i>dd</i> (J=14,0; 7,3)	1
			H-7'b	3,00	<i>dd</i> (J=14,0; 3,8)	1
C-8'	CH	74,3	H-8'	5,17	<i>m</i>	1
C-9'	C=O	173,1	-	-	-	-

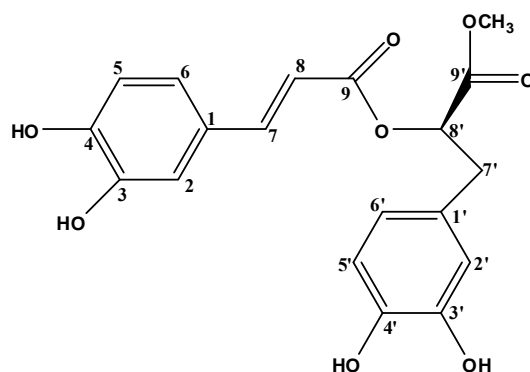
Слика 3.79 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **26** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



Слика 3.80 ^{13}C -NMR и HSQC спектар супстанце **26** (CD_3OD ; 400,0; 50,3 MHz)

27. Метилестар рузмаринске киселине

Метилестар рузмаринске киселине по први пут је изолован 1989. из биљке *Salvia miltiorrhiza* (Kohda et al., 1989). До данас, супстанца је изолована из различитих биљних врста, али само из две врсте рода *Origanum*: *O. dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010) са подручја Грчке, и *O. vulgare* (Ding et al., 2010) и из Јапана. Супстанца **27** изолована је као наранџаста уљана супстанца и спектроскопским методама је одређена структура приказана на **слици 3.81**.



Слика 3.81 27. Метилестар рузмаринске киселине

Метанолски раствор супстанце **27** показао је следећу вредност оптичке ротације: $[\alpha]_D^{20} + 2,14$ ($c=1,08$; MeOH).

Анализом $^1\text{H-NMR}$ спектра (**Табела 3.36**; **Слика 3.82**) супстанце **27** запажа се да је готово идентичан протонском спектру рузмаринске киселине (супстанца **26**). Једино се разликује синглет на $\delta_{\text{H}} 3,70$, који интеграцијом даје три протона што је директна индикација за постојање метил групе у молекулу.

На основу осталих сигнала идентификована су два АВХ система:

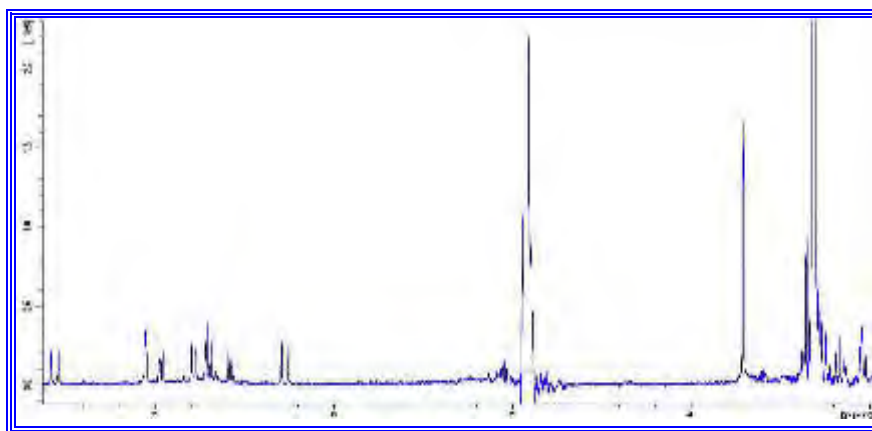
- два дублета на $\delta_{\text{H}} 7,05$ ($J=2,0$ Hz) и $\delta_{\text{H}} 6,78$ ($J=8,2$ Hz), као и двоструки дублет на $\delta_{\text{H}} 6,95$ ($J=8,2; 2,0$ Hz) одговарају протонима H-2; H-5 и H-6,
- два дублета на $\delta_{\text{H}} 6,73$ ($J=1,8$ Hz) и $\delta_{\text{H}} 6,69$ ($J=8,2$ Hz), као и двоструки дублет на $\delta_{\text{H}} 6,58$ ($J=8,2; 1,8$ Hz) одговарају протонима H-2'; H-5' и H-6'.

Два АВ дублета који одговарају *trans*-олефинским протонима на δ_{H} 7,55 ($J=16,0$ Hz) и δ_{H} 6,26 ($J=16,0$ Hz) представљају протоне Н-7 и Н-8 у молекулу.

Један мултиплет на δ_{H} 5,18 одговара окси-метинском протону Н-8', док два двострука дублета на δ_{H} 3,08 ($J=14,0$; 7,3) и δ_{H} 3,00 ($J=14,0$; 4,2) представљају метиленске протоне Н-7'a,b.

Табела 3.36 ^1H -NMR и ^{13}C -NMR супстанце **27** (CD_3OD ; 400,0 MHz; 50,3 MHz)

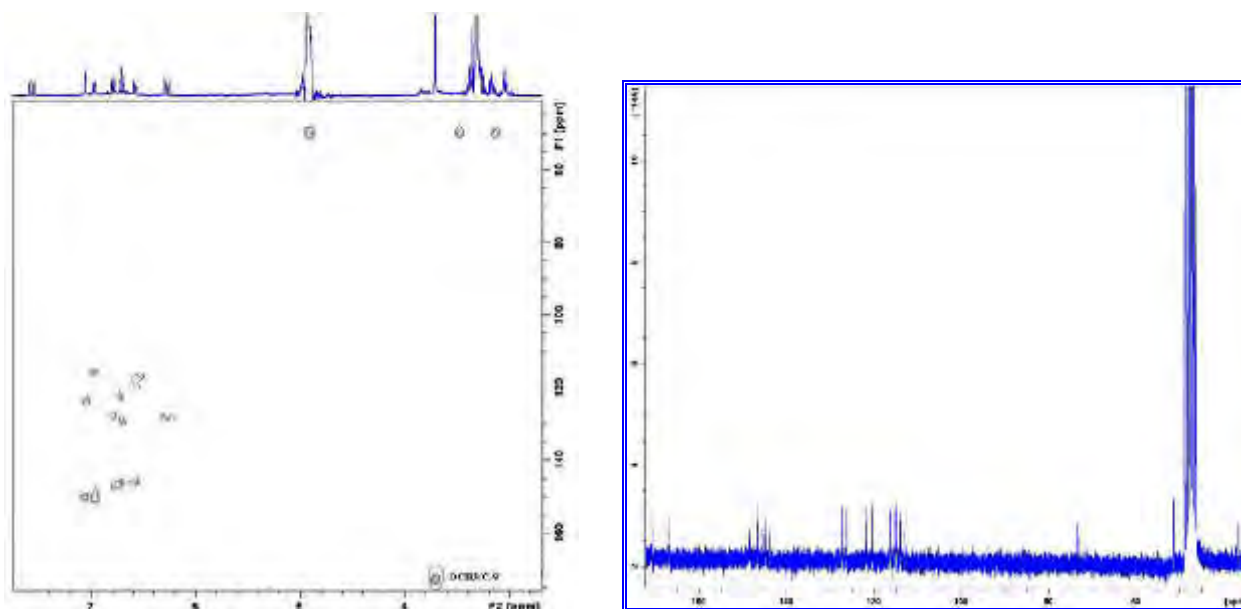
Положај	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. Н
C-1	C	127,6	-	-	-	-
C-2	CH	114,6	H-2	7,05	<i>d</i> ($J=2,0$)	1
C-3	C	147,8	-	-	-	-
C-4	C	149,7	-	-	-	-
C-5	CH	116,4	H-5	6,78	<i>d</i> ($J=8,2$)	1
C-6	CH	123,2	H-6	6,95	<i>dd</i> ($J=8,2, 2,0$)	1
C-7	CH	146,8	H-7	7,55	<i>d</i> ($J=16,0$)	1
C-8	CH	115,3	H-8	6,26	<i>d</i> ($J=16,0$)	1
C-9	C=O	168,3	-	-	-	-
C-1'	C	128,9	-	-	-	-
C-2'	CH	117,2	H-2'	6,73	<i>d</i> ($J=2,0$)	1
C-3'	C	146,2	-	-	-	-
C-4'	C	145,3	-	-	-	-
C-5'	CH	117,6	H-5'	6,69	<i>d</i> ($J=8,2$)	1
C-6'	CH	121,8	H-6'	6,58	<i>dd</i> ($J=8,2, 2,0$)	1
C-7'	CH ₂	38,1	H-7'a	3,08	<i>dd</i> ($J=14,0; 7,3$)	1
			H-7'b	3,00	<i>dd</i> ($J=14,0; 4,2$)	1
C-8'	CH	74,8	H-8'	5,18	<i>m</i>	1
C-9'	C=O	172,3	-	-	-	-
OCH ₃	CH ₃	52,7	CH ₃	3,70	<i>s</i>	3



Слика 3.82 ^1H -NMR спектар супстанце **27** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

^{13}C -NMR спектар садржи деветнаест сигнала: један метил, један метилен, девет метинских и осам кватернерних угљеникових атома којима припадају и два карбоксилна угљеникова атома. Сигнали на вишим вредностима хемијских померања (нижим вредностима поља) δ_{C} 149,7; 147,8; 146,2; 145,3 одговарају ароматичним угљениковим атомима за које је везан јак електрофил, тј. кисеоников атом (хидроксилне групе). Угљеников атом са померањем на δ_{C} 52,7, означен је као метил група, естарски везана за карбоксилну групу ($-\text{COOCH}_3$). Померање ка вишим вредностима хемијског померања сигнала који одговара угљенику карбоксилне групе C-9' (δ_{C} 173,7 у односу на 172,3 супстанца **26**) указује на 9'-O-метил естерификацију, што је у сагласности са литературним подацима (Parejo et al., 2004). Поред тога, на НМВС уочава се повезаност сигнала метил групе са сигналом за угљеник C-9', што је директан доказ горе наведене претпоставке о позицији метил групе (Слика 3.83).

Супстанца показује антиоксидативну активност и депигментацију па се претпоставља да се може користити у индустрији хране као адитив или у козметици за контролу пигментације коже (Ding et al., 2010).



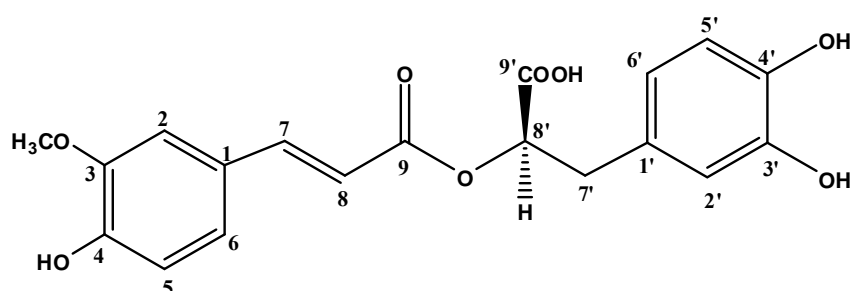
Слика 3.83 НМВС и ^{13}C -NMR спектри супстанце **27** (CD_3OD ; 400,0; 50,3 MHz)

28. 3-О-Метил рузмаринска киселина

Први пут супстанца **28** је изолована из крви и урина мишева као продукт метаболизма након оралне употребе рузмаринске киселине (Baba et al., 2004).

Ово је први пут да је супстанца изолована из рода *Origanum*, а други пут из биљног материјала. Први пут је изолована и идентификована из екстракта биљке са јапанског подручја, под називом *Keiskea japonica* (Murata et al., 2012).

Супстанца **28** изолована је као црвено-жута аморфна супстанца и одређена је следећа структура приказана на **слици 3.84**.



Слика 3.84 28. 3-О-Метил рузмаринска киселина

Оптичка ротација метанолног раствора супстанце **28** одређена је и износи $[\alpha]_D^{20} + 2,51$ ($c=0,7$; MeOH).

Анализом $^1\text{H-NMR}$ спектра супстанце **28** (Табела 3.37; Слика 3.85) запажа се сличност са протонским спектром рузмаринске киселине (супстанца **26**), уз присуство још једног синглета на δ_{H} 3,90, који интеграцијом даје три протона, што је директна индикација присуства метокси групе у молекулу. С обзиром на то да су сигнали који одговарају ароматичним протонима једног АВХ система померени ка вишим вредностима хемијских померања, у односу на сигнале ароматичних протона истог система код рузмаринске киселине δ_{H} 7,20 у односу на δ_{H} 7,04 (d , $J=2,0$ Hz; H-2), δ_{H} 6,82 vs δ_{H} 6,78 (d , $J=8,2$ Hz; H-5) и δ_{H} 7,05 vs 6,95 (dd , $J=8,2$; 2,0 Hz; H-6), претпоставља се да је метокси група везана за један ароматични прстен. Хемијска померања сигнала на $^{13}\text{C-NMR}$ спектру супстанце **28** готово су идентична сигналима на $^{13}\text{C-NMR}$ спектру

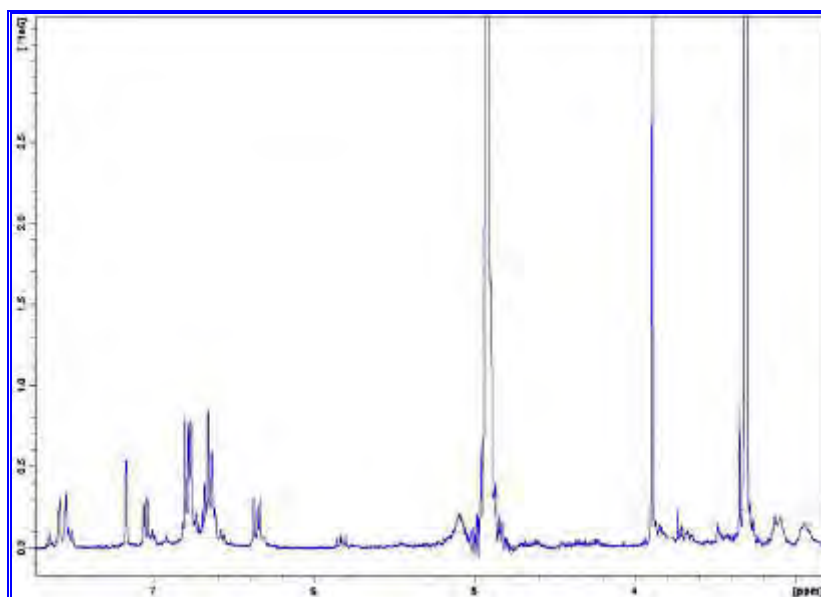
супстанце **26**. Једино се разликују сигнали који одговарају угљениковим атомима ароматичног прстена који садржи метокси групу као супституент: δ_C 127,4 vs 127,8 (C-1), 111,4 vs 114,2 (C-2), 149,2 vs 147,5 (C-3), 149,5 vs 149,7 (C-4), 116,2 vs 116,4 (C-5) и 124,5 vs 123,1 (C-6). Како долази до значајне промене померања ка вишим вредностима код угљеника C-3, сматра се да је до супституције дошло на овом угљениковом атому (Слика 3.86).

Наведене вредности су у сагласности са литературним подацима за 3-О-метил рузмаринску киселину (Baba et al., 2004).

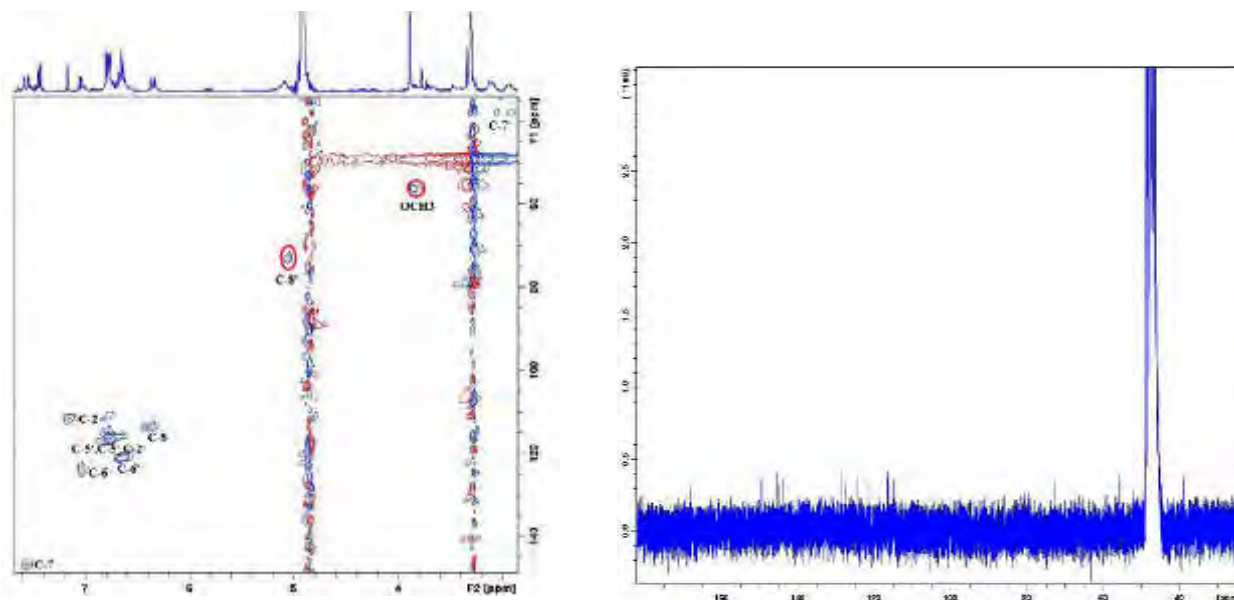
Битно је такође напоменути да, упоређујући спектроскопске податке супстанце **28** и **27**, примећује се битна разлика хемијских померања протона метил групе: δ_H 3,90 (супст. **28**) vs 3,70 (супст. **27**); δ_C 56,5 (супст. **28**) vs 52,7 (супст. **27**).

Табела 3.37 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ супстанце **28** (CD_3OD ; 400,0 MHz; 50,3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	C	127,4	-	-	-	-
C-2	CH	111,4	H-2	7,20	<i>d</i> (J=2,0)	1
C-3	C	149,2	-	-	-	-
C-4	C	149,5	-	-	-	-
C-5	CH	116,2	H-5	6,82	<i>d</i> (J=8,2)	1
C-6	CH	124,5	H-6	7,05	<i>dd</i> (J=8,2; 2,0)	1
C-7	CH	146,6	H-7	7,52	<i>d</i> (J=16,0)	1
C-8	CH	115,5	H-8	6,36	<i>d</i> (J=16,0)	1
C-9	C=O	168,8	-	-	-	-
C-1'	C	129,4	-	-	-	-
C-2'	CH	117,4	H-2'	6,74	<i>d</i> (J=2,0)	1
C-3'	C	145,5	-	-	-	-
C-4'	C	144,3	-	-	-	-
C-5'	CH	117,3	H-5'	6,72	<i>d</i> (J=8,2)	1
C-6'	CH	122,1	H-6'	6,64	<i>dd</i> (J=8,2; 1,8)	1
C-7'	CH ₂	38,3	H-7'a	3,10	<i>m</i>	1
			H-7'b	3,05	<i>m</i>	1
C-8'	CH	74,6	H-8'	5,08	<i>m</i>	1
C-9'	C=O	173,4	-	-	-	-
OCH ₃	CH ₃	56,5	CH ₃	3,90	<i>s</i>	3



Слика 3.85 ^1H -NMR спектар супстанце **28** (CD_3OD ; 400,0 MHz)



Слика 3.86 HSQC и ^{13}C -NMR спектри супстанце **28** (CD_3OD ; 400,0; 50,3 MHz)

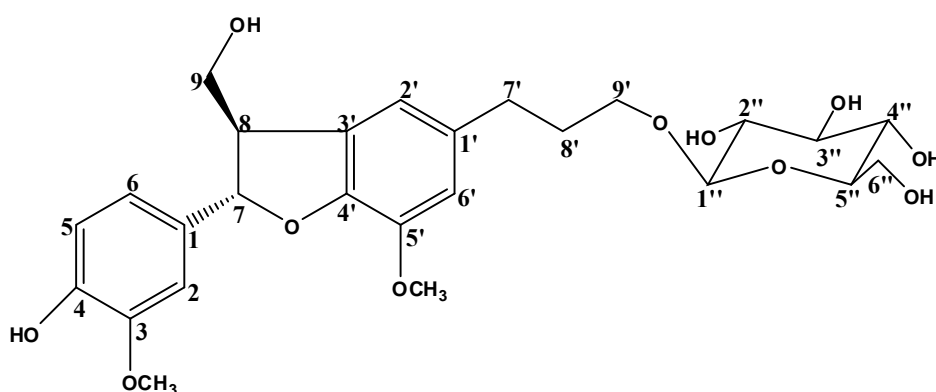
3.6 Неолигнан

29. Глочидиобозид;

(7*S*, 8*R*)-дихидро дехидро дикониферил алкохол-9'-О-β-D-глюкопиранозид (7*S*, 8*R*)-7,8-дихидро-8-хидроксиметил-5'-метокси-2-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-1'-бензофуран-пропанол 9'-О-β-D-глюкопиранозид

Takeda et al. по први пут су супстанцу **29** изоловали 1998. године из биљке *Glochidion obovatum* и комплетно хемијски окарактерисали. До сада је супстанца изолована из многих биљних врста. Међутим, карактеристично је да већина биљака из којих је супстанца изолована потиче са кинеског подручја: (*Glochidion zeylanicum* (Gaertn) A. Juss (Otsuka et al., 2000), *Bridelia glauca* Bl. f. *balansae* (Tucht.) Hatusima, (Sueyoshi et al., 2007), *Osmanthus heterophyllus* (Machida et al., 2009), *Chloranthus japonicus* Sieb. (Kuang et al., 2009), *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob (Yu Pan et al., 2010). Ово је први пут да је супстанца **29** изолована из рода *Origanum*.

Супстанца **29** изолована је као наранџаста аморфна супстанца и одређена јој је следећа структура приказана на **слици 3.87**.



Слика 3.87 29. Глочидиобозид

Оптичка ротација метанолског раствора супстанце **29** је одређена и износи $[\alpha]_D^{20} - 31,6$ ($c=0,68$; MeOH).

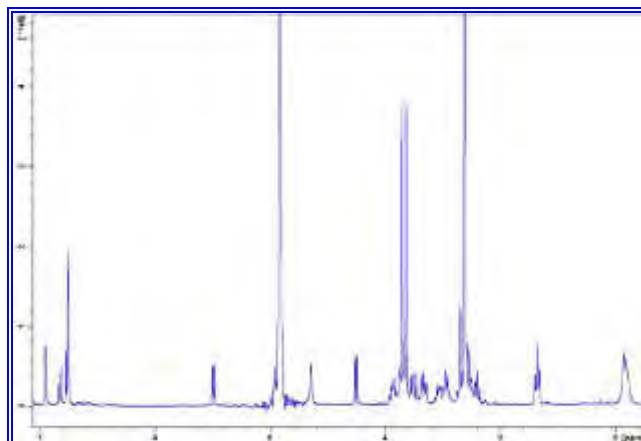
На $^1\text{H-NMR}$ спектру уочавају се четири сигнала у регији ароматичних протона. Два дублета на $\delta_{\text{H}} 6,95$ ($J=1,4$) и $\delta_{\text{H}} 6,77$ ($J=8,2$), као и двоструки дублет на $\delta_{\text{H}} 6,82$ ($J=8,2$; $1,4$) чине један АВХ систем и наводе на претпоставку да супстанца **29** у свом саставу садржи један-три супституисани ароматични прстен (Табела 3.38; Слика 3.88). У овој регији уочава се и један широки синглет на $\delta_{\text{H}} 6,76$ који интеграцијом даје два протона, карактеристичним за молекуле који садрже ароматични прстен са четири супституента.

Табела 3.38 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **29** (CD_3OD ; $400,0\text{ MHz}$)

Позиција	Тип С атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	C	133,7	-	-	-	-
C-2	CH	110,1	H-2	6,95	<i>d</i> ($J=1,4$)	1
C-3	C	149,0	-	-	-	-
C-4	C	146,7	-	-	-	-
C-5	CH	115,8	H-5	6,77	<i>d</i> ($J=8,0$)	1
C-6	CH	119,3	H-6	6,82	<i>dd</i> ($J=8,0$; $1,4$)	1
C-7	CH	87,8	H-7	5,50	<i>d</i> ($J=6,3$)	1
C-8	CH	55,7	H-8	3,47	<i>m</i>	1
C-9	CH ₂	64,7	H-9 ^a	3,84	**	1
			H-9 ^b	3,75	<i>dd</i> ($J=10,5$; $7,6$)	1
C-1'	C	136,7	-	-	-	-
C-2'	CH	113,8	H-2'	6,76	<i>brs</i>	1
C-3'	C	144,9	-	-	-	-
C-4'	C	147,0	-	-	-	-
C-5'	CH	146,5	-	-	-	-
C-6'	CH	117,7	H-6'	6,76	<i>brs</i>	1
C-7'	CH	32,7	H-7'	2,68	<i>t</i> ($J=7,5$)	2
C-8'	CH	32,9	H-8'	1,90	<i>m</i>	2
C-9'	CH ₂	69,8	H-9'a	3,93	<i>m</i>	1
			H-9'b	3,54	<i>m</i>	1
C-1''	CH	104,1	H-1''	4,24	<i>d</i> ($J=7,7$)	1
C-2''	CH	74,8	H-2''	3,20	<i>t</i> ($J=8,0$)	1
C-3''	CH	77,8	H-3''	3,36	<i>m</i>	1
C-4''	CH	71,4	H-4''	3,24	<i>m</i>	1
C-5''	CH	77,4	H-5''	3,24	<i>m</i>	1
C-6''	CH ₂	62,5	H-6''a	3,83	**	1
			H-6''b	3,65	<i>dd</i> ($J=11,9$; $5,4$)	1
3-OCH ₃	CH ₃	56,2	CH ₃	3,82	<i>s</i>	3
5'-OCH ₃	CH ₃	56,5	CH ₃	3,86	<i>s</i>	3

* вредности су утврђене на основу HSQC и HMBC спектра.

** Преклапање са сигналом OCH₃.



Слика 3.88 ^1H -NMR спектар супстанце **29** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

На ^1H -NMR спектру уочавају се још два синглета δ_{H} 3,86 и δ_{H} 3,82, карактеристична за метокси групе као и дублет на δ_{H} 4,24 ($J=7,7$ Hz) сигнал карактеристичан за аномерни протон C-1'' шећера, што сугерише и присуство β -D-глюкопиранозне јединице у молекулу.

COSY спектар даје три спин ситема:

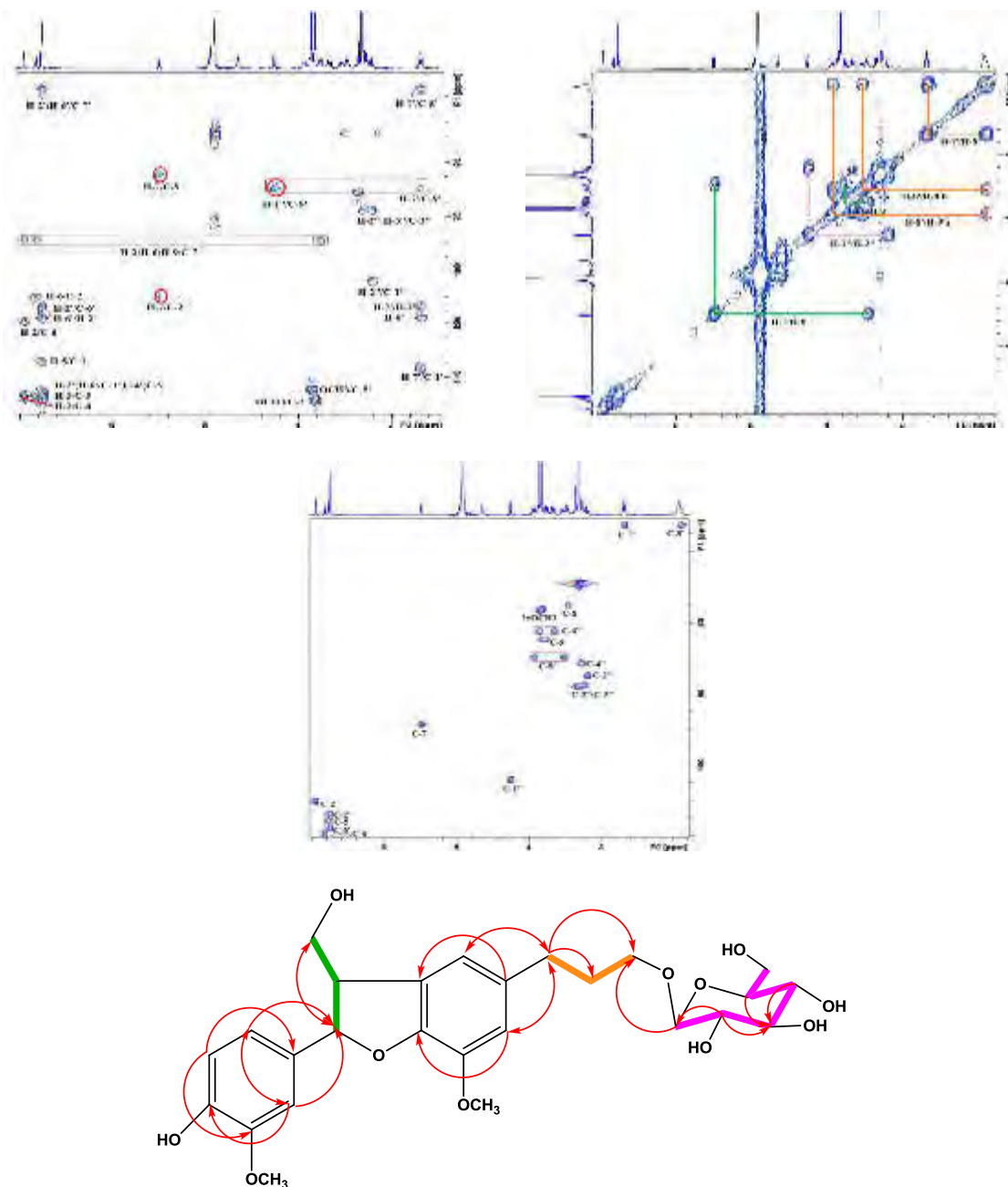
- Спин А: један оксиметин протон који се у облику дублета уочава на δ_{H} 5,50 ($J=6,3$ Hz) куплован је са вициналним метин протоном који се у облику мултиплета налази на δ_{H} 3,47. Вицинални метин протон се додатно куплује са два геминална хидроксиметил протона чија се померања налазе на δ_{H} 3,84 (сигнал је делимично прекривен сигналом за метокси групу) и на δ_{H} 3,75 у облику двоструког дублета (dd , $J=10,5$; 7,6 Hz). Описан систем као и хемијска померања сигнала одговарају хидроксиметил фурановом прстену.
- Спин В: корелација између триплета на δ_{H} 2,68 ($J=7,5$) и мултиплета на δ_{H} 1,90, који је са друге стране у корелацији са мултиплетима на δ_{H} 3,93 и δ_{H} 3,54 указују на присуство хидрокси пропил групе у молекулу.
- Спин С: корелација између протона шећера што потврђује присуство β -D-глюкопиранозидне јединице.

Коначна структура супстанце као и позиција шећерне компоненте добијена је на основу HSQC и HMBC спектра (Слика 3.89).

Хемијско померање угљеника C-9' од δ_C 69,8 код супстанце **29** знатно је више у односу на супстанце које садрже слободну хидроксилну групу на позицији C-9' (δ_C 64,0) и указују на место везивања шећера (Takeda et al., 1998). Да је шећерна компонента везана за угљеник C-9' потврђено је помоћу НМВС спектра где се јасно уочава корелација између дублета на δ_C 4,24 ($J=7,7$ Hz; H-1") сигнала карактеристичног за аномерни протон глукозе и угљеника C-9'. Такође, купловање између H-9a/C-7, H-2/C-7 и H-6/C-7, које се уочава на НМВС спектру, потврђује да је трисупституисани ароматични прстен везан за угљеник C-7 бензофуранског дела молекула.

Помоћу НМВС спектра утврђене су и позиције метокси група у молекулу: једна метокси група се налази на C-3 трисупституисаног ароматичног прстена, док се друга метокси група налази на позицији C-5' бензофуранског прстена. Хетеронуклеарно НМВС купловање између 2H-7'/C-1', 2H-7'/C-2', 2H-7'/C-6', 2H-7'/C-8' и 2H-7'/C-9' указује да је бочни низ везан за позицију C-1' бензофуранског прстена.

Стереохемија супстанце **29** потврђена је упоређивањем хемијских померања и константи спрезања са вредностима датим у литератури (Matsuda et al., 1996). Константа спрезања између 7-арил и 8-хидроксиметил протона од $J=6,3$ Hz указује на њихову *trans* конфигурацију. Апсолутна конфигурација супстанце *7S, 8R* одређена је упоређивањем вредности хемијских померања за угљеникове атоме C-7 и C-8 на $^{13}\text{C-NMR}$ са вредностима из литературе, који одговарају различитим диастереоизомерима. На основу литературних података хемијско померање C-7 и C-8 од δ_C 86,5–87,5 и 55,0–56,5, појединачно, одговара *7S,8R*-конфигурацији; док су за *7R, 8S*-конфигурацију супстанце одређена следећа хемијска померања δ_C 88,5–89,5 и 52,5–53,5 за угљеникове атоме C-8 и C-7, појединачно (Zheng et al., 2008).

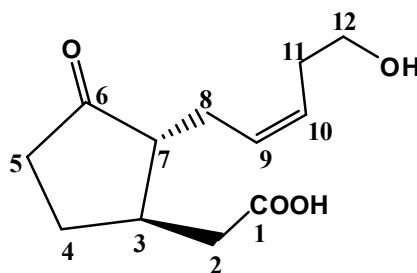


Слика 3.89 HMBC, COSY и HSQC спектри супстанце **29** (CD₃OD; 400,0 MHz) и структурно приказане најважније корелације уочене на HMBC (црвене стрелице) и COSY спектру

3.7 Алициклични деривати

30. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина

Први пут супстанца **30** је изолована из гљиве *B. theobromae* (Miersch et al., 1991). Касније, супстанца је изолована из различитих биљних врста: *Perilla frutescens* (Fujita et al., 1996), *Salvia officinalis* (Wang et al., 2000), *Thymus vulgaris* (Kitajima et al., 2004). Из рода *Origanum* изолована је и идентификована у оквиру три врсте са подручја Грчке: *O. vulgare* L. ssp *hirtum* (Koukoulitsa et al., 2006), *O. dubium* Boiss. (Pachopos, 2007) and *O. dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010). Супстанца **30** изолована је у облику безбојног уља и одређена јој је следећа хемијска структура приказана на **слици 3.90**.



Слика 3.90 30. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина

Вредност оптичке ротације метанолног раствора супстанце **30** износи

$$[\alpha]_D^{20} - 13,44 \text{ (} c=0,8; \text{ MeOH).}$$

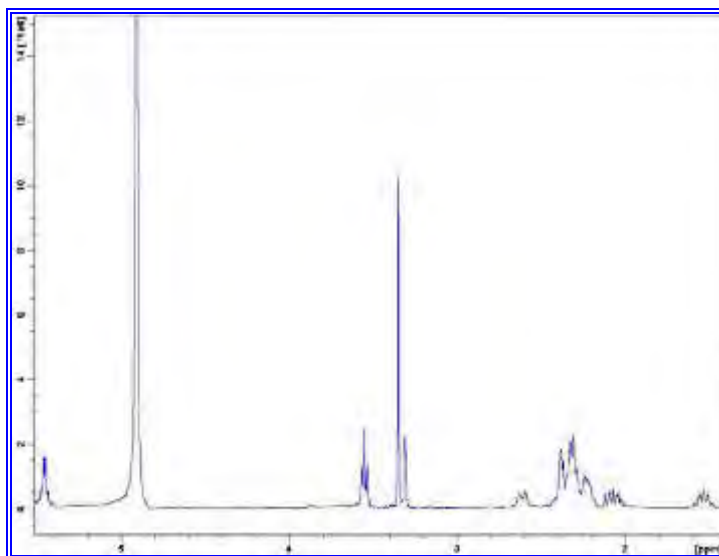
У $^1\text{H-NMR}$ делу спектра (**Табела 3.39**; **Слика 3.91**) карактеристичном за олефинске протоне, налазе се два двострука дублет триплета на δ_{H} 5,49 ($J=11,8; 7,4; 1,0$) и δ_{H} 5,42 ($J=11,8; 7,4; 1,0$) што одговара вициналним *cis*-метин протонима Н-9, Н-10. У сагласности са литературним подацима (Miersch et al., 1991), хемијска померања на δ_{H} 5,7-5,2 карактеристична су за природно добијене деривате јасмоничне киселине које у свом саставу имају бочни ланац са *cis* двоструком везом. На основу вредности константи спрезања и литературних података, триплет на δ_{H} 2,38 ($J=5,9$) одговара протонима Н-8a,b,

док кватрлет на δ_{H} 2,31 ($J=6,8$) протонима на позицији H-11a,b. Такође, триплет на δ_{H} 3,55 одговара геминалним протонима на позицији H-12a,b, док сигнали на нижим вредностима спектра одговарају алифатичним протонима молекула.

Протонски спектар је идентичан спектрима за јасмоничну киселину претходно изоловану из врста рода *Origanum* (Chatzopoulou et al. 2010; Koukoulitsa et al., 2006; Pachopos, 2007).

Табела 3.39 $^1\text{H-NMR}$ супстанце **30** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

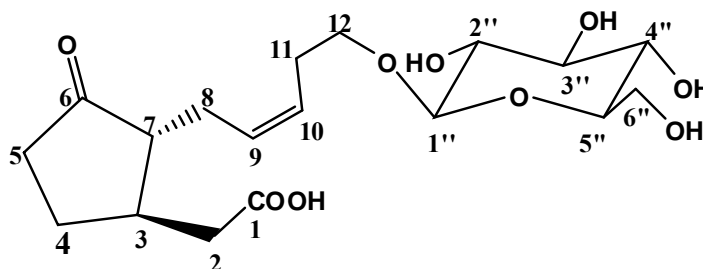
Позиција	Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрењања J (Hz)	Бр. H
-	-	-	-
H-2a	2,67	<i>dd</i> ($J=18,6; 13,9$)	1
H-2b, H-3, H-4b,H-5b,H-7	2,25-2,09	<i>m</i>	4
H-4a	1,53	<i>m</i>	1
H-5a	2,00	<i>ddd</i> ($J=18,6;10,2;8,3$)	1
-	-	-	-
H-8a,b	2,38	<i>t</i> ($J=5,9$)	2
H-9	5,42	<i>ddt</i> ($J=11,8; 7,4; 1,0$)	1
H-10	5,49	<i>ddt</i> ($J=11,8; 7,4; 1,0$)	1
H-11a,b	2,31	<i>q</i> ($J=6,8$)	2
H-12a,b	3,55	<i>t</i> ($J=6,8$)	2



Слика 3.91 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **30** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

31. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина 12-О-β-глюкопиранозид

Поред наведеног природног материјала и биљних врста из којих је изолована супстанца **30**, супстанца **31** је идентификована и из *S. tuberosum* (Šimko, 1996). Супстанца **31** изолована је као безбојно уље и помоћу спектроскопских метода одређена је следећа структура приказана на **слици 3.92**.



Слика 3.92 31. 12-О-Хидрокси јасмонична киселина 12-О-β-глюкопиранозид

Вредност оптичке ротације метанолног раствора супстанце **31** износи $[\alpha]_D^{20} - 9,24$ ($c=0,7$; MeOH).

Анализом ^1H NMR спектра добијеног за супстанцу **31** уочава се сличност са протонским спектром 12-О-јасмоничне киселине (**30**), уз присуство и сигнала карактеристичних за β-глюкопиранозу (**Табела 3.40**; **Слика 3.93**).

Дублет на δ 4,27 ($J=7,8$ Hz), који је карактеристичан сигнал за аномерни протон H-1' шећера, у корелацији је са вициналним протоном H-2' на основу COSY спектра. Сигнал наведеног протона уочава се као двоструки дублет са померањем на δ_{H} 3,17 и константом спрезања $J=9,0$; 7,8 Hz. Вредности константи спрезања ова два протона карактеристични су за глюкозу. Супротно ^1H -NMR спектру супстанце **30**, где се геминални протони H-12a,b налазе на δ_{H} 3,55 у облику триплета са константом $J=6,9$ Hz, овде су наведени протони два одвојена сигнала двоструки триплет на δ_{H} 3,88 ($J=7,4$; 9,6 Hz) и квартет на δ 3,56 ($J=9,6$ Hz) што указује да је глюкоза као шећерна компонента везана за C-12.

На ^{13}C -NMR спектру супстанце **31** уочава се укупно осамнаест сигнала: шест сигнала глукозе и дванаест сигнала основног скелета. Међу њима, два сигнала карактеристична за карбоксилну групу на δ_{C} 222,7 (C-6) и δ_{C} 177,0 (C-1), као и угљеник на δ_{C} 104,8 карактеристичан за угљеник C-1' шећера.

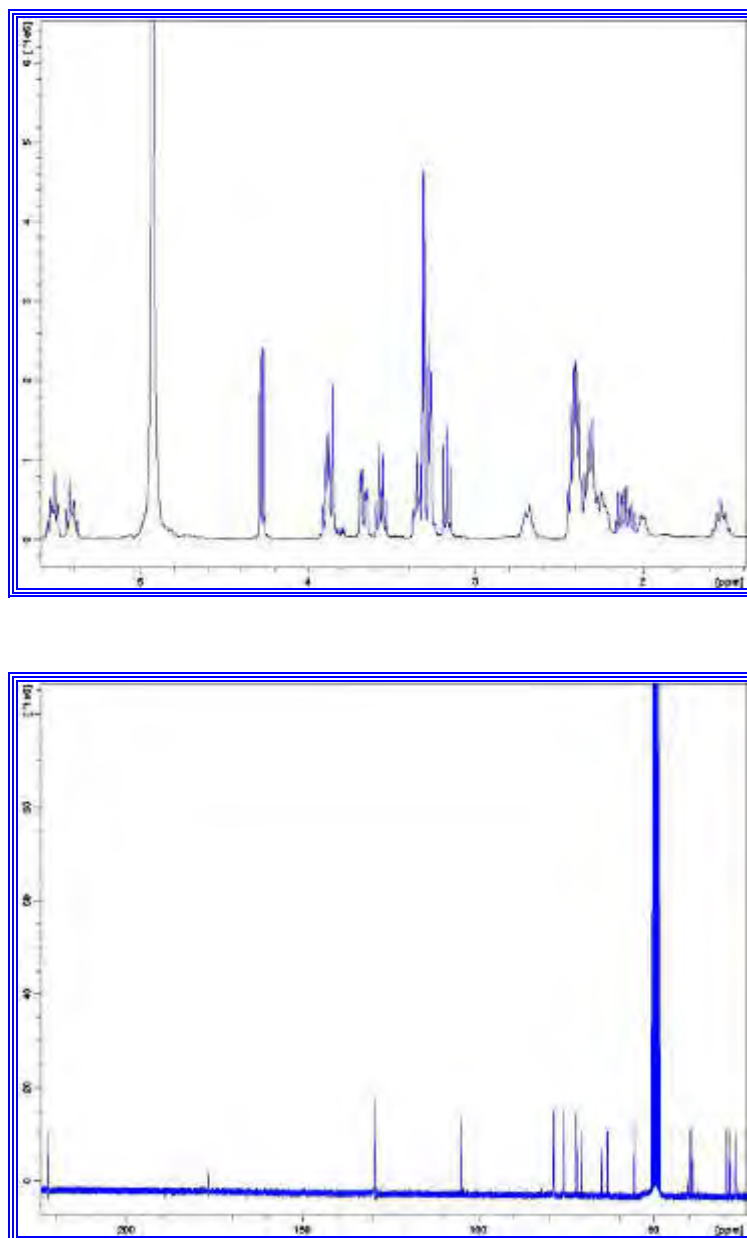
Презентовани подаци су у сагласности са литературним подацима (Fujita et al., 1996; Koukoulitsa et al., 2006; Pachopos, 2007; Chatzopoulou et al., 2010).

Табела 3.40 ^1H -NMR и ^{13}C -NMR супстанце **31** (CD_3OD ; 400,0; 50.3 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	C=O	177,0	-	-	-	-
C-2	CH ₂	42,6	H-2a	2,69	<i>dd</i> (J=13,6; 18,4)	1
C-3	CH	39,7	H-3	2,25	<i>m</i>	1
C-4	CH ₂	29,4	H-4b	1,53	<i>m</i>	1
			H-2b, H-4a, H-5b	2,15-2,04	<i>m</i>	3
C-5	CH ₂	39,2	H-5a	2,41**	<i>m</i>	1
C-6	C=O	222,7	-	-	-	-
C-7	CH	55,6	H-7	1,98	<i>m</i>	1
C-8	CH ₂	27,4	H-8	3,47	<i>m</i>	1
C-9	CH	129,4	H-9	5,41	<i>dt</i> (J=7,2; 10,6)	1
C-10	CH	129,5	H-10	5,51	<i>dt</i> (J=7,0; 10,8)	1
C-11	CH ₂	29,8	H-11a,b	2,41**	<i>m</i>	2
C-12	CH ₂	72,2	H-12a	3,88	<i>dt</i> (J=7,4; 9,6)	1
			H-12b	3,56	<i>q</i> (J=9,6)	1
C-1'	CH	104,8	H-1'	4,27	<i>d</i> (J=7,8)	1
C-2'	CH	75,6	H-2'	3,17	<i>dd</i> (J=7,8; 9,0)	1
C-3'	CH	78,6	H-3', H-4', H-5'	3,38-3,27	<i>m</i>	3
C-4'	CH	70,7				
C-5'	CH	78,4				
C-6'	CH ₂	63,3	H-6a'	3,85	*	1
			H-6b'	3,66	<i>dd</i> (J=5,3; 11,8)	1

* Сигнал делимично преклопљен са сигналом протона H-12a.

** Преклопљени сигнали.

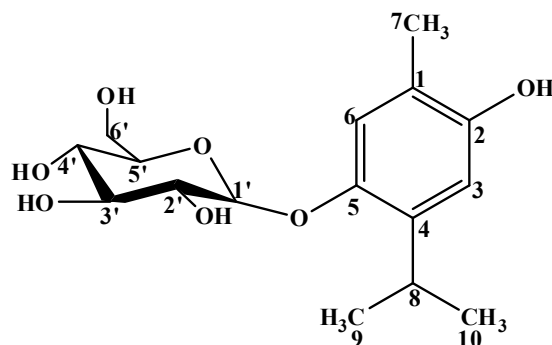


Слика 3.93 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ спектри супстанце **31** (CD_3OD ; 400,0; 50,3MHz)

3.8 Монотерпенски гликозиди

32. Тимохинол-5-О-β-глукопиранозид

Први пут супстанца је изолована из биљке *Schisandra chinensis* (Yahara et al., 1993), док је у оквиру фамилије Lamiaceae први пут изолована и хемијски окарактерисана из *Origanum syriacum* (Kamel et al. 2001). До данас је изолована још из две врсте рода *Origanum*: *O. vulgare* L. ssp *hirtum* (Koukoulitsa et al., 2006) и *O. dubium* Boiss. (Pachopos, 2007). Супстанца **32** је безбојно уље хемијске структуре приказано на слици



Слика 3.94 32. Тимохинол-5-О-β-глукопиранозид

Вредност оптичке ротације метанолског раствора супстанце **32** износи $[\alpha]_D^{20} - 24,3$ ($c = 0,37$; MeOH).

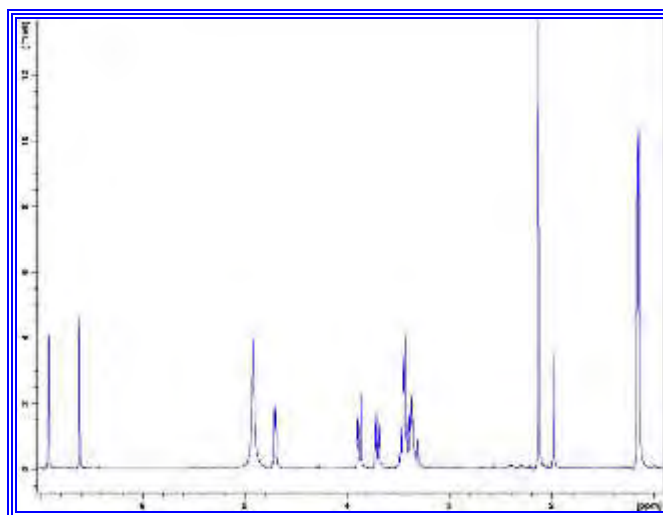
На $^1\text{H-NMR}$ спектру супстанце **32** (Табела 3.41; Слика 3.95 – 3.96), уочавају се два синглета на $\delta_{\text{H}} 6,62$ и $\delta_{\text{H}} 6,93$ који одговарају протонима Н-3 и Н-6, појединачно (Yahara et al., 1993). Мултиплет на $\delta_{\text{H}} 3,47$ заједно са двоструким дублетом на $\delta_{\text{H}} 1,15$ ($J=6,8; 1,8$ Hz), који интеграцијом даје укупно шест протона, указују на присуство изопропил групе као бочног ланца у молекулу (Н-8, CH_3 -9 и CH_3 -10, појединачно). Са друге стране, синглет на $\delta_{\text{H}} 2,13$ који интеграцијом даје три протона карактеристичан је за метил групу CH_3 -7 (Yahara et al., 1993). У области од $\delta_{\text{H}} 3,30$ до $\delta_{\text{H}} 4,70$, $^1\text{H-NMR}$ спектра уочава се неколико сигнала који интеграцијом дају укупно седам протона

карактеристичних за молекулу глукозе. Како је сигнал аномерног протона глукозе идентификован на δ_{H} 4,70 у облику дублета са константом спрезања $J=7,5$ Hz, утврђена је β -конфигурација глукопиранозидне јединице.

Табела 3.41 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}$ * супстанце **32** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	C	123,1	-	-	-	-
C-2	C	152,2	-	-	-	-
C-3	CH	112,2	H-3	6,62	<i>s</i>	1
C-4	C	138,2	-	-	-	-
C-5	C	149,2	-	-	-	-
C-6	CH	119,8	H-6	6,93	<i>s</i>	1
C-7	CH ₃	15,8	H-7	2,13	<i>s</i>	3
C-8	CH	26,8	H-8	3,47	<i>m</i>	1
C-9	CH ₃	23,5	H-9,H-10	1,15	<i>dd</i> (J=1,8; 6.8)	6
C-10	CH ₃	23,4				
C-1'	CH	103,9	H-1'	4,70	<i>d</i> (J=7,5)	1
C-2'	CH	74,1				
C-3'	CH	76,9	H-2',H-3'	3,49-3,33	<i>m</i>	4
C-4'	CH	70,5				
C-5'	CH	77,4				
C-6'	CH ₂	61,9	H-6'a	3,88	<i>dd</i> (J=1,5; 12.0)	1
			H-6'b	3,70	<i>dd</i> (J=5,1; 12,0)	1

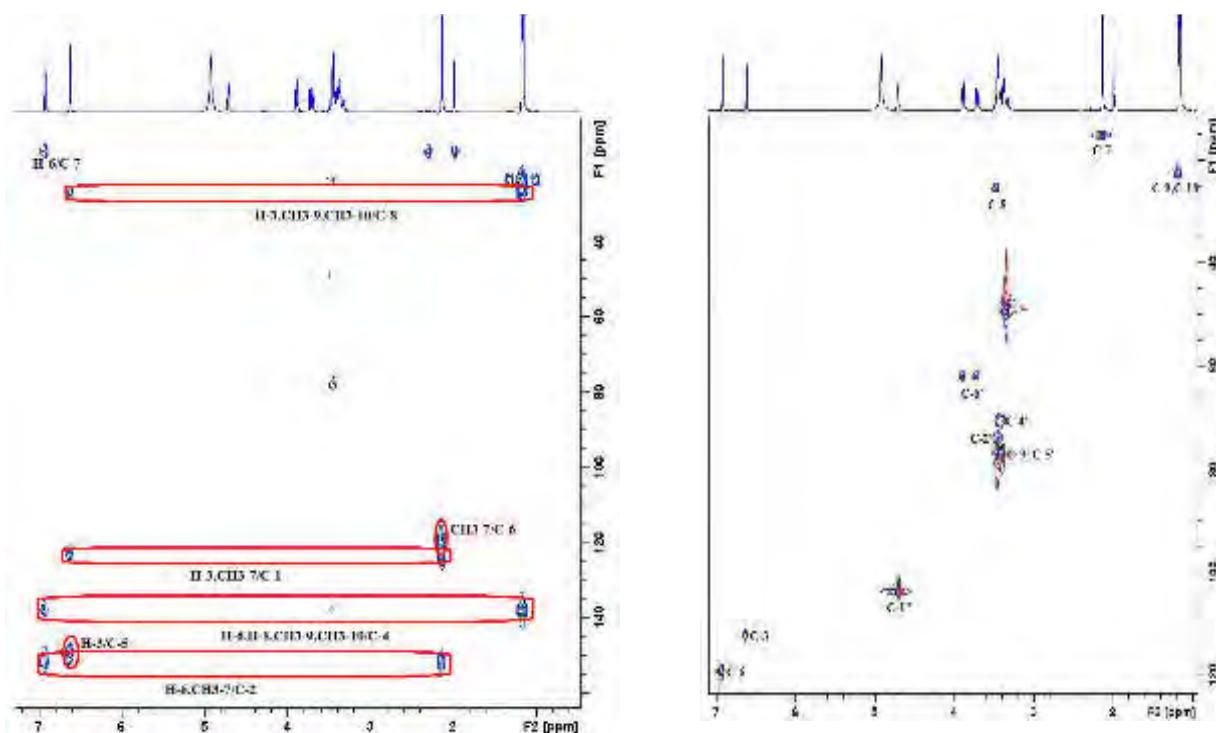
* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC спектра.

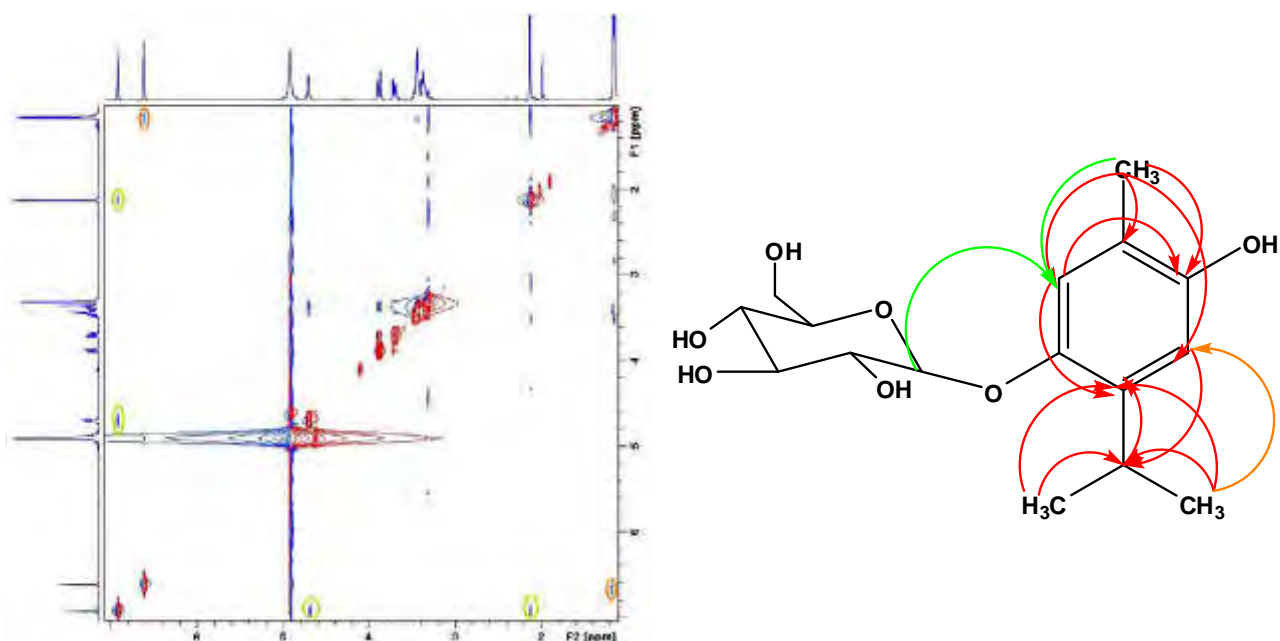


Слика 3.95 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **32** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Помоћу ROESY спектра утврђена је конформација молекула као и положај шећерне компоненте. Дублет на δ_{H} 4,70 који одговара аномерном протону глукозе Н-1' даје гОе сигнал са синглетом на вишим вредностима померања δ_{H} 6,93 (Н-6), што указује на то да је глукоза везана за угљеников атом С-5. Такође, гОе сигнал синглета на δ_{H} 1,15 (СН₃-7) и горе наведеног синглета на δ_{H} 6,93 (Н-6) потврђује да је метил група супституент на позицији С-1 док гОе сигнал између Н-3 и СН₃-9/ СН₃-10 потврђује претпоставку да се изопропил група налази на С-4 (Слика 3.96).

Са HSQC и HMBS спектра утврђено је да молекула укупно садржи шест угљеникових атома несупституисаног шећера са померањима на: δ_{C} 103,9 (С-1'); 74,1 (С-2'); 76,9 (С-3'); 70,5 (С-4'); 77,4 (С-5') и 62,4 (С-6') заједно са 10 угљеникових сигнала агликона који одговарају следећим хемијским групама: три метил групе (δ_{C} 15,8; 23,4 и 23,5), три метин групе (δ_{C} 26,8; 112,2; 119,8) и четири кватернерна угљеникова атома (δ_{C} 152,2; 149,2; 138,2 и 123,1).



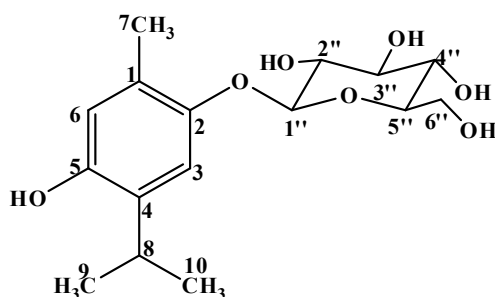


Слика 3.96 НМБС, HSQC и ROESY спектри супстанце **32** (CD₃OD; 400,0 MHz); Структурно представљене корелације уочене на НМБС (црвене стрелице) и ROESY спектрима

33. Тимохинол-2-О-β-глукопиранозид

Први пут супстанца **33** идентификована је у биљци *Sphaeranthus bullatus* (Jakirović et al., 1990). Поред наведених биљних врста рода *Origanum* из којих је изолована претходно описана супстанца **32**, супстанца **33** је изолована и идентификована и из врсте *O. dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010).

Супстанца **33** изолована је као жуто уље и одређена јој је структура приказана на слици 3.97.



Слика 3.97 **33**. Тимохинол-2-О-β-глукопиранозид

Вредност оптичке ротације метанолног раствора супстанце **33** износи $[\alpha]_D^{20} - 37,8$ ($c=0,7$; MeOH).

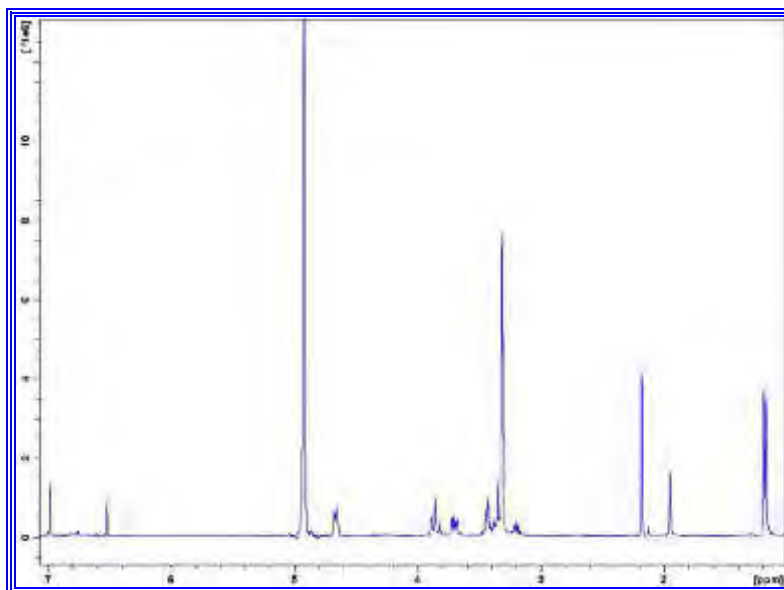
$^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **33** (Табела 3.42; Слика 3.98 – 3.99) је веома сличан протонском спектру тимохинол-5-О- β -глукопиранозида (**32**), са следећим разликама:

- синглет у ароматичном делу спектра је померен ка вишим вредностима фреквенције [$\Delta\delta=- 0,10$ ppm], од δ_{H} 6,52 на 6,62,
- мултиплет који одговара H-8 је такође померен ка вишим вредностима [$\Delta\delta=- 0,27$ ppm] (δ_{H} 3,20 vs 3,47). Ове разлике указују да је шећерна компонента везана у *para*- положају у молеку **33** у односу на **32**.

Табела 3.42 $^1\text{H-NMR}$ и $^{13}\text{C-NMR}^*$ супстанце **33** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Позиција	Тип C атома	Хемијско померање δ (ppm)		Хемијско померање δ (ppm)	Константа спрезања J (Hz)	Бр. H
C-1	C	126,9	-	-	-	-
C-2	C	150,5	-	-	-	-
C-3	CH	115,3	H-3	6,98	<i>s</i>	1
C-4	C	133,4	-	-	-	-
C-5	C	150,1	-	-	-	-
C-6	CH	117,6	H-6	6,52	<i>s</i>	1
C-7	CH ₃	15,6	H-7	2,18	<i>s</i>	3
C-8	CH	27,8	H-8	3,20	<i>m</i>	1
C-9	CH ₃	22,6				
C-10	CH ₃	22,4	H-9,H-10	1,19	<i>dd</i> (J=1,4; 6,9)	6
C-1'	CH	104,1	H-1'	4,67	<i>d</i> (J=7,5)	1
C-2'	CH	75,0				
C-3'	CH	77,6	H-2',H-3'			
C-4'	CH	70,9	H-4',H-5'	3,49-3,33	<i>m</i>	4
C-5'	CH	77,9				
C-6'	CH ₂	62,5	H-6'a	3,88	<i>dd</i> (J=2,2; 12,0)	1
			H-6'b	3,70	<i>dd</i> (J=5,2; 12,0)	1

* Вредности су добијене на основу HSQC и HMBC спектра.

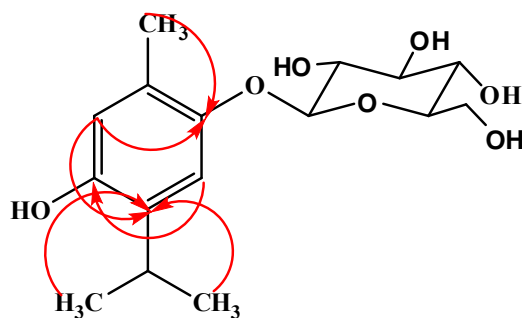
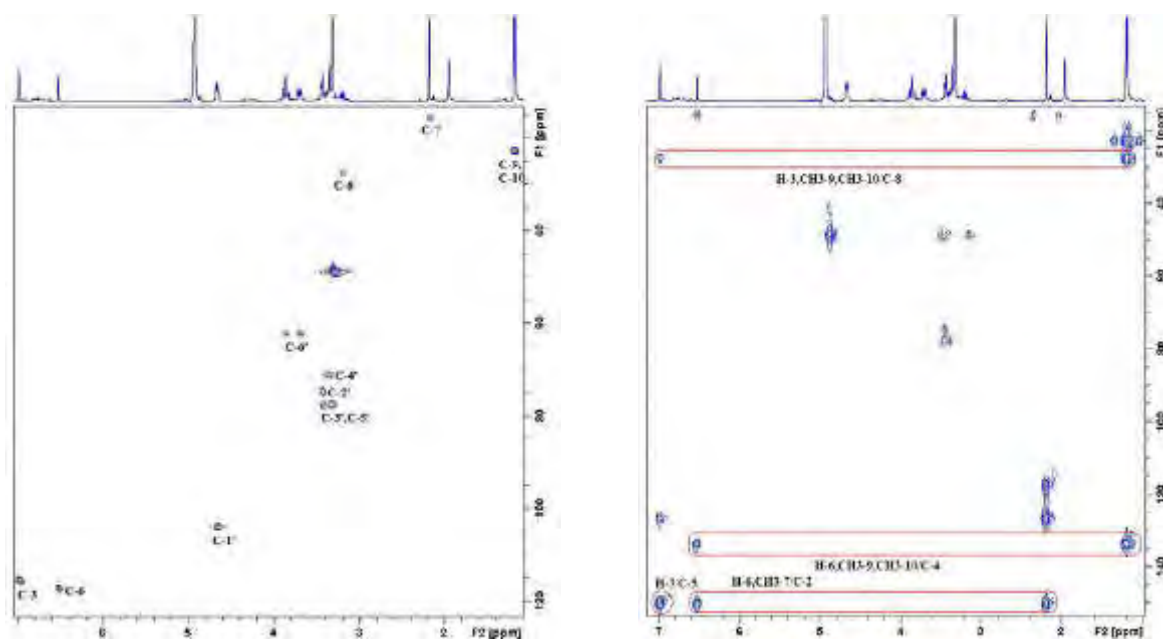


Слика 3.98 $^1\text{H-NMR}$ спектар супстанце **33** (CD_3OD ; 400,0 MHz)

Такође, на основу HMBC спектра супстанце **33**, C-2 на δ_{C} 150,5 је у корелацији са метил групом на δ_{H} 2,18 (H-7) и ароматичним синглетом на δ_{H} 6,52 (H-6), који је у овом случају померен ка нижим вредностима, у односу на вредности код супстанце **32** код које је на HMBC спектру уочено да је C-2 на δ_{C} 152,2 у корелацији са метил групом на δ_{H} 2,13 (H-7) као и ароматичним синглетом на δ_{H} 6,93 (H-6). На основу свега наведеног, изводи се закључак да синглет на нижим вредностима одговара протону H-6, док синглет на вишим вредностима фреквенције одговара протону H-3, што је супротно положају сигнала код супстанце **32** (δ_{H} 6,93 vs 6,62).

На основу ових запажања, као и промена које су уочене код хемијских померања угљеника C-2 (δ_{C} 150,5 vs 152,2) и C-5 (δ_{C} 150,1 vs 149,2) упоређивањем спектроскопских података супстанци **32** и **33** потврђује се претпоставка да се шећерна компонента налази на C-2 угљениковом атому код супстанце **33**, што је у сагласности са литературним подацима (Jakupovic et al., 1990).

Положај свих угљеникових атома утврђен је на основу HSQC и HMBC спектра (Слика 3.99).



Слика 3.99 HSQC и HMBC спектри супстанце **33** (CD_3OD ; 400,0 MHz); Структурно приказане најбитније корелације добијене на основу HMBC спектра

3.9 Антимикробна активност

3.9.1 Антимикробна активност екстракта, фракција и чистих једињења биљке *Centaurea rannonica*

Применом микродилуционе методе на 11 бактерија и квасац *Candida albicans* одређена је антимикробна активност неполарног екстракта биљке *C. rannonica* која се креће у опсегу од 31,25 – 125,0 µg/mL, при чему је екстракт најактивнији на *E. faecalis* (31,25 µg/mL). Фракција означена PAV_F је најактивнија према културама *E. faecalis* (15,62 – 31,25 µg/mL) и *A. baumannii* 31,25 µg/mL.

Од свих тестираних једињења, супстанце **8**, **12**, **13** су показале најбољу антибактеријску активност и код њих је измерена минимална инхибиторна концентрација (МИС) 31,25 – 125,0 µg/mL и минимална бактерицидна концентрација (МВС) 62,5 – 250,0 µg/mL. Неполарни екстракт биљке као и фракција F која садржи сесквитерпенске лактоне **1**, **9**, **10**, **13**, показују израженију антимикробну активност у односу на појединачне супстанце. Такође, супстанца **3**, која чини смешу супстанце **2** и **3** у односу 3:1 показује благо појачану активност у односу на остала изолована једињења.

Проучавајући резултате антимикробне активности сесквитерпенских лактона датих у **табели 3.43** запажа се да су све супстанце показале приближно исту, умерену, антимикробну активност. Од свих 14 тестираних сесквитерпенских лактона изолованих из *C. rannonica* гвајанолиди **8**, **10**, **11**, **12**, **13** и гермакранолид **14** показали су најјаче дејство на испитиване микроорганизме МИС 31,25 – 125,0 µg/mL док се активност свих осталих лактона кретала у опсегу МИС 125,0 – 500,0 µg/mL.

Према резултатима микродилуционе методе изоловани флавоноиди показали су знатно слабију активност у односу на SIs (**Табела 3.44**). Супстанца **21** је инхибирала раст свих тестираних микроорганизама у концентрацијама 62,5 – 500,0 µg/mL. Остали флавоноиди показали су врло слабу активност или потпуну неактивност на микроорганизме *S. aureus* и *C. albicans*.

Од наведених група једињења изолованих из биљке *C. pannonica*, лигнани су показали најслабију активност од МИС 125,0 – >500 µg/mL (Табела 3.44), са изузетком арктина који је показао нешто већу активност.

Резултати антимикуробне активности есенцијалног уља биљке *C. pannonica* указују да уље показује значајну активност (Табела 3.45). Слично као код супстанци и екстракта, грам (+) бактерије су осетљивије на дејство етеричног уља у односу на грам (-) сојење, што је у сагласности са претходним испитивањима (Yayli et al., 2005). Нађено је да уље изоловано из *C. pannonica* показује јаку бактерицидну активност на метил-резистентан сој *S. aureus* (МВС је 0,63 µL/mL), средње јаку активност на сојење *E. faecalis*, *M. lysodeikticus*, *K. pneumoniae* и *C. albicans* (МВС је 0,63 – 5,00 µL/mL) и потпуну неактивност на бактерије *E. coli* и *P. aeruginosa* МИС, МВС >5,00 µL/mL. Добијена антимикуробна активност уља може се објаснити садржајем основних идентификованих метаболита есенцијалног уља: 9-октадеканоинска киселина и (Z,Z)-9,12-октадекадиенска киселина, кариофилен-оксида и спатуленола. Све наведене супстанце појединачно, показале су значајну антимикуробну активност у досадашњим испитивањима на поједине сојење бактерија и гљива. У овом случају, међутим, не сме се занемарити присуство појединих компоненти у уљу у мањим количинама и њихов евентуални синергистички ефекат са основним метаболитима (Bougatsos et al., 2004; Lanciotti et al., 2003; Marino et al., 2001; Zheng et al., 2005).

Табела 3.43 Антимикробна активност сесквитерпенских лактона (1-14) изолованих из биљке *C. ranonica* (MIC и MBC $\mu\text{g/mL}$)

Супстанца	Грам (-) бактерије														Грам (+) бактерије						Квасац		
	Стандарни сој				Клинички изолати										Стандардни сој		Клинички изолати				Стандардни сој		
	<i>Escherichia coli</i> 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853		<i>Escherichia coli</i> 2020		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2503		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2645		<i>Acinetobacter baumannii</i> 5310		<i>Citrobacter amalonaticus</i> 6168		<i>Enterococcus faecalis</i> 29212		<i>Enterococcus faecalis</i> 2049		<i>Staphylococcus aureus</i> 0801		<i>Candida albicans</i> 164279		
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	125,0	250,0	125,0	250,0	250,0	500,0	125,0	125,0	125,0	250,0	62,5	125,0	250,0	250,0	62,5	62,5	125,0	125,0	62,5	250,0	500,0	-	
2	125,0	500,0	62,5	250,0	250,0	-	125,0	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	62,5	62,5	125,0	125,0	62,5	250,0	500,0	-	
3*	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	250,0	31,25	62,5	62,5	250,0	62,5	62,5	125,0	250,0	31,25	62,5	62,5	125,0	62,5	125,0	125,0	250,0	
4	250,0	500,0	62,5	250,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	250,0	250,0	62,5	125,0	125,0	125,0	500,0	-	500,0	-	
5	250,0	500,0	125,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	250,0	500,0	125,0	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	500,0	-	
6	250,0	250,0	125,0	250,0	500,0	-	250,0	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	125,0	62,5	62,5	250,0	250,0	125,0	250,0	500,0	500,0	
7	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	125,0	250,0	250,0	250,0	500,0	500,0	-	
8	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	250,0	62,5	125,0	62,5	125,0	62,5	62,5	125,0	125,0	62,5	62,5	62,5	125,0	250,0	250,0	500,0	-	
9	250,0	250,0	62,5	125,0	250,0	500,0	125,0	250,0	250,0	500,0	62,5	125,0	250,0	250,0	62,5	62,5	62,5	125,0	250,0	250,0	500,0	500,0	
10	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	500,0	62,5	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	62,5	125,0	62,5	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	
11	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	62,5	125,0	125,0	125,0	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	125,0	125,0	500,0	
12	125,0	250,0	62,5	250,0	250,0	500,0	62,5	125,0	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	125,0	31,25	62,5	31,25	62,5	125,0	125,0	250,0	500,0	
13	125,0	250,0	62,5	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	125,0	62,5	125,0	125,0	250,0	31,25	62,5	31,25	62,5	125,0	125,0	125,0	250,0	
14	125,0	125,0	62,5	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	250,0	250,0	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0	250,0	500,0	

* Смеша две супстанце (2 и 3).

Табела 3.44 Антимикробна активност лигнана (15-18), флавоноида (19-25) екстракта и фракције биљке *C. rannonica* (MIC и MBC $\mu\text{g/mL}$)

Супстанца	Грам (-) бактерије														Грам (+) бактерије						Квасац		
	Стандарни сој				Клинички изолати										Стандардни сој		Клинички изолати				Стандардни сој		
	<i>Escherichia coli</i> 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853		<i>Escherichia coli</i> 2020		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2503		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2645		<i>Acinetobacter baumannii</i> 5310		<i>Citrobacter amalonaticus</i> 6168		<i>Enterococcus faecalis</i> 29212		<i>Enterococcus faecalis</i> 2049		<i>Staphylococcus aureus</i> 0801		<i>Candida albicans</i> 164279		
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
15	250,0	250,0	250,0	250,0	125,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	250,0	250,0	125,0	125,0	125,0	500,0	>500,0	-	н.а.	-	
16	250,0	250,0	250,0	250,0	125,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	500,0	>500,0	-	н.а.	-	
17	250,0	500,0	250,0	250,0	125,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	500,0	>500,0	-	500,0	500,0	
18	250,0	250,0	250,0	250,0	125,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	500,0	>500,0	-	н.а.	-	
19	125,0	250,0	125,0	250,0	250,0	500,0	62,5	250,0	125,0	500,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	62,5	125,0	250,0	500,0	н.а.	-	
20	125,0	250,0	125,0	250,0	250,0	500,0	62,5	250,0	250,0	500,0	125,0	125,0	250,0	250,0	125,0	125,0	62,5	125,0	250,0	500,0	н.а.	-	
21	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	62,5	250,0	125,0	250,0	62,5	125,0	62,5	125,0	>500,0	-	500,0	-	
22	250,0	125,0	125,0	250,0	125,0	500,0	125,0	250,0	125,0	500,0	62,5	500,0	125,0	250,0	62,5	125,0	62,5	125,0	>500,0	-	н.а.	-	
23	250,0	500,0	250,0	250,0	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	500,0	62,5	500,0	250,0	250,0	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	250,0	н.а.	-	
24	250,0	500,0	250,0	250,0	250,0	500,0	250,0	500,0	125,0	500,0	62,5	500,0	250,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	>500,0	-	н.а.	-	
25	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	500,0	62,5	250,0	250,0	500,0	125,0	125,0	250,0	500,0	125,0	250,0	62,5	62,5	250,0	250,0	н.а.	-	
Ект. PAV	125,0	125,0	62,5	125,0	62,5	125,0	62,5	125,0	62,5	125,0	31,25	62,5	62,5	125,0	31,25	62,5	31,25	62,5	125,0	250,0	125,0	125,0	
Фрак. F	125,0	125,0	62,5	62,5	62,5	125,0	62,5	125,0	62,5	250,0	31,25	62,5	62,5	125,0	15,62	62,5	31,25	62,5	62,5	250,0	125,0	250,0	

Табела 3.45 Антимикробна активност есенцијалног уља биљке *C. pannonica* (MIC и MBC $\mu\text{L}/\text{mL}$)

Микроорганизми	Есенцијално уље <i>C. pannonica</i>		Стандард	
	MIC	MBC	MIC ^a	MBC ^a
Бактерије				
Грам (+) бактерије				
<i>E. faecalis</i>	0,63	0,63	0,31	0,31
<i>M. lysodeikticus</i>	2,50	5,00	0,62	1,25
<i>S. aureus</i>	0,31	0,63	0,62	1,25
Грам (-) бактерије				
<i>E. coli</i>	>5,00	>5,00	0,31	0,62
<i>K. pneumoniae</i>	1,25	1,25	0,31	0,31
<i>P. aeruginosa</i>	>5,00	>5,00	>2,50	>2,50
Квасац				
<i>C. albicans</i>	2,50	5,00	0,31	0,31

^a Стандардни антибиотици коришћени у раду: тетрациклин за бактерије и нистатин за *C. albicans* изражени у $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.9.2 Антимикробна активност екстракта, фракција и чистих једињења биљке *O. scabrum*

Супстанце изоловане из поларног екстракта *O. scabrum* показале су умерену активност на тестиране микроорганизме. Најосетљивија бактерија је изолат *A. baumannii* са измереном МИС 62,5 – 125,0 µg/mL, док је најотпронији микроорганизам *Citrobacter amalonaticus* са МИС 125,0 – 500,0 µg/mL. Испитивани екстракт је показао нешто израженију антимикробну активност у односу на испитиване супстанце. Дериват рузмаринске киселине, супстанца **28** и неолигн **29** са МИС 62,5 – 250,0 µg/mL јесу супстанце са најизраженијом активношћу, док су монотерепенски гликозиди са МИС 250,0 – >500 µg/mL показали најслабију активност на испитиване микроорганизме (Табела 3.46). Значајну активност у односу на све остале испитане супстанце на сој *S. aureus* показује супстанца **26** са МИС 62,5 µg/mL, као и супстанца **30** на *C. albicans* са истом вредношћу минималне инхибиторне концентрације.

Екстракти обе биљке имају знатно бољу активност од појединачних једињења, њихове вредности минималне инхибиторне концентрације су приближне фосфомицину МИС 32 µg/mL код појединих испитиваних сојева бактерија. Такође, сва једињења су показала знатно бољу активност на грам (+) сојеве и чак знатно јачу код соја *E. faecalis* од антибиотика Гентамицин Синерги МИС 500 µg/mL и Стрептомицин Синерг. <=1000,0 µg/mL (Табеле 3.47 – 3.48).

Табела 3.46 Антимикробна активност секундарних метаболита изолованих из биљке *O. scabrum* (MIC и MBC $\mu\text{g/mL}$)

Супстанца	Грам (-) бактерије														Грам (+) бактерије						Квасац		
	Стандарни сој				Клинички изолати										Стандардни сој		Клинички изолати				Стандардни сој		
	<i>Escherichia coli</i> 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853		<i>Escherichia coli</i> 2020		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2503		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2645		<i>Acinetobacter baumannii</i> 5310		<i>Citrobacter amalonaticus</i> 6168		<i>Enterococcus faecalis</i> 29212		<i>Enterococcus faecalis</i> 2049		<i>Staphylococcus aureus</i> 0801		<i>Candida albicans</i> 164279		
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
26	250,0	250,0	250,0	500,0	500,0	500,0	500,0	125,0	250,0	250,0	500,0	125,0	250,0	500,0	500,0	125,0	125,0	125,0	500,0	62,5	250,0	250,0	250,0
27	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	500,0	125,0	500,0	250,0	250,0	
28	250,0	500,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	62,5	250,0	125,0	125,0	125,0	250,0	125,0	500,0	125,0	500,0	250,0	500,0	
29	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	250,0	62,5	125,0	250,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0	250,0	500,0	125,0	125,0	
30	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	250,0	125,0	250,0	250,0	250,0	125,0	125,0	250,0	500,0	250,0	500,0	62,5	125,0	
31	125,0	125,0	125,0	500,0	500,0	500,0	125,0	250,0	250,0	500,0	125,0	250,0	250,0	500,0	125,0	125,0	125,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	
32	250,0	500,0	250,0	500,0	250,0	250,0	250,0	500,0	500,0	500,0	125,0	250,0	500,0	250,0	250,0	250,0	250,0	500,0	500,0	-	125,0	250,0	
33	250,0	250,0	250,0	500,0	250,0	250,0	250,0	500,0	250,0	500,0	125,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	500,0	250,0	250,0	125,0	125,0	
Екст. ORI	125,0	250,0	125,0	125,0	250,0	125,0	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	62,5	62,5	250,0	250,0	125,0	125,0	125,0	250,0	125,0	250,0	125,0	250,0

Табела 3.47 Антимикробна активност антибиотика на G(-) сојева бактерија (MIC $\mu\text{g/mL}$)

Антибиотик	Грам (-) бактерије						
	Стандарни сој		Клинички изолати				
	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	<i>Escherichia coli</i> 2020	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2503	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2645	<i>Acinetobacter baumannii</i> 5310	<i>Citrobacter amalonaticus</i> 6168
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
Амикацин	≤ 16	≤ 16	≤ 16	> 32	32	> 32	≤ 16
Амо/К Слав	$> 8/4$	$> 16/8$	16/8	$> 16/8$	$> 16/8$	$> 16/8$	$\leq 8/4$
Ампицилин	≤ 8	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	≤ 8
Цефазолин	≤ 8	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	≤ 8
Цефепим	≤ 8	16	≤ 8	> 16	> 32	> 16	≤ 8
Цефотаксим	≤ 2	8	≤ 2	> 32	> 8	> 32	≤ 2
Цефокситин	≤ 8	> 8	≤ 8	> 8	> 16	> 8	≤ 8
Цефтазидим	≤ 1	8	≤ 1	> 16	> 16	> 16	≤ 1
Цефуросим	≤ 4	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	8
Цолистин	≤ 2	4	≤ 2	≤ 2	> 4	≤ 2	≤ 2
Ертапенем	≤ 2	> 4	≤ 2	> 4	> 4	> 4	≤ 2
Фосфомицин	≤ 32	≤ 32	≤ 32	≤ 32	≤ 32	> 32	≤ 32
Гентамицин	≤ 4	≤ 4	≤ 4	8	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Имипенем	≤ 4	8	≤ 4	> 8	> 8	> 8	≤ 4
Левофлоксацин	≤ 2	≤ 2	> 4	> 4	> 4	4	≤ 2
Меропенем	≤ 1	≤ 1	≤ 1	8	> 8	> 8	≤ 1
Мезлоцилин	≤ 16	≤ 16	64	> 64	> 64	> 64	≤ 16
Нитрофурантоин	≤ 32	> 64	≤ 32	> 64	> 64	> 64	≤ 32
Норфлоксацин	≤ 4	≤ 4	≤ 8	> 8	> 8	> 8	≤ 4
Пиперацилин	≤ 16	≤ 16	64	64	> 64	> 64	≤ 16
Тетрациклин	≤ 4	> 8	> 8	> 8	≤ 4	> 8	≤ 4
Тобрамицин	≤ 4	≤ 4	> 8	> 8	> 8	8	≤ 4
Триметоприм	≤ 8	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8	≤ 8

Табела 3.48 Антимикробна активност антибиотика на G(+) сојеве бактерија (MIC $\mu\text{g/mL}$)

Антибиотик	Грам (+) бактерије		
	Стандардни сој	Клинички изолати	
	<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	<i>Enterococcus faecalis</i> 2049	<i>Staphylococcus aureus</i> 0801
	MIC	MIC	MIC
Амо/К Clav	$\leq 4/2$	$\leq 4/2$	$\leq 4/2$
Ампицилин	8	$\leq 0,25$	> 8
Цефалотин	16	16	≤ 8
Хлорамфеникол	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Ципрофлоксацин	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Клиндамицин	> 2	> 2	0,5
Даптомицин	4	4	≤ 1
Еритромицин	4	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Фосфомицин	≤ 32	> 32	≤ 32
Фусидна киселина	≤ 2	≤ 2	16
Гент. Синерги	$\leq 500,0$	$\leq 500,0$	-
Гентамицин	8	8	≤ 4
Левифлоксацин	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Линезолид	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Моксифлоксацин	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Нетилмицин	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Нитрофурантои	≤ 32	≤ 32	≤ 32
Норфлоксацин	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Оксацилин	> 2	> 2	> 2
Пеницилин	8	8	> 8
Рифампин	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Стреп. Синерги	$\leq 1000,0$	$\leq 1000,0$	-
Синерицид	> 2	2	≤ 1
Тикопланин	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Тетрациклин	> 8	> 8	≤ 2
Триметх/Сулф	$\leq 2/38$	$\leq 2/38$	$\leq 2/38$
Ванцомицин	4	4	2

3.10 Хемотаксономски значај изолованих метаболита

Род *Centaurea* L. сматра се таксономски веома компликованим због различите морфологије и поленске разноврсности врста (Susanna and Garcia-Jacas, 2007). Таксономско сређивање рода је и данас изазов за ботаничаре. На основу најновијих истраживања на молекуларном нивоу три монофилетске групе су дефинисане унутар рода (*Acrocentron*, *Cyanus* и *Jacea*). Чак више, предлаже се да се одређене секције уједињују унутар група.

Centaurea pannonica припада секцији *Jacea-Lepteranthus* унутар групе „*Centaurea jacea*” (*Jacea*). Група је највећа унутар рода и садржи укупно 29 секција. Карактер групе је специфичан *Centaurea jacea* тип полена (Garcia-Jacas et al., 2000). Хемијском анализом врста из групе су изоловани различити секундарни метаболити при чему основне групе једињења чине сесквитерпенски лактони, флавоноиди и лигнани.

Гвајанолиди су изоловани из 54 врсте рода *Centaurea* L., при чему 23 припадају групи *Jacea* (Milošević-Ifantis et al., 2013). Јако оксидовани и халогеновани гвајанолиди су предоминантна подгрупа гвајанолида унутар групе, са цинароциприном и јанерином (супстанца 5) као основним конституентима, док су гвајанолиди који садрже хлоров атом основни конституенти врста које припадају двема груписаним секцијама *Jacea-Lepteranthus*. Хлорохисопфолин Ц (супстанца 2) и деривати су идентификовани у свим врстама секције *Lepteranthus*, тако да се може сматрати евентуалним хемотаксономским маркером наведене групе секција. Готово да нема хемотаксономске разлике између ове две секције; ово запажање везано за хемијски састав унутар две секције је у потпуној сагласности са предлогом о груписању ове две секције базираном на DNA анализи (Garcia-Jacas et al., 2006).

Од осталих гвајанолида изолованих из биљке *C. pannonica* бабилин А (супстанца 1) је изолован из *C. babylonica* (секција *Microlophus*), бабилин Б (супстанца 6) и цебелин Ј (супстанца 7) из *C. glastifolia* L. (*Cheirolepis-Pseudoseridia-Pteracantha-Plumosipappus* комплекс). У сагласности са референцом научне групе Гарциа-Јакас (Garcia-Jacas), *C. thracica* (Јанка) Хајек је премештена из секције *Microlophus* у групу секција *Cheirolepis-Pseudoseridia-*

Pteracantha-Plumosirappus, чак више њихов предлог да *Cheirolepis* и *Microlophus* секције треба редефинисати у потпуности је у сагласности са нашим подацима (Garcia-Jacas et al., 2006). Хлорорепдиолид (супстанца **10**), епоксирепдиолид (супстанца **12**), репдиолид (супстанца **13**) и репин (супстанца **3**) изоловани из *C. rannonica* су идентификоване у биљци *C. repens*, бившој врсти рода *Centaurea* L., која је регруписана у род *Rhaponticum* Vaill.; такође, рхапосерин (супстанца **8**) је изолована први пут из биљке *Rhaponticum seratuloides* (Georgi) Bobrov., врсти која такође припада роду *Rhaponticum*. Овај податак као и присуство гвајанолида (Cis et al., 2006) у недавно редефинисаном роду *Rhaponticum* Vaill. подржавају претпоставку да врсте из групе *Jacea* имају јаку хемотакономску повезаност са наведеним родом.

Интересанто је да из врсте *C. jacea* од које је *Jacea* група добила назив, није изолован ни један гвајанолид већ два гермакранолида, кницин и ацетиловани дериват 4'-ацетилкницин (Forgo et al., 2012), потенцијални хемотаксономски меркер секције *Acrolophus* (Nowak, 1992; Gousiadou and Skaltsa, 2003; Јанаčković, 2004a,b). Узимајући у обзир да су гермакранолиди кницин, салонитенолид и њихови деривати идентификовани заједно са гвајанолидима у неким врстама рода *Centaurea* L. које припадају осталим секцијама унутар *Jacea* групе, ова чињеница може објаснити хемијски профил *C. jacea* L. Чак више у сагласности са Јанаčković (2004a) присуство кницина у неким врстама подрода *Jacea* је повезано са присуством салонитенолида, такође је важно напоменути да све претходно испитане врсте било које секције садрже салонитенолид деривате са бочним ланцем на позицији С-8, док се код супстанце **3** бочни ланац налази на позицији С-15.

Међу лигнанима, диарилбутиролактони арктигенин, матересинол и арктин (супстанаца **15-17**) идентификовано у 90% да сада испитаних *Centaurea* врсте. Присуство фенилпропаноид гликозида сирингина (супстанца **18**) као дериват синапил алкохола, активног интермедијера биосинтетичког пута лигнана је очекиван (Dewick, 2001).

Метилувани флавоноиди и њихови гликозиди су дефинисани као основна подгрупа унутар *Centaurea* L. (Formisano et al., 2012). Чак више, флавоноиди са метокси групом на позицији С-6, као и шећерном компонентом на С-7 могу се сматрати важним хемотаксономским маркером не само за секцију *Jacea-Lepteranthus*, већ и за целу *Jacea* групу. Презентовани флавоноиди (19-25) изоловани из биљке *C. rannonica* су у комплетној сагласности са недавном публикацијом научне групе Formisano et al., (2012), која је у ревијалном раду презентовала све до сада изоловане флавоноиде из група Cardueae, фамилије Asteraceae.

Анализом есенцијалног уља добијено је укупно 45 једињења што чини 82,2% укупне количине уља. Квантитативно најзаступљеније групе једињења су вишемасне киселине и оксидовани сесквитерпенски деривати. Како су из секције *Jacea-Lepteranthus* испитане четри *Centaurea* врсте и у свима је нађено да су најзаступљеније групе вишемасне киселине и оксидовани сесквитерпени, ове групе једињења се могу сматрати евентуалним хемотаксономским маркером секције у даљим истраживањима (Milošević et al., 2010).

Origanum scabrum припада потфамилији Nepetoideae унутар фамилије Lamiaceae и ово је једина врста из секције *Anatolicon* Bentham рода *Origanum* (Ietswaart, 1980) која је испитана до данас. Из биљке је изоловано и идентификовано 8 супстанци које припадају следећим групама: фенолне киселине типа депсида (супстанце 26-28), неолигнан (29), алициклични деривати (30-31) и монотерпенски гликозиди (32-33). Основно једињење изоловано из биљке је рузмаринска киселина, која је изолована из многих врста фамилије Lamiaceae и сматра се потенцијалним хемотаксономским маркером потфамилије Nepetoideae (Zgorcka and Glowniak, 2001; Grayer and de Kok, 1998). Рузмаринска киселина и њени деривати су карактеристични секундарни метаболити рода *Origanum*, с обзиром да је рузмаринска киселина идентификована у готово свим врстама рода *Origanum* испитиваним до сада. Такође, како су врсте рода *Origanum* богате есенцијалним уљима, па самим тим моно/сескви-терпенима, присуство монотерпенских гликозида је очекивано. Ова група једињења укључује тимихинол-5-О-β-глукопиранозид (супстанца 32) и тимохинол-2-О-β-глукопиранозид (супстанца 33) који су по први пут изоловани

из *Origanum syriacum* (Kamel et al., 2001) а затим и из врста са Грчког подручја *O. dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010) и *O. vulgare* ssp. *hirtum* (Koukoulitsa et al., 2006), као и из врсте *Origanum tyttanthum* из Узбекистана (Takeda et al., 2008). Интересантно је напоменути да су алициклични деривати до сада изоловани само из предходно наведених врста са Грчког подручја и да нису до сада изоловани ни из једне биљне врсте из потфамилије Nepetoideae. Неолигнан глочидиобизид је први пут изолован из рода *Origanum* и може бити интересантан маркер потфамилије Nepetoideae у будућим истраживањима (Milošević-Ifantis et al., 2012).

4. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата можемо извести следеће закључке:

1. Хемијска анализа биљака

Centaurea pannonica

- Из врсте *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkaі хроматографским и спектроскопским методама изоловано је **25** супстанци (супстанца **1-25**) од којих је **14** сесквитерпенских лактона, **7** флавоноида, **3** лигнана и **1** фенилпропаноид глукозид.
- Међу наведеним једињењима изоловане су и идентификоване **3** нове супстанце из групе сесквитерпенских лактона, први пут изоловане из природног материјала:
 - **Гермакранолид**
 - **2 α -Хидрокси 8-дехидрокси-15-О-метакрилат салонитенолид**
(Супстанца **14**)
 - **Гвајанолиди**
 - **2 α ,8 α -Дихидрокси дехидрокостунолид лактон** (Супстанца **9**)
 - **Панонин** (Супстанца **11**).
- Сесквитерпенски лактон **рхапосерин** (Супстанца **8**) и флавоноид **диосметин** (Супстанца **20**) су по први пут изоловани из врсте рода *Centaurea*.
- Применом GC/MS анализирано је есенцијално уље биљке *C. pannonica*. Идентификовано је **45** супстанци што чини **82,2%** укупног састава есенцијалног уља. Квантитативно најзаступљеније групе једињења су вишемасне киселине са **43,7%** и оксиговани сесквитерпени **18,7%**.

Origanum scabrum

- Из врсте *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. изоловано је и идентификовано **8** супстанци (супстанца **26-33**) од којих су **3** фенолне киселине из групе депсида, **2** гликозидна монотерпена, **2** алициклична деривата и **1** неолигнан.

- Све наведене супстанце су по први пут изоловане из биљке, док су дериват рузмаринске киселине **3-О-метил рузмаринска киселина** (супстанца **28**) и неолигнан **глочидиобозид** (супстанца **29**) први пут изоловани из рода *Origanum*.

2. Антимикробна активност

Centaurea pannonica

- На основу добијених резултата истраживања антимикробне активности, коришћењем микродилуционе методе, евиденто је да сви тестирани узорци поседују антимикробну активност.
- Од три групе једињења изолованих из биљке, сесквитерпенски лактони, показали су најизраженију активност, при чему су од **14** испитиних SIs, најачу активност показали гвајанолиди са више кисеоничних група **8, 10, 11, 12, 13** као и гермакранолид **14**.
- Флавоноиди и лигнани су показали знатно слабију активност на испитане сојеве.
- Резултати антимикробне активности есенцијалног уља биљке *C. pannonica* указују да уље показује значајну активност, нађено ја да уље изоловано из *C. pannonica* показује јаку бактерицидну активност на метил-резистентан сој *S. aureus*.

Origanum scabrum

- Супстанце изоловане из поларног екстракта *O. scabrum* показале су умерену активност на тестиране микроорганизме.
- Дериват рузмаринске киселине, супстанца **28** и неолигнан **29** су супстанце са најизраженијом активношћу док су монотерепенски гликозиди показали најслабију активност на испитиване микроорганизме.
- Испитивани екстракти и изоловане фракције биљака показали су јачу антимикробну активност у односу на појединачне супстанце.
- У поређењу са комерцијалним антибиотицима тестирани узорци су у већини случајева показали слабију антимикробну активност.

3. Хемотаксономски значај

Centaurea pannonica

- Основни секундарни метаболити изоловани из биљке *C. pannonica* секција *Jacea-Lepteranthus*, група *Jacea* су сесквитерпенски лактони, група гвајанолида.
- Од укупно 40 врста рода *Centaurea* из којих су изоловани и идентификовани гвајанолиди, двадесет врста припада групи *Jacea*.
- У групи су нарочито заступљени оксиговани гвајанолиди тако да се могу сматрати евентуалним хемотаксономским маркером групе.
- Унутар секције *Jacea-Lepteranthus* испитано је укупно 8 врста.
- Нарочито заступљени су хлоровани деривати гвајанолида, који су врло ретко заступљени у природи. Како је наведена група једињења идентификована у готово свим испитиваним врстама може се сматрати потенцијалним хемотаксономским маркером секције.

Origanum scabrum

- Рузмаринска киселина и њени деривати су основна група једињења изолована из врсте *O. scabrum*.
- Како је наведена киселина изолована из готово свих врста рода *Origanum*, може се сматрати потенцијалним хемотаксономским маркером.
- Неолигнан глочидиобозид је изолован по први пут из рода *Origanum* и интересантан је хемијски маркер за даља истраживања унутар наведеног рода.

ЛІТЕРАТУРА

1. Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G., 2004. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4595–4603.
2. Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy (4th ed.) Carol Stream, IL: Allured Publishing Co., Illinois.
3. Agrawal, P.K., 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medicinal and Aromatic plants, Luknow, India, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokio.
4. Akbar, S., Fries, D.S., Malone M.H., 1995. Effect of various pretreatments on the hypothermic activity of repin in naive rats. *J. Ethnopham.* 49, 91–99.
5. Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin, F. 2003 Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. *Chem.Nat. Comp.* 39, 219-220.
6. Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F., 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* 49 1410–1416
7. Alberto Marco, J., Sanz, F.J., Albiach, R., Rustaiyan, A., Habibi, Z., 1993. Bisabolene derivatives and sesquiterpene lactones from *Cousinia* species. *Phytochemistry* 32, 395-400.
8. Al-Easa, H.S., Mann, J., Rizk, A.F., 1990. Guaianolides from *Centaurea sinaica*. *Phytochemistry* 29, 1324-1325.
9. Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 40, 4168–4170.
10. Al-Saghir, J.; Al-Ashi, R.; Salloum, R.; Saliba, NA.; Talhouk, RS., Homaidan FR., 2009. Anti-inflammatory properties of Salograviolide A purified from Lebanese plant *Centaurea ainetensis*. *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 36.
11. Amábile-Cuevas, C.F., 2010. Global perspectives of the resistance problem. In Sosa AJ, Byarugada DK, Amábile-Cuevas CF, Okeke I, Kariuki S, Hsueh PR, editors. *Antimicrobial resistance in developing countries*. New York: Springer. 3-13.
12. Amaratunga, C., Sreng, S., Suon, S., Phelps, E.S., Stepniewska, K., et al. 2012. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. *Lancet. Infect. Dis.* 12, 851–858.
13. Amiguet, V.T., Petit, P., Ta, C.A., Nuñez, R., Sánchez-Vindas, P., Alvarez, L.P., Smith, M.L., Arnason, J.T., Durst, T., 2006. Phytochemistry and antifungal properties of the newly discovered tree pleodendron costaricense. *J. Nat. Prod.*, 69, 1005–1009.

14. Appendino, G., Gariboldi, P., Belliardo, F., 1986. Sesquiterpene lactones from *Centaurea uniflora* ssp. *nervosa*. *Phytochemistry* 25, 2163-2165. Öksüz, S., Serin, S., Topçu, G., 1994. Sesquiterpene lactones from *Centaurea hermannii*. *Phytochemistry* 35, 435-438.
15. Aqil, M., Khan, I.Z., Diamari, G.A. 1998. Flavonoids from *Centaurea senegalensis* DC (Compositae). *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 12, 177-180.
16. Aslan, Ü., Öksüz, S., 1999. Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turk J Chem*, 23, 15-20.
17. Assaf, M.H., Ali, A.A., Makboul, M.A., Beck, J.P., Anton, R., 1987. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Med.* 53, 343-345.
18. Ayres, D.C., Loike J.D. 1990. *Lignans-Chemical, biological and clinical properties*, Cambridge University Press, Cambridge, New York. p.198.
19. Baba, S. Osakabe N., Natsume, M., Terao, J., 2004. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.* 75, 165-178.
20. Barreroa, A.F., Oltraa, J.E. Álvarez, M., Raslanb, S.D., Saúdec, A.D., Akssirad, M., 2000. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia* 71, 60-64.
21. Barton Sir, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., 1999. *Comprehensive natural products chemistry*. Elsevier Science Ltd, London.
22. Bastos, M.M., Kijjoa, A. S.M., Cardoso Jose M., Gutierrez Alicia B., Herz W., 1990. Constituents of *Centaurea sphaerocephala* ssp. *polyacantha*, *Planta Med.* 56, 403-405.
23. Bellakhdar, J., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Piozzi, F., 1988. Constituents of *Origanum compactum*. *Planta Med.*, 54, 94-94.
24. Bendahou, M., Muselli, M., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106, 132-139.
25. Bentamène, A., Benayache, S., Creche, J., Petit, G., Bermejo-Barrera, J., Leon, F., Benayache, F., 2005. A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1061-1065.
26. Berdin, A.G., Adekenov, S.M., Raldugin, V.A., Shakirov, M.M., Druganov, A.G., Kulyyasov, A.T. Tolstikov, G.A., 1999. Rhapsoserine and rhaserolide, new sesquiterpene lactones from *Rhaponticum serratuloides*. *Russ. Chem. Bull.* 48, 1987-1991.
27. Berdin, G.A., Raldugin, A.V., Shakirov, M.M., Bagryanskaya, Yu.I., Gatilov, V.Yu., Druganov, G.A., Kulyyasov, T.A., Adekenov, M.S., Habdolda, G., Tolstikov, A.G., 2001. 15-O-Deacetyl-rhapsoserin and rhaserin-new components of a lactone mixture from *Rhaponticum serratuloides*. *Russ. Chem. Bull.* 50, 537-542.
28. Behal, V., 2001. Nontraditional microbial bioactive metabolites. *Fol. Microbiol.* 46, 363-370.
29. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2007. *Biochemistry*. W.H. Freeman and company, New York.

30. Bick J.A., Lange B.M., 2003 Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 146–154.
31. Bohlmann, F., Ziesche, J., 1980. Neue Guajanolide und Acetylenverbindungen aus *Ptilostemon*-Arten. *Phytochemistry* 19, 692–696.
32. Bohlmann, F., Gupta, R.K., 1981. Guaianolides from *Centaurea canariensis*. *Phytochemistry* 20, 2773–2775.
33. Bohlmann, F., Adler, A., King, R.K., Robinson, H., 1982a. Germacranolides from *Mikania grazielae*. *Phytochemistry* 21, 1169–1170.
34. Bohlmann, F., Zdero, C., 1982b. Chemotaxonomy of the genus *Pleiotaxis*. *Phytochemistry* 21, 1434–1435.
35. Bohlmann, F., Gupta, R.K., 1982c. 8β -hydroxy dehydrozaluzanin C from *Andryala pinnatifida*. *Phytochemistry* 21, 1799–1800.
36. Bohlmann, J, Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8):4126–4133.
37. Bojňanský, V., Fargašová, A., 2007. Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains region. Springer. Berlin, Heidelberg.
38. Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M., 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.* 402, 85–90.
39. Borkowski, B., Biesiadecka, A., 1996. Comparison of virusostatic activity of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acid (in Polish), *Herba Pol.* 317–321.
40. Bosabalidis, A., Gabrieli, C., Niopas, I., 1998. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens*. *Phytochemistry* 49, 1549–1553.
41. Bougatsos C, Ngassapa O, Runyoro KBD, Ioanna BC. 2004. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Zeit. Naturf. C.* 59, 368–372.
42. Bruno, M., Diaz, G.J., Herz, W., 1991. Guaianolides and lignans from *C. solstitialis subsp. schouwii*. *Phytochemistry* 30, 4165–4166.
43. Bruno, M., Fazio, C., Paternostro, M.P., Diaz, J.G., Herz, W., 1995. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea napifolia*. *Planta Med.* 61, 374–375.
44. Bruno, M., Paternostro, M.P., Gedris, T.E., Herz, W., 1996. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea nicaensis*, *Phytochemistry* 41, 335–336.
45. Bruno, M., Vasallo, N., Fazio, C., Gedris, E.T., Herz, W., 1998. Sesquiterpene lactones of two *Centaurea* species from Sicily. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 801–803.
46. Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, A.R., Arnold A.N., 2005. Guaianolides from *Centaurea babylonica*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 817–825.
47. Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, A.R., Bastow, F.K., Lee, H-K., 2005. Cytotoxic activity of some natural and synthetic guaianolides. *J. Nat. Prod.* 68, 1042–1046.
48. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253.

49. Butler, M.S., 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 25, 475–516.
50. Cardona, M.L., Fernandez, I., Pedro, J.R., Perez, B., 1991. Sesquiterpene lactones and Flavonoids From *Centaurea aspera*. *Phytochemistry* 30, 2331–2333.
51. Cardona M. L., Garcia B., Munoz M. C., Navarro F. I., Pedro J. R., 1997. New sesquiterpenes and other constituents from *Centaurea paui*. *Liebigs Ann./Recl.*, 3, 527–532. CA 126: 314852.
52. Carpita, N., McCann, M., 2000. The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, G. Wilhelm, and R.L. Jones, eds Rockville, IL: American Society of Plant Physiologists, 52–108.
53. Cartagena, E., Montanaro, S., Bardón, A., 2008. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. *Rev. Latinoamer. Quím.* 36/2, 43–51.
54. Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, A.R., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M., 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 349–352.
55. Chaturvedi, D., 2011. 10. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, 313–334. ISBN: 978-81-308-0448-4
56. Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., Lax Vivancos, V., Panagiotis K., Golegou, S., Skaltsa, H., 2010. Depsides and Other Polar Constituents from *Origanum dictamnus* L. and Their in Vitro Antimicrobial Activity in Clinical Strains. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6064–6068.
57. Chicca, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertugrul, K., Flamini, G., Nieri, P., 2011. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3066–3070.
58. Christensen, L.P., Lam, J., 1991a. Flavones and other constituents from *Centaurea* species, *Phytochemistry* 30, 2663–2665.
59. Christensen, L.P., Lam, J., 1991b. Acetylenes and other constituents from *Centaurea* species *Phytochemistry* 30, 3289–3292.
60. Chun, S.-S., Vattem, D.A., Lin, Y.-T., Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 40, 809–816.
61. Cis, J., Nowak, G., Kisiel, W., 2006. Antifeedant properties and chemotaxonomic implications of sesquiterpene lactones and syringin from *Rhaponticum pulchrum* *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 862–867.
62. Collado González, I., Macías, F.A., Massanet, M.G., R-Luis F., 1985. Guaianolides from *Centaurea canariensis* *. *Phytochemistry* 24, 2107–2109.
63. Collado González, I., Macías, F.A., Massanet, M.G., R-Luis F., 1985. Guaianolides from *Centaurea canariensis* *. *Phytochemistry* 24, 2107–2109.
64. Collado González, I., Macías, F.A., Massanet, M.G., R-Luis F., 1986. Structure, chemistry and stereochemistry of clementeins. Sesquiterpene lactones from *Centaurea clementei*. *Tetrahedron* 42, 3611–3622.
65. Cooper, G., Laird, A., Nahar, L., Sarker, S.D., 2002. Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (Compositae). *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 65–67.

66. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., Natural products (secondary metabolites). In Buchanan et al.(eds.) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville MD 2000; 1250-1318.
67. Csupor, D. , Widowitz, U., Blazsó, G., Laczkó-Zöld, E., Tatsimo, S. N. J. Balogh, Á. Boros, K., Dankó, B., Bauer, R. Hohmann, J., 2012. Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the Carpathian. Basin Phytother. Res. DOI: 10.1002/ptr.4754
68. Cueva, C., Moreno-Arribas M.V., Martín-Álvarez, P.J., Vicente, M.F., Bills, G., Basilio, A., López Rivas, C., Requena, T., Rodríguez, M.J., Bartoloméa, B., 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. Res. Microbiol. 161, 372–382.
69. Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Ag. 26, 343–356.
70. Ćirić, A., 2009. Antimikrobna aktivnost sekundarnih metabolita izolovanih iz vrsta *Centaurea spruneri* Boiss & Heldr i *Centaurea zuccariniana* DC. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
71. Ćirić, A., Karioti, A., Koukoulitsa, C., Soković, M., Skaltsa, H., 2012. Sesquiterpene lactones from *Centaurea zuccariniana* and their antimicrobial activity. Chem Biodivers.9, 2843-2853.
72. Daniewski, W.M., Nowak, G., Routsis, E., 1992. Salograviolide A, a sesquiterpene from *Centaurea salonitana*. Phytochemistry, 31, 2891–2893.
73. Daniewski, M.W., Nowak, G., 1993. Further sesquiterpene lactones of *Centaurea bella*. Phytochemistry 32, 204–205.
74. Daniewski, M.W., Nowak, G., Pankowska, E., Georgiadis, T., Routsis, E., Rychlewska, U., Szczepanska, B., 1993. Sesquiterpene Lactones of *Centaurea salonitana*. Phytochemistry 34, 445–447.
75. Damak, N., Ghorbel, H., Bahroun, A., Damak, M., Mc Killop, A., Simmonds, M., 2000. Contribution to structural investigation of *Centaurea dimorpha* compounds. J. Soc. Chim.Tunis 4, 653-658.
76. Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. J. Chromatogr. A. 503, 1–24.
77. Davis, E.M., Croteau, R., 2000. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. Topics in Current Chemistry, Vol. 209, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 53–95.
78. Dawidar A.M., Metwally M.A., Abou-Elzahab M., Abdel-Mogib M., 1989. Chemical constituents of two *Centaurea* species, Pharmazie 44, 735–736.
79. Deans, S.G., Svoboda, K.P., 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil Flavour Frag. J. 5, 187-190.
80. De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., de Groot, A., Konig, W.A., Bouwmeester, H.J. 1998. (?)-Germacrene A biosynthesis—The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. Plant Physiol. 117, 1381–1392.
81. De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., Dalm, M.C.F., De Groot, A., Bouwmeester, H.J., 2001. Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. demonstration of a cytochrome P450 (1)-germacrene A hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. Plant Physiol. 125, 1930–1940.

82. De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., Joerink, M., de Groot, A., Bouwmeester, H.J., 2002. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiol.* 129, 257–268.
83. DeMartino, 2005. Lignan Natural Products. Baran Group Meeting.
84. Dewick, M.P., 2001. *Medical Natural Products*, second ed. John Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester.
85. Dey, P.M., Harborne, J.B. 1999. *Plant biochemistr.* Academic Press, London.
86. Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Stojkovic, D., Seridi, R., Skaltsa, H., 2007. Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. *J. Nat. Prod.* 70, 1796-1799.
87. Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C., Skaltsa, H., 2008. A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3725-3731.
88. Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, S.A., Voragen A.,G.J., van Berkel, W.J.H., 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *BMBR.* 1, 21–38.
89. Diklić, N., 1974. *Origanum L.* [In: Diklić, N., Janković, M. M. *Lamiaceae Lindley*]. In: Josifović, M. (ed.): *Flora SR Srbije 6: Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd.* 474-475.
90. Ding, H.Y., Chou, T.H., Liang, C.H., 2010. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. *Food Chem.* 123, 254–262.
91. Drew, D.P., Krichau, N. Reichwald, K., Simonsen, H.T., 2009. Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem. Rev.* 8, 581–599.
92. Dostál, J., 1976. In *Flora Europea*; Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burgess, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., (Eds.) Cambridge University Press. Cambridge, Vol. 4, p. 290.
93. Duraipandiyar, V., Abdullah Al-Harbi, N., Ignacimuthu, S., Muthukumar, C., 2012. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm. *BMC Complement Altern Med.* 12, 1–6.
94. Dural, H., Bagci, Y., Ertugrul, K., Demirelma, H., Flamini, G., Luigi Cioni, P., Morelli, I., 2003. Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1417-1425.
95. El-Dahmy, S., Bohlmann, F., Sarg, T. M., Ateya, A., Farrag, N., 1985. New guaianolides from *Centaurea aegyptiaca*. *Planta Med.* 176–177.
96. Evstratova, I.R., Rybalko, S.K., Rzazade, Ya.R., 1967. Acroptilin-a new sesquiterpene lacrone from *Acroptilon repens*. *Chem. Nat. Compd.* 3, 284.
97. Evstratova, I.R., Mukhametzhinov, M.N., Sheichenko, V.I., Shreter A.I., Pakaln, D., 1969. Isolation of repin from *Centaurea hyrcanica*. *Chem. Nat. Compd.* 5, 186.
98. Faleiro, M.L., 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Méndez-Vilas, A. (Ed.). ©FORMATEX 1143–1156.

99. Fernández, I., García, B., Grancha, J.F., Pedro, J.R., 1989. Sesquiterpene lactones, flavonoids and coumarins from *Centaurea collina*. *Phytochemistry* 28, 2405–2407.
100. Fernández, I., Pedro, J.R., Polo, E., 1995. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifera*. *Phytochemistry* 38, 655–657.
101. Fernandes, R., Heywood, V.H., 1972. *Origanum* L. In: *Flora Europaea*, Tutin TG, Heywood, V.H, Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (eds.) III, London, New York, Cambridge Univ. Press. 171.
102. Flamini, G., Antognoli, E., Morelli, I., 2001. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* 57, 559–564.
103. Flamini, G., Ertugrul, K., Cioni, P.L., Morelli, I., Dural, H., Bagci, Y., 2002. Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 953–959.
104. Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., 2002a. Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochem. Sys. Ecol.* 30, 1051–1054.
105. Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y., Kargioglu, M., 2002b. Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry* 61, 433–437.
106. Flamini, G., Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Tugay, O., Demirelma, H., 2004. Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 553–557.
107. Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P. L., Bagci, Y., Dural, H., Ertugrul, K. Uysal, T. and Savran, A., 2006. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Pl. Syst. Evol.* 261, 217–228.
108. Fleisher, A., Fleisher, Z., 1988. Identification of Biblical Hyssop and origin of the traditional use of oregano-group herbs in the mediterranean region. *Econ.Bot.* 42, 232–241.
109. Fleisher, A., Sneer, N., 1982. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J. Sci. Food Agric.* 33, 441–446.
110. Forgo, P., Zupkó, I., Molnár, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J., 2012. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia* 83, 921–925.
111. Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., 2010. Volatile components of *Centaurea bracteata* and *C. pannonica* subsp. *pannonica* growing wild in Croatia. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1649–1654.
112. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Maggio, A., Rosselli, S., Bruno, M., 2012. Flavonoids in the subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution and ¹³C-NMR spectral data. *Chem. Biodiv.* 9, 2096–2158.
113. Fortuna, A.M., de Riscalá, E.C., Catalan C.A.N., Gedris T.E., Herz W., 2001. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 967–971.

114. Fraga, B.M., 1992; 1993; 1994; 1995; 1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012 Natural Sesquiterpenoids. Natural Products Reports 9, 217-241 and 557-580; 10, 397-419; 11, 533-554; 12, 303-320; 13, 307-326; 14, 145-162; 15, 73-92; 16, 21-38; 16, 711-730; 17, 483-504; 18, 650-673; 19, 650-672; 20, 392-413; 21, 669-693; 22, 465-486; 23, 943-972; 24, 1350-1381; 25, 1180-1209; 26, 1125-1155; 27, 1681-1708; 28, 1580-1610; 29, 1334-1366.
115. Freudenberg, K., 1965. Lignin: Its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. Science 148, 595-600.
116. Freudenberg, K., Nelsh, A.C., 1968. Constitution and Biosynthesis of Lignin: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol. 2, A. Kleinzeller, G.F. Springer, and H.G. Wittman, eds (New York: Springer-Verlag).
117. Fujita T., Terato K., Nalayama M., 1996. Two jasmonoid glucosides and a phenylvaleric acid glucosides from *Perilla frutescens*", Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 732-735.
118. Fukai, T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nomura T., 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. Life Scien. 71, 1449-1463.
119. Funk V.A., Susanna A., Stuessy T.F. & Bayer R.J. (eds.) 2009. Systematics, evolution and biogeography of Compositae. IAPT, Vienna, Austria.
120. Gadeschi, E., Jorge, Z.D., Massanet, G.M., Lurs, F.R., 1989. Two derivatives of costic acid from *Centaurea arguta*. Phytochemistry 28, 2204-2206.
121. Garcia-Jacas, N., Susana, A., Mozaffarian, V., Ilarslan, R., 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. Plant Syst. Evol. 223, 185-199.
122. Garcia-Jacas, N., Susana, A., Garnatje, T., Vilatersana, R., 2001. Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaurinae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. Ann. Bot. 87, 503-515.
123. Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Romaschenko, K., Suarez-Santiago, V.N., Ertugrul, K., Susana, A., 2006. *Centaurea* revisited: A molecular survey of the Jacea group. Ann. Bot. 98, 741-753.
124. Geppert, B., Drozd, B., Kielczewski, M., Holub, M., 1983. Sesquiterpene lactones. XXIII. Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. Acta Soc. Bot. Pol. 52, 23-34.
125. Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba N.A., Darwiche, N., 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials. Drug. Discov. Today 15, 668-678.
126. Ghisalberti, E.L., 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. Fitoterapia 68, 303-325.
127. González, G.A., Bermejo, J., Rincones Rodríguez, M., 1972b. Dihidroestafiatona aislada de la *Centaurea webbiana*. Sch. Bip. An. Quim. 68, 333-334.
128. González, G.A., Bermejo, J., Bretón, L.J., Massanet M.G., Triana, J., 1974. Chlorohyssopifolin C, D, E and vahlenin, four new sesquiterpene lactones from *Centaurea hyssopifolia*. Phytochemistry 13, 1193-1197.
129. González, G.A., Bermejo, J., Massanet M.G., 1977. Aportación al estudio quimiotaxonomico del genera *Centaurea*. Rev. Latinoamer. Quim. 8, 176-181.
130. González G.A., Bermejo J., Cabrera I., Massanet M.G., Mansilla H., Galindo, A., 1978a. Two sesquiterpene lactones from *Centaurea canariensis*. Phytochemistry 17, 955-956.

131. González, G.A., Bermejo, J., Amaro, M.J., Massanet, M.G., Galindo, A., Cabrera, I., 1978b. Sesquiterpene lactones from *Centaurea linifolia* Vahl. *Cem. J. Chem.* 56, 491–494.
132. González, G.A., de la Rosa, D.A., Massanet, M.G., 1982. Subexpinnatin, a new Guaianolide from *Centaurea canariensis*. *Phytochemistry* 21, 2363–2368.
133. González, A.G., Barrera, J.B., García, T.Z., Rosas, F.E., 1984. Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 23, 2071–2072.
134. González-Platas, J., Pérez-Ruiz, C., González, G.A., Bermejo, J., Medjroubi, K., 1999. 4 β ,15-Dihydro-3-dehydrosolstitialin A. *Acta Cryst. C55*, 1837–1839.
135. Goun, E., Cunningham, G., Solodnikov, S., Krasnykch, O., Miles, H., 2002. Antithrombin activity of some constituents from *Origanum vulgare*. *Fitoterapia* 73, 692–694.
136. Gousiadou, C., Skaltsa, H., 2003. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea* *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 389–396.
137. Grayer, R.J., de Kok P.J. R. 1998. Flavonoids and verbascoside as chemotaxonomic characters in the genera *Oxera* and *Faradaya* (Labiatae) *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 729-741.
138. Gülcema, I. D., Alankuş-Calışkan, O.C., Karaalp, A., Uygur Örs, Ballar, P., Bedir, E., 2010. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. *Carbohydr. Res.* 345, 2529–2533.
139. Hall, I.H., Grippo, A.A., Lee, K.H., Chaney, S.G., Holbrook, D.J., 1987. Effect of helenalin and bis(helenalanyl)malonate on nucleic acid and protein synthesis in human KB carcinoma cells. *Pharm. Res.* 4, 509–514.
140. Hamamouchi, M., 2002. Medicinal plants in Morocco: traditional use, marketing, and strategies for conservation and increasing value. *Esperance Medicale* 9, 454–458.
141. Hamburger, M., Wolfender, J.-L., Hostettmann K. 1993. Search for chlorinated sesquiterpene lactones in the neurotoxic thistle *Centaurea solstitialis* by liquid chromatography-mass spectrometry, and model studies on their possible artifactual formation. *Natural Toxins* 1, 315–327.
142. Hammoud, L. Seghiri, R. Benayache, S. Mosset, P. Lobstein, A. Chaabi, M. León, F. Brouard, I. Bermejo, J. Benayache F., 2012. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* all. var. *walliana* M. *Natural product research.* 26, 203-208.
143. Harborne J.B., 1980. Plant phenolics. In: Bell EA, Charlwood BV (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, volume 8 *Secondary Plant Products*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 329–395.
144. Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, Renée J.; Harley, M.M., de Kok, Rogier P.J. et al. 2004. "Labiatae". In Kubitzki, Klaus; Kadereit, Joachim W. *The Families and Genera of Vascular Plants VII.* Berlin; Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 167–275.
145. Harvala, C., Skaltsa, H., 1986. Chemical study on *Origanum dictamnus* L., Part 1. *Plant Med. Phytother.* 20, 300–304.
146. Harvey, A.L., 2008 Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 19/20, 894–901.
147. Hawas, U.W., El-Desoky, S.K., Kawashty, S.A., Sharaf, M. 2008. Two new flavonoids from *Origanum vulgare*. *Nat. Prod. Res.* 22, 1540–1543.

148. Helal, M.A., Nakamura, N., Meselhy, R. M., El-Fishawy, M.A., Hattori, M., Mahran H.G., 1997. Guaianolides from *Centaurea scoparia*. *Phytochemistry* 45, 551–554.
149. Hellenic Pharmacopeia. 2002. 5th ed, EOF, Athens, Chapter 2.8.12.
150. Hermann, K., 1960. Über Den „Gerbstoff“ Der Labiatenblätter. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 293, 1043–1048.
151. Higuchi, T., Brown, S.A. 1963. Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenylpropanoid system in lignification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 621–628.
152. Holzmanova, V., 1996. Rosmarinic acid and its biological activity (In Czech). *Chem. Listy* 90, 486–496.
153. Hoffmann, H.M.R., Rabe, J., 1985. Synthesis and Biological Activity of α -Methylene- γ -butyrolactones. *Angewandte Chemie.* 24, 94–110.
154. Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1147–1149.
155. Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front Microbiol.* 3, 1–24.
156. Ietswaart, J. M., 1980. A taxonomic revision of genus *Origanum*. Leiden University Press: Leiden.
157. Ifantis Milošević, T., Solujić, S., Skaltsa, H., 2011. Secondary metabolites from the aerial parts of *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. *Biochem. Syst. Ecol.* 44, 289–294.
158. Ifantis Milošević, T., Solujić S., Pavlović-Muratspahić D., Skaltsa, H., 2013. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry* DOI:10.1016/j.phytochem.2013.05.014
159. Jakupovic, J., Grenz, M., Bohlmann, F., Mungai, G.M., 1990. Carvotacetone derivatives and eudesman-12,6 β -olides from *Sphaeranthus* species. *Phytochemistry* 29, 1213–1217.
160. Jakupović, J., Jia, Y., Pathak, V.P., Bohlmann, F., King, R.M., 1986. Bisabolen derivatives and sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Planta med.* 5, 399–401.
161. Janačković, P., 2004a. Fitochemical and chemotaxonomic research of some *Centaurea* L. (Asteraceae) species from the Central Balkan Peninsula. Ph.D. [In Serbian].
162. Janačković, P., Tešević, V., Milosavljevic, S., Vajs, V., Marin, P.D., 2004b. Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 355–357.
163. Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakariah, K.K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* 36, 117–122.
164. Josifović, M., 1975. Flora SR Srbije (VII). Josifović, M., Stjepanović, L., Kojić, M., Nikolić, V. (eds.), SANU, Beograd, crp. 256.
165. Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Bruneau, C., 2011. Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chem. Nat. Comp.* 46, 966–967.

166. Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M., Girre, L., 1992. Chimie et activités biologiques du genre *Centaurea*. Pharm. Acta Helv. 67, 178, and references therein.
167. Kamel M.S., Assaf M.H., Hasanean H.A., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., 2001. Monoterpene glucosides from *Origanum syriacum*. Phytochemistry 58, 1149–1152.
168. Karamenderes, C., Demirci, B., Baser, K.H.C., 2008. Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey. J. Essent. Oil Res. 20, 342-349.
169. Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B., Harvala, C., 2002. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea deusta*. Antifungal and antibacterial activities. Zeit. Naturf. C. 57c, 75–80.
170. Karioti, A., Vrahimi-Hadjilouca, T., Droushiotis, D., Rancic, A., Hadjipavlou-Litina, D., Skaltsa, H., 2006. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. Planta Med. 72, 1330-1334.
171. Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aoyama, Y., Kasai, T., 2003. 6-hydroxyflavonoids as α -glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 445–447.
172. Kawaghuchi, Y., Yamauchi, S., Masuda, K., Nishiwaki, H., Akiyama, K., Maruyama, M., Sugahara, T., Kishida, T., Koba, Y., 2009. Antimicrobial activity of stereoisomers of butane-type lignans. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 1806–1810.
173. Keenan, J.I., Salm, N., Wallace, A.J., Hampton, M.B., 2012. Using food to reduce *H. pylori* associated inflammation. Phytother. Res. 26, 1620–1625.
174. Kikuzaki, H., Nakatani, N., 1989. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.) Agric. Biol. Chem. 53, 519–524.
175. Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., 2004. A new hydroxyjasnone glucoside and its related compounds from the leaf of thyme. Chem. Pharm. Bull. 52, 1013–1014.
176. Kohda, H., Takeda, O., Tanaka, S., Yamasaki, K., Yamashita, A., Kurokawa, T., Ishibashi, S., 1989. Isolation of Inhibitors of adenylate cyclase from Dan-shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. Chem. Pharm. Bull. 37 (5) 1287–1290.
177. Kokkini, F., 1997. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano; Padulosi Ed. Valenzano, Italy, 2-12.
178. Konstantinopoulou, M., Karioti, A. Skaltsa, H., 2003. Sesquiterpene lactones from *Anthemis altissima* and their anti-*Helicobacter pylori* activity. J. Nat. Prod. 5, 699-702.
179. Koutecký, P., 2008. Taxonomic study of Central European taxa of *Centaurea* sect. *Jacea*, Summary of Ph.D. Thesis, Czech Republik.
180. Koukoulitsa, C., Geromichalos, G.D., Skaltsa, H., 2005. VolSurf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek *Centaurea* sp. J.Comput.-Aid. Mol. Des. 19, 617–623.
181. Koukoulitsa, C., Karioti A., Bergonzi, C. M., Pescitelli, G., Di Bari, L. Skaltsa, H., 2006. Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. J. Agric. Food Chem. 54, 5388–5392.
182. Kuang, X.H., Xia, G.Y., Yang, B.Y., Wang, H.Q., Lü, W.S., 2009. Lignan constituents from *Chloranthus japonicus*. Sieb. Arch. Pharm. Res. 32, 3, 329–334.

183. Kubacey, M. T., Haggag, G. E., El-Toumy, A. S., Ahmed, A. A., El-Ashmawy, M. I., Youns, M.M., 2012. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. J. Pharm. Res. 5, 3352-3361.
184. Kuete, V., Nguemeving, J.R., Beng, V.P., Azebaze, A.G., Etoa, F.X., Meyer, M., Bodo, B., Nkengfack, A.E., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). J. Ethnopharmacol. 109, 372–379.
185. Kuete, V., Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Beng, V.P., Hussain, H., Krohn K., Nkengfack, A.E. 2008. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. Pharmazie 62, 552–556.
186. Kulevanova, S., Stefova, M., Stefkov, G., Stafilov, T., 2001. Identification, isolation, and determination of flavones in *Origanum vulgare* from Macedonian flora. J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 24, 589–600.
187. Kumarasamy, Y., Middleton, M., Reid, R., Nahar, L., Sarker, S., 2003. Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra*. Fitoterapia 74, 609–612.
188. Kushnir, L.E., Kuzovkov, A.D., 1968. Problem concerning structure of saurine. A sesquiterpene lactone from *Saussurea pulchella*. Fisch. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal 12. 21–29.
189. Lamb, A., Yang, X.D., Tsang, Y.H., Li, J.D., Higashi, H., Hatakeyama, M., Peek, R.M., Blanke, S.R., Chen L.F., 2009. *Helicobacter pylori* CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. EMBO Rep. 10, 1242–1249.
190. Lanciotti, R., Belletti, N., Patrignani, F., Gianotti, A., Gardini, F., Guerzoni, E.M., 2003. Application of hexanal, (*E*)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. J. Agric. Food Chem. 51, 2958–2963.
191. Lazari, D.M., Skaltsa, H.D., Conrstantinidis, T. 1999. Volatile constituents of *Centaurea raphanina* Sm. Subsp. Mixta (DC.) Runemark and *C. spruneri* Boiss. and Heldr. (Asteraceae), growing wild in Greece. Flav. Fragr. J. 14, 415–418.
192. Lazari, D.M., Skaltsa, H.D. T. Conrstantinidis 2000. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. Flav. Fragr. J. 15, 7–11.
193. Lee, D.G., Jung H.J., Woo, E.R., 2005. Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3alpha-O-beta-D-glucopyranoside isolated from the root bark of *Lycium chinense* Miller against human pathogenic microorganisms. Arch. Pharmacol. Res., 28, 1031–1036.
194. Lee, L.Y., Shim, J.S., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., 2008. Antibacterial activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. against foodborne pathogens. J. Food Prot. 71, 1926–1930.
195. Lin, Y.L., Wang, C.N., Shiao, Y.J., Liu, T.Y., Wang, W.Y., 2003. Benzolignanoid and polyphenols from *Origanum vulgare*. J. Chin. Chem. Soc. 50, 1079–1083.
196. Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Sokolov, V.S., 1975. “Gerbstoffe” und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. Planta Med. 27, 372–380.
197. Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J. Ethnopharmacol. 49, 57–68.

198. López-Rodríguez, M., García, V.P., Zater, H., Benayache, S., Benayache, F., 2009. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Cryst.* E65, 1867–1868.
199. Louaar, S., Achouri, A., Lefahal, M., Laouer, H., Medjroubi, K., Duddeck, H., Akkal, S. 2011. Flavonoids from Algerian endemic *Centaurea microcarpa* and their chemotaxonomical significance. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1603–1604.
200. Luo, Y., Cai, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science* 74, 2157–2184
201. Mabberley, D.J., 1997. *The Plant Book*, second ed., Cambridge University, Press, Cambridge. 138
202. Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
203. Machida, K., Sakamoto, S., Kikuchi, M., 2009. Two new neolignan glycosides from leaves of *Osmanthus heterophyllus*. *J. Nat. Med.* 63, 227–231.
204. Mann, J. (1987) *Secondary metabolites*. Oxford chemistry series.
205. Marco, J.A., Sanz, J.F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M., 1992. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species *Phytochemistry* 31, 3527–3530.
206. Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.S., Garcia Liso, V., Batlle, N., 1997. Sesquiterpene lactones from *Artemisia lucentica*. *Phytochemistry* 45, 755–763.
207. Marin, D.P., 2003. *Biohemijska i molekularna sistematika biljaka*. Beograd
208. Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Inter. J. of Food Microb.* 67, 187–195.
209. Markham, K.R., 1989. In “*Methods in Plant Biochemistry*”, *Plant Phenolics* (Dey, P.M. and Harborne, J.B., Ed.), vol. 1, Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. 197–235.
210. Massada, Y., 1976. *Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry*. John Wiley & Sons, New York.
211. Massanet, G.M., Collado, L.G., Macias, F.A., 1983. Structural determination of clementin, a new guaianolide isolated from *Centaurea clementei*. *Tetrahedron Lett.* 24, 1641–1642.
212. Massiot, G., Morfaux, A.M., Le Men-Olivier, L., Bouququant, J., Madaci, A., Mahamoud, A., Chopova, M., Aclinou, P., 1986. Guaianolides from leaves of *Centaurea incana*. *Phytochemistry* 25, 258–261.
213. Matsuda, N.; Sato, H.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M., 1996. Isolation and absolute structures of the neolignan glycosides with the enantiomeric aglycones from leaves of *Viburnum awabuki* K. Koch. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1122–1123.
214. Matsuura, H., Chiji H., Asakawa, C., Amano, M., Yoshihara, T., Mizutani, J., 2003. DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2311–2316.
215. Mattern, G., Weckert, E., Youssef, D., Frahm, W.A., 1996. Absolute configuration of chlorojanerin, a chlorine-containing guaianolide from *Centaurea scoparia*. *Acta Cryst.* C52, 1791–1793.
216. Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., Aclinou, P., 1997. Guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry* 45, 1449–1451.

217. Medjroubi, K., Benayache, F., León, F. & Bermejo, J., 2003. Complete assignment of the ^{13}C and ^1H NMR spectra of two known guaianolides isolated from *Centaurea musimonum*. Rev. Colombiana Quim. 32, 17–25.
218. Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., 2005. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimonum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia 76, 744–746.
219. Menichini, F., di Benedetto, R., Delle Monache, F., 1996. A triterpene and guaianolide from *Ptilostemmon gnaphaloides*. Phytochemistry 41, 1377–1379.
220. Merrill B.G., Stevens L.H.K., 1985. Sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis*. Phytochemistry 24, 2013–2018.
221. Middleton, M., Cox, J. P., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Reid, R., Sarker D.S., 2003. Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). Biochem. Syst. Ecol. 31, 653–656.
222. Miersch, O., Schneider G., Sembdner G., 1991. Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 30, 4049–4051.
223. Milosević, T., Argyropoulou C., Solujić, S., MuratSpahić, D., Skaltsa, H., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*. Nat. Prod. Commun. 5, 1663–1668.
224. Mirovich, V.M., Peshkova, V.A., Shatokhina, R.K., 1989. Phenolic acids of *Origanum vulgare*. Khim. Prir. Soedin. 6, 850–850. CA 112:115824.
225. Mishio, T., Honma, T., Iwashina, T., 2006. Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. Biochem. Syst. Ecol. 34, 180–184.
226. Monsalve, L.N., Rosselli, S., Bruno, M., Baldessaria, A. 2009. Lipase-catalysed preparation of acyl derivatives of the germacranolide cnicin. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57, 40–47.
227. Muhammad, I., Takamatsu, S., Mossa, S.J., El-Ferally, S.F., Walker, A.L., Clark M.A., 2003. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Centaurothamnus maximus* and *Vicoa pentanema*. Phytotherapy Res. 17, 168–173.
228. Murata, T., Miyase, T., Yoshizaki, F., 2012. Hyaluronidase inhibitors from *Keiskea japonica*. Chem. Pharm. Bull. 60, 121–128.
229. Natakani, N., Kikuzaki H., 1987. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). Agric. Biol. Chem. 51, 2727–2732.
230. Navarro, J.J., Caballero, C.M., Moran, R.J., Medarde, M., Grande, M., Anaya, J., 1990. Guaianolides and eudesmanolides from *Centaurea ornata*. J. Nat. Prod. 53, 573–578.
231. NCCLS (1999) *Performance standard for antimicrobial activity susceptibility test ninth international supplement*. Document M100-S-, Wayne, PA.
232. Negrete, E.R., Backhouse, N., Avendaño, S., San Martín, A., 1984. Dehydrocostus lactone et 8 α -hydroxydehydrocostus lactone de *Centaurea chilensis* Hooker et Arnold. Plant. Méd. Phytothér. 4, 226–232.
233. Negrete, E. R., Latorre, L., Backhouse, N., Peña, R., Delporte, C., 1988a. Etudes anatomiques et phytochimiques: Flavonoïdes et lactone de *Centaurea chilensis* Hooker et Arnold. Plant. Méd. Phytothér. 22, 1–10.
234. Negrete, E.R., Backhouse, N., San-Martín, A., Cassels, K.B., Hartmann, R., Breitmaier, E., 1988b. Guaianolides from *Centaurea chilensis* and *Centaurea floccosa*. Chem. Ztg. 112, 144–146.

235. Negrete R.E., Backhouse N., Prieto P., Mejias H., Camargo R.C., Cassels B.K., Breitmaier E., Hartmann R., 1989. Steroids, a lignan and a flavonoid from *Centaurea melitensis* L, Plant Med. Phytother. 23, 293–304.
236. Neu, R., 1957. Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als reagenzien für den Nachweis von oxyphenyl-benzo- γ -pyronen, die Naturwissenschaften. 44, 181–183.
237. Newman J.D., Cragg, G.M., 2007. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 70, 461–477.
238. Newman J.D., Cragg, G.M., 2010. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. 75, 311–335.
239. Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, E.C.D., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen P.A.M., Flavonoids 2001. A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 74, 418–425.
240. Nisar Khan, A., Fatima, I., Abdul Khaliq, U., Malik, A., AbbasMiana, G., Qureshi, Z.R., Rasheed, H., 2011. Potent anti-platelet constituents from *Centaurea iberica*. Molecules 16, 2053–2064.
241. Nishibe, S., Tsukamoto, H., Hisada, S., 1984. Effects of O-methylation and O-glucosylation on carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts of matairesinol, (+)-pinoresinol and (+)-epipinoresinol Chem. Pharm. Bull. 32, 4653–4657.
242. Nowak, G., Holub, M., Buuděšinsky, M. 1988. Sesquiterpene lactones. XXXIV. Guaianolides in the genus *Leuzea* DC. Acta Soc. Bot. Pol. 57, 157-163.
243. Nowak, G., Holub, M., Buuděšinsky, M., 1989. Sesquiterpene lactones. XXXVI. Sesquiterpene lactones in several subgenera of the genus *Centaurea* L. Acta Soc. Bot. Pol. 58, 95–102.
244. Nowak, G., 1992. A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe Centaureinae of the Compositae. Phytochemistry 31, 2363-2368.
245. Nowak, G., 1993. Chromatography of twenty six sesquiterpene lactones from *Centaurea bella*. Chromatographia 35, 325–328.
246. Ohno, N., Hirai, H., Yoshioka, H., Domínguez, A.X., Mabry J.T., 1973. Cynaropicrin: A sesquiterpene lactone from *Centaurea americana*. Phytochemistry 12, 221–222.
247. Okada, K., Kasahara, H., Yamaguchi, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., Nojiri, H., Yamane, H., 2008. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in arabidopsis. Plant Cell Physiol. 49, 604–616.
248. Öksüz, S., Ulubelen, A., Aynechi, Y., Wagner, H., 1982. A guaianolide from *Centaurea behen*. Phytochemistry 21, 2747–2749.
249. Öksüz, S., Ayyildiz, H., Johansson C., 1983. 6-methoxylated and C-glycosyl flavonoids from *Centaurea* species. J. Nat. Prod. 47, 902-903.
250. Öksüz, S., Putun, E., 1983. Guaianolides from *Centaurea kotschyi*. Phytochemistry 22, 2615–2616.
251. Öksüz, S., Topçu, G., 1994. Guaianolides from *Centaurea glastifolia*. Phytochemistry 37, 487–490.
252. Oksuz, S., Serin, S., 1997. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. Phytochemistry 46, 545.
253. Oluk, E.A., Çakır, A., 2009. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. Afr. J. Biotechnol. 8, 5769-5772.

254. Özkan, G., Sagdic, O., Baydar, N.G., Baydar, H., 2004. Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts. *Food Sci. Technol. Int.* 10, 277-281.
255. O'Brien, C., Henrich, P.P., Passi, N., D.A., 2011. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin. Infect. Dis.* 24, 570-577.
256. O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.-L., Sederoff, R. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J.* 4, 751-757.
257. Otsuka, H., Hirata, E., Shinzato, T., Takeda Y. 2000. Isolation of lignan glucosides and neolignan sulfate from the leaves of *Glochidion zeylanicum* (Gaertn) A. Juss *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1084-1086.
258. Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T., Yeşilada, E., 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiol. Res.* 164, 545-552.
259. Pachopos, N. 2007. Chemical analysis of the polar constituents of the plant *Origanum dubium* Boiss. (Lamiaceae) M.Sc., Athens.
260. Palomino, O.M., Gomez-Serranillos, P., Carretero, E., Cases, A., 1997. Variation in the flavonoid content of *Origanum X majoricum* in different plant stages by HPLC. *Planta Med.* 63, 584-584.
261. Pan, J.Y.; Chen, S.L., Yang, M.H., Wu, J., Sinkkonen, J., Zou, K., 2009. An update on lignans: natural products and synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1251-1292, 1460-4752.
262. Panagouleas, C., Skaltsa, H., Lazari, D., Skaltsounis, A.L., Sokovic, M., 2003. Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. *mixta* growing wild in Greece. *Pharm. Biol.* 41, 266-270.
263. Parejo, I., Caprai, E., Bastisa, J., Vidalomat, F., Jáuregui O., Codina C., 2004. Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J. Ethnopharm.* 94, 175-184.
264. Parr, A.J., Bolwell, G.P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80: 985-1012.
265. Peng, S.C., Cheng, C.Y., Sheu F., Su, C.H., 2008. The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape. *J. Appl. Microbiol.* 105, 485-491.
266. Peshkova, V.A., Mirovich, V.M., 1984. Flavonoids of *Origanum vulgare*. *Khim. Prir. Soedin.* 4, 522-522.
267. Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B., Meinhard, J., 1993. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189, 10-14.
268. Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Molecules of interest-Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.
269. Picman, A.K., Towers, G.H.N., 1983. Antibacterial activity of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 11, 321-327.
270. Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042.
271. Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L.S., 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. ibercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1645-1651.

272. Radušienė, J., Ivanauskas, L., Janulis, V., Jakštas, V., 2008. Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania, *Biologija* 54, 45–49.
273. Raj Narayana, K., Sripal Reddy, M., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Ind. J. Pharm.* 33, 2–16.
274. Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. Pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*. 8, 157–180.
275. Ren Y., Acuña U.M., Jiménez, F., Garcia, R., Mejía, M., Chai, H., Gallucci, J.C., Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., Carcache de Blanco, E.J., Kinghorn, A.D., 2012. Cytotoxic and NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*. *Tetrahedron* 68, 2671–2678.
276. Ribeiro, N.L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir-Babayev, N., Sarker, S.D., 2002. Flavonoid C-glucosides and a lignan from *Centaurea macrocephala* (Compositae). *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 1097–1100.
277. Robles, M., Choi, B.H., Han, B., Santa Cruz, K., Kim, R.C., 1998. Repin-induced neurotoxicity in rodents. *Exp. Neurol.* 152, 129–136.
278. Rodriguez, E., Towers, G.H.N., Mitchell, J.C., 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15, 1573–1580.
279. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahn, H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295, 517–524.
280. Rosenthal, G.A., Berenbaum M.R., 1992. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, Vol II Ecological and evolutionary processes, 2nd edition academic press, San Diego.
281. Rosselli, S., Bruno, M., Maggio, A., R.A. Bancheva, S., Senatore, F., Formisano, C., 2009. Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 426–431.
282. Rosler, H., Star, A.E., Mabry, T.J., 1971. New 6-methoxyflavonols from *Centaurea jacea*. *Phytochemistry* 10, 450–451.
283. Rustaiyan, A., Niknejad, A., Zdero, C., Bohlmann, F., 1981a. A guaianolide from *Centaurea behen*. *Phytochemistry* 10, 2427–2429.
284. Rustaiyan, A., Nazarians, L., Bohlmann, F., 1981b. Guaianolides from *Acroptilon repens*. *Phytochemistry* 20, 1152–1153.
285. Rustaiyan, A., Ardebili, S., 1984. New guaianolides from *C. kandavanensis*. *Planta Med.* 4, 363–364.
286. Rustaiyan, A., Sharif, Z., Tajarodi, A., Ziesche, J., Bohlmann, F., 1984. Neue guaianolide aus *Centaurea imperialis*. *Planta Med.* 50, 193–194.
287. Rustaiyan, A., Ahmadi, B., Jakupovic, J., Bohlmann, F., 1986. Sesquiterpene lactones and eudesmane derivatives from *Onopordon carmanicum*. *Phytochemistry* 25, 1659–1662.
288. Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., 1998. Essential Oil Chemical Composition of wild populations of Italian Oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3741–3746.

289. Rüngeler, P., Lyv, G., Castro, V., Mora, G., Pahl, H.L., Merfort, I., 1998. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF- α B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. *Planta Med.* 64, 588-593.
290. Sakakibara, A., Mabry, T.J., 1977. A UV procedure for distinguishing 5-hydroxyl-6-methoxyl from 5,6-dihydroxyl systems in flavones and 3-O-substituted flavonols. *Rev. Latinoam. Quim.* 8, 99.
291. Saleem, M., Nazir, M., Ali S.M., Hussain, H., Lee Y.S., Riaza, N., Jabbar, A., 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* 27, 238–254.
292. Saleem, M., Kim, H.J. Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant lignans. *Nat. Prod. Rep.* 22, 696-716.
293. Şahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Ozer, H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15, 549–557.
294. Sanz, J.F., Marco, J.A., Rustaiyan, A., 1990. Chemical constituents of *Centaurea persica* and *Senecio coronopifolius*. *Pharmazie* 45, 381.
295. Sarg, T.M., El-Domiaty, M., El-Dahmy, S., 1987. Further guaianolides from *Centaurea aegyptiaca*. *Sci. Pharm.* 55, 107–110.
296. Sarg, T., El-Dahmy, S., El-Domaity, M., Ateya, A., 1988. Guaianolides and other constituents from *Centaurea sinaica*. *Acta Pharm. Hung.* 58, 129.
297. Saroglou, V.; Karioti, A.; Demetzos, C.; Dimas, K.; Skaltsa, H., 2005. Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 68, 1404-1407.
298. Sathiamoorthy, B., Gupta, P., Kumar, M., Chaturvedi, A.K., Shukla P.K., Maurya, R., New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 239–242.
299. Sato, Y., Suzuki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata H., Higuti, T., 2000. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 72, 483–488.
300. Savidge, R.A., Udagama-Randenaya, P.V., and Lelinhos, V., 1994. Properties of two enzymes of lignification in conifers. In *Proceedings of the Second International Symposium on the Applications of Biotechnology to Tree Culture, Protection and Utilization*, C.H. Michler, M.R. Becwar, D. Cullen, W.L. Nance, R.R. Sederoff, and J.M. Slavicek, eds (St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service), p. 10.
301. Scarpati, M.L., Oriente, G., 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric. Sci.* 28, 2329–2333.
302. Schafer, H., Wink, M., 2009. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotech. J.* 4, 1684–1703.
303. Segiet-Kujawa, E., Michalowska, A., 1990. Determination of flavonoids in Hb. *Origani. Herba Pol.* 36, 79-82. CA 116:136343
304. Senatore, F., Rigano, D. De Fusco, R., Bruno M., 2003. Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (Asteraceae), two species growing wild in Sicily. *Flavour Fragr. J.* 18, 248–251.

305. Shoeb, M., MacManus, S.M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D., 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *C. americana*. *Phytochemistry* 67, 2370–2375.
306. Shoeb, M., Rahman, M. M., Nahar, L., Delazar, A., Jaspars, M., Macmanus, S.M. Sarker, S.D. 2004. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *DARU* 12, 87–93.
307. Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., 2001. Flavonoids and other polyphenols. *Methods Enzymol.* 335, 157-166.
308. Skaltsa, H., Harvala, C., 1987. Chemical study of *Origanum dictamnus* L. Part 2. Leaf glucosides. *Plant Med. Phytother.* 21, 56–62.
309. Slimestad, R., Marston, A., Mavi, S. Hostettmann, K., 1995. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med.* 61, 562–563.
310. Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 59, 201–222.
311. Silva, M.L.A., Coímbra, H.S., Pereira, A.C., Almeida, V.A., Lima, T.C., Costa, E.S., Vinhólis, A. H.C., Royo, V.A., Silva, R., Da Silva Filho, A.A., Cunha, W.R., Furtado, N.A.J.C., Martins, C. H.G., Carvalho, T.C., Bastos, J.K., 2007. Evaluation of *Piper cubeba* extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Phytother. Res.* 21, 420 – 422.
312. Silva, M.L.A., Martinsa, C.H.G., Lucarina, R., Satob, D.N., Pavanb, F.R., Freitas, N.H.A., Andradeb L.N., Pereira, A.C., Bianco, T.N.C., Vinholisa, A.H.C., Cunha, W.R., Bastos, J.K. Silvaa, R., da Silva Filhoa, A.A. 2009. Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic lignans. *Z. Naturforsch.* 64 c, 779 – 784.
313. Souleles, C., 1990. Flavonoids of *Origanum dubium*. *Plant Med. Phytother.* 24, 175–178.
314. Stevens L.K., Wong Y.R., 1986. Structure of chlororepdiolide, a new sesquiterpene lactone from *C. repens*. *J. Nat. Prod.* 49, 833–837.
315. Stevens, L.K., 1982. Sesquiterpene lactones from *C. repens*. *Phytochemistry* 21, 1093–1098.
316. Sueyoshi, E., Liu, H., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Aramoto, M., Takeda, Y., 2007. Bridelioside, a new lignan glycoside from *Bridelia glauca* Bl. f. *balansae* (Tucht.) Hatusima. *J. Nat. Med.* 61, 468–471.
317. Susanna, A., Garcia-Jacas, N., 2007. “The tribe Cardueae”, in “Flowering Plants. Eudicots. Asterales”, in Kadereit, J., Jeffrey, C. (Eds.) “The Families and Genera of Vascular Plants”, Ed. K. Kubitzki, Springer, Berlin, Heidelberg. 8, pp. 123–146.
318. Šimko, I., Omer, E.A., Ewing, E.E., Daviesa, P.J., McMurrya, S., Koch, J.L., 1996. Tuberonic (12-OH-jasmonic) acid glucoside and its methyl ester in potato. *Phytochemistry* 43, 727-730.
319. Talhouk, R.S., El-Jouni, W., Baalbaki, R., Gali-Muhtasib, H., Kogan, J., Talhouk, S.N. 2008. Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*. *J. Med. Plants Res.* 2, 024-033.
320. Takeda, Y., Mima, C., Masuda, T., Hirata, E., Takushi, A., Otsuka, H., 1998. Glochidioboside, a glucoside of (7S, 8R)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol from leaves of *Glochidion obovatum*. *Phytochemistry* 49, 2137–2139.

321. Takeda, Y., Tomonari, M., Arimoto, S., Masuda, T., Otsuka, H., Matsunami, K., Honda, G., Ito, M., Takaishi, Y., Kiuchi, F., Khodzhimatov, O. K., Ashurmetov O. A. 2008. A new phenolic glucoside from Uzbek medicinal plant *Origanum tyttanthum*. J. Nat. Med. 62, 71–74.
322. Tešević, V., Vajs, V., Todorović, N., Djoković, D. Marin, P., Milosavljević, S., 1998. Sesquiterpene lactones from plant species *Centaurea solstitialis* L.J. Serb. Chem. Soc. 63, 131–135.
323. Tolstikov, G.A., Flekhter, O.B., Shultz, E.E., Baltina, L.A., Tolstikov, A.G., 2005. Betulin and Its Derivatives. Chemistry and Biological Activity. Chem. Sust. Dev. 13, 1-29.
324. Tornhamre, S., Schmidt, T.J., Näsman-Glaser, B., Ericsson, I., Lindgren, JA., 2001. Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C(4) synthase in human blood cells. Biochem Pharmacol. 62, 903-911.
325. Toyoda, T., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Nishibe, S., Deyama, T., Takenaka, Y., Hirano, N., Tanaka, H., Takasu, S., Ban, H., Kumagai, T., Inada, K., 2007. Utsunomiya, H., Tatematsu, M., Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid, a plant lignan, on *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. Cancer Sci. 98, 1689–1695.
326. Tukov, F.F, Rimoldi, J.M, Matthews, J.C., 2004. Characterization of the role of glutathione in repin-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and dopaminergic neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC12) cells. Neurotoxicology 25, 989–999.
327. Twaij, H.A., Kery, A., Al-Khazraji, N.K., 1983. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. J. Ethnopharmacol. 9, 299-314.
328. Ulubelen, A., Öksüz, S., Meriçli, A.H., 1988. Palmitic acid ester of sitosteryl β -glucoside From *Centaurea regia*. Phytochemistry 27, 3964–3965.
329. Vajs, V., Todorović, N., Ristić, M., Tešević, V., Todorović, B., Janačković, P., Marin, P., Milosavljević, S., 1999. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. Phytochemistry 52, 383–386.
330. Van Den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A, 11, 463–467.
331. Vasquez, M., Quijano, L., Fronczek, R.F., Macias, A.F., Urbatsch, E.L., Cox B.P., Fischer, N.H., 1990. Sesquiterpene lactones and lignanes from *Rudbeckia* species. Phytochemistry 29, 561–565.
332. Venkateswara Rao, G., Mukhopadhyay, T., Annamalai, T., Radhakrishnan, N., Sahoo M.R., 2011. Chemical constituent and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. Pharmacognosy Res. 3, 143–145.
333. Voirin, B., 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxy flavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. Phytochemistry 22, 2107-2145.
334. Vogt, H.J., Tausch, I., Wölbling, R.H., Kaiser, P.M., 1991. Melissenextrakt bei *Herpes simplex* (eine Plazebo-kontrollierte Doppelblind-Studie). Allgemeinarzt 13, 832–841.
335. Vajs, V., Todorovic, N., Ristic, M., Tesević, V., Todorović, B., Janačković, P., Marin, P., Milosavljević, S. 1999. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. Phytochemistry 52, 383–386.

336. Wagner, H., Hoerhammer, L., Hoer, R., Murakami, T., Farkas, L., 1969. Untersuchungen über die Glykoside von *Centaurea jacea* L. III. Isolierung, Struktur und Synthese von 4,5,7-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-flavon-7-mono- β -D-glucopyranoside. *Tetrahedron Lett.* 39, 3411–3414.
337. Walton, N.J., Brown, D.E., 1999. *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Chapter 1: Harborne, J.B. Classes and functions of secondary products from plants. Imperial college press and World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd.
338. Wang M., Kikuzaki H., Zhu N., Sang S., Nakatani N., Ho C.-T., 2000. Isolation and structural elucidation of two new glucosides from Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48, 235–238.
339. Warnke, P.H., Becker, S.T., Podschun, R., Sivananthan, S., Springer, I.N., Russo, P.A., Wiltfang, J., Fickenscher, H., Sherry, E., 2009. The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J. Craniomaxillofac Surg.* 37, 392–397.
340. Whetten, R., Sederoff, R., 1995. Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 1001–1013.
341. Williams, W.L.Jr., Hall, I.H., Grippo, A.A., Oswald, C.B., Lee, K.H., Holbrook, D.J., Chaney, S.G., 1988. Inhibition of nucleic acid synthesis in P-388 lymphocytic leukemia tumor cells by helenalin and bis(helenalinyl)malonate in vivo. *J. Pharm. Sci.* 77, 178–184.
342. Withers S.T., Keasling J.D., 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 980–990.
343. Wojdyła, A., Oszmiański, J., Czemyers, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949.
344. Wu, R., Ye, Q., Chen, N., Zhang, G., 2000. Chemical constituents of *Origanum vulgare* L. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 12, 13-16. CA 135:2915.
345. Yadav, S.B., Vyasji, T., 2000. Flavonoids from *Origanum majorana*. *Indian Drugs* 37, 508-508. CA 135:105009.
346. Yahara, S., Sakamoto, C., Nohara, T., Niiho, Y., Nakajima, Y., Ito, H., 1993. Thymoquinol glucosides from *Schisandrae fructus*. *Shoykugaku Zasshi* 47, 420–422. CA 121:65387.
347. Yayli, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolaylı, S., Coşkunçelebi, K., Karaoğlu, S., 2005. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry* 66, 1741-1745.
348. Yesilada, E., Gürbüza, I., Bedirb, E., Tatlic, I., Khanb, I.A., 2004. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. solstitialis through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *J. Ethnopharmacol.* 95, 213–219.
349. Yoshioka, H., Mabry, T.J., 1971. The geminal coupling and paramagnetic shift of exomethylen protons in the α, β -unsaturated γ -lactone group of sesquiterpene lactones containing C₈- α -hydroxyl groups. *Tetrahedron* 27, 3317–3322.
350. Youssef, D., Frahm A.W., 1995. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; III. Phenolic constituents of the aerial parts. *Planta Med.* 61, 570–573.
351. Youssef, D., Frahm, W., 1994a. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; Chlorinated guaianolides of the aerial parts. *Planta Med.* 60, 267–271.
352. Youssef, D., Frahm, W., 1994b. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; II. Guaianolides of the aerial parts. *Planta Med.* 60, 572–575.

353. Youssef, A.T.D., 1998. Sesquiterpene lactones of *Centaurea scoparia*. *Phytochemistry* 49, 1733–1737.
354. Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M., Palazon, J., 2010. Podophyllotoxin: Current approaches to its biotechnological production and future challenges. *Eng. Life Sci.* 10, 281-292.
355. Yu Pan, J., Zhang, S., Wu, J., Xin Li, Q., Hui Xiao, Z., 2010. Litseaglutinan A and lignans from *Litsea glutinosa*. *Helv. Chim. Acta.* 93, 951–957.
356. Yayli, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolayli, S., Coşkunçelebi, K., Karaoğlu, S., 2005. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry* 66, 1741–1745.
357. Zaghloul, A.M., Salama, O.M. Halim, A.F., Mansoura, 1990. Chemical investigation of *Centaurea glomerata* Vahl. *J. Pharm. Sci.* 6, 61-68.
358. Zakirov, Kh.S., Kasymov, Z.Sh., Sidyakin, P.G., 1982. Sesquiterpene lactones of *Jurinea suffruticosa*. *Khim. Prirod. Soed.* 3, 399.
359. Zdero, C., Bohlmann, F., 1989. Sesquiterpene lactones from *Oldenburgia arbuscula* and *Pleiotaxis rugosa*. *Phytochemistry* 28, 3345–3346.
360. Zgórká, G., Lutostanska, E., Główniak, K., 1997. Seasonal variations of phenolic acids in *Origanum vulgare* leaves. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 7, 187–190.
361. Zgórká, G, Główniak, K., 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 79-87.
362. Zheng, S., Wang, X., Gao, L., Shen, X., Liu, Z., 1997. Studies on the flavonoid compounds of *Origanum vulgare* L. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* 36 B, 104-106. CA 127: 92675.
363. Zheng, X.K., Li, K.K., Wang, Y.Z., 2008. *Chin. Chem. Lett.* 19, 19.
364. Zheng, J.C., Yoo, S.J., Lee, G.T., Cho, Y.H., Kim, H.Y., Kim, G.W., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 579, 5157–5162.

БИОГРАФИЈА

Тања С. Милошевић-Ифантис рођена је 25.07.1979. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву техничку школу завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер истраживање и развој, уписала се школске 1998/99. године, где је и дипломирала, децембра 2004. године, са просечном оценом 9,10. На последипломске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу (смер Биохемија) уписала се 2004. године, а магистарску тезу под насловом „**Антимикробна активност екстракта биљке *Hypericum perforatum L.***” одбранила је 2007. године, под менторством професорке др Славице Солујић.

Након дипломирања 2005. године ангажована је као истраживач приправник, а од 2009. године као истраживач сарадник на пројектима које финансира Министарство просвете и науке Републике Србије. [пројекти бр. 1740 (2005. године), 142025 (2006. – 2010. године) и III 43004 (2011. године)]. Од тог периода бави се научно – истраживачким радом из области статичке и динамичке биохемије биљака и микроорганизама и хемије природних производа. У току ангажовања на пројектима успешно је водила експерименталну наставу на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на предметима Биохемија и Хемија природних производа као и на предмету Биофармација, Фармацеутског факултета у Крагујевцу.

У току докторских студија, октобра 2008. године, као стипендиста грчке државне фондације ИКУ, боравила је годину дана на Фармацеутском факултету, Универзитета у Атени, када је започела експериментални део докторске дисертације у лабораторији професорке др Хелен Скалтса. Од 2011. године живи у Грчкој и ради у својству истраживача сарадника на пројекту Грчко-турске билатералне сарадње на Фармацеутском факултету, Универзитета у Атени.

ПРИЛОГ

СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА

Резултати истраживања, приказани у оквиру ове докторске дисертације, објављени су као следећи радови у наведеним међународним часописима:

- 1. T. Milošević, C. Argyropoulou, S. Solujić, D. Muratspahić, H. Skaltsa**
Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*
Nat. Prod. Commun. 5 (2010) 1663-1668.
- 2. T. Milošević Ifantis, S. Solujić, H. Skaltsa**
Secondary metabolites from the aerial parts of *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.
Biochem. Syst. Ecol. 44 (2012) 289-294.
- 3. T. Milošević Ifantis, S. Solujić., D. Pavlović-Muratspahić, H. Skaltsa**
Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance
Phytochemistry (2013) DOI:10.1016/j.phytochem.2013.05.014

Natural Product Communications 2010

Volume 5, Number 10, Pages 1663-1668

Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*

Tanja Milošević, Catherine Argyropoulou, Slavica Solujić,
Dragana Murat-Spahić and Helen Skaltsa

Abstract - The chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils obtained by hydrodistillation from *Centaurea pannonica* (Heufel) Simonkai and *C. jacea* L. (Asteraceae), were investigated. The essential oils were analyzed by GC and GC-MS. Forty five and twenty nine compounds were identified in the two oils, respectively. *C. pannonica* oil was rich in fatty acids (43.7%), with 9-octadecanoic acid (34.0%) and (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid (8.6%) as the major compounds. In contrast, the essential oil of *C. jacea* was dominated by oxygenated sesquiterpenes (43.2%), among which caryophyllene oxide (23.5%) and spathulenol (8.9%) were the major constituents. However, the oil was also characterized by an important fatty acid fraction (15.5%), with 9-octadecanoic acid (8.9%) and hexadecanoic acid (6.6%) being the main components. The antimicrobial activities of the essential oils were evaluated by the microdilution method against three Gram-positive and three Gram-negative bacteria, and one yeast. Both oils exhibited significant antimicrobial activity, especially against Gram-positive bacteria.

Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*

Tanja Milošević^{a,b}, Catherine Argyropoulou^a, Slavica Solujić^b, Dragana Murat-Spahljé^c and Helen Skaltsa^{a*}

^a Department of Pharmacognosy & Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 157 01, Athens, Greece

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Department of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

skaltsa@pharm.uoa.gr

Received: July 9th, 2010; Accepted: July 30th, 2010

The chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils obtained by hydrodistillation from *Centaurea pannonica* (Heufel) Simonkai and *C. jacea* L. (Asteraceae), were investigated. The essential oils were analyzed by GC and GC-MS. Forty five and twenty nine compounds were identified in the two oils, respectively. *C. pannonica* oil was rich in fatty acids (43.7%), with 9-octadecanoic acid (34.0%) and (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid (8.6%) as the major compounds. In contrast, the essential oil of *C. jacea* was dominated by oxygenated sesquiterpenes (43.2%), among which caryophyllene oxide (23.5%) and spathulenol (8.9%) were the major constituents. However, the oil was also characterized by an important fatty acid fraction (15.5%), with 9-octadecanoic acid (8.9%) and hexadecanoic acid (6.6%) being the main components. The antimicrobial activities of the essential oils were evaluated by the microdilution method against three Gram-positive and three Gram-negative bacteria, and one yeast. Both oils exhibited significant antimicrobial activity, especially against Gram-positive bacteria.

Keywords: *Centaurea pannonica* (Heufel) Simonkai, *Centaurea jacea* L., essential oil, fatty acids, sesquiterpenes, antimicrobial activity

The genus *Centaurea* L. is represented by approximately 40 species in Serbia, distributed across all parts of the country [1]. Some members of this genus, such as *C. cyanus* L., *C. benedictus* L., *C. calcitrapa* L. and *C. scabiosa* L. are used in folk medicine as diuretic, emmenagogue, cholagogue, astringent and antiseptic agents, and in the treatment of fever and tumors [2,3]. The taxonomy of the genus is still complex. The taxonomic scheme currently preferred is the segregation of the genus into several sections, mostly based on morphological characters. Both taxa investigated here belong to the morphologically complicated section *Jacea* (Cass.) DC [4].

C. pannonica (Heufel) Simonkai is an erect perennial plant with pink flower heads on branched stems, 30-80 cm in height, widely distributed on dry land. It is traditionally used for stomach diseases [3,5]. *C. jacea*,

known under the common name brown knapweed, is distributed across Europe. It is a perennial herb, very variable in height, with large terminal pink flowers, flowering from June to September. It is used in Serbian folk medicine as a diuretic, antidiabetic and febrifuge [5,6]. Concerning the secondary metabolites of *Centaurea* sp., sesquiterpene lactones are predominant and are of taxonomic significance [7-12]. In addition, flavonoids, lignans, steroids, hydrocarbons, polyacetylenes and alkaloids have also been isolated from this genus [13-17]. Previous phytochemical investigations on the volatile compounds have focused on the relationship between chemical composition and taxonomy [18-21]. Some essential oils obtained from *Centaurea* sp. were found to possess antifungal and antibacterial activities [22,23]. To the best of our knowledge, there is no previous report on the volatile constituents of *Centaurea* taxa belonging to the section *Jacea* (Cass.) DC. Therefore, to fulfill this gap, we

Table 1. Chemical composition (relative % peak area) of the essential oils of *C. pannonica* and *C. jacea*

*RI, retention indices calculated against C9-C24 n-alkanes on HP-5MS (1) and HP-1mowax (2) capillary columns, respectively.

Compound	RI,*	RI,*	Centaurea	
			pannonica (%)	jacea (%)
(E)-2-Hexenal	851	1210	0.2	0.5
2-Pentyl-furan	990	1231	0.5	1.1
n-Octanal	996	1289	0.1	-
(E,E)-2,4-Heptadienal	1010	1443	0.3	-
Benzyl alcohol	1033	-	1.1	4.2
n-Nonanal	1102	1392	3.2	1.6
(E)-2-Nonenal	1163	1328	0.2	-
2-Hydroxy-benzoic acid	1179	1390	-	0.8
n-Decanal	1199	1500	1.3	0.9
(E)-2-Decenal	1265	1639	0.4	-
Dihydroedulan II	1288	1485	0.4	1.2
Dihydroedulan I	1291	1512	0.2	-
Thesaplinone A	1296	-	0.3	-
Thesaplinone B	1312	-	0.3	-
(E,E)-2,4-Decadienal	1310	1812	0.5	-
E- β -Damascenone	1378	1765	0.4	7.3
β -Elemene	1391	1572	0.4	-
β -Caryophyllene	1417	1580	1.2	-
Waldene	1448	1598	0.3	-
α -Humulene	1455	1660	0.3	-
Geranyl acetone	1458	1863	0.7	1.3
Germacrene D	1482	1701	1.0	-
β -Ionone	1486	1950	0.6	1.3
β -Selinene	1492	1717	0.3	-
Tridecanal	1507	1817	0.3	-
2,4-Bis-(1,1-dimethyl-ethyl)-phenol	1512	-	-	1.1
1,3,3-Trimethyl-2-cyclohexanone	1560	-	-	3.1
1,3-Epoxyheptal-4-(14)-ene	1562	1924	-	2.5
Spathulenol	1580	2120	6.0	8.9
Caryophyllene oxide	1585	1987	8.0	23.5
Sesviol-4-(14)-en-1-one	1595	2010	0.7	2.3
Nor-copaenone	1610	2156	0.5	1.7
Vulgarol B	1615	2345	0.6	-
1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	1626	-	1.3	2.5
Fanoneol	1635	-	0.8	-
β -Eudesmol	1652	2238	1.6	1.8
Heptadecane	1700	1700	0.2	-
Valerolol	1715	-	-	0.7
Dodecane	1800	1800	0.2	-
1,15-Pentadecanediol	1812	-	0.2	-
Hexadecanal	1815	2108	0.3	0.7
6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	1842	2131	0.9	1.9
Hexadecanol	1872	2384	0.9	-
Ethyl linolate	1894	-	0.2	-
(E,E)-Farnesyl acetone	1920	2386	-	1.3
Hexadecanoic acid	1965	2911	0.7	6.6
Manoyl oxide	1987	-	-	0.7
n-Eicosane	2000	2000	-	0.7
11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	2054	-	0.2	-
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	2130	3150	8.6	-
9-Octadecenoic acid	2140	3154	34.0	8.9
Tricosane	2300	2300	-	0.6
Pentacosane	2500	2500	1.0	-
Heptacosane	2700	2700	0.6	0.1
Total			82.2	89.8
$[\alpha]_D^{20}$	-0.88 (hep, c 2.56)	-0.41 (hep, c 1.70)		

report here the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils obtained from the aerial parts of *C. pannonica* and *C. jacea* L., both growing wild in Serbia.

Table 2. The chemical classes of compounds isolated from *C. pannonica* and *C. jacea* essential oils

Compound class	<i>C. pannonica</i>		<i>C. jacea</i>	
	%	No. of compounds	%	No. of compounds
<i>Alkanes</i>				
Alkanes, alkenes	2.2	4	1.4	3
<i>Alcohols</i>				
Alcohols	2.2	3	4.2	1
<i>Aldehydes</i>				
Aldehydes	6.8	10	3.7	4
<i>Ketones</i>				
Ketones	0.9	1	6.3	3
<i>Fatty acids and aliphatic esters</i>				
Fatty acids and aliphatic esters	43.7	5	15.5	2
<i>Terpenoids</i>				
Sesquiterpene hydrocarbons	3.5	6	-	-
Oxygenated sesquiterpenes	18.7	7	43.2	7
Diterpenes	-	-	0.7	1
<i>Phenylpropanoids</i>				
Phenylpropanoids	-	-	1.1	1
<i>Miscellaneous</i>				
Miscellaneous	1.3	2	2.6	3
<i>Compounds with 13 carbons</i>				
Compounds with 13 carbons	2.9	7	11.1	4
Total	82.2	45	89.8	25

Hydrodistillation of the aerial parts of *C. pannonica* and *C. jacea* yielded ca. 0.043% and 0.025% (v/w), respectively, of colorless essential oils with pleasant odors. The identified compounds are listed in Table 1, according to their retention index on the HP-5MS column. Forty-five compounds were identified representing 82.2% of the total essential oil from *C. pannonica*. Unsaturated and aliphatic acids (43.7%) were the major group (Table 2). Among them, 9-octadecanoic acid (34.0%) and (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid (8.6%) were the main components. Oxygenated sesquiterpenes constituted 18.7% of the total oil, with caryophyllene oxide (8.0%) and spathulenol (6.0%) as the major compounds. Aldehydes represented also a large portion of this oil (6.8%) with n-nonanal being the major constituent (3.2%). Twenty-nine constituents were identified representing 89.8% of the total oil of *C. jacea*. The oil was characterized by a high content of oxygenated sesquiterpenes (43.2%), and fatty acids (15.5%). Among the oxygenated sesquiterpenes, caryophyllene oxide (23.5%) and spathulenol (8.9%) were the main constituents. Furthermore, 9-octadecanoic acid (8.9%) and hexadecanoic acid (6.6%) were determined as the major compounds of the fatty acid portion. These compounds are rather more typical constituents of epicuticular waxes than of essential oils [24]. Also, E- β -damascenone formed 7.3% of the oil of *C. jacea*. Both essential oils were characterized by the absence of monoterpenes and were also deficient in odoriferous phenylpropanoids.

The high content of oxygenated sesquiterpenes and fatty acids are characteristic of *Centaurea* species. Hexadecanoic and dodecanoid acids were the main compounds of *Centaurea* species from Turkey and Bulgaria [25-27], whereas the main components from Greek *Centaurea* essential oils were caryophyllene oxide and spathulenol, as well as hexadecanoic acid

Microorganism	Essential oil of <i>C. pannonica</i>		Essential oil of <i>C. jacea</i>		Standard	
	MIC ^a	MBC ^b	MIC ^a	MBC ^b	MIC ^{c,d}	MBC ^{c,d}
Bacteria						
Gram-positive						
<i>E. faecalis</i>	0.63	0.63	2.50	5.00	0.31	0.31
<i>M. lysodeikticus</i>	2.50	5.00	2.50	5.00	0.62	1.25
<i>S. aureus</i>	0.31	0.63	0.08	0.16	0.62	1.25
Gram-negative						
<i>E. coli</i>	>5.00	>5.00	>5.00	>5.00	0.31	0.62
<i>K. pneumoniae</i>	1.25	1.25	1.25	2.50	0.31	0.31
<i>P. aeruginosa</i>	>5.00	>5.00	>5.00	>5.00	>2.50	>2.50
Yeast						
<i>C. albicans</i>	2.50	5.00	2.50	2.50	0.31	0.31

Table 3. Antimicrobial activity of the essential oils of *C. pannonica* and *C. jacea* aerial parts.

^aValues given as $\mu\text{L/mL}$; ^bThe standard drugs used were tetracycline, for bacteria and nystatin for *C. albicans*; ^cin $\mu\text{g/mL}$.

[20,28]. However, this is the first time that unsaturated fatty acids have been identified as main components in *Centaurea* sp. essential oils. In previous reports, they were found only in significantly lower amounts [20,27]. Another significant characteristic of both oils was the presence of C-13 compounds (2.9% and 11.1% respectively) in appreciable amounts. It is the first time that *E-ft*-damascenone has been identified in such a high percentage in the genus *Centaurea*. In previous reports this compound ranged up to 2.1% [26-28].

The results of the antimicrobial assay showed that both oils exhibited significant activity against the tested strains (Table 3). Gram-positive bacteria were more sensitive than Gram-negative bacteria and yeast. This finding agrees with previous reports [22]. The oils of *C. pannonica* and *C. jacea* were found to have strong bactericidal effects against methicillin-resistant *S. aureus* (MBC of 0.63 and 0.16 $\mu\text{L/mL}$ respectively), moderate activity against *E. faecalis*, *M. lysodeikticus*, *K. pneumoniae* and *C. albicans* (MBC 0.63-5.00 $\mu\text{L/mL}$ respectively) and no inhibition against *E. coli* and *P. aeruginosa* MIC, MBC >5.00 $\mu\text{L/mL}$. The inhibitory effect may be attributed to their main compounds, such as 9-octadecanoic acid and (Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid, caryophyllene oxide, and spathulenol, since, according to the literature, these components were found to be effective against several bacteria and fungal pathogens [29,30]. The presence of long chain aldehydes, alcohols, and ketones should also be taken into consideration. It is also possible that the minor components may be involved in some type of synergism with the other active compounds [31,32].

As a conclusion, section *Jacea* differs from the previously studied sections, especially with regard to its high content of unsaturated fatty acids. Also, the level of C-13 compounds is of interest. More species belonging to section *Jacea* should be studied, since their chemical profile could be used as a chemotaxonomic

marker. Moreover, the obtained results support the idea that *Centaurea* essential oils could be promising sources of antimicrobial agents.

Experimental

Plant material: Aerial parts of *C. pannonica* (Heuffl) Simonkai and *C. jacea* L. were collected during the flowering period (September, 2008) in Divostin (Šumarice, Kragujevac district, Central Serbia), at ca. 200-250 m altitude. Voucher specimens of the plants were deposited to the Herbarium of the Department of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade: no. 16387 (*C. pannonica*) and no. 16388 (*C. jacea*).

Essential oil extraction: Air-dried plant material (70 g) from each taxon was cut into small pieces, and the essential oils were obtained by hydrodistillation in 500 mL H₂O for 2 h in a modified Clevenger apparatus [33]. The oils, taken up in 2 mL of capillary GC grade *n*-heptane and dried over anhydrous sodium sulfate, were stored at -4°C and subsequently analyzed by GC and GC-MS. The yield was defined as the volume of essential oil obtained relative to the weight of dry aerial parts.

Gas chromatography: Analysis was carried out on a Perkin Elmer 8500 gas chromatograph with FID, fitted with a Supelcowax-10 fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm I.D.; film thickness: 0.25 μm). The column temperature was programmed from 75° to 250°C at a rate of 2.5°C/min. The injector and detector temperatures were programmed at 230° and 300°C, respectively. Injection volume for all the samples was 2 μL of pure oil.

Gas chromatography-mass spectrometry: The composition of the volatile constituents was established by GC-MS analyses, which were performed on a Hewlett-Packard 5973-6890 system operating in EI mode (70 eV) equipped with a split/splitless injector

(220°C), a split ratio of 1/10, using a non polar fused silica HP-5 MS capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.), film thickness: 0.25 µm) and a polar HP-Innowax capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness: 0.50 µm). The temperature program for the HP-5 MS column was from 60°C (5 min) to 280°C at a rate of 4°C/min and for the HP-Innowax column from 60°C to 260°C at a rate of 3°C/min. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. Injection volumes of each sample were 2 µL.

Identification of compounds: Retention indices for all compounds were determined according to the Van den Dool approach [34], using *n*-alkanes (C9-C24) as standards. Identification of the components was based on comparison of their MS with those of the Wiley Library [35] and those described in the literature [36,37].

Optical rotation: The $[\alpha]_D^{20}$ values were determined at 20°C at 589 nm in *n*-heptane on a Perkin-Elmer 341 Polarimeter.

Antimicrobial assay: The antimicrobial activity of the essential oils was evaluated against the following Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 25922), two clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* (FSB 26), and *Pseudomonas aeruginosa* (FSB 37), as well as against the following Gram-positive bacteria: *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and the yeast *Candida albicans* (ATCC 10259). All microbial strains were obtained from the Faculty of Biochemistry and Chemistry, University of Belgrade and Institute for Health Protection of Kragujevac, Serbia.

References

- [1] Flora Serbia (1975) Serbian Academy of Science and Arts, Belgrade, 229-233.
- [2] Janačković P, Tešević V, Marin PD, Milosavljević S, Dulerić-Laušević S, Janačković S, Veljić M. (2008) Brine shrimp lethality bioassay of selected *Centaurea* L. species (Asteraceae). *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 60, 681-685.
- [3] Johnson T. (2003) *Herbage Ethnobotany database CD-ROM, Second Edition* Holisticopia, Santa Cruz, CA.
- [4] Garcia-Jacas N, Uysal T, Romashchenko KU, Suarez-Santiago NV, Ertugrul K, Susanna A. (2006) *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. *Annals of Botany*, 98, 741-753.
- [5] Flora Europea (1976) Cambridge University Press, Cambridge, 4, 290-291.
- [6] Sarić M. (1989) *Medical Plants of SR Serbia*, Belgrade.
- [7] Nowak G, Drozd B, Georgiadis T. (1984) Sesquiterpene lactones. XXIX. Chicin in species of the subgenus *Acolophus* (Cass) Dobrocz. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53, 199-205.
- [8] Bruno M, Rosselli S, Maggio A, Raccuglia RA, Arnold NA. (2005) Guaianolides from *Centaurea habylonica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 817-825.
- [9] (a) Bruno M, Diaz JC, Herz W. (1991) Guaianolides and lignans from *Centaurea solstitialis* subsp. *schouwii*. *Phytochemistry*, 30, 4165-4166; (b) Rosselli S, Maggio AM, Raccuglia RA, Simmonds MSJ, Arnold NA, Bruno M. (2006) Guaianolides from the aerial parts of *Centaurea hololeuca*. *Natural Product Communications*, 1, 281-285; (c) Shueb M, Celik S, Nahar L, MacManus SM, Kong-Thu-in P, Jaspars M, Sarker SD. (2007) Two selanitenolide derivatives from the aerial parts of *Centaurea gigantea* inhibit the growth of colorectal cancer cells *in vitro*. *Natural Product Communications*, 2, 121-125.

The bacterial strains were cultured on nutrient agar for 24 h at 37°C, while *Candida albicans* (ATCC 10259) was cultured on Sabouraud dextrose agar at 28°C for 48 h. The minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by the microdilution method [38] with slight modification [39]. The essential oils were diluted in Müller-Hinton broth supplemented with Tween-80 (1:10). A series of two-fold dilutions of the oils, ranging from 5.00-0.08 µL/mL, was tested in a microtiter plate (96 wells) with the addition of 0.01 mL bacterial spore suspension (6.5×10^5 CFU/mL) and yeast spore suspension (3×10^8 CFU/mL). Tetracyclin and nystatin (10.00-0.08 µg/mL), were used as positive controls. Resazurin sodium salt (0.5%, w/v) (Alfa Aesar) was used as indicator, in order to estimate visually any change in color from violet to pink indicating reduction of the dye due to bacterial growth. The MIC values were determined as the lowest concentration of the oils inhibiting the visible growth of each micro-organism. To determine MBC, broth was taken from each well and inoculated in Müller-Hinton broth for 24 h at 37°C for bacteria or in Sabouraud dextrose agar for 48 h at 28°C for the yeast. The MBC was defined as the lowest concentration (where violet color was visible) of the essential oil at which the inoculated microorganism was completely killed. The experiments were performed in duplicate.

Acknowledgments – Tanja Milošević warmly thanks the Greek Foundation of Scholarships (IKY) for financial support of her PhD program, the results of which form part of the present paper. This study was also supported by the Ministry of Science, Republic of Serbia (project No. 142025).

- [10] Bruno M, Fazio C, Passananti S, Paternostro MP, Diaz JC, Herz W. (1994) Sesquiterpene lactones from *Centaurea sphaerocephala* ssp. *sphaerocephala*. *Phytochemistry*, **35**, 1371-1372.
- [11] Tešević V, Milosavljević S, Vajs V, Janačković P, Dorđević I, Jadranin M, Vučković I. (2007) Quantitative analysis of sesquiterpene lactone enicin in seven *Centaurea* species wild-growing in Serbia and Montenegro using ¹³C-NMR spectroscopy. *Journal of Serbian Chemical Society*, **72**, 1275-1280.
- [12] Lopez-Rodriguez M, Garcia VP, Zater S, Benayache S, Benazache F. (2009) Cynaraltrial, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Crystallographica*, **E65**, 01867-01868.
- [13] Cardona ML, Fernandez I, Pedro JR, Perez B. (1991) Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*, **30**, 2331-2333.
- [14] Flamini G, Bulleri C, Morelli L. (2002) Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 1051-1054.
- [15] Tešević V, Milosavljević S, Vajs V, Janačković P, Popsavin M. (2003) Dithiophenes and other constituents of roots of *Centaurea nicotai*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 89-90.
- [16] Dumlu MU, Gurkan E. (2006) A new active compound from *Centaurea* species. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A Journal of Biosciences*, **61**, 44-46.
- [17] Djeddi S, Argyropoulou C, Skaltsa H. (2008) Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 336-339.
- [18] Dural H, Bağcı Y, Ertugrul K, Demirelma H, Flamini G, Cioni LP, Morelli L. (2003) Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea micranthera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 1417-1425.
- [19] Flamini G, Ertugrul K, Cioni PL, Morelli L, Dural H, Bağcı Y. (2002) Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudocahiza* subsp. *pseudocahiza* and *C. halimensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 953-959.
- [20] Lazari MD, Skaltsa HD, Constantinidis T. (1999) Volatile constituents of *Centaurea raphanosa* subsp. *mixta* (DC.) Runemark and *C. spruneri* Boiss. & Heldr. (Asteraceae), growing wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 415-418.
- [21] (a) Senatore F, Rigano D, De Fusco R, Bruno M. (2003) Volatile component of *Centaurea cineraria* L., subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (Asteraceae), two species growing wild in Sicily. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**, 248-251; (b) Formisano C, Rigano D, Senatore F, Bruno M, Rosselli S, Ramondo FM, Spadaro V. (2008) Chemical composition of the essential oils of *Centaurea sicana* and *C. giardiniae* growing wild in Sicily. *Natural Product Communications*, **3**, 919-922; (c) Formisano C, Senatore F, Bancheva S, Bruno M, Maggio A, Rosselli S. (2010) Volatile components of aerial parts of *Centaurea nigrescens* and *C. stenolepis* growing wild in the Balkans. *Natural Product Communications*, **5**, 273-278.
- [22] Yaylı N, Yaşar A, Güleç C, Usta A, Kolaylı S, Coşkunçelebi K, Karaoğlu S. (2005) Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, **66**, 1741-1745.
- [23] Yaylı N, Yaşar A, Yaylı N, Albay C, Asamaz Y, Coşkunçelebi K, Karaoğlu S. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendiculata* and *Centaurea helenioides*. *Pharmaceutical Biology*, **47**, 7-12.
- [24] Engel R, Gulz PG, Herrmann T, Nahrstedt A. (1993) Glandular trichomes and the volatiles obtained by steam distillation of *Quercus robur* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A Journal of Biosciences*, **48**, 736-744.
- [25] Altıntaş A, Kose YB, Kademir A, Demirci B, Baser KH. (2009) Composition of essential oil of *Centaurea subigna*. *Chemistry of Natural Compounds*, **45**, 276-277.
- [26] Karamenderes C, Demirci B, Baser KH. (2008) Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, **20**, 342-349.
- [27] Rosselli S, Bruno M, Maggio A, Raccuglia AR, Bancheva S, Senatore F, Formisano C. (2009) Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochemical Systematics and Ecology*, **37**, 426-431.
- [28] Lazari MD, Skaltsa HD, Constantinidis T. (2000) Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakentis* (Frey & Sint.) Georg. and *C. zaccariniana* DC. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **15**, 7-11.
- [29] Zheng JC, Yoo SJ, Lee GT, Cho YH, Kim IY, Kim GW. (2005) Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, **579**, 5157-5162.
- [30] Bougatsos C, Ngassapa O, Runyoro KBD, Ioanna BC. (2004) Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A Journal of Biosciences*, **59**, 368-372.
- [31] Marino M, Bersani C, Comi G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, **67**, 187-195.
- [32] Lanciotti R, Beilotti N, Patrignani F, Gianotti A, Gardini F, Guerzoni EM. (2003) Application of hexanal, (*E*)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 2958-2963.
- [33] Hellenic Pharmacopeia. (2002). 5th ed. EOF, Athens. Chapter 2.8.12.
- [34] Van Den Dool H, Kratz PD. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**, 463-467.

- [35] Massada Y. (1976) *Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry*. John Wiley & Sons, New York.
- [36] Davies NW. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *Journal of Chromatography A*, **503**, 1-24.
- [37] Adams RP. (2007) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th ed.) Carol Stream, IL: Allured Publishing Co., Illinois.
- [38] NCCLS (1999) *Performance standard for antimicrobial activity susceptibility test ninth international supplement*. Document M100-S, Wayne, PA.
- [39] Mothana AR, Al-Rehaily JA, Schülze W. (2010) Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two endemic saqatri *Commiphora* species. *Molecules*, **15**, 689-698.



Secondary metabolites from the aerial parts of *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.

Tanja Milošević Ifantis^{a,b}, Slavica Solujić^b, Helen Skaltsa^{a,*}

^a Department of Pharmacognosy & Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 157 71 Athens, Greece

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2012

Accepted 3 June 2012

Available online 4 July 2012

Keywords:

Origanum scabrum Boiss. & Heldr.

Lamiaceae

Phenolic acid

Neolignan

Chemotaxonomy

1. Subject and source

The genus *Origanum* (Lamiaceae) comprises approximately 40 species (Ietswaart, 1980). Most of them have a very local distribution around the Mediterranean. In particular, nine are restricted to Greece, South Balkans and Asia Minor (six are local Greek endemics) (Kokkini, 1996). Systematics and taxonomy of the genus are difficult due to hybridization between species and large variation of almost all morphological characters within the genus (Skoula and Harborne, 2002).

Origanum scabrum Boiss. & Heldr. is an endemic species distributed at the mountains of South Greece. It is rhizomatous perennial herb with the erect, light or dark brown stems up to 45 cm long. The leaves are sessile, heart-shaped or roundish up to 12 pairs per stem while bracts are conspicuous, ovate to ovate-elliptica. Corolla is pink and it flowers from June to September (Ietswaart, 1980; Fernandes and Heywood, 1972). The aerial parts of *O. scabrum* Boiss. & Heldr. were collected from mountain Dirphys (island of Evia) during flowering period in June 2007. A voucher of the species from the same locality, on which our collection was based, is kept in the University of Patras Herbarium (Phitos 3938, UPA).

The plants are well known as medicinal and culinary herbs (Dorman and Deans, 2000; Burt, 2004; Milos et al., 2000) and also as garden plants. Among them *Origanum vulgare* L. plays a primary role among culinary herbs in world trade (Prieto et al., 2007). As far as we know, there are no data about uses of *O. scabrum*.

* Corresponding author. Tel./fax: +30 2107274593.

E-mail address: skaltsa@pharm.uoa.gr (H. Skaltsa).

Table 1
Secondary metabolites isolated from *Origanum* spp.^a

Species	Origin of species	Compound	References
<i>O. compactum</i> Benth.	Morocco	β -Amyrin, betulin, betulinic acid, 21- α -hydroxy oleanolic acid, 21- α -hydroxy ursolic acid, aromadendrin, thymohydroquinone	Bellakhdar et al., 1988
<i>O. dictamnus</i> L.	Greece	Apigenin, eriodictyol, quercetin, luteolin	Harvala and Skaltsa, 1986
	Greece	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside, eriodictyol-7- <i>O</i> -glucoside, luteolin-7- <i>O</i> -glucoside, vitexin, isovitexin, isoorientin, orientin	Skaltsa and Harvala, 1987
	Greece	Salvianolic acid P, rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ester, thymoquinone, thymoquinol-2- <i>O</i> - β -glucopyranoside, oresbuisin A, <i>E</i> -caffeic acid, apigenin, kaempferol, quercetin, eriodictyol, taxifolin, naringenin, 12-hydroxyjasmonic acid, 12-hydroxyjasmonic acid	Chatzopoulou et al., 2010
<i>O. dubium</i> Boiss.	Greece	Apigenin-4'-methylether, kaempferol-3, 6,7-trimethylether, quercetin-3, 6-dimethylether, quercetin-3,6, 7-trimethylether	Souleles, 1990
<i>O. intercedens</i> Rech.	Crete Greece	Caffeic acid, rosmarinic acid, carvacrol	Pizzale et al., 2002
<i>O. × intercedens</i> Rech. (= <i>O. onites</i> × <i>vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>)	Greece Technological Educational Institution Thessaloniki	Thymosin, 5,6,4'-trihydroxy-7, 3'-dimethoxyflavone, thymonin, cirsimaritin, genkwain	Bosabalidis et al., 1998
<i>O. majorana</i> L.	Egypt	Arbutin, methylarbutin, hydroquinone, hydroquinone-monomethyl ether	Assaf et al., 1987
	–	Apigenin, kaempferol, luteolin	Yadav and Tripathi, 2000
	Japan, Local market	6-hydroxyapigenin, 6-hydroxyapigenin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside, 6-hydroxyluteolin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside, 6-hydroxyapigenin-7- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -feruloyl)- β - <i>D</i> -glucopyranoside, 6-hydroxyluteolin-7- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -feruloyl)- β - <i>D</i> -glucopyranoside	Kawabata et al., 2003
<i>O. majoricum</i> Camb. (= <i>O. majorana</i> × <i>vulgare</i> ssp. <i>virens</i>)	Spain	Apigenin, luteolin, naringin, rutoside, chrysoeriol	Palomino et al., 1997
<i>O. onites</i> L.	Crete Greece	Caffeic acid, rosmarinic acid, carvacrol	Pizzale et al., 2002
<i>O. syriacum</i> L.	Egypt	Thymoquinol-2- <i>O</i> - β -glucopyranoside, thymoquinol-5- <i>O</i> - β -glucopyranoside, thymoquinol-2,5- <i>O</i> - β -diglucopyranoside, carvacrol-2- <i>O</i> - β -glucopyranosyl-(1 → 2)- β -glucopyranoside, <i>p</i> -menth-1-ene-3,4-diol	Kamel et al., 2001
		4- <i>O</i> - β -glucopyranoside	
<i>O. tyttanthum</i> Gontsch.	Uzbekistan	4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosylbenzyl-3'-hydroxyl-4'-methoxybenzoate, thymol, carvacrol, thymol- β - <i>D</i> -glucoside, naringenin, eryodictiol, 4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosylbenzyl-3', 4'-dihydroxybenzoate, thymoquinol-5- <i>O</i> - β -glucopyranoside, thymoquinol-2- <i>O</i> - β -glucopyranoside, acetin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -methylglucuronate, rosmarinic acid, 4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosylbenzyl-4'-hydroxy benzoate, 4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosylbenzyl-4'-hydroxy-3'-methoxy-benzoate	Takeda et al., 2008
<i>O. vulgare</i> L.	Novosibirsk province Russia	Cosmoside, luteoline-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	Peshkova and Mirovich, 1984
	Japan Botanical garden	4-[(3,4)-dihydroxybenzoyloxy)methyl]phenyl- β -glucopyranoside	Nakatani and Kikuzaki, 1987
	Japan Botanical garden	<i>E</i> -caffeic acid, rosmarinic acid, protocatechuic acid	Kikuzaki and Nakatani, 1989
	Russia	Vanillic acid, <i>E</i> -caffeic acid, cinnamic acid, protocatechuic acid, syringic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, chloregenic acid	Mirovich et al., 1989
	–	Apigenin, luteolin	Segiet-Kujawa and Michalowska, 1990

Table 1 (continued)

Species	Origin of species	Compound	References
	–	5-hydroxy-7-methoxy-6-O-[α -l-ramnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl]flavon, 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone, 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone, isosakuranetin 7-O- β -D-neohesperidoside, 3',4',5'-trimethoxy-furanoflavone	Zheng et al., 1997
	Poland	<i>E</i> -caffeic acid, rosmarinic acid	Zgórka et al., 1997
	–	Protocatechuic acid, ursolic acid, oleanolic acid, sagitatoside A, β -sitosterol, stigmaterol, tilianin	Wu et al., 2000
	FYROM	Apigenin, diosmetin, luteolin, chrysoeriol	Kulevanova et al., 2001
	Russia	Aristolochic acid I, aristolochic acid II, D-(+)-raffinose, ursolic acid	Goun et al., 2002
	Japan Botanical garden	4'-O- β -D-glucopyranosyl-3',4'-dihydroxybenzyl protocatechuate, 4'-O- β -D-glucopyranosyl-3',4'-dihydroxybenzyl, 4-O-methylprotocatechuate	Matsuura et al., 2003
	Taiwan	Salvianolic acid A, salvianolic acid C, lithospermic acid, rosmarinic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, apigenin-7-O- β -D-glucuronide, apigenin-7-O- β -D-(6'-methyl) glucuronide, luteolin, luteolin-7-O- β -D-glucopyranoside, luteolin-7-O- β -D-glucuronide, luteolin-7-O- β -D-xylopyranoside, 4-hydroxybenzyl alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside, 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)methyl phenyl-O- β -D-glucopyranoside	Lin et al., 2003
	Lithuania Botanical garden	Rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, hyperozide, naringin + rutin, luteolin, astragalol, vitexin, isovitexin, eriodictol, quercetin, naringenin, diosmetin	Radušienė et al., 2008
	China Drug store	Rosmarinic acid methyl ester	Ding et al., 2010
	Egypt	Apigenin, luteolin, salvagenin, cirsimartin, diosmetin, desmetoxycentauridin, 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy-apigenin, apigenin-7-O-glucoside, luteolin 7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside-6''-methylester, luteolin-7-O- α -l-rhamnoside-4'- β -D-glucoside, quercetin 3-O- β -D-glucoside-4'-O- α -l-rhamnoside	Hawas et al., 2008
	India	Origanol A, origanol B, ursolic acid, oleanolic acid, β -sitosterol, triacontanol	Venkateswara Rao et al., 2011
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i> (Link) letswaart	Greece	Apigenin, luteolin, chrysoeriol, diosmetin, quercetin, eriodictyol, cosmoside, vicenin-2, caffeic acid, <i>p</i> -menth-3-ene-1,2-diol 1-O- β -glucopyranoside, thymoquinol-2-O- β -glucopyranoside, thymoquinol-5-O- β -glucopyranoside, thymoquinol-2,5-O- β -diglucopyranoside, 12-O-hydroxyjasmonic acid, 12-O-hydroxyjasmonic acid 12-O- β -glucopyranoside, lithospermic acid B, rosmarinic acid, 10- <i>epi</i> -lithospermic acid, <i>epi</i> -lithospermic acid B.	Koukoulitsa et al., 2006

^a The authorities of the species have been recorded according to letswaart (1980).

2. Previous work

The genus *Origanum* is known to contain a diversity of compounds (Table 1). Previous study of *O. scabrum* focused on volatile secondary metabolites which was found to contain carvacrol, *p*-cymene, γ -terpinene and thymol (Aligiannis et al., 2001). There are limited data about the non volatile secondary metabolites of *O. scabrum* Boiss. & Heldr. (Tomás-Barberán et al., 1988). This study deals with the isolation and structural elucidation of polar constituents from *O. scabrum*.

3. Present study

The air-dried powdered aerial parts of *O. scabrum* (0.24 kg) were successively extracted at room temperature with CH₂Cl₂ (5.7 g), MeOH (9.1 g) and MeOH:H₂O 5:1 (6.8 g) and evaporated to dryness *in vacuo*. The latter extract was chosen for further analysis based on the ¹H NMR spectra of all extracts. Fractionation was carried out by VLC over silica gel (10 × 8 cm) using as eluent mixtures of CH₂Cl₂:MeOH:H₂O of increasing polarity (97:3:0.3–0:20:80) to yield 10 fractions (A–J). According to TLC analysis on silica gel (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3) fractions E and F were selected for further research. Fraction E (eluted with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3; 0.63 g) was further applied to CC on silica gel using a step-wise gradient of CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (98:2:0.2–20:80:8) and afforded 14 fractions (EA–EN). The fraction EI (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3; 82.6 mg) was subjected to

RP-HPLC (MeOH:AcOH 5% 35:65) and allowed the isolation of compounds **7** (10.1 mg; t_R 13.6 min), **4** (9.2 mg; t_R 15.2 min), **8** (2.8 mg; t_R 26.6 min). Fraction EJ (84.3 mg eluted with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 60:40:4) also was further purified by RP-HPLC (MeOH:AcOH 5% 35:65) and yielded **6** (2.8 mg; t_R 11.3 min).

Fraction F (eluted with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 50:50:5; 1.5 g) was further applied to VLC over silica gel using CH₂Cl₂:MeOH:H₂O mixtures of increasing polarity (97:3:0.3–0:50:50) and yielded nine fractions (FA–FI). Combined fractions FD, FE and FF (FD; 0.32 g) were submitted to CC on silica gel (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 97:3:0.3–50:50:5) and yielded twelve fractions (FD'A–FD'L). Fraction FD'F (eluted with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 80:20:2; 99.1 mg) was further subjected to RP-HPLC (MeOH:AcOH 5% 35:65) and finally yielded compounds **4** (20.1 mg; t_R 9.5 min), **5** (7.2 mg; t_R 10.3 min), **2** (3.6 mg; t_R 14.7 min), **3** (2.7 mg; t_R 17.5 min). Fraction FD'I (eluted with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 70:30:3; 42.7 mg) was similarly purified by RP-HPLC (MeOH:AcOH 5% 35:65) and allowed the isolation of compounds **6** (5.5 mg; t_R 10.8 min) and **1** (28.7 mg; t_R 50.5 min).

Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out on silica gel 60H (Merck, Art. 7736). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 (Merck, Art. 9385). TLC: Merck silica gel 60 F254 (Merck, Art. 5554); detection, UV light

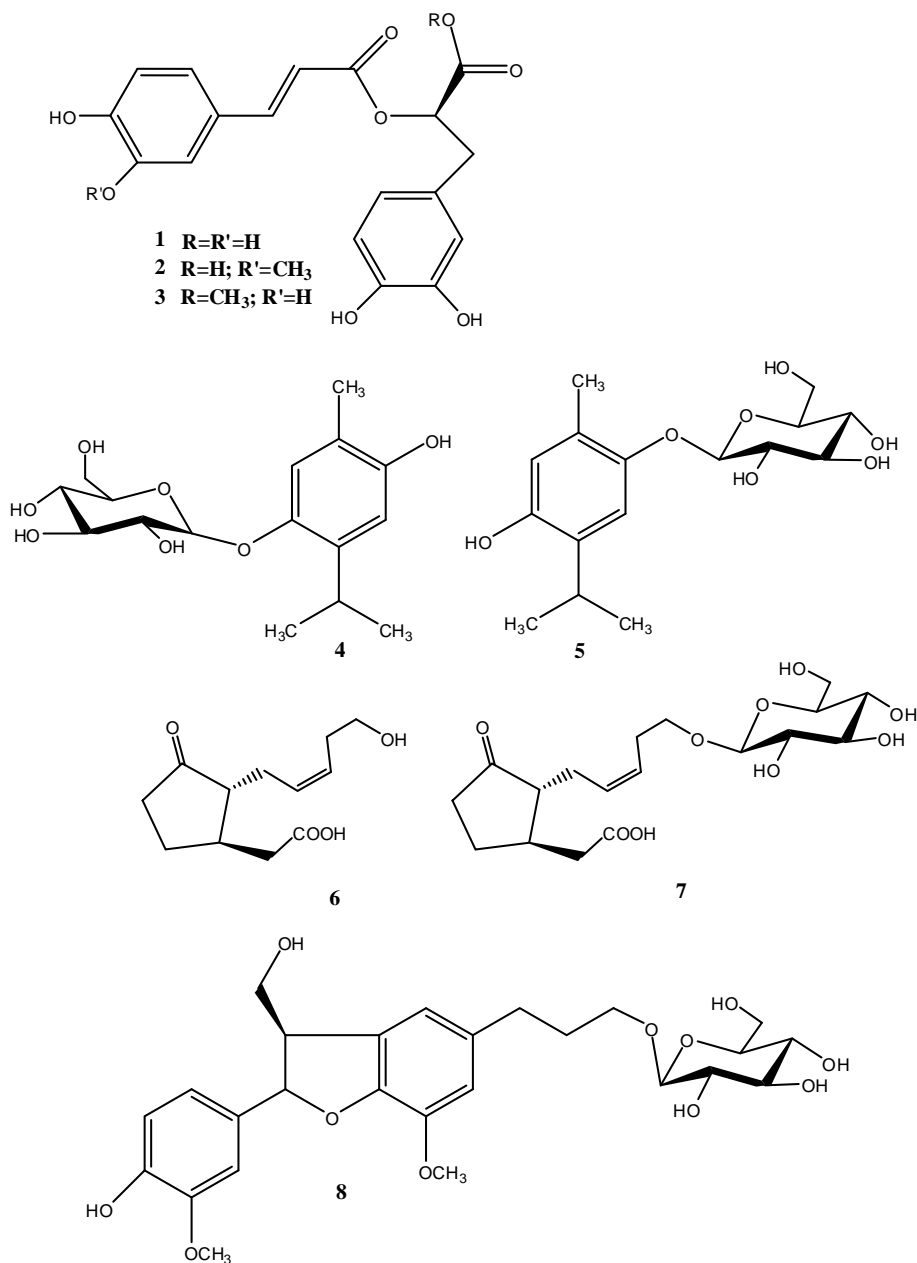


Fig. 1. Secondary metabolites isolated from *O. scabrum*.

(absorbance: λ 254 and λ 365 nm); spray reagents, vanillin-H₂SO₄ on silica gel. Semi-preparative HPLC was carried on a JASCO liquid chromatograph with pump (PU-2080 Plus), refractive index detector (RID-10A, Shimadzu), Kromasil RP-18 column (250 × 10 mm, 10 μ m) and software program Clarity.

The structure of isolated compounds (Fig. 1) was elucidated by combination of spectroscopic (UV, ¹H/¹³C NMR and 2D NMR) and literature data. They were identified as: rosmarinic acid (**1**) (Kohda et al., 1989; Sawabe et al., 2006), 3-*O*-methyl rosmarinic acid (**2**) (Baba et al., 2004), methyl ester of rosmarinic acid (**3**) (Kohda et al., 1989; Sawabe et al., 2006), thymoquinol-5-*O*- β -glucopyranoside (**4**) (Kamel et al., 2001), thymoquinol-2-*O*- β -glucopyranoside (**5**) (Kamel et al., 2001), 12-*O*-hydroxyjasmonic acid (**6**) (Fujita et al., 1996) and its 12-*O*- β -glucoside (**7**) (Fujita et al., 1996), glochidioboside (**8**) (Takeda et al., 1998; Kuang et al., 2009).

4. Chemotaxonomic significance

O. scabrum belongs to the subfamily Nepetoideae within Lamiaceae family and this is the only taxon from section Anaticon Bentham of the genus *Origanum* (Ietswaart, 1980) studied so far. The isolated compounds from *O. scabrum* (Fig. 1) were assigned as phenolic acids, namely as depsides (**1–3**), monoterpene glucosides (**4, 5**), two alicyclic derivatives (**6, 7**) and one neolignan (**8**). To the best of our knowledge, all compounds were found for the first time in *O. scabrum*. Substances **2** and **8** are reported for the first time in the genus. The major compound present in *O. scabrum* is rosmarinic acid (**1**). So far, it has been isolated from many species belonging to the Lamiaceae family and it was noted as potentially chemotaxonomic marker of the sub-family Nepetoideae (Zgorka and Głowniak, 2001; Grayer and de Kok, 1998). As shown in Table 1, rosmarinic acid and its derivatives are characteristic secondary metabolites of the genus *Origanum*, since rosmarinic acid is identified in almost any *Origanum* species studied, so far. The methyl ester of rosmarinic acid (**3**) was previously isolated from the *Origanum dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010), and *O. vulgare* (Ding et al., 2010), while 3-*O*-methyl rosmarinic acid (**2**) has never previously been reported into *Origanum* spp. From the other hand, species from the genus *Origanum* are renowned for their essential oils (Skoula et al., 1999). Although the plants are rich in mono- and sesqui-/terpenoids, monoterpene glucosides have been isolated from few species. This group of compounds including thymoquinol-5-*O*- β -glucopyranoside (**4**) and thymoquinol-2-*O*- β -glucopyranoside (**5**) have been firstly isolated from *Origanum syriacum* (Kamel et al., 2001). Later, they have been found in two Greek taxa, namely *O. dictamnus* (Chatzopoulou et al., 2010) and *O. vulgare* ssp. *hirtum* (Koukoulitsa et al., 2006), as well as in *Origanum tyttanthum* from Uzbekistan (Takeda et al., 2008). It is noteworthy that the alicyclic derivatives (**6, 7**), found only in the aforementioned Greek *Origanum* spp. (Chatzopoulou et al., 2010; Koukoulitsa et al., 2006), have not been isolated so far from any other species belonging to the sub-family Nepetoideae. Furthermore, this is the first report of the presence of the neolignan glochidioboside (**8**) in the genus *Origanum*.

On the basis of the present study and according to previous researches, it could be concluded that rosmarinic acid and its derivatives have important role in the genus *Origanum* and they could be considered as useful chemotaxonomic markers not only for *Origanum* genus, but potentially for all taxa of the Nepetoideae subfamily. In addition, the neolignan, glochidioboside, could be interesting marker for the Nepetoideae subfamily.

Acknowledgements

The authors are grateful to Ass. Prof. Theophanis Constantinidis (Department of Ecology & Systematics, Faculty of Biology, University of Athens) for the collection and identification of the plant material.

References

- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4168.
- Assaf, M.H., Ali, A.A., Makboul, M.A., Beck, J.P., Anton, R., 1987. *Planta Med.* 53, 343.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Terao, J., 2004. *Life Sci.* 75, 165.
- Bellakhdar, J., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Piozzi, F., 1988. *Planta Med.* 54, 94.
- Bosabalidis, A., Gabrieli, C., Niopas, I., 1998. *Phytochemistry* 49, 1549.
- Burt, S., 2004. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223.
- Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., Lax Vivancos, V., Panagiotis, K., Golegou, S., Skaltsa, H., 2010. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6064.
- Ding, H.Y., Chou, T.H., Liang, C.H., 2010. *Food Chem.* 123, 254.
- Dorman, H.J., Deans, S.G., 2000. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308.
- Fernandes, R., Heywood, V.H., 1972. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burgess, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europea*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, pp. 171–172.
- Fujita, T., Terato, K., Nakayama, M., 1996. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 732.
- Goun, E., Cunningham, G., Solodnikov, S., Krasnykch, O., Miles, H., 2002. *Fitoterapia* 73, 692.
- Grayer, R.J., de Kok, R.P.J., 1998. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 729.
- Harvala, C., Skaltsa, H., 1986. *Plant Med. Phytother.* 20, 300.
- Hawas, U.W., El-Desoky, S.K., Kwashty, S.A., Sharaf, M., 2008. *Nat. Prod. Res.* 22, 1540.
- Ietswaart, J.H., 1980. *A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*. Leiden University, The Hague.
- Kamel, M.S., Assaf, M.H., Hasanean, H.A., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., 2001. *Phytochemistry* 58, 1149.
- Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aoyama, Y., Kasai, T., 2003. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 445.
- Kikuzaki, H., Nakatani, N., 1989. *Agric. Biol. Chem.* 53, 519.
- Kohda, H., Takeda, O., Tanaka, S., Yamasaki, K., Yamashita, A., 1989. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1287.
- Kokkini, S., 1996. *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. 8–12 May 1996 CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.
- Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, C.M., Pescitelli, G., Di Bari, L., Skaltsa, H., 2006. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5388.

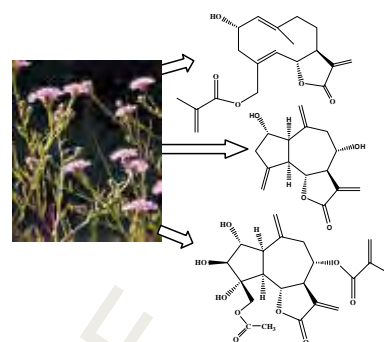
- Kuang, H., Xia, Y., Yang, B., Wang, Q., Lü, S., 2009. *Arch. Pharm. Res.* 32, 329.
- Kulevanova, S., Stefova, M., Stefkov, G., Stafilov, T., 2001. *J. Liq. Chromatograph. Relat. Technol.* 24, 589.
- Lin, Y.L., Wang, C.N., Shiao, Y.J., Liu, T.Y., Wang, W.Y., 2003. *J. Chin. Chem. Soc.* 50, 1079.
- Matsuura, H., Chiji, H., Asakawa, C., Amano, M., Yoshihara, T., Mizutani, J., 2003. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2311.
- Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I., 2000. *Food Chem.* 71, 79.
- Mirovich, V.M., Peshkova, V.A., Shatokhina, R.K., 1989. *Khim. Prir. Soedin.* 6, 850.
- Nakatani, N., Kikuzaki, H., 1987. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2727.
- Palomino, O.M., Gómez-Serranillos, P., Carretero, E., Cases, A., 1997. *Planta Med.* 63, 584.
- Peshkova, V.A., Mirovich, V.M., 1984. *Khim. Prir. Soedin.* 4, 522.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L.S., 2002. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1645.
- Prieto, J.M., Iacopini, P., Cioni, P., Chericoni, S., 2007. *Food Chem.* 104, 889.
- Radušienė, J., Ivanauskas, L., Janulis, V., Jakštas, V., 2008. *Biologija* 54, 45.
- Sawabe, A., Satake, T., Aizawa, R., Sakatani, K., Nishimoto, K., Ozeki, C., Hamada, Y., Komemushi, S., 2006. *J. Oleo Sci.* 55, 413.
- Segiet-Kujawa, E., Michalowska, A., 1990. *Herba Pol.* 36, 79.
- Skaltsa, H., Harvala, C., 1987. *Plant Med. Phytother.* 21, 56.
- Skoula, M., Harborne, J.B., 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum* V. In: Kintzios, S.E. (Ed.), *Oregano*. Taylor & Francis, London in New York, p. 277.
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson, C.B., 1999. *Phytochemistry* 52, 649.
- Souleles, C., 1990. *Plant Med. Phytother.* 24, 175.
- Takeda, Y., Mima, C., Masuda, T., Hirata, E., Takushi, A., Otsuka, H., 1998. *Phytochemistry* 49, 2137.
- Takeda, Y., Tomonari, M., Arimoto, S., Masuda, T., Otsuka, H., Matsunami, K., Honda, G., Ito, M., Takaishi, Y., Kiuchi, F., Khodzimatov, O.K., Ashurmetov, O.A., 2008. *J. Nat. Med.* 62, 71.
- Tomás-Barberán, F.A., Grayer-Barkmeijer, R.J., Gil, I.M., Harborne, B.J., 1988. *Phytochemistry* 27, 2631.
- Venkateswara Rao, G., Mukhopadhyay, T., Annamalai, T., Radhakrishnan, N., Sahoo, M.R., 2011. *Pharm. Res.* 3, 143.
- Wu, R., Ye, Q., Chen, N., Zhang, G., 2000. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 12, 13.
- Yadav, S.B., Tripathi, V., 2000. *Indian Drugs* 37, 508.
- Zgorka, G., Glowniak, K., 2001. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 79.
- Zgorka, G., Lutostanska, E., Glowniak, K., 1997. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 7, 187.
- Zheng, S., Wang, X., Gao, L., Shen, X., Liu, Z., 1997. *Indian J. Chem. Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* 36 B, 104.

Graphical abstract

Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance

pp xxx-xxx

Tanja Milošević Ifantis, Slavica Solujić, Dragana Pavlović-Muratspahić, Helen Skaltsa *



Structure of sesquiterpene lactones (1–3) isolated from the *C. pannonica* non polar extract.

Highlights

• Phytochemical study of *C. pannonica* (Heuff.) Simonk. • Chemotaxonomy study of “*Centaurea jacea*” group. • One new germacranolide, two new and eleven known guaianolides were identified. • Moreover, seven flavonoids, three lignans and one phenolic glucoside were isolated.



Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance

Tanja Milošević Ifantis^{a,b}, Slavica Solujić^b, Dragana Pavlović-Muratspahić^c, Helen Skaltsa^{a,*}

^aDepartment of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Panoplistiriosfis, Zografou, 15701 Athens, Greece

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, B. Džonićeva 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^cDepartment of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanović 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2013

Received in revised form 23 May 2013

Available online xxx

Keywords:

C. pannonica (Heuff.) Simonk.

Centaurea L.

Centaurea jacea group

NMR

Guaiacolsides

Flavonoids

Lignans

Chemotaxonomy

ABSTRACT

The non polar extract of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk., growing wild in Serbia, was studied and twenty-five compounds including 14 sesquiterpene lactones, 7 flavonoids, 3 lignans and 1 phenylpropanoid glycoside were isolated. All compounds were isolated for the first time from this species. Among them, one germacranolide 2 α -hydroxy, 8-dehydroxy 15-O-methacrylate saloniitenolide (1) and two guaianolides 2 α ,8 γ -dihydroxy-dehydrocistus lactone (2) and pantumin (3) are natural compounds. The structures of the compounds were established on the basis of spectroscopic analyses (UV, IR, HREIMS and 1D & 2D NMR). The chemical profile of *C. pannonica*, which belongs to the “*Centaurea jacea*” group, was compared to previously studied taxa of the same group and used to assess the phylogenetic relationships in the group.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Centaurea L. (Asteraceae, subtribe Centaureinae) is represented with around 40 species in Serbia across all parts of country (Josifović, 1975). Depending on the classification adopted, *Centaurea* comprises approximately 250 species (Susanna and García-Jacas, 2007), mainly distributed around Europe and the Mediterranean area. *Centaurea* L. presents great morphological, karyological and pollen diversity and its taxonomy is very complicated (Brenner, 1994; Gabrielyan, 1995; García-Jacas et al., 2001; Mabblerley, 1997; Susanna et al., 1995; Susanna and García-Jacas, 2007; Wagenitz and Hellwig, 1996). Based on newer molecular approaches, three monophyletic core groups (*Acrocentron*, *Cyanus* and *jacea*) defined within the genus. Moreover, some studies indicated that many sections into mentioned groups should merge together (García-Jacas et al., 2000, 2001, 2006). *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. is a perennial species, native to sunny, stony and semi steppes, boundaries and saline meadows of Europe (Bojňanský and Fargašová, 2007; Dostál, 1976). It belongs to the section *jacea* (including sect. *Lepteranthus* as suggested by Dittrich (1968) and Wagenitz and Hellwig (1996), which is one of the most widespread section of the “*Centaurea jacea*” (*jacea*) group. This group is the

largest in the genus and shows an enormous diversity of habit and morphological adaptations. The exclusive character of the group is the peculiar “*Centaurea jacea*” pollen type, which differs from the rest of pollen types by the very small size of the prolate or subprolate grains, and a cavate, microechinate or scabrid exine (Marín Villodre and García-Jacas, 2000; Milatersana et al., 2001; Wagenitz, 1955). Based to the geographical distribution of *Centaurea* L., the *jacea* group has been divided into three major clades, where the most of the taxa occur in the eastern Mediterranean and the Trans-Turanian regions (García-Jacas et al., 2000, 2006).

Sesquiterpene lactones (SLs) constitute the main secondary metabolites of the genus *Centaurea* L. and are useful as chemotaxonomic markers of the genus (Traga, 1992–2012). In addition, phytochemical analyses of the genus have led to the isolation of flavonoids (Formisano et al., 2012), lignans (Cooper et al., 2002; Janačković et al., 2004), indole alkaloids (Sarker et al., 2001), coumarins (Fernández et al., 1989), phenylpropanoids and sterols (Flamini et al., 2002a,b; Tešević et al., 1998a,b).

Although many contributions concerning the chemistry of numerous species of *Centaurea* have been reported, so far the phytochemical investigations on the non volatile constituents of *C. pannonica* are very limited (Kajš-a-Kamb et al., 1992; Sulyok and Laszlo-Bencsik, 1985). In our previous paper (Milošević et al., 2010), we reported the composition of the volatile fractions from *C. pannonica* and *C. jacea*, both belonging to *jacea* section of the *jacea* group. In the present article, we describe the isolation and

* Corresponding author. Tel./fax: +30 2107274593.
E-mail address: skaltsa@pharm.uoi.gr (H. Skaltsa).

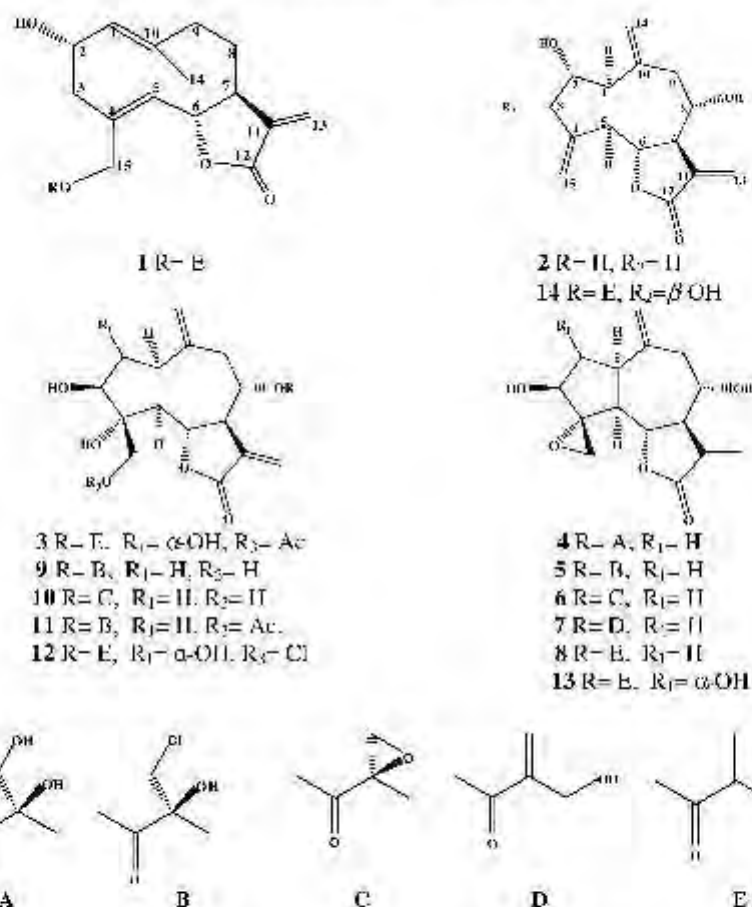


Fig. 1. Structure of sesquiterpene lactones isolated from *C. pannonica* (1–14).

structural elucidation of three new sesquiterpene lactones, the germacranolide (1) and the guaianolides (2 and 3), together with other twenty-two known compounds: eleven guaianolides

Table 1
1H NMR (400 MHz), 13C NMR (50.3 MHz) and HMBC data of compound 1 in CDCl₃.

Position	δ _H	δ _C	HMBC
1	5.02 (d, J = 10.0)	124.8	C-9, C-14
2	4.63 (dt, J = 10.0, 5.8)	60.7	C-3
3a	2.87 (dd, J = 11.2, 5.8)	51.5	C-2, C-4, C-5, C-15
3b	2.09 (t, J = 11.2) ^a		
4	–	130.2	
5	5.15 (d, J = 10.2)	132.6	C-1, C-7, C-15
6	4.54 (dd, J = 10.2, 9.1)	79.7	C-8
7	2.58 (m)	50.8	C-11
8a	2.19 (m) ^a	27.7	
8b	1.63 (m)		
9a	2.45 (dd, J = 15.0, 5.1)	40.6	C-14
9b	2.14 (dd, J = 15.0, 2.3) ^b		
10	–	132.6	
11	–	130.1	
12	–	169.8	
13a	6.26 (d, J = 3.4)	120.1	C-7, C-12
13b	5.52 (d, J = 3.2)		
14	1.41 (s)	16.8	C-1, C-8, C-10
15	1.66 (s)	62.2	C-4, C-5, C-16
16	–	166.7	
17	–	135.5	
18a	6.12 (dq, J = 1.4, 1.2)	126.4	C-16, C-18
18b	5.59 (dq, J = 1.4, 1.2)		
19	1.56 (s)	18.2	C-16, C-17, C-18

^a Assignments based on HSQC and HMBC experiments.

^b Partially overlap signals.

(4–14), seven flavonoids (15–21), three lignans (22–24) and one phenolic glucoside (25).

Chemotaxonomic importance of our results has been discussed based on previously published data on the chemical profile of the taxa belonging to the *facca* group.

2. Results and discussion

2.1. Phytochemical profile

Dried powdered aerial parts of *C. pannonica* were extracted by cold maceration with cyclohexane-Et₂O-MeOH (1:1:1) and the extract was partitioned with brine (saturated aq. solution of NaCl). The resulted lipophilic extract was subjected to a series of chromatographic procedures to obtain twenty-five compounds in total. The known compounds were readily identified as the guaianolides (Fig. 1); babylonin A (4) (Bruno et al., 2005), chlorophysopifolin C (5) (Bruno et al., 2005; González et al., 1974), repin (6) (Bruno et al., 2005; Stevens, 1982), janicin (7) (Bruno et al., 2005), 19-deoxyjanerin (8) (Boblmann and Ziesche, 1980), babylonin B (9) (Bruno et al., 2005), cehellin J (10) (Nowak et al., 1989; Bruno et al., 2005), rhapaserin (11) (Berdin et al., 1999), chlororepdiolide (12) (Buděšínský and Šaman, 1995; Stevens and Wong, 1986), epoxyrepdiolide (13) (Stevens, 1982), and repdiolide (14) (Buděšínský and Šaman, 1995; Stevens, 1982); the flavonoids (Tormisano et al., 2012; Harborne, 1994): apigenin (15), diosmetin (16), hispidulin (17), nepetin (18), hispidulin 7-O-β-D-glucopyranoside (19), nepetin 7-O-β-D-glucopyranoside (20), 6-methoxykaempferol (21); the lignans: matairesinol (22) (Rahman et al., 1990), arctigenin (23) (Suzuki et al., 1982) and arctiin (24) (Nishibe

Table 2
¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (50.5 MHz) and HMBC data of compounds **2** and **3** in CDCl₃.

Position	2			3		
	δ _H	δ _C	HMBC	δ _H	δ _C	HMBC
1	2.80 (dd, <i>J</i> = 9.6, 7.6) ^a	55.5	C-5, C-6	3.17 (1H, dd, <i>J</i> = 10.8, 6.6)	55.1	C-2, C-3, C-10 ^b
2	3.94 (dd, <i>J</i> = 7.8, 5.6, 3.5)	71.5		4.04 (1H, dd, <i>J</i> = 6.8, 4.6)	79.8	
3a	2.00 (dd, <i>J</i> = 14.2, 3.6)	41.5	C-4	3.80 (1H, brd, <i>J</i> = 4.6)	31.3	
3b	2.32 (dd, <i>J</i> = 14.2, 3.5)					
4	–	141.1		–	82.0	C-1, C-7
5	2.99 (dd, <i>J</i> = 10.1, 9.8)	50.9	C-6	2.58 (1H, t, <i>J</i> = 10.8)	56.5	C-1, C-2, C-3, C-6
6	3.88 (dd, <i>J</i> = 10.4, 9.0)	78.8	C-11	4.59 (1H, dd, <i>J</i> = 10.8, 9.8)	75.9	C-8
7	2.78 (dadd, <i>J</i> = 9.0, 8.2, 5.2, 2.8) ^b	50.3		3.10 (1H, ddt, <i>J</i> = 9.5, 3.5, 3.3)	47.8	C-8, C-11
8	<15 (1H, br, <i>J</i> = 8.2, 3.3) ^c	71.7		5.05 (1H, ddt, <i>J</i> = 9.6, 4.7, 4.7)	71.9	
9a	2.85 (qd, <i>J</i> = 14.0, 3.3)	41.1	C-8	2.67 (1H, dd, <i>J</i> = 14.0, 4.7)	38.5	C-14
9b	2.39 (qt, <i>J</i> = 14.0, 3.6)			2.36 (1H, dd, <i>J</i> = 14.0, 4.7)		
10	–	145.8		–	139.6	
11	–	137.4		–	136.5	
12	–	169.7		–	168.5	
13a	0.28 (dd, <i>J</i> = 3.2, 0.7)	123.4	C-7, C-12, C-11	6.20 (1H, s, <i>J</i> = 3.2)	123.0	C-7, C-11, C-12
13b	6.14 (ds, <i>J</i> = 2.8, 0.7)			5.82 (1H, d, <i>J</i> = 3.2)		
14a	5.08 (d, <i>J</i> = 1.4)	118.8	C-1, C-9	5.22 (1H, brs)	118.0	C-1, C-9, C-10
14b	5.06 (d, <i>J</i> = 1.4)			5.02 (1H, brs)		
15a	5.37 (br d, <i>J</i> = 3.2)	113.8	C-3, C-5	4.74 (1H, d, <i>J</i> = 12.4)	64.7	C-3, C-20
15b	5.12 (br d, <i>J</i> = 2.2)			4.22 (1H, d, <i>J</i> = 12.4)		
16	–			–	166.2	
17	–			–	135.8	
18a	–			6.17 (1H, brs)	126.9	C-19
18b	–			5.06 (1H, brs)		
19	–			1.97 (3H, s)	18.1	C-18, C-17, C-18
20	–			–	172.3	
21	–			2.14 (3H, s)	21.2	C-20

^a Assignments were made using HSQC and HMBC data.

^b Partially overlapped signals.

^c Value not observed.

Table 3
¹³C NMR data (50.5 MHz) of compounds **12**, **13**, **14** in CDCl₃.

Position	12	13	14
C-1	51.5	51.4	55.3
C-2	77.2	76.9	81.0
C-3	78.0	77.4	82.5
C-4	147.1	85.3	82.2
C-5	47.8	48.4	56.7
C-6	78.0	78.0	76.7
C-7	48.5	47.1	47.2
C-8	73.6	73.5	73.7
C-9	35.8	36.8	37.8
C-10	139.3	136.3	139.5
C-11	137.0	136.9	136.5
C-12	168.9	168.7	169.3
C-13	122.7	123.1	123.3
C-14	120.5	120.6	118.9
C-15	114.0	47.7	47.8
C-16	166.4	166.5	166.5
C-17	135.0	135.8	135.9
C-18	126.7	126.9	126.8
C-19	18.1	18.2	18.2

^a Assignments were made using HSQC and HMBC data.

et al., 1993), as well as the phenylpropanoid glycoside syringin (**25**) (Sugiyama et al., 1993) by comparison of their physical and spectroscopic data with those reported in the literature. Additionally, three new sesquiterpene lactones (**1–3**) were isolated and identified (Fig. 1). Their ¹H NMR, ¹³C NMR and HMBC data are given in Tables 1 and 2. We also report here the ¹³C NMR for compound **13**, as well as full data of ¹³C NMR in CDCl₃ for compounds **12** and **14** for the first time (Table 3).

Compound **1** was obtained as yellow oil. The molecular formula C₁₉H₂₄O₅ was derived from the pseudomolecular ion peak at *m/z* 350.1961 [calculated 350.1967 for [M+NH₄]⁺]. The IR spectrum afforded absorption bands typical for hydroxyl, and γ -lactone

groups at 3600–3250 cm⁻¹ and 1760 cm⁻¹, respectively and characteristic band at 1730 cm⁻¹ due to the ester of the side chain. Analysis of the ¹H NMR, ¹³C NMR and 2D NMR (CDCl₃) spectroscopic data (Table 1) indicated the presence of a 5-membered lactone ring bounding to a germacradiene system. The ¹³C NMR and DEPT/¹³C NMR spectra revealed the presence of 19 carbons: six quaternary carbons, six methylenes, five methines and two methyl groups. In the ¹H NMR, two characteristic one-proton doublets, appeared downfield at δ_H 6.26 (H-13a) and δ_H 5.52 (H-13b), both being coupled to H-7 (δ_C 2.58), confirmed the α -methylene- γ -lactone. Furthermore, the coupling constant between H-6 and H-7 ($J_{6,7}$ = 9.1 Hz) together with the allylic coupling constant between H-7 and H-13 ($J_{7,13}$ = 3.2 Hz) indicated the *trans* attachment of the lactone ring. The HSQC and HMBC spectra confirmed a germacradiene skeleton (δ_H = 1.41 s, 3H; δ_C = 16.9; CH₃-14; δ_H = 5.02 d, 1H, H-1; δ_C = 129.8 C-1; δ_H = 5.15, d, 1H, H-5; δ_C = 132.6 C-5) with oxygenated functions at C-2 (δ_C 69.7) and C-15 (δ_C 62.2). The large coupling constant between H-1 and H-2 ($J_{1,2}$ = 10.0 Hz) agreed with an α -configuration of the hydroxyl group (Bohlmann et al., 1982; Vasquez et al., 1990). An α -orientation of H-2 would have shown smaller coupling constant ($J_{1,2}$ = 6.0 Hz) (Marrero et al., 1997). Two doublets of quaternary carbons at δ_C 6.12 and δ_C 5.59 (H-18a and H-18b) respectively, and one sharp singlet integrating for three protons at δ_H 1.96 (CH₃-19) indicated the presence of a methyl methacrylate lateral chain. The cross peak in the HMBC spectrum between the singlet of CH₃-19 (at δ_H 4.66, integrating for two protons) and the carbonyl at C-16 (δ_C 166.7) confirmed the position of the lateral chain at C-15 (Fig. 2). It should be mentioned that in the cases where the hydroxymethylene group of C-15 is not substituted, the geminal protons (CH₂-15) appear as two separate distinguished doublets with large coupling constant (J_{gem} = ca. 10 Hz), one around 4.30 ppm and the other around 4.10 ppm (Bohlmann et al., 1984). The relative stereochemistry of **1** was confirmed by comparing the coupling constants between vicinal protons with

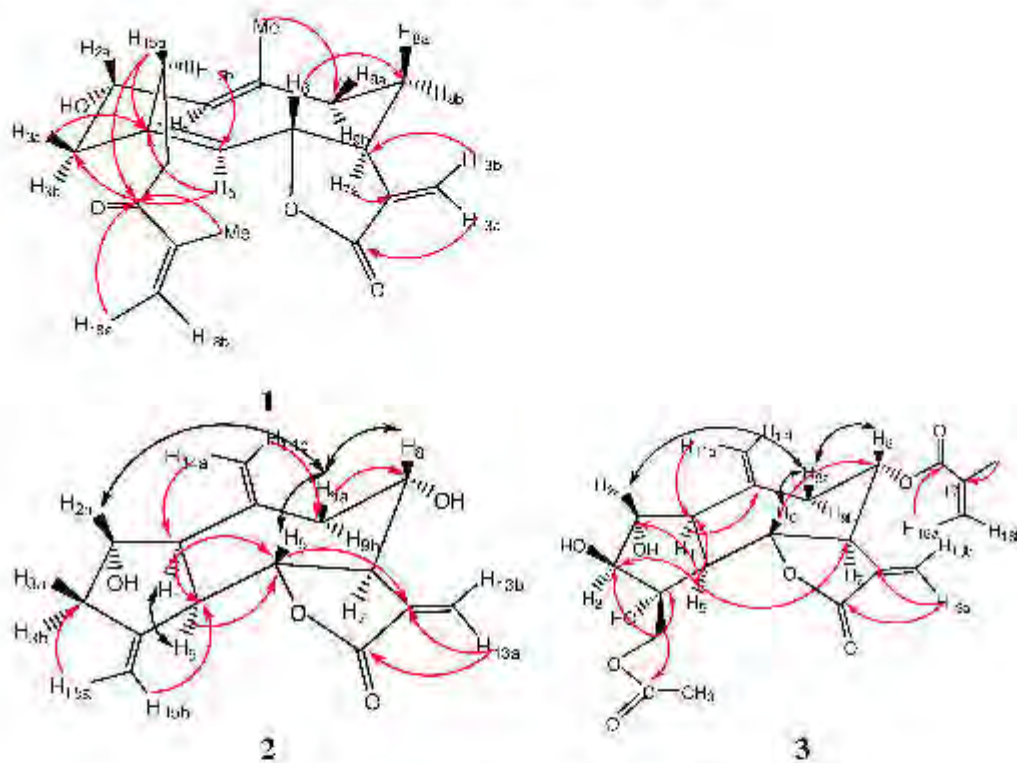


Fig. 2. ^1H NMR cross-peaks (–) of **1**, **2** and **3** and NOE correlations (–) of **2** and **3**.

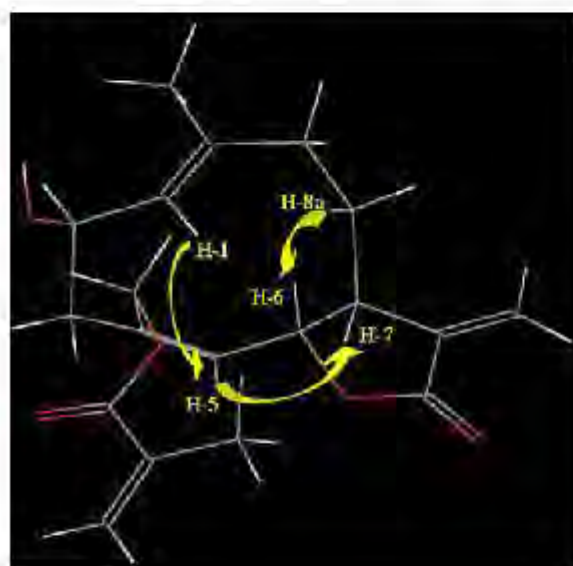


Fig. 3. Minimum energy conformation of **1** and some 3D-NOE correlations.

those reported for relevant germaeranolides (Karioti et al., 2002). The coupling patterns and the magnitude of the coupling constants of H-1, H-2 and H-5 to H-7 were in full agreement with the α stereochemistry for H-1 and a *trans*-disposition of H-5/H-6 and H-6/H-7 (Rustaiyan et al., 1986). NOESY correlations between H-1 and H-5, H-5 and H-7, as well as H-6 and H-8a confirmed the stereochemistry of all chiral centres (Fig. 3). Consequently, compound **1** was established as 2 α -hydroxy-8-dehydroxy-15-O-methylacrylate salomonitenolide.

Compound **2** was obtained as yellow oil. Its molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ was derived from the pseudomolecular ion peak at m/z 263.1275 (calculated 263.1283 for $[\text{M}+\text{H}]^+$). The IR spectrum

exhibited strong bands due to free hydroxyl groups ($\nu = 3600\text{ cm}^{-1}$), γ -lactone ($\nu = 1770\text{ cm}^{-1}$) and methylene group ($\nu = 1665\text{ cm}^{-1}$). The 1D and 2D-NMR data indicated that compound **2** belongs to the group of 2-hydroxy-guaianolides. Analyses of the ^{13}C NMR and DEPT/ ^{13}C NMR spectral data of **2** revealed the presence of one carbonyl group, six olefinic carbons, three oxygenated carbons and five aliphatic carbons. From the ^1H NMR spectra, it was obvious the deficiency of signals corresponding to lateral chain protons: this evidence corroborated with the upfield chemical shifts of the two oxymethine protons (H-6, H-8, HSQC spectrum), compared to similar isolated guaianolides bearing a lateral chain (compounds **12** and **13**). Actually, the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR and HSQC spectra of substance **2** besides the characteristic signals of the guaiane skeleton revealed the presence of three exocyclic double bonds: one characteristic double bond ($\delta_{\text{H}} = 6.28\text{ d}$, 1 H, H-8-13a; $\delta_{\text{H}}\text{H} = 6.14\text{ d}$, 1 H, H-13b; $\delta_{\text{C}} = 123.4$, C-13; $\delta_{\text{C}} = 137.3$, C-11); guaiane seven member ring double bond ($\delta_{\text{H}} = 5.08\text{ d}$, 1 H, H-14a; $\delta_{\text{H}}\text{H} = 5.06\text{ d}$, 1 H, H-14b; $\delta_{\text{C}} = 118.8$, C-14; $\delta_{\text{C}} = 141.1$, C-10); guaiane five member ring double bond ($\delta_{\text{H}} = 5.37\text{ dd}$, 1 H, H-15a; $\delta_{\text{H}} = 5.12\text{ dd}$, 1H, H-15b; $\delta_{\text{C}} = 112.8$, C-15; $\delta_{\text{C}} = 145.8$, C-4). The deshielded chemical shift of H-2 indicated the presence of -OH group at position C-2. Moreover, the clearly correlation between H-2 with two doublet of doublets at $\delta_{\text{C}} 2.60$ ($J = 14.2, 5.6\text{ Hz}$) and $\delta_{\text{C}} 2.32$ ($J = 14.2, 3.5$) allowed us to assign the methylene group at position C-3. The HMBC spectrum showed a clear correlation between the following quaternary carbons: C-12 ($\delta_{\text{C}} 169.2$) and H-13a,b; C-11 ($\delta_{\text{C}} 137.3$) and H-13a, H-6; C-4 ($\delta_{\text{C}} 141.1$) and H-3 (Fig. 2). The relative stereochemistry of **2** was deduced by NOESY experiment, as well as by comparing the chemical shifts and the coupling constants between vicinal protons with those reported for relevant guaianolides (Böhlmann and Gupta, 1982; Daniewski and Nowak, 1993; Stevens and Wong, 1986). The NOE correlations between H-8, H-6 and H-2 with H-3a and H-3b allowed us to assume that these three protons have same orientation. Furthermore, the absence of NOE correlations between H-6 and H-7, H-5, as well as

178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212

the observed coupling $J_{5,6} = 10.4$ Hz and $J_{6,7} = 9.0$ Hz confirmed the *trans*-axial dispositions of protons at C-5 (α), C-6 (β) and C-7 (α) (Fig. 2). Therefore, it could be concluded that H-8 and H-2 are β -oriented. The β -orientation of H-8 was further confirmed by the large *spin spin* coupling constant between H-7 and H-8 of 8.2 Hz, which is indicative of their *trans* arrangement. It is noteworthy that in the cases of *cis* arrangement, the coupling constant between H-7 and H-8 is approximately 2 Hz (Bohlmann and Gupta, 1982). Moreover, in the case of 8 β -OH, the signal of H-6 is shifted downfield due to the deshielding effect of this 8 β -hydroxyl group, while H-13b signal is not affected (Bohlmann and Gupta, 1982). The observed coupling constant between H-1 and H-2 ($J_{1,2} = 7.8$ Hz) confirmed the *trans*-disposition, according to previous data (Stevens and Wong, 1986), giving evidence that the seven member ring of similar 7-hydroxy-guaianolides has a twist chair conformation, while the five member ring is essentially planar. As the five member ring is flattened, the coupling constant between the *trans*-arranged protons H-1 and H-2 is not too large, approximately of 6–9 Hz. Consequently, compound **2** was established as 2 α , 8 α -dihydroxy-dehydrocoscus lactone.

Compound **3**, obtained as a yellow–red oil, has a molecular formula $C_{21}H_{36}O_5$, as assigned by HRMS with *m/z* peak for the pseudomolecular ion at 440.1916 (calcd. 440.1920 for $[M+NH_4]^+$). The IR spectra showed absorption bands at 1765 cm^{-1} that corresponds to 5 ring lactone, and at 3600 cm^{-1} from a hydroxyl group.

Analysis of the 1H NMR and ^{13}C NMR ($CDCl_3$) spectroscopic data (Table 2) of **3** were in part comparable to those of 2-hydroxy guaianolides **2**, **12**, **13**, **14**, but also to NMR spectra of guaianolide **11**, which implied the presence of oxygenated function at C-15. Here, the C-15 hydroxy group was esterified by acetic acid, indicated by the correlation of the ester carbonyl and both protons at C-15 in the HMBC spectrum. The relative configuration of substance **3** was deduced from the NOESY experiment (Fig. 2). Observed long range effects of H-8/H-6/H-2 with H-9a indicated their identical orientation. The chemical shifts and the coupling pattern of these proton signals were found to be comparable with those of **12**. Assuming the usual α -orientation for the H-7, the large values of $J_{7,8} = 10.8$ and $J_{7,6} = 9.6$ confirmed their *trans* disposition and β -orientation of H-6/H-8. Moreover, H-2 is β -oriented which is in agreement with the literature data and the biosynthetic route of the 2-hydroxy-guaianolides of the genus *Centaurea* L., described so far (Berdin et al., 2001; Daniewski and Nowak, 1993; Stevens and Wong, 1986). According to the present spectroscopic data, compound **3** is new and given the name pannonicin.

The absolute configuration of new compounds was not ascertained. However we, assume that, on biosynthetic ground, they have same absolute stereochemistry of chlororepdiolide (**12**), co-occurring in the same species, and whose absolute configuration has been ascertained by X-ray diffraction analysis (Stevens and Wong, 1986).

2.2. Distribution of guaianolides, flavonoids and lignans in *Centaurea jacea* group

Centaurea jacea group is the largest in the genus *Centaurea* L. and shows an enormous diversity of habit and morphological adaptations (García-Jacas et al., 2000). It includes 29 sections (Wagenitz and Hellwig, 1996), which DNA sequences have classified into 17 natural groups: *Acrotophus-Phalolepis-Maculosae-Pseudophalolepis*; *Ammocyanus*; *Cruciatapa-Terranophaca-Serdidiolides*; *Corethrospis*; *Cynaroides-Paraphysis*; *Chortolepis*; *Chevalepis-Pseudoseridia-Preracantha-Plumosipappus*; *Crossheimia*; *Jacea*; *Leptanthus*; *Hymenocentron*; *Melanoloma*; *Seridia*; *Mesocentron*; *Microlophus*; *Phaeopappus*; *Pseudophaeopappoides*; *Pseudoseridia*; *Rhizocalathium*; *Ptosimopappus*; *Willkommia* (García Jacas et al., 2000, 2006). Based to the frequency of some phytochemical enti-

ties between species classified into the same section, here are discussed the chemotaxonomic interrelations within *Jacea* group. Guaianolides are present in forty-four species of the genus *Centaurea* L. (Table 4), twenty-one of them belong to the *Jacea* group. Although, there are not the abundant secondary metabolites, guaianolides are also found in some species belonging to sections out of *Jacea* group; seven belong to the section *Acrocentron* and four are dispersed to other sections (Table 4a). In addition, ten former *Centaurea* species recently classified to other genera are also sources of guaianolides (Table 4b). Highly oxygenated and halogenized guaianolides are predominant sub-groups into taxa of *Jacea* group with cynaropicrin and jacein as main constituents, while chlorine-containing guaianolides are main constituents of the species belonging to *Jacea-Leptanthus* clade. Chlorohyssonifolin C and its derivatives were identified in all species of *Leptanthus* section and it should be considered as important chemotaxonomic marker of the clade. Almost, there are no chemotaxonomic differences between these two sections; this evidence supports the proposal based on DNA sequences to merge them together (García-Jacas et al., 2006). Although *C. jacea* nominated the whole *Jacea* group, the plant did not reveal the presence of any guaianolide, but of two germacranolides, namely cnicin and its acetylated derivative *acetylcnicin* (Fargo et al., 2012), potential chemotaxonomic markers of the *Acrolophus* section (Nowak, 1992; Gousiadou and Skaltsa, 2003; Janačković, 2004; Janačković et al., 2004). Taking in consideration that the germacranolides cnicin, salomonitolid and their derivatives occur together with guaianolides in some *Centaurea* L. species belonging to other sections than *Acrolophus* into *Jacea* group, this fact could explain the chemical profile of *C. jacea* L. Moreover, according to Janačković (2004) the presence of cnicin in some species of the subgenus *Jacea* is associated with the presence of salomonitolid. It is noteworthy that all previously studied taxa of any section revealed salomonitolid derivatives with lateral chains at C-8, in compound **3** the lateral chain is attached to the hydroxymethyl group of C-4.

Among the rest of the guaianolides isolated in the present study, babylin A was also isolated from *C. babylinica* [section *Microlophus*], babylin B and cebellin J from *C. glastifolia* L. (*Chortolepis-Pseudoseridia-Preracantha-Plumosipappus* complex). According to García-Jacas et al. (2006), *C. thivacka* (Janka) Hayek was removed from section *Microlophus* and was placed in the clade with the species of the complex *Chortolepis-Pseudoseridia-Preracantha-Plumosipappus*. Moreover, they suggested that *Chevalepis* and *Microlophus* should be redefined, which is supported by our data. Chlororepdiolide, epoxyrepdiolide, repdiolide and repin isolated from *C. pannonica* are also found in *C. repens*, one of the former species of the genus *Centaurea* L., which re-grouped in the genus *Rhaponticum* Vaill. (Table 4b); moreover rhapsosetin, isolated for the first time from *Rhaponticum serotoides* (Georgi) Bobrov, was also isolated from *C. pannonica*. This evidence along with the presence of guaianolides (Cis et al., 2006) in the recently redefined genus *Rhaponticum* Vaill. corroborate with the assumption that species from *Jacea* group have strong chemotaxonomic relationship with this latter genus. Although taxa of the *Jacea* group contain other types of SIs expected through the biosynthetic route, such as germacranolides and eudesmanolides, their main constituents and chemotaxonomic markers of this group are the guaianolides, consequently our survey is confined to this subgroup of SIs (Table 4). In addition, the distribution of guaianolides in taxa belonging to other sections of the genus *Centaurea* L. (Table 4a), as well as to former species of the genus *Centaurea* L., classified recently to other genera (Table 4b) is presented in order to approach their potential chemotaxonomic correlations.

Although *C. pannonica* has been previously studied for its flavonoid content (Kajča Kamb et al., 1992; Sulyok and Laszlo Benesik, 1985) none of the mentioned flavonoids has been even detected in

Table 4
Guaianolides isolated from taxa of “*Centaurea Jacea*” group.^a

Section-clade/plant species	Origin of species	Sesquiterpene lactones	References
<i>Calcitrapa</i> <i>C. sinaica</i> DC.	Egypt	Amberboin, chlorohyssopifolin A [= centaurepensis], chlororeptilide [= cebellin E] sinaicin	Al-Easa et al. (1990), Sarg et al. (1988)
<i>Cheirolepis–Pseudoseridia–Pteracantha–Plumosipappus</i> <i>C. deflexa</i> Wagenitz	Turkey	Aguerin B, cynaropicrin, 8-desacylcynaropicrin, (=3S,3 α R,4S,6 α R,6 α S,6 β R)-4-hydroxy-3-methyl-6-methyleneoctahydroazulenol[4,5- β]furan-2,8(3H,9 β H)-dione [=15-nor-guaianolides]	Chicca et al. (2011)
<i>C. glastifolia</i> L.	Turkey	Acroptilin, aguerin B, centaurepensis, cynaropicrin, chlorojanerin, cebellin D, cebellin F, cebellin J, 19-desoxypicrolide A, 15-deschloro-15-hydroxyepistolide, 15-deschloro-15-hydroperoxychlorojanerin, 19-desoxy-15-chlorojanerin, 17,18-desoxyrepin, epicebellin J, epistolide, epicentaurepensis, janerin, repidiolide trio1, repin [=subluteolide]	Nowak (1992), Öksüz and Topçu (1994)
<i>C. hermanii</i> F. Herm.	Turkey	Cynaropicrin, chlorojanerin 15-deschloro-15-hydroperoxychlorojanerin [=hermanoid 1], 15-deschloro-15-hydroperoxychlorohyssopifolin B [=hermanoid 2], 15-deschloro-3 β -acetoxy-15-hydroxychlorojanerin 15-deschloro-15-acetoxychlorojanerin, janerin, 19-desoxychlorojanerin [=linichlorin A]	Öksüz et al. (1994)
<i>C. isaurica</i> Hub. Mor.	Turkey	Janerin	Flamini et al. (2004)
<i>C. kotschy</i> Boiss.	Turkey	Desacylcynaropicrin, cynaropicrin, linichlorin B, linichlorin B derivative	Öksüz and Putun (1983)
<i>C. thracica</i> (Janka) Hayek	Bulgaria	Chlorojanerin, cynaropicrin, janerin	Nowak (1992), Nowak et al. (1989)
<i>Corethrospis</i> <i>C. scoparia</i> Sieb.	Egypt	(1S,3S,5R,6R,7R,8S)-8-angelyloxy-3-hydroxyguai-3(15), 10(14) 11(13)-trien-6,12-olide, cebellin F, chlorohyssopifolin A, chlorohyssopifolin B, chlorojanerin, chloroscoparin [=19 acetate cebellin D], (1R,3S,4S,5S,6S,7R,8S)-4 β -(chloromethyl)-3 β ,4 α -dihydroxy-8 α -(3-formyl-2-methyl-propenoyloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-10(14),11(13)-dien-6,12-olide, (1R,3S,4S, 5S,6S,7R,8S)-4 β -(chloromethyl)-3 β ,4 α -dihydroxy-8 α -(sarracenyloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-10(14),11(13)-dien-6,12-olide, cynaropicrin, desacylcynaropicrin, 3 β ,8 α -O-di(4-hydroxy-tigloyl)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olide, 8 α ,4'-(hydroxytiglylate)-8-desacyloxysubluteolide, 8-desacylrepin, 8-desacetylcentaurepensis-8-O-(4-hydroxytiglylate) [= cebellin D], diain, janerin,8 α -hydroxy-11 α ,13-dihydrozaluzanin C, 8 α -hydroxy-3 β -(benzolyloxy)-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olide, 3 β -hydroxy-8 α -(3,4-dimethoxybenzolyloxy)-11 β ,13-dihydro-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-guai-4(15),10(14)-dien-6,12-olide, linichlorin A	Dawidar et al. (1989), Youssef and Frahm (1994a,b), Helal et al. (1997), Youssef (1998)
<i>Cynaroides–Paraphysis</i> <i>C. imperialis</i> Hauffk. ex Bornm.	Teheran	Centaurepensis, 3-desoxysolstitialin A, 8-desacetyl-centaurepensis-8-O-(4-hydroxytiglylate), 15-deschloro-15-hydroxy-8-desacylcentaurepensis-8-O-(4-hydroxy)iglylate, solstitialin A-acetate, solstitialin A	Rustaiyan et al. (1984)
<i>Jacea–Lepteranthus</i> <i>C. debeauxii</i> Gren. & Gordon subsp. <i>thuillieri</i> Dostál	Department of medical plants in Poznan Poland	Cynaropicrin	Geppert et al. (1983)
<i>C. exarata</i> Boiss. ex Cosson.	–	Cynaropicrin	Nowak et al. (1986a)
<i>C. hyrcanica</i> Bornm.	Russia	Chlorohyssopifolin C [= acroptilin], janerin, repin	Evstratova et al. (1969), Geppert et al. (1983)
<i>C. hyssopifolia</i> Vahl	Spain	Chlorohyssopifolin A, chlorohyssopifolin B, chlorohyssopifolin C, chlorohyssopifolin D, chlorohyssopifolin E, janerin, repin	González et al. (1972a, 1974), Geppert et al. (1983)
<i>C. janeri</i> Graells	–	Chlorohyssopifolin C, chlorojanerin, janerin	González et al. (1977), Geppert et al. (1983)
<i>C. linifolia</i> L.	Spain	Aguerin B, chlorohyssopifolin A, chlorohyssopifolin B, chlorohyssopifolin C, chlorohyssopifolin D, chlorohyssopifolin E, cynaropicrin linichlorin A, linichlorin B, linichlorin C; janerin, repin	González et al. (1978b), Geppert et al. (1983)
<i>C. nigra</i> L.	–	Chlorohyssopifolin A	Kajj-a-Kamb et al. (1992)
<i>C. uniflora</i> Turra ssp. <i>nervosa</i> (Willd.) Bonnier et Layens	Italy	Janerin, 8-tigloyloxy 2,3 β -dihydroxy 4-epoxy dehydro costus lactone, 8 α -methacryloyloxy-8-desacyloxysubluteolide	Appendino et al. (1986)
<i>Mesocentron</i> <i>C. solstitialis</i> L.	California, Argentina	Acroptilin, centaurepensis, cynaropicrin, 8-desacyloxy-8 α -[2-methylacryloyloxy]-11 β ,13-dihydro-subluteolide, 8-desacylcentaurepensis-8-O-(4-hydroxy)iglylate,19-desoxyclojanerin, 11 β ,13-dihydro-deacylcynaropicrin, 17-epi centaurepensis, epistolstiolide, janerin, linichlorin B, 13-O-acetyl solstitialin A, repin, solstitialin A, subluteolide, solstitialide	Merrill and Stevens (1985), Jakupović et al. (1986), Tešević et al. (1998a,b)
<i>C. solstitialis</i> L. subsp. <i>schouwii</i> (DC.) Dostál	Sicily	Aguerin B, cynaropicrin, 4 β ,15-dihydro-3-dehydro solstitialin A acetate	Bruno et al. (1991)
<i>Microlophus</i> <i>C. babylonica</i> (L.) L.	Lebanon	Babylin A, babylin B, cebellin J, chlorohyssopifolin C, janerin, repin	Bruno et al. (2005)
<i>C. behen</i> L.	Iran	Aguerin B, cynaropicrin, desacylcynaropicrin, grosshemin, 4 β ,15-dihydro-3-dehydro solstitialin A 4 β ,15-dihydro-3-dehydro solstitialin A 13-acetate	Rustaiyan et al. (1981a), Öksüz et al. (1982)
<i>Ptosimopappus</i>			

Sections (late/early species)	Origin of species	Secondary metabolites	References
<i>C. prosimoneporei</i> Hayek	Turkey	Chlorojanerin, cynaropicrin, deacetylcynaropicrin, 11 β ,13-dihydro-deacetylcynaropicrin, 11 β ,13-dihydro-deacetylcynaropicrin, 4 β ,13-dihydro-3-dehydro-salsolinol A, junicin, zehizinin C, zaluzarin D	Çelik et al. (2007)
<i>C. prosimoneporeoides</i> Wagenitz	Turkey	Cynaropicrin, 11,13-dihydro-desacetylcynaropicrin	Öksüz and Sertin (1997)

The sections into *Jacea* group are listed according to García-Jacas et al. (2009).

Table 4a

Glaucanoides isolated from *Centaurea* L. taxa belonging to sections out of *Jacea* group

Sections	Origin of species	Secondary metabolites	References
Acrocentron			
<i>C. scutell</i> L.	Algeria and Tunisia	14-chloro-10 β -hydroxy-10(14)-dihydrozaluzarin D, kandavanolide, zaluzarin D	Bentayene et al. (2005)
<i>C. sinetensis</i> Boiss.	Lebanon	Salignavolide A	Sahba et al. (2009)
<i>C. talhou</i> L.	Spain	Deacetylcynaropicrin, 11 β ,11-dihydro-deacetylcynaropicrin, 31-hydroxy-8 α -epoxymethylacryloyloxy-4(15),10(14),11(15)-trien-(1 α H)-5 α H)-guaiane-6,12-olide, and its 11 β ,13-dihydro derivative	Perez-Lopez et al. (1987, 1988)
<i>C. incana</i> Desf. – <i>Centaurea proserpens</i> Willd.	Algeria	Acropifin, acropifin-4,15-epiisomer [= solstitialide], desoxyrepin, junicin, repidiolide (cis), repin	Massiot et al. (1986)
<i>C. kandavanensis</i> Beninger	Turkey	9 β -hydroxykandavanolide [= salignavolide A], kandavanolide	Kustayan and Ardebil (1984)
<i>C. nicoli</i> Bald.	Montenegro	9-O-acetylsalignavolide A, 3-deacetyl-9-O-acetylsalignavolide A, kandavanolide, salignavolide A, salignavolide B	Va's et al. (1999)
<i>C. ornata</i> Willd.	Spain	Grossheimin α,β -dihydroxyisobutyrate, 3 α -dihydro-4(15)-tetrahydrogrosheimin α,β -dihydroxyisobutyrate	Navarro et al. (1990)
<i>C. ornata</i> Willd. ssp. <i>ornata</i> Franco	Roumélia	Cynaropicrin, 17,18-dihydroxygeraniin A, 17,18-dihydroxygeraniin B, deacetylcynaropicrin, grossheimin 2',3'-dihydroxyisobutyrate	Bastos et al. (1984)
<i>C. saxatilis</i> Vis.	Greece	Agnerin A, cantharidin, salignavolide A, salignavolide B, salignavolide C	Daniewsky et al. (1992); Daniewski et al. (1993)
Orientalis			
<i>C. clementi</i> Busc. ex DC.	Spain	Clementin, clementin B, C, cynaropicrin, deacetyl-cynaropicrin	Massiot et al. (1983); Colado-González et al. (1986)
Hibiscus sections			
<i>C. aegyptiaca</i> L.	Egypt	Chlorohyssopifolin A, chlorohyssopifolin B, chlorohyssopifolin E, chlorojanerin, 8-deoxygerin, 8-deacylcynaropicrin, 11 α ,11-dihydrojanerin, 19-desoxychlorojanerin, 17,18-epoxy-19-desoxychlorojanerin – solstitialide], epomyrepidiolide, junicin, repin, sauginin	El-Dahmy et al. (1985); Sarg et al. (1937)
<i>C. crassicaulis</i> Maire	Algeria	Aucerin B, centaurepsin, C-17 epimer of centaurepsin, chlorojanerin, cynaropicrin, 17,18-desoxyrepin, 19-desoxy-13-chlorojanerin, cynaropicrin, 4 β ,15-dihydro-3-dehydro-salsolinol A, nicotinate, 4',15-dihydro-3-dehydro-salsolinol A, linchlorin B, 3-oxo-4 α -acetoxy-15-hydroxy-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H,11 β H-gua-10(14)-ene-6,12-olide, 3-oxo-2 α -hydroxy-15-hydroxy-1 α H,5 α H,6 β H,7 α H-11 β H-gua-10(14)-ene-6,12-olide, repin	González Plaza et al. (1998); Merfifi et al. (1997, 2003, 2005); López-Rodríguez et al. (2008)
<i>C. haboni</i> Wagenitz	Iran	Agnerin A, 11,13-dihydro-deacetylcynaropicrin, deacetylcynaropicrin 8-(S)-3-hydroxy-2-methylbutanoate]	Marco et al. (1992)

the present study. Methylated flavonoids and their glycosides were noted as the main sub-group within *Centaurea* L. (Formisano et al., 2012). Furthermore, flavonoids with methoxy group at position C-6, as well as sugar moiety at position C-7 could be considered as important chemotaxonomic markers not only for the sections *Jacea-Lepzeranthus*, but also for the whole *Jacea* group. Our present results are in complete agreement with data presented by Formisano et al. (2012). Nepetin, hispidulin and their glucosides are the main flavonoids of *C. pamonica*, while diosmetin is for the first time isolated from the genus *Centaurea* L. As Janačković (2004), Janačković et al. (2004) pointed out in a research with twenty five *Centaurea* sp. from Central Balkan Peninsula, nepetin was present in almost all investigated taxa, consequently this flavonoid could be potential chemotaxonomic marker of *Centaurea* species originated from this area.

Among the lignans, the diarylbutyrolactones arctigenin, matairesinol and arctiin are identified in the 90% of *Centaurea* species (Table 5), as well as in taxa recently classified to other genera

(Table 5a). Moreover, the presence of the phenylpropanoid glycoside syringin as derivative of sinapyl alcohol, active intermediate of the biosynthetic pathway of lignans is expected (Dowick, 2001). Cis et al. (2003) pointed out positive correlation of syringin with accumulation of **guaiane- and/or** germacrene type SLs in the plants of *Centaureinae* subtribe. Our results corroborate to this assumption. In addition, the biosynthetic pathway of guaiane- and/or germacrene type SLs is almost exclusively followed by the biosynthetic pathway of diarylbutyrolactones lignans.

3. Experimental

3.1. General experimental procedure

Optical rotation was recorded on a Perkin Elmer 341 polarimeter. The $[\alpha]_D^{25}$ values were obtained in CHCl_3 (Uvasol) at 20 °C. UV spectra were recorded on a Shimadzu UV 160A spectrophotometer, according to Mabry et al. (1970). IR spectra were carried out

Table 4b
Cucurbitanoides isolated from former species of the genus *Centaurea* L., classified recently to other genera.

Genera	Origin of species	Sesquiterpene lactones	References
<i>Cheimolophus</i> Cass.			
<i>C. sagata</i> Nees = <i>Cheimolophus sagata</i> (Hutch.) C. López	Canary Islands, Spain	Aguerin B, cynaropicrin	Galdemir et al. (1988)
<i>C. canariensis</i> Brass. (syn. <i>subserpinata</i> Burch.) = <i>Cheimolophus canariensis</i> (Willd.) Holub	Tenerife	Aguerin A, aguerin B, cynaropicrin, 3-desoxycynaropicrin, 11,13-dihydrodeacetylcynaropicrin, 3-epi-11,13-dihydrodeacetylcynaropicrin, deacetylcynaropicrin, 3 α -hydroxydehydrocostus lactone, 8 α -methacryloyloxy dehydrocostus lactone, 8 α -methacryloyloxy dehydrocostus lactone, subserpinatin, subserpinatin B, subserpinatin C	Buhlmann and Gupta (1981), González et al. (1978a, 1982), Colado González et al. (1985)
<i>C. ragusanensis</i> Svent. = <i>Cheimolophus ragusanensis</i> (Svent.) Holub	–	Cynaropicrin, deacetyl-cynaropicrin	González et al. (1984)
<i>C. webbiana</i> Sch. Bip. = <i>Cheimolophus webbiana</i> (Sch. Bip.) Holub	Tenerife	Dihydrocostafetone I	González et al. (1972b)
<i>Plectrocephalus</i> D. Don			
<i>C. americana</i> Nutt. (former sect. <i>Plectrocephalus</i>) = <i>Plectrocephalus americanus</i> (Nutt.) D. Don	Mexico	Cynaropicrin	Ortiz et al. (1973)
<i>C. chilensis</i> Hook & Ar. (former sect. <i>Plectrocephalus</i>) = <i>Plectrocephalus chilensis</i> G. Don ex Loudon	Chile	8 α -methoxydehydrocostus lactone, 11 β H-11,13-dihydrodeacetyl-cynaropicrin-8- β -D-glucoside, dehydrocostus lactone, 8 α -hydroxydehydrocostus lactone	Negrón et al. (1984, 1986a, c)
<i>Psephellus</i> Cass.			
<i>C. austriaca</i> All. = <i>C. krenzigii</i> Sosa	Austria	Acroptilin, cebellin D, E, F, J, centaurepsin, chlorojanerin, cynaropicrin, janicin, repidiolide, repin	Nowak (1992), Nowak et al. (1993)
<i>C. bella</i> Trautv.	Cultivated plant, Poland	Acroptilin, cebellin A, B, D, E 1-chlororepidiolide, F, G, H, I, J, K, L, N, O, centaurepsin, chlorojanerin, cynaropicrin, 8-deoxy-oxg-8 α -(2-methylacryloyl)-suburenlide, 15-deoxyrepin, 19-desoxychlorojanerin, 17,18-epoxy-10-deoxy-chlorojanerin, janicin, 8 α ,4'-hydroxy[2]furanate-8-deacetyl-suburenlide, repin, repidiolide	Daniewski and Nowak (1993), Nowak (1993)
<i>C. carthagenica</i> (Sosa) Sosa = <i>Psephellus carthagenicus</i> Sosa	–	Cynaropicrin	Nowak et al. (1986a)
<i>C. drabifolia</i> Willd. = <i>Psephellus drabifolius</i> (Willd.) K. Koch	–	Cynaropicrin	Nowak et al. (1986a)
<i>C. dimidiata</i> M. Bieb. = <i>Psephellus dimidiatus</i> (M. Bieb.) K. Koch	–	Cynaropicrin, 15-deoxyrepin, 19-deoxyrepin	Nowak et al. (1986b)
<i>C. leucophylla</i> DC. = <i>Psephellus leucophyllus</i> (DC.) Boiss.	–	Acroptilin, centaurepsin, cynaropicrin, tricholobin B, janicin, repin, Cynaropicrin	Nowak et al. (1986b)
<i>C. leucophylla</i> M. Bieb. = <i>Psephellus leucophyllus</i> (= M. Bieb.) C. A. Mey	–	–	–
<i>C. marchaliana</i> Spreng. subgenus <i>Cheimolophus</i> = <i>Psephellus marchalianus</i> (Spreng.) K. Koch	Russia	Acroptilin, cebellin D, chlorojanerin, janicin	Nowak (1992), Nowak et al. (1989)
<i>C. phaeopappoides</i> Bordz. subgenus <i>Odontopappus</i> = <i>Psephellus phaeopappoides</i> (Bordz.) Wagenitz	Russia	Chlorojanerin, cynaropicrin, janicin	Nowak (1992), Nowak et al. (1989)
<i>C. zangeri</i> (Sosa) Sosa (non crossb.) = <i>Psephellus zangeri</i> Sosa, <i>Rapumichium</i> Vahl	–	Cynaropicrin	Nowak et al. (1986a)
<i>C. confinis</i> L. = <i>Rapumichium confinis</i> (L.) Greuter	Spain, Sicily, Italy	Chlorojanerin, chloroxyssopifoline A, 17-epi-chloroxyssopifoline A, mixture of suburenlide and repin, janicin, mixture of bicylin B, its C, 17-epimer and 1 α -deschloro 1 α -lyl oxyl chlorojanerin	Fernández et al. (1993), Bruno et al. (1998)
<i>C. repens</i> L. (= former <i>Acroptilon repens</i> DC.) = <i>Rapumichium repens</i> (L.) Holub	California, Argentina	Acroptilolide, aguerin B, chlororepidiolide, chloroxyssopifoline A, chloroxyssopifoline C, cynaropicrin, 2,3-dihydroxy-8 α -methacryloyloxydehydrocostuslactone, epoxyrepidiolide, janicin, repidiolide, resin, resensulide	Evsratova et al. (1967), Jakupović et al. (1986), Rastagan et al. (1981b), Stevens (1982), Stevens and Woner (1985)

378 by Perkin-Elmer Paragon 500 FT-IR spectrophotometer. ¹H, ¹³C and
379 2D-NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 400, and on a Bru-
378 ker AC 200 (50.3 MHz for ¹³C NMR) spectrometers at 295 K. Chemi-
379 cal shift are reported in ppm (δ) using the residual solvent signal
380 (δ_H 7.27 in ¹H and δ_C 77.0 in ¹³C, CDCl₃) or (δ_H 3.31 in ¹H and δ_C -
381 49.0 in ¹³C, CD₃OD) as reference. COSY, HSQC, HMBC, and NOESY
382 experiments were performed using standard Bruker micropro-

grams. High resolution mass determinations (HREIMS) were carried out on an Agilent Q-TOF 6540 UHD.

Vacuum liquid chromatography (VLC) was performed on a silica gel (Merck; 40–63 μ m) (Coll and Bowden, 1986), column chromatography (CC) on silica gel 60H (SDS; 40–63 μ m) and Sephadex LH 20 (Pharmacia). Gradient elution with the solvents mixtures indicated in each case. Semi-preparative RP₁₈-HPLC was performed

383
384
385
386
387
388
389

Table 5
Lignans isolated from *Centaurea* sp. 5a, since 2000^a

Section/clade/plant species	Origin of species	Lignans	References
<i>Acrolepis</i> – <i>Phalolepis</i> – <i>Mozulosea</i> – <i>Pseudophalolepis</i> <i>C. alboides</i> Friis	Serbia	Acetigenin, matasinesinol	Jrućković et al. (2004)
<i>Chirolepis</i> – <i>Pennianosebia</i> – <i>Pterocaulis</i> – <i>Phoenagappus</i> complex <i>C. albiflora</i> Wagnitz <i>C. isaurica</i> Dub. Mor. <i>Crossostemum</i> <i>C. macrocephala</i> Muss. Paschke, ex Willd.	Turkey Turkey Cultivated plant France	Acetigenin, acetin Acetin Acetigenin, acetin, lappaol A, matasinesinol, matasinesinolside	Chivera et al. (2011) Mammi et al. (2004) Ribeiro et al. (2002); Shoeb et al. (2004)
<i>Jaceo-Legteranthus</i> <i>C. jaceo</i> L. <i>C. nigra</i> L. (sord.)	Hungary France	Tachygenin Acetigenin, acetin, matasinesinol, matasinesinolside, thuyaplicatin, methyl ether	Fujgi et al. (2012); Middleton et al. (2003)
<i>Centaurea Turanica</i> – <i>aphana</i> – <i>Sordidulae</i> <i>C. ibérica</i> Trev. ex Sprengel	Pakistan	Dimeric lignan glucoside	Anna Nisar et al. (2011)
<i>Pannoniappus</i> <i>C. pannonica</i> Hayek 5b Former species of <i>Centaurea</i> L., classified recently to other genera. Genera: <i>Cynus</i> Mill. <i>C. montana</i> L. = <i>Cynus montanus</i> (L.) Hill	Turkey Cultivated plant Denmark	Acetigenin, matasinesinol Acetigenin	Çelik et al. (2006) Christensen and Lam (1991)
<i>Plectrocephalus</i> D. Don <i>C. emmanata</i> Nutt. (former) sect. <i>Plectrocephalus</i> = <i>Plectrocephalus americanus</i> (Nutt.) D. Don <i>C. weinmii</i> Hook. et Arn. = <i>Plectrocephalus weinmii</i> (Hook. & Arn.) N. García & Susanna	Cultivated seeds England and France Argentina	Lignan glucosides (d-benzylbutyryl)-lactones derivatives) acetigenin, acetin, acetigenin, matasinesinol, matasinesinolside, lappaol A Acetigenin, matasinesinol	Cooper et al. (2002); Shoeb et al. (2000) Bortone et al. (2001)

^a Previous references are cited in González and Saldías (2013).

390 on a HPLC system: PU-2080 pump Plus (JASCO); refractive index
391 detector RID-10A (Shimadzu); software: Clarity (JASCO), with Kro-
392 masil RP-18 column (I.d.: 10 mm, length: 250 mm, 10 µm) and flow
393 1.5–1.8 ml/min. Prep. TLC plates pre coated with silica gel 60
394 (Merck, Art. 5721) and Cellulose (Merck, Art. 5716). Fractions mon-
395 itoring to follow separation was performed by TLC on silica gel 60
396 F254 (Merck, Art. 5554) and cellulose (Merck, Art. 5685). Com-
397 pounds were detected using UV absorbance (λ 254 and λ
398 365 nm). Anisaldehyde/sulphuric acid reagent (anisaldehyde 5%
399 in H₂SO₄/AcOH 1:50) was used for detection of SLs and lignans at
400 TLC chromatography, while Neu's reagent (Neu, 1957) was used
401 for flavonoids. Analytical solvents were obtained from Panreac
402 Quimica SA (Barcelona, Spain, Italy), while deuterated solvents
403 were purchased from Merck, KGaA (Darmstadt, Germany).

404 3.2. Plant material

405 Aerial parts of *C. pannonica* were collected during the flowering
406 period (September, 2008) in Divostin (Šumarići, Kragujevac dis-
407 trict, Central Serbia), at ca. 200–250 m altitude. Voucher specimens
408 were deposited to the Herbarium of the Department of Botany,
409 Faculty of Biology, University of Belgrade (No. 16387).

410 3.3. Extraction

411 The air dried powdered aerial parts of *C. pannonica* (0.36 kg)
412 were extracted at room temperature with cyclohexane–Et₂O–
413 MeOH (1:1:1; extract A) and MeOH–H₂O (1:1; extract B). Extract
414 A was washed with brine, the aqueous layer re-extracted with
415 EtOAc, and the organic layer dried with Na₂SO₄, concentrated under
416 reduced pressure and used for further analysis.

417 3.4. Isolation

418 Extract A (8.5 g) was fractionated by VLC over silica gel
419 (10.0 × 8.0 cm) with mixtures of cyclohexane–EtOAc–Me₂CO–

420 MeOH–H₂O (100:0:0:0–0:0:50:50) to yield eleven fraction (Frac-
421 tions A–H) of 500 mL each. The fractions were screened by analyt-
422 ical thin layer chromatography on silica gel (Merck, Art. 5554) and
423 ¹H NMR. Based on the obtained chromatographic results, in combi-
424 nation with their ¹H NMR spectra, seven fractions were selected
425 for further analyses. Fraction D (1.24 g; eluted with cyclohexane-
426 EtOAc 25:75) was further applied to VLC over silica gel
427 (10.0 × 8.0 cm) with mixt. of CH₂Cl₂–MeOH–H₂O (95:5:0–
428 0:100:0) to yield eight fractions (DA–DH). Combined sub-fractions
429 DD and DE (DD; 37.6 mg, eluted with CH₂Cl₂–MeOH–H₂O
430 85:15;1,5–80:20:2) were further applied to preparative TLC plates
431 on silica gel (Merck, Art. 5721) using CH₂Cl₂–Me₂CO–HCOOH 9:2:1
432 as eluent and yielded **17** (9.3 mg). Sub-fraction DC (1009.6 mg)
433 was subjected to VLC (10 cm × 8 cm) over silica gel (Merck, Art.
434 7736) with mixt. of CH₂Cl₂–MeOH (100:0–0:100) and yielded **14**
435 fractions (BCA–BCN). Sub-fractions DCH (101.9 mg; eluted with
436 CH₂Cl₂:MeOH 93:7) and DCK (33.6 mg; eluted with CH₂Cl₂:MeOH
437 84:16) were further purified by RP₁₈-HPLC (MeOH–H₂O 2:1, 4:3
438 respectively) and yielded: DCII **22** (t_R 11.1 min, 2.3 mg), **8** (t_R
439 12.7 min, 1.5 mg), mixture of **5** and **6** (t_R 13.2 min, 13.8 mg), **23**
440 (t_R 14.2 min, 16.3 mg), **1** (t_R 15.6 min, 3.1 mg), **16** (t_R = 20.6 min,
441 3.3 mg), as well as **21** (t_R 24.7 min, 2.1 mg); DCK (33.6 mg) **7** (t_R
442 14.2 min, 1.5 mg), **17** (t_R 53.3 min, 2.3 mg). Sub fraction DCI
443 (670.7 mg; eluted with CH₂Cl₂:MeOH 90:10) by repeated CC over
444 silica gel (CH₂Cl₂–MeOH 95:5–0:100) and Sephadex LH-20
445 (MeOH–CH₂Cl₂ 80:20) afforded **15** (1.7 mg). Fraction E (0.99 g;
446 eluted with EtOAc 100%) was subjected to CC over silica gel with
447 CH₂Cl₂–EtOAc–MeOH (100:0:0–0:0:100) and afforded 26 sub-fractions
448 (EA–EZ₄). Sub-fraction ES (5.5 mg; eluted with CH₂Cl₂–EtOAc
449 20:80) was identified as compound **7**. Sub-fractions EN (95.2 mg;
450 eluted with CH₂Cl₂:EtOAc 40:60) and EV (80.0 mg; eluted with
451 CH₂Cl₂–EtOAc 0:100) were further purified by RP₁₈-HPLC
452 (MeOH–H₂O 2:1, 3:2 respectively) and afforded EN: **11** (t_R
453 12.1 min, 1.2 mg), **5** (t_R 15.2 min, 2.9 mg), **12** (16.8 min, 30.5 mg);
454 EV: **4** (t_R 9.4 min, 5.4 mg), **2** (t_R 10.6 min, 1.1 mg), **13** (t_R
455 16.9 min, 18.7 mg), **14** (t_R 26.3 min, 6.3 mg). Part (100 mg) of

fraction T (594.4 mg, eluted with EtOAc–Me₂CO, 90:10) afforded by RP₁₈-HPLC (MeOH:H₂O 3:2) 4 (*t*_R 10.3 min, 9.0 mg), 2 (*t*_R 11.4 min, 2.6 mg), 10 (*t*_R 12.8 min, 3.9 mg), 13 (*t*_R 18.2 min, 15.6 mg), 14 (*t*_R 28.9 min, 1.9 mg) and 18 (*t*_R 26.5 min, 2.1 mg). Fraction C (110 mg; eluted with EtOAc–Me₂CO, 75:25) was subjected to RP₁₈ HPLC (MeOH:H₂O 9:1) and afforded 10 (*t*_R 13.8 min, 6.2 mg), 3 (*t*_R 20.2 min, 4.3 mg), 9 (*t*_R 25.2 min, 1.2 mg). Fraction I (1.75 g, eluted with EtOAc–Me₂CO, 75:25) was applied to VLC with mixtures of CH₂Cl₂–MeOH of increasing polarity. Six sub-fractions were collected (IA–IF). Sub-fraction IAV–IB (52.5 mg; eluted with CH₂Cl₂–MeOH 97:3–90:10) further purified by RP₁₈-HPLC (MeOH:H₂O 3:2) yielded 24 (*t*_R 10.3 min, 9.0 mg). Fraction J (233.9 mg, eluted with EtOAc–Me₂CO 75:25) was submitted to CC over silica gel with mixtures of CH₂Cl₂–MeOH (95:5–0:100). Twenty-one fractions (JA–JU) were collected. Combined sub-fractions JP, JQ, JR (13.5 mg; eluted with CH₂Cl₂–MeOH 50:50–30:70) were identified as 20, while JD (eluted with CH₂Cl₂–MeOH 97:3) as 18 (7.7 mg). The sub-fraction JK (56.3 mg; eluted with CH₂Cl₂–MeOH 87:13–85:15) was submitted to RP₁₈-HPLC (MeOH:H₂O 1:1) and yielded 25 (*t*_R 7.4 min, 1.2 mg) and 19 (*t*_R 22.7 min, 11.8 mg). Fraction K (233.9 mg, eluted with EtOAc–Me₂CO 75:25) was submitted to CC over silica gel using mixtures of CH₂Cl₂–MeOH of increasing polarity and afforded 20 (8.7 mg) and 19 (6.3 mg).

3.4.1. 2α-Hydroxy-15-methacrylate germacra-1(10),6,7(11)-trien-12,6α-olide (1)

Yellow oil; (CHCl₃): ¹H and ¹³C NMR and HMBC data are given in Table 1; [α]_D²⁰ +15.70 (CHCl₃, c 0.070); IR (CaF₂): ν_{max} 3600–3250, 1760, 1730, 1710 cm⁻¹; HREIMS *m/z* 350.1961 [M+NH₄]⁺ (calcd. 350.1967 for C₁₉H₂₄O₆+NH₄⁺).

3.4.2. 2α,8α-dihydroxy-1αH,5αH,6βH,7αH-guai-4(15),10(14),11(13)-trien-6,12-olide (2)

Yellow oil; (CHCl₃): ¹H and ¹³C NMR and HMBC data are given in Table 2; [α]_D²⁰ +55.56 (CHCl₃, c 0.054); IR (CaF₂): ν_{max} 3600, 1770, 1665 cm⁻¹; HREIMS *m/z* 263.1275 [M+H]⁺ (calcd. 263.1283 for C₁₇H₁₈O₄+H⁺).

3.4.3. 2α,3β,14α-trihydroxy-4β-(acetoxyethyl)-8α-(4-methacrylate)-1αH,5αH,6βH,7αH-guai-10(14),11(13)-dien-6,12-olide (3)

Yellow red oil; (CHCl₃): ¹H and ¹³C NMR and HMBC data are given in Table 3; [α]_D²⁰ +17.40 (CHCl₃, c 0.105); IR (CaF₂): ν_{max} 3600–3400, 1765, 1717 cm⁻¹; HREIMS *m/z* 440.1916 [M+NH₄]⁺ (calcd. 440.1920 for C₂₁H₂₈O₉+NH₄⁺).

3.5. Database

Databases SciFinder and Reaxys were used for the literature data on guaianolides, flavonoids and lignans for the *Jacea* group, as well as literature data (Fraga, 1992–2012; Formisano et al., 2012). All entries from 1967 until the June 2012 were considered (Youssef and Frahm 1984a,b).

Acknowledgments

Tanja Mitašević iFranić warmly thanks the Greek Foundation of Scholarships (IKY) for financial support of her Ph.D. program, the results of which form part of the present paper. This study was also supported by the Ministry of Science, Republic of Serbia (project No. III 43004). Authors are thankful to Prof. Dr. Jörg Heilmann, (Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie Naturwissenschaftliche Fakultät IV Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) for recording HREIMS spectra, Ass. Prof. Theophanis Constantinidis (Department of Ecology & Systematics, Faculty of Biology, University of Athens) for kind help and invaluable suggestions about *Cen-*

taurea spp. chemotaxonomy, as well as Dr. Catherine Koukoulitsa, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Athens, for help to drawing 3D structure of compounds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.014>.

References

Al-Easa, H.S., Mann, J., Rizk, A.F., 1990. Guaianolides from *Centaurea sinica*. *Phytochemistry* 29, 1324–1325.
 Anwar Nisar, K., Inai, F., Umrig A shai, R., Akhul, M., Churruar Abbas, M., Zia ur Rehman, Q., Huma, K., 2011. Potent anti-prolifer constituents from *Centaurea ibérica*. *Molecules* 16, 2053–2064.
 Appendino, G., Gariboldi, P., Belardin, P., 1986. Sesquiterpene lactones from *Centaurea uniflora* ssp. *neriosa*. *Phytochemistry* 25, 2163–2165.
 Rastov, M.M.M., Kijac, A., Pich, M.M.M., 1984. Constituents of *Centaurea ornata* ssp. *ornata*. *Fitoterapia* LXV, 191.
 Bantamene, A., Benayache, S., Ceché, J., Petit, G., Bernicejo-Barreira, J., Leon, F., Benayache, F., 2005. A new guaianolide and nine sesquiterpene lactones from *Centaurea crabsi* L. (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1091–1095.
 Berlin, G.A., Adekenov, M.S., Raldušiu, A.V., Shakhov, M.M., Druganov, A.G., Kulyasov, T.A., Tolstikov, G.A., 1988. Raposone and chaseneol, new sesquiterpene lactones from *Rhaponticum serotoides*. *Russ. Chem. Bull.* 48, 1987–1991.
 Berlin, G.A., Raldušiu, A.V., Shakhov, M.M., Bagrynskaya, Y.I., Lashov, V.Yu., Druganov, A.G., Kulyasov, T.A., Adekenov, M.S., Habbóida, G., Tolstikov, A.G., 2001. 15-O-Deacetyl raposone and chaseneol, new components of a lactone mixture from *Rhaponticum serotoides*. *Russ. Chem. Bull.* 50, 537–542.
 Bohrlmann, F., Ziesche, J., 1980. Neue guaianolide und acetylenverbindungen aus *Phacelia artem.* *Phytochemistry* 19, 697–698.
 Bohrlmann, F., Gupta, R.K., 1981. Guaianolides from *Centaurea covariensis*. *Phytochemistry* 20, 2773–2775.
 Bohrlmann, F., Adler, A., King, R.K., Robinson, H., 1982. Germacra lactides from *Mikania guazulica*. *Phytochemistry* 21, 1169–1170.
 Bohrlmann, F., Gupta, R.K., 1987. Repeating dehydrodiazepam C from *Andryala inopifolia*. *Phytochemistry* 21, 1799–1800.
 Bohrlmann, F., Barajice, S., King, M.R., Robinson, H., 1984. Additional guaianolides from *Asplenium sarracenicum*. *Phytochemistry* 23, 1189–1190.
 Bojarský, V., Fargašová, A., 2007. Atlas of seeds and fruits of Central and Eastern European Flora: The Carpathian Mountains Region. Springer, Berlin, Heidelberg.
 Bremer, K., 1984. Asteraceae. Dicotyledons and Classification. Timber Press, Portland.
 Bruno, M., Diaz, G.J., Herz, W., 1993. Guaianolides and lignans from *C. rosenbluthii* ssp. *abundant*. *Phytochemistry* 30, 4165–4166.
 Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, A.R., Arnold, A.N., 200a. Guaianolides from *Centaurea bebiyanica*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 817–825.
 Bruno, M., Vassallo, N., Fiori, C., Galati, L.F., Herz, W., 1988. Sesquiterpene lactones of two *Centaurea* species from Sicily. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 801–805.
 Budžinský, M., Šarata, D., 1995. Corchor-13 NMR spectra of sesquiterpene lactones. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* 30, 231–275.
 Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, A.R., Uyss, J., Kösiel, W., Michalska, X., Bruno, M., 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Chaenactis pinnatopappa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 349–352.
 Chicca, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertaufel, K., Flaminio, G., Nieri, P., 2011. Anti-proliferative activity of agnesin B and a new rare non-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3088–3070.
 Christensen, L.P., Lars, J., 1991. Flavones and other constituents from *Chaenactis* species. *Phytochemistry* 30, 2663–2665.
 Cis, J., Nowak, G., Homociewicz-Hassan, M., Kwieć, W., 2001. Syringin in some species of the subtribe Centaureinae of the Asteraceae. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72, 303–307.
 Cis, J., Nowak, G., Kwieć, W., 2006. Antileishman properties and chemotaxonomic implications of sesquiterpene lactones and syringin from *Rhaponticum pichram*. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 802–807.
 Colado González, I., Marías, F.A., Massaret, M.G., R-Luis, F., 1985. Guaianolides from *Centaurea covariensis*. *Phytochemistry* 24, 2107–2109.
 Colado González, I., Marías, F.A., Massaret, M.G., R-Luis, F., 1986. Structure, chemistry and stereochemistry of clemereins, sesquiterpene lactones from *Centaurea clemerei*. *Tetrahedron* 42, 3611–3622.
 Col, J.C., Rosales, B.E., 1986. The application of column liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* 49, 934–936.
 Cooper, C., Laird, A., Nakar, E., Sarker, S.D., 2002. Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea crabsi* (Compositae). *Ann. Bot.* 90, 65–67.
 Daniewsky, W.M., Nowak, G., Kousci, E., 1992. Salogravidolide A, a sesquiterpene from *Centaurea solonchoca*. *Phytochemistry* 31, 2891–2893.
 Daniewski, M.W., Nowak, G., 1993. Further sesquiterpene lactones of *Chaenactis*. *Phytochemistry* 32, 204–205.

- 592 Daniewski, M.W., Nowak, G., Pankowska, E., Georgiadis, T., Routsis, E., Rychlewska,
593 U., Szczepanska, B., 1993. Sesquiterpene Lactones of *Centaurea salominita*.
594 Phytochemistry 34, 445–447.
- 595 Dawidar, A.M., Metwally, M.A., Abou-Elzahab, M., Abdel-Mogib, M., 1989. Chemical
596 constituents of two *Centaurea* species. Pharmazie 44, 735.
- 597 Dewick, M.P., 2001. Medical Natural Products, second ed. John Wiley and Sons Ltd.,
598 Baffins Lane, Chichester.
- 599 Dittrich, M., 1968. Morphologische Untersuchungen an den Früchten der Subtribus
600 Cardueae-Centaureinae (Compositae). Willdenowia 5, 67–107.
- 601 Dostál, J., 1976. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burgess, N.A., Moore, D.M., Valentine,
602 D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), Flora Europea, vol. 4. Cambridge
603 University Press, Cambridge, p. 290.
- 604 El-Dahmy, S., Bohlmann, F., Sarg, T.M., Ateya, A., Farrag, N., 1985. New guaianolides
605 from *Centaurea aegyptiaca*. Planta Med., 176–177.
- 606 Evstratova, I.R., Rybalko, S.K., Rzaade, Ya.R., 1967. Acroptilin-a new sesquiterpene
607 lactone from *Acroptilon repens*. Chem. Nat. Compd. 3, 284.
- 608 Evstratova, I.R., Mukhametzanov, M.N., Sheichenko, V.I., Shreter, A.I., Pakaln, D.A.,
609 1969. Isolation of repin from *Centaurea hircanica*. Chem. Nat. Compd. 5, 186.
- 610 Fernández, I., García, B., Grancha, J.F., Pedro, R.J., 1987. Two guaianolides from
611 *Centaurea collina*. Phytochemistry 26, 2403–2405.
- 612 Fernández, I., García, B., Grancha, J.F., Pedro, J.R., 1989. Sesquiterpene lactones,
613 flavonoids and coumarins from *Centaurea collina*. Phytochemistry 28, 2405–
614 2407.
- 615 Fernández, I., Pedro, J.R., Polo, E., 1995. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba*
616 and *C. conifera*. Phytochemistry 38, 655–657.
- 617 Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I., 2002a. Secondary constituents from *Centaurea*
618 *horrida* and their evolutionary meaning. Biochem. Syst. Ecol. 30, 1051–1054.
- 619 Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y., Kargiöglu, M.,
620 2002b. Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp.
621 *pseudoscabiosa* from Turkey. Phytochemistry 61, 433–437.
- 622 Flamini, G., Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Tugay, O., Demirelma, H.,
623 2004. Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their
624 chemotaxonomical significance. Biochem. Syst. Ecol. 32, 553–557.
- 625 Forgo, P., Zupkó, I., Molnár, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J., 2012. Bioactivity-
626 guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L.
627 Fitoterapia 83, 921–925.
- 628 Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Bancheva, S., Maggio, A., Rosselli, S., Bruno,
629 M., 2012. Flavonoids in the subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe
630 Cardueae, Asteraceae): distribution and ¹³C-NMR spectral data. Chem.
631 Biodivers. 9, 2096–2158.
- 632 Fortuna, M.A., de Riscalca, C.E., Catalan, A.C., Gedris, E.T., Herz, W., 2001.
633 Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. Biochem. Syst. Ecol. 29, 967–
634 971.
- 635 Fraga, B.M., 1992; 1993; 1994; 1995; 1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002;
636 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012. Natural
637 sesquiterpenoids. Nat. Prod. Rep. 9, 217–241 and 557–580; 10, 397–419; 11,
638 533–554; 12, 303–320; 13, 307–326; 14, 145–162; 15, 73–92; 16, 21–38; 16,
639 711–730; 17, 483–504; 18, 650–673; 19, 650–672; 20, 392–413; 21, 669–693;
640 22, 465–486; 23, 943–972; 24, 1350–1381; 25, 1180–1209; 26, 1125–1155; 27,
641 1681–1708; 28, 1580–1610; 29, 1334–1366.
- 642 Gabrielyan, E., 1995. On the generic status of certain groups of Centaureinae
643 (Compositae). In: Hind, D.J.N., Jeffrey, C., Pope, G.V. (Eds.), Advances in
644 Compositae Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 145–152.
- 645 Gadeschi, E., Jorge, Z.D., Massanet, G.M., Lurs, F.R., 1989. Two derivatives of costic
646 acid from *Centaurea arguta*. Phytochemistry 28, 2204–2206.
- 647 Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffarian, V., Ilarslan, R., 2000. The natural
648 delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the
649 *Centaurea jacea* group. Plant Syst. Evol. 223, 185–199.
- 650 Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Garnatje, T., Vilatersana, R., 2001. Generic delimitation
651 and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Asteraceae): a combined nuclear
652 and chloroplast DNA analysis. Ann. Bot. 87, 503–515.
- 653 Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Romaschenko, K., Suárez-Santiago, V.N., Ertugrul, K.,
654 Susanna, A., 2006. *Centaurea* revisited: a molecular survey of the *Jacea* group.
655 Ann. Bot. 98, 741–753.
- 656 Geppert, B., Drozd, B., Kielczewski, M., Holub, M., 1983. Sesquiterpene lactones.
657 XXIII. Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. Acta Soc.
658 Bot. Pol. 52, 23–34.
- 659 González, G.A., Bermejo, J., Bretón, L.J., Triana, J., 1972a. Constituents of Compositae.
660 XV. Chlorohyssopifolin A and B, two new sesquiterpene lactones from *Centaurea*
661 *hyssopifolia* Vahl. Tetrahedron Lett. 20, 2017–2020.
- 662 González, G.A., Bermejo, J., Rincones Rodríguez, M., 1972b. Dihydrostafiatona
663 aislada de la *Centaurea webbiana*. Sch. Bip. An. Quim. 68, 333–334.
- 664 González, G.A., Bermejo, J., Bretón, L.J., Massanet, M.G., Triana, J., 1974.
665 Chlorohyssopifolin C, D, E and vahlenin, four new sesquiterpene lactones
666 from *Centaurea hyssopifolia*. Phytochemistry 13, 1193–1197.
- 667 González, G.A., Bermejo, J., Massanet, M.G., 1977. Aportación al estudio
668 quimiotaxonomico del genero *Centaurea*. Rev. Latinoam. Quim. 8, 176–181.
- 669 González, G.A., Bermejo, J., Cabrera, I., Massanet, M.G., Mansilla, H., Galindo, A.,
670 1978a. Two sesquiterpene lactones from *Centaurea canariensis*. Phytochemistry
671 17, 955–956.
- 672 González, G.A., Bermejo, J., Amaro, M.J., Massanet, M.G., Galindo, A., Cabrera, I.,
673 1978b. Sesquiterpene lactones from *Centaurea linifolia* Vahl. Cem. J. Chem. 56,
674 491–494.
- 675 González, G.A., de la Rosa, D.A., Massanet, M.G., 1982. Subexpinnatin, a new
676 Guaianolide from *Centaurea canariensis*. Phytochemistry 21, 2363–2368.
- González, A.G., Barrera, J.B., García, T.Z., Rosas, F.E., 1984. Sesquiterpene lactones
677 from *Centaurea* species. Phytochemistry 23, 2071–2072.
- 678 González-Platas, J., Ruiz-Pérez, C., González, G.A., Bermejo, J., Medjroubi, K., 1999.
679 4,15-Dihydro-3-dehydrostitaliin A. Acta Crystallogr. C55,
680 1837–1839.
- 681 Gousiadou, Ch., Skaltsa, H., 2003. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*.
682 Biochem. Syst. Ecol. 31, 389–396.
- 683 Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman &
684 Hall, London.
- 685 Helal, M.A., Nakamura, N., Meselhy, R.M., El-Fishawy, M.A., Hattori, M., Mahran,
686 H.G., 1997. Guaianolides from *Centaurea scoparia*. Phytochemistry 45,
687 551–554.
- 688 Jakupović, J., Jia, Y., Pathak, V.P., Bohlmann, F., King, R.M., 1986. Bisabolen
689 derivatives and sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. Planta Med. 5,
690 399–401.
- 691 Janačković, P., 2004a. Fitochemical and chemotaxonomic research of some
692 *Centaurea* L. (Asteraceae) species from the Central Balkan Peninsula. Ph.D. [In
693 Serbian].
- 694 Janačković, P., Tešević, V., Milosavljević, S., Vajs, V., Marin, P.D., 2004. Sesquiterpene
695 lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. Biochem. Syst. Ecol. 32, 355–
696 357.
- 697 Josifović, M., 1975. Flora SR Srbije (VII). In: Josifović, M., Stjepanović, L., Kojić, M.,
698 Nikolić, V. (Eds.), SANU, Beograd. p. 256 [In Serbian].
- 699 Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M., Girre, L., 1992. Chimie et activités biologiques du
700 genre *Centaurea*. Pharm. Acta Helv. 67, 178, and references therein.
- 701 Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B., Harvala, C., 2002. Secondary
702 metabolites from the aerial parts of *Centaurea deusta*. Antifungal and
703 antibacterial activities. Z. Naturforsch. C. 57c, 75–80.
- 704 López-Rodríguez, M., García, V.P., Zater, H., Benayache, S., Benayache, F., 2009.
705 Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimonum*. Acta
706 Crystallogr. E65, 1867–1868.
- 707 Mabblerley, D.J., 1997. The Plant Book, second ed. Cambridge University Press,
708 Cambridge, p. 138.
- 709 Mabry, J.T., Markham, R.K., Thomas, B.M., 1970. The Systemic Identification of
710 Flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 711 Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M.,
712 1992. Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species.
713 Phytochemistry 31, 3527–3530.
- 714 Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.S., García Liso, V., Batlle, N., 1997. Sesquiterpene lactones
715 from *Artemisia lucentica*. Phytochemistry 45, 755–763.
- 716 Martín Villodre, J., Garcia-Jacas, N., 2000. Pollen studies in subtribe Centaureinae
717 (Asteraceae): the *Jacea* group analysed with electron microscopy. Bot. J. Linn.
718 Soc. 133, 473–484.
- 719 Massanet, G.M., Collado, L.G., Macías, F.A., 1983. Structural determination of
720 clementin, a new guaianolide isolated from *Centaurea clemente*. Tetrahedron
721 Lett. 24, 1641–1642.
- 722 Massiot, G., Morfaux, A.M., Le Men-Olivier, L., Bouquouant, J., Madaci, A., Mahamoud,
723 A., Chopova, M., Acinou, P., 1986. Guaianolides from leaves of *Centaurea incana*.
724 Phytochemistry 25, 258–261.
- 725 Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., Acinou, P.,
726 1997. Guaianolides from *Centaurea musimonum*. Phytochemistry 45, 1449–
727 1451.
- 728 Medjroubi, K., Benayache, F., León, F., Bermejo, J., 2003. Complete assignment of the
729 ¹³C and ¹H NMR spectra of two known guaianolides isolated from *Centaurea*
730 *musimonum*. Rev. Colomb. Quim. 32, 17–25.
- 731 Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., 2005. Sesquiterpene lactones from
732 *Centaurea musimonum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. Fitoterapia 76,
733 744–746.
- 734 Merrill, B.G., Stevens, L.H.K., 1985. Sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis*.
735 Phytochemistry 24, 2013–2018.
- 736 Middleton, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Reid, R., Sarker, D.S.,
737 2003. Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of
738 *Centaurea nigra* (Asteraceae). Biochem. Syst. Ecol. 31, 653–656.
- 739 Milošević, T., Argyropoulou, C., Solujić, S., Muratpahić, D., Skaltsa, H., 2010.
740 Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from
741 *pannonica* and *C. jacea*. Nat. Prod. Commun. 5, 1663–1668.
- 742 Navarro, J.J., Caballero, C.M., Moran, R.J., Medarde, M., Grande, M., Anaya, J., 1990.
743 Guaianolides and eudesmanolides from *Centaurea ornata*. J. Nat. Prod. 53, 573–
744 578.
- 745 Neu, R., 1957. Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen
746 alsreagenzien für den Nachweis von oxyphenyl-benzo-γ-pyrenen. die
747 Naturwissen-schaften. 44, 181–183.
- 748 Negrete, E.R., Backhouse, N., Avendaño, S., San Martín, A., 1984. Dehydrocostus
749 lactone et 8α-hydroxydehydrocostus lactone de *Centaurea chilensis* Hooker et
750 Arnold. Plant. Méd. Phytothér. 4, 226–232.
- 751 Negrete, E.R., Latorre, L., Backhouse, N., Peña, R., Delporte, C., 1988a. Etudes
752 anatomiques et phytochimiques: flavonoides et lactone de *Centaurea chilensis*
753 Hooker et Arnold. Plant. Méd. Phytothér. 22, 1–10.
- 754 Negrete, E.R., Backhouse, N., San-Martín, A., Cassels, K.B., Hartmann, R., Breitmaier,
755 E., 1988b. Guaianolides from *Centaurea chilensis* and *Centaurea floccosa*. Chem.
756 Ztg 112, 144–146.
- 757 Nishibe, S., Fujimoto, T., Nose, M., Takeda, T., Ogihara, Y., Xu, G., 1993. Lignans from
758 *Trachelospermum axillare*. Phytochemistry 52, 1579–1581.
- 759 Nowak, G., Drozd, B., Kroszczyński, W., Holub, M., 1986a. Sesquiterpene lactones.
760 XXIX. Cynaropicrin in species of the subtribe Centaureinae. Acta Soc. Bot. Pol.
761 55, 17–22.

- 763 Nowak, G., Drozd, B., Holub, M., Lagodzinska, A., 1986b. Sesquiterpene lactones
764 XXXIII. Guaianolides in the subgenus *Psephellus* Cass. Schmalh. genus
765 *Centaurea*. Acta Soc. Bot. Pol. 55, 629–638.
- 766 Nowak, G., Holub, M., Buděšínský, M., 1989. Sesquiterpene lactones. XXXVI.
767 Sesquiterpene lactones in several subgenera of the genus *Centaurea* L. Acta
768 Soc. Bot. Pol. 58, 95–102.
- 769 Nowak, G., 1992. A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe
770 *Centaureinae* of the Compositae. Phytochemistry 31, 2363–2368.
- 771 Nowak, G., 1993. Chromatography of twenty six sesquiterpene lactones from
772 *Centaurea bella*. Chromatographia 35, 325–328.
- 773 Ohno, N., Hirai, H., Yoshioka, H., Domínguez, A.X., Mabry, J.T., 1973. Cynaropicrin: A
774 sesquiterpene lactone from *Centaurea americana*. Phytochemistry 12, 221–222.
- 775 Öksüz, S., Ulubelen, A., Aynechi, Y., Wagner, H., 1982. A guaianolide from *Centaurea*
776 *behen*. Phytochemistry 21, 2747–2749.
- 777 Öksüz, S., Putun, E., 1983. Guaianolides from *Centaurea kotschyi*. Phytochemistry 22,
778 2615–2616.
- 779 Öksüz, S., Serin, S., Topçu, G., 1994. Sesquiterpene lactones from *Centaurea hermanii*.
780 Phytochemistry 35, 435–438.
- 781 Öksüz, S., Topçu, G., 1994. Guaianolides from *Centaurea glastifolia*. Phytochemistry
782 37, 487–490.
- 783 Öksüz, S., Serin, S., 1997. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*.
784 Phytochemistry 46, 545.
- 785 Rahman, M.M.A., Dewick, P.M., Jackson, D.E., Lucas, J.A., 1990. Lignans of *Forsythia*
786 *intermedia*. Phytochemistry 29, 1971.
- 787 Ribeiro, N.L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir-Babayev, N., Sarker, S.D., 2002.
788 Flavonoid C-glucosides and a lignans from *Centaurea macrocephala*
789 (Compositae). Biochem. Syst. Ecol. 30, 1097–1100.
- 790 Rustaiyan, A., Niknejad, A., Zdero, C., Bohlmann, F., 1981a. A guaianolide from
791 *Centaurea behen*. Phytochemistry 10, 2427–2429.
- 792 Rustaiyan, A., Nazarians, L., Bohlmann, F., 1981b. Guaianolides from *Acroptilon*
793 *repens*. Phytochemistry 20, 1152–1153.
- 794 Rustaiyan, A., Ardebili, S., 1984. New guaianolides from *C. kandavanensis*. Planta
795 Med. 4, 363–364.
- 796 Rustaiyan, A., Sharif, Z., Tajarodi, A., Ziesche, J., Bohlmann, F., 1984. Neue
797 guaianolide aus *Centaurea imperialis*. Planta Med. 50, 193–194.
- 798 Rustaiyan, A., Ahmadi, B., Jakupovic, J., Bohlmann, F., 1986. Sesquiterpene lactones
799 and eudesmane derivatives from *Onopordon carmanicum*. Phytochemistry 25,
800 1659–1662.
- 801 Saliba, N.A., Dakdouki, S., Homeidan, F.R., Kogan, J., Bouhadir, K., Talhouk, S.,
802 Talhouk, R., 2009. Bio-guided identification of an anti-inflammatory guaianolide
803 from *Centaurea ainetensis*. Pharm. Biol. 47, 701–707.
- 804 Sarker, D.S., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., 2001. Indole alkaloids
805 from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). Phytochemistry 57, 1273–
806 1276.
- 807 Sarg, T.M., El-Domiati, M., El-Dahmy, S., 1987. Further guaianolides from *Centaurea*
808 *aegyptiaca*. Sci. Pharm. 55, 107–110.
- 809 Sarg, T., El-Dahmy, S., El-Domaity, M., Ateya, A., 1988. Guaianolides and other
810 constituents from *Centaurea sinaica*. Acta Pharm. Hung. 58, 129.
- 811 Shoeb, M., Rahman, M.M., Nahar, L., Delazar, A., Jaspars, M., Macmanus, M.S.,
812 Satyajit, S., 2004. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*.
813 DARU 12, 87–93.
- Shoeb, M., MacManus, M.S., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Kong Thoo-Lin, P., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D., 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. Phytochemistry 67, 2370–2375.
- Stevens, L.K., 1982. Sesquiterpene lactones from *C. repens*. Phytochemistry 21, 1093–1098.
- Stevens, L.K., Wong, Y.R., 1986. Structure of chlororepdiolide, a new sesquiterpene lactone from *C. repens*. J. Nat. Prod. 49, 833–837.
- Sugiyama, M., Nagayama, E., Kikuchi, M., 1993. Lignan and phenylpropanoid glycosides *Osmanthus asiaticus*. Phytochemistry 33, 1215–1219.
- Sulyok, G., Laszlo-Bencsik, Á., 1985. Cyanidin 3-(6-succinyl glucoside)-5-glucoside from flowers of seven *Centaurea* species. Phytochemistry 5, 1121–1122.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. Am. J. Bot. 82, 1056–1068.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., 2007. "The tribe Cardueae", in "Flowering Plants. Eudicots. Asterales". In: Kadereit, J., Jeffrey, C. (Eds.), The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 8. Kubitzki, K. (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 123–146.
- Suzuki, H., Lee, K.H., Mitsumasa, H., Toshiyuki, I., Kazuo, I., Huang, H.C., 1982. (+)-Arctigenin, a lignan from *Wikstroemia indica*. Phytochemistry 21, 1824–1825.
- Tešević, V., Vajs, V., Janačković, P., Todorović, N., Djoković, D., Marin, P., Milosavljević, S., 1998a. Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species: *C. derventana* and *C. kosaninii*. Planta Med. 64, 488.
- Tešević, V., Vajs, V., Todorović, N., Djoković, D., Marin, P., Milosavljević, S., 1998b. Sesquiterpene lactones from plant species *Centaurea solstitialis* L. J. Serb. Chem. Soc. 63, 131–135.
- Vajs, V., Todorović, N., Ristić, M., Tešević, V., Todorović, B., Janačković, P., Marin, P., Milosavljević, S., 1999. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. Phytochemistry 52, 383–386.
- Vasquez, M., Quijano, L., Fronczek, F.R., Macias, F.A., Urbatsch, L.E., Cox, P.B., Fischer, N.H., 1990. Sesquiterpene lactones and lignans from *Rudbeckia* species. Phytochemistry 29, 561–565.
- Vilatersana, R., Martín Villodre, J., Susanna, A., Garcia-Jacasm, N., Garnatje, T., 2001. Pollen studies in subtribe *Centaureinae* (Asteraceae): the *Carthamus* complex and the genus *Aegialophila* analyzed with electron microscopy. Plant Biol. 3, 607–615.
- Wagenitz, G., 1955. Pollenmorphologie und Systematik in der Gattung *Centaurea* L. s.1. Flora 142, 213–279.
- Wagenitz, G., Hellwig, F.H., 1996. Evolution of characters and phylogeny of the *Centaureinae*. In: Hind, D.J.N., Beentje, H.G. (Eds.) Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Royal Botanical Gardens, Kew. pp. 491–510.
- Youssef, D., Frahm, W., 1994a. Constituents of the egyptian *Centaurea scoparia*: Chlorinated guaianolides of the aerial parts. Planta Med. 60, 267–271.
- Youssef, D., Frahm, W., 1994b. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; II. Guaianolides of the aerial parts. Planta Med. 60, 572–575.
- Youssef, A.T.D., 1998. Sesquiterpene lactones of *Centaurea scoparia*. Phytochemistry 49, 1733–1737.