

Original paper

## Isolation of trachelogenin 4-*O*- $\beta$ -D-glucoside from the fruits of *Carthamus tinctorius* L.

Andrzej Patyra<sup>1,2,3,\*</sup>, Marcin Kolakowski<sup>1</sup>, Marta Katarzyna Dudek<sup>4</sup>, Anna Karolina Kiss<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Doctoral School, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

<sup>4</sup> Structural Studies Department, Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Łódź, Poland

\* Correspondence: [andrzej.patyra@wum.edu.pl](mailto:andrzej.patyra@wum.edu.pl)

**Abstract:** Trachelogenin 4-*O*- $\beta$ -D-glucoside or tracheloside is a rare lignan glycoside present mostly in some plants from the *Cynarae* tribe of the *Asteraceae* family. As this lignan is also present in small amounts in the human diet, isolation and study of the pharmacological properties of this compound may bring some new insights into the role of lignans. This study aimed to isolate trachelogenin 4-*O*- $\beta$ -D-glucoside from the fruits of safflower using chromatographic methods. Briefly, 339 mg of tracheloside was isolated from 500 g of plant material. The yield is sufficient for performing biological studies, thus confirming that safflower fruits are a significant source of this rare compound.

**Keywords:** *Carthamus tinctorius*, lignans, isolation, tracheloside, trachelogenin

Article is published under the CC BY license.

### 1. Wstęp

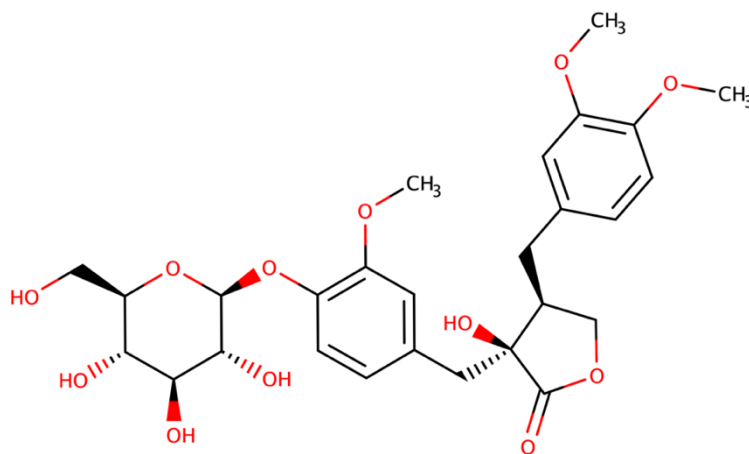
Krokosz barwierski (*Carthamus tinctorius* L.) jest rośliną jednoroczną należącą do rodziny astrowatych (*Asteraceae*), dorastającą do 130 centymetrów wysokości, posiadającą białozółte, błyszczące, krzaczaste, wyprostowane i cylindryczne łodygi, klasyfikowane jako podstawowe, drugo- i trzeciorzędowe, które są zakończone kulistymi główkami. Zielone, miękkie liście są ułożone naprzemiennie, mają jajowaty lub jajowato-lancetowaty kształt, mogą być gładkie lub pokryte licznymi kolcami. Obupłciowe kwiaty o budowie rurkowatej, promienistej, występują na szczytach łodyg, są barwy pomarańczowej lub czerwono-pomarańczowej, ściśle otoczone przylistkami i kolczastymi wypustkami. *C. tinctorius* owocuje tworząc białe, błyszczące i gładkie owoce, zwane niełupkami, mogą być pokryte włoskami. Korzeń krokosza barwierskiego jest cienki, wrzecionowaty z licznymi korzeniami bocznymi, może osiągać długość do 2-3 metrów w zależności od dostępności wody [1,2].

W czasach prehistorycznych był uprawiany na terenach dzisiejszych Chin, Indii, Iranu i Egiptu. W Tajlandii wodny ekstrakt z kwiatów był stosowany do koloryzacji włosów. W średniowieczu nastąpił początek upraw krokosza barwierskiego na terenie Włoch, Hiszpanii oraz Francji, skąd w XX wieku został wprowadzony do upraw na terenie Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej [1]. Kwiaty omawianego gatunku posłużyły, ze względu na obecność czerwonych i pomarańczowych pigmentów, do produkcji barwników. Do komercjalizacji upraw krokosza barwierskiego przyczynił się w latach pięćdziesiątych XX wieku, rozwój przemysłu farb i lakierów, gdzie znalazł zastosowanie przy ich produkcji [3]. Gdy zaczęto stosować barwniki anilinowe w skali przemysłowej, krokosz przestał być uprawiany w celu pozyskania barwników.

Zastosowania krokosza barwierskiego w tradycyjnej medycynie perskiej były zależne od wykorzystywanej części rośliny. Kwiat, nasiona i olej z nasion były stosowane jako środek przeczyszczający, w literaturze opisano również stosowanie tych części rośliny w reumatyzmie i paraliżu. Owoc i liście wykorzystywane były jako środek przeciwbólowy, rozkurczający oraz jako odtrutka na jad skorpiona [2]. W tradycyjnej medycynie indyjskiej krokosz barwierski był stosowany w świerzbie, zapaleniu stawów i mastalgii oraz w celu zwiększenia libido [3]. W Chinach różyczki krokosza barwierskiego były szeroko stosowane w chorobach

związanych z zastojem krwi, zaburzeniach miesiączkowania, a także w leczeniu ran wewnętrznych lub zewnętrznych [1]. W Korei ekstrakt z nasion *C. tinctorius* był stosowany do wzmacniania kości, zapobiegania osteoporozie i w chorobach ginekologicznych [4]. W Irańskiej medycynie ludowej był stosowany również jako lek na łuszczycę, bielactwo, owrzodzenia jamy ustnej, drętwienie kończyn, obniżonym nastroju, łysieniu, stłuczeniach z towarzyszącą opuchlizną i kolce [1-3].

W *C. tinctorius* stwierdzono obecność szeregu lignanów takich jak: arktygeniny, matairezynolu, sekoizolaricirezynolu, trachelogeniny i ich glikozydów [3]. Dla wymienionych lignanów wykazano potencjalne działanie przeciwnowotworowe, wspomagające leczenie otyłości czy neuroprotektoryjne [5]. W badaniu *in vitro* na komórkach Huh7 i HEK 293T stwierdzono, że trachelogenina zapobiega wnikaniu wirusa zapalenia wątroby typu C do komórek wątroby [6]. Wykazano hamujące działanie trachelogeniny na proliferację komórek nowotworowych w badaniu *in vitro* na komórkach HCT-116 [7]. Istnieją również doniesienia o działaniu antyestrogennym lignanów. W tym kontekście potwierdzono *in vitro* aktywność trachelozydu na komórkach Ishikawa, wykazując znaczne obniżenie aktywności alkalicznej fosfatazy, porównywalne z tamoksyfenem [8]. Lignany obecne w owocach krokosza barwierskiego należą do związków obecnych w ludzkiej diecie, w szczególności w produktach mącznych i ziarnach zbóż, natomiast ze względu na ich nieznaczną zawartość (czasem wręcz śladową) istnieje potrzeba znalezienia źródeł tych związków do izolacji.



**Rysunek 1.** Wzór strukturalny 4-O- $\beta$ -D-glukozydu trachelogeniny (trachelozydu).

Celem tej pracy było opracowanie wydajnego schematu izolacji jednego z bardziej istotnych i rzadkich w przyrodzie lignanów, 4-O- $\beta$ -D-glukozydu trachelogeniny (trachelozydu) (Rysunek 1.), z owoców krokosza barwierskiego za pomocą metod chromatograficznych.

## 2. Materiały i Metody

Materiał badawczy stanowiło 500 g owoców krokosza barwierskiego zakupionych od Złota Rybka Ilona Bura Jarosław Bury (Ostrów Wielkopolski, Polska). Metanol (cz.d.a.), kwas mrówkowy (cz.d.a.), octan etylu (cz.d.a.), chloroform (cz.d.a.), kwas siarkowy 98% (cz.d.a.), dichlorometan (cz.d.a.), aceton (cz.d.a.) i n-heksan (cz.d.a.) zakupiono od POCh (Gliwice, Polska). Acetonitryl do chromatografii (gradient), żel krzemionkowy TLC 60G F<sub>254</sub> płytki szklane 10 x 20 cm oraz żel krzemionkowy (60-200  $\mu$ m) zakupiono od Merck (Darmstadt, Niemcy). DMSO zakupiono od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Niemcy). Diaion HP-20 zakupiono od Supelco Analytical (Bellefonte PA, USA). Waniinę zakupiono od Veb Laborchemie (Apolda, Niemcy). Woda do HPLC była przygotowana przy użyciu systemu oczyszczającego Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, USA) (18.2 M $\Omega$  cm).

Surowiec (500 g) odtłuszczono przy pomocy 1 L n-heksanu i 3-krotnie ekstrahowano na łaźni ultradźwiękowej SONIC-5 (POLSONIC, Poznań, Polska) z wykorzystaniem 100% metanolu w 60°C przez 2 h i odparowano do sucha na wyparce rotacyjnej Rotavator R-3 (Buchi, Flawil, Szwajcaria) uzyskując 12,8 g suchego wyciągu, który scharakteryzowano fitochemicznie.

Analiza UHPLC-DAD-ESI-MS/MS została przeprowadzona na systemie ultrasprawnej chromatografii ciekowej UHPLC-3000 RS (Dionex, Dreieich, Niemcy) z detektorem diodowym (DAD) i spektrometrem mas typu pułapka jonową i interfejsem ESI AmaZon SL (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy). Rozdziału dokonano na kolumnie Zorbax SB-C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,9 μm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Faza ruchoma składała się z 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (A) i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B) wykorzystując gradient: 0–60 min, 15–100% B. Wielkość nastrzyku wynosiła 5 μL. Eluenty z chromatografu ciekowego były wprowadzane do interfejsu ESI bez splittingu i analizowane w trybie jonów ujemnych, z następującymi parametrami: ciśnienie nebulizatora – 40 psi; natężenie przepływu neutralnego gazu – 9 L/min; temperatura azotu – 300°C; napięcie kapilary – 4,5 kV. Masy jonów rejestrowano w zakresie 100 do 2200 m/z. Widma UV były rejestrowane przy długości fal 200–400 nm.

Widma NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i dwuwymiarowe (ROESY, COSY, HSQC, HMBC) otrzymano przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 500 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Niemcy) odpowiednio przy częstotliwościach 500 i 126 MHz i wyposażonego w 5 mm głowicę sondy BBFO. Przesunięcia chemiczne odniesiono do sygnałów rozpuszczalnika: odpowiednio 3,31 i 49,50 ppm dla  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  w metanolu- $d_4$ .

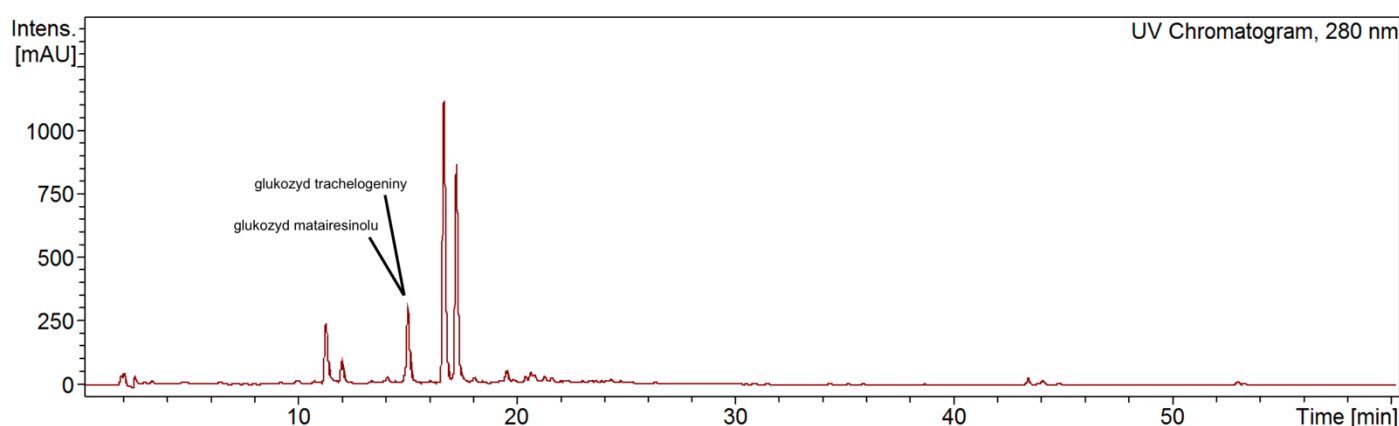
Związki były identyfikowane lub częściowo identyfikowane na podstawie ich czasu retencji, widma UV, jonu pseudomolekularnego i jego fragmentacji, widm NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i dwuwymiarowych oraz porównując powyższe dane, z danymi związków uprzednio wyizolowanymi w naszym laboratorium i/lub z danymi literaturowymi.

Analizę TLC przeprowadzono na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym 60G F<sub>254</sub>. Płytki rozwijano w komorze pionowej wcześniej nasyconej fazą ruchomą przez co najmniej 15 minut. Odczynnikiem wywołującym był 1% roztwór waniliny w stężonym kwasie siarkowym (VI). Chromatogram wybarwiano poprzez ogranie w temperaturze 105°C. Fazą ruchomą stanowiła mieszanina dichlorometanu i metanolu (93:7).

Do izolacji wykorzystano chromatografię preparatywną (HPLC-PREP) z wykorzystaniem systemu LC20-AP (Shimadzu, Japonia). Rozdziału dokonano na kolumnie Zorbax SB-C18 (150 mm × 21,2 mm, 5 μm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Faza ruchoma składała się z 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (A) i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B) używając następującego gradientu: 0–60 min, 5–40% B. Parametry analizy: objętość nastrzyku – 400 μL; prędkość przepływu – 20 ml/min;  $\lambda_1$ =254 nm,  $\lambda_2$ =350 nm.

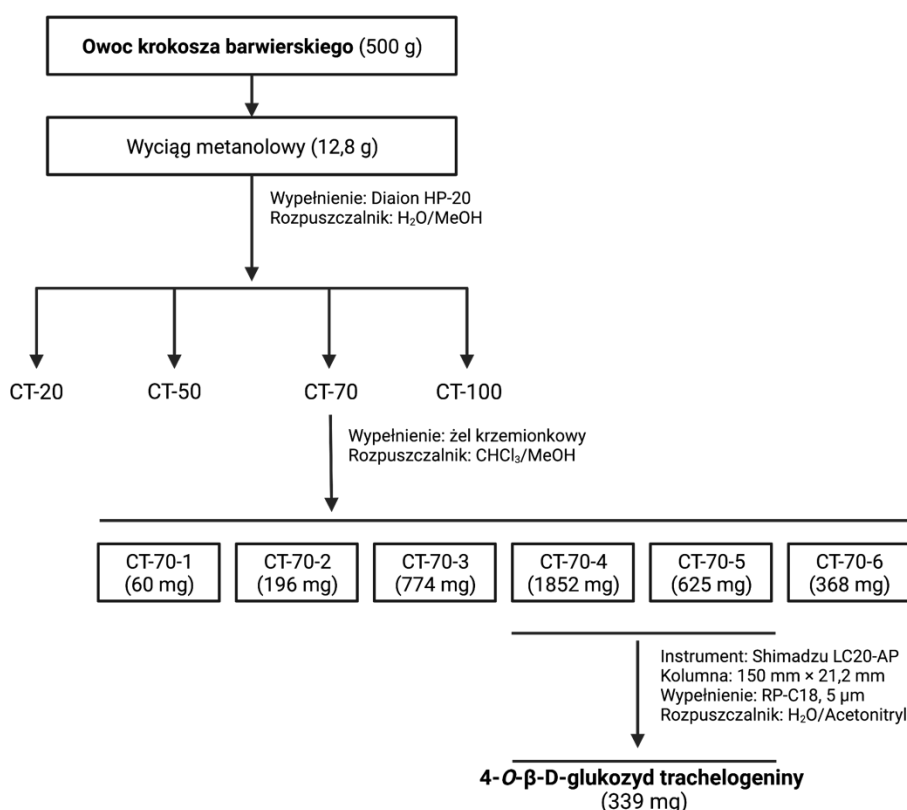
### 3. Wyniki

Z 500 gramów owoców krokosza otrzymano 12,8 g suchego wyciągu metanolowego, który scharakteryzowano fitochemicznie z wykorzystaniem metody UHPLC-DAD-ESI-MS/MS. W wyciągu stwierdzono obecność dwóch glikozydów lignanowych: 4-*O*-β-D-glukozyd trachelogeniny (RT = 15,2 min; MS = 595 m/z; UV<sub>max</sub> λ = 227 nm, 278 nm) oraz 4-*O*-β-D-glukozyd matairezynolu (RT = 15,2 min; MS = 519 m/z; UV<sub>max</sub> λ = 227 nm, 278 nm) (Rysunek 2.).



Rysunek 2. Chromatogram związków występujących w ekstrakcie metanolowym z owoców krokosza przy długości fali 280 nm.

Suchy wyciąg poddano rozdziałowi z zastosowaniem chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem Diaion HP-20 jako fazy stacjonarnej i gradientu wody i metanolu (80:0 → 0:100) jako eluentu. Otrzymano 4 frakcje, które scharakteryzowano przy użyciu metody UHPLC-DAD-ESI-MS/MS. Stwierdzono obecność obu związków lignanowych we frakcji wymytej 70% metanolem (CT-70 – 2,432 g). Ponadto we frakcji wymytej 100% metanolem zidentyfikowano aglikon arktygeninę (RT = 25,8 min; MS = 371 m/z;  $UV_{max} \lambda = 222 \text{ nm}, 281 \text{ nm}$ ). Pełen schemat rozdziału i izolacji przedstawiono na Rysunku 3.

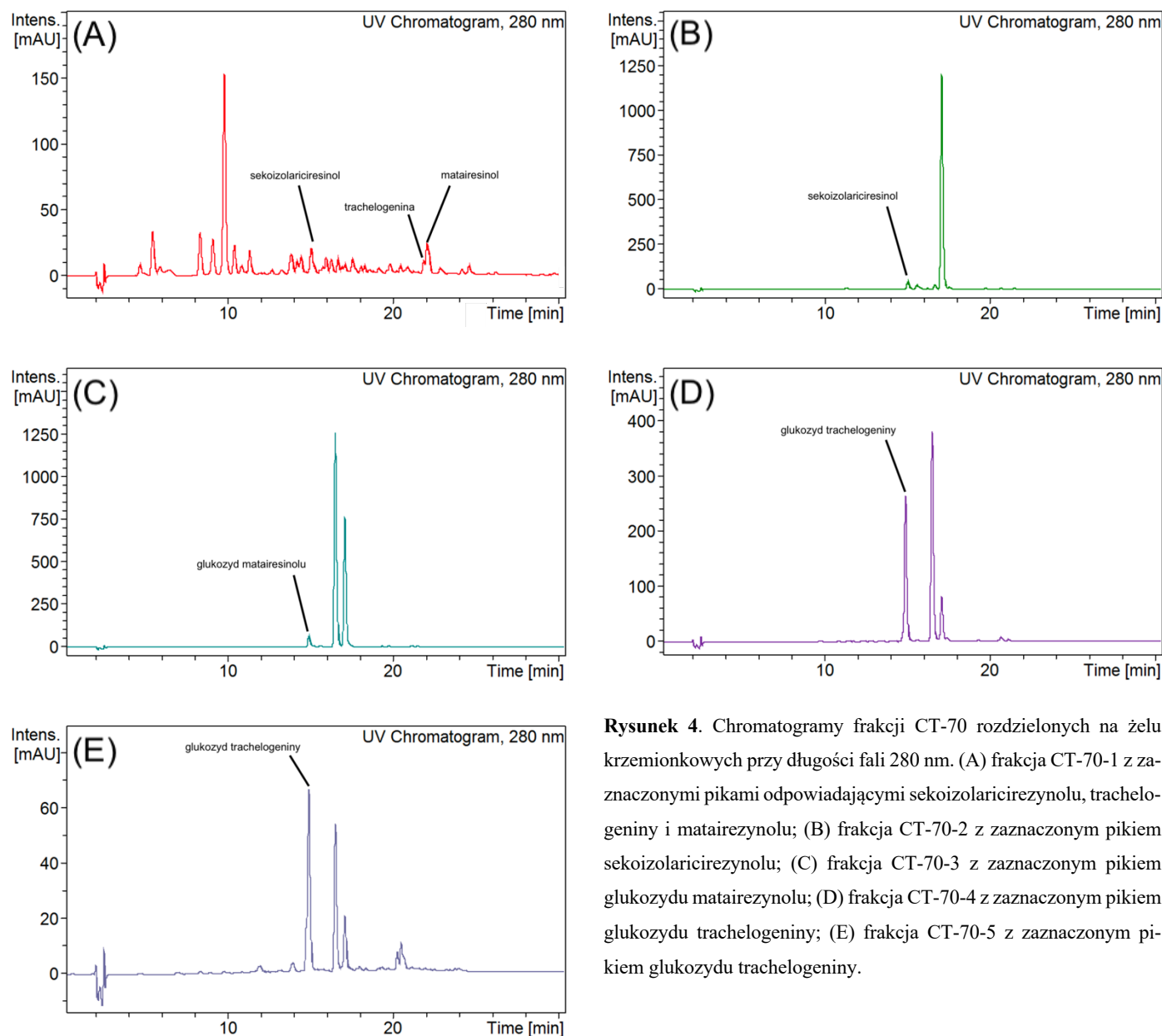


**Rysunek 3.** Schemat izolacji 4-O-β-D-glukozydu trachelogeniny z owoców krokosza barwierskiego. Stworzono za pomocą BioRender (Biorender.com).

Frakcja CT-70 została poddana dalszemu rozdziałowi na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym, wymywając gradientem mieszaniny chloroformu i metanolu (100:0 → 80:20), otrzymując 38 frakcji po 60 ml, które połączono w 6 głównych frakcji na podstawie ich profilu TLC (CT-70-1 – CT-70-6). Następnie skład poszczególnych frakcji przeanalizowano metodą UHPLC-DAD-ESI-MS/MS i potwierdzono rozdział obu związków lignanowych. Obecność 4-O-β-D-glukozydu matairezynolu potwierdzono we frakcji CT-70-3 (0,774 g), natomiast 4-O-β-D-glukozyd trachelogeniny we frakcjach CT-70-4 (1,852 g) i CT-70-5 (0,625 g). Ponadto we frakcjach CT-70-1 (0,060 g) i CT-70-2 (0,196 g) stwierdzono obecność sekoizolaricirezynolu (RT = 15,0; MS = 361 m/z;  $UV_{max} \lambda = 218 \text{ nm}, 280 \text{ nm}$ ) oraz w samej CT-70-1 śladowe ilości aglikonów trachelogeniny (RT = 22,1; MS = m/z 387 Da;  $UV_{max} \lambda = 220 \text{ nm}, 280 \text{ nm}$ ) i matairezynolu (RT = 22,3; MS = m/z 357 Da;  $UV_{max} \lambda = 219 \text{ nm}, 280 \text{ nm}$ ) (Rysunek 4.).

Z frakcji CT-70-4 i CT-70-5 wyizolowano przy użyciu chromatografii preparatywnej, jednorodny związek (odpowiednio 210 i 129 mg; RT = 11,75-14,00 min). Wyizolowany związek miał postać krystalicznego proszku i był barwy białoróżowej. Jego tożsamość potwierdzono najpierw na podstawie jonu pseudomolekularnego m/z 595 [M-H+HCOOH]<sup>-</sup> i jego fragmentacji – m/z 549 Da [M-H]<sup>-</sup> odpowiadający odłączeniu się adduktu HCOOH, m/z 387 Da [M-H-162]<sup>-</sup> odpowiadający utracie heksozy, m/z 357 Da

$[M-H-162-30]^-$  odpowiadający utracie grupy metoksyłowej i  $m/z$  339 Da  $[M-H-162-48]^-$  odpowiadający jednoczesnej utracie wody i grupy metoksyłowej. Zaobserwowano też charakterystyczne dla lignanów widmo UV ( $UV_{max}$   $\lambda$  = 197 nm, 225 nm i 279 nm). Identyfikację potwierdzono analizą NMR, porównując widma  $^1H$ ,  $^{13}C$  i dwuwymiarowe z danymi literaturowymi [9].



**Rysunek 4.** Chromatogramy frakcji CT-70 rozdzielonych na żelu krzemionkowym przy długości fali 280 nm. (A) frakcja CT-70-1 z zaznaczonymi pikami odpowiadającymi sekoizolaricirezynolu, trachelogeniny i matairezynolu; (B) frakcja CT-70-2 z zaznaczonym pikiem sekoizolaricirezynolu; (C) frakcja CT-70-3 z zaznaczonym pikiem glukozyd matairezynolu; (D) frakcja CT-70-4 z zaznaczonym pikiem glukozyd trachelogeniny; (E) frakcja CT-70-5 z zaznaczonym pikiem glukozyd trachelogeniny.

#### 4. Dyskusja

W owocach krokosza stwierdzano dotychczas obecność takich lignanów jak arktygenina, matairezynol, trachelogenina, sekoizolaricirezynol oraz ich glukozydów [3]. W toku analizy surowca potwierdziliśmy obecność wszystkich wyżej wymienionych aglikonów oraz glukozydów matairezynolu i trachelogeniny. Spośród wymienionych lignanów trachelogenina i jej glukozyd występują w materiale roślinnym stosunkowo rzadko. Ich obecność, oprócz w owocach krokosza, stwierdzono w łodygach *Trachelospermum* Lem. [10], w owocach *Cirsium* Mill. [11] czy *Cynara* L. [12].

Z 500 gramów surowca pozyskaliśmy łącznie 339 mg 4-O- $\beta$ -D-glukozyd trachelogeniny. Zawartość tego związku w owocach krokosza nie była dotąd określona ilościowo, a izolacja najczęściej dotyczyła samego aglikonu. Kuehnl i wsp. wyizolowali 21,8 mg aglikonu trachelogeniny z 1 kg owoców [13]. W rodzaju ostrożeń (*Cirsium* Mill.) glukozyd trachelogeniny występuje w owocach

ilościach sięgających 26,1 mmol/kg, co w przeliczeniu daje około 10 g związku na kilogram surowca [14]. Warto przy tym jednak zwrócić uwagę, że są to wartości wyliczone na podstawie widma HPLC-UV, a nie ilości wyizolowane z surowca roślinnego. W tym kontekście owoc krokosza może być uznany za dość dobre źródło glukozydu trachelogeniny (1,2 mmol/kg; 678 mg na kg surowca), a ponadto, przez swoje przemysłowe zastosowanie, znacznie łatwiej dostępne.

Głównym wyzwaniem w izolacji było odseparowanie glukozydów trachelogeniny i matairezynolu – oba związki miały ten sam czas retencji na kolumnie RP-C18 rozwijanej gradientem wody i acetonitrylu. Pod tym względem kluczowym momentem izolacji była separacja z wykorzystaniem kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym, co pozwoliło na skuteczny rozdział tych lignanów i izolację poszczególnych związków.

## 5. Wnioski

Owoce krokosza barwierskiego mogą stanowić wartościowe źródło 4-*O*-β-D-glukozydu trachelogeniny, a opracowana metoda izolacji tego związku pozwala na łatwe pozyskanie istotnych ilości związku do badań biologicznych.

**Wkład autorski:** Koncepcja, A.K. i A.P.; metodologia, A.P.; ekstrakcja i izolacja, M.K i A.P.; analiza fitochemiczna, A.P.; analiza NMR, M.D.; źródła, M.K. i A.P.; tekst – zasadniczy tekst manuskryptu, A.P. i M.K.; edycja tekstu manuskryptu, A.P. i A.K.; wizualizacja, A.P.; nadzór, A.P. Wszyscy autorzy przeczytali i zaakceptowali opublikowaną wersję manuskryptu.

**Podziękowania:** Marvin był używany do rysowania, wyświetlania i charakteryzowania struktur chemicznych Marvin 17.21.0, Chemaxon (<https://www.chemaxon.com>).

W artykule wykorzystano fragmenty pracy magisterskiej pt. „*Identyfikacja i izolacja lignanów o potencjalnej aktywności biologicznej*” autorstwa magistra farmacji Marcina Kołakowskiego.

Modernizacja spektrometru Bruker 500 MHz, który został wykorzystany do pomiarów NMR przeprowadzonych w tej pracy, została sfinansowana przez fundusze Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Łódzkiego, RPLD.01.01.00-10-0008/18.

**Finansowanie:** Niniejsze badanie nie posiadało zewnętrznego finansowania.

**Konflikt Interesów:** Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

## Odnośniki literaturowe

1. Asgarpanah, J.; Kazemivash, N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chin J Integr Med* 2013, 19, 153-159, doi:10.1007/s11655-013-1354-5.
2. Delshad, E.; Yousefi, M.; Sasannezhad, P.; Rakhshandeh, H.; Ayati, Z. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from Traditional Medicine to Modern Medicine. *Electron Physician* 2018, 10, 6672-6681, doi:10.19082/6672.
3. Zhang, L.L.; Tian, K.; Tang, Z.H.; Chen, X.J.; Bian, Z.X.; Wang, Y.T.; Lu, J.J. Phytochemistry and Pharmacology of *Carthamus tinctorius* L. *Am J Chin Med* 2016, 44, 197-226, doi:10.1142/s0192415x16500130.
4. Zafari, M.; Ebadi, A.; Jahanbakhsh, S.; Sedghi, M. Safflower (*Carthamus tinctorius*) Biochemical Properties, Yield, and Oil Content Affected by 24-Epibrassinosteroid and Genotype under Drought Stress. *J Agric Food Chem* 2020, 68, 6040-6047, doi:10.1021/acs.jafc.9b06860.
5. Zalesak, F.; Bon, D.J.D.; Pospisil, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacol Res* 2019, 146, 104284, doi:10.1016/j.phrs.2019.104284.
6. Qian, X.J.; Jin, Y.S.; Chen, H.S.; Xu, Q.Q.; Ren, H.; Zhu, S.Y.; Tang, H.L.; Wang, Y.; Zhao, P.; Qi, Z.T.; et al. Trachelogenin, a novel inhibitor of hepatitis C virus entry through CD81. *J Gen Virol* 2016, 97, 1134-1144, doi:10.1099/jgv.0.000432.
7. Moura, A.F.; Lima, K.S.B.; Sousa, T.S.; Marinho-Filho, J.D.B.; Pessoa, C.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.D.L.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Araújo, A.J. In vitro antitumor effect of a lignan isolated from *Combretum fruticosum*, trachelogenin, in HCT-116 human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro* 2018, 47, 129-136, doi:10.1016/j.tiv.2017.11.014.
8. Yoo, H.H.; Park, J.H.; Kwon, S.W. An anti-estrogenic lignan glycoside, tracheloside, from seeds of *Carthamus tinctorius*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006, 70, 2783-2785, doi:10.1271/bbb.60290.
9. Jo, A.R.; Han, H.-s.; Seo, S.; Shin, J.-S.; Lee, J.Y.; Kim, H.J.; Lee, K.-T. Inhibitory effect of moschamine isolated from *Carthamus tinctorius* on LPS-induced inflammatory mediators via AP-1 and STAT1/3 inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2017, 27, 5245-5251, doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.035.
10. Tan, X.Q.; Chen, H.S.; Liu, R.H.; Tan, C.H.; Xu, C.L.; Xuan, W.D.; Zhang, W.D. Lignans from *Trachelospermum jasminoides*. *Planta Med* 2005, 71, 93-95, doi:10.1055/s-2005-837761.
11. Boldizsár, I.; Krasznai, M.; Tóth, F.; Noszál, B.; Molnár-Perl, I. Complementary fragmentation pattern analysis by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmed the precious lignan content of *Cirsium* weeds. *J Chromatogr A* 2010, 1217, 6281-6289, doi:10.1016/j.chroma.2010.08.018.
12. Graikou, K.; Kourti, P.M.; Zengin, G.; Gortzi, O.; Danalatos, N.; Chinou, I. Chemical Characterisation-Biological Evaluation of Greek Cultivar Cardoon Seeds (*Cynara cardunculus*). A By-product with Potential High Added Value. *Planta Med* 2021, 87, 1025-1031, doi:10.1055/a-1472-6336.

13. Kuehnl, S.; Schroecksnadel, S.; Temml, V.; Gostner, J.M.; Schennach, H.; Schuster, D.; Schwaiger, S.; Rollinger, J.M.; Fuchs, D.; Stuppner, H. Lignans from *Carthamus tinctorius* suppress tryptophan breakdown via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Phytomedicine* 2013, 20, 1190-1195, doi:10.1016/j.phymed.2013.06.006.
14. Szokol-Borsodi, L.; Sólyomváry, A.; Molnár-Perl, I.; Boldizsár, I. Optimum yields of dibenzylbutyrolactone-type lignans from *Cynareae* fruits, during their ripening, germination and enzymatic hydrolysis processes, determined by on-line chromatographic methods. *Phytochem Anal* 2012, 23, 598-603, doi:10.1002/pca.2360.