

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Studium dimerizace resveratrolu a izolace *trans*- ϵ -viniferinu

Diplomová práce

Bc. Lukáš Toupal

Školitel: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

Školitel - specialista, konzultant: RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.

České Budějovice 2016

Toupal L., 2016: Studium dimerizace resveratrolu a izolace *trans*- ϵ -viniferinu. [Study of resveratrol dimerization and *trans*- ϵ -viniferin isolation. Mgr. Thesis, in Czech.] – 74 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Teoretická část práce je zaměřena na možnosti přípravy dimerů *trans*-resveratrolu, jejich výskyt v rostlinách a možnosti izolace s důrazem na *trans*- ϵ -viniferin.

Experimentální část se zabývá dimerizací *trans*-resveratrolu zvolenými činidly, jmenovitě 2-hydroxy-1,4-naftochinonem, tetrachloro-1,4-benzochinonem, lakázou a chloridem železitým, za různých reakčních podmínek. S cílem přípravy dimerů *trans*-resveratrolu je dále testována Fentonova reakce a její modifikace. Poslední část této práce je věnována izolaci *trans*- ϵ -viniferinu z réví pomocí chromatografických metod.

Annotation

The theoretical part is focused on the preparation of the *trans*-resveratrol dimers, their occurrence in the plants and their isolation possibility with emphasis to *trans*- ϵ -viniferin.

In the experimental part of master thesis the selected reagents, namely 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, tetrachloro-1,4-benzoquinone, laccase and ferric chloride, were studied with the aim of the *trans*-resveratrol dimer preparation. Furthermore, the Fenton reaction and its modification was also studied. Last part of this thesis is devoted to the *trans*- ϵ -viniferin isolation from grape cane by chromatographic methods.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 18. 4. 2016

.....

Poděkování

V této části diplomové práce bych chtěl poděkovat svému školiteli panu prof. Ing. Janu Třískovi, CSc. za skvělé vedení diplomové práce, cenné rady a připomínky k této práci. Dále bych chtěl poděkovat paní RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí, cenné rady a za ochotu mi kdykoliv a s čímkoliv pomoci. Dále bych chtěl poděkovat paní Ing. Jarmile Bočkové za poskytnutí některých chemikálií použitých v této práci. Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Janu Sýkorovi, Ph.D. (Ústav chemických procesů AV ČR) za změření NMR spekter. Velký dík samozřejmě patří i mé rodině, která mě během mého studia velice podporuje.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Cíle práce.....	2
2	Rešeršní část	2
2.1	Výskyt v rostlinách.....	4
2.1.1	Čeleď jesencovité (Celastraceae)	6
2.1.2	Čeleď šáchorovité (Cyperaceae)	6
2.1.3	Čeleď dvojkřídláčovité (Dipterocarpaceae)	6
2.1.4	Čeleď bobovité (Fabaceae, syn. Leguminosae, Papilionaceae)	8
2.1.5	Čeleď liánovcovité (Gnetaceae)	9
2.1.6	Čeleď welwitschiovité (Welwitschiaceae)	9
2.1.7	Čeleď rdesnovité (Polygonaceae)	10
2.1.8	Čeleď kosatcovité (Iridaceae)	10
2.1.9	Čeleď morušovníkovité (Moraceae)	11
2.1.10	Čeleď pivoňkovité (Paeoniaceae)	11
2.1.11	Čeleď révovité (Vitaceae)	11
2.1.12	Čeleď borovicovité (Pinaceae)	11
2.2	Dimerizace.....	12
2.2.1	Biomimetické a nebiomimetické syntézy	12
2.2.1.1	Celková syntéza dimerů	15
2.2.1.2	Fototransformace.....	19
2.2.2	Biotransformace a enzymatické párování	20
2.2.2.1	Dimerizace lakázami	20
2.2.2.2	Dimerizace houbovými patogeny	22
2.2.2.3	Dimerizace peroxidázami.....	23
2.3	Fentonova reakce.....	24
3	Experimentální část	26
3.1	Materiál a metody.....	26
3.1.1	Chemikálie	26
3.1.2	Přístroje	26
3.1.2.1	HPLC Metoda	26
3.1.2.2	LC-MS Metoda	27
3.1.3	Dimerizace <i>E</i> -resveratrolu lakázou	28
3.1.4	Dimerizace <i>E</i> -resveratrolu 2-hydroxy-1,4-naftochinonem	29
3.1.5	Dimerizace <i>E</i> -resveratrolu tetrachloro-1,4-benzochinonem	30
3.1.5.1	Vliv vody na reakci	30

3.1.6	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> chloridem železitým.....	31
3.1.6.1	Vliv reakční doby.....	31
3.1.6.2	Vliv UV záření na reakci.....	32
3.1.6.3	Vliv vody na reakci.....	32
3.1.7	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> pomocí Fentonovy reakce.....	34
3.1.7.1	Fentonova reakce s FeSO ₄	34
3.1.7.2	Fentonova reakce s CuSO ₄	35
3.1.7.3	Fentonova reakce s CuSO ₄ - vliv okyselení.....	35
3.1.7.4	Fentonova reakce s CuSO ₄ - vliv teploty.....	36
3.1.7.5	Optimalizace čištění extrakcí tuhou fází.....	36
3.1.7.6	Fentonova reakce s CuSO ₄ při použití karbamidperoxidu.....	37
3.1.8	Izolace <i>E-ε-viniferinu</i> z réví pomocí chromatografických metod.....	38
4	Výsledky.....	39
4.1	Kalibrace.....	39
4.2	Naměřená data.....	39
4.2.1	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> lakázou.....	40
4.2.2	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> 2-hydroxy-1,4-naftochinonem.....	41
4.2.3	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> tetrachloro-1,4-benzochinonem.....	42
4.2.4	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> chloridem železitým.....	44
4.2.5	Dimerizace <i>E-resveratrolu</i> pomocí Fentonovy reakce.....	48
4.2.5.1	Fentonova reakce s CuSO ₄ - vliv okyselení.....	50
4.2.5.2	Fentonova reakce s CuSO ₄ - vliv teploty.....	51
4.2.5.3	Optimalizace čištění extrakcí tuhou fází.....	51
4.2.5.4	Fentonova reakce s CuSO ₄ při použití karbamidperoxidu.....	52
4.2.6	Izolace <i>E-ε-viniferinu</i> z réví pomocí chromatografických metod.....	53
5	Diskuze výsledků.....	54
6	Závěr.....	60
7	Reference.....	61
8	Seznam použitých zkratek.....	73
9	Přílohy.....	74

1 Úvod

Rostlinné polyfenoly přitahovaly velikou pozornost lidí na celém světě v minulých desetiletích pro jejich pozitivní účinek na lidský organismus. Mezi takové polyfenoly lze počítat i stilbeny. Stilbeny jsou z chemického hlediska dvě benzenová jádra spojená ethylenovým můstkem. Stilbeny spadají do skupiny látek zvaných fytoalexiny, které hrají významnou roli v ochraně rostlin před biotickým i abiotickým stresem ⁽¹⁾.

Resveratrol je právě taková přírodní polyfenolická sloučenina nacházející se v celé řadě rostlin, jejichž plody jsou na jídelníčku lidí odjakživa. Jmenovitě lze zmínit hrozny révy vinné, ořechy (např. arašídý), řadu druhů zeleniny (např. zelí, kapusta, brokolice, česnek, cibule...) ^(2,3), moruše, borůvky, brusinky či žakie ⁽⁴⁾. Strukturální název resveratrolu je 3,4',5-trihydroxystilben.

Nicméně resveratrol je pouze jednou sloučeninou z velice rozmanité skupiny stilbenů. V minulých letech byly prokázány pozitivní účinky jak monomerních, tak oligomerních stilbenů na lidské zdraví. Mezi tuto pozoruhodnou řadu biologických účinků lze také počítat schopnost potlačit růst a vývoj rakovinných buněk ^(4,5), antioxidační ⁽⁶⁾, antibakteriální ⁽⁷⁾, antimykotické ^(8,9), modulovat metabolismus lipidů ⁽¹⁰⁾, pozitivní účinek na kardiovaskulární soustavu ⁽¹¹⁾, pozitivní účinek proti stárnutí a angiogenezi ⁽¹²⁾ a mnoho dalších. Za zdůraznění snad stojí nedávno objevené vlastnosti δ -viniferinu: mírné antioxidační účinky a účinky chránící před oxidací hemoglobinu ⁽¹³⁾, protizánětlivé účinky na lipopolysacharid stimulovaný makrofágy myši ⁽¹⁴⁾, účinky vykazující přímou cytotoxicitu vybraných rakovinných buněk nejen pro δ -viniferin, ale i další oligomery ⁽¹⁵⁾, či léčebné účinky patologických neurodegenerativních chorob, mezi které se řadí Alzheimerova choroba ⁽¹⁶⁾.

Biologickým aktivitám oligomerů a polymerů resveratrolu je velice málo porozuměno. Příčinou je bezpochyby omezená dostupnost těchto sloučenin, zejména proto, že naprostá většina z nich může být v současnosti získána pouze prostřednictvím izolace z rostlinných materiálů. Hlavním cílem této práce je tedy snaha najít jednoduchý způsob přípravy *E- ϵ* -viniferinu a též i jeho izolace z révy vinné. Réva se pro tento účel zdá být velice lukrativním zdrojem, protože každoročně jsou rok staré výhony révy (dále jen réví) z vinice odstraňovány prořezáváním. Navíc jsou bohaté právě na *E*-resveratrol a zmíněný dimer *E- ϵ* -viniferin ⁽¹⁷⁾.

Výzkum stilbenů i nadále pokračuje, protože se předpokládá, že tyto sloučeniny budou vykazovat i další, doposud nepopsané biologické účinky a pomohou zemědělsky a ekonomicky významným rostlinným druhům více odolávat patogenům.

1.1 Cíle práce

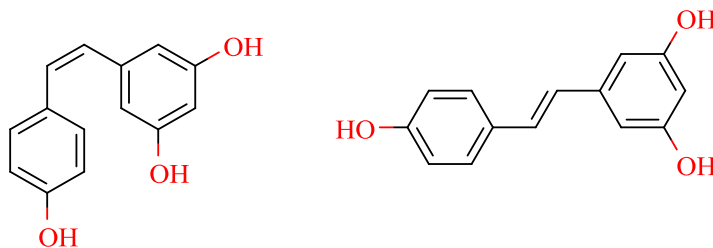
Resveratrol a jeho oligomery jsou v současnosti vzhledem ke svým významným biologickým vlastnostem předmětem zájmu široké vědecké komunity. Hlavním cílem diplomové práce bylo:

- vypracovat literární přehled možností přípravy dimerů resveratrolu, jejich výskytu v rostlinách a možností izolace s důrazem na *E-ε*-viniferin
- studium dimerizace resveratrolu pomocí vhodně zvolených činidel, např. chlorperoxybenzoová kyselina, chloranil, 2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon a stanovení produktů pomocí HPLC
- otestovat možnost použití lakázy a UV záření pro přípravu *E-ε*-viniferinu
- pokusit se pomocí chromatografických metod izolovat čistý *E-ε*-viniferin z réví jakožto perspektivní suroviny pro tyto účely a charakterizovat čistou látku pomocí dostupných analytických metod, zejména hmotnostní spektrometrie

2 Rešeršní část

Podle současné zkušenosti je běžně používána *trans* a *cis* nomenklatura pro popisování stereochemie nasycených kruhů, zatímco *E/Z* nomenklatura k popisu stereochemie dvojných vazeb. Z tohoto důvodu jsou triviální názvy sloučenin zmíněné v této práci (spolu se synonymy uvedenými v literatuře) následující: *Z*-resveratrol (*cis*-resveratrol); *E*-resveratrol (*trans*-resveratrol); *Z-ε*-viniferin (*cis-ε*-viniferin); *E-ε*-viniferin (*trans-ε*-viniferin); *Z-ω*-viniferin (*cis-ω*-viniferin, dehydrodimer *cis-cis*-resveratrolu); *E-ω*-viniferin (*trans-ω*-viniferin, dehydrodimer *cis-trans*-resveratrolu); *E-δ*-viniferin (*trans-δ*-viniferin, *trans*-resveratrol dehydrodimer), r2-viniferin (vitisin A). Především v kapitole 2.1 jsou uváděny optické izomery oligomerů resveratrolu (např. (-)-*ε*-viniferin a (+)-*ε*-viniferin).

Resveratrol je sloučenina vyskytující se ve dvou izomerních formách *Z*-resveratrol a *E*-resveratrol. Na obrázku 1 jsou znázorněny obě tyto izomerní formy resveratrolu.



Obrázek 1: Strukturální vzorec *Z*- a *E*-resveratrolu.

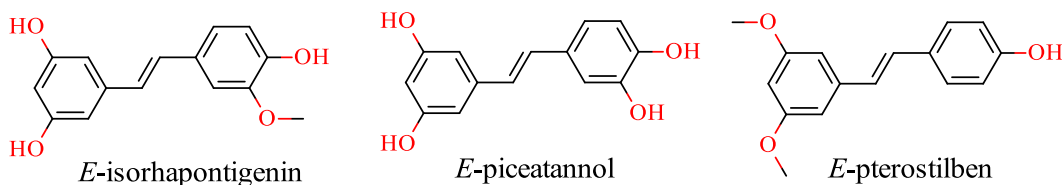
Řadou studií bylo prokázáno, že resveratrol je biologicky aktivní, má výrazné antioxidační vlastnosti a pohlcuje volné radikály⁽²⁾. Resveratrol byl poprvé objeven v kořeni

kýchavice velkokvěté již v roce 1940 ⁽¹⁸⁾. Nejbohatší přírodní zdroj *E*-resveratrolu je v křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*) ⁽¹⁹⁾.

Největší pozornost však přitahuje *E*-resveratrol jako látka vyskytující se v révě vinné. Jen v průběhu minulého desetiletí bylo publikováno nesčetně prací věnovaných výskytu *E*-resveratrolu či jeho oligomerů právě v révě vinné a to bez ohledu, zda byly práce zaměřeny na jeho výskyt v réví ^(17, 20–22), listech ⁽²³⁾, kůře ⁽²⁴⁾ či celé mladé rostlině ⁽²⁵⁾. Jeho objev ve víně zapříčinil právě tento zájem ⁽²⁶⁾. Navíc byl velice příhodný zejména proto, že o rok později bylo prokázáno, že ve víně se vyskytující polyfenoly významně inhibují oxidaci mastných kyselin, která je hlavním příspěvkem arteriosklerózy ⁽¹⁰⁾.

První oligomer *E*-resveratrolu (hopeafenol) byl izolovaný z *Hopea odorata* a *Balanocarpus heimii* před přibližně 50 lety ⁽²⁷⁾. Jeho charakterizace proběhla pomocí rentgenové difrakce ^(28, 29). Od té doby bylo charakterizováno přibližně 100 dimerů *E*-resveratrolu ať už přírodních či syntetických.

Oligomery se vykazují řadou velice rozmanitých účinků, z nichž nejznámější jsou antioxidační. Antioxidační vlastnosti oligomerů derivátů *E*-resveratrolu spolu se vztahy mezi jejich strukturou a aktivitou jsou detailně shrnuty v review z roku 2013 ⁽³⁰⁾. Oligomery stilbenů jsou nejrozšířenější v přírodě z celé skupiny polyfenolických sloučenin. Jejich struktura je založena na *E*-resveratrolu a jeho derivátech (zejména isorhapontigenin ⁽³¹⁾ pterostilben a piceatannol ⁽³²⁾).



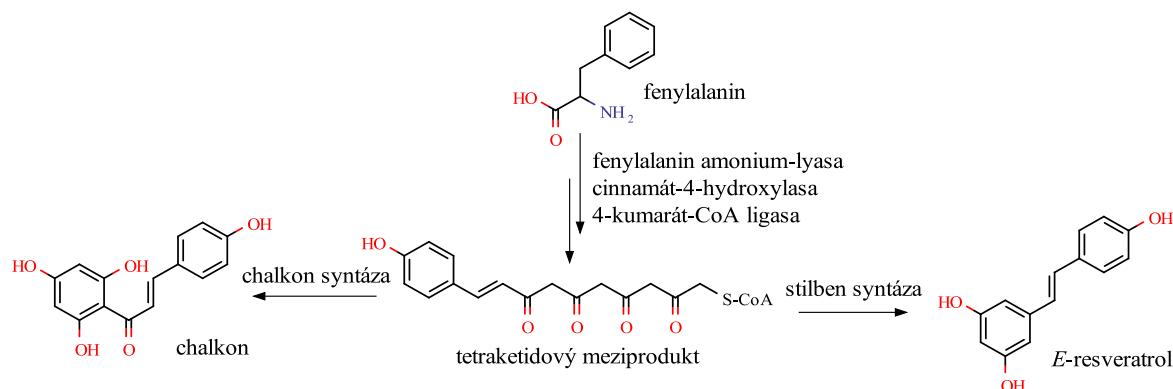
Obrázek 2: Strukturální vzorce přírodních derivátů *E*-resveratrolu.

2.1 Výskyt v rostlinách

Rostliny jsou ve svém přirozeném prostředí napadány velkým počtem potencionálně patogenních mikroorganismů, hlavně se jedná o houby, bakterie a viry. Takovéto napadení je označováno jako biotický stres. Konstitutivní obranu rostlin tvoří strukturální bariéry (např. vosky, kutin, suberin, lignin, fenoly, celulóza a proteiny buněčné stěny), které jsou obvykle posíleny při infekci⁽³³⁾. Obranná reakce může být aktivována nejen jako odpověď na infekci patogenními mikroorganismy ale i též na abiotický stres. Mezi abiotický stres se řadí působení UV-C záření^(34, 35) nebo působení chemikálií (respirační inhibitory, povrchově aktivní látky, antibiotika, regulátory růstu, soli kovů, elicitory uvolněné patogeny nebo produkty vzniklé z činnosti houbových degradačních enzymů)⁽³⁶⁾.

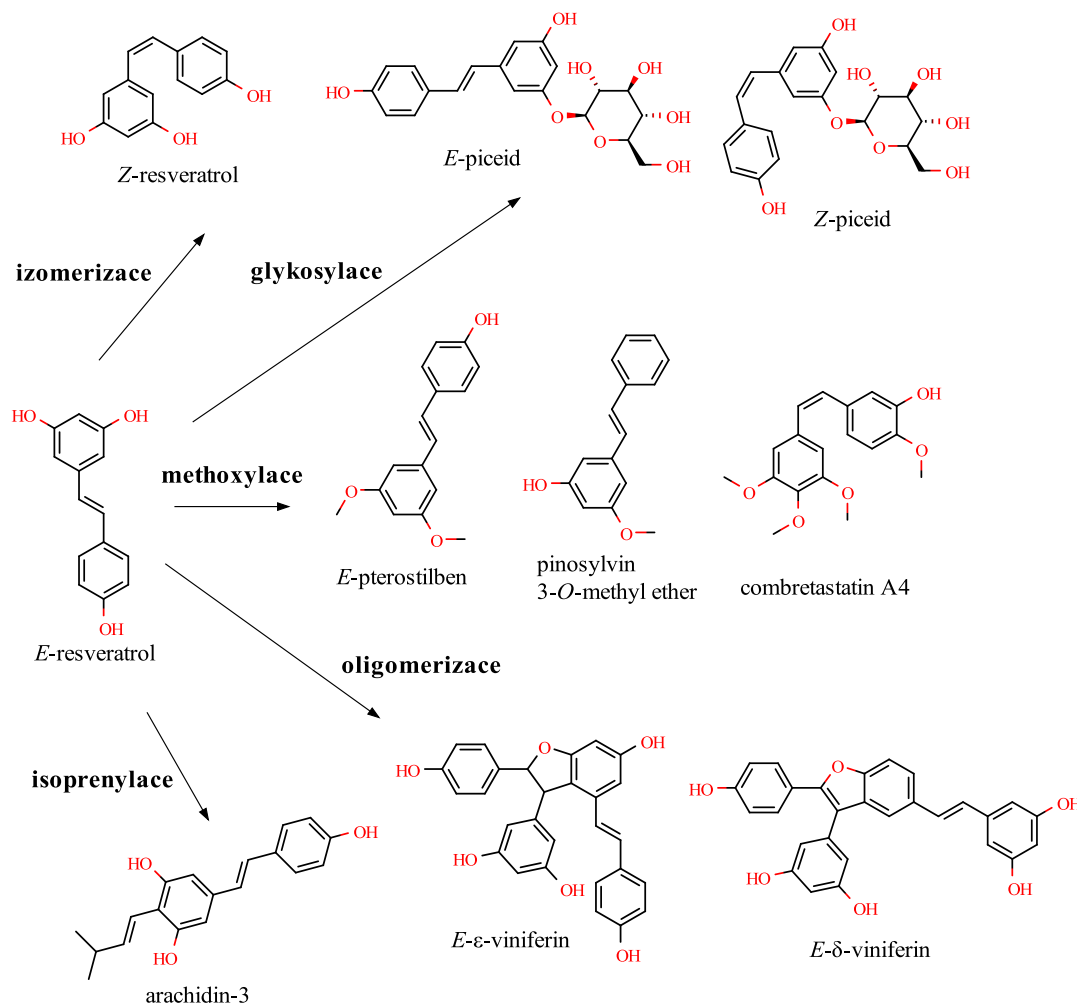
Obranná reakce je nejlépe popisována akumulací fytoalexinů a syntézou proteinů souvisejících s patogenezí⁽³⁷⁾. Fytoalexiny jsou nízkomolekulární antimikrobiální sekundární metabolity rostlin. Bylo ukázáno, že fytoalexiny mají biologickou aktivitu proti širokému počtu patogenů a jejich přítomnost může být považována jako známka rezistence k nemocem. Přestože většina fytoalexinů je méně fytotoxická než syntetické fungicidy, rostliny jsou schopny akumulovat v pletivech fytoalexiny ve velkém množství. Tím pak vytvoří koncentrace mnohem větší, než jsou nezbytné k inhibici růstu houbového patogenu⁽³⁵⁾. Mezi fytoalexiny spadá nepřeberné množství látek, z nichž nejznámější skupinou jsou pravděpodobně stilbeny.

Stilbeny jsou menší skupinou sekundárních metabolitů odvozené od fenylypropanoidů. Jsou tvořené mnohými rostlinami nepříbuzných druhů z fenylyalaninu pomocí několika enzymů, z nichž nejdůležitější je stilben syntáza (obr. 3). Stilbeny byly stanoveny a popsány v rostlinách s různými cíli. Například se jednalo o popis vztahů mezi rostlinou a patogenem⁽³⁸⁾, nebo vystavení UV záření⁽³⁴⁾.



Obrázek 3: Biosyntéza *E*-resveratrolu (převzato z^(2, 38)).

Langcake a Pryce popsali, že *E*-resveratrol není efektivní antimykotická látka a je přeměňován na více účinné látky (např. jeho dimer ϵ -viniferin či trimer α -viniferin) ^(34, 39). Samotný *E*-resveratrol by se tedy nezdál býti fytoalexinem, ale jeho tvorba má za následek přeměnu na více účinné oligomery o obvykle 2 až 8 jednotkách *E*-resveratrolu. Kromě oligomerů se může *E*-resveratrol přeměňovat na řadu dalších sloučenin ⁽³⁸⁾, jejichž struktura je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4: Nejčastější přeměny rostlinných stilbenů (převzato z ⁽³⁸⁾).

Samotný resveratrol byl nalezen u více než 72 rostlinných druhů, které spadají do 31 rodů a 12 čeledí. Spolu s rozvojem analytických metod tyto čísla narůstají ⁽²⁾. V říši rostlin bylo charakterizováno více než 1000 stilbenů. Stilbeny byly popsány v řadě vzdáleně příbuzných rostlinných čeledí zahrnující jesencovité (Celastraceae), šachorovité (Cyperaceae), dvojkřídláčovité (Dipterocarpaceae), bobovité (Fabaceae), liánovcovité (Gnetaceae), welwitschiovité (Welwitschiaceae), rdesnovité (Polygonaceae), kosatcovité (Iridaceae), morušovníkovité (Moraceae), pivoňkovité (Paeoniaceae) a révovité (Vitaceae).

2.1.1 Čeleď jesencovité (Celastraceae)

Jesencovité jsou čeleď dvouděložných rostlin zahrnující přibližně 90 rodů a 1300 druhů. V této čeledi byly objeveny 4 stilbeny, které byly izolovány z kůry salacie (*Salacia lehmbachii*) pocházející z Papuy-Nové Guineje. Tyto stilbeny byly pojmenovány lehmbacholy A – D ⁽⁴⁰⁾.

2.1.2 Čeleď šáchorovité (Cyperaceae)

Čeleď šáchorovité zahrnuje suchozemské, pobřežní či bahenní rostliny podobné travám. Tato čeleď zahrnuje rody bahnička (*Eleocharis*), bezosetka (*Isolepis*), hrotnosemenka (*Rhynchospora*), kamýšek (*Scirpoides*), kamyšník (*Bolboschoenus*), ostřice (*Carex*), mařice (*Cladium*), sklovka (*Scleria*), skřípina (*Scirpus*), skřípinec (*Schoenoplectus*), skřípinka (*Blysmus*), suchopýr (*Eriophorum*), suchopýrek (*Trichophorum*), šáchor (*Cyperus*), šáchorek (*Pycneus*), šášina (*Schoenus*), tuřička (*Kobresia*), uncinie (*Uncinia*) ⁽⁴¹⁾.

V kořeni a oddenku ostřice (*Carex pumila*) byly identifikovány fenoly: ϵ -viniferin, miyabenol C a A ⁽⁴²⁾. V jiné studii byl objeven v podzemní části této ostřice kobofenol B. Jedná se tetramer tvořený dvěma jednotkami ϵ -viniferinu ⁽⁴³⁾. Jiný druh ostřice (*C. kobomugi*) obsahoval též v kořeni a oddenku ϵ -viniferin a miyabenol C. Kromě těchto dvou stilbenů byl přítomen i další stilben. Jednalo se o tetramer resveratrolu a byl pojmenován kobofenol A ⁽⁴⁴⁾.

Semena skřípiny (*Scirpus maritimus*) obsahovaly resveratrol, piceatannol, ϵ -viniferin, scirpusin A (dehydrodimer resveratrolu a piceatannolu) a scirpusin B (dehydrodimer piceatannolu) ⁽⁴⁵⁾.

2.1.3 Čeleď dvojkřídláčovité (Dipterocarpaceae)

Do čeledi dvojkřídláčovitých patří rody dvojkřídláč (*Dipterocarpus*), hopea (*Hopea*), nestejnokřídlatec (*Anisoptera*), pětikřídlatec (*Dryobalanops*), shorea (*Shorea*) a vaterie (*Vateria*) spolu s rody *Cotylelobium*, *Marquesia*, *Monotes*, *Neobalanocarpus*, *Pakaraimaea*, *Parashorea*, *Stemonoporus*, *Upuna*, *Vateriopsis*, *Vatica*, jež nemají české názvy ⁽⁴¹⁾.

Dvojkřídláče jsou středně velké až velké stromy s úzkou kopulovitou korunou. Jejich plody jsou jednosemenné nepukavé tobolky, které mají létající zařízení v podobě dvou křídel. Právě pro toto charakteristického zařízení jim bylo uděleno jejich jméno. Mezi dvojkřídláče patří kolem 70 druhů ⁽⁴⁶⁾. U jednoho ze zástupců (*Dipterocarpus hasseltii*) byly nalezeny oligomery resveratrolu (–)- ϵ -viniferin, laevifonol, (–)- α -viniferin, vaticanol B, (–)-hopeafenol a tetramer resveratrolu diptoindonesin E ⁽⁴⁷⁾.

Rod *Vatica* obsahuje okolo 65 druhů. Zástupci tohoto rodu jsou malé až středně vysoké stromy běžně se vyskytující na ostrově Borneo a v oblasti Malajského poloostrova v jihovýchodní Asii. Zástupci tohoto rodu jsou obtížně rozpoznatelné, což činí tento rod málo známý⁽⁴⁸⁾. Ve stonku druhu *Vatica diospyroides* byl objeven cytotoxický tetramer resveratrolu vaticafenol A spolu s *E*-resveratrolem a dalším jeho tetramerem vaticafenolem A⁽⁴⁹⁾. Dále lze zmínit stilbeny vaticanol A – C, resveratrol, piceid, ϵ -viniferin⁽⁵⁰⁾ a hexamer resveratrolu vaticanol D⁽⁵¹⁾, které byly objeveny v kůře *V. rassak*. Ve stonku dalšího zástupce (*V. albiramis*) tohoto rodu byly nalezeny glukosidy tetramerů resveratrolu vatalbinosid A – E s 13 dříve popsánymi stilbeny: (–)-hopeafenol, vaticanol B, vaticacid B a C, *E*- ϵ -viniferin, balanocarpol, ampelopsin A, vaticanol C, stenofyllol C, piceid, *Z*- ϵ -viniferin, vateriafenol A a bergenin⁽⁵²⁾. Jako posledního zástupce lze uvést druh *V. oblongifolia*, v níž byly nalezeny tetramery resveratrolu hopeafenol A, isohopeafenol A a vaticafenol A⁽⁵³⁾.

Rod *Hopea* zahrnuje přes 100 druhů nacházející se od jižní Indie přes jižní Čínu do Malajsie. Jedná se hlavně o stromy patřící většinou do vrchního stromového patra či středního stromového patra. Tyto stromy obvykle rostou v nadmořské výšce mezi 800 – 1600 m. Značná variabilita vaječníků, listů a kůry činí zástupce tohoto rodu nejrozmanitější v čeledi dvojkřídláčovitých⁽⁴⁸⁾. *Hopea chinensis* se vyznačuje přítomností oligostilbenů hopeachinol A a B spolu s potencionálně imunopresivním polyfenolem diptoindonesinem G, které byly charakterizovány v kmenové kůře⁽⁵⁴⁾. Další analýzy kůry odhalily přítomnost 5 oligomerů resveratrolu a dva polyfenoly pojmenované hopeachinol C a D⁽⁵⁵⁾. Nedávno byly nalezeny v kmenové kůře ještě další stilbeny a to hopeachinol E – I⁽⁵⁶⁾. Kůra druhu *H. parviflora* obsahuje (+)-parviflorol, (–)-ampelopsin, (+)-balanocarpol, (–)- ϵ -viniferin a (–)-hopeafenol⁽⁵⁷⁾. V kmenu byly dále nalezeny pentamery hopeacid A a B, trimer hopeacid C a dimer hopeacid D spolu s devíti dalšími oligomery resveratrolu: malibatol, ampelopsin A, balanocarpol, piceid, vateriafenol B, (–)-hopeafenol, pauciflorol C, grandifenol A a vatalbinosid A⁽⁵⁸⁾. Z kmenové kůry druhů *H. odorata*, *H. mengarawan* a *H. nigra* bylo izolováno 7 derivátů resveratrolu. Mezi které se řadil balanocarpol, heimiol A, vaticanol G, vaticanol B, hopeafenol, ampelopsin H a hemlesyanol C⁽⁵⁹⁾. Kmenová kůra dalšího zástupce (*H. gregaria*) obsahuje 6 dimerů: ampelopsin A, balanocarpol, ϵ -viniferin, hopeafuran, heimiol A a parviflorol⁽⁶⁰⁾.

Rod *Shorea* (*Shorea*) je pojmenován po guvernérovi Johnu Shoreovi. Lze napočítat 196 druhů spadajících do tohoto rodu v oblasti od jižní Asie přes Malajsii do Filipín, Jávy a Moluky. Dále je 138 druhů známých na ostrově Borneo, z nichž je 91 endemických⁽⁴⁸⁾. V kořeni *Shorea roxburghii* byl nově objeven dimer resveratrolu roxburghiol A a s ním byly

nalezeny stilbeny vaticanol A, (–)-hopeafenol, isohopeafenol, apigenin 7-O-arabinosid, *E*-piceid a 2-C-glykosid *E*-resveratrolu⁽⁶¹⁾. Nedávno bylo nalezeno 20 stilbenů a oligostilbenů v kůře tohoto druhu. Mezi nimi lze zdůraznit dimery resveratrolu: (+)-parviflorol, malibatol A a B, (–)-ampelopsin A, (–)-balanocarpol, hopeafuran, dále lze zdůraznit trimery resveratrolu: pauciflorol A, (+)- α -viniferin, vaticanol A, E a G spolu s jeho tetramery: (–)-hopeafenol, (+)-isohopeafenol, hemsleyanol D, (–)-ampelopsin H, vaticanol B, C⁽⁶²⁾. V kůře jiného zástupce (*S. hemsleyana*) byly zjištěny stilbeny hemsleyanosid A – D⁽⁶³⁾. Kmenová kůra dalšího ze zástupců rodu *shorea* (*S. acuminata*) obsahovala dimer resveratrolu acuminatol spolu se stlibeny laevifonol, (–)- α -viniferin, shoreaketon, vaticanol B a (–)-hopeafenol⁽⁶⁴⁾.

2.1.4 Čeleď bobovité (Fabaceae, syn. Leguminosae, Papilionaceae)

Čeleď bobovité zahrnuje stromy, keře a byliny. Řadí se do ní přibližně 700 rodů čítající asi 18000 druhů rozšířených po celém světě, obzvláště v tropických oblastech. Mnohé rostliny této čeledi jsou ekonomicky důležité. Využívá se jejich dřevo, plody a pěstují se i pro okrasný efekt⁽⁴⁶⁾. Stilbeny byly popsány zejména v rostlinách rodu jerlín (*Sophora*) a čimišník (*Caragana*).

Zástupci rodu jerlín jsou opadavé nebo stálezelené stromy, keře nebo vytrvalé byliny. Existuje asi 70-80 druhů rozšířených v tropických a mírných pásech⁽⁴⁶⁾. Kořen jerlínu vikvolistého (syn. jerlín Davidův; *Sophora davidii*) obsahuje kromě nezmíněných fenolů následující oligomery stilbenů davidiol A – C, leachianon A, miyabenol C, α -viniferin, ε -viniferin⁽⁶⁵⁾ a prvně popsáný přírodní pentamer resveratrolu davidiol D⁽⁶⁶⁾. Kořen dalšího jerlínu (*S. leachiana*) obsahuje pět oligostilbenů pojmenovaných leachinol C – G⁽⁶⁷⁾. Leachinol C je tetramer tvořený pallidolem a dvěma jednotkami *E*-resveratrolu⁽⁶⁸⁾. Navazující práce dále v kořeni této rostliny odhalily přítomnost stilbenů (–)- ε -viniferin, hopeafenol, nově popsáný leachianon I⁽⁶⁹⁾ a později ještě flavonostilbeny alopecuron A – F⁽⁷⁰⁾. Další výzkum jiného druhu jerlínu (*S. moorcroftiana*) ukázal přítomnost pěti oligomerů resveratrolu: (–)- ε -viniferin, (+)- α -viniferin, miyabenol C, *cis*-miyabenol C a trimer pojmenovaný soforastilben A⁽⁷¹⁾. V kořenu dalšího druhu jerlínu (*S. stenophylla*) byly nalezeny dva nové tetramery resveratrolu stenopyllol A a C, jeden nový trimer resveratrolu stenopyllol B spolu se stlibeny davidiol B, (–)- ε -viniferin a (–)-hopeafenol⁽⁷²⁾.

V rodu čimišník se nachází asi 100 druhů. Čimišníky jsou většinou opadavé keře výjimečně menší stromy⁽⁷³⁾. V kořeni čimišníku (*Caragana sinica*) se nacházejí stilbeny (+)- α -viniferin, miyabenol C, pallidol a kobofenol A⁽⁷⁴⁾. Dále byl nalezen v kořeni čimišníku

trimer resveratrolu carafenol A, (+)-isoampelopsin F, carafenol B a C, (-)-ampelopsin F ⁽⁷⁵⁾. Později bylo dokázáno, že kořen této rostliny produkuje i dva tetramery resveratrolu carasinol B a kobofenol A ⁽⁷⁶⁾. Kořen jiného čičišníku (*C. chamlague*) obsahuje též (+)- α -viniferin a kobofenol A ⁽⁷⁷⁾.

2.1.5 Čeleď liánovcovité (Gnetaceae)

Rostliny spadající do této čeledi se vyskytují v subtropických a tropických oblastech. Jedná se většinou o popínavé rostliny zřídka malé stromky či keře ⁽⁷⁸⁾.

Rod liánovce (*Gnetum*) obsahuje přibližně 40 druhů rostoucích převážně v Asii a Oceánii. Rostliny v tomto rodu jsou známé pro vysoký obsah stilbenů. Mnohé z nich jsou odedávna používány v lidové medicíně. Dřevo liánovců (*Gnetum leyboldii* a *G. schwackeanum*) obsahuje gnetiny A – E ⁽⁷⁹⁾. Liánovec jedlý (*G. gnemon*) obsahuje resveratrol, isorhapontigenin, gnemonosid D, gnetin C a E spolu s nově popsányými stilbeny gnemonosid L a M ⁽⁸⁰⁾. Kořenový extrakt tohoto liánovce v jiné práci ukázal přítomnost stilbenů gnemonol A a B ⁽⁸¹⁾. V navazujících pracích bylo v kořeni tohoto liánovce popsáno několik dalších derivátů stilbenů a to ampelopsin E, Z-ampelopsin E, gnetin C, D a E gnemonoly G (dimer resveratrolu), H, I, J (trimery resveratrolu) ⁽⁸²⁾ později i gnemonoly K a L (trimery resveratrolu), gnemonol M (dimer isorhapontigeninu) a gnemonosid K (glukosid trimeru resveratrolu) ⁽⁸³⁾. V endospermu tohoto liánovce byl dále identifikován gnetin L spolu s dříve určenými stilbeny: resveratrol, gnetin C, gnemonosid A, C a D ⁽⁸⁴⁾. Stonek jiného liánovce (*G. latifolium*) obsahuje nově popsáný trimer latifolol spolu s pěti dalšími stilbeny (resveratrol, ϵ -viniferin, gnetiny E, D a C) ⁽⁸⁵⁾. Pokračující práce zabývající se stilbeny v liánovcích odhalila v dalším liánovci (*G. gnemonoides*) přítomnost stilbenů gnemonosid A – D spolu s *E*-resveratrolem, gnetiny C, D a E ⁽⁸⁶⁾. V navazujícím roce byly ve stonku tohoto liánovce nalezeny stilbeny gnemonol C, gnemonosid E a gnetal ⁽⁸¹⁾. Pět dalších dimerů resveratrolu (gnetuhainin A – E) bylo izolováno spolu s resveratrolem, ϵ -viniferinem a δ -viniferinem z lián liánovce (*G. hainanense*) ⁽⁸⁷⁾.

2.1.6 Čeleď welwitschiovité (Welwitschiaceae)

V některých klasifikacích bývá tato čeleď zahrnována do čeledi liánovcovitých. Dřevo welwitschie podivné (*Welwitschia mirabilis*) mimo další látky obsahuje dehydrodimery resveratrolu gnetin F a G a trimery gnetin H a I ⁽⁸⁸⁾. Stonek welwitschie podivné obsahuje glukosidy trimerů resveratrolu pojmenované mirabilosid C – F spolu s resveratrolem, gnemonosidem B a gnetinem C ⁽⁸⁹⁾.

2.1.7 Čeleď rdesnovité (Polygonaceae)

Čeleď rdesnovité zahrnuje 45 rodů čítající asi 800 druhů ⁽⁹⁰⁾. Doposud byly nalezeny stilbeny v rodech *Calligonum* ⁽⁹¹⁾, opletka (*Fallopia*), truskavec (*Polygonum*) ⁽⁹²⁾, reveň (*Rheum*) ⁽⁹³⁾, šťovík (*Rumex*) ⁽⁹⁴⁾.

Rod reveň obsahuje přibližně 60 druhů, jehož zástupci se hlavně nachází v Asii v nadmořských výškách 1800 - 2300 m.n.m, což odpovídá subalpínské a zčásti alpínské zóně. Podzemní část reveně je znám jako „Da-Huang“ a je součástí tradiční lidové medicíny při léčbě zácpy, zánětu, selhání ledvin a infekčního onemocnění. Kořen reveně (*Rheum lhasaense*) obsahuje stilbeny maximol A, gnetin C, ϵ -viniferin, a pallidol spolu s nově identifikovanými trimery resveratrolu rheumlhasol A a B ⁽⁹³⁾.

Jednou z nejbohatších rostlin na *E*-resveratrol je křídlatka japonská ⁽⁹²⁾. Vědecké pojmenování křídlatky japonské (*Fallopia japonica*, syn. *Polygonum japonicum*, *P. cuspidatum*, *Pleuropterus zuccarinii* a *Reynoutria japonica*) a její zařazení se v důsledku podrobnějších studií příbuzenských vztahů mění ⁽⁹⁵⁾.

2.1.8 Čeleď kosatcovité (Iridaceae)

Do čeledi kosatcovitých patří byliny jako acidantera (*Acidanthera*, syn. *Iris*), aristea (*Aristea*), babiana (*Babiana*), badil (*Sisyrinchium*), cypela (*Cypella*), černohlávka (*Melasphaerula*), dierama (*Dierama*), dietes (*Dietes*), diplarena (*Diplarrena*), duhovnice (*Ixia*), ferárie (*Ferraria*), frézie (*Freesia*), herbertka (*Herbertia*), kosatcovník (*Gynandris*, syn. *Moraea*), kosatec (*Iris*), lapéruzie (*Lapeirousia*), libercie (*Libertia*), mečík (*Gladiolus*), montbrécie (*Crocsmia*), morea (*Moraea*), neomarika (*Neomarica*), romulea (*Romulea*), sparaxis (*Sparaxis*), šafrán (*Crocus*), tritonie (*Tritonia*), tygřice (*Tigridia*), vršřala (*Geissorhiza*), watsonie (*Watsonia*), zárubka (*Witsenia*) ⁽⁴¹⁾. Mnohé z nich jsou využívány pro okrasný efekt.

Kosatec je rod jednoděložných rostlin. Tento rod byl pojmenován po řecké bohyni Iris kvůli široké rozmanitosti barev květů ⁽⁹⁶⁾. Semena kosatce (*Iris halophila*) obsahují monomerní stilben halofilol A, tetramer resveratrolu halofilol B, resveratrol, ϵ -viniferin a γ -2-viniferin ⁽⁹⁷⁾. V methanolovém extraktu semen jiného kosatce (*I. clarkei*) byly nalezeny oligomery resveratrolu ampelopsin B a α -viniferin ⁽⁹⁸⁾.

2.1.9 Čeleď morušovníkovité (Moraceae)

Čeleď morušovníkovitých rostlin zahrnuje okolo 40 rodů, v nichž se nachází 1400 druhů. Tyto rostliny se vyskytují nejčastěji v tropickém pásu vzácněji v mírném až subtropickém pásu ⁽⁹⁹⁾.

V stonku morušovníku jižního (*Morus australis*) byly identifikovány flavony spolu s oxyresveratrolem, 4'-(2-methyl-2-buten-4-yl)oxyresveratrolem a dvěma možnými deriváty dimerů resveratrolu alboctalol a macrourin B ⁽¹⁰⁰⁾.

2.1.10 Čeleď pivoňkovité (Paeoniaceae)

Tato čeleď zahrnuje pouze jeden rod a to rod pivoňka (*Paeonia*). Pivoňek existuje 33 druhů. Jedná se o vytrvalé byliny, polokeře či keře ⁽¹⁰¹⁾. Kořen pivoňky čínské (*Paeonia lactiflora*) je používán v tradiční čínské medicíně. V jejích semenech byly nalezeny stilbeny *Z*- ϵ -viniferin, *E*-resveratrol, *E*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glukopyranosid, *E*- ϵ -viniferin, gnetin H, suffruticosol A a B ⁽¹⁰²⁾. V semenech pivoňky keřové (*P. suffruticosa*) jsou přítomny stilbeny *Z*-resveratrol, paeoniflorin a tři trimery resveratrolu suffruticosol A, B a C ⁽¹⁰³⁾, později byl ještě objeven další trimer resveratrolu *Z*-ampelopsin E ⁽¹⁰⁴⁾.

2.1.11 Čeleď révovité (Vitaceae)

Čeleď révovité zahrnuje přibližně 900 druhů spadajících do 14 – 17 rodů. Především v rostlinách z pěti těchto rodů byly nalezeny stilbeny, jmenovitě se jedná o rody révovník (*Ampelopsis*), žumen (*Cissus*), cyfostema (*Cyphostemma*), loubinec (*Parthenocissus*) a réva (*Vitis*) ^(105, 106).

Poslední přehledné review o výskytu stilbenů v celé této čeledi bylo podrobně zpracováno v roce 2012 francouzskými autory ⁽¹⁰⁵⁾. Stejní autoři popsali výskyt stilbenů v rodu *Vitis* spolu s jejich výskytem ve víně ⁽¹⁰⁶⁾. Výskyt stilbenů v révě vinné a jejich účinky byly dále shrnuty v knize, která se zaměřuje na požitelné části révy ⁽³⁾.

Výskyt resveratrolu v révě je velice intenzivně sledován, vzhledem k pozitivním účinkům přítomného resveratrolu a jeho oligomerů. Nicméně bylo již poukázáno na to, že mnoho studií vynechalo oligomery resveratrolu, což poskytuje velice limitující informace o skutečném profilu stilbenů v révě.

2.1.12 Čeleď borovicovité (Pinaceae)

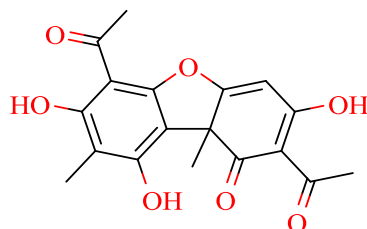
V kůře smrku ztepilého (*Picea abies*) je minoritně zastoupený resveratrol ⁽¹⁰⁷⁾. Dále byl pak resveratrol objeven v kůře borovice turecké (*Pinus brutia*) ⁽¹⁰⁸⁾ či borovice korejské (*P. koraiensis*) ⁽¹⁰⁹⁾ spolu s dalšími látkami.

2.2 Dimerizace

V současné době jsou uplatňovány 3 hlavní postupy mající za cíl přípravu dimerů. Jmenovitě se jedná o biotransformaci, biomimetické a nebiomimetické syntézy ⁽¹¹⁰⁾. Biomimetické syntézy spadají do oblasti organické chemie a zahrnují jak testování hypotéz syntetických reakcí snažících se napodobit reakce v přírodě, tak jejich studium. Existuje několik publikací shrnující problematiku biomimetických syntéz oligomerů *E*-resveratrolu a jeho analogů ^(110–112).

2.2.1 Biomimetické a nebiomimetické syntézy

Úplně první práce pokládající základy této problematiky byla provedena Bartonem a kol. ⁽¹¹³⁾. Tato práce ilustrovala vznik kyseliny usnové (obr. 5) prostřednictvím radikálového párování *ortho*- a *para*-fenolických radikálů generovaných pomocí hexakynoželezitanového aniontu.

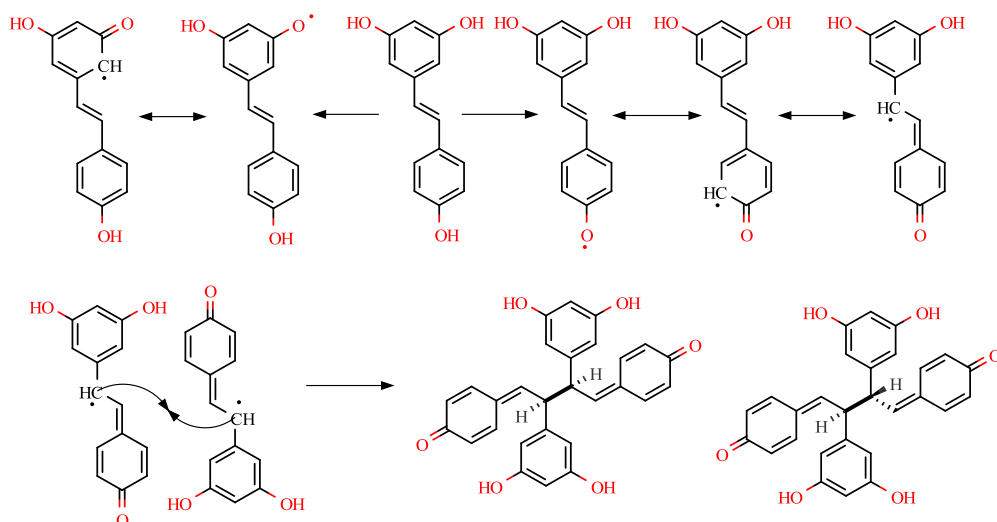


Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny usnové.

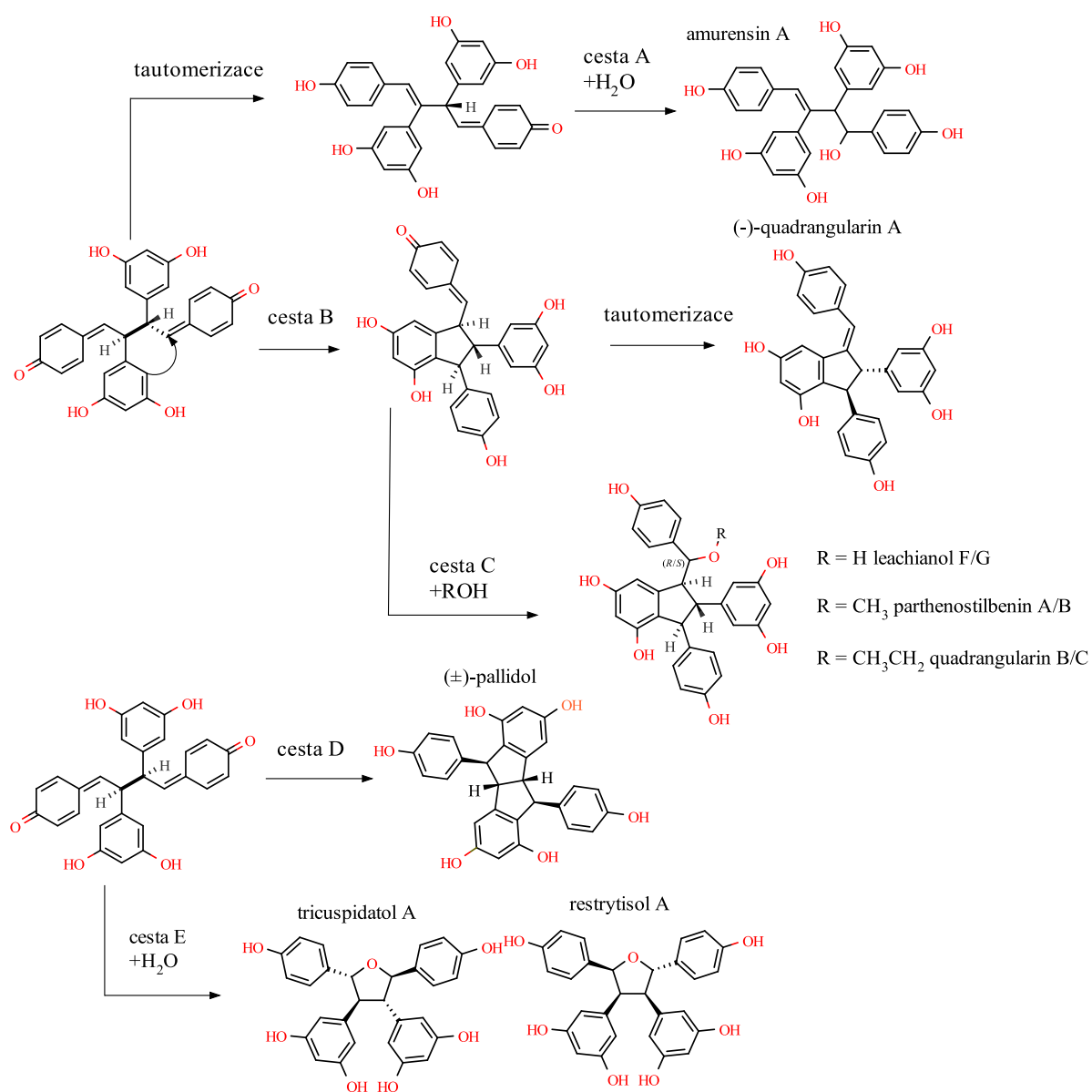
Od roku 1977 do roku 2006 byla většina reakcí vedoucí k dimerům resveratrolu prováděna prostřednictvím biomimetických syntéz ⁽¹¹²⁾. Jednoduchost postupu, ale i nedostatek regio- či stereo-selektivity vedl obecně k nízkému výtěžku. Nevýhodou byly často i komplikace s vznikem komplexní směsi, ze které je obtížné produkt oddělit.

Biomimetické syntézy dimerů a oligomerů *E*-resveratrolu mohou být zahajovány elektrochemicky ⁽¹¹⁴⁾, změnou pH ⁽¹¹⁵⁾, solemi kovů ^(116, 117), či mohou záviset na povaze a polaritě rozpouštědla ⁽¹¹⁸⁾.

Strategie biomimetických syntéz je založena na tvorbě radikálů (obr. 6). Reakcí dvou těchto radikálů vznikne meziprodukt. Struktura meziproductu závisí čistě na druhu radikálů, ze kterých vznikl. Tento meziprodukt představuje prekurzor dimerů *E*-resveratrolu. Dle prostředí je posléze přeměněn na dimery. Různorodost a variabilita produkovaných dimerů je představena různými reakčními cestami A – E na obrázku 7.



Obrázek 6: Předpoklad tvorby radikálů *E*-resveratrolu (převzato z (110, 116, 119)).



Obrázek 7: Navržený mechanismus syntézy dimerů (převzato z (111, 120)).

Nejčastěji studovanou sloučeninou (katalyzátorem) v případě biomimeteckých syntéz oligomerů *E*-resveratrolu je chlorid železitý. Byl použit v jedné z prvních dimerizací *E*-resveratrolu na *E*- ϵ -viniferin probíhající v systému methanol-voda s uváděným výtěžkem 30% ^(121, 122). *E*-resveratrol v prostředí acetonu po 20 h reakce, též s chloridem železitým, poskytuje *E*- ϵ -viniferin, ale i pallidol a nejvíce *E*- δ -viniferinu ⁽¹¹⁶⁾. Vliv chloridu železitého byl sledován i na derivát resveratrolu (3,4-dimetoxy-4'-acetoxy stilben) v prostředí dichlormethanu. Při této reakci byly vytvořeny dva dimery, které svou strukturou připomínaly cyfostemmin A a restrytisol C ⁽¹²³⁾.

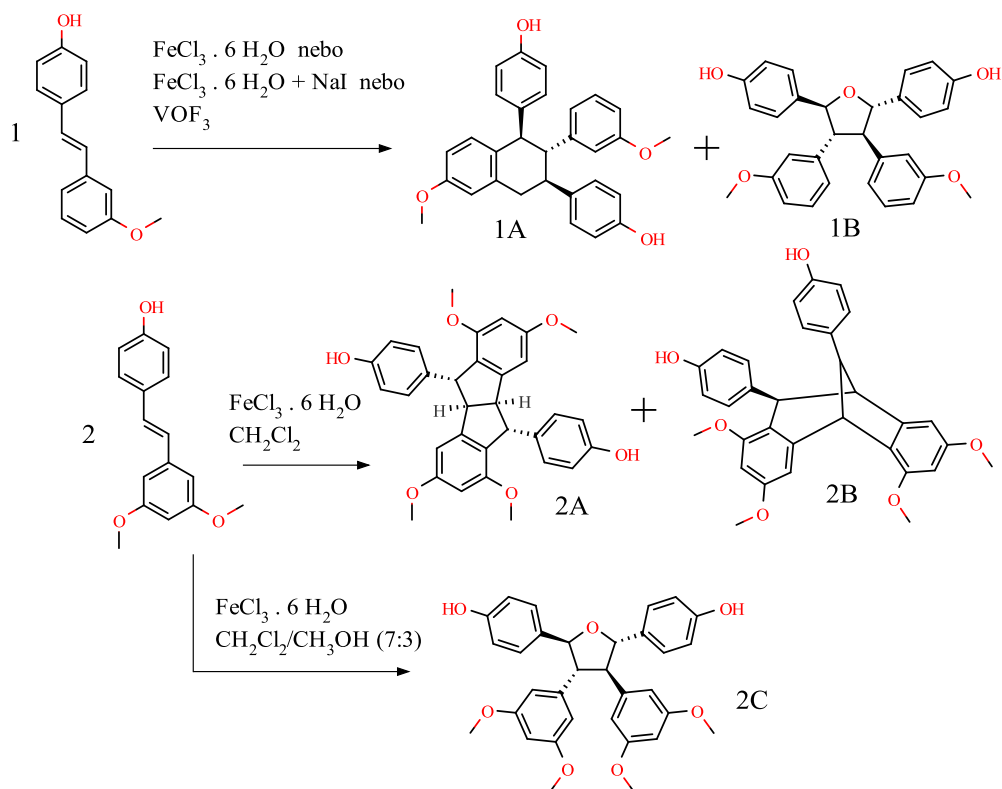
Kromě chloridu železitého se k syntéze dimerů prokázaly býti vhodné i další sloučeniny. $\text{Ti}(\text{NO}_3)_3$ byl schopný za 30 min při $-50\text{ }^\circ\text{C}$ přeměnit *E*-resveratrol na *E*- ϵ -viniferin (výtěžnost 30%), nebo reakce *E*-resveratrolu s CeSO_4 v methanolu při -50°C po 26 h vytvoří směs *E*- ϵ -viniferinu (výtěžnost 3,7%) a *E*- δ -viniferinu (výtěžnost 8,4%). Směs roztoků K_2CO_3 a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ je schopná při teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$ za 10 min přeměnit *E*-resveratrol na tři dimery (*E*- ϵ -viniferin s výtěžností 21,9%, *E*- δ -viniferin s výtěžností 22,5% a pallidol s výtěžností 15,7%) ⁽¹¹⁶⁾.

Jednou z biomimeteckých syntéz, která selektivně přeměňovala *E*-resveratrol na *E*- δ -viniferin, byla prezentována autory Sako a kol. ⁽¹¹⁷⁾. Ti podrobili *E*-resveratrol rozpuštěný v methanolu působení následujících solí: CH_3COOAg , Ag_2O , Ag_2CO_3 , AgNO_3 , $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_3$, CH_3COOCu , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ a $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Přestože všechny soli byly více či méně schopny tvořit *E*- δ -viniferin (výtěžnost od 4 do 97%), pouze octan stříbrný tvořil tento dimer s uváděnou výtěžností 97%. Octan stříbrný, dle výsledků této práce, byl též schopný přeměňovat *E*- ϵ -viniferin na oktamer *E*-resveratrolu vitisin B. Jiná publikace zase udává, že oxid stříbrný v systému aceton-voda mění derivát *E*-resveratrolu (isorhapontigenin) na dimery připomínající δ -viniferin a trimer ⁽¹²⁴⁾.

Vlastní dimerizaci *E*-resveratrolu je možno provést i za pomoci kyselé katalýzy kyselinou mravenčí. *E*-resveratrol je v důsledku působení kyseliny mravenčí přeměněn na dimery resformicol A, B, C. Překvapivé je, že resformicol C má ve své struktuře pouze 3 benzenová jádra ⁽¹²⁵⁾.

Další pohled na biomimetecké syntézy se soustředil na dimerizaci v přírodě se nevyskytujícího se derivátu *E*-resveratrolu (sloučeniny **1** na obr. 8) a pterostilbenu (sloučeniny **2** na obr. 8). Spolu s různými solemi kovů (CH_3COOAg , CuBr_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{NaI}$, PbO_2 , VOF_3) byl zkoumán i vliv polarity. Octan stříbrný přeměňoval obě tyto sloučeniny na analogické formy *E*- δ -viniferinu. PbO_2 je schopen derivát **1** dimerizovat

těž na analog *E*- δ -viniferinu i na dimer **1A**. CuBr_2 dimerizoval **1** pouze na **1A**. Zbylé produkty reakcí uvedených látek s analogy **1** a **2** jsou uvedeny v reakčním schématu (obr. 8) ⁽¹¹⁸⁾.

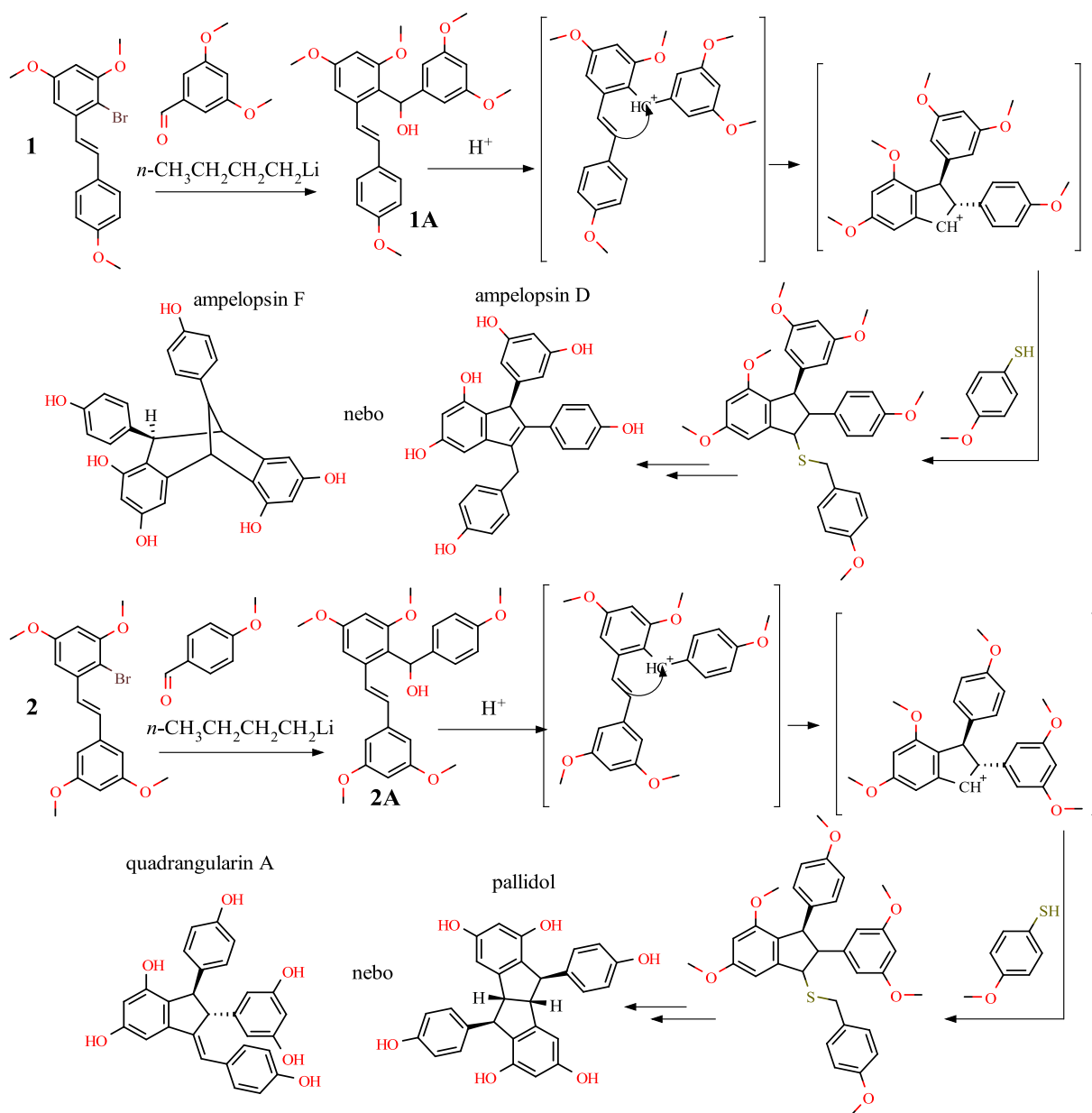


Obrázek 8: Příklad biomimetické syntézy (převzato z ⁽¹¹⁸⁾).

Přestože sloučeniny A – D uvedené na obrázku 8 se běžně nevyskytují v přírodě, jejich strukturální vzorce připomínají přírodní analogy. Sloučeninu **1A** lze přirovnat k resformicolu A, sloučeninu **2A** k pallidolu, sloučeninu **2B** k ampelopsinu F a sloučeniny **1B** a **2C** připomínají tricuspidadol A.

2.2.1.1 Celková syntéza dimerů

Přestože oligomery *E*-resveratrolu jsou známy několik desetiletí, doposud nebyl významný zájem o jejich úplnou syntézu. Teprve v roce 2007 Snyder a kol. ⁽¹²⁶⁾ přišli se selektivním postupem přípravy *de novo* přírodních dimerů *E*-resveratrolu. Jednalo se o přípravu dimerů ampelopsin D a F, isoampelopsin D, quadrangularin A a pallidol. Syntéza vycházela z 2-brom-3,4',5-trimetoxystilbenu nebo 2-brom-3,3',5,5'-tetrametoxystilbenu a řídila se dle uvedeného schématu (obr. 9).

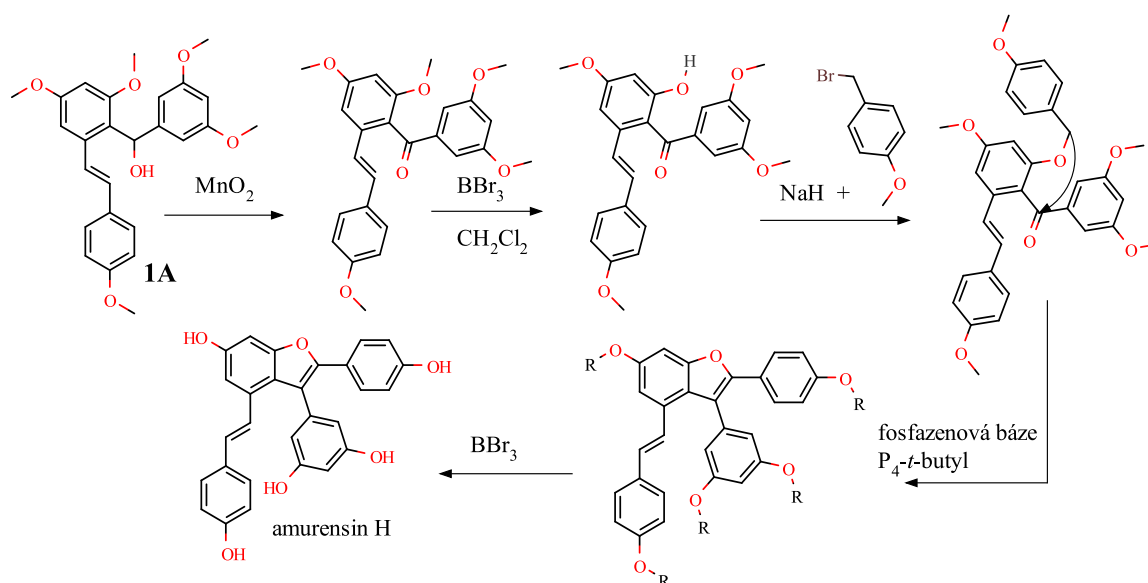


Obrázek 9: Zjednodušené schéma Snyderovy selektivní syntézy dimerů (převzato z ^(126, 127)).

Rozdíl mezi vznikem produktů (ampelopsin F × ampelopsin D; quadrangularin A × pallidol) závisí čistě na reakčních podmínkách v posledních krocích syntézy ^(126, 127).

V několika navazujících pracích byl popsán ještě přístup k selektivní syntéze dimerů heimiol A, hopeahainol D, gnetuhainin C a jeho analogu ⁽¹²⁸⁾, hopeanol, hopeahainol A ⁽¹²⁹⁾, carafenol B a C ⁽¹²⁷⁾. Nejvýznamnějším rysem Snyderovy práce je bezesporu demonstrování skutečnosti, že přírodní dimery a oligomery *E*-resveratrolu mohou být připraveny kontrolovanou regioselektivní syntézou a přitom lze dosáhnout uspokojivého výtěžku ^(126–130).

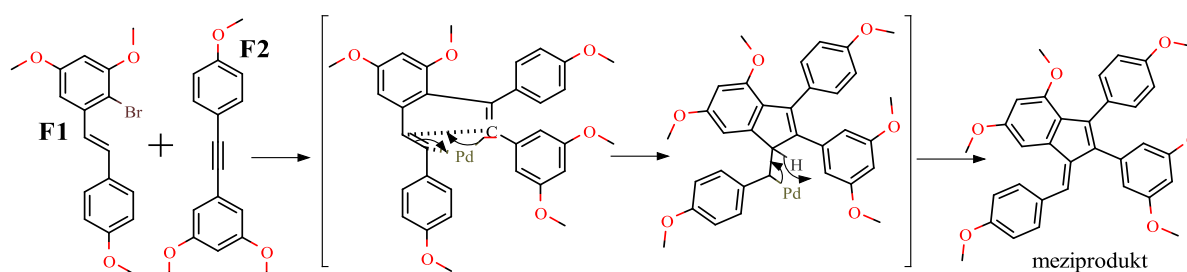
Kraus a Gupta ⁽¹³¹⁾ roce 2009 s využitím Snyderova stavebního bloku **1A** připravili dimer amurensin H. Reakční schéma je zobrazeno na obrázku 10.



Obrázek 10: Schéma Krausovy syntézy amurensinu H (převzato z ⁽¹³¹⁾).

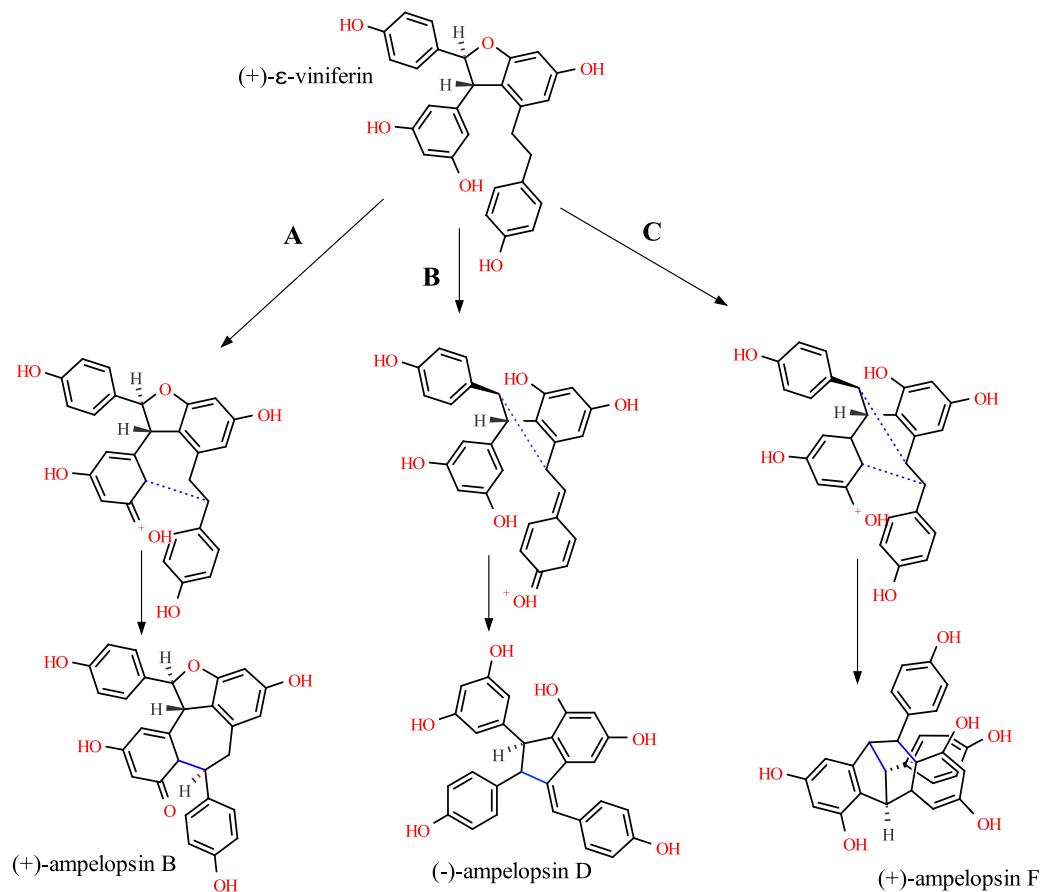
Matsura a kol. ⁽¹²⁰⁾ rozvinuli strategii syntézy dimerů a přišli s efektivnějším způsobem syntézy pallidolu a quadrangularinu A (dimery *E*-resveratrolu). Schéma tvorby těchto dvou dimerů vychází z nového stavebního bloku (dibutyl derivát *E*-resveratrolu) a je velice podobné Snyderovu (obr. 9), co se týče struktury meziproductů.

V roce 2009 Jeffrey a Sarpong ⁽¹³²⁾ prezentovali syntézu didehydropallidol permethyl etheru jako produktu vzniklého v důsledku Heckovy reakce bromstilbenu **F1** s tolanem **F2** (obr. 11). Funkčnost této reakce závisí na katalytické schopnosti forem Pd^{0/II}, která je demonstrována na reakčním schéma na obrázku 11. Meziproduct této katalytické přeměny za pomoci paládia lze jednoduchou reakcí s FeCl₃ · 6 H₂O v CH₂Cl₂ převést na analog pallidolu. Meziproduct může být také považován za prekurzor jiných dvou dimerů *E*-resveratrolu a to quadrangularinu A a parthenocissinu B.



Obrázek 11: Přístup Jeffrey a Sarponga k syntéze dimerů ⁽¹¹⁰⁾.

Mnohé dimery *E*-resveratrolu lze připravit transformací jiných dimerů. Nejznámějším v přírodě vyskytujícím se dimerem je *E*- ϵ -viniferin. Dle Takaya a kol. ⁽¹³³⁾ je z tohoto dimeru možné připravit čtyři další dimery, jmenovitě se jedná o ampelopsin A, B, D a F. Schéma ukazující reakční postup je zobrazeno na obrázku 12.



Obrázek 12: Tvorba ampelopsinu A, B, D a F (převzato z ⁽¹³³⁾).

Modře jsou zdůrazněny dimer tvořící vazby. Reakční podmínky v schématu (obr. 12) jsou následující: **A** – HCl ve vodě při pokojové teplotě po dobu 50h (výtěžnost 38%), nebo H₂SO₄ v methanolu pod zpětným chladičem po dobu 5 dní (výtěžnost 13%).

B – CF₃SO₃H v methanolu pod zpětným chladičem po dobu 7 dní (výtěžnost 14%), nebo H₂SO₄ v methanolu pod zpětným chladičem po dobu 5 dní (výtěžnost 6%).

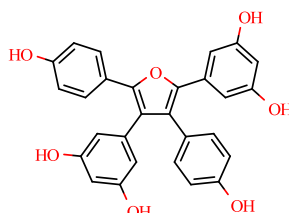
C – HCl ve vodě při pokojové teplotě po dobu 50h (výtěžnost 8%), nebo CF₃SO₃H v nitromethanu při pokojové teplotě po dobu 10 h (výtěžnost 38%), nebo CF₃SO₃H v methanolu pod zpětným chladičem po dobu 7 dní (výtěžnost 21%), nebo H₂SO₄ v methanolu pod zpětným chladičem po dobu 5 dní (výtěžnost 19%).

2.2.1.2 Fototransformace

E-resveratrol vystavený působení UV záření je schopný se přeměnit nejen na *Z*-resveratrol, ale i na dimery, trimery a tetramery resveratrolu. Fototransformace za přítomnosti vzdušného kyslíku produkuje více látek než za podmínek inertní atmosféry argonu. V prostředí oxidační atmosféry stanovila Moravcová některé dimery jako možný *E*- a *Z*- ω -viniferin ⁽¹³⁴⁾. UV záření je schopné produkovat také *Z/E* izomery dimerů resveratrolu, např. *Z*- ϵ -viniferin může být syntetizován fotoreakcí *E*- ϵ -viniferinu ⁽¹²²⁾.

UV záření není jen schopné produkovat z *E*-resveratrolu oligomery a jeho *Z* izomer, ale je též schopné přeměnit dimery na jiné dimery. Ozařováním parthenocissinu A rtuťovou výbojkou ($\lambda > 320$ nm) v prostředí methanolu po dobu 2 h poskytlo produkty quadrangularin A a menší množství laetevirenu A. V další části provedli stejní autoři ozařování parthenocissinu B v 50% methanolu, které poskytlo produkty laetevirenu B a D ⁽¹³⁵⁾. Dimery leachianol F a G mohou být přeměněny na jiný dimer (quadrangularin A a parthenocissin A) v prostředí $\text{BF}_3 \cdot (\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O} + \text{CH}_2\text{Cl}_2$ a následného ozařování ($\lambda > 306$ nm) ⁽¹¹⁵⁾.

E-resveratrol lze dimerizovat i za pomoci laseru (630 nm). Přestože záření o vlnové délce 630 nm nemá takovou energii jako UV záření, je dostačující pro tvorbu dimerů ⁽¹³⁶⁾. Produkt dimerizace, který vykazoval silnější analgetické účinky než samotný *E*-resveratrol, je zobrazen na obrázku 13.



Obrázek 13: Produkt dimerizace laserem (převzato z ⁽¹³⁶⁾).

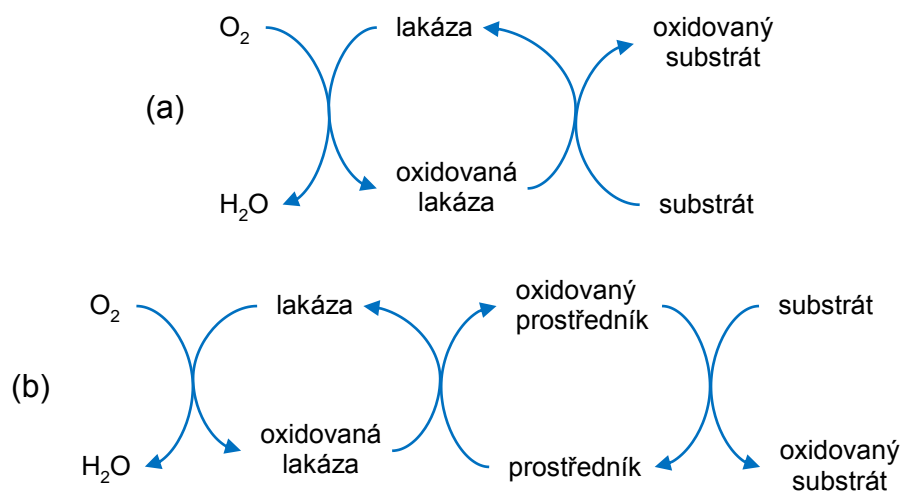
UV záření se ukázalo být i potenciálním způsobem, jak navýšit obsah stilbenů v rostlinném materiálu. Od roku 1991 proběhla řada studií věnující se této problematice. Jedním z příkladů může být navýšení obsahu stilbenů v hroznech révy vinné, kde největší nárůst byl zaznamenán u *E*-resveratrolu a piceatannolu a to až dvojnásobek původního množství ⁽¹³⁷⁾. Nebo dalším příkladem může být ozařování listů (kultivar Chasselas), které vede k tvorbě *Z/E*- ϵ -viniferinu a *Z/E*- δ -viniferinu ⁽¹³⁸⁾. Tříška a Houška ⁽¹³⁹⁾ publikovali review týkající se této problematiky.

2.2.2 Biotransformace a enzymatické párování

Studium biotransformace *E-resveratrolu* či obecně oligostilbenů bylo vedeno s mnoha odlišnými cíli. Některé případy sledovaly produkty přeměny *E-resveratrolu* na oligomery^(140, 141), jiné zase vliv patogenu či oxidázy na tyto látky⁽¹⁴²⁾. Biotransformace stilbenů zejména *E-resveratrolu* jsou limitovány variabilitou a dostupností oxidáz na trhu. Navíc jsou nespecifické pro účely dimerizace, proto je obtížné předpovídat, jaký výsledek jejich použití poskytne⁽¹¹⁰⁾.

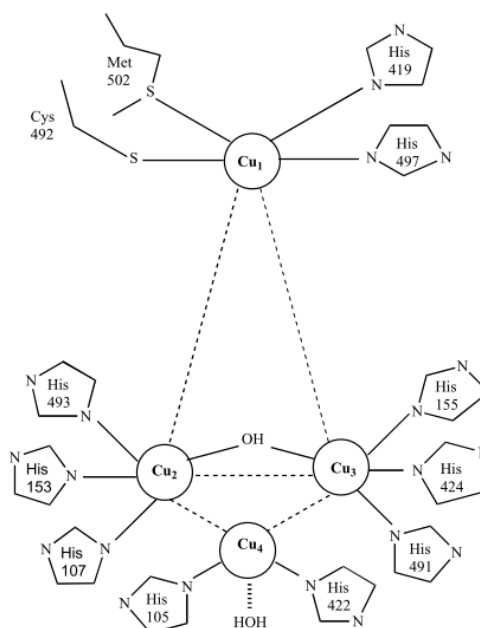
2.2.2.1 Dimerizace lakázami

Lakázy, též nazývané „blue oxidases“, jsou skupina měď obsahujících enzymů, které katalyzují širokou škálu reakcí sloučenin, při kterých je molekulární kyslík redukován na vodu. Zjednodušené schéma je zobrazeno na obrázku 14 část a. Bohužel však ve většině případů nemůže být substrát oxidován přímo lakázou. Důvody způsobující toto omezení jsou dva: sterický efekt a vysoký redoxní potenciál. Tyto dvě překážky jsou v přírodě překonávány tzv. prostředníkem (mediator). Pokud se snažíme napodobit přírodu, pak mnohdy onu látku přidáváme a pak hovoříme o „chemical mediator“ (obr. 14 - část b).



Obrázek 14: Schéma reprezentující redoxní cykly oxidace substrátu pomocí lakázy⁽¹⁴³⁾.

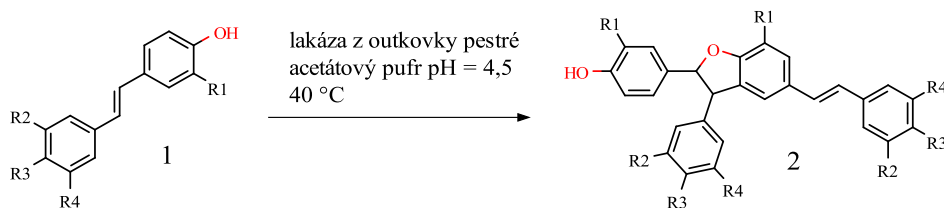
Lakázy jsou široce rozšířené u hub, některých bakterií, vyšších rostlin a byly dokonce nalezeny i v některých zástupcích hmyzu. Tyto extracelulární enzymy získaly pozornost díky jejich schopnosti oxidovat fenolické látky a sloučeniny podobné ligninům, stejně jako přírodní polutanty. Zmíněné schopnosti učinily tyto biokatalyzátory velice používané v mnohých biotechnologických postupech^(33, 143, 144).



Obrázek 15: Schématické zobrazení aktivního místa lakázy ukazující relativní orientaci atomů mědi ⁽¹⁴³⁾.

Funkčnost lakázy závisí na distribuci atomů mědi mezi třemi rozdílnými vazebnými místy. Atomy mědi jsou nezbytné a hrají nepostradatelnou roli v mechanismu katalýzy. Vlastní mechanismus lze rozdělit do třech kroků. V první kroku měď 1 přijímá elektrony od substrátu. Měď 1 je tedy redukována a substrát je oxidován. Přijaté elektrony mědi 1 jsou poté vnitřně převedeny do shluku tří atomů mědi (2, 3 a 4). A teprve tento shluk tří atomů mědi je schopný redukovat molekulu kyslíku na vodu. Takováto struktura byla popsána u lakáz z: outkovky pestré (*Trametes versicolor*), outkovky rumělkové (*Pycnoporus cinnabarinus*), *Melanocarpus albomyces*, *Rigidoporus lignosus* a bacilu senného (*Bacillus subtilis*) ⁽¹⁴³⁾.

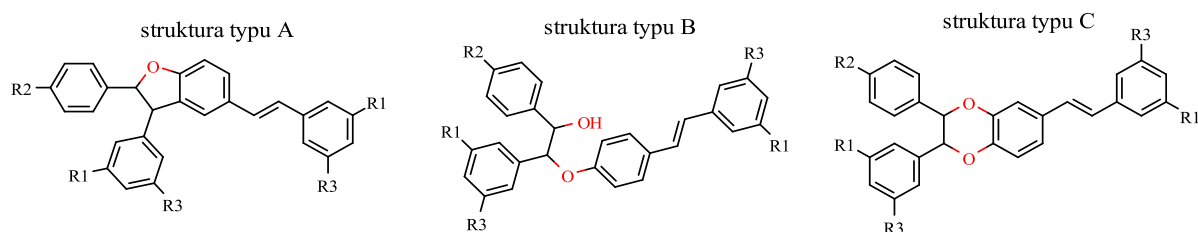
Jedna z prvních prací se soustředila na oxidativní dimerizaci série několika hydroxystilbenů katalyzovanou lakázou, která poskytla 4-O-alfa-beta-5 (podobné dihydrofuranu) dimery, které byly hlavními produkty ⁽¹⁴⁰⁾. Snaha vylepšit tuto reakci vedla k použití komerčně dostupné lakázy z outkovky pestré. Reakční mechanismus tvorby oligomerů *E*-resveratrolu za použití právě této lakázy byl popsán hned několika autory ^(145–148) a je zobrazen na obrázku 16:



Obrázek 16: Dimerizace při použití lakázy z outkovky pestré (převzato z ⁽¹⁴⁵⁾).

Dimerizace *E*-resveratrolu či jeho analogů poskytuje ekvivalentní *E*-dehydrodimer (v případě *E*-resveratrolu $R_1, R_3 = H$ a v případě *E*- δ -viniferinu $R_2, R_4 = OH$)^(145–148).

Dalším příkladem může být lakáza z outkovky pýřité (*T. pubescens*). Tato lakáza poskytla podobné výsledky jako lakáza z outkovky pestré. Produkty reakce resveratrolu a jemu podobných stilbenů s touto lakázou jsou dimery vzniklé vazbami zobrazenými na obrázku 17. Podle těchto vazeb lze produkty rozdělit do tří skupin: analogy δ -viniferinu (obr. 17 - typ A), dimery tvořené etherovou vazbou (obr. 17 - typ B) a dimery tvořené benzodioxanovou strukturou (obr. 17 - typ C). Množství jednotlivých produktů se lišilo v závislosti na struktuře výchozí látky. V neposlední řadě bylo prezentováno, že lakáza z outkovky pýřité nejlépe funguje v systému dvou fází a to ethylacetátové, v němž je rozpuštěný substrát, a vodné, která je pufována acetátovým pufrům na pH 4,5⁽¹⁴⁹⁾. Tato lakáza poskytuje výtěžek 18% *E*- δ -viniferinu⁽¹⁴⁰⁾.



Obrázek 17: Produkty dimerizace lakázou z outkovky pýřité (převzato z^(110, 149)).

E- δ -viniferin může být připraven v rozumném množství i použitím lakázy z *Myceliophthora thermophyla* (poskytující výtěžek 31% dimeru)⁽¹⁴⁰⁾.

Na druhou stranu ne všechny lakázy jsou schopné katalyzovat oxidaci *E*-resveratrolu, např. lakáza z *Pyricularia oryzae*⁽¹⁴²⁾.

2.2.2.2 Dimerizace houbovými patogeny

Zájem a problematiky plísní souvisí především s výnosy produkce v zemědělství. Zatímco produkce *E*-resveratrolu jako odpověď na stres je široce přijata, tvorba jeho oligomerů v případě napadení např. houbami nemusí být zcela jasná. Nejasné je, zda přítomné oligomery jsou důsledkem obranného mechanismu rostliny či odpovědi proliferace houby na obranný mechanismus rostliny. *E*-resveratrol a jeho oligomery jsou známé svými antimykotickými účinky. Mezi nejvýznamnější houbové patogeny spadá plíseň révová (*Plasmopara viticola*), padlí révové (*Erysiphe necator*, syn. *Uncinula necator*), plíseň šedá (*Botrytis cinerea*)⁽⁸⁾.

Listy révy vinné infikované plísní révovou produkují *Z/E*-piceid, *E*-resveratrol, *E*- ϵ -viniferin a *E*- δ -viniferin⁽¹³⁸⁾. Navazující práce popsala ještě 8 neidentifikovaných dimerů

resveratrolu a navíc α -viniferin a *E/Z*-pterostilben⁽¹⁵⁰⁾. Další studium odhalilo navíc ještě tvorbu stilbenů ampelopsin D, quadrangularin A, isohopeafenol, *Z*- ϵ -viniferin, ampelopsin H, *Z*-miyabenol C, *Z/E*- ω -viniferin. Rozmanitost zastoupení těchto stilbenů může souviset se stádiem rozvoje infekce⁽¹⁵¹⁾. Obdobně rozmanité zastoupení stilbenů zaznamenal i Mattivi a kol.⁽²³⁾, který též vystavil listy révy vinné působení plísně révové.

Jedním z nejvýznamnějších patogenů révy vinné je padlí révové. Zatím co plané kultivary révy jsou celkem odolné proti této plísni, pro kultivary využívané k produkci hroznů může tato houba představovat problém. Vliv této plísně na listy révy má za následek též tvorbu stilbenů: *E*-piceid, *E*-resveratrol, *E*- ϵ -viniferin a *E*- δ -viniferin. Tyto stilbeny byly tvořeny ve všech zkoumaných kultivarech⁽¹⁵²⁾.

Plíseň šedá je všudypřítomný houbový patogen, který kolonizuje stárnoucí nebo mrtvá rostlinná pletiva. Enzymy izolované z plísně šedé jsou schopné oxidovat resveratrol na ϵ -viniferin a ve vyšší míře oxidovat i pterostilben⁽¹⁵³⁾. Plíseň šedá se ukázala být schopná tvořit z *E*-resveratrolu 6 dimerů (restrytisol A – C, leachinol F, *E*- δ -viniferin a pallidol), z nichž nejvíce zastoupený byl *E*- δ -viniferin⁽¹⁵⁴⁾. Působení této plísně na rostlinný materiál révy vinné má též za následek tvorbu *E*-resveratrolu a jeho přeměnu na *E*- δ -viniferin⁽¹⁵⁵⁾.

2.2.2.3 Dimerizace peroxidázami.

Peroxidázy obsahují železo v aktivním místě a jsou velice podobné lakázám. Jak tyto enzymy ovlivňují tvorbu produktu, není ještě zcela úplně známo. Peroxidázy využívají peroxid vodíku, aby katalyzoval oxidativní reakce. Peroxid vodíku je tedy nezbytný pro funkčnost peroxidázy. Příkladem může být křenová peroxidáza (Horseradish peroxidase), která katalyzuje reakce podle schéma⁽¹¹⁹⁾:



Vliv křenové peroxidázy na *E*-resveratrol byl poprvé představen Langcakem a Prycem v roce 1977⁽¹⁵⁶⁾. Dle těchto autorů peroxidáza v systému aceton-voda byla schopná měnit *E*-resveratrol na δ -viniferin s výtěžkem 41%.

Na jejich metodu navázali japonští autoři. Ve své práci podrobili *E*-resveratrol působení křenové peroxidázy, peroxidázy ze sóji luštinaté (*Glycine max*) a houby (*Arthromyces ramosus*). Reakce *E*-resveratrolu s těmito peroxidázami při 37 °C tvoří komplexní směs produktů. Při nižší teplotě poskytují v systému aceton-voda ve všech třech případech dva dimery *E*-resveratrolu a to *E*- δ -viniferin a pallidol. V prostředí ethanolu poskytují peroxidázy z *G. max* a *A. ramosus* menší množství zmíněných dvou dimerů, ale též navíc i leachianol F, G a quadrangularin B, C⁽¹¹⁶⁾.

Z uvedených prací vycházel Wilkens a kol. ⁽¹¹⁹⁾. V jeho práci byly sledovány přeměny křenovou peroxidázou nejen *E*-reveratrolu, ale i jeho dimeru *E*-ε-viniferinu. Při reakci s *E*-resveratrolem poskytla tato peroxidáza opět produkt *E*-δ-viniferin spolu s dvěma trimery pojmenovanými resviniferin A a B. (–)-ε-viniferin vystavený působení peroxidázy zreagoval za tvorby čtyř různých tetramerů *E*-resveratrolu.

V jiné studii bylo prokázáno, že křenová peroxidáza byla schopná přeměnit směs *E*-resveratrolu s quadrangularinem A na laetevirenol C a D. Následně přeměnila směs *E*-resveratrolu s parthenocissinem A na laetevirenol E a parthenocissin B ⁽¹³⁵⁾.

V další práci bylo dokázáno, jak významnou roli hraje pH, a to nejen na množství produktu, ale i na to jaký produkt se bude tvořit. Celkem 7 dimerů *E*-resveratrolu bylo syntetizováno křenovou peroxidázou při různém pH. Tato peroxidáza v prostředí acetonu a pufru (pH 8,0) poskytuje *E*-δ-viniferin jako nejvýznamnější produkt. Snížení pH na 6,0 má za následek tvorbu leachianolu F a G spolu s *E*- a *Z*-δ-viniferinem. Při pH 5,0 se navíc ještě tvoří pallidol a při pH 4,0 jsou tvořeny produkty *E*-δ-viniferin, leachianol F a G v minimálním množství. Navíc při takto nízkém pH není tato peroxidáza významně schopna dimerizovat *E*-resveratrol ⁽¹¹⁵⁾.

V neposlední řadě hraje významnou roli to, jak bude do reakce přidáván peroxid vodíku. Způsob přidávání peroxidu má vliv na formaci specifického dimeru. Přidání peroxidu najednou způsobí to, že křenová peroxidáza vytvoří *E*-δ-viniferin, kdežto přidání po kapkách způsobí tvorbu gnetinu C ⁽¹⁴⁷⁾.

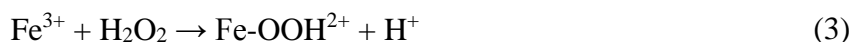
Křenová peroxidáza je schopna tvořit i tetramery *E*-resveratrolu. Její působení v 50% roztoku acetonu mění (+)-ε-viniferin na vitisin B a C ⁽¹⁵⁷⁾.

2.3 Fentonova reakce

H.J.H Fenton objevil v roce 1894, že některé kovy jsou schopné zvýšit oxidační sílu peroxidu vodíku. Od tohoto objevu byly reakce katalyzované peroxidem vodíku spolu se solí daného kovu (především Fe^{II}, ale i Cu^I) nazývány Fentonova reakce. Ve skutečnosti tyto vybrané kovy jsou schopné generovat hydroxylové radikály. Vzniklé •OH radikály jsou mnohem účinnější oxidační činidlo než samotný peroxid vodíku. Produkce hydroxylových radikálů probíhá (•OH) dle schéma ^(158–160):



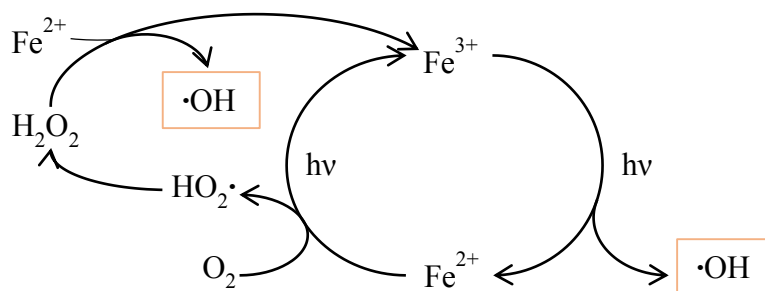
Železnatý ion zahajuje rozklad peroxidu vodíku, což má za následek tvorbu radikálů. Tvorba hydroxylových radikálů ve vodném prostředí zahrnuje sled reakcí:



Katalýza tímto způsobem je velice pomalá ($k_3 = 0,001-0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dále tvořené radikály $\text{HO}_2\cdot$ mají menší oxidační účinek než radikály $\cdot\text{OH}$. Navíc tvořené Fe^{3+} ionty se srážejí jako $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Uvážením dalších reakcí (5)-(7), které spotřebovávají $\cdot\text{OH}$ radikály produkované Fentonovou reakcí, se zdá být tento průběh méně vhodným z hlediska účinnosti oxidace⁽¹⁶⁰⁾.



Vyšší účinnosti lze dosáhnout za pomoci katalýzy. Fentonova reakce může být katalyzována fotochemicky (foto-Fentonova reakce) nebo elektrochemicky (elektro-Fentonova reakce)⁽¹⁶⁰⁾. Foto-Fentonova reakce umožňuje regeneraci Fe^{3+} iontů. Mechanismus foto-Fentonovy reakce je zobrazen na obrázku 18.



Obrázek 18: Schéma foto-Fentonovy reakce (převzato z⁽¹⁶¹⁾).

Fentonova reakce probíhá za optimálního pH 3 – 5, přičemž pokud je pH příliš vysoké vzniká nerozpustná forma $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a peroxid vodíku je přeměňován na kyslík⁽¹⁵⁸⁾.

V současné době Fentonova reakce a její modifikace může nalézt uplatnění při čištění odpadních vod, oxidaci až mineralizaci organických látek např. fenolů, formaldehydu, pesticidů, gumárenských chemikálií a mnoho dalších^(158, 160).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Při dimerizaci *E*-resveratrolu byly použity následující chemikálie, které byly čistoty p.a. nebo vyšší: ethylacetát (Fluka), methanol (Merck), dichlormethan (Merck), acetonitril (Merck), aceton (Merck), HCl (Sigma-Aldrich), *E*-resveratrol (Alchimica), chlorid železitý (Sigma-Aldrich), pentahydrát síranu měďnatého (Lachema), heptahydrát síranu železnatého (Lachema), 2-hydroxy-1,4-naftochinon (Sigma-Aldrich), tetrachloro-1,4-benzochinon (Sigma-Aldrich), 30% peroxid vodíku (Sigma-Aldrich), karbamidperoxid (adiční sloučenina močoviny a peroxidu vodíku) (Sigma-Aldrich), kyselina octová (Fluka), trihydrát octanu sodného (Merck), lakáza z outkovky pestré (*Trametes versicolor*, Sigma-Aldrich) a destilovaná voda.

Mobilní fázi HPLC tvořily acetonitril (LiCrosolv; Merck) a kyselina orthofosforečná (Fluka). Mobilní fázi LC-MS tvořily acetonitril (Fischer-Scientific) a kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich). Pro kalibraci byl použit standard *E*-resveratrolu (Sigma-Aldrich).

3.1.2 Přístroje

Kromě základního laboratorního vybavení byly v této práci použity následující přístroje: ultrazvuková lázeň (UCC4 Powersonic), centrifuga (Hettich, universal 32R), vodní lázeň (VL 05).

Pro účely adsorpční chromatografie byly použity kolonky SPE založené na extrakci tuhou fází (SPE - Solid Phase Extraction): SPE LiChrolut PR-18 (velikost částic 40 – 63 μm , Merck). Byly použity kolonky s náplní 200 nebo 500 mg. Pokud není uvedeno jinak, byly použity kolonky s náplní 200 mg.

Při izolaci *E*- ϵ -viniferinu z réví pomocí chromatografických metod byla použita skleněná kolona Versatile ECO^{PLUS} Solvent Resistant (Kronlab, 25 x 250 mm). Jako stacionární fáze sloužil polyamid (pro kolonovou chromatografii 6, Fluka). Mobilní fáze byla vháněna na kolonu mikro čerpadlem (MMC/2C).

3.1.2.1 HPLC Metoda

Při kapalinové chromatografii bylo použito čerpadlo HPLC Hewlett Packard Ti-series 1050, kolona s reverzní fází: Phenomenex Luna C18(2) o délce 150 mm, šířce 2 mm a

průměrem částic 3 μm . Objem smyčky byl 5 μl . Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min. Analýza byla prováděna v gradientu acetonitril-kys. orthofosforečná-voda. Časová změna gradientu je uvedena v tabulce I.

Tabulka I: Složení mobilní fáze pro HPLC.

čas [min]	množství A [%]	množství B [%]
0	80	20
20	20	80
25	0	100

A: 5% acetonitril + 0,1% kyselina orthofosforečná

B: 80% acetonitril + 0,1% kyselina orthofosforečná

K detekci a kvantifikaci byl použit detektor DAD (Agilent, G1315B, spektra byla zaznamenávána v rozsahu 190 – 600 nm). Detekce a kvantifikace probíhala při 220 a 315 nm. Vyhodnocení probíhalo při 315 nm. Druhý detektor FLD (Agilent, G1321A, fluorescenční spektra byla zaznamenávána v rozsahu 340 – 600 nm, Ex 315 nm, Em 395 nm). Vyhodnocení naměřených dat bylo zpracováno programem ChemStation for LC 3D ve verzi A:10.02 [1757].

3.1.2.2 LC-MS Metoda

Pro chromatografii s hmotnostní detekcí byl použit přístroj LCQ Accela Fleet (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) vybavený iontovými zdroji (ESI, APCI a APPI) a detektorem diodového pole. Byla použita kolona Hypersil Gold (Thermo Electron Corporation, Bellefonte, PA, USA) s rozměry 50 x 2,1 mm a průměrem částic 1,9 μm a gradient tvořený směsí voda-acetonitril-kyselina mravenčí⁽¹⁶²⁾. Profil gradientu je uveden v tabulce II.

Tabulka II: Gradient mobilní fáze pro LC-MS spektrometrii.

čas [min]	množství A [%]	množství B [%]
0	100	0
1	100	0
14	50	50
15	0	100

A: 5% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí

B: 80% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí

Nástřikový objem byl 10 μl a průtok 0,4 ml/min. Při ionizaci pomocí APCI zdroje byla teplota kapiláry 275 °C, teplota odpařování 400 °C, průtok ochranného plynu dusíku 58 l/min a pomocného 10 l/min, napětí zdroje 6 kV, zdrojový proud 5 μA a kapilární napětí 10 V⁽¹⁶²⁾.

3.1.3 Dimerizace *E*-resveratrolu lakázou

Dimerizace *E*-resveratrolu pomocí lakázy z outkovky pestré (*T. versicolor*) byla provedena na základě literatury ^(146, 148).

Dle tabulek byl připraven acetátový pufr (0,1 mol/l, pH 5) smícháním 6,78 ml roztoku octanu sodného (0,1 mol/l) s 3,22 ml roztoku kyseliny octové (0,1 mol/l). Do každé ze tří vialek označeny vzorek č. 1 – 3 bylo naváženo 2,4 mg lakázy. Lakáza byla rozpuštěna v 1 ml acetátového pufru. Reakce ve vzorcích byla zahájena přidáním 1 ml roztoku resveratrolu (2 mg/ml). Vzorky byly obaleny alobalem, tak aby reakce probíhala ve tmě a umístěny na třepačku. Reakce byla ukončena po 18 h a 15 min extrakcí do ethylacetátu. Extrakce probíhala tak, že vzorky byly naředěny 7 ml destilované vody. Poté byly přidány 2 ml ethylacetátu a vzorek byl protřepán. Po ustálení fázového rozhraní byl ethylacetátový podíl odebrán a extrakční postup dvakrát opakován přidáním 1 ml ethylacetátu. Ethylacetát byl pak ze vzorků odstraněn proudem dusíku při 40 °C a odparek byl před vlastním měřením metodou HPLC (viz kapitola 3.1.2.1) rozpuštěn v 1 ml methanolu.

3.1.4 Dimerizace *E*-resveratrolu 2-hydroxy-1,4-naftochinonem

Vzorky 1 – 8 byly připraveny tak, že k navážce 20,0 mg 2-hydroxy-1,4-naftochinonu (114,8 μmol) bylo přidáno 0,2 ml methanolového roztoku *E*-resveratrolu (100,08 mg/ml; 87,7 μmol). Vzorky č. 1, 2, 5 a 6 byly naředěny 1,1 ml methanolu a 0,4 ml vody. Tyto vzorky po přidání vody zčervenaly. Vzorky č. 3, 4, 7 a 8 byly naředěny 1,5 ml methanolu. Vzorky č. 5, 6, 7 a 8 byly ozařovány při 254 nm po dobu 30 min. Vzorky č. 1 – 4 byly uchovávány po dobu reakce ve tmě a vzorky č. 5 – 8 byly k nim přidány po ozařování. Reakce probíhala při laboratorní teplotě. Po 5 dnech od začátku reakce byla část (0,1 ml) od každého vzorku odebrána, naředěna 15x a změřena pomocí kapalinové chromatografie. Naředěné podíly vzorků č. 2, 4, 5 a 7 byly ponechány na světle. Po 49 dnech od začátku reakce byla znovu část (0,1 ml) od každého vzorku odebrána, naředěna 15x a znovu změřena. Též byly změřeny i dříve naředěné podíly, které byly od pátého dne reakce ponechány na světle u okna při laboratorní teplotě. Od 49. dne od zahájení reakce byly vzorky 1 – 8 přeneseny ze tmy a umístěny na světle u okna při laboratorní teplotě. Poslední měření vzorků č. 1 – 8 proběhlo po 62 dnech od začátku reakce.

3.1.5 Dimerizace *E*-resveratrolu tetrachloro-1,4-benzochinonem

Byl připraven zásobní roztok *E*-resveratrolu (14,8 mg/ml) v acetonitrilu, jež byl čirý s nepatrným množstvím bílých částí nerozpuštěného *E*-resveratrolu, a zásobní roztok tetrachloro-1,4-benzochinonu v acetonitrilu (dále jen *p*-chloranil; 15,51 mg/ml), který byl žlutý s žlutými nerozpuštěnými částmi.

Vzorky č. 1 – 6 byly vytvořeny smícháním 1 ml (čiré části) zásobního roztoku *p*-chloranilu (63 μ mol) s 1 ml zásobního roztoku *E*-resveratrolu (čiré části; 64,8 μ mol). Ihned po smíchání žlutý roztok *p*-chloranilu s čirým roztokem *E*-resveratrolu vytvořily lehce nafialovělé zbarvení (podobné lihovému fixu). Odlišnost mezi jednotlivými vzorky byla tvořena podmínkami, během kterých reakce probíhala. Vzorky č. 1 a 2 byly po dobu reakce ponechány na světle při laboratorní teplotě. Vzorky č. 3 a 4 byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě během reakce. Vzorky č. 5 a 6 byly po dobu reakce umístěny do tepelného bloku při teplotě 50°C a přikryty alobalem.

Reakce probíhala po dobu 17 h 40 min. Po ukončení reakce byla část od každého vzorku naředěna a měřena pomocí kapalinové chromatografie.

Původní vzorky č. 1, 3 a 6 byly po 19 h 20 min od zahájení reakce ozařovány UV lampou při 254 nm po dobu 4 h. Po ukončení ozařování byla část od každého z těchto vzorků zředěna a změřena pomocí kapalinové chromatografie.

Vzorek č. 7 byl připraven tak, že bylo smícháno 1 ml ozářeného vzorku č. 1 a 0,1 ml HCl o koncentraci 0,05 mol/l. Ihned po smíchání byla část tohoto vzorku naředěna a změřena. Vzorek č. 7 byl pak uložen přes noc při laboratorní teplotě. Další den byla část tohoto vzorku znovu naředěna a změřena.

Dále byl připraven roztok *p*-chloranilu (0,99 mg/ml) v acetonitrilu zředěn 50x a změřen pomocí kapalinové chromatografie.

3.1.5.1 Vliv vody na reakci

Vzorek č. 8 byl připraven smícháním 0,5 ml roztoku *E*-resveratrolu v acetonitrilu (2,94 mg/ml; 6,4 μ mol) s 0,5 ml roztoku *p*-chloranilu v acetonitrilu (3,18 mg/ml; 6,4 μ mol). Směs byla protřepána a uložena ve tmě při laboratorní teplotě. Po 23 h byla část vzorku č. 8 naředěna a změřena. Z vzorku č. 8 byly vytvořeny vzorky č. 9 a 10 tak, že k odebranému podílu vzorku č. 8 (0,1 ml) bylo po 24 h od začátku reakce přidáno 0,05 ml destilované vody (vzorek č. 10) a další odebrané části vzorku č. 8 (0,1 ml) bylo přidáno 0,05 ml deionizované vody (vzorek č. 11).

3.1.6 Dimerizace *E*-resveratrolu chloridem železitým

Pro vzorky 1 a 2 byla reakce následující: 0,4 ml roztoku *E*-resveratrolu (100,08 mg/ml; 175,3 μmol) bylo smícháno s 0,8 ml vodného roztoku chloridu železitého (93 mg/ml; 458 μmol). Pro vzorky 3 a 4 byla reakce následující: 0,4 ml roztoku *E*-resveratrolu (100,08 mg/ml 175,3 μmol) bylo smícháno s 0,8 ml methanolového roztoku chloridu železitého (93 mg/ml; 458 μmol). Po smíchání se ve vzorcích 3 a 4 vytvořila v reakční směsi sraženina, která byla rozpuštěna přidáním 0,5 ml methanolu. Všechny vzorky byly první hodinu reakce průběžně protřepávány. Reakce probíhala ve tmě za laboratorní teploty a byla ukončena po 71,5 h.

Po ukončení reakce byly vzorky č. 1 a 3 pročištěny přes SPE RP18 a vzorky č. 2 a 4 pročištěny extrakcí do ethylacetátu. Vzorek 1 byl zředěn 60 ml destilované vody. Tento vzorek po přidání vody zezelenal a následně změnil barvu přes žlutozelenou až na výslednou zelenohnědou. Vzorek č. 3 byl zředěn 50 ml destilované vody. Vzorek měl po naředění vodou hnědou barvu odlišnou od vzorku 1. SPE kolonky byly aktivovány 2x podílem methanolu a poté 2x objemem kolonky destilovanou vodou. Následně byly zředěné vzorky aplikovány na aktivované kolonky. Poté byly kolonky vysušeny. Po tomto kroku byly sorbované látky eluovány 2 + 1 ml methanolem.

Vzorky č. 2 a 4 byly zředěny vodou 3x. Následně byly ke každému vzorku přidány 2 ml ethylacetátu a obsah protřepán. Po protřepání se nechaly vzorky 20 min ustálit a po této době byly centrifugovány při 20 °C, 3000 ot/min, 10 min. Po centrifugaci se odebral ethylacetátový podíl. Postup extrakce se opakoval znovu s 2 ml a poté 1 ml ethylacetátu. Odebraný ethylacetát byl odpařen proudem dusíku (při 40°C) a sušina byla rozpuštěna ve 3 ml methanolu. Pročištěné vzorky byly pak změřeny kapalinovou chromatografií (viz kapitola 3.1.2).

3.1.6.1 Vliv reakční doby

Vzorky č. 5 a 6 byly připraveny opakováním postupu vzorku č. 2. Doba reakce byla prodloužena na 20 dní. Barva vzorků byla tmavozelená až černá. Po ukončení reakce byly vzorky pročištěny extrakcí do ethylacetátu stejným způsobem, jako je uvedeno u vzorku č. 2. Následně byl ethylacetát ze vzorků odpařen proudem dusíku (při 40°C) a sušina byla rozpuštěna ve 3 ml methanolu. Po 15 dnech od pročištění extrakcí do ethylacetátu byl odebrán 1 ml pročištěného vzorku č. 6. Methanol byl odstraněn proudem dusíku při 40 °C a odparek byl rozpuštěn v 1 ml dichlormethanu.

Do prázdné SPE kolonky byl umístěn filtr, na něj se nanasla vrstva 8,5 mm vyžíhaného silikagelu a obsah byl znovu přikryt filtrem. Silikagel byl aktivován dichlormethanem. Po aktivačním kroku byl aplikován 1 ml připraveného dichlormethanového vzorku č. 6. Následovalo promývání 2 ml dichlormethanu (frakce I). Silikagel nebyl po tomto kroku sušen. V dalším kroku byl silikagel promyt 20 ml roztoku dichlormethanu s acetonem (18 dichlormethan : 2 aceton; frakce II). Po tomto kroku byl silikagel vysušen a následně byl promýván acetonem 2x 1 ml (frakce III). Poslední promývání bylo 2x 1 ml methanolu (frakce IV).

3.1.6.2 Vliv UV záření na reakci

Vzorky č. 7 – 10 byly připraveny smícháním 0,2 ml methanolového roztoku *E*-resveratrolu (100,08 mg/ml; 87,6 μ mol) s 0,8 ml vodného roztoku chloridu železitého (46,5 mg/ml; 229,3 μ mol). K vzorkům č. 9 a 10 bylo následně přidáno 0,7 ml methanolu. Vzorky č. 7 a 8 byly ozařovány po dobu 15 min UV lampou při 254 nm a dále reakce probíhala 71 h ve tmě při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byl methanol a část vody ze vzorků odstraněn proudem dusíku při 40 °C. Ke vzorkům, jež obsahovaly zbytek vody, byl přidán 1 ml ethylacetátu a 0,8 ml vody. Vzorky byly ponořeny na 1 min do ultrazvukové lázně a protřepány. 15 min po vytvoření fázového rozhraní se ethylacetátový podíl odebral. Extrahování do ethylacetátu probíhalo celkem 3x s podílem 1 ml, 1 ml a 0,5 ml. Z odebraného podílu byl odpařen ethylacetát proudem dusíku při 40 °C. Vzorky byly pak rozpuštěny v 2 ml methanolu a měřeny pomocí kapalinové chromatografie (viz kapitola 3.1.2).

3.1.6.3 Vliv vody na reakci

Při přípravě zásobních roztoků v tomto oddílu, byl použit pouze vysušený methanol. Vzorek č. 11 byl připraven smícháním 0,5 ml zásobního roztoku *E*-resveratrolu (2,97 mg/ml; 6,5 μ mol) s 0,5 ml zásobního roztoku chloridu železitého (1,94 mg/ml; 5,9 μ mol). Vzorek byl protřepán a uchován při laboratorní teplotě ve tmě. Po 23 h byla část vzorku č. 11 naředěna a měřena pomocí kapalinové chromatografie. Z vzorku č. 11 byly vytvořeny vzorky č. 12 a 13 tak, že k odebranému podílu vzorku č. 11 (0,1 ml) bylo po 24 h od začátku reakce přidáno 0,05 ml destilované vody (vzorek č. 12) a k další odebrané části vzorku č. 11 (0,1 ml) bylo přidáno 0,05 ml deionizované vody (vzorek č. 13). Vzorky č. 12 a 13 byly po třech dnech zředěny a změřeny. Vzorky č. 12 a 13 byly následně čištěny přes SPE kolonky. Z důvodu malého množství a žádného vlivu na výsledek mezi destilovanou a deionizovanou vodou byly oba tyto vzorky smíchány a naředěny vodou tak, aby byl procentuální obsah methanolu 2%. Směs těchto vzorků byla nanasena na předem aktivovanou SPE-RP18 kolonku. Po vysušení

kolonky byl vzorek eluován 2 x 0,5 ml methanolu. Extrakt z SPE byl označen jako vzorek č. 14. Tento vzorek byl následně měřen pomocí kapalinové chromatografie a chromatografie s hmotnostní detekcí (viz kapitola 3.1.2). Dále byla měřena část, která se na kolonce nezachytila.

Vzorek č. 15 byl vytvořen tak, že 0,1 ml vzorku č. 11 (4 dny od začátku reakce, uchovávan ve tmě při laboratorní teplotě) bylo smícháno s 0,2 ml deionizované vody. Vzorek č. 15 byl uchovávan ve tmě při laboratorní teplotě. Po jednom dni byla část vzorku č. 15 naředěna a změřena metodou HPLC.

3.1.7 Dimerizace *E*-resveratrolu pomocí Fentonovy reakce

3.1.7.1 Fentonova reakce s FeSO₄

Byl připraven zásobní roztok FeSO₄ v destilované vodě (10 mmol/l), dále byl připraven zásobní roztok *E*-resveratrolu v methanolu (100 mmol/l).

Vzorek č. 1 byl připraven smícháním 0,4 ml zásobního roztoku FeSO₄ (4 μmol) s 0,4 ml zásobního roztoku *E*-resveratrolu (40 μmol). Po smíchání se vytvořil zákal, který byl rozpuštěn přidáním 1,4 ml methanolu. Následně byla reakční směs okyselená 5 kapkami 0,1 M HCl na pH kolem 3 pH papírkem. Reakční směs byla umístěna do vodní lázně (40 °C). Reakce byla zahájena přidáním 4 x 10 μl (0,4 μmol) peroxidu vodíku (30%). Po každém přidání 10 μl peroxidu vodíku byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Během reakce byl vzorek průběžně protřepáván. Po jedné hodině byla část vzorku (10 μl) zředěna 50x methanolem a změřena metodou HPLC (vzorek označen 1A). Po 1h 20 min bylo přidáno znovu 4 x 10 μl peroxidu vodíku (30%). Po každém přidání podílu byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Během reakce byl vzorek průběžně protřepáván. Po 1h 50 min byla reakce ukončena, vzorek vyjmut z vodní lázně a po ustálení teploty byl naředěn a měřen pomocí kapalinové chromatografie (vzorek označen 1B). Výsledná barva vzorku připomínala rez oproti původnímu lehce zelenému zbarvení. Po 5 dnech byla znovu část vzorku č. 1 naředěna a změřena metodou HPLC (vzorek označen 1C).

Čtyři dny od zahájení reakce bylo 0,5 ml vzorku č. 1 čištěno přes SPE kolonku. Kolonka byla aktivována (2x objemem kolonky) methanolem a poté (2x objemem kolonky) destilovanou vodou. 0,5 ml vzorku č. 1 bylo zředěno 15 ml destilované vody. Takto zředěný vzorek byl použit na pročištění. Během vlastního čištění se nad filtrem kolonky vytvořila hnědá usazenina, která zpomalovala průběh čištění. Po průchodu vzorku byla usazenina zvířena destilovanou vodou a odebrána pasterkou. Tento vzorek z usazeniny byl následně protřepán do ethylacetátu. Ethylacetátový podíl byl pak odebrán, odpařen proudem dusíku při 40 °C a rozpuštěn v 0,2 ml methanolu. Před vlastní elucí byla SPE kolonka vysušena. Vzorek č. 1 byl z SPE eluován 1 a 0,5 ml methanolu a následně měřen metodou HPLC a LC-MS (viz kapitola 3.1.2.2).

3.1.7.2 Fentonova reakce s CuSO₄

Byl připraven zásobní roztok CuSO₄ v destilované vodě (10 mmol/l) a zásobní roztok *E*-resveratrolu v methanolu (100 mmol/l).

Vzorek č. 2 byl připraven smícháním 0,4 ml zásobního roztoku CuSO₄ (4 μmol) s 0,4 ml zásobního roztoku *E*-resveratrolu (40 μmol). Po smíchání se vytvořil zákal, který byl rozpuštěn přidáním 1,4 ml methanolu. Následně byla reakční směs okyselena 5 kapkami 0,1 M HCl na pH kolem 3 pH papírkem. Reakční směs byla umístěna do vodní lázně (40 °C). Reakce byla zahájena přidáním 4 x 10 μl (0,4 μmol) peroxidu vodíku (30%). Po každém přidání 10 μl peroxidu vodíku byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Po jedné hodině byla část vzorku (10 μl) zředěna 50x methanolem a měřena metodou HPLC (vzorek označen 2A). Po 1 h 20 min bylo přidáno znovu 4 x 10 μl peroxidu vodíku (30%). Po každém přidání podílu byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Během reakce byl vzorek průběžně protřepáván. Po 1 h 50 min byla reakce ukončena naředěna část vzorku a změřena (vzorek označen 2B). Po ukončení reakce byla výsledná barva vzorku č. 2 oranžovo-červená oproti původnímu namodralému zabarvení. Po 4 dnech, od ukončení reakce, byla znovu část vzorku č. 2 naředěna a měřena (vzorek označen 2C).

Tři dny od zahájení reakce bylo 0,5 ml vzorku č. 2 čištěno přes SPE kolonku. Kolonka byla aktivována (2x objemem kolonky) methanolem a poté (2x objemem kolonky) destilovanou vodou. 0,5 ml vzorku č. 2 bylo zředěno 15 ml destilované vody. Takto zředěný vzorek byl použit na pročištění. Tento vzorek netvořil usazeninu nad filtrem SPE kolonky. Před vlastní elucí byla kolonka vysušena. Vzorek č. 2 byl z SPE eluován 1 a 0,5 ml methanolu a následně měřen metodou HPLC a LC-MS (viz kapitola 3.1.2.2).

3.1.7.3 Fentonova reakce s CuSO₄ - vliv okyselení

Vliv okyselení byl zkoumán na vzorcích č. 3 – 8. Reakce v těchto vzorcích probíhala při teplotě 30 °C. Příprava těchto vzorků byla identická s přípravou vzorku č. 2. Jediným rozdílem bylo přidání množství 0,1 M HCl. Okyselení bylo pro jednotlivé vzorky následující: Vzorky č. 3 a 4 nebyly okyseleny, vzorky č. 5 a 6 byly okyseleny 2 kapkami 0,1 M HCl, vzorky č. 7 a 8 byly okyseleny 5 kapkami 0,1 M HCl. Připravené vzorky byly před přidáním peroxidu vodíku umístěny do vodní lázně nastavené na 30 °C. Po ustálení teploty byla zahájena reakce přidáním 4 x 10 μl peroxidu vodíku (30 %). Po každém přidání 10 μl peroxidu vodíku byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Po 1 h 20 min bylo přidáno znovu 4 x 10 μl peroxidu vodíku (30 %). Po každém přidání podílu byla reakční směs promíchána ve vodní lázni. Během reakce byly vzorky průběžně protřepávány. Po 1 h 50 min byla reakce ukončena a vzorky vyjmuty z vodní lázně. Po ustálení teploty ve vzorcích byla část od každého

vzorku naředěna a měřena metodou HPLC. V průběhu reakce se barva vzorků měnila z lehce namodralé přes oranžovou až na oranžovo-červenou.

3.1.7.4 Fentonova reakce s CuSO_4 - vliv teploty

Vliv teploty byl sledován na vzorcích č. 9 – 12. Příprava všech těchto vzorků byla identická s přípravou vzorku č. 2. Až na nastavení odlišné teploty vodní lázně, bylo postupováno stejným způsobem jako u tohoto vzorku. Vzorky č. 9 a 10 byly před zahájením reakce a během reakce umístěny do vodní lázně nastavené na 60 °C. Vzorky č. 11 a 12 nebyly umístěny do vodní lázně a teplota před a během reakce odpovídala laboratorní teplotě. Všechny tyto vzorky nebyly měřeny po prvním přidavku peroxidu, ale byly měřeny až po ukončení reakce.

3.1.7.5 Optimalizace čištění extrakcí tuhou fází

Za účelem čištění vzorků a zakoncentrování dimeru byla provedena extrakce tuhou fází, při níž byly použity SPE-RP18 kolony (500 mg). S cílem získat co nejvíce dimeru, byly použity oba duplicitní vzorky č. 9 a 10. Čištění probíhalo 21 dní od ukončení reakce, vzorky byly během této doby skladovány ve tmě při laboratorní teplotě. 1 ml vzorku č. 9 spolu s 1 ml vzorku č. 10 byl zředěn 31 ml destilované vody tak, aby výsledné zastoupení methanolu bylo přibližně 5%. SPE kolonka byla aktivována 2 x methanolem a 2 x 5% methanolem. Následovalo nanesení vzorku, po němž byla kolonka vysušena. Eluce probíhala v následujících frakcích:

Frakce I	- nesorbováno, 5% methanol (přibližně 35 ml)
Frakce II	- 50% methanol (2 x 1 ml)
Frakce III	- 80% methanol (2 x 1 ml)
Frakce IV	- 100% methanol (2 x 1 ml)
Frakce V	- 100% ethylacetát (2 x 1 ml)

Mezi frakcí IV a V byla kolonka vysušena. Ethylacetát byl z frakce V odpařen při 40 °C proudem dusíku, a sušina rozpuštěna v 0,2 ml methanolu.

V závislosti na výsledcích, bylo čištění provedeno znovu s jemněji odstupňovanou polaritou eluentu. Pro toto čištění byly připraveny nové vzorky č. 13 – 15. Každý vzorek byl připraven opakováním postupu vzorku č. 2. Jediným rozdílem bylo okyselení, které bylo provedeno pouze 2 kapkami 0,1 M HCl. Vzorky byly před zahájením reakce umístěny do vodní lázně (40 °C). Reakce byla zahájena přidáním 4 x 10 µl peroxidu vodíku (po každém přidavku peroxidu byl vzorek promíchán). Po 1 h 20 min byl stejným způsobem znovu přidán peroxid vodíku (4 x 10 µl). Po každém přidání podílu byla reakční směs promíchána ve vodní

lázni. Během celého průběhu reakce byly vzorky průběžně protřepávány. Po 1 h 50 min byla reakce ukončena a vzorky vyjmuty z vodní lázně. Po ustálení teploty ve vzorcích byly 2 ml od každého vzorku naředěny 31 ml destilované vody. Vzorky byly následně čištěny přes SPE-RP18 (500 mg). Tyto kolonky byly předem aktivovány 2 x objemem methanolu a 2 x objemem 5% methanolu. V dalším kroku byl nanesen vzorek. Eluce a rozdělení do frakcí probíhalo následovně:

Frakce I	- 30% methanol (2 x 1 ml)
Frakce II	- 50% methanol (2 x 1 ml)
Frakce III	- 60% methanol (2 x 1 ml)
Frakce IV	- 80% methanol (2 x 1 ml)
Frakce V	- 100% methanol (2 x 1 ml)

3.1.7.6 Fentonova reakce s CuSO_4 při použití karbamidperoxidu

Do vialek označených vzorky č. 16 – 18 bylo naváženo 76 mg peroxyhydrátu močoviny. Do každého vzorku bylo přidáno 0,4 ml roztoku *E*-resveratrolu v methanolu (100 mmol/l; 40 μmol), 0,4 ml roztoku CuSO_4 ve vodě (10 mmol/l; 4 μmol), 1,4 ml methanolu a nakonec byla reakční směs okyselena 2 kapkami 0,1 M HCl. Vzorky byly během reakce (1 h 50 min) umístěny do vodní lázně při 40 °C. Během vlastní reakce byly vzorky průběžně protřepávány. Po ukončení reakce byly vzorky naředěny 7 ml destilované vody. Následovalo čištění extrakcí do ethylacetátu. Čištění probíhalo ve 3 krocích s objemy 2 ml, 1 ml, 1 ml ethylacetátu. V každém kroku byl ethylacetát z jednotlivých vzorků odebrán. Odebrané vzorky byly pak zbaveny ethylacetátu proudem dusíku při 40 °C. Sušina byla pak rozpuštěna ve 2 ml methanolu a ředěna před měřením metodou HPLC.

Pro porovnání Fentonovy reakce mezi karbamidperoxidem a běžným peroxidem vodíku byly vytvořeny vzorky č. 19 – 21. Tyto vzorky byly připraveny stejným postupem jako vzorky č. 13 – 15 a reakce probíhala za stejných podmínek. Rozdíl nastal až při jejich čištění. Před vlastním čištěním byly vzorky naředěny 7 ml destilované vody. Čištění bylo provedeno extrakcí do ethylacetátu ve třech krocích identicky jako u vzorků č. 16 – 18.

3.1.8 Izolace *E-ε*-viniferinu z réví pomocí chromatografických metod

Bylo naváženo 17,12 g polyamidu, který byl vložen do kolony. Kolona byla sestavena dle uvedeného schéma (obr. 19). Výška polyamidového sloupce činila 17,1 cm, a průměr kolony odpovídal 25 mm. Kolona byla aktivována 60 ml 40% methanolu. K separaci byl použit zakoncentrovaný methanolvý extrakt z réví, jehož objem byl 2,7 ml.



Obrázek 19: Schéma sestavení kolony.

Vlastní separace probíhala ve frakcích o objemu 100 ml s výjimkou poslední frakce, ve které bylo použito pouze 40 ml. 2. pokus byl proveden bez 20% methanolu. Jednotlivé rozdělení frakcí je uvedeno v tabulce III.

Tabulka III: Rozdělení frakcí.

	1. pokus	2. pokus
frakce I	70% methanol	70% methanol
frakce II	20% methanol	85% methanol
frakce III	85% methanol	90% methanol
frakce IV	90% methanol	100% methanol
frakce V	100% methanol	100% methanol
frakce VI	100% methanol	

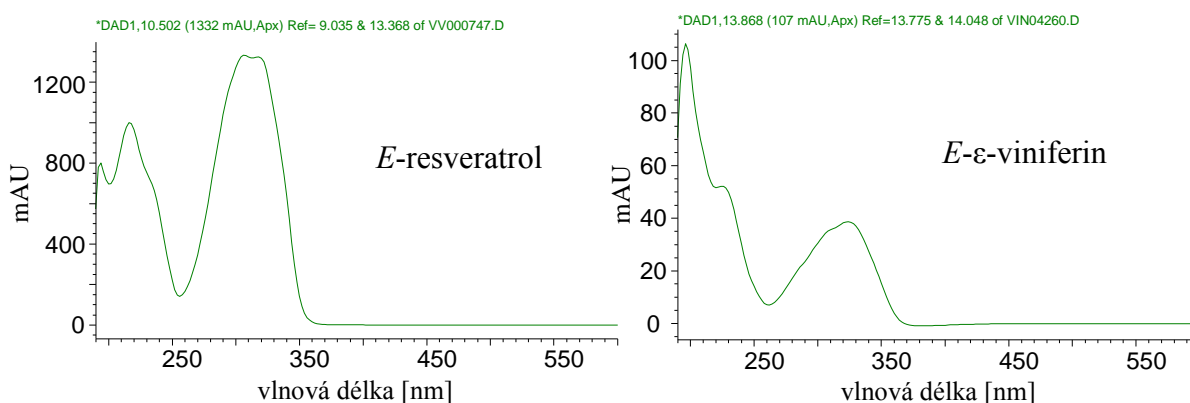
4 Výsledky

4.1 Kalibrace

Kalibrační přímka byla získána proměřením roztoků standardu *E*-resveratrolu, při 315 nm. Lineární regrese kalibrační přímky měla tvar $y = 271,16x + 5,7854$ a korelační koeficient měl hodnotu 0,9947. Tato kalibrace byla použita ke stanovení obsahu *E*-resveratrolu a obsahu jeho dvou dimerů *E*- ϵ -viniferinu a *E*- δ -viniferinu jako ekvivalentu *E*-resveratrolu.

4.2 Naměřená data

Dimery *E*-resveratrolu (*E*- ϵ -viniferin a *E*- δ -viniferin) byly určeny tak, že naměřená data (retenční časy, UV spektra, LC-MS spektra) byly porovnány s údaji uvedenými v literatuře. Jako další určující krok *E*- ϵ -viniferinu sloužil extrakt z révy révy vinné, kde spolu s *E*-resveratrole patří *E*- ϵ -viniferin k nejvýznamněji zastoupeným látkám. Absorpční spektra *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu jsou uvedena na obrázku 20.



Obrázek 20: Absorpční spektra *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu.

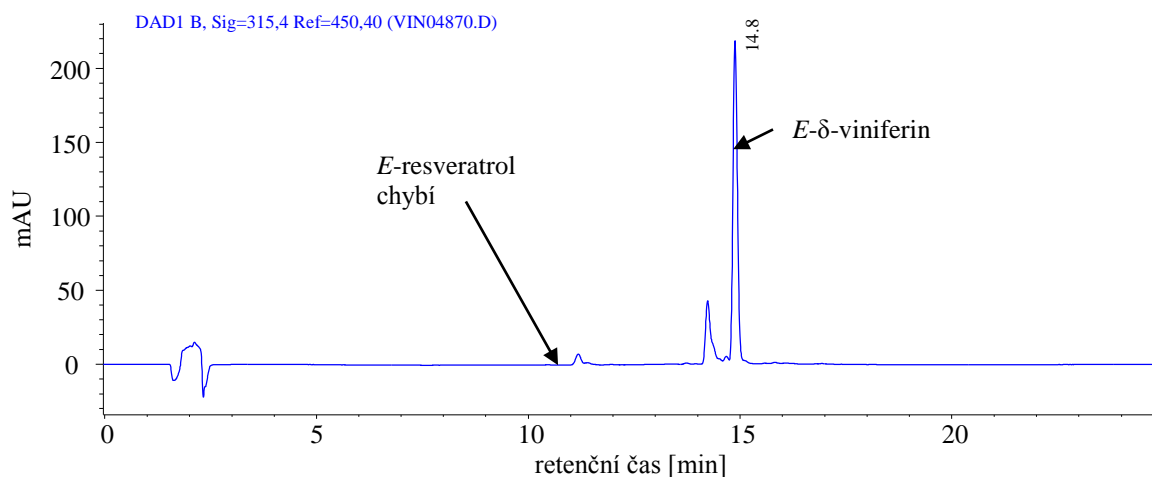
Určení *E*- δ -viniferinu, který byl produktem mnohých reakcí, se zakládalo kromě výše zmíněného měření též na změření NMR spekter. Vzhledem k nedostatečně čistému produktu reakce se pomocí NMR měření jednoznačně neprokázala struktura tohoto dimeru. Vše však naznačuje tomu, že se bude jednat o *E*- δ -viniferin. Další měření NMR spekter bude znovu provedeno u produktu reakce resveratrolu s lakázou, při které byl *E*- δ -viniferin získán čistější.

4.2.1 Dimerizace *E*-resveratrolu lakázou

Reakce *E*-resveratrolu lakázou z outkovky pestré poskytla stejný produkt jako Fentonova reakce s CuSO_4 nebo jako reakce *E*-resveratrolu s chloridem železitým ve vysušeném methanolu s dodatečně přidanou vodou. Dle literatury ^(146, 148) se jedná o dimer *E*- δ -viniferin.

Při vlastní extrakci do ethylacetátu se vytvořila jakási bílá mezifáze. Ta nebyla odebrána. V druhém a třetím extrakčním kroku již nebyla tak významně patrná jako v kroku prvním. Vzorek č. 1 ale obsahoval tuto bílou mezifáze více než zbylé dva vzorky.

Vyhodnocená data dimerizace *E*-resveratrolu lakázou jsou zobrazeny na obrázku 40, aby je bylo možné porovnat dimerizací za pomoci modifikované Fentonovy reakce s CuSO_4 . Kromě zmíněného dimeru vzniklo ještě minimální množství dalších dvou látek s podobnými UV-VIS spektry a blízkým retenčním časem. Záznam z kapalinové chromatografie je zobrazen na obrázku 21.

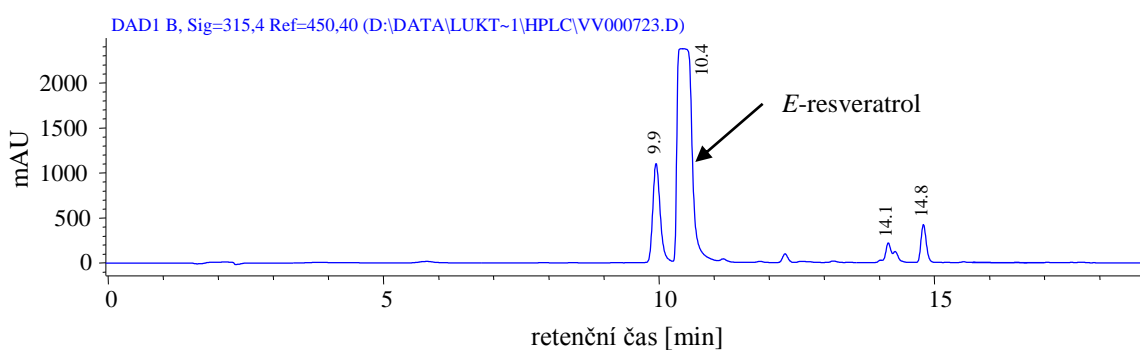


Obrázek 21: Záznam z kapalinové chromatografie vzorku č. 2.

Z výsledků vyplývá (obr. 21), že lakáza dimerizuje *E*-resveratrol velice specificky. Při této reakci nevzniká totiž rozmanitá škála produktů a veškerý *E*-resveratrol byl spotřebován reakcí.

4.2.2 Dimerizace *E*-resveratrolu 2-hydroxy-1,4-naftochinonem

Podle vyhodnocených výsledků lze usuzovat, že *E*-resveratrol s 2-hydroxy-1,4-naftochinonem téměř nereaguje. Bylo zkoumáno několik modifikací této reakce včetně působení UV záření o vlnové délce 254 nm či vliv slunečního světla. Vzorky 1 – 8 byly měřeny 5. den reakce a 49. den reakce metodou HPLC (kap. 3.1.2.1) při níž nebyly detekovány žádné produkty, jevící se jako dimer, ve vzorcích. Naproti tomu v naředěných podílech vzorků č. 2, 4, 5 a 7, uchovávaných na světle od 5. dne reakce po dobu 44 dní, bylo naměřeno nepatrné množství potencionálních dimerů (obr. 22). Sluneční záření tedy nejvýznamněji ovlivňovalo reakci, jež vedla k produkci minoritního zastoupení produktů.



Obrázek 22: Zředěný vzorek č. 7 uchovávaný od 5. dne reakce 44 dní na světle.

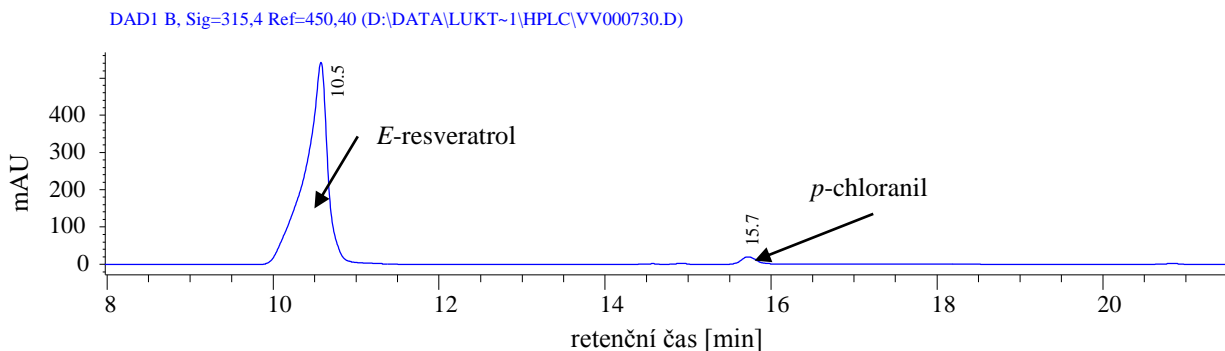
Neznámá látka s retenčním časem 9,9 min byla přítomna ve všech vzorcích v této sekci.

Dále byly měřeny vzorky 1 – 8, které byly 49 dní uchovávány ve tmě a od 49. dne umístěny na 13 dní na světle u okna při laboratorní teplotě. Naměřené chromatogramy byly podobné jako na obrázku 22. Množství látek jevící se jako potencionální dimery bylo mnohem nižší.

Vzhledem k nedostatečnému množství vzniklých produktů reakce, nebyl žádný ze vzorků reakce *E*-resveratrolu s 2-hydroxy-1,4-naftochinonem měřen pomocí metody LC-MS (kap. 3.1.2.2).

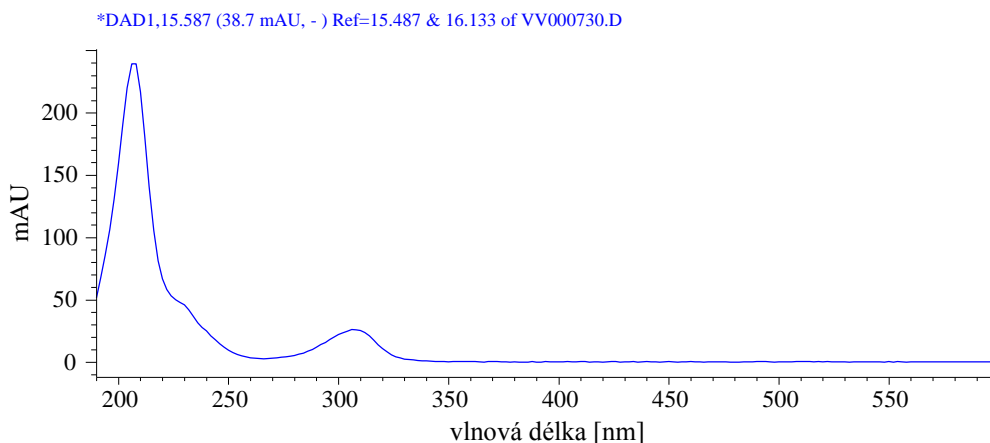
4.2.3 Dimerizace *E*-resveratrolu tetrachloro-1,4-benzochinonem

Dimerizace *E*-resveratrolu s *p*-chloranilem byla studována v prostředí acetonitrilu za různých reakčních podmínek (viz kapitola 3.1.5). Z naměřených vzorků 1 – 6 vyplývá, že tato reakce neprobíhá. Naměřené chromatogramy mezi jednotlivými vzorky 1 – 6 byly prakticky stejné, jako je uvedeno na obrázku 23.



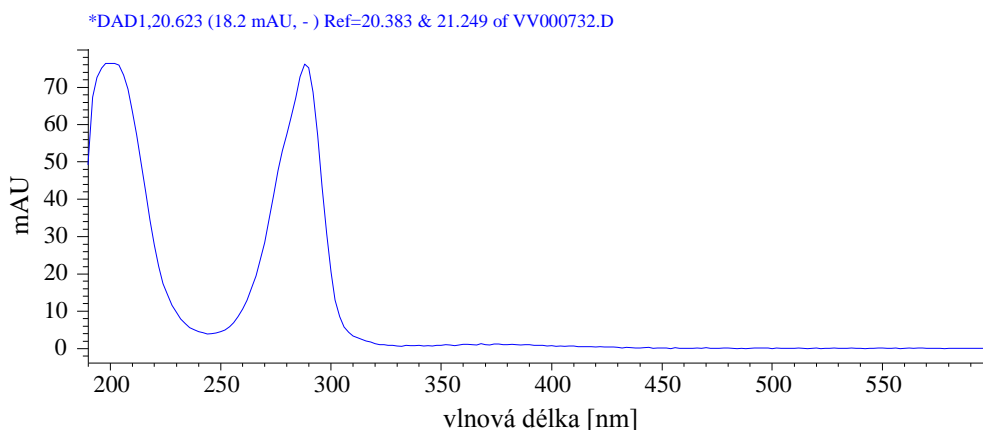
Obrázek 23: HPLC chromatogram vzorku č. 1.

Vrchol, který je na obrázku 23 s retenčním čase 15,7 min, odpovídá jednomu ze dvou vrcholů *p*-chloranilu a jeho absorpční spektrum je zobrazeno na obrázku 24.



Obrázek 24: Absorpční spektrum prvního vrcholu *p*-chloranilu.

Druhý vrchol *p*-chloranilu, který měl retenční čas 20,3 min má absorpční spektrum uvedené na obrázku 25.

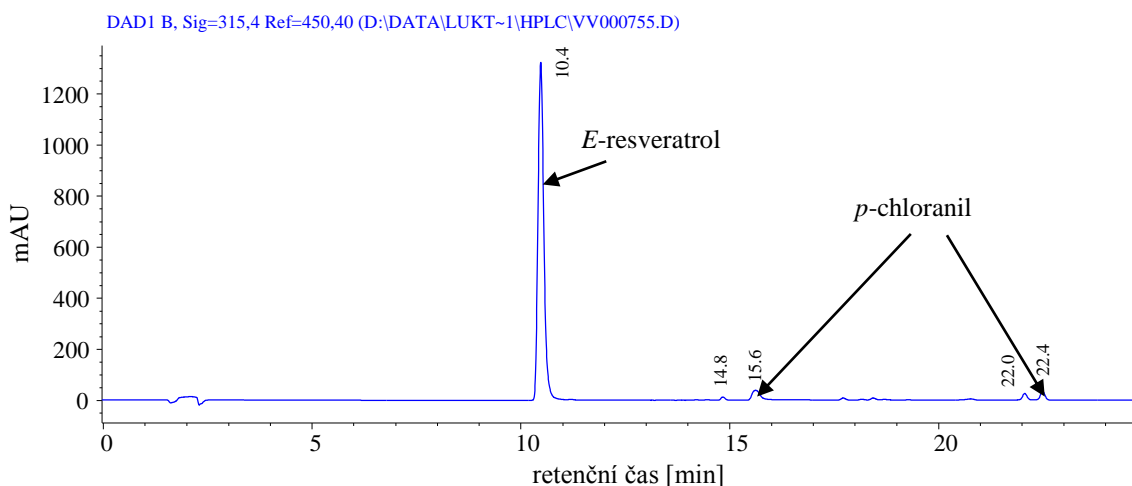


Obrázek 25: Absorpční spektrum druhého vrcholu *p*-chloranilu.

Oba vrcholy odpovídající *p*-chloranilu byly určeny změřením samotného roztoku *p*-chloranilu v acetonitrilu použitého při přípravě vzorků metodou HPLC.

Ozařováním vzorků č. 1, 3 a 6 nemělo též žádný dopad na reakci. Stejně tak dopadl i pokus rozběhnout reakci okyselením ozářeného vzorku č. 1. Přestože okyselení nezpůsobilo žádnou změnu, co se týče *E*-resveratrolu, okyselení způsobilo, že se změnil poměr mezi jednotlivými vrcholy odpovídající *p*-chloranilu.

Použití vysušeného acetonitrilu (vzorek č. 8) nemělo žádný dopad na chod reakce. Přidání vody do tohoto vzorku však způsobilo, že se změnil poměr mezi jednotlivými vrcholy odpovídající *p*-chloranilu podobně jako při okyselení. Chromatogram vzorku č. 8 po přidání vody je zobrazen na obrázku 26.

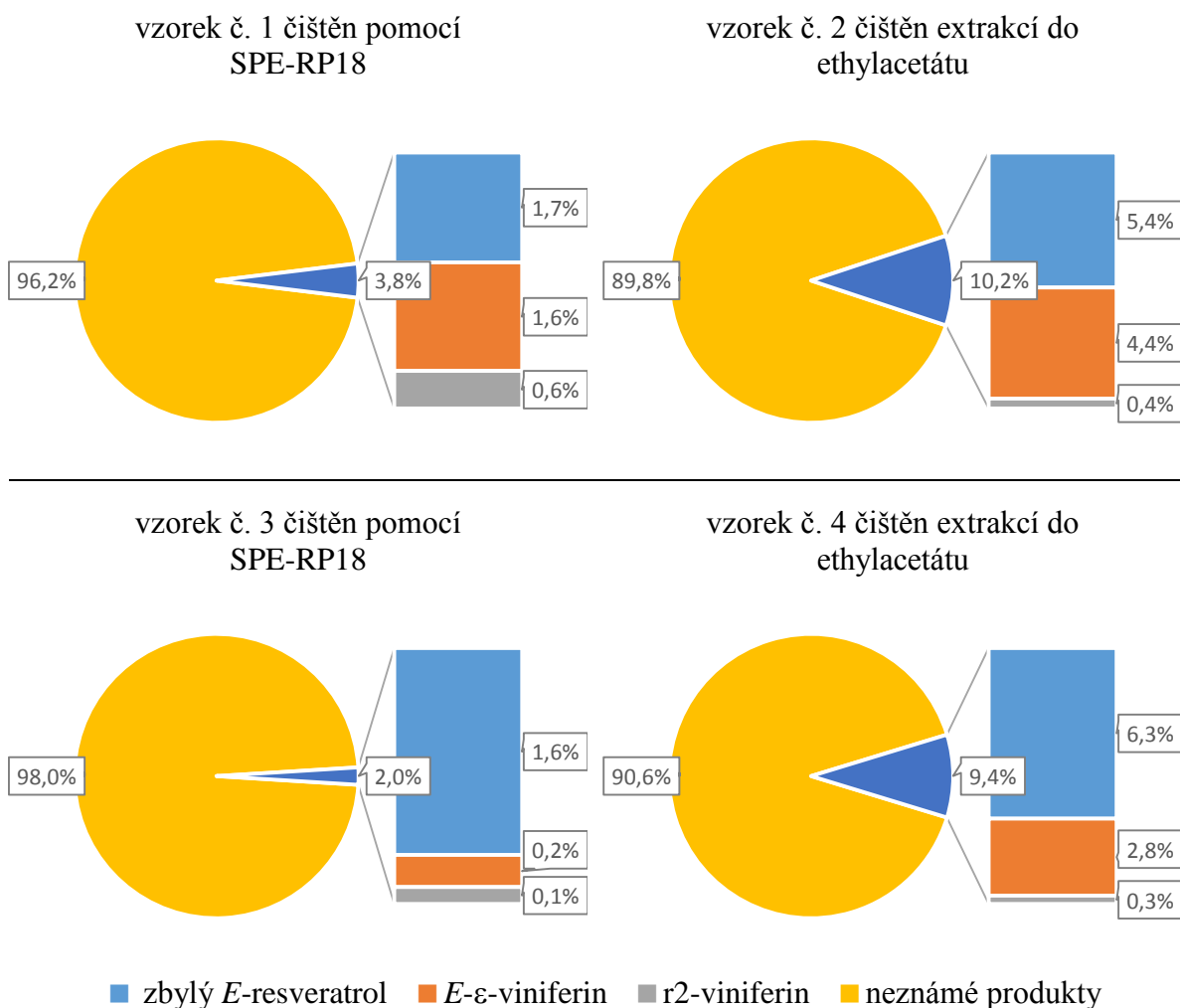


Obrázek 26: HPLC chromatogram vzorku č. 8 po přidání vody.

Na tomto chromatogramu je možné vidět i dvě minoritní látky s retenčními časy 14,8 a 22,0 min. Protože je jejich množství zanedbatelné bylo od dalšího použití *p*-chloranilu k dimerizaci *E*-resveratrolu upuštěno.

4.2.4 Dimerizace *E*-resveratrolu chloridem železitým

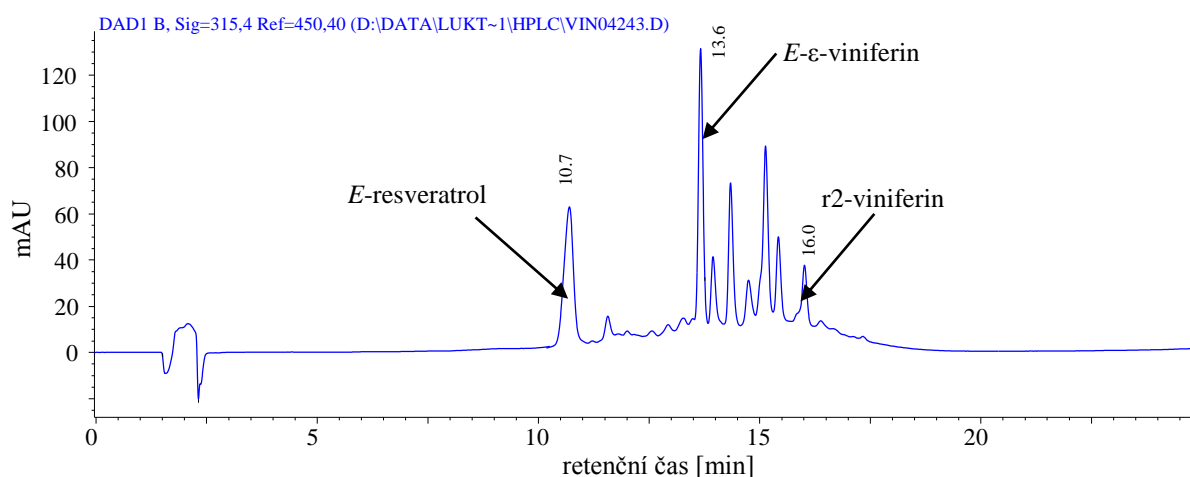
Reakce *E*-resveratrolu s chloridem železitým rozpuštěným vodě (vzorek č. 1 a 2) vedla k zisku většího množství produktů, než tomu bylo u obdobné reakce (vzorek č. 3 a 4), v níž byl chlorid železitý rozpuštěný v methanolu. Dále je možné pozorovat rozdíl při čištění vzorků extrakcí tuhou fází a při čištění extrakcí do ethylacetátu. Výsledky ukazují, že extrakce do ethylacetátu poskytuje větší výtěžnost *E*- ϵ -viniferinu než je tomu při čištění pomocí SPE-RP18 kolonek. Vyhodnocená data jsou vnesena do výšečových grafů na obrázku 27.



Obrázek 27: Výšečové grafy z vyhodnocených dat pro vzorky č. 1-4.

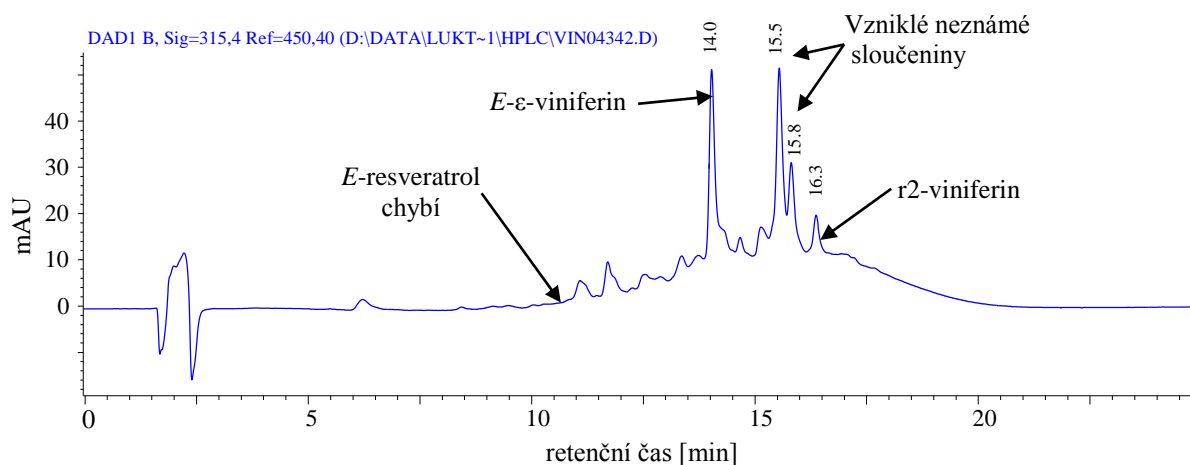
100% v grafech na obrázku 27 odpovídá celkovému množství *E*-resveratrolu přidaného do vzorku. Čištění bylo provedeno s cílem zbavení se iontů železa před vlastním měření metodou HPLC (kap. 3.1.2.1).

Míra, se kterou reakce probíhá, je pozorovatelná porovnáním obrázků 28 a 29.



Obrázek 28: Reakce po dobu 3 dní (vzorek č. 1).

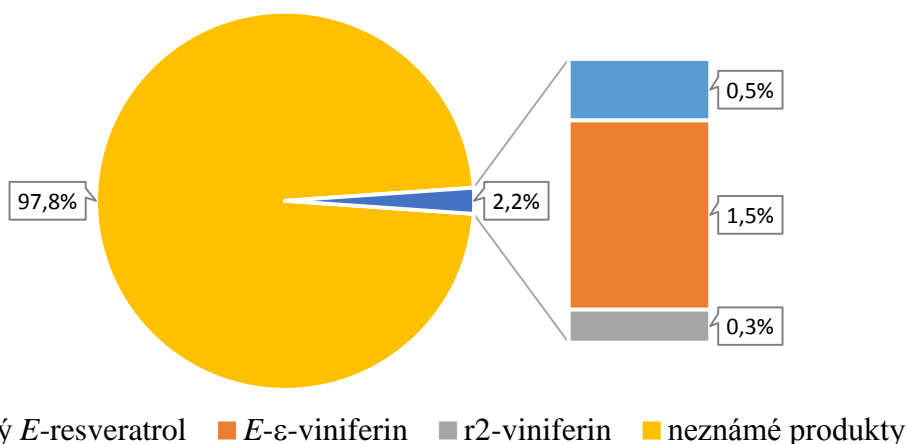
Reakce po 3 dnech tvoří *E-ε*-viniferin a r2-viniferin spolu s pěti dalšími neidentifikovanými látkami. Prodloužením doby reakce na 20 dní, tři z těchto látek zmizí a zbylé dvě jsou přítomny ve větším množství.



Obrázek 29: Reakce po dobu 20 dní (vzorek č. 5).

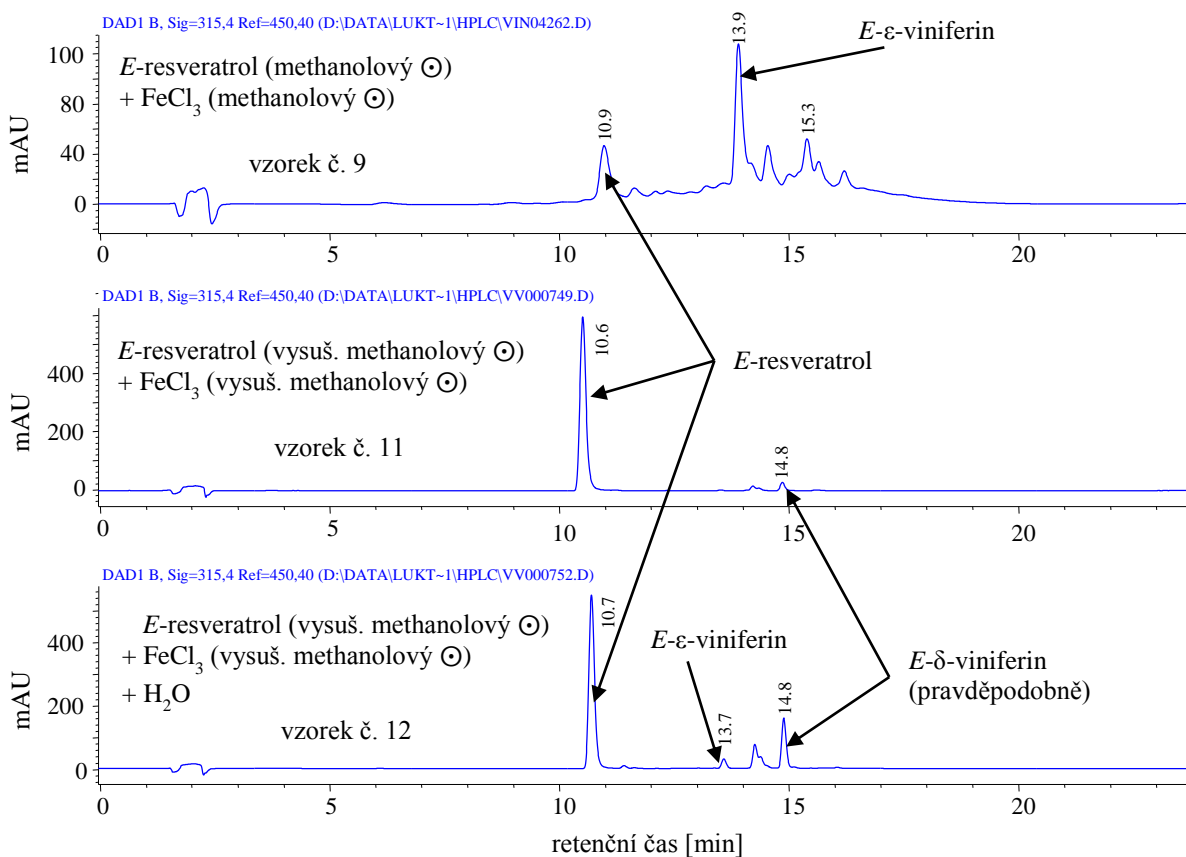
Při porovnání časového hlediska na reakci *E*-resveratrolu s chloridem železitým je zřejmé, že tato reakce nekončí tvorbou *E-ε*-viniferinu. *E-ε*-viniferin je sice nejvýznamněji zastoupenou sloučeninou po třech dnech reakce, ale po dvaceti dnech je pravděpodobně přeměňován na jiné látky, jež odpovídají na chromatogramu vzorku č. 5 (obr. 29) vrcholům s retenčními časy 15,5 a 15,8 min. Tyto dvě nově vzniklé sloučeniny jsou pravděpodobně stilbenoidní povahy, protože mají fluorescenci.

V další části této práce byl sledován vliv UV záření 254 nm na tuto reakci. Vyhodnocená data jsou zobrazena na obrázku 30.



Obrázek 30: Vliv ozařování na reakci.

Z výsledků vyplývá, že UV záření nemá významný vliv na reakci a tvorbu *E*-ε-viniferinu. Na druhou stranu, vliv vody na reakci je dobře patrný porovnáním chromatogramů vzorků č. 9, 11 a 12, které jsou uvedeny na obrázku 31.

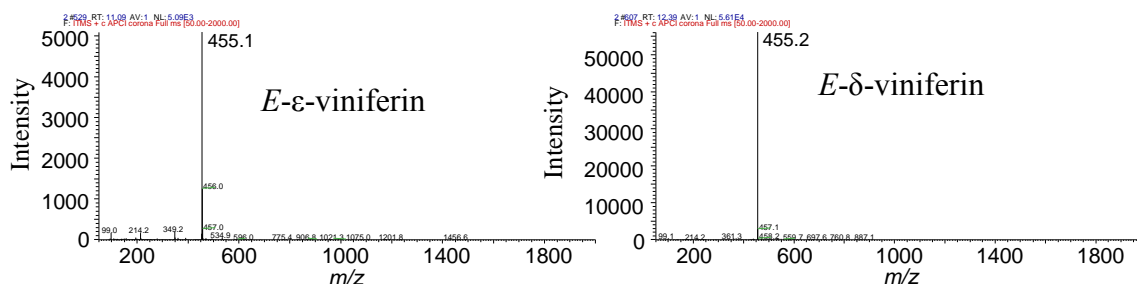


Obrázek 31: Chromatogramy vzorků č. 9, 11 a 12.

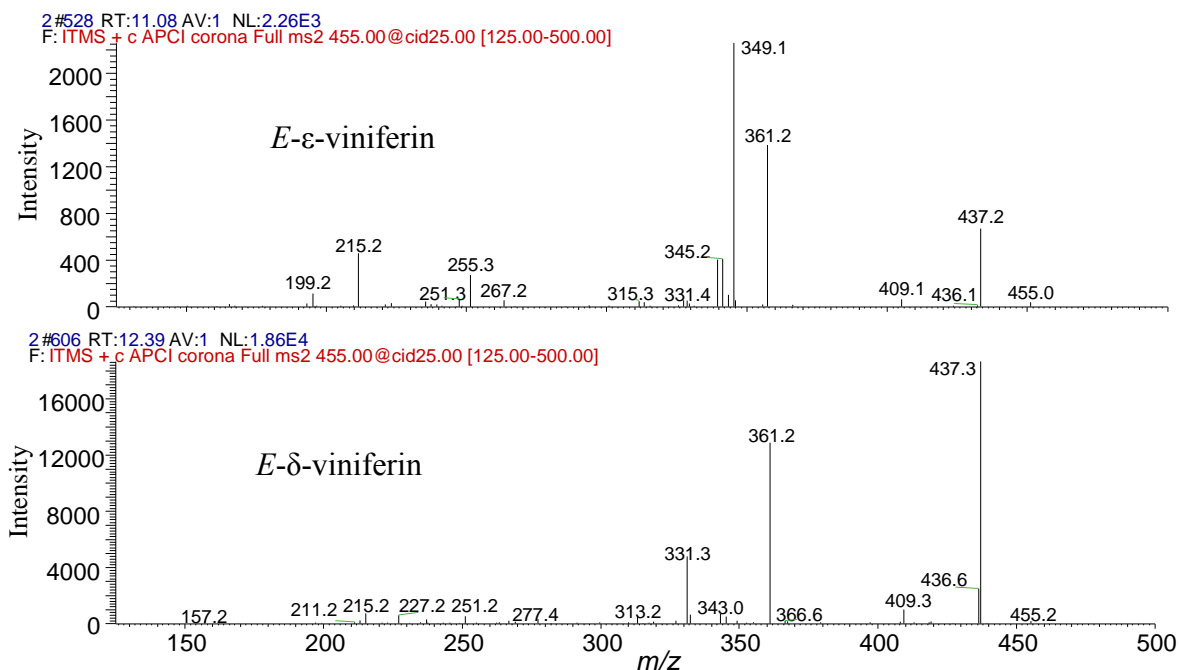
Absence vody měla za následek praktické zastavení reakce (vzorek č. 11). Lze proto usuzovat, že přítomnost vody hraje nezbytnou roli k chodu reakce. To bylo prokázáno jejím následným přidáním (vzorek č. 12). Avšak zpětně přidaná voda k vzorku poskytla nesrovnatelně nižší zastoupení *E-ε*-viniferinu a na druhou stranu vyšší zastoupení jiného dimeru. Jedná se pravděpodobně o *E-δ*-viniferin.

Dále bylo zkoumáno, jak množství vody ovlivní produkci tohoto dimeru. Nebyl detekován významný rozdíl v získaném množství *E-δ*-viniferinu mezi vzorky č. 12 a 15.

Jednou z hlavních metod pro určení těchto dvou dimerů byla metoda LC-MS (viz kapitola 3.1.2.2). Touto metodou byl změřen vzorek č. 14, který byl přečištěn extrakcí tuhou fází. Naměřená data jsou uvedena na obrázku 32. Nejvýznamnější vrchol odpovídající molekulárnímu iontu dimerů s hodnotou m/z 455 ($M + H$)⁺ v pozitivním módu APCI byl pak znovu fragmentován (obr. 33). Byl zjištěn významný rozdíl v rozpadovém spektru obou dimerů. Spektrum *E-ε*-viniferinu obsahuje navíc ion m/z 349, který by mohl sloužit pro identifikaci této látky.



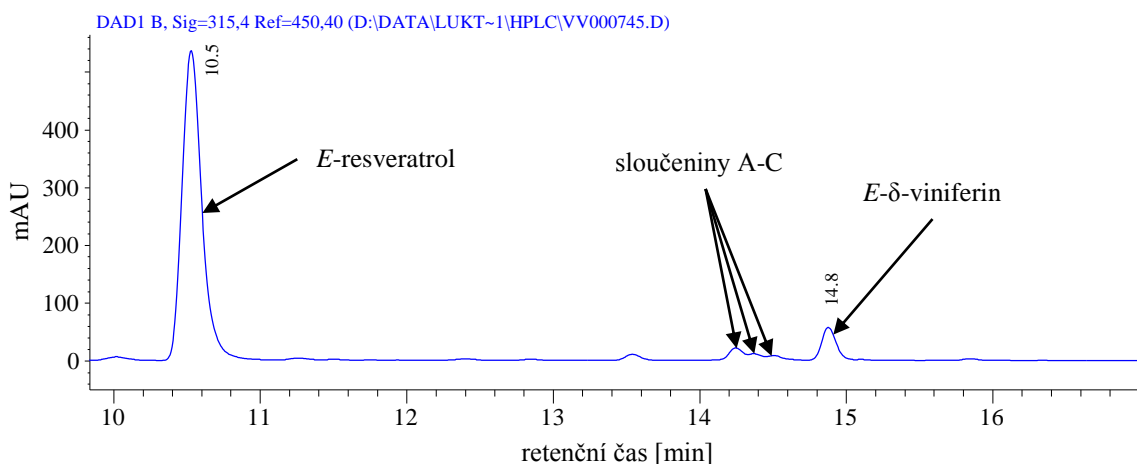
Obrázek 32: Hmotnostní spektra.



Obrázek 33: Fragmentace MS² dimerů v pozitivním módu APCI.

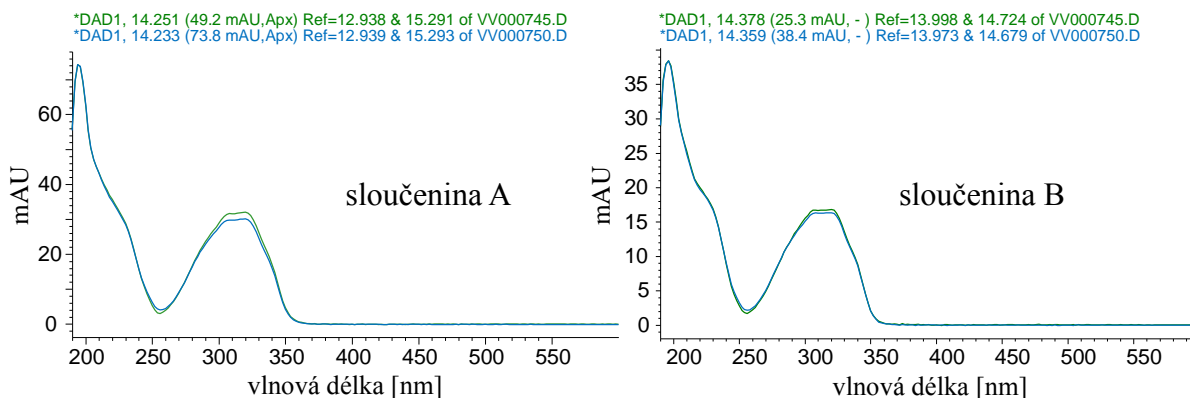
4.2.5 Dimerizace *E*-resveratrolu pomocí Fentonovy reakce

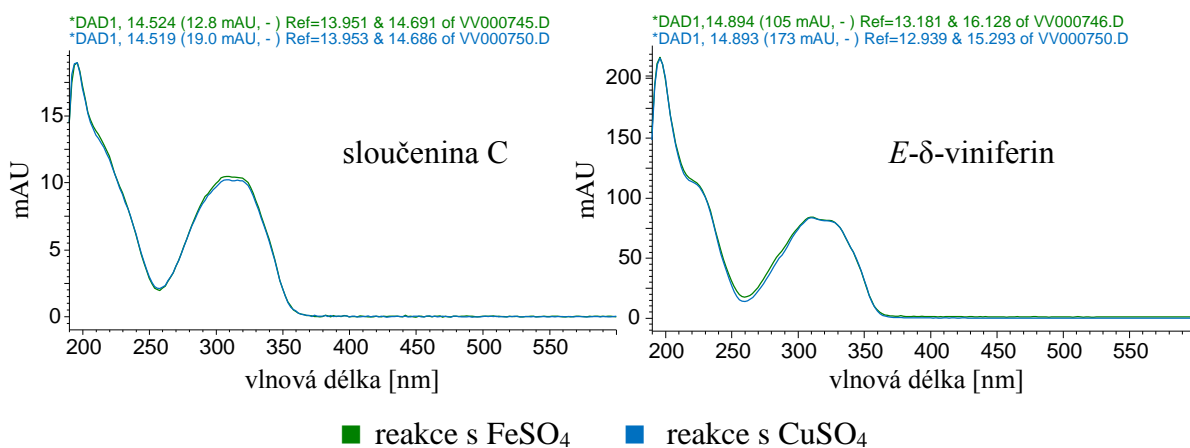
Dimerizace *E*-resveratrolu pomocí Fentonovy reakce s použitím FeSO_4 poskytuje po přidání první dávky peroxidu vodíku (vzorek č. 1A) jako nejvýznamnější produkt dimer (pravděpodobně *E*- δ -viniferin), který není čistý. Teprve po přidání druhé dávky peroxidu vodíku (vzorek č. 1B) je přítomen tento dimer čistý. Přidání druhé dávky peroxidu vodíku má i za následek větší přeměnu *E*-resveratrolu. Dále při této reakci vzniká i několik dalších minoritně zastoupených sloučenin (pravděpodobně dimerů).



Obrázek 34: HPLC chromatogram Fentonovy reakce s FeSO_4 (vzorek č. 1A).

Dimerizace *E*-resveratrolu pomocí Fentonovy reakce s použitím FeSO_4 nebyla zkoumána do takové hloubky jako Fentonova reakce s použitím CuSO_4 vzhledem k obtížnějšímu postupu čištění reakčních produktů. Z hlediska množství tvořených produktů se tyto soli významně neliší. Rozdíl nelze zaznamenat ani na vytvořených produktech. Nejvýznamnějším produktem u obou těchto solí je pravděpodobně *E*- δ -viniferin. Minoritně zastoupené dimery (sloučeniny A – C na obr. 34) se tvoří stejně, jak při použití CuSO_4 , tak při použití FeSO_4 . Jejich shodnost je prezentována na UV spektrech těchto látek na obrázku 35.



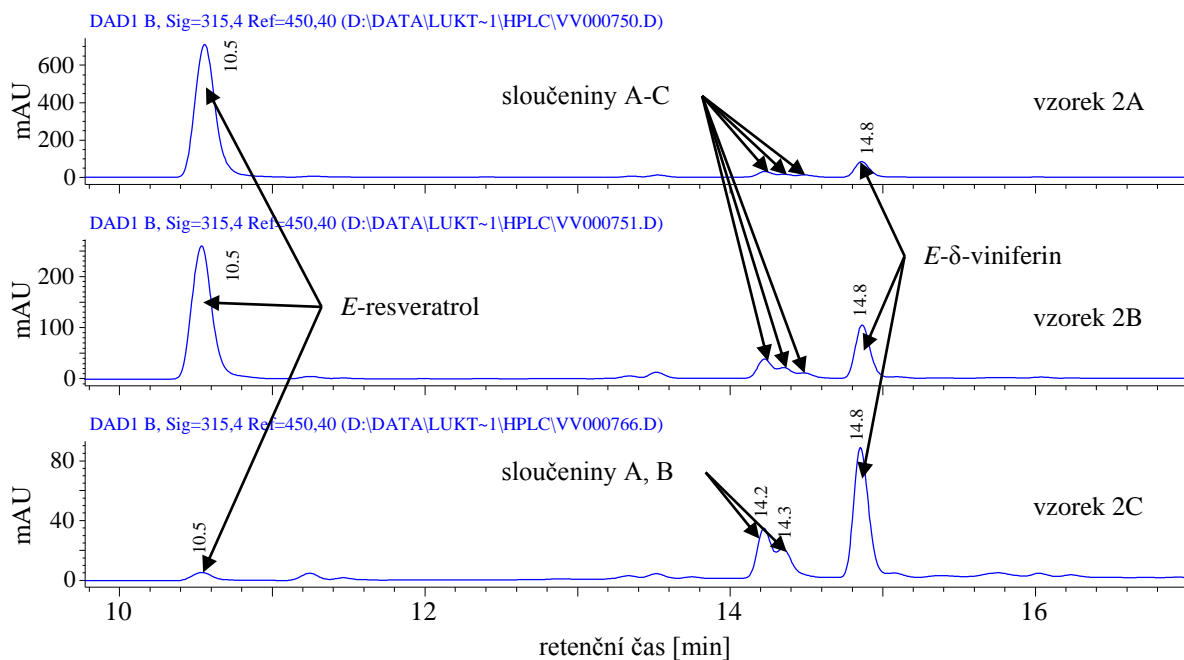


Obrázek 35: Porovnání UV spekter vzniklých dimerů při použití FeSO₄ a CuSO₄.

Důvod, upřednostnění Fentonovy reakce s CuSO₄, je ten, že při čištění přes SPE kolonky se nevytvořil nad filtrem kolonky sediment, který bránil průchodu vzorku, na rozdíl od reakce s FeSO₄. Navíc v tomto sedimentu byl přítomen *E-δ-viniferin*, který se měl pomocí kolonky pročistit a zakonzentrovat.

Dimerizace *E-resveratrolu* pomocí modifikované Fentonovy reakce s CuSO₄ poskytuje po přidání první dávky (vzorek č. 2A) peroxidu vodíku jako nejvýznamnější produkt dimer, který je identický s nejvýznamnějším dimerem při použití FeSO₄. Množství tohoto dimeru (*E-δ-viniferin*) je však menší, ale již po přidání první dávky je čistý. Po přidání druhé dávky (vzorek č. 2B) peroxidu vodíku je množství produkovaného dimeru přibližně stejné s reakcí, v níž byl použit FeSO₄. Rozdíl mezi CuSO₄ a FeSO₄ po přidání druhé dávky spočívá v množství přítomného *E-resveratrolu*. Více nezreagovaného *E-resveratrolu* je v reakci s FeSO₄.

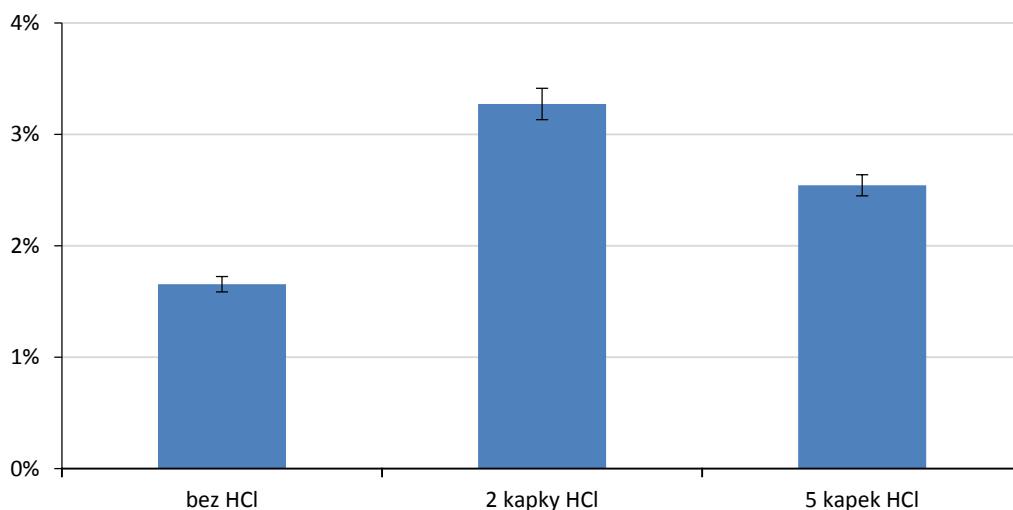
Z hlediska stability tvořených produktů byly vzorky měřeny znovu po několika dnech od ukončení reakce. Jedná se o vzorky č. 1C a 2C. V těchto vzorcích bylo naměřeno minimální množství *E-resveratrolu*. Další změnou byl pokles množství přítomného dimeru (pravděpodobně *E-δ-viniferin*). Spolu s těmito změnami byl měřen slabý nárůst v množství dimerů označených sloučenina A a B. Uvedené změny platí pro Fentonovu reakci s použitím, jak FeSO₄, tak CuSO₄. Přičemž při použití FeSO₄ byly zaznamenány tři další tvořené látky (pravděpodobně dimery) s retenčními časy 12,2, 13,5 a 13,7 min. Zastoupení těchto látek bylo nižší než sloučenin A a B. Uvedené změny jsou prezentovány na obrázku 36.



Obrázek 36: HPLC chromatogram Fentonovy reakce s CuSO_4 (vzorek č. 2A – 2C).

4.2.5.1 Fentonova reakce s CuSO_4 - vliv okyselení

Vliv okyselení byl zkoumán na vzorcích č. 3 – 8, v nichž probíhala reakce při 30 °C ve tmě. Výsledná data jsou vnesena do obrázku 37, kde 100% odpovídá absolutnímu množství vneseného *E*-resveratrolu do reakce.

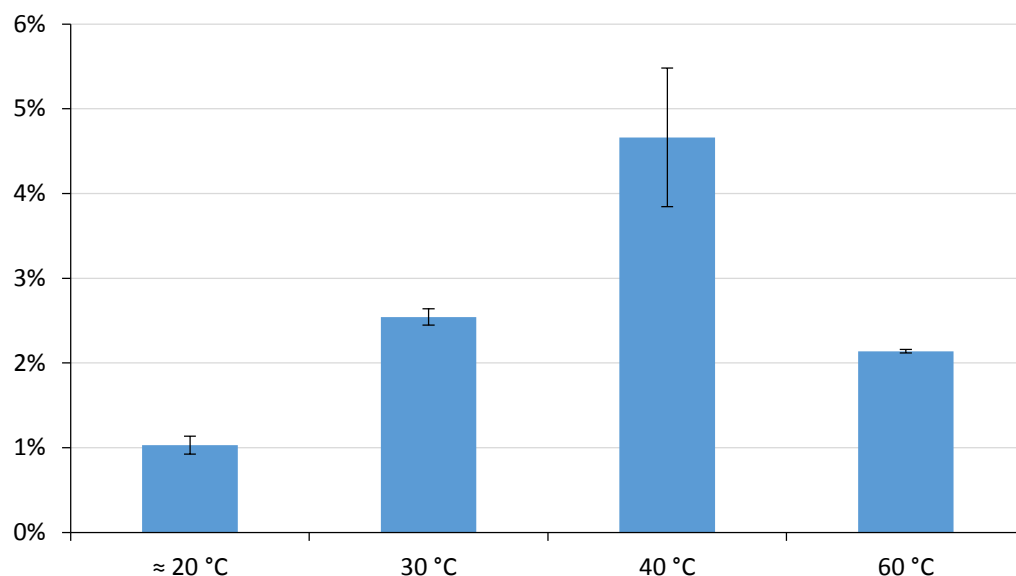


Obrázek 37: Vliv okyselení na tvorbu dimeru.

Výsledky ukazují, že je nezbytné, pro dosažení vyšší výtěžnosti, reakci okyselit. Okyselení má tedy významný vliv na průběh reakce. Nicméně při okyselení pěti kapkami 0,1M HCl na pH odpovídající hodnotě 3 pH papírkem je výtěžnost nižší nežli tomu je při okyselení pouze dvěma kapkami.

4.2.5.2 Fentonova reakce s CuSO₄ - vliv teploty

Vliv teploty je zobrazen na obrázku 38. K sestavení grafu byly použity naměřená data vzorků č. 2, 7 – 12. Všechny tyto vzorky byly připraveny okyselením 5 kapkami 0,1 M HCl, reakce probíhala ve tmě a byla ukončena přidáním 80 µl peroxidu vodíku. 100% odpovídá absolutnímu množství vneseného *E*-resveratrolu do reakce.

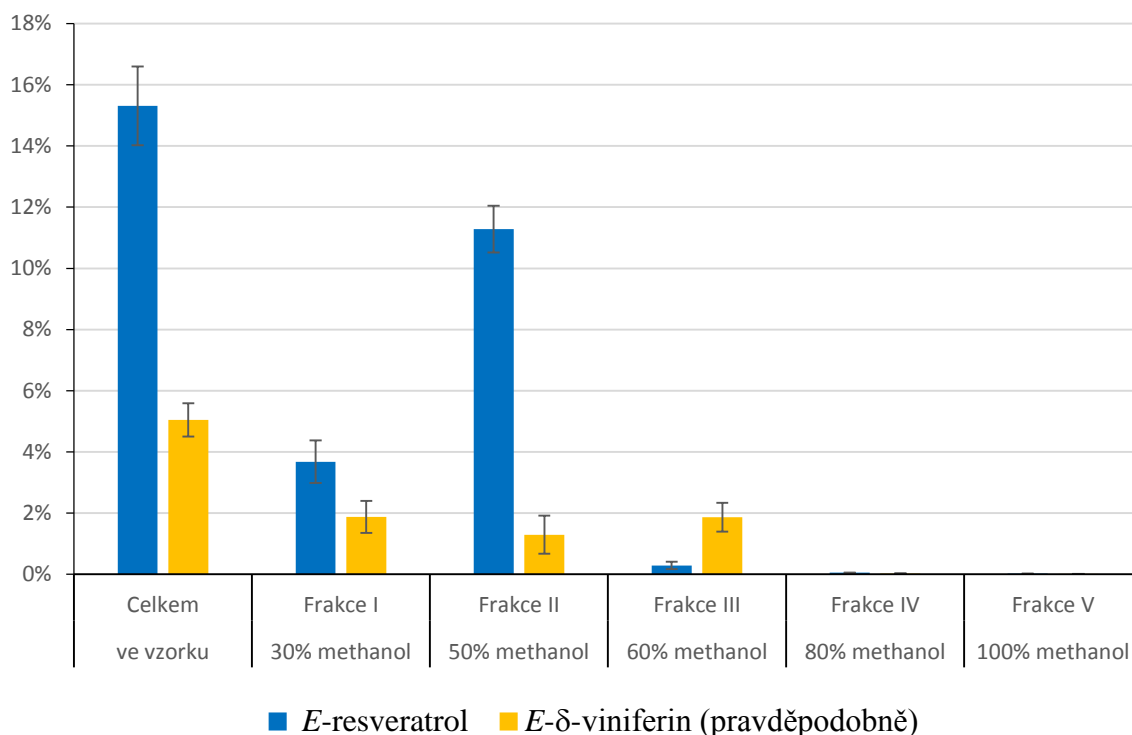


Obrázek 38: Teplotní závislost na množství produkovaného dimeru.

Je zřejmé, že se zvyšující se teplotou roste procentuální výtěžnost dimeru, který se jeví jako *E*- δ -viniferin. Ale při překročení určité teplotní hranice (mezi 40 – 60 °C) je výtěžnost tohoto dimeru nižší.

4.2.5.3 Optimalizace čištění extrakcí tuhou fází

První čištění bylo provedeno s cílem nalezení frakcí, v nichž se vyskytuje *E*-resveratrol a dimer, který se jeví jako *E*- δ -viniferin. V závislosti na těchto výsledcích bylo sestaveno podrobnější rozdělení frakcí. Dále při druhém čištění nebyla použita frakce VI, tvořená ethylacetátem. Důvod pro vynechání byl ten, že v této a dvou předcházejících frakcích nebyl při prvním čištění přítomen žádný *E*-resveratrol ani dimer. Vyhodnocená data z druhého čištění pro *E*-resveratrol i jeho dimer (pravděpodobně *E*- δ -viniferin) jsou uvedena na obrázku 39, kde 100% odpovídá absolutnímu množství *E*-resveratrolu vneseného do reakce.

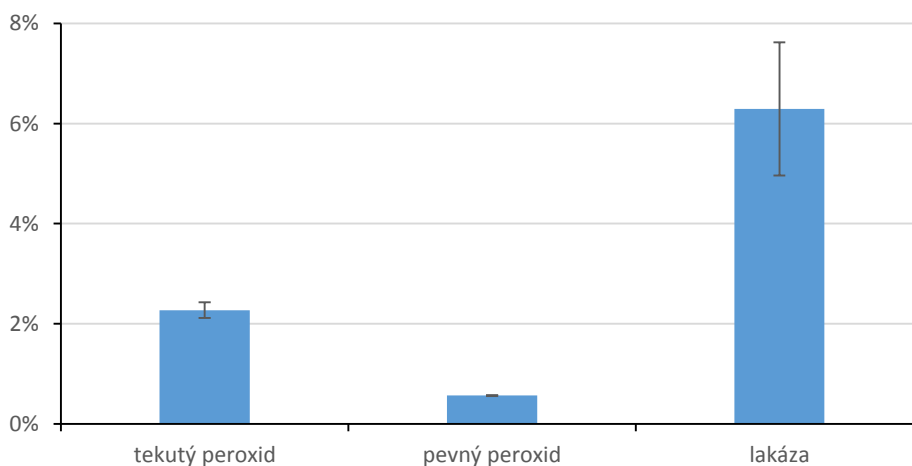


Obrázek 39: Výsledky čištění vzorků č. 13 – 15 pomocí SPE kolonek.

Dle výsledků je patrné, že dimer je nejčistější ve frakci III, kde zaujímá přibližně 37% z celkového množství dimeru. Zato *E-resveratrol* je nejvíce přítomen ve frakci II.

4.2.5.4 Fentonova reakce s CuSO_4 při použití karbamidperoxidu

Výsledky této reakce jsou uvedeny na obrázku č. 40. 30% peroxid vodíku je zobrazen jako „tekutý peroxid“ a peroxyhydrát močoviny je zobrazen jako „pevný peroxid“.

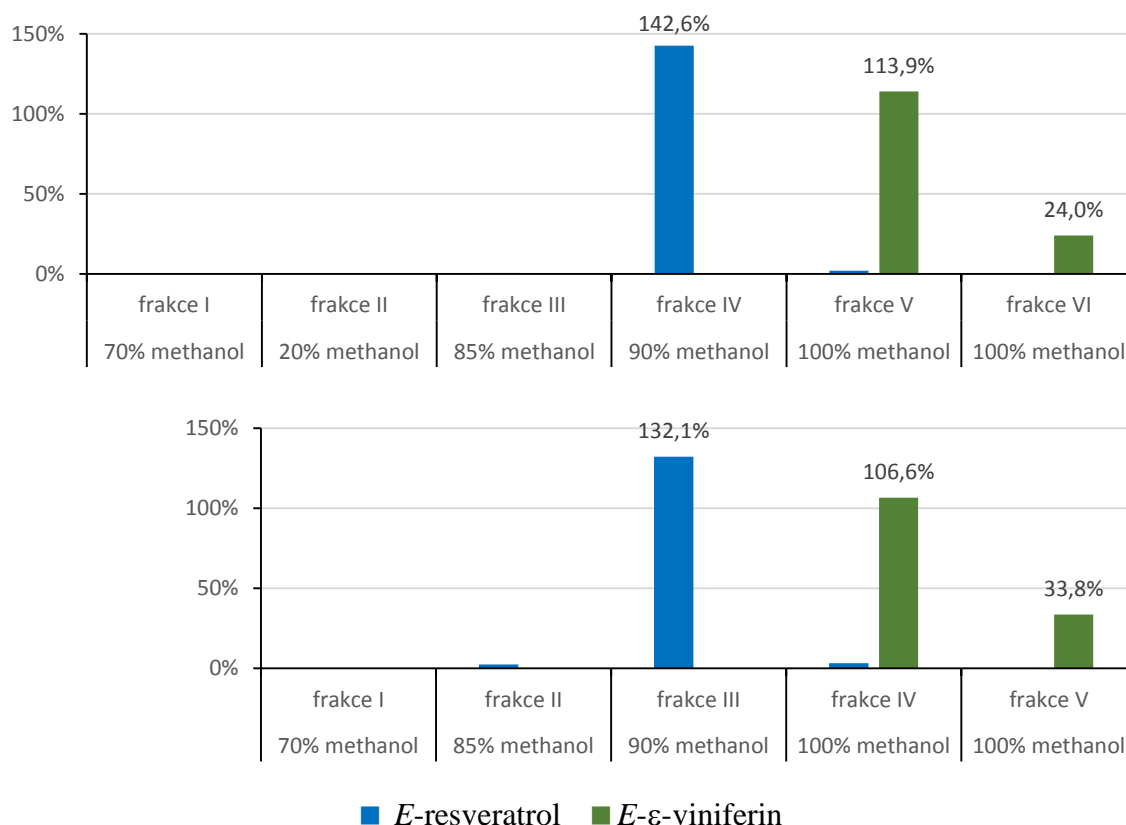


Obrázek 40: Porovnání zisku dimeru.

Adiční sloučenina močoviny a peroxidu vodíku se oproti klasickému peroxidu vodíku nezdá vhodnější k dimerizaci *E-resveratrolu*, ale v tomto případě nebyl prostudován vliv vody.

4.2.6 Izolace *E-ε*-viniferinu z réví pomocí chromatografických metod

Zahuštěný extrakt z réví, který byl použit, vznikl smícháním dvou směsí extraktů kultivarů révy vinné. Při tomto smíchání vznikla sraženina, která byla odstraněna filtrací. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 41, kde 100% odpovídá absolutnímu množství dané látky (3,95 mg *E-resveratrolu*; 2,57 mg *E-ε*-viniferinu) nanesené na polyamid v extraktu.



Obrázek 41: Zastoupení *E-resveratrolu* a *E-ε*-viniferinu v jednotlivých frakcích.

Ve frakci II byly po jednom dni patrné vysrážené bílé vločky neznámé látky. Kromě rozdílu získaného *E-ε*-viniferinu v frakci V byl i rozdíl v čistotě. Zejména využití metody označené jako pokus 1, v níž byl použit 20% methanol (frakce II), což znamená skokové snížení koncentrace methanolu, má za následek vyšší čistotu, jak *E-resveratrolu* v frakci IV (90% methanol), tak *E-ε*-viniferinu v následující frakci V (100% methanol). Tetramer *E-resveratrolu* (*r2*-viniferin) nebyl detekován v žádné frakci, přestože se jednalo o třetí nejvýznamnější látku extraktu. Čistota frakcí, v nichž bylo stanoveno nejvíce *E-resveratrolu* a *E-ε*-viniferinu, je prezentována na chromatogramech v příloze.

5 Diskuze výsledků

Reakce *E*-resveratrolu s 2-hydroxy-1,4-naftochinonem, bez ohledu na zkoumanou variabilitu reakčních podmínek, neposkytla dostatečné množství produktu jevícího se jako dimer. Přítomnost vody při této reakci se zdá být irelevantní. Ze všech zkoumaných podmínek se nejvhodněji projevil vliv světla. Bohužel však nevzniklo významné množství produktů. Dále čas, který byl zapotřebí k provedení reakce, byl příliš dlouhý. Z časového hlediska nemá tedy tato reakce praktické uplatnění, a proto bylo upuštěno od zkoumání dalších podmínek.

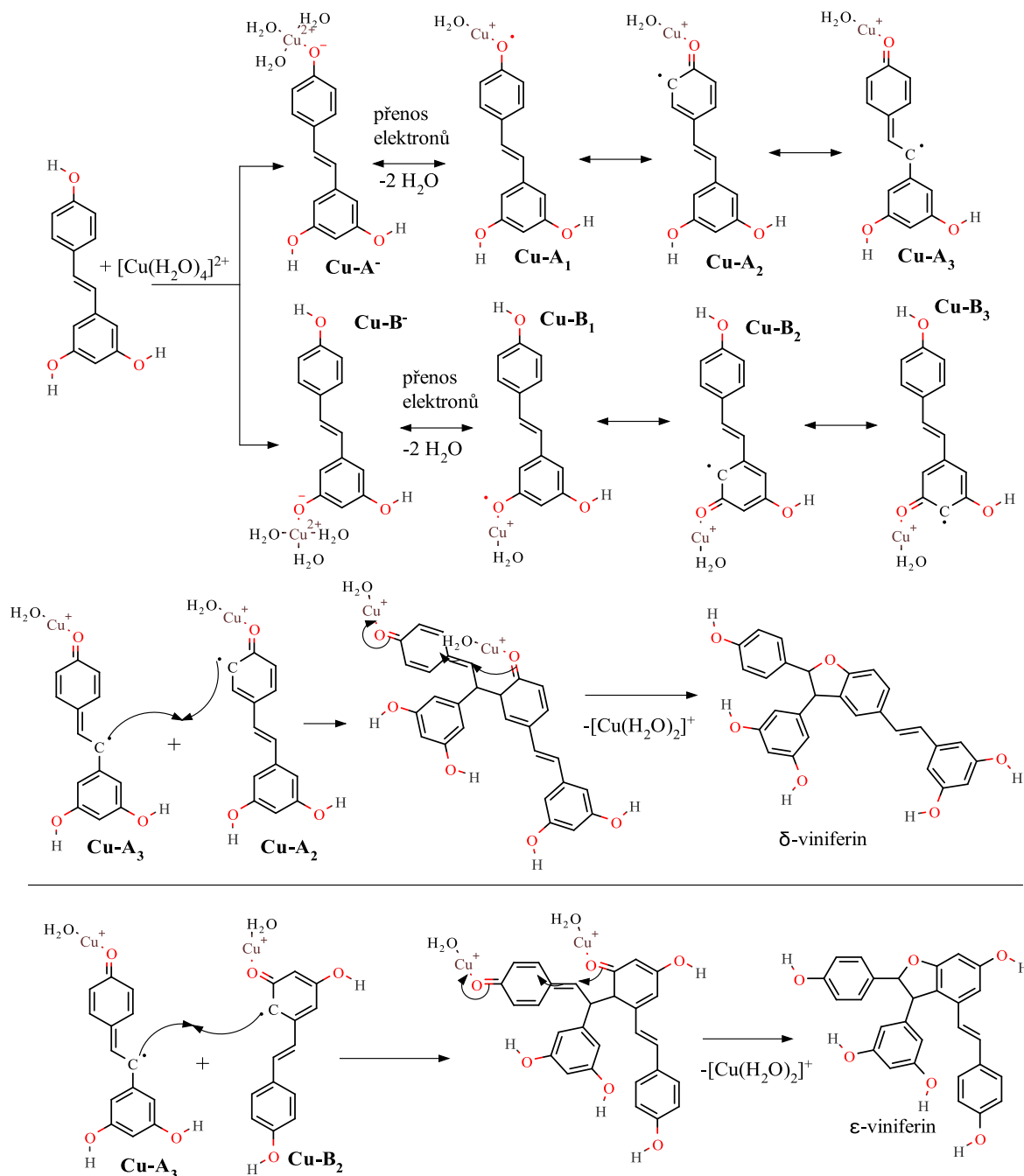
Reakce s 2-hydroxy-1,4-naftochinonem a tetrachloro-1,4-benzochinonem byly provedeny ve snaze využít potencionální schopnost těchto látek produkovat hydroxylové radikály^(163, 164). Halogenované chinony byly již dříve použity k dimerizaci např. 2,3,4-trihydroxybenzoové kyseliny⁽¹⁶⁵⁾ a proto bylo předpokládáno, že budou schopny dimerizovat i *E*-resveratrol. Tento předpoklad nebyl potvrzen, a proto bylo upuštěno od dalšího testování těchto látek. Navíc tetrachloro-1,4-benzochinon zhoršoval separační vlastnosti kolony (obr. 23).

Reakce *E*-resveratrolu s chloridem železitým byla provedena s cílem opakovat popsanou metodu^(121, 122), dle které byla očekávána vysoká výtěžnost (30%) *E*- ϵ -viniferinu. Popsaná vysoká výtěžnost *E*- ϵ -viniferinu byla předpokladem, že zmínění autoři připravili z *E*- ϵ -viniferinu jiný dimer, a to amurensin H. Vzhledem k nízkému výtěžku, který nedosáhl publikovaných hodnot, byly provedeny modifikace této reakce. V souvislosti s cíli této práce byl sledován vliv reakční doby, UV záření a vliv vody na reakci.

Prodloužením reakční doby bylo prokázáno, že reakce *E*-resveratrolu s chloridem železitým nekončí tvorbou dimerů, ale pokračuje. Výsledky ukazují, že prodloužením reakční doby vznikají dvě látky nacházející se na chromatogramu mezi *E*- ϵ -viniferinem a r2-viniferinem (tetramer *E*-resveratrolu). Dle polarity by se tedy mohlo jednat o dimery, trimery či dokonce tetramery *E*-resveratrolu (např. pallidol, ampelopsin D, qudrangularin A, α -viniferin a mnoho dalších)^(23, 150, 166).

UV záření nemělo významnější dopad na tvorbu *E*- ϵ -viniferinu. Na druhou stranu vliv vody má neopomenutelný dopad na chod reakce. Už jen ze samotných výsledků této práce (obr. 27) je patrné, že reakce probíhající ve vodném prostředí (vzorky č. 1 a 2) tvoří větší množství produktů než reakce v samotném methanolu (vzorky č. 3 a 4). S cílem prokázat významný vliv vody byla reakce provedena znovu s použitím vysušeného methanolu. Tato reakce prakticky vůbec neprobíhala, dokud nebyla voda opět přidána do reakce. Vysvětlení tohoto fenoménu bude pravděpodobně tedy spočívat ve skutečnosti, že dimerizace

E-resveratrolu není katalyzována Fe^{3+} kationtem, ale $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ kationtem. Mechanismus tvorby tohoto komplexního kationtu by mohl být analogický tvorbě podobného kationtu obsahujícího měď (Tamboli a kol., 2012 ⁽¹⁶⁷⁾). Tito autoři navrhli schéma dimerizace *E*-resveratrolu katalyzované pomocí kationtu $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (obr. 42, str. 55). Dá se tedy předpokládat, že toto schéma bude platit i pro hexaaquaželezitý komplex.



Obrázek 42: Dimerizace katalyzovaná pomocí aquakomplexu mědi (převzato z ⁽¹⁶⁷⁾).

Dá se usuzovat, že uvedené schéma (obr. 42) lze aplikovat pro jakýkoli kov tvořící aqua-komplex v oxidované a redukované formě ⁽¹⁶⁸⁾.

Zajímavostí dimerizace *E-resveratrolu* pomocí chloridu železitého je, že ve vodném prostředí byl preferenčně tvořen *E-ε-viniferin* a *r2-viniferin* a v prostředí vysušeného methanolu s dodatečně přidanou vodou byl tvořen *E-δ-viniferin*. Jak *E-ε-viniferin* ^(121, 122), tak *E-δ-viniferin* ⁽¹¹⁶⁾ byly již dříve připraveny reakcí *E-resveratrolu* s chloridem železitým.

E-ε-viniferin a *E-δ-viniferin* byly určeny na základě porovnání naměřených dat s údaji uvedenými v literatuře. Především se jednalo o retenční časy a fragmentaci v pozitivní módu APCI ^(23, 115, 119, 138, 150, 151, 166, 169). *E-δ-viniferin* byl též připraven reakcí *E-resveratrolu* s lakázou z outkovky pestré na základě literatury ^(146, 148). Tato reakce byla provedena v souvislosti s cíli práce a pro porovnání naměřených dat *E-δ-viniferinu* s produkty reakcí. Zdá se, že lakáza z outkovky pestré je schopna ve většině případů velice selektivně přeměňovat *E-resveratrol* či jeho deriváty/analogy (např. piceid ⁽¹⁴⁸⁾ a další ^(145, 146)) na odpovídající formu dimeru (v případě *E-resveratrolu* se jedná o *E-δ-viniferin*).

E-δ-viniferin byl poprvé syntetizován pomocí křenové peroxidázy ⁽¹⁵⁶⁾. Tento dimer se zdá být velice slibnou sloučeninou, jejíž účinky jsou intenzivně zkoumány v poslední době. Byl objeven efekt *E-δ-viniferinu*, resp. jeho enantiomerů na lidské erythrocyty použitím *in vitro* systémů (pohlcování hydroxylových radikálů, pohlcování volných radikálů DPPH a peroxidace lipidů). Tento dimer dále ukázal mírné antioxidační vlastnosti a ochranný účinek před oxidací hemoglobinu ⁽¹³⁾. *E-δ-viniferin* se vyznačuje i protizánětlivým účinkem na lipopolysacharid stimulovaný makrofágy myši. Chronické záněty bývají příčinou mnoha nemocí zahrnující neurologická onemocnění, metabolické poruchy, obezitu, kardiovaskulární onemocnění a rakovinu ⁽¹⁴⁾.

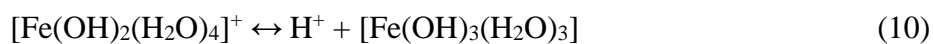
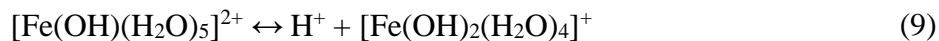
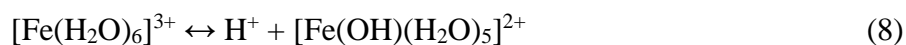
Obdobně jako *E-δ-viniferin* se i *E-ε-viniferin* se zdá být velice slibnou sloučeninou, jejíž účinky jsou intenzivně sledovány. Za zmínku stojí některé účinky *E-ε-viniferinu* objevené v poslední době. Antimikrobiální účinek proti *Streptococcus mutans* a *S. sanguis*, což jsou bakterie žijící v ústní dutině člověka ⁽¹⁷⁰⁾. Prevence a léčba rakoviny, při níž *E-ε-viniferin* ukázal přímou cytotoxicitu vybraných rakovinných buněk ⁽¹⁵⁾. Navyšuje sirtuin 3 (SIRT3) a chrání buňky v modelech Huntingtonovy choroby ⁽¹⁷¹⁾. *E-ε-viniferin* v kombinaci s vankomycinem mají bakteriostatický antimikrobiální účinky vůči rezistentním stafylokokům (*Staphylococcus aureus*) ⁽¹⁷²⁾.

Dimerizace *E-resveratrolu* pomocí Fentonovy reakce bude pravděpodobně probíhat ve dvou krocích. V prvním kroku budou tvořeny z peroxidu vodíku hydroxylové radikály za katalýzy Fe^{2+} nebo Cu^+ kationty dle rovnice (2). Při katalýze vzniknou kationty Fe^{3+} a Cu^{2+} . Hydroxylové radikály v kroku propagace způsobí tvorbu radikálů *E-resveratrolu* (obr. 6).

Nakonec terminací radikálů *E*-resveratrolu vzniknou dimery. V druhém kroku vystupují kationty vzniklé při procesu katalýzy Fe^{3+} a Cu^{2+} resp. jejich aquakomplexy $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ a $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Dle navrženého schématu (obr. 42) tyto aquakomplexy jsou schopné též produkovat dimery.

Nejvhodnější reakcí v této práci, co se týče přípravy dimerů *E*-resveratrolu, se ukázala být Fentonova reakce a její modifikace. Výsledky ukázaly, že není žádný významný rozdíl na tvorbě produktů, které byly detekovány fluorescenčním detektorem, (sloučeniny A – C, *E*- δ -viniferin; obr. 34 – 36) při použití katalyzátoru FeSO_4 nebo CuSO_4 . Vzhledem ke komplikacím při čištění reakce s FeSO_4 (tvorba sedimentu nad filtrem SPE kolonky), bylo od použití FeSO_4 upuštěno. Negativním faktorem při tvorbě zmíněného sedimentu byla skutečnost, že v tomto sedimentu byl též obsažen *E*- δ -viniferin, který se měl prostřednictvím SPE kolonky pročistit a zakoncentrovat. Vznik sedimentu nad filtrem kolonky je možné připisovat nerozpustné formě $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Fentonova reakce probíhá za optimálního pH 3 – 5, přičemž pokud je pH příliš vysoké vzniká nerozpustná forma $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a peroxid vodíku je přeměňován na kyslík ⁽¹⁵⁸⁾.

Železité ionty jsou stabilní v kyselém prostředí, ale pokud bude pH zvyšováno, pak bude železo přecházet z hexaaquakomplexu dle rovnic (8) – (10) ⁽¹⁷³⁾.



Otázkou zůstává, do jaké míry ovlivní hydroxo ligand v uvedených komplexech železa reakci. Růst pH a vznik hydroxidového aniontu je součástí Fentonovy reakce (dle rovnice (2), str. 24). Proto se lze domnívat, že uvedené hydroxo-aqua komplexy budou mít dopad na průběh reakce. Měď, na rozdíl od železa, se vyskytuje v komplexu $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Tento komplex též s rostoucím pH přechází přes $[\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ na modrou nerozpustnou formu $[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ⁽¹⁷⁴⁾. Vzhledem k červeno-hnědé barvě vzorku po ukončení reakce nelze předpokládat, že by pH významně vzrostlo, aby se vytvořila nerozpustná forma. Dle výsledků má pH významný vliv na množství tvořeného *E*- δ -viniferinu (obr. 37). Vliv pH na strukturu tvořených dimerů lze nalézt i v literatuře, kde byl popsán např. pro dimerizaci *E*-resveratrolu za pomoci peroxidázy ⁽¹¹⁵⁾.

Teplota byla nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím produkci dimeru. Při laboratorní teplotě byl dimer tvořen 4,5x méně než při 40 °C. Nicméně při 60 °C bylo množství vytvořeného dimeru menší než při 40 °C. Proto se lze domnívat, že vznikající *E*- δ -viniferin se

může přeměňovat či rozpadat. Vliv teploty může velice úzce souviset se stabilitou tvořených sloučenin.

Čištění připraveného dimeru přes SPE kolonky bylo provedeno 2x. Cílem prvního čištění bylo určit polaritu eluentu, při níž bude *E-resveratrol* a *E-δ-viniferin* eluován z kolonky. Podle výsledků prvního čištění bylo provedeno druhé s podrobnějším rozdělením polarit eluentu. Nejčistší a nejkoncentrovanější byl *E-δ-viniferin* ve frakci III (obr. 39) odpovídající 60% methanolu. Tato frakce byla pak poslána na změření NMR spekter. Bohužel vzhledem k nedostatečně čistému produktu reakce se jednoznačně nedokázala potvrdit struktura. Měření NMR spekter bude opakováno s *E-δ-viniferinem*, který byl produktem reakce s lakázou.

Nižší výtěžnost Fentonovy reakce pomocí pevného peroxidu vodíku mohla být způsobena přítomností $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Další vysvětlení by mohlo být založeno na způsobu přidávání peroxidu vodíku. Způsob přidávání peroxidu hraje významnou roli na tvorbu produktů při dimerizaci *E-resveratrolu* za pomoci křenové peroxidázy⁽¹⁴⁷⁾. V této práci byl peroxid vodíku přidáván vždy ve dvou krocích po 4 x 10 μl, přičemž po přidání každé dávky byla reakční směs promíchána. V případě pevného peroxidu vodíku bylo celkové množství naváženo najednou před začátkem reakce ve vialce. Důvodem změny přidávání pevného peroxidu vodíku byla realizace prováděné reakce. Další možné vysvětlení nízkého zisku *E-δ-viniferinu* se zakládá na přítomnosti malého množství vody ve vzorku. V této práci nebylo sledováno, jak množství vody (obecněji polarita) ovlivní tvorbu dimeru pomocí Fentonovy reakce s pevným peroxidem. Nelze tedy striktně říci, že použití pevného peroxidu vodíku při Fentonově reakci vede k nižší výtěžnosti *E-δ-viniferinu*. Navíc vliv polarity, jak bylo již publikováno autory z Malajsie⁽¹¹⁸⁾, hraje velice významnou roli při tvorbě dimerů. Dále nižší výtěžnost v reakcích, které byly čištěny extrakcí do ethylacetátu, mohla být způsobena přítomností methanolu ve vodné fázi.

Kvantifikace *E-δ-viniferinu* byla prováděna pomocí kalibrační křivky *E-resveratrolu*. Výtěžnost *E-δ-viniferinu* v procentech byla počítána na celkové množství *E-resveratrolu* dané do reakce. V některých publikacích⁽¹¹⁶⁾ se ale lze setkat s myšlenkou, že výtěžnost bude dvojnásobná. Usuzuje se tak zejména proto, že dimery vznikají spárováním dvou jednotek *E-resveratrolu*.

Čištění rostlinných extraktů pomocí chromatografických metod s cílem získání *E-resveratrolu* a jeho dimerů především *E-ε-viniferinu* by mohlo být výhodné při současné ceně (Sigma-Aldrich) *E-ε-viniferinu* cca. 5800 Kč za 1 mg⁽¹⁷⁵⁾ a *E-resveratrolu* v rozmezí od cca. 4700 do cca. 7500 Kč za 100 mg⁽¹⁷⁶⁾. Uvedený způsob se zdá být stále lukrativní i přes

klesající cenu (např. Extra Synthese, kde se udává 157 € za 10 mg *E-ε*-viniferinu⁽¹⁷⁷⁾ a 390 € za 100 mg *E*-resveratrolu⁽¹⁷⁸⁾).

Využití réví, coby zdroje těchto látek, je velice příhodné. Už jen skutečnost, že se jedná o odpadní materiál, z něj činí velice slibný zdroj. Obvykle je réví na vinici ponecháno, spáleno, nebo zkompostováno^(8, 17, 20, 22, 179). Jen pro představu, že produkce réví za rok činí cca 1 t/ha, spolu s plochou 8 milionů ha celosvětových vinic a průměrného obsahu *E*-resveratrolu v réví 1 mg/g sušiny, by mohlo být vyprodukováno až 8 000 t *E*-resveratrolu za rok⁽¹⁷⁾. Vhodnost postupu je podtržena skutečností, že réví obsahuje větší množství stilbenů než bobule a listy^(180, 181). Dále lze uvážit některé techniky umožňující navýšit obsah stilbenů. Skladování před vlastní extrakcí zvyšuje obsah *E*-resveratrolu a jeho oligomerů a to až několikanásobně⁽¹⁸²⁾. Jejich obsah by se dal navýšit i řadou dalších technik, jako např. působením UV záření, ozonu, nebo jinými způsoby abiotického stresu^(183–185). Volbou vhodného extrakčního postupu (např. zrychlené extrakce v methanolu při 10 – 10,5 MPa a teploty 100 °C) lze docílit výtěžku až 6 mg/g sušiny *E*-resveratrolu, 2 mg/g sušiny *E-ε*-viniferinu a celkového obsahu stilbenů 8,5 mg/g sušiny⁽¹⁸⁶⁾. K čištění stilbenů z extraktů je možné využít i např. odstředivé rozdělovací chromatografie⁽¹⁸⁷⁾.

Výše zmíněné způsoby navýšení obsahu stilbenů a jejich extrakce z rostlinného materiálu spolu s výsledky v této práci a sborníku⁽¹⁸⁸⁾ může sloužit k produkci *E*-resveratrolu a *E-ε*-viniferinu ve značném množství a čistotě. Oproti uvedené práci⁽¹⁸⁸⁾, kde bylo dosaženo výtěžku 90 – 97% *E*-resveratrolu a 94 – 95% *E-ε*-viniferinu, bylo zde dosaženo čistější frakce s *E*-resveratrolelem (z hlediska čistoty stilbenů). Tento malý rozdíl lze připsat mírně odlišným parametrům použité kolony a množství použitého polyamidu.

Výsledkem použití 20% methanolu v procesu separace (1. pokus) byl zisk čistějšího *E-ε*-viniferinu ve frakci V. Dále, při porovnání chromatografického procesu separace (1. pokus a 2. pokus), je znatelný rozdíl v množství *E-ε*-viniferinu ve frakci V (1. pokus) a IV (2. pokus). Celková výtěžnost zhruba 140% obou látek byla pravděpodobně způsobena několika faktory. V první řadě extrakt použitý na separaci vznikl smícháním dvou extraktů směsi odlišných kultivarů. Navíc tyto extrakty obsahovaly jiné koncentrace *E*-resveratrolu a *E-ε*-viniferinu. Po jejich smíchání vznikla sraženina, která byla odstraněna filtrací. Od provedení pokusu do vlastního měření (14 dní) byl smíchaný extrakt z réví uchovávan v lednici, během přepravy nebyl chlazen. Prodleva byla způsobena v důsledku stěhování laboratoře CzechGlobe. Po této době se v extraktu z réví vytvořila sraženina a nebylo ji možné rozpustit. Rozpouštění sraženiny se nedařilo ani za pomoci ultrazvuku. Zvýšení teploty s cílem rozpustit tuto sraženinu se jevilo nevhodné především z hlediska stability stanovovaných látek. Vlastní ředění mohlo způsobit malou část chyby.

6 Závěr

- lakáza z outkovky pestré produkuje *E*- δ -viniferin
- 2-hydroxy-1,4-naftochinon a tetrachloro-1,4-benzochinon nejsou vhodné k dimerizaci *E*-resveratrolu, za žádných zkoumaných podmínek
- chlorid železitý je schopen přeměnit *E*-resveratrol na *E*- ϵ -viniferin i na *E*- δ -viniferin
- UV záření nemá zásadní vliv na reakci *E*-resveratrolu s chloridem železitým
- byl prokázán nezbytný vliv vody při tvorbě dimerů chloridem železitým
- byl připraven *E*- δ -viniferin pomocí Fentonovy reakce a její modifikace použitím CuSO_4
- byly nalezeny optimální podmínky (okyselení, teplota) modifikované Fentonovy reakce za přítomnosti CuSO_4
- použití karbamidperoxidu pro účely dimerizace *E*-resveratrolu pomocí Fentonovy reakce za přítomnosti CuSO_4 nebylo za uvedených podmínek vhodnější než použití klasického peroxidu vodíku
- byl navržen způsob čištění extraktu z réví révy vinné pomocí chromatografických metod umožňující získání *E*-resveratrolu a jeho dimeru *E*- ϵ -viniferinu ve vysoké čistotě

7 Reference

1. BURNS J., T. YOKOTA., H. ASHIHARA., M.E.J. LEAN. a A. CROZIER. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(11), str. 3337–3340.
2. ŠMIDRKAL J., V. FILIP., K. MELZOCH., I. HANZLÍKOVÁ., D. BUCKIOVÁ. a B. KRÍSA. Resveratrol. *Chemické listy*. 2001, **95**, str. 602–609.
3. LIM T.K. *Vitis vinifera*. In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London; 2012. str. 867–878. ISBN 978-94-007-1763-3.
4. AGGARWAL B.B., A. BHARDWAJ., R.S. AGGARWAL., N.P. SEERAM., S. SHISHODIA. a Y. TAKADA. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*. 2004, **24**(5A), str. 2783–2840.
5. CARDILE V., L. LOMBARDO., C. SPATAFORA. a C. TRINGALI. Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues. *Bioorganic Chemistry*. 2005, **33**(1), str. 22–33.
6. GÜLÇİN İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010, **11**(1), str. 210–218.
7. SOTHEESWARAN S. a V. PASUPATHY. Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry*. 1993, **32**(5), str. 1083–1092.
8. SCHNEE S., E.F. QUEIROZ., F. VOINESCO., L. MARCOURT., P.H. DUBUIS., J.L. WOLFENDER. a K. GINDRO. *Vitis vinifera* Canes, a New Source of Antifungal Compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**(23), str. 5459–5467.
9. BOKEL M., M.N.C. DIYASENA., A.A.L. GUNATILAKA., W. KRAUS. a S. SOTHEESWARAN. Canaliculatol, an antifungal resveratrol trimer from *Stemonoporous canaliculatus*. *Phytochemistry*. 1988, **27**(2), str. 377–380.
10. FRANKEL E.N., A.L. WATERHOUSE. a J.E. KINSELLA. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*. 1993, **341**(8852), str. 1103–1104.
11. HOU H., B. LI., Z. ZHANG., C. XUE., G. YU., J. WANG., Y. BAO., L. BU., J. SUN., Z. PENG. a S. SU. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. *Food Chemistry*. 2012, **135**(3), str. 1432–1439.
12. KASIOTIS K.M., H. PRATSINIS., D. KLETSAS. a S.A. HAROUTOUNIAN. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, **61**, str. 112–120.
13. FICARRA S., E. TELLONE., D. PIROLI., A. RUSSO., D. BARRECA., A. GALTIERI., B. GIARDINA., P. GAVEZZOTTI., S. RIVA. a M.C. DE ROSA. Insights into the properties of the two enantiomers of *trans*- δ -viniferin, a resveratrol derivative: antioxidant activity, biochemical and molecular modeling studies of its interactions with hemoglobin. *Molecular BioSystems*. 2016, **12**(4), str. 1276–1286.
14. HSIEH P.H. *Anti-inflammatory effect of resveratrol metabolite, δ -viniferin, on lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage*. The State University of New Jersey, Rutgers, University-Graduate School-New Brunswick; 2016.
15. XUE Y.Q., J.M. DI., Y. LUO., K.J. CHENG., X. WEI. a Z. SHI. Resveratrol Oligomers for the Prevention and Treatment of Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, **2014**.

16. RICHARD T., A.D. PAWLUS., M.L. IGLÉSIAS., E. PEDROT., P. WAFFO-TEGUO., J.M. MÉRILLON. a J.P. MONTI. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011, **1215**(1), str. 103–108.
17. RAYNE S., E. KARACABEY. a G. MAZZA. Grape cane waste as a source of *trans*-resveratrol and *trans*-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*. 2008, **27**(3), str. 335–340.
18. TAKAOKA M.J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*. 1940, **3**, str. 1–16.
19. NONOMURA S., H. KANAGAWA. a A. MAKIMOTO. Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (*Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc.). *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1963, **83**, str. 988–990.
20. VERGARA C., D. VON BAER., C. MARDONES., A. WILKENS., K. WERNEKINCK., A. DAMM., S. MACKE., T. GORENA. a P. WINTERHALTER. Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(4), str. 929–933.
21. ZHANG A., Y. FANG., X. LI., J. MENG., H. WANG., H. LI., Z. ZHANG. a Z. GUO. Occurrence and Estimation of *trans*-Resveratrol in One-Year-Old Canes from Seven Major Chinese Grape Producing Regions. *Molecules*. 2011, **16**(4), str. 2846–2861.
22. RAYNE S. *High-Value Phytochemicals from Grape Cane Waste: Potential Value-Added Viticultural Sources of Trans-Resveratrol and Trans-ε-Viniferin with Medicinal and Anti-Phytopathogenic Applications* [online]. 2007 [staženo 17.4.2015]. Dostupné z: <http://precedings.nature.com/documents/636/version/1>.
23. MATTIVI F., U. VRHOVSEK., G. MALACARNE., D. MASUERO., L. ZULINI., M. STEFANINI., C. MOSER., R. VELASCO. a G. GUELLA. Profiling of Resveratrol Oligomers, Important Stress Metabolites, Accumulating in the Leaves of Hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) Genotypes Infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(10), str. 5364–5375.
24. CHOI C.W., Y.H. CHOI., M.R. CHA., D.S. YOO., B.T. KIM., G. HWAN YON., Y.L. CHOI., Y.H. KIM. a S.Y. RYU. A New Glycoside of Resveratrol Dimer from Stem Bark of *Vitis vinifera*. *Korea Research Institute of Chemical Technology*. 2010, **31**, str. 3448–3450.
25. WANG W., K. TANG., H.R. YANG., P.F. WEN., P. ZHANG., H.L. WANG. a W.D. HUANG. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, **48**(2–3), str. 142–152.
26. SIEMANN E.H. a L.L. CREASY. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1992, **43**, str. 49–52.
27. COGGON P., N.F. JANES., F.E. KING., T.J. KING., R.J. MOLYNEUX., J.W.W. MORGAN. a K. SELLARS. Hopeaphenol, an extractive of the heartwood of *Hopea odorata* and *Balanocarpus heimii*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1965, str. 406–409.
28. COGGON P., T.J. KING. a S.C. WALLWORK. The structure of hopeaphenol. *Chemical Communications (London)*. 1966, (13), str. 439–440.
29. COGGON P., A.T. MCPHAIL. a S.C. WALLWORK. Structure of hopeaphenol: X-ray analysis of the benzene solvate of dibromodeca-*O*-methylhopeaphenol. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*. 1970, str. 884–897.
30. HE S. a X. YAN. From Resveratrol to Its Derivatives: New Sources of Natural Antioxidant. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, **20**(8), str. 1005–1017.

31. YAO C.S., L.X. ZHOU. a M. LIN. Preparation on oligostilbenes of isorhapontigenin by oxidative coupling reaction. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2004, **52**(2), str. 238–243.
32. RIMANDO A.M., W. KALT., J.B. MAGEE., J. DEWEY. a J.R. BALLINGTON. Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(15), str. 4713–4719.
33. JEANDET P., A.C. DOUILLET-BREUIL., R. BESSIS., S. DEBORD., M. SBAGHI. a M. ADRIAN. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(10), str. 2731–2741.
34. LANGCAKE P. a R.J. PRYCE. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*. 1977, **16**(8), str. 1193–1196.
35. DERCKES W., L.L. CREASY. a C.J. LUCZKA-BAYLES. Stilbene phytoalexins and disease resistance in *Vitis*. In: DANIEL M. A R.P. PURKAYASTHA. *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. Marcel Dekker: New York; 1995. str. 287–315. ISBN 0-8247-9269-6.
36. HARBORNE J.B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1999, **27**(4), str. 335–367.
37. DERCKEL J.P., F. BAILLIEUL., S. MANTEAU., J.C. AUDRAN., B. HAYE., B. LAMBERT. a L. LEGENDRE. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 1999, **89**(3), str. 197–203.
38. CHONG J., A. POUTARAUD. a P. HUGUENEY. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*. 2009, **177**(3), str. 143–155.
39. LANGCAKE P. a R.J. PRYCE. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977, **33**(2), str. 151–152.
40. KAWAZOE K., N. SHIMOGAI., Y. TAKAISHI., K.S. RAO. a Y. IMAKURA. Four stilbenes from *Salacia lehmbachii*. *Phytochemistry*. 1997, **44**(8), str. 1569–1573.
41. SKALICKÁ A., V. VĚTVIČKA. a V. ZELENÝ. Botanický slovník rodových jmen cévnatých rostlin. Praha: Aventinum; 2012. ISBN 978-80-7442-031-3.
42. KURIHARA H., J. KAWABATA., S. ICHIKAWA. a J. MIZUTANI. (–)-ε-Viniferin and Related Oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb.(Gyperaceae). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1990, **54**(4), str. 1097–1099.
43. KAWABATA J., M. MISHIMA., H. KURIHARA. a J. MIZUTANI. Kobophenol B, A tetrastilbene from *Carex pumila*. *Phytochemistry*. 1991, **30**(2), str. 645–647.
44. KURIHARA H., J. KAWABATA., S. ICHIKAWA., M. MISHIMA. a J. MIZUTANI. Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochemistry*. 1991, **30**(2), str. 649–653.
45. POWELL R.G., R. BAJAJ. a J.L. MCLAUGHLIN. Bioactive Stilbenes of *Scirpus maritimus*. *Journal of Natural Products*. 1987, **50**(2), str. 293–296.
46. *Dendrologie online* [online]. [staženo 21.3.2016]. Dostupné z: <http://database.dendrologie.cz>.
47. MUHTADI, E.H. HAKIM., L.D. JULIAWATY., Y.M. SYAH., S.A. ACHMAD., J. LATIP. a E.L. GHISALBERTI. Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia*. 2006, **77**(7–8), str. 550–555.
48. ASHTON P.S. Dipterocarpaceae. In: SOEPADMO E., L.G. SAW. A R.C.K. CHUNG. *Tree Flora of Sabah and Sarawak*. Volume 5. 2002. str. 63–388. ISBN 983-2181-59-3.

49. SEO E.K., H. CHAI., H.L. CONSTANT., T. SANTISUK., V. REUTRAKUL., C.W.W. BEECHER., N.R. FARNSWORTH., G.A. CORDELL., J.M. PEZZUTO. a A.D. KINGHORN. Resveratrol Tetramers from *Vatica diospyroides*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1999, **64**(19), str. 6976–6983.
50. TANAKA T., T. ITO., K. NAKAYA., M. IINUMA. a S. RISWAN. Oligostilbenoids in stem bark of *Vatica rassak*. *Phytochemistry*. 2000, **54**(1), str. 63–69.
51. TANAKA T., T. ITO., K. NAKAYA., M. IINUMA., Y. TAKAHASHI., H. NAGANAWA., N. MATSUURA. a M. UBUKATA. Vaticanol D, a novel resveratrol hexamer isolated from *Vatica rassak*. *Tetrahedron Letters*. 2000, **41**(41), str. 7929–7932.
52. ABE N., T. ITO., K. OHGUCHI., M. NASU., Y. MASUDA., M. OYAMA., Y. NOZAWA., M. ITO. a M. IINUMA. Resveratrol Oligomers from *Vatica albiramis*. *Journal of Natural Products*. 2010, **73**(9), str. 1499–1506.
53. ZGODA-POLS J.R., A.J. FREYER., L.B. KILLMER. a J.R. PORTER. Antimicrobial Resveratrol Tetramers from the Stem Bark of *Vatica oblongifolia* ssp. *oblongifolia*. *Journal of Natural Products*. 2002, **65**(11), str. 1554–1559.
54. GE H.M., W.H. YANG., Y. SHEN., N. JIANG., Z.K. GUO., Q. LUO., Q. XU., J. MA. a R.X. TAN. Immunosuppressive Resveratrol Aneuploids from *Hopea chinensis*. *Chemistry – A European Journal*. 2010, **16**(21), str. 6338–6345.
55. YAN T., T. WANG., W. WEI., N. JIANG., Y.H. QIN., R.X. TAN. a H.M. GE. Polyphenolic acetylcholinesterase inhibitors from *Hopea chinensis*. *Planta Medica*. 2012, **78**(10), str. 1015–1019.
56. CHENG Y.Q., R. JIANG., W. HUANG., W. WEI., C.J. CHEN., R.X. TAN. a H.M. GE. Hopeachinols E-K, novel oligostilbenoids from the stem bark of *Hopea chinensis*. *RSC Advances*. 2014, **4**(55), str. 28901–28907.
57. TANAKA T., T. ITO., Y. IDO., T.K. SON., K. NAKAYA., M. IINUMA., M. OHYAMA. a V. CHELLADURAI. Stilbenoids in the stem bark of *Hopea parviflora*. *Phytochemistry*. 2000, **53**(8), str. 1015–1019.
58. ABE N., T. ITO., M. OYAMA., R. SAWA., Y. TAKAHASHI., V. CHELLADURAI. a M. IINUMA. Occurrence of C-Glucoside of Resveratrol Oligomers in *Hopea parviflora*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2011, **59**(2), str. 239–248.
59. ATUN S., N. AZNAM., R. ARIANINGRUM., Y. TAKAYA. a N. MASATAKE. Resveratrol derivatives from stem bark of *Hopea* and their biological activity test. *Journal of Physical Science*. 2008, **19**(2), str. 7–21.
60. SAHIDIN S., E.H. HAKIM., Y.M. SYAH., L.D. JULIAWATY., S.A. ACHMAD., L. BIN DIN. a J. LATIP. Resveratrol dimers from stem bark of *Hopea gregaria* and Their Cytotoxic Properties. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2010, **8**(2), str. 245–251.
61. PATCHARAMUN W., J. SICHAEM., P. SIRIPONG., S. KHUMKRATOK., J. JONG-ARAMRUANG. a S. TIP-PYANG. A new dimeric resveratrol from the roots of *Shorea roxburghii*. *Fitoterapia*. 2011, **82**(3), str. 489–492.
62. MORIKAWA T., S. CHAIPECH., H. MATSUDA., M. HAMAOKA., Y. UMEDA., H. SATO., H. TAMURA., H. KON'I., K. NINOMIYA., M. YOSHIKAWA., Y. PONGPIRIYADACHA., T. HAYAKAWA. a O. MURAOKA. Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3,4-dihydroisocoumarins from the bark of *Shorea roxburghii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, **20**(2), str. 832–840.
63. ITO T., T. TANAKA., Y. IDO., K. NAKAYA., M. IINUMA. a S. RISWAN. Four new stilbenoid C-glucosides isolated from the stem bark of *Shorea hemsleyana*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2000, **48**(12), str. 1959–1963.
64. MUHAMMAD N., L.B. DIN., I. SAHIDIN., S.F. HASHIM., N. IBRAHIM., Z. ZAKARIA. a W.A. YAACOB. Acuminatol and other antioxidative resveratrol oligomers from the stem bark of *Shorea acuminata*. *Molecules*. 2012, **17**(8), str. 9043–9055.

65. TANAKA T., T. ITO., M. IINUMA., M. OHYAMA., M. ICHISE. a Y. TATEISHI. Stilbene oligomers in roots of *Sophora davidii*. *Phytochemistry*. 2000, **53**(8), str. 1009–1014.
66. OHYAMA M., M. ICHISE., T. TANAKA., M. IINUMA. a C.L. BURANDT JR. Davidiol D, first naturally occurring resveratrol pentamer isolated from *Sophora davidii*. *Tetrahedron Letters*. 1996, **37**(29), str. 5155–5158.
67. OHYAMA M., T. TANAKA. a M. IINUMA. Five resveratrol oligomers from roots of *Sophora leachiana*. *Phytochemistry*. 1995, **38**(3), str. 733–740.
68. OHYAMA M., T. TANAKA. a M. IINUMA. A novel stilbene tetramer, leachianol C, isolated from *Sophora leachiana*. *Tetrahedron Letters*. 1994, **35**(42), str. 7817–7820.
69. IINUMA M., M. OHYAMA., T. TANAKA. a F.A. LANG. A flavonostilbene and two stilbene oligomers in roots of *Sophora leachiana*. *Phytochemistry*. 1994, **37**(4), str. 1157–1159.
70. IINUMA M., M. OHYAMA. a T. TANAKA. Six flavonostilbenes and a flavanone in roots of *Sophora alopecuroides*. *Phytochemistry*. 1995, **38**(2), str. 519–525.
71. SHIRATAKI Y., T. TANAKA., M. OHYAMA., S. TODA. a M. IINUMA. Stilbene oligomers in roots of *Sophora moorcroftiana*. *Natural Medicines*. 2002, **56**(4), str. 139–142.
72. OHYAMA M., T. TANAKA., M. IINUMA. a C.L. BURANDT. Phenolic Compounds Isolated from the Roots of *Sophora stenophylla*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1998, **46**(4), str. 663–668.
73. LIU Y., Z. CHAN. a G.P. YAKOVLEV. *Flora of China* [online]. *Caragana Fabricius*. [staženo 10.3.2016]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=105589.
74. LUO H.F., L. ZHANG. a C. HU. Four Stilbene Oligomers from the Roots of *Caragana sinica*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 2000, **9**(3), str. 162–165.
75. LUO H.F., L.P. ZHANG. a C.Q. HU. Five novel oligostilbenes from the roots of *Caragana sinica*. *Tetrahedron*. 2001, **57**(23), str. 4849–4854.
76. SHU N., H. ZHOU. a C. HU. Simultaneous determination of the contents of three stilbene oligomers in *Caragana sinica* collected in different seasons using an improved HPLC method. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006, **29**(4), str. 608–612.
77. SUNG S.H., S.Y. KANG., K.Y. LEE., M.J. PARK., J.H. KIM., J.H. PARK., Y.C. KIM. a J. KIM. (+)-Alpha-viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002, **25**(1), str. 125–127.
78. WATSON L. a M.J. DALLWITZ. *The families of gymnosperms* [online]. 2008 [staženo 21.2.2016]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/gymno/www/gnetacea.htm>.
79. LINS A.P., M.N.D.S. RIBEIRO., O.R. GOTTLIEB. a H.E. GOTTLIEB. Gnetins: Resveratrol Oligomers From *Gnetum* Species. *Journal of Natural Products*. 1982, **45**(6), str. 754–761.
80. KATO H., M. SAMIZO., R. KAWABATA., F. TAKANO. a T. OHTA. Stilbenoids from the melinjo (*Gnetum gnemon* L.) fruit modulate cytokine production in murine Peyer's patch cells ex vivo. *Planta Medica*. 2011, **77**(10), str. 1027–1034.
81. ILIYA I., T. TANAKA., M. IINUMA., Z. ALI., M. FURASAWA., K. NAKAYA., Y. SHIRATAKI., J. MURATA. a D. DARNAEDI. Stilbene Derivatives from Two Species of Gnetaceae. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2002, **50**(6), str. 796–801.
82. ILIYA I., Z. ALI., T. TANAKA., M. IINUMA., M. FURUSAWA., K. NAKAYA., J. MURATA. a D. DARNAEDI. Four New Stilbene Oligomers in the Root of *Gnetum gnemon*. *Helvetica Chimica Acta*. 2002, **85**(8), str. 2538–2546.

83. ILIYA I., Z. ALI., T. TANAKA., M. IINUMA., M. FURUSAWA., K. NAKAYA., J. MURATA., D. DARNAEDI., N. MATSUURA. a M. UBUKATA. Stilbene derivatives from *Gnetum gnemon* Linn. *Phytochemistry*. 2003, **62**(4), str. 601–606.
84. KATO E., Y. TOKUNAGA. a F. SAKAN. Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and Their Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(6), str. 2544–2549.
85. ILIYA I., Z. ALI., T. TANAKA., M. IINUMA., M. FURUSAWA., K. NAKAYA., J. MURATA. a D. DARNAEDI. Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (Gnetaceae). *Phytochemistry*. 2002, **61**(8), str. 959–961.
86. NAKAYA M.I., Y. SHIRATAKI., J. MURATA. a D. DARNAEDI. Four new glucosides of stilbene oligomers from the stem of *Gnetum gnemonoides*. *Heterocycles*. 2001, **55**, str. 2123–2130.
87. HUANG K.S., Y.H. WANG., RONG-LI. a M. LIN. Five New Stilbene Dimers from the Lianas of *Gnetum hainanense*. *Journal of Natural Products*. 2000, **63**(1), str. 86–89.
88. LINS A.P., M. YOSHIDA., O.R. GOTTLIEB., H.E. GOTTLIEB. a K. KUBITZKI. Gnetins in Welwitschia. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*. 1986, **95**(9-10), str. 737–748.
89. MURATA H., I. ILIYA., T. TANAKA., M. FURUSAWA., T. ITO., K. NAKAYA., M. OYAMA. a M. IINUMA. Four New Trimeric Stilbene Glucosides from *Welwitschia mirabilis*. *Chemistry & Biodiversity*. 2005, **2**(6), str. 773–779.
90. WATSON L. a M.J. DALLWITZ. *The families of flowering plants* [online]. 2016 [staženo 20.3.2016]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/www/polygona.htm>.
91. OKASAKA M., Y. TAKAISHI., K. KOGURE., K. FUKUZAWA., H. SHIBATA., T. HIGUTI., G. HONDA., M. ITO., O.K. KODZHIMATOV. a O. ASHURMETOV. New Stilbene Derivatives from *Calligonum leucocladum*. *Journal of Natural Products*. 2004, **67**(6), str. 1044–1046.
92. ARICHI H., Y. KIMURA., H. OKUDA., K. BABA., M. KOZAWA. a S. ARICHI. Effects of Stilbene Components of the Roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on Lipid Metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1982, **30**(5), str. 1766–1770.
93. LIU W.B., L. HU., Q. HU., N.N. CHEN., Q.S. YANG. a F.F. WANG. New resveratrol oligomer derivatives from the roots of *Rheum lhasaense*. *Molecules*. 2013, **18**(6), str. 7093–7102.
94. KEREM Z., I. BILKIS., M.A. FLAISHMAN. a L. SIVAN. Antioxidant Activity and Inhibition of α -Glucosidase by *trans*-Resveratrol, Piceid, and a Novel *trans*-Stilbene from the Roots of Israeli *Rumex bucephalophorus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(4), str. 1243–1247.
95. *Integrated Taxonomic Information System* [online]. *Fallopia japonica* var. *japonica*. 2011 [staženo 20.3.2016]. Dostupné z: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=20889.
96. *Kew royal botanic gardens* [online]. *Iris sibirica* (Siberian iris). [staženo 15.3.2016]. Dostupné z: <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/iris-sibirica-siberian-iris>.
97. WANG Y.Q., J.J. TAN., C.H. TAN., S.H. JIANG. a D.Y. ZHU. Halophilols A and B, two new stilbenes from *Iris halophila*. *Planta Medica*. 2003, **69**(8), str. 779–781.
98. KECKEIS K., S.D. SARKER. a L. DINAN. Resveratrol-type oligostilbenes from *Iris clarkei* antagonize 20-hydroxyecdysone action in the *Drosophila melanogaster* B_{II} cell line. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000, **57**(2), str. 333–336.
99. WATSON L. a M.J. DALLWITZ. *The families of flowering plants* [online]. 2016 [staženo 12.1.2016]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/www/moraceae.htm>.

100. SYAH Y.M., L.D. JULIAWATY., S.A. ACHMAD., E.H. HAKIM., H. TAKAYAMA., I.M. SAID. a J. LATIP. Phenolic Constituents from the Wood of *Morus australis* with Cytotoxic Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2008, **63**(1-2), str. 35–39.
101. WATSON L. a M.J. DALLWITZ. *The families of flowering plants* [online]. 2016 [staženo 10.2.2016]. Dostupné z: <http://delta-intkey.com/angio/www/paeoniac.htm>.
102. HYO JIN K.I.M., E.J. CHANG., C.H.O. SUNG HEE., S.K. CHUNG., P. HEUI DONG. a S.W. CHOI. Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated from Seeds of *Paeonia lactiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002, **66**(9), str. 1990–1993.
103. SARKER S.D., P. WHITING., L. DINAN., V. ŠIK. a H.H. REES. Identification and ecdysteroid antagonist activity of three resveratrol trimers (suffruticosols A, B and C) from *Paeonia suffruticosa*. *Tetrahedron*. 1999, **55**(2), str. 513–524.
104. CAI T. a Y. CAI. *cis*-Ampelopsin E, a Stilbene Isolated from the Seeds of *Paeonia suffruticosa*, Inhibits Lipopolysaccharide-Stimulated Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages via Blockade of Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, **34**(9), str. 1501.
105. RIVIERE C., A.D. PAWLUS. a J.-M. MERILLON. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*. 2012, **29**(11), str. 1317–1333.
106. PAWLUS A.D., P. WAFFO-TEGUO. a J.M. MERILLON. Stilbenoid Chemistry from wine and the genus *Vitis*, A Review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 2012, **46**, str. 57–111.
107. MANNILA E., A. TALVITIE. a E. KOLEHMAINEN. Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry*. 1993, **33**(4), str. 813–816.
108. KIVRAK İ., Ş. KIVRAK., M. HARMANDAR. a Y. ÇETINTAŞ. Phenolic Compounds of *Pinus brutia* Ten: Chemical Investigation and Quantitative Analysis Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization Source. *Records of Natural Products*. 2013, **7**, str. 313–319.
109. DONGJOO K. a B. YOUNGSOO. Stilbenoids of Korean pine (*Pinus koraiensis*) inner bark. *Mokchae Konghak = Journal of the Korean Wood Science and Technology*. 2009, **37**(5), str. 474–479.
110. VELU S.S., F.N. THOMAS. a F.J.F. WEBER. Strategies and methods for the syntheses of natural oligomeric stilbenoids and analogues. *Current Organic Chemistry*. 2012, **16**(5), str. 605–662.
111. MATSUURA B.S. *The Development of Transition Metal Catalyzed Reactions for Applications in Complex Molecule Synthesis, Methodological Development and Biomass Processing*. The University of Michigan; 2015.
112. WENLING L., L. TENG., Y. YUHUA. a Y. YADONG. Chemoselectively Synthesis of Resveratrol Oligomers. *Chinese Journal of Organic Chemistry*. 2013, **33**(12), str. 2443–2459.
113. BARTON D.H.R., A.M. DEFLORIN. a O.E. EDWARDS. 108. The synthesis of usnic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1956, str. 530–534.
114. HONG F.J., Y.Y. LOW., K.W. CHONG., N.F. THOMAS. a T.S. KAM. Biomimetic Oxidative Dimerization of Anodically Generated Stilbene Radical Cations: Effect of Aromatic Substitution on Product Distribution and Reaction Pathways. *The Journal of Organic Chemistry*. 2014, **79**(10), str. 4528–4543.
115. LI C., J. LU., X. XU., R. HU. a Y. PAN. pH-switched HRP-catalyzed dimerization of resveratrol: a selective biomimetic synthesis. *Green Chemistry*. 2012, **14**(12), str. 3281–3284.

116. TAKAYA Y., K. TERASHIMA., J. ITO., Y.H. HE., M. TATEOKA., N. YAMAGUCHI. a M. NIWA. Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron*. 2005, **61**(43), str. 10285–10290.
117. SAKO M., H. HOSOKAWA., T. ITO. a M. IINUMA. Regioselective Oxidative Coupling of 4-Hydroxystilbenes: Synthesis of Resveratrol and ϵ -Viniferin (*E*)-Dehydrodimers. *The Journal of Organic Chemistry*. 2004, **69**(7), str. 2598–2600.
118. VELU S.S., I. BUNIYAMIN., L.K. CHING., F. FERAZ., I. NOORBATCHA., L.C. GEE., K. AWANG., I.A. WAHAB. a J.F.F. WEBER. Regio- and Stereoselective Biomimetic Synthesis of Oligostilbenoid Dimers from Resveratrol Analogues: Influence of the Solvent, Oxidant, and Substitution. *Chemistry – A European Journal*. 2008, **14**(36), str. 11376–11384.
119. WILKENS A., J. PAULSEN., V. WRAY. a P. WINTERHALTER. Structures of Two Novel Trimeric Stilbenes Obtained by Horseradish Peroxidase Catalyzed Biotransformation of *trans*-Resveratrol and (–)- ϵ -Viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, **58**(11), str. 6754–6761.
120. MATSUURA B.S., M.H. KEYLOR., B. LI., Y. LIN., S. ALLISON., D.A. PRATT. a C.R.J. STEPHENSON. A Scalable Biomimetic Synthesis of Resveratrol Dimers and Systematic Evaluation of their Antioxidant Activities. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015, **54**(12), str. 3754–3757.
121. HUANG K.S., M. LIN. a Y.H. WANG. Synthesis of Amurensin H a New Resveratrol Dimer from the Roots of *Vitis Amurensis*. *Chinese Chemical Letters*. 1999, **10**(10), str. 817–820.
122. YAO C.S., M. LIN. a Y.H. WANG. Synthesis of the active stilbenoids by photooxidation reaction of *trans*- ϵ -viniferin. *Chinese Journal of Chemistry*. 2004, **22**(11), str. 1350–1355.
123. THOMAS N.F., K.C. LEE., T. PARADATHATHU., J.F.F. WEBER., K. AWANG., D. RONDEAU. a P. RICHOMME. Tandem pericyclic reactions in a new FeCl₃-promoted synthesis of catechol analogues of resveratrol. *Tetrahedron*. 2002, **58**(36), str. 7201–7206.
124. ZHOU L.X. a M. LIN. Studies on the preparation of bioactive oligomerstilbene by oxidative coupling reaction (I)-Preparation of shegansu B using silver oxide as oxidant. *Chinese Chemical Letters*. 2000, **11**(6), str. 515–516.
125. LI X.M., K.S. HUANG., M. LIN. a L.X. ZHOU. Studies on formic acid-catalyzed dimerization of isorhapontigenin and of resveratrol to tetralins. *Tetrahedron*. 2003, **59**(24), str. 4405–4413.
126. SNYDER S.A., A.L. ZOGRAFOS. a Y. LIN. Total Synthesis of Resveratrol-Based Natural Products: A Chemoselective Solution. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, **46**(43), str. 8186–8191.
127. SNYDER S.A. a Z.G. BRILL. Structural Revision and Total Synthesis of Caraphenol B and C. *Organic Letters*. 2011, **13**(20), str. 5524–5527.
128. SNYDER S.A., N.E. WRIGHT., J.J. PFLUEGER. a S.P. BREAZZANO. Total Syntheses of Heimiol A, Hopeahainol D, and Constrained Analogues. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, **50**(37), str. 8629–8633.
129. SNYDER S.A., S.B. THOMAS., A.C. MAYER. a S.P. BREAZZANO. Total Syntheses of Hopeanol and Hopeahainol A Empowered by a Chiral Brønsted Acid Induced Pinacol Rearrangement. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, **51**(17), str. 4080–4084.
130. SNYDER S.A., A. GOLLNER. a M.I. CHIRIAC. Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis. *Nature*. 2011, **474**(7352), str. 461–466.

131. KRAUS G.A. a V. GUPTA. A new synthetic strategy for the synthesis of bioactive stilbene dimers. A direct synthesis of amurensin H. *Tetrahedron Letters*. 2009, **50**(51), str. 7180–7183.
132. JEFFREY J.L. a R. SARPONG. An approach to the synthesis of dimeric resveratrol natural products via a palladium-catalyzed domino reaction. *Tetrahedron Letters*. 2009, **50**(17), str. 1969–1972.
133. TAKAYA Y., K.X. YAN., K. TERASHIMA., J. ITO. a M. NIWA. Chemical determination of the absolute structures of resveratrol dimers, ampelopsins A, B, D and F. *Tetrahedron*. 2002, **58**(36), str. 7259–7265.
134. MORAVCOVÁ L. *Fotochemické transformace resveratrolu a jeho analogů*. VŠCHT Praha. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství; 2006.
135. HE S., B. WU., Y. PAN. a L. JIANG. Stilbene Oligomers from *Parthenocissus laetevirens*: Isolation, Biomimetic Synthesis, Absolute Configuration, and Implication of Antioxidative Defense System in the Plant. *The Journal of Organic Chemistry*. 2008, **73**(14), str. 5233–5241.
136. YE Y., F. FANG. a Y. LI. Dimerization of Resveratrol Induced by Red Light and Its Synergistic Analgesic Effects with Cobra Neurotoxin. *Photochemistry and Photobiology*. 2014, **90**(4), str. 860–866.
137. CANTOS E., J.C. ESPÍN., M.J. FERNÁNDEZ., J. OLIVA. a F.A. TOMÁS-BARBERÁN. Postharvest UV-C-Irradiated Grapes as a Potential Source for Producing Stilbene-Enriched Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(5), str. 1208–1214.
138. PEZET R., C. PERRET., J.B. JEAN-DENIS., R. TABACCHI., K. GINDRO. a O. VIRET. δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(18), str. 5488–5492.
139. TRÍŠKA J. a M. HOUŠKA. Physical Methods of Resveratrol Induction in Grapes and Grape Products—A Review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2012, **30**(6), str. 489–502.
140. NICOTRA S., M.R. CRAMAROSSA., A. MUCCI., U.M. PAGNONI., S. RIVA. a L. FORTI. Biotransformation of resveratrol: synthesis of *trans*-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*. 2004, **60**(3), str. 595–600.
141. CICHEWICZ R.H. a S.A. KOUZI. Biotransformation of Resveratrol to Piceid by *Bacillus cereus*. *Journal of Natural Products*. 1998, **61**(10), str. 1313–1314.
142. ESPÍN J.C. a H.J. WICHERS. Study of the Oxidation of Resveratrol Catalyzed by Polyphenol Oxidase. Effect of Polyphenol Oxidase, Laccase and Peroxidase on the Antiradical Capacity of Resveratrol. *Journal of Food Biochemistry*. 2000, **24**(3), str. 225–250.
143. KUNAMNENI A., F.J. PLOU., A. BALLESTEROS. a M. ALCALDE. Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2008, **2**(1), str. 10–24.
144. RIVERA-HOYOS C.M., E.D. MORALES-ÁLVAREZ., R.A. POUTOU-PIÑALES., A.M. PEDROZA-RODRÍGUEZ., R. RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ. a J.M. DELGADO-BOADA. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 2013, **27**(3–4), str. 67–82.
145. BENEVENTI E., S. CONTE., M.R. CRAMAROSSA., S. RIVA. a L. FORTI. Chemo-enzymatic synthesis of new resveratrol-related dimers containing the benzo[b]furan framework and evaluation of their radical scavenger activities. *Tetrahedron*. 2015, **71**(20), str. 3052–3058.

146. BHUSAINAHALLI V.M., C. SPATAFORA., M. CHALAL., D. VERVANDIER-FASSEUR., P. MEUNIER., N. LATRUFFE. a C. TRINGALI. Resveratrol-Related Dehydrodimers: Laccase-Mediated Biomimetic Synthesis and Antiproliferative Activity. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012, **2012**(27), str. 5217–5224.
147. COTTYN B., A. KOLLMANN., P. WAFFO-TEGUO. a P.H. DUCROT. Rationalization and In Vitro Modeling of the Chemical Mechanisms of the Enzymatic Oxidation of Phenolic Compounds in Planta: From Flavonols and Stilbenoids to Lignins. *Chemistry – A European Journal*. 2011, **17**(26), str. 7282–7287.
148. GAVEZZOTTI P., F. BERTACCHI., G. FRONZA., V. KŘEN., D. MONTI. a S. RIVA. Laccase-Catalyzed Dimerization of Piceid, a Resveratrol Glucoside, and its Further Enzymatic Elaboration. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2015, **357**(8), str. 1831–1839.
149. PONZONI C., E. BENEVENTI., M.R. CRAMAROSSA., S. RAIMONDI., G. TREVISI., U.M. PAGNONI., S. RIVA. a L. FORTI. Laccase-Catalyzed Dimerization of Hydroxystilbenes. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2007, **349**(8-9), str. 1497–1506.
150. JEAN-DENIS J.B., R. PEZET. a R. TABACCHI. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1112**(1–2), str. 263–268.
151. VRHOVSEK U., G. MALACARNE., D. MASUERO., L. ZULINI., G. GUELLA., M. STEFANINI., R. VELASCO. a F. MATTIVI. Profiling and accurate quantification of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-pterostilbene and 11 viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2012, **18**(1), str. 11–19.
152. SCHNEE S., O. VIRET. a K. GINDRO. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2008, **72**(4–6), str. 128–133.
153. PEZET R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiology Letters*. 1998, **167**(2), str. 203–208.
154. CICHEWICZ R.H., S.A. KOUZI. a M.T. HAMANN. Dimerization of Resveratrol by the Grapevine Pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*. 1999, **63**(1), str. 29–33.
155. TIMPERIO A.M., A. D’ALESSANDRO., M. FAGIONI., P. MAGRO. a L. ZOLLA. Production of the phytoalexins *trans*-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012, **50**(0), str. 65–71.
156. LANGCAKE P. a R.J. PRYCE. Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: production of a grapevine phytoalexin mimic. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1977, (7), str. 208–210.
157. ITO J. a M. NIWA. Absolute structures of new hydroxystilbenoids, vitisin C and viniferal, from *Vitis vinifera* “Kyohou.” *Tetrahedron*. 1996, **52**(30), str. 9991–9998.
158. *Fenton’s reaction* [online]. [staženo 1.4.2016]. Dostupné z: <http://www.lenntech.com/fenton-reaction.htm>.
159. URBAŃSKI N.K. a A. BERSEWICZ. Generation of OH initiated by interaction of Fe²⁺ and Cu⁺ with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochimica Polonica – English Edition*. 2000, **47**(4), str. 951–962.
160. OTURAN M.A., N. OTURAN., M.C. EDELAHI., F.I. PODVORICA. a K. EL KACEMI. Oxidative degradation of herbicide diuron in aqueous medium by Fenton’s reaction based advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*. 2011, **171**(1), str. 127–135.

161. CATASTINI C., M. SARAKHA., G. MAILHOT. a M. BOLTE. Iron (III) aquacomplexes as effective photocatalysts for the degradation of pesticides in homogeneous aqueous solutions. *The Science of The Total Environment*. 2002, **298**(1-3), str. 219–228.
162. TRÍSKA J., N. VRCHOTOVÁ., J. OLEJNÍČKOVÁ., R. JÍLEK. a R. SOTOLÁŘ. Separation and Identification of Highly Fluorescent Compounds Derived from *trans*-Resveratrol in the Leaves of *Vitis vinifera* Infected by *Plasmopara viticola*. *Molecules*. 2012, **17**(3), str. 2773–2783.
163. ZHU B.Z., H.T. ZHAO., B. KALYANARAMAN. a B. FREI. Metal-independent production of hydroxyl radicals by halogenated quinones and hydrogen peroxide: an ESR spin trapping study. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002, **32**(5), str. 465–473.
164. ZHU B.Z., B. KALYANARAMAN. a G. BIN JIANG. Molecular mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals by hydrogen peroxide and halogenated quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(45), str. 17575–17578.
165. KODAMA A., H. SHIBANO. a J. KAWABATA. Oxidative Dimer Produced from a 2,3,4-Trihydroxybenzoic Ester. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007, **71**(7), str. 1731–1734.
166. MOSS R., Q. MAO., D. TAYLOR. a C. SAUCIER. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2013, **27**(16), str. 1815–1827.
167. TAMBOLI V.F., N. RE., C. COLETTI., A. DEFANT., I. MANCINI. a P. TOSI. A joint experimental and theoretical investigation on the oxidative coupling of resveratrol induced by copper and iron ions. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2012, **319–320**, str. 55–63.
168. KALLIES B. a R. MEIER. Electronic Structure of 3d $[M(H_2O)_6]^{3+}$ Ions from Sc^{III} to Fe^{III}: A Quantum Mechanical Study Based on DFT Computations and Natural Bond Orbital Analyses. *Inorganic Chemistry*. 2001, **40**(13), str. 3101–3112.
169. GUERRERO R.F., B. PUERTAS., M.I. FERNÁNDEZ., M. PALMA. a E. CANTOS-VILLAR. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010, **11**(1), str. 231–238.
170. YIM N., D.T. HA., T.N. TRUNG., J.P. KIM., S. LEE., M. NA., H. JUNG., H.S. KIM., Y.H. KIM. a K. BAE. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010, **20**(3), str. 1165–1168.
171. FU J., J. JIN., R.H. CICHEWICZ., S.A. HAGEMAN., T.K. ELLIS., L. XIANG., Q. PENG., M. JIANG., N. ARBEZ., K. HOTALING., C.A. ROSS. a W. DUAN. *trans*-(-)- ϵ -Viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington Disease. *The Journal of biological chemistry*. 2012, **287**(29), str. 24460–24472.
172. BASRI D.F., L.W. XIAN., N.I. ABDUL SHUKOR. a J. LATIP. Bacteriostatic antimicrobial combination: Antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *BioMed Research International*. 2014, **9**(4), str. 1–8.
173. ERDEY L. Iron. **In:** *Gravimetric Analysis: Part 2, International Series Of Monographs On Analytical Chemistry*. Volume 7. Pergamon; 1965. str. 337–348. ISBN 9781483209241.
174. *Relative Stability of Precipitates and Complex Ions of Cu²⁺* [online]. [staženo 2.4.2016]. Dostupné z: <http://www.laney.edu/wp/cheli-fossum/files/2012/01/039.pdf>.
175. *Sigma-Aldrich* [online]. Viniferin. [staženo 30.3.2016]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/smb00074?lang=en®ion=CZ>.

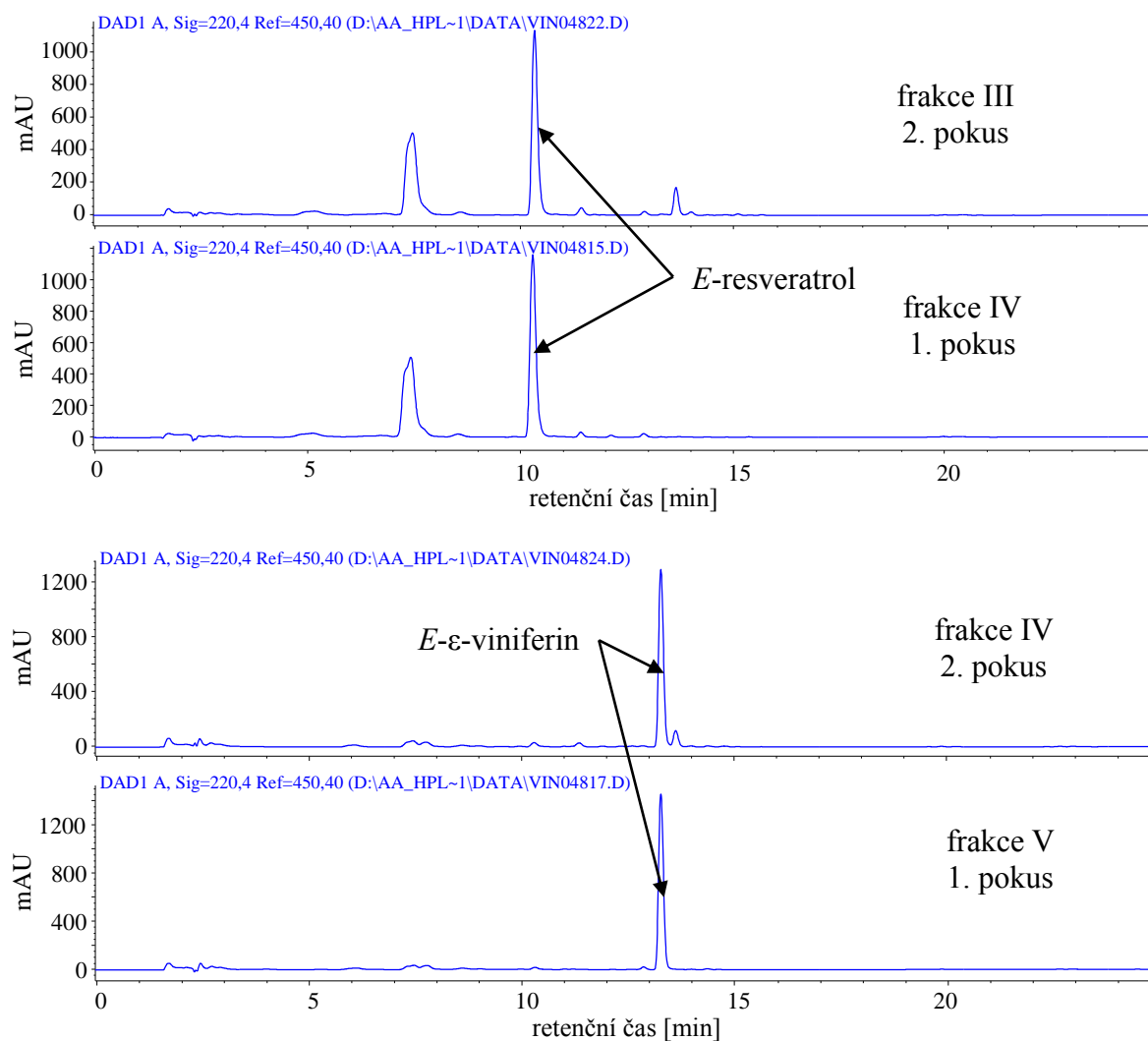
176. *Sigma-Aldrich* [online]. Resveratrol. [staženo 30.3.2016]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5010?lang=en®ion=CZ>.
177. *Extrasynthese* [online]. *Trans-Epsilon-Viniferin*. [staženo 5.4.2016]. Dostupné z: <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/polyphenol/trans-epsilon-viniferin-p7839483-c4958.html>.
178. *Extrasynthese* [online]. Resveratrol. [staženo 5.4.2016]. Dostupné z: <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/polyphenol/resveratrol-p7839486-c4963-s.html>.
179. LAMBERT C., T. RICHARD., E. RENOUF., J. BISSON., P. WAFFO-TÉGUO., L. BORDENAVE., N. OLLAT., J.M. MÉRILLON. a S. CLUZET. Comparative Analyses of Stilbenoids in Canes of Major *Vitis vinifera* L. Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**(47), str. 11392–11399.
180. BALÍK J., M. KYSELÁKOVÁ., N. VRCHOTOVÁ., J. TRÍSKA., M. KUMŠTA., J. VEVERKA., P. HÍC., J. TOTUŠEK. a D. LEFNEROVÁ. Relations between Polyphenols Content and Antioxidative Activity in Vine Grapes and Leaves. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, **26**, str. S25–S32.
181. MIKEŠ O., N. VRCHOTOVÁ., J. TRÍSKA., M. KYSELÁKOVÁ. a J. ŠMIDRKAL. Distribution of Major Polyphenolic Compounds in Vine Grapes of Different Cultivars Growing in South Moravian Vineyards. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, **26**(3), str. 182–189.
182. GORENA T., V. SAEZ., C. MARDONES., C. VERGARA., P. WINTERHALTER. a D. VON BAER. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*. 2014, **155**(0), str. 256–263.
183. GONZÁLEZ-BARRIO R., D. BELTRÁN., E. CANTOS., M.I. GIL., J.C. ESPÍN. a F.A. TOMÁS-BARBERÁN. Comparison of Ozone and UV-C Treatments on the Postharvest Stilbenoid Monomer, Dimer, and Trimer Induction in Var. “Superior” White Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(12), str. 4222–4228.
184. CAVALIERE C., P. FOGLIA., F. MARINI., R. SAMPERI., D. ANTONACCI. a A. LAGANÀ. The interactive effects of irrigation, nitrogen fertilisation rate, delayed harvest and storage on the polyphenol content in red grape (*Vitis vinifera*) berries: A factorial experimental design. *Food Chemistry*. 2010, **122**(4), str. 1176–1184.
185. CANTOS E., J.C. ESPÍN. a F.A. TOMÁS-BARBERÁN. Postharvest Stilbene-Enrichment of Red and White Table Grape Varieties Using UV-C Irradiation Pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(22), str. 6322–6329.
186. SOURAL I., N. VRCHOTOVÁ., J. TRÍSKA., J. BALÍK., Š. HORNÍK., P. CUŘÍNOVÁ. a J. SÝKORA. Various Extraction Methods for Obtaining Stilbenes from Grape Cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules*. 2015, **20**(4), str. 6093–6112.
187. ZGA N., Y. PAPASTAMOULIS., A. TORIBIO., T. RICHARD., J.C. DELAUNAY., P. JEANDET., J.H. RENAULT., J.P. MONTI., J.M. MÉRILLON. a P. WAFFO-TÉGUO. Preparative purification of anti-amyloidogenic stilbenoids from *Vitis vinifera* (Chardonnay) stems by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2009, **877**(10), str. 1000–1004.
188. TRÍSKA J., N. VRCHOTOVÁ., J. BALÍK. a I. SOURAL. Renewable chemicals from waste - securing the molecular value from waste streams. **In: Isolation of trans-ε-viniferin from viticulture waste**. London; 2015. str. P22.

8 Seznam použitých zkratek

- APCI – atmospheric pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku
- APPI – atmospheric pressure photo ionization – fotoionizace za atmosférického tlaku
- ESI – electrospray ionization – ionizace elektrosprejem
- AU – jednotka absorbance
- DAD – diode array detector – UV detektor s diodovým polem
- DPPH – 2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
- FLD – fluorescenční detektor
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
- NMR – nukleární magnetická rezonance
- ot/min – otáčky za minutu
- SPE – extrakce tuhou fází
- syn. – synonymum

9 Přílohy

Na obrázku 43 jsou uvedeny chromatogramy frakcí s největším obsahem *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu.



Obrázek 43: Chromatogram frakcí (znázornění čistoty) s největším obsahem *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu.

Při čištění extraktu z réví pomocí chromatografických metod označeného 1. pokus byla skokově snížena polarita z 70% na 20% methanol. Další čištění označené 2. pokus nezahrnovalo použití 20% methanolu.