

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Dimerizace resveratrolu a výskyt dimerů resveratrolu ve vybraných rostlinách

Bakalářská práce

Lukáš Toupal

Školitel: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.
Konzultant: RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

České Budějovice 2014

Toupal L., 2014: Dimerizace resveratrolu a výskyt dimerů resveratrolu ve vybraných rostlinách. [Dimerization of resveratrol and occurrence of resveratrol dimers in selected plants. Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Teoretická část je zaměřena na dimery resveratrolu, jejich výskyt v rostlinách a jejich možnou přípravu transformací resveratrolu.

V experimentální části bakalářské práce jsou porovnávány metody extrakce vybraných derivátů stilbenů (*E*-resveratrolu a *E-ε*-viniferinu) z réví a čištění získaných extraktů pomocí SPE. Dále se tato práce zabývá dimerizací resveratrolu pomocí chloridu železitého.

Annotation

The theoretical part is focused on the dimers of resveratrol, their occurrence in plants and their possible preparation by transformation of resveratrol.

In the experimental part of bachelor thesis the extraction methods of selected stilbene derivatives (*E*-resveratrol and *E-ε*-viniferin) from grape cane are compared and purification the obtained extracts was compared using SPE. Furthermore this work deals with dimerization of resveratrol using ferric chloride.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 25. 4. 2014

.....

Poděkování

V této části bakalářské práce bych chtěl poděkovat svému školiteli panu prof. Ing. Janu Třískovi, CSc. za skvělé vedení bakalářské práce, cenné rady a připomínky k mé 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. 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 dimerů	4
2.1.1	Dimery resveratrolu z <i>Parthenocissus tricuspidata</i>	4
2.1.2	Dimer resveratrolu z <i>Parthenocissus quinquefolia</i>	4
2.1.3	Dimer resveratrolu z <i>Parthenocissus laetevirens</i>	4
2.1.4	Dimery resveratrolu z <i>Cissus quadrangularis</i>	4
2.1.5	Dimery resveratrolu z <i>Vitis thunbergii</i>	5
2.1.6	Dimery resveratrolu z <i>Gnetum gnemon</i>	5
2.1.7	Dimery resveratrolu z <i>Shorea roxburghii</i>	5
2.2	Biotické transformace resveratrolu	6
2.2.1	Dimerizace pomocí lakáz	7
2.2.2	Dimerizace peroxidázami	8
2.2.3	Mikrobiální transformace	8
2.3	Abiotické transformace resveratrolu	9
2.3.1	Dimerizace založená na katalýze FeCl ₃	9
2.3.1.1	Syntéza analogů restrytisolu C a cyphostemminu A	9
2.3.1.2	Syntéza amurensinu H	9
2.3.2	Kyselá katalýza	10
2.3.2.1	Katalýza kyselinou mravenčí	10
2.3.2.2	Syntéza ampelopsinů	10
2.3.3	Oxidace anorganickými činidly	10
2.3.4	Reakční kaskády	11
2.3.5	Fototransformace	12
3	Experimentální část	13
3.1	Materiál a metody	13
3.1.1	Chemikálie	13
3.1.2	Rostlinný materiál	13
3.1.3	Přístroje	13
3.1.4	Metody extrakce dimerů	14
3.1.4.1	Extrakce pomocí FexIKA	15
3.1.5	Adsorpční chromatografie	16
3.1.6	Dimerizace resveratrolu chloridem železitým	17
4	Výsledky	18
4.1	Kalibrace	18

4.2	Naměřená data	18
4.2.1	HPLC metoda	18
4.2.2	LC-MS metoda	19
4.2.3	Porovnání extrakčních metod	20
4.2.4	Dimerizace	24
5	Diskuze výsledků	25
6	Závěr	29
7	Reference	30
8	Seznam použitých zkratk	36
9	Seznam příloh	37
10	Přílohy	38

1 Úvod

Od dávných časů sloužily lidem rostliny jako přírodní zdroj látek pomáhající při ošetřování a léčbě. V současnosti je známo mnoho rostlinných druhů vykazující pozitivní farmakologický účinek ⁽¹⁾. Veliká pozornost byla a je věnována rostlinám obsahující resveratrol a jeho oligomerní formy souhrnně nazývaných stilbeny. Resveratrol byl poprvé izolován roku 1940 z kořene kýchavice velkokvěté ⁽²⁾ a chemicky je to 3,4',5-trihydroxystilben. Ze struktury stilbenu vyplývá, že mohou existovat dva stereoisomery, a to *cis* a *trans* (obr. 1) ⁽³⁾.

Hlavní význam resveratrolu v rostlinách spočívá v jejich ochraně před stresem. Resveratrol je tvořen rostlinou, jako fytoalexin, ve zvýšené míře jako odpověď na biotický či abiotický stres ⁽³⁻⁵⁾. Ochrana před stresem má za následek přeměnu resveratrolu na více účinné dimery a oligomery například viniferiny ^(6, 7). Některé viniferiny mnohonásobně převyšují svými účinky (např. antifungálními, antioxidačními) samotný resveratrol ^(4, 8, 9). Viniferiny získaly své pojmenování podle rostliny *Vitis vinifera* (dále jen *V. vinifera*), v níž byly objeveny. *V. vinifera* neboli réva vinná je trvalá a opadavá dřevina z čeledi Vitaceae pocházející ze Středomořského regionu Evropy a jihozápadní Asie. Dnes je běžně pěstována na každém obývaném kontinentu a je ekonomicky důležitá pro svou roli při produkci vína ⁽¹⁰⁾.

První skutečný zájem o resveratrol však přišel až v roce 1992 se zjištěním přítomnosti resveratrolu ve víně a následnou snahou vysvětlit kardio-protektivní účinky červeného vína tzv. „francouzský paradox“ ⁽¹¹⁾. Termín „francouzský paradox“ popisuje skutečnost, že lidé v určitých oblastech Francie mají nižší úmrtnost způsobenou infarktem myokardu, než by se u nich očekávalo navzdory jejich stravě bohaté na nasycené mastné kyseliny ⁽³⁾. Až o několik let později byl resveratrol navržen jako hlavní faktor tohoto paradoxu pro objevené účinky. Dnes připisujeme resveratrolu a jeho oligomerům mnoho účinků jmenovitě antibakteriální, antifungální ⁽¹²⁾, antioxidační ^(3, 9, 13), antimutagení ⁽¹³⁾, hepatoprotektivní ⁽¹⁴⁾, vyvolávající apoptózu B-lymfocytů leukémie ⁽¹⁵⁾, inhibice lidských enzymů cytochromu P450 ⁽¹⁶⁾, inhibice cyklooxygenázy (COX I, COX II) ^(13, 17), protizánětlivé, protinádorové ⁽¹⁸⁾, terapeutické ve všech třech fázích karcinogeneze ^(19, 20), antimikrobiální ⁽¹⁷⁾.

Resveratrol a jeho oligomery stilbeny jsou podstatněji vytvářeny u rostlin druhu *Vitis*, v kořeni a stonku, kde působí jako prevence proti hnilobě. Tato zvýšená tvorba může vést k celkově většímu obsahu stilbenů v těchto částech rostliny než v listech či hroznech ⁽²¹⁻²⁴⁾. Zatímco mnoho publikací se věnovalo výskytu resveratrolu a dalších stilbenů ve víně, hroznech a slupkách hroznů, zaměření na vegetativní části rostliny (réví, stonek a listy) nebylo tak časté až do nedávné doby ⁽²⁵⁾. Přitom konkrétně réví z *V. vinifera* se jeví jako slibný zdroj *E-resveratrolu* a dalších stilbenů na bázi resveratrolu ^(26, 27).

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je:

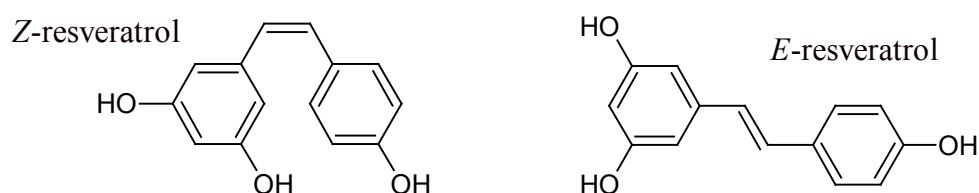
- Literární přehled biotické a abiotické transformace resveratrolu na dimery resveratrolu a možností jejich přípravy.
- Výskyt dimerů resveratrolu v rostlinném materiálu, zejména částech rostliny révy vinné.
- Pokus o izolaci dimerů resveratrolu z rostlinného materiálu pomocí adsorpční chromatografie.
- Dimerizace resveratrolu pomocí chloridu železitého.

2 Rešeršní část

Podle současné zkušenosti byla běžně používána *trans* a *cis* nomenklatura pro popisování stereochemie nasycených kruhů, zatímco *E/Z* nomenklatura byla používána k popisu stereochemie dvojných vazeb. Přestože je *E/Z* nomenklatura pro *trans* a *cis* konfiguraci u dvojných vazby přesnější, není běžná v literatuře stilbenů. Mattivi a kol. ⁽²⁸⁾ ilustroval tento problém ve studii, kde podrobil listy *V. vinifera* působení *Plasmopara viticola* (dále jen *P. viticola*). Mezi produkty tohoto působení byl nalezen ϵ -viniferin v obou izomerních formách, ale i jeho další dva izomery rozdílné od ϵ -viniferinu v *cis* konformaci na pozici 2 a 3 dihydrobenzofuranu. Autoři pojmenovali tyto dva *cis*-dihydrobenzofuranové analogy *E*- a *Z*- ω -viniferin.

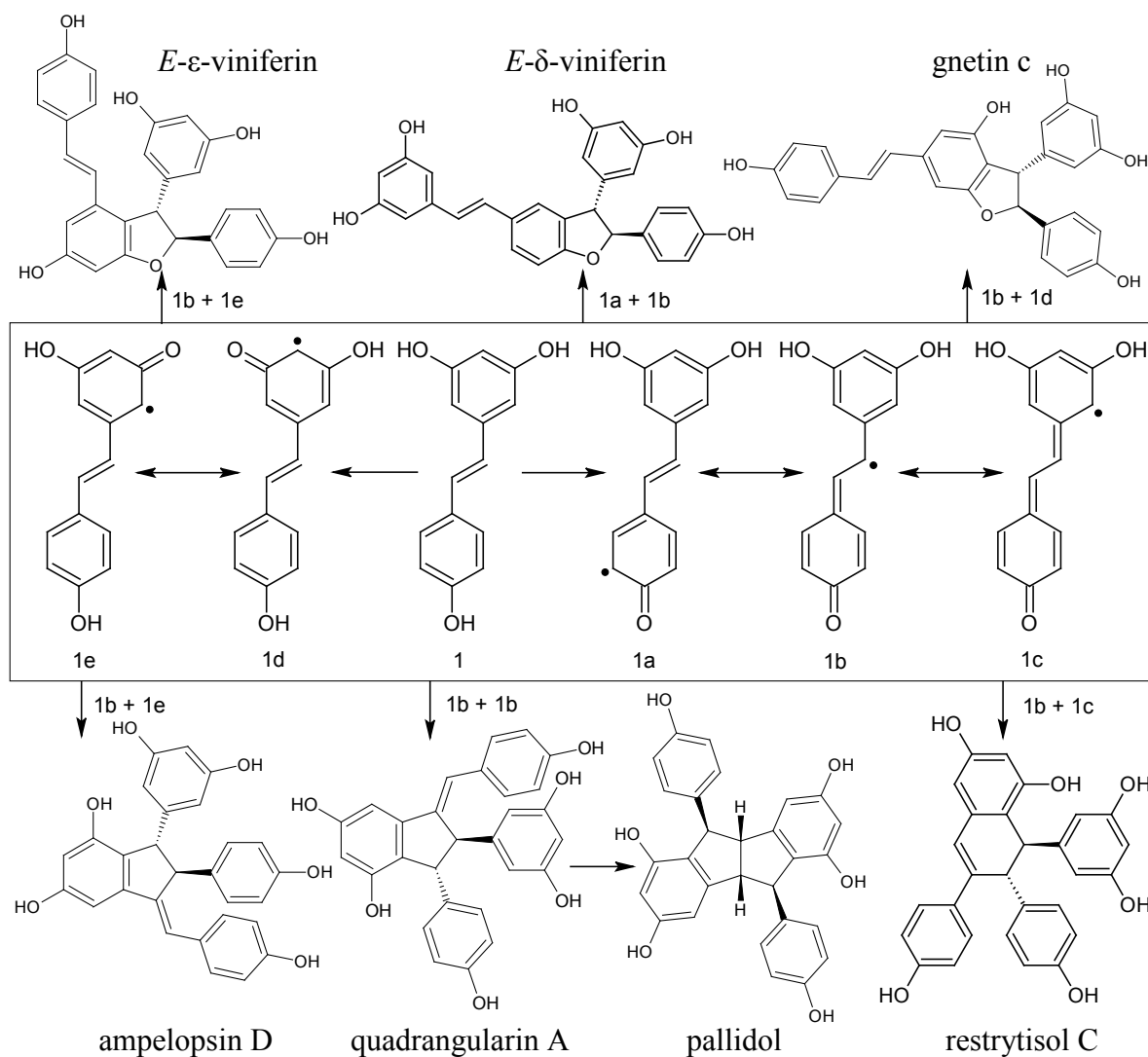
Triviální názvy sloučenin zmíněné v této práci (spolu se synonymy uvedenými v literatuře) jsou následující: *Z*-resveratrol (*cis*-resveratrol); *E*-resveratrol (*trans*-resveratrol); *Z*- ϵ -viniferin (*cis*- ϵ -viniferin); *E*- ϵ -viniferin (*trans*- ϵ -viniferin); *Z*- ω -viniferin (*cis*- ω -viniferin, dehydrodimer *cis*-*cis*-resveratrolu); *E*- ω -viniferin (*trans*- ω -viniferin, dehydrodimer *cis*-*trans*-resveratrolu); *E*- δ -viniferin (*trans*- δ -viniferin, *trans*-resveratrol dehydrodimer).

Resveratrol se nachází v přírodě ve dvou izomerních formách *Z*-resveratrol a *E*-resveratrol. Pouze však jeho *trans* forma je biologicky aktivní ⁽³⁾. Na obrázku 1 jsou znázorněny obě izomerní formy resveratrolu.



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

Na obrázku 2 je uveden pravděpodobný průběh dimerizace či oligomerizace *E*-resveratrolu katalyzované enzymy. Ty pravděpodobně svou činností vyvolají tvorbu meziproductů (radikály 1a – 1e), jejichž spárováním vzniknou dimery ^(29, 30). Stejný mechanismus se předpokládá i pro dimerizaci za pomoci anorganických činidel ⁽³¹⁾.



Obrázek 2: Možné biosyntetické trasy tvorby dimerů.

Sloučenina, popsaná na obrázku 2 jako produkt reakce radikálů 1b a 1e, *E*-ε-viniferin je nejvíce zastoupený dimer mezi rostlinami rodu *Vitis*. *E*-ε-viniferin byl poprvé izolován z *V. vinifera* a je klasifikován jako model pro jeho biosyntézu z resveratrolu ^(32, 33). Podobně jako resveratrol, tento dimer získal pozornost jako fytoalexin, u něhož byly pozorovány antioxidační, antifungální a antibakteriální účinky ^(9, 34). Antioxidační účinky mají látky, které v nízké koncentraci (ve srovnání s oxidovatelným substrátem) významným způsobem omezují nebo přímo zpomalují oxidaci substrátu vyvolanou oxidačními činidly. *E*-ε-viniferin ukázal lepší antioxidační vlastnosti (IC₅₀ hodnot 0,12 – 0,16 mM) než *E*-resveratrol (IC₅₀ hodnot

0,92 – 0,98 mM) na polární systém DMSO/O₂⁻. Antioxidační aktivita byla změřena pomocí EPR ⁽⁹⁾. Další pozorovanou aktivitou *E*- ϵ -viniferinu je jeho schopnost inhibovat hepatomové buňky HepG2 blokováním průběhu buněčného cyklu na přechodu mezi G2/M fázemi. Antiproliferační účinek vůči HepG2 buňkám *E*- ϵ -viniferinu je ale nižší než *E*-resveratrolu ⁽³⁵⁾.

2.1 Výskyt dimerů

V přírodě se oligostilbeny nalézají v rostlinách čeledí Dipterocarpaceae, Vitaceae, Leguminosae, Cyperaceae, Gnetaceae, Iridaceae, Celastraceae, Paeoniaceae, Moraceae, Pinaceae, Fabaceae, Poaceae ^(31, 36, 37). V kapitolách 2.1.1 až 2.1.7 jsou uvedeny některé druhy spadající do těchto čeledí, které jsou významné z hlediska dimerů v nich obsažené.

2.1.1 Dimery resveratrolu z *Parthenocissus tricuspidata*

Parthenocissus tricuspidata je latinský název pro rostlinu loubinec trojlaločný (syn. přísavník trojcípý). Loubinec trojlaločný je ale též lidově nazýván psí víno. Jedná se o popínavou rostlinu z čeledi Vitaceae pocházející z východní Asie. V této rostlině byly objeveny dimery resveratrolu: pallidol, ϵ -viniferin, ampelopsin F a isoampelopsin F ⁽³⁸⁾.

2.1.2 Dimer resveratrolu z *Parthenocissus quinquefolia*

Parthenocissus quinquefolia je latinsky pojmenován loubinec pětistý (syn. přísavník pětistý). Loubinec pětistý je stejně jako loubinec trojlaločný popínavá rostlina z čeledi Vitaceae, avšak původem z východní části Severní Ameriky. Japonští autoři izolovali z této rostliny dimer parthenocissin A, trimer parthenocissin B spolu s dalšími stilbeny jako resveratrol, piceatannol (3,3',4',5-tetrahydroxystilben) či piceid (3,4',5-trihydroxystilben-3-*O*- β -D-glukopyranosid, obr. 3) ⁽³⁹⁾.

2.1.3 Dimer resveratrolu z *Parthenocissus laetevirens*

Rostliny z čeledi Vitaceae jsou známy svým vysokým obsahem stilbenů. Z kořene a stonku *Parthenocissus laetevirens* byl izolován dimer resveratrolu laetevirenol A spolu se stilbeny (laetevirenoly B-E) ⁽⁴⁰⁾.

2.1.4 Dimery resveratrolu z *Cissus quadrangularis*

Cissus quadrangularis (dále jen *C. quadrangularis*) byl používán v Indii jako tradiční přípravek urychlující hojení zlomenin ⁽¹⁾. *C. quadrangularis* patří též do čeledi Vitaceae. Fytochemická studie stonku *C. quadrangularis* prokázala přítomnost stilbenů jako: resveratrol, piceatannol, pallidol, parthenocissin A, quadrangularin A, B, C. Tato studie nově popsala dimery resveratrolu quadrangularin A, B a C ⁽⁴¹⁾.

2.1.5 Dimery resveratrolu z *Vitis thunbergii*

Vitis thunbergii je latinsky pojmenována réva thunbergova. Její kořeny jsou tradičně používány pro léčbu průjmu, zlomenin, žloutenky a zánětu jater na Taiwanu. V kořenu této révy byly objeveny stilbeny (ampelopsin C, (-)-viniferal, (+)-vitisin A, (+)-vitisin C a miyabenol A) a dimery resveratrolu (vitisinoly A-D a (+)-ε-viniferin) ⁽⁴²⁾.

2.1.6 Dimery resveratrolu z *Gnetum gnemon*

Liánovec jedlý, indonéským názvem melinjo, je neopadavý strom z čeledi Gnetaceae široce pěstovaný v jihovýchodní Asii. Jeho plody mění své zbarvení od zelené přes žlutou, oranžovou až po červenou, označující jejich zralost. V Indonésii jsou plody a listy liánovce součástí mnohých jídel. Zralá semínka liánovce jsou obaleny schránkou. V endospermu semene liánovce byly nalezeny stilbeny: resveratrol, gnemonoside A, gnemonoside C, gnemonoside D včetně dimerů gnetin C a gnetin L ⁽⁴³⁾. Kdežto v kořeni *Gnetum gnemon* byly již dříve nalezeny dimery resveratrolu (gnemonol G, gnetiny C a D) spolu se stilbeny (gnemonoly H, I a J, gnetin E, ampelopsin E, Z-ampelopsin E) ⁽⁴⁴⁾.

2.1.7 Dimery resveratrolu z *Shorea roxburghii*

Rod *Shorea* patří do čeledi Dipterocarpaceae, obsahující 22 druhů v Thajsku. Rostliny, patřící do tohoto rodu, jsou charakteristické svou bohatostí na oligostilbeny. *Shorea roxburghii* (dále jen *S. roxburghii*) je široce rozšířena v Thajsku a jeho sousedících státech. *S. roxburghii* patří mezi opadavé dřeviny. Kůra *S. roxburghii*, pro místní známá jako „Pha-yom“, je tradičně používána jako konzervační či jako adstringentní přísada pro tradiční lihoviny v Thajsku. V indické lidové medicíně byla používána na léčbu úplavice, průjmu, cholery ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. V kořenu *S. roxburghii* byla prokázána přítomnost dimerů resveratrolu (roxburghiol A, melanoxylin A, (-)-ε-viniferin, hopeahainanfenol a vitisinol G) spolu s dalšími stilbeny (caragafenol A, vaticanol A, (-)-hopeafenol, isohopeafenol, apigenin 7-O-arabinoside, E-piceid a E-3,5,4'-trihydroxyresveratrol 2-C-glykosid) ⁽⁴⁶⁾.

2.2 Biotické transformace resveratrolu

Celosvětově je drtivá většina oblastí osazených kultivary révy vinné náchylná na různé plísňové choroby. Mezi tři přední houbové patogeny napadající révu lze zařadit *Erysiphe nestor* (dále jen *E. nestor*, syn. *Uncinula necator*, padlí révové), *P. viticola* (plíseň révová) a *Botrytis cinerea* (dále jen *B. cinerea*, plíseň šedá). Za účelem vyprodukovat co možná nejkvalitnější víno se pro ochranu révy používá mnoho fungicidů. Jejich použití může vést k negativním efektům jak na životní prostředí, tak na lidské zdraví, zejména při přítomnosti zbytků pesticidů v hroznech ⁽⁴⁸⁾. Přitom se však réva dokáže bránit sama proti takovýmto patogenům. Ukázalo se, že rychlé hromadění resveratrolu ve zdravých tkáních v okolí infekce, zpomaluje či zastavuje šíření infekce ⁽³⁶⁾. Resveratrol je za těchto podmínek transformován rostlinou do několika více účinných antimykotik ⁽¹²⁾. Schnee a kol. ⁽⁴⁸⁾ se snažil nalézt nový přírodní fungicid. Zaměřil se na houbové patogeny (*E. necator*, *P. viticola* a *B. cinerea*), které nechal působit na methanolický a ethanolický extrakt z révy *V. vinifera* tří kultivarů (Pinot Noir, Gamaret a Divico). Navzdory zcela rozdílnému chování houbových patogenů, vykazovaly všechny extrakty podobné antifungální aktivity. Existovaly zde pouze drobné rozdíly ve složení výsledné směsi.

P. viticola se stala od roku 1878 nejzávažnější chorobou révy na Evropských vinicích, zejména pro nejvíce pěstované kultivary *V. vinifera* ⁽⁸⁾. Pezet a kol. ⁽⁴⁹⁾ studoval vliv fytoalexinů na tento houbový patogen *in vitro*. Použil stilbeny extrahované z listu *V. vinifera* methanolem. Extrakt po pročištění centrifugací ošetřil zoosporami *P. viticola*. Po sedmidenní inkubaci byly nalezeny stilbeny (*E*- a *Z*-piceid, *E*- ϵ - a *E*- δ -viniferin), z nichž *E*- δ -viniferin byl nejvíce zastoupený. Tento viniferin se prokázal být stejně tak toxický na zoospory *P. viticola* jako pterostilben, který byl považován za nejvíce toxický stilben pro houby. V následující studii se Pezet a kol. ⁽⁸⁾ zaměřil na efekt stilbenů (*E*-resveratrolu, *E*- ϵ - a *E*- δ -viniferinů a pterostilbenu) na mobilitu zoospor a na šíření tohoto houbového patogenu v listu senzitivního kultivaru révy vinné Chasselasa a resistantního kultivaru Solaris. *E*-resveratrol se prokázal být nejméně toxický na mobilitu, kdežto *E*- δ -viniferin a pterostilben nejvíce. Naočkování *P. viticola* vedlo u kultivaru Chasselas k hojnému výskytu infekce s nízkou koncentrací stilbenů v místě infekce, naopak u kultivaru Solaris byla pozorována pouze nekrotická skvrna v místě ošetření s vysokou koncentrací stilbenů.

2.2.1 Dimerizace pomocí lakáz

Lakázy jsou enzymy oxidoreduktázy, v angličtině též nazývány „blue oxidases“, které jsou široce rozšířeny u hub a některých bakterií. Tyto enzymy jsou schopny katalyzovat oxidační reakce různých fenolických sloučenin. Aktivní strana těchto enzymů se skládá z kovových shluků, obsahujících 4 atomy mědi. Vlastní oxidace pak závisí na redoxním potenciálu mezi aktivní stranou lakázy a oxidovanou sloučeninou. Lakázy ukazují výjimečnou všestrannost substrátu a proto jsou potenciálně vhodný biokatalyzátor pro mírnou oxidaci organických sloučenin ⁽⁵⁰⁾.

B. cinerea je houbový patogen, který může napadat širokou škálu rostlin. U révy vinné tato nemoc může mít vliv na všechna zelená pletiva, zejména pak na dozrávající plody ⁽⁵¹⁾. V jedné z prvních studií Pezet ⁽⁵²⁾ publikoval práci v níž demonstroval, že lakáza produkovaná *B. cinerea* katalyzuje oxidaci resveratrolu a přeměňuje jej na ϵ -viniferin a to tak, že ϵ -viniferin je prakticky jediný produkt.

Cichewicz a spol. ⁽¹²⁾ oxidoval resveratrol za pomoci lakáz z tří kmenů *B. cinerea* (ATCC 11542, ATCC 12481 a ATCC 20599) a dvou kmenů *Botrytis allii* (ATCC 9435 a ATCC 42381). Po dvoudenní inkubaci kulturou *B. cinerea* ATCC 11542 získal opakovanou sloupcovou chromatografií a chromatografií na tenké vrstvě šest oxidovaných dimerů. Tři z těchto dimerů byly již známy (δ -viniferin, leachinol F a pallidol) a tři byly nově popsány (restrytisol A-C). Izolace těchto dimerů z rostoucí kultury podporuje fakt, že odbourávání fytoalexinů hraje pro patogen významnou roli.

V dřívější studii vedlo vystavení resveratrolu lakáze izolované z *B. cinerea* k získání *E*- δ -viniferinu a jeho izomerní formy *Z*- δ -viniferinu jako jediné dimerní formy *E*-resveratrolu ⁽⁵³⁾.

Z výsledků prací založených na oxidaci *E*-resveratrolu pomocí lakáz z *B. cinerea* vycházel Nicotra, který však použil lakázy z *Myceliophthora thermophyla* (dále jen *M. thermophyla*) a z *Trametes pubescens* (dále jen *T. pubescens*). Při použití lakázy z *M. thermophyla* získal *Z*- δ -viniferin s výtěžností 31% a u lakázy *T. pubescens* získal tentýž produkt avšak s nižší výtěžností a to pouhých 18% ⁽⁵⁰⁾.

2.2.2 Dimerizace peroxidázami

Japonští autoři se pokoušeli připravit ϵ -viniferin za pomoci peroxidáz ze sóje luštinaté (*Glycine max*), houby (*Arthromyces ramosus* (dále jen *A. ramosus*)) a křenu selského. Reakce resveratrolu s peroxidázami prováděli za teploty 27 °C. Ve výsledku nenalezli ϵ -viniferin mezi produkty žádné z testovaných peroxidáz, nicméně našli několik dimerů resveratrolu, z nichž největší zastoupení má δ -viniferin. Nalezené dimery jsou uvedeny v tabulce I, kde uvedená procenta odpovídají míře transformace⁽³¹⁾.

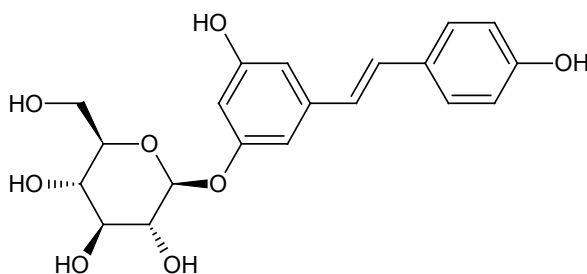
Tabulka I: Zastoupení produktů získaných ošetřením resveratrolu peroxidázami⁽³¹⁾.

původ peroxidázy	rozpouštědlo (50 % vodný ☉)	δ -viniferin (%)	pallidol (%)	směs F a G leachinolu (%)	směs B a C quadrangularinu (%)
sója luštinatá	aceton	21,4	7,2	1,8	-
<i>A. ramosus</i>	aceton	18,4	7,4	4,6	-
křen selský	aceton	12,6	10,2	-	-
sója luštinatá	ethanol	12,1	9,5	5,2	8,6
<i>A. ramosus</i>	ethanol	13,1	5,0	4,6	8,2

Znak % v tabulce I uvádí stupně přeměny (2mol produktu/mol resveratrolu*100)

2.2.3 Mikrobiální transformace

Resveratrol, jakožto fytoalexin, je antimikrobiálně aktivní látka s významnými antioxidačními účinky. Cichewicz sledoval tyto aktivity vystavením *E*-resveratrolu 12 mikrobiálním kulturám *Bacillus cereus* (dále jen *B. cereus*). Ze všech zkoumaných kultur pouze však jediná kultura byla schopna biotransformace *E*-resveratrolu a to *B. cereus* UI 1477. Celobuněčná suspenze této kultury poskytla piceid, jako produkt biotransformace, s výtěžkem 11%⁽⁵⁴⁾.



Obrázek 3: Strukturní vzorec piceidu.

2.3 Abiotické transformace resveratrolu

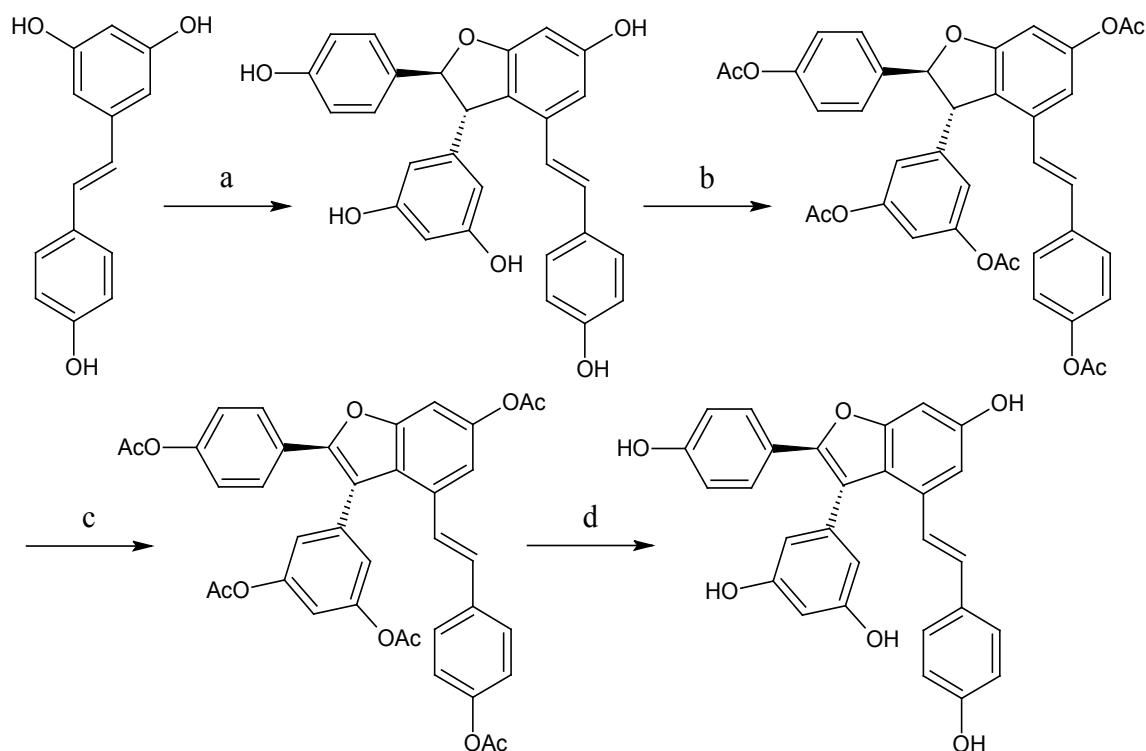
2.3.1 Dimerizace založená na katalýze FeCl_3

2.3.1.1 Syntéza analogů restrytisolu C a cyphostemminu A

Thomas a kol. ⁽⁵⁵⁾ syntetizoval analog resveratrolu 3,4-dimethoxy-12-acetoxy stilben. Takovýto stilben pak spolu s chloridem železitým v dichlormethanu se přeměnil za pokojové teploty na dva dimery. Konstituční vzorce těchto dimerů se podobaly konstitučním vzorcům v přírodě se vyskytujících dimerů restrytisolu C a cyphostemminu A. Rozdíl spočíval v analogické struktuře syntetizovaného stilbenu, jež místo methoxy a acetoxy skupin měl navázanu hydroxylovou skupinu.

2.3.1.2 Syntéza amurensinu H

Amurensin H byl původně izolován z kořene révy amurské (*Vitis amurensis*). Jeho syntéza je založena na oxidaci resveratrolu pomocí chloridu železitého v methanolu při pokojové teplotě. Tento klíčový krok poskytne ϵ -viniferin, který zreaguje přes 2 meziprodukty až na výsledný amurensin H. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 4 ⁽⁵⁶⁾.



a. FeCl_3 , CH_3OH b. $(\text{Ac})_2\text{O}$, pyridin c. DDQ, 1,4-dioxan pod zpětným chladičem d. K_2CO_3 , CH_3OH

Obrázek 4: Syntéza Amurensinu H.

2.3.2 Kyselá katalýza

2.3.2.1 Katalýza kyselinou mravenčí

Dimerizace s použitím 80% kyseliny mravenčí, sloužící jako katalyzátor, vedla k získání produktů pojmenovaných resformicol A, B a C. Resformicol A a B byl získán jako bezbarvý amorfni prášek a resformicol C jako nažloutlý amorfni prášek. Všechny tři syntetické produkty mohou být rozlišeny mechanismem Diels-Alderovy reakce dvojího druhu. Obvyklé [4+2] adice tvořící benzo-cyklohexanový systém (výsledný produkt resformicol A a B). Druhou je adice vedoucí ke ztrátě substituovaného benzenového jádra (výsledný produkt resformicol C). Struktury resformicolů A, B a C byly stanoveny pomocí UV, IR, MS spektrometrie a NMR ⁽³⁷⁾.

2.3.2.2 Syntéza ampelopsinů

Ampelopsiny jsou dimery pojmenované podle rodu *Ampelopsis* (révovník) z čeledi Vitaceae. Je možné je připravit kyselou katalýzou (+)-ε-viniferinu. Takaya a kol. ⁽⁵⁷⁾ syntetizoval ampelopsiny B, D, F za použití kyselin, uvedených v tabulce II.

Tabulka II: Kysele katalyzovaná přeměna (+)-ε-viniferinu na ampelopsiny.

činidlo	rozpouštědlo	čas	výtěžek (%)		
			(+)-ampelopsin B	(-)-ampelopsin D	(+)-ampelopsin F
HCl	H ₂ O	50 h	38	-	8
CF ₃ SO ₃ H	CH ₃ NO ₂	10 h	-	-	38
CF ₃ SO ₃ H	CH ₃ OH	7 dní		14 a 8	21
H ₂ SO ₄	CH ₃ OH	5 dní	13	6 a 10	19

Znak % v tabulce II uvádí výtěžek. U připraveného (-)-ampelopsinu D jsou uvedeny dva výtěžky, protože (-)-ampelopsin D vznikal ve dvou formách, jež se lišily optickou otáčivostí. Rozdílnost mezi vzniklými ampelopsiny je dána v rozdílu polohy protonace během zahajovací fáze reakce.

2.3.3 Oxidace anorganickými činidly

Existuje mnoho způsobů jak přeměnit resveratrol na dimery. V jedné ze studií se snažili japonští autoři vyrobit ε-viniferin za použití činidel běžně používané k oxidaci fenolů. Seznam činidel, podmínky reakce a výsledné produkty jsou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III: Dimerizace resveratrolu pomocí anorganických oxidantů ⁽³¹⁾.

činidlo	rozpouštědlo	teplota (°C)	čas	výtěžek (%)		
				ε-viniferin	δ-viniferin	pallidol
Tl(NO ₃) ₃	CH ₃ OH	-50	5 min	30,1	-	-
Tl(NO ₃) ₃	CH ₃ OH	-30	5 min	3,9	-	-
K ₃ [Fe(CN) ₆]	CH ₃ OH	25	10 min	21,9	22,5	15,7
Ce(SO ₄) ₂	CH ₃ OH	-50	26 h	3,7	8,4	-
FeCl ₃	CH ₃ COCH ₃	25	20 h	0,9	97,0	1,5
MnO ₂	CH ₂ Cl ₂	25	24 h	-	91,0	9,0

Znak % v tabulce III uvádí stupně přeměny (2mol produktu/mol resveratrolu*100). Jak je v tabulce III uvedeno, dusičnan thallitý přeměňuje resveratrol v methanolu na ε-viniferin v relativně velkém výtěžku. Při zvyšování teploty však podíl ε-viniferinu klesá a při 0 °C je resveratrol přeměňován na komplexní směs. Dalším zjištěním této práce bylo, že FeCl₃ v acetonu a MnO₂ v dichlormethanu přeměnily resveratrol na *E*-δ-viniferin. Pallidol vznikl v přítomnosti K₃[Fe(CN)₆] v methanolu po krátkou dobu jako třetí nejzastoupenější dimer ⁽³¹⁾.

V dřívější studii jiní japonští autoři podrobili resveratrol působení činidel uvedených v tabulce IV v methanolu při 50 °C po dobu 1 h. Tyto činidla více či méně přeměňují resveratrol na *E*-δ-viniferin ⁽¹⁷⁾.

Tabulka IV: Oxidativní dimerizace resveratrolu.

činidlo	výtěžek (%)	
	nezměněný resveratrol	<i>E</i> -δ-viniferin
CH ₃ COOAg	~1	97
Ag ₂ O	8	76
Ag ₂ CO ₃	37	56
AgNO ₃	95	4
(CH ₃ COO) ₃ Mn	19	55
CH ₃ COOCu	57	24
(CH ₃ COO) ₂ Cu	62	22

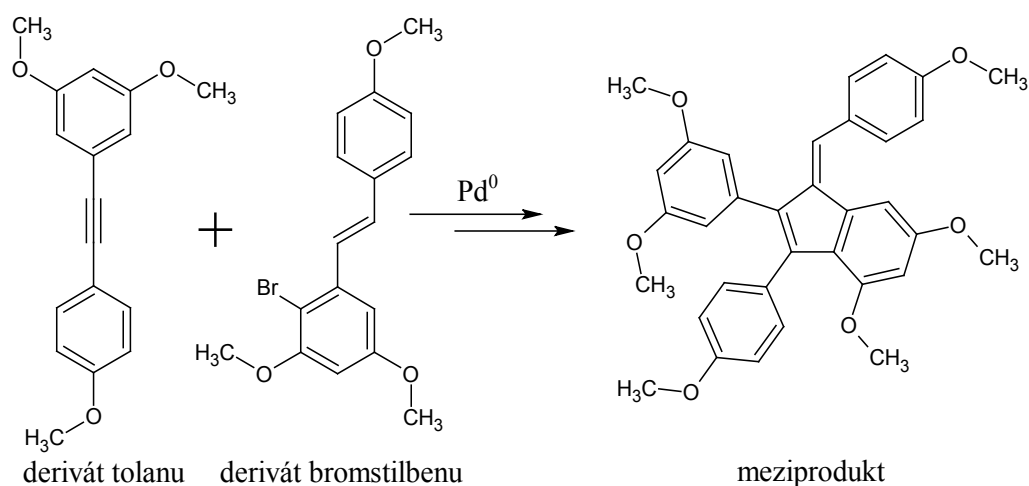
Z těchto výsledků vyplývá (tab. IV), že nejefektivnějším způsobem jak bez použití enzymů připravit *E*-δ-viniferin je při použití CH₃COOAg.

2.3.4 Reakční kaskády

Z počátku se přistupovalo k syntéze dimerů resveratrolu pomocí strategie jež byla odvozena od jejich předpokládané biogeneze. Což nebylo nic jiného než tvorba radikálů nebo karbokationtů, vzniklých z *E*-resveratrolu jeho vystavením různým chemikáliím či enzymům. V roce 2007 Snyder a kol. ⁽⁴⁾ vydal článek, v němž uvádí chemoselektivní přístup k syntéze několika přírodních polyfenolických produktů, jež jsou považovány za produkty vzniklé dimerizací resveratrolu. Snyder použil snadno dostupný stavební blok, skládající se ze tří

aromatických kruhů, který byl podroben reakční kaskádě, vyústující v pět přírodních produktů na bázi resveratrolu: ampelopsin D, isoampelopsin D, ampelopsin F, quadrangularin A a pallidol. Mezi další produkty patřily paucifloral F, isopaucifloral F a diptoindonesin A, které však neobsahují 4 ale pouze 3 aromatické kruhy^(4, 58).

Snyderovu strategii syntézy dimerů resveratrolu rozšířila Jeffrey a kol.⁽⁵⁹⁾ Ta se snažila zkoumat všestrannost reakční kaskády mezi derivátem bromstilbenu a derivátem tolanu katalyzované pomocí palladia. Taková kaskáda poskytne meziprodukt (obr. 5), obsahující veškeré znaky odpovídající několika dimerů resveratrolu. Z tohoto meziproduktu selektivní redukcí exocyklické dvojné vazby lze získat prekursor quadrangularinu A či parthenocissinu A. Meziprodukt je taktéž možné přeměnit na prekursor pallidolu pomocí $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ v CH_2Cl_2 .



Obrázek 5: Vznik meziproduktu reakční kaskády.

2.3.5 Fototransformace

E-resveratrol je možné přeměnit na dimery, trimery a tetramery fototransformací. Vznikající produkty vlastní fototransformace jsou pak závislé na podmínkách, v nichž reakce probíhá. Fototransformace (po dobu 7,5 h v prostředí 40 % methanolu), použitím vysokotlaké výbojky v přítomnosti vzduchu jako oxidační atmosféry, poskytuje větší rozmanitost produktů než je tomu při použití nízkotlaké monochromatické výbojky v přítomnosti argonu jako inertní atmosféry. Mezi izolovanými látkami produktů fototransformace v prostředí inertní atmosféry byly nalezeny 3 majoritní sloučeniny (*Z*-resveratrol, nezměněný *E*-resveratrol, 3,5,7-trihydroxyfenantren). V přítomnosti oxidační atmosféry vzduchu byly nalezeny dimery, trimery i tetramery *E*-resveratrolu. Dimery určila autorka jako některé z možných izomerů *E*- ω -viniferinu a *Z*- ω -viniferinu. Produkty byly identifikovány prostřednictvím MS a NMR⁽⁶⁰⁾.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Pro extrakci resveratrolu a jeho dimerů byl použit ethylacetát od firmy Fluka, methanol od firmy Merck 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). Při dimerizaci *E*-resveratrolu byl použit hexahydrát chloridu železitého (Merck).

3.1.2 Rostlinný materiál

Pro stanovení obsahu resveratrolu a jeho dimerů bylo použito réví *V. vinifera* dvou odrůd a to Veltlínského zeleného a Frankovky. Réví Veltlínského zeleného a Frankovky bylo sbíráno a lyofilizováno v roce 2011 z vinice poblíž Lednice. Rostlinný materiál byl skladován při - 18 °C.

3.1.3 Přístroje

Kromě základního laboratorního vybavení byly v této práci použity následující přístroje: ultrazvuková lázeň (UCC4 Powersonic), centrifuga (Hettich, universal 32R), nožový mlýnek (VIPO), vakuová odparka (Laborota 4000, Heidolph Instruments).

Extrakce ve fluidním loži byly provedeny extrakčním přístrojem IKA®RET Control-Visc Safety Control za pomoci Labworldsoft softwaru.

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 V.

Tabulka V: Složení mobilní fáze pro HPLC.

čas [min]	množství A [%]	množství B [%]	A: 5 % acetonitril + 0,1 % kyselina orthofosforečná
0	80	20	
20	20	80	B: 80 % acetonitril + 0,1 % kyselina orthofosforečná
25	0	100	

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 pouze při 315 nm. Druhý detektor FLD (Agilent, G1321A, spektra byla zaznamenávána fluorescencí v rozsahu 340 – 600 nm). Fluorescenční detekce (Ex 315 nm, Em 395 nm) sloužila jako kontrola. Vyhodnocení naměřených dat bylo zpracováno programem ChemStation for LC 3D ve verzi A:10.02 [1757].

Pro účely adsorpční chromatografie byly použity kolonky SPE založené na extrakci tuhou fází (SPE - Solid Phase Extraction): SPE LiChrolut EN (náplň 200 mg, velikost částic není uvedena, Merck) a SPE LiChrolut PR-18 (náplň 200 mg, velikost částic 40 – 63 µm, Merck).

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. Kolona Hypersil Gold (Thermo Electron Corporation, Bellefonte, PA, USA) s rozměry 50 x 2,1 mm a průměrem částic 1,9 µm a byl použit gradient tvořený směsí voda-acetonitril-kyselina mravenčí ⁽⁶¹⁾. Profil gradientu je uveden v tabulce VI.

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

čas [min]	množství A [%]	množství B [%]	
0	100	0	A: 5 % acetonitril +
1	100	0	0,1 % kyselina mravenčí
14	50	50	B: 80 % acetonitril +
15	0	100	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 ⁽⁶¹⁾.

3.1.4 Metody extrakce dimerů

Na laboratorních vahách byl přesně navážen mletý lyofilizovaný materiál réví Veltlínského zeleného (tab. VII) do každé z devíti zkumavek. V dalším kroku se do každé zkumavky přidaly 3 ml rozpouštědla. Následovala extrakce za podmínek uvedených v tabulce VII.

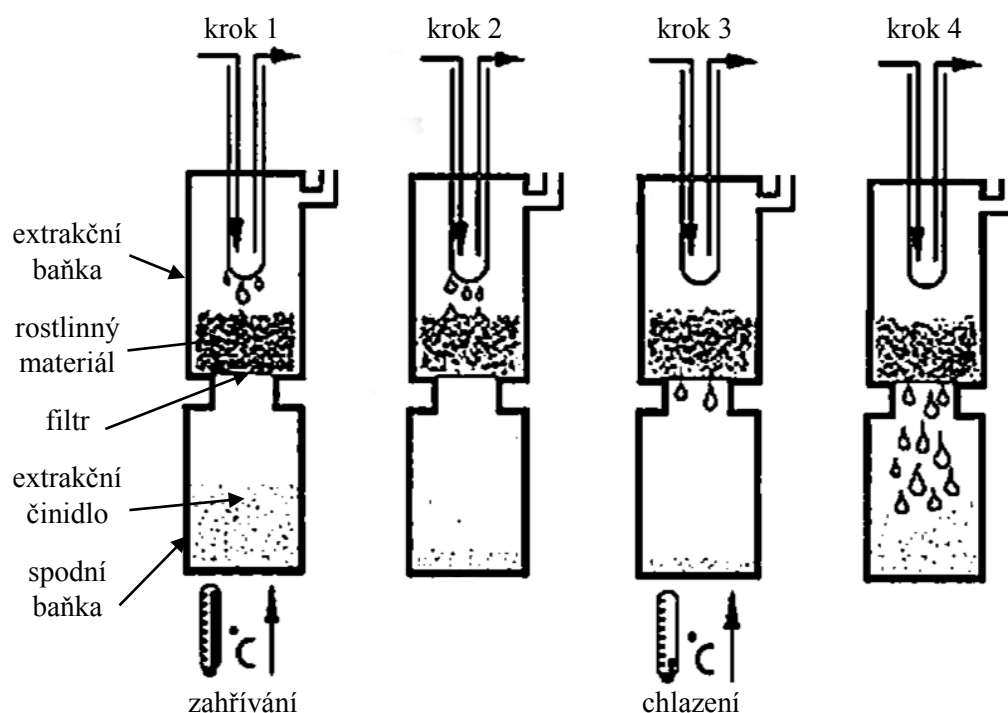
Tabulka VII: Podmínky extrakce.

vzorek číslo	rozpouštědlo	podmínky extrakce	celková doba extrakce	navážka [g]	výsledný objem [ml]
1	methanol	při laboratorní teplotě	45 min	0,253	5
2	methanol	při 50°C	45 min	0,252	5
3	methanol	10 min ultrazvuk při laboratorní teplotě, 35 min při laboratorní teplotě	45 min	0,250	5
4	methanol	při laboratorní teplotě	24 h	0,250	5
5	destilovaná voda	zalito vroucí vodou, 45 min při 50°C	45 min	0,250	5
6	ethylacetát	při laboratorní teplotě	45 min	0,252	4
7	ethylacetát	při 50°C	45 min	0,250	4
8	ethylacetát	10 min ultrazvuk při laboratorní teplotě, 35 min při laboratorní teplotě	45 min	0,252	4
9	ethylacetát	při laboratorní teplotě	24 h	0,251	4
10	methanol	FexIKA (viz kapitola 3.1.4.1)	40 min	4,995	90
11	ethylacetát	FexIKA (viz kapitola 3.1.4.1)	40 min	3,964	4

Zkumavky byly v průběhu extrakce uchovávány ve tmě a průběžně protřepávány. Po ukončení extrakčního procesu byly zkumavky centrifugovány při 20 °C a 3000 ot/min po dobu 10 min. Pak byly supernatanty odebrány do připravených vialek. Usazený rostlinný materiál byl následně dvakrát promýván 1 ml daného extrakčního činidla. Následovala opětovná centrifugace při stejných podmínkách, po níž byl supernatant z promývání přidán k supernatantu prvního extrakčního kroku. Methanolicke extrakty byly doplněny na objem 5 ml. Z ethylacetátových extraktů byl odpařen ethylacetát v proudě dusíku při 40 °C a následně byl vzorek rozpuštěn ve 4 ml methanolu. Vodný extrakt byl přefiltrován přes skleněný filtr a výsledný objem doplněn na 5 ml. Získané eluáty byly uchovávány v mrazáku.

3.1.4.1 Extrakce pomocí FexIKA

Princip FexIKA je založen na kapalně extrakci neboli FBE (fluidized bed extraction). Základní princip extrakce je znázorněn na obrázku 6, kde je celý postup rozdělen do 4 kroků. Při vlastní extrakci je magnetickou míchačkou míchané rozpouštědlo ve spodní baňce zahříváno na námi zadanou teplotu a vypařováno (krok 1). Páry rozpouštědla procházejí skrz filtr a vzorek až na chladič, kde kondenzují a skapávají na vzorek (krok 2). Kondenzát se postupně shromažďuje v extrakční baňce, zatímco ve spodní baňce ubývá rozpouštědlo. Jakmile uplyne příslušný čas, automaticky se přepne zahřívání na chlazení (krok 3). Klesající teplota ve spodní baňce vyvolá vznik podtlaku. Vzniklý podtlak způsobí, že rozpouštědlo s extrahovanými látkami proteče filtrem zpět do spodní baňky (krok 4). Po chlazení může opět začít další cyklus. Teplotu, počet a délku cyklů nastavuje uživatel.



Obrázek 6: Schéma jednoho cyklu extrakce ve fluidním loži.

Postup při extrahování pomocí FexIKA byl následující. Byl navážen mletý lyofilizovaný materiál réví Veltlínského zeleného (vzorek 10 a 11) podle tabulky VII. 100 ml rozpouštědla bylo nalito do spodní baňky a dle uvedeného schématu (obr. 6) byla prováděna extrakce s parametry: teplota lože 100 °C, 3 cykly, celková doba 40 min. Po ukončení všech cyklů byl ethylacetát odpařen na vakuové odparce a extrahované látky byly rozpuštěny v 4 ml methanolu. Získané eluáty byly uchovávány v mrazáku.

3.1.5 Adsorpční chromatografie

Pro pročištění a zakoncentrování vzorku byly otestovány kolonky SPE LiChrolut EN a SPE LiChrolut PR-18. Pro tyto testy byly použity extrakty vzorků 2, 5 a 7 (tab. VII). Tři SPE LiChrolut EN a tři SPE LiChrolut PR-18 byly aktivovány 2x 0,5 ml methanolu a následně promývány 0,5 ml a 300 ml destilované vody. Ze vzorku 2 byl odebrán objem 1,5 ml do dvou kádínek, zředěn destilovanou vodou na celkový objem 75 ml, tak aby množství methanolu v roztoku bylo 2 %. První zředěný extrakt byl použit na kolonku SPE LiChrolut EN a druhý na SPE LiChrolut PR-18. Stejným způsobem bylo postupováno u vzorků číslo 5 a 7. Následně byly SPE kolonky vysušeny a sorbované látky byly z nich vymyty 3x 0,5 ml methanolu. Objem promytého methanolu byl následně doplněn na 1,5 ml. Získané eluáty byly uchovávány v mrazáku.

3.1.6 Dimerizace resveratrolu chloridem železitým

Roztok resveratrolu byl smíchán s roztokem chloridu železitého na celkový objem 1 ml podle tabulky VIII, promíchán a nechal se reagovat po dobu 24 h při laboratorní teplotě.

Tabulka VIII: Dimerizace resveratrolu.

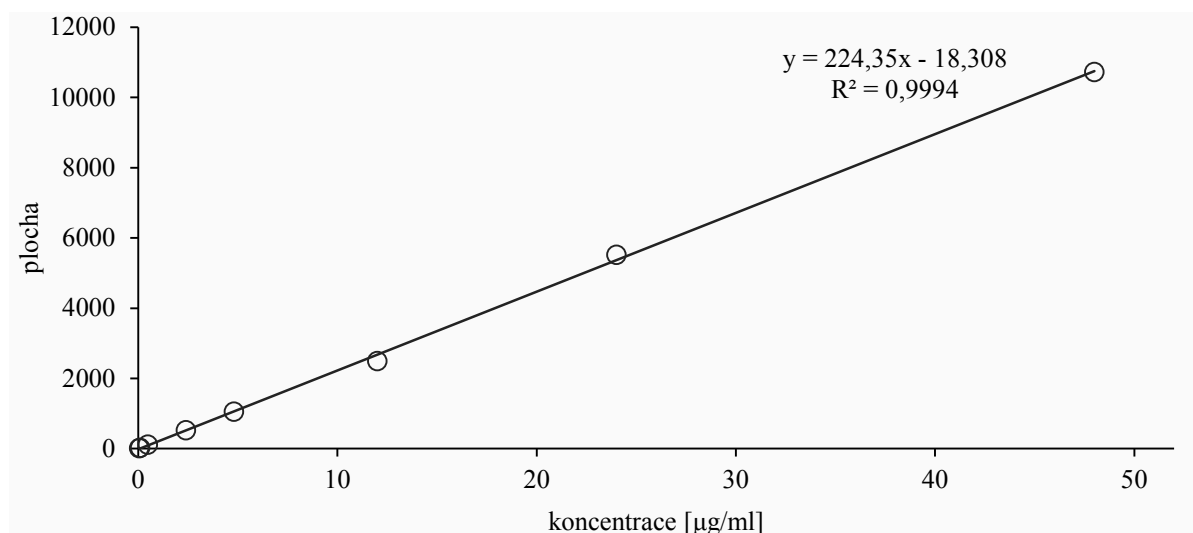
vzorek	objem resveratrolu (c = 20 mg/ml) [μl]	methanol [μl]	objem FeCl ₃ (c = 49,56 mg/ml) [μl]	voda [μl]	prostředí
1	5	495	2	498	tma
2	5	495	2	498	světlo
3	5	495	4	496	tma
4	5	495	4	496	světlo
5	5	495	1	499	tma
6	5	495	1	499	světlo

Po ukončení reakce byl roztok, v němž probíhala reakce, kvantitativně převeden do kádinky, zředěn na objem 25 ml tak, aby množství methanolu v roztoku bylo 2 %. Takto zředěný roztok byl pročištěn a zkoncentrován na připravených kolonkách. Aby bylo možné stanovit produkty reakce pomocí HPLC, bylo nezbytné reakční médium pročistit od železa. Byly použity pouze kolony SPE LiChrolut PR-18, protože byly výhodnější. Jejich aktivace probíhala stejně, jako bylo uvedeno výše v kapitole 3.1.5. Po adsorpci požadovaných látek na povrch náplně kolony následovala jejich eluce promýváním kolonky 3x 0,5 ml methanolu. Objem promytého methanolu byl následně doplněn na 1,5 ml. Získané eluáty byly uchovávány v mrazáku.

4 Výsledky

4.1 Kalibrace

Na obrázku 7 je uvedena kalibrační přímka získaná proměřením roztoků standardu *E*-resveratrolu. Tato kalibrace byla použita ke stanovení obsahu *E*-resveratrolu a obsahu *E*- ϵ -viniferinu jako ekvivalentu *E*-resveratrolu.

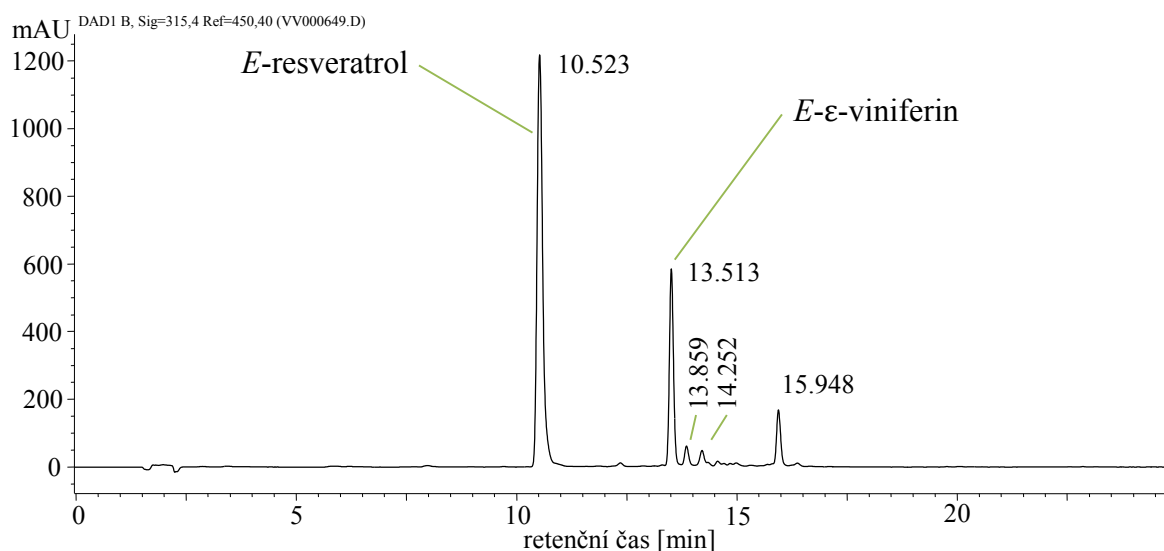


Obrázek 7: Kalibrace.

4.2 Naměřená data

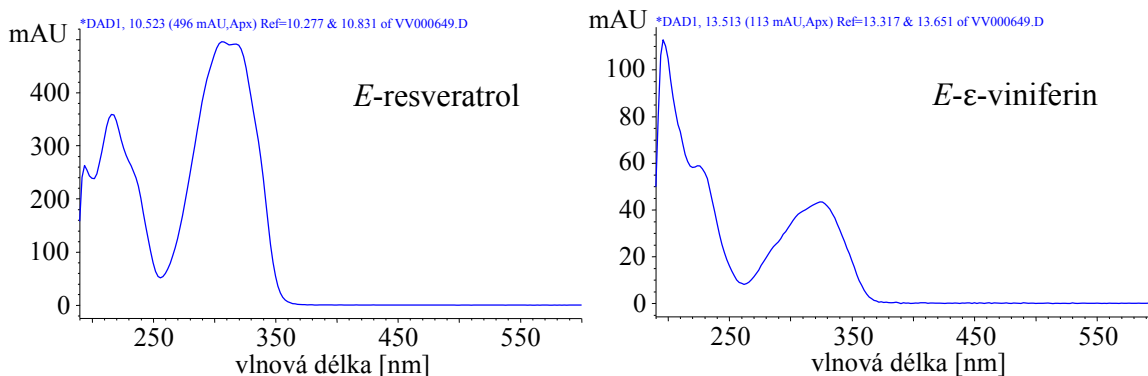
4.2.1 HPLC metoda

Obrázek 8 ukazuje reprezentativní chromatogram z HPLC.



Obrázek 8: HPLC chromatogram vzorku 7 (viz tab. VII).

Sloučeniny, jež jsou eluovány v retenčních časech 10,523 a 13,513 min, byly určeny jako *E*-resveratrol a *E*- ϵ -viniferin. Absorpční spektra těchto dvou sloučenin jsou uvedena v obrázku 9.

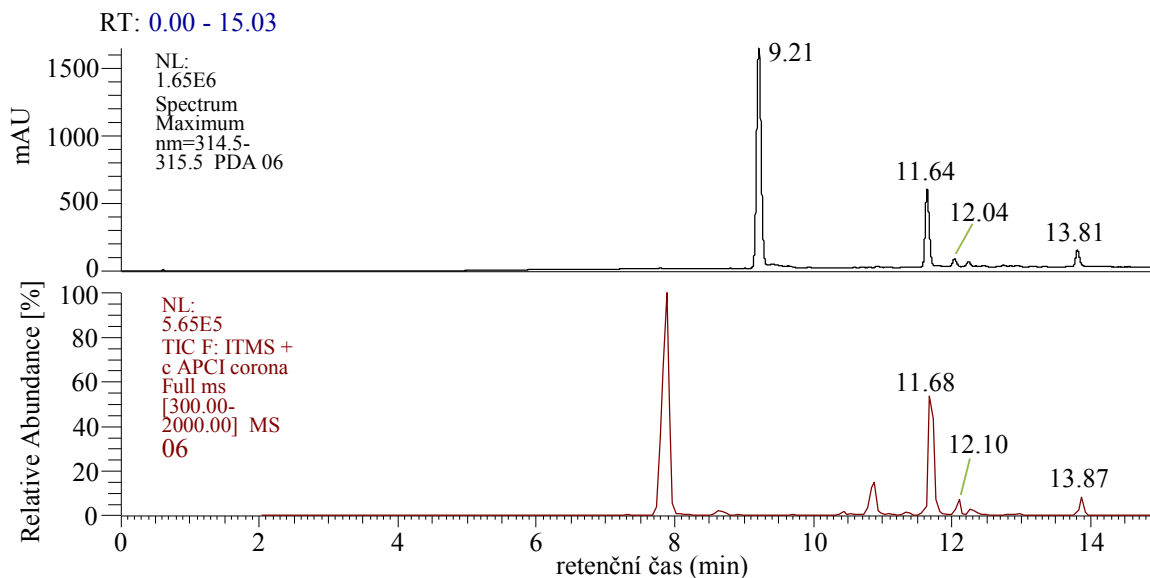


Obrázek 9: Absorpční spektra *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu.

E-Resveratrol vykazuje typické maximum v oblasti 310 – 320 nm (obr. 9). Druhé maximum charakteristické pro *E*- ϵ -viniferin je 323 nm.

4.2.2 LC-MS metoda

Obrázek 10 uvádí záznam z LC-MS.

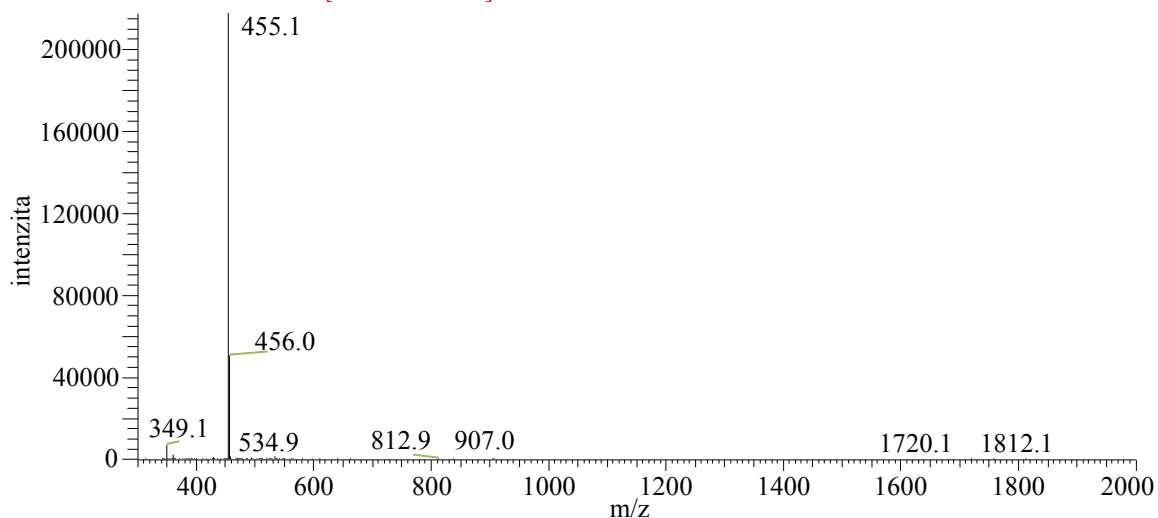


Obrázek 10: Záznam z LC-MS vzorku 7 (viz tab. VII).

Na obrázku 10 je záznam LC-MS nahoře DAD (315 nm) a dolní je záznam celkového iontového proudu (TIC, „fullscan“). Vrcholy s vyznačenými retenčními časy odpovídají sloučeninám na bázi resveratrolu. Vrchol sloučeniny s retenčním časem 9,21 min v DAD odpovídá *E*-resveratrolu. Vrchol sloučeniny s retenčním časem 12,10 min v TIC udával

v pozitivním módu APCI hodnotu m/z 681 ($[M+H]^+$) a s retenčním časem 13,87 min v TIC udával v pozitivním módu APCI hodnotu m/z 907 ($[M+H]^+$). Jedná se pravděpodobně o trimer a tetramer *E*-resveratrolu. Hmotnostní spektrum vrcholu sloučeniny s retenčním časem 11,68 min v TIC odpovídá *E*- ϵ -viniferinu a je znázorněno na obrázku 11.

06 #651 RT: 11.68 AV: 1 NL: 2.17E5
F: ITMS + c APCI corona Full ms [300.00-2000.00]

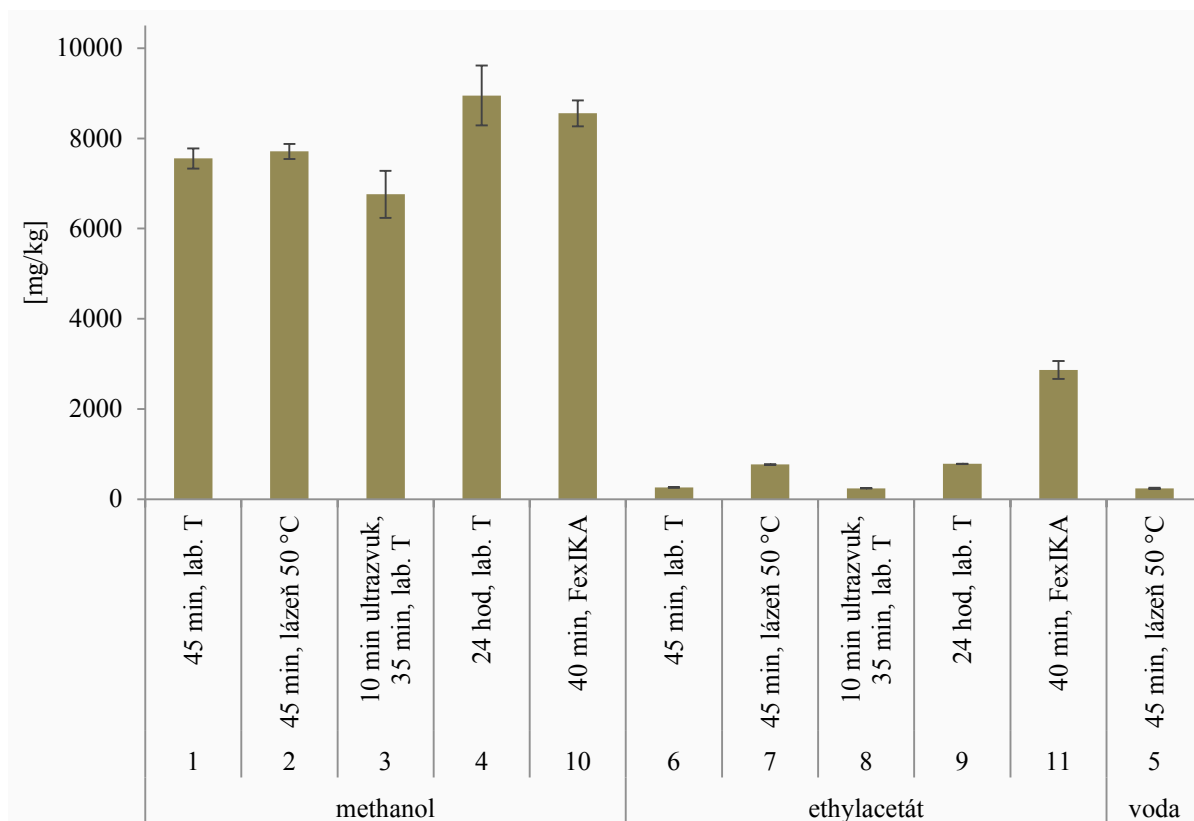


Obrázek 11: Hmotnostní spektrum vrcholu s retenčním časem 11,68 min v TIC.

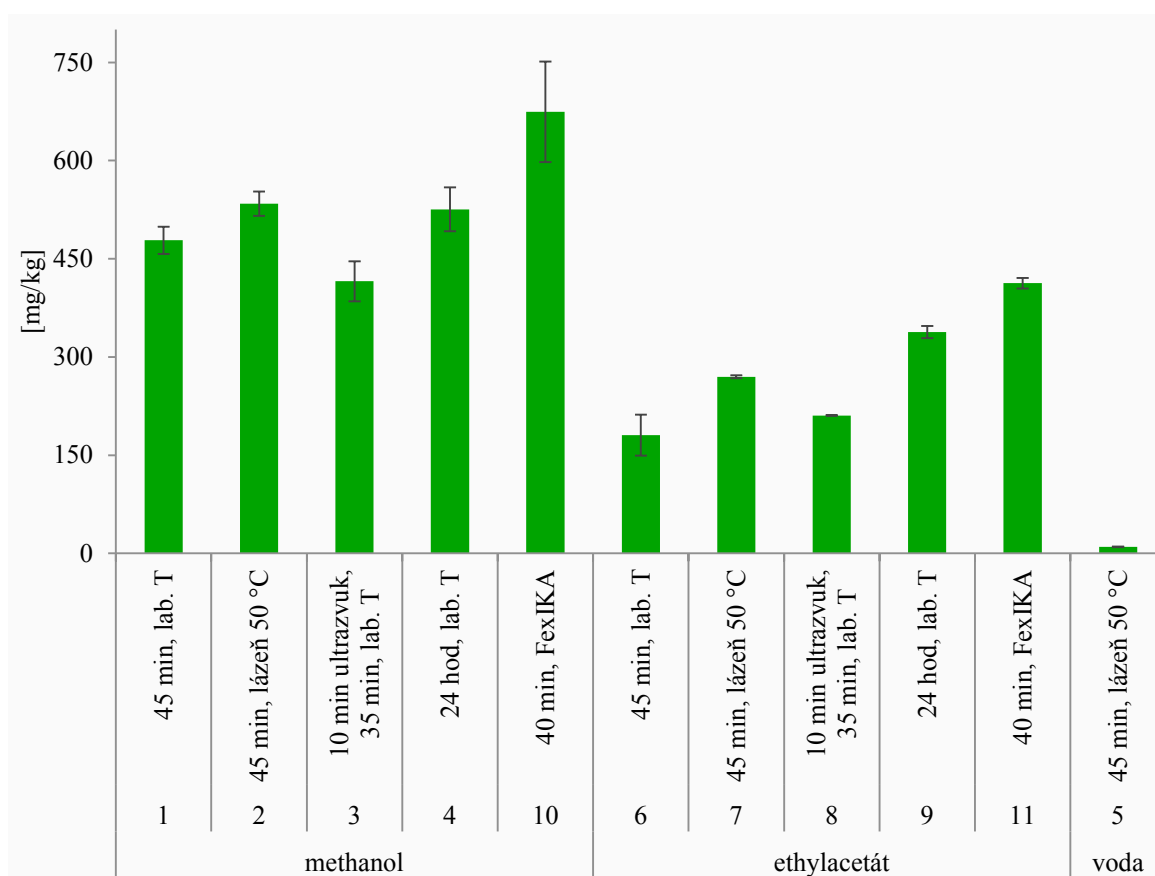
Nejvýznamnější vrchol „base peak“ v tomto spektru je molekulární pík s hodnotou m/z 455 ($[M+H]^+$) a je typický pro dimery, zejména viniferiny. Obrázek 11 ukazuje i nejvýznamnější fragment s hodnotou m/z 349 ($[M+H]^+$).

4.2.3 Porovnání extrakčních metod

Následující obrázky ukazují porovnání extrakční účinnosti pro *E*-resveratrol (obr. 12) a *E*- ϵ -viniferin (obr. 13). Čísla (1-11), uvedená u podmínek extrakce, odkazují na čísla vzorků s bližšími informacemi popsány v tabulce VII.



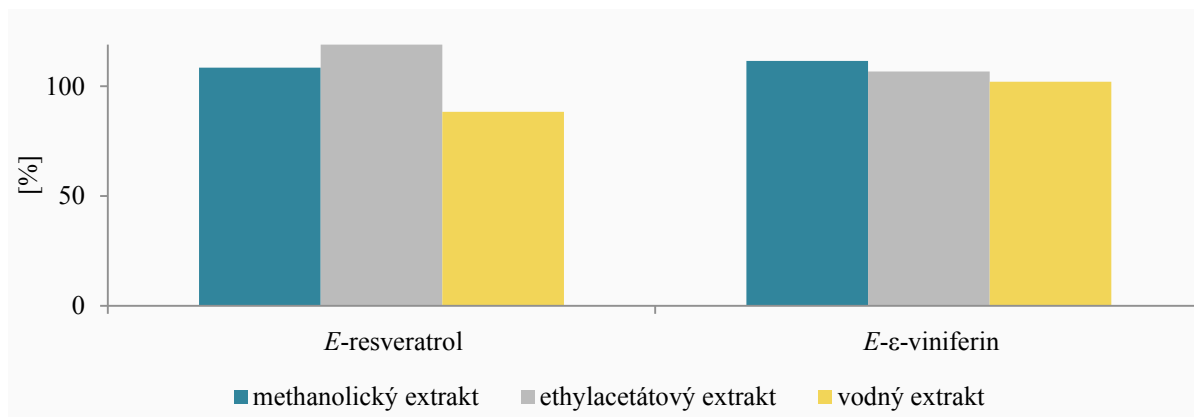
Obrázek 12: Množství *E*-resveratrolu získaného vybranými metodami.



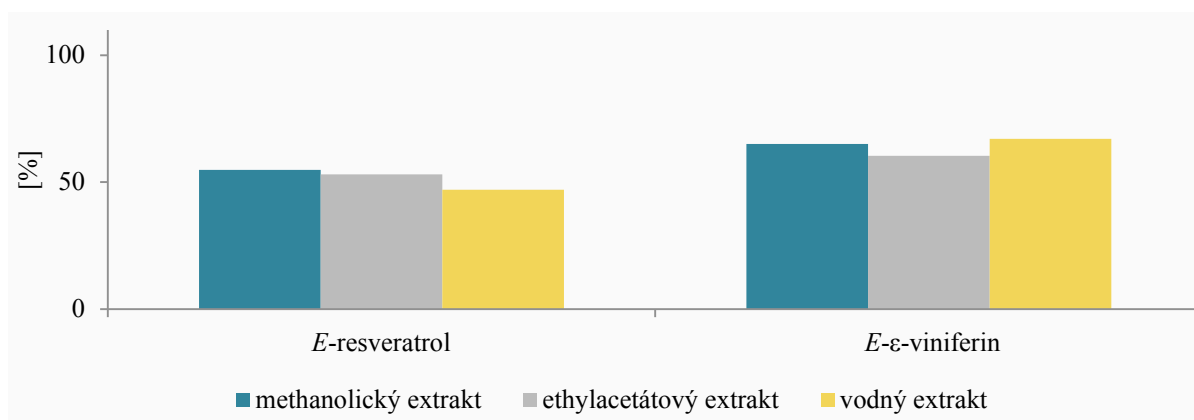
Obrázek 13: Množství *E*-ε-viniferinu získaného vybranými metodami.

Na obrázku 12 a 13 vidíme, že nejefektivnější metodou pro extrakci *E-ε-viniferinu* je extrakce ve fluidním loži. Statistické porovnání účinnosti mezi vzorky 10 a 4, 4 a 2, 3 a 4 prokázalo, že rozdíly jsou statisticky významné a nejsou rovnocenné, a to jak u *E-resveratrolu* (obr. 12), tak *E-ε-viniferinu* (obr. 13).

Obrázek 14 a 15 znázorňuje efektivnost čištění otestovaných kolonek SPE LiChrolut RP-18 a SPE LiChrolut SPE EN.



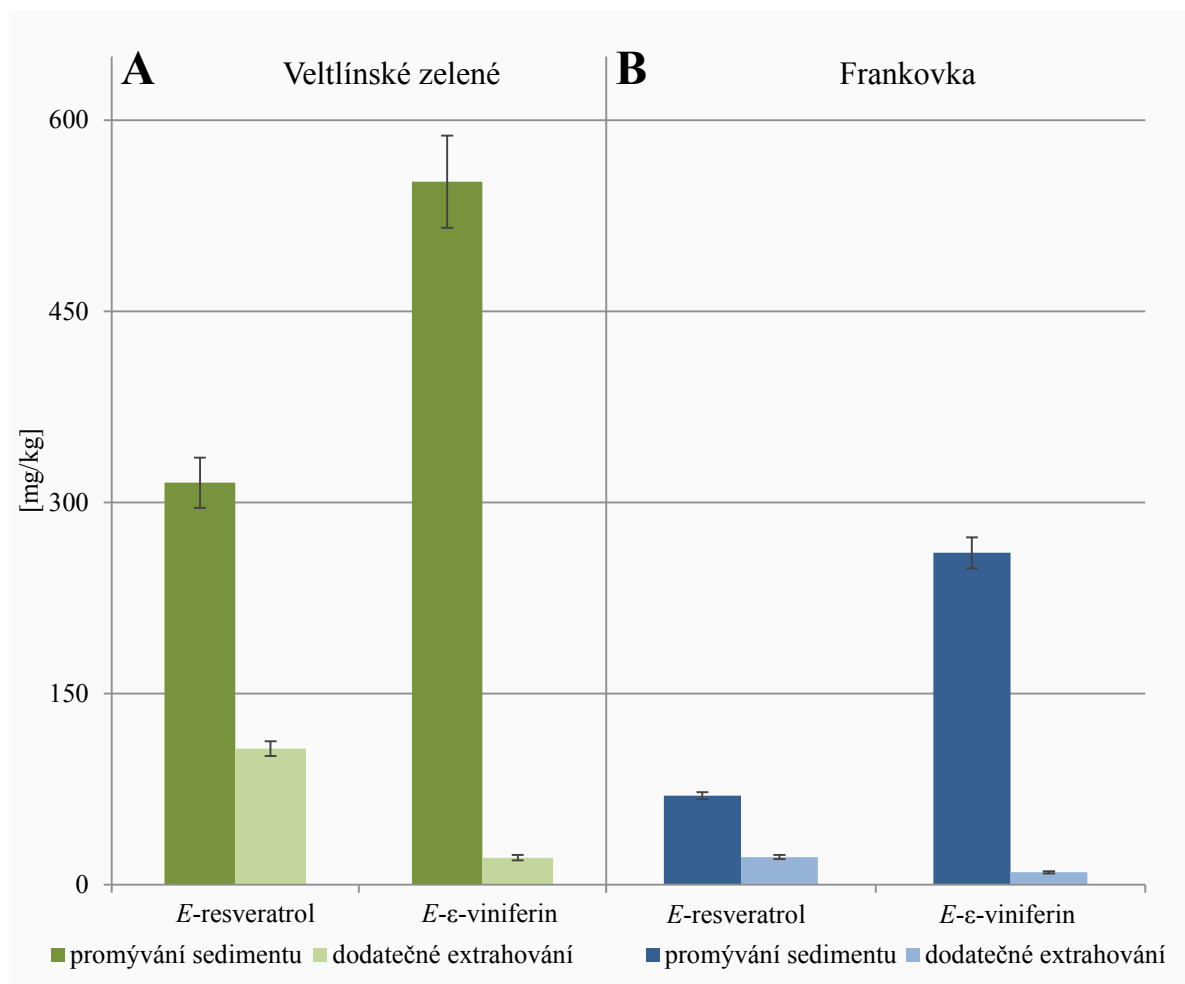
Obrázek 14: Výtěžnost z SPE LiChrolut RP-18.



Obrázek 15: Výtěžnost z SPE LiChrolut EN.

Výsledky ukazují (obr. 14 a 15), že kolonky LiChrolut RP-18 dokáží zachytit prakticky veškerý *E-resveratrol* a *E-ε-viniferin* a že kolonky LiChrolut EN nejsou tak efektivní pro *E-resveratrol*, ani pro *E-ε-viniferin*.

Obrázek 16 uvádí porovnání množství *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu mezi kultivary *V. vinifera* Veltlínského zeleného (část A) a Frankovky (část B). V obrázku 16 je též uvedeno množství těchto látek získaných dodatečnou extrakcí, jež odpovídá množství *E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu zbylého v rostlinném materiálu po 1. extrakci a následném promytí. Extrakční proces (promývání sedimentu a dodatečného promývání) byl stejný jako u vzorku 9 (tab. VII).

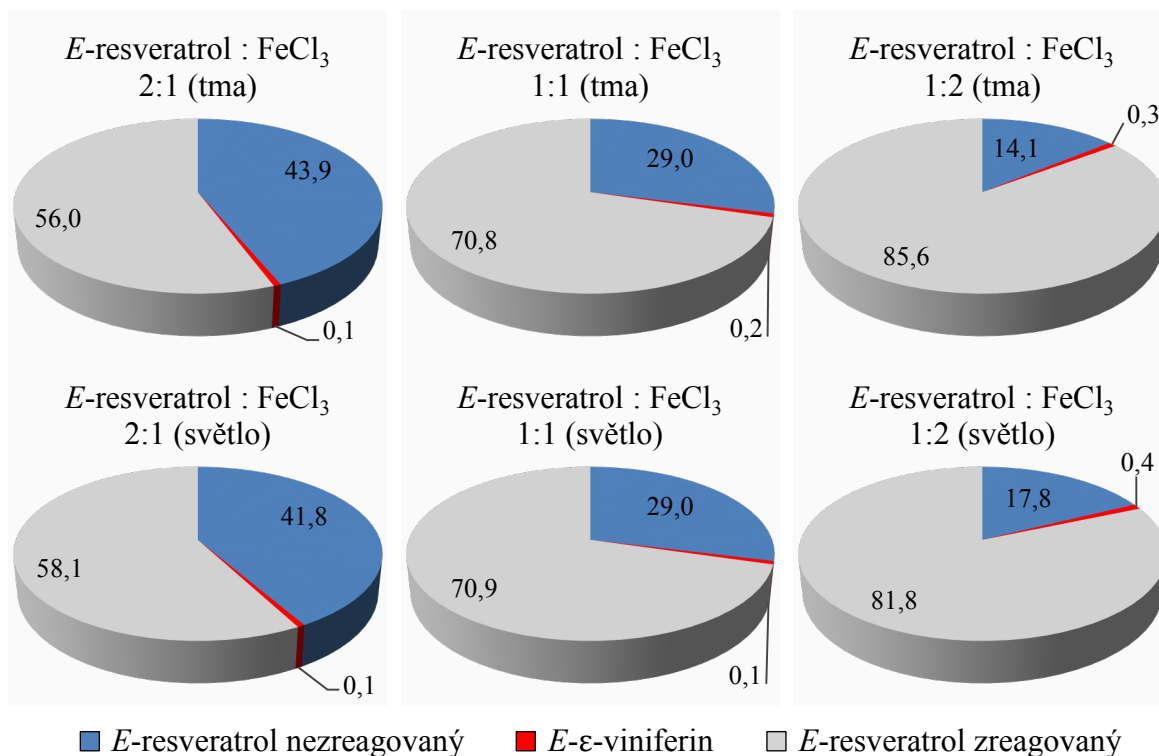


Obrázek 16: Porovnání obsahu resveratrolu v réví Veltlínského zeleného a Frankovky.

Z výsledků (obr. 16) vyplývá, že réví kultivaru Veltlínské zelené (bílá odrůda) je vhodnější zdroj stilbenů (*E*-resveratrolu a *E*- ϵ -viniferinu) než réví kultivaru Frankovka (modrá odrůda).

4.2.4 Dimerizace

V obrázku 17 je uvedena dimerizace resveratrolu chloridem železitým v různých poměrech. Dále je zde uvedeno procentuální zastoupení nezreagovaného *E*-resveratrolu, *E*-resveratrolu přeměněného na komplexní směs produktů (*E*-resveratrol zreagovaný) a vzniklého *E*- ϵ -viniferinu.



Obrázek 17: Dimerizace *E*-resveratrolu chloridem železitým.

Jak je patrné z obrázku 17, příprava *E*- ϵ -viniferinu dimerizací *E*-resveratrolu za pomoci chloridu železitého není efektivní. Vznikající množství *E*- ϵ -viniferinu je možné zvýšit zvýšením zastoupení chloridu železitého v poměru k *E*-resveratrolu. Větší zastoupením chloridu železitého v reakčním médiu způsobí i výraznější přeměnu *E*-resveratrolu na další produkty.

5 Diskuze výsledků

E-resveratrol v réví byl určen na základě porovnání naměřených dat v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2 se standardem (Sigma-Aldrich). *E*- ϵ -viniferin byl určen porovnáním naměřených dat s literaturou. V případě hmotnostních spekter udává literatura ^(25, 49, 62-65) v $[M+H]^+$ -fragmentační vzor *E*- ϵ -viniferinu: **453**, 435, 359, **347**, 333, 265, 253 (tučně zvýrazněné fragmenty jsou shodné s naměřenými daty). Nejvýznamější vrchol na obrázku 11, odpovídající 455 m/z , je, podle této literatury, typický pro dimery a to konkrétně parthenocissin A, quadrangularin A, ϵ -, δ - a ω -viniferin (viniferiny v obou izomerních formách). Jako určující je v tomto případě fragment 349 m/z v $[M+H]^+$. Tento fragment je nejvýznamnější pro *E*- ϵ -viniferin na rozdíl třeba od *E*- δ -viniferinu, který má nejvýznamnější fragment 369 $[M+H]^+$. Dalším faktorem určující tento dimer jako *E*- ϵ -viniferin je skutečnost, že *E*- ϵ -viniferin je druhý nejzastoupenější stilben v réví, dokonce v mnohých kultivarech převyšuje samotný resveratrol. Neopomenutelnou skutečností je též, že v réví se nevyskytuje *Z*-resveratrol. Z tohoto hlediska nelze předpokládat, že by se vyskytovaly dimery obsahující ve své struktuře *cis* konformaci ve významném zastoupení ^(21, 65, 66).

Přesnou strukturu trimeru a tetrameru *E*-resveratrolu se nepodařilo určit. Trimer by mohl být např. ampelopsin C či *E-trans*-miyabenol C a tetramer např. hopeaphenol, isohopeaphenol, vitisin A nebo *E*-vitisin B. Všechny tyto zmíněné trimery a tetramery byly nalezeny v *V. vinifera* ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ a lze se proto domnívat, že některý z nich by mohl být neidentifikovanou sloučeninou.

Réví je bohaté na resveratrol a jeho deriváty. Tyto sloučeniny mají významné biologické účinky na zdraví. Přesto je však každoročně z vinice odstraňováno prořezáváním a je buďto na vinici ponecháno, spáleno, nebo zkompostováno. Nicméně tento nevyužitý odpadní materiál je potencionálním zdrojem cenných sloučenin ^(25-27, 32, 48, 66). Vhodnost réví jako zdroje resveratrolu a jeho oligomerů stilbenů je podtržena skutečností, že réví může obsahovat až několikanásobné množství resveratrolu než bobule či listy ^(23, 24). V této práci byly zkoumány metody využití tohoto odpadního materiálu coby zdroje stilbenů zejména *E*- ϵ -viniferinu. Různé metody extrakce vycházely z rozpouštědel: methanol, ethylacetát a voda. Voda, nejpolárnější ze zkoumaných rozpouštědel, se projevila jako nejméně vhodná pro extrakci. Methanol se vykazuje svou schopností nejlépe extrahovat stilbeny (*E*-resveratrol a *E*- ϵ -viniferin) mezi uvedenými rozpouštědly. Jeho nevýhoda spočívá ve skutečnosti, že spolu s chtěnými stilbeny vyextrahuje i další polární látky. Ethylacetát nedokáže extrahovat velké množství *E*-resveratrolu, zato dokáže extrahovat významné množství *E*- ϵ -viniferinu. Mezi klady ethylacetátu lze uvést např. jeho fyzikální vlastnost nerozpouštět velké množství

polárních látek a snadnou odstranitelnost odpařením spolu s možností rozpustit získaný *E-ε-viniferin* v dalším rozpouštědle. Pro extrakci *E-ε-viniferinu* (dimerů resveratrolu) ukázaly výsledky jako nejúčinnější extrakci za pomoci FexIKA, která je popsána u vzorků 10 a 11 (tab. VII). Druhou nejúčinnější metodou byla extrakce po dobu 24 h při laboratorní teplotě a třetí extrakce ve vodní lázni při 50 °C po dobu 45 min. Účinnost zbylých 2 metod se lišila mezi *E-resveratrole* a *E-ε-viniferinem*. Rozdíly vyextrahovaného množství *E-resveratrolu* a *E-ε-viniferinu* pomocí ultrazvuku by mohly být způsobeny rozdíly mezi polaritou analytu a polaritou rozpouštědel. Tento předpoklad by mohl podporovat fakt, že množství vyextrahovaného *E-ε-viniferinu* ve vzorku 8 (10 min ultrazvuk, 35 min při laboratorní teplotě) je větší než ve vzorku 6 (45 min při laboratorní teplotě). Pro výběr nejvhodnějších podmínek je nutné soustředit se na co největší čistotu, vyextrahované množství a nenáročnost vlastní extrakce. Čistoty lze dosáhnout použitím ethylacetátu. S ohledem na vyextrahované množství představují extrakce ve fluidním loži a extrakce po dobu 24 h dvě metody možného praktického využití. Použití extrakce ve fluidním loži v průmyslu se zdá být zbytečné vzhledem k porovnání získaného množství *E-ε-viniferinu* extrakce pomocí FexIKA (viz kapitola 3.1.4.1) s extrakcí po dobu 24 h při laboratorní teplotě (obr. 13). Největší předností extrakce po dobu 24 h oproti extrakci pomocí FexIKA je to, že není potřeba další speciální vybavení k vyextrahování přibližně stejného množství *E-ε-viniferinu*, je třeba jen prodloužit extrakční čas na 24 h. Z výše uvedených důvodů byla, jako nejvhodnější metoda, zvolena metoda použitá u vzorku 9 (extrakce ethylacetátem po dobu 24 h).

Obdobnou studii využití réví jako zdroj stilbenů (*E-resveratrolu* a *E-ε-viniferinu*) provedli Karacabey a Mazza ⁽⁶⁸⁾. Ti hledali optimalizaci extrakce stilbenů z réví pomocí proměnné koncentrace ethanolu a teploty. Závěrem určili 68 % vodný roztok ethanolu jako nejvhodnější rozpouštědlo *E-ε-viniferinu* a že narůstající teplota téměř lineárně zvyšuje extrahované množství.

Dalším podstatným zjištěním bylo, že skladování při pokojové teplotě má na réví významný vliv. Množství v réví přítomných stilbenů totiž roste, až dosáhne maxima (cca. 150 dní skladování). Nejznatelnější nárůst byl zaznamenán u kultivaru Pinot Noir, kde se množství přítomných stilbenů zvětšilo pětinašobně. Nejmarkantnější změny množství byly detekovány u *E-resveratrolu*, kdežto zastoupení *E-ε-viniferinu* se výrazně neměnilo. Takovýto efekt nenastal v mraženém, lyofilizovaném či mletém materiálu ⁽⁶⁵⁾.

Pro pročištění a zkoncentrování by mohl nalézt uplatnění sorbent užitý v SPE LiChrolut RP-18, jež má schopnost vázat prakticky všechny *E-resveratrol* a *E-ε-viniferin*, kdežto SPE LiChrolut EN jen cca polovinu.

Využití všech těchto poznatků by se dalo uplatnit k průmyslové produkci stilbenů a to i přesto, že byl zjištěn obsah *E-resveratrolu* i *E-ε-viniferinu* v réví révy vinné (kultivaru Cabernet Sauvignon) v nejmenším množství vzhledem k dalším rostlinám z rodu *Vitis*. Téměř dvojnásobné množství *E-ε-viniferinu* obsahují *Vitis amurensis*, *Vitis labrusca* a *Vitis riparia* ⁽²¹⁾. Potenciál réví révy vinné, coby zdroj stilbenů, je však nezměrný. Resveratrol a jeho oligomery stilbeny se využívají pro své pozitivní účinky na zdraví již nějakou dobu. Například v České republice jsou k dostání přípravky Evelor Resveratrol a A1 Resveratrol 800 RX obsahující *E-resveratrol*. Ze zahraničních lze uvést například: NeoCell Resveratrol Antioxidant, Nature's Way Resveratrol Synergistic Formula Vegetarian Vcaps a mnoho dalších ⁽⁶⁹⁾. Celá řada takovýchto přípravků na bázi resveratrolu je deklarována jako potravinové doplňky. Dávky resveratrolu v přípravcích jsou většinou 250 – 500 mg. Jejich čistě pozitivní vliv na lidské zdraví je však diskutabilní vzhledem k tomu, že nebylo provedeno mnoho studií sledujících vliv resveratrolu na lidské zdraví v dlouhodobém měřítku. Doposud v provedených studiích nebyly zjištěny žádné vážné vedlejší účinky, i když je resveratrol brán ve velkých dávkách. Avšak resveratrolové doplňky mohou interagovat spolu s některými léčivy a vyvolat tak nežádoucí efekt (např. s aspirinem při dlouhodobém užívání může zapříčinit krvácení v žaludku) ⁽⁷⁰⁾.

Tisíce kultivarů révy vinné jsou pěstovány na vinicích po celém světě za jediným účelem a to k produkci vína. Dle odhadů v roce 2008 mohly extrahované stilbeny z réví na celosvětových vinicích dosáhnout ekonomické hodnoty větší než \$30 miliard. Tento odhad je založen na předpokládaném obsahu stilbenů 2 – 5 g/kg suš. v réví a na tehdejší ceně, což dělalo \$2000 až \$3000 na hektar ⁽²⁷⁾. Novější odhady jsou menší \$300 - \$970 za kg resveratrolu podle původu a čistoty ⁽²⁵⁾.

Množství *E-resveratrolu* v červených vínech je obvykle větší než je tomu ve vínech bílých ⁽³⁾. Z toho by se mohlo předpokládat, že bude i množství stilbenů v réví modrých odrůd révy vinné vyšší nežli tomu je u odrůd bílých. Frankovka, jako modrá odrůda, by tedy měla obsahovat vyšší zastoupení stilbenů než je tomu u odrůdy Veltlínské zelené (obr. 16). Tento fakt je ale v rozporu s naměřenými daty a některými studiemi ^(65, 66), kde ne u všech bílých odrůd je obsah stilbenů v réví menší než je tomu u odrůd modrých. Bohatost červených vůči bílým vínům na *E-resveratrol* bude tedy zapříčiněna jen technologií výroby.

Napříč pracemi zaměřenými na obsah stilbenů v réví *V. vinifera* vynikal kultivar Pinot Noir svou bohatostí na stilbeny (zejména na *E-ε-viniferin*). Nejvyšší množství *E-resveratrolu* bylo v jednotlivých pracích stanoveno u kultivarů: Pinot Noir z francouzské oblasti Villenave-d'Ornon (1526 mg/kg suš.) ⁽⁶⁶⁾, Pinot Noir z Britské Kolumbie (3450 mg/kg suš.) ⁽²⁷⁾, Hasaine

sladki z Estonska (3200 mg/kg suš.) ⁽⁶⁴⁾, Pinot Noir z Čínské oblasti Yanling (1751,6 mg/kg č.h.) ⁽⁷¹⁾, Pinot Noir z kanadského Pentictonu (4250 mg/kg suš.) ⁽⁶⁸⁾, Gewürztraminer z Chile (4628 mg/kg suš.) ⁽²⁵⁾, Mandilaria z řeckého ostrova Santorini (266 mg/kg suš.) ⁽⁷²⁾. A s *E*-resveratrolem byl stanoven rovněž jeho dimer *E*- ϵ -viniferin. Tento dimer nebyl stanován ve všech pracích. Nejvyšší množství *E*- ϵ -viniferinu bylo zaznamenáno v réví kultivarů: Pinot Noir z francouzské oblasti Villenave-d'Ornon (3737 mg/kg suš.) ⁽⁶⁶⁾, Pinot Noir z Britské Kolumbie (1300 mg/kg suš.) ⁽²⁷⁾, Hasaine sladki z Estonska (1700 mg/kg suš.) ⁽⁶⁴⁾, Pinot Noir z kanadského Pentictonu (2030 mg/kg suš.) ⁽⁶⁸⁾, Gewürztraminer z Chile (744 mg/kg suš.) ⁽²⁵⁾, Athiri z řeckého ostrova Santorini (499 mg/kg suš.) ⁽⁷²⁾.

Kultivar Veltlínské zelené původem z jižní Moravy má, ve srovnání s výše uvedenými kultivary, až 2x vyšší obsah *E*-resveratrolu (6760 – 8949 mg/kg suš., methanolické extrakty, obr. 12) než je tomu třeba u zmíněného nejbohatšího kultivaru na stilbeny Pinot Noir. Na druhou stranu množství *E*- ϵ -viniferinu (415 – 674 mg/kg suš., methanolické extrakty, obr. 13) v něm obsažené je téměř 3x nižší. Pro srovnání byly zvoleny methanolické extrakty, které se pro porovnání obsahu jeví vhodnější, jelikož ve výše uvedených pracích používaly ke stanovení obsahu stilbenů methanol nebo ethanol. Jiné v Čechách pěstované kultivary obsahují 2,6 – 37,1 mg/kg č.h. *E*-resveratrolu ⁽²⁴⁾. Pro porovnání však nejsou ideální, neboť byl použit čerstvý rostlinný materiál.

Výše uvedené hodnoty množství *E*- ϵ -viniferinu a *E*-resveratrolu v réví vykazují významné rozdíly i u stejných kultivarů. Rozdíly lze interpretovat tak, že réva vinná bude tvořit tyto fytoalexiny podle geografické polohy (klimatu, intenzitě slunečního záření atd.), vinařské technologie, nebo stres působících faktorů během růstu. Například pěstování ve skleníku nebo na vinici má vliv na tvorbu *E*-resveratrolu a *E*-piceidu stejně tak jako způsob zavlažování ⁽⁷³⁾.

Dimerizace *E*-resveratrolu chloridem železitým byla provedena s cílem připravit *E*- ϵ -viniferin. Tato reakce v methanolu při pokojové teplotě poskytuje komplexní směs produktů na bázi resveratrolu a jen nepatrné zastoupení *E*- ϵ -viniferinu (obr. 17) bez ohledu na prostředí. K obdobnému závěru dospěla i Moravcová ⁽⁶⁰⁾. Naopak Wang a kol. ⁽⁵⁶⁾ uvedl, že za těchto podmínek dospěli k získání *E*- ϵ -viniferinu, z něhož dále syntetizovali amurensin H. Modifikaci Wangovy metody provedl Shingai a kol. ⁽⁷⁴⁾. Ten k resveratrolu (100 mg) v ethanolu (10 ml) přidal DPPH (345 mg) rozpuštěný v ethanolu (180 ml). Taková reakce mu za pokojové teploty poskytla také komplexní směs produktů o výtěžku 89 mg s největším zastoupením *E*- δ -viniferinu (25 mg). Jeho výsledky též uvádí, že Fe^{3+} katalyzovaná dimerizace reaveratrolu není efektivní reakcí a poskytuje komplexní směs produktů. Jako efektivní přípravu *E*- ϵ -viniferinu navrhl použití CuCl_2 namísto FeCl_3 .

6 Závěr

- pro extrakci dimerů je nejvhodnější extrakční činidlo ethylacetát ve srovnání s methanolem a vodou
- pro extrakci dimerů je nejvhodnější extrakce po dobu 24 h při laboratorní teplotě (macerace)
- pro čištění a zakoncentrování dimerů je vhodnější použít SPE LiChrolut RP-18 než SPE LiChrolut EN
- réví kultivaru Veltlínské zelené je vhodnější zdroj *E-ε*-viniferinu než réví Frankovky
- dimerizace *E*-resveratrolu chloridem železitým poskytuje komplexní směs produktů a jen nepatrné množství *E-ε*-viniferinu

7 Reference

1. MISHRA G., S. SRIVASTAVA a B.P. NAGORI. Pharmacological and therapeutic activity of *Cissus quadrangularis*: an overview. *International Journal of PharmTech Research*. 2010, **2**(2), 1298-1310.
2. TAKAOKA M.J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*. 1940, **3**, 1-16. (citováno z: Šmidrkal J. 2001 (3)).
3. ŠMIDRKAL J., V. FILIP, K. MELZUCH, I. HANZLÍKOVÁ, D. BUCKIOVÁ a B. KŘÍSA. Resveratrol. *Chemické listy*. 2001, **95**, 602-609.
4. 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), 8186-8191.
5. SOLEAS G.J., E.P. DIAMANDIS a D.M. GOLDBERG. Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone? *Clinical Biochemistry*. 1997, **30**(2), 91-113.
6. LANGCAKE P. a R.J. PRYCE. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*. 1977, **16**(8), 1193-1196.
7. LANGCAKE P. a R.J. PRYCE. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977, **33**(2), 151-152.
8. PEZET R., K. GINDRO, O. VIRET a H. RICHTER. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis VEA*. 2004, **43**(2), 145-148.
9. PRIVAT C., J.P. TELO, V. BERNARDES-GENISSON, A. VIEIRA, J.-P. SOUCHARD a F. NEPVEU. Antioxidant properties of *trans*- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(5), 1213-1217.
10. CHOI C.W., Y.H. CHOI, M.-R. CHA, D.S. YOO, B.T. KIM, G.H. 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**, 3448-3450.
11. SIEMANN E.H. a L.L. CREASY. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1992, **43**, 49-52. (citováno z: Šmidrkal J. 2001 (3)).
12. 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), 29-33.
13. JANG M., L. CAI, G.O. UDEANI, K.V. SLOWING, C.F. THOMAS, C.W.W. BEECHER, H.H.S. FONG, N.R. FARNSWORTH, A.D. KINGHORN, R.G. MEHTA, R.C. MOON a J.M. PEZZUTO. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997, **275**(5297), 218-220.
14. OSHIMA Y., K. NAMAOKA, A. KAMIJOU, S. MATSUOKA, M. NAKANO, K. TERAOKA a Y. OHIZUMI. Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes,

isolated from the oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). *Experientia*. 1995, **51**(1), 63-66.

15. BILLARD C., J.-C. IZARD, V. ROMAN, C. KERN, C. MATHIOT, F. MENTZ a J.-P. KOLB. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, ϵ -viniferin and vine-shots derived polyphenols (Vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*. 2002, **43**(10), 1991-2002.

16. PIVER B., F. BERTHOU, Y. DREANO a D. LUCAS. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sciences*. 2003, **73**(9), 1199-1213.

17. 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), 2598-2600.

18. HA D.T., H. KIM, P.T. THUONG, T.M. NGOC, I. LEE, N.D. HUNG a K. BAE. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009, **125**(2), 304-309.

19. 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), 2783-2840.

20. BAVARESCO L., F. MATTIVI, M. DE ROSSO a R. FLAMINI. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2012, **12**(13), 1366-1381.

21. PAWLUS A.D., R. SAHLI, J. BISSON, C. RIVIÈRE, J.-C. DELAUNAY, T. RICHARD, E. GOMÈS, L. BORDENAVE, P. WAFFO-TÉGUO a J.-M. MÉRILLON. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **61**(3), 501-511.

22. 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), 142-152.

23. BALÍK J., M. KYSELÁKOVÁ, N. VRCHOTOVÁ, J. TRÍSKA, M. KUMŠTA, J. VEVERKA, P. HÍČ, J. TOTUŠEK a D. LEFNEROVÁ. Relations between polyphenols content and antioxidative activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, **26**, S25-S32.

24. 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), 182-189.

25. 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*. 2011, **60**(4), 929-933.

26. 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 [cit. 20.2.2014]. Dostupné z: <http://precedings.nature.com/documents/636/version/1>.
27. 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), 335-340.
28. 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 $\times$ Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(10), 5364-5375.
29. LI X.-C. a D. FERREIRA. Stereoselective cyclization of stilbene derived carbocations. *Tetrahedron*. 2003, **59**(9), 1501-1507.
30. SONG T., B. ZHOU, G.-W. PENG, Q.-B. ZHANG, L.-Z. WU, Q. LIU a Y. WANG. Aerobic oxidative coupling of resveratrol and its analogues by visible light using mesoporous graphitic carbon nitride (mpg-C₃N₄) as a bioinspired catalyst. *Chemistry – A European Journal*. 2014, **20**(3), 678-682.
31. TAKAYA Y., K. TERASHIMA, J. ITO, Y.-H. HE, M. TATEOKA, N. YAMAGUCHI a M. NIWA. Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron*. 2005, **61**(43), 10285-10290.
32. 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**, 57-111.
33. SOTHEESWARAN S. a V. PASUPATHY. Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry*. 1993, **32**(5), 1083-1092.
34. BALA A.E.A., A. KOLLMANN, P.H. DUCROT, A. MAJIRA, L. KERHOAS, P. LEROUX, R. DELORME a J. EINHORN. *Cis* ϵ -viniferin: a new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. *Journal of Phytopathology*. 2000, **148**(1), 29-32.
35. COLIN D., A. LANCON, D. DELMAS, G. LIZARD, J. ABROSSINOW, E. KAHN, B. JANNIN a N. LATRUFFE. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie*. 2008, **90**(11–12), 1674-1684.
36. JEANDET P., R. BESSIS, M. SBAGHI a P. MEUNIER. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*. 1995, **143**(3), 135-139.
37. 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), 4405-4413.

38. TANAKA T., M. OHYAMA, K. MORIMOTO, F. ASAI a M. IINUMA. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochemistry*. 1998, **48**(7), 1241-1243.
39. TANAKA T., M. IINUMA a H. MURATA. Stilbene derivatives in the stem of *Parthenocissus quinquefolia*. *Phytochemistry*. 1998, **48**(6), 1045-1049.
40. CHOI Y.L., B.T. KIM a J.-N. HEO. Total synthesis of laetevirenol A. *The Journal of Organic Chemistry*. 2012, **77**(19), 8762-8767.
41. ADESANYA S.A., R. NIA, M.-T. MARTIN, N. BOUKAMCHA, A. MONTAGNAC a M. PAÍS. Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*. *Journal of Natural Products*. 1999, **62**(12), 1694-1695.
42. HUANG Y.-L., W.-J. TSAI, C.-C. SHEN a C.-C. CHEN. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *Journal of Natural Products*. 2005, **68**(2), 217-220.
43. 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), 2544-2549.
44. ILIYA I., Z. ALI, T. TANAKA, M. IINUMA, M. FURUSAWA, K.-I. NAKAYA, J. MURATA a D. DARNAEDI. Four new stilbene oligomers in the root of *Gnetum gnemon*. *Helvetica Chimica Acta*. 2002, **85**(8), 2538-2546.
45. MORIKAWA T., S. CHAIPECH, H. MATSUDA, M. HAMAO, 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), 832-840.
46. 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), 489-492.
47. SUBRAMANIAN R., P. SUBBRAMANIYAN a V. RAJ. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power. *SpringerPlus*. 2013, **2**(1), 28.
48. 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), 5459-5467.
49. 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), 5488-5492.
50. 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), 595-600.

51. ADRIAN M. a P. JEANDET. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia*. 2012, **83**(8), 1345-1350.
52. 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), 203-208.
53. BREUIL A.-C., M. ADRIAN, N. PIRIO, P. MEUNIER, R. BESSIS a P. JEANDET. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters*. 1998, **39**(7), 537-540.
54. CICHEWICZ R.H. a S.A. KOUZI. Biotransformation of resveratrol to piceid by *Bacillus cereus*. *Journal of Natural Products*. 1998, **61**(10), 1313-1314.
55. 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 C. *Tetrahedron*. 2002, **58**(36), 7201-7206.
56. 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), 817-820.
57. 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), 7259-7265.
58. SNYDER S.A., A. GOLLNER a M.I. CHIRIAC. Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis. *Nature*. 2011, **474**(7352), 461-466.
59. 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), 1969-1972.
60. MORAVCOVÁ L. *Fotochemické transformace resveratrolu a jeho analogů*. VŠCHT Praha, 2006. Diplomová práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství.
61. 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), 2773-2783.
62. MULINACCI N., M. INNOCENTI, A.R. SANTAMARIA, G. LA MARCA a G. PASQUA. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of stilbenoids in cell cultures of *Vitis vinifera* L., cv. Malvasia. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010, **24**(14), 2065-2073.
63. SZEWCZUK L.M., S.H. LEE, I.A. BLAIR a T.M. PENNING. Viniferin formation by COX-1: evidence for radical intermediates during co-oxidation of resveratrol. *Journal of Natural Products*. 2004, **68**(1), 36-42.
64. PÜSSA T., J. FLOREN, P. KULDKEPP a A. RAAL. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(20), 7488-7494.

65. 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), 256-263.
66. 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), 11392-11399.
67. PAWLUS A.D., E. CANTOS-VILLAR, T. RICHARD, J. BISSON, P. POUPARD, Y. PAPASTAMOULIS, J.-P. MONTI, P.-L. TEISSEDE, P. WAFFO-TÉGUO a J.-M. MÉRILLON. Chemical dereplication of wine stilbenoids using high performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1289**(0), 19-26.
68. KARACABEY E. a G. MAZZA. Optimization of solid–liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(15), 6318-6325.
69. ANONYMOUS. Resveratrol. *VitaCart* [online]. 2013 [cit. 20.3.2014]. Dostupné z: <http://www.vitacart.com/resveratrol.html>.
70. MADDOX T.M. Resveratrol supplements. *WebMD* [online]. 2012 [cit. 20.3.2014]. Dostupné z: <http://www.webmd.com/heart-disease/resveratrol-supplements>.
71. 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), 2846-2861.
72. ANASTASIADI M., H. PRATSINIS, D. KLETSAS, A.-L. SKALTSOUNIS a S.A. HAROUTOUNIAN. Grape stem extracts: polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 2012, **48**(2), 316-322.
73. TRÍSKA J., J. BALÍK, N. VRCHOTOVÁ a O. MIKEŠ. Influence of cultivation conditions relating to climatic change on the selected polyphenol content in grapevine plants. **In:** STOJANOV R., Z. ŽALUD, P. CUDLÍN, A. FARDA, O. URBAN a M. TRNKA. *Global Change and Resilience From Impacts to Responses*. Brno. Global Change Research Centre AS CR, v. v. i., 2013. 252-254. ISBN 978-80-904351-9-3.
74. SHINGAI Y., A. FUJIMOTO, M. NAKAMURA a T. MASUDA. Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from Fe-catalyzed oxidation of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(15), 8180-8186.

8 Seznam použitých zkratek

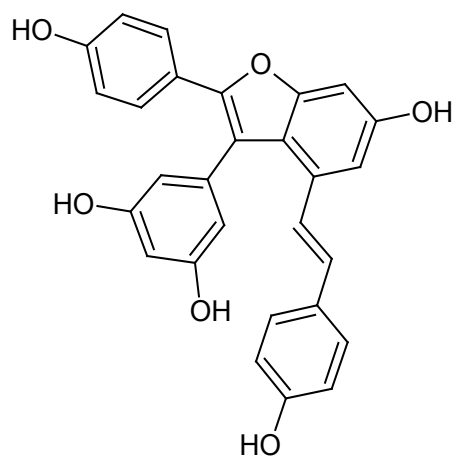
APCI	– atmospheric pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	– atmospheric pressure photo ionization – fotoionizace za atmosférického tlaku
AU	– jednotka absorbance
č.h.	– čerstvá hmotnost
DDQ	– 2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DMSO	– dimethylsulfoxid
DPPH	– 2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EPR	– elektronová paramagnetická rezonance
FBE	– extrakce ve fluidím loži
HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	– kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
NMR	– nukleární magnetická rezonance
ot/min	– otáčky za minutu
PDA	– photodiode array detector – detektor diodového pole
SPE	– extrakce tuhou fází
suš.	– sušina
syn.	– synonymum
TIC	– záznam celkového iontového proudu

9 Seznam příloh

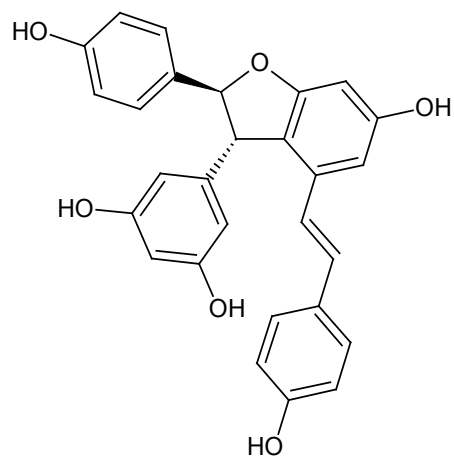
Číselně řazené	Abecedně řazené
1: amurensin H 38	13: ampelopsin A 39
2: <i>E</i> -ε-viniferin 38	14: ampelopsin B 39
3: <i>E</i> -ω-viniferin 38	15: ampelopsin D 39
4: heimiol A 38	34: ampelopsin F 41
5: <i>E</i> -δ-viniferin 38	41: amurensin A 42
6: gnetin C 38	1: amurensin H 38
7: <i>Z</i> -ε-viniferin 38	10: balanocarpol 39
8: <i>Z</i> -ω-viniferin 38	39: betulifol A 42
9: vitisinol B 39	48: betulifol B 43
10: balanocarpol 39	33: caraphenol B 41
11: vitisinol C 39	32: caraphenol C 41
12: vitisinol D 39	22: cyphostemmin A 40
13: ampelopsin A 39	37: cyphostemmin B 42
14: ampelopsin B 39	49: gnemonol G 43
15: ampelopsin D 39	50: gnetin A 43
16: isoampelopsin D 39	6: gnetin C 38
17: resformicol A 40	42: gnetin L 42
18: resformicol B 40	4: heimiol A 38
19: resformicol C 40	16: isoampelopsin D 39
20: pallidol 40	35: isoampelopsin F 42
21: restrytisol C 40	38: laetevirenol A 42
22: cyphostemmin A 40	31: leachinol F (7S) a G (7R) 41
23: vitisinol A 40	45: malibatol A 43
24: tricuspidatol A 40	46: malibatol B 43
25: restrytisol A 40	47: melanoxylin A 43
26: restrytisol B 40	20: pallidol 40
27: quadrangularin A 41	28: parthenocissin A 41
28: parthenocissin A 41	27: quadrangularin A 41
29: quadrangularin B 41	29: quadrangularin B 41
30: quadrangularin C 41	30: quadrangularin C 41
31: leachinol F (7S) a G (7R) 41	17: resformicol A 40
32: caraphenol C 41	18: resformicol B 40
33: caraphenol B 41	19: resformicol C 40
34: ampelopsin F 41	25: restrytisol A 40
35: isoampelopsin F 42	26: restrytisol B 40
36: vitisinol E 42	21: restrytisol C 40
37: cyphostemmin B 42	43: roxburgiol A 43
38: laetevirenol A 42	40: scirpusin A 42
39: betulifol A 42	24: tricuspidatol A 40
40: scirpusin A 42	5: <i>E</i> -δ-viniferin 38
41: amurensin A 42	2: <i>E</i> -ε-viniferin 38
42: gnetin L 42	7: <i>Z</i> -ε-viniferin 38
43: roxburgiol A 43	3: <i>E</i> -ω-viniferin 38
44: vitisinol G 43	8: <i>Z</i> -ω-viniferin 38
45: malibatol A 43	23: vitisinol A 40
46: malibatol B 43	9: vitisinol B 39
47: melanoxylin A 43	11: vitisinol C 39
48: betulifol B 43	12: vitisinol D 39
49: gnemonol G 43	36: vitisinol E 42
50: gnetin A 43	44: vitisinol G 43

10 Přílohy

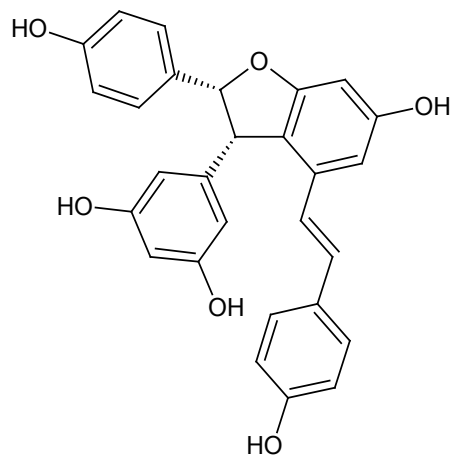
Vzorce dimerů resveratrolu



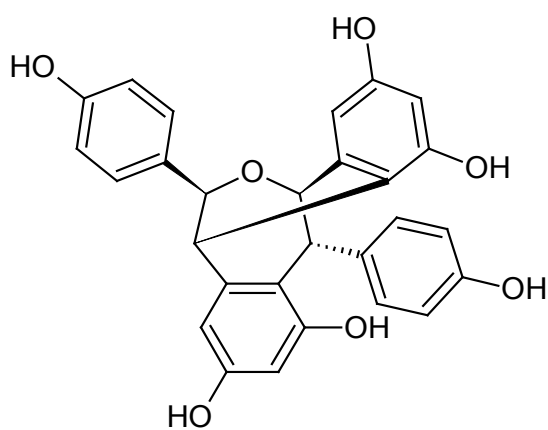
1: amurensin H



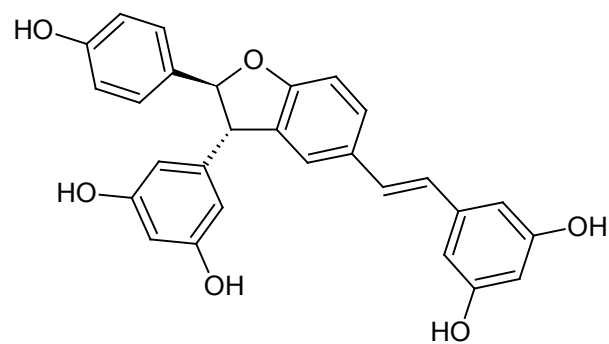
2: *E*-ε-viniferin



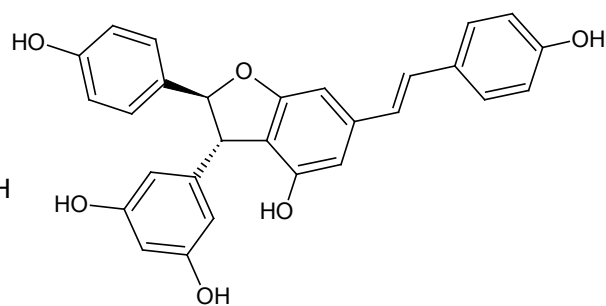
3: *E*-ω-viniferin



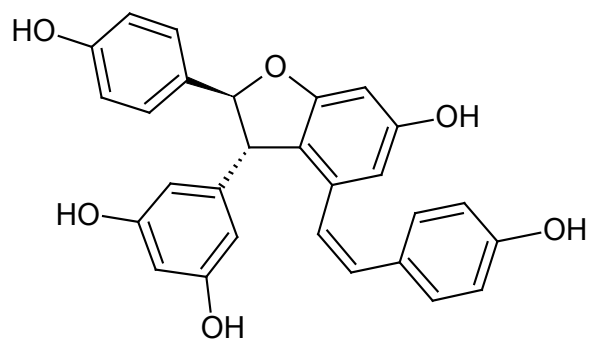
4: heimiol A



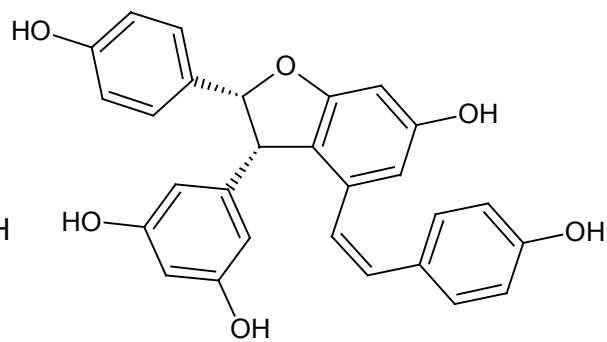
5: *E*-δ-viniferin



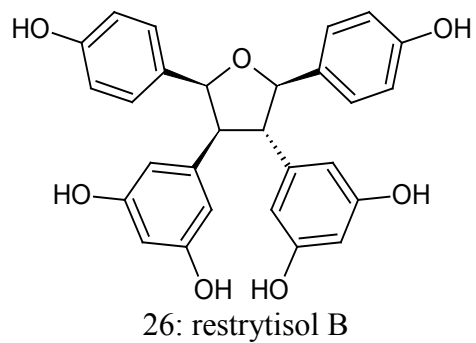
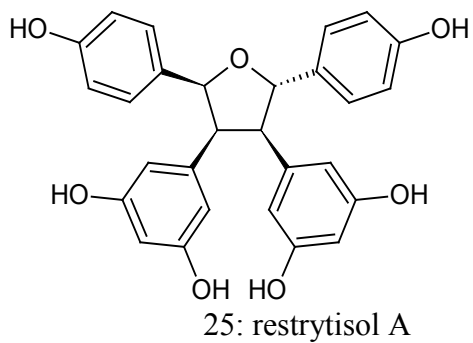
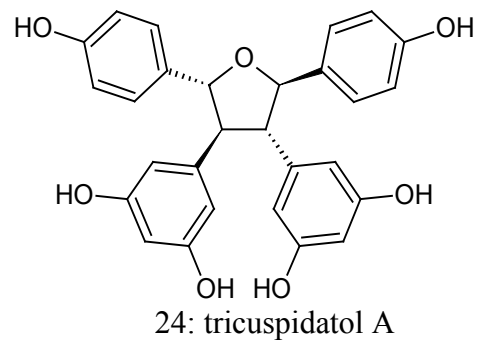
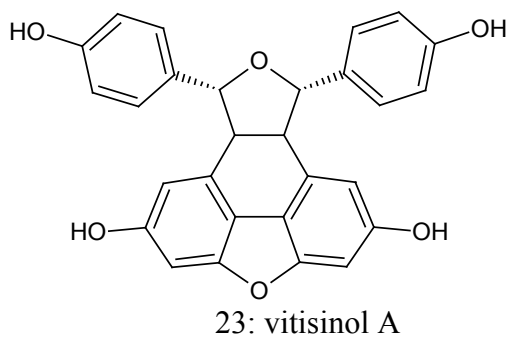
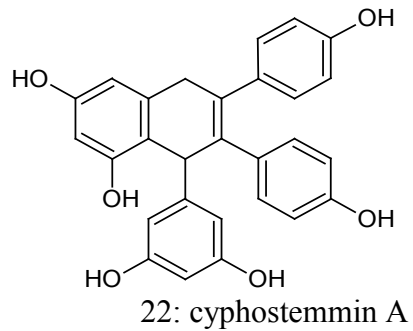
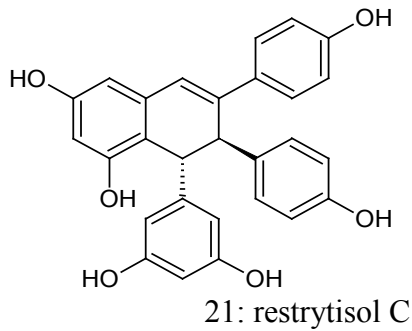
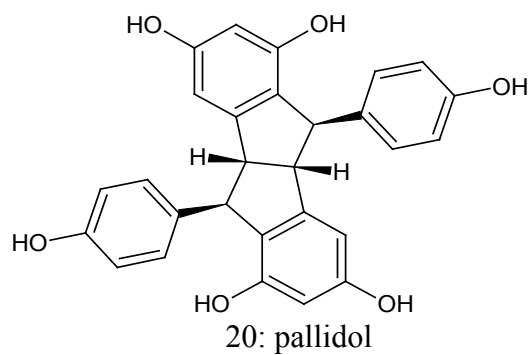
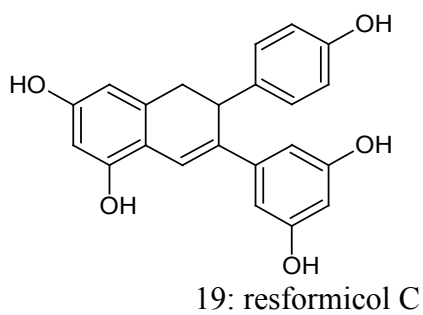
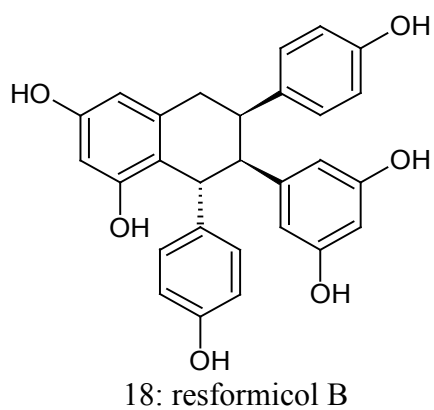
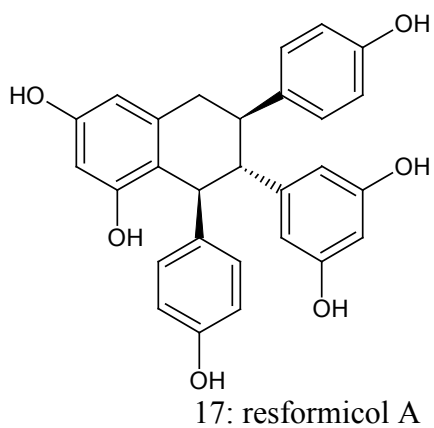
6: gnetin C

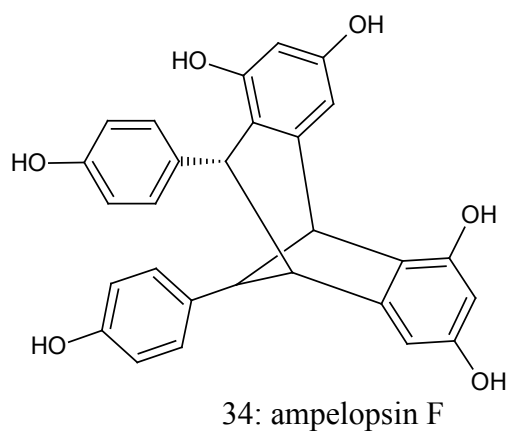
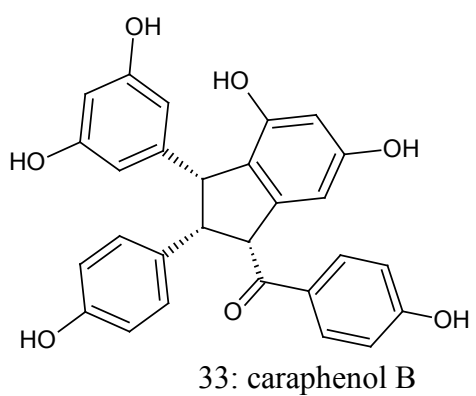
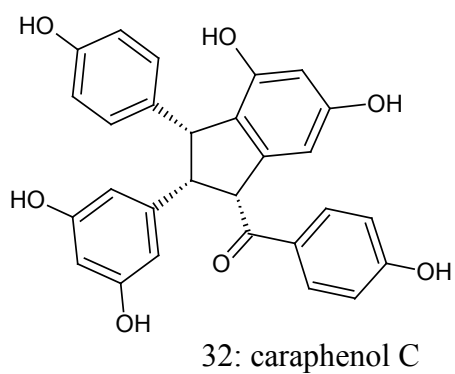
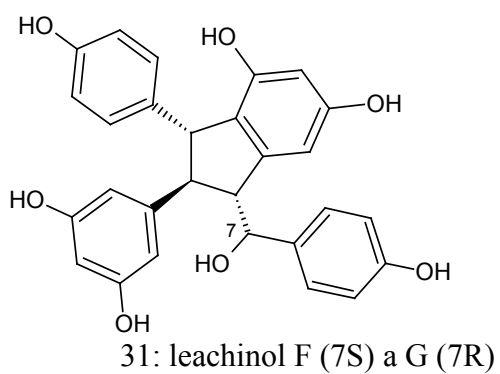
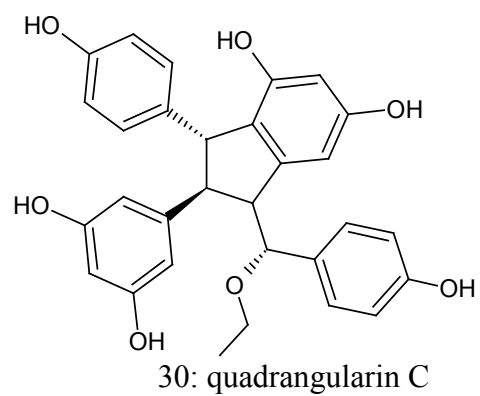
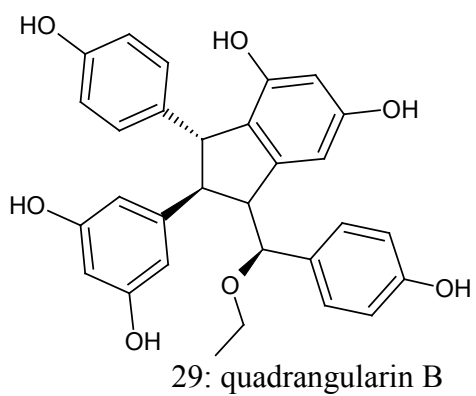
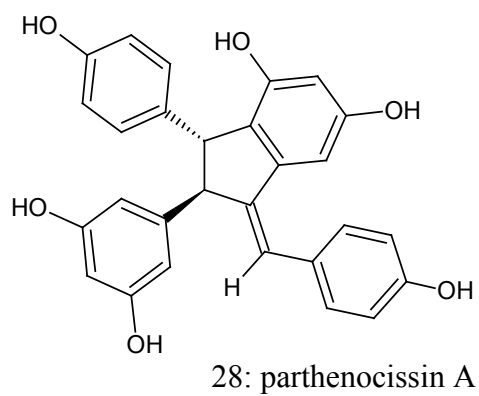
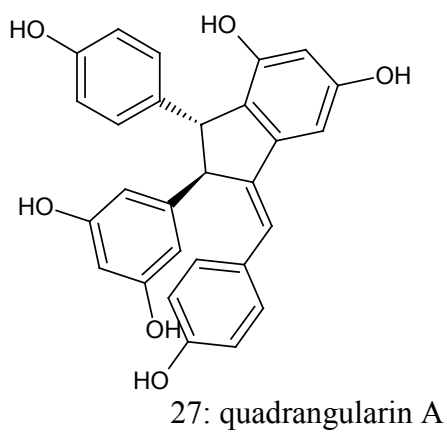


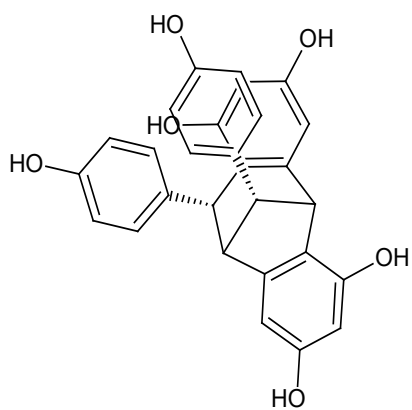
7: *Z*-ε-viniferin



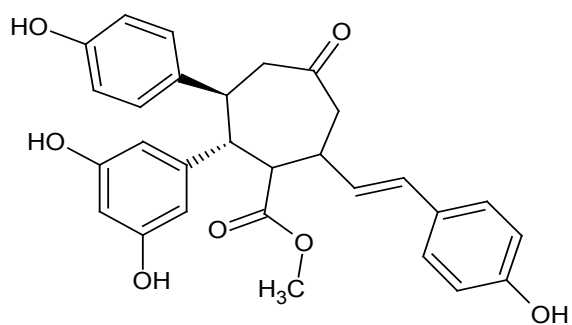
8: *Z*-ω-viniferin



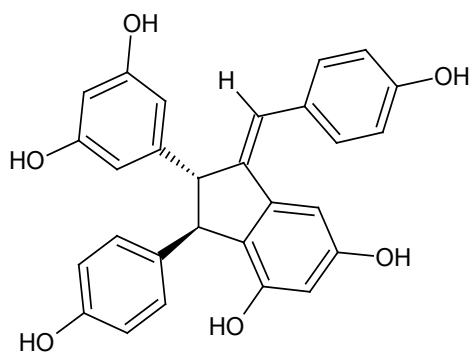




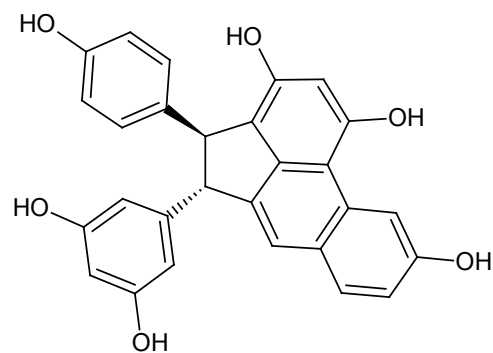
35: isoampelopsin F



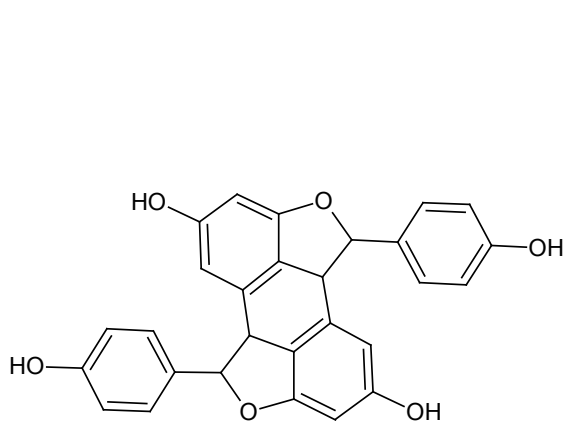
36: vitisinol E



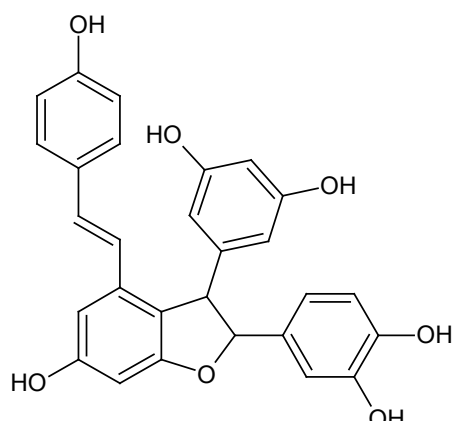
37: cyphostemmin B



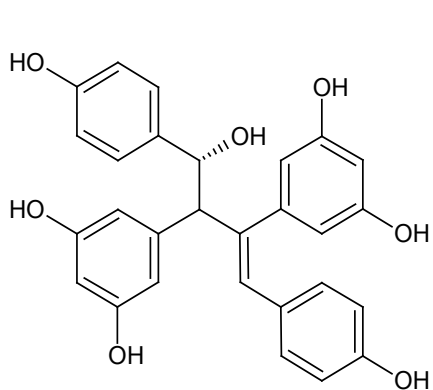
38: laetevirenol A



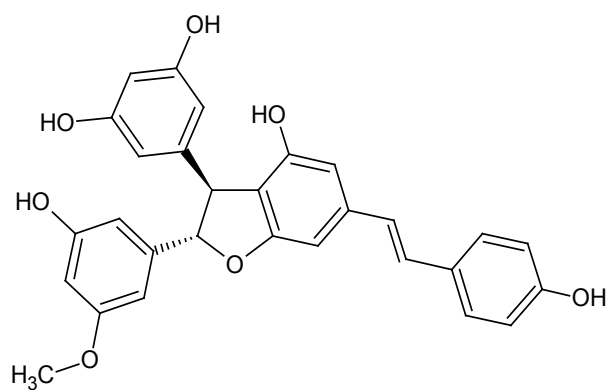
39: betulifol A



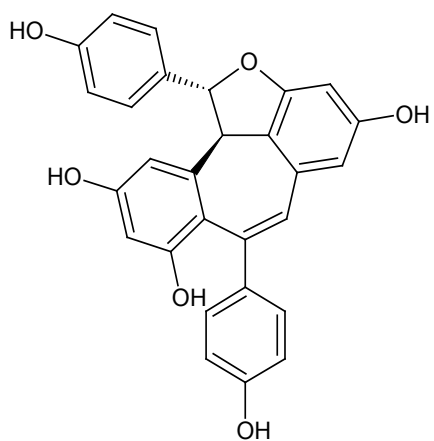
40: scirpusin A



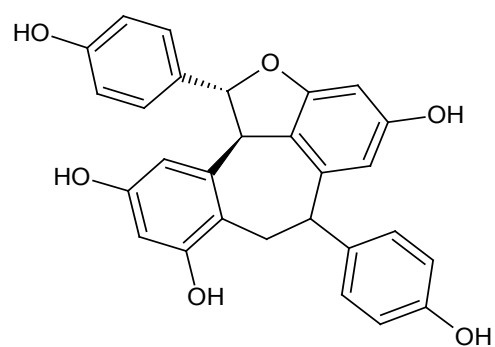
41: amurensin A



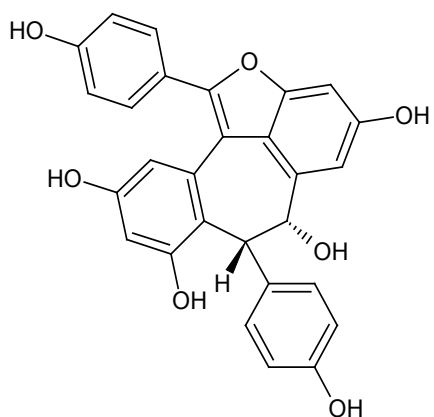
42: gnetin L



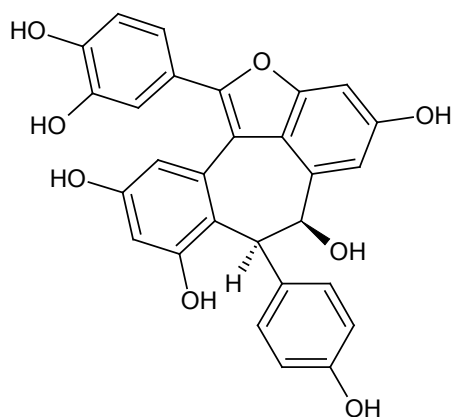
43: roxburgiol A



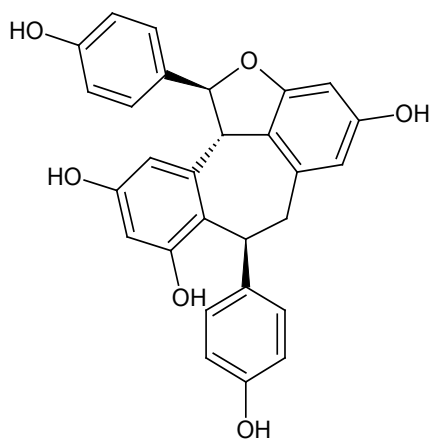
44: vitisinol G



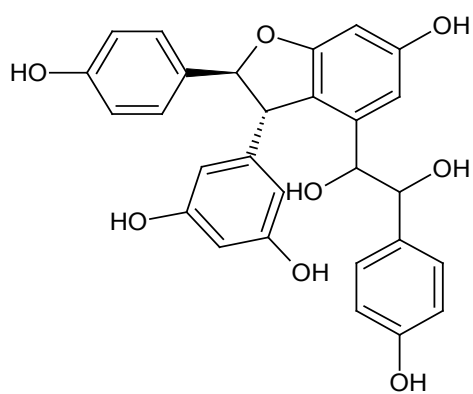
45: malibatol A



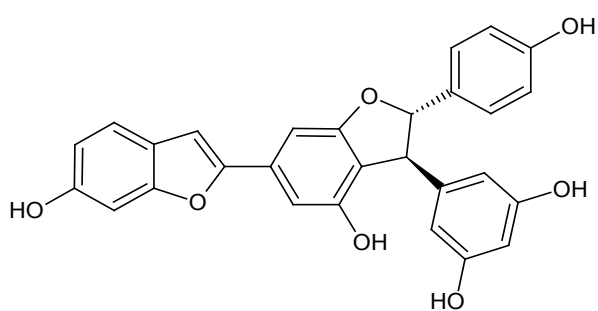
46: malibatol B



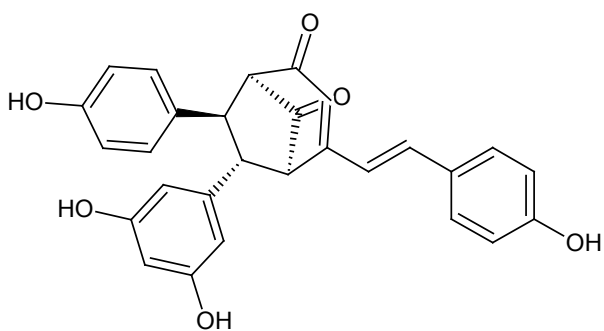
47: melanoxylin A



48: betulifol B



49: gnemonol G



50: gnetin A