

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 386

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 307/80 (2006.01)

C07C 7/10 (2006.01)

C07C 7/12 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36**
(22) Přihlášeno: **22.01.2019**
(40) Zveřejněno: **15.07.2020**
(Věstník č. 29/2020)
(47) Uděleno: **04.06.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **15.07.2020**
(Věstník č. 29/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

RAYNE, Sierra; KARACABEY, Erkan; MAZZA, G. 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.; RODRÍGUEZ-CABO, T., et al. Assessment of alcoholic distillates for the extraction of bioactive polyphenols from grapevine canes. *Industrial crops and products*, 2018, 111: 99-106.; SOURAL, Ivo, et al. Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules*, 2015, 20.4: 6093-6112.; DOSTÁLEK, PAVEL, et al. Stabilizační prostředky pro zvýšení koloidní stability piva Stabilizers for Increased Colloidal Stability of Beer. *Kvasny prum.* 57/2011 (7-8).

(73) Majitel patentu:

Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.,
Brno, Staré Brno, CZ
MikroChem LKT spol. s r.o., Třeboň, CZ
Mendelova univerzita v Brně, Brno, CZ

(72) Původce:

prof. Ing. Jan Tríska, CSc., České Budějovice,
České Budějovice 2, CZ
Ing. Jan Mareš, Nová Ves, CZ
doc. Ing. Josef Balík, Ph.D., Lednice, CZ
Ing. Pavel Híc, Ph.D., 935 04 Devičany, SK
RNDr. Naděžda Vrchotová, České Budějovice,
České Budějovice 2, CZ
Ing. Jana Rajchmanová, České Budějovice, České
Budějovice 3, CZ
Ing. Olga Vilímková, Lhenice, CZ

(74) Zástupce:

Patentová kancelář VYNALEZY.cz, Mgr. Hana
Jirkalová, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4,
Michle

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy trans-ε-viniferinu z réví

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy *trans-ε-viniferinu* z réví, který je charakterizovaný tím, že se vysušené kousky réví macerují isopropylalkoholem a získaný surový *trans-ε-viniferin* se čistí kapalinovou adsorpční chromatografií, při které je kolona naplněna sorbentem na bázi křemeliny, která je potažena polyamidem, za oddělení čistého *trans-ε-viniferinu* a resveratrolu ze směsi stilbenů. Získané čisté sloučeniny mají využití v přípravcích na ochranu rostlin, v medicíně, kosmetice a potravinářství.

Způsob přípravy *trans-ε-viniferinu* z réví

Oblast techniky

5

Řešení se týká způsobu přípravy *trans-ε-viniferinu* z réví zlepšenou izolací a čištěním účinné látky zejména pro přípravky na ochranu rostlin, pro kosmetiku, pro potravinářské a lékařské použití.

10 Dosavadní stav techniky

Důsledné zhodnocení odpadů je relativně nový koncept v oblasti současného zemědělství a potravinářského průmyslu. Zemědělské odpady mohou být zdrojem hodnotných fytochemikálií a produktů s vyšší přidanou hodnotou. Jedním z nových objektů výzkumu se stávají odpady z vinohradnictví, kde před kompostováním a spalováním by bylo možno z odpadních materiálů získávat velmi cenné látky. Biomasa réví (0,5 až 2 kg/keř) z každoročního prořezávání révy vinné představuje podle stávající literatury velmi cenný zdroj *trans-resveratrolu* a *trans-ε-viniferinu*, které mají využití zejména v medicíně. Např. pro *trans-resveratrol* se udává obsah 3,45 g.kg⁻¹ suchého réví a 1,3 g.kg⁻¹ suchého réví pro *trans-ε-viniferin* (Rayne et al., 2008). Réví může tedy představovat významný zdroj resveratrolu, jeho dimerů a oligomerů. Dimery a oligomery resveratrolu mohou sloužit jako významný zdroj látek pro další výzkum a vývoj léčiv a speciálních potravních doplňků. V roce 2011 bylo publikováno, že *trans-ε-viniferin* glukosid vykazuje *in vitro* nejvyšší inhibiční aktivitu proti hromadění amyloidních β-peptidů a mohl by tedy sloužit jako atraktivní nový kandidát pro ochranu mozkových buněk při léčení Alzheimerovy choroby (AD) (Richard et al., 2011). Podle nejnovějších výzkumů (Vion E. et al., 2018) je právě *trans-ε-viniferin* nejvhodnějším kandidátem na prevenci a možnou budoucí terapii AD. Resveratrol, jeho dimery a oligomery vykazují celou řadu dalších biologických aktivit, např. *trans-ε-viniferin* zvyšuje aktivitu mitochondriálního sirtuinu 3 a chrání buňky v modelu Huntingtonovy choroby, která je prakticky neléčitelná (Fu et al., 2012). Byla popsána aktivita *trans-ε-viniferinu* nejen jako preventivního prostředku proti onemocnění rakovinou, ale i jako látky vykazující přímou cytotoxicitu na vybrané rakovinné buněčné linie (Xue et al., 2014). Velmi nadějně vypadají výsledky publikované ve studii Basri et al. (2014), kdy se ukázalo, že kombinace *trans-ε-viniferinu* a vancomycinu je účinná proti Methicilin-rezistentnímu zlatému stafylokoku (Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, MRSA), což je bakterie odpovědná za obtížně léčitelné infekce u lidí a zvířat. Všechny výše uvedené a další studie (nejsou zmíněny např. další oblasti výzkumu zahrnující kosmetický a potravinářský průmysl) vyžadují a budou vyžadovat výchozí látku, jakou je např. *trans-ε-viniferin*, v daleko větším množství.

První zmínkou o extrakci dřevnatých částí (woody stems) rostliny *Vitis vinifera* a čištění extraktu na sloupci polyamidu je publikace Aaviksaara et al. (2003). I když se patrně v tomto případě nejedná přímo o réví, iniciovala tato publikace s největší pravděpodobností pozdější soustavnou studii extrakce réví různými rozpouštědly (Rayne et al., 2008). Autoři této publikace doporučují pro kvantitativní extrakci *trans-resveratrolu* a *trans-ε-viniferinu* směsi alkoholu s vodou (70 až 80% alkohol). Karacabey et al. (2012) extrahovali rozemleté réví odrůdy Pinot Noir samotnou vodou a vodou s přídavkem alkoholu (7,4 %, 15 % a 25 %) v tlakové aparatuře při teplotách 85, 95, 105, 120, 140 a 160 °C a zjistili, že při teplotách vyšších než 95 °C dochází ke snižování výtěžků extrakce jak pro *trans-resveratrol*, tak pro *trans-ε-viniferin*. Maximální výtěžek *trans-ε-viniferinu* činil 1,65 g/kg lyofilizovaného réví. Soral et al. (2015) zjistili, že maximální výtěžek stilbenů poskytuje v případě réví z Cabernet Moravia urychlená extrakce methanolem (8500 ± 1100 µg/g sušiny).

Pawlus et al. (2013) prostudovali profil 9 derivátů stilbenů (stilbenoidů) u 16 odrůd révy a zjistili, že největší výtěžek *trans-ε-viniferinu* činí 5,74 g/kg u odrůdy *Vitis riparia*. Pull. Vergara et al. (2012) studovali distribuci *trans-resveratrolu*, *trans-piceatannolu* a *trans-ε-viniferinu* u čilských odrůd Pinot Noir a Gewürztraminer a zjistili nejvyšší koncentraci *trans-ε-viniferinu* 868 mg/kg

réví u odrůdy Pinot Noir. Navíc zjistili u této odrůdy, že je výhodné ponechat réví po ořezání ve vinici ještě po dobu dvou měsíců, kdy obsah výše uvedených stilbenů se prakticky zdvojnásobí, na rozdíl od jiných odrůd. Lambert et al. (2013) analyzovali 16 odrůd *Vitis vinifera* L. na obsah *trans-ε*-viniferinu, *trans*-resveratrolu, *trans*-piceatannolu, vitisinu B a poprvé na obsah hopeafenolu a miyabenolu C pomocí LC-NMR. Největší množství *trans-ε*-viniferinu našli autoři této studie opět u odrůdy Pinot Noir (3,74 g/kg réví). Bylo zjištěno, že skladování réví hraje významnou úlohu z hlediska obsahu stilbenoidů (jejich obsah se významně zvyšuje). Gorena et al. (2014) popsali až pětinasobné zvýšení koncentrace stilbenoidů u odrůdy Pinot Noir během skladování réví až po dobu 8 měsíců, zatímco tento efekt nenastává u réví, které je zmrazeno, lyofilizováno, nebo rozemleto.

Podle dostupné literatury se pro maceraci réví dosud používá methanol, aceton a jejich směsi s vodou. V některých případech se používá hexan, ethylacetát. V případě vodných alkoholů se z réví dostávají do extraktu látky ve vodě rozpustné, zejména cukry, které při dalším chromatografickém dělení zatěžují kolonu a zhoršují separaci látek.

Ze separačních metod je nutno zmínit vysoce rychlostní protiproudou kapalinovou chromatografii, pomocí které izoloval Wei et al. (2014) čtyři stilbeny z kořenů odrůdy Cabernet Sauvignon – z 241 mg surového extraktu bylo získáno 18,7 mg *trans-ε*-viniferinu. Kong et al. (2016) použili tuto techniku pro dělení *trans-δ*-viniferinu a *trans-ε*-viniferinu. Rozdílné afinity resveratrolu a *trans-ε*-viniferinu k polyvinyliden fluoridu (PVDF) využil More-Salmi et al. (2014) k jejich oddělení a měření antityrosinase aktivity získaných látek po předchozím patentování postupu dělení (Salmi a Vercauteren, 2012).

V dostupné literatuře je pro chromatografické dělení resveratrolu ze směsi stilbenů pomocí adsorpční chromatografie dosud popisováno použití polyamidu (Aaviksaara, 2003), dále použití polyvinyliden fluoridu pro dělení resveratrolu a *trans-ε*-viniferinu (Salmi a Vercauteren, 2012). Uvedené chromatografické metody využívají velmi drahé sorbenty, jejichž dělicí schopnosti se při větším zatížení kolony rapidně zhoršují.

Vzhledem ke stále se zvyšující poptávce po *trans-ε*-viniferinu se hledají nové efektivnější způsoby přípravy této účinné látky.

35 Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy *trans-ε*-viniferinu z réví podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vysušené kousky réví macerují isopropylalkoholem a získaný surový *trans-ε*-viniferin se čistí kapalinovou adsorpční chromatografií, při které je kolona naplněna sorbentem na bázi křemeliny, která je potažena polyamidem, za oddělení čistého *trans-ε*-viniferinu a resveratrolu ze směsi stilbenů.

Způsob podle vynálezu je charakterizován tím, že se kousky réví o velikosti do 3 mm a sušíně 90 až 93 % hmotn. macerují alespoň 5 h při teplotě 20 až 50 °C, načež se získaný macerát čistí chromatograficky.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se suchá drť réví maceruje v uzavřené nádobě isopropylalkoholem, poté se drť réví odstraní a získaný macerát se čistí adsorpční chromatografií, při které je kolona naplněna křemelinou, která je potažena polyamidem typu PA66. Tak se získá čistý *trans-ε*-viniferin a resveratrol ze směsi stilbenů.

Způsob podle vynálezu zjednodušuje maceraci réví, neboť do extraktu réví isopropylalkoholem nepřecházejí cukry a nezatěžují chromatografickou kolonu při následném čištění extraktu a získávání čistého *trans-ε*-viniferinu, neboť při použití polyamidu na křemelině nedochází

v takové míře ke zhoršení dělicích vlastností kolony a vzhledem k ceně sorbentu je celý způsob podle vynálezu významně ekonomičtější.

5 Způsob podle vynálezu byl dobře ověřen původci v praxi v laboratořích přihlašovatele, kterým je MikroChem LKT spol. s r.o., Třeboň, CZ.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezuji.

10 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

15 Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se odpadní réví podrtí na menší frakce (cca 1 mm až 30 mm) a nechá se volně sušit na sušinu 90 až 93 % hmotn. Proces sušení je realizován volným rozložením drceného réví v nízké vrstvě cca 20 až 30 mm v dobře větraných skladovacích prostorách (uzavřené). Především z důvodu vysoké počáteční vlhkosti réví je nutné materiál pravidelně obracet (2x až 3x týdně). Celková doba sušení je závislá na okolní teplotě vzduchu a intenzitě větrání, řádově se pohybuje v jednotkách týdnů.

20 K vysušenému materiálu v množství 1 kg sušiny réví v uzavřené extrakční nádobě se přidá trojnásobná hmotnost izopropylalkoholu a v podmínkách 20 až 22 °C ponechá po dobu 6 dní macerovat. Následně je extrakt oddělen od extrahovaného réví. Zbytek extrakčního činidla z vlhkého extrahovaného réví se získá lisováním na pístovém lisu. Získaný extrakt je zahuštěn na 25 vakuové odparce a izopropylalkohol recyklován k další extrakci.

Obsah *trans-ε*-viniferinu v získaném surovém extraktu činil 1,11 g a obsah resveratrolu 2,02 g. Extrakt byl následně nanesen na kolonu naplněnou křemelinou s potahem polyamidu (Beerpap[®]) s cílem separace jednotlivých stilbenů. Teoretický výtěžek *trans-ε*-viniferinu po separaci na 30 koloně byl dle provedených analýz jednotlivých frakcí 0,87 g *trans-ε*-viniferinu a 1,71 g resveratrolu.

Příklad 2

35 Odpadní réví se podrtí na menší frakce (cca 1 mm až 30 mm) a nechá se volně sušit na sušinu 90 až 93 % hmotn. Proces sušení je realizován volným rozložením drceného réví v nízké vrstvě cca 20 až 30 mm v dobře větraných skladovacích prostorách (uzavřené). Především z důvodu vysoké počáteční vlhkosti réví je nutné materiál pravidelně obracet (2x až 3x týdně). Celková doba sušení je závislá na okolní teplotě vzduchu a intenzitě větrání, řádově se pohybuje v jednotkách 40 týdnů.

45 K vysušenému materiálu v množství 1 kg sušiny réví v uzavřené extrakční nádobě se přidá trojnásobná hmotnost izopropylalkoholu a v podmínkách 50 °C se ponechá po dobu 24 hodin macerovat. Následně je extrakt oddělen od extrahovaného réví. Zbytek extrakčního činidla z vlhkého extrahovaného réví se získá lisováním na pístovém lisu. Získaný extrakt je zahušťován na vakuové odparce a izopropylalkohol recyklován k další extrakci.

50 Obsah *trans-ε*-viniferinu v získaném surovém extraktu činil 1,04 g a obsah resveratrolu 2,42 g. Extrakt byl následně nanesen na kolonu naplněnou křemelinou s potahem polyamidu (Beerpap[®]) s cílem separace jednotlivých stilbenů. Teoretický výtěžek *trans-ε*-viniferinu po separaci na koloně byl dle provedených analýz jednotlivých frakcí 0,81 g *trans-ε*-viniferinu a 2,06 g resveratrolu.

Příklad 3

5 Odpadní réví se podrtí na menší frakce (cca 1 mm až 30 mm) a nechá se volně sušit na sušinu 90 až 93 % hmotn. Proces sušení je realizován volným rozložením drceného réví v nízké vrstvě cca 20 až 30 mm v dobře větraných skladovacích prostorách (uzavřené). Především z důvodu vysoké počáteční vlhkosti réví je nutné materiál pravidelně obracet (2x až 3x týdně). Celková doba sušení je závislá na okolní teplotě vzduchu a intenzitě větrání, řádově se pohybuje v jednotkách týdnů.

10 K extrakci réví se využije kontinuální vakuové extrakce na čtvrtprovozním modifikovaném Soxhletově extraktoru. Množství vysušeného materiálu vztažené na 1 kg sušiny se nasype do nádoby extraktoru. Do další nádoby, která je součástí extrakčního systému, se nalije extrakční rozpouštědlo (izopropylalkohol) v množství odpovídající cca 3násobku hmotnosti extrahovaného materiálu. Systém je provozován za podtlaku 40 000 Pa (400 mBar). Na extrahovaný materiál je 15 kontinuálně přiváděno extrakční rozpouštědlo o teplotě 45 až 50 °C. Extrakt je jímán do baňky (nádoby), ze které je do systému zpětně recyklováno používané rozpouštědlo. Výhodou tohoto systému je, že lze po ukončení extrakce vyjmout již vyextrahované réví a naplnit nádobu novým 20 materiálem, který je následně extrahován opět stejným rozpouštědlem. Další výhodou je celková doba extrakčního cyklu, který se pohybuje kolem 5 h. Zbytek extrakčního činidla z vlhkého extrahovaného réví se získá lisováním na pístovém lisu. Získaný extrakt ze systému je nutné ještě 25 částečně zahustit na vakuové odparce a získaný izopropylalkohol je opět recyklován k další extrakci.

25 Obsah *trans-ε*-viniferinu v získaném surovém extraktu činil 1,32 g a obsah resveratrolu 2,74 g. Extrakt byl následně nanesen na kolonu naplněnou křemelinou s potahem polyamidu (Beerpap[®]) s cílem separace jednotlivých stilbenů. Teoretický výtěžek *trans-ε*-viniferinu po separaci na koloně byl dle provedených analýz jednotlivých frakcí 1,03 g *trans-ε*-viniferinu a 30 2,33 g resveratrolu.

Dělení stilbenů na koloně

35 Pro separaci jednotlivých látek ze skupiny stilbenů byla použita čtvrtprovozní skleněná chromatografická kolona o výšce 0,5 m a vnitřním průměru 0,05 m. Kolona je z obou stran utěsněna a uzavřena dvěma přírubami s otvory na osazení hadiček. Kolona byla naplněna sorbentem na bázi křemeliny s potahem polyamidu (Beerpap[®]) a výšce sloupce cca 0,38 m. K hornímu vstupu kolony bylo připojeno čerpadlo pro preparační chromatografii s výkonem 1 až 40 300 ml/min, určené k čerpání elučního rozpouštědla.

40 Před nanesením vzorku na kolonu byl sorbent kondicionován 80% metanolem. Vzorek zahuštěného extraktu v množství 10 až 30 ml byl následně nanesen na horní část sloupce sorbentu a poté spuštěno čerpadlo s nastaveným výkonem 10 ml/h. Elučním rozpouštědlem byl 45 80% metanol. Na výstupu z dolní části kolony byly jímány frakce cca po 500 ml. Tyto jímané frakce byly zahuštěny do sucha na rotační vakuové odparce.

Příklad 4

50 Zahuštěný extrakt získaný pomocí výše uvedených extrakčních technik byl po předchozí kondicionaci separační kolony roztokem 80% metanolu nanesen na horní část sloupce kolony. Eluce stilbenů ze vzorku byla provedena 80% roztokem metanolu, který byl čerpán přes sloupec kolony v množství 10 ml/minutu. Z každé jímané frakce každá o objemu 500 ml byl nejprve odebrán vzorek pro analýzu a následně byly frakce zahuštěny do sucha na rotační vakuové odparce. Celkem bylo získáno 8 frakcí.

55

Dle získaných výsledků analýz všech 8 odebraných frakcí bylo zjištěno, že resveratrol je obsažen ve 3. odebrané frakci v množství odpovídající 99 % celkového obsahu tohoto stilbenu. Obsah *trans-ε-viniferinu* byl zjištěn v největším zastoupení v 6. frakci, a to v množství odpovídající 72 % z celkového obsahu. Tento stilben byl identifikován i ve frakci č. 5 (10 % obsahu), č. 7 (15,8 % obsahu) a č. 8 (1,5 % obsahu).

Použitý sorbent (Beerpap[®]) k dělení jednotlivých stilbenů se ukázal jako vhodný a pro separaci čistých látek *trans-ε-viniferinu* a resveratrolu jako velice účinný s vysokým stupněm účinnosti. Velikou výhodou je i cenová dostupnost pro použití ve větším i velkém měřítku.

Průmyslová využitelnost

Nový způsob přípravy *trans-ε-viniferinu* z réví umožňuje jednodušeji a levněji získat čistý *trans-ε-viniferin* a resveratrol ze směsi stilbenů, které mají využití v přípravcích na ochranu rostlin, v medicíně, kosmetice a potravinářství.

Seznam použité literatury

- Aaviksaara A., Hagua M., Püssab T., Roastob M., Tsouprasc G.: Purification of resveratrol from vine stems. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem. 52, (4), 155–164 (2003)
- Basri D.F., LeeWee Xian L.W., Nur Indah Abdul Shukor N.I.A., Latip J.: Bacteriostatic antimicrobial combination: Antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BioMed Research International Volume 2014, Article ID 461756, 8 pages
- Fu J., Jing Jin J., Robert H. Cichewicz R.H., Hageman S.A., Ellis T.K., Xiang L., Peng Q., Jiang M., Arbez N., Hotaling K., Ross Ch.A., Duan W.: *Trans-(-)-ε-viniferin* increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMPK, and protects cells in models of Huntington's disease. Journal of Biological Chemistry Vol. 287, No. 29, 24460–24472 (2012)
- Gorena T., Saez V., Mardones C., Vergara C., Winterhalter P., von Baer D.: Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. Food Chemistry 155, 256–263 (2014)
- Karacabey E., Mazza G., Bayındırılı L., Artik N.: Extraction of bioactive compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*) using a pressurized low-polarity water extractor. Food Bioprocess Technol. 5, 359–371 (2012)
- Kong Q., Ren X., Hu R., Yin X., Jiang G., Pan Y.: Isolation and purification of two antioxidant isomers of resveratrol dimer from the wine grape by counter-current chromatography. J. Sep. Sci 39, 2374–2379 (2016)
- Lambert C., Richard T., Renouf E., Bisson J., Waffo-Tégou P., Bordenave L., Ollat N., Mérillon Jean-Michel, Cluzet S.: Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. J. Agric. Food Chem. 61, 11392–11399 (2013)
- Pawlus A.D., Sahli R., Bisson J., Rivière C., Delaunay Jean-Claude, Richard T., Gomès E., Louis Bordenave L., Waffo-Tégou P., Mérillon Jean-Michel.: Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. J. Agric. Food Chem. 61, 501–511 (2013)
- Rayne, S.; Karacabey, E.; Mazza, G.: Grape cane waste as a source of *trans-resveratrol* and *trans-viniferin*: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. Ind. Crops Prod. 27, 335–340 (2008)
- Richard T., Poupard P., Nassra M., Papastamoulis Y., Iglesias M.L., Krisa S., Waffo-Tégou P., Mérillon J.M., Monti J.P.: Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. Bioorganic & Medicinal Chemistry 19, 3152–3155 (2011)
- Salmi C., Vercauteren J.: Method for obtaining epsilon-viniferin and/or resveratrol and corresponding products, WO 2012156917 A2 (16.5. 2012)

- Salmi-Morel C., Julia A., Vigor C., Vercauteren J.: A huge PVDF adsorption difference between resveratrol and ϵ -viniferin allows to quantitatively purify them and to assess their anti-tyrosinase property. *Chromatographia* 77, 957-961 (2014)
- 5 Soural I., Vrchotová N., Tříška J., Balík J., Horník Š., Cuřínová P., Sýkora J.: Comparison of various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules* 20, 6093-6112 (2015)
- Vergara C., von Baer D., Mardones C., Wilkens A., Wernekinck K., Damm A., Macke S., Gorena T., Winterhalter P.: Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60, 929-933 (2012)
- 10 Vion E., Page G., Bourdeaud E., Paccalin, M., Guillard J., Bilan, A.R.: *Trans* ϵ -viniferin is an amyloid- β disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 88, 1-6 (2018)
- Wei Y., Li P., Ma L., Li J.: Separation and purification of four stilbenes from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon roots through high-speed countercurrent chromatography. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 35 (2), 226-233 (2014)
- 15 Xue You-Qiu, Di Jin-Ming, Yun Luo Y., Cheng Ke-Jun, Xing Wei X., Shi Z.: Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014, Article ID 765832, 9 pages
- Zhang A., Yulin Fang Y., Li X., Meng J., Wang H., Li H., Zhang Z., Guo Z.: Occurrence and estimation of *trans*-resveratrol in one-year-old canes from seven major Chinese grape producing regions. *Molecules* 16, 2846-2861 (2011)
- 20

25

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy *trans*- ϵ -viniferinu z réví, **vyznačující se tím**, že se vysušené kousky réví macerují isopropylalkoholem a získaný surový *trans*- ϵ -viniferin se čistí kapalinovou adsorpční chromatografií, při které je kolona naplněna sorbentem na bázi křemeliny, která je potažena polyamidem, za oddělení čistého *trans*- ϵ -viniferinu a resveratrolu ze směsi stilbenů.
- 30
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se kousky réví o velikosti do 3 mm a obsahu sušiny 90 až 93 % hmotn. macerují alespoň 5 h při teplotě 20 až 50 °C, načež se získaný macerát čistí chromatograficky.
- 35