



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανιχνευτές στην HPLC. Εφαρμογές στις αναλύσεις του οίνου

Βακάκης Αλέξανδρος-Ιωάννης & Παπαδάτου Κωνσταντίνα-Μαρία

ΑΜ :19685008 & 19685087

Επιβλέπουσα

Όνοματεπώνυμο: Αρχοντούλα Χατζηλαζάρου

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

Detectors in HPLC. Applications in wine analyzes

**Vakakis Alexandros -Ioannis & Papadatou Konstantina-Maria
Registration Number: 19685008 & 19685087**

Supervisor name and surname: Archontoula Chatzilazarou

ATHENS, SEPTEMBER-2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:

«Ανιχνευτές στην HPLC. Εφαρμογές στις αναλύσεις του οίνου»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2ου Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3ου Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογράφων Βακάκης Αλέξανδρος - Ιωάννης και η κάτωθι υπογραφούσα Παπαδάτου Κωνσταντίνα - Μαρία του Νικόλαου και Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 19685008 και 19685087 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου». Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Ο/Η Δηλών/ούσα

Βακάκης Αλέξανδρος-Ιωάννης

&

Παπαδάτου Κωνσταντίνα-Μαρία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια οι αναφορές της υγρής χρωματογραφίας (liquid chromatography) έχουν αυξηθεί, εφόσον το φάσμα των εφαρμογών της είναι αρκετά ευρύ. Περίπου το 80% των διαδεδομένων χημικών ενώσεων που μελετώνται στον οίνο, δεν μπορεί να αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία (gas chromatography). Παλιότερα, οι επιδόσεις της αέριας χρωματογραφίας ήταν πολλοί περισσότερες από ότι της υγρής. Παρόλ' αυτά με την πάροδο του χρόνου και την συνεχή εξερεύνηση και εξέλιξη στον κλάδο της χρωματογραφίας έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία ασχολείται με τον διαχωρισμό των ουσιών μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα μερικών δευτερολέπτων και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά σε σχέση με αυτά της αέριας χρωματογραφίας.

Ένα μεγάλο μέρος της επιτυχίας της HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), οφείλεται στην μεγάλη ποικιλία των ανιχνευτών. Χάρη στις ιδιότητές τους καθιστούν δυνατή την ανάλυση πολλών και διαφορετικών ουσιών, εφόσον ανάλογα με την χαρακτηριστική ομάδα που προσδιορίζεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαφορετικός ανιχνευτής, ώστε να προκύψει ακριβέστερο και με μεγάλη ευαισθησία αποτέλεσμα. Στην συγκεκριμένη εργασία γίνεται ανάλυση όλων των παραμέτρων που αφορούν την HPLC, όπως είναι η αρχή λειτουργίας της, οι υποκατηγορίες της, οι στατικές και κινητές φάσεις, οι στήλες που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση, ο εξοπλισμός και η οργανολογία, καθώς γίνεται εκτενής ανάλυση των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται.

Τέλος, έχει γίνει βιβλιογραφική καταγραφή όλων των διαθέσιμων πρωτοκόλλων για την ανάλυση των σημαντικότερων ενώσεων του οίνου.

Λέξεις κλειδιά: υγρή χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ανιχνευτές, στατική φάση, κινητή φάση, χρωματογραφικές στήλες, οίνος

ABSTRACT

In recent years, references to liquid chromatography have increased, since its range of applications is quite wide. About 80% of the widespread chemical compounds studied in wine can't be analysed by gas chromatography. In the past, the performance of gas chromatography was much better than that of liquid chromatography. However, with the passage of time and the continuous exploration and development in the field of chromatography, new techniques have been developed, such as high-performance liquid chromatography, which achieves the separation of substances within a short time of a few seconds and has a higher performance than gas chromatography.

Much of the success of HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) is due to the wide variety of detectors. Thanks to their properties, they make it possible to analyse many different substances, since depending on the characteristic group to be identified, a different detector can be used to obtain a more accurate and sensitive result. In this paper, all the parameters related to HPLC are analysed, such as its operating principle, its subcategories, the static and mobile phases used in the analysis, the equipment and instrumentation, as well as an extensive analysis of the detectors used.

Finally, a literature survey has been made of all available protocols for the analysis of the most important wine compounds.

Keywords: liquid chromatography, high performance liquid chromatography, detectors, static phase, mobile phase, chromatography columns, wine

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	9
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή.....	10
1.1. Υγρή Χρωματογραφία.....	10
1.2. Αρχές λειτουργίας της HPLC.....	10
1.3. Υποκατηγορίες HPLC.....	11
1.4. Στατικές Φάσεις στη HPLC.....	12
1.5. Οργανολογία-εξοπλισμός HPLC.....	13
1.5.1. Διαλύτες.....	14
1.5.2. Σύστημα διανομής της κινητής φάσης.....	14
1.5.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	16
1.5.4. Χρωματογραφική στήλη.....	16
1.5.5. Ανιχνευτές.....	18
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Χημεία οίνων.....	26
2.1. Οργανικά οξέα.....	26
2.2. Φαινολικές ενώσεις.....	27
2.3. Σάκχαρα.....	28
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Εφαρμογές της HPLC στον οίνο.....	29
3.1. Ανθοκυάνες & Φαινολικά.....	32
3.2. Αμινοξέα.....	32
3.3. Ωχρατοξίνη.....	34
3.4. Γλουταθειόνη & θειόλες.....	34
3.5. Οργανικά οξέα & Σάκχαρα.....	35
3.6. Φυτοφάρμακα.....	36
3.7. Εφαρμογή σε δείγματα οίνου στο εργαστήριο της σχολής.....	36
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πρωτόκολλα αναλύσεων οίνων με HPLC.....	38
4.1. Ανάλυση ανθοκυανών σταφυλιών και των οίνων με HPLC-MS.....	38

4.2. Ανάλυση χρωματισμένων πολυμερών σε ερυθρό οίνο μέσω αντίστροφης φάσης HPLC	38
4.3. Ανάλυση στιλβενίων στον οίνο μέσω HPLC	40
4.4. Ανάλυση αμινοξέων με HPLC	48
4.5. Ταυτόχρονη ανάλυση HPLC βιογενών αμίνων, αμινοξέων και ιόντων αμμωνίου ως παράγωγα αμινοενόνης στον οίνο	49
4.6 Ταυτόχρονος προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων στον οίνο με HPLC	50
4.7 Προσδιορισμός φλαβονοειδών στον οίνο	51
4.8. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, αλκοολών και σακχάρων	51
4.9. Προσδιορισμός γλουταθειόνης και θειολών	52
4.10. Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοξέων και κυστεΐνης	54
4.11. Προσδιορισμός ωχρατοξίνης τον οίνο (1ος τρόπος)	55
4.11.1. Προσδιορισμός ωχρατοξίνης (2ος τρόπος)	55
4.12. Προσδιορισμός πυροανθοκυανών	56
4.13. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων	56
4.14. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, πολυφαινολών και φουρανικών ενώσεων	57
4.15. Εντοπισμός ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στον οίνο	62
4.16. Προσδιορισμός κατεχινών και φαινολικών οξέων	63
4.17. Προσδιορισμός λυσοζύμης (1ος τρόπος)	64
4.17.1 Λυσοζύμη (2ος τρόπος)	64
4.17.2. Μέτρηση λυσοζύμης σε οίνο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (3ος τρόπος)	65
4.18. Δοσολογία σακχάρων στον οίνο με HPLC	67
4.19. Οργανικά οξέα: HPLC	67
4.20. Ανάλυση βιογενών αμίνων	68
4.21. Προσδιορισμός εννέα βασικών ανθοκυανινών σε κόκκινο και ροζέ οίνο	69
4.22. Προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος και D-ισο-ασκορβικού οξέος	70
4.23. Προσδιορισμός ολικής αιθανόλης στον οίνο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	71

4.24. Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF).....	72
4.25. Πολυσαρτικό κάλιο (ΚΡΑ).....	73
5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΤΗΛΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ	
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Συνθήκες HPLC για ανάλυση της ρεσβερατρόλης και παραγώγων

Πίνακας 2: Συνθήκες HPLC για ανάλυση πολυφαινόλων και ανθοκυανών

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος εισαγωγής δείγματος

Εικόνα 3 :Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή UV

Εικόνα 4: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή PDA

Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή δείκτη διάθλασης

Εικόνα 6: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή σκέδασης εξατμιστικού φωτός

Εικόνα 7: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας φασματοσκοπικών ανιχνευτών μάζας. (Α) με πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και (Β) με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI)

Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή φθορισμού

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Χρωματογράφημα ενώσεων-HPLC/DAD

Διάγραμμα 2: Χρωματογράφημα ενώσεων-HPLC/RID

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η αναφορά και χρήση των διαθέσιμων ανιχνευτών HPLC και η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για την χρήση του κάθε ανιχνευτή, μέσω της καταγραφής όλων των πρωτοκόλλων ανάλυσης των ενώσεων που εντοπίζονται στα γλεύκη και τους εμφιαλωμένους οίνους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Υγρή Χρωματογραφία

Η HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) είναι η χρωματογραφία υγρής φάσης ανάλογη τεχνική με την χρωματογραφία αέριας φάσης, στην οποία γίνεται ο διαχωρισμός ενός δείγματος στα επιμέρους συστατικά του, σύμφωνα με τις αλληλεπιδράσεις αυτού με την υγρή κινητή φάση και την στερεή στατική φάση.^[23] Η μεγάλη επιτυχία της HPLC οφείλεται στην χρήση μικρών ομοιόμορφων σωματιδίων που οδηγούν σε μικρή διάχυση περιδίνησης και γρήγορη μεταφορά μάζας.^[9]

Πιο συγκεκριμένα, η χρωματογραφική στήλη, που αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα μιας χρωματογραφικής μονάδας, πρέπει να περιλαμβάνει ένα κατάλληλο υλικό, το οποίο είναι εξειδικευμένο για κάθε σύνολο συστατικών που πρόκειται να διαχωριστεί. Στην HPLC δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιούνται διάφοροι διαλύτες αλλά και μείγματα διαφορετικών διαλυτών, καθώς ακόμη είναι δυνατή τόσο της ισοκρατικής όσο και της βαθμιδωτής χρήσης της σύνθεσης της κινητής φάσης. Με την βοήθεια των αντλιών υψηλής πίεσης, το μίγμα των διαλυτών εισέρχεται στο σύστημα της HPLC και διαπερνά την χρωματογραφική στήλη, εντός της οποίας επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών του αναλύτη.^[1]

Σε έναν υποθετικό διαχωρισμό, όπου διαχωρίζεται ένα μείγμα που αποτελείται από 2 συστατικά, το συστατικό 1 επιδρά αμοιβαία με την στατική φάση λιγότερο ισχυρά από ότι το συστατικό 2 και πιο πολύ από ότι η κινητή φάση. Κατά την εισαγωγή του μείγματος στην στήλη, τα επιμέρους συστατικά του θα διέλθουν κατά μήκος της στήλης. Τα μόρια από το συστατικό 1 θα επιδράσουν αμοιβαία με την στατική φάση και θα συγκρατηθούν λίγο πιο πολύ απ' ότι τα μόρια της κινητής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια από το συστατικό 1 να ωθούνται εντός της στήλης με ταχύτητα μικρότερη από αυτή που κινούνται τα μόρια της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα μόρια του συστατικού 2 που αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την στατική φάση, θα παραμείνουν για περισσότερο χρόνο εντός της στήλης. Όταν τα συστατικά εξέρχονται από την στήλη, δημιουργούν διάφορες ζώνες, οι οποίες

ανιχνεύονται από τον επιλεγμένο ανιχνευτή και γίνεται η καταγραφή τους υπό την μορφή καμπύλων Gauss.^[1]

1.2. Αρχές λειτουργίας της HPLC

Μια κύρια διαφορά των οργάνων της HPLC με αυτά των περισσότερων της αέριας χρωματογραφίας είναι ότι φτιάχνονται σπονδυλωτά. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται εύκολη και δυνατή η αλλαγή και αντικατάσταση διαφορετικών μονάδων μεταξύ τους. Οι αναλύτες της HPLC διαφοροποιούνται ανάλογα με την συμβατότητα που έχουν στις διαφορετικές στερεές στατικές φάσεις ή με μία υγρή κινητή φάση. Η διάχυση είναι αυτή που ελέγχει κυρίως την κινητική της κατανομής των διαλυμένων ουσιών μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης. Σε σύγκριση με τα αέρια, η διάχυση των αναλύτων στα υγρά είναι 1000 έως 10000 φορές πιο αργή. Προκειμένου να μειωθεί ως το ελάχιστο ο χρόνος που χρειάζεται για την αλληλεπίδραση του αναλύτη με την κινητή και στατική φάση θα πρέπει να εφαρμοστούν 2 παράμετροι. Η πρώτη παράμετρος είναι ότι τα σωματίδια του υλικού πλήρωσης θα πρέπει να είναι μικρά και το γέμισμα θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφα και πυκνά. Για να εφαρμοστεί αυτή η παράμετρος γίνεται χρήση σφαιρικών σωματιδίων ομοιόμορφου μεγέθους, με αποτέλεσμα να προκύπτει μικρή τιμή της σταθεράς A στην εξίσωση van Deemter (μικρότερη διάχυση περιδίνησης)

$$h = A + B/u + Cu, \text{ όπου}$$

A, B, C: σταθερές μιας ορισμένης στήλης που βρίσκονται σε εξάρτηση με το υλικό πληρώσεως και με την φύση της στατικής και κινητικής φάσης της στήλης

A: σχετίζεται με την στροβιλώδη διάχυση και δεν εξαρτάται από την ταχύτητα. Αποτελεί μέτρο της διεύρυνσης μιας κορυφής. Τα μόρια μίας ουσίας δεν διανύουν το ίδιο μήκος εξαιτίας της ανομοιομορφίας του πληρωτικού υλικού. Όσο πιο μικρή η διάμετρος των σωματιδίων τόσο πιο μικροί θα είναι οι όροι A και h.

B/u: σχετίζεται με την διαμήκη διάχυση και βρίσκεται σε άμεση εξάρτηση με τον συντελεστή διαχύσεως (ιξώδες, θερμοκρασία). Με την πάροδο του χρόνου η διαμήκης διάχυση ολοένα και αυξάνεται, με αποτέλεσμα η διεύρυνση κορυφής να αυξάνεται με την μείωση της ταχύτητας.

Cu: συνδέεται με την αντίσταση μεταφοράς μάζας στη στήλη, η οποία δυσκολεύει την άμεση αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των 2 φάσεων και με την εγκάρσια διάχυση εντός της κινητής φάσης από τον έναν θάλαμο στον άλλο.

Η δεύτερη παράμετρος είναι ότι η στατική φάση θα πρέπει να είναι υπό την μορφή λεπτής στιβάδας με καλή ομοιογένεια και χωρίς ακίνητα, λιμνάζοντα μέρη, ούτως ώστε να προκύπτει μικρή τιμή τις σταθεράς C (ταχύτερη μεταφορά μάζας μεταξύ φάσεων/απαραίτητη σε υψηλούς ρυθμούς ροής). Λόγω του ότι η μοριακή διάχυση στα υγρά είναι μικρή, ο όρος B στην παραπάνω εξίσωση είναι μικρός.^[9]

Γενικά στην HPLC ο όρος *h* καθορίζεται από την μεταφορά μάζας.

1.3. Υποκατηγορίες HPLC

- 1) Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase Chromatography, NPC). Σε αυτή χρησιμοποιείται μια πολική στατική φάση και σχετικά μη πολικοί ή μέτρια πολικοί διαλύτες, όπως το εξάνιο και το τετραϋδροφουράνιο.
- 2) Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reverse Phase Chromatography, RPC). Σε αυτή έχουν αντιστραφεί οι πολικότητες των στατικών και κινητών φάσεων σε σχέση με την χρωματογραφία κανονικής φάσης. Σήμερα η RPC χρησιμοποιείται 10 φορές περισσότερο από την NPC.
- 3) Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography, IEC). Εδώ τα ιόντα του δείγματος ανταλλάσσονται με τα ιόντα της στατικής φάσης. ⁽²⁾ Τα σωματίδια ιοντοανταλλαγής φέρουν συγκεκριμένο θετικό και αρνητικό φορτίο. Σημαντική παράμετρος της IEC είναι ότι η ηλεκτρική ουδετερότητα είναι υποχρεωτική. Το διάλυμα έκλουσης θα πρέπει να είναι ιοντικό, διότι για τον διαχωρισμό ιόντων, προκειμένου να μετακινηθούν τα ιόντα του αναλύτη στο κάτω μέρος της στήλης θα πρέπει να αντικατασταθούν από κάποιο άλλο ιόν.
- 4) Ιοντική Χρωματογραφία (Ion Chromatography). Υποκατηγορία της IEC, όπου εδώ χρησιμοποιούνται αποδοτικά σωματίδια ιοντοανταλλαγής.
- 5) Χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC). Εδώ προσροφάται το νερό πάνω σε μία υδρόφιλη επιφάνεια, με αποτέλεσμα να λάβει χώρα η διεργασία του καταμερισμού. Αυτός ο διαχωρισμός πληροί τις προϋποθέσεις για υδατοδιαλυτούς αναλύτες με υψηλή πολικότητα. Ως εκλουστικό διάλυμα κυρίως χρησιμοποιείται το διάλυμα ακετονιτρίλιο-νερό, όπου το νερό είναι το ισχυρό εκλουστικό.
- 6) Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC). Εδώ ο διαχωρισμός γίνεται βάσει του μεγέθους των μορίων. Το μεγαλύτερο μέρος της στατικής φάσης συγκροτείται κυρίως από πόρους. Τα μόρια με το μεγαλύτερο μέγεθος αδυνατούν να περάσουν από τους πόρους που έχουν μικρότερο μέγεθος από αυτά, με αποτέλεσμα να εξέρχονται στον όγκο του εκλουστικού διαλύματος. Τα μικρότερα μόρια εισέρχονται σε όλα τα μεγέθη πόρων της στατικής φάσης και εξέρχονται τελευταία. Όλοι οι αναλύτες στην SEC εκλούνται εντός ενός συγκεκριμένου παραθύρου κατακράτησης όγκου με τα μόρια με το μεγαλύτερο μέγεθος να εκλούνται πρώτα και τα μόρια με μέγεθος μικρότερο από ένα όριο, να εκλούνται όλα μαζί στο τέλος. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους διαχωρίζονται εντός του παραθύρου κατακράτησης.
- 7) Χρωματογραφία Διήθησης Σε Πήκτωμα (Gel Filtration Chromatography, GFC). Όταν η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων και γίνεται χρήση υδατικών διαλυμάτων έκλουσης.

- 8) Χρωματογραφία Διέλευσης Μέσω Πηκτώματος (Gel Permeation Chromatography, GPC). Γίνεται χρήση πορώδων πολυμερικών στατικών φάσεων και οργανικών διαλυτών έκλουσης, με συχνή χρήση υψηλής θερμοκρασίας, για τον προσδιορισμό της κατανομής μοριακών μεγεθών των πολυμερών.
- 9) Χρωματογραφία Αποκλεισμού Ιόντων (Ion Exclusion Chromatography, ICE). Έχει βάση στις αρχές αποκλεισμού, έτσι όλοι οι αναλύτες εκλύονται εντός ενός καθορισμένου παραθύρου κατακράτησης. Χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό ασθενών ηλεκτρολυτών π.χ. ασθενών οξέων από ισχυρά οξέα.
- 10) Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography). Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό κάποιων βιομορίων. Βασίζεται στην εξαιρετικά συγκεκριμένη δεσμικότητα ανάμεσα σε έναν αναλύτη και το ομόλογό του. Γίνεται ακινητοποίηση του ομόλογου στην στατική φάση (στήλη συγγένειας). Όταν ο αναλύτης μαζί με άλλες ουσίες περνάν από την στήλη συγγένειας, συγκρατείται μόνο ο αναλύτης. Έπειτα ο αναλύτης εκλύεται με την χρήση ενός εκλουστικού διαλύματος που μπορεί να αποσπάσει τον αναλύτη από το ομόλογό του, το οποίο δίνει μία οξεία κορυφή.^{[1],[9]}

1.4. Στατικές Φάσεις στη HPLC

Η στατική φάση αποτελεί το προσροφητικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος. Η επιλογή του γίνεται με βάση τη δραστηριότητα του στερεού και το μέγεθος των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η δραστηριότητα του προσροφητικού υλικού αποτελεί το μέτρο έλξης που έχει το ίδιο για τις διαλυμένες ουσίες του δείγματος. Τον μεγαλύτερο βαθμό δραστικότητας έχουν τα εντελώς άνυδρα στερεά και τα ευρέως γνωστά και χρησιμοποιούμενα προσροφητικά υλικά είναι το silica gel και η αλουμίνα.^[22] Όσον αφορά το μέγεθος των σωματιδίων στα πρώτα στάδια της HPLC γινόταν χρήση μικροσωματιδίων ακανόνιστου σχήματος πορώδων μικροσωματιδίων πηκτώματος πυριτίας (silica gel) ή αλουμίνας με διαμέτρους $\leq 10\mu\text{m}$. Με την πάροδο του χρόνου δημιουργήθηκαν σωματίδια σφαιρικού σχήματος που εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιομορφία πλήρωσης και καλύτερη απόδοση. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται σωματίδια πυριτίας υψηλής καθαρότητας, με χαμηλό ποσοστό από ίχνη μετάλλων και διαμέτρους από $<10\mu\text{m}$ έως και $<2\mu\text{m}$ και αποτελούν καταλυτικό ρόλο της επιτυχίας της HPLC. Τα σωματίδια με μικρές διαμέτρους εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίθετη πίεση, παράλληλα όμως έχουν πολύ μικρές απώλειες στην απόδοση κάτω από υψηλούς ρυθμούς ροής και έτσι επιτρέπεται να γίνονται ταχύτεροι διαχωρισμοί.^[9]

Συχνά παρατηρείται να γίνεται χρήση σωματιδίων με μικροπορώδες. Οι πόροι αυτών μπορεί να διαπεραστούν από τους αναλύτες και διαλύτες έκλουσης. Στο μεγαλύτερο ποσοστό η ενεργή περιοχή βρίσκεται μέσα στους πόρους.^[9]

Στην επιφάνεια των σωματιδίων πυριτίας υπάρχουν ομάδες σιλανόλης SiOH. Αυτές οι ομάδες παρέχονται ως πολικά κέντρα αλληλεπίδρασης, γεγονός το οποίο μπορεί να θεωρηθεί είτε πλεονέκτημα είτε μειονέκτημα.^[9]

Υπάρχουν ακόμα χρωματογραφικές στήλες γραφιτικού άνθρακα, αλουμίνας, τιτανίας και ζirkονίας, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή σε ακραία pH σε σχέση με τις χρωματογραφικές στήλες πυριτίας. Παρόλα αυτά κανένα άλλο σωματίδιο φορέα δε εμφανίζει τόσο υψηλές αποδόσεις όσο τα σωματίδια πυριτίας.^[9]

1. Μάκρο-μέσο-μικρο πορώδες δομές. Πληρωτικά διάχυσης. Γενικά οι πόροι με μέγεθος <100Å αναφέρονται ως μικροπόροι ενώ οι πόροι με μέγεθος >1000Å ονομάζονται ως μακροπόροι. Οι πόροι με ενδιάμεσο μέγεθος ονομάζονται μεσοπόροι. Οι μακροπορώδεις δομές χρησιμοποιούνται γενικά για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων (π.χ. πρωτεΐνες).

Μη πορώδη πληρωτικά υλικά σωματιδίων με πολύ μικρό μέγεθος (κυρίως πυριτίας) δεν χρησιμοποιούνται πλέον στην HPLC λόγω της υψηλής πίεσης που χρειάζεται να ασκηθεί.

2. Σωματίδια με επιφανειακό πορώδες. Έχουν αντικαταστήσει τα μη πορώδη πληρωτικά υλικά. Είναι σωματίδια με έναν στερεό πυρήνα και μια λεπτή ενεργή επιφανειακή στιβάδα. Το πληρωτικό υλικό έχει έναν εσωτερικό συντηγμένο πυρήνα ή έναν πυρήνα μη πορώδους σωματιδίου και ένα εξωτερικό πορώδες κέλυφος. Με αποτέλεσμα, οι αναλύτες να έρχονται σε αλληλεπίδραση μόνο με το εξωτερικό κέλυφος, έτσι μειώνεται η αντίσταση της μεταφοράς μάζας και αυτά τα σωματίδια παρέχουν πολύ υψηλή διαχωριστική απόδοση.

3. Κλασικές ρητίνες ιοντοανταλλαγής. Πλέον δεν χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς διαχωρισμούς. Όμως, χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του νερού, για διαχωρισμούς μετάλλων μεγάλης κλίμακας και για την μετατροπή κάποιας ουσίας από μία ιοντική της μορφή σε μία άλλη (σε εργαστηριακή κλίμακα). Υπάρχουν 4 τύποι ρητινών ιοντοανταλλαγής που χρησιμοποιούνται: 1) ισχυρά όξινης, 2) ισχυρά βασικές, 3) ασθενώς όξινης και 4) ασθενώς βασικές.

4. Ρητίνες ανταλλαγής κατιόντων. Αποτελούνται από λειτουργικές χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες το κατιόν είναι κινητό και μπορεί να αντικατασταθεί από κάποιο άλλο κατιόν.

Η χωρητικότητα ανταλλαγής μίας ρητίνης ορίζεται ως το σύνολο των ισοδύναμων του υδρογόνου που μπορεί να αντικατασταθεί ανά μονάδα όγκου ή ανά μονάδα μάζας της ρητίνης. Η χωρητικότητα ανταλλαγής κυμαίνεται περίπου από 1 έως 4 χιλιοϊστοδύναμα ανά γραμμάριο. Όσο μικρότερη είναι η χωρητικότητα ανταλλαγής μίας στήλης, τόσο πιο μικρή είναι η κατακράτηση της διαλυμένης ουσίας.

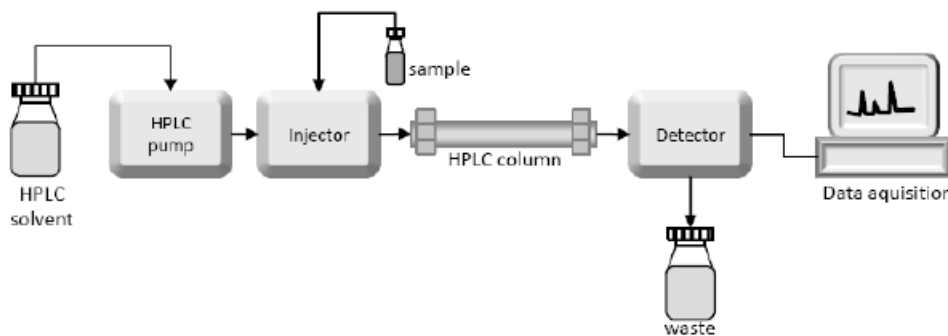
5. Οι ρητίνες ανταλλαγής ανιόντων αποτελούνται από μόνιμες κατιοντικές ή πρωτονιομένες κατιοντικές ομάδες, οι οποίες είναι σταθερά προσκολλημένες στη ρητίνη.

6. Μια μονολιθική στήλη περιέχει μόνο μία στερεή ράβδο, η οποία είναι διάτρητη παντού από ένα δίκτυο πόρων.^[9]

1.5. Οργανολογία-εξοπλισμός HPLC

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται κυρίως από:

1. ένα σύστημα παροχής της κινητής φάσεως, δηλαδή τους διαλύτες και την αντλία
2. ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δηλαδή τον εγχυτήρα
3. τη χρωματογραφική στήλη που περιέχει την στατική φάση
4. τον ανιχνευτή
5. τον καταγραφέα (έναν υπολογιστή) για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την εμφάνιση του χρωματογραφήματος



Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

1.5.1. Διαλύτες

Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα μείγμα διαλυτών, οι οποίοι είναι αποθηκευμένοι σε ξεχωριστά δοχεία. Πριν γίνει η ανάμειξη των διαλυτών θα πρέπει να γίνει μια επεξεργασία αυτών για την αποφυγή των προβλημάτων στην ροή λειτουργίας του υγρού χρωματογράφου. Κάθε σύστημα HPLC περιλαμβάνει φιάλες (γυάλινες ή από ανοξείδωτο χάλυβα), οι οποίες περιέχουν διάφορες ουσίες που μπορούν να απομακρύνουν τα διαλυμένα αέρια (οξυγόνο και άζωτο) που βρίσκονται στους διαλύτες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται απαέρωση και γίνεται σε θερμαινόμενους θαλάμους. Σε περίπτωση που οι διαλύτες δεν απαερωθούν σωστά οι σχηματιζόμενες φυσαλίδες θα οδηγήσουν σε απώλεια ροής του διαλύτη ή σε οξεία διάσπαση του χρωματογραφήματος. Στη συνέχεια οι διαλύτες περνούν από ένα φίλτρο διηθήσεως το οποίο θα συγκρατήσει τα υπολείμματα σκόνης και αιωρούμενης ύλης.^[9]

Έπειτα μέσω της βαλβίδας αναμείξεως γίνεται η ανάμειξη των διαλυτών. Υπάρχουν 2 επιλογές, η πρώτη ονομάζεται ισοκρατική έκλυση και η δεύτερη βαθμιδωτή έκλυση. Στην ισοκρατική έκλυση η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, δηλαδή οι διαλύτες αναμιγνύονται με σταθερή αναλογία. Από την άλλη πλευρά στην βαθμιδωτή έκλυση η αναλογία ανάμειξης των διαλυτών μεταβάλλεται προοδευτικά με την εξέλιξη του χρωματογραφήματος. Πιο συγκεκριμένα, η ανάμειξη προγραμματίζεται δημιουργώντας στην αρχή ένα πιο “αδύναμο” διαλύτη και στη συνέχεια έναν “ισχυρότερο”. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται περισσότερες και καλύτερες διαχωρισμένες και ευδιάκριτες κορυφές στο χρωματογράφημα.^[9]

Στα σύγχρονα συστήματα HPLC χρησιμοποιείται η μέθοδος της βαθμιδωτής έκλουσης. Υπάρχουν βαθμιδωτά συστήματα άντλησης ακόμα και με τέσσερις βαθμίδες. Η αρχή λειτουργίας αυτών των συστημάτων είναι το σημείο μεταβολής της σύστασης του διαλύτη το οποίο μπορεί να γίνεται με χαμηλή πίεση στην αρχή της τροφοδοσίας ή με υψηλή πίεση στην έξοδο της αντλίας. Σε κάθε σύστημα HPLC βαθμίδας υψηλής πίεσης υπάρχουν δοχεία με διαφορετικούς διαλύτες προς ανάμειξη, κάθε δοχείο είναι συνδεδεμένο με τη δική του αντλία. Για την ανάμειξη των διαλυτών υπάρχει ένας θάλαμος είτε παθητικής είτε ενεργητικής ανάμειξης και μέσω ενός προγράμματος βαθμίδων, ελέγχεται ο ρυθμός παροχής των 2 αντλιών. Ο ολικός ρυθμός παραμένει πάντα σταθερός, αλλά διαφέρει μεταξύ των αντλιών. Ένα τέτοιο σύστημα είναι αρκετά ακριβό.^[9]

Σε ένα σύστημα βαθμιδωτής άντλησης με χαμηλή πίεση γίνεται χρήση ανεξάρτητων δίθυρων βαλβίδων όπου η θύρα εισόδου συνδέεται με τις φιάλες των διαλυμάτων και οι θύρες εξόδου των βαλβίδων συνδέονται σε μια κοινή, η οποία καταλήγει στην αντλία.

1.5.2. Σύστημα διανομής της κινητής φάσης

Αφού γίνει η κατεργασία και η ανάμειξη των διαλυτών προς σχηματισμό της κινητής φάσης εισέρχεται στο σύστημα διανομής, με τη βοήθεια του οποίου θα καταλήξει εντός του συστήματος του χρωματογράφου. Το σύστημα διανομής του διαλύτη αποτελείται από 4 τμήματα. Μια αντλία, όπου είναι το κύριο και πιο σημαντικό μέρος του εξοπλισμού, ένα φίλτρο εισόδου, ένα σύστημα απαέρωσης και έναν παλμικό αποσβεστήρα. Αναλυτικότερα το φίλτρο εισόδου αποτελείται από τρίμμα ανοξειδωτού χάλυβα με μέγεθος πόρων 0,2μm και βρίσκεται πριν την αντλία. Ο ρόλος του είναι να φιλτράρει το υγρό έκλουσης από σωματίδια που μπορεί να δημιουργήσουν φθορές στο έμβολο, στη βαλβίδα ελέγχου και στη στήλη. Γι' αυτόν τον λόγο συνήθως προτιμούνται διαλύτες υψηλής καθαρότητας για τη HPLC. Στη συνέχεια το σύστημα απαέρωσης χρησιμοποιείται για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Γενικότερα, η διαλυτότητα του αέρα είναι υψηλότερη σε οργανικούς διαλύτες και επειδή γνωρίζουμε ότι η διαλυτότητα των αερίων μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, το διάλυμα έκλουσης πριν εισαχθεί στην αντλία περνά μέσα από έναν θερμαινόμενο απαερωτή για τη μείωση των διαλυμένων αερίων. Σε αντίθετη περίπτωση οι φυσαλίδες θα δημιουργήσουν προβλήματα στην λειτουργία της βαλβίδας ελέγχου, της αντλίας και του ανιχνευτή. Αυτός ο τρόπος απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων ονομάζεται απαέρωση υπό κενό διαμέσου διαπερατής μεμβράνης από αέρια και είναι αυτός που χρησιμοποιείται περισσότερο καθώς απομακρύνει το 75 με 95% του διαλυμένου αέρα. Ένας άλλος τρόπος απαέρωσης είναι με την εισαγωγή φυσαλίδων ηλίου οι οποίες εκτοπίζουν τις φυσαλίδες αερίων. Η μέθοδος αυτή είναι περισσότερο αποτελεσματική από την προηγούμενη αλλά απαιτεί μεγαλύτερη προσοχή και φροντίδα.^[9]

Το σημαντικότερο και κυριότερο μέρος του συστήματος διανομής της κινητής φάσης είναι η αντλία. Οι αντλίες ενός συστήματος HPLC είναι θετικής εκτόπισης και βασίζονται στην ιδιότητα των ασυμπίεστων υγρών. Η πιο κοινή αντλία που χρησιμοποιείται στην HPLC είναι η παλινδρομική αντλία (μονού ή διπλού εμβόλου).^[9]

Πιο συγκεκριμένα, η αντλία μονού εμβόλου αποτελείται από έναν θάλαμο που υπάρχει το έμβολο και 2 βαλβίδες ελέγχου στην είσοδο και στην έξοδο. Όταν γίνεται η αναρρόφηση του

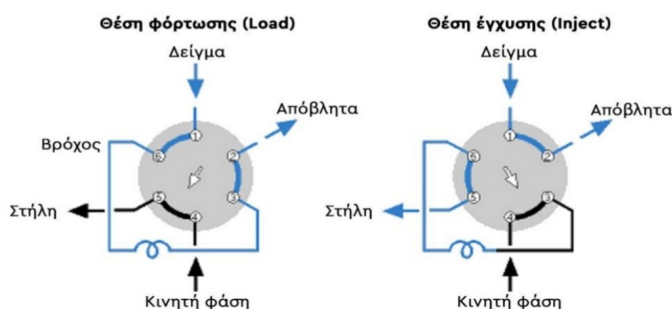
υγρού η βαλβίδα εξόδου είναι κλειστή ενώ όταν κινείται το έμβολο η βαλβίδα εξόδου ανοίγει. Αυτή η λειτουργία αποσκοπεί στην όσο το δυνατόν μικρότερη διαρροή του υγρού. Ο θόρυβος και οι κραδασμοί που δημιουργούνται από αυτές τις αντλίες κατά την κίνηση του εμβόλου πρέπει να εξαλείφονται. Γι' αυτό τον σκοπό γίνεται χρήση παλμικών αποσβεστήρων, μια συσκευή από εύκαμπτο υλικό. Καθώς το υγρό έκλουσης βγαίνει από την αντλία περνά μέσα από τον παλμικό αποσβεστήρα και μετά εισέρχεται στο κύριο σύστημα του HPLC. ^[9]

Σήμερα οι αντλίες τέτοιου τύπου δεν χρησιμοποιούνται τόσο συχνά λόγω των μειονεκτημάτων τους όπως η μικρή χωρητικότητα, η υψηλή πίεση εξόδου αλλά και ο μηχανικός παλμός που δημιουργείται με την κίνηση του εμβόλου. Έχουν όμως αντικατασταθεί από τις αντλίες διπλού εμβόλου. Η λειτουργία αυτών γίνεται με τη βοήθεια υπολογιστή όπου δίνεται κίνηση στις 2 βαλβίδες των 2 κεφαλών των 2 εμβόλων και έτσι οι κραδασμοί μειώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι αυτές στις αντλίες μονού εμβόλου. ^[9]

Υπάρχουν και οι αντλίες σύριγγας, οι οποίες αποτελούνται από μια μηχανοκίνητη σύριγγα με όγκο τέτοιο, ώστε να μη χρειάζεται να ξαναγεμίσει για να ολοκληρωθεί η χρωματογραφική ανάλυση. Η λειτουργία βασίζεται σε μια βαλβίδα με 3 θύρες η οποία περιστρέφεται ανάλογα προς τη φιάλη του διαλύτη για να γίνει η αναρρόφηση και η τροφοδότηση της σύριγγας. Η βαλβίδα περιστρέφεται ξανά και συνδέεται με τον εχγυτήρα. Το πλεονέκτημα μιας τέτοιας αντλίας είναι η μη παλμική λειτουργία και χρησιμοποιείται για συστήματα που έχουν μεγάλη ευαισθησία στους παλμούς. Τέλος, οι πνευματικές αντλίες είναι πιο απλές με μικρότερο κόστος αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με βαθμιδωτή έκλυση, έχουν μικρή χωρητικότητα και δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν μεγαλύτερες πιέσεις από 2.000psi. ^[1]

1.5.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Σε ένα σύστημα HPLC για την εισαγωγή του δείγματος χρησιμοποιείται μια βαλβίδα έγχυσης η οποία αποτελείται από ένα ρότορα με 3 σχισμές, ένα στάτορα με 6 θύρες και έναν βρόχο. Οι θύρες βαθμονομούνται από το 1 έως το 6 ξεκινώντας από πάνω και δεξιόστροφα. Πιο συγκεκριμένα, στη θύρα 2 εισέρχεται το δείγμα με τη βοήθεια μιας σύριγγας είτε αυτόματα είτε χειροκίνητα, από εκεί το δείγμα οδηγείται μέσω της πρώτης σχισμής του ρότορα στη θύρα 1, η οποία συνδέεται με τον βρόχο που σταδιακά γεμίζει και καταλήγει στη θύρα 4. Από εκεί μέσω της δεύτερης σχισμής του ρότορα οδηγείται στη θύρα 3 των αποβλήτων. Η θύρα 6 είναι συνδεδεμένη με την αντλία όπου εισέρχεται η κινητή φάση και μέσω της τρίτης σχισμής του ρότορα κατευθύνεται στη θύρα 5, η οποία οδηγεί στη χρωματογραφική στήλη. Η ανάμειξη του δείγματος με την κινητή φάση επιτυγχάνεται με την περιστροφή του ρότορα κατά 60° όπου πλέον η βαλβίδα έχει μπει σε θέση έγχυσης. Στη θέση αυτή η κινητή φάση που εισέρχεται από τη θύρα 6 μεταβιβάζεται στη θύρα 1 και σταδιακά παρασέρνει το δείγμα μέσα από το βρόχο στη θύρα 4 και από εκεί στη θύρα 5. Με αυτό τον τρόπο η κινητή φάση που πλέον περιέχει και το δείγμα προς εξέταση μεταφέρεται και εισάγεται στην αναλυτική στήλη. ^[9]



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος εισαγωγής δείγματος

1.5.4. Χρωματογραφική Στήλη

Η χρωματογραφική στήλη περιέχει τη στατική φάση, στην οποία θα γίνει και ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η εσωτερική διάμετρος και το μήκος της είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς αυτά επηρεάζουν τους ρυθμούς κατακράτησης και τους χρόνους έκλυσης των ουσιών. Επιπλέον κρίσιμος παράγοντας της απόδοσης και αποτελεσματικότητας της αναλυτικής στήλης είναι και η θερμοκρασία της, η οποία θα πρέπει να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται κάποιοι θερμοστάτες, οι οποίοι διατηρούν σταθερή και ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας εντός της στήλης.^[22]

Μια αναλυτική στήλη κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χάλυβα με εσωτερικά τοιχώματα διαμέτρου κυρίως 4,6mm αλλά και 4mm ή 2,1 mm. Αυτές που έχουν διάμετρο 1mm ονομάζονται τριχοειδείς στήλες. Στην είσοδο και στην έξοδο υπάρχει υαλότριμμα, το οποίο λειτουργεί ως φίλτρο και ρυθμιστής της ομοιόμορφης κατανομής της κινητής φάσης εντός της στήλης. Το μήκος των στηλών μπορεί να είναι από 5 έως 250mm. Είναι γνωστό ότι η απόδοση της στήλης αυξάνεται σχεδόν αντιστρόφως ανάλογα με την διάμετρο των σωματιδίων.^[9]

Οι τύποι πληρωτικού υλικού που χρησιμοποιούνται στην HPLC μπορεί να είναι:

- i. Silica με συνδεδεμένη φάση. Το υλικό αυτό αποτελείται από σωματίδια SiO_2 τα οποία επικαλύπτονται από μια λεπτή οργανική στοιβάδα.

- ii. Μικροπορώδη πολυμερική ρητίνη. Το υλικό αυτό αποτελείται από τη σύνδεση διασταυρούμενων συμπολυμερών και ονομάζεται gel
- iii. Μακροπορώδη πολυμερική ρητίνη. Τα συμπολυμερή είναι περισσότερο διασταυρούμενα δημιουργώντας ένα μεγαλύτερο πυρηνικό πλέγμα από περισσότερα gel με μεγαλύτερους πόρους.
- iv. Υμενοειδή σωματίδια. Το υλικό αποτελείται από έναν γυάλινο ή πολυμερή πυρήνα, ο οποίος είναι αδρανής, μη πορώδης και επικαλύπτεται από μια λεπτή πορώδη στοιβάδα silica.^[1]

Πιο συγκεκριμένα, οι 3 στήλες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οι ακόλουθες:

1. Στήλη C18

Οι χρωματογραφικές στήλες C18 περιέχουν ως στατική φάση την ουσία C18 ή αλλιώς οκταδεκυλοσιλάνιο (ODS), το μόριο της οποίας αποτελείται από 18 μόρια άνθρακα. Λόγω αυτού μπορούμε να εντοπίσουμε οποιαδήποτε παραλλαγή στην ένωση.^[8]

Τα κύρια χαρακτηριστικά της στήλης αυτής είναι τα παρακάτω:

- A. Η στήλη αποτελείται από υβριδικό πυρίτιο οργανικό ή ανόργανο
- B. Η περιεκτικότητα σε άνθρακα είναι 20%
- C. Το μέγεθος των σωματιδίων που μπορούν να περάσουν είναι 2, 3 και 5μm
- D. Το μέγεθος των πόρων είναι 120 Å
- E. Ο τύπος συγκόλλησης είναι πολυμερές
- F. Το εύρος του είναι 1 με 12

Τα πλεονεκτήματα της στήλης C18 είναι αρχικά το χαμηλό κόστος, η εύκολη χρήση και η ανθεκτικότητα. Είναι κατάλληλη για χαμηλές συνθήκες πίεσης, λόγω της ομοιογενούς με ομοιόμορφα σωματίδια ουσίας που περιέχει και συμβατή με κάθε σύγχρονο ή παλιό εξάρτημα και σύστημα της HPLC. Επίσης οι στήλες αυτές υπάρχουν σε διάφορα μεγέθη κατάλληλες για διαχωρισμό βασικών και ουδέτερων ουσιών λόγω του μεγάλου εύρους υδροφοβικότητας και pH. Τέλος είναι ικανή να παράγει καθαρές κορυφές για την πιο εύκολη και αποτελεσματική ανάλυση.^[8]

2. Στήλη C18-Aqueous

Τέτοιες χρωματογραφικές στήλες βασίζονται σε εξαιρετικά καθαρή ουσία silica gel και είναι ανθεκτικές στο νερό με 100% υδατική φάση.

Χαρακτηριστικά μιας τέτοιας στήλης είναι η μοναδική συγκόλληση στατικής φάσης με τεχνολογία διπλής σφράγισης, εύρος pH 1,5-10, στατική φάση C18, μέγεθος σωματιδίων 3, 5 και 10μm, μέγεθος πόρων 120 Å, ειδική επιφάνεια 320m²/g και περιεκτικότητα σε άνθρακα 20%. Τα πλεονεκτήματα της C18-Aqueous είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής και η παραγωγή καλής συμμετρίας σχήματος κορυφής που δίνει.^[6]

3. Στήλη Aminex

Οι χρωματογραφικές στήλες Aminex χρησιμοποιούνται για ανάλυση οργανικών οξέων και αλκοολών αλλά και μικρών όξινων και πολικών μορίων. Είναι γεμάτες με ένα πολυμερές διβινυλοβενζόλιο πολυστυρολίου, οι εκλούσεις είναι ισοκρατικές με νερό ή αραιό οξύ και τα δείγματα πριν περάσουν μέσα από αυτή χρειάζονται μόνο ένα φιλτράρισμα από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm.^[42]

Οι μέθοδοι HPLC που χρησιμοποιούν στήλες Aminex χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς αποκλεισμού ιόντων, απαλλαγής ιόντων και καταμερισμού κανονικής φάσης. Έχουν υψηλή απόδοση και επιλεκτικότητα, σταθερότητα υψηλής πίεσης και pH.^[42]

Εκτός από την αναλυτική-χρωματογραφική στήλη υπάρχουν οι βοηθητικές στήλες που ονομάζονται προστήλες-προκορεστές ασφαλείας και οι βραχείς αναλώσιμες στήλες που ονομάζονται guard columns. Οι πρώτες τοποθετούνται ανάμεσα από την αντλία και το σύστημα εισαγωγής και έχουν σκοπό να διασφαλίσουν τον κορεσμό της κινητής φάσης, ώστε να μην διαλυθεί από την στατική καθώς εισέρχεται μέσα από τη στήλη. Οι δεύτερες τοποθετούνται μεταξύ της βαλβίδας εισαγωγής του δείγματος και της αναλυτικής στήλης με σκοπό την κατακράτηση υπολειμμάτων που θα επιμολύνουν και θα μεταβάλλουν την απόδοση της αναλυτικής στήλης αλλά και την κατακράτηση ισχυρά προσροφούμενων ενώσεων οι οποίες δε θα μπορούσαν να εκλουστούν. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η φθορά και παρατείνεται ο χρόνος ζωής της αναλυτικής στήλης.^[9]

1.5.5. Ανιχνευτές

Ένας ανιχνευτής για να θεωρηθεί αξιόπιστος και αποτελεσματικός θα πρέπει να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Υψηλή ευαισθησία
2. Χαμηλό όριο ανίχνευσης
3. Να μη μετατοπίζεται πολύ η γραμμή βάσης του κατά τη διάρκεια μιας πολύωρης χρωματογραφικής διαδικασίας
4. Η απόκριση των ουσιών και η καταγραφή των δεδομένων πρέπει να γίνονται γρήγορα
5. Απουσία ευαισθησίας σε μικρές μεταβολές της παροχής και της θερμοκρασίας
6. Να διαθέτει μεγάλο εύρος γραμμικότητας, διευκολύνοντας έτσι την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων

Βάση του τελευταίου, υπάρχουν πολλοί ανιχνευτές που είναι μη γραμμικοί και έτσι χρειάζεται η ενσωμάτωση ενός επιπλέον οργάνου που να 'γραμμικοποιεί' το αποτέλεσμα. Δυστυχώς, η διαδικασία αυτή δεν ελέγχεται και δεν παρακολουθείται από τον χρήστη, αλλά είναι ήδη ρυθμισμένη από τον κατασκευαστή.^[9]

Οι ανιχνευτές διαχωρίζονται σε 2 τύπους με βάση την ικανότητά τους να αποκρίνονται στις διάφορες ουσίες. Η πρώτη είναι η ολική απόκριση, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην έρευνα. Η δεύτερη είναι η εκλεκτική απόκριση, η οποία χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να εξετάσουμε μια συγκεκριμένη ουσία.

Διάφορα είδη ανιχνευτών

- A) Ανιχνευτές UV-VIS
- B) Ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων
- C) Ανιχνευτές ηλεκτρικής αγωγιμότητας
- D) Ανιχνευτές δείκτης διάθλασης
- E) Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- F) Ανιχνευτές σκεδαζόμενης ακτινοβολίας
- G) Φασματοσκοπικοί ανιχνευτές μάζας
- H) Ανιχνευτές φθορισμού

A. Ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-VIS)

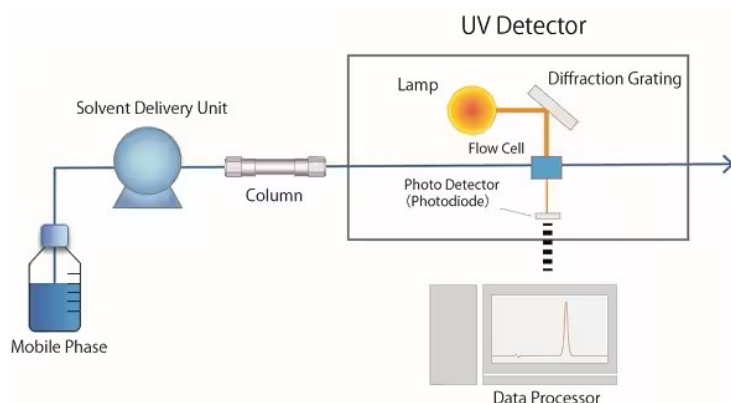
Οι ανιχνευτές UV-VIS ταξινομούνται στην κατηγορία των ανιχνευτών απορρόφησης και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ενώσεων που έχουν χρωμοφόρο, δηλαδή αυτές που απορροφούν το φως. Έχουν καλή ευαισθησία, σταθερότητα και είναι εύκολοι στον χειρισμό.

Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση HPLC. Η υπεριώδη ακτινοβολία έχει μήκος κύματος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 200nm και 400nm και με έναν ανιχνευτή UV μπορούμε να προσδιορίσουμε την περιοχή κορυφής και το ύψος της σε μόνο ένα ή δύο ξεχωριστά μήκη κύματος. Η λειτουργία ενός τέτοιου ανιχνευτή βασίζεται στην απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας του δείγματος. Γι' αυτόν τον λόγο, είναι πολύ σημαντικό να επιλέγεται το κατάλληλο μήκος κύματος με βάση τον τύπο της ουσίας που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα, δηλαδή το υγρό έκλουσης που εξέρχεται από την χρωματογραφική στήλη, εισέρχεται σε γυάλινη κυψελίδα ροής από την οποία διέρχεται η υπεριώδης ακτινοβολία από πηγή φωτός λυχνίας δευτερίου (λυχνία D₂). Μέρος αυτής απορροφάται από τα μόρια του δείγματος. Η ένταση της ακτινοβολίας που ανιχνεύεται όταν η δέσμη φωτός περάσει από το διάλυμα κινητής φάσης που δεν περιέχει την ουσία προς ανάλυση θα διαφέρει από αυτήν που περιέχει το δείγμα. Η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας προσδιορίζεται με τον υπολογισμό των δύο εντάσεων του υπεριώδους που ανιχνεύονται και καταγράφονται. ^{[1],[9]}

Ο ανιχνευτής UV-VIS χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να επιλέξουμε ένα μεγαλύτερο μήκος κύματος, αφού το ορατό έχει εύρος μήκους κύματος μεταξύ 400nm και 800nm. Για την λειτουργία ενός ανιχνευτή UV-VIS χρησιμοποιείται πηγή φωτός λυχνίας βολφραμίου (λυχνία W). Το φως από τον λαμπτήρα κατευθύνεται σε ένα πλέγμα περίθλασης και έτσι το φως διαχέεται στα μήκη κύματος που το αποτελούν. Έπειτα το πλέγμα περιστρέφεται και κατευθύνει δέσμη φωτός ενός μόνο μήκους κύματος μέσα από την κυψελίδα και το δείγμα. Τέλος καταλήγει σε μια φωτοδίοδο όπου ανιχνεύεται η απορρόφηση, καταγράφεται και το αποτέλεσμα οπτικοποιείται σε 2 διαστάσεις, αυτή της έντασης και του χρόνου.^[9] Οι ανιχνευτές UV-VIS μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω 2 κατηγορίες:

1. Ανιχνευτές σταθερού μήκους κύματος στους οποίους το μήκος κύματος είναι συνήθως τα 254nm, τα οποία και ρυθμίζονται πάντα πριν την έγχυση του δείγματος στον εγχυτήρα του οργάνου της HPLC. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται λάμπα υδραργύρου χαμηλής πίεσης. Αποτελούν τους πιο παλιούς, φθηνούς και απλούς ανιχνευτές UV-VIS.

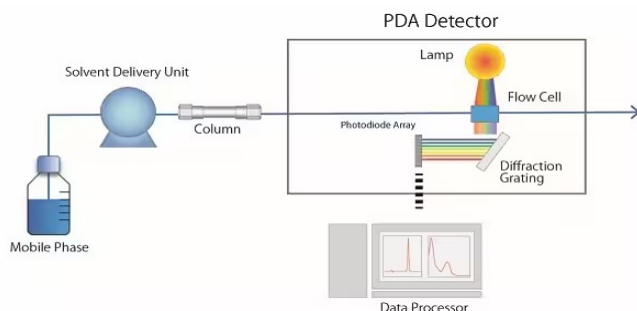
2. Ανιχνευτές μεταβλητού μήκους κύματος, οι οποίοι μπορούν να προγραμματιστούν με σκοπό να αλλάζουν μήκη κύματος κατά την διάρκεια εξέλιξης μιας χρωματογραφικής ανάλυσης.



Εικόνα 3: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή UV

B. Ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array Detectors, PDA) ή Ανιχνευτές συστοιχίας διόδων (Diode Array Detectors, DAD)

Οι ανιχνευτές DAD ταξινομούνται και αυτοί στους ανιχνευτές απορρόφησης, έχουν καλή ευαισθησία και σταθερότητα. Έχουν την ικανότητα να καταγράψουν μεγάλο εύρος μήκος κύματος ακόμη και ολόκληρο το φάσμα. Μπορούν να προσδιορίσουν την περιοχή κορυφής, το ύψος της κορυφής και το μήκος κύματος. Η διαφορά ενός τέτοιου ανιχνευτή με έναν ανιχνευτή UV-VIS είναι ότι στους DAD το φως από τους λαμπτήρες εκπέμπεται απευθείας στην κυψελίδα με το δείγμα και στη συνέχεια προσπίπτει στο πλέγμα περίθλασης όπου διαχέεται. Το διασκορπισμένο φως κατευθύνεται σε μια σειρά από φωτοδιόδους, όπου η κάθε μια ποσοτικοποιεί ένα διαφορετικό μήκος κύματος. Τα μειονεκτήματα των ανιχνευτών συστοιχίας διόδων είναι ο μεγάλος θόρυβος και η ευαισθησία σε διάφορες αλλαγές, όπως σε διακυμάνσεις της λυχνίας.^{[1],[9]}



Εικόνα 4: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή PDA

C. Ανιχνευτές ηλεκτρικής αγωγιμότητας

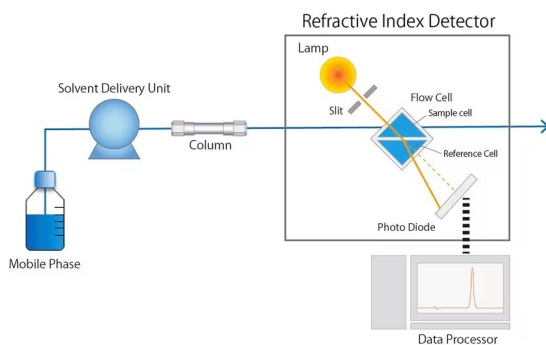
Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας χαρακτηρίζονται ως ανιχνευτές ιδιότητας κύριας μάζας και μετρούν την αγωγιμότητα της κινητής φάσης, δηλαδή ανιχνεύουν την ύπαρξη ιόντων σε ένα διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, ένας ανιχνευτής αγωγιμότητας μετρά την ικανότητα ενός διαλύματος να μεταφέρει ρεύμα όταν τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο. Η ικανότητα αυτή εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα. Γι' αυτόν τον λόγο οι ανιχνευτές αγωγιμότητας χρησιμοποιούνται σε χρωματογραφία ιόντων όπου μας επιτρέπεται η μέτρηση ανόργανων ιόντων και μικρών οργανικών ουσιών, όπως οργανικά οξέα και αμίνες. Η λειτουργία των ανιχνευτών ηλεκτρικής αγωγιμότητας βασίζεται στη μέτρηση της αντίστασης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων στην κυψελίδα. Τα δύο ηλεκτρόδια είναι φτιαγμένα από ανοξείδωτο χάλυβα, είναι σε σχήμα δίσκου και απέχουν μεταξύ τους 1mm. Τοποθετείται και ένας αισθητήρας θερμοκρασίας σε σημείο όπου να έχει επαφή με το υγρό, με σκοπό να ελέγχεται η θερμοκρασία. Αυτό απαιτείται καθώς οι ανιχνευτές αγωγιμότητας είναι ευαίσθητοι στις μεταβολές θερμοκρασίας, δηλαδή ακόμα και μια αλλαγή 1°C προκαλεί 2% αλλαγή στην ηλεκτρική αγωγιμότητα. Μετά, λοιπόν, την έκλουση των ιόντων εφαρμόζεται σταθερή τάση μεταξύ του ζεύγους ηλεκτροδίων και ανιχνεύεται η αλλαγή στο ρεύμα. Σε περίπτωση που υπάρχουν ιόντα στην κινητή φάση, τότε ρέει ρεύμα το οποίο παράγει σήμα και ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή. Το σήμα αυτό είναι ανάλογο με την συγκέντρωση των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα και εξαρτάται από το φορτίο και το μέγεθος της προς ανάλυση ουσίας. Είναι γνωστό ότι οι μικρές και περισσότερο φορτισμένες ενώσεις παράγουν μεγαλύτερο σήμα από μεγαλύτερες ενώσεις, λιγότερο φορτισμένες.^{[1],[9]}

D. Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index, RID)

Οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης είναι ανιχνευτές γενικής χρήσης και χρησιμοποιούνται για ανίχνευση δειγμάτων που δεν απορροφούν το υπεριώδες, όπως σάκχαρα, αλκοόλη και ανόργανα ιόντα. Τα μειονεκτήματα ενός τέτοιου ανιχνευτή είναι ότι ο δείκτης διάθλασης μεταβάλλεται με αλλαγές της θερμοκρασίας, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ένας θερμοστατικός οπτικός παρεμποδιστής, ώστε να εξισορροπείται η θερμοκρασία του υγρού πριν εισέλθει στην κυψελίδα. Επιπλέον, υπάρχει ασυμβατότητα της λειτουργίας του ανιχνευτή με τη λειτουργία της βαθμιδωτής έκλουσης του διαλύτη. Αυτό γίνεται, γιατί κατά την βαθμιδωτή μεταβολή του διαλύτη μεταβάλλεται και η σύσταση του εκλούσματος και κατά συνέπεια και ο δείκτης διάθλασης.^{[1],[9]}

Η πλειοψηφία των συστημάτων HPLC με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης βασίζονται στο διαφορικό διαθλασιόμετρο. Πιο αναλυτικά, το διαφορικό διαθλασιόμετρο αποτελείται από μια κυψελίδα χαλαζία η οποία χωρίζεται σε 2 διαμερίσματα-κυψελίδες. Η μια κυψελίδα γεμίζεται με τον επιλεγμένο διαλύτη και ονομάζεται κυψελίδα αναφοράς και στη δεύτερη κυψελίδα εισέρχεται το έκλουσμα από την χρωματογραφική στήλη και ονομάζεται κυψελίδα δείγματος. Εντός της κυψελίδας τοποθετείται κοίλο πρίσμα 45 μοιρών. Η μονοχρωματική δέσμη φωτός από την πηγή διέρχεται πρώτα από την κυψελίδα αναφοράς έπειτα από την κυψελίδα του δείγματος και στο τέλος προσπίπτει στον φωτοανιχνευτή. Ο τελευταίος αποτελείται από 2 πανομοιότυπες φωτοδιόδους οι οποίες παράγουν ρεύμα, των οποίων η διαφορά μετράται κατά την διαδικασία επεξεργασίας του σήματος. Όταν, λοιπόν, ο δείκτης διάθλασης από της κυψελίδα αναφοράς n_R είναι ίσος με τον δείκτη διάθλασης από την

κυψελίδα του δείγματος n_s , δηλαδή $n_R = n_s$, τότε παράγεται μηδενικό σήμα. Αυτό σημαίνει ότι και στις 2 κυψελίδες το υγρό είναι ίδιο και το έκλουσμα δεν περιέχει καμία άλλη ουσία. Όταν ισχύει $n_R \neq n_s$, τότε το έκλουσμα εκτός από τον διαλύτη περιέχει και άλλη ουσία και γι' αυτό ο δείκτης διάθλασης του υγρού της κυψελίδας του δείγματος αυξάνεται. Η διαφορά των δεικτών διάθλασης είναι ανάλογη με το σήμα που εξέρχεται από τον ανιχνευτή, το οποίο σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας προς ανάλυση.^[9]



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή δείκτη διάθλασης

Ε. Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (EC)

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ενώσεων που μπορούν να αναχθούν ή να οξειδωθούν. Θεωρούνται οι πιο ευαίσθητοι και εκλεκτικοί ανιχνευτές. Για την λειτουργία τέτοιων ανιχνευτών γίνεται χρήση ηλεκτρικά αγωγίμων κινητών φάσεων. Η μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται σε τρία ηλεκτρόδια, αυτό της αναφοράς, του δείγματος και ένα βοηθητικό. Μεταξύ των 2 ρώτων ηλεκτροδίων εφαρμόζεται μια σταθερά διαφορά δυναμικού, η οποία οδηγεί σε ηλεκτροχημική αντίδραση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου δείγματος. Καθώς λοιπόν γίνονται οι οξειδώσεις και οι αναγωγές των ουσιών παράγεται ρεύμα το οποίο εξισορροπείται από ένα αντίθετης κατεύθυνσης ρεύμα.^[9]

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές διακρίνονται στις 2 ακόλουθες κατηγορίες:

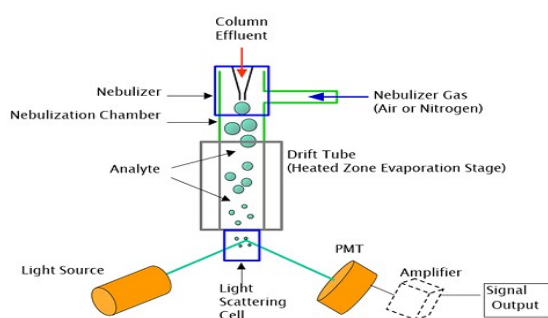
- Κουλομετρικοί ανιχνευτές EC, οι οποίοι χρησιμοποιούν ηλεκτρόδιο δείγματος από πορώδες γραφίτη τύπου Frit το οποίο δίνει δυνατότητα σχεδόν 100% απόδοση μετατροπής, πράγμα που τους κάνει και περισσότερο ευαίσθητους και ανθεκτικούς. Δίνουν μεγαλύτερο σήμα ωστόσο υπάρχει παραγωγή θορύβου.
- Αμπερομετρικοί ανιχνευτές EC, οι οποίοι χρησιμοποιούν ηλεκτρόδια λεπτής στρώσης σε σχήμα δίσκου. Σε σύγκριση με τους κουλομετρικούς ανιχνευτές έχουν χαμηλότερες αποδόσεις μετατροπής και έχουν τη δυνατότητα να μετατρέψουν μόνο το 5-10% της ηλεκτροχημικά αντιδραστικής αναλυόμενης ουσίας. Η χρήση τους δεν είναι ιδανική και εύκολη για γενικές αναλύσεις καθώς είναι ευαίσθητοι σε μικρές

μεταβολές στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οι οποίες προκαλούν αλλαγές στο τελικό σήμα.^[1]

F. Ανιχνευτές σκέδασης φωτός

Υπάρχουν 3 κατηγορίες ανιχνευτών που βασίζονται στην σκέδαση του φωτός, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω:

1. Ανιχνευτής σκέδασης εξατμιστικού φωτός (ELSD): Είναι ο πιο δημοφιλής και η λειτουργία του βασίζεται στην αρχή της μέτρησης σωματιδίων σε αερόλυμα, δηλαδή στην νεφελοποίηση της κινητής φάσης και της μέτρησης του σκεδαζόμενου φωτός από τα δημιουργούμενα σωματίδια. Αναλυτικότερα, το έκλουσμα εξέρχεται από την χρωματογραφική στήλη, εισέρχεται σε έναν θερμαινόμενο θάλαμο όπου και νεφελοποιείται. Τα μη πτητικά σωματίδια αιωρούνται σε αυτό το ρεύμα αερίου. Το φως σκεδάζεται από τα σωματίδια και η ανίχνευση γίνεται από ένα φωτοκύτταρο, το οποίο είναι τοποθετημένο υπό γωνία ως προς την προσπίπτουσα δέσμη φωτός. Η ένταση την ανίχνευσης σχετίζεται με την ποσότητα της ουσίας προς ανάλυση, είναι ανεξάρτητη από τον διαλύτη, τη θερμοκρασία και το ρυθμό ροής. Δεν απαιτείται χρήση χρωμοφόρων ενώσεων αλλά η κινητή φάση πρέπει να αποτελείται από πτητικές ουσίες. Πολύ μικρά σωματίδια σχηματίζονται από τα υπολείμματα των μη πτητικών ουσιών του υγρού έκλουσης το οποίο διέρχεται μέσα από φωτεινή δέσμη συνήθως διοδικού λέιζερ.^[9]



Εικόνα 6: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή σκέδασης εξατμιστικού φωτός

2. Ανιχνευτής σκέδασης φωτός με πυρήνα συμπύκνωσης (CNLSD): Με αυτήν τη μέθοδο αφού γίνει η εξατμηση της κινητής φάσης προστίθεται στα σωματίδια ένα κορεσμένο ρεύμα διαλύτη. Έτσι, σχηματίζονται πυρήνες συμπύκνωσης, δηλαδή το ρεύμα του αερολύματος μεγαλώνει τα σωματίδια προσλαμβάνουν φορτίο αυξάνονται σε μέγεθος και στη συνέχεια μπορούν να ανιχνευθούν πολύ πιο εύκολα.^[9]

3. Ανιχνευτής σκέδασης φωτός λέιζερ (LLSD) ή ανιχνευτής πολλαπλών γωνιών σκέδασης φωτός (MALS): Με αυτόν τον τύπο ανιχνευτή οι μετρήσεις γίνονται σε διαλύματα. Ως πηγή

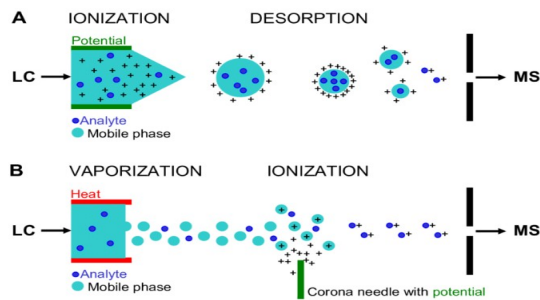
φωτός χρησιμοποιείται το λέιζερ. Το διάσπαρτο φως περνά μέσα από την κυψελίδα με το δείγμα και το σκεδαζόμενο φως ανιχνεύεται και μετράται από πολλές γωνίες. Με τα δεδομένα που λαμβάνουμε μπορούμε να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος και το μέγεθος της προς ανάλυσης ουσίας χωρίς να έχουμε χρησιμοποιήσει κάποιο πρότυπο διάλυμα αναφοράς και την ανάγκη δημιουργίας καμπύλης βαθμονόμησης.^[9]

G. Φασματοσκοπικοί ανιχνευτές μάζας ή φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC/MS)

Οι φασματοσκοπικοί ανιχνευτές μάζας σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελούν μια ενόργανη τεχνική εξαιρετικά ευέλικτη με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Μέσω αυτής μπορούν να αναλυθούν ενώσεις που είναι θερμικά ασταθές, έχουν υψηλή πολικότητα ή υψηλή μοριακή μάζα ακόμη και πρωτεΐνες. Η αρχή της λειτουργίας των φασματοσκοπικών ανιχνευτών μάζας βασίζεται στον ιονισμό των αναλυόμενων ουσιών. Η τεχνική αυτή μετρά την αναλογία μάζας/φορτίου. Η ανίχνευση των προς ανάλυση ουσιών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και έτσι αναγνωρίζεται η δομή αυτών και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους. Το σύστημα οργάνου HPLC/MS αποτελείται από ένα υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης και ένα φασματοφωτόμετρο μάζας τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας διεπαφής. Οι διεπαφές που χρησιμοποιούνται κοινώς είναι οι διεπαφές ιονισμού ηλεκτροψεκασμού και οι διεπαφές χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης.^{[1],[9]}

Η πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) χρησιμοποιείται για ανίχνευση ιονικών και πολικών μεγάλων μορίων, όπως οι πρωτεΐνες. Το διάλυμα του δείγματος διέρχεται μέσω της βελόνας ηλεκτροψεκασμού όπου εφαρμόζεται υψηλή διαφορά δυναμικού. Με αυτόν τον τρόπο τα φορτισμένα σταγονίδια ψεκάζονται από τη βελόνα και έχουν επιφανειακό φορτίο ίδιας πολικότητας με αυτό της βελόνας. Τα σταγονίδια κατευθύνονται προς τον κώνο και παράλληλα εξατμίζεται ο διαλύτης. Με την εξάτμιση του διαλύτη τα σωματίδια συρρικνώνονται και όταν φτάσει στο σημείο η επιφανειακή τάση να μη μπορεί να κρατήσει το φορτίο, το σωματίδιο σχίζεται. Έτσι, παράγονται φορτισμένα μόρια της ουσίας προς ανάλυση τα οποία εκπέμπονται και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας, ώστε να ανιχνευθούν.^[9]

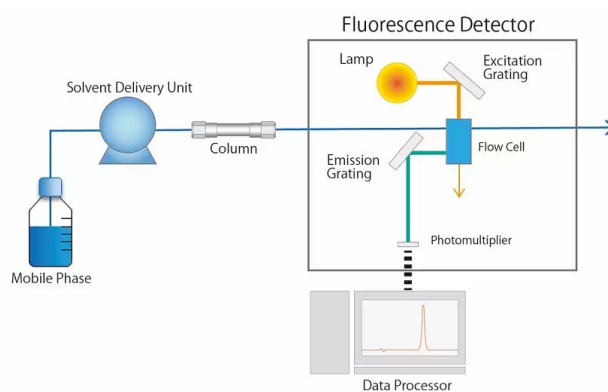
Ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) χρησιμοποιείται για μικρότερα μόρια και είναι ακατάλληλο για ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων. Η διαφορά με τον ESI βρίσκεται στον τρόπο πραγματοποίησης ιονισμού. Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα του δείγματος εισάγεται σε έναν πνευματικό νεφελοποιητή. Το έκλουσμα, δηλαδή, μεταφέρεται πρώτα σε έναν θερμό θάλαμο χαλαζία και έπειτα γίνεται μια κορωνοειδής εκκένωση όπου δημιουργούνται τα ιόντα. Με την εκκένωση κορώνας παράγονται πρωτογενή ιόντα αυτά αντιδρούν με τα μοριακά ιόντα του διαλύτη, σχηματίζονται δευτερογενή αέρια ιόντα αντιδρώντα συγκρούονται με την αναλυόμενη ουσία και σχηματίζονται ιόντα αναλυόμενης ουσίας που θα αναλυθούν από το φασματόμετρο μάζας.^[9]



Εικόνα 7: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας φασματοσκοπικών ανιχνευτών μάζας. (A) με πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και (B) με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI)

Η. Ανιχνευτές φθορισμού

Οι ανιχνευτές φθορισμού στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ουσιών που εκπέμπουν φθορισμό όταν εκτίθενται σε ακτινοβολία υπεριώδους φωτός. Πιο συγκεκριμένα, φθορισμό έχουμε όταν τα μόρια της προς ανάλυση ουσίας διεγείρονται και απορροφούν φως σε μήκος κύματος μεγάλης ενέργειας και έπειτα επιστρέφουν στο αρχικό επίπεδο εκπέμποντας φωτεινό σήμα μικρότερου μήκους κύματος, η ένταση του οποίου ανιχνεύεται από τον φθορομετρικό ανιχνευτή. Παρόλα αυτά δεν μπορούν όλες οι ενώσεις να έχουν απορρόφηση φθορισμού, δηλαδή να προκαλούν φυσικό φθορισμό και γι' αυτό θα πρέπει να δεχτούν κάποια ειδική επεξεργασία. Παράδειγμα τέτοιων ουσιών είναι τα αμινοξέα που μπορούν να γίνουν φθορίζουσες ουσίες μετά από παραγωγή, δηλαδή μια αντίδραση με ένα αντιδραστήριο-παράγωγο φθορισμού. Οι ανιχνευτές αυτοί χαρακτηρίζονται για την μεγάλη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ακρίβεια στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φθορίζουσων ουσιών. Η λειτουργία ενός ανιχνευτή φθορισμού βασίζεται σε ορισμένες αρχές. Αναλυτικότερα η παροχή-πηγή ρεύματος του συστήματος HPLC είναι ένας λαμπτήρας ευρέους φάσματος δευτερίου ή ξένου. Η ακτίνα υπεριώδους φωτός από την πηγή περνά μέσα από το δείγμα και αν περιέχει φθορίζουσα ουσία αυτή θα απορροφήσει μέρος της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, το οποίο επιλέγεται από ένα μονοχρωματικό φίλτρο που τοποθετείται σε ορθή γωνία ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία και μεταξύ του λαμπτήρα και της κυψελίδας. Μετά τη απορρόφηση εκπέμπεται η φθοριστική ακτινοβολία, το φθοριστικό σήμα αναλύεται ως προς την ένταση, η οποία είναι και ανάλογη με την συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας που περιέχει το δείγμα.^{[1],[9]}



Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας ανιχνευτή φθορισμού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Χημεία Οίνων

2.1. Οργανικά Οξέα

Τα οργανικά οξέα του οίνου μπορεί να προέρχονται είτε από το σταφύλι είτε να σχηματίζονται κατά τη ζύμωση του γλεύκους και τις μικροβιακές αλλοιώσεις του οίνου. Τα οργανικά οξέα που προέρχονται από το σταφύλι είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ, οι ποσότητες των οποίων ελαττώνονται κατά την ωρίμανση. Στο γλεύκος το τρυγικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα οργανικά οξέα. Από την άλλη τα οργανικά οξέα που σχηματίζονται από ζυμώσεις είναι το ηλεκτρικό οξύ και το γαλακτικό οξύ που συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου. Ακόμη, υπάρχουν οργανικά οξέα που μπορεί να προέρχονται από μικροβιακές αλλοιώσεις και να συμβάλλουν εξίσου στο άρωμα του οίνου, όπως είναι τα οξικό, κιτρομηλικό, διμεθυλογλυκερινικό, πυροσταφυλικό και α-κετογλουταρικό οξύ.^[3]

Πιο αναλυτικά:

1. Τρυγικό οξύ: αποτελεί το πιο σημαντικό οξύ των σταφυλιών έχοντας την μεγαλύτερη ισχύ και επίδραση στην οξύτητα του οίνου. Κατά την αλκοολική ζύμωση και την αποθήκευση, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες το τρυγικό οξύ σχηματίζει τρυγικά άλατα με τα ιόντα ασβεστίου και καλίου, τα οποία σχηματίζουν κρυστάλλους και καταβυθίζονται μειώνοντας έτσι την οξύτητα του οίνου. Η συγκέντρωσή του στο πράσινο σταφύλι είναι περίπου 15 g/L,

ενώ στο ώριμο περίπου 7,5 g/L. Γενικά είναι ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές, μπορεί όμως να προβληθεί από γαλακτικά βακτήρια αυξάνοντας έτσι την πτητική οξύτητα.

2.Μηλικό οξύ: έχει σημαντική επίδραση στον οργανοληπτικό προφίλ των οίνων. Η συγκέντρωσή του στα πράσινα σταφύλια είναι 15-25 g/L, ενώ στα ώριμα σταφύλια είναι 2-5 g/L. Είναι ευαίσθητο στις βακτηριακές προσβολές καθώς μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης αλλά και στις προσβολές από ζυμομύκητες καθώς μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα από το μικροοργανισμό *Schizosaccharomyces pombe* μέσω της μηλοαλκοολικής ζύμωσης.

3.Κιτρικό οξύ: Η συγκέντρωσή του στο σταφύλι είναι μέχρι 0,5 g/L και με την ευγενή σήψη μπορεί να φτάσει μέχρι 0,8-1,0 g/L. Προσβάλλεται εύκολα από γαλακτικά βακτήρια μειώνοντας έτσι την συγκέντρωσή του και αυξάνοντας την πτητική οξύτητα. Είναι ένα από τα οξέα που επιτρέπεται η προσθήκη του στο γλεύκος, αλλά όχι για την αύξηση της οξύτητας.

4. Γαλακτουρονικό οξύ: παράγεται μέσω υδρόλυσης των πηκτινών του σταφυλιού. Η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στους ερυθρούς οίνους και στα σταφύλια που έχουν προσβληθεί από τον μύκητα *Botrytis cinerea*.

5. Γλυκουρονικό οξύ: παράγεται με ενζυμική οξείδωση της γλυκόζης. Η παρουσία του συνδέεται και με προσβολή από τον μύκητα *Botrytis cinerea* ή βακτήρια.

6. Γλυκονικό οξύ: παράγεται με οξείδωση της αλδεϋδομάδας της γλυκόζης από το ένζυμο γλυκοξειδάση του μύκητα *Botrytis cinerea*.

7. Οξαλικό οξύ: στο γλεύκος ανιχνεύεται σε μικρές ποσότητες μπορεί όμως να σχηματιστεί με οξείδωση τρυγικού οξέος.

8. Ασκορβικό οξύ: γνωστό και ως βιταμίνη C, εντοπίζεται στο γλεύκος, αλλά κατά τη ζύμωση καταναλώνεται από τις ζύμες. Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό στους οίνους πάντα σε συνδυασμό με το θειώδες.

9. Ηλεκτρικό οξύ: Σχηματίζεται κατά τη ζύμωση και ανέρχεται σε ποσότητες 0,5-1,5 gr/l. Συμβάλλει στη γευστική ισορροπία καθώς συνδυάζει το ξινό, το αλμυρό και το πικρό. Πολύ ανθεκτικό σε βακτηριακές προσβολές.

10. Γαλακτικό οξύ: παράγεται από δράση των ζυμών κατά τη ζύμωση και των μηλογαλακτικών βακτηρίων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Υπάρχουν 2 ισομερή. Το (D-) σε ποσότητες 0,1-0,5gr/l (L+) σε ποσότητες 0,1-3gr/l.

11. Οξικό οξύ: παράγεται από αιθυλική αλκοόλη με τη βοήθεια βακτηρίων καθώς επίσης και από τη χημική της οξείδωση. Υψηλές συγκεντρώσεις αυτού είναι μη επιθυμητές καθώς προσδίδουν οσμή και γεύση ξιδιού στον οίνο.

12. Τα κετονικά οξέα, πυροσταφυλικό οξύ και α-κετογλουταρικό οξύ βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στον οίνο και σχηματίζονται μόνο κατά την αλκοολική ζύμωση.

2.2. Φαινολικές Ενώσεις

Τα φαινολικά συστατικά είναι μια κατηγορία χημικών ενώσεων με αρωματικό βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος έχει πυρηνόφιλο χαρακτήρα και τη χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης (-OH), η οποία έχει όξινο χαρακτήρα. Εντοπίζονται στην πρώτη ύλη, δηλαδή στα σταφύλια και συμβάλλουν στη γεύση, στην στυπτικότητα και στο χρώμα του οίνου.^[3]

Η παρουσία και η ποσότητα των φαινολικών συστατικών στον οίνο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών και τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες. Οι ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών και οίνοι συνήθως περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών συστατικών σε σύγκριση με τις λευκές ποικιλίες.

Οι φαινολικές ενώσεις διαιρούνται σε διάφορες οικογένειες, όπως:

1. Φαινολικά οξέα: στην οποία κατηγορία ανήκουν τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος.
2. Φλαβόνες: ενώσεις υπεύθυνες για το κόκκινο και μωβ χρώμα των οίνων, οι οποίες περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες (καμφερόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη), τις φλαβονονόλες και τις φλαβανόλες (διυδροκερκετίνη, διυδροκαμφερόλη).
3. Ανθοκυάνες: βρίσκονται στους φλοιούς και οφείλονται για τις πορφυρές, ερυθρές, μπλε και μωβ αποχρώσεις στον οίνο. Μπορούν να αντιδράσουν σε υδατικό διάλυμα με τη μορφή ετεροζιτών, οι οποίοι υδρολύονται εύκολα σε άγλυκα που ονομάζονται ανθοκυανιδίνες. Η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη είναι δύο εκ των πρόδρομων ανθοκυανιδινών σταφυλιών και οίνων. Η κυρίαρχη ανθοκυανιδίνη όμως είναι η μαλβιδίνη.
4. Τανίνες: ενώσεις υπεύθυνες για τη στυπτικότητα και την αίσθηση της "ξηρότητας" στον οίνο.

Τα φαινολικά οξέα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών μαζί με τα στιλβένια. Τα τελευταία αποτελούν πολυφαινόλες που περιέχουν δύο βενζολικούς δακτυλίους και μπορεί να συνδέονται με αιθύλιο ή αιθυλενική αλυσίδα και είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Παράδειγμα τέτοιας ένωσης είναι η ρεσβερατρόλη που απαντάται σε λευκούς και ερυθρούς οίνους.^[3]

2.3. Σάκχαρα

Τα σάκχαρα ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών ενώσεων και αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τους οργανισμούς. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), ολιγοσακχαρίτες (π.χ. σακχαρόζη) και πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο, κυτταρίνη).^[3]

Στο γλεύκος και τον οίνο, η συνολική ποσότητα των σακχάρων κυμαίνεται από 150 έως 300gr/l.^[3] Τα πιο σημαντικά είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ενώ σε μικρότερες ποσότητες ανέρχονται η γαλακτόζη και η σακχαρόζη. Οι πεντόζες ανήκουν στα μη ζυμώσιμα σάκχαρα.

Η αναλογία γλυκόζης/φρουκτόζης είναι αυτή που απασχολεί ιδιαίτερα τον οινολόγο. Στα άγουρα σταφύλια η γλυκόζη υπερτερεί, με την ωρίμανση η συγκέντρωση της φρουκτόζης αυξάνεται, ώσπου στην πλήρη ωρίμανση του σταφυλιού η αναλογία να φτάσει σχεδόν 1:1.

Επίσης, για συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ 170 και 200 g/l, η γλυκόζη ζυμώνεται ταχύτερα, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων (> 250g/l) ζυμώνεται περισσότερο η φρουκτόζη. Μεταξύ 200 και 250 g/l, και τα δύο σάκχαρα ζυμώνονται ισόποσα.^[3]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Εφαρμογές της HPLC στον οίνο

3.1. Ανθοκυάνες & Φαινολικά

Σε πρόσφατη έρευνα που διεξάχθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο της Μαδρίτης έγινε χρήση της HPLC και της φασματοσκοπίας μάζας με στόχο την ανάλυση των ανθοκυανών ερυθρών σταφυλιών και οίνων.^[12] Η φασματομετρία μάζας είναι μια ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να προσδιορίσει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά διάφορες χημικές ενώσεις. Αυτή η τεχνική στηρίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κατιόντων κυρίως) με την βοήθεια μιας κατάλληλης διάταξης και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των ιόντων που λαμβάνονται με την δομή της πρόδρομης ένωσης.^[22]

Βρέθηκαν 20 διαφορετικές ανθοκυάνες σε 19 διαφορετικά δείγματα εκχυλίσματος σταφυλιών αλλά και οίνων. Για πρώτη φορά μάλιστα ανιχνεύθηκαν cis και trans ισομερή παράγωγα της π-κουμαρυλικής αλκοόλης.

Γενικότερα η διαφοροποίηση των κρασιών ανάλογα με την ποικιλιακή τους σύνθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες αναλύσεις ποικίλων φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως ο καθορισμός των πρωτεϊνών, του χρώματος και των πολυφαινολών, των αμινοξέων, των

αρωματικών ενώσεων και η ανάλυση του DNA. Η τελευταία ανάλυση είναι η καλύτερη και πιο ακριβής, αλλά δυστυχώς στα γλεύκη και στα κρασιά παρουσιάζεται πολύ μικρή συγκέντρωση υπολειμματικού DNA και αυτό δρα σαν περιοριστικός παράγοντας.

Συχνές αναλύσεις ρουτίνας των ανθοκυανών περιλαμβάνουν φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές τεχνικές. Έτσι, η HPLC σε συνδυασμό με τους ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA ή αλλιώς DAD ανιχνευτές συστοιχίας διόδων) έχει γίνει η προτιμητέα μέθοδος παρακολούθησης ανθοκυανικών προφίλ. Παρόλα αυτά μερικές φορές οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιοδίων δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί στο να διαχωρίσουν συστατικά με παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά. Έτσι, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται παράλληλα με την HPLC, σαν βοηθητική τεχνική για την κατηγοριοποίηση των ανθοκυανών.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες διαδικασίες εκχύλισης των ανθοκυανών από τα σταφύλια και η ανάλυσή τους μέσω της HPLC. Σε μερικές περιπτώσεις κατά την διάρκεια της εκχύλισης γίνεται χρήση όξινων διαλυτών, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν μερική υδρόλυση των ακετυλιωμένων ανθοκυανών, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφορα σφάλματα. Ακόμη στην HPLC, όταν γίνεται χρήση ενός οργανικού οξέος ως ρυθμιστή οξύτητας μπορεί να προκύψουν αναλυτικά σφάλματα, όπως αυτά περιγράφονται όταν χρησιμοποιείται το μυρμηκικό οξύ. Στην σύγχρονη βιβλιογραφία η δομική αποσαφήνιση των ανθοκυανών γίνεται είτε με κλασμάτωση του δείγματος είτε με την χρήση διαφορετικών συνθηκών HPLC.^[12]

Στην ερυθρή οινοποίηση, ο εν ζυμώσει μούστος παραμένει για ένα εύλογο χρονικό διάστημα σε επαφή με τους φλοιούς και τα γίγαρτα των σταφυλιών, έτσι ώστε να εκχυλιστούν από αυτά τα επιθυμητά συστατικά, όπως ερυθρές χρωστικές και πολυφαινόλες που θα προσδώσουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν. Εφόσον ολοκληρωθεί η ζύμωση είναι πιθανό να ακολουθήσει ωρίμαση και παλαίωση του παραγόμενου οίνου σε δρύινα δοχεία με περιορισμένη επαφή με τον αέρα. Αυτή η διαδικασία συνήθως διαρκεί έως και 2 χρόνια (μπορεί και παραπάνω) και έπειτα ο οίνος εμφιαλώνεται και μπορεί να παλαιώσει περαιτέρω στην φιάλη. Κατά την διάρκεια των ανωτέρων διεργασιών οι ερυθρές χρωστικές, οι κατεχίνες, οι προανθοκυανιδίνες και άλλα συστατικά του κρασιού πιστεύεται ότι αντιδρούν μεταξύ τους και δίνουν χρωματισμένες, πολυμερισμένες ενώσεις και θεωρείται ότι η δημιουργία αυτών των ενώσεων συνεισφέρει στην σταθεροποίηση του χρώματος των ερυθρών οίνων.^[15]

Για να εκτιμηθούν τα επίπεδα των χρωματισμένων πολυμερών προστίθεται περίσσεια διοξειδίου του θείου (SO₂) σε έναν οίνο και μετράται το εναπομείναν χρώμα φασματοφωτομετρικά στα 520nm. Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στο ότι το διοξείδιο του θείου έχει μικρή επίδραση στο χρώμα των χρωματισμένων πολυμερών, εφόσον η θέση στον C4 των ανθοκυανών είναι ενωμένη με άλλη ένωση και έτσι δεν μπορεί να προσδεθεί σε αυτή την θέση το θειώδες και να αποχρωματίσει την ανθοκυάνη.

Οι ερυθρές χρωστικές στον οίνο μπορούν να αναλυθούν μέσω της HPLC και μια μέθοδος χρησιμοποιεί μια αντίστροφης φάσης στήλη πολυστυρενίου διβινυλοβενζολίου, για τον διαχωρισμό των περισσότερων μονομερών ανθοκυανών από τις πολυμερισμένες σε κρασιά

από την ποικιλία Pinot Noir. Ενώ αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη οι ενώσεις που εκλούνται στην κορυφή των πολυμερών δεν έχουν χαρακτηριστεί και έτσι η τοποθέτηση ως κορυφή πολυμερών δεν έχει πιστοποιηθεί. Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για κρασιά εκτός του Pinot Noir, διότι σε αντίθεση με αυτά τα κρασιά από Pinot Noir, τα υπόλοιπα περιέχουν παράγωγα p-κουμαροϋλίου των ανθοκυανών και μερικές από αυτές τις ενώσεις συνεκλούνται με τα πολυμερή.^[15]

Τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης στον οίνο ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή και από ένα έτος σε ένα άλλο. Καμιά περιοχή δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι παράγει κρασιά με εξαιρετικά υψηλότερα επίπεδα της trans-ρεσβερατρόλης από όλες τις υπόλοιπες περιοχές και τα επίπεδα της cis-ρεσβερατρόλης ακολουθούν την ίδια λογική με αυτά της trans-ρεσβερατρόλης. Γενικότερα τα ερυθρά κρασιά περιέχουν υψηλότερα επίπεδα ρεσβερατρόλης από ότι τα λευκά κρασιά. Το μέσο επίπεδο της trans-ρεσβερατρόλης-γλυκοζίτη στα ερυθρά μπορεί να είναι έως και 3 φορές περισσότερο από αυτό της trans-ρεσβερατρόλης.

Οι πολυφαινόλες είναι από τις μεγαλύτερες τάξεις που περιέχουν φυσικά προϊόντα, όπως φαινολικά οξέα και πρόσθετα, φλαβονοειδή, λιγνάνες και ενώσεις στιλβενίων. Οι ενώσεις των φλαβονοειδών έχουν χαρακτηριστεί και κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την χημική τους τους δομή. Συχνά υποδιαιρούνται σε 5 υποομάδες:

1. Φλαβονόλες
2. Φλαβόνες
3. Φλαβανόνες
4. Φλαβαν-3-όλες
5. Ανθοκυανιδίνες

Η πιο αντιπροσωπευτική ένωση για την ομάδα των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη και σχετικές με αυτή ενώσεις.

Ο διαχωρισμός αυτών των ενώσεων μέσω της HPLC απομακρύνει την ανάγκη παραγωγοποίησης των στιλβενίων και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς με ανιχνευτή UV και φθορισμού.

Η ρεσβερατρόλη είναι ο πιο κοινός αναλύτης που έχει ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία κρασιών μέσω της HPLC.

Η αντίστροφης φάσης HPLC είναι συνήθως η πιο βολική μέθοδος σε σχέση με άλλους τύπους υγρής χρωματογραφίας, όπως η χρωματογραφία κανονικής φάσης.^[21]

Οι φαινολικές ενώσεις στο σταφύλι και στον οίνο μπορούν να διαιρεθούν σε 2 ομάδες:

- G. Τα μη φλαβονοειδή (υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμικά οξέα και στιλβένια)
- H. Τις φλαβονοειδείς ενώσεις (ανθοκυάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες)

Οι ανθοκυάνες είναι μία οικογένεια των πολυφαινολών, η οποία ευθύνεται για το χρώμα των σταφυλιών και των οίνων. Οι φλαβαν-3-όλες (μονομερείς κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) είναι μια άλλη μεγάλη οικογένεια πολυφαινολικών ενώσεων που είναι κυρίως υπεύθυνες για την στυπτικότητα, πικράδα και την δομή των κρασιών. Η τελευταία ομάδα των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι οποίες συμβάλλουν κυρίως στην πικράδα και

επηρεάζουν το κόκκινο χρώμα. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στα σταφύλια εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού και επηρεάζεται άμεσα από τις αμπελοκαλλιεργητικές τεχνικές και από τις περιβαλλοντικές καταστάσεις. Όπως το στάδιο της ωρίμανσης, τις καιρικές συνθήκες και η απόδοση του αμπελώνα. Οι φλαβαν-3-όλες είναι επίσης υπεύθυνες για τις αντιδράσεις καφετιάσματος των γλεύκων και των οίνων και αντιδρούν με τις ανθοκυάνες, συμβάλλοντας έτσι στην σταθεροποίηση του ερυθρού χρώματος.

Οι πολυφαινόλες και πιο συγκεκριμένα ορισμένα φαινολικά οξέα και φλαβονόλες συμμετέχουν στο φαινόμενο κατά το οποίο οι χρωστικές και άλλα μη έγχρωμα οργανικά συστατικά σχηματίζουν μοριακές ενώσεις ή σύμπλοκα (copigmentation). Για αυτό το λόγο, οι ανθοκυάνες παρουσιάζουν πολύ περισσότερο χρώμα από ότι συνήθως αναμένεται σύμφωνα με την συγκέντρωσή τους. Ακόμη, τα υδροξυκιναμικά οξέα συμμετέχουν στον σχηματισμό μιας νέας τάξης χαμηλού μοριακού βάρους χρωστικών, που προέρχονται από τις ανθοκυάνες, οι οποίες ονομάζονται πυρανοανθοκυάνες, οι οποίες αρχικά είχαν συσχετιστεί με ορισμένους δευτερεύοντες μεταβολίτες ζυμών, όπως την ακεταλδεΐδη ή το πυροσταφυλικό οξύ.

Η ανάλυση των φαινολικών ενώσεων τόσο στα σταφύλια, όσο και στους οίνους είναι αρκετά πολύπλοκη, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας τους. Η HPLC έχει γίνει η πλέον επιλεγμένη μέθοδος για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων. Ανάλογα με την φύση των προς ανάλυση φαινολικών ενώσεων, οι γενικές προϋποθέσεις για μια ανάλυση HPLC αποτελούν ένα πρώτο στάδιο καθαρισμού, με υγρή-υγρή ή στερεής φάσης (στήλες γεμισμένες με RP silica gel C18, Toyopearl gel HW-40 ή πολυαμίδιο) εκχυλίσεις, χρησιμοποιώντας για έκλυση διάφορους διαλύτες που διαφέρουν σε pH και/ή πολικότητα. Όταν αναλύονται οι φαινολικές ενώσεις από γίγαρτα και φλοιούς, ένα αρχικό στάδιο εκχύλισης θα πρέπει να προστεθεί. Αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας μεθόδους, όπως η άλεση των στερεών τμημάτων του σταφυλιού με την παρουσία ενός διαλύτη εκχύλισης.

Μερικές φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια και στους οίνους παρουσιάζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις στο φάσμα UV-Vis και μπορούν έτσι να εντοπιστούν εύκολα με την HPLC, χρησιμοποιώντας ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων. Οι ανθοκυάνες είναι ερυθρού χρωματισμού και εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 520nm. Οι φλαβονόλες είναι κίτρινου χρωματισμού και εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 360nm. Τέλος, τα υδρακινναμικά οξέα μπορούν να ανιχνευθούν πιο συγκεκριμένα από την υψηλή απορρόφηση περίπου στα 320nm. Δυστυχώς, οι κύριες πολυφαινόλες των σταφυλιών και των οίνων (φλαβαν-3-όλες) δεν εμφανίζουν συγκεκριμένη απορρόφηση και έχουν ένα μέγιστο γύρω στα 280nm, όπως όλα τα προαναφερθέντα φαινολικά. Σε αντίθεση οι φλαβαν-3-όλες έχουν ιδιότητες φθορισμού, όπου άλλες πολυφαινόλες δεν εμφανίζουν. Αυτός είναι ο λόγος που η χρήση του ανιχνευτή φθορισμού έχει προταθεί για την ανάλυση των φλαβαν-3-ολών.^[25]

3.2. Αμινοξέα

Κατά την πάροδο του χρόνου η εξέλιξη των αναλύσεων μέσω οργάνων έχει αναπτυχθεί τόσο, ώστε να μας έχει επιτραπεί η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση ενός μεγαλύτερου

αριθμού ελεύθερων αμινοξέων με μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα γλεύκη και τα κρασιά απαιτούν μια ειδική ανάλυση των αμινοξέων. Οι αυξανόμενες ανάγκες περιλαμβάνουν:

- Ταυτόχρονη ανίχνευση πρωτογενών και δευτερογενών αμινοξέων, όπως η προλίνη, η οποία είναι το κύριο αμινοξύ, το οποίο εντοπίζεται στα κρασιά.
- Ακριβής ανάλυση της αργινίνης, εξαιτίας των τοξικολογικών επιπτώσεων αυτής της ένωσης σε μεταγενέστερες αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν σε σχηματισμό καρβαμικού αιθυλεστέρα και ουρίας.
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης για όλα τα άλλα αμινοξέα.
- Μικρός χρόνος και διάρκεια αναλύσεων, ούτως ώστε να υπάρχουν αναλύσεις ρουτίνας για την πιστοποίηση των κρασιών.
- Δυνατότητα δημιουργίας μίας βάσης δεδομένων για τα χαρακτηριστικά διαφόρων χημικών προϊόντων, το οποίο θα βοηθήσει στον εντοπισμό της νοθείας

Τρεις εναλλακτικές τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την ανάλυση των ελεύθερων αμινοξέων στα γλεύκη και τους οίνους. Στην πρώτη τεχνική γίνεται χρήση ιοντικής χρωματογραφίας, παραγωγοποίηση νινυδρίνης και ανίχνευση στο υπεριώδες. Αυτή η τεχνική εμφανίζει μερικά προβλήματα στα όρια ανίχνευσης. Στην δεύτερη τεχνική γίνεται διαχωρισμός των πτητικών παραγώγων των αμινοξέων με αέρια χρωματογραφία και η ανίχνευση γίνεται με ανιχνευτή FID (ανιχνευτής ιονισμού φλόγας ή/και με φασματοφωτομετρία μάζας). Αυτή η τεχνική απαιτεί μια προσεκτική εκχύλιση και συμπύκνωση του δείγματος καθώς και πολύπλοκες διαδικασίες παραγωγοποίησης. Αυτές οι διαδικασίες εμφανίζουν κάποια προβλήματα όσο αναφορά την απόδοση της εκχύλισης και της παραγωγοποίησης, τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά αν εφαρμοστούν σωστά και προσεκτικά αυτές οι μέθοδοι, τότε εμφανίζουν υψηλής ισχύς αναλύσεις και μεγάλη ευαισθησία. Στην τρίτη τεχνική γίνεται διαχωρισμός των παραγώγων των αμινοξέων μέσω της HPLC και η ανίχνευσή τους μέσω φθορισμού. Αυτή η τεχνική παρέχει το πλεονέκτημα της ταχύτητας, ευκολίας (εφόσον δεν χρειάζονται προηγούμενες διεργασίες εκχύλισης), ευαισθησίας και απλούστερης αυτοματοποίησης, το οποίο κάνει αυτή την μέθοδο χρήσιμη για την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Το κύριο μειονέκτημα είναι οι πολλές κορυφές που σχηματίζονται για μερικά παράγωγα.

Τα περισσότερα δημοσιοποιημένα δεδομένα για την ανάλυση των ελεύθερων αμινοξέων στα κρασιά έχουν ληφθεί ύστερα από την χρήση αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, όπως αυτά της νινυδρίνης, του φαινυλο-ισοθειοκυανικού (PITC), της οφθαλαλδεϋδης/μερκαπταιθανόλης (OPA/MCE).^[26]

Τα αμινοξέα και το ιόν αμμωνίου (NH_4^+) είναι απαραίτητοι παράγοντες ανάπτυξης για την σωστή ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και των γαλακτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια της αλκοολικής και της μηλογαλακτικής ζύμωσης αντίστοιχα. Κάποιες βιογενείς αμίνες σχηματίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα κρασιά, μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των πρόδρομων αμινοξέων τους, λόγω της δράσης των ζυμομυκήτων κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων κατά την μηλογαλακτική ζύμωση ή από άλλους μικροοργανισμούς που έχουν επιμολύνει τον οίνο. Οι βιογενείς αμίνες

βρίσκονται και σε άλλα τρόφιμα/ποτά, που προέρχονται από ζύμωση, εκτός από τον οίνο, όπως είναι το τυρί και η μπύρα.

Κάποιες από αυτές τις αμίνες, όπως η ισταμίνη, τυραμίνη και η φαινυλαιθυλαμίνη είναι βλαβερές για την υγεία κάποιου, οδηγώντας κάποιους να πάσχουν από ναυτία, πονοκεφάλους και αναπνευστικές δυσλειτουργίες και ειδικότερα όταν αυτές συνοδεύονται από αλκοόλ και ακεταλδεΐδη. Για αυτό τον λόγο, παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει κάποια επίσημη μέθοδος για την ανάλυσή της, μερικές χώρες έχουν καθιερώσει νόμιμα ή προτεινόμενα όρια της συγκέντρωσης της ισταμίνης στον οίνο.

Η τελική συγκέντρωση των ανωτέρων ενώσεων στον οίνο ποικίλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία του σταφυλιού, και το υποκείμενο, τα αζωτούχα λιπάσματα, ο καιρός, η ωριμότητα και οι οινολογικές πρακτικές.

Η ανάλυση αυτών των ενώσεων είναι δύσκολη εξαιτίας των διαφορετικών δομών και την απουσία ενός συγκεκριμένου χρωμοφόρου και ως εκ τούτου αυτά παραγωγοποιούνται χρησιμοποιώντας διαφορετικές χημικές ενώσεις για την βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και την αποφυγή παρεμβολών της μήτρας (η μήτρα αφορά τα συστατικά ενός δείγματος εκτός από την αναλυόμενη ουσία που μας ενδιαφέρει). Είναι σύνηθες να αναλύονται οι βιογενείς αμίνες και τα αμινοξέα ξεχωριστά μέσω της HPLC, ύστερα από παραγωγοποίηση πριν ή μετά την στήλη, ως φθορίζοντα παράγωγα με οφθαλοδιαλδεΐδη (OPA). Παρόλα αυτά το κύριο αμινοξύ στον οίνο, δηλαδή η προλίνη, δεν αντιδρά σε αυτή την περίπτωση είτε με το 6-αμινοκίνολυλ-N-υδροξυσουκινιμιδυλκαρβαμικό (AQC), είτε με την δημιουργία ισχυρών απορροφητικών παραγώγων υπεριώδους-ορατού με νινυδρίνη ή με χλωριούχο δανσύλιο. Έχουν δημοσιευθεί κάποιες μέθοδοι, οι οποίες επιτρέπουν την κοινή ανάλυση των αμινοξέων και των βιογενών αμίνων στον οίνο. Ωστόσο παρά τα αναμενόμενα πλεονεκτήματά του σε σχέση με την ξεχωριστή ανάλυση αυτών των ενώσεων, εξακολουθούν να έχουν ορισμένους περιορισμούς. Για παράδειγμα, ο Lozapon ανέπτυξε μια μέθοδο HPLC ικανή να χωρίζει και ποσοτικοποιεί 20 αμινοξέα και 4 πολυαμίνες, ύστερα από παραγωγοποίηση με FMOC-Su. Παρόλα αυτά η περίσσεια του αντιδραστήριου και το προϊόν την υδρόλυσης (FMOC-OH) εξακολουθούν να υπάρχουν ως πλειοψηφικές κορυφές στο χρωματογράφημα και η μέθοδος δεν προσδιορίζει τις αρωματικές βιογενείς αμίνες, την ισταμίνη και την τυραμίνη, τα οποία είναι τα πιο σημαντικά δεδομένων των επιπτώσεών τους στην υγεία των καταναλωτών ή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), ένα χαρακτηριστικό αμινοξύ στα σταφύλια. Μια ακόμη ταυτόχρονη ανάλυση, που βασίζεται στην παραγωγοποίηση OPA, ποσοτικοποιεί 20 αμινοξέα, και 17 αμίνες, αλλά το αντιδραστήριο δεν χρησιμεύει για τον προσδιορισμό της προλίνης, η οποία ποσοτικά είναι το πιο σημαντικό αμινοξύ στα σταφύλια και τους οίνους.

3.3. Ωχρατοξίνη

Μια από τις εφαρμογές της HPLC ανάλυσης στον οίνο είναι η ανίχνευση συγκεντρώσεων της μυκοτοξίνης ωχρατοξίνη A, η ύπαρξη της οποίας οφείλεται σε μυκητιακή μόλυνση της πρώτης ύλης, δηλαδή του σταφυλιού. Η τοξίνη αυτή παράγεται από στελέχη μυκήτων *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium verrucosum*, τα οποία προσβάλλουν τα σταφύλια.^{[14][43]} Η δράση αυτών ευνοείται και

επιταγχύνεται όταν οι ράγες είναι τραυματισμένες, με αποτέλεσμα η είσοδος του μύκητα εντός αυτών να είναι πολύ πιο εύκολη. Πολλοί παράγοντες είναι αυτοί που επηρεάζουν την ποσότητα παραγωγής της ωχρατοξίνης A. Ένας από αυτούς είναι το στάδιο ανάπτυξης των σταφυλιών. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι η συγκέντρωση της ωχρατοξίνης A είναι χαμηλότερη στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της ράγας σε σχέση με αυτήν κατά την συγκομιδή^[14] Επίσης η μυκοτοξίνη αυτή απελευθερώνεται κατά την έκθλιψη των σταφυλιών και ειδικότερα στην ερυθρή οινοποίηση με την διαβροχή έχει παρατηρηθεί αύξηση συγκέντρωσης κατά 20%. Αυτό επιβεβαιώνεται και από έρευνα των Ottender και Majerus, η οποία απέδειξε ότι η τοξίνη αυτή ανιχνεύεται πιο συχνά στους ερυθρούς οίνους απ'ότι στους ροζέ και λευκούς¹. Κατά τη ζύμωση η συγκέντρωση της τοξίνης μπορεί να μειωθεί και γι'αυτόν τον λόγο ανιχνεύονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτής στο μούστο απ'ότι στον οίνο. Κυρίως είναι γνωστό ότι κατά την οινοποίηση δεν μπορεί να παραχθεί καθώς με την παραγωγή αλκοόλης αναστέλλεται η ανάπτυξη των μυκήτων.^{[14],[43]}

Η ανίχνευση της ωχρατοξίνης A στον οίνο είναι πολύ σημαντική και απαραίτητη καθώς έχει ταξινομηθεί από την IARC (Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο) ως καρκινογόνα ουσία για τον άνθρωπο.^[4]

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των τροφίμων έχει ορίσει ένα μέγιστο επίπεδο επιτρεπόμενης περιεκτικότητας ωχρατοξίνης A των 2.0ng/g για όλους τους τύπους οίνων. Για την ανίχνευση τόσο χαμηλών συγκεντρώσεων χρησιμοποιείται η μέθοδος ανάλυσης HPLC με ανιχνευτή φθορισμού.^[4]

3.4. Γλουταθειόνη & Θειόλες

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH) και γενικά ουσιών που περιέχουν θειόλη.

Η γλουταθειόνη είναι μια ένωση χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία περιέχει υδρόφιλες ενώσεις και μια ή περισσότερες ομάδες θειόλης. Παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των ζυμών. Σε περίπτωση έλλειψης της γλουταθειόνης δημιουργούνται μεταλλάγματα ζυμομυκήτων, των οποίων ο πολλαπλασιασμός γίνεται εξαιρετικά αργά . Επιπλέον η γλουταθειόνη συμβάλλει στην εξάλειψη των ορθοκινονών, ενώσεις οι οποίες οφείλονται για το καφέ χρώμα των λευκών οίνων και την απώλεια χρώματος των ερυθρών λόγω των οξειδώσεων. Γενικότερα η GSH είναι φυσικό αντιοξειδωτικό που διασφαλίζει την διατήρηση του χρώματος και των αρωμάτων του οίνου αλλά λειτουργεί και ως ρυθμιστικό σε κυτταρικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.^[36]

Από αναλύσεις 21 ποικιλιών σταφυλιού βρέθηκε ότι η γλουταθειόνη κυμαίνεται σε ποσότητες από 17,3 έως 114,4mg/kg. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το 1% του ξηρού βάρους του *Saccharomyces cerevisiae* αποτελείται από GSH. Για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης και άλλων ουσιών που περιέχουν θειόλη με τη μέθοδο HPLC πρέπει πρώτα να γίνει μια παραγωγοποίηση των θειολών πριν από την εισαγωγή του δείγματος στην χρωματογραφική στήλη. Η παραγωγοποίηση γίνεται με τη χρήση ο-φθαλαλδεΐδη (OPA) και 2-αμινοαιθανόλη. Τα παράγωγα ισοϊνδόλης που σχηματίζονται διαχωρίζονται σε στήλη ανάστροφης φάσης και η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γίνεται με χρήση ανιχνευτή φθορισμού.^[36]

Τα ελάχιστα όρια ανίχνευσης για τις θειόλες είναι για την γλουταθειόνη 1μg/l, για την κυστεΐνη 2,7μg/l, για την μεθανοθειόλη 12,8μg/l και για την αιθανοθειόλη 11μg/l.^[36]

3.5. Οργανικά οξέα & Σάκχαρα

Μια από τις εφαρμογές της HPLC ανάλυσης στον οίνο είναι ο προσδιορισμός συγκέντρωσης και ταυτοποίησης οργανικών οξέων και σακχάρων, τα οποία σχετίζονται με την χημική και γευστική ισορροπία των οίνων. Το προφίλ και η συγκέντρωση αυτών στα σταφύλια και κατά συνέπεια στον οίνο εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως την περιοχή προέλευσης, την ποικιλία, το κλίμα, το στάδιο ωρίμανσης, τις συνθήκες διεργασίας και άλλα .

Τα οργανικά οξέα αποτελούν κύριους μεταβολίτες του κρασιού, σημαντικοί για την επεξεργασία του σταφυλιού και τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης του μούστου. Οξέα όπως το τρυγικό, μηλικό και γαλακτικό επηρεάζουν το pH και σχετίζονται με την χημική σταθερότητα του οίνου αλλά και το γευστικό προφίλ και ισορροπία. Από την άλλη η ύπαρξη συγκεντρώσεων οξικού οξέος δηλώνει μικροβιολογική αλλοίωση, η οποία είναι μη επιθυμητή.^[10]

Τα σάκχαρα ανήκουν και αυτά στην κατηγορία των πρωτογενών μεταβολιτών που σχετίζονται με την ποιότητα του οίνου. Από αυτά η γλυκόζη και φρουκτόζη είναι τα κύρια σάκχαρα του σταφυλιού. Οι συγκεντρώσεις αυτών μειώνονται κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς μεταβολίζονται από τις ζύμες. Στον οίνο μένουν τα αζύμωτα σάκχαρα, όπως η αραβινόζη και η ξυλόζη. Άλλα είδη σακχάρων που εντοπίζουμε στον μούστο είναι αυτά από τη δράση της πηκτινάσης όπως η ραμνόζη και σε μικρότερες ποσότητες η μαλτόζη.^[10]

Δεδομένου, λοιπόν, της σημασίας των σακχάρων και των οργανικών οξέων στην ποιότητα του σταφυλιού και του οίνου καθίσταται απαραίτητος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αυτών των 2 πρωτογενών μεταβολιτών. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά για αυτόν το σκοπό είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), λόγω των γρήγορων αποτελεσμάτων και της αξιοπιστίας που μας δίνει. Για την ανίχνευσή τους γίνεται χρήση είτε ανιχνευτών υπεριώδους (UV) είτε ανιχνευτών συστοιχίας διοδών (DAD) είτε φασματομετρίας μάζας (MS).^[22] Ο Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου (OIV) συνιστά τη μέθοδο HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RID) για τον προσδιορισμό των σακχάρων (OIV, 2011).

Επιπλέον η χρωματογραφική ανάλυση HPLC μας δίνει την δυνατότητα να μπορούμε να προσδιορίσουμε τις συγκεντρώσεις σακχάρων και οργανικών οξέων ταυτόχρονα. Πιο συγκεκριμένα, για τον διαχωρισμό των ενώσεων χρησιμοποιούνται στήλες ανταλλαγής ιόντων οι οποίες περιέχουν σωματίδια σουλφονωμένης ρητίνης και ισοκρατική φάση με οξινισμένο υπερκάθαρο νερό. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με τη χρήση 2 διαφορετικών ανιχνευτών. Για την ανίχνευση των σακχάρων χρησιμοποιείται ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RID), ενώ για την ανίχνευση των οργανικών οξέων χρησιμοποιείται ανιχνευτής διάταξης φωτοδιοδίου (DAD). Συνεπώς χρησιμοποιείται σύστημα HPLC DAD-RID.^[10]

3.6. Φυτοφάρμακα

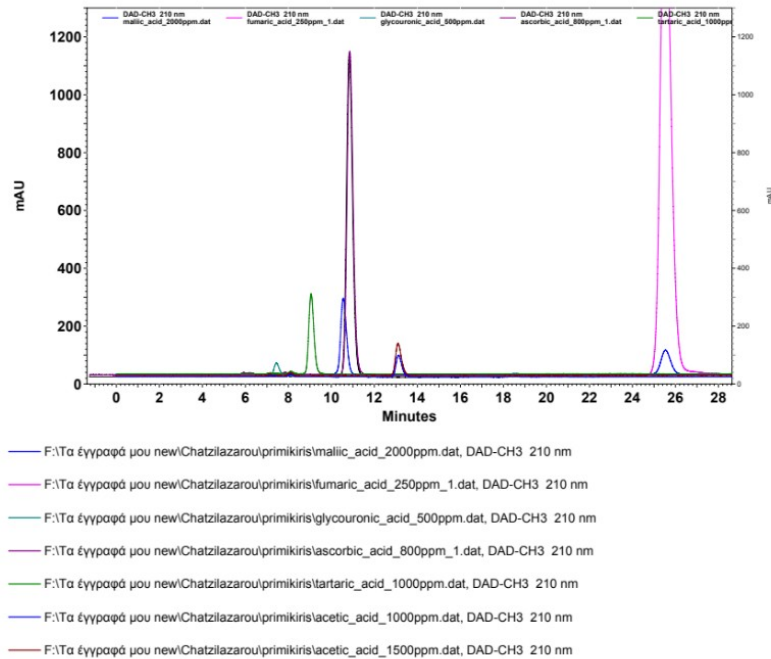
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στους οίνους. Η χρήση των φυτοφαρμάκων στην αμπελουργία

είναι ευρέως κοινή και γίνεται με σκοπό την προστασία των αμπελώνων από ασθένειες. Το πρόβλημα είναι ότι τα υπολείμματα αυτών παραμένουν στα σταφύλια και μεταφέρονται στο τελικό προϊόν, δηλαδή στον οίνο. Νομοθετικά από την Ευρωπαϊκή Ένωση τα ανώτατα όρια υπολειμματικών φυτοφαρμάκων στα σταφύλια που προορίζονται για παραγωγή οίνου είναι 0,01-10mg/kg ανάλογα και το είδος του φυτοφαρμάκου. Λόγω των πολύ μικρών ποσοτήτων των φυτοφαρμάκων στον οίνο και διάφορων παρεμποδιστικών ουσιών που εκχυλίζονται ταυτόχρονα με αυτά, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίησή τους είναι αρκετά δύσκολη υπόθεση. Τα δείγματα πρέπει να καθαριστούν, να συμπυκνωθούν και να εμπλουτιστούν με την προς ανάλυση ουσία ώστε να μπορέσει να γίνει η ανίχνευση από ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD).^[42]

3.7. Εφαρμογή σε δείγματα οίνου στο εργαστήριο της σχολής

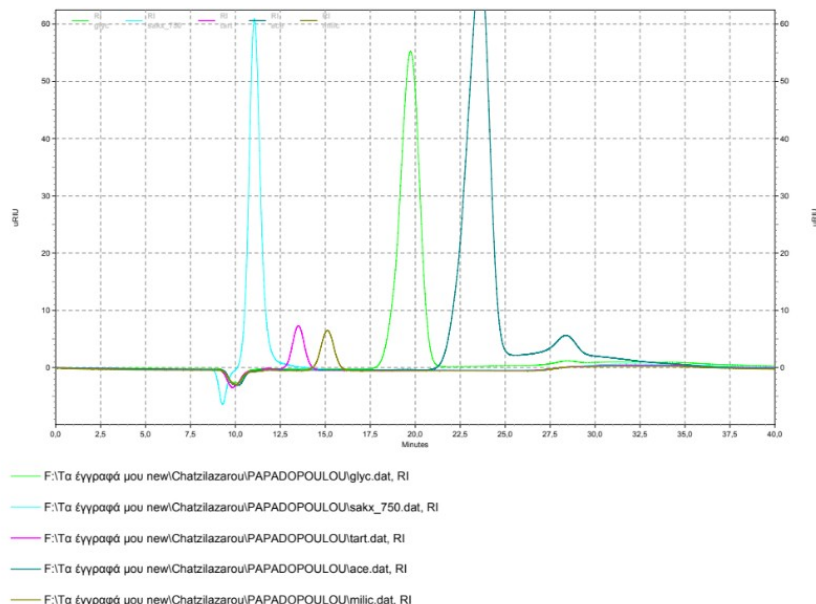
Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση σε δείγματα λευκού οίνου με τη χρήση διάταξης Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Η ανάλυση έγινε στο εργαστήριο της σχολής με τις ανάλογες χρωματογραφικές συνθήκες και πρωτόκολλα, με τις υπάρχουσες στήλες και τα δείγματα αναλύθηκαν ξεχωριστά από 2 διαφορετικούς ανιχνευτές, έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης(RI).

Στο παρακάτω χρωματογράφημα απεικονίζονται οι κορυφές 7 χημικών ενώσεων, οργανικών οξέων που εντοπίστηκαν από τον ανιχνευτή DAD. Παρατηρούμε ότι οι κορυφές του φουμαρικού με του μηλικού, του ασκορβικού με του μηλικού και του οξικού αλληλοεπικαλύπτονται. Αυτό σημαίνει ότι ο ανιχνευτής αυτός δεν ήταν κατάλληλος για τον σωστό διαχωρισμό των κορυφών και κατά συνέπεια τη σωστή ποσοτικοποίηση όλων των ενώσεων Χρωματογράφημα ενώσεων-HPLC/DAD



Διάγραμμα 1: Χρωματογράφημα ενώσεων-HPLC/DAD

Αντίθετα στο παρακάτω χρωματογράφημα που λάβαμε από τον ανιχνευτή RI οι κορυφές των οξέων είναι διαχωρισμένες και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν εύκολα οι ενώσεις. Επιπλέον ο ανιχνευτής διάθλασης μας έδωσε τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε όχι μόνο οξέα αλλά και σάκχαρα, σακχαρόζη και γλυκερίνη.



Διάγραμμα 2: Χρωματογράφημα ενώσεων-HPLC/RID

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πρωτόκολλα αναλύσεων οίνων με HPLC

4.1. Ανάλυση ανθοκυανών σταφυλιών και των οίνων με HPLC-MS

Προετοιμασία δείγματος

Συλλέγεται δείγμα, που περιέχει 10 τσαμπιά που έχουν διαλεχθεί τυχαία από 8 διαφορετικά φυτά μέσα στον αμπελώνα. Στο εργαστήριο, οι ράγες διαχωρίζονται από τους βόστρυχους και ένα σετ 100 ραγών διαλέγεται τυχαία και έπειτα ζυγίζεται. Έπειτα, οι φλοιοί από κάθε ράγα διαχωρίζονται από την σάρκα και τα γίγαρτα. Ακολουθεί εκχύλιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς, με την διαδικασία του Bourzeix, κατά την οποία χρησιμοποιούνται διάφοροι διαλύτες όπως μεθανόλη, ακετόνη και νερό, με καθόλου προσθήκη οξέος. Η σάρκα και τα γίγαρτα απομακρύνονται. Τα δείγματα δεν χρειάζονται κάποια άλλη προετοιμασία πριν την ανάλυση HPLC.

Τα δείγματα οίνου δεν χρειάζονται κάποια προετοιμασία πριν την ανάλυση HPLC

Εξοπλισμός

Οι HPLC-MS αναλύσεις πραγματοποιούνται με την χρήση ενός HP 1100 MSD συστήματος με έναν PDA UV-Vis ανιχνευτή, συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο μάζας (τετραπολικός αναλυτής), εξοπλισμένος με διεπαφή ESI. Χρωματογραφικός διαχωρισμός γίνεται με την χρήση μιας 250 x 4,6mm, 5μm Nova-Pak C18 χαλύβδινη στήλη με ένα 20 x 3,9mm Sentry Nova-Pak C18 προστατευτικό φυσίγγιο και τα 2 με ρυθμισμένη θερμοκρασία στους 50°C. Όλα τα δείγματα αναλύονται εις διπλούν.

Συνθήκες ανάλυσης

HPLC: η κινητή φάση είναι νερό/ακετονιτρίλιο (50:50) (Διάλυμα B), και νερό/ακετονιτρίλιο (95:5) (Διάλυμα A), και τα 2 ρυθμισμένα σε pH 1,3 με τριφθοροξικό οξύ, με ρυθμό ροής 0,6 ml/min. Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και είναι ως εξής: 0min, 15% (B), 0-20min, 15-30% (B), 20-25min, 30-35% (B), 25-35min, 35-40% (B), 35-42min, 40% (B), 42-43min, 40-100% (B), 43-48min, 100% (B) και 48-49min, 100-15% (B).

PDA: φάσματα καταγράφονται κάθε δευτερόλεπτο μεταξύ 250-600nm με εύρος ζώνης 1,2nm και τα χρωματογραφήματα αποκτώνται στα 520nm.

Αναλύσεις MS: οι παράμετροι της MS είναι ως εξής: τριχοειδής τάση 4000V. Ο κατακερματιστής αυξάνεται από 90 σε 120V. Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης 325°C, ροή αερίου (N₂) 12ml/min. Το όργανο λειτουργεί σε λειτουργία σάρωσης θετικού ιόντος από m/z 50-2000 με ρυθμό σάρωσης 1,47 s/κύκλο. ^[12]

4.2. Ανάλυση χρωματισμένων πολυμερών σε ερυθρό οίνο μέσω αντίστροφης φάσης HPLC

Ανάλυση HPLC

Γίνεται χρήση μίας 250 x 4,6mm πολυστυρενίου διβινυλοβενζολίου αντίστροφης φάσης στήλης (PLRP-S 100 Å 5μm) με προστατευτικό φυσίγγιο (10 x 4,6mm) του ίδιου υλικού. Και οι 2 στήλες διατηρούνται στους 30 °C. Τα δείγματα οίνων διαυγάζονται με φυγοκέντρηση στα 12,000g σε φυγόκεντρο Mikro 12-24 για 4 λεπτά, πριν την έγχυση. Ο όγκος του εγχύματος είναι 20ml και οι χρωστικές του οίνου εκκλύονται με έναν ρυθμό ροής 1ml/min, με την ακόλουθη βαθμιδωτή έκλυση του διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 1,5% w/w H₃PO₄) και διαλύτη B (20% v/v διαλύτη A σε CH₃CN): από 92-73% διαλύτη A για τα πρώτα 55 λεπτά, διατήρηση στα 73% από τα 55 έως τα 59 λεπτά, μείωση από τα 73% στο 30% από τα 59 έως τα 64 λεπτά, διατήρηση στο 30% από τα 64 έως τα 69 λεπτά και αύξηση στο 92% από τα 70 έως τα 76 λεπτά. Τα δεδομένα λαμβάνονται στην περιοχή μήκους κύματος από 250 έως 550nm. Τα ξεχωριστά μονομερή ανθοκυανών ταυτοποιούνται από τον σχετικό χρόνο κατακράτησης, από την απορρόφηση υπεριώδους-ορατού και από τα χαρακτηριστικά του φάσματος μάζας. Οι χρωστικές ποσοτικοποιούνται ως ισοδύναμα της μαλβιδίν-3-γλυκοζίτη με βάση την περιοχή της κορυφής στα 520nm.

Ποιοτική ανάλυση των χρωστικών πολυμερών με υπερδιήθηση

Το δείγμα ερυθρού οίνου φυγοκεντρείται στα 12,000g για 5 λεπτά, ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά. Δόσεις από το υπερκείμενο υγρό (0,5ml) τοποθετούνται σε μικροσυγκεντρωτές με όριο τα 3,000 ονομαστικού μοριακού βάρους (NMWCO) και φυγοκεντρούνται στα 12,000g για 45 λεπτά μέχρι ο όγκος του κατακρατήματος να μειωθεί περίπου σε 0,1ml. Το πρώτο διήθημα χρησιμοποιείται απευθείας για ανάλυση με HPLC. Ο όγκος του κατακρατήματος ρυθμίζεται στα 0,5ml με προσθήκη μοντέλου κρασιού (δηλαδή 0,4ml υδατικό διάλυμα αιθανόλης 12% v/v, pH 3,2, ρυθμιζόμενο με τρυγικό οξύ). Ύστερα από ήπια ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρείται περεταίρω όπως αναφέρεται παραπάνω. Η υπερδιήθηση διεξάγεται 3 φορές. Το κατακράτημα ρυθμίζεται στον αρχικό του όγκο με το μοντέλο κρασιού και αναλύεται με HPLC.

Ποιοτική ανάλυση των χρωστικών πολυμερών: καθίζηση από πρωτεΐνη

Ξηρή σκόνη ζελατίνης προστίθεται στο δείγμα του προς ανάλυση οίνου, για να δημιουργηθεί ένα εναιώρημα, το οποίο θα περιέχει 4g/l προστιθέμενης ζελατίνης. Τα δείγματα προς ανάλυση καθώς και το δείγμα χωρίς την ζελατίνη (control) ανακινούνται και αποθηκεύονται στους -8°C για ένα βράδυ, πριν φυγοκεντρηθούν στα 12,000g για 10 λεπτά στους -8 °C. Τα υπερκείμενα συλλέγονται και αναλύονται με HPLC.

Ποιοτική ανάλυση των χρωστικών πολυμερών: αντίδραση με SO₂

Η συγκέντρωση των χρωστικών προσαρμόζεται με μοντέλο οίνου σε παρόμοιο επίπεδο απορρόφησης (κατά προσέγγιση η τιμή της απορρόφησης να είναι 0,080 σε μια 10mm κυψελίδα) στα 520nm. Σε 1,9ml από το κάθε διάλυμα προστίθεται 0,1 ml υδατικού διαλύματος Na₂S₂O₅ (60g/l) για να δοθεί ένα διάλυμα που να έχει συγκέντρωση περίπου 2 g/l SO₂. Μετράται η απορρόφηση όλων των δειγμάτων την ώρα της προσθήκης και 1 ώρα μετά στα 520nm.

Ποιοτική ανάλυση των χρωστικών πολυμερών: ανάλυση φασματοφωτομετρίας μάζας με ηλεκτροψεκασμό υγρής χρωματογραφίας (LC/ESI-MS)

Τα όργανα και οι διαδικασίες είναι ίδιες, όπως έχουν αναφερθεί προηγουμένως με τις ακόλουθες αλλαγές: για την έκλυση χρησιμοποιείται το διάλυμα Α (υδατικό διάλυμα 4,5% w/w μυρμηκικό οξύ) και το διάλυμα Β (20% του διαλύματος Α και 80% CH₃CN) ως εξής: 86% έως 66% διάλυμα Α για τα πρώτα 55 λεπτά, διατήρηση στα 66% από τα 55 έως τα 59 λεπτά, μείωση από τα 66% στα 30% από τα 59 μέχρι τα 64 λεπτά, διατήρηση στο 30% από τα 64 έως τα 73 λεπτά και αύξηση στο 86% από τα 73 έως τα 75 λεπτά. Η στήλη ρυθμίζεται σε 86% διαλύματος Α για 10 λεπτά πριν τον εμβολιασμό.^[15]

4.3. Ανάλυση στιλβενίων στο οίνο μέσω HPLC

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα πρέπει να αποθηκευτούν στο ψυγείο στους 4 °C σε ένα μαύρο δοχείο, μέχρι την ανάλυση. Δείγματα τα οποία έχουν ανοιχθεί πρέπει να προστατεύονται από το ηλιακό φως και να αποθηκεύονται στους 4 °C και να αναλύονται μέσα στις επόμενες μέρες.

Ανάλυση HPLC

Οι συσκευασίες στηλών με η-οκταδεκυλοσιλάνιο (ODS ή C18) χρησιμοποιούνται για διαχωρισμούς ρεσβερατρόλης και των σχετικών ενώσεων. Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται με τις στήλες αντίστροφης φάσης HPLC είναι ένα μείγμα ακετονιτριλίου και/ή μεθανόλης σε συνδυασμό με νερό που περιέχει μικρές ποσότητες οξέος.

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ρεσβερατρόλης και των συγγενικών ενώσεων πραγματοποιείται με απορρόφηση υπεριώδους στα 306-308nm μήκη κύματος και με DAD ανίχνευση, επειδή επιτρέπει ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών μηκών κύματος. Άλλες λιγότερο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για ανίχνευση είναι οι ακόλουθες: φθορισμομετρική ανίχνευση (FLD), ηλεκτροχημική ανίχνευση (ECD) και ανίχνευση φασματοφωτομετρίας μάζας (MSD)

Συνθήκες HPLC

Πίνακας 1: Συνθήκες HPLC για ανάλυση της ρεσβερατρόλης και παραγώγων

Ένωση που προσδιορίζεται	Στήλη	Κινητή φάση Ρυθμός ροής (ml/min)	Ανίχνευση
--------------------------	-------	----------------------------------	-----------

Ισοκρατική έκλυση

Trans-ρεσβερατρόλη	C18 Lichrocart (250 x 4,6mm, 5μm σωματίδια)	Νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ (79:29.9:01, v/v) 1ml/min	UV 310nm
Trans-ρεσβερατρόλη	Octadecyl (250 x 4,6mm, 5μm)	Νερό/ακετονιτρίλιο (75:25, v/v)	UV- Vis 190-360nm

η	24°C	pH 3 με χρήση H ₃ PO ₄ 1,5ml/min	
Cis- και trans πολυδατίνη (ρεσβερατρο λ-3-β-γλυκοζίτης)	LiChrospher 100 CN (250 x 4mm, 5μm)	Νερό/ακετονιτρίλιο/ μεθανόλη (90:5:5, v/v) 1ml/min	UV 306nm
Trans- και cis ρεσβερατρόλη, trans- και cis- ρεσβερατρόλη, γλυκοζίτης	LiChrospher 100 CN (250 x 4mm, 5μm)	Νερό/ακετονιτρίλιο/ μεθανόλη (90:5:5, v/v) 1ml/min	UV 306nm DAD
Trans- ρεσβερατρόλη	Nucleosil C18 (150 x 4,6mm, 5μm) δεσμευμένη φάση βενζυλοδιμεθυλοσιλίου (150 x 4,6mm, 7±2 μm)	0,05mol/L NH ₄ H ₂ PO ₄ σε 25% v/v υδατικό διάλυμα ακετονιτρίλιου	UV 200-800nm ECD με γυάλινο ηλεκτρόδιο άνθρακα και ηλεκτρόδιο αναφοράς αργύρου/χλωριούχου αργύρου
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη και κερσετίνη	Luna C18 (2) (250 x 2mm, 5μm) 30°C	1% v/v υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος/ακετονιτρίλιο/2-προπανόλη (70:22:8, v/v)	UV/DAD, MS 306nm ESI trans-resveratrol m/z 227
Trans- ρεσβερατρόλη	Capcellpak C18UG120 (250 x 1,5mm, 5μm)	Μεθανόλη/20mM οξικό αμμώνιο pH 5,5 (55:45, v/v) Ρυθμός ροής 0,15ml/min	LC-MS, ESI [M-H] m/z 227
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη	ODS (100 x 2mm, 3μm)	20mM οξικού νατρίου, 0,5mM EDTA pH 4,5 και 18% ακετονιτρίλιου, 0,4ml/min	Multi-channel ECD +700mV
Trans- ρεσβερατρόλη	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6mm, 5μm) 25°C	Μεθανόλη/νερό (35:65, v/v) 1ml/min	DAD 306nm και CLD
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη	120-5-C18 Nucleosil (250 x 4.0mm, 5μm)	25% ακετονιτρίλιο, 0,1% H ₃ PO ₄ και NaCl (c= 5 mM/L) σε νερό 1ml/min	UV Maximum 306 έως 320nm, και 295 αντίστοιχα ECD στα 0,75V
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη	Zorbax SB-C18 (100 x 3.0 mm, 3,5mm)	Οξικό αμμώνιο 1mM/ακετονιτρίλιο (73:27, v/v) 1ml/min	MS/MS με APCI αρνητικό m/z 227

Βαθμιδωτή έκλυση

Trans- και cis-ρεσβερατρόλη	Nova-Pak C18 (150 x 3,9mm, 4μm)	A. Μεθανόλη/οξικό οξύ/νερό (10:2:88, v/v) B. Μεθανόλη/οξικό οξύ νερό (90:2:8, v/v) Το διάλυμα A από 100% έως 85%, 0-15min, 85% έως 50%, 15-25min, 50% έως 30%, 25-34min 1ml/min	Απορρόφηση λ=280nm: FLD λex=360nm λem=374nm
Trans-ρεσβερατρόλη, κατεχίνη, επικατεχίνη	C18Hypersil H5 ODS (250 x 4,6mm)	A. 9% ακετονιτρίλιο, 91% (5% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος) B. 25% ακετονιτρίλιο, 75% (5% υδατικό δ/μα οξικού οξέος) Γ. 70% ακετονιτρίλιο, 30% (5% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος) 100% A, 0-10min, 100% B, 10-11min και διατήρηση από τα 11-22min. Για την προετοιμασία της στήλης για την επόμενη εκτέλεση, 5min 100% Γ και στην συνέχεια 100% A για 15min 1ml/min	FLD 11min λex=280nm, λem=315nm και για την κατεχίνη και την επικατεχίνη λex=324nm και λem=370nm μέχρι τα 20min
Trans- και cis-ρεσβερατρόλη, και cis- piceid, και trans- αστριγκίνη και (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και αστιλβίνη και διυδρομυρικετίνη-3-O-ραμνοσίδη	Prontosil C18 (250 x 4.0mm, 4μm)	A. νερό/τριφθοριούχο οξικό οξύ (99:1, v/v) B. Ακετονιτρίλιο/διάλυμα A (80:20, v/v) για στυλβένια 15% B, 0-10min, 15-18% B, 10-13min, 18% B, 13-15min, 18-23% B, 15-17min, 23-25% B, 17-21min, 25% B, 21-24min, 25-32% B, 24-28min, 32% B, 28-30min, 32-40% B, 30-33min, 40% B, 33-38min, 40-70% B, 38-44min, 70-80% B, 44-47min, 80-90% B, 47-52min, 90-100% B, 52-53min, 100% B, 53-58min, 10min ισορροπία, επανεκκίνηση με 18% B και τέλος με 100% B σε 4min 1ml/min	Βήματα FLD: nm 280/310, 290/390, 260/400, 300/390, 260/400

Στιλβένια: trans-ρεσβερατρόλη, trans-πικεατανόλη, trans-αστρινγκίνη	Kromasil 5μm C18	A. Μεθανόλη/1.8mM μηρμυκικό οξύ B. νερό/1,8mM μυρμηκικό οξύ. 0min, 70% B και 30% A, ακολουθεί μια γραμμική βαθμίδωση μέχρι να φτάσει 40% B μέσα σε 30min. Στην συνέχεια αλλάζετε σε 0% B για 2min και διατηρείται για 3min, ώστε να πλυθεί η στήλη. 150μl/min	MS, MS/MS TOF-MS ESI m/z [M-H]- t _R , min 227.0: 25,4 243.0 19.7 389.2 17.1 405.0 12,1
trans-ρεσβερατρόλη	Kromasil 5μm C18	A. μεθανόλη/μυρμηκικό οξύ 0,09% B. νερό/μυρμηκικό οξύ 0,09% 0min, 70% B και 30% A, ακολουθεί μια γραμμική βαθμίδωση μέχρι να φτάσει 30% B μέσα σε 30min. Στην συνέχεια αλλάζετε σε 0% B για 5min και διατηρείται για 5min, ώστε να πλυθεί η στήλη. 150μl/min	HPLC-UV, HPLC- FL, HPLC-MS
Trans-ρεσβερατρόλη	C18 (250 x 4,6mm, 6μm)	A. Μεθανόλη/νερό/οξικό οξύ (10:90:1, v/v) B. Μεθανόλη/νερό/οξικό οξύ (90:10:1, v/v) B: 0-40%, 0.0-18.0min, 40-100%, 18.0-25.0min, 100% 25.0-27.0min 1ml/min	UV DAD UV-Vis και MS, APCI αρνητικό ιόν
Ρεσβερατρόλη-3-O-β-D-γλυκοζίτης και (36 ενώσεις) φλαβονειδ-γλυκοζίτες ή παράγωγα υδατανθράκων των φαινολικών οξέων	LiChropher 100-RP-18 (250 x 4,6mm,5μm) 20-25 °C	A. νερό/μυρμηκικό οξύ (92:2, v/v) B. ακετονιτρίλιο/νερό/μυρμηκικό οξύ (80:18:2, v/v), ισοκρατική: 100% A 5min, GE: 10%- 30% B σε 25min και 30%-100% σε 5min και ισοκρατική 100% B 5min 0.8ml/min	UV-Vis 280-310nm και 520nm ESI- και SSI-MS
Trans-ρεσβερατρόλη και 13 πολυφαινόλες	C18 (250 x 4,6mm, 6μm)	A. Μεθανόλη/νερό/οξικό οξύ (10:90:1, v/v) B. μεθανόλη/νερό/οξικό οξύ	UV 306nm

και ανθοκυανίνες		(90:10:1, v/v) 0-40% B, 0-18min, 40-100% B, 18-25min, 100%, 25-27min 1,5ml/min	
Trans- ρεσβερατρόλη	Spher ODS C18 (250 x 4.0mm, 5μm) 40 °C	A. Νερό/ακετονιτρίλιο (70:30, v/v) B. Νερό/μεθανόλη (50:50, v/v) Διάλυμα A από 0-18min, μετά από A 100 σε B 100% σε 1min και B 100 σε A 100% σε 6min 0,6ml/min	DAD UV-Vis 208nm 308nm
Trans- ρεσβερατρόλη	ODS Hypersil (250 x 4.0mm, 5μm) 40 °C	A. ακετονιτρίλιο B. νερό που περιέχει υπερχλωρικό οξύ (0,6ml/L) 5% A, 0min, 5-50% A, 0- 5min, 50-60% A, 5-15min, 60% A, 15-30min για να ξεπλυθεί η στήλη, επαναφέρετε τις αρχικές συνθήκες για 5min 1ml/min	DAD 310nm
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη	ODS C18 (250 x 4.0mm, 5μm) 40 °C	A. νερό/μεθανόλη (50:50, v/v) B. νερό/ακετονιτρίλιο (70:30, v/v) Διάλυμα A από 0-18min, μετά από A 100% σε B 100% σε 1 min και από B 100% σε A 100% σε 6min για να ξάνα επαναφερθούν οι αρχικές συνθήκες. 0,6ml/min	DAD 285nm 306nm
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη	Nucleosil, C18 120 (250 x 4.0mm, 5μm) 40 °C	A. οξικό οξύ 12% σε νερό, pH 2,4 B. οξικό οξύ 12% ph 2,4/ακετονιτρίλιο (20:80, v/v) 18% B, 0-11min, 18-23% B, 11-18min, 23-100% B, 18- 31min 1,5ml/min	UV 285nm και 306nm
Trans- και cis- ρεσβερατρόλη και trans- και cis- ρεσβερατρόλη- γλυκοζίτης	Symetry C18 (150 x 2,1mm, 5μm)	A. νερό με pH 2,5 προσαρμοσμένο με H ₂ SO ₄ B. ακετονιτρίλιο A%/B%, min 100/0, 0: 50/50, 60; 50/50, 90; 0/100,100; 100/0, 110;	UV 280nm και 305nm MS SIM mode, στα m/z 228

		0,2ml/min	
Trans- ρεσβερατρόλη	LiChropher 100- RP-18 (250 x 4mm, 5μm) 35 °C	A. νερό/0.05% τριφθοροξικό οξύ (TFA) B. μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (60:40) 0-10% B, 0-5min, 10-15% B, 5-40min, 15-35% B, 40- 55min, 35-10% B για 20min για εξισορρόπηση της στήλης 1ml/min	DAD 306nm MSD trap σε ESI mode MS ²
Cis- και trans- ρεσβερατρόλη	Nucleosil, C18 120 (250 x 4.0mm, 5μm) 40 °C	A. υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, pH 2,4 B. 20% διαλύματος A και 80% ακετονιτρίλιο 82% A, 0-10min, 82-77% A, 10-17min, 77-75,5% A, 17- 21min, 75,5-68,5% A, 21- 27min, 68,5-0% A, 27-30min 1,5ml/min	DAD UV-Vis 285nm, 306nm
Cis- και trans- ρεσβερατρόλη	Chromolite Performance RP-18e (100 x 4.6mm)	A. νερό/οξικό οξύ (94:6. v/v) B. νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ (65:30:5, v/v) 85-70% A, 0-10min, 70-20% A, 10-17min, 20-0% A, 17- 18min, 0-85% A, 18-20min 4.0 ml/min	UV-Vis 285 και 306nm
Trans- ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ, κερσετίνη, ρουτίνη	ODS Hypersil (250 x 4.0mm, 5μm)	A. οξικό οξύ B. μεθανόλη Γ. νερό A/B/Γ, (v/v), χρόνος 0-5min, 5:15:80, 0,4ml/min, 5-30min, 5:20:75, 0,5ml/min, 30- 50min, 5:45:50, 0,5ml/min	UV 360nm, 272nm, 373,256nm, 360,259nm
Cis- και trans- πολυδατίνη (ρεσβερατρολ-3-β- γλυκοζίτης)	ODS Hypersil (250 x 4.0mm, 5μm)	A. οξικό οξύ B. μεθανόλη Γ. νερό 0min, 5% A, 15% B, 80% Γ, 0,4ml/min. Μετά από 5min, 5% A, 20% B, 75% Γ, 0,5ml/min. Στα 30min, 5% A, 45% B, 50% Γ μέχρι τα 40min. Ύστερα ακολουθεί 10 λεπτά εξισορρόπηση με το αρχικό διάλυμα (0min)	DAD 306nm
Trans- ρεσβερατρόλη και πτεροστιλβένια	C18	GE. Μεθανόλη/μυρμηκικό οξύ (50mM)	UV και FLD

Trans- και cis-ρεσβερατρόλη, trans- και cis-πολυδατίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη, ρουτίνη, κερσετίνη	ODS Hypersil (250 x 4mm, 5μm)	Οξικό οξύ/μεθανόλη/νερό %A/B/Γ: min: ml/min 5/15/80: 0: 0,4 5/20/75: 5: 0,5 5/45/50: 30: 0,5 5/45/50: 40: 0,5 5/15/80: 50: 0,4	DAD 265, 280, 306nm, 317 και 369
Πρότυπη trans- και cis- ρεσβερατρόλη	HP ODS Hypersil (100 x 2,1mm, 5μm) 40 °C	Νερό/μεθανόλη %A/B, min 100/0, 0 0/100, 15 100/0, 16 100/0, 21 0,5ml/min	DAD 306, 286nm
Κατεχίνη, επικατεχίνη, ρουτίνη, trans- και cis- ρεσβερατρόλη και κερσετίνη	Spherisorb ODS-2 (150 x 4mm, 5μm) θερμοκρασία δωματίου	Ακετονιτρίλιο/ 5% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος %A/B, min 9/91, 0 9/91, 10 25/75, 11 25/75, 22 70/30, 23 70/30, 28 9/91, 29 9/91, 44 1ml/min	DAD 306nm Φθορισμός t _R (min) 4.1, 8.5, 14.4, 17.2, 19.5, 25.0
trans- και cis-ρεσβερατρόλη, trans-ε και cis-ε-βινιφερίνη, trans-δ και cis-δ-βινιφερίνη, trans-,cis-πτεροστιλβένια	C18 Lichrospher (250 x 4,6mm, 5μm) 25 °C	Ακετονιτρίλιο/νερό: 1min ισοκρατική (20:80%); γραμμική βαθμίδωση, 20/80%-75/25% 30min; 75/25%-100%, 2min; 100% 3min; 20/80%, 1min; ισοκρατική 20/80% 4min 1ml/min	Trans ε- και trans δ-βινιφερίνη UV 307nm MSD

GE: βαθμιδωτή έκλυση, ECD: ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, APCI: ατμοσφαιρικής πίεσης χημικός ιονισμός, ESI: ιονισμός ηλεκτροψεκασμού, SSI: ιονισμός με ηχητικό ψεκασμό, CID: σύγκρουση- επαγόμενη διάσπαση, HBA: υδροξυβενζοϊκό οξύ, HCA: υδροξυκιναμικό οξύ, t_R: χρόνος κατακράτησης.^[21]

4.4. Ανάλυση αμινοξέων με HPLC

Προετοιμασία δείγματος

Τα γλεύκη φιλτράρονται με ένα χαρτί Whatman No.4 και στην συνέχεια αραιώνονται (1:4, v/v) με ένα πρότυπο διάλυμα (νορβαλίνη + σαρκosίνη) στα 62,5mmole/L σε 0,1M HCl. Το

νέο διάλυμα ξανά φιλτράρεται μέσω ενός 0,45mm φίλτρου μίας χρήσεως, πριν εγχυθεί στην χρωματογραφική στήλη. Τα δείγματα κρασιού ετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο, αλλά εξαιρείται το αρχικό στάδιο της διήθησης.

Παραγωγοποίηση

Ο αυτόματος δειγματολήπτης προγραμματίζεται να προσθέτει 5ml ρυθμιστικό διάλυμα βορικού νατρίου (0,4N, pH 10.4) σε 1ml αντιδραστήριο OPA και 1ml δείγματος. Το μίγμα της αντίδρασης στην συνέχεια αναδεύεται κατά την διάρκεια 6 κύκλων (10sec/κύκλος) πριν προστεθεί 1ml FMOC-Cl αντιδραστήριο. Το τελικό μίγμα αναδεύεται σε 3 κύκλους και τελικά εγχύεται στην στήλη (όγκος εγχύματος: 8ml)

Εξοπλισμός

Γίνεται χρήση του χρωματογραφικού συστήματος Hewlett Packard 1090 Series II/M AminoQuant liquid chromatograph περιλαμβάνοντας: κλίβανο στήλης, δυαδικό σύστημα έκλουσης D35, αυτόματο δειγματολήπτη, ένας προγραμματιζόμενος ανιχνευτής φθορισμού Hewlett Packard 1046A, μια μονάδα δίσκου Hewlett Packard 9153C, Hewlett Packard ChemStation 9000/300 και έναν εκτυπωτή Hewlett Packard Think Jet. Η χρωματογραφική στήλη είναι η C18 HP AminoAcid Analysis (200 x 2,1mm), προστατευμένη από μία 15 x 2,1mm προστατευτική στήλη

Συνθήκες ανάλυσης

Κινητές φάσεις: ο εκλουτής A είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα 20mM οξικού νατρίου (pH 7,2, που ρυθμίζεται με διάλυμα οξικού οξέος. 2% v/v), περιέχοντας 0,018% v/v τριαιθυλαμίνη. Ο εκλουτής B είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα 20% 100mM οξικού νατρίου (pH 9,10, ρυθμιζόμενο με οξικό οξύ 2% v/v), 40% ακετονιτρίλιο και 40% μεθανόλη.

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος min	17,0	18,0	18,1	18,5	23,9	24,0	25
Εκλουτής A%	40	0	0	0	0	0	100
Ροή (ml/min)	0,45	0,45	0,45	0,80	0,80	0,45	0,45

Ανίχνευση

Τα μήκη κύματος διέγερσης/εκπομπής είναι αντίστοιχα 340/450nm για τα πρωτογενή αμινοξέα και 237/340nm για τα δευτερογενή αμινοξέα.^[26]

4.5. Ταυτόχρονη ανάλυση HPLC βιογενών αμίνων, αμινοξέων και ιόντων αμμωνίου ως παράγωγα αμινοεξόνης στον οίνο

Ενζυμικός προσδιορισμός ιόντων αμμωνίου

Η αμμωνία προσδιορίζεται με ένα ενζυμικό κιτ για τον προσδιορισμό της ουρίας και ιόντων αμμωνίου στα τρόφιμα από την Boehringer Mannheim/ R- Biopharm. Στα δείγματα κρασιού προστίθεται PVPP, ώστε να αποφευχθεί η παρεμβολή των ταννινών.

Παραγωγή

Τα παράγωγα της αμινοεξάνης αποκτώνται με αντίδραση 1,75ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού 1M (pH=9), 750μl μεθανόλης 1ml του δείγματος, χωρίς κάποια προεπεξεργασία, 20μl ενός εσωτερικού προτύπου(L-2-αμινοαδipικό οξύ, 1g/l) και 30μl DEEMM σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό καπάκι για 30 λεπτά, μέσα σε ένα λουτρό υπερήχων. Το δείγμα στην συνέχεια θερμαίνεται στους 70 °C για 2h, για να επιτραπεί η πλήρης αποικοδόμηση του περίσσειου DEEMM και των υποπροϊόντων των αντιδραστηρίων.

Ανάλυση HPLC

Χρησιμοποιείται ένα σύστημα Varian ProStar HPLC που περιλαμβάνει μια τριαδική αντλία ProStar 240, έναν αυτόματο δειγματολήπτη ProStar 410 και έναν ανιχνευτή PDA ProStar 330.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός γίνεται σε μία ACE HPLC στήλη (5 C18-HL) μέγεθος σωματιδίων 5μm (250mm x 4,6mm) σε θερμοκρασία 16 °C, σε έναν κλίβανο MFE-01, μέσω μιας δυαδικής βαθμιδωτής έκλουσης που είναι ως εξής:

Χρόνος (min)	0.0	20.0	30.5	33.5	65.0	73.0	78.0	82.0	85.0
Εκλουτής A	90	90	83	83	60	28	18	0	0
Εκλουτής B	10	10	17	17	40	72	82	100	100

Ο εκλουτής A είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα 25mM οξικού άλατος με pH 5,8, με 0,02% οξειδίου του νατρίου και ο εκλουτής B είναι ένα μείγμα 80:20 ακετονιτρίου και μεθανόλης. Ο ρυθμός ροής είναι 0,9ml/min.

Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής PDA που παρακολουθείται στα 280, 269 και 300nm.

Σε αυτές τις συνθήκες διαχωρίζονται, ταυτοποιούνται και ποσοτικοποιούνται με ένα μοναδικό έγχυμα 24 αμινοξέα (συν το εσωτερικό πρότυπο), το αμμωνιακό ιόν και 9 βιογενείς αμίνες.

Οι επιθυμητές ενώσεις ταυτοποιούνται σύμφωνα με τους χρόνους κατακράτησης και τα UV-Vis χαρακτηριστικά των παραγώγων των αντίστοιχων πρότυπων και ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου. Τα όρια ανίχνευσης υπολογίζονται σύμφωνα με την μέθοδο OIV Oeno 7/2000. ^[27]

4.6 Ταυτόχρονος προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων στον οίνο με HPLC

Εξοπλισμός και συνθήκες ανάλυσης

Για την ανάλυση γίνεται χρήση συστήματος Agilent HPLC, μοντέλο 1260 Infinity LC, εξοπλισμένο με αντλία τεταρτοταγούς διαλύτη, απαερωτή, θάλαμο στήλης με θερμοστάτη, αυτόματο δειγματολήπτη, ανιχνευτή διάταξης διοδών DAD και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID. Τα δεδομένα υποβάλλονται σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το λογισμικό OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies).

Για την αναλυτική διαδικασία χρησιμοποιείται χρωματογραφική στήλη ανταλλαγής ιόντων Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7mm και εσωτερικά σωματίδια 8μm) και μια προστήλη PL Hi-Plex H (5 x 3mm). Η θερμοκρασία στήλης πρέπει να διατηρείται στους 70°C και η θερμοκρασία της κυψελίδας ροής του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης στους 50°C. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης είναι 0,5ml/min με συνολικό χρόνο λειτουργίας της χρωματογραφικής ανάλυσης τα 20 λεπτά.

Προετοιμασία κινητής φάσης και δειγμάτων

Για την κινητή φάση χρησιμοποιείται διάλυμα H₂SO₄ 4.0mM/L σε υπερκάθαρο νερό, δηλαδή σε νερό απαλλαγμένο από όλα τα διαλυτά στερεά και με αγωγιμότητα κάτω από 0,1μS/cm.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιούνται εμπορικά δείγματα οίνου και χυμού σταφυλιών. Λήψη 500ml οίνου ή χυμού και αραιώση σε 1ml υπερκάθαρου νερού. Διήθηση του αραιωμένου δείγματος μέσω μεμβράνης πόρων 0,45μm. Ο όγκος της ένεσης του δείγματος που εισάγεται στο σύστημα είναι 10ml. Η χρωματογραφική ανάλυση ξεκινά, η έκλυση είναι ισοκρατική και γίνεται λήψη του χρόνου κατακράτησης για κάθε ένωση.

Για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων, όπως τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό, κιτρικό και οξικό οξύ, γίνεται χρήση ανιχνευτή DAD στα 210nm.

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, ραμνόζη, γίνεται χρήση ανιχνευτή RID.^[10]

4.7 Προσδιορισμός φλαβονοειδών στον οίνο

Εξοπλισμός και συνθήκες ανάλυσης

Για την ανάλυση γίνεται χρήση συστήματος HPLC το οποίο αποτελείται από ένα σύστημα άντλησης σειράς Shimadzu LC-6A, έναν αυτόματο εγχυτήρα SIL-6A εξοπλισμένο με βρόχο 50ml, έναν ανιχνευτή ορατού UV SPD-6AV στα 360 nm και ένα λογισμικό σταθμού δεδομένων χρωματογραφίας C-R6A για την επεξεργασία των δεδομένων. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται είναι η Merck LiChrospher 100RP-18e (250 x 4mm, με εσωτερικά σωματίδια 5μm) και η προστατευτική προστήλη η Merck RP-18 (10mm x 4mm). Η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να διατηρείται στους 20°C.^[13]

Προετοιμασία δειγμάτων και κινητής φάσης

Για την παρασκευή των δειγμάτων γίνεται χρήση εμπορικών οίνων τα οποία διαλύονται σε διάλυμα μεθανόλης συγκέντρωσης 1mg/ml, διηθούνται σε φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,45μm και έπειτα γίνεται έγχυση 40ml στον χρωματογράφο.

Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο Διαλύτης Α αποτελείται από 19% ακετονιτρίλιο, 5% μεθανόλη και 1% THF σε νερό (pH=3). Ο Διαλύτης Β αποτελείται από 55% ακετονιτρίλιο και 15% μεθανόλη σε νερό (pH=3). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης είναι 1,0ml/min.

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	Διαλύτης Β (%)
0-15	2
15-28	2-28
28-40	28-36
40-44	36
44-45	36-86
45-52	86

4.8. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, αλκοολών και σακχάρων

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων οίνων γίνεται άμεση έγχυση σε φυσίγγια Bond Elute SAX για καθαρισμό αυτών και έπειτα αραιώση σε αναλογία 1:20 με την κινητή φάση. Τέλος διήθηση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης 0,22μm μέγεθος πόρων.

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC Jasco εξοπλισμένο με αντλία και δύο ανιχνευτές συνδεδεμένους σε σειρά. Έναν ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος UV στα 210nm για την μέτρηση των οργανικών οξέων και έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης για τη μέτρηση των σακχάρων.

Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιείται είναι Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), της οποίας η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 45°C και μια προστήλη αντίστοιχη (30 x 4,6mm). Η έκλουση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από 0,003-0,05N H₂SO₄ με 6% ακετονιτρίλιο (v/v). Ο ρυθμός ροής είναι 0,5ml/min και ο όγκος ένεσης του δείγματος είναι 20ml.^[7]

4.9 Προσδιορισμός γλουταθειόνης και θειολών

Προετοιμασία δείγματος

Λήψη 0,5ml χυμού σταφυλιών πριν τη ζύμωση, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης. Αραίωση με 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 50mM οξικού νατρίου pH=4 που περιέχει 0,1mM EDTA. Το δείγμα απαιτεί κάποια επεξεργασία πριν την χρωματογραφική ανάλυση γι' αυτό γίνεται μια παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη.

Παραγωγοποίηση

Τα αντιδραστήρια της παραγωγοποίησης είναι τα εξής:

- 2mg ο-φθαλαλδεϋδης διαλυμένα σε 1ml μεθανόλης (φουσαλίδιο Νο1)
- 2ml 2-αμινοαιθανόλης διαλυμένα σε 1ml βορικού νατρίου 0,8M, pH=7,4.

Με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη Hewlett-Packard γίνεται λήψη 2ml OPA από το φουσαλίδιο Νο1, έπειτα λήψη 5ml οίνου και τέλος λήψη 2ml 2-αμινοαιθανόλης και ανάμειξη για 1 λεπτό. Πριν από κάθε λήψη ξεπλένετε τη βελόνα με νερό. Το δείγμα των 9ml εγχύεται στον χρωματογράφο για ανάλυση.^[36]

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC Hewlett-Packard εξοπλισμένο με στήλη Ultramex 3C18 (100 x 4,6mm, με σωματίδια 3μm) και έναν ανιχνευτή φθορισμού με διέγερση στα 340nm και εκπομπή στα 450nm. Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 50mM οξικού νατρίου, pH=5,7 για τον διαλύτη A και μεθανόλη για τον διαλύτη B.^[36]

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
1	90	10
2	85	15
6	72	28
7	68	32
9	64	36
10	56	44
12	52	48
19	50	50
21	40	60
25	32	68
26	0	100
31	90	10

4.10 Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοξέων και κυστεΐνης

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την χρωματογραφική ανάλυση των ελεύθερων αμινοξέων και της κυστεΐνης χρησιμοποιείται σύστημα HPLC δυαδικής κλίσης HP 1100 της Hewlett-Packard εξοπλισμένο με έναν αυτόματο δειγματολήπτη και έναν ανιχνευτή φθορισμού Jasco 821 FP με μήκος κύματος διέγερσης τα 356nm και μήκος κύματος εκπομπής τα 445nm. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται είναι η LiChrospher RP 18 (125mm x 4mm, με σωματίδια 5μm) και η προστατευτική στήλη παραγωγοποίησης είναι εξίσου η LiChrospher (4mm x 4mm, με σωματίδια 5μm).^[39]

Παραγωγοποίηση

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων είναι απαραίτητη μια παραγωγοποίηση στην προστήλη με τη χρήση ο-φθαλδιαλδεύδης (OPA). Επειδή όμως το αντιδραστήριο αυτό δεν χρησιμοποιείται για την μέτρηση αμινοξέων θείου, όπως η κυστεΐνη πρέπει να γίνει προηγουμένως και μια παραγωγοποίηση με ιωδοοξικό οξύ (IDA).^[39]

Για τη παρασκευή των παραπάνω αντιδραστηρίων ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες:

1. Παρασκευή αντιδραστηρίου IDA: διάλυση 3,5g του αντιδραστηρίου σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού με τελικό όγκο 100ml και τελικό pH=9,5. Αποθήκευση στους 4°C.
2. Παρασκευή αντιδραστηρίου OPA: διάλυση 750mg του αντιδραστηρίου σε 5ml μεθανόλης και 0,5ml 2-μερκαπτοαιθανόλης και συμπλήρωση με 50ml ρυθμιστικού έως τελικό όγκο 50ml. Αποθήκευση τους 4°C στο σκοτάδι.
3. Για το ρυθμιστικό διάλυμα βορικού χρειάζονται 6,2g H₃BO₃ διαλυμένα σε νερό, δημιουργώντας διάλυμα τελικού όγκου 1000ml, το οποίο ρυθμίζεται σε pH=9,5.
4. Το πρότυπο διάλυμα L-αμινοξέων παρασκευάζεται με διάλυση 22 αμινοξέων σε νερό με σκοπό να ληφθεί συγκέντρωση παρόμοια με αυτή του κρασιού. Προσθήκη λίγων σταγόνων HCl για την διάλυση των αμινοξέων και έπειτα φύλλαξη στους -20°C. Ο όγκος ένεσης του διαλύματος για την χρωματογραφική ανάλυση είναι 10ml. Ο χρόνος διάρκειας της χρωματογραφικής ανάλυσης είναι 107λεπτά

Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A παρασκευάζεται με 230ml υδατικού διαλύματος 250mM όξινου φωσφορικού δινατρίου, 200ml υδατικού διαλύματος 250mM προπιονικού οξέος και 20ml διμεθυλσουλφοξειδίου. Ρύθμιση pH=6,65 και τελική προσθήκη 65ml ακετονιτριλίου με νερό σε τελικό όγκο 1000ml. Για τον διαλύτη B γίνεται ανάμειξη 400ml ακετονιτριλίου, 330ml μεθανόλης, 70ml διμεθυλσουλφοξειδίου και 200ml νερό. Τέλος διήθηση και των 2 διαλυτών μέσα από μεμβράνη μεγέθους πόρων 0,45μm. Ο ρυθμός ροής 0,8ml/min.^[39]

Πρόγραμμα έκλυσης:

Χρόνος (min)	0	2	35	45	80	85	110	115	120	125
Διαλύτης A (%)	95	90	90	70	70	60	20	20	50	95

Διαλύτης Β (%)	5	10	10	30	30	40	80	80	50	5
----------------	---	----	----	----	----	----	----	----	----	---

4.11 Προσδιορισμός ωχρατοξίνης τον οίνο (1ος τρόπος)

Εξολισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με αντλία βαθμίδωσης και ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 336nm και μήκος κύματος εκπομπής 464nm. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε αναλυτική στήλη (125 x 4mm, με σωματίδια) και προστήλη (4 x 4mm) LiChrospher RP 18.^[4]

Η έκλυση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από μεθανόλη, νερό και οξικό οξύ σε αναλογίες 70:30:2 (v/v/v). Ο ρυθμός ροής είναι 0,5ml/min.^[4]

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση 10ml οίνου ή μούστου αραιώνονται σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS, το pH ρυθμίζεται στο 7-7,5 και το δείγμα διηθείται. 10ml του δείγματος εγχύονται σε στήλη ανοσοσυγγένειας IAC, η οποία συγκρατεί στο ειδικό προσροφητικό υλικό που έχει διάφορες διαλυμένες προσμίξεις που δεν θέλουμε. Η κινητή φάση της στήλης αυτής αποτελείται από 4ml διαλύματος μεθανόλης οξινομένη σε οξικό οξύ σε αναλογία 98:2 (v/v). Το έκλυσμα δηλαδή η ωχρατοξίνη εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και πριν την ανάλυση HPLC διαλύεται σε 200ml κινητής φάσης. Δηλαδή τα πρότυπα διαλύματα αποτελούνται από OTA διαλυμένη σε μεθανόλη μετά από την παραπάνω επεξεργασία.

4.11.1. Προσδιορισμός ωχρατοξίνης (2ος τρόπος)

Εξοπισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC με στήλη ανάστροφης φάσης Discovery C18 (15cm x 4,6mm, με σωματίδια 5μm) και ανιχνευτή φθορισμού Perkin-Elmer με μήκος κύματος διέγερσης 333nm και μήκος κύματος εκπομπής 460nm.^[14]

Προετοιμασία δείγματος και κινητής φάσης

Για την προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιούνται 10ml οίνου τα οποία αραιώνονται σε 10ml υδατικού διαλύματος PEG 1% και NaHCO₃ 5% και διηθούνται.

Πριν όμως την ανάλυση HPLC το δείγμα περνά από στήλη ανοσοσυγγένειας για τον καθαρισμό του. Οι στήλες αυτές παρέχουν καθαρά εκλύσματα λόγω της ιδιότητας των αντισωμάτων που διαθέτουν για την τοξίνη αυτή. Πιο αναλυτικά, το δείγμα περνά μέσα από την στήλη αυτή και η ωχρατοξίνη εκλύεται με 2ml μεθανόλης και ρυθμό ροής 1ml/min. Έπειτα το έκλυσμα εξατμίζεται υπό ρεύμα αζώτου και διαλύεται σε 250ml κινητής φάσης.

Στη συνέχεια εισάγονται 100ml του δείγματος αυτού στον χρωματογράφο. Η έκλυση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από μείγμα ακετονιτριλίου-νερού-οξικού οξέος σε

αναλογία 99:99:2 (v/v/v), με ρυθμό ροής 1ml/min. Η ποσοτικοποίηση γίνεται μετρώντας τις περιοχές των κορυφών στο χρόνο κατακράτησης της ωχρατοξίνης.

4.12. Προσδιορισμός πυροανθοκυανών

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC Aligent technologies 1100 εξοπλισμένο με τεταρτοταγής αντλία και αυτόματο δειγματολήπτη. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται είναι RP Phenomenex Luna C18 PFP (250 x 4,6mm, με σωματίδια 5μm) και αντίστοιχη προστήλη. Η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να διατηρείται στους 25°C. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται ανιχνευτής συστοιχίας διοδών DAD σε μήκος κύματος απορρόφησης 520nm. Ο όγκος ένεσης στον δειγματολήπτη είναι 40ml. Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι 0,2% τριφθοροξικό οξύ σε νερό και ο διαλύτης B είναι 0,2% τριφθοροξικό οξύ σε μεθανόλη.^[5]

Πρόγραμμα έκλυσης:

Χρόνος (min)	0	0-20	20-30	30-40	40-50
Διαλύτης B (%)	20	20-45	45-55	55-70	20

Τα δείγματα μπορεί να είναι είτε οίνοι εμφιαλωμένοι είτε σε ζύμωση.

4.13. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με τριμερή αντλία SP-8800 και ανιχνευτή DAD. Η ανίχνευση γίνεται σε μήκος κύματος απορρόφησης 280nm. Η αναλυτική στήλη και η προστήλη είναι η 250-4 Superspher 100RP18 και η 250-4 Superspher 100W18E αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης πρέπει να διατηρείται στους 20°C. Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 3 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι 1% οξικό οξύ σε νερό, ο διαλύτης B είναι 5% οξικό οξύ σε νερό και ο διαλύτης Γ είναι μείγμα οξικού οξέος/ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 5:30:65 (v/v/v). Ο ρυθμός ροής είναι 0,5ml/min. Τα δείγματα είναι οίνος χωρίς καμία επεξεργασία.^[41]

Πρόγραμμα έκλυσης:

Χρόνος (min)	B (%)	Γ (%)	A (%)	B (%)	Γ (%)	A (%)	B (%)	Γ (%)
0	100	0	100	0	0	100	0	0
15	-	-	-	-	-	0	100	0
20	99	1	-	-	-	-	-	-
30	97	3	0	100	0	0	100	0

40	95	5	0	95	5	0	95	5
50	90	10	0	90	10	0	90	10
60	90	10	0	80	20	0	80	20
80	70	30	0	70	30	0	70	30
120	0	100	0	0	100	0	0	100

4.14. Προσδιορισμός οργανικών οξέων, πολυφαινόλων και φουρανικών ενώσεων

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC με χρωματογραφική στήλη ανάλυσης Atlantis dC18 (250 x 4,6mm, με σωματίδια 5μm), η θερμοκρασία της οποίας πρέπει να διατηρείται στους 30°C. Χρειάζονται 12 λεπτά έκλουσης για τα οργανικά οξέα και 60 λεπτά για τις φαινόλες (στιλβένια, φλαβονοειδή). Χρησιμοποιείται ανιχνευτής UV σε διάφορα μήκη κύματος ανάλογα σε ποια απορροφούν οι ενώσεις.^[38] Πιο αναλυτικά:

Μήκη κύματος (nm)	Ενώσεις
210	Οργανικά και βενζοϊκά οξέα και φλαβανόλες
254	Ελλαγικό οξύ
280	Φουράνια και κινναμωνικό οξύ
315	Υδροξυκινναμικά οξέα
360	Φλαβονοειδή

Για τα οργανικά οξέα η έκλουση είναι ισοκρατική η κινητή φάση αποτελείται από 100% ακετονιτρίλιο. Από την άλλη για τις πολυφαινόλες και τα φουράνια η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη Α που είναι το ακετονιτρίλιο και το διαλύτη Β που είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα 10mM φωσφορικού οξέος ρυθμισμένο σε pH=2,7 με πυκνόθειϊκό οξύ.^[38]

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)
0-30	0-20
30-50	20-50

Ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min και ο όγκος ένεσης δείγματος που εγχύεται στον χρωματογράφο είναι 10ml. Η ένεση γίνεται 3 φορές. Πριν την ανάλυση HPLC τα δείγματα πρέπει να φιλτράρονται μέσα από μεμβράνες διήθησης μέγεθος πόρων 0,45μm.

Πιο αναλυτικά τα δείγματα οι ενώσεις προς ανάλυση και χρωματογραφικές συνθήκες:^[38]

Πίνακας 2: Συνθήκες HPLC για ανάλυση πολυφαινόλων και ανθοκυανών

Δείγματα	Αναλυτές	Αναλυτική στήλη	Εκλουστικά	Μήκη κύματος (nm)
Ερυθροί οίνοι	15 πολυφαινόλες	ODS-Hypersil (2,1 x 100mm, 5μm) T= 40°C	Διαλύτης Α:οξιτισμένο νερό, 0,6% υπερχλωρικό οξύ Διαλύτης Β:μεθανόλη Ρυθμός ροής:0,3ml/min	280
Ερυθροί οίνοι	20 πολυφαινόλες + ανθοκυάνες	LiChrospher RP-18 (4 x 250mm, 5μm) T= 40°C	Διαλύτης Α: 9mM υδατικό ορθοφωσφορικό οξύ, Ph=2,5 Διαλύτης Β: διαλύτης Α/ακετονιτρίλιο 75:25 (v/v) Ρυθμός ροής:1,0ml/min	280, 320,360 και 520
Ερυθροί οίνοι	12 πολυφαινόλες	Hypersil ODS (4,6 x 200mm, 5μm)	Διαλύτης Α:οξικό οξύ σε νερό, 2% (v/v) Διαλύτης Β: νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ 78:20:2 (v/v/v) Ρυθμός ροής:1,0ml/min	254,280 και 340
Ερυθροί οίνοι	16 πολυφαινόλες	ODS-Hypersil (4,6 x 200mm, 5μm)	Διαλύτης Α: νερό/μυρμιγκικό οξύ 99:1 (v/v) Διαλύτης Β:μεθανόλη Ρυθμός ροής:0,3ml/min	280,320 και 350
Ερυθροί οίνοι	35 πολυφαινόλες + ανθοκυάνες	Spherisorb C18 (4,6 x 250mm, 5μm)T= 40°C	Διαλύτης Α: 50mM υδατικό αμμώνιο όξινο φωσφορικό, pH=2,6 Διαλύτης Β: διαλύτης Α/ακετονιτρίλιο 20:80 (v/v) Διαλύτης C:200mM φωσφορικό οξύ pH=1,5	280,320,360 και 520
Ερυθροί οίνοι	47 πολυφαινόλες	Nova-Pak C18 (3,9	Διαλύτης Α: οξικό οξύ σε νερό, 2%(v/v)	280,340 και 310

		x300mm,4μm)	Διαλύτης B:νερό/ακετονιτρίλιο/ οξικό οξύ 78:20:2 (v/v/v) Ρυθμός ροής:0,7 ml/min	
Ερυθροί οίνοι	30 πολυφαινόλες + ανθοκυάνες	Atlantis dC18 (2,1 x 250mm, 5μm) T= 30°C	Διαλύτης A: μυρμιγκικό οξύ σε νερό, 5 % (v/v) Διαλύτης B:ακετονιτρίλιο/νερό/ μυρμιγκικό οξύ 80:15:5 (v/v/v) Ρυθμός ροής:0,25 ml/min	280,320,360 και 520
Ερυθροί οίνοι	6 οργανικά οξέα	Nucleogel ion 300 OA (7,7 x300mm) T= 30°C	Ισοκρατικό:0,01N θειικό οξύ Ρυθμός ροής:0,2 ml/min	214
Ερυθροί οίνοι	38 πολυφαινόλες + ανθοκυάνες	Waters symmetry C18 (4,6 x 150mm, 5μm) T= 35°C	Διαλύτης A:μυρμιγκικό οξύ σε νερό, 5% (v/v) Διαλύτης B:μεθανόλη Ρυθμός ροής:1,0 ml/min	280,320,360 και 520
Ερυθροί οίνοι	48 πολυφαινόλες + ανθοκυάνες	Ace 5 C18 (4,6 x 250mm) T= 20°C	Διαλύτης A:50mM υδατικό αμμώνιο όξινο φωσφορικό, pH=2,6 Διαλύτης B: διαλύτης A/ακετονιτρίλιο 20:80 (v/v) Διαλύτης C:200mM φωσφορικό οξύ pH=1,5	280,320,360 και 520
Ερυθροί οίνοι	6 πολυφαινόλες	LC18RP packing Supelco (2,1 x 150mm, 5μm)	Διαλύτης A: 5% μυρμιγκικό οξύ σε νερό Διαλύτης B: ακετονιτρίλιο Ρυθμός ροής:0,3-0,8 ml/min	285,306 και 207
Ερυθροί οίνοι	11 πολυφαινόλες	LichroCART 250-4	Ισοκρατικό:5mM φωσφορικό οξύ	210

	και 2 οργανικά οξέα	Superdpher RP 18 (4,6 x 250mm, 5μm)	Ρυθμός ροής:0,7 ml/min	
Μούστος και οίνος από κόκκινα σταφύλια	7 οργανικά οξέα και πολυφαινόλες	Synergi Polar-RP (4,6 x 250mm) T= 30°C	Διαλύτης Α:τριφθοροξικό οξύ σε νερό, 0,2% (v/v) pH=1,9 Διαλύτης Β:ακετονιτρίλιο Ρυθμός ροής:1,5ml/min	210 και 280
Λευκοί οίνοι	17 πολυφαινόλες	Nova-Pak C18 (3,9 x 300mm, 4μm) T= 20°C	Διαλύτης Α: οξικό οξύ σε νερό, 2% (v/v) Διαλύτης Β:νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ. 58:40:2 (v/v/v) Ρυθμός ροής:1,0ml/min	280 και 320
Χυμός λευκών σταφυλιών	3 οργανικά οξέα	Bio-Rad Aminex HPX 87 (300 x 7,9mm)	Ισοκρατικό:0,01N θειικό οξύ Ρυθμός ροής:0,6ml/min	214
Ερυθροί και λευκοί οίνοι	17 πολυφαινόλες	Chromolith Perfor mance RP 18e (4,6 x 100mm) T= 30°C	Διαλύτης Α:μεθανόλη/διπλής απόσταξης νερό 2,5:97,5 (v/v) Ph=3 με H ₃ PO ₄ Διαλύτης Β:μεθανόλη/ διπλής απόσταξης νερό 50:50 (v/v) Ph=3 με H ₃ PO ₄ Ρυθμός ροής:1,0ml/min	256,280,308,324 και 365
Ερυθροί και λευκοί οίνοι	13 πολυφαινόλες	Aligent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250mm, 5μm)	Διαλύτης Α:νερό/μεθανόλη/μυρμηγκικό οξύ 97:2,5:0,5 (v/v/v) Διαλύτης Β:μεθανόλη Ρυθμός ροής:1,0ml/min	280,305 και 370
Ερυθροί, λευκοί και ροζέ οίνοι	17 πολυφαινόλες	Nova-Pak C18 (3,9 x 150mm, 4μm)	Διαλύτης Α:νερό/οξικό οξύ/μεθανόλη 88:2:10 (v/v/v) Διαλύτης Β:νερό/οξικό οξύ/μεθανόλη 8:2:90 (v/v/v) Ρυθμός ροής:0,7ml/min	270, 307 και 360
Μούστοι	6 οργανικά	Spherisorb	Διαλύτης Α:νερό	265

και ενισχυμένοι οίνοι	οξέα	C18 (4,6 x 150mm, 3μm)	Διαλύτης B:ακετονιτρίλιο Ρυθμός ροής: 1,5ml/min	
-----------------------	------	------------------------	--	--

4.15. Εντοπισμός ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στον οίνο

Τα πρότυπα των φυτοφαρμάκων διαλύονται σε μεθανόλη.

Διαδικασία SPE

Πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση θα πρέπει να γίνει μια επεξεργασία των δειγμάτων γνωστή και ως SPE. Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια κλασική και συμβατική μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται για αναλύσεις φυτοφαρμάκων. Η λειτουργία της βασίζεται στην αρχή της προσρόφησης αναλυόμενων ουσιών, οι οποίες παγιδεύονται στο προσροφητικό υλικό της στήλης και στη συνέχεια εκκλούνται. Η προσρόφηση βασίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και την παρουσία αρωματικών δακτυλίων εντός του πολυμερικού δικτύου που οδηγεί σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τους αρωματικούς δακτυλίους στη χημική δομή των φυτοφαρμάκων.^[42]

Χρησιμοποιούνται στήλες Bakerbond Octadecyl C18 Polar Plus SPE και C18=SDB-1 και θάλαμος Baker SPE-12 G SPE. Οι στήλες πλένονται με μεθανόλη και μετά με νερό. Τα δείγματα κρασιών αραιώνονται (3:1) και 200ml εγχύονται στις στήλες C18 ή C18=SDB-1 SPE με ρυθμό ροής 7,5–10 mL/min. Η έκλυση γίνεται με 10ml μεθανόλης.^[42]

Αναλυτικές συνθήκες

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC με αναλυτική στήλη 2ORBAX Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6mm, με σωματίδια 5μm), της οποίας η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 22°C. Ο προσδιορισμός γίνεται με ανιχνευτή DAD. Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι νερό και ο διαλύτης B είναι ακετονιτρίλιο. Ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min και ο όγκος ένεσης 20ml.

Πρόγραμμα έκλυσης:

Χρόνος (min)	B (%)
0	30
30	έως 76
35	έως 100
35-45	100 (ισοκρατικό)

4.16. Προσδιορισμός κατεχινών και φαινολικών οξέων

Παρασκευή πρότυπων κατεχινών και επικατεχινών διαλυμένα σε νερό και μεθανόλη σε αναλογία 50:50 (v/v).

Πριν την ανάλυση HPLC τα δείγματα οίνου πρέπει να περάσουν από τη διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης SPE.

Διαδικασία SPE

Πραγματοποιείται ένα προφίλ έκλουσης για να προσδιοριστούν οι καλύτερες συνθήκες πλύσης και έκλουσης για την SPE. Αυτό γίνεται με την κατανομή 2ml του δείγματος στο HyperSep. Ξεκινάμε τις πλύσεις με αυξανόμενες ελουτροπικές αντοχές του διαλύτη, ξεκινώντας με μεθανόλη / νερό / 0,1% μυρμηκικό οξύ σε αναλογίες 0:100:0,1 (v/v/v) και συνεχίζοντας αυξάνοντας σταδιακά τις αναλογίες κατά 10% σε 100:0:0,1 (v/v/v) μεθανόλη / νερό / 0,1% μυρμηκικό οξύ. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τέσσερα στάδια πλύσης, χρησιμοποιώντας 1 mL μεθανόλης για κάθε στάδιο. Κάθε στάδιο πλύσης συλλέγεται και αναλύεται στην HPLC.^[11]

Αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται συστημα HPLC Thermo Scientific Accela™ UHPLC με χρωματογραφική στήλη Thermo Scientific Accela PFP (100 x 2,1mm, με σωματίδια 2,6µm), της οποίας η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 30°C. Ο προσδιορισμός γίνεται με ανιχνευτή UV με μήκος κύματος απορρόφησης 200nm. Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A αποτελείται από νερό και 0,1% μυρμηκικό οξύ και ο διαλύτης B από ακετονιτρίλιο και 0,1% μυρμηκικό οξύ. Ο ρυθμός ροής είναι 0,4ml/min και ο όγκος της ένεσης 1ml.^[11]

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	B (%)
0	2
0,1	2
7,1	65
7,2	95
7,9	95
8	2
10	2

4.17. Προσδιορισμός λυσοζύμης (1ος τρόπος)

Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη χρησιμοποιείται από τους οινοποιούς, για να ελέγξουν την ανάπτυξη των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (κυρίως των Gram+), που προκαλούν αλλοίωση του οίνου, να ελέγξουν ορισμένες πτυχές της μηλογαλακτικής ζύμωσης και για την σταθεροποίηση των οίνων μετά την αλκοολική ζύμωση ή όταν η μηλογαλακτική έχει τελειώσει.

Η λυσοζύμη χρησιμοποιείται, πλέον, έναντι της προσθήκης υψηλών επιπέδων SO₂ για τον έλεγχο της ανάπτυξης των *Pediococcus*, *Lactobacilli* κ.α. Σε αντίθεση με το SO₂ η λυσοζύμη δεν επηρεάζει τις ζύμες.^[28]

Αυτό το ένζυμο είναι μια πεπτιδογλυκαν N-ακετυλομουραμοϋλοϋδρολάση και χρησιμοποιεί τις πεπτιδογλυκάνες ως υπόστρωμα. Οι πεπτιδογλυκάνες είναι οι κύριες ενώσεις μιας προστατευτικής στρώσης των κυτταρικών τοιχωμάτων τόσο στα Gram θετικά όσο και στα Gram αρνητικά βακτήρια. Η λυσοζύμη υδρολύει την πεπτιδογλυκάνη, με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων. Τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν μια περίπλοκη δομή εξωτερικής μεμβράνης, που συχνά προστατεύει την στρώση των πεπτιδογλυκανών από την δράση της λυσοζύμης. Παρόλα αυτά δεν είναι όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια ανθεκτικά απέναντι στη λυσοζύμη.^[29]

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με δυαδική αντλία, βρόχο 20ml, χρωματογραφική στήλη TSK gel Phenyl- 5PW ανάστροφης φάσης (7,5cm x 4,6mm) της οποίας η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 30°C και 2 ανιχνευτές. Έναν ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 276nm και μήκος κύματος εκπομπής 345nm και έναν ανιχνευτή UV με μήκος κύματος απορρόφησης 280nm. Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι 98% νερό/1% ακετονιτρίλιο/0,2% TFA και ο διαλύτης B είναι 70% ακετονιτρίλιο/29,8% νερό/0,2% TFA.

Το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής: 100% A για 3min, για τα επόμενα 7min έως 35% B και διατήρηση σε αυτό το ποσοστό για 5min, για τα επόμενα 12min αύξηση του B έως 59,5% και μετά μέχρι 100% B σε 2min και διατήρηση για 5min. Στα επόμενα 2min επιστροφή στο 100% A και διατήρηση για 10min. Ο όγκος ένεσης του δείγματος είναι 20ml και ο ρυθμός ροής 1 ml/min.^[40]

Για τους ερυθρούς οίνους πρέπει να προβείται σε οξίνιση με HCl 10N σε αναλογία 1:10 (HCl:οίνο) και έπειτα διήθηση με μεβράνη 0,22μm. Η προεπεξεργασία με υδροχλωριο γίνεται γιατί οι φαινόλες των ερυθρών δεσμεύουν τη λυσοζύμη και με αυτόν το τρόπο αποφεύγεται το φαινόμενο αυτό.^[40]

4.17.1 Λυσοζύμη (2ος τρόπος)

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με πολυμερική στήλη αντίστροφης φάσης με λειτουργικές ομάδες φαινυλίου Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP (4,6mm x 7,5cm) της οποίας η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους 40°C, μια προστήλη ίδιου υλικού Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel (3,2mm x 1,5cm), βρόχο έγχυσης 20ml και έναν ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 276nm και μήκος

κύματος εκπομπής 345nm. Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη Α 1% CH₃CN, 0,2% TFA, 98,8% H₂O και τον διαλύτη Β 70% CH₃CN, 0,2% TFA, 29,8% H₂O. Ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min.^[32]

Για τα διαλύματα αναφοράς λαμβάνετε 20mg/L από το πρότυπο διάλυμα λυσοζύμης.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα με λευκό οίνο φιλτράρονται σε φίλτρα οξικής κυτταρίνης με πορώδες 0,65μm ενώ τα δείγματα με ερυθρό οίνο ρυθμίζονται σε pH=11,5, αλκαλοποιούνται με χρήση NH₄OH και μετά φιλτράρονται με φίλτρα οξικής κυτταρίνης πορώδους 0,65μm.

Διαλύματα αναφοράς 1 g/L τρυγικού οξέος σε 10% αιθανόλη (v/v) ρυθμισμένο σε pH 3,2 με ουδέτερο τρυγικό κάλιο και διάλυμα που περιέχει 250 mg/L πρότυπο λυσοζύμης διαλυμένο στο μητρικό διάλυμα με συνεχή ανάδευση για 1 ώρα. Διατηρείται στο ψυγείο για 4 εβδομάδες το πολύ.

Για τα διαλύματα, το διάλυμα αναφοράς αραιώνεται με το αρχικό διάλυμα μέχρι να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις. Αυτά τα διαλύματα παρασκευάζονται καθημερινά.

4.17.2. Μέτρηση λυσοζύμης σε οίνο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (3ος τρόπος)

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες:

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται συσκευή HPLC εξοπλισμένη με σύστημα άντλησης κατάλληλο για βαθμιδωτή έκλουση, θερμοστατικό διαμέρισμα στήλης που να διατηρεί τη θερμοκρασία της στους 30°C, έναν ανιχνευτή UV με μήκος κύματος απορρόφησης 280 nm σε συνδυασμό με φασματοφθορόμετρο με μήκος κύματος διέγερσης 276 nm και μήκος κύματος εκπομπής 345 nm, μια χρωματογραφική στήλη πολυμερές σε αντίστροφη φάση με λειτουργικές ομάδες φαινυλίου Toso Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP (7,5 cm x 4,6 mm) και μια προ-στήλη στο ίδιο υλικό με τη στήλη: Toso Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel, (1,5 cm 3,2 mm). Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από δύο διαλύτες . Ο διαλύτης Α αποτελείται ακετονιτρίλιο 1%, TFA 0,2 %, H₂O= 98,8% και ο διαλύτης Β ακετονιτρίλιο 70%, TFA 0,2 %, H₂O = 29,8%. Ο όγκος ένεσης είναι 20ml και ο ρυθμός ροής 1 mL/min^[35]

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα κρασιά οξινίζονται με HCl (10M), αραιώνονται 1/10 και διηθούνται χρησιμοποιώντας πολυαμίδιο με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,22 μm, 5 λεπτά μετά την προσθήκη. Ποσότητες από 1 έως 250 mg/L τυπικής λυσοζύμης, διαλυμένες σε πρότυπο διάλυμα με συνεχή ανάδευση για τουλάχιστον 12 ώρες. Πρότυπο διάλυμα: Τρυγικό οξύ 1g/L, Αιθυλική αλκοόλη 10% v/v, ρυθμισμένο σε pH 3,2 με ουδέτερο τρυγικό κάλιο.

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
--------------	-------	-------

0	100	0
3	100	0
10	65	35
15	65	35
27	40,5	59,5
29	0	100
34	0	100
36	100	0
40	100	0

4.18. Δοσολογία σακχάρων στον οίνο με HPLC

Τα σάκχαρα και η γλυκερίνη διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με τη χρήση στήλης αλκυλαμίνης και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων σε γλεύκη και οίνους έως 20g/L. Για συγκεντρώσεις σακχάρων άνω των 20g/L κάνουμε αραιώση. Με τον ίδιο τρόπο επίσης μπορούν να ποσοτικοποιηθούν η γλυκερόλη (μεταξύ 0,5-15g/L) και η σακχαρόζη (μεταξύ 1-40g/L).^[26]

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC με στήλη αλκυλαμίνης (250 x 4,6mm, σωματίδια 5μm,) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID. Η έκλουση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία (80/20). Ο ρυθμός ροής του δείγματος είναι 1mL/min και ο όγκος της ένεσης είναι 10 – 50mL. Για την προετοιμασία των δειγμάτων πρώτα πρέπει να γίνει απαέρωση με άζωτο ή ήλιο. Στη συνέχεια αν αυτό είναι απαραίτητο, δηλαδή αν η συγκέντρωση των σακχάρων είναι πάνω από 20g/L πρέπει να αραιωθούν. Ύστερα φιλτράρονται μέσα από μεμβράνη πόρων 0,45μm και αναλύονται στον υγρό χρωματογράφο.^[26]

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται είτε με καμπύλη βαθμονόμησης είτε με υπολογισμό του συντελεστή απόκρισης μέσω του παρακάτω τύπου

$$RF_i = \text{περιοχή}_i / C_i$$

όπου,

περιοχή_i: εμβαδόν κορυφής

C_i: ποσότητα αναλυόμενης ουσίας που υπάρχει στο δείγμα^[26]

4.19. Οργανικά οξέα: HPLC

Ο προσδιορισμός και ο διαχωρισμός των οργανικών οξέων μπορεί να γίνει με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιώντας 2 στατικές φάσεις. Για τον προσδιορισμό του μηλικού και του τρυγικού οξέος χρησιμοποιείται στήλη διοξειδίου του πυριτίου με οκτυλικό δεσμό, ενώ για το κιτρικό και γαλακτικό οξύ γίνεται χρήση στήλης ιοντοανταλλακτικής ρητίνης. Η ανίχνευση των οξέων γίνεται με ανιχνευτή UV με απορρόφηση στα 210nm.^[27]

Αναλυτικές συνθήκες

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC

A. Για διαχωρισμό κιτρικού, γαλακτικού και οξικού οξέος χρησιμοποιείται μια στήλη με ρητίνη ανταλλαγής κατιόντων, π.χ. HPX-87 H BIO-RAD (300mm x 7,8mm, σωματίδια 9μm). Η έκλουση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από διάλυμα θεικού οξέος 0,0125mol/L. Ο ρυθμός ροής του δείγματος είναι 0,6ml/min, η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να διατηρείται στους 60 – 65°C και ο όγκος της ένεσης είναι 10mL.

B. Για διαχωρισμό φουμαρικού, ηλεκτρικού, γαλακτικού, μηλικού και τρυγικού οξέος χρησιμοποιούνται δύο στήλες τοποθετημένες σε σειρά εφοδιασμένες με οκτυλοδεσμικό πυρίτιο (250mm x 4mm, σωματίδια 5μm). Η έκλουση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 70g/L και θεικό αμμώνιο 14g/L, ρυθμισμένο σε pH 2,1 με προσθήκη φωσφορικού οξέος. Ο ρυθμός ροής είναι 0,8mL/min, η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να ρυθμίζεται στους 20°C και ο όγκος της ένεσης είναι 10mL.^[27]

Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα κρασιού ή γλεύκους απασερώνονται και έπειτα περνάνε μέσα από φίλτρο μέγεθος πόρων 0,45μm. Έγχυση στον χρωματογράφο 10ml διαλύματος αναφοράς και 10ml από το δείγμα. Οι ενέσεις αυτές επαναλαμβάνονται 3 φορές.

Προετοιμασία διαλύματος αναφοράς: τρυγικό οξύ 5g/L, μηλικό οξύ 5g/L, γαλακτικό νάτριο 6,22g/L, οξικό νάτριο 6,83g/L, ηλεκτρικό οξύ 5g/L, φουμαρικό οξύ 0,01g/L και κιτρικό οξύ 5g/L.

Ποιοτική ανάλυση

Με βάση τους χρόνους κατακράτησης τα οργανικά οξέα διαχωρίζονται κατά σειρά έκλουσης ως εξής:

- κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, φουμαρικό και οξικό οξύ με την πρώτη μέθοδο
- τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό, οξικό, κιτρικό, ηλεκτρικό και φουμαρικό οξύ με την δεύτερη μέθοδο.

Ποσοτική ανάλυση

Μέτρηση εμβαδού των κορυφών και προσδιορισμός των μέσων όρων για τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα

4.20. Ανάλυση βιογενών αμίνων

Παρασκευή εκλουστικών

Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και χρησιμοποιούνται 2 διαλύτες. Το διάλυμα Α αποτελείται από 11,12g διβασικού φωσφορικού νατρίου, το οποίο αραιώνεται σε νερό υψηλής καθαρότητας σε ογκομετρική φιάλη 2 λίτρων, ομογενοποιείται και διηθείται από μεμβράνη 0,45μm. Ο διαλύτης Β αποτελείται από 100% ακετονιτρίλιο.^[33]

Για το διάλυμα παραγωγοποίησης OPA χρησιμοποιείτε 20mg OPA σε φιάλη των 50ml και συμπληρώνετε με μεθανόλη.

Για το ρυθμιστικό διάλυμα βορικού ζυγίζετε 3,81g Na₂B₄O₇, το οποίο μεταφέρετε σε ογκομετρική των 100ml και συμπληρώνετε με απιονισμένο νερό. Ομογενοποιείτε και ρυθμίζετε το pH=10,5.

Για τις βιογενείς αμίνες που βρίσκονται σε μορφή άλατος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το βάρος του άλατος στον τελικό προσδιορισμό.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων θα πρέπει να γίνει πρώτα απαέρωση με αέριο άζωτο. Διηθείτε 120ml των δειγμάτων σε μεμβράνες. Για οίνο εμφιαλωμένο χρησιμοποιείτε μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,45μm ενώ για μούστο ή μη διαυγασμένο οίνο χρησιμοποιείτε μια σειρά φίλτρων με μέγεθος πόρων 0,45μm-0,8μm-1,2μm-5μm. Στα 100ml του διηθημένου δείγματος γίνεται προσθήκη 0,5ml 1,6-διαμινοεξανίου από αυτά λαμβάνονται τα 5ml και προσθέτονται 5ml μεθανόλης. Για την ανάλυση στον χρωματογράφο θα πρέπει να γίνει και μια παραγωγοποίηση. Αναμιγνύετε 2ml OPA, 2ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού και 0,6ml 2-μερκαπτοαιθανόλη. Κάνετε προσθήκη 0,4ml δείγματος και αμέσως έγχυση στον αναλυτή γιατί το παράγωγο είναι πολύ ασταθές.

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20
95	80	20

Ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min, χρωματογραφική στήλη (250 mm x 4mm, με σωματίδια 5 μm) η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να διατηρείται στους 35°C.^[33]

Η ανίχνευση γίνεται με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 365nm και μήκος κύματος εκπομπής 445nm.

4.21. Προσδιορισμός εννέα βασικών ανθοκυανινών σε κόκκινο και ροζέ οίνο

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με δυαδική αντλία κλίσης, σύστημα έγχυσης για όγκους δειγμάτων που κυμαίνονται από 10 έως 200 ml, έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων ή ανιχνευτής UV με μήκος κύματος 518nm, έναν φούρνο για θέρμανση στήλης στους 40°C, ένα σύστημα απαέρωσης διαλύτη και μια αναλυτική στήλη LiChrospher 100 RP 18 (5 μm) σε στήλη προστασίας LiChroCart 250-4 RP 18 (30-40 mm).

Για την προετοιμασία δειγμάτων τα διαυγή κρασιά χύνονται απευθείας χωρίς προετοιμασία στα φιαλίδια δειγμάτων του αυτόματου εναλλάκτη δειγμάτων. Τα θολά δείγματα φιλτράρονται χρησιμοποιώντας ένα φίλτρο μεμβράνης 0,45 μm για την προετοιμασία του δείγματος HPLC. Το πρώτο μέρος του διηθήματος πρέπει να απορριφθεί.^[31]

Ο όγκος ένεσης είναι 50ml για τα κόκκινα και 200ml για τα ροζέ. Ο ρυθμός ροής είναι 0,8ml/min.

Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι Νερό/Μυρμηκικό οξύ/Ακετονιτρίλιο 87:10:3 (v/v/v) και ο διαλύτης B είναι Νερό/Μυρμηκικό οξύ/Ακετονιτρίλιο 40:10:50 (v/v/v).^[31]

Πρόγραμμα έκλυσης:

Χρόνος (min)	A (%)	B(%)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

Η ανάλυση HPLC των ανθοκυανινών στον οίνο είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί λόγω της απουσίας καθαρών προϊόντων που διατίθενται στο εμπόριο. Επιπλέον, οι ανθοκυανίνες είναι εξαιρετικά ασταθείς στο διάλυμα.

4.22. Προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος και D-ισο-ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος που περιγράφεται έχει επικυρωθεί σε μια συλλογική μελέτη από τις αναλύσεις δειγμάτων κρασιού με αυξημένες ποσότητες από 30 mg/L έως 150 mg/l για το L-ασκορβικό οξύ και 10 mg/L έως 100 mg/l για το D-ισοασκορβικό οξύ αντίστοιχα.

Συσκευή

- 1.HPLC-puml
- 2.Loop injector, 20 ml

3.Ανιχνευτής UV

Προετοιμασία κινητής φάσης

Για την κινητή φάση προετοιμάζουμε τις ακόλουθες λύσεις:

1. 12,93 g n -οκτυλαμίνης σε 100 ml μεθανόλης: Προσθέτουμε 5 ml διαλύματος n-οκτυλαμίνης σε περίπου 400 ml δι-απεσταγμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως. Ρυθμίζουμε αυτό το διάλυμα σε pH 5,4 έως 5,6 προσθέτοντας στάγδην 25% φωσφορικό οξύ. Προστίθενται 50 ml του ρυθμιστικού διαλύματος* και μεταφέρουμε το σύνθετο μείγμα σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml συμπληρώνοντας με δι-απεσταγμένο νερό. Πριν από τη χρήση, η κινητή φάση πρέπει να φιλτραριστεί μέσω μιας μεμβράνης (αναγεννημένη κυτταρίνη, 0,2 μm) και αν είναι δυνατόν να απαερωθεί με ήλιο (περίπου 10 λεπτά) ανάλογα με τις ανάγκες του συστήματος HPLC που χρησιμοποιείται.

*Ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5,4) : 430 ml διαλύματος οξικού νατρίου και 70 ml διαλύματος οξικού οξέος

2. 68,05 g οξικού νατρίου, 3 H₂O σε 500 ml δι-απεσταγμένου νερού

3. 12,01 g καθαρού οξικού οξέος σε 200 ml δι-απεσταγμένου νερού^[28]

Παρασκευή αρχικού διαλύματος (1 mg/ml)

Προετοιμάζουμε ένα υδατικό διάλυμα οξαλικού οξέος 2% και αποβάλλουμε το διαλυμένο οξυγόνο με εμφύσηση μέσω αζώτου. Ζυγίζονται ακριβώς 100 mg L-ασκορβικού οξέος και D-ισο-ασκορβικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη 100 ml και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με το υδατικό διάλυμα οξαλικού οξέος 2%.

Προετοιμασία διαλυμάτων αναφοράς

Για τα διαλύματα αναφοράς αραιώνουμε το αρχικό διάλυμα στις επιθυμητές συγκεντρώσεις με διάλυμα οξαλικού οξέος 2%. Συνιστώνται συγκεντρώσεις μεταξύ 10 mg/l και 120 mg/l, π.χ. 100ml, 200ml, 400ml, 800ml, 1200ml έως 10 ml, που αντιστοιχούν σε 10, 20, 40, 80 και 120 mg/l.

Τα δείγματα κρασιού διοχετεύονται μέσω μιας μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0,2 μm πριν από την έγχυση. Για περιεκτικότητες άνω των 150 mg/L, είναι απαραίτητο να αραιωθεί το δείγμα.

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με χρωματογραφική στήλη π.χ. Nucleosil 120 C18 (25 cm x 4 mm, 7 μm), προστήλη π.χ. Nucleosil 120 C18 (4cm x 4 mm, 7 μm) και ανιχνευτή UV σε μήκος κύματος απορρόφησης 266nm. Η έκλουση είναι ισοκρατική και ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min. Ο όγκος ένεσης είναι 20ml.^[28]

Ταυτοποίηση

Η αναγνώριση των κορυφών γίνεται με τη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης μεταξύ προτύπων και δειγμάτων. Ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του L-ασκορβικού οξέος και του

D-ισο-ασκορβικού οξέος που προκαλείται από την ασκορβική οξειδάση, δεν θα πρέπει να βρεθεί σήμα στο χρόνο κατακράτησης του L-ασκορβικού οξέος και του D-ισο-ασκορβικού οξέος. Εάν ανιχνευθούν αιχμές παρεμβολής, το εμβαδόν των κορυφών τους θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναλυτών.

4.23. Προσδιορισμός ολικής αιθανόλης στον οίνο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Παρασκευή διαλυμάτων

1. Το αποθεματικό διάλυμα παρασκευάζεται με αραιώση κατάλληλης ποσότητας αιθανόλης (πυκνότητα = 0,785 g/mL) σε εξαιρετικά καθαρό νερό ποιότητας HPLC προκειμένου να ληφθεί συγκέντρωση μεταξύ 300 και 400 mg/L. Δεδομένου ότι η καθαρή αιθανόλη είναι εξαιρετικά πτητική, το αποθεματικό διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται με δειγματοληψία σταθερών όγκων αιθανόλης χρησιμοποιώντας βαθμονομημένες φιάλες.
2. Το μητρικό διάλυμα παρασκευάζεται 10 mL καθαρής αιθανόλης σε μια βαθμονομημένη φιάλη, μεταφέρετε την καθαρή αιθανόλη σε άλλη βαθμονομημένη φιάλη των 20 mL και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με εξαιρετικά καθαρό νερό ποιότητας HPLC. Τα διαλύματα που αραιώνονται παρασκευάζονται συμπληρώνοντας τον όγκο με εξαιρετικά καθαρό νερό ποιότητας HPLC σε βαθμονομημένες φιάλες μεγαλύτερης χωρητικότητας.
3. Τα διαλύματα βαθμονόμησης, με συγκεντρώσεις 10 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L και 100 mg/L, λαμβάνονται με αραιώση του μητρικού διαλύματος σε βαθμονομημένες φιάλες των 50 mL. Οι απαιτούμενοι όγκοι λαμβάνονται δείγματα από το αποθεματικό διάλυμα χρησιμοποιώντας μικροσιφόνιο ακριβείας και συμπληρώνονται μέχρι τον όγκο με εξαιρετικά καθαρό νερό ποιότητας HPLC σε βαθμονομημένες φιάλες.

Παραγωγοποίηση

Πριν την χρωματογραφική ανάλυση πρέπει να γίνει μια παραγωγοποίηση του δείγματος με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH). Η παραγωγοποίηση πραγματοποιείται σε γυάλινα φιαλίδια των 2 mL σφραγισμένα με πώματα από τεφλόν, μέσα στα οποία προστίθενται διαδοχικά: 100 mL οίνου ή πρότυπο διάλυμα φιλτραρισμένο στα 0,45 μm, 20 mL πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα διοξειδίου του θείου σε συγκέντρωση 1120 mg/L SO₂, 20 mL θειικό οξύ 25% και 140 mL πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης σε ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 2 g/L DNPH.

Μετά από αυτές τις προσθήκες, το διάλυμα αναδεύεται αμέσως με vortex και τοποθετείται σε φούρνο στους 65 °C για 15 λεπτά πριν ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά πριν εγχυθεί στη συσκευή HPLC. Τα δείγματα πρέπει να εγχέονται σε λιγότερο από 10 ώρες από το τέλος της αντίδρασης παραγωγοποίησης.^[29]

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες:

Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας με μήκος κύματος απορρόφησης 365 nm, εξοπλισμένη με δύο αντλίες βαθμίδωσης και φούρνο για τη θέρμανση της στήλης C18 (250

x 4,6 mm, διάμετρος σωματιδίων: 4 μm) στους 35 °C. Η έκλουση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 2 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι 0,5% μυρμηκικό οξύ σε εξαιρετικά καθαρό νερό ποιότητας HPLC και ο διαλύτης B είναι ακετονιτρίλιο. Ο ρυθμός ροής είναι 0,75 mL/min και ο όγκος ένεσης 15 mL.^[29]

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0,1	65	5
8	40	60
13	10	90
15	5	95
17	5	95
21	65	35
25	65	35

4.24. Υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλη (HMF)

Η υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλη (HMF) ανήκει στις φουρανικές ενώσεις και είναι προϊόν μη ενζυμικής οξειδωσης των σακχάρων μέσω των αντιδράσεων τύπου Maillard. Η παρουσία της υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλης στους οίνους μπορεί να είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής εξέλιξης του προϊόντος ή μπορεί να επηρεαστεί από συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης ή επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την αλκοολική ζύμωση και την αποθήκευση του οίνου καθώς και με την επικράτηση όξινων συνθηκών η παραγωγή της υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλης αυξάνεται. Η παρουσία της σε μικρές ποσότητες θεωρείται αποδεκτή και δεν επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του κρασιού, αντιθέτως μπορεί να συμβάλλει θετικά και στο άρωμα του οίνου. Ωστόσο, υψηλότερα επίπεδα υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλης μπορεί να υποδηλώνουν προχωρημένη οξειδωση του κρασιού με αρνητική επίδραση στη γεύση και την ποιότητα του. Γι' αυτό το επίπεδο της HMF θεωρείται δείκτης ποιότητας του προϊόντος.

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες:

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται συσκευή HPLC εξοπλισμένη με έναν βρόχο εγχυτήρα, 5 ή 10 mL, έναν φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής που επιτρέπει τη μέτρηση στα 280 nm και μια στήλη διοξειδίου του πυριτίου ανάστροφης φάσης (π.χ. Bondapak C18-Corasil, Waters Ass). Η έκλουση είναι ισοκρατική και η κινητή φάση αποτελείται από νερό/μεθανόλη/οξικό οξύ που είχαν προηγουμένως διηθηθεί μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm, σε ποσότητες (40 mL/9 mL/1 mL). Ο ρυθμός ροής κινητής φάσης είναι 1,5 mL/min. Ο χρόνος κατακράτησης της υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλης είναι περίπου έξι έως επτά λεπτά.^[30]

Παρασκευή διαλυμάτων:

Για την παρασκευή του διαλύματος αναφοράς υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλη, 25 mg/L (m/v), σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL, τοποθετήστε 25 mg υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλης

ζυγισμένη με ακρίβεια και φέρτε τον μέχρι τον όγκο με μεθανόλη. Αραιώστε αυτό το διάλυμα 1/10 με μεθανόλη και διηθήστε μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm. Εάν το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο σε ερμητικά σφραγισμένο καφέ γυάλινο μπουκάλι, θα πρέπει να διατηρηθεί για δύο έως τρεις μήνες.

4.25. Πολυσπαρτικό κάλιο (KPA)

Η διαδικασία συνίσταται στην διενέργεια του προσδιορισμού του ασπαρτικού οξέος στον οίνο πριν και μετά την όξινη υδρόλυση με παραγωγοποίηση με ορθοφθαλδεΐδη (OPA). Η διαφορά στην περιεκτικότητα σε ασπαρτικό οξύ μεταξύ του υδρολυμένου και του μη υδρολυμένου υποδικνύει το επίπεδο προσθήκης πολυσπαρτικού οξέος για την τρυγική σταθεροποίηση του οίνου.^[34]

Για την όξινη υδρόλυση χρειάζεται διάλυμα 10 g/L μεταδιθειώδες νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), το οποίο παρασκευάζεται ζυγίζοντας 5 γραμμάρια μεταδιθειώδους νατρίου σε φιάλη 500 mL. Συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με εξαιρετικά καθαρό νερό, 6M υδροχλωρικό οξύ (HCl) και 5M υδροξείδιο του νατρίου (NaOH).

Για τα μητρικά διαλύματα ασπαρτικού οξέος παρασκευάζετε τις 2 παρακάτω λύσεις:
Μητρικό διάλυμα 1: διάλυμα 8000 mg/L ασπαρτικού οξέος σε εξαιρετικά καθαρό νερό
Μητρικό διάλυμα 2: διάλυμα 200 mg/L ασπαρτικού οξέος σε εξαιρετικά καθαρό νερό

Αποθεματικό διάλυμα αμινοκαπροϊκού οξέος στα 1000 mg/L σε εξαιρετικά καθαρό νερό
Διαλύματα βαθμονόμησης που παρασκευάζονται με αραιώση των μητρικών διαλυμάτων 1 και 2 σε διπλή απόσταξη νερό. Οι τιμές αναφοράς είναι οι εξής:

- 2 mg/L STD1: πάρτε 0,200 mL μητρικού διαλύματος 2 και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη των 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό
- 10 mg/L STD2: πάρτε 1.000 mL μητρικού διαλύματος 2 και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό
- 50 mg/L STD3: πάρτε 5.000 mL μητρικού διαλύματος 2 και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό
- 100 mg/L STD4: πάρτε 0,250 mL μητρικού διαλύματος 1 και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό
- 250 mg/L STD5: πάρτε 0,625 mL μητρικού διαλύματος 1 και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό
- 500 mg/L STD6: πάρτε 1.250 mL μητρικού διαλύματος 1 (3.4.1.) και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 20 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό^[34]

Παραγωγή αντιδραστηρίων

1. Ρυθμιστικό διάλυμα δεκαϋδρικού τετραβορικού νατρίου 0,1 M με pH 10,5: διαλύστε 19,1 g τετραβορικού νατρίου και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή σε φιάλη 500 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό. Ελέγξτε την τιμή του pH.

2. Διάλυμα ορθο-φθαλαλδεΐδη (OPA) και μερκαπτοαιθανόλη: Προσθέστε 100 mg OPA, 200 μL μερκαπτοαιθανόλης και 1 mL μεθανόλης σε φιάλη 10 mL και συμπληρώστε μέχρι τη

χαραγή με το ρυθμιστικό διάλυμα δεκαϋδρικού τετραβορικού νατρίου 0,1 M με pH 10,5. Το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση. Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση αποτελείται από 4 διαλύτες. Ο διαλύτης A είναι εξαιρετικά καθαρό νερό, ο διαλύτης B είναι 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου/τετραϋδροφουρανίου (96:4), ο διαλύτης C είναι μεθανόλη και ο διαλύτης D ακετονιτρίλιο. Ο ρυθμός ροής είναι 1,1ml/min.

Για το ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M οξικού νατρίου: διαλύονται 2,05 g άνυδρου οξικού νατρίου και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή σε βαθμονομημένη φιάλη 500 mL με εξαιρετικά καθαρό νερό.

Εξοπλισμός και αναλυτικές συνθήκες

Για την ανάλυση χρησιμοποιείται σύστημα HPLC εξοπλισμένο με τεταρτοταγή αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη, διαμέρισμα με θερμοστάτη για τη στήλη ρυθμισμένο στους 40 °C, βρόχο έγχυσης 10ml, ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης 340nm και μήκος κύματος εκπομπής 450nm και μια χρωματογραφική στήλη με πολικό άκρο C18 (π.χ. Syncronis aQ (4,6 x 250 mm, με σωματίδια 5 μm)).^[34]

Η διαδικασία χωρίζεται σε τρεις φάσεις: υδρόλυση θερμού οξέος του δείγματος κρασιού, τη διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων (τόσο των διαλυμάτων βαθμονόμησης όσο και των οίνων πριν και μετά την υδρόλυση), τα οποία αναλύονται με HPLC-FLD για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ασπαρτικού οξέος και ανάλυση HPLC-FLD.

Φάση 1: Υδρόλυση οξέος

Αδειάστε τα ακόλουθα διαδοχικά σε ένα φιαλίδιο από φιμέ γυαλί των 4 mL με βιδωτό καπάκι και έπειτα θερμάνετε στους 108°C σε θερμαινόμενη πλάκα για 72 ώρες.

- 0,2 mL διαλύματος 10 g/L μεταδιθειώδους νατρίου
- 2 mL δείγμα κρασιού,
- 2 mL 6 M HCl

Μετά από τις 72 ώρες ρίξτε το διάλυμα σε φιάλη των 10 mL, προσθέστε 2,5 mL 5 M NaOH και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με εξαιρετικά καθαρό νερό.

Φάση 2: Προετοιμασία για ανάλυση HPLC

Η μέθοδος προβλέπει μια αντίδραση παραγωγοποίησης του ασπαρτικού οξέος με ορθοφθαλαλδεΰδη (OPA).

Για να προετοιμάσετε τα δείγματα για ανάλυση με HPLC, προχωρήστε ως εξής:

Για τα διαλύματα βαθμονόμησης και δείγματα κρασιού πριν από την υδρόλυση πάρτε ένα δείγμα 1 mL του διαλύματος για ανάλυση και το φιλτράρετε με μικροφίλτρο (φίλτρο 0,20 μm) σε φιάλη των 20 mL, προσθέστε 0,2 mL εσωτερικού προτύπου και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με εξαιρετικά καθαρό νερό.

Για τα δείγματα μετά την υδρόλυση πάρτε ένα δείγμα 5 mL του διαλύματος για ανάλυση και διηθήστε το (φίλτρο 0,20 μm) σε φιάλη των 20 mL, προσθέστε 0,2 mL εσωτερικού προτύπου και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με εξαιρετικά καθαρό νερό.

Φάση 3: Φάση παραγωγοποίησης

Το παρακάτω είναι ένα παράδειγμα της αυτοματοποιημένης λειτουργίας παραγωγοποίησης με αυτόματη δειγματοληψία:

Θέσεις αντιδραστηρίου στον αυτόματο δειγματολήπτη:

θέση 1: μεθανόλη,

θέση 3: OPA,

θέση 4: άδεια φιαλίδιο,

θέση 11: εξαιρετικά καθαρό νερό.

Φάσεις παραγωγοποίησης: τραβήξτε 2,0 μL από τον αέρα, τραβήξτε 20,0 μL από το φιαλίδιο 1, μεταφέρετε 20,0 μL στο φιαλίδιο 4, τραβήξτε 5,0 μL από το δείγμα, μεταφέρετε 5,0 μL στο κάθισμα, τραβήξτε 0,0 μL από το φιαλίδιο 1 (για να καθαρίσετε το εξωτερικό της βελόνας), τραβήξτε 5,0 μL από το φιαλίδιο 3, μεταφέρετε 5,0 μL στο κάθισμα, ανακατέψτε 10,0 μL στο κάθισμα, 10 φορές, περιμένετε 0,50 λεπτά και το δείγμα είναι έτοιμο για έγχυση.^[34]

Πρόγραμμα έκλουσης:

Χρόνος (min)	B(%)	C(%)	D(%)
0	100	0	0
3	100	0	0
15	50	25	25
17	84	8	8
18	100	0	0

6. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΤΗΛΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Ενώσεις	Αναλυτικές στήλες	Ανιχνευτές
Ανθοκυάνες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nova Pak C18 (250x4.6mm, 5μm) ▪ LiChrospher 100 RP 18 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PDA 250-600nm ▪ UV 518nm
Πυροανθοκυάνες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RP Phenomenex Luna C18 PFP (250x4.6mm, 5μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PDA 250nm
Αμινοξέα & Βιογενείς αμίνες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ C18 HP AminoAcid Analysis (200x2.1mm) ▪ ACE HPLC 5C18-HL (250x4.6mm, 5μm) ▪ LiChrospher RP 18 (125X4mm, 5μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FLD:340/450nm (διέγερση/εκπομπή) για τα πρωτογενή, 237/340nm για τα δευτερογενή ▪ PDA 280nm, 269nm, 300nm ▪ FLD 356/445nm
Φλαβονοειδή	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Merck LiChrospher 100RP-18e (250x4mm) ▪ Atlantis dC18 (250x4.6mm, 5μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV SPD-6AV 360nm ▪ UV 360nm
Θειόλες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ultramex 3C18 (100x4.6mm, 3μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FLD 340/450nm
Ωχρατοξίνη	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LiChrospher RP C18 (125X4mm) ▪ Discovery RP C18 (150x4mm, 5μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FLD 336/464nm ▪ FLD 333/460nm
Φαινολικά οξέα & κατεχίνες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Thermo Scientific Accela PFP (100x2.1mm, 2.6μm) ▪ 250-4 Supersher 100RP18 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV 200nm ▪ UV 280nm
Λυσοζύμη	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TSK gel Pheny-5PW RP 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FLD 276/345nm

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV 280nm
Σάκχαρα	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Στήλη αλκυλαμίνης (250x4.6mm, 5μm) ▪ Aminex HPX-87H (300x7.8mm) ▪ Aligent Hi-Plex H (300x7.7mm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RID
Οργανικά οξέα	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aligent Hi-Plex H (300x7.7mm) ▪ HPX-87 H BIO-RAD (300x7.8mm, 9μm) ▪ Atlantis dC18 (250x4.6mm, 5μm) ▪ Aminex HPX-87H (300x7.8mm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PDA 210nm
L-ασκορβικό & D-ισο-ασκορβικό οξύ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nucleosil 120 C18 (250x4mm, 7μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV 266nm
Αλκοόλες	<ul style="list-style-type: none"> ▪ C18 (250x4.6mm, 4μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV 365nm
Φουρανικές ενώσεις	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bondapak C18-Corasil (250x4.6mm, 5μm) ▪ Atlantis dC18 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UV 280nm
Πολυσαρπτικό κάλιο	<ul style="list-style-type: none"> ▪ C18 Synchronis aQ (250x4.6mm, 5μm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FLD 340/450nm

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Απ' όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, κατανοούμε τη μεγάλη σημασία και την ανάγκη για χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης στην ανάλυση των ενώσεων του οίνου. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση και ποσοτικοποίηση σημαντικών συστατικών του οίνου, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις και πολλά ακόμα. Αυτό που επισημαίνεται είναι η μεγάλη ποικιλία των ανιχνευτών της HPLC. Κάθε ανιχνευτής μπορεί να ανιχνεύσει κατάλληλα και να δώσει καλύτερα χρωματογραφήματα για συγκεκριμένες

χαρακτηριστικές ομάδες ενώσεων. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε ενώσεις με πολύ μικρές ποσότητες και η χρησιμοποίηση διαφορετικών ανιχνευτών και διαφορετικών πρωτοκόλλων μας επιτρέπει να διαχωρίσουμε ενώσεις που είναι πολύ κοντά στον χρόνο έκλουσης. Γι' αυτόν τον λόγο πρέπει να γίνεται η επιλογή του κατάλληλου ανιχνευτή για κάθε ένωση, ώστε να έχουμε και τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Λούκου, Ζαχαρένια (2003, *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ)*), Ανάπτυξη μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού βιογενών αμινών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και εφαρμογή σε αλκοολούχα ποτά.<https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/15219#page/1/mode/2up>
2. Παπαγιαννακόπουλος Πάνος και Γιάννης Γ. Λαζάρου. “Εργαστήριο Φωτοχημείας και Χημικής Κινητικής “Φασματοσκόπια Μάζας.””*Foundation for Research and Technology-Hellas*,2020,tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm.
3. Σεχάντε, Αντναν, and Βασίλειος Νικολού. “Χημεία Οίνων και Ποτών Προέλευση και Προσδιορισμός Βασικών Ενώσεων .”*EClass Uniwa*, 2021,eclass.uniwa.gr/modules/document/?course=WVBS369
4. Anli, E., & Bayram, M. (2009). *Ochratoxin A in Wines. Food Reviews International*, 25(3), 214–232. doi:10.1080/8755912090295618
5. Bozic , Jelena Topic, et al. “Implementation of High Performance Liquid Chromatography Coupled to Thermal Lens Spectrometry for Quantification of Pyranoanthocyanins during Fermentation of Pinot Noir Grapes.” *Springer Link*, 2020, link.springer.com/article/10.1007/s42452-020-3005-8.
6. “C18-Aqueous Hplc Column.” *Hawash Scientific*, 2019.<https://www.hawachhplccolumn.com/product/c18-aqueous-hplc-columns/>

7. Castellari, M., Versari, A., Spinabelli, U., Galassi, S., & Amati, A. (2000). *AN IMPROVED HPLC METHOD FOR THE ANALYSIS OF ORGANIC ACIDS, CARBOHYDRATES, AND ALCOHOLS IN GRAPE MUSTS AND WINES*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23(13), 2047–2056. doi:10.1081/jlc-100100472
8. Choudhary, Ankur . “C-18 HPLC Columns and Their Properties .” *Pharmaguideline*, 2008, www.hawachplccolumn.com/product/c18-aqueous-hplc-columns/.
9. Christian, Gary D., et al. *Analytical Chemistry*. 7th ed., vol. 850, WILEY, 2020.
10. Dolci, Monica. “Determination of Catechins and Phenolic Acids in Red Wine by Solid Phase Extraction and HPLC.” *Thermo Fisher Scientific*, 2012, assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-20583-Determination-Catechins-Phenolic-Acids-Red-Wine-Solid-Phase-Extraction-HPLC.pdf
11. Ellison R.T., Giehl T.J., Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. 1991 J. Clin. Invest. 88: 1080-1091
12. Fang, F., Li, J.-M., Pan, Q.-H., & Huang, W.-D. (2007). *Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging*. *Food Chemistry*, 101(1), 428–433. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.03
13. Flajs, D., Domijan, A.-M., Ivić, D., Cvjetković, B., & Peraica, M. (2009). *ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia*. *Food Control*, 20(6), 590–592. doi:10.1016/j.foodcont.2008.08.02
14. Gao Y.C., Zhang G., Krentz S., Darius S., Power J., Lagarde G., Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. 2002 Australian Journal of Grape and Wine Research 8, 76–83
15. García-Beneytez, E., Cabello, F., & Revilla, E. (2003). *Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5622–5629. doi:10.1021/jf0302207
16. Gocan, S. (2009). *Analysis of Stilbenes in Wine by HPLC: Recent Approaches*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32(11-12), 1598–1643. doi:10.1080/10826070902956352
17. Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). *HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618–626. doi:10.1016/j.jfca.2007.03.002
18. Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & García-Romero, E. (2007). *Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone*

- Derivatives in Wine and Beer Samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 608–613.doi:10.1021/jf062820m
19. Herbert, P., Barros, P., Ratola, N., & Alves, A. (2000). *HPLC Determination of Amino Acids in Musts and Port Wine Using OPA/FMOC Derivatives. Journal of Food Science*, 65(7), 1130–1133.doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10251.x
 20. Hughey V.L., Johnson E.A., Antimicrobial Activity of Lysozyme against Bacteria Involved in Food Spoilage and Food-Borne Disease 1987, *Applied and Environmental Microbiology*. 2165-2170
 21. Jeffrey, Marla . “Lysozyme to Combat Wine Spoilage .” *Gusmer Enterprises, Inc*, 2021, www.gusmerenterprises.com/catalog/wine/wine-fermentation/enological-enzymes/lysozyme/.
 22. KNAUER. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Principles and Components. <https://www.knauer.net/en/Blog/High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC-Principles-and-Components>
 23. LibreTexts CHEMISTRY.Liquid Chromatography. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)
 24. Masschalck B., Michiels C. W., Antimicrobial Properties of Lysozyme in Relation to Foodborne Vegetative Bacteria. 2003, *Critical Reviews in Microbiology* 29(3): 191-214
 25. OIV: Dosage of sugars by HPLC (Type-II), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-1-sugars/dosage-of-sugars-by-hplc-%28type-ii%29>
 26. OIV: Organic Acids : HPLC (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/organic-acids-%3A-hplc-%28type-iv%29>
 27. OIV: Determination of L-ascorbic acid and D-iso-ascorbic acid by HPLC (Type-II), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/determination-of-l-ascorbic-acid-and-d-iso-ascorbic-acid-by-hplc-%28type-ii%29>
 28. OIV: Determination of total ethanol in wine by high-performance liquid chromatography (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/determination-of-total-ethanol-in-wine-by-high-performance-liquid-chromatography-%28type-iv%29>
 29. OIV: Hydroxymethylfurfural (HPLC) (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1->

- [organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/hydroxymethylfurfural-%28hplc%29-%28type-iv%29](https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/hplc-determination-of-nine-major-anthocyanins-in-red-and-rose-wines-%28type-ii%29)
30. OIV: HPLC-Determination of nine major Anthocyanins in red and rosé wines (Type-II), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/hplc-determination-of-nine-major-anthocyanins-in-red-and-rose-wines-%28type-ii%29>
 31. OIV: Determination of Lysozyme by HPLC (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/determination-of-lysozyme-by-hplc-%28type-iv%29>
 32. OIV: Analysis of biogenic amines in musts and wines HPLC (Type-II), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/analysis-of-biogenic-amines-in-musts-and-wines-hplc-%28type-ii%29>
 33. OIV: Method for the determination of potassium polyaspartate in wine by high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-3-other-non-organic-compounds/method-for-the-determination-of-potassium-polyaspartate-in-wine-by-high-performance-liq>
 34. OIV: Determination of lysozyme in wine using high-performance liquid chromatography (Type-IV), <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/determination-of-lysozyme-in-wine-using-high-performance-liquid-chromatography-%28type-iv%29>
 35. Park, S. K., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (2000). *Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. Food Chemistry, 68(4), 475–480.* doi:10.1016/s0308-8146(99)00227-7
 36. PENG, Z., ILAND, P. G., OBERHOLSTER, A., SEFTON, M. A., & WATERS, E. J. (2002). *Analysis of pigmented polymers in red wine by reverse phase HPLC. Australian Journal of Grape and Wine Research, 8(1), 70–75.* doi:10.1111/j.1755-0238.2002.tb00213.x
 37. Pereira, V., Câmara, J. S., Cacho, J., & Marques, J. C. (2010). *HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. Journal of Separation Science, NA–NA.* doi:10.1002/jssc.200900784

38. Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Marchand, S., Beloqui, A. A., & Bertrand, A. (2001). *Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(8), 731–738.* doi:10.1002/jsfa.871
39. Riponi, Claudio , et al. "Hplc Analysis of Lysozyme in Different Types of Wine." *Jsb* , vol. 3, 2020. https://www.go-jsb.co.uk/resources/media/application_notes/_402_A08L15A_Analysisoflysozymeinwine_JSB_2.pdf
40. Roggero, J.-P., Coen, S., & Archier, P. (1990). *Wine Phenolics: Optimization Of HPLC Analysis. Journal of Liquid Chromatography, 13(13), 2593-2603.* doi:10.1080/01483919008049057
41. Schwartz, Norman. "Aminex Organic Acid and Alcohol Analysis Columns." *Biorad* , 2019, www.bio-rad.com/en-gr/product/aminex-organic-acid-alcohol-analysis-columns?ID=cdc9d572-65ea-4e55-8e3a-dda17b1aalea.
42. Tuzimski, T. (2012). *DETERMINATION OF PESTICIDES IN WINES SAMPLES BY HPLC-DAD AND HPTLC-DAD. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35(10), 1415–1428.* doi:10.1080/10826076.2012.676316
43. Visconti, A., Pascale, M., & Centonze, G. (1999). *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 864(1), 89–101.* doi:10.1016/s0021-9673(99)00996-6