

## Optimalizácia podmienok rozdelenia antokyanínov červených vín HPLC

MILAN DRDÁK—PAVOL DAUČÍK—JOLANA KAROVIČOVÁ—PETER ŠIMKO  
ALICA RAJNIAKOVÁ

**Súhrn.** Práca sa zaoberá výberom vhodných podmienok na rozdelenie antokyanínov v červených vínach za podmienok gradientovej elúcie HPLC. Určilo sa optimálne pH mobilnej fázy vo vzťahu k detekcii vo viditeľnej oblasti a separačnej účinnosti kolóny, skúmala sa kyselinová zložka v mobilnej fáze (kyseliny mravčia, octová, fosforečná a chloristá); vhodná je najmä  $\text{HClO}_4$ , nevhodná  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; ďalej sa práca zamerala na výber vhodného gradientu a jeho reprodukovateľnosť. Reprodukovateľnosť gradientu je mimoriadne závislá od spôsobu a doby regenerácie kolóny pred analýzou.

Optimalizácia podmienok chromatografického procesu je základným predpokladom pri analýze mnohozložkových zmesí. Z hľadiska optimalizácie chromatografického rozdelenia antokyanínových farbív a ich správania sa na kolóne je potrebné optimalizovať pH mobilnej fázy, vybrať vhodnú kyselinovú zložku v mobilnej fáze a následne postupne na základe experimentu upresniť vhodný typ gradienta.

Pri výbere mobilnej fázy sa vychádza z požiadavky, aby sa pri vhodnej selektivite a maximálnom rozsahu elučnej sily skladala z minimálneho počtu zložiek. Dôležitou požiadavkou je vytvorenie takého priebehu elučnej sily v závislosti od času, aby sa zložky rozložili na celom chromatograme a aby píky boli strmé, s prakticky konštantnou šírkou (t.j. pri gaussovskom rozdelení  $4\sigma$ ). Súčasne sa vyžaduje spojitá zmena elučnej sily bez nespojitých zmien v sekundárnych rozpúšťadlových efektoch, čo je mimoriadne závažné pri zmesiach, kde možno využívať s požadovaným efektom len gradientovú elúciu [4]. Rozpúšťadlové efekty spôsobujú zhoršenie separácie v čase nespojitej zmeny elučnej sily na kolóne a možnosť vymývania frakcie nerozdelených zložiek [1—3]. V predkla-

---

Doc. Ing. Milan Drdák, DrSc., Ing. Jolana Karovičová, CSc., Ing. Peter Šimko, CSc., Ing. Alica Rajniaková, CSc., Katedra sacharidov a konzervácia potravín, Ing. Pavol Daučík, CSc., Katedra technológie ropy a petrochémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

danej práci sme sa zamerali na výber vhodných podmienok rozdelenia antokyanínov červených vín za podmienok gradientovej elúcie s cieľom dosiahnuť uvedené požiadavky HPLC.

### Materiál a metódy

Chemikálie: metanol pre UV spektroskopiu (Lachema, Brno), kyselina chlo-  
ristá — 70 % (Xenon, Lodž), redestilovaná voda, kyselina mravčia — 99,7 %  
(Lachema, Brno), kyselina octová — 99 % (Lachema, Brno), kyselina trihydro-  
génfosforečná — 85 % (Lachema, Brno).

*Rozdelenie antokyanínov HPLC.* Na rozdelenie antokyanínových farbív čer-  
vených vín sme použili vysokoúčinný kvapalinový chromatograf typu VARIAN  
8500 (USA), vybavený spektrofotometrickým detektorom UV/VIS VARIS-  
CAN 634 D, zapisovačom A-25 a vysokotlakovým nástrekovým systémom  
stop flow.

Podmienky analýzy:

kolóna: SEPHARON-SGX-C18 ( $0,32 \times 15$  cm),

prietok mobilnej fázy:  $30 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ ,

pracovný tlak: 14 MPa,

vlnová dĺžka detektora: 520 nm.

*Charakteristiky chromatografického rozdelenia.* Separačná účinnosť vyjadruje  
hodnota rozlíšenia dvoch zložiek  $i, j$  —  $R_{i,j}$  ktorá sa vypočíta podľa vzťahu

$$R_{i,j} = 0,25 \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{k + 1} N_{\text{ef}}^{0,5},$$

kde  $\alpha$  je selektivita systému,  $k'$  — kapacitný faktor,  $N_{\text{ef}}$  — počet efektívnych  
priehradiek kolóny,

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}, \quad k' = \frac{t_r - t_0}{t_0},$$

$t_r$  — elučný čas,  $t_0$  — mŕtvy elučný čas kolóny,

$$N_{\text{ef}} = \left[ \frac{t_r - t_0}{\sigma_t} \right]^2 = N \left[ \frac{k'}{1 + k'} \right]^2,$$

$n$  je počet teoretických priehradiek kolóny,  $\sigma_t$  — smerodajná odchýlka graus-  
sovského rozdelenia,

$$N = 16 \left[ \frac{t_r}{w} \right]^2:$$

$w$  — šírka píku,

Matematicko-štatistické charakteristiky.  
Smerodajná odchýlka

$$s = \left[ \frac{S(x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{1/2},$$

kde  $\bar{x}$  je aritmetický priemer,  $S$  — suma,  $n$  — počet meraní, rozptyl

$$\sigma = \left[ \frac{S(x_i - \bar{x})^2}{n(n - 1)} \right]^{1/2}.$$

### Výsledky a diskusia

V súlade s úvodným textom sme pristúpili k postupnému výberu optimálnych podmienok rozdelenia antokyanínov červených vín pomocou gradientovej HPLC.

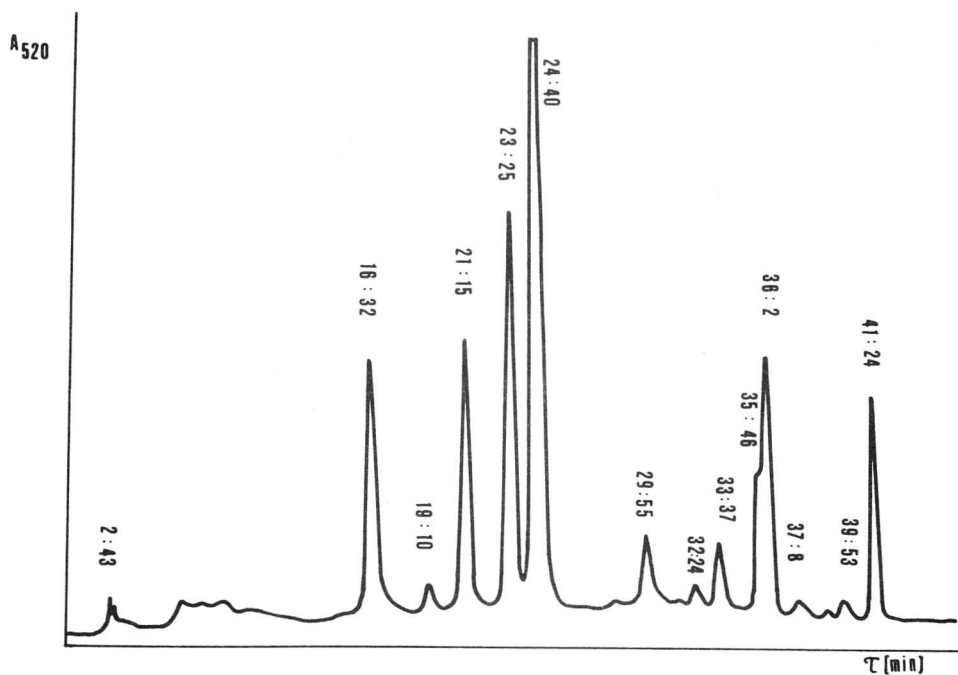
*Optimálne pH.* Pri chromatografickom rozdelení antokyanových farbív dôležitú úlohu hrá hodnota pH prostredia, čo je spojené s detekciou (vplyv pH na štruktúru a farebnosť antokyanínov) vo viditeľnej oblasti spektra. Z aspektu detekcie ide o dosiahnutie čím väčšej sumy plochy píkov pri danej koncentrácii. V závislosti od pH sa mení i separačná účinnosť, ktorú možno vyjadriť hodnotou rozlíšenia dvoch zložiek. V prvej etape sme preto skúmali vplyv pH na rozdelenie farbív pri použití roztokov kyseliny chloristej, ktorá sa ukázala vhodnou v predchádzajúcich prácach [4—8]. Pracovali sme v oblasti hodnôt pH, keď prevláda v roztoku červený flavýliový kation antokyanových farbív, t. j. v rozmedzí pH od 1,5 do 2,2. Pracovali sme s gradientom, pričom solvent A bola  $\text{HClO}_4$  vo vode s príslušným pH a solvent B metanol. Volili sme gradient: začiatok 25 % B v A, vzrast 1 % B/min, koniec 75 % B v A. V tab. 1 podávame prehľad o počte oddelených píkov vo víne Alibernet a zodpovedajúcich plôch. Príklady chromatografických záznamov rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet pri pH 1,5 a 1,9 sú na obr. 1 a 2.

Zo získaných výsledkov sme zostrojili grafické závislosti plochy píkov ( $P$ )  $P = f(\text{pH})$  a  $R_{i,j} = f(\text{pH})$  a rámcovo určili optimálne rozpätie hodnôt pH pre rozdelenie antokyanínov. Závislosti sú znázornené na obr. 3 pre  $R_{4,5}$ ,  $R_{7,8}$  a  $R_{12,13}$ . Ukázalo sa, že pre chromatografické rozdelenie antokyanínov z hľadiska detekcie a separačnej účinnosti je najvhodnejšia oblasť pH v rozmedzí od 1,5 do 1,8.

Tabuľka 1. Plocha píkuv pri danom pH pre vzorku 1A  
Table 1. Peak area at the given pH for the sample 1A

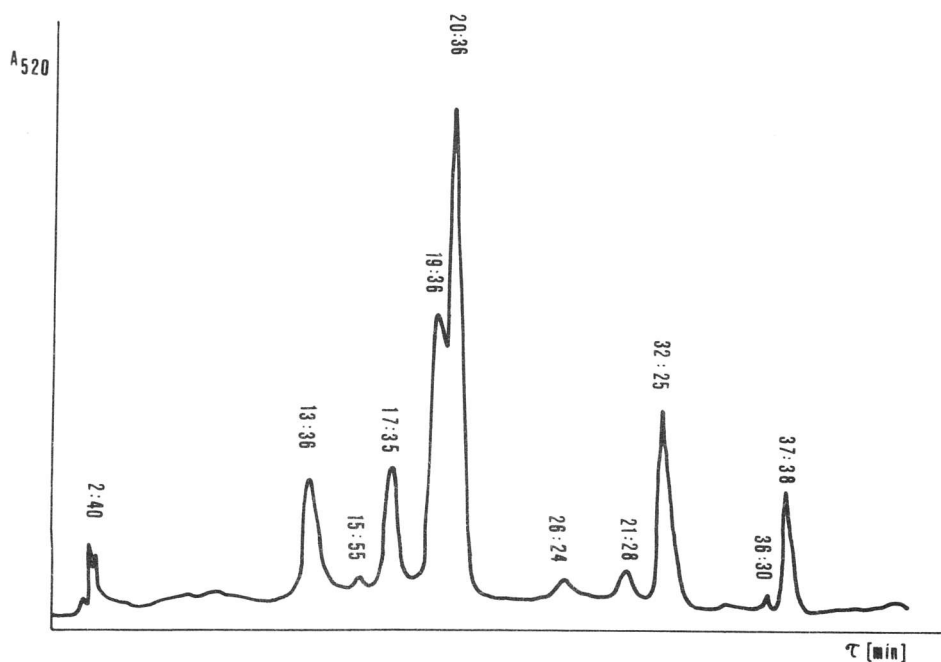
Číslo píku <sup>1</sup>	Plocha píku pri danom pH <sup>2</sup> (cm <sup>2</sup> )					
	1,5	1,6	1,8	1,9	2,1	2,2
1	1,69	1,50	1,39	1,16	1,09	0,90
2	0,17	0,14	0,13	0,06	0,03	—
3	1,79	1,56	1,25	1,19	1,02	1,04
4	2,23	2,20	2,21	2,74	—	—
5	6,12	6,26	5,73	4,15	7,04	6,81
6	0,46	0,39	0,32	0,27	0,15	—
7	0,14	0,137	0,12	—	—	—
8	0,68	0,40	0,36	0,35	0,14	0,13
9	—	—	—	—	—	—
10	2,39	2,06	1,99	1,65	1,41	1,45
11	0,09	0,07	0,06	—	—	—
12	0,12	0,10	0,07	0,08	—	—
13	0,92	0,86	0,82	0,73	0,68	0,58

1 — Number of peak, 2 — Peak area at the given pH.



Obr. 1. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo vine Alibernet 1A pri pH 1,5, nástrek 9  $\mu$ l.

Fig. 1. Chromatogram of the selection of antocyanines in the wine Alibernet 1A at pH 1.5, injection 9  $\mu$ l.



Obr. 2. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet 1A pri pH 1,9, nástretek 9  $\mu$ l.

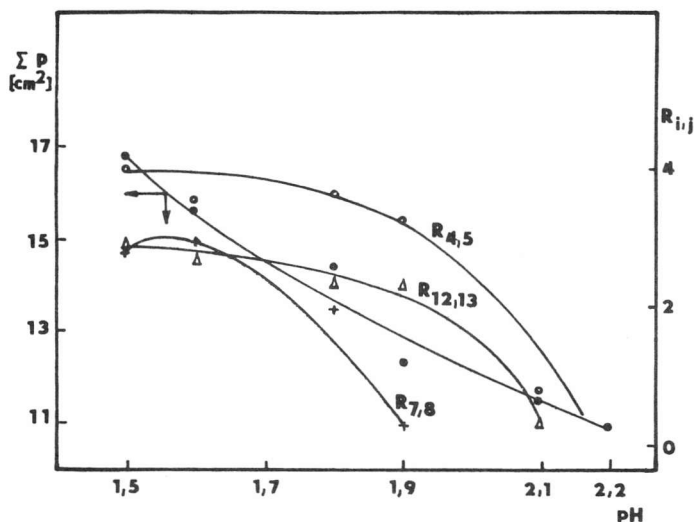
Fig. 2. Chromatogram of the selection of antocyanines in the wine Alibernet 1A at pH 1.9, injection 9  $\mu$ l.

*Kyselinová zložka v mobilnej fáze.* Optimálne pH sa dosiahne požitím vhodnej kyselinovej zložky v mobilnej fáze, ktorá môže mať okrem spomínaných účinkov vplyv na životnosť kolóny, ako aj na vlastný prístroj (agresivita). V publikovaných prácach sa doteraz na okyselenie použila 10 % kyselina mravčia, 10 % kyselina octová a kyselina chloristá [9—11].

Pri výbere kyselinovej zložky v mobilnej fáze sme odskúšali 4 kyseliny, a to mravčiu, octovú, fosforečnú a chloristú. Kyselina octová sa neosvedčila. Pri pomerne vysokej koncentrácii (15 %) sa dosahuje relatívne vysoké pH (2,17), ktoré nie je pre detekciu antokyanínov vo viditeľnej oblasti optimálne a taktiež separačná účinnosť sa znížila.

Tabuľky 2—4 uvádzajú prehľad o elučných časoch ( $t_r$ ), kapacitných faktoroch ( $k'$ ), selektivite ( $\alpha$ ) a rozlíšení dvoch nasledujúcich píkov pre roztoky kyseliny mravej, fosforečnej a chloristej vo vode. Roztoky predstavujú solvent A a solvent B. Gradient bol volený tak, aby začiatok predstavoval 25 % B v A, vzrastal 1 % B/min a koniec 75 % B v A. Koncentrácia kyseliny mravej a fosforečnej bola limitovaná odporúčaním, ktoré berie do úvahy ich korozív-

nosť proti častiam prístroja z nehrdzavejúcej ocele. Použitie kyseliny chloristej nie je limitované jej koncentráciou. Na obr. 4 a 5 sú chromatografické záznamy vzorky vína Alibernet pri použití 10 %  $\text{HCOOH}$  a  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_3\text{PO}_4$ .



Obr. 3. Závislosť plochy píkovej a rozlíšenia ( $R_{i,j}$ ) pri rôznych hodnotách pH mobilnej fázy.  
Fig. 3. Dependence of peak area and resolution ( $R_{i,j}$ ) at different pH values in a mobile phase.

Z údajov v tabuľkách a z chromatografických záznamov rozdelenia antokyanínov HPLC sme usúdili, že z hľadiska separačnej účinnosti sú kyselina mravčia a kyselina chloristá najvhodnejšími kyselinami v mobilnej fáze. Pre úplnosť treba uviesť, že pre detektor pre kyselinu mravčiu je limitujúcou hodnota pH 3, takže najvýhodnejšou sa zdá úprava pH mobilnej fázy kyselinou chloristou.

*Výber vhodného gradientu.* Výber vhodného gradientu sme robili v dvoch krokoch, a to výberom počiatočného zloženia mobilnej fázy a nastavením vhodného tvaru a strmosti gradientu. Tieto kroky sme robili empiricky, vhodnými zmenami profilu gradientu, kým sme nedosiahli uspokojivý gradient z hľadiska detekcie a separačnej účinnosti.

Vhodné zloženie mobilnej fázy na začiatku gradientu sme vyhodnotili na základe kapacitných faktorov štvrtého a piateho píku a ich selektivity v systéme. Tieto dve zložky sa v danej sústave najhoršie separovali a preto hodnoty selektivity týchto dvoch píkovej najlepšie vyjadrujú kvalitu chromatografického procesu. Príklad výberu zloženia mobilnej fázy na začiatku gradientu pri používaní  $\text{H}_3\text{PO}_4$  je v tab. 5. Výsledky sú porovnateľné s dokumentovanými výsledkami pri použití  $\text{HClO}_4$  (pH 1,8). Píky na chromatograme boli dostatočne rozde-

Tabuľka 2. Výpočet rozlíšenia pre dané  $N = 6500$ . Solvent A — vodný roztok kyseliny chloristej

Table 2. The calculation of resolution for the given  $N = 6500$ . Solvent A — water solvent of perchloric acid

Číslo píku <sup>1</sup>	0,0316 mol . dm <sup>-3</sup> HClO <sub>4</sub>		pH 1,5	
	$t_r$ (min)	$k'$	$\alpha$	$R_{i,j}$
1	16:32	5,08	1,19	11,08
2	19:10	6,05	1,13	7,90
3	21:15	6,82	1,12	7,46
4	23:25	7,62	1,06	4,08
5	24:40	8,07	1,24	14,15
6	29:55	10:01	1,09	6,92
7	32:24	10,93	1,04	2,92
8	33:37	11,37	1,07	4,84
9	35:46	12,16	1,01	0,59
10	36:2	12,26	1,05	3,43
11	37:38	12,85	1,06	4,55
12	39:53	13,68	1,04	2,95
13	41:24	14,24		
0,0251 mol . dm <sup>-3</sup> HClO <sub>4</sub>		pH 1,6		
1	16:23	4,62	1,16	9,54
2	18:35	5,37	1,10	6,29
3	20:9	5,91	1,12	7,28
4	22:9	6,59	1,05	3,48
5	23:9	6,94	1,33	14,67
6	28,18	9,26	1,09	6,02
7	36:35	10,11	1,04	2,96
8	31,45	10,53	1,07	5,26
9	—	11,26	1,01	0
10	33:58	11,35	1,05	4,90
11	36:10	11,90	1,06	4,32
12	38:13	12,67	1,04	2,78
13	39:35	13,19		

1 — Number of peak.

né, avšak nepriaznivo sa prejavila pomerne vysoká hodnota pH a veľký rozdiel koncentrácií metanolu v rozpúšťadlách A a B. Tieto výsledky boli podkladom pre zmenu počiatočných koncentrácií mobilnej fázy a voľbu jednotlivých typov gradientov (tab. 6).

Vhodnosť zvolených typov gradientov sme posúdili na základe kapacitných faktorov  $k'_4, k'_5, k'_9, k'_{10}$  a tiež koeficientov selektivity  $\alpha_{4,5}$  a  $\alpha_{9,10}$  (tab. 7). V prípade, že selektivita je 1, rozlíšenie dvoch píkov je nulové a preto zvolený systém nie je vhodný z hľadiska rozlíšenia a selektivity na rozdelenie dvoch odpovedajúcich

Tabuľka 3. Výpočet rozlíšenia pre dané  $N = 6500$ . Solvent A — 10 % roztok kyseliny mravčej vo vode

Table 3. The calculation resolution for the given  $N = 6500$ . Solvent A — 10% solvent of the formic acid in water

Číslo píku <sup>1</sup>	10 % roztok HCOOH <sup>2</sup> pH 1,5			
	$t_r$ (min)	$k'$	$\alpha$	$R_{i,j}$
1	8:10	2,01	1,27	12,15
2	9:37	2,54	1,27	13,20
3	14:23	3,23	1,32	16,16
4	14:56	4,29	1,05	2,97
5	20:14	4,50	1,43	21,12
6	23:8	6,45	1,17	10,11
7	24:49	7,51	1,08	5,47
8	27:17	8,13	1,11	7,29
9	28:7	9,04	1,03	2,39
10	29:00	9,35	1,03	2,46
11	31:17	9,67	1,13	8,24
12	32:18	10,89	1,08	5,29
13	34:34	11,72		

1 — Number of peak, 2 — 10% solvent of HCOOH.

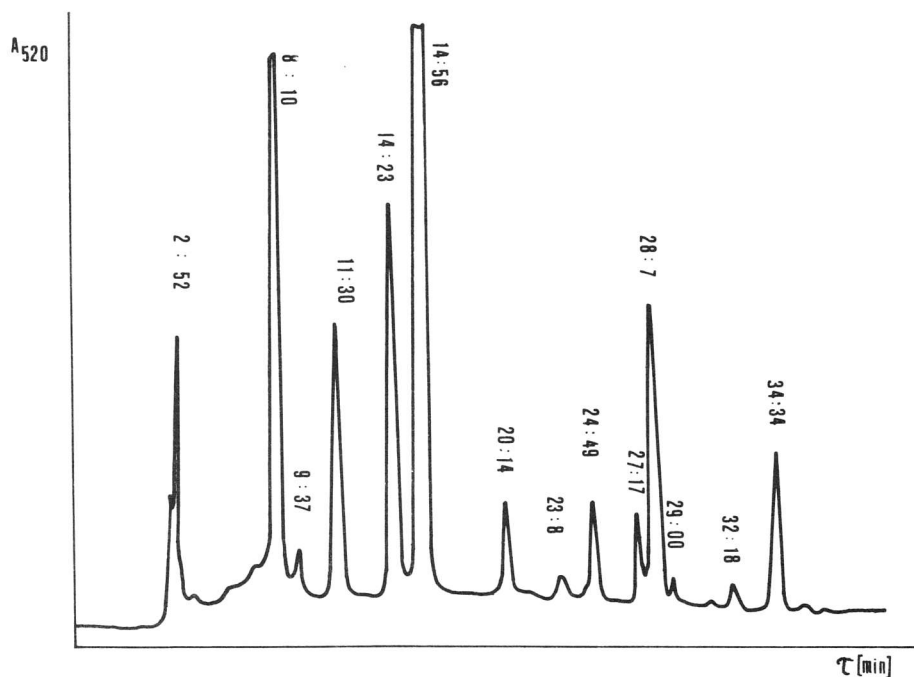
Tabuľka 4. Výpočet rozlíšenia pre dané  $N = 6500$ . Solvent A — 0,05 mol . dm<sup>-3</sup> roztok kyseliny fosforečnej vo vode

Table 4. The calculation of resolution for the given  $N = 6500$ . Solvent A — 0.05 mol dm<sup>-3</sup> solvent of phosphoric acid

Číslo píku <sup>1</sup>	0,05 mol . dm <sup>-3</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,8			
	$t_r$ (min)	$k'$	$\alpha$	$R_{i,j}$
1	14:05	4,24	1,23	12,84
2	16:57	5,24	1,13	7,87
3	18:47	5,91	1,50	9,19
4	21:12	6,80	1,06	3,80
5	22:15	7,19	1,28	15,86
6	27:42	9,19	1,11	7,36
7	30:29	10,22	1,04	3,17
8	31:28	10,68	1,07	4,78
9	33:44	11,42	1	0
10	33:44	11,42	1,08	5,87
11	36:23	12,39	1,07	5,25
12	38:55	13,32	1,04	2,65
13	40:14	13,81		

1 — Number of peak.





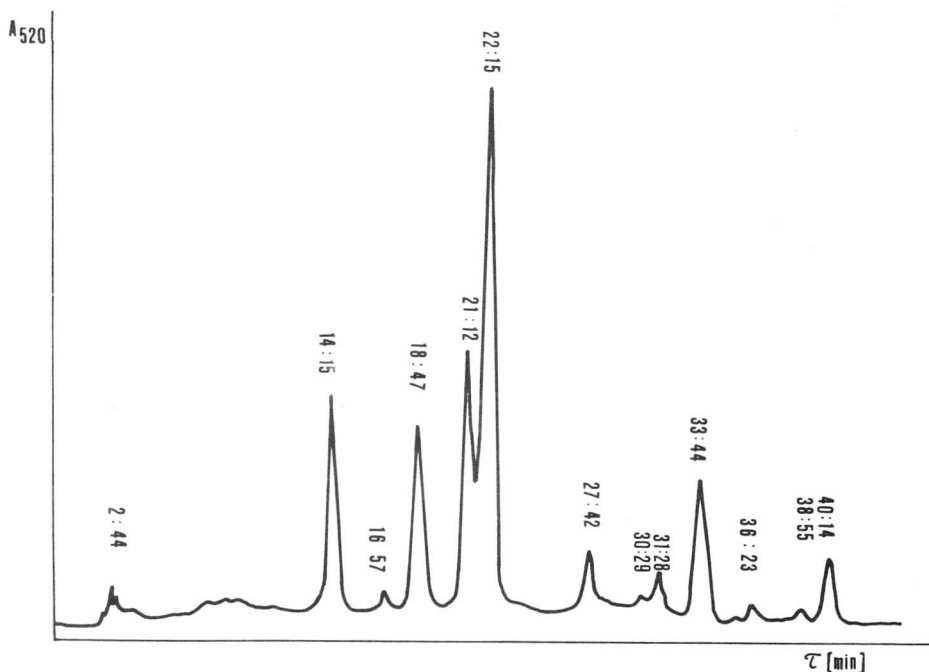
Obr. 4. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet 1A pre solvent A = 10 % HCOOH vo vode, nástrek 9  $\mu$ l.

Fig. 4. Chromatogram of the selection of anytocyanines in the wine Alibernet 1A for the solvent A = 10% HCOOH in water, injection 9  $\mu$ l.

Tabuľka 5. Optimalizácia zloženia mobilnej fázy na začiatku gradientu  
Table 5. Optimization of the mobile phase composition at the beginning of gradient

A: 0,05 mol. dm <sup>-3</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> — H <sub>2</sub> O		pH 1,8		B: MetOH	
% B		Vzrast <sup>3</sup> % B/min	$k'_4$	$k'_5$	$\alpha_{4,5}$
zač. <sup>1</sup>	koniec <sup>2</sup>				
25	75	1	6,95	7,34	1,06
30	75	1	6,34	6,64	1,04
40	75	1	2,73	2,73	1
25	75	2	4,55	4,55	1

1 — Beginning, 2 — End, 3 — Increase.



Obr. 5. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet 1A pre solvent  $A = 0.05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_3\text{PO}_4$  vo vode, nástrek  $9 \mu\text{l}$ .

Fig. 5. Chromatogram of the selection of antocyanines in the wine Alibernet 1A for the solvent  $A = 0.05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_3\text{PO}_4$  in water, injection  $9 \mu\text{l}$ .

látok v zmesi. Z výsledkov vyplýva, že najvhodnejší typ gradientu na rozdelenie antokyanínov v červených vínach je typ 4. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet 1 A je na obr. 6.

*Reprodukovateľnosť gradientu rozdelenia antokyanínov.* Po vytypovaní vhodného typu gradientu sme sa zamerali na rozdelenie antokyanínov vzhľadom na reprodukovateľnosť gradientu. Rozdelenie antokyanínov sme opakovali sedemkrát s tým, že sme dodržiavali rovnaké podmienky pri regenerácii kolóny.

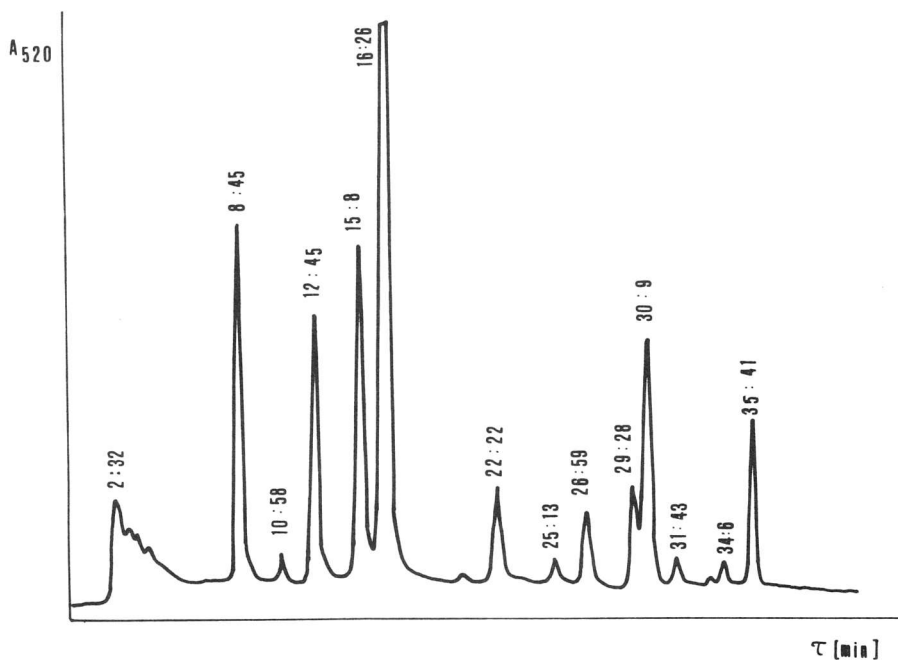
Obr. 6. Chromatografický záznam rozdelenia antokyanínov vo víne Alibernet po výbere vhodných podmienok gradientovej elúcie, nástrek  $9 \mu\text{l}$ .

Fig. 6. Chromatogram of the selection of antocyanines in the wine Alibernet when the appropriate conditions of the gradient elution were chosen, injection  $9 \mu\text{l}$ .

Tabuľka 6. Jednotlivé typy gradientov použité pri meraní vzorky 1A  
Table 6. Respective types of gradients used at the measurement of sample 1A

Roztok A: <sup>1</sup> 20 % CH <sub>3</sub> OH + 80 % H <sub>2</sub> O + HClO <sub>4</sub> Roztok B: <sup>2</sup> 80 % CH <sub>3</sub> OH + 20 % H <sub>2</sub> O + HClO <sub>4</sub>				
(HClO <sub>4</sub> ) mol.l <sup>-1</sup>	0,0158	0,0158	0,0158	0,0251
pH	1,8	1,8	1,8	1,6
	Typ gradientu <sup>3</sup>			
	1	2	3	4
Gradient: <sup>4</sup> zač. % B <sup>5</sup> koniec % B <sup>6</sup>	25 85	20 70	20 70	20 75
Vzrast % B za minútu <sup>7</sup>	1 %	1 %	1 %/20 min 2 %/15 min	1 %/20 min 2 %/15 min 1 %/ 5 min
Čas analýzy <sup>8</sup>	60 min	50 min		

1 — Solvent A, 2 — Solvent B, 3 — Gradient type, 4 — Gradient, 5 — Beginning % B, 6 — End % B, 7 — Increase % B per minute, 8 — Analysis time.



Tabuľka 7. Hodnoty kapacitných faktorov a selektivit pre píky 4, 5 a 9, 10 v závislosti od použitého gradientu

Table 7. The values of both capacity factors and selectivities for the peaks 4, 5 and 9, 10 in dependence on used gradient

Roztok HClO <sub>4</sub> s pH <sup>1</sup>	Typ gradientu <sup>2</sup>	$k'_4$	$k'_5$	$\alpha_{4,5}$	$k'_9$	$k'_{10}$	$\alpha_{9,10}$
1,8	1	2,85	3,15	1,10	8,55	8,55	1
1,8	2	4,69	5,20	1,11	9,36	9,36	1
1,8	3	3,77	4,17	1,10	10,53	10,53	1
1,6	4	5,77	6,34	1,10	11,08	11,26	1,01

1 — HCl solution having pH, 2 — Gradient type.

Tabuľka 8. Hodnoty priemerných kapacitných faktorov, štandardných odchýlok a rozptylov na overenie reprodukovateľnosti gradientu za vybraných podmienok rozdelenia antokyanínov červených vín

Table 8. The values of both average capacity factors, standard deviations and scattering for the verification of reproducibility gradient under the special conditions of the selection of red wine antocyanines

Číslo píku <sup>1</sup>	$k'$	$s$	$\sigma$
1	3,88	0,57	0,51
2	5,06	0,55	0,59
3	6,20	0,62	0,55
4	7,13	0,52	0,46
5	7,77	0,49	0,44
6	10,96	0,47	0,42
7	12,26	0,41	0,37
8	12,99	0,30	0,27
9	14,00	0,19	0,17
10	14,27	0,16	0,15
11	14,93	0,17	0,15
12	16,07	0,15	0,13
13	16,82	0,16	0,14

1 — Number of peak.

Výsledky hodnôt priemerných hodnôt kapacitných faktorov, smerodajných odchýlok a rozptylu sú v tab. 8. Zistili sme, že reprodukovateľnosť gradientu je mimoriadne závislá od spôsobu a doby regenerácie kolóny pred analýzou. I pri prisnom dodržaní spôsobu a časovej nadväznosti analýz je značný rozptyl jednotlivých kapacitných faktorov.

## Literatúra

1. Kardoš, E.—Berek, D.: Základy kvapalinovej chromatografie. Bratislava, Alfa 1976.
2. Churáček, J.—Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Praha, SNTL 1984.
3. Jandera, P.—Churáček, J.: Kapalinová chromatografie s programovaným zložením mobilní fáze. Praha, Academia 1984.
4. Drdák, M.—Daučík, P.—Kubaský, J., Bull. PV, 28 (8), 1989, s. 189.
5. Drdák, M.—Daučík, P.—Kubaský, J., J. Chromatogr., 504, 1990, s. 207.
6. Drdák, M.—Daučík, P., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 180.
7. Drdák, M.—Daučík, P.—Kubaský, J., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 224.
8. Drdák, M.—Daučík, P.—Kubaský, J., Mitt. Klosterneuburg, 39, 1989, s. 228.
9. Wulf, L. W.—Nagel, C. W., Am. J. Enol. Vitic., 29, 1978, s. 42.
10. Nagel, C. W.—Wulf, L. W., Am. J. Enol. Vitic., 30, 1979, s. 111.
11. Preston, N. W.—Timberlake, F. C., J. Chromatogr., 214, 1981, s. 222.

Do redakcie došlo 27. 6. 1991

### Оптимизация условий разделения антоцианинов красных вин высокоскоростной жидкостной хроматографией (HPLC)

#### Резюме

Работа занимается подбором подходящих условий для разделения антоцианинов в красных винах при условиях градиентного элюирования HPLC. Определилось оптимальное pH мобильной фазы в отношении к детекции в видимой области и сепарационной эффективности колонки, исследовался состав кислотной части в мобильной фазе (кислоты муравьиная, уксусная, фосфорная и хлорная). Подходящая особенно  $\text{HClO}_4$ , неподходящая  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Кроме того работа намерена на подбор подходящего градиента и его воспроизводимость. Воспроизводимость градиента особенно зависима от способа и времени регенерации колонки перед анализом.

### Conditions optimization of the antocyanines separation in red wines using the HPLC

#### Summary

This paper deals with the choice of suitable conditions for the separation of antocyanines in red wines under the conditions of the HPLC gradient elution. The optimal pH of the mobile phase was determined in dependence on both the detection in the visible area and separative efficiency of column. The acidic component in a mobile phase has been investigated (formic acid, acetic acid, phosphoric acid and perchloric acid);  $\text{HClO}_4$  seems to be especially appropriate,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  is unsuitable. This paper is also aimed to the selection of a suitable gradient and its reproducibility which depends on the way and time of the column regeneration before analysis.