

## ŞARAPLARDA FENOLİK ASİTLER, PROSIYANİDİNLER VE FLAVANOLLERİN TAYİNİ İÇİN HPLC METOTLARI

### HPLC METHODS FOR THE DETERMINATION OF PHENOLIC ACIDS, PROCYANIDINS AND FLAVANOLS IN WINE

Güleren ÖZKAN

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA

**ÖZET:** Bu derleme, şarapta fenolik asitlerin, prosiyanidinlerin ve flavanollerin tayinlerinde kullanılan HPLC metotlarını özetlemektedir. Bu bileşiklerin şaraptan ekstraksiyon metotları, bozucu bileşiklerin etkilerinin giderilmesinde kullanılan metotlar ve HPLC işlemleri hakkında bilgileri de kapsamaktadır.

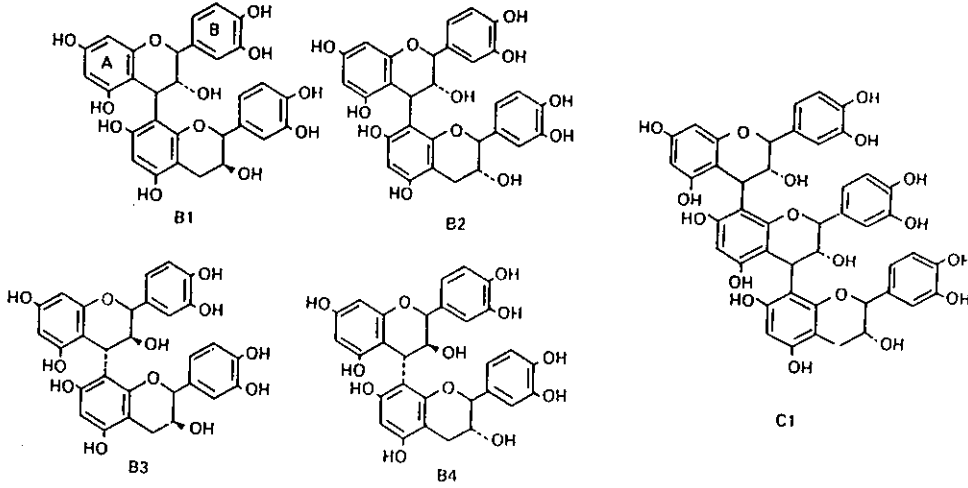
**ABSTRACT:** This manuscript summarizes HPLC methodologies used for the determination of phenolic acids, procyanidins and flavanols in wine. It includes also methods of extraction of these compounds, methods used to eliminate potential interfering compounds and the HPLC determinant step.

#### GİRİŞ

Fenolik asitler, flavanoller ve prosiyanidinler, şarabın tadını, kalitesini ve rengini etkileyen, şarabın olgunlaşmasında doğal koruyucu rolleri olan bileşiklerdir (ROBICHAUD ve NOBLE, 1990). Bu nedenle kromatografik tayinleri önem arz etmektedir. Ancak fenolik bileşiklerin ayrılmaları, kimyasal özelliklerindeki benzerlik sebebiyle son derece zordur. Bu bileşiklerin ayrılma ve kantitatif tayinlerinde önceleri kağıt, ince tabaka ve kolon kromatografisi metotlarından yararlanılmış, bu gün bu tekniklerin yerini yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) almıştır (WULF ve NAGEL, 1976; WULF ve NAGEL, 1978; EVANS, 1983). Özellikle ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RP HPLC) üzüm ve şarapta fenolik asitler, prosiyanidinler ve flavanollerin tayinlerinde yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Fenolik asitler terimi sinamik asitleri ( $C_6-C_3$ ) ve benzoik asitleri ( $C_7$ ) kapsar. Üzüm suyu ve şarapta bulunan fenolik asitler, gallik asit (3,4,5,-trihidroksibenzoik asit), protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), p-hidroksibenzoik asit, şirinjik asit (3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoik asit), gentisik asit (2,5-dihidroksibenzoik asit), vanillik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit), o-kumarik asit (2-hidroksisinamik asit), m-kumarik asit (3-hidroksisinamik asit), p-kumarik asit (4-hidroksisinamik asit), sinapik asit (3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamik asit), kafeik asit (3,4-dihidroksisinamik asit), klorojenik asittir. Bunlar serbest asitler halinde bulunabildikleri gibi, esterleri ve glikozitleri halinde de bulunabilirler (KRAMLING, ve SINGLETON, 1969; BARONOWSKI ve NAGEL, 1981; NAGEL ve ark. 1979; NAGEL ve WULF, 1979; ONG ve NAGEL, 1978; SINGLETON ve ark. 1978; SPANOS ve WROLSTAD, 1992). Şaraplarda fenolik bileşim ve bu bileşimi etkileyen faktörler üretim aşamasının tasarımında son derece önemlidir (SINGLETON ve TROUSDALE, 1983; SPANOS ve WROLSTAD, 1992).

Flavanoller ve prosiyanidinler, polifenolik bileşiklerin şarabın ve üzüm suyunun tadı ve kararlılığında önemli olan iki sınıfıdır (LUNTE ve ark. 1988). Bu bileşikler, polimerizasyonlarına bağlı olarak acı veya buruk tattadır. Bu bileşiklerin yükseltgenmesi ve polimerizasyonu şarapta istenmeyen bulanıklığa ve çökmelere sebep olur. Flavanoller, 2-fenil-3,4-dihidro-2H-1 benzopiran yapılı polifenolik bileşiklerdir. Kateşin ve epikateşinde 2 ve 3 numaralı karbonların stereokimyasal pozisyonları farklıdır. Gallokateşinler B halkasının 3 pozisyonunda bir hidroksil grubu daha içerirler. Flavanollerin çoğu, 3 pozisyonunda gallik asit esterleri olarak bulunurlar. Epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat, üzüm çekirdeklerinde bulunmaktadır. 3 ve 4 numaradaki karbon atomlarının şiral özelliği nedeniyle prosiyanidinler farklı stereoizomerler halinde bulunabilirler. Şekil 1, şarapta bulunan dört prosiyanidin dimerini ve bir prosiyanidin trimerini göstermektedir. Prosiyanidin B-5, 2 epikateşin biriminin 4-6 pozisyonlarında birleştiği bir diğer prosiyanidindir. Kateşin, epikateşin, rutin, katekol, floroglusinol, epigallokateşin, epigallokateşin gallat, prosiyanidin B-2, prosiyanidin B-3, prosiyanidin B-4, prosiyanidin C-1, bu grubun şarapta bulunan temel örnekleridir.



Şekil 1. Şarapta bulunan prosiyanidinler.

Yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi, fenolik bileşiklerin tayininde izokratik koşullarda kullanılabilir (ROSTON ve KISSINGER, 1981; MAHLER ve ark. 1988; WOODRING ve ark. 1990). Ancak, fenolik asitlerin polaritelerindeki farklılık sebebiyle genellikle gradient elüsyon tercih edilir (BARROSO ve ark. 1983; SALOGOITY AUGUSTE ve BERTRAND, 1984; SHATIRISHVILI, 1986; ROGGERO ve ark. 1990; CARTONI ve ark. 1991; ACHILLI ve ark. 1993; BRU ve ark. 1996, CHILLA ve ark. 1996; GUILLEN ve ark. 1996a,b).

Bu bileşiklerin tespitinde UV dedektör (SYMONDS, 1978; ONG ve NAGEL ve 1978; TYRON ve ark. 1988; TYRON ve ark. 1988; CARTONI ve ark. 1991; SHATIRISHVILI, 1986; BUJARELLI ve ark. 1995). Fotodiyot dedektör (JAWORSKI ve LEE, 1987; HONG ve WROLSTAD, 1990; BARTOLEME ve ark. 1993; CHILLA ve ark. 1996; GUILLEN ve ark. 1996; ROGGERO ve ark. 1997), elektrokimyasal dedektör (ROSTON ve KISSINGER, 1981; LUNTE ve ark. 1988; MAHLER ve ark. 1988; WOODRING ve ark. 1990) ve kulometrik dedektörden (ACHILLI ve ark. 1993) yararlanılır. Tepitlerin UV veya fotodiyot dedektör ile yapılması durumunda bileşiklerin alıkonma zamanları ve UV absorpsiyon özelliklerinden; elektrokimyasal ve kulometrik dedektörün kullanılması durumunda ise bileşiklerin alıkonma zamanları ve voltametrik davranışlarından yararlanılır. UV dedektörün kullanılması durumunda benzoik asitler için 280 nm, sinamik asitler için 320 nm'de absorbans ölçümleri tercih edilir. Özellikle birbirinden ayırlamayan fenolik asitlerin kantitatif değerlendirilmelerinde maksimum absorbans dalga boylarının farklı olmalarından yararlanılır (CARTONI ve ark. 1991). Kromatografik kolunu ayrılmamış halde terkeden piklerin bile kulometrik dedektörle çözümleneceği belirtilmektedir (ACHILLI ve ark. 1993).

Şaraptaki fenolik bileşiklerin sıvı kromatografik ayrılımlarında doğrudan enjeksiyon kullanılabilir (ROGGERO ve ark. 1990; ACHILLI ve ark. 1993; LAMUELA RAVENTOS ve WATERHOUSE, 1994; ROGGERO ve ark. 1997). Çalışmacıların bu tip enjeksiyonu tercih etmelerinin sebebi, ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek trans cis izomerik dönüşümleri ve hidroliz tepkimelerinin bozucu etkilerini önlemektir. Ancak fenolik bileşiklerin derişimleri, kırmızı şarapta mg/L düzeyinde; beyaz şaraplarda ise µg/L düzeyindedir. Direkt enjeksiyon durumunda tespit ve kantitatif tayinde zorluklar vardır. Bu nedenle bir derişirme aşaması gerekmektedir. Numune hazırlama işlemi ile numune matriksinin etkisi de bir dereceye kadar azaltılabilir.

Şarabın fenolik asitlerin kromatografik analizine uygun şekilde hazırlanmasında sıvı sıvı ekstraksiyonu veya katı sıvı ekstraksiyonundan yararlanılabilir. Fenolik asitlerin ekstraksiyonunda etil asetatın (ROSTON ve KISSINGER, 1981; MAHLER ve ark. 1988; WOODRING ve ark. 1990) ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı dikkat çekmektedir. Ekstraksiyon çözücüsünün vakumda veya azot akımında uzaklaştırılmasından sonra kalıntı uygun miktarda elue edicide çözümlenerek kromatografik ayırmada kullanılmaktadır. Bu gün ekstraksiyon işleminin kesikli yerine sürekli uygulanması üzerinde durulmakta ve kaynama noktasının düşüklüğü sebebiyle ekstraksiyon çözücüsü olarak dietil eter seçilmektedir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak eterin kullanıldığı 200 aşamalı sürekli bir ekstraksiyonun, eter şarap hacmi için uygun faz oranında ve uygun hızdaki bir döner bu-

harlaştıncıda ve şarabın sodyum klorür ile doyurulduğu koşullarda yapılması durumunda %70'in üzerinde bir ekstraksiyon verimine ulaşılacağı (gallik asit, %40) belirtilmektedir (BRU ve ark, 1996; GUILLEN ve ark. 1996a,b).

Şarabın katı faz ekstraksiyonunda Sep Pak C18 kartuştan yararlanılır (JAWORSKI ve LEE, 1987; CARTONI ve ark. 1991; GUILLEN ve ark. 1996a,b). Katı sıvı ekstraksiyonda şarap, Sep Pak C18 kartuştan geçirilerek fenolik bileşikler, Sep Pak C 18 kartuşta tutulur. Kartuş su ile yıkanarak şekerler ve uçucu olmayan organik asitler kartuştan uzaklaştırılır. Fenoller, metanol (JAWORSKI ve LEE, 1987) veya THF (CARTONI ve ark. 1991) ile kartuştan elue edilir. Eluat ya bu haliyle veya çözücü döner buharlaştırıcı veya N<sub>2</sub> gazı ile uzaklaştırıldıktan sonra az miktarda mobil fazda çözülerek HPLC sistemine enjekte edilirler.

Fenoliklerin üzüm suyundan ekstraksiyonu durumunda rengin koyulaşmasını önlemek için üzüm ekstresine askorbik asit ilave edilir. Takiben üzüm suyuna mutlak etanol ilave edilerek proteinlerin çökmesi sağlanır. Protein çökmesinden sonra etanol uzaklaştırılır, numune orijinal hacmine seyreltilir. Bundan sonra katı faz ekstraksiyonu uygulanır.

Bazı çalışmalarda fenolik bileşikler arasında bozucu etkileri azaltmak için HPLC enjeksiyonundan önce üzüm suyu ve şarabın asidik ve nötral bileşiklere ayrılmasının önemi üzerinde de durulmaktadır (ROSTON ve KISSINGER, 1981; JAWORSKI ve LEE, 1987; OZMIANSKI ve ark. 1988; OZMIANSKI ve LEE, 1990; GUILLEN ve ark. 1996b; GUILLEN ve ark. 1997). Böyle bir ayırma durumunda Sep Pak C18 kartuş nötral fenolikler için metanol ve su ile; asidik fenolikler için 0,01 N HCl ile aktif hale getirilir. Numune, pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra önce nötral fenolikler için hazırlanmış kartuştan geçirilir. Eluentin pH'sı 2,5'a ayarlanır ve asidik fenolikler için hazırlanmış kartuştan geçirilir. Her bir kartuş metanol ile ekstrakte edilir. Antosiyanın pigmentlerinin bir kısmı, fenolik asitlerle birlikte elue olabilir. Ancak kromatogramın son kısmında yer aldıkları için tayinde bozucu etki yapmazlar. Katı faz ekstraksiyonda stiren divinilbenzen dolgulu kartuşların da uygun olduğu belirtilmektedir (CHILLA ve ark. 1996).

GUILLEN ve ark. (1996a), şarap fenoliklerinin kromatografik ayırmalarında iç standard olarak kullanılacak maddeler üzerinde çalışmışlardır. β-rezorsilik asit, 2,6-dimetoksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzaldehit üzerinde duran çalışmacılar 2,5-dihidroksibenzaldehitin piki, p-hidroksibenzaldehit piki ile çakışsa bile iç standard olarak kullanılacak en iyi bileşik olduğunu belirtmektedirler. 340 nm'de çalışmanın uygunluğu da çalışmacılar tarafından ifade edilmektedir.

Flavanol ve prosiyanidinlerin ayrılmalarında ince tabaka, kağıt ve preparatif kromatografi çalışmaları vardır. Bu teknikler zaman alıcı ve güvenilir kantitatif tayin için yeterli değildir. Tespit için siyanidin bozunma ürünleri veya asidik toluentiol ile reaksiyon ürünleri esas alınır. Bu gün prosiyanidinlerin tayinlerinde HPLC-UV (SALOGOITY-AUGUSTE ve BERTRAND 1984), HPLC-fotodiyot dedektör (JAWORSKI ve LEE, 1987; LAMUELA RAVENTOS ve WATERHOUSE, 1994) veya HPLC -elektrokimyasal dedektör (LUNTE ve ark.1988) sistemlerinde ayırma tercih edilmektedir. Tespitlerinde elektrokimyasal dedektörün daha uygun olduğu belirtilmektedir (LUNTE ve ark. 1988). Bazı durumlarda dedektörle elektrokimyasal veya spektral davranışın incelenmesi yanısıra hidroliz tepkimelerinden de pik tespiti için yararlanıldığı belirtilmektedir. Epikateşin gallatın tespiti için tannase enzimi üzüm çekirdiği ekstraktına ilave edilerek bu enzim ile gallik asit esterlerinin hidrolizi katalizlenmekte ve bu durumda kromatogramda epikateşin pikinin kaybolması ve gallik asit pikinin görülmesinden yararlanılarak pik tespiti gerçekleştirilmektedir (LUNTE ve ark. 1988). Prosiyanidin ve flavanollerin kromatografik ayırmaları, gradient koşulda gerçekleştirilir (LUNTE ve ark. 1988; RICARDO da SILVA ve ark. 1990).

Prosiyanidinlerin tayinlerinde şarabın direkt enjeksiyonu ile çalışılabilir (LAMUELA RAVENTOS ve WATERHOUSE, 1994). Şarabın prosiyanidinlerin ve flavanollerin kromatografik analizleri için hazırlanmasında genellikle katı faz ekstraksiyonundan yararlanılır. Prosiyanidinlerin ve flavanollerin şaraptan izolasyonunda öncelikle şarabın etanolü uzaklaştırılır ve şarap C18 kartuştan geçirilir. Kartuşun su ile yıkanması suretiyle organik asitler ve şekerler, kartuştan amonyak geçirilerek fenolik asitler uzaklaştırılır. Flavanoller, metanol ile kartuştan elue edilir ve HPLC mobil fazı ile seyreltilerek cihaza enjekte edilir (LUNTE ve ark. 1988).

Üzümün fenolik bileşikleri yanısıra şarap fıçlarından şaraba geçen ve şarabın flavorını etkileyen fenolik aldehitler de vardır. Bunlardan önemlileri, 3,4- dihidroksibenzaldehit, 4-hidroksibenzaldehit, vanillin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit), şiringaldehit (3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzaldehit), koniferaldehit (4-hidroksi-

3-metoksisinmaldehit ), sinapaldehit (3,5-dimetoksi-4-hidroksisinmaldehit ve benzaldehittir. Şarap fıçıları sebebiyle şaraplara geçen aldehitlerin tayinleri de yüksek performans sıvı kromatografi ile yapılabilir (BURTSCHER ve ark. 1982; SALOGOITY-AUGUSTE ve ark. 1987; GUILLEN ve ark. 1996a,b). Şaraptan dietil eter ile ekstraksiyonlarının HPLC enjeksiyonu için uygun olduğu belirtilmektedir (SALOGOITY-AUGUSTE ve ark. 1987). Ayırmaları gradient koşulda gerçekleştirilir, organik çözücü olarak genellikle asetonditriden yararlanılır ve pH ayarlamada fosforik asit veya asetik asit kullanılır.

Fenolik asitlerin standard çözeltileri, genellikle su-metanol, su-asetonitril karışımında çözülerek kullanılmaktadır. Ancak matriks etkiyi dikkate alabilmek için bazı fenoliklerin standard çözeltilerinin %12 (v/v) etanol, %5 dekstroz çözeltisinde (MAHLER ve ark. 1988; WOODRING ve ark. 1990) veya %15 (v/v) etanol çözeltisinde (BRU ve ark. 1996) hazırlandığı da dikkat çekmektedir.

Sirkede fenoliklerin tayininde de yine HPLC metodlarından yararlanılmaktadır (GARCIA PARILLA ve ark. 1994; GARCIA-PARILLA ve ark. 1996). Sirkede belirlenen asitler, gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, protokateşik asit, kafeik asit ve p-kumarik asittir. Sirkenin direkt enjeksiyonu mümkündür. Bileşiklerin tespitinde piklerin spektral davranışlarını daha iyi izleyebilmek için foto diyot dedektör tercih edilmektedir.

Fenolik asitlerin yapılarında hem karboksilik asit grubu hem de fenolik asit grubu bulunmaktadır. Bu nedenle molekül içi etkileşimler vardır. Ayrıca fenolik bileşiklerin aralarında da etkileşimler olmaktadır. Bu etkileşimler numunenin veya standard karışımın özelliklerine göre değişiklik gösterirler. Ayrıca dedektör cevabı, bir akıştan diğerine yaklaşık %20 değişebilir. Bu nedenle sadece alıkonma zamanları ve kapasite faktörleri esas alınarak pik tespiti yanlışlıklara sebep olabilir. Yapılan çalışmalarda standard çözeltilerin ekstrakte edildikten sonra mobil fazda çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmeleri durumunda belirlenen kapasite faktörleri, saf standartların direkt enjeksiyonda kullanılması durumunda elde edilen kapasite faktörlerinden biraz daha küçük bulunmaktadır. Standartları ihtiva eden çözeltinin ve şarabın hazırlandığı gün kullanılması durumunda kapasite faktörleri arasında uyum olduğu, ancak bir kaç gün beklemiş numune ve standartlarla çalışmada fenoliklerin kendi aralarındaki etkileşimler nedeniyle farklılıklar gözlendiği ifade edilmektedir (MAHLER ve ark. 1988; WOODRING ve ark. 1990). Foto diyot dedektör ile spektral özelliklerin incelenmesi veya elektrokimyasal dedektörle voltametrik davranışların irdelenmesi pik tespitinde yararlı olmaktadır.

Şarapta toplam fenol tayini Singleton ve Slinkarda ait yöntemle yapılır ve sonuç gallik asit eşdeğeri olarak verilir (SINGLETON ve ESAU, 1969). SOMERS ve ZIEMELIS (1980) SO<sub>2</sub> varlığında o-dihidroksi fenoliklerin Folin Ciocalteu reaktifi ile etkileşimlerinde sinerjistik etkinin söz konusu olduğunu ve SO<sub>2</sub>/fenolik asit oranı büyüdükçe hatanın arttığını belirtmektedirler. SO<sub>2</sub>'nin 30 ppm derişimlerinde bozucu etki yapmadığı ancak kolorimetrik tayinin toplam fenol tayini için spesifik olmadığı ve SO<sub>2</sub> yanısıra fenolik olmayan bileşiklerin de bu tayinde bozucu etki yapabileceği, bu nedenle sonuçların dikkatle yorumlanması gerektiği belirtilmektedir (SOMERS ve ZIEMELIS, 1985; SPANOS ve WROLSTAD, 1990). Yapılan kromatografik çalışmalarda elde edilen sonuçlarla toplam fenol tayininde elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar bu bozucu etkilere atfedilmektedir.

## KAYNAKLAR

- ACHILLI, G., CELLERINO, G.P. and GAMACHE, P.H, d'ERIL, G.V.M. 1993. Identification and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system. *J. Chromatogr.* 632, 111-117.
- BARONOWSKI, J.D., NAGEL, C.W. 1981. Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white Riesling wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 5-13.
- BARROSO, C.G., TORRIJOS, R.C, and PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. 1983. HPLC separation of benzoic and cinnamic acids in wines. *J. Chromatographia*, 17, 249-252.
- BARTOLEME, B., BENGEOCHA, M.L., GALVEZ, M.C., PERZ-HARBE, F.J., HERNANDEZ, T., ESTRALLA, I., GOMEZ-CORDOVES, C. 1993. Photodiode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A.*, 655, 119-122.
- BRU, E.R., BARROSO, C.G., CELA, R and PEREZ -BUSTAMANTE, J.A. 1996. Development of a rotatory and continuous liquid-liquid extraction technique for phenolic compounds in wine, *Analyst.*, 121, 297-302.
- BUIARELLI, F., CARTONI, G., COCCIOLI, F., LEVETSOVITOU, Z. 1995. Determination of phenolic acids in wine by high performance liquid chromatography with a microbore column. *J. Chromatogr. A.* 695, 229-235.
- BURTSCHER, E., BINDER, H., CONCIN, R., and BOBLETER, O. 1982. Separation of phenols, phenolic aldehydes, ketones and acids by high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 252, 167-176.
- CARTONI, G.P., COCCIOLI, F. PONTELLI, L. and QUATRUCCI, E., 1991. Separation and identification of free phenolic acids in wines by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 537, 93-99.
- CHILLA, C., GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G., PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. 1996. Automated on-line solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine. *J. Chromatogr. A.* 750, 209-214.
- EVANS, M.E. 1983. High performance liquid chromatography in enology. *J. Liq. Chromatogr.* 6, 153-178.

- GARCIA-PARILLA, C., HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. 1996. Phenols HPLC analysis by direct injection of sherry wine vinegar. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 19(2), 247-258.
- GARCIA-PARILLA, M.C., LEON CAMOCHO, M., HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. 1994. Separation and identification of phenolic acids in wine vinegar analysis by HPLC. *Food Chem.*, 50, 313-315.
- GUILLEN D.A., BARROSO, C.G., PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. 1996a. Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by high performance liquid chromatography incorporating internal standards. *J. Chromatogr. A.*, 724, 117-124.
- GUILLEN, D.A., BRU, E., BARROSO, C.G., PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. 1996b. Comparative study of sample preparation techniques for the phenolic compounds in Fino sherry wine. *Química Analítica*. 15, 58-63.
- GUILLEN, D.A., MERELLO, F., BARROSO C.G., and PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. 1997. Solid phase extraction polyphenolic compounds in Fino sherry wine. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 403-406.
- JAWORSKI, A.W., LEE, C.Y., 1987. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 257-259.
- KRAMLING, T.E., SINGLETON, V.L. 1969. An estimate of the non-flavonoid phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 20, 86-92.
- LAMUELA RAVENTOS, R.M. and WATERHOUSE A.L. 1994. A direct HPLC separation of wine phenolics. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(1), 1-5.
- LUNTE, S.M., BLANKENSHIP K.D., and READ, S.A. 1988. Detection and identification of procyanidins and flavanols in wine by dual electrode liquid chromatography-electrochemistry. *Analyst*. 113, 99-102.
- MAHLER, S., EDWARDS, P.A. and CHISHOLM, M.G. 1988. HPLC identification of phenols in Vidal blanc wine using electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem* 36, 946-951.
- NAGEL, C.W., BARONOWSKI, J.D., WULF, L.W., POWERS, J.R. 1979. The hydroxycinnamic acid tartaric acid ester content of musts and grape varieties grown in the Pacific Northwest. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 198-201.
- NAGEL, C.W. and WULF, L.W. 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 111-116.
- ONG, B.Y., NAGEL, C.W. 1978. High pressure liquid chromatographic analysis of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters and their glucose esters in *Vitis vinifera*. *J. Chromatogr.* 157, 345-355.
- OSZMIANSKI, J., LEE C.Y. 1990. Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 204-206.
- OSZMIANSKI, J., RAMOS, T., and BOURZEIX, M. 1988. Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 259-262.
- RICARDO da SILVA, J.M., ROSEC, J.P., BOURZEIX, M, and HEREDIA, N.1990. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 53, 85-92.
- ROBICHAUD, J.L. and NOBLE, A.C. 1990. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* 53, 343-353.
- ROGGERO, J.P., COEN, S., P. ARCHIER. 1990., Wine phenolics: Optimization of HPLC analysis. *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 2593-2603.
- ROGGERO, J.P., ARCHIER, P., COEN, S. 1997. Chromatography of phenolics in wine. *Wine-Nutritional and therapeutic benefits.* 661, 6-11.
- ROSTON, D.A. and KISSINGER, P.T. 1981. Identification of phenolic constituents in commercial beverages by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.* 53, 1695-1699.
- SALOGOITY-AUGUSTE, M.H. and BERTRAND, A. 1984. Wine phenolics-Analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1241-1247.
- SALOGOITY-AUGUSTE, M.H., TRICARD, C., SUDRAUD, P.1987. Dosage simultane des aldehydes aromatiques et des coumarines par chromatographie liquide haute performance. Application aux vins et eaux-de-vie vieillies et fût de chene. *J. Chromatogr.* 392, 379-387.
- SHATIRISHVILI, I. Sh. 1986. Combination of chromatographic techniques for analysing the composition of georgian alcoholic beverages. *J. Chromatogr.* 364, 183-188
- SINGLETON, V.L., TIMBIRLAKE, C.F., LEA, A.G.H. 1978. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.* 29, 403-410.
- SINGLETON, V.L and ESAU, P. 1969. Phenolic substance in grapes and wine and their significance, Academic Press. New York.
- SINGLETON, V.L., TROUSDALE, E. 1983. White wine phenolics: Varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 27-34.
- SOMERS, T.C., ZIEMELIS, G. 1980. Gross interference by sulphur dioxide in standard determinations of wine phenolics. *J. Sci. Food Agric.* 31, 600-610.
- SOMERS, T.C. and ZIEMELIS, G., 1985. Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis Vinifera*: Grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 36, 1275-1284.
- SPANOS, G.A., WROLSTAD, R.E. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thomson seedless grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1565-1571.
- SPANOS, G.A. and WROLSTAD, R.E. 1992. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage-A review. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1478-1487.
- SYMONDS, P. 1978. Application of high performance liquid chromatography to determination of some organic acids in wine. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 32, 957-968.
- TYRON, C.R., EDWARDS, P.A., CHISHOLM, M.G. 1988. Determination of the phenolic content of some French-American hybrid white wines using ultraviolet spectroscopy. *Am. J. Enol Vitic.* 39, 5-10.
- WULF, L.W, and NAGEL, C.W. 1976. Analysis of phenolic acids and flavanoids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 116, 271-279.
- WULF, L.W. and NAGEL, C.W. 1978. High performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 42-49.
- WOODRING, P.J., EDWARDS, P.A and CHISHOLM, M.G. 1990. HPLC determination of non-flavonoid phenols in Vidal blanc wine using electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* 38, 729-732.