

ÜZÜM ŞIRASI, ŞARAP VE SİRKEDE ORGANİK ASİTLERİN TAYİNLERİ İÇİN HPLC METOTLARI

HPLC METHODS FOR THE DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN GRAPE MUST, WINE AND VINEGAR

Yüksel DENLİ

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

ÖZET: Karboksilik asitlerin, şarabın biyolojik kararlılığında ve organoleptik özelliklerinde önemli etkileri vardır. Bu çalışmada üzüm şırası, şarap ve sirkede önemli organik asitlerin tayini için yüksek performans sıvı kromatografik metotlar derlenmiştir.

ABSTRACT: Carboxylic acids have an important influence on the biological stability and organoleptic properties of wines. In this paper, high performance liquid chromatographic methods for the determination of the main carboxylic acids in grape must, wine and vinegar is reviewed.

GİRİŞ

Karboksilik asitler, şıra, şarap ve sirkenin önemli bileşenleridir. Bu ürünlerdeki karboksilik asitlerin yapıları ve derişimleri, şarap kimyasında çeşitli açılardan önemlidir. Bu bileşikler, şarabın organoleptik özelliklerini etkiler ve birçok enzimatik tepkimeye ürün veya substrat olarak davranırlar. Karboksilik asitler alkol fermentasyonu ara kademelerinde ve malolaktik fermentasyonda oluşurlar. Son ürünün kararlılığını, rengini tat ve kokusunu etkilerler.

Şarapta bulunan karboksilik asitler, tartarik, malik, sitrik, laktik, asetik, sitrik, süksinik, galaktronik, glukonik, şikimik, sitramalik ve fumarik asittir. Bazı asitler, özellikle asetik ve süksinik asit, şarapta esterleri halinde bulunabilir. Tartarik, malik ve sitrik asitler, şıra ve şarabın temel asitleridir. Şıranın organik asit bileşimi ile şarabın organik asit bileşimi benzerdir. Bazı asitlerin şıra ve şaraptaki derişimleri ile ilgili veriler, Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Şıra ve Şarapta Bazı Organik Asitlerin Derişimleri İçin Belirlenen Aralıklar (TUSSEAU ve BENOIT, 1987; MARECA, 1983)

Asitler	Şıra	Şarap
Tartarik asit	2-15 g/L	1-5 g/L
Malik asit	5-20 g/L	0-10 g/L
Sitrik asit	0,2-0,5 g/L	0-0,5 g/L
L (+) -Laktik asit	-	0-5 g/L
Asetik asit	-	
Süksinik asit	-	0-1,5 g/L
Galaktronik asit		0,04-1 g/L
Glukuronik asit		0-0,6 g/L
Okzalik asit		0-60 mg/L
Şikimik asit	0-100 mg/L	0-100 mg/L
Fumarik asit	0-100 mg/L	0-100 mg/L
Formik asit	0-100 mg/L	0-100 mg/L
Pirüvik asit	0-100 mg/L	0-100 mg/L

Tartarik asit şarap asiti olarak bilinir ve şarapta asidite ayarlamalarında kullanılmasına izin verilen tek asittir. Tartarik asit üzümde hem serbest hem de potasyum bitartarat tuzu halinde bulunur. Şıra ve şarapta tartarik asit miktarı, üzüm çeşidine, üretim yılına, olgunluk derecesine ve üretim yöntemlerine göre değişiklik göstermektedir. (LAMIKANRA ve ark. 1995) Güneşi bol olan bölgelerde tartarik asit derişiminin belirgin ölçüde yüksek olduğu bilinmektedir. Asiti az olan şaraplara Avrupa Topluluğu şarap tüzüğüne göre en fazla 1,5 g/L düzeyine kadar katılmasına izin verilmektedir (YAVUZESER, 1989).

Sitrik asit üzüm şırasında çok az bulunur. Biyolojik asit azalması olarak da bilinen malolaktik fermentasyona uğrayan şaraplarda miktarı daha da azdır. Sitrik asit genelde kırmızı şaraplarda beyaz şaraplardan daha az miktarlarda bulunur. Şarap kırılmalarında etkin bileşik olan demir fosfatı kolay çözebildiği için özellikle beyaz kırılmayı maskeleyememek için kullanılmaktadır. AT şarap tüzüğüne göre şaraba en fazla 1 g/L düzeyinde katılabilir (YAVUZESER, 1989).

Asetik asit, etil alkol fermentasyonunda ara ürün asetaldehitin yükseltgenmesi ile veya dinlendirme sırasında asetik asit bakterilerinin faaliyeti sonucunda oluşur.

Laktik asit, malolaktik fermantasyonunun son ürünüdür ve genel olarak şarabın üretiminden sonraki bir kaç ay içerisinde meydana gelir. Oluşumu, metabisüfit veya kükürt dioksit ilavesi ile önlenir. Şarap orijini belirlemek açısından tayini önemli olabilir. Şarapta ayrıca iz derişimlerde dikarboksilik, hidroksi, keto ve fenolik asitler vardır.

Bazı asitler koruyucu amaçla veya asitliği ve kararlılığı kontrol için şaraba ilave edilebilir. Antioksidan olarak askorbik asit (150 mg/L) ve antiseptik olarak sorbik asit (200 mg/L) kullanılabilir. Benzoik asit ve salisilik asitin fermentasyonu önleme amacıyla kullanılmasına müsaade edilmemektedir.

Her bir asit, diğer bileşenlerin bozucu etkilerinin önlenmesi durumunda spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. Bu asitlerin tayinlerinde genellikle enzimatik yöntemlerden yararlanılmaktadır (AMERINE ve OUGH, 1980). Malik asitin NAD/NADH⁺ indikatör reaksiyon- enzimatik tayini, asetik asitin şarabın buhar destilasyonu ile elde edilen fraksiyonun asit baz titrasyonu ile tayini ve tartarik asitin amonyum vanadat ile etkileşimini esas alan Blouin Rebelein metodu ile tayini, standard metotlar olarak kullanılır. Ancak şikimik asit, fumarik asit ve sitramalik asit gibi şarabın diğer asitlerinin bazıları için standard yöntemler ve şarabın temel asiti olan tartarik asitin tayini için enzimatik bir yöntem yoktur.

Son yıllarda şıra, şarap ve sirkede karboksilik asitlerin analizlerinde yüksek performans sıvı kromatografi yönteminin yaygın bir şekilde kullanıldığı dikkat çekmektedir (MENTASTI ve ark. 1985; FRAYNE, 1986; BADOUD ve PRATZ, 1986; TUSEAU ve BENOIT, 1987; SCHNEIDER ve ark. 1987; MARCE ve ark. 1990; a,b LLORENTE ve ark. 1991; HERRERA ve ark. 1993; LOPEZ ve GOMEZ, 1996). Bu analizlerde **iyon değişim ve iyon boyut ayırma** (TURKELSON ve RICHARDS 1978; GRIFFON ve ark., 1985), **solvofobik kromatografi** (BADOUD ve PRATZ, 1986, KEEFER ve SCHUSTER, 1986, MENTASTI ve ark. 1985), **iyon çifti kromatografisi** (KEEFER ve SCHUSTER, 1986; GENNARO ve BERTOLO, 1989) ve **organik asitlerin türevlerinin ters faz sıvı kromatografisi** (COOPER ve ANDERS, 1974; MENTASTI ve ark. 1985; BADOUD ve PRATZ, 1986; MARCE ve ark, 1991a,b) olmak üzere 4 ana metot vardır. İyon değişim ve iyon boyut ayırma metodunda ayırmalar, silika esaslı iyon değiştiriciler ve stiren divinilbenzen kopolimerlerinde gerçekleştirilir. Solvofobik kromatografide mobil faza asitler veya tampon çözeltiler ilave edilerek pH düşürülür, böylece karboksilik asitlerin iyonlaşması önlenir. Bu şartlarda organik bileşen ile ters faz-durgun faz arasında hidrofobik etkileşimlerden yararlanır. İyon çifti kromatografisi, silika jel veya selülöz kaplı kolonlarda iyon çifti oluşturuca ve apolar mobil faz kullanılarak gerçekleştirilir veya polar olmayan iyon çifti oluşturuca yararlanılabilir. İyon değişim ve boyut ayırma kromatografisinde poliollerin bozucu etkilerine dikkat çekilmektedir. Bu tekniğin bir diğer dezavantajı her durum için doğrusal kalibrasyon grafiğinin elde edilememesidir (TUSSEAU ve BENOIT, 1987).

Şarap, şıra ve sirkede organik asitlerin tayininde ters faz yüksek performans sıvı kromatografi tekniği (RPHPLC), tercih edilen sıvı kromatografi tekniğidir. Analizlerde sıklıkla ultraviyole (UV) dedektörleri kullanılır (LAMIKANRA ve ark. 1995). Pik saflığının çok dalga boyu taramalı dedektör kullanılarak denetlenmesi önerilebilir. Piklerin kalitatif yorumlarında numuneye standard ilavesinden yararlanılabilir, bu ayrıca geri kazanmanın tayinin de de kullanılmaktadır (HERRERA ve ark 1993, CACCAMO ve ark. 1986 TUSSEU ve BENOIT, 1987).

Organik asitlerin RPHPLC ile tayinlerinde direkt tayinden yararlanabilir (TUSSEAU ve BENOIT, 1987). Ancak organik asitlerin sıvı kromatografi ile ayırımlarında ve tespitlerinde temel güçlük, polaritelerinin geniş bir aralığa yayılması ve türevlendirilmemiş olduklarında dedektör duyarlılığının yetersizliğidir (BUSLIG ve ark. 1982). RI dedektörler ancak izokratik koşullarda ve eluentin kırma indisi numuneninkinden daha düşük ise kullanılabilir (TENTA, 1991) (CALULL ve ark., 1992 a,b; LOPEZ ve ark. 1996). Ayrıca çözücü piki ve ilgilenilen piklerin tespitini bozacak diğer pikleri de tespit eder.

Bazı durumlarda suyun tartarik asite yakın negatif pik verdiği ve bunun da tartarik asitin kantitatif tayininde bozucu etki yapabildiği belirtilmektedir (EVANS, 1983). Ultraviyole absorpsiyonda özellikle (206-214) nm dalga boylarında çalışma eluentin absorpsiyonu nedeniyle kısıtlanabilir. Ayrıca kısa dalga boylarında absorpsiyon yapan diğer şarap bileşenleri, asitlerin kromatogramının arka tarafında geniş pikler halinde elue olurlar, bu ise ikinci numunenin enjeksiyonunun gecikmesine sebep olur (EVANS, 1983).

Organik asitlerin tespitindeki bu güçlükler, türev hazırlayarak giderilir (MENTASTI ve ark. 1985; BADOUD ve PRATZ 1986; MARCE ve ark. 1990a,b; STEINER ve ark. 1984, CACCAMO ve ark. 1986). Karboksilik asitlerin ters faz sıvı kromatografi ile ayrılmasında fenaçil (MENTASTI ve ark. 1985; MARCE ve ark. 1990; MARCE ve ark. 1991; CACAMO ve ark. 1986), naftaçil (COOPER ve ANDERS, 1974), p-nitrofenil (GRUSHKA ve ark. 1975) ve p-nitrobenzil (BADOUD ve PRATZ, 1986; STEINER ve ark. 1984) esterlerinden yararlanılır. Türevlerin UV absorbans özellikleri tayinler için yeterlidir ancak istenen türev yanısıra istenmeyen ikincil ürünlerin oluşması veya reaktiflerdeki safsızlıkların bozucu etkileri de vardır. Bazı türevlerin hiç bir işlem gerektirmeden HPLC sistemine enjekte edilebileceği belirtilmektedir. (MENTASTI ve ark. 1985). Bazılarında ise türevlendirici fazlasının uzaklaştırılmasına ve bir temizleme işleminin özellikle HPLC kolonunun korunması için gerektiğine dikkat çekilmektedir (BADOUD ve PRATZ, 1986). Türevlerin ayrımalarında genellikle gradient koşulda çalışılır (MARCE ve ark. 1990b; BADOUD ve PRATZ, 1986). Fenaçil türevlerinin izokratik olarak da ayrılabilirliği belirtilmektedir (MARCE ve ark. 1991b).

Türev çalışmalarının bazılarında iç standard kullanımı da dikkat çekmektedir. BADOUD ve PRATZ (1986), p-nitrobenzil esterlerinden yararlandıkları çalışmada benzil malonik asiti, CACCOMO ve ark. (1986), fenaçil esterlerinden yararlandıkları çalışmada metil malonik asiti iç standard olarak kullanmışlardır.

Organik asitlerin ayrılmaları ve kantitatif tayinleri yapı benzerlikleri ve spektral özelliklerinde farklılık olmaması sebebiyle son derece zordur (KEEFER ve SCHUSTER, 1986). Ayrıca şaraplarda bulunan organik asitlerin çoğunun pKa değerleri birbirine son derece yakındır ve bu durum kromatografik ayırmada pH'dan yararlanmayı kısıtlamaktadır.

Organik asitlerin ayrılmaları ve kantitatif tayinleri yapı benzerlikleri ve spektral özelliklerinde farklılık olmaması sebebiyle son derece zordur (KEEFER ve SCHUSTER, 1986). Ayrıca şaraplarda bulunan organik asitlerin çoğunun pKa değerleri birbirine son derece yakındır ve birinin fazla bulunması durumunda kantitatif ayırma güç olmaktadır. Ayrıca bazı bileşiklerin zamanla bozunması da kantitatif tayinde bir sorun yaratmaktadır. Askorbik asitin, çözeltinin 48 saat beklemesi durumunda tesbit edilemediği açıklanmaktadır. Asetik asitin uçuculuğunun da kantitatif tayinde hatalara sebep olabildiğini belirtmektedirler. Bazı asitlerin birbirlerine göre bağlı miktarlarının da kantitatif tayinde üzerinde durulması gereken bir husus olduğuna dikkat çekilmektedir. Künik asitin, tartarik asite oranının önemli olduğu ve tartarik asit/künik oranı 4:1 olduğunda tayinde hatalar olduğu açıklanmaktadır. Glükoz ve früktozun bozucu etkileri de dikkatle incelenmiştir. Glükoz ve früktoz, şıranın temel monosakkaritleridir. Glükozun 0,5 g/L'lik ve früktozun 80 g/L'lik çözeltisi, bozucu etkinin incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır (LLORENTE ve ark. 1991). Glukoronik asitin, standardlarla yapılan çalışmada kantitatif yorumunun yapılabildiği, numune çalışmasında ise bu asitin glükoz ve früktoz ile birlikte elue olduğu, bu nedenle kantitatif yorumunun yapılamadığı da belirtilmektedir. RPHPLC yönteminin uygulandığı çalışmalarda tartarik asitin, glukonik ve galaktronik asitlerden ve diğer polar bileşiklerden ayırımının pH, 2,4'den küçük olduğunda daha iyi olduğunu; ayrıca süksinik, sitramalik ve fumarik asitlerin birbirinden ayrılmalarındaki problemin elue ediciye az miktarda organik çözücü ilave edilerek giderilebileceği belirtilmektedir.

Metodun seçiminde analiz edilecek asitlerin yapısı (uçucu, aromatik, polifonksiyonel) ve asitlerin numunedeki derişimleri yanısıra matriks etki de önemlidir.

Organik asitlerin ayrılmalarında sıklıkla yararlanılan kolonlar C 8 veya C18'dir. Kolon 2 veya 3'lü olarak kullanılarak etkin tabaka sayısı artırılabilir (GARCIA ve ark. 1993; TUSSEU ve BENOIT, 1987). Ancak bu durumda bile kromatogramın belli noktalarında ayırma zorlukları vardır. Özellikle kırmızı şaraplardaki analizlerde ayırma zorlukları tamamen aşılamamıştır. Organik asitlerin iyonlaşmalarını önlemek için mobil faz pH'sının 2'lere kadar çekilmesi kullanılan kolonların ömrünü etkilemektedir.

Organik asitlerin sıvı kromatografik ayrımalarında elue edici olarak genellikle organik asitlerin iyonlaşması önlenerek şekilde pH ayarı yapılmış çözücüler kullanılır (HERRERA ve ark. 1993). Fosfat tamponlarının kullanıldığı çalışmalar da vardır (TUSSEAU ve BENOIT, 1987).

Kalibrasyon grafikleri numune derişimlerine uygun aralıkları kapsayacak şekilde hazırlanmış standartlarla gerçekleştirilir (HERRERA ve ark. 1993). Bazı çalışmalarda, standard karışımların hazırlanmasında şarap ortamına benzetebilmek için standartlar şaraptaki etanol yüzdesinde hazırlanabilir. Bu amaçla asitlerin %13 (v/v) etanolde hazırlanarak kullanıldığı dikkat çekmektedir (HERRERA ve ark. 1993).

Analizlerde şıra, şarap veya sirkenin direkt enjeksiyonu kullanılabilir (FRAYNE, 1986; TUSSEAU ve BENOIT, 1987). Organik asitlerin tespitlerinde sıklıkla UV dedektörden yararlanılır. Organik asitlerin UV dedektör ile tespitinde problem, fenoliklerin, acılık veren maddelerin ve früktozun 210 nm'deki absorpsiyonlarıdır. Bazı çalışmalarda früktozun malik asitle birlikte elue olması problem yaratmaktadır, özellikle tatlı şaraplar ve şıradaki bu duruma dikkat çekilmektedir. Bu problem, kolonun veya kromatografik koşulların değiştirilmesi ile giderilemez. Şıra, şarap ve sirke organik asitlerin tayinlerinde bozucu etkileri nedeniyle şekerleri ve polialkollerini ayırmak gerekir. Bu amaçla kuarterner amin kartuş veya C 18 kartuşlardan (HERRERA ve ark. 1993) yararlanılır. Sep Pak C18 kartuş, öncelikle metanol veya etanol ile aktif hale getirilir, su ile yıkanır ve süzölmüş numune kartuşa uygulanır. Kartuşta alıkonan asitler, fosforik asitle elue edilir. Bu koşullarda polifenoller ve antosiyaninler, kartuşta kalırlar. Bu işlem numunenin seyrelmesine sebep olur, seyrelmeyi istenen düzeyde tutmak son derece önemlidir (GARCIA ve ark. 1993. VERETTE, ve ark. (1995), çalışmalarında dializ ünitesini bozucuların eliminasyonu için kullanmışlardır. Mobil faz pH'sının ayarlanması ile malik asitin früktozdan ayrılmasının mümkün olduğu da belirtilmektedir (SCHNEIDER ve ark. 1987).

HPLC yönteminin verileri ile malik asit, laktik asit, asetik asit ve sitrik asitin enzimatik yöntemlerle elde edilen sonuçları arasında uyum olduğu, ancak tartarik asitin Bloin-Rebelein metodunun daha yüksek sonuç (0,2-1,0 g/L) verdiği belirtilmektedir (TUSSEAU ve BENOIT, 1987). Bu durum, vanadatın maleik asit, gliserin ve karbonhidratla etkileşimine bağlanmaktadır (MENTASTI ve ark. 1985). Organik asitlerin HPLC ile tayininde tayin sınırı olarak 200 mg/L verilmektedir (TUSSEAU ve BENOIT, 1987). Ayrıca tartarik asit ve malik asit tayininde numunenin seyreltilerek verilmesinin uygunluğu, aksi takdirde kolon yüklemesinin aşıldığı bunun da geri kazanma yüzdesini düşürdüğü belirtilmektedir (BISSEL ve ark. 1989).

KAYNAKLAR

- AMERINE, M.A. and OUGH, C.S. 1980. Methods for analysis of musts and wines. Wiley, New York.
- BADOUD R., PRATZ G. 1986. Improved high performance liquid chromatographic analysis of some carboxylic acids in food and beverages as their p-nitrobenzyl esters. J. Chromatogr. 360, 119-136.
- BISSELL, P., EWART, A. SANGTIPPAWAN, W. 1989. Loading concentrations for tartaric and malic acid for single column HPLC organic acid analysis. Am. J. Enol. Vitic. 40(4), 316-319.
- BUSLIG, B.S., WILSON, C.W. and SHAW, P.E. 1982. High performance liquid chromatographic separation of carboxylic acids with anion exchange and reversed phase columns, J. Food Chem. 30, 342-345.
- CACCAMO, F., CARFAGNINI, G., CORCIA, A-di, SAMPERI, R. 1986. Improved high performance liquid chromatographic assay for determining organic acids in wines. J. Chromatogr. 362, 47-53.
- CALULL, M., MARCE, R.M. BORRULL, F. 1992 (a). Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape musts by ion exchange high performance liquid chromatography with refractive index detection. J. Chromatogr. 590, 215-222.
- CACULL, M., LOPEZ, E., MARCE, R.M., OLUCHA, J.C., BORRULL, F. 1992 (b). Optimization of an ion exchange high performance liquid chromatographic method for the determination of carboxylic acids, sugars glycerols and ethanol in wines. J. Chromatogr. 589, 151-158.
- COPPER, M.J. and ANDERS, M.W. 1974. Anal. Chem. 46, 1849-1852.
- EVANS, M.E. 1983. High performance liquid chromatography in enology J. Liq. Chromatogr. 6, 153-178.
- FRAYNE, R.F. 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. Am. J. Enol. Vitic. 37, 281-287.
- GARCIA ROMERO, E., SANCHEZ MUNOZ, G. MARTIN ALVAREZ, P.J., CABEZUDO IBANEZ. M.D. 1993. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high performance liquid chromatography. Chromatogr. A. 655, 111-117.
- GENNARO, M.C., BERTOLO, P.L. 1989. Determination of the principal anionic components in wines and soft drinks, by ion interaction reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 472, 433-440.
- GRIFFON, J.P., BLACHERE, A. REMINIAC, C. 1985. Dosage des acides organiques du vin par chromatographie en phase liquide. Analusis. 13, 218-225.
- HERRERA, M.O., GARCIA, H.L., MIR, M.V., MARTINEZ, M.C.L. 1993. Determination by high performance liquid chromatography of organic acids in spanish rose wines from the Alpujarra-Contraviesa Region of Granada. J.Liq. Chromatogr. 16, 3101-3112.

- KEEFER, J.F., SCHUSTER, S.M. 1986. Separation of citric acid cycle intermediates by high performance liquid chromatography with ion-pairing. *J. Chromatogr.* 383, 297-305.
- LAMIKANRA, O., INYANG I.D., LEONG, S. 1995. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 43, 3026-3028.
- LLORENTE, M., VILLARROYA, A.B., GOMEZ-CORDOVES, C. 1991. Reverse-phase HPLC of organic acids in musts. *Chromatographia.* 32, 555-558.
- LOPEZ, E.F., GOMEZ, E.F. 1996. Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *J. Chromatogr. Sci.* 34, 254-257.
- LOPEZ, T.E., PUIG-DEV, M.A., TEIXEIRA, E., BUXADERAS, S. 1996. Organic acids, sugars and glycerol content in white wine making products determined by HPLC. Relationship to climate and variatal factors. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(2), 193-198.
- MARECA CORTES, I. 1983. Origen, composicion y evolucion del vino. Editorial Alhambra. Madrid.
- MARCE, R.M., CALULL, M., MANCHOBAR, R.M., BORRULLF., RIUS, F.X. 1990(a). An optimized direct method for the determination of carboxylic acids in beverages by HPLC. *Chromatographia*, 28, 54-58.
- MARCE, R.M., CALULL, M., BORRULL, F., RIUS, F.X. 1990(b). Determination of major carboxylic acids in wine by an optimized HPLC method wiht linear gradient elution. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4) 289-294.
- MARCE, R.M., CALULL, M., OLUCHA, J.C., BORRULL, F., RIUS, F.X. 1991(a). Optimization of the derivatization method for the liquid chromatographic determination of carboxylic acids in beverages by HPLC. *Anal. Chim. Acta*, 242, 25-30.
- MARCE, R.M., CALULL, M., OLUCHA, J.C., BORRULL, F., RIUS, F.X. 1991(b). Optimized isocratic separation of major carboxylic acids in wine. *J. Chromatogr.* 542, 277-293.
- MENTASTI, E., GENNARO, M.C., SARZANINI, C., BAIOCCHI, C; SAVIGLIANO, M., 1985. Derivatization, identification and separation of carboxylic acids in wines and beverages by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 322, 177-189.
- SCHNEIDER, A., GERBI, V., and REDOGLIA, M. 1987. A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, (2), 151-155.
- STEINER, W., MUELLER, E., FROFEHLICH, D. and BATTAGLIA, R. 1984. HPLC Analysis of carboxylic acids as p-nitrobenzyl esters in fruit juices and wine. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 75(1), 37-50.
- TENTA, S. 1991. Method for simultaneous HPLC determination of organic acids, glucose, fructose, glycerine and ethanol in musts and wines. *Enotesnico*, 27(10), 81-87.
- TURKELSON, V.T., RICHARDS, M. 1978. Separation of the citric acid cycle acids by liquid chromatography. *Anal. Chem.* 50, 1420-1423.
- TUSSEAU, D., and BENOIT, C. 1987. Routine high performance liquid chromatographic determination of carboxylic acids in wines and champagne. *J. Chromatogr.* 395, 323-333.
- VERETTE, E., QIAN, F., MANGANI, F. 1995. On line dialysis with high performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *J. Chromatogr. A.* 705, 195-203.
- YAVUZESER, A. 1989. Şaraplarda Kimyasal ve Analitik Yöntemler ve Şarap İşletmeleri Denetimi, Tekel Enstitüleri Yayınları, Yayın No: 33.