



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**ORGANİK ASİTLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE AYIRIMI VE UV-GÖRÜNÜR
SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ**

Doktora Tezi

Nada SİDDİK

Danışman
Prof. Dr. Adem ASAN

SAMSUN

2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**



**ORGANİK ASİTLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE AYIRIMI VE UV-GÖRÜNÜR
SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ**

Doktora Tezi

Nada SİDDİK

Danışman
Prof. Dr. Adem ASAN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.20.008 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN

2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Nada SIDDİK tarafından, Prof. Dr. Adem ASAN danışmanlığında hazırlanan “ORGANİK ASİTLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE AYIRIMI VE UV-GÖRÜNÜR SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 4.1.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Hasan CESUR Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fak. Kimya Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Hasan Temiz Ondokuz Mayıs Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Müh. Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Adem Asan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fak. Kimya Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Mehmet Aslanoğlu Harran Üniversitesi Fen Ed. Fak. Kimya Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğrt Üyesi Bediha Akmeşe Hitit Üniversitesi Sağlık Hiz. MYO Eczane Hizmetleri Bölümü	☐ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

08 /11 / 2023
Nada Sıddık

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: ORGANİK ASİTLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE AYIRIMI VE UV-GÖRÜNÜR SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 08/11/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 18

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

08 /11/ 2023
Prof. Dr. Adem ASAN

ÖZET

ORGANİK ASİTLERİN YÜKSEK BASINÇ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE AYIRIMI VE UV-GÖRÜNÜR SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ

Nada SIDDIK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Doktora, Kasım/2023

Danışman: Prof. Dr. Adem ASAN

Gıda ve içecek endüstrisindeki organik asitlerin dikkatli bir şekilde izlenmesi ve analizi, endüstrinin sıkı kalite kontrol önlemleri almasını, düzenleyici standartlara uyum sağlamasına ve tüketicilerin güvenli, orijinal ve yüksek kaliteli gıda ve içecek taleplerini karşılamasına imkân tanınmaktadır. Bu çalışmada, meyve sularındaki ana organik asitlerin (sitrik, malik, tartarik ve süksinik asitler) ters fazlı HPLC-UV tayini için basit ve etkili bir tek adımlı kolon öncesi türevlendirme yöntemi geliştirilmiştir. Organik asitler genel olarak zayıf spektral özelliklere sahiptirler. Bu nedenle, bu maddelerin UV-Gör. detektör kullanılarak doğrudan tayin edilmeleri zordur. Geliştirilen tayin yöntemi, söz konusu bu organik asitlerin, N,N'-diizopropilkarbodiimidin varlığında 1-naftilamin reaktifi kullanılarak amid türevlerine dönüştürülmesi, ters-faz HPLC kolonda ayırımlarının sağlanması ve detektör olarak UV spektrofotometrenin kullanılmasıyla meyve suyu numunelerinde analiz edilmeleri aşamalarını içermektedir.

AQ-C18 ayırım kolonunun kullanıldığı ters-faz HPLC analizi için hareketli faz olarak Asetonitril (ACN): Metanol (MeOH): Tetrahidrofuran (THF): Su (37:4:1:58 v/v) karışımı kullanılmış ve akış hızı 2,0 mL/dk değerine ayarlanmıştır. Amid türevlerine dönüştürülen organik asitlerin, oda sıcaklığında 22 dakika içinde ayırımları mükemmel bir şekilde sağlanmış ve UV Spektrofotometrede 222 nm dalga boyunda ölçümler alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir.

Organik asitlerin gözlenebilme sınırları; sitrik asit için 0,69 µg/mL, tartarik asit için 0,18 µg/mL, malik asit için 0,48 µg/mL ve süksinik asit için 0,14 µg/mL olarak bulunmuştu. Herhangi bir ekstraksiyon basamağı içermeyen geliştirilen yöntem, yaygın bir şekilde tüketilen üç farklı meyve suyu örneğine başarı ile uygulandı.

Organik asit türevlerinin 1 mL portakal suyunda numunesinden geri alınabilirliği % 88,97-92,52, bağıl standart sapma ile % 2,95-4,56 düzeyinde, 1 mL elma suyunda numunesinden geri alınabilirliği % 85,46-93,14, bağıl standart sapma ile % 2,98-4,55 düzeyinde, 1 mL karışık meyve suyu numunesinden geri alınabilirliği ise % 85,71-89,15, bağıl standart sapma ile % 2,99-4,55 düzeylerinde olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Organik asitler, 1-Naftilamin, N,N'-diizopropilkarbodiimid, HPLC/UV, Meyve suyu.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS BY USING HPLC WITH UV-VISIBLE DETECTION

Nada SIDDIK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Ph.D., November/2023

Supervisor: Prof. Dr. Adem ASAN

Careful monitoring and analysis of organic acids in the food and beverage industry is very important to enable the industry to implement stringent quality control measures, comply with regulatory standards and meet consumers' demands for safe, authentic and high-quality food and beverages. In this study, a simple and effective one-step pre-column derivatization method for reversed-phase HPLC-UV determination of the major organic acids (citric, malic, tartaric, and succinic acids) in fruit juices has been developed. Organic acids generally have poor spectral properties, which make their direct determination by HPLC-UV very difficult. Therefore, targeted organic acids have been derivatized using 1-naphthylamine in the presence of N,N'-diisopropylcarbodiimide as a coupling agent.

The resulting organic acid amide derivatives were successfully separated on an AQ-C18 reserve phase column with isocratic elution using mobile phase with the composition (37 acetonitrile: 4 methanol: 1 tetrahydrofuran: 58 water) at a flow rate of 2.0 mL/min. A sufficient separation of organic acid derivatives was achieved within 22 minutes at room temperature and they were detected by a UV detector at 222 nm.

Detection limits were 0.69 µg/mL, 0.18 µg/mL, 0.48 µg/mL, and 0.14 µg/mL for citric acid, tartaric acid, malic acid, and succinic acid, respectively. The developed method was successfully applied to three different widely consumed fruit juice samples without the need for any extraction procedures.

Recoveries of organic acid derivatives from the sample of 1 mL of orange juice were 88.97–92.52 %, with relative standard deviations between 2.95 % and 4.56 %; for the sample of 1 mL of apple juice, recoveries were 85.46 %–93.14 %, with relative standard deviations of 2.98–4.55 %; and recoveries for the 1 mL mixed fruit juice sample were 85.71–89.15 %, with 2.99–4.55 % relative standard deviations.

Keywords: Organic acids, 1-Naphthylamine, N,N'-diisopropylcarbodiimide, HPLC/UV, Fruit juice.

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her türlü destek ve imkânı sağlayan, değerli bilgi ve önerilerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Adem ASAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmalarım boyunca tez izleme komitesinde yer alan ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Hasan TEMİZ ve Prof. Dr. Hasan CESUR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Halil KUTUK'a teşekkür ederim.

Doktora deneysel çalışmalarım için ortam sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kimya Bölümü Başkanı Prof. Dr. Necati MENEK'e teşekkür ederim.

Beni yetiştiren ve bu noktaya gelmemde büyük emeği olan annem Ayşe LABENİ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen ve her zaman yanımda duran abim Abdullah SIDDIK'a teşekkür ederim.

Nada SIDDIK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Organik Asitlerin Önemi ve Kullanım Alanları	3
2.2. Gıda Sanayinde Organik Asitlerin Önemi ve İşlevleri	3
2.2.1. pH Kontrolü	4
2.2.2. Lezzet Düzenleme	5
2.2.3. Mikrobiyal İnhibisyon	5
2.2.4. Şelatlaşma	6
2.3. Meyve Sularında Organik Asitler	6
2.3.1. Sitrik Asit	7
2.3.2. Malik Asit	11
2.3.3. Tartarik Asit	14
2.3.4. Süksinik Asit	18
2.4. Birleştirme Tepkimeleri (Coupling Reactions)	21
2.4.1. Birleştirme Ajanları	22
2.4.2. Karbodiimidler	23
2.4.3. N,N'-Diizopropilkarbodiimid	25
2.4.4.1-Naftilamin	25
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	26
2.5.1. Kromatografide Temel Kavramlar	27
2.5.2. HPLC Cihazının Yapısı ve Kısımları	30
2.5.3. UV Dedektörler	34
2.6. Kaynak Özetleri	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
3.2. Kullanılan Cihazlar	51
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması	52
3.4. Deneysel Çalışmalar	53
3.4.1. Organik Asitlerinin UV Spektrumları	53
3.4.2. Organik Asitlerin Türevlendirme Çalışmaları	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1. Optimizasyon Çalışmaları	59
4.1.1. Türevlendirme Tepkimesine Çözücünün Etkisi	59
4.1.2. Türevlendirme Tepkimesine pH'ın Etkisi	60
4.1.3. Türevlendirme Tepkimesine Sıcaklığın Etkisi:	60
4.1.4. Türevlendirme Tepkimesine Zaman Etkisi	61
4.1.5. Türevlendirme Tepkimesine Naftilamin Derişiminin Etkisi	62
4.1.6. Organik Asit Amid Türevlerinin IR Spektrometri Sonuçları	63
4.2. Kromatografik Çalışmalar	65
4.2.1. En Uygun Hareketli Fazın Belirlenmesi	65
4.2.2. En Uygun Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	66
4.2.3. En Uygun Akış Hızının Belirlenmesi	66
4.2.4. Kullanılan Hacim	66

4.2.5.Organik Asitlerin Amid Türevlerinin Tek Tek Kromatogramları	67
4.2.6.Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri	69
4.3.Uygulamalar	73
5. SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR	81
ÖZ GEÇMİŞ.....	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: Absorbans
α	: Seçicilik
b	: Spektrofotometrik Cihazın Cm Cinsinden Hücre Uzunluğu
c	: Mol/Litre Cinsinden Numune Derişimi
ϵ	: Molar Absorptivite Katsayısı
H	: Plaka Yüksekliği
k	: Alıkonma Faktörü
L	: Kolon Dolgusunun Uzunluğu
N	: Plaka Sayısı
R_s	: Ayırma Gücü
t_R	: Alıkonma Zamanı
t_0	:Ölü Zamanı
$W_{1/2}$	: Pik Yüksekliğinin Yarisındaki Pik Genişliği

Kısaltmalar

ACN	: Asetonitril
CA	: Sitrik Aisd
DIC	: N,N'-diizopropilkarbodiimid
EtOH	: Etil Alkol
FTIR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Komatografisi
LC	: Sıvı Kromatografisi
MA	: Malik Aisd
MeOH	: Metil Alkol
NA	: 1-Naftilamin
RP- HPLC	: Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Komatografisi
SA	: Süksinik Asid
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
TA:	: Tartarik asid
THF	: tetrahidrofuran
UV-Gör.	: Ultraviyole ve Görünür Işık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Organik asitlerin sentezi için bazı kimyasal tepkimeleri	3
Şekil 2.2. Sitrik asidin yapısı	8
Şekil 2.3. Malik asidin yapısı.....	11
Şekil 2.4. Malik asit sentezinin tepkimeleri	12
Şekil 2.5. Malik asidin bazı sağlık yararları.....	13
Şekil 2.6. Tartarik asidin yapısı	15
Şekil 2.7. Tartarik asidin stereoizomeri	15
Şekil 2.8. Süksinik asidin yapısı	18
Şekil 2.9. Genel amidleşme tepkimesi	22
Şekil 2.10. Karbodiimidin üç temel rezonans yapısı.....	23
Şekil 2.11. Karbodiimidlerin varlığında amidleşme tepkimesinin mekanizması	24
Şekil 2.12. N,N'-disübstitüe tiyoürelerin kükürt giderme yoluyla karbodiimidlerin sentezi .	24
Şekil 2.13. N,N'-disübstitüe ürenin dehidre edilmesiyle karbodiimid sentez tepkimesi	24
Şekil 2.14. İzosiyanatların katalitik dönüşümü yoluyla karbodiimid sentez tepkimesi	25
Şekil 2.15. N,N'-Diizopropilkarbodiimid yapısı	25
Şekil 2.16. α -Naftilamin yapısı	26
Şekil 2.17. Alıkonma zamanı gösteren tipik bir kromatogram. t_0 : ölü zamanı, t_R : maddenin alıkonma zamanı.....	28
Şekil 2.18. Tipik bir HPLC cihazı.....	30
Şekil 2.19. HPLC'de UV- Gör dedektörü için Z şeklindeki tipik bir akış hücresidir.....	35
Şekil 2.20. UV-Gör. Spektrofotometrelerin cihaz genel tasarımı; a) Sabit çift ışınlı cihaz; b) Zamanlamalı çift-ışınlı cihaz.....	36
Şekil 3.1. 1×10^{-3} M Sitrik asit çözeltisinin UV spektrumu	53
Şekil 3.2. 1×10^{-3} M Malik asit çözeltisinin UV spektrumu.....	54
Şekil 3.3. 1×10^{-3} M Tartarik asit çözeltisinin UV spektrumu	54
Şekil 3.4. 1×10^{-3} M Süksinik asit çözeltisinin UV spektrumu	54
Şekil 3.5. DIC varlığında ve su ortamında, organik asitler ile aminler arasında meydana gelen tepkime.....	56
Şekil 3.6. Organik asitleri temsil eden TA ile başlangıç reaktiflerin ve tartarik asit amid türevinin UV-Gör. spektrumları. A:1-naftilamin (NA), N,N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) ve tartarik asit (TA) (5×10^{-4} M); B: tartarik asit amid türevi (10^{-5} M).	57
Şekil 3.7. Organik asit amid türevleri: MA, malik asit; CA, sitrik asit; TA, tartarik asit;SA, süksinik asit	58
Şekil 4.1. Tartarik asidin türevlendirme tepkimesine etanolün etkisi	59
Şekil 4.2. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine pH'nın etkisi	60
Şekil 4.3. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine sıcaklığın etkisi.....	61
Şekil 4.4. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine zamanın etkisi.....	62

Şekil 4.5. NA derişiminin türevlendirme tepkimesinin verimi üzerindeki etkisi.....	63
Şekil 4.6. Sitrik asit amid türevinin FTIR spektrumu.	64
Şekil 4.7. Malik asit amid türevinin FTIR spektrumu.	64
Şekil 4.8. Tartarik asit amid türevinin FTIR spektrumu.	65
Şekil 4.9. Süksinik asit amid türevinin FTIR spektrumu.	65
Şekil 4.10. Organik asitlerin amid türevlerinin standart kromatogramı; (1) tartarik asit (0,30 µg); (2) malik asit (0,27 µg); (3) süksinik asit (0,24 µg); (4) sitrik asit (0,38 µg). (Kromatografik şartlar; kolon: AQ C18 ters-faz ayırım kolonu; hareketli faz: 37 ACN: 4 MeOH: 1 THF: 58 H ₂ O (v/v); akış hızı: 2,0 mL/dk; sıcaklık: 25 °C; otomasyon enjeksiyon hacmi 20 µL)	69
Şekil 4.11. Portakal suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit, (4) sitrik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir).....	75
Şekil 4.12. Elma suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir)	75
Şekil 4.13. Karışık meyve suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit, (3) süksinik asit, (4) sitrik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir) ...	76

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Çeşitli organik asitlerin bazı fiziksel özellikleri	7
Tablo 2.2. Katkı madde olarak kullanılan asitlerin bazı işlevselliğini ve özelliklerini (Saltmarsh, 2020)	21
Tablo 2.3. Yaygın HPLC Dedektörlerin performansları (Skoog vd., 2018).....	34
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan organik asitler veya organik asitlerin tuzları.....	52
Tablo 3.2. Gerçek numune uygulamasında kullanılan meyve sularının son kullanma tarihleri	53
Tablo 4.1. Organik asitlerin amid türevlerinin ters-faz HPLC ayırma için belirlenen optimum şartlar.....	67
Tablo 4.2. Organik asitlerin amid türevlerinin alıkonma zamanları, alıkonma zamanlarının yüzde bağlı standart sapması ve pik alanlarının yüzde bağlı standart sapması (n=3).	68
Tablo 4.3. Organik asitlerin amid türevinin ayırımında gün içi ve günler arası elde edilen kesinlik değerleri (n=6)	70
Tablo 4.4. Organik asitlerin amid türevinin ayırımında gün içi ve günler arası elde edilen kesinlik değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n=6)	71
Tablo 4.5. Organik asitlerin amid türevlerinin ters-faz HPLC-UV detektör ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n=3).....	71
Tablo 4.6. Portakal suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3).....	72
Tablo 4.7. Elma suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3).....	73
Tablo 4.8. Karışık meyve suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3).....	73
Tablo 4.9. Meyve suyu numunelerinden hesaplanan organik asit miktarları ⁽¹⁾	77

1. GİRİŞ

Gıda Sanayi, temel günlük yiyecek ve içeceklerden üst düzey lüks olanlara kadar her şeyi kapsayan geniş bir endüstridir. Tüm dünyada insan yaşamının sürdürülmesinde ve zenginleştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Değişen tüketici tercihleri, beslenme alışkanlıkları, sağlık kaygıları ve kültürel gelenekler gibi çeşitli faktörler tarafından yönlendirilmektedir. Yiyecek ve içecek endüstrisinin önemi, her yaştan insana beslenme, keyif ve uygun ürünler sağlayabilmesinde yatmaktadır. Bu endüstri, yönelimler, küreselleşme, artan şehirleşme ve teknolojiadaki gelişmeler nedeniyle sürekli olarak önemli değişikliklere uğramaktadır.

Bu geniş sektör içerisinde meyve suyu sektörü de ayrı bir önem taşımaktadır. Özellikle meyve suları, sağlık açısından pek çok fayda sağlayarak temel vitaminler, mineraller, antioksidanlar ve anti-inflamatuar maddeleri ferahlatıcı ve lezzetli bir şekilde sunmaktadır. Sağlık bilincinin artmasıyla, meyve suları gibi doğal ve besleyici içeceklerin talebi artmış, bu da endüstride yenilikleri tetiklemiştir. Ayrıca meyve suyu sektörü, çeşitli meyveler için talep oluşturarak ve sürdürülebilir tarım uygulamalarını teşvik ederek tarım ekonomilerini de desteklemektedir. Meyve suları dünya çapında çok yönlü bir ürün olarak takdir edilmektedir. Ancak, meyve sularının bozulabilir doğası, üretim ve muhafaza ile ilgili önemli zorluklar beraberinde getirmektedir.

Birkaç faktör arasında, gıda ve içecek endüstrisindeki organik asitlerin izlenmesi, ürün kalitesi, güvenliği ve tüketici memnuniyeti üzerindeki sayısız etkisi nedeniyle son derece önem arz etmektedir. Sitrik, malik, tartarik ve asetik asitler gibi organik asitler, yiyecek ve içecek ürünlerinin aromasının arttırılmasında, asitliğin düzenlenmesinde ve korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Üreticiler, bu organik asitlerin seviyelerini dikkatlice izleyerek tutarlı tat profilleri sağlayabilir, üretim süreçlerini optimize edebilir ve ürünlerinin raf ömrünü uzatabilmektedir. Ayrıca, organik asitlerin varlığı özellikle doğal meyve suları ve fermante içecekler gibi belirli ürünlerin tazeliğini ve otantikliğini gösterebilmektedir. Öte yandan, organik asit normal seviyesini aştığında ürün bozulması veya fermantasyon sorunlarına işaret edebilmektedir. Organik asitlerin dikkatli bir şekilde izlenmesi ve analizi, endüstrinin sıkı kalite kontrol önlemleri almasını, düzenleyici standartlara uyum sağlamasına ve tüketicilerin güvenli, orijinal ve yüksek kaliteli gıda ve içecek taleplerini karşılamasına imkân tanınmaktadır. Ayrıca, sağlık ve sürdürülebilirliği göz önünde bulundurarak

gelişen tüketici tercihlerine hitap eden yeni ürünler oluşturmak ve yenilik yapmak için araştırma ve geliştirme çabalarına yardımcı olmaktadır.

Gıda endüstrisinin kalite kontrolünde ve geliştiriminde çok önemli etkilere sahip olan organik asitlerin tayini için spektroskopi, voltametri, kapiler elektroforez, gaz kromatografi, iyon değişirme kromatografi ve HPLC yöntemleri gibi birçok analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu bilgiler ışığında hedeflenen çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılarak organik asitlerin tayini amaçlanmıştır. Bu yöntem, diğer analitik yöntemlere göre; ayırma üstünlüğü sağlamakta, çoklu örnek analizlerini mümkün kılmakta, düşük maliyetle uygulanabilmekte ve gözlenebilme sınırında avantajlar sunmaktadır.

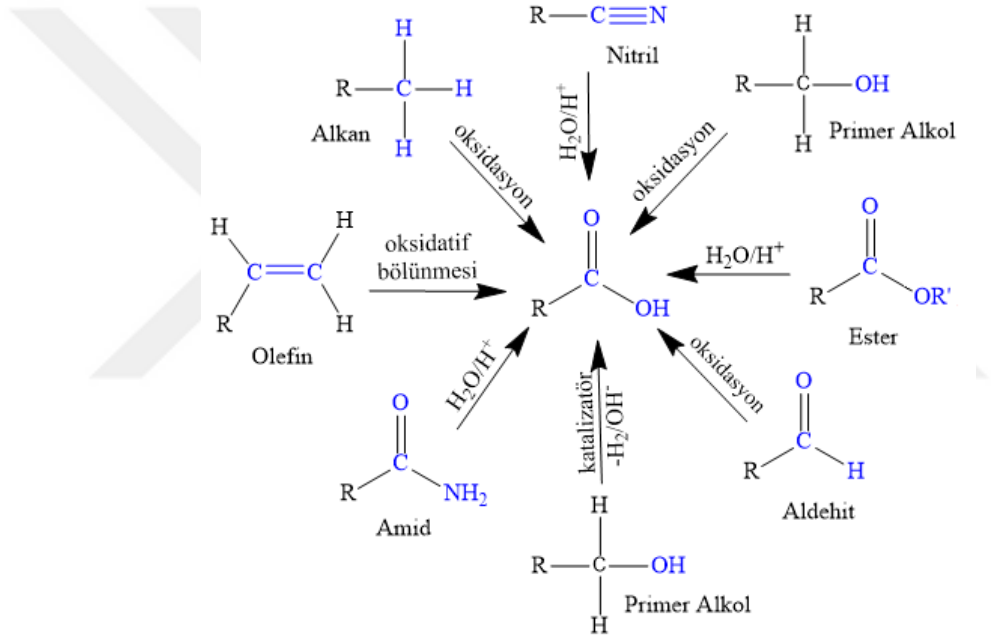
Organik asitlerin UV-görünür spektrofotometrik absorpsiyon şiddetlerinin çok düşük olması ve benzer yapılara aynı zamanda benzer spektral özelliklere sahip olması nedeniyle bunların doğrudan tayinleri çok zordur. Bu nedenle, söz konusu organik asitleri türevlendirilerek yüksek basınç sıvı kromatografisi ile bu türevlerin ters-faz kromatografi kolonu kullanılarak ayırımlarının sağlanması, daha sonra da UV-Görünür spektrofotometrenin detektör olarak kullanılması ile tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Karbodiimidler, amidleşme, esterleşme ve peptit sentezi için yaygın olarak kullanılan birleştirme ajanlarıdır. Literatürde, organik asitlerin amidleşmesi veya esterleşmesi, oda sıcaklığında çözücü olarak su kullanılıp N,N'-diizopropilkarbodiimidin varlığında gerçekleştirilmiştir (Fattahi vd., 2018). Özelliği dikkate alarak, UV bölgesinde güçlü bir absorbands bandına sahip organik asit amid türevlerini elde etmek için bir birleştirme ajan olarak N,N'-diizopropilkarbodiimid varlığında türevlendirme reaktifi olarak 1-Naftilamin kullanılmaktadır. Meyve sularındaki ana organik asitlerin (sitrik, malik, tartarik ve süksinik) HPLC-UV tayini için bir kolon öncesi türevlendirme yöntemi geliştirmesi, bu asitlerin kolonda ayrılması ve kullanılan bir UV detektör ile tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Organik Asitlerin Önemi ve Kullanım Alanları

Bazı karboksilli asitler, yaşam döngülerinin farklı aşamalarında doğal olarak oluşan bileşiklerdir (canlı organizma-krebs döngüsü; fermentasyon işlemleri ve jeolojik işlemler). Bununla birlikte, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi laboratuvarlarda ve fabrikalarda aldehitlerin, primer alkollerin ve hidrokarbonların oksidasyon tepkimeleri, olefinlerin oksidatif bölünmesi (*oxidative cleavage*), alkollerin baz katalize dehidrojenasyonu veya nitrillerin, esterlerin veya amidlerin hidrolizi yoluyla üretilmektedirler (Georgiana ve Gabriel, 2018).



Şekil 2.1. Organik asitlerin sentezi için bazı kimyasal tepkimeleri

Tıp, tarım, ilaç, gıda ve diğer endüstrilerdeki çeşitli uygulamaları ile organik asitler günümüzde önemli oranda çeşitli roller oynamaktadır. Karboksilli asitler ve türevleri, polimerler, biyopolimerler, kaplamalar, yapışkanlar ve farmasötik ilaçları üretiminde kullanılmaktadır. Çözücüler, gıda katkı maddeleri ve antimikrobiyaller olarak da kullanılabilirler.

2.2. Gıda Sanayinde Organik Asitlerin Önemi ve İşlevleri

Organik asitlerin gıda endüstrisinde önemli rolleri vardır, çünkü duyuşal niteliklerini (ör., tat, koku ve renk) ve gıda maddelerinin stabilitesini etkilemektedirler. Organik asitler, insanın tükettiği çok çeşitli ürünlerde mevcut olabilir. Doğal olarak

sebze ve meyvelerde bulunur (örn. turunçgillerde sitrik asit, üzümelerde tartarik asit, elmalarda malik asit, maydanoz ve brokolide oksalik asit tuzları) ve fermentasyon gibi işlemler sırasında yiyecek veya içeceklerle katkı madde olarak eklenebilmektedir. Örneğinin, asitleştirici ve asitlik düzenleyici (sitrik asit), koruyucular (propiyonik asit), emülgatörler (tartarik asit), antioksidanlar (askorbik asit) veya aroma (sitrik ve malik asit) olarak eklenebilmektedir.

Gıdalarda bulunan organik asitlerin seviyesi ve doğası, fermentasyon işlemlerinin izlenme, üretim, depolama aşamalarını kontrol etmek veya bu ürünler hile olup olmadığını tanımlamak için gerekli bilgileri sağlamaktadır. Elbette bu amaç için, yiyecek ve içeceklerde mevcut olan farklı asitlerin miktarlarını belirlemek ve ölçmek için analitik yöntemlerin sürekli olarak geliştirilmesi ve uygulanması gerekmektedir (Coşkun, 2017; Georgiana ve Gabriel, 2018).

Asitleştiricilerin gıda sanayindeki en temel işlevleri pH kontrolü, lezzet düzenleme, mikrobiyal inhibisyon (koruyucu) ve şelatlamadır (Dziezak, 2003).

2.2.1.pH Kontrolü

Asit eklenmesinin en yaygın sebeplerinden biri pH'ı kontrol etmektir. Bu genellikle enzimatik tepkimeleri önlemek, belirli hidrokolloidlerin ve proteinlerin jelleşmesini kontrol etmek ve fermentasyon işlemlerinde pH'ı standartlaştırmak için yapılmaktadır.

İlk örnekte, pH'ın düşürülmesi, ürün renk ve tat bozulmasının gelişmesini destekleyen birçok doğal enzimi etkisizleştirmektedir. Örneğin, polifenol oksidaz fenollerini kinonlara yükseltgenmekte, bu enzim pH 5 ve 7 arasında aktiftir ve geri dönülmez şekilde 3 veya daha düşük bir pH'ta etkisiz hale gelmektedir.

İkinci örnekte, pektin ve jelatin bazlı tatlılar, reçeller, jöleler, konserve ve diğer ürünlerin üretiminde uygun pH kontrolü çok önemlidir. Örneğin, yüksek metoksil pektinlerin jel oluşturması için pH'nın 2,5 ila 3 arasında tutulması gerekmektedir.

Son örnekte, optimum mikrobiyal aktivite sağlamak ve istenmeyen mikropların gelişmesini engellemek için pH standardizasyonu fermentasyon işlemlerinde rutin olarak yapılmaktadır (Doores vd., 2005).

2.2.2. Lezzet Düzenleme

Her asit; algılanan ekşiliğin başlangıç zamanı, ekşiliğin yoğunluğu ve herhangi bir kalıcı tat içeren belli başlı özelliklere sahiptir. Genel bir kural olarak, zayıf asitler, aynı pH'taki güçlü asitlerden daha baskın ekşi bir tada sahiptir, çünkü çoğu iyonlaşmamış halde bulunmaktadır. Ekşiliğe ek olarak, asitler acılık ve sıkılaştırıcı özelliğine de sahip olabilmektedir.

Asitler ayrıca, diğer lezzet bileşiklerinin tat duyumlarını değiştirme veya yoğunlaştırma, karakteristik tadın dışındakileri harmanlama ve ekşilik hissini uzatarak, istenmeyen tatları maskeleyen yeteneğine sahiptir. Örneğin, düşük kalorili tatlandırıcılar içeren meyveli içeceklerde, asitler tatlandırıcının ağızda kalan tadını maskeleyip ekşiliğiyle doğal meyve suyu tadını vermektedir. Asitler nadiren doğada tek bir asit olarak bulunduğundan, asitlerin bir arada kullanılması daha doğal bir tadı sunmaktadır. Glutamik ve süksinik asitler gibi bazı asitler, lezzet arttırıcı özelliklere sahiptir (Chahardoli vd., 2020).

2.2.3. Mikrobiyal İnhibisyon

Bilinen en eski biyolojik koruyucular bazı istenilen mikroorganizmalar tarafından üretilen zayıf organik asitlerin yetenekleri ile bozulmaları azaltıp, birçok fermente gıdanın raf ömrünü uzatması ile tanınmıştır. Ekşileştiriciler koruyucu olarak mikroorganizmaların gelişmesini önlemek, gıda bozulmalarına, gıda zehirlenmelerine ve hastalıklara yol açan bazı sporların faaliyetini engellemektedir. En çok laktik, asetik ve propiyonik asitler bu görevi için kullanılmıştır.

Daha önceden yapılan çalışmalarda eş-molar düzeyde adlandırılan organik asitlerin güçlü inorganik asitlere oranla antimikrobiyal etkilerinin daha yüksek olduğu ve zayıf asitlerde antimikrobiyal etkinin pH'nın sınırlandırılması ile arttığı gözlemlenmiştir. Zayıf organik asitlerin antimikrobiyal özelliklerinin iyonlaşmayan moleküllerin fonksiyonları ile sağlandığı sonucuna varılmıştır.  rnek olarak; sütte *Salmonella typhimurium* hücreleri pH hidroklorik asit yerine laktik asit ile 4'e düşürüldüğünde daha hızlı ölmektedir. Etki, iyonlaşmamış durumunda hem pH hem de asidin derişimine bağlanır. İyonlaşmamış asidin hücreler tarafından kolayca alındığı ve hücre içinde iyonlaştığı, pH düşüşüne ve asit anyonuyla metabolik bozulmaya neden olduğudur. Bu yüzden düşük pH'ta asitlerdeki iyonlaşmamış molekül oranı ve antimikrobiyal etki yüksektir.

Öte yanında, antimikrobiyal etki pH seviyesine bağlıdır. Düşük pH seviyesinde (< 5,0) daha etkilidirler ve yüksek pH seviyesinde (> 5,0) gıdalardaki yararlı etkileri halen şüphelidir. Tüm bunlara karşı fumarik, sorbik, benzoik, monolaurik ve diğer esterler gibi diğer bazı organik asitler yüksek pH aralığında etki gösterirler ve her ne kadar mikrobiyel kaynaklı biyolojik koruyucular kategorisinde yer almasalar da halen pek çoğu gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır.

Asitleşme ayrıca benzoatlar, sorbatlar ve propiyonatlar gibi antimikrobiyal ajanların (maddelerin) etkinliğini arttırmaktadır. Sodyum benzoat, pH 4,5'e düşene kadar antimikrobiyal aktivitesini göstermez. Asitlerin karışımları, mikrobiyal büyümeyi engellemek için sinerjist olarak etki etmektedir. Örneğin, laktik ve asetik asitlerin, *heterofermentrik laktobasilli*'yin gelişmesini engellediği bulunmuştur (Coban, 2020; Çelikyurt, 2008; Trček vd., 2015).

2.2.4. Şelatlaşma

Oksidatif tepkimeler gıdalarda doğal olarak oluşur. Renk ve doku değişikliği, esmerleşme, ransidite (acılaşma), bulanıklık ve lezzet ve besinlerin bozulması gibi üründe istenmeyen birçok etkiden sorumludurlar. Bu tepkimelere katalizör olarak, bakır, demir ve manganez gibi metal iyonların üründe veya işlem makinelerinde sadece eser miktarlarda bulunması gerekir. Buna göre, metaller gıdalarda istenen özellikleri bozdukları için, metallerin etkisiz hale getirilmesi, bu özelliklerinin de korunması demektir. Organik asitler ağır metal iyonlarıyla kompleks oluşturdıklarından, bunların oksidasyonu katalize edici etkilerini önlemektedirler. Antioksidanlarla birlikte kullanıldığında, asitlerin ürün stabilitesi üzerinde bir etkisi vardır. Sitrik asit ve bunun tuzları en yaygın kullanılan şelatlama ajanlarıdır. Kısacası organik asitlerin şelatlaşma etkisiyle, gıdaların renk, yapı ve lezzetlerinin bozulmasını önleyip raf ömrünü uzatabilmektedir (Kirimura vd., 2011; Nauta, 1991).

2.3. Meyve Sularında Organik Asitler

Organik asitler meyvelerden elde edilen tüm ürünleri karakterize etmek için ilgilenilen bileşiklerdir. Meyve ve meyve ürünlerindeki asitlerin türleri ve birikimi; mevsim, olgunlaşma durumu, ekolojik koşulları, işleme yöntemleri ve saklama süresine bağlı olarak oldukça değişkendir. Ayrıca, meyvelerin çoğunluğunun lezzeti, asit-şeker dengesiyle oluşmaktadır. Meyvelerin toplam asit içeriğinin şeker miktarına oranı, olgunluğun bir kriteridir. Organik asitler meyve sularında şekerden sonra en bol

bulunan katı bileşendir. Asitliğin cinsi ve miktarı, gıdalarda bozulmuşluğun bir ölçüsüdür. Bu nedenle, meyvelerdeki organik asitlerin belirlenmesi ve kantitatif analizi, gıda teknolojisinde kalite değerlendirmesi için çok önemli olduğunu kabul edilmiştir. Lezzet kalitesinin en önemli analitik ölçümlerinden biri ve ana olgunluk indeksi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, organik asitler aynı zamanda meyve ürünlerinde otantiklik (gerçeklik) indeksidir, çünkü işleme ve depolama sırasında meyvelerin diğer bileşenlerine göre bozulma olasılığı daha düşüktür. Bu ürünlerinin organik asit bileşimlerinin bilinmesi, ürünlerde hile olup olmadığı konusunda da sağlıklı bir fikir verebilmektedir (Çelik vd., 2019; Khosravi, 2015).

Meyvelerde en çok sitrik, malik ve tartarik asit bulunmaktadır. Sitrik asit üzüm sü meyveler ve turunçgil meyvelerinin ana asidi iken; malik asit yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerin, elma gibi, ana asididir. Bununla birlikte, üzüm suyunun ekşiliğine çoğunlukla tartarik asit neden olmaktadır. Laktik, oksalik, askorbik, izositrik, süksinik, benzoik, sitramalik, galakturonik, shikimik, kinik ve fumarik asitler gibi az miktarda başka asitler de meyvelerde bulunur. Bunların yanında fermentasyon sonucu meydana gelen organik asitler de vardır. Bunlardan formik asit, asetik asit, propionik asit ve laktik asit (Huang vd., 2009; Karadeniz, 2004). Tablo 2.1 'de farklı asitlerin bazı fiziksel özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Çeşitli organik asitlerin bazı fiziksel özellikleri

Bileşik	Molekül Formülü	Moleküler Ağırlığı (g/mol)	pKa Değeri	Çözünürlük, Suda (g/L)	Erime noktası °C
Sitrik asit	C ₆ H ₈ O ₇	192,123*	3,13-4,76-6,39	592	156
Malik asit	C ₄ H ₆ O ₅	134,087	3,23-4,77	558	130
Tartarik asit	C ₄ H ₆ O ₆	150,087	2,88-3,94	206**	210-212**
Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	60,052	4,64	Karıştırılabilir	16-17
Laktik asit	C ₃ H ₆ O ₃	90,078	3,77	Karıştırılabilir	16,8
Fumarik asit	C ₄ H ₄ O ₄	116,072	3,02-4,39	4,9	287
Süksinik asit	C ₄ H ₆ O ₆	118,088	3,90-5,19	58	184–190
Maleik asit	C ₄ H ₄ O ₄	116,072	1,92-6,22	478,8	135
Malonik asit	C ₃ H ₄ O ₄	104,061	2,62-5,30	763	135-137

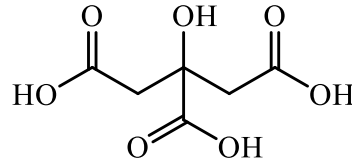
* Anhidrit için, sitrik asit monohidrat ise 210.038 g/mol

** dl-tartarik asit için

2.3.1. Sitrik Asit

Sitrik asit formülü C₆H₈O₇ şeklinde, halk arasında limon tuzu olarak da bilinir. Literatürde H₃Cit olarak da belirtilebilir. IUPAC adı ise 2-hidroksipropan-1,2,3-

trikarboksilli asittir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesine göre, asit düzenleyiciler arasındaki kod adı E 330'dur.



Şekil 2.2. Sitrık asidin yapısı

Hemen hemen bütün hayvanlar ve bitkilerin yapısında var olan sitrik asit, doğada hücrel faaliyetlerin birçoğunda görev alan ve turunçgillerde doğal olarak derişik olan zayıf bir trikarboksilli asittir. Renksiz, kristal yapılı, suda çözünürlüğü oldukça fazladır. Susuz bir formda veya bir monohidrat olarak bulunabilir. Sitrık asit, hiçbir kiral karbon içermez, bu nedenle hiçbir stereoizomerizm göstermez.

2.3.1.1. Bulundukları Yerler ve Üretimi

Sitrık asit, neredeyse tüm canlı organizmalar tarafından üretilmektedir. Sitrık, Krebs döngüsünde sitrik asit döngüsü olarak da adlandırılan ilk oluşun ürünüdür. Meyve ve sebzelerin çoğu sitrik asit içerir; turunçgil, ananas, çilek, kiraz ve domates gibidir. % 1'in üzerinde sitrik asit içeriğine sahip olan meyveler; limon (% 4-8), siyah kuş üzümü (% 1,5-3) greyfurt (% 1,2-2,1), portakal, mandalina, kırmızı kuş üzümü, ahududu ve çilek (% 0,6-1,3) 'tir (Cowden, 2002).

Sitrık asit ilk olarak 1784 yılında, kimyager Carl Wilhelm Scheele tarafından, limon suyundan kristalize ederek izole edilmişti. Sitrık asit, araştırmacıların, şeker kaynaklardan (mısır ve melas gibi) beslendiğinde sitrik asit oluşturan siyah küften (*Aspergillus niger*) de üretilebileceğini keşfettiği 1900'lerin başlarına kadar limon suyundan üretilmişti (Berovic ve Legisa, 2007; Matthey ve Kristiansen, 1999).

2.3.1.2. Önemi ve Faydaları

Sitrık asidin sağlığa birçok faydası vardır. Bunlardan;

Enerjiyi metabolize etmesi: sitrat, sitrik asit döngüsü adı verilen bir süreç sırasında oluşun ilk moleküldür. Ayrıca trikarboksilli asit (TCA) veya Krebs döngüsü olarak da bilinir, hücrelerdeki bu kimyasal tepkimeler gıdaları kullanılabilir enerjiye dönüştürmeye yardımcı olmaktadır. İnsanlar ve diğer aerobik organizmalar enerjilerinin çoğunu bu döngüden almaktadırlar. Ayrıca; sitrat, mitokondriden

sitoplazmaya taşınabilir, daha sonra yağ asidi sentezi için asetil-CoA'ya ve oksaloasetata ayrılabilir. Sitrat, apatit kristallerinin boyutunu düzenlemeye yardımcı olan kemiğin önemli bir bileşenidir (Berg vd., 2002).

Besin emilimini artırır: sitrik asit, minerallerin biyoyararlanımını artırır, vücudun onları daha iyi emmesine izin vermektedir. Örneğin, kalsiyum sitrat emilim için mide asidi gerektirmez. Ayrıca, gaz, şişkinlik veya kabızlık gibi yan etkileri oldukça azdır. Benzer şekilde, sitrat formundaki magnezyum tamamen emilir, magnezyum oksit ve magnezyum sülfattan daha iyi yararlanma sağlamaktadır. Ayrıca kalsiyum takviyelerinin emilimini arttırmaktadır (Straub, 2007; Walker vd., 2003).

Böbrek taşları çözünme ajanı ve antikoagülandır: sitrik asit–potasyum sitrat formunda–yeni böbrek taşı oluşumunu önler ve daha önce oluşanları parçalara ayırmaktadır. Böbrek taşları, genellikle böbreklerde bulunan kristallerden oluşan katı kütlelerdir. Bu asit, idrarı taş oluşumu için daha az uygun hale getirerek böbrek taşlarına karşı korumaktadır. Anhidrit sitrik asidin etki mekanizması bir asitleme aktivitesi ve kalsiyum şelatlama aktivitesidir. Sitrik asidin fizyolojik etkisi azalan pıhtılaşma faktörü aktivitesi ile olmaktadır (Prezioso vd., 2015).

Diğer faydaları: sitrik asit, çeşitli bakteriler ve virüslere karşı etkili bir dezenfektandır. Bir test çalışması, gıda kaynaklı hastalıkların önde gelen bir nedeni olan insan norovirüsünün tedavisinde veya önlenmesinde etkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, toksin üreten *Clostridium botulinum* bakterilerinin neden olduğu nadir fakat ciddi bir hastalık olan botulizme karşı korunmak için konserve meyve ve sebzelere eklenmektedir (Townsend vd., 1954).

2.3.1.3. Kullanım Alanları

Sitrik asidin kullanım alanları ele alınırsa; gıda sektörü, tarım sektörü, metal üretimi ve işlenmesi, ilaç sektörü ve içecek sektörü gibi aktif alanlarda yer aldığı görülür. Yiyecek ve içecekler, dünyada üretilen sitrik asidin yaklaşık % 70'ini (yaklaşık olarak içecekler % 50 ve diğer gıdalar % 20), ilaçlar ve diyet takviyeleri % 12'sini kullanmakta ve geri kalan % 18'u temizlik maddelerinde kullanılmaktadır (Nwosu, 2015).

Gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan organik asittir. Gazlı içecekler, meyve suları, toz içecekler, şekerlemeler, dondurulmuş gıdalar ve bazı süt ürünleri genellikle bu maddeyi içermektedir. Sitrik asit, tüketilen tüm asitleştiricilerin % 60'ından

fazlasını oluşturmaktadır. Diğer asitleştirici maddelerin etkilerini değerlendirmek için standart olarak kullanılmaktadır (gıda asitlerinin en geniş tampon aralığı (2,5-6,5) sitrik asittir).

Sitrik asidin en önemli kullanımları içeceklerdedir. Lezzetlendirici, asitleştirici, metal iyonlarını şelat ajanı, koruyucu ve tampon olarak alkolsüz karbonatlı ve karbonatsız içeceklere yaygın olarak eklenmektedir. Böylece istenen tatlılık özelliklerinin elde edilebilmektedir. Sodyum sitrat keskin asitleri yüksek oranda asitlendirilmiş gazlı içeceklerde bastırmakta; serin, tuzlu bir tat verir ve karbonatlaşmayı sürdürmeye yardımcı olmaktadır. Doğal meyve suları ve şarapta, metal şelat etkisinden dolayı asit, metallerin tanen veya fosfat ile bağlanmasından kaynaklanan bulanıklığı önlemektedir. Sitrik asidin kalsiyum tuzu, fruktoz tatlandırılmış, içecek tozlarında topaklanmayı önleyici olarak kullanılır, burada magnezyum oksit ve trikalsiyum fosfat gibi esmerleşmeyi destekleyen diğer bileşenlerin alkalinitesini nötrleştirmektedir (Kirimura vd., 2011).

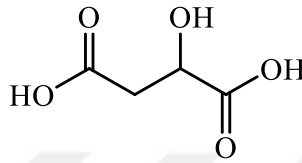
Sebze konservelerinde, asitleştirici olarak çoğunlukla sitrik asit ilave edilmektedir. Çoğu peynir koruyucu olarak sitrik asit içermektedir. Dondurma ve eritme peynirlerinde emülgatör ve olgunlaştırıcı, çok sayıda üründe mevcut aromayı geliştirici ve kuvvetlendirici olarak kullanılır. Ayrıca mayonez, soslar, meyveli ürünler, reçel, marmelat ve jölelerde yer almaktadır. Yağlı gıdalarda antioksidanlarla sinerjist etki göstermektedir.

İlaçları stabilize etmek veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan bu madde ayrıca virüslere ve bakterilere karşı bir dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Sitrik asit, ilaçlarda ve besin takviyelerinde kullanılan endüstriyel bir maddedir. Aktif bileşenleri stabilize etmeye ve korumaya yardımcı olmak için ilaçlara eklenmiştir. Çiğnenebilir ve şurup bazlı ilaçların tadını geliştirmek veya maskeleyerek için kullanılmaktadır. Magnezyum ve kalsiyum gibi mineral takviyeleri, emilimini arttırmak için sitrat formunda sitrik asit içerebilmektedir.

Ayrıca bu madde, sabun köpüğü, su lekeleri, kireç ve pas temizliği için genel bir temizleme maddesi ve dezenfektan olarak ticari olarak satılmaktadır. Klor gibi geleneksel dezenfektan ve temizlik ürünlerine göre daha güvenli bir alternatif olarak görülmektedir (Dziezak, 2003; Joye, 2019).

2.3.2. Malik Asit

Malik asit veya elma asidi (L-enantiyomeri) $C_4H_6O_5$, ilk olarak 1785 yılında, bilim insanı Carl Wilhelm Scheele tarafından elmadan izole edilerek elde edilmiştir. 1787 yılında ise, kimyager Antoine Lavoisier, bu aside Latince'de elma manasına geldiği için "malik asit" adını vermiştir. IUPAC adı ise 2-hidroksibütandioik asit, başka sistematik kimyasal adlar da 1-hidroksi-1,2-etandikarboksilli asit ve hidroksisüksinik asittir. Gıda katkı madde olarak kod adı E 296'dur.



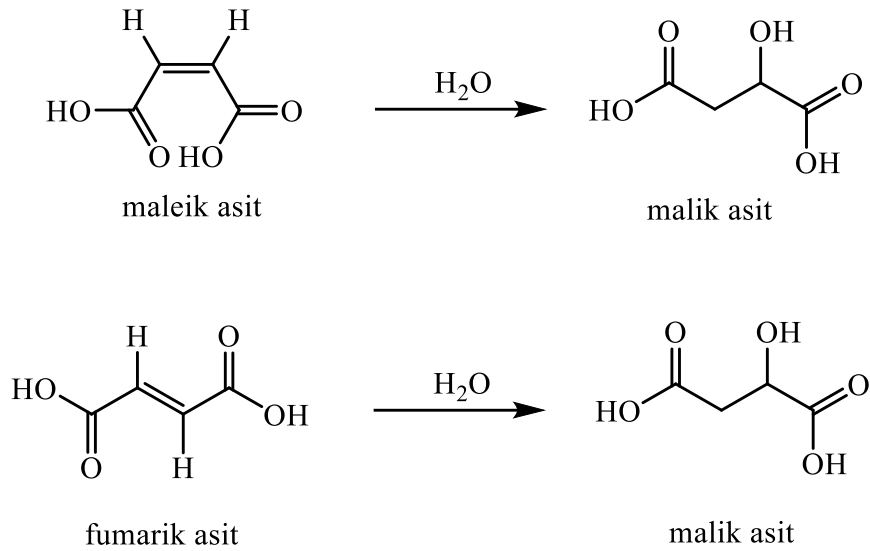
Şekil 2.3. Malik asidin yapısı

Malik asit, tüm canlı organizmalar tarafından yapılan ve pek çok ekşi veya mayhoş gıdada rol oynayan organik bir dikarboksilli asittir. Malik asit, hafif bir kokuya, hoş kalıcı bir aromaya ve güçlü bir asidik tadına sahip beyaz kristal bir toz saf halinde elde edilmektedir. Sitrik asit ile karşılaştırıldığında, malik asit çok daha güçlü asitlik tat göstermektedir. Sitrik aside göre yüzde 20 daha az malik asit kullanılarak aynı asidik seviyeye ulaşmak söz konusudur. Sentetik olarak üretilen malik asit rasemik bir karışım iken (DL-malik asit) doğal olarak oluşan madde levorotatiftir (L-enantiyomer) (Brittain, 2001).

2.3.2.1. Bulundukları Yerler ve Üretimi

Malik asit (L-enantiyomer), özellikle ekşimsi olgunlaşmamış meyvelerde ve en çok elmalarda doğal olarak bulunmaktadır. Elmanın toplam asidinin yüzde 94 ila 98'i malik asitten gelmekte; bazı çalışmalara göre ortalama değeri 0,45 g/100g 'dir. Elma dışında, turunçgillerde ve birçok meyvelerde (kayısı, armut, incir, kiraz ve üzüm gibi) ikinci en baskın asittir. Brokoli, erik, havuç, patates, taze fasulye gibi sebze ve meyvelerde de malik asit bulunmaktadır.

Malik asit (Rasemik karışım), ticari anlamda fosil kaynaklardan elde edilir, maleik asit ve fumarik asitlerin katalizör varlığında hidrat edilmesiyle sentezlenmektedir; Şekil 2.4. Bununla birlikte, daha çevre dostu teknikler arayışı, mikroorganizmalar kullanarak şekerlerden malik asit üretilmesi için daha fazla araştırma çabasını tetiklemiştir (Kövilein vd., 2020).



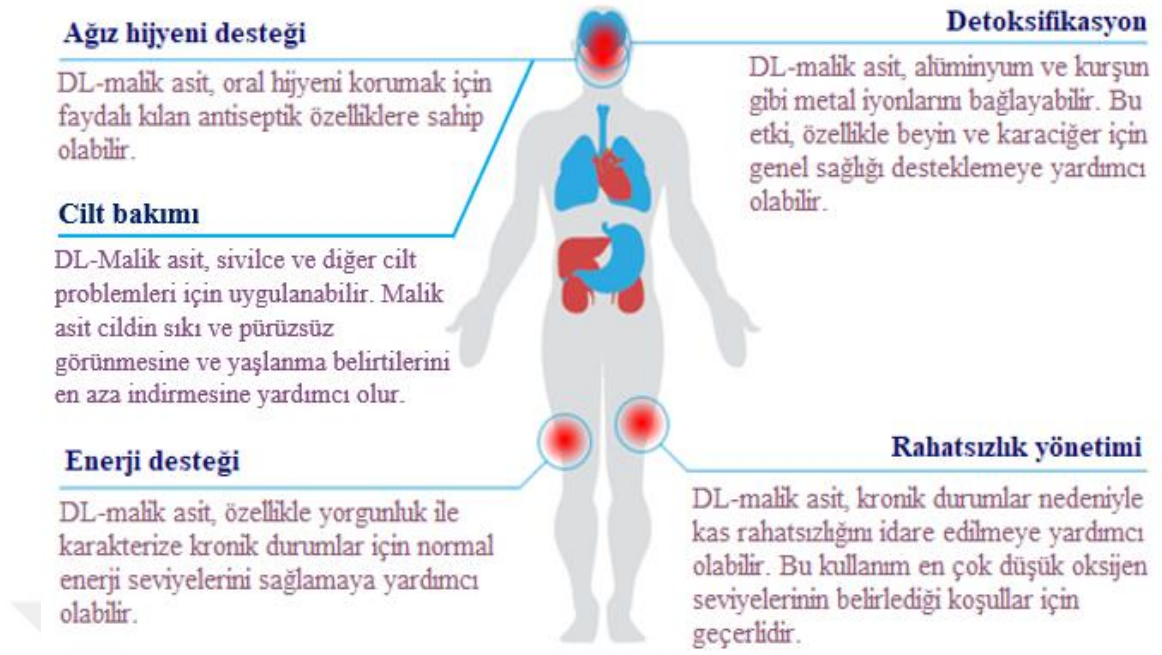
Şekil 2.4. Malik asit sentezinin tepkimeleri

2.3.2.2. Önemi ve Faydaları

Şekil 2.5'te belirttiği gibi, malik asit sahip olduğu özellikleri sayesinde sağlığa da çok faydalıdır. Malik asit, hayattaki canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan enerji döngüsü olan Krebs döngüsünün önemli bir basamağıdır. Hücre metabolizmasında önemli bir rol oynayarak vücudun ATP üretmesine yardım eder. Bu sayede vücudun enerji üretimine büyük katkı sağlamış olmaktadır.

Malik asit kasların yorulmasını önler. Fibromiyalji denen kas, tendon ve bağlardaki şiddetli ağrılara, kaslar hızlıca yorulduğu ve kas dokularının daha zor çalıştığı enerji kaybı da eşlik etmektedir. Magnezyumlu malik asit alınması, fibromiyaljinin neden olduğu ağrı ve hassasiyeti azaltmakta ve kasların performansını artırmaktadır (Russell vd., 1995).

Malik asit, ağız sağlığını korumaya da yardımcı olur; ağızda mikropları tutan bir antiseptik gibi davranarak enfeksiyon riskini ciddi biçimde düşürmektedir. Aynı zamanda tükürük üretimini de artırır ve bu yüzden ağız hijyeni ve kuru ağız için de uygulanmaktadır. Malik asit, pek çok diş macunu ve gargaranın da en meşhur maddesidir.



Şekil 2.5. Malik asidin bazı sağlık yararları

Sivilce, siğiller, nasır ve diğer cilt problemleri için cilde malik asit uygulanabilir. Malik asit cildin sıkı ve pürüzsüz görünmesine yardımcı olmakta, ciltteki kırısklıkları ve ince çizgileri soldurarak yaşlanma belirtilerini en aza indirmekte, adeta doğal bir soyulma (peeling) görevi görmektedir. Fakat malik asidin ürtiker, şişme, döküntü gibi yan etkileri de olabildiğinden az miktarda ve bir doktor gözetiminde alınmalıdır (Baldo vd., 2010; Taylor vd., 2013).

Malik asit vücutta biriken bazı metallerin oluşturduğu toksik etkisini azaltır. Bu sayede, karaciğer ve beyinde oluşacak hastalıkların da önüne geçer. Şelat yapıcı olması sayesinde, metalik toksinleri etkisiz hale getirmektedir. Sinir, kas ve kalbin düzgün çalışmasına yardım eder ve bağışıklık sistemini güçlendirir.

2.3.2.3. Kullanma Alanları

Malik asit, pek çok endüstri dalında farklı amaçlarla yoğun biçimde kullanılmaktadır. Uygulamalar dayanarak, piyasa içecekler, şekerlemeler ve yiyecekler, kişisel bakım ve diğerlerine ayrılmıştır. Gıda endüstrisi, başlıca malik asit tüketicileri ve toplam malik asit tüketiminin yaklaşık % 85'ini oluşturmaktadır. Günümüzde, içecekler en büyük uygulama bölümünü temsil etmektedir, çünkü malik asit bu sektörde tercih edilen bir asit maddesi olarak kullanılmaktadır.

Gıda sanayinde; malik asit, asitlik düzenleyici, lezzetlendirici, antioksidan, tamponlama maddesi ve şelat maddesi olarak kullanılmaktadır. Malik asidin en yaygın kullanım alanı içinde meyve lezzeti olan gıdalardır. Bunların başlıca, meyve lezzetli karbonatlı ve karbonatsız içecek ve şuruplardır.

Doğal ve yapay renk maddelerine olumsuz bir etkisi olmadığından, elma, üzüm ve diğer meyve sularından hazırlanan içeceklerde renk stabilizörü olarak kullanılmaktadır. Malik asidin içeceklerdeki kullanımının bir diğer nedeni, kolay çözünmesi, damakta uzun süreli ve kalıcı etkide bir tat bırakması, farklı aromalarla uyumlu olmasıdır. Damakta kalan tadının dolayısıyla çilek ve vişne gibi meyve lezzetlerini arttırmaktadır. Malik asidin meyve suyu konsantresine katılması, içeceğin doğal lezzetini de artırmaktadır. Diyet ürünlerin tatlandırıcı etkisini artırır ve aynı zamanda, damakta kalan tatlı tadın da önüne geçmektedir. Aspartamla tatlandırılmış içeceklerde, malik asit, aspartam ile sinerjistik olarak etki eder, böylece malik ve sitrik asitlerin birlikte kullanımı, aspartam seviyesinde % 10'luk bir düşüşe sağlamaktadır. Ayrıca, askorbik asitle sinerjistik etki oluşturmaktadır. Böylece, bakır ve demirle stabil kompleks sağlayarak oksidasyonu da önlemektedir.

Sert şekerler (şekerleme) üretiminde, çiklet yapımında, reçel, jöle yapımında ve jelatinli tatlılarda da malik asit kullanılmaktadır. Malik asidin şekerin yapısındaki diğer bileşenlerle kolay etkileşim sağlaması, parlaklık ve berraklığı artırıcı etki göstermesi öncelikli tercih sebepleridir.

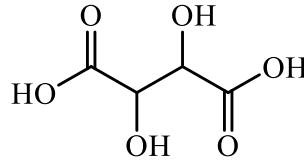
Malik asit, konserve ürünlerde ise pH kontrolünü sağladığı için kullanılmakta ve konserve ürünlerde malik asidin kullanılmasının bir diğer nedeni de esmerleşmesi geciktirmesidir. Ekşi hamur üretiminde ve kabartıcı ürünlerde de malik asitten faydalanılmaktadır. Ayrıca, şelat yeteneği ve antioksidan özelliklere sahip olduğu için, bitkisel yağlarda oksidasyonu geciktirmek için bütül hidroksitoluen ile bir sinerjist olarak kullanılabilir.

Bahsedilen faydaları için İlaç ve kozmetik endüstrisinde önemli bir bileşendir. Malik asit ayrıca efervesan tozlarda, gargaralarda ve diş temizleme tabletlerinde sitrik aside alternatif olarak kullanılır (Dziezak, 2003; Joye, 2019).

2.3.3. Tartarik Asit

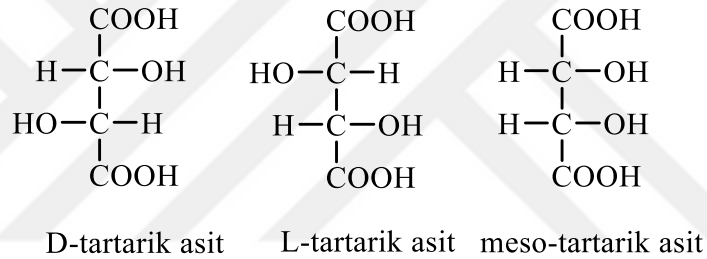
Tartarik asit, dihidroksi-süksinik asit de olarak bilinir, $C_4H_6O_6$ formülünü organik asittir, birçok bitkide bulunur ve eski Yunanlılar ve Romalılar tarafından tartar

olarak bilinmektedir. IUPAC adı ise 2,3-Dihidroksibütandioik asittir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'ne göre, asit düzenleyiciler arasındaki kod adı E 334'tür.



Şekil 2.6. Tartarik asidin yapısı

Tartarik asit iki kiral merkeze sahiptir, ancak bu bileşiğin dört stereoizomerinden ikisi aynıdır. Dolayısıyla, üç stereoizomerik tartarik asit vardır, Şekil 2.7. Bu stereoizomerlerin ikisi enantiomerler, L-tartarik asit ve D-tartarik asit, üçüncüsü ise *meso* bileşiği adı verilen bir akiral diastereomerdir. *levo* ve *dekstro* tartarik asit karışımı rasemik tartarik asit olarak bilinmektedir (Kassaian, 2000).



Şekil 2.7. Tartarik asidin stereoizomeri

Tartarik asit, beyaz kristal yapıya sahip bir dikarboksilli asittir. Doğal olarak birçok bitkide, özellikle de üzümelerde ve demirhindelerde bulunur ve şarapta bulunan ana asitlerden biridir. Kokusuz, çok ekşi tadı ve suda oldukça çözünen asittir. Ekşi bir tat vermek için gıdalara eklenir ve antioksidan olarak kullanılmaktadır. Antioksidan özelliğini, şelat madde olarak işlevinden kaynaklanmaktadır. Bitkilerde oluşan tartarik asit, kiraldir, asidin doğal olarak oluşan şekli dekstrotartarik asittir. Tartarik asidin üç stereoizomeri ise, *levo*-, *dekstro*- ve *meso* tartarik asitler, yapay olarak yapılabilmektedir.

2.3.3.1. Bulundukları Yerler ve Üretimi

Tartarik asit insan vücudunda üretilmemekle birlikte üzüm, muz ve demirhindi gibi meyvelerde doğal olarak bulunan bir organik asittir. Bazı çalışmalara göre, üzümelerde bulunan asit derişimleri aralığı 4,98–7,48 g/L'dir (Soyer vd., 2003). Bu oran

üzüm türlerine ve olgunlaşma durumuna göre çok farklıdır. Olgunlaşmamış meyveler daha fazla asit oranına sahiptirler.

Doğal olarak bulunduğu ya da katkı maddesi amacıyla ilave edildiği gıdalarla birlikte vücuda alındığında metabolize edilemez. İnsanlar tarafından tüketilen çoğu tartrat, mide-bağırsak kanaldaki, özellikle kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından metabolize edilmektedir. Tüketilen tartarik asidin sadece % 15-20'si değişmemiş idrarda salgılanmaktadır. Tartarik asit, şarap ve üzüm tüketimi için bir biyobelirteçtir.

Tartarik asit ilk olarak 1769'da İsveçli kimyager Carl Wilhelm Scheele tarafından ayırmıştır. Çökeltiler ve şarap fermantasyonundan çıkan diğer atık ürünler ısıtılır ve kalsiyum hidroksit ile nötrleştirilir; Çöken kalsiyum tartaratın sülfürik asitle işlenmesiyle de tartarik asit oluşmaktadır. Levotartarik asit ise, ilk olarak Fransız kimyager Louis Pasteur tarafından sodyum amonyum tuzundan hazırlanmıştır.

Tartarik asit, bazı doğal ürünlerden, örneğin, üzüm ve asidik meyvelerinin suyunu, genellikle sitrik veya malik asitle birlikte elde edilebilmektedir. Şarap endüstrisinin çeşitli yan ürünlerinden ortaya çıkarılan potasyum hidrojen tartarattan da üretilebilir, ayrıca maleik asit gibi petrol yan ürünlerinden başlayarak kimyasal sentez ile hazırlanabilmektedir (Kassaian, 2000).

2.3.3.2. Önemi ve Faydaları

Tartarik asit, bağışıklık sistemini sağlıklı tutan ve vücudu enfeksiyonlardan koruyan antioksidan ve anti-enflamatuar özelliklerle sahiptir.

Tartarik asit, cilt bakım ürünlerinde artan kullanımı olan geniş doğal alfa-hidroksi asit (AHA) ailesine aittir. AHA'lar adeta doğal bir soyulma (peeling) görevi görmektedir. Sivilce, siğiller, nasır ve diğer cilt problemleri için cilde uygulanabilir. Ciltteki kırılganlıkları ve ince çizgileri soldurarak yaşlanma belirtilerini en aza indirir ve kolajen ve kan akışını arttırmaktadır (Tang ve Yang, 2018).

Tartarik asit, sindirime yardımcı olur, bağırsak fonksiyonlarını iyileştirir. Glikoz toleransını artırır ve ayrıca bağırsak absorpsiyonu düzeltilmektedir. Fakat aşırı tüketim mide sorunlarına yol açabileceğinden, yalnızca ılımlı olarak tüketilmelidir. Aşırı tüketim susuzluk, kusma, ishal, karın ağrısı ve mide-bağırsak iltihabının artmasına neden olabilmektedir (Amssayef ve Eddouks, 2022; Spiller vd., 2003).

Gerçekleşmesi nadir olsa bile, tartarik asit, malik asit üretimini inhibe ederek çalışan ve yüksek dozlarda felç ve ölüme neden olan bir kas toksinidir. Bununla birlikte, tartarik asitler % 1,2 kadar yüksek derişimlerde toksin değildir (Fitzhugh ve Nelson, 1947).

2.3.3.3. Kullanma Alanları

Tartarik asit, başta gıda sanayi olmak üzere çeşitli sanayi dallarında kullanılan bir asittir. Gıda sanayinde asitlik düzenleyici, antioksidan, lezzetlendirici ve şelat maddesi bir uygulama bulmaktadır. Çok ekşi tadıyla meyvelerde (doğal ve yapay üzüm aroması) doğal aromayı arttırmakta ve üzüm aromalı gıdaların koyu pembemsi doğal renklerini belirgin bir şekilde arttırdığından, Genellikle üzüm aromalı gıdalarda asitleştirici olarak özellikle tercih edilmektedir. Meyve kökenli bir asit olduğu için, tatlılar, şekerler, jöleler, reçeller, meyve nektarları, dondurmalar, jelatinler ve pastalarda asitleştirici ve lezzet artırıcı olarak kullanılmaktadır. Tartarik asit ve sitrik asit karışımıyla, tüketiciler tarafından istenen ekşi elma ve benzeri özellikli aroma çeşitleri sağlamaktadır. Malik asitle birlikte şaraptaki asitliğin % 90'ına katkıda bulunmaktadır.

Meyve, sebze veya balık konservelerinde, pH'ı, rengi, tadı ve besin değerini stabilize ettiği ve sinerjik bir antioksidan görevi gördüğü birçok uygulamaya sahiptir. Ayrıca karbonatlı içeceklerin hazırlanmasında ve antioksidan olarak yağlarda kullanılmaktadır.

Daha çok “tartar kremi” olarak bilinen asidik monopotasyum tuzu, kabartma tozlarında kullanılmaktadır. Düşük sıcaklıklarda az çözünürlüğe sahip olduğundan, tartar kreması pişirme sıcaklıklarına ulaşana kadar bikarbonat ile tepkimeye girmez; bu, hamurun yoğurulması sırasında erken kabarmayı engelleyip maksimum hacim gelişimi sağlamaktadır. Ayrıca, tartar kremi lokum ve kremşanti gibi ürünlerde kıvam artırıcı olarak tercih edilmektedir.

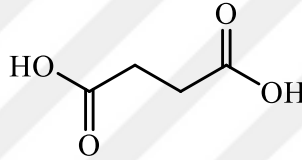
İlaç endüstrisinde, aktif madde için yardımcı madde veya taşıyıcı madde olarak kullanılır, bazikliğin düzeltilmesine yardımcı olmaktadır. Kullanım kolaylığı, stabilitesi ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle, efervesan tabletleri ve tozlarında bir asitlendirme maddesi olarak işlev görmektedir.

Tartarik asit, metallerin parlatılması, cilalanması ve temizlenmesi için kullanılabilir. Yünlerin boyanması için de tercih edilir. Çimento endüstrisinde,

özellikle de geciktirici etkisinin bu malzemelerin işlenmesini kolaylaştırdığı sıva ve alçıtaşlarda kullanılmaktadır (Kassaian, 2000).

2.3.4. Süksinik Asit

Süksinik asit, Kehribar asit veya kehribar ruhu, $(CH_2)_2(COOH)_2$ kimyasal formüllü bir dikarboksilli asit. Adı, kehribar anlamına gelen Latince succinum 'dan gelmektedir. IUPAC adı ise bütandioik asittir. Gıda katkı maddesi E363 olarak pazarlanmaktadır. Tablo 2.2'te Katkı madde olarak kullanılan asitlerin bazı işlevselliğini ve özelliklerini verilmişti. Süksinik asit, bütanın terminal metil gruplarının her birinin karşılık gelen karboksil grubuna tam oksidasyonundan kaynaklanan bir alfa, omega-dikarboksilli asittir.



Şekil 2.8. Süksinik asidin yapısı

Süksinik asit, dört karbon atomlu bir dikarboksilli asittir ve doğal olarak bitki ve hayvan dokularında bulunmaktadır. Vücuttaki intermediyer metabolizmada (krebs döngüsü) önemli bir rol oynamaktadır. Süksinik asit, tuzlu acı bir tadı olan beyaz bir kristal katı maddedir. Suda çözünür, etanol, eter, aseton ve gliserin içinde ise az çözünmektedir. Süksinik asit, nispeten düşük asit kuvvetine sahip higroskopik olmayan bir asitleştiricidir (Theron ve Lues, 2010).

2.3.4.1. Bulundukları Yerler ve Üretimi

Botanik reçinelerde, fosilleşmiş ağaçlarda ve özellikle Baltık Kehribarında yüksek miktarlarda süksinik asit bulunabilmektedir. Baltık kehribar % 3-8 süksinik asit içerebilir. Düşük derişimlerde birçok hayvanın dokularında yer alıp, sitrik asit döngüsünde ara metabolizma görevini ifa etmektedir. Süksinik asit, brokoli, ravent, şeker pancarı, taze et özleri, çeşitli peynirler ve lahana turşusu gibi yiyeceklerde bulunan doğal asitlerden biridir. Bu ürünlerin tümü, doğal olarak mevcut olan küçük miktarlarda süksinik asidin bir lezzet artışına bağlı olabilen çok belirgin ve değişik

tatlara sahiptir. Bu, süksinik asidin, diğer gıda asitleri ile çoğaltılamayan çeşitli tatlar üzerinde bazı ilginç etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Featherstone, 2015).

Süksinik asit, 1546'da kuru damıtma ile kehribardan saflaştırılma ile Alman kimyager Georgius Agricola tarafından keşfedilmişti. Yaygın endüstriyel yollar arasında maleik asidin hidrojenlenmesi, 1,4-bütandiolün oksidasyonu ve etilen glikolün karbonilasyonu bulunur. Süksinat ayrıca bütandan maleik anhidrit yoluyla üretilmektedir. Ayrıca sentetik olarak da etilen (C_2H_4), etilen diklorür ($C_2H_4Cl_2$) ve etilen disiyanür ($C_2H_4(CN)_2$)'den elde edilebilmekte ve etilen disiyanür (Süksinonitril) hidrolizle direkt süksinik asit vermektedir.

Bununla birlikte, süksinik asit üretebilen bazı mikroorganizmalar vardır (örneğin, *Actinobacillus sukkinogenes*, *Anaerobiospirillum süksinatürensler* ve *Mannheimia süksinatürürler*). Ayrıca, süksinik asit, amonyum tartarat veya kalsiyum maltın bakteriyel fermentasyonundan üretilmektedir. Genetiği değiştirilmiş *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*, glukoz fermentasyonu yoluyla ticari üretim için önerilmektedir. Tarımsal ve gıda atık akımlarının fermentasyonu (örneğin *Yarrowia lipolytica* kullanılarak) yapılan süksinik asit üretimi, süksinik asidin daha az ekolojik kimyasal sentezini azaltmak için günümüzde araştırılan stratejilerden biridir (Kohli vd., 2019; Quitmann vd., 2014).

2.3.4.2. Önemi ve Faydaları

Süksinat, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve yok edilmesinde de rol alan birçok metabolik yolun çapraz yolundaki önemli bir metabolittir. Bununla birlikte, aleminin epigenetik, tümör genez, sinyal iletimi, endo ve parakrin modülasyonu ve inflamasyona uzandığı giderek daha belirgin hale gelmektedir. Canlı organizmalarda, süksinik asit, ATP yapımında yer alan elektron taşıma zincirinin 2. kompleksindeki süksinat dehidrojenaz enzimi tarafından fumarata dönüştürülen metabolik bir ara ürün olarak çoklu biyolojik rollere sahip olan bir anyon olan süksinat biçimini alır ve hücresel metabolik durumu yansıtan bir sinyal molekülü görevi görmektedir.

Süksinat, mitokondride, trikarboksilli asit döngüsü (TCA) ile üretilmektedir. Süksinat, mitokondriyal matriksten çıkabilir ve hücre dışı alanda olduğu gibi sitoplazmada da işlev görebilir, gen ekspresyonunu değiştirebilir, epigenetik durumu değiştirebilir veya hormon benzeri bir sinyal üretebilmektedir. Süksinat, sırasıyla T

hücrelerini aktive eden antijen sunan hücrelerin aktivitesini tetikleyerek adaptif immüniteyi artırabilmektedir (Tretter vd., 2016). Süksinik asit; nutrasötik, radyasyon koruyucu, ülser önleyici ilaç, mikro besin ve temel metabolit rolü oynamaktadır.

Başka bir tarafta, 2004 yılında, biyo-rafinerilerin karlılığını ve verimliliğini arttırma potansiyeline sahip bir bileşik olarak, ABD Enerji Bakanlığı'nın biyokütleden elde edilen ilk 12 platform kimyasalları listesine süksinat yerleştirilmişti (Quitmann vd., 2014).

2.3.4.3. Kullanma Alanları

Süksinik asit, tarım, gıda, ilaç, plastik, kozmetik ve tekstil alanlarında sayısız uygulama için yüksek değerli ürünlerin (4,4-bütandiol, tetrahidrofuran, adipik asit, γ -bütrolakton ve n-metilpirrolidon gibi) üretimi için bir hammadde olarak kullanılabilmektedir.

Bir gıda katkı maddesi ve diyet takviyesi olarak, süksinik asit, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından genellikle kullanılmış miktar için biraz kısıtlama ile güvenli olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği gıdalarda kullanıma izin verilen süksinik asit miktarı için ürün bazında sınırlamalar getirmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2013).

Öncelikle yiyecek ve içecek endüstrisinde bir asitlik düzenleyici ve tampon olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, umami tadı için biraz ekşi ve sıkılaştırıcı bir etki vermektedir. Bazı gıdalarda bir asitleştirici olarak kullanıldığında bir avantajı olan, oldukça yavaş bir tat oluşumuna sahip olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. Süksinik asit ve sodyum tuzu, tatlılar, çorbalar ve evde içecek hazırlamak için kullanılabilecek tozlar gibi gıda ürünlerinde lezzet arttırıcı maddeler olarak kullanılmaktadır. Susuz olduğu için, kurutma maddesi olarak kullanılır. Toz karışımlarda topaklanmayı önleyici olarak kullanılmaktadır. Süksinik anhidrit, kabartma tozlarında kullanılan en uygun kabartıcı asit işlevini üstlenir. Toz halindeki yiyeceklerin ve içeceklerin formülasyonunda çok daha yüksek bir tolerans sağlar, çünkü oda sıcaklığında diğer nem çekerek sıvılaşmayan asitlere kıyasla suda daha fazla çözünürlüğe sahiptir (Featherstone, 2015).

Farmasötik ürünlerdeki bir yardımcı madde olarak, asiditeyi kontrol etmek veya bir karşı iyon olarak da kullanılır. Süksinik asit bazı polyesterlerin öncüsü ve bazı alkid reçinelerinin bir bileşenidir. Süksinik asit ayrıca doku mühendisliği uygulamalarında

ilgi çeken belirli biyolojik olarak parçalanın polimerlerin bazıları olarak hizmet eder (Kohli vd., 2019).

Tablo 2.2. Katkı madde olarak kullanılan asitlerin bazı işlevselliğini ve özelliklerini (Saltmarsh, 2020)

Organik Asit	Fiziksel Yapısı	E No.*	Tadı	Kokusu	İşlevselliği
Sitrik asit	Katı	E330	Güçlü turuncgiller tadı	Kokusuz	Lezzetlendirici, asitlik düzenleyici, Antimikrobiyal, şelat maddesi
Malik asit	Katı	E296	Ekşi ve biraz keskin	Elma	Lezzetlendirici, asitlik düzenleyici, Antimikrobiyal,
Tartarik asit	Katı	E334	Ekşi ve biraz sıkılaştırıcı	Kokusuz	Kabartma maddesi, hamur düzeltici, lezzetlendirici, asitlik düzenleyici,
Süksinik asit	Katı	E363	Ekşi ve acı	Kokusuz	Lezzetlendirici, asitlik düzenleyici, Antimikrobiyal,

* Avrupa gıda güvenliği Otoritesine göre, koruyucu liste (E200-E299) ve antioksidanlar ve asitlik düzenleyiciler (E300-E399) 'dur.

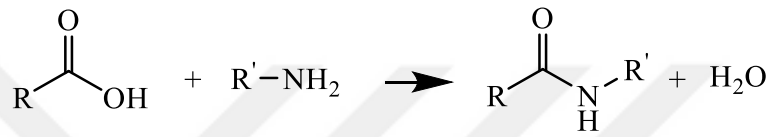
2.4. Birleştirme Tepkimeleri (Coupling Reactions)

Birleştirme tepkimesi, daha karmaşık bir molekül oluşturmak için iki ayrı molekülün kimyasal olarak bir katalizör ya da birleştirme ajanı yardımıyla birleştirildiği bir tür kimyasal tepkimedir. Bu süreç genellikle, Suzuki-Miyaura birleştirme tepkimesinde bir karbon-karbon (C-C) bağının oluşumu gibi, tepkimeye giren moleküllerin her birinden atomlar arasında yeni bir bağın oluşumunu içermektedir (Smith, 2017). Birleştirme tepkimeleri, organik sentezde temeldir ve kimyagerlerin basit yapı moleküllerini birleştirerek yeni daha karmaşık moleküller oluşturmaya olanak tanımaktadır.

Bir birleştirme tepkimeleri, belirli özelliklere ve işlevlere sahip yeni bileşiklerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kimyagerlerin tıp, malzeme bilimi, analitik kimya ve daha fazlası dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda gerekli olan kesin yapılara sahip moleküller oluşturmalarını sağlamaktadır. Bununla birlikte, genellikle birleştirme tepkimesi kendiliğinden gerçekleşmez ve fonksiyonel grupları aktive etmek için katalizörün veya birleştirici ajanın varlığını gerektirmektedir. Tepkimende, reaktanlardan biri tipik olarak, diğer reaktan üzerindeki bir fonksiyonel grupla tepkimeye girebilen bir tamamlayıcı fonksiyonel grup içermektedir. Sonuç, genellikle

su veya hidrojen klorür gibi küçük bir molekülün (A-X) ortadan kaldırılmasıyla birlikte yeni bir bağın oluşumudur.

Bu tepkimeler, farmasötikler, biyokimyasallar ve zirai kimyasallar gibi karmaşık moleküller oluşturmak için organik sentezde yaygın olarak kullanılmaktadır. Önemli bir birleştirme tepkimesi türü, amid oluşumudur. Karboksamidler, peptitlerin, laktamların ve bilinen ilaçların % 25'inden fazlasının sentezlenmesindeki değerli rollerinden dolayı organik ve tıbbi kimya alanlarında kayda değer bir öneme sahiptir. Antikanser, antifungal (mantar önleyici) ve antibakteriyel özelliklere sahip biyoaktif ürünlerin sentezinde kullanılmaktadır (Pedrood vd., 2021).



Şekil 2.9. Genel amidleşme tepkimesi

Birleştirme tepkimeleri, belirli özelliklere ve işlevlere sahip yeni bileşiklerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kimyagerlerin tıp, malzeme bilimi, analitik kimya ve daha fazlası dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda gerekli olan kesin yapılara sahip moleküller oluşturmalarını sağlamaktadır. Bununla birlikte, genellikle birleştirme tepkimesi kendiliğinden gerçekleşmez ve fonksiyonel grupları aktive etmek için katalizörün veya birleştirici ajanın varlığını gerektirmektedir.

2.4.1. Birleştirme Ajanları

Birleştirme ajan, iki reaktif molekül arasında yeni bir kovalent bağın oluşumunu kolaylaştıran kimyasal bir bileşiktir. Birleştirme ajanları, daha karmaşık bir molekül oluşturmak için iki molekülün bir araya getirilmesinin amaçlandığı tepkimelerde sıklıkla kullanılmaktadır.

Yukarıda bahsedildiği gibi birleştirme tepkimeleri, tepkimeye giren moleküllerin her birinden atomlar arasında yeni bir bağın oluşumunu içermektedir. Bununla birlikte, birçok durumda, reaktanlar, sterik engelleme, elektronik faktörler veya diğer zorluklar nedeniyle birbirleriyle kolayca tepkimeye girmeyebilir. İşte burada birleştirici ajanlar devreye girmektedir. Tepkimenin gerçekleşmesi için uygun kimyasal ortamı sağlayarak yeni bir bağın oluşumunu kolaylaştıran araçlar olarak görev yapmaktadırlar. Birleştirme ajanlar genellikle reaktanlardan biriyle tepkimeye girerek, daha sonra istenen bağ oluşturmak için diğer reaktan ile tepkimeye girebilen

reaktif bir tür oluşturmaktadır. Bu, iki başlangıç reaktanı arasındaki doğrudan tepkimeyi engelleyebilecek engellerin aşılmasına yardımcı olmaktadır. Karbodiimidler, amidleşme ve esterleşme için kullanılan önemli bağlayıcı ajanlardan biridir (Verma vd., 2023; Wang ve Zheng, 2022).

2.4.2. Karbodiimidler

Karbodiimidler, çeşitli fonksiyonel grupların, örneğin amidler, anhidritler, amidinler ve esterlerin hazırlanması için çok yönlü birleştirme ajanlarıdır, ayrıca hafif oksitleyici veya dehidre edici maddelerdir (Muthyala, 1995). Karbodiimidler, iki nitrojen atomuna çift bağlı bir merkezi karbon atomu içerir ve $R-N=C=N-R'$ genel formülü ile neredeyse doğrusal bir düzenleme oluşturmaktadır. Bu genel formül aşağıdaki gibi üç temel rezonans yapısında gösterilebilmektedir:

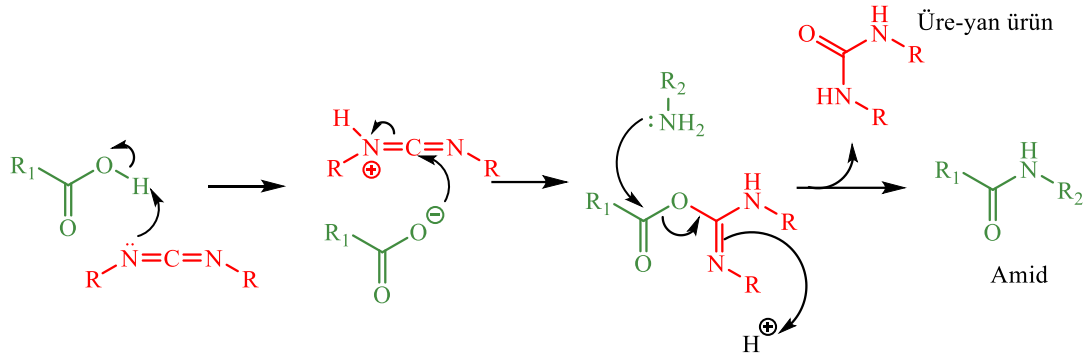


Şekil 2.10. Karbodiimidin üç temel rezonans yapısı

Bu özel yapı, karbodiimidlere farklı bir reaktivite kazandırarak, bir dizi kimyasal dönüşüme katılmalarına izin vermektedir.

Karbodiimidler, amid bağları (peptit bağları) oluşturmak için kullanılan en yaygın birleştirme ajanlarından biridir. Doğrudan karboksilik asitlerden ve aminlerden amidlerin sentezinde karbodiimidlerin kullanımı ilk kez 1955'te Sheehan ve Hess'in öncü çalışmasında rapor edilmişti. N,N'-disikloheksilkarbodiimid, bildirilen ilk karbodiimiddi ve tepkime koşulları çok karmaşık değildi (Sheehan ve Hess, 1955). Bundan sonra, karbodiimidler kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve diğer birçok karbodiimid sentezlenmiş ve N,N'-diizopropilkarbodiimid gibi alana tanıtılmıştı. Karbodiimidler, diğer fonksiyonel grupların sentezindeki önemli rollerine ek olarak, peptit sentezinde ve N-ucunda peptit bağlanmasında kullanılan en önemli reaktiflerden biri haline gelmişti (Gürer vd., 2021; Manne vd., 2021; Orlandin vd., 2022).

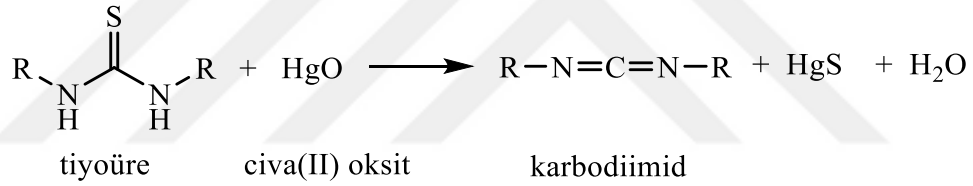
Tepkime mekanizması, birinci reaktandaki karboksil grubunun karbodiimidler tarafından aktivasyonuna dayanmaktadır. Bu aktivasyon, karboksilik grubun negatif yüklü oksijeninin elektronegatifliğini artırarak ve bir O-asilisüre oluşturarak elde edilmektedir. Aktive edilmiş ara ürün, diğer reaktandan bir amino grubunun nükleofilik saldırısını daha verimli hale getirir ve böylece bir amid bağının oluşturur ve ürenin çok kararlı bir ayrılan grup olarak ayrılmaktadır (Clayden vd., 2012).



Şekil 2.11. Karbodiimidlerin varlığında amidleşme tepkimenin mekanizması

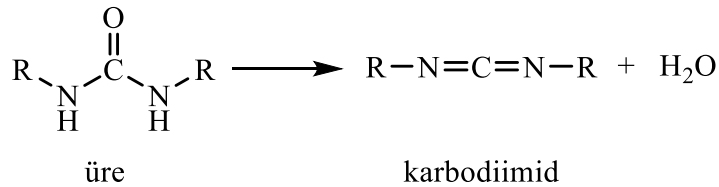
2.4.2.1. Karbodiimidlerin Sentezi

Karbodiimidler çeşitli yöntemlerle sentezlenebilmektedir. Karbodiimidlerin sentezi için en yaygın yöntemlerden biri tiyoüreler, izotiyoureler veya selenourelerle başlmaktadır. N,N'-disüstitüe tiyoürelerin benzen veya aseton ortamında sarı cıva oksit (HgO) ile kükürt giderme, karbodiimid elde etmenin klasik bir yoludur (Kurzer ve Douraghi-Zadeh, 1967).



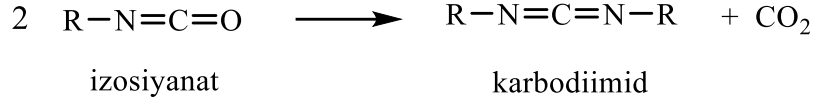
Şekil 2.12. N,N'-disüstitüe tiyoürelerin kükürt giderme yoluyla karbodiimidlerin sentezi

Yan ürünün (su) üretilen karbodiimid ile tepkimeye girerek üre oluşturmasını önlemek için genellikle tepkime karışımına CaCl₂, Na₂SO₄ veya MgSO₄ gibi dehidrasyon ajanları eklenmektedir. Buna göre, Karbodiimid, ürenin dehidre edilmesiyle de sentezlenebilmektedir. Piridin veya trietilamin varlığında fosfor pentoksit veya trifenilfosfinler ile bir N,N'-disüstitüe ürenin dehidrasyonu, karşılık gelen karbodiimidi vermektedir (Stevens vd., 1967).



Şekil 2.13. N,N'-disüstitüe ürenin dehidre edilmesiyle karbodiimid sentez tepkimesi

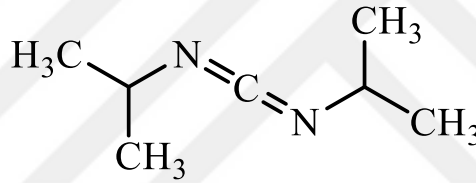
Karbodiimid elde etmenin bir başka önemli yolu, izosiyanatların karbodiimidlere katalitik dönüşümüdür. Fosfin oksitler gibi bir katalizör varlığında, izosiyanatların iki eşdeğeri, karbondioksit kaybıyla simetrik karbodiimidlere dönüştürülebilmektedir (Ulrich, 2008).



Şekil 2.14. İzosiyanatların katalitik dönüşümü yoluyla karbodiimid sentez tepkimesi

2.4.3. N,N'-Diizopropilkarbodiimid

N,N'-Diizopropilkarbodiimid (DIC) veya 1,3-diizopropilkarbodiimid, peptit sentezinde (amid bağı) en yaygın olarak yer alan üç karbodiimidden biridir, diğer iki karbodiimid, N,N'-disikloheksilkarbodiimid ve 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür.



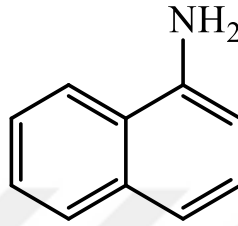
Şekil 2.15. N,N'-Diizopropilkarbodiimid yapısı

DIC, etanol ve asetonitril gibi çoğu organik çözücüyle kolayca karışabilen, suyla karışmayan bir sıvıdır ve yan ürünü olan N,N'-diizopropilüre de çoğu organik çözücünde çözünür, bu da tepkime karışımından yıkanarak giderilmesini kolaylaştırmaktadır. N,N'-diizopropilkarbodiimid, bazı organik veya biyo-organik asitlerin türetilmesi için birleştirme ajanı olarak bazı analitik yöntemlerde halihazırda uygulanmıştır (Buratti vd., 1999; Klimowska ve Wielgomas, 2018). Literatürde, DIC'nin karboksilik asitlerin ılıman koşullar ve yüksek verim ile sulu çözeltide amidleşme ve esterleşme tepkimelerinde kullanımı rapor edilmiştir (Fattahi vd., 2018). Bu bulgulara dayanarak, bir kromoforun amidleşme yoluyla çalışma altında organik asitlere bağlanmasını kolaylaştırmak için bu çalışma için DIC seçilmiştir.

2.4.4.1-Naftilamin

α -Naftilamin olarak da bilinen 1-naftilamin, birinci karbon pozisyonunda bir amino grubunun ikame (süstitüe) edilmesiyle naftalinden türevlendirilen aromatik bir amindir. Saf haliyle renksiz iğneler halinde kristalleşir, ancak havada kolayca

kahverengimsi veya kırmızımsı-mor bir renge dönüşmektedir. 1-Naftilamin suda çözünmez, ancak alkolde ve diğer birçok organik çözücünde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Hoş olmayan bir kokuya sahiptir, kolayca süblimleşmekte ve 49 °C'de ermektedir. 1-Naftilamin, naftalin kısmı nedeniyle özellikle UV bölgesinde güçlü spektral özelliklere sahiptir. Boyaların, kauçukların, antioksidanların, zirai kimyasalların, bazı ilaçların ve diğer kimyasalların sentezi için kimyasal bir ara madde olarak birçok uygulamaya sahiptir.



Şekil 2.16. α -Naftilamin yapısı

Kimyasal ve spektral özellikleri nedeniyle 1-naftilamin, analitik kimyada bir reaktif olarak birçok uygulamaya sahiptir, örneğin, 1-naftilamin, serbest yağ asitlerinin benzen ortamında asit klorürlerine dönüştürüldükten sonra tayini için kullanılmıştır (Ikeda vd., 1983). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda 1-naftilamin, suda bakır (II) iyonları Cu^{2+} (Cai vd., 2023) ve nitrit iyonları NO_2^- (Abou-Melha, 2020) tayini için reaktif olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, birleştirme ajan olarak DIC varlığında reaktif olarak 1-naftilamin ile organik asitlerin kolon öncesi türevlendirme yöntemini geliştirmeyi amaçlamaktadır. Elde edilen türevler daha sonra HPLC'de ters-faz kolonda ayrılıp UV dedektör kullanılarak tayin edilmeleri hedeflenmiştir.

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, kompleks karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, teşhis ve tayin edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, birbirine yakın bileşenlerin ayrılmasını sağlayan çeşitli ve önemli bir yöntemler grubunu içermektedir ki, diğer yöntemlerle bu ayrımlar genellikle mümkün olamamaktadır.

Kromatografinin temel prensibi, bir sabit faz ve bir hareketli fazın kullanılmasını içermektedir. Kromatografik ayrımlar sırasında, numune gaz, sıvı veya süperkritik akışkan halinde bir hareketli fazda çözülür. Bu hareketli faz, yerçekimi veya basınç etkisi altında bir kolon içinde veya katı bir yüzeyde sabitleştirilmiş bir karıştırılmaz sabit fazdan geçirilmektedir. Bu iki faz numune bileşenlerinin hareketli

faz ile sabit faz arasında farklı oranlarda dağılacak şekilde seçilir. Sabit faz tarafından kuvvetli bir şekilde tutulan bileşenler, hareketli fazın akışıyla yavaş hareket ederken, sabit faz tarafından zayıf bir şekilde tutulan bileşenler daha hızlı hareket etmektedir. Bu göç hızlarındaki fark, numune bileşenlerinin belirgin bantlar veya bölgelere ayrılmasına yol açar ve bu bantlar veya bölgeler nitel ve nicel olarak analiz edilebilmektedir (Gündüz, 2002; Skoog vd., 2018).

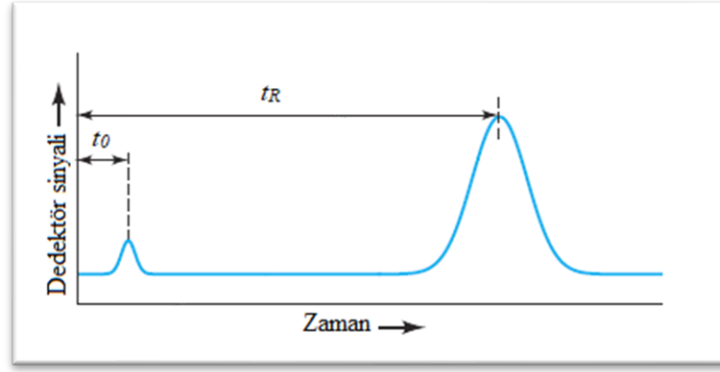
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), biyoteknoloji ve farmasötik endüstri alanında analitlerin teşhis edilmesi, karakterize edilmesi ve saflaştırılması için kullanılan önemli yöntemlerin başında gelmektedir. Bu yöntem, farklı alıkonma zamanlarına sahip çözünür moleküllerin çok dar kromatografik kolondan yüksek basınç altında bir hareketli faz ile sürükleyerek ayrılmasını ve tanımlanmasını sağlamaktadır. HPLC'nin avantajları arasında; uzun kolon ömrü, yüksek tekrarlanabilirlik, duyarlılık, kısa analiz süresi ve ayırım çeşitliliği bulunmaktadır. Bu yöntem amino asitlerden proteinlere, nükleik asitlere ve diğer birçok molekül sınıfına kadar geniş bir aralıkta analiz ve saflaştırma imkânı sunmaktadır (Konanç, 2013; Omar ve Khalifa, 2022).

2.5.1. Kromatografide Temel Kavramlar

Kromatografide, bileşenlerin tam olarak ayrılabilmesi için sistematik özelliklerin, yani alıkonma zamanı, seçicilik, kolon verimliliği ve ayırma gücü gibi temel faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Doğrukol, 2011; Meyer, 2013; Skoog vd., 2014).

2.5.1.1. Alıkonma Zamanı (t_R) ve Alıkonma Faktörü (k)

Şekil 2.17'de görüldüğü gibi, alıkonma zaman (t_R), numune enjeksiyonu anından bir analitin dedektöre ulaşması için gereken süre olarak tanımlanmaktadır. Öte yandan, sabit fazda tutulmayan türlerin dedektöre ulaşma süresi ise ölü zaman olarak tanımlanır ve (t_0) sembolü ile gösterilmektedir.



Şekil 2.17. Alıkonma zamanı gösteren tipik bir kromatogram. t_0 : ölü zamanı, t_R : maddenin alıkonma zamanı

Alıkonma faktörü (k), kapasite faktörü olarak da bilinir, kolonlardaki analitlerin göç hızlarını karşılaştırmak için önemli bir deneysel değerdir (2.1). k 'nin kolon geometrisinden veya hacimsel akış hızından bağımsız kalması özellikle önemlidir. Bu, belirli bir analit, hareketli faz ve sabit faz kombinasyonu için, kolonun geometrisinden veya hareketli fazın akış hızından bağımsız olarak alıkonma faktörünün aynı olacağı anlamına gelmektedir.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

k değeri 1'den anlamlı derecede daha düşükse analitin ölü zamana yakın bir anda kolondan çıkacağını göstermektedir. Aksine, Alıkonma faktörü çok büyükse, elüsyon süreleri aşırı uzun olur. İdeal olarak, bir karışımdaki çözücülerin Alıkonma faktörleri 1 ila 10 aralığında olmalıdır.

2.5.1.2. Seçicilik (α)

İki türün A ve B için bir kolonun seçicilik faktörü; daha fazla tutulan bileşenin alıkonma faktörünün (k_B) daha az tutulan bileşenin alıkonma faktörüne (k_A) oranı olarak tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (2.2)$$

Bu tanıma göre, (α) her zaman birden büyüktür. Seçicilik (α) ayrıca alıkonma zamanları kullanılarak deneysel bir kromatogramdan da belirlenebilmektedir.

$$\alpha = \frac{t_{R_B} - t_0}{t_{R_A} - t_0} \quad (2.3)$$

Seçicilik analitin, sabit fazın ve hareketli fazın fiziksel ve kimyasal yapısına bağlıdır ve bu faktörlerin değiştirilmesi ile değiştirilebilmektedir. Öte yandan, seçicilik kolon boyutlarından ve akış hızından bağımsızdır ve bu kromatografide çok önemli bir kavramdır.

2.5.1.3. Kolon Verimliliği

Alıkonma zamanı ve seçiciliğin yanı sıra, İyi bir ayırmanın elde edilmesine için piklerin keskin olması gerekmektedir. Bunu, birbiri ile ilgili iki terim kullanılarak ölçülebilen kolon verimliliği ile ilgilidir; plaka yüksekliği (H) ve teorik plaka sayısı (N). Bu iki değer arasındaki ilişki şu şekilde ifade edilebilmektedir.

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.4)$$

L kolon dolgusunun uzunluğudur.

Plaka sayısı (N) arttıkça ve plaka yüksekliği (H) küçüldükçe kromatografik kolonların verimliliği artar ve daha keskin pikleri elde edilebilmektedir.

Yaklaşık plaka sayısı N, alıkonma zamanı (t_R) ve pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği ($W_{1/2}$) kullanılarak hesaplayabilmektedir.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.5)$$

Plaka sayısı N ve plaka yüksekliği H, kolonlar arasında ayırma güçleri ve verimliliklerini karşılaştırmaya yardımcı oldukları cihaz üretiminde önemlidir.

2.5.1.4. Kolonun Ayırma Gücü

Ayırma gücü (R_s), bir kromatografi kolonunun A ve B analitlerini etkili bir şekilde ayırma yeteneğinin nicel bir ölçüsüdür.

Bir ayırma işleminde optimizasyon sağlamak, en verimli ayırmayı belirlemek için hızın, ayırma gücünün ve alıkonma faktörünün sistematik olarak analiz edilmesini içermektedir. Ayırma gücü ayırmayı tek tek olarak iyileştirecek veya yok edecek üç faktörün fonksiyondur:

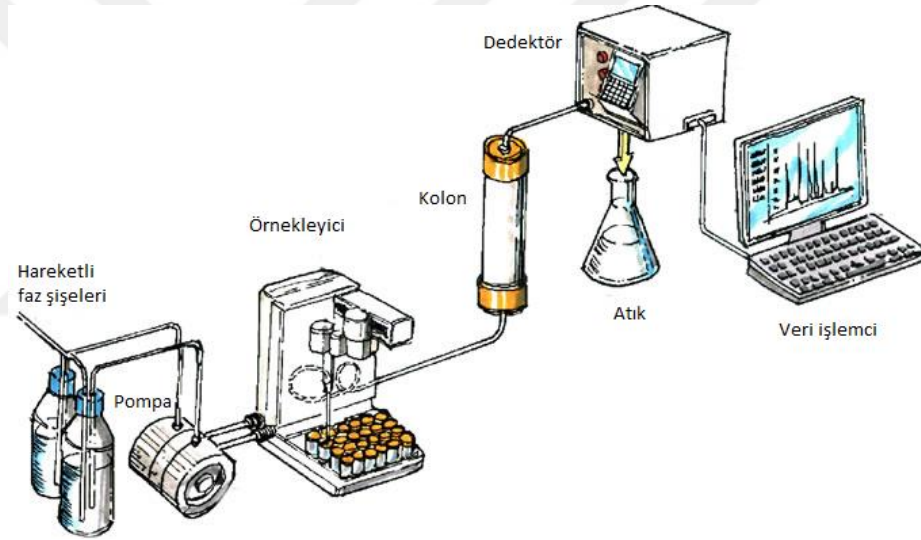
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1+k} \right) \quad (2.6)$$

N: kolon verimliliği ile ilgili olan teorik plaka sayısıdır; α : seçicilik; k: alıkonma faktörüdür.

Genellikle 2 ile 7 arasında olan k değerleri, ayırma gücü ve alıkonma zamanı arasında iyi bir uzlaşma sağlamaktadır. Bu değere ulaşmak için mobil faz rasyonel olarak ayarlanabilir ve/veya sabit faz değiştirilir ve böylece alıkonma ve seçicilik iyileştirilebilmektedir. Plaka sayısı artırmak ile kolon gücü artar ancak bu daha uzun kolon kullanmak ve analize süresini artırmak anlamına gelmektedir.

2.5.2. HPLC Cihazının Yapısı ve Kısımları

Modern HPLC'de yaygın olan 3–10 μm 'lik dolgu parçacıklarıyla iyi akış hızlarına ulaşmak için birkaç yüz atmosferlik pompalama basınçları gerekmektedir. Bu yüksek basınçlar nedeniyle, HPLC karmaşık olma eğiliminde olan özel bir donanım gerektirir. Tipik bir HPLC cihazının önemli bileşenlerinin bir şematığı Şekil 2.18'de gösterilmektedir (Lindsay, 1992; Skoog vd., 2018).



Şekil 2.18. Tipik bir HPLC cihazı

2.5.2.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri.

Modern bir sıvı kromatografi cihazı tipik olarak 500 mL veya daha fazla çözücü içeren cam hazneler içermektedir. Hareketli fazdaki çözünmüş gazları ve toz parçacıklarını ortadan kaldırmak için genellikle önlemler alınmaktadır. Çözünmüş gazlar ve parçacıklar akış hızlarını olumsuz etkileyebilir, bant genişlemesine neden olabilir ve dedektör performansını etkileyebilmektedir. Gaz gidericiler, çözünmüş gazları çıkarmak için vakum pompası, damıtma, ısıtma ve karıştırma sistemi veya inert gaz kabarcıkları üfleyici kullanabilmektedir. Filtreleme sistemleri genellikle toz ve tanecik halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemlerine zarar vermesini ve kolonu tıkamasını önlemek için kullanılmaktadır. Gaz gidericiler ve filtreler, HPLC

sisteminin ana parçaları olmayabilmektedir. Bu durumda çözücüler, bir milipor gözenekli filtreden vakum altında filtrelenerek ayrı ayrı işlenebilmektedir. Elüsyon, tek bir çözücü veya sabit çözücü karışımı ile izokratik elüsyon veya farklı polariteye sahip değişen çözücü sistemleri ile gradiyent elüsyon olarak adlandırılmaktadır. Modern HPLC cihazları, zaman içinde çözücülerin hacimsel oranı doğrusal veya üstel değişikliklerine izin vererek, ayarlanabilir oranlarda birden fazla rezervuardan sıvıları vermek için oranlama valfleri içerebilmektedir.

2.5.2.2. Pompalama Sistemleri

Sıvı kromatografik pompaların, 400 bar'a kadar basınç üretme, vuruntusuz basınç çıkışı sağlama, % 0,5 veya daha iyi bir bağıl akış tekrarlanabilirliği üretilebilirliği ile 0,1-10 mL/dk akış hızları sunma ve çeşitli çözücülerden kaynaklanan korozyona karşı dayanıklılık olma gibi özel gereksinimleri vardır. Pompalar tarafından üretilen yüksek basınçlar patlama tehlikesi oluşturmaz, ancak bir çatlak oluşturarak çözücü sızıntısına yer açar ve böylece yangın tehlikesine veya bazı çözücülerle çevreye zarar vermesine neden olabilmektedir.

LC'de İki ana pompa tipi kullanılır: pistonlu pompalar ve sürgülü pompalar. Pistonlu pompalar, motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücüü pompalayan küçük silindirlere oluşmaktadır. İki küresel kontrol musluğu çözücünün silindire giriş ve çıkış akışını düzenlemektedir. Ayrıca, hidrolik olarak kumanda edilen esnek bir diyafram kullanılarak basınç çözücüye iletilmektedir. Pistonlu pompalar, vuruntulu akış üretebilir, bu nedenle vuruntuların kromatogramdaki gürültüyü artırmaması için modern LC cihazlarında ikili pompa başlıkları veya elips kesitli kam milleri kullanılmaktadır. Gradient elüsyona uyarlanabilirlik, yüksek çıkış basınçları (700 bar'a kadar) gibi avantajlar sunmaktadırlar. Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden bağımsız sabit akış hızları oluşturabilmektedir.

Öte yandan, sürgülü pompalar genellikle kademeli bir motor tarafından çalıştırılan vidalı güdüm mekanizması ile harekete geçirilen bir sürgüsü ile donatılmış büyük, şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşmaktadır. Sürgülü pompalar, viskozite ve karşı basınçtan bağımsız bir vuruntusuz akış sağlamaktadır. Ancak sınırlı çözücü kapasiteleri ve basınç limitleri vardır. Birçok ticari cihaz, ihtiyaç duyulduğunda akış

hızını ve çözücü bileşimini ayarlamak için bilgisayar kontrollü akış ölçümü ve programlama sistemlerini içermektedir.

2.5.2.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Sıvı kromatografik ölçümlerin kesinliği genellikle numune enjeksiyon tekrarlanabilirliği ile sınırlıdır. Özellikle, yavaş numune enjeksiyonundan oluşan bant genişlemesi de kesinliği olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bu nedenle numune hacimleri küçük olmalıdır, 500 µL'den fazla olmamalı ve tercihen sistemin basıncını düşürmeden yüklenmelidir. Numune giriş sarımları, LC'de numune yüklemek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Genellikle LC cihazına entegre edilirler ve 1 µL ila 100 µL veya daha fazla numune hacimleriyle değiştirilebilir sarımlar sunmaktadırlar. Binde birkaç bağıl standart sapma ile yüksek basınç altında enjeksiyonlara izin vermektedirler. Günümüzde birçok kromatograf, numune kaplarından numuneleri sırayla enjekte edebilen otomatik enjektörlerle birlikte gelmektedir. Gözetimsiz analiz için sürekli değişken hacim ve kontrollü sıcaklık ortamları ile programlanabilir enjeksiyon sağlayabilmektedirler.

2.5.2.4. HPLC Kolonları

Sıvı kromatografi kolonları, başlıca paslanmaz çelikten ve bazı durumlarda cam veya polimer malzemeden yapılmaktadır. Boyutları ve iç dolgusu farklılık gösteren yüzlerce hazır kolon mevcuttur. Kromatografik kolonun Her zaman düz ve boyu 5-25 cm arasındadır. Analitik kolonların iç çapları 3-5 mm arasında değişebilmektedir. Dolgu maddelerinin tanecik boyutu 3-10 µm kadardır ve 1 metrelik bir kolonda 40,000 ila 70,000 tabaka bulunabilmektedir. Mikro-kolonlar ise daha kısa ve iç çapı daha küçük olan yüksek performanslı kolonlardır. Bu kolonlar, kısa sürede niteliği çok farklı bileşenleri ayırıştırma avantajı sağlar ve çözücü sarfiyatını azaltarak maliyeti düşürmektedir. Mikro-kolonlar, dolgu maddelerinin tanecik boyutları 3-5 µm ve tabaka sayısının 100,000 tabaka/m'ye kadar çıktığı hızlı ayırma imkânı sunmaktadırlar. Ters faz (RP-HPLC) ayırma kolonları, günümüzde en yaygın kullanılan kolon türlerindendir. Bu kolonlar, silika esaslı yapılarla yüksek ayırma gücü ve mekanik dayanıklılık sağlamaktadır. Dolgu maddeleri arasında silika dışında alüminyum oksit tanecikleri, gözenekli polimer tanecikleri ve iyon değiştirici reçineler de yer almaktadır.

2.5.2.5. Emniyet Kolonlar

Analitik kolonun ömrünü artırmak için emniyet kolonları kullanılmaktadır. Emniyet kolonu, çözücüdeki tanecik haldeki ve yabancı maddeleri tutmanın yanı sıra numune içindeki sabit fazda tersinmez şekilde bağlanan bileşenleri de tutulmaktadır. Emniyet kolonunun dolgu maddesi, analitik kolonunkine benzer olmalı, ancak kısa kolonlar ve büyük tanecikleri kullanılarak basınç düşüşü minimize edilmektedir. Kirlendiğinde, emniyet kolonu yeni dolgu maddesiyle doldurulur veya aynı tip yeni bir kolonla değiştirilir, böylece daha pahalı olan analitik kolon korunmaktadır.

2.5.2.6. Kolonda Sıcaklık Kontrolü

Kromatografide sıcaklık kontrolü, uygulamaya bağlı olarak değişebilmektedir. Bazı uygulamalarda kolonlar oda sıcaklığında çalışırken, daha iyi ve daha tekrarlanabilir kromatogramlar için termostatlar (ısıtıcılar) veya su ceketleri aracılığıyla sabit bir kolon sıcaklığının muhafaza edilmesi tercih edilmektedir. UHPLC'de sıcaklık kontrolü daha da önemlidir, çünkü ultra yüksek basınçlardan kaynaklanan sürtünmeli ısıtma nedeniyle kolondaki sıcaklık gradyanları meydana gelebilmektedir.

2.5.2.7. Detektörler

LC Dedektörleri, hareketli fazdaki değişiklikleri izleyerek maddeleri teşhis ve tayin etmek için kullanılan araçlardır. Sıvı akışlarındaki düşük derişimleri saptamak için akış hücreleriyle uyarlanmış geleneksel analitik aygıtlardır. Bu tür dedektörleri uyarlamak ve geliştirmek, LC geliştirmede önemli bir zorluk olmuştur.

İdeal bir LC dedektörünün istenen özellikleri arasında yüksek seçicilik, hassasiyet, çalışma aralığında doğrusallık ve ölçüm tekrarlanabilirliği bulunmaktadır. Ayrıca bölge genişlemesini en aza indirmek için minimum iç hacme sahip olmalı ve sıvı akışı uyumluluğuna uygun olmalıdır.

Sıvı kromatografik dedektörler iki ana kategoriye ayrılır. Yığın özelliği dedektörleri, çözünen maddelerden etkilenen kırılma indeksi, dielektrik sabiti veya yoğunluk gibi bir mobil faz yığın özelliğine tepki vermektedir. Öte yandan, analit özelliği dedektörleri, mobil faz tarafından paylaşılmayan UV absorbanı, floresans veya difüzyon akımı gibi özel analit özelliklere yanıt vermektedir (Lindsay, 1992; Skoog vd., 2018). Tablo 2.3'te yaygın HPLC dedektörlerini ve bunların temel performansları verilmiştir.

Tablo 2.3. Yaygın HPLC Dedektörlerin performansları (Skoog vd., 2018)

HPLC Dedektörü	Tepki	Kütle LOD*
Absorbans	Seçici	10 pg
Floresans	Seçici	10 fg
Elektrokimyasal	Seçici	100 pg
Kırma indisi	Evrensel	1 ng
İletkenlik	Seçici	100 pg–1 ng
Kütle spektrometresi	Seçici	<1 pg
FTIR	Seçici	1 µg
Fotoiyonlaşma	Seçici	<1 pg
Eleman seçici	Seçici	1 ng

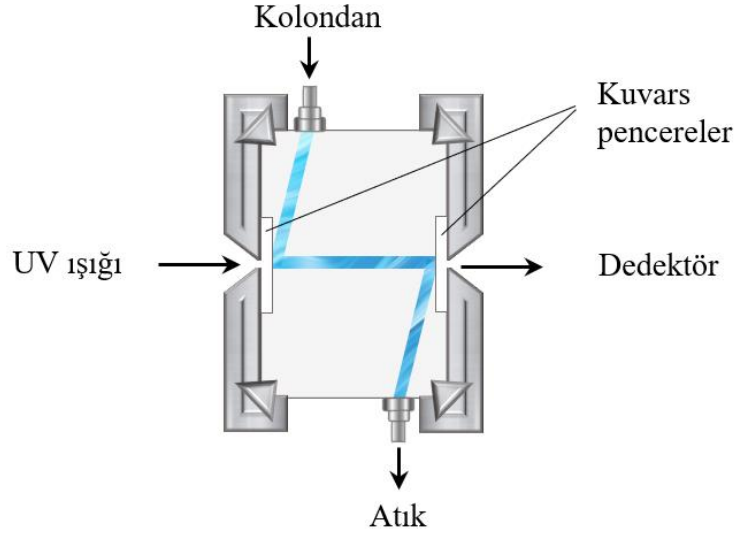
*Kütle LOD'leri (gözlenebilme sınırları) bileşiğe, cihaza ve HPLC koşullarına bağlıdır, ancak verilenler, mevcut olduğunda ticari sistemlerde tipik değerlerdir.

2.5.3. UV Dedektörler

UV dedektörleri, HPLC'de en yaygın kullanılan dedektörlerden biridir. Yalnızca uygun spektral özelliklere sahip bileşiklere yanıt verdikleri için seçici dedektörler olarak sayılırlar. UV dedektörleri genelde 190 -350 nm aralığında çalışır. Bu aralıkta olefinler, aromatik bileşikler ve çift veya üçlü bağ içeren moleküller gibi pek çok tür absorpsiyon bantlarına sahiptir. Bazı organik çözücüler UV ışığını absorb ettiğinden, algılama aralığında absorb etmeyen çözücülerin kullanılmasına dikkat edilmelidir. Bununla birlikte, LC'de kullanılan su ve asetonitril gibi birçok çözücü UV ışığı için geçirgendir (Konanç, 2017).

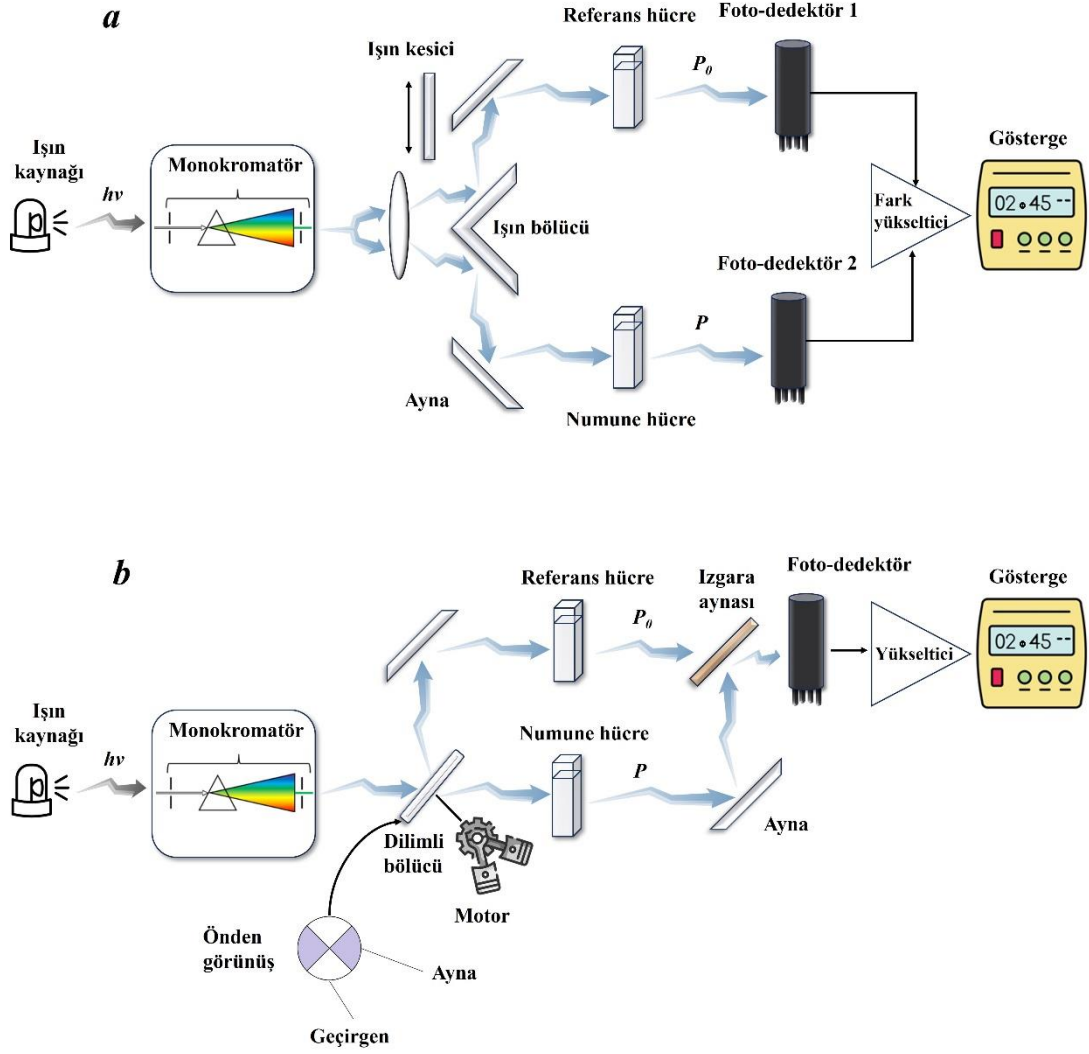
UV-Gör. dedektörlerinde UV-Gör. ışığı bir ölçüm hücresindeki bir numuneden geçer. Absorpsiyon ölçüldükten sonra Lambert-Beer yasası ($A=\epsilon bc$) numune içeriği hakkında bilgi sağlamak için kullanılmaktadır. ϵ molar absorpsiyon katsayısıdır; b cm olarak hücre uzunluğudur; c, mol/litre cinsinden numune derişimidir. Bir dedektör hücresindeki belirli bir molekül için ϵ ve b sabit olduğundan, absorbans yalnızca derişime bağlıdır ve derişimle doğru orantılıdır. 190-400 nm aralığında sürekli spektrum sağlamak için bir döteryum lambası kullanılır ve cihazlar genellikle yaklaşık 350 nm'de görünür bölgede kullanılan tungsten lambasına geçmektedir. Şekil 2.19, kromatografik kolondan çıkan eluentlerin absorpsiyonunu ölçmek için genellikle LC'de kullanılan Z şeklindeki tipik bir akış hücresini göstermektedir. Bant genişlemesini önlemek için akış hücresinin hacmi genellikle mümkün olduğu kadar

küçük olmalıdır. Tipik olarak, hücre hacimleri 1 ila 10 μL arasında değişir ve hücre yolu uzunlukları 2 ila 10 mm arasındadır (Doğrukol, 2011; Lindsay, 1992).



Şekil 2.19. HPLC'de UV- Gör dedektörü için Z şeklindeki tipik bir akış hücresidir

Birçok UV-Gör. dedektörü çift ışınli cihazlardır. Şekil 2.20'de görüldüğü gibi kaynaktan gelen ışık, istenen dalga boyunu seçmek için bir ızgaradan geçer, ardından ışın V şeklindeki bir ayna tarafından iki özdeş ışına ayrılmaktadır. Bir dizi eğri ve düz aynayalar kullanılarak, bu iki ışınlardan birisi numune hücresine yönlendirir, diğeri ise referans ışın olarak görevi görmektedir. Alternatif olarak, ışının tamamı, bir kez referans hücreden ve ardından numune hücresinden geçecek şekilde dönen bir dilimli bölücü aynası tarafından zaman karşı ikiye ayrılmaktadır. Sonunda çıktılar yükseltilir ve elektronik olarak hesaplayarak monitörde görüntülenmektedir. LC kromatogramı, zamanın bir fonksiyonu olarak absorbansın bir grafiğidir. Tek ışınli cihazlar da mevcuttur. Bu durumda, referansın şiddet ölçümleri, absorbansın hesaplanması için daha sonra geri aranmak üzere bir elektronik hafızada tutulmaktadır.



Şekil 2.20. UV-Gör. Spektrofotometrelerin cihaz genel tasarımı; a) Sabit çift ışınlı cihaz; b) Zamanlamalı çift-ışınlı cihaz

Geçmişte, Filtreli UV Absorpsiyon Dedektörleri, ışık kaynağı olarak cıva lambası olan filtreli fotometreleri kullanıyordu. Bu dedektörlerde 254 nm'deki şiddetli ışın filtrelerle izole edilmiş ve bazı cihazlar filtre değiştirmek yoluyla 250, 313, 334 ve 365 nm'deki diğer ışınlar kullanılmasına izin vermiştir. Bununla birlikte, bu tür bir dedektör, bu dalga boylarındaki ışınlardan biri absorplayan bileşiklere sınırlıdır. Birçok organik fonksiyonel grup ve anorganik tür, bu UV dalga boylarından en az birini kapsayan geniş absorpsiyon bantlarına sahiptir.

Bu tipe bağlı absorpsiyon dedektörleri olarak, kromatografi kolonundan elue edilen absorplayıcı türlerin teşhis etmek için girişim filtreli döteryum veya tungsten lambalar kullanılmıştı. Bazı cihazlar, farklı absorplayan türleri teşhis etmek için hızlı

geçiş için filtre tekerlekleri ile donatılmıştı. Günümüzde, taramalı ve diyot dizimli spektrometreleri tamamen filtre cihazlarının yerini almıştır.

Taramalı absorpsiyon dedektörleri, genellikle çoğu HPLC üreticisi tarafından optik ağırlı tarama spektrofotometreden oluşan dedektörleri piyasaya sunmaktadır. Bazı dedektörler yalnızca UV bölgesinde çalışırken, diğerleri hem UV hem de görünür bölgesini kapsamaktadır. Bu dedektörler, tüm kromatogramın tek bir dalga boyunda elde edilmesine veya zamanla yeterince ayrıldığında her bir pike ait analit için farklı dalga boylarının seçilmesine izin veren çeşitli çalışma modları sunmaktadır. Bilgisayar kontrolü genellikle her eluent için dalga boyu seçimini optimize etmek için kullanılmaktadır. Ek olarak, teşhis amacıyla, istenen dalga boyu bölgesini kapsamlı bir şekilde taramak için eluent akışı durdurulabilmektedir.

Dizimli aygıtlar olan diyot dizisi dedektörleri, en güçlü UV spektrofotometrik detektörleridir. Çalışma prensibi, geniş bir emisyon kaynağından gelen ışığın tamamının bir holografik optik ağı ve akromatik mercek sistemleri aracılığıyla dedektör hücresine yönlendirilmesine dayanılmaktadır. Bu cihazlar, yaklaşık 1 saniyede spektrumun tamamı taramasına izin verir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, kolonundan çıktığı anda toplanıp bilgisayarda saklanabilir. Analitlerin nitel ve nicel tayini için koşulların seçilmesinde yardımcı olan bu dedektörler ile üç boyutlu grafikler elde edilebilmektedir.

UV-Gör. absorbans dedektörleri, iyi seçicilik, duyarlılık (10^{-8} - 10^{-9} mg/mL) ve numuneyi tahrip etmemesi gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Pek çok HPLC çözücüsü ile düşük zemin sinyalleri vererek gradient elüsyon için uygun hale gelirler ve kullanımları kolaydır. Ancak, dikkate alınması gereken bazı sınırlamalar vardır. Analitler, UV veya görünür bölgede absorbans göstermelidir ve dedektörler, çözücülerin UV gözlenebilme değerinin altındaki dalga boylarında herhangi bir absorpsiyon göstermezler ve detektörün cevabı, belirli bir bileşiğin farklı dalga boylarında molar absorptivitesine bağlı olarak değişir; bu, farklı bileşikler arasında UV teşhisindeki duyarlılık ve seçicilik farklılıklarını açıklamaktadır (Skoog vd., 2018; Skoog vd., 2014).

2.6. Kaynak Özetleri

Badoud ve Pratz (1986) çalışmalarında; yiyecek ve içeceklerde bulunan organik asitler ile O-(4-nitrobenzil)-N,N'-diizopropilizoüre reaktifi arasında türevlendirme

işlemi gerçekleştirmiş ve oluşan türevler HPLC de UV-Gör dedektör kullanarak tayin edilmiştir. Türevlendirme tepkimesi içi karışım dioksan-su (9:1) ortamında 80°C'de 60 dakika ısıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Güçlü bir katyon değiştirici reçine (Dowex 50W-X8) türevlendirme tepkimesinden önce numune temizliği için ve tepkimeden sonra fazla reaktifi uzaklaştırmak için kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Nucleosil-5 RP-18 (250×4,0 mm iç çap; 5 µm), gradyan elüsyon: 20 dakika süresince % 20'den % 80'e asetonitril-su, akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 265 nm olarak belirlenmiştir.

Llorente vd. (1991) çalışmalarında; üzüm şırası örnekleri ve elma suyunda bulunan organik asitleri türevlendirmeden HPLC de UV-Gör dedektör kullanarak µg düzeyinde tayin etmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Beckman ODS-Ultrasfer C₁₈. (250×4,0 mm iç çap; 5µm) mobil faz formik asit (% 0,02), akış hızı 0,3 mL/dk ve dalga boyu 190 nm olarak belirlenmiştir. Glukuronik asit ile şıralarda baskın olan monosakkaritler arasında ve kinik asit ile tartarik asit arasında bazı girişimler gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Marcé vd. (1991) çalışmalarında; şaraplarda bulunan malik, asetik, tartarik, laktik, süksinik, metilmalonik, sitrik asit için fenasil bromür reaktifi ile türevlendirildi ve oluşan türevler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayini edildi. Türevlendirme reaksiyonu aseton ortamında 90°C sıcaklığında 90 dakika disikloheksan 18-taç-6 varlığında gerçekleştirildi. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Spherisorb ODS2 (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), kolon sıcaklığı: 30 °C, mobil faz: su ve metanol ile doğrusal gradient elüsyon için metanol içeriği 20 dakikada % 40'tan % 75'e çıkarıldı ve akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 254 nm olarak belirlenmiştir.

Nisperos-Carriedo vd. (1992) çalışmalarında, meyve, sebze ve içecekleri tek kullanımlık bir C₁₈ Sep-Pak kartuşundan geçirildikten sonra dehidroaskorbik, askorbik, malik, sitrik ve oksalik asitler HPLC'de diyot dizisi detektörü kullanarak tayin etmişlerdir. Ardışık üç kolonu kullanılmıştı: Spheri-5 RP-18 (110×4,6 mm iç çap) kolonu ve iki Polypore H kolonu (110×4,6 mm ve 220×4,6 mm iç çap). Diğer HPLC kromatografik şartlar, mobil faz % 2 KH₂PO₄ (pH 2,3), akış hızı 0,4 mL/dk, dalga boyu 215 ve 260 nm olarak belirlenmiştir.

Fernandez-Garcia ve McGregor (1994) çalışmalarında; fermentasyon ve depolama izlemek için, yoğurt numunelerde bulunan orotik, sitrik, pirüvik, laktik, ürik,

asetik, propiyonik ve hippurik asitleri sıvı faz ekstraksiyonu ile HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayin etmişler ve çalışmada iki ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmışlardır.

1) Asetonitril ve su ve 2) 0,01 M H₂SO₄. H₂SO₄ ekstraksiyonu kullanılarak daha iyi sonuçlar elde edildi. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: AMINEX HPX-87H iyon değiştirme kolonu (300×7,8 mm iç çap), kolon sıcaklığı 65 °C, mobil faz: 0,0075N H₂SO₄ çözeltisi, akış hızı 0,7 mL/dk, dalga boyu 210 nm, analiz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.

Lagoutte vd. (1994) çalışmalarında; sigara dumanındaki bulunan glikolik, laktik, formik ve asetik asitler ile *p*-bromidfenasil bromür türevlendirilmesi geliştirilmiş ve oluşan türevleri HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak bu maddeleri tayin etmişlerdir. Türevlendirme işlemi asetonitril ortamında 80°C sıcaklığında 1 saat disikloheksan 18-taç-6 (dicyclohexane18-crown-6) ve 1,4,7,10,13,16-heksaoksasiklooktadekan varlığında gerçekleştirilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Nucleosil 5 C₁₈ kolonu (125×3 mm iç çap), kolon sıcaklığı: 22 °C, mobil faz: asetonitril-metanol (52:48) (çözücü A) ve su (çözücü B), akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 255 nm, enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir. Gradient elüsyon: ilk 20 dakika boyunca % 39 çözücü A ile % 61 çözücü A, daha sonra 3 dakika boyunca % 61'den % 0'a çözücü A doğrusal bir şekilde değiştirildi. Çalışma, kromatografi ve kapiler elektroforez yöntemleri arasında karşılaştırılmış ve sonuçların birbirine yakın olduğu ancak CE'de sürenin daha kısa olduğunu belirlemişlerdir.

Walker (1995) çalışmasında; karbamid peroksit formülasyon numunelerde bulunan sitrik asit HPLC'de 251 nm dalga boyunda UV kullanılmış ve 20 µg/g gözlenebilme sınır ile tayin etmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Hamilton PRP-X100 iyon değiştirme kolonu (100×4,1 mm iç çap), mobil faz: NaOH ile pH'ı 4,5'e ayarlanmış 0,5 mM 1,3,5-benzentrikarboksilik asit içeren bir asetonitril-su (25:75) karışımıdır, akış hızı 1,0 mL/dk, analiz süresi 20 dk olarak belirlenmiştir.

Miwa ve Yamamoto (1996) çalışmalarında; 2-nitrofenilhidrazin hidroklorür ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılarak sitrik, tartarik, malik, laktik, asetik, süksinik ve fumarik asitlerin türevlendirilmesi geliştirilmiş ve oluşan türevleri ön işleme yapılmadan ters fazlı iyon-çifti kromatografide içeceklerde ayrılıp tayin etmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Jsphere ODS-M 80

kolonu, mobil faz: 0,005 M tetraetilamonyum (karşı iyon olarak) içeren fosfat tampon-asetonitril-metanol (80:10:10, v/v), akış hızı 2,0 mL/dk, dalga boyu 400 nm olarak belirlenmiştir.

Blanco vd. (1996) çalışmalarında, elma suyu numunelerinde bulunan kinik, malik, şikimik ve sitrik asitler kılcal HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak ng düzeyinde tayin etmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kapiler kolon: Spherisorb ODS-2 (300×0,32 mm iç çap, 5 µm), kolon sıcaklığı 20 °C, mobil faz: (0,01 M) K₂HPO₄/H₃PO₄ (pH 2,7), akış hızı 2 µL/dk, dalga boyu 206 nm, analiz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.

Rioux vd. (1999) çalışmalarında; 2-bromo-2'-asetonafton ve trietilamin kullanılarak yağ asitlerin türevlendirilmesi geliştirilmiş ve oluşan yağ asidi naftasil esterleri ters fazlı HPLC'de biyolojik numunelerde ayrılıp tayin etmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Nova-Pak C18 (250×4,6 mm iç çap; 4µm); mobil faz: Metanol-asetonitril-su; gradyan elüsyon: 80:10:10'da (v/v/v) başlayarak, 30 dakikada 86:10:4'e (v/v/v) yükselir, sonra 10 dakikada 90:10:0'a (v/v/v) çıkar, 90:10:0'da (v/v/v) 5 dakikada tutulur ve 5 dakikada başlangıç koşullarına geri dönülür; akış hızı 1,0 mL/dk; kolon sıcaklığı 30 °C; dalga boyu 246 nm olarak belirlenmiştir.

Lian vd. (1999) çalışmalarında; farmasötik kullanım için tartarik ve malik asit numunelerinde bulunan oksalik, fumarik, maleik ve süksinik asitler ters fazlı iyon baskılamalı HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayin ettiler. Bu çalışmada mobil faz olarak perklorik asit ile pH 2,10–2,15'e ayarlanmış su seçilmiş. Perklorik asit, büyük ölçüde düşük uygulama derişiminde daha güçlü asitliği ve baskılayıcı etkisi nedeniyle tercih edilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Nova-Pak C18 (150×3,9 mm iç çap; 4 µm), akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 30°C, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Jayaprakasha ve Sakariah (2002) çalışmalarında; Garcinia Cambogia özlerinde bulunan (-) hidroksisitrik asit, tartarik, sitrik ve malik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayin etmişlerdir. Bitki ekstraktından organik asitleri izole etmek için numuneler ya 8 mM sülfürik asitle ya da 5 g Dowex-50 [H⁺] reçinesiyle ön işlemlere tabi tutulmuş; Dowex-50 [H⁺] ile daha iyi sonuçlar elde edilmişti. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: µ-BondapackTM C₁₈ (300×3,9 mm iç çap), mobil faz: 6

mM sülfürik asit, akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 30°C, enjeksiyon hacmi: 20 µL, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Silva vd. (2002) çalışmalarında, ayva meyvesi ve ayva reçeli numunelerinde bulunan sitrik, askorbik, malik, kinik, şikimik, oksalik ve fumarik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayin etmişlerdir. Numune ön hazırlığı, numuneden organik asitleri metanol (40°C'de) ile ekstraksiyonu ve ardından bir ISOLUTE C₁₈ (NEC) kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonunu içermektedir. HPLC kromatografik şartları, iyon dışlama kolonu Nucleogel Ion 300 OA (300×7,7 mm iç çap), mobil faz olarak H₂SO₄ 0.01 M ile izokratik elüsyon, akış hızı 0,1 ml/dk, dalga boyu 214 nm olarak belirlenmiştir.

Cunha vd. (2002) çalışmalarında; meyve sularındaki bulunan malik, sitrik, süksinik, tartarik asitler ile O-(4-nitrobenzyl)-N,N'-diisopropylisourea reaktifi arasında türevlendirmesi geliştirilmiş ve oluşan türevleri HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak tayin etmişlerdir. Numune temizleme ve türevlendirme işlemi önceki bir çalışmaya (Badoud ve Pratz,1986) göre gerçekleştirilmiş, fakat farklı kromatografik şartlar uygulanmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Spherisorb ODS (150×4,6 mm iç çap; 3 µm), mobil faz: su (A) ve asetonyitril (B), gradyan elüsyon: 10 dakika içinde B'nin % 30 ila % 45'i, 10 dakika içinde B'nin % 45 ila % 55'i ve 10 dakika içinde B'nin % 55 ila % 80'i ve 2 dakika içinde başlangıç koşullarına geri dönüş, akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 265 nm olarak belirlenmiştir.

Shui ve Leong (2002) çalışmalarında, meyve suları ve içeceklerde bulunan organik asitlerin ve fenolik bileşiklerin HPLC'de foto diyot dizisi dedektörü kullanarak eş zamanlı tayin etmişlerdir. Elde edilen LOD, Gallik asit için 0,02 mg/L ile (-)-Kinik asit için 12,50 mg/L arasındaydı. Çalışmada gradient elüsyon kullanıldı: akış hızı 0,35 mL/dk (çözücü A) olan pH 2,5 sülfürik asit çözeltisi ve metanolün (çözücü B) akış hızı 0'dan 0,45 mL/dk'ya 15'ten 75 dakikaya çıkarıldı, sonra 0,45 mL/dk akış hızında 5 dakika tutulmuş ve bundan sonra 5 dakika sırasında başlangıç koşullarına düşürülür. HPLC kromatografik diğer şartları, kolon Shim-Pack VP-ODS (250×4,6 mm iç çap), kolon sıcaklığı 40 °C, dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir.

Suarez-Luque vd. (2002) çalışmalarında; bal numunelerde bulunan Malik, maleik, sitrik, süksinik ve fumarik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak 0,0064 ile 7,57 mg/kg aralığında gözlenebilme sınırları ile tayin etmişlerdir. Numune

temizleme (ön-işlemleri) için anyon değiştirici kartuşlarla katı faz ekstraksiyon prosedürü kullanıldı. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Spherisorb ODS-2 S5 (250×4,6 mm iç çap; 5µm), mobil faz: % 4,5 metafosforik asit (pH 2,20), akış hızı 0,7 mL/dk, dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir.

Sanarico vd. (2003) çalışmalarında; Balzamik Sirkesi numunelerde bulunan sitrik, malik, tartarik, laktik, asetik, glukonik ve süksinik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanılarak ve 0,01 ile 9,5 g/100 g aralığında gözlenebilme sınırları ile tayin etmişlerdir. Bilinmeyen maddelerin büyük birçoğu sitrik asit, tartarik asit, glukonik asit ve malik asitle örtüşüyordu. Bununla birlikte, standart bir ekleme yönteminin kullanılmasıyla genişim sorunu en aza indirildi. HPLC için kromatografik şartlar, Kolon: Bio-Rad Aminex HPX 87H Hidrojen oluşturan katyon değiştirici reçine bazlı kolon (300×7,8 mm iç çap), kolon sıcaklığı: 42 C, mobil faz: 0.004 M sülfürik asit, akış hızı 0,6 mL/dk, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Pérez-Ruiz vd. (2004) çalışmalarında, içeceklerdeki sitrik, laktik, malik, oksalik ve tartarik asitler HPLC sisteminde görünür ışıkla on-line ışınlamanın ardından kemilüminesan dedektörü ile tayin etmişlerdir. Organik asitler kolon sonrası Fe^{3+} ve UO_2^{2+} varlığında görünür ışıkla ışınlanmış ve Fe^{2+} üretilmişti. Daha sonra oksidan eklenmeden bir luminol sisteminde kemilüminesans yoğunluğu ölçülerek oluşan Fe^{2+} belirlendi. Çalışmada izokratik elüsyon kullanıldı: mobil faz: 0,005 M sülfürik asit, 0,30 mL/dk akış hızında. Fotokimyasal reaktif: (5×10^{-3} M) Fe^{3+} , (1×10^{-3} M) UO_2^{2+} , (0,01 M) H_2SO_4 , (% 0,02) poli (vinil alkol), 0,70 mL/dk akış hızında. Kemilüminesans reaktifi: 0,1 M borat tamponundaki (pH 10,8) (5×10^{-4} M) luminol 2 mL/dk akış hızında. HPLC kromatografik diğer şartlar, kolon: Ultrasfer ODS C18 (250×4,0 mm iç çap; 5µm), dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Kerem vd. (2004) çalışmalarında; şıra ve şaraptaki ana karboksilik asitlerin (sitrik, tartarik, malik, laktik, asetik dahil) ve polifenollerin ayrılması ve tayini için yeni bir sabit faz kullandılar. Synergi™ Polar-RP™ kolonu, düşük pH'lı sulu mobil fazlar için uygun olacak şekilde tasarlanmış polar uç kapaklı, eter bağlantılı fenil grupları içeren yeni bir silika bazlı kolon içermektedir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Synergi™ Polar-RP™ (250×4,6 mm iç çap; 4 µm); kolon sıcaklığı: 30 °C; mobil faz: % 0.2 trifloroasetik asit in su (pH 1,9) (solvent A) ve asetonitril (solvent B); elüsyon modu: ilk 7 dakika için yalnızca çözücü A'nın izokratik elüsyon (organik

asit ayrımı için), daha sonra, polifenollerin ayrılmasında doğrusal bir gradyan elüsyon; akış hızı: 1,5 mL/dk; dalga boyu 210 ve 280 nm olarak belirlenmiştir.

Zotou vd. (2004) çalışmalarında; şarap numunelerde bulunan Galakturonik, tartarik, malik, laktik, asetik, sitrik ve süksinik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak ve 0,001-0,05 g/L aralığında gözlenebilme sınırları ile tayin edilmişti. Numune temizleme (ön-işlemleri) için polivinilpirolidon (PVP) ve SAX kartuşları kullanılmıştı. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Inertsil ODS-2 (250×4,0 mm iç çap; 5µm), mobil faz: 0,02 M KH₂PO₄ (H₃PO₄ ile pH 2,88'e ayarlanmış) içeren su-metanol (98:2; v/v) çözeltisidir, akış hızı 0,6 mL/dk, dalga boyu 230 nm olarak belirlenmiştir.

Bravo vd. (2005) çalışmalarında; UV dedektörü ile HPLC sisteme bağlı mikrodalga ışıması ile yağ asitlerinin on-line türevlendirme yöntemi geliştirmişlerdir. Üç reaktif (2,4-Dinitrofenilhidrazin, benzoil klorür ve fenilhidrazin) test edildi. Hem 2,4-Dinitrofenilhidrazin hem de fenilhidrazin ile iyi sonuçlar elde edilmiş, ancak 2,4-Dinitrofenilhidrazin kullanınca dalga boyu 310 nm'de olduğu için girişimlerin azaldığı görüldü. On-line mikrodalga ışınlama sistemi için; 130 cm uzunluğunda ve 0,1 mm iç çapında bir reaktör sarmağı 450 W'lık mikrodalga fırın içine yerleştirilmiş ve sistem numune başına 1 dakika süreyle çalıştırıldı. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: m-Bondapack C18 (250×4,6 mm iç çap), mobil faz: metanol-su (92/8; v/v), akış hızı 0,8 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Chinnici vd. (2005) çalışmalarında; meyve sularındaki bulunan ana organik asitler (oksalik, sitrik, malik, kinik, galakturonik, askorbik, süksinik ve fumarik asit dâhil) ve şekerler (sükroz, glikoz ve fruktoz) HPLC'de iyon dışlama kromatografi modu ile UV-Gör dedektör kullanarak tayin etmişlerdir. Numune temizleme (ön-işlemleri) için Bond Elute® SAX kartuşları kullanıldı. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: katyon değiştirici reçine bazlı Bio-Rad Aminex HPX 87H kolonu (300×7,8 mm iç çap), mobil faz: 0,005 M fosforik asit, akış hızı 0,4 mL/dk, kolon sıcaklığını 25 °C, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Benassi ve Cecchi (2006) çalışmalarında, beyaz şaraplarda bulunan karboksilik asitler ve fenolik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak tayin ettiler. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Spherisorb ODS-2 (250×4,0 mm iç çap; 5 µm); mobil faz: sülfürik asit (pH 2,5) (A) / metanol (B); gradient elüsyon: 0 dk'da % 0 (B/A),

10 dk'da % 5 (B/A), 20 dk'da % 30 (B/A), 30 dk'da % 50 (B/A); akış hızı ve dalga boyu: 210 nm'de algılama ile ilk 10 dakika için 0,5 mL/dk, ardından 278 nm'de algılama ile sonuna kadar 0,7 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Chen vd. (2006) çalışmalarında; biyokütle ön arıtma hidrolizatlarındaki bazı karboksilik asitlerin (formik, malik, laktik, asetik, maleik, süksinik, fumarik asitler dâhil), aldehitlerin ve polifenollerin 0,002 ila 17 μ M aralığında gözlenebilme sınırlarında maddelerin ayrılması ve tayini için bir C30 sabit faz kullanmışlardır. YMC Karotenoid S-3 kolonu, düşük pH'lı tamamen sulu mobil fazlar için uygun olacak şekilde tasarlanmış bir C30 bağlı silika bazlı ters fazlı kolondur. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: YMC Carotenoid S-3 (150×4,6 mm iç çap; 3 μ m); kolon sıcaklığı: 30 °C; mobil faz: % 0,05 (v/v) fosforik asit (pH 2,2–2,3) (çözücü A) ve su-asetonitril (10:90) (çözücü B) ile doğrusal olmayan gradyan elüsyon; akış hızı: 1,0 mL/dk; enjeksiyon hacmi: 25 μ L; dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Rodrigues vd. (2007) çalışmalarında; demlenmiş kahve numunelerde bulunan asetik, sitrik, formik, malik, pirüvik, kinik ve süksinik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanılarak 0,4-34 mg/L aralığında gözlenebilme sınırları ile maddeleri tayin etmişlerdir. Numune temizleme (ön-işlemleri) için Strata-SAX kartuşları kullanılarak bir katı faz ekstraksiyonu (SPE) kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Gemini C18 (150×4,0 mm iç çap; 5 μ m), mobil faz: % 1 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 2,4), akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Dopico-Garcia vd. (2007) çalışmalarında; beyaz üzümelerde bulunan fenolik bileşikler ve organik asitler (oksalik, sitrik, tartarik, malik, şikimik ve fumarik asitler) HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ve 1,5-86 mg/kg aralığında gözlenebilme sınırları ile tayin etmişlerdir. Numune hazırlama için önce fenolik bileşikler ve organik asitler, 40 °C'de % 5 metanol içeren sulu HCl çözeltisi (pH 2) kullanılarak ekstraksiyonu yapılmış, ardından organik asitleri fenolik bileşiklerden ayırmak için katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulanmıştır. SPE için uç kapaksız C18 kolonları kullanılmıştır çünkü bu kolonlar apolar, polar ve katyon değişim tutma mekanizmalarına göre çalışıyor ve organik asit ayrımı için daha iyi sonuçlar verildiği için kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: iyon dışlama Nucleogel Ion 300 OA (300 mm×7,7 mm iç çap), mobil faz: 0,01 M sülfürik asit çözeltisi, akış hızı 0,2 mL/dk, analiz süresi: 60 dk, dalga boyu 214 nm olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşikler de farklı kromatografik koşullar kullanılarak belirlenmiştir.

Czauderna vd. (2008) çalışmalarında; kefir ve diğer biyolojik numunelerde bulunan kısa zincirli organik asitler (süksinik, laktik, asetik, propiyonik, bütirik asitler dahil) ile 2,4-dibromoasetofenon reaktif ile türevlendirme işlemi gerçekleştirmişler ve asidin türevlerini HPLC de fotodiyot dizisi dedektör kullanarak tayin etmişlerdir. Başlangıçta asitler, sodyum tuzlarına dönüştürülerek bazik hale getirilmiş, daha sonra elde edilen asit tuzları, fazla 2,4-dibromoasetofenon ve trietilamin ile türevlendirilmiştir. Türevlendirme işlemi aseton ortamında 45 °C'de 60 dakika ısıtılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen türevleri ışıktan korunmuş ve analiz edilene kadar 0°C'nin altında saklanmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Nova Pak C18 kolonu (300×3,9 mm iç çap; 4 µm), kolon sıcaklığı 39 °C, mobil faz: (A) su ve (B) metanol, elüsyon: doğrusal olmayan ikili gradient elüsyon programı, akış hızı 0,75 ila 3,0 mL/dk, dalga boyu 259 nm olarak belirlenmiştir.

De Quiros vd. (2009) çalışmalarında; beyaz şaraptaki ana karboksilik asitlerin (tartarik, malik, asetik, laktik, sitrik ve süksinik asitler) ayrılması ve tayini için yeni bir sabit faz kullanılmıştır. TEKNOKROMA, Tr-010065 Mediterraneana™ sea₁₈, genelde kullanılan oktadesilsilan (ODS2) kolonlarından daha yüksek toplam karbon içeriğine ve daha büyük yüzey alanına sahiptir ve dolayısıyla daha iyi bir hassasiyet ve uygun bir performans göstermişti. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: TEKNOKROMA, Tr-010065 Mediterraneana™ sea₁₈ (150×4,0 mm iç çap; 3 µm); mobil faz: % 0,1 (v/v) formik asit içeren su; akış hızı: 0,5 mL/dk; dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir.

Violeta vd. (2010) çalışmalarında; meyve sularındaki bulunan oksalik, sitrik, tartarik, malik, askorbik ve laktik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanmış ve 0,1-20 mg/L aralığındaki gözlenebilme sınırlarında tayin edilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Hypersil Gold aQ (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), kolon sıcaklığı: 10 °C, mobil faz: 50 mM fosfat çözeltisi (pH 2,8), akış hızı 0,7 mL/dk, dalga boyu 254 nm askorbik asit için ve diğer asitler için 214 nm olarak belirlenmiştir.

Moreira vd. (2010) çalışmalarında; meyve sularındaki bulunan galakturonik asit ile *p*-aminobenzoik asit reaktif olarak arasında türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiş ve asidin türevini HPLC de UV-Gör dedektör kullanarak mg/L düzeyinde tayin etmişlerdir. Meyve numunelerinin pektinden mono galakturonik asit elde etmek için enzimatik bir hidroliz ile ön-işlem yapılmıştır. Türevlendirme işlemi NaBH₃CN varlığında bir DMSO/asetik asit (70:30; v/v) çözeltisinde 60 °C'de 15 dakika ısıtılarak

gerçekleştirilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Synergi Hydro C18 (250×4,6 mm iç çap; 3µm), Gradyan modunda mobil faz: (A) su ve (B) metanol, her ikisi de % 0,1 HCOOH ve amonyum format (20 mmol L⁻¹) içerir (% 100 'den ila% 65 'e A, 40 dakika içinde indirilmiştir, Ardından 20 dakika içinde A'nın tekrar % 100 'üne çıkarılmıştır), akış hızı 0,3 mL/dk, dalga boyu 304 nm olarak belirlenmiştir. GA türevinin karakterizasyonu için HPLC ile pozitif iyon modunda elektro-sprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi dedektörü (HPLC-ESI-MS/MS) kullanılmıştır.

Uckoo vd. (2011) çalışmalarında; narenciye suyundaki bulunan üç amin (oktopamin, sinefrin, ve tiramin) ve iki organik asit (askorbik asit ve sitrik asit) HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ve 0,63-5 ng aralığındaki gözlenebilme sınırlar ile ayrılmış ve tayin edilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Xbridge C18 kolonu (150×4,6 mm iç çap; 3,5 µm), mobil faz: 0,03 mM fosforik asit, akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 223 nm ve 254 nm olarak belirlenmiştir.

Qureshi vd. (2011) çalışmalarında; fermantasyonla üretilen laktik asit numunelerdeki safsızlıklar olarak bulunan alifatik karboksilik asitler (oksalik, formik, pirüvik, sitrik, fumarik, süksinik asitler dahil) ayrılması ve tayini için yeni nesil polar gömülü (embedded) ters faz kullanılmıştır. YMC-Pack ODS-AQ kolondaki gömülü (embedded) polar kısım, % 100 sulu mobil fazda bile hidrokarbon zincirlerinin hidrofobik çöküşünü önlemesi nedeniyle daha iyi bir hassasiyet ve performans göstermiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: TYMC-Pack ODS-AQ (250 mm×4,6 mm iç çap; 5 µm); kolon sıcaklığı: 40 °C, mobil faz: 20 mM fosfat tamponu (pH 2,20); akış hızı: 1,0 mL/dk; dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Scherer vd. (2012) çalışmalarında; meyve ve meyve suları numunelerde bulunan tartarik, malik, askorbik ve sitrik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ve % 82 ile % 110 arasındaki geri kazanım değerleri ile tayin edilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: ters faz C18 (150×4,6 mm iç çap; 3µm); mobil faz: 0,01 mol/L KH₂PO₄ (pH = 2,60); akış hızı 0,5 mL/dk; dalga boyu tartarik, malik ve sitrik asitler için 210 nm ve askorbik asit için 250 nm olarak belirlenmiştir.

Eyeghe-Bickong vd. (2012) çalışmalarında; üzüm ve şarap numunelerde bulunan ana şekerler (glukoz, fruktoz) ve organik asitler (sitrik, tartarik, malik, süksinik asitler) iyon değişimli HPLC'de diyot dizisi dedektörü ve kırılma indisi detektörü

kullanarak tayin edilmiştir. Ekstraksiyon prosedürleri, % 5 (w/v) çözünmeyen polivinilpolipirrolidon ve kloroform kullanımını ve 50 °C'de 30 dakika sürekli çalkalama ile inkübasyonu kapsamıştı. Malik asit ve fruktoz arasında bir örtüşme gözlenmiş ve bu iki bileşiğin derişimlerini hesaplamak için bir dış standart kalibrasyonu ve yeni bir denklem kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Aminex HPX-87H iyon değişimli kolonu (300×7,78 mm iç çap); mobil faz: 5 mM sülfürik asit; akış hızı 0,5 mL/dk; dalga boyu 210 nm ve ek olarak fruktoz için 278 nm olarak belirlenmiştir.

De Baere vd. (2013) çalışmalarında; bakteriyel fermentasyon ortamlarında bulunan kısa zincirli asitler (formik, asetik, propiyonik, bütirik, süksinik, laktik asitler) HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak 0,13 ila 0,33 mM aralığındaki gözlenebilme sınırlar ile tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon prosedürü, dietileter kullanılarak bir sıvı-sıvı geri ekstraksiyonunu içerir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Hypersil Gold aQ kolonları (150×4,6 mm iç çap; 3 µm); kolon sıcaklığı: 30 °C, mobil faz: 20 mM of NaH₂PO₄ (pH 2,2) (A) ve asetonitril (B) doğrusal olmayan gradyan elüsyon ile; akış hızı: 0,80-1,50 mL/dk ve dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Pellegrini vd. (2014) çalışmalarında; biyolojik numunelerindeki bulunan laktat ile 9-klorometil antrasen reaktif olarak arasında türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiş ve asidin türevini HPLC de floresan dedektörü ya da diyot dizisi dedektörü kullanarak 50 nM düzeyinde tayin etmişlerdir. Türevlendirme işlemi trietanolamin ve tetra-n-bütillamonyum bromür varlığında asetonitril ortamında 70 °C'de 30 dakika ısıtılarak gerçekleştirilmişti. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: GEMINI C18 (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), kolon sıcaklığı: 40 °C, mobil faz: asetonitril-su (65/35; v/v), akış hızı 0,8 mL/dk, UV algılama için dalga boyu 365 nm olarak belirlenmiştir.

Zong vd. (2015) çalışmalarında; sirke numunelerde bulunan oksalik, laktik, asetik, süksinik, sitrik, propanoik ve D-piroglutamik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak tayin ettiler. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Waters Symmetry C18 (150×4,6 mm iç çap; 5 µm), mobil faz: metanol-0,010 M sodyum dihidrojen fosfat (pH 2,8) (2:98, v/v), akış hızı 0,8 mL/dk, kolon sıcaklığı 23°C, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Kemmer vd. (2015) çalışmalarında; meyve suyu ve sirke numunelerinde bulunan tartarik, malik, malonik, laktik, asetik, sitrik, maleik, süksinik ve fumarik asitlerin UV dedektörü kullanılarak ters faz HPLC ile ayrılması ve tayini için bakır (II) iyonu ile on-line kompleksleştirme gerçekleştirmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Inertsil ODS 3 (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), kolon sıcaklığı: 40 °C, mobil faz: 10 mM bakır (II) sülfat içeren 5 mM sülfürik asit çözeltisi (pH 2,3), akış hızı: 0,8 mL/dk, dalga boyu 240 nm olarak belirlenmiştir.

Hazer vd. (2016) çalışmalarında; anadolu karaçamı numunelerinde bulunan oksalik, tartarik, formik, laktik, asetik ve sitrik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ve 1,16 mg/L ile 4,01 mg/L aralığında gözlenebilme sınırları ile tayin gerçekleştirildi. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Inertsil C₁₈ ODS-3 (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), mobil faz: su (pH 2,0'ye H₂SO₄ ile ayarlanmış) ve asetonitril (95:5, v/v) karışımıdır, akış hızı 0,8 mL/dk, kolon sıcaklığı 60 °C, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Filip vd. (2016) çalışmalarında; meyve suyu ve doğal meyve suları ile hazırlanan dış beyazlatma jeli numunelerinde bulunan oksalik, sitrik, tartarik, malik ve süksinik asitler HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak ve 0,15 mg/L ile 2,47 mg/L aralığında gözlenebilme sınırları ile bu maddeleri tayin etmişlerdir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Carbosep Coregel 87H3 kolon (300×7,8 mm iç çap), mobil faz: 0,005 M sülfürik asit çözeltisi, akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C, dalga boyu 214 nm olarak belirlenmiştir.

Hou vd. (2016) çalışmalarında; halojenli karboksilik asitler (monokloroasetik asit, monobromoasetik asit, dikloroasetik asit, 2-kloropropiyonik asit, 2-bromopropiyonik asit ve 3-kloropropiyonik asit) ile 2-Nitrofenilhidrazin hidroklorür türevlendirmesi geliştirilmiş ve oluşan türevleri ön-işleme gerek kalmadan HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ayırıp tayini gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme için asetonitril-su (70:30) ortamında oda sıcaklığında 2 saat birleştirme ajanı olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Inertsil ODS-3 kolonu (250 mm×4,6 mm iç çap; 5 µm), kolon sıcaklığı: 40 °C, mobil faz: asetonitril (çözücü A) ve % 0,1 fosforik asit (çözücü B), akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 392 nm, enjeksiyon hacmi: 20 µL olarak belirlenmiştir. Gradient elüsyon: ilk 10 dakika boyunca % 28'den % 40'a eluent A, 4

dakika boyunca sabit ve sonra 6 dakika boyunca % 55'e eluent A gönderilir, ardından anında başlangıç şartlarına dönülür ve 10 dakika boyunca hareketli faz gönderilir.

Büyüktuncel (2017) çalışmasında; doğal ve ticari portakal sularında bulunan oksalik, tartarik, malik, askorbik, laktik, asetik, sitrik, fumarik asitler HPLC'de diyot dizisi dedektörü kullanarak ve 0,2 mg/L ila 50 mg/L aralığında gözlenebilme sınırları içerisinde maddeleri tayin etmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Inertsil ODS-4 C18 (250×4,0 mm iç çap; 5µm), mobil faz: 10 mM KH₂PO₄ (pH=2,2), akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 60 °C, dalga boyu, 245 nm askorbik asit için ve diğer asitler için 210 nm olarak belirlenmiştir.

Mortera vd. (2018) çalışmalarında; süt ürünleri ve şarap numunelerinde bulunan kısa zincirli organik asitler (ör., malik, oksalik, formik, laktik, asetik, sitrik, süksinik, tartarik asitler) diyot dizisi detektörlü RP-HPLC'ye bağlı çok değişkenli kalibrasyon kullanılarak bir tayin yöntemi gerçekleştirmişlerdir. Çalışma, yakın alıkonma zamanına sahip pikleri, kromatogramlar arasında zaman sensörü tutarsızlıkları ve ilk kalibrasyon sürecinin bir parçası olmayan beklenmedik bileşiklerin varlığını içeren zorlukların olduğu bir sistemde iyi çözünürlük elde etmeyi amaçlamıştı. İkinci dereceden kalibrasyon algoritmalarında veri işleme için paralel faktör analizi ve katlanmamış kısmi en küçük kareler yöntemleri, artıklı çift doğrusallaştırma ile kullanılmıştır. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Zorbax SB C18 (150×4,6 mm iç çap; 5 µm), mobil faz: 20 mmol/L fosfat tamponu (pH 2,20), akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 206 ila 288 nm dalga boyu aralığı olarak belirlenmiştir.

Yu vd. (2020) çalışmalarında; yenilebilir mantarların kültür besiyerinde bulunan 13 organik asit (oksalik, maleik, sitrik asit, tartarik, malik, süksinik, fumarik asit dahil) HPLC'de UV-Gör dedektör kullanarak ve 0,05 µg/mL ila 10,63 µg/mL arasına gözlenebilme sınırlarında maddeler tayin edilmiştir. Yeterli ayrımı elde etmek için ligand değiştirme modunda çalışan ve eşzamanlı şekerler ve organik asitleri ayırabilen iki şeker kolonu (yani SH1011 kolonu ve KC-811 kolonu) kullanılmıştı. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: Shodex SH1011 kolon (300×8,0 mm iç çap; 6 µm) ve Shodex KC-811 kolon (300×8,0 mm iç çap; 6 µm), mobil faz: 4 mmol/L HClO₄ çözeltisi, akış hızı 1,0 mL/dk, kolon sıcaklığı 60 °C, dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir.

Uzhel vd. (2021) çalışmalarında; içeceklerde organik asit profilin ve inorganik iyonların tayini için hiper dallanmış fonksiyonel tabakaya sahip yeni bir kimyasal olarak türevlenmiş bir anyon değiştirici geliştirmişlerdir. Hem ikincil (sekonder) hem de birincil (pimer) aminler, PS-DVB mikroküresel parçacıkların hiper dallanması için kullanıldı (çapraz bağlanma derecesi % 50, parçacık boyutu $5,5 \pm 0,5$ μm). Oluşan parçacıklar daha sonra paslanmaz çelik bir kolon (50 mm×4,0 mm iç çap) içine dolduruldu. Seyreltilmiş numuneler, kolonu kirletebilecek aromatik bileşiklerden kurtulmak için analizden önce stiren-divinilbenzen kartuşlarından (Strata® SDBL 100 μm , Phenomenex) geçirildi. Elde edilen yeni anyon değiştirici M4-DEA, iletkenlik detektörü ile bastırılmış iyon kromatografi (IC) sisteminde kullanıldı. Mobil faz olarak KOH çözeltisi kullanıldı: 1,0 mL/dk'lık bir akış hızında 120 dakikada 4 mmol/L KOH'dan 40 mmol/L KOH'a gradient elüsyon hareketli fazı kullanıldı.

Shojaee AliAbadi vd. (2022) çalışmalarında; limon suyu numunelerde bulunan sitrik asit, izo-sitrik asit ve malik asit HPLC'de tandem kütle spektrometresi kullanarak ve 0,32 mg/L ila 7,8 mg/L aralığında gözlenebilme sınırlarında tayinler yapıldı. MS/MS sistemi, bir elektrosprey kaynağı (Z-sprey) ile donatılmış ve negatif iyonizasyon modunda çalıştırılan üçlü dört kutuplu bir kütle spektrometresinden (Quattro Micro) meydana gelmişti. HPLC için kromatografik şartlar, kolon: GL Science ODS C18 sütunu (250 mm×4,6 mm iç çap; 5 μm); mobil faz: (A) su/formik asit % 0,1 ve (B) metanol/formik asit % 0,1'dir; Gradyan elüsyon: ilk 3 dakikada % 100 çözelti (A), ardından 14 dakika boyunca % 90 (A) / % 10 solüsyon (B), ardından 11 dakika boyunca % 100 çözelti (A); akış hızı 0,4 mL/dk ve kolon sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir.

Mei vd. (2022) çalışmalarında; D-malik asit ve L-malik asit enantiyomerleri ile (R)-1-(1-naftil)etilamin türevlendirme tepkimesi geliştirilmiş ve oluşan türevleri ters faz HPLC'de L-malik asit bazı bazı ilaçlarda ayrılmış ve tayin edilmiştir. Malik asidin karboksil grubunu aktive etmek için 1-hidroksibenzotriazol ve 1-etil-3-(3-dimetillaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanıldı. Türevlendirme tepkimesi 40 °C'de 2 saat asetronitril ortamında gerçekleştirilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar, Kolon: Kromasil C18 kolonu, mobil faz: asetronitril-0,01 mol/L potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (pH 2,80) (45:55, v/v), akış hızı 1,0 mL/dk, dalga boyu 225 nm, enjeksiyon hacmi: 20 μL olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Sitrik asit, $C_6H_8O_7$, Merck (Analitik saflıkta)
2. Di-sodyum DL-malat, $C_4H_4Na_2O_5$, Merck (Analitik saflıkta)
3. Tartarik asit, $C_4H_6O_6$, Merck (Analitik saflıkta)
4. Süksinik asit, $C_4H_6O_4$, Fluka (Analitik saflıkta)
5. 1-Naftilamin, $C_{10}H_9N$, Merck (Analitik saflıkta)
6. N,N'-diizopropilkarbodiimid, $(CH_3)_2CHN=C=NCH(CH_3)_2$, TCI (> % 98,0)
7. Etanol, C_2H_5OH , J.T.Baker (HPLC saflıkta)
8. Metanol, C_2H_3OH , J.T.Baker (HPLC saflıkta)
9. Asetonitril, C_2H_3N , Merck (HPLC saflıkta)
10. Tetrahidrofuran, C_4H_8O , Merck (HPLC saflıkta)
11. Sodyum hidroksit, NaOH, Merck
12. Hidroklorik asit, HCl, Sigma-Aldrich
13. Fosforik asit, H_3PO_2 , Merck

3.2. Kullanılan Cihazlar

1. UV-Görünür Spektrofotometre (Evolution array EA-1301005, Thermo Scientific)
2. HPLC (Shimadzu), pompa (LC-20 AT), gaz giderme ünitesi (DGU-20A_{3R}), dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-10AS vp), otomatik örnekleyici (SIL-20A), kolon (InertSustain[®] AQ-C18 (250×4,6 mm iç çap; 5 µm), GL Sciences Inc.), LCSolution 1.25 yazılımı tarafından kontrol edilmektedir.
3. FTIR spektrometresi (Perkin-Elmer), 4 cm⁻¹'lik bir spektral çözünürlüğe sahiptir.
4. pH metre (Multi-parameter Analyzer C864, Consort[™]), kombine pH elektrot (blueline 17 pH, Schott Instrument)
5. Ultra saf su cihazı (Direct8, MilliQ[®])

6. Etüv (Elektro-mag)
7. Hassas terazi (0,0001 g duyarlılıkta, ViBRA)
8. Vortex karıştırıcı (Zx³, VELP Scientifica)
9. Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (wisestir MSH-20A, Dathan Scientific)

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Tablo 3.1 'de gösterilen ve çalışmada kullanılan her bir organik asit için derişimi 1×10^{-2} M olacak şekilde alınarak uygun miktarda terazide tartılmış ve saf su ile çözülerek 100 mL'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler buzdolabında saklanmış, daha seyreltik çözeltiler bu stok çözeltilerden yararlanılarak ve saf su ile seyreltilerek elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan organik asitler veya organik asitlerin tuzları

Maddenin adı	Kapalı formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Sitrik asit	$C_6H_8O_7$	192,12
Di-sodyum DL-malat	$C_4H_4Na_2O_5$	178,05
Tartarik asit	$C_4H_6O_6$	150,09
Süksinik asit	$C_4H_6O_4$	118,09

1-Naftilamin (NA) çözeltisi hazırlamak için, 1-naftilaminden terazide 1,7183 g (12 mmol) tartılarak küçük bir behere konulmuş ve üzerine bir miktar etil alkol eklenip çözülmüştür. Çözünen naftilamin balon jöjeye aktarılmış ve etil alkol ile 100 mL 'ye tamamlanarak 0,12 M derişimde NA çözeltisi hazırlanmıştır.

N,N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) sıvı faz durumunda olduğundan yoğunluğu dikkate alınarak molar derişimi 6,33 M olarak hesaplanmıştır. DIC çözeltisi hazırlamak için, DIC çözeltisinden pipet ile 3,95 mL (25 mmol) alınarak balon jöjeye aktarılmış ve etil alkol ile 50 mL 'ye tamamlanarak 0,5 M derişimde DIC çözeltisi hazırlanmıştır.

Gerçek numuneler için tüketime hazır elma suyu (% 100 meyve suyu), portakal nektarı ve karışık meyve suyu (her bir meyve suyu oranı bilinmiyor) yerel bir marketten temin edildi. Satın alınan meyve sularının son kullanma tarihleri Tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2. Gerçek numune uygulamasında kullanılan meyve sularının son kullanma tarihleri

Meyve suyu	Son kullanma tarihi
1) Elma suyu	11-08-2023
2) Portakal suyu	15-08-2023
3) Karışık meyve suyu	18-08-2023

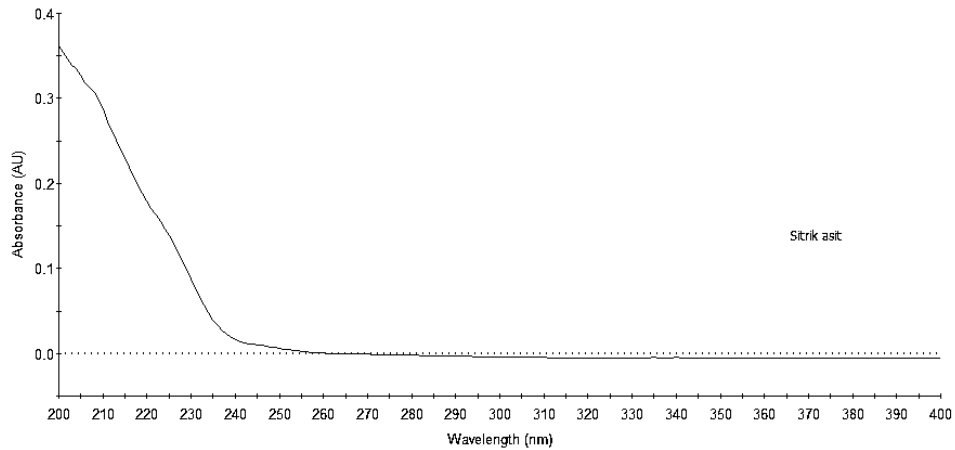
Elma suyu ve karışık meyve nektarı analiz edilmeden önce 0,45 µm gözenekli membran filtrelerden süzildükten sonra kullanılmıştır. Ancak, portakal nektar numunesi koloidal bir dokuya sahiptir. Bu nedenle, kolloidal parçacıkların analiz prosedürlerini etkilemesini önlemek ve berrak bir numune çözeltisi elde etmek için, 1 mL portakal nektar numunesine pH 11 olana kadar 1 M NaOH çözeltisinden ilave edilmiş, daha sonra 1 M HCl çözeltisi ile nötrleştirilerek pH değeri 3,5 yapılmıştır. Bunun sonucunda kolloidal parçacıklar çöktürülerek ortamdan uzaklaştırıldı ve daha sonra çözelti süzülerek saf su ile 5 mL'ye kadar seyreltildi, böylece portakal nektar numunesi türevlendirmeye hazır hale getirildi.

Gerçek numunelerin türevlendirme işlemi için, her bir meyve suyu numunenin 1 mL'si saf su ile 5 mL'ye seyreltilmiş (portakal nektarı numuneleri hariç) ve standart çözeltilere uygulanan türevlendirme işlemleri gerçek numunelere de uygulanmıştır.

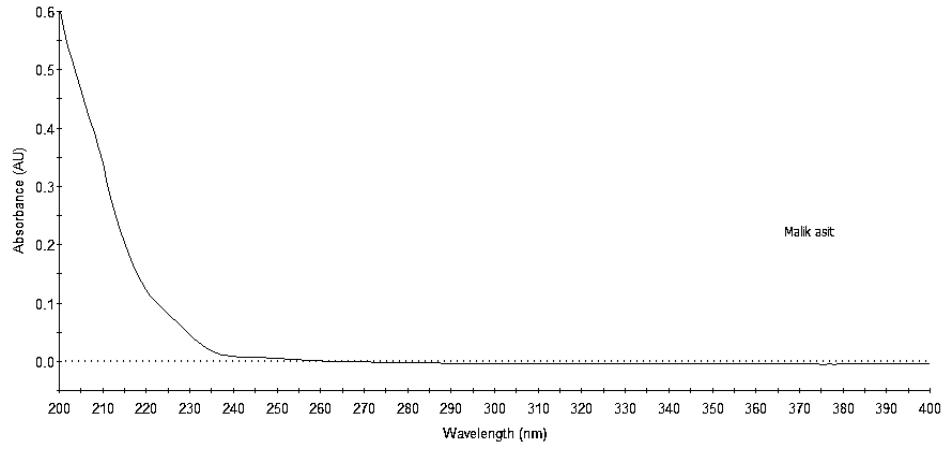
3.4. Deneysel Çalışmalar

3.4.1. Organik Asitlerinin UV Spektrumları

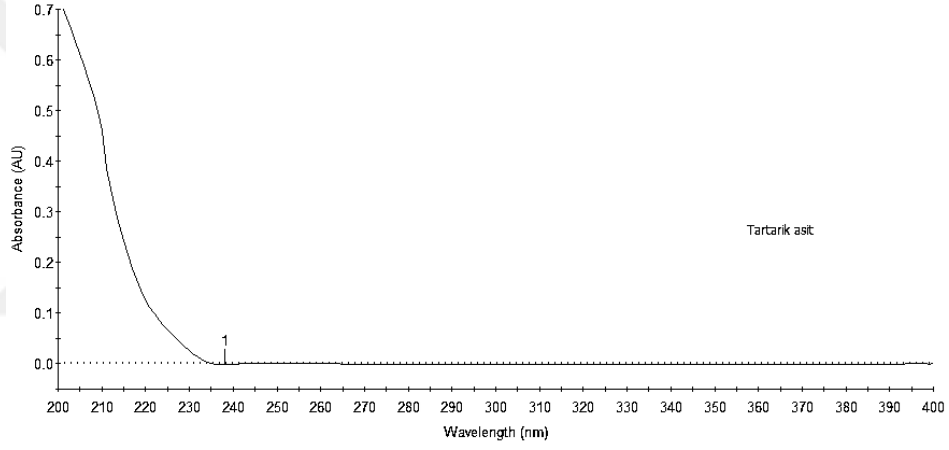
Önceden hazırlanmış her bir stok organik asit çözeltisinden yararlanarak 1×10^{-3} M derişimde yeni standart çözeltiler elde edildi ve bu çözeltilerin UV spektrumları kör çözeltiye karşı (saf su) UV cihazında ölçüldü. Ölçülen spektrumlar spektrofotometre cihazından alındığı şekli ile aşağıda verildiği gibidir.



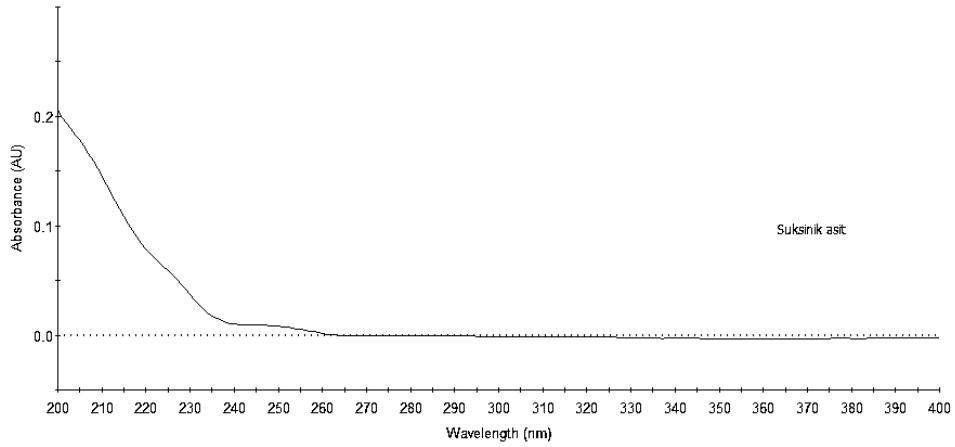
Şekil 3.1. 1×10^{-3} M Sitrik asit çözeltisinin UV spektrumu



Şekil 3.2. 1×10^{-3} M Malik asit çözeltisinin UV spektrumu



Şekil 3.3. 1×10^{-3} M Tartarik asit çözeltisinin UV spektrumu



Şekil 3.4. 1×10^{-3} M Süksinik asit çözeltisinin UV spektrumu

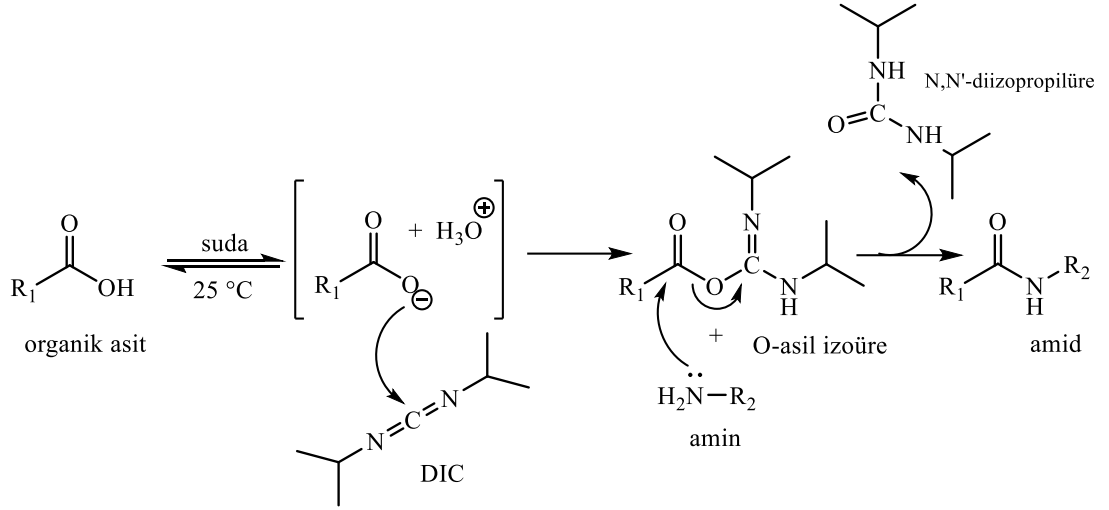
Yukarıda şekilleri verilen organik asitlerin UV spektrumları incelendiğinde, 240 nm dalga boyundan sonra herhangi bir absorpsiyon gözlemlenmediği ve böylece elde

edilen spektrumların absorpsiyon şiddetlerinin son derece zayıf olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bu nedenle, söz konusu asitlerin genellikle UV dedektör kullanılarak doğrudan belirlenmesi çok zordur. Buna göre, organik asitlerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) UV dedektör kullanılarak tayin edilebilmeleri için daha güçlü absorpsiyon şiddetlerine sahip türevlerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Çalışma kapsamında, organik asitleri 1-naftilamin ile birleştirme ajanı karbodiimidin varlığında türevlenerek bu organik asitlere bir kromofor grup ekleme çalışmaları yapıldı. Bu amaçla 1-naftilamin reaktifi kullanıldı. Çünkü 1-naftilamin, UV bölgesinde konjugasyon ve π - π^* geçişleri göstermesi nedeniyle güçlü bir absorbans bandına sahip naftil halkasına sahiptir.

Yukarıda bahsedildiği gibi, karbodiimidler ilk olarak 1955'te Sheehan ve Hess tarafından amidleşme tepkimelerini katalize etmek için uygulanmıştır. Bundan sonra karbodiimidler ayrıntılı bir şekilde incelenmiş ve amidleşme, esterleşme ve peptit sentezi için en önemli birleştirme ajanlarından biri haline geldiği görülmüştür. Ayrıca, literatürde karbodiimidler, betain formülasyonunda bulunan haloasetik asitler ile 1-naftilamin arasındaki türevlendirme tepkimesini gerçekleştirmek için birleştirme ajanları olarak kullanılmıştır (Ghassempour vd., 2006). Türevlendirme tepkimesi benzen ortamında 90 °C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Ancak başka bir çalışma, amidleşme tepkimelerin N,N'-diizopropilkarbodiimid varlığında ve sulu ortamlarda gerçekleşebileceğini göstermiş (Fattahi vd., 2018). Fattahi vd. göre su, organik asitlerin asitliğini artırır ve iyonlaşmalarını kolaylaştırır, bu da aktivitelerinin artmasına ve DIC ile tepkimelerinin hızlanmasına yol açar. Bu özellik dikkate alınarak, organik asitlerin sulu ortamda 1-naftilamin ile türevlendirmesi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

3.4.2. Organik Asitlerin Türevlendirme Çalışmaları

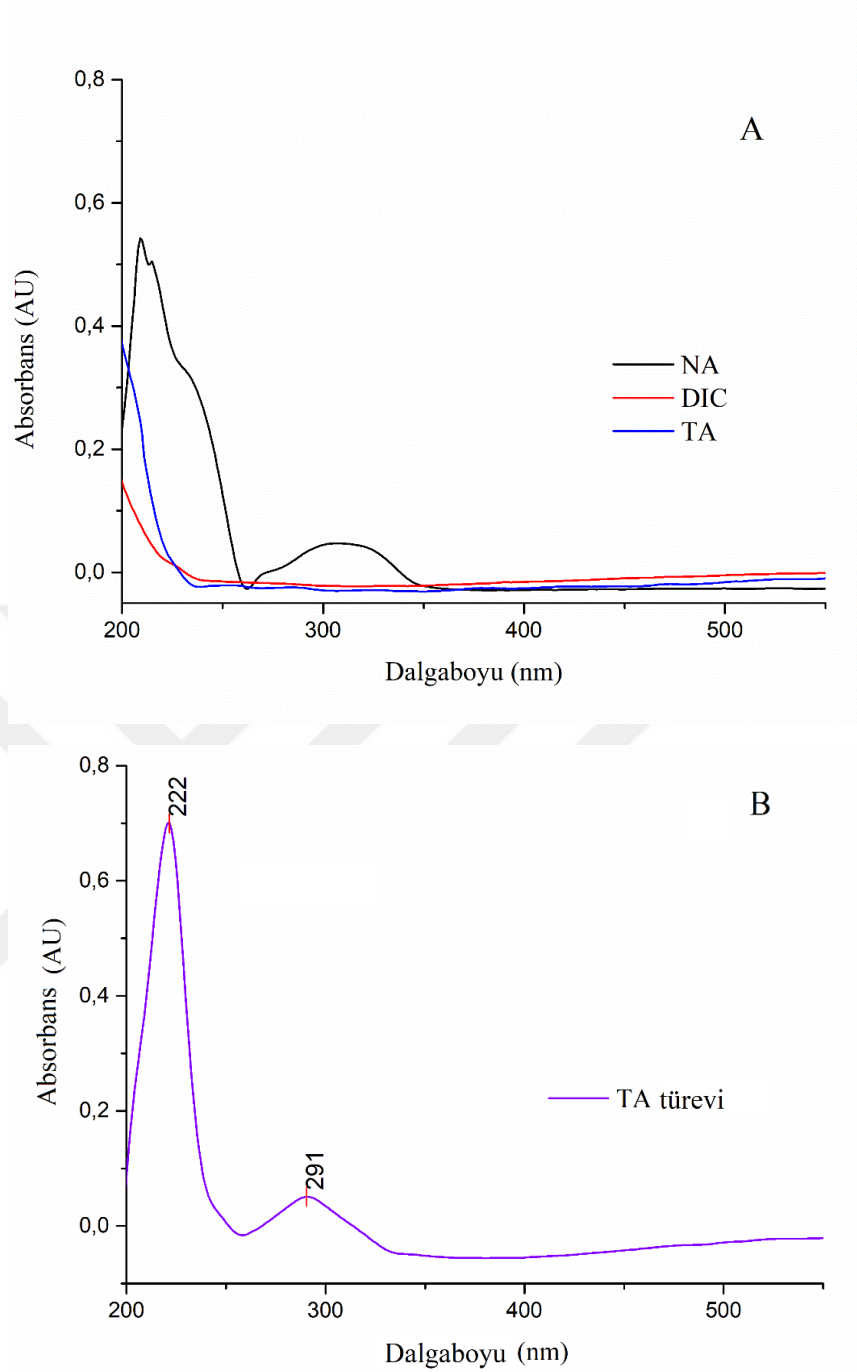
N,N'-diizopropilkarbodiimid varlığında, su ortamında ve oda sıcaklığında, organik asitler ve aminler arasında bir amidin oluştuğu tepkimeyi şu şekildedir:



Şekil 3.5. DIC varlığında ve su ortamında, organik asitler ile aminler arasında meydana gelen tepkime

Literatürde organik asitlerin türevlendirmesi için bu tepkime üzerinde yapılan çalışmalar söz konusudur. Bu çalışmada ise, bu tepkime modifiye edilerek kullanıldı ve organik asitler amid türevlerine dönüştürüldü. Bu amaçla tiramin, fenilendiamin ve 1-naftilamin gibi birkaç amin bileşiği türevlendirme tepkimesi için çalışıldı ve en iyi sonuçların 1-naftilamin bileşiği ile elde edildiği görüldü. Organik asit amid türevlerinin absorpsiyon spektrumları 200 ila 750 nm arasında UV-Görünür spektrofotometrede tarandı. Tüm spektrumlar, önceki çalışmalardaki verilerle tutarlı olarak 222 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği gözlemlendi (Ghassempour vd., 2006). Bu nedenle, organik asitlerin amid türevleri için UV spektrometrede dalga boyu 222 nm değerine ayarlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda organik asitler amid türevlerine dönüştürülmüş ve oluşan organik asit türevleri çöktürülerek ayrılarak ortamdaki fazla reaktiflerin elimine edilmesi sağlanmıştır.

Organik asitlerin amid türevlerini elde etmek için, (0,02 mmol) organik asit içeren her bir standart çözeltinin 5 mL'sine, 0,12 M NA çözeltisinden 1,6 mL ilave edilmiş ve pH, 1 M HCl kullanılarak 3,5'e ayarlanmıştır. Daha sonra ortama 0,5 M DIC çözeltisinden 0,4 mL ilave edilmiş ve tepkime karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen çökelek süzülülerek birkaç kez % 30 (v/v) etanol çözeltisiyle yıkanmış, ardından 5 mL % 30 (v/v) THF/ACN içerisinde çözölmüştür. Bu çözeltiden alınan bir kısım asetonitril ile seyreltilerek UV-Gör. spektrumu alındı. Bu çalışmalar sonucu elde edilen tartarik asidin amid türevinin spektrumu ile reaktiflerin spektrumları Şekil 3.6'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.6. Organik asitleri temsil eden TA ile başlangıç reaktiflerin ve tartarik asit amid türevinin UV-Gör. spektrumları. A:1-naftilamin (NA), N,N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) ve tartarik asit (TA) ($5 \times 10^{-4}M$); B: tartarik asit amid türevi ($10^{-5}M$).

Laboratuvarıda türevlendirme işlemi sonucunda katı faz olarak elde edilen sitrik asit (CA), malik asit (MA), tartarik asit (TA), süksinik asit (SA) türevlerinin renkleri Şekil 3.7'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.7. Organik asit amid türevleri: MA, malik asit; CA, sitrik asit; TA, tartarik asit; SA, süksinik asit

Elde edilen bu organik asit amid türevlerinin UV bandlarındaki absorpsiyon şiddetlerinin arttığı elde edilen spektrumlardan gözlemlenmiştir. Organik asit amid türevlerinin ters-faz HPLC sisteminde ayrımları iyi bir resolusyon ile sağlanmış, ve böylece absorpsiyon şiddetlerinin artması sonucu UV spektrofotometrik dedektör kullanılarak meyve suyu numunelerindeki organik asitlerin analizleri başarı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

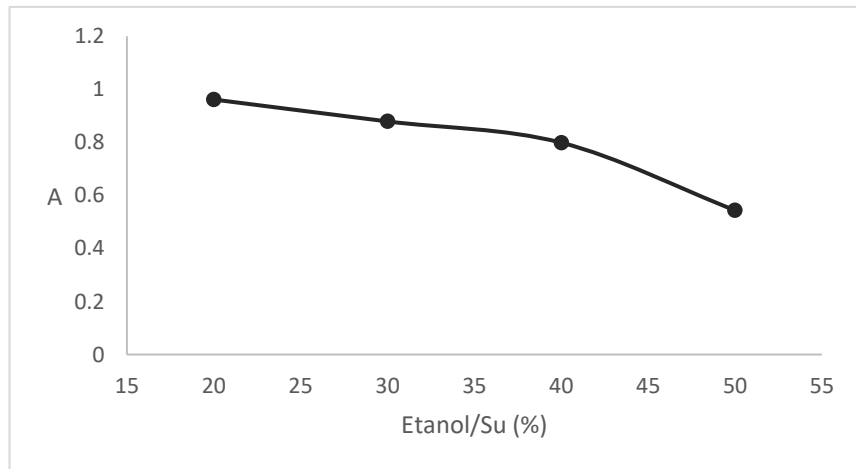
4.1. Optimizasyon Çalışmaları

Organik asitlerin UV absorpsiyon band şiddetleri çok düşük olduğu için absorpsiyon şiddetlerini artırması amacıyla türevlendirilmeleri hedeflenmiştir. Bu amaçla, organik asitlerin amid türevlerine dönüştürülme tepkimesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu hedef doğrultusunda, türevlendirme tepkimesine etki eden ve önem arz eden bazı parametreler üzerinde çalışılmış ve elde edilen değişimler aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Türevlendirme Tepkimesine Çözücünün Etkisi

Gerçek numunelerin sulu ortamda analizi yapılacağı için türevlendirme tepkimesi su ortamında gerçekleştirilmiştir. Ancak, reaktiflerin çözünmesini kolaylaştırmak ve amidlerle çökelek oluşturmalarını önlemek için ortama etanol eklenmiştir. Bu nedenle ortamdaki etanolün etkisi araştırıldı. Araştırma sonucu etanol yüzdesi arttırıldığında oluşan çökeleğin bir kısmını çözmesi tepkimenin verimini düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Şekil 4.1'de görüleceği gibi, türevlendirme tepkimesindeki etanol oranı 20-50 arasına değiştirilmiş ve optimum etanol oranı % 20-40 arasında bulunmuştur. Bu nedenle türevlendirme reaksiyonu için ortamdaki optimum etanol/su oranı olarak % 30 (v/v) seçilmiştir. Etanol yerine metanol çözücüsü de test edilmiş ve benzer bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Etanol, metanolden daha az toksik olduğu için etanol kullanımı tercih edilmiştir.



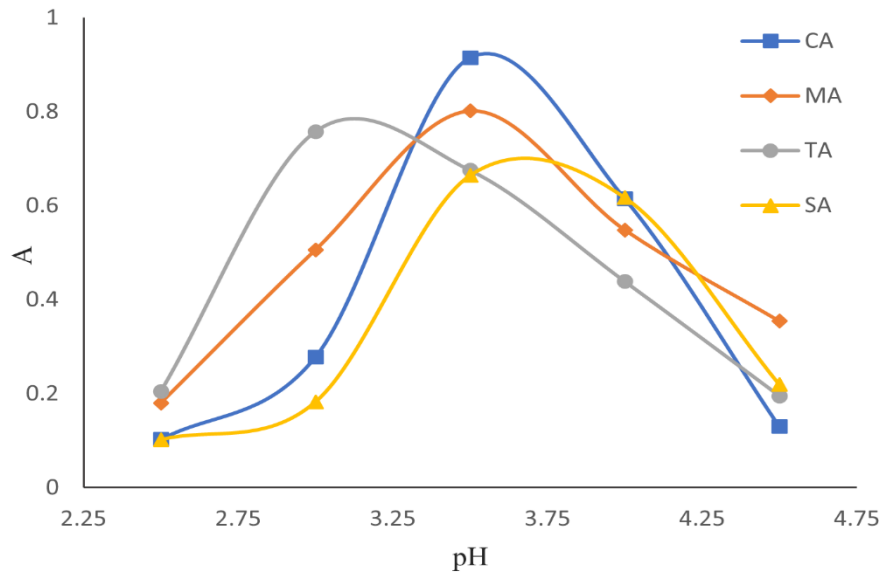
Şekil 4.1. Tartarik asidin türevlendirme tepkimesine etanolün etkisi

Tartarik asit kullanılarak yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar, diğer organik asitler için ortalama olarak aynı değer ile benzerlik göstermiştir.

4.1.2. Türevlendirme Tepkimesine pH'ın Etkisi

Organik asitlerin aminlerle karbodiimit varlığında türevlendirme tepkimesi, zayıf asit ortamında gerçekleşir (Mojarradi, 2010; Nakajima ve Ikada, 1995). Türevlendirme tepkimesi sonucu oluşan ürünün verimi üzerine ortamın asitliğinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, her organik asit için farklı pH değerlerinde (2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5) türevlendirme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra çözeltiler süzölmüş ve çökelek tetrahidrofuran'da çözülmüştür. Bu çözeltilerden bir kısım alıp asetronitril ile seyreltilmiş ve UV spektrumları alınmıştır. pH değişimine karşı 222 nm dalga boyunda absorpsiyon şiddetleri ölçölmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Şekilden de göröleceğı gibi, ortamın pH'ının türevlendirme tepkimesini önemli derecede etkilediğı görölmüştür. Farklı organik asit türevleri farklı pH değerlerinde (3-4) farklı optimum pH değerine sahiptir. Bu verilere göre türevlendirme tepkimesi için pH=3.5 değerinin en uygun pH değeri olduğı belirlenmiştir.

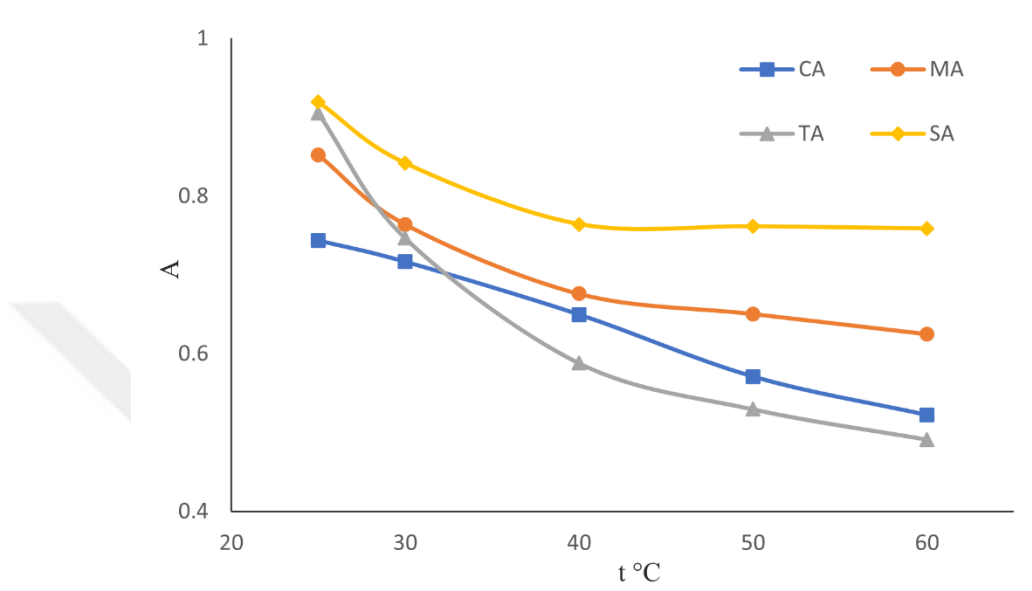


Şekil 4.2. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine pH'nın etkisi

4.1.3. Türevlendirme Tepkimesine Sıcaklığın Etkisi:

Çalışmada organik asitlerin türevlendirilmesine sıcaklığın etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C) her

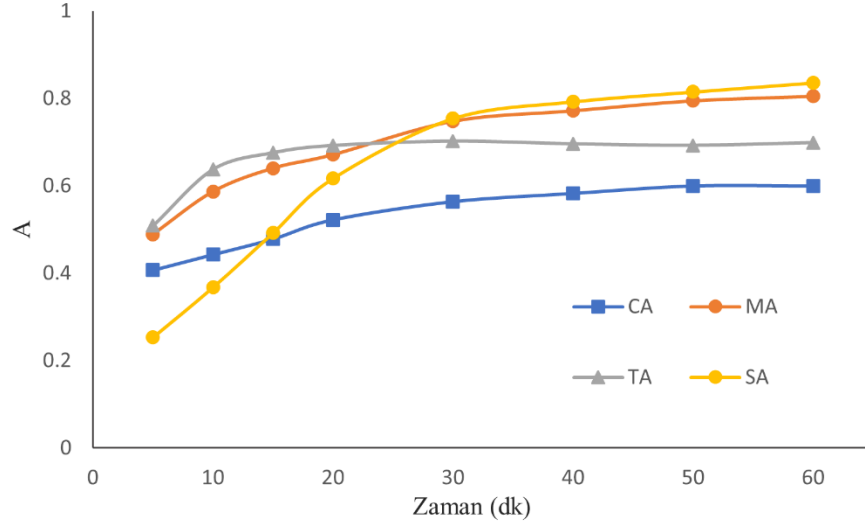
bir asit ile türevlendirme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Oluşan türevlerin absorpsiyon 222 nm dalga boyunda ölçülmüş ve elde edilen verilerden çizilen grafik Şekil 4.3 'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi sıcaklık artırıldığında absorpsiyon şiddetlerinde azalması görüldüğü için türevlendirme tepkimeleri bütün çalışmalar oda sıcaklığında (25 °C) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine sıcaklığın etkisi

4.1.4. Türevlendirme Tepkimesine Zaman Etkisi

Oluşan organik asit amid türevlerinin zaman içinde absorpsiyon şiddetlerinin değişimi için diğer şartlarda göz önüne alındığında zaman bağılı olarak absorpsiyon değeri 60 dk boyunca 222 nm dalga boyunda ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi absorpsiyon genellikle 30 dakikaya kadar arttığını ve sonrasında hemen hemen sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, türevlendirme tepkimesi için 30 dakikalık optimum bir bekleme süresi seçilmiştir.

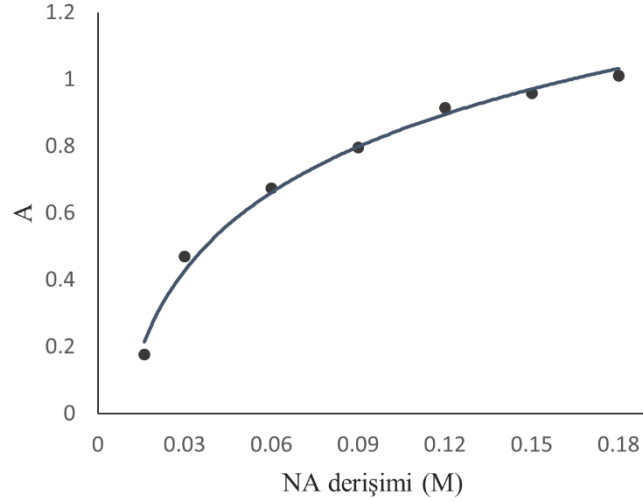


Şekil 4.4. Organik asitlerin türevlendirme tepkimesine zamanın etkisi.

4.1.5. Türevlendirme Tepkimesine Naftilamin Derişiminin Etkisi

1-naftilamin (NA) derişiminin türevlendirme tepkimesinin verimi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Türevlendirme tepkimeleri NA derişiminin 0,015-0,18 M aralığında değişmesi optimum şartlar olarak belirlenmiştir. Derişimin değiştirilmesi ile çözeltilerin UV ölçümleri alınmış, 222 nm dalga boyunda tartarik asit türevinin absorbansı ile NA derişimi arasında elde edilen veriler Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi NA derişiminin artmasıyla absorbans şiddeti artmıştır. Bununla birlikte, bu çalışmada 0,12 M'lik bir derişim tercih edilmiştir çünkü daha yüksek derişimlerde NA, çözünürlük sorunlarına ve girişimlere neden olma potansiyeli söz konusudur.



Şekil 4.5. NA derişiminin türevlendirme tepkimesinin verimi üzerindeki etkisi

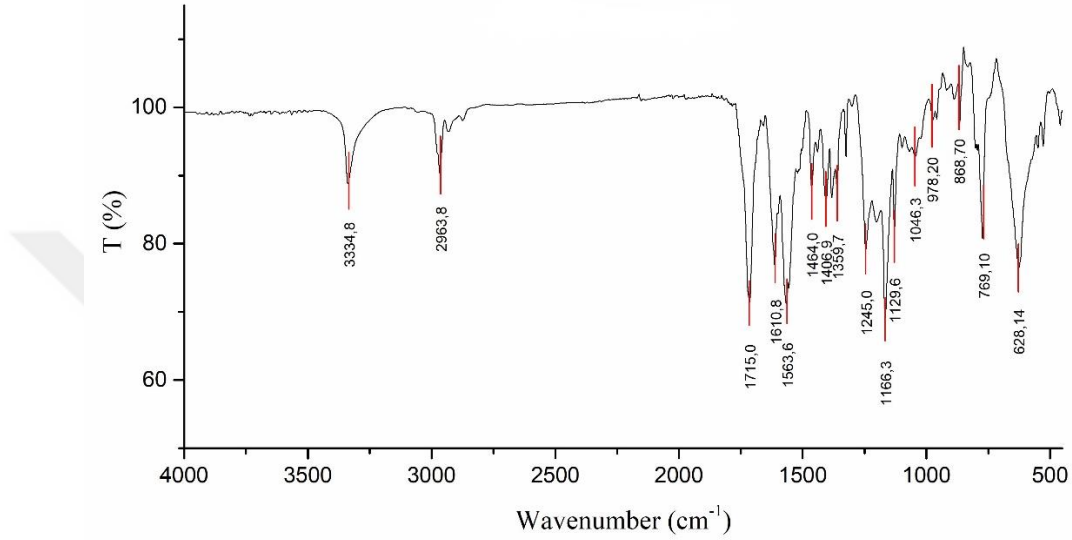
Türevlendirme tepkimesine N,N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) derişiminin etkisi de araştırılmıştır. Eklenen NA miktarına eşdeğer bir miktar veren 0,5 M'lık bir DIC derişimi seçilmiştir çünkü eklenen NA miktarından daha fazla DIC ilavesi tepkime verimini arttırmadığı hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmadaki organik asitlerin türevlendirme tepkimesi için 1,6 mL (0,12 M) NA etanol çözeltisi (0,2 mmol NA), 0,4 mL (0,5 M) DIC etanol çözeltisi (0,2 mmol DIC içeriği), etanol/su oranı % 30, ortamın pH'sı 3,5, türevlendirme zamanı 30 dakika ve tepkimenin oda sıcaklığında meydana geldiği en uygun şartlar olarak optimize edilmiştir.

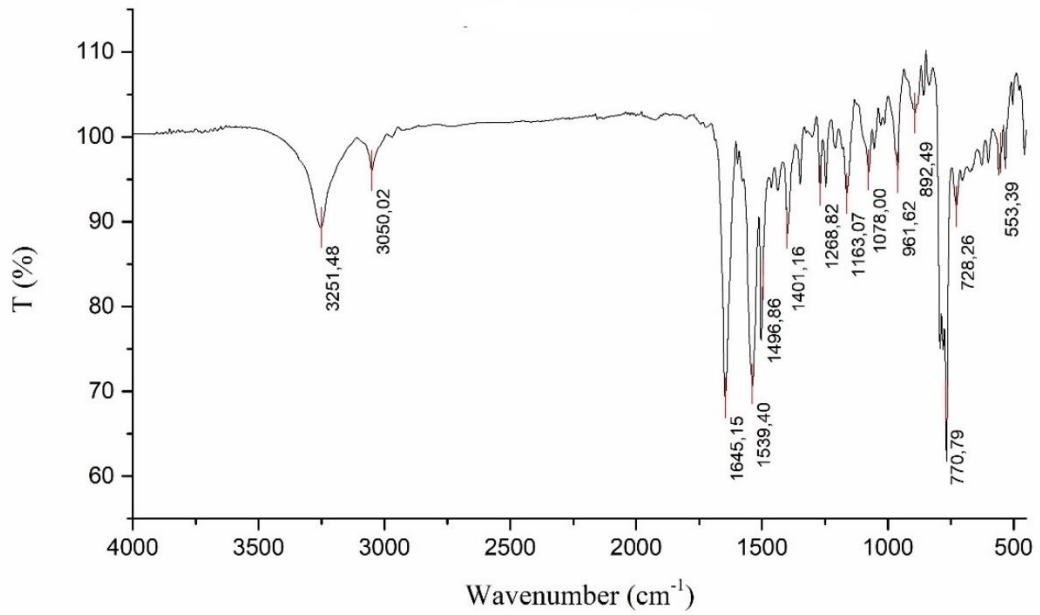
4.1.6. Organik Asit Amid Türevlerinin IR Ölçüm Sonuçları

Şekil 3.7'de gösterilen katı faz durumunda elde edilen organik asitlerinin amid türevlerinin kalitatif analizi IR spektrumları alınarak test edildi. Bilindiği gibi elektromanyetik spektrumun IR bölgesi genellikle yakın IR ($12500-4000\text{ cm}^{-1}$), orta IR ($4000-200\text{ cm}^{-1}$) ve uzak IR ($200-10\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç alt bölgeye ayrılarak değerlendirilmektedir. Ancak analitik açıdan, orta IR'nin bir kısmı olan $4000-600\text{ cm}^{-1}$ aralığı, organik bileşenlerin yapısını aydınlatmak ve incelemek için kullanılmaktadır. Buna göre, önerilen türevlendirme tepkimesi sonucunda organik asit amid türevlerinin oluşumunu doğrulamak amacıyla, türevlendirme tepkimesi sonucunda elde edilen çökeleklerin FT-IR spektrumları $4000-450\text{ cm}^{-1}$ aralığında tarandı, Şekil 4.6 ila 4.9'daki spektrumlardan gösterildiği gibi: ilk olarak, karboksilik O-H bağına karşılık gelen, tipik olarak $3500-2500\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen geniş gerilme bandı kaybolmuş;

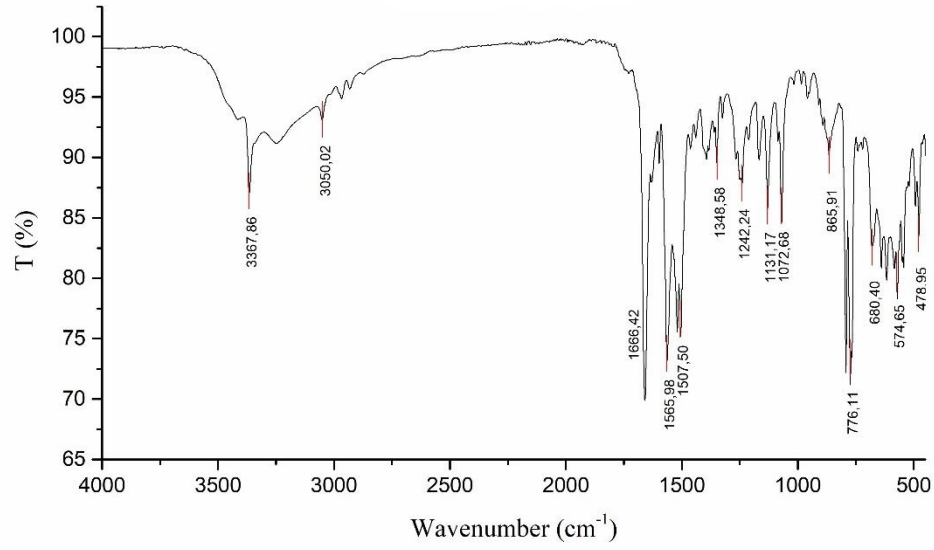
sitrik, malik, tartarik ve süksinik asit türevleri için sırasıyla 3335, 3251, 3368 ve 3267 cm^{-1} 'de yeni bir keskin pik ortaya çıkmıştır. Bu bulgular tüm karboksilik grupların dönüşümünü ve N-H bağlarının oluşumunu göstermektedir. Öte yandan sitrik, malik, tartarik ve süksinik asit türevleri için sırasıyla 1715, 1645, 1666 ve 1650 cm^{-1} 'de C=O gerilme bandı gözlemlendi. Elde edilen bu bulgular, organik asit amid türevlerinin başarılı bir sentezlendiğini göstermektedir.



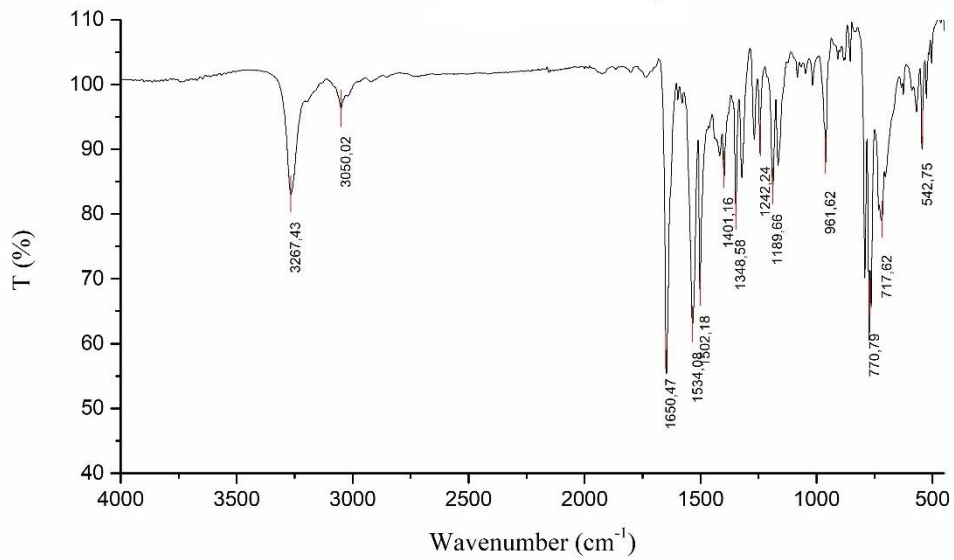
Şekil 4.6. Sitrik asit amid türevinin FTIR spektrumu.



Şekil 4.7. Malik asit amid türevinin FTIR spektrumu.



Şekil 4.8. Tartarik asit amid türevinin FTIR spektrumu.



Şekil 4.9. Süksinik asit amid türevinin FTIR spektrumu.

4.2. Kromatografik Çalışmalar

Organik asitlerin amid türevleri standart çözeltilerle çalışılarak başarılı bir şekilde elde edildikten sonra piyasada en yaygın tüketilen meyve sularında bulunan organik asitlerin tayin edilmesi için kromatografik çalışmalara geçilmiştir.

4.2.1. En Uygun Hareketli Fazın Belirlenmesi

Organik asitlerin amid türevlerinin ayrılması için HPLC'de ters-faz ayırım kolonu ile literatürdeki bazı çalışmalar da dikkate alınarak çeşitli hareketli faz

kompozisyonları etil alkol (EtOH), metil alkol (MeOH), asetonitril (ACN), tetrahidrofuran (THF), fosforik asit (H_3PO_4) karışımları farklı oranlarda karıştırılarak denenmiş ve hazırlanan her bir hareketli faz için organik asitlerin amid türevlerinin teker teker kromatogramları HPLC cihazından elde edilmiştir. Yapılan bir çok çalışma sonucu elde edilen kromatogramlar alıkonma zamanı, pik şekilleri ve piklerin ayrılma gücü açısından değerlendirilmiştir. Yine elde edilen pikler değerlendirildiğinde optimum hareketli faz kompozisyonu olarak % 37 ACN, % 4 MeOH, % 1 THF, % 58 su (v/v) karışımına karar verilmiş ve tüm kromatografik çalışma boyunca bu hareketli faz kompozisyonu kullanılmıştır.

4.2.2. En Uygun Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Organik asitlerin amid türevlerinin, kullanılan ters-faz kromatografi kolonunda en uygun ayırımı sağlamak için kolon sıcaklığının bu türevlerin ayırımına etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla kolonun bulunduğu ortamın sıcaklığı 25, 35, ve 45 °C değerlerine ayarlanarak her bir sıcaklık için organik asit türevleri için kromatogramlar elde edilmiş ve elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda gerek alıkonma zamanı ve gerekse pik şekilleri (pik boyları) açısından herhangi bir değişme oluşmadığı için tüm çalışma boyunca oda sıcaklığında (25 °C) çalışılmış ve bu sıcaklıkta kromatogramlar elde edilmiştir.

4.2.3. En Uygun Akış Hızının Belirlenmesi

Organik asitlerin amid türevlerinin kromatografik olarak ayrılmasında 0,7; 1,0; 1,2; 1,5; 1,7; 2,0 ve 2,3 mL/dk hareketli faz akış hızları denenmiştir. Düşük akış hızlarında alıkonma zamanının çok uzadığı ve piklerin yayvanlaştığı, yüksek akış hızlarında ise (2,3 mL/dk) sonradan gelen iki pikin (süksinik asit ve sitrik asit) birbirinden tam olarak ayrılmadığı görülmüştür. Akış hızı 2,0 mL/dk değerinde çalışıldığında ise gerek piklerin keskin ve simetrik olması ve gerekse alıkonma zamanının kısılması ve de kromatogramda en son gelen süksinik asit ile sitrik asidin birbirinden çok iyi ayrılması nedeniyle cihazın akış hızı 2,0 mL/dk değerine ayarlanmış ve tüm çalışma boyunca bu değer optimum akış hızı değeri olarak kullanılmıştır.

4.2.4. Kullanılan Hacim

Organik asitlerin amid türevlerinin analizi için ters-faz HPLC ayırma kolonuna, kullanılan bütün çözeltilerden aynı hacimde (20 µL) sistem tarafından otomatik olarak

gönderilmiştir. HPLC cihazının çözelti kısmına 1 mL'lik cam viallere konan çözeltiler buradan sistem tarafından otomatik olarak alınarak kolona enjekte edilmektedir. HPLC sistemi, aynı anda aynı ya da farklı 100 örneğin analiz edilmesine imkân tanımaktadır.

4.2.5. Organik Asitlerin Amid Türevlerinin Tek Tek Kromatogramları

Çalışmada, gerçek numunelerde (meyve sularında) en yaygın bulunan dört organik asidin (sitrik asit, malik asit, tartarik asit, süksinik asit) analiz edilmesi hedeflenmiştir. Çalışılan dört organik asidin amid türevlerine dönüştürüldüğü UV-Gör spektrumlarından belirlenmişti. Bu aşamada, kromatografik şartlar değiştirilerek her bir organik asit amid türevinin optimum kromatografik ayırımı ve alıkonma zamanının belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan dört organik asidin de kromatogramları elde edilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi bu organik asit türevlerinin kromatografik kolonda ayrılması için birçok hareketli faz kompozisyonu, farklı akış hızlarına ayarlanarak farklı kromatogramlar elde edilmiştir. Bu arada organik asitlerin amid türevlerinin ayırımına kolon sıcaklığının etkisi de incelenmiştir. Elde edilen kromatogramlar, en iyi pik şekilleri, pik boyları, alıkonma zamanları ve ayırımları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bütün bu çalışmaların sonunda organik asitlerin amid türevlerinin en iyi ayırımının sağlanması için ters-faz HPLC-UV spektrofotometrik tayinleri için oluşan optimum kromatografik şartlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Organik asitlerin amid türevlerinin ters-faz HPLC ayırma için belirlenen optimum şartlar.

Kolon	InertSustain® AQ-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) C/N 5020-89731, S/N 6HR94071
Hareketli faz (v/v)	37 ACN: 4 MeOH: 1 THF: 58 H ₂ O
Akış hızı (mL/dk)	2,0
Kolon sıcaklığı (°C)	25
UV- dalga boyu (nm)	222
Enjeksiyon hacmi (µL)	20
Analiz süresi (dk)	22

Optimum kromatografik ayırım şartları belirlendikten sonra her bir organik asit amid türevinden otomatik olarak peş peşe enjeksiyonlar yapıldı ve elde edilen kromatogramlardan her bir organik asidin amid türevi için alıkonma zamanlarındaki

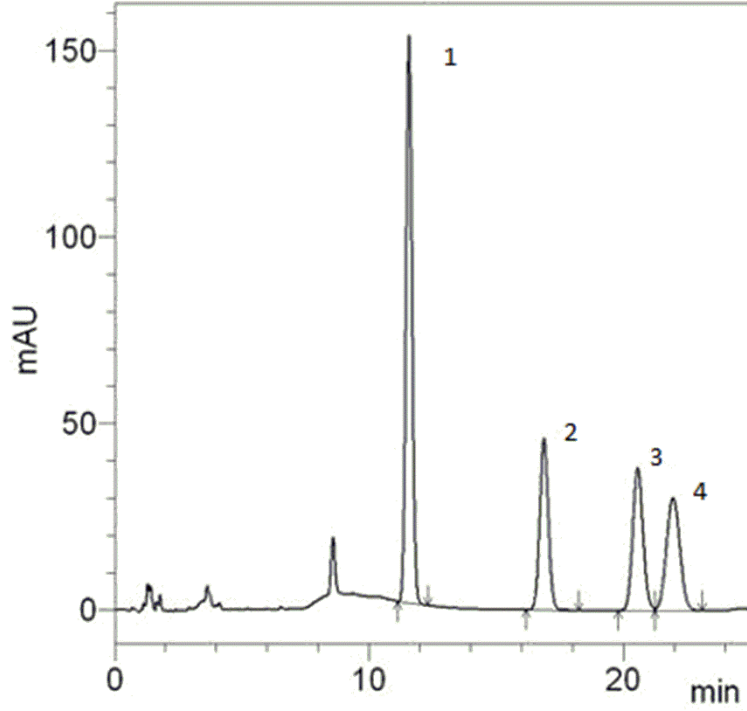
değişimler incelenmiştir. Bu kromatogramlardan elde edilen organik asitlerin amid türevlerinin alıkonma zamanları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Organik asitlerin amid türevlerinin alıkonma zamanları, alıkonma zamanlarının yüzde bağlı standart sapması ve pik alanlarının yüzde bağlı standart sapması (n=3).

Organik asit	Alıkonma zamanı (dk)	Alıkonma zaman için % BSS*	Pik alanı için % BSS*
1) Tartarik asit	11,57	0,23	0,10
2) Malik asit	16,88	0,37	0,35
3) Süksinik asit	20,57	0,41	0,17
4) Sitrik asit	21,96	0,33	0,43

*BSS: bağlı standart sapma

Çalışılan dört organik asidin amid türevi için tek tek kromatogramlarının elde edilmesi ve alıkonma zamanlarının belirlenmesinin ardından her bir organik asidin amid türevinin standart çözeltileri kullanılarak her birinin derişimi 10^{-4} M olacak şekilde bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan bu organik asit amid türevleri karışımdan optimum kromatografik şartlarda HPLC cihazında 20 μ L otomasyon sonucu bu asitler için standart kromatogram elde edilmiştir. Elde edilen standart karışımın kromatogramı Şekil 4.10'te görüldüğü gibidir. Şekilden de görülebileceği gibi analiz süresi 22 dakikadır ve iyi ayrılmış simetrik ve keskin pikler, elde edilmiştir.



Şekil 4.10. Organik asitlerin amid türevlerinin standart kromatogramı; (1) tartarik asit (0,30 µg); (2) malik asit (0,27 µg); (3) süksinik asit (0,24 µg); (4) sitrik asit (0,38 µg). (Kromatografik şartlar; kolon: AQ C18 ters-faz ayırım kolonu; hareketli faz: 37 ACN: 4 MeOH: 1 THF: 58 H₂O (v/v); akış hızı: 2,0 mL/dk; sıcaklık: 25 °C; otomasyon enjeksiyon hacmi 20 µL)

Organik asitlerden sitrik asit, malik asit, tartarik asit ve süksinik asit amid türevleri kolon öncesi türevlendirilerek (pre-kolon) ters-faz HPLC kolonunda ayırımları sağlanmıştır. Ayırımları başarılı bir şekilde sağlanan bu organik asitlerin amid türevlerinin belirlenmeleri HPLC sistemine kombine olan UV spektrofotometrik detektörle 222 nm dalga boyunda sağlanmıştır.

4.2.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri

Organik asitlerin amid türevlerinin ters-faz HPLC kolonda ayırım için optimum şartlar belirlendikten sonra, doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), kesinlik ve geri kazanım gibi istatistiksel parametrelerin belirleme çalışmaları yapılmıştır.

4.2.6.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Elde Edilmesi

Organik asitlerden sitrik asit, malik asit, tartarik asit ve süksinik asit için geliştirilen ters-faz HPLC yönteminde doğrusal çalışma aralığı ve istatistiksel parametreleri belirlenmesi için farklı derişimlerde standart organik asit amid türevleri için çözeltiler hazırlanmış ve her bir derişim için elde edilen pik alanları otomatik

olarak değerlendirilerek her bir organik asit için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen bu kalibrasyon grafiklerinden çalışılan her bir organik asit için doğrusal çalışma aralıkları ve diğer istatistiksel parametreler belirlenmiştir.

4.2.6.2. Kesinlik

Organik asitlerin tayini için geliştirilen yöntemin kesinliğini test etmek için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılarak değişiklikler izlenmiştir. Bu amaçla, her bir organik asitlerin amid türevi için belli derişimde belli zamanlarda, aynı hacimden elde edilen kromatogramların alıkonma zamanları ve pik alanlarındaki bağı standart sapmalar hesaplanmış ve kesinliğin göstergesi olarak Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Organik asitlerin amid türevinin ayırımında gün içi ve günler arası elde edilen kesinlik değerleri (n=6)

Organik asit	Gün içi (n=6)		Günler arası (n=6)	
	Pik alanı % BSS*	Alıkonma zamanı % BSS	Pik alanı % BSS	Alıkonma zamanı % BSS
1. Tartarik	1,67	0,23	2,53	0,36
2. Malik	1,53	0,26	2,07	0,39
3. Süksinik	1,17	0,35	2,71	0,27
4. Sitrik	1,47	0,41	2,64	0,35

*bağı standart sapma

Tablo 4.3'ten de görüldüğü gibi gün içinde elde edilen kromatogramların alıkonma zamanının yüzde bağı standart sapması % 0,23 ile % 0,41 arasında değişirken, pik alanlarının yüzde bağı standart sapması % 1,17 ile % 1,67 arasında değişmektedir. Günler arasında ise bu değerler sırasıyla pik alanlarında % 2,07 ile % 2,64 arasında iken, alıkonma zamanında ise % 0,27 ile % 0,39 arasında değişmektedir.

Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak *F*-testi ve *t*-testi ile değerlendirildi. Tablo 4.4'ten de görülebileceği gibi hesaplanan *F*-testi ve *t*-testi değerleri elde edilen gün içi ve günler arası verilerin birbirinden anlamlı bir şekilde farklı olmadığını ortaya koymuştur.

Tablo 4.4. Organik asitlerin amid türevinin ayırımında gün içi ve günler arası elde edilen kesinlik değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n=6)

	Tartarik asit	Malik asit	Süksinik asit	Sitrik asit
F-test	2,35 (7,15)*	1,87 (7,15)*	5,26 (7,15)*	3,19 (7,15)*
t-test	0,89 (2,23)*	0,96 (2,23)*	0,84 (2,23)*	0,48 (2,23)*

*parantez içindeki değerler % 95 güven seviyesinde kritik *F* ve *t* değerleridir.

Sonuçlar, organik asitlerin amid türevlerinin analizi için geliştirilen yöntemin iyi bir kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.6.3. Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Organik asitlerin amid türevlerinin geliştirilen yöntemde hangi aralıkta doğrusal cevap verdiğini belirlemesi amacıyla her bir organik asidin standart çözeltisinden farklı derişimlerde peş peşe aynı derişim ve hacimde üç kez analiz edilerek her birinin kromatogramları elde edilmiş ve aynı derişimdeki üç kromatogramın ortalama pik alanları dikkate alınarak derişime karşı her birinin kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Çalışılan dört organik asidin amid türevi için doğrusal çalışma aralığı ve bu verilerden regresyon denklemi belirlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.5'te olduğu gibidir.

Tablo 4.5. Organik asitlerin amid türevlerinin ters-faz HPLC-UV detektör ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n=3)

Organik asit	a (ortalama $\pm$ SS ^(a))	b (ortalama $\pm$ SS)	r	Doğrusal aralık (μ g/mL)	LOD^(b) (μ g/mL)	LOQ^(c) (μ g/mL)
1. Tartarik	0,427 $\pm$ 0,009	7,586 $\pm$ 0,217	0,9987	1,0-600	0,18	0,60
2. Malik	0,201 $\pm$ 0,003	1,218 $\pm$ 0,074	0,9992	2,5-550	0,48	1,61
3. Süksinik	0,226 $\pm$ 0,003	2,690 $\pm$ 0,064	0,9992	1,0-450	0,14	0,47
4. Sitrik	0,141 $\pm$ 0,002	3,180 $\pm$ 0,078	0,9991	2,5-750	0,69	2,31

^(a) Standart sapma

^(b) gözlenebilme sınırı (S/N = 3)

^(c) Tayin sınırı (S/N = 10)

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) için her bir organik asidin amid türevinin standart çözeltisi, kromatografik analizde kullanılan hareketli faz ile kademe kademe seyreltilerek her birinin kromatogramları elde edilmiştir. Belli bir derişimde sonra duyarlık artırılmış ve pikler küçülmüş. Bu noktada gözlenebilme sınırı için sinyalin gürültüden üç katı olan pikler (S/N = 3) dikkate alınarak belirlenmiştir. Tayin

sınırı ise, sinyalin gürültüden 10 katı olan pikler ($S/N = 10$) dikkate alınarak belirlenmiştir.

Elde edilen bu verilerden de görülebileceği gibi meyve sularında bulunan organik asitlerin tayini için geliştirilen bu yöntem duyarlı bir yöntemdir ve herhangi bir ekstraksiyon işlemi gerektirmeden organik asitlerin doğrudan tayinine izin vermektedir.

4.2.6.4. Geri Kazanım

Meyve suyu örnekleri kompleks matrikse sahiptir ve hem bu etkilerin yöntem üzerindeki davranışını görebilmek hem de meyve sularında bulunan organik asitlerin ters-faz HPLC-UV tayinleri için ve geliştirilen metodun doğruluğunu göstermek için aynı şartlarda analizi yapılan 1 mL meyve suyu örneklerine bilinen miktarlarda (düşük ve yüksek) standart organik asidin amid türevleri eklenerek meyve suyu numenleri eklemeyen önce ve eklendikten sonra analiz edilerek her birinin kromatogramı elde edilmiştir. Optimum kromatografik şartlar altında elde edilen her bir meyve suyu numunesi için kromatogramlar değerlendirilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan geri kazanım değerleri Tablo 4.6, 4.7 ve 4.8 de verilmiştir.

Tablo 4.6. Portakal suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3)

Organik asit	İlave edilen miktar (µg/mL)	% Geri kazanım	% BSS*
1. Tartarik	20	91,95	3,58
	500	89,51	3,15
2. Malik	40	89,53	3,72
	400	88,97	4,27
3. Süksinik	10	89,43	2,95
	300	90,17	4,56
4. Sitrik	40	92,52	4,17
	500	89,76	3,95

*bağıl standart sapma

Portakal suyu numunesinden geri kazanma oranı yüzde 88,97-92,52 aralığında ve bu verilerin bağıl standart sapması ise yüzde 2,95-4,56 aralığında bulunmuştur.

Tablo 4.7. Elma suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3)

Organik asit	İlave edilen miktar ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri kazanım	% BSS*
1. Tartarik	20	93,14	3,15
	500	91,95	4,17
2. Malik	40	88,41	2,98
	400	89,11	3,50
3. Süksinik	10	87,17	4,01
	300	85,46	4,55
4. Sitrik	40	86,52	3,17
	500	88,67	4,01

*bağıl standart sapma

Elma suyu numunesinden geri kazanma oranı yüzde 85,46-93,14 aralığında ve bu verilerin bağıl standart sapması ise yüzde 2,98-4,55 aralığında bulunmuştur.

Tablo 4.8. Karışık meyve suyu numunesinden elde edilen geri kazanım değerleri (n=3)

Organik asit	İlave edilen miktar ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri kazanım	% BSS*
1. Tartarik	20	89,15	3,68
	500	86,15	4,15
2. Malik	40	89,10	3,27
	400	88,12	3,72
3. Süksinik	10	87,34	2,99
	300	85,71	4,55
4. Sitrik	40	88,17	3,17
	500	87,61	4,02

*bağıl standart sapma

Karışık meyve suyu numunesinden geri kazanma oranı yüzde 85,71-89,15 aralığında ve bu verilerin bağıl standart sapması ise yüzde 2,99-4,55 aralığında bulunmuştur.

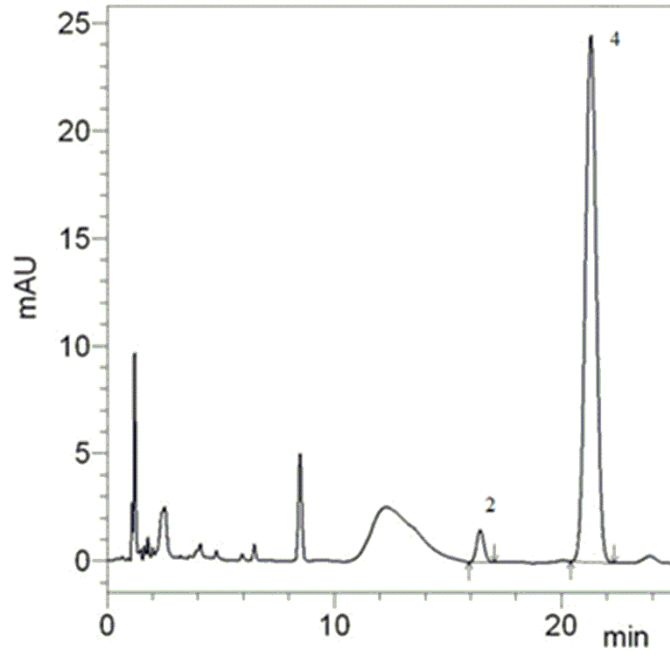
4.3. Uygulamalar

Çalışan organik asitler amid türevleri için standart çözeltilerle geliştirilen yöntem, validasyon parametreleri belirlendikten sonra, aynı kromatografik şartlarda gerçek numune uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, bilinen bir marka ve piyasada en

çok tüketilen meyve sularından elma suyu, portakal suyu ve karışık meyve suyu yerel marketten temin edilmiştir.

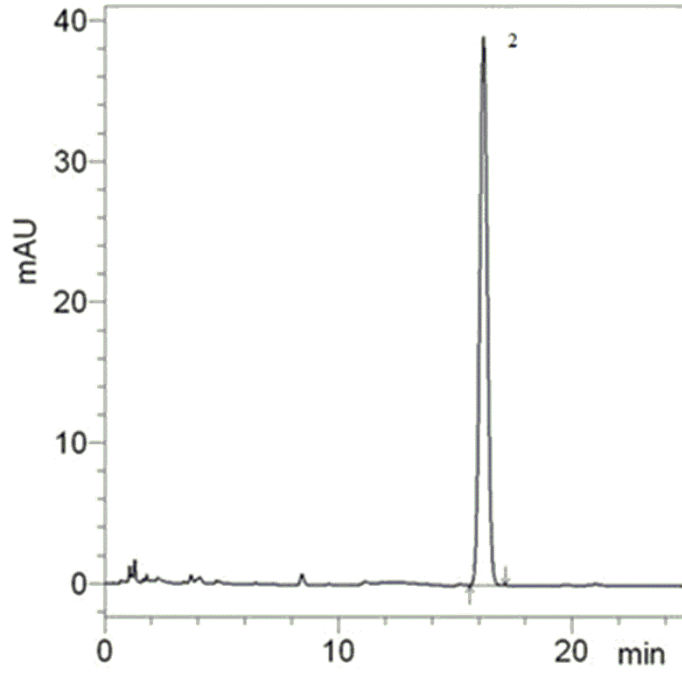
Genel olarak, meyve suları pektinden kaynaklanan koloidal çok ince parçacıkları içeren bir yapıya sahiptir ve süzülmesi zordur. Bu çalışmada organik asitlerin amid türevleri çökelek olarak elde edildiği için meyve sularında bulunan bu taneciklerin çökelek oluşumuna etkilerinin engellenmesi gerekir. Bu nedenle çözeltinin asiditesinin değiştirilmesi, koloidal moleküller arasındaki elektrostatik itmeyi değiştirebilir. Buna bağlı olarak, pH=11'e kadar 1 M NaOH ilavesinin ardından pH 3.5'e kadar 1 M HCl ile nötrleştirmenin koloidal tanecikleri çökelterek berrak bir çözelti verdiği deneysel olarak gözlemlenmiştir.

Meyve suyu numunelerinde bulunan organik asitlerin türevlendirilmesi için, 1 mL portakal suyu numunesi alınarak çözelti berrak hale gelene kadar 1 M NaOH çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra pH = 3,5 olana kadar 1 M HCl eklenmiştir. Çözelti, süzülüp 5 mL'ye kadar suyla seyreltilmiştir. Meyve suyu numunelerinin her birinden 1 mL alınmış ve 0,45 µm Şırınga filtresinden süzölmüş, çözelti son olarak 5 mL'ye seyreltilmiştir. Her bir numuneye 0,2 mmol olacak şekilde (0,12 M) 1-naftilamin çözeltisinden 1,6 mL eklenmiş ve pH 3,5'e ayarlanmıştır. Daha sonra 0,2 mmol olacak şekilde (0,5 M) karbodiimid çözeltisinden 0,4 mL eklenmiştir. Tepkimenin gerçekleşmesi için karışım oda sıcaklığında 30 dakika magnetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bundan sonra tepkime karışımı süzölmüş ve çökelti birkaç kez % 30 (v/v) etanol çözeltisiyle yıkanmış, ardından 5 mL % 30 (v/v) THF/ACN içerisinde çözölmüştür. Elde edilen bu meyve suyu numunelerinin çözeltilerinden belli miktar alınarak hareketli faz ile 2 mL ye seyreltilmiştir. Gerçek numune çözeltisi cihazda analizlenmeden önce tekrar 0,45 µm şırınga filtresinden süzölmüş ve daha sonra 20 µL otomasyonla cihaza gönderilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve şekil 4.13 de göröldüğü gibidir.



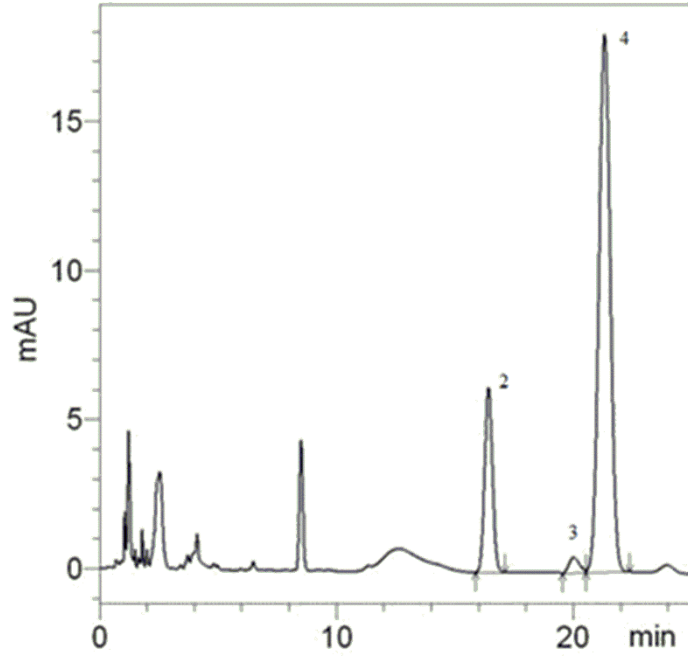
Şekil 4.11. Portakal suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit, (4) sitrik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir)

Kromatogramdan da görüleceği gibi organik asitler için geliştirilen bu yöntemde portakal suyu numunesinden malik asit ve sitrik asidin varlığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Elma suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir)

Kromatogramdan da görüleceği gibi organik asitler için geliştirilen bu yöntemde elma suyu numunesinden malik asidin varlığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Karışık meyve suyu numunesinden elde edilen kromatogram; (2) malik asit, (3) süksinik asit, (4) sitrik asit (kromatografik şartlar Şekil 4.10'da olduğu gibidir)

Kromatogramdan da görüleceği gibi organik asitler için geliştirilen bu yöntemde karışık meyve suyu numunesinden malik asit ve sitrik asidin varlığı belirlenmiştir.

Her bir meyve suyu numunesinden kromatogramlar elde edildikten sonra kromatogramlardaki piklerin alanları dikkate alınarak kalibrasyon grafiklerinden miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 4.10 de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.9. Meyve suyu numunelerinden hesaplanan organik asit miktarları ⁽¹⁾

Meyve suyu	Tartarik asit (g/L)	Malik asit (g/L)	Süksinik asit (g/L)	Sitrik asit (g/L)
Elma	TSA ⁽²⁾	3,596±0,103 % BSS ⁽³⁾ : 1,149	TSA	TSA
Portakal	TSA	0,107±0,004 % BSS: 1,428	TSA	4,895±0,273 % BSS: 2,250
Karışık meyve	TSA	0,813±0,009 % BSS: 0,468	0,022±0,002 % BSS: 3,662	4,078±0,115 % BSS: 0,543

⁽¹⁾ $\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$ (Sonuçlar n=3 için % 95 güven seviyesinde elde edildi)

⁽²⁾ TSA: tayin sınırını altında

⁽³⁾ Bağlı standart sapma

Portakal suyu (nektar) sitrik asit ve çok düşük miktarda malik asit içermektedir. Bu meyve suyuna su eklendiği ve dolayısıyla malik asidin seyreltildiği anlamına gelebilir. Öte yandan, sitrik asit içeriği kısmen doğal meyve suyundan ve kısmen eklenen asitleştiriciden kaynaklanabilir. Sitrik ve malik asit içeren karışık meyve suyu (nektar) için de aynı durum söz konusudur. Bu örnekte malik asit içeriği portakal suyundaki içeriğinden daha yüksekti. Karışık meyve suyunun elma özünü içermesinden beri beklenen bir durumdur. Elma suyu sadece elmada ana organik asit olan malik asit göstermiştir. Sitrik asitin düşük miktarda nedeniyle bu numunede sitrik asit tespit edilmemiştir.

5. SONUÇ

Bu Tez çalışmada, Meyve sularındaki ana organik asitlerin (sitrik, malik, tartarik ve süksinik asitler) ters fazlı HPLC-UV tayini için basit ve etkili bir tek adımlı kolon öncesi türevlendirme yöntemi geliştirilmiştir. Çok düşük UV bölgesi absorbans şiddetlere sahip olan organik asitlerin UV tespitini kolaylaştırmak için, onlara türevlendirme yoluyla bir kromofor grubunun eklenmesi planlanmıştır. Geliştirilen bu tayin yöntemi, söz konusu bu organik asitlerin, N,N'-diizopropilkarbodiimidin varlığında 1-naftilamin reaktifi kullanılarak amid türevlerine dönüştürülmesiyle spektral özelliklerini güçlendirilmiştir. Oluşan organik asit amid türevleri literatür bilgileri de göz önünde bulundurularak ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemin bağlı UV dedektör ile analizi yapılarak çalışmanın amacı gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk basamağında, 1-naftilaminin incelenen organik asitlerle birleştirilmesiyle organik asit amid türevleri elde edildi. Fazla miktarda 1-naftilamin ve eşdeğer miktarda diizopropilkarbodiimid (her biri için 0,2 mmol) ile birleşme reaksiyonu gerçekleştirildi ve çökelek halinde türevler elde edildi. Türevlendirme reaksiyonu için optimum şartlar incelendi ve reaksiyon için en uygun ortamın olduğu % 30 etanol/su çözeltisi, ortamın pH'sı 3,5, türevlendirme zamanı 30 dakika ve tepkimenin oda sıcaklığında meydana geldiği bulundu. Elde edilen organik asit amid türevleri FT-IR kullanılarak karakterize edilmiş ve spektrumlardan karboksilik gruplara ait tüm O-H bantlarının kaybolduğu ve N-H bağlarını temsil eden yeni bantların oluştuğu, yani türevlerin başarıyla sentezlendiği gösterilmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında elde edilen organik asit amid türevlerinin yüksek performanslı sıvı kromatografide tam olarak ayırımını sağlayacak optimum şartlar belirlenmiştir. Bu amaçla, literatür bilgileri dikkate alınarak ve piklerin alıkonma süresi, pik şekilleri ve piklerin ayırma gücü açısından değerlendirilmesi sonucunda, incelenen türevlerin UV dedektör ile yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sisteminde ayrılması için optimum koşullar elde edilmiştir. Çalışma altında organik asitlerin yeterli kromatografik ayırımın gerçekleştiği en uygun optimum şartlar; hareketli faz: asetonitril-metanol-tetrahidrofuran-su (37:4:1:58, v/v) karışımı, kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi 10 µL, akış hızı 2,0 mL/dk ve UV dedektörü 222 nm olarak belirlenmiş ve analiz süresi 22 dk bulunmuştur.

Daha sonra, geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğinin belirlemek amacıyla validasyon çalışmaları yapıldı. Duyarlılık, doğruluk, kesinlik, doğrusal aralığı, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik parametreleri tek tek değerlendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Geliştiren bu yöntemin gerçek numune uygulaması ve meyve sularındaki organik asitlerinin tayini için yerel bir marketten temin edilen tüketime hazır meyve suları kromatografik olarak analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre, portakal suyu sitrik asit ve çok düşük miktarda malik asit içermektedir. Bu meyve suyuna su eklendiği ve dolayısıyla malik asidin seyreltildiği düşünülebilir. Sitrik asit içeriği ise kısmen doğal meyve suyundan ve kısmen eklenen asitleştiriciden kaynaklanabilir. Sitrik ve malik asit içeriği gösteren karışık meyve suyu için de aynı durumdadır. Elma suyu numunesinde sadece elmada ana organik asit olarak bulunan malik asit belirlenmiştir. Sitrik asit derişiminin düşük olması nedeniyle bu numunede sitrik asit tespit edilememiştir. Bulunan sonuçlar literatürdeki sonuçlarla genelde uyumluydu (Cunha vd., 2002).

Meyve suları örneklerine uygulanan geri kazanım çalışması için, 1 mL meyve suyu örneklerine derişimi bilinen miktarda sitrik, malik, tartarik ve süksinik karışımı ilave edilmiş ve standartlara uygulanan tüm işlemler tekrarlanmıştır. Geri kazanım çalışmalara göre bu dört organik asit için Geri kazanım oranları % 88,97-92,52 ve bağıl standart sapması ise % 2,95-4,56 arasında olduğu belirlenmiştir.

Literatürdeki önceki yöntemlerle karşılaştırıldığında, geliştirilen bu yöntemin avantajını basit olması ve ön işlem gerektirmemesi açısından görebilmektedir. Örneğin, önceki bir yöntemde türevlendirme tepkimesin süresi daha kısa olmasına rağmen (yaklaşık 10 dakika), türevlendirme tepkimesi 80°C'de iki aşamada gerçekleşti ve ayırmayı sağlamak için mobil fazda karşıt iyonların kullanılması gerekiyordu (Miwa, 2000). Başka bir yöntemde, matrisi ve reaktif fazlasını giderilmek için türevlendirmeden önce ve sonra olmak üzere iki temizleme adımına ihtiyaç duyulmuştur (Cunha vd., 2002).

Yapılan bu çalışma sonucunda meyve suyu örneklerindeki organik asitlerinin tespiti için geliştirilen analiz yöntemi ile literatüre düşük maliyetli, yüksek duyarlıklılı ve eş zamanlı dört organik asit analizlerinin yapılabildiği yeni bir yöntem kazandırılmıştır. Yöntemin, söz konusu organik asitlerin farklı örneklerde seçici ve

hassas bir şekilde belirlenmesi için daha fazla geliştirilmesi ve test edilmesi potansiyeli bulunmaktadır. Buna yanı sıra yöntem geliştirilmede ilk kez sentezlenen bu di-karboksilik asit amid türevleri, farmasötik endüstrisinde, polimer teknolojisinde ve tarımsal uygulamalarında büyük önem taşıyan di-karboksilik asitlere bağlı oldukları için farklı çalışma alanlarında kullanılabilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abou-Melha, K. S. (2020). Analytical chemistry optical chemosensor for spectrophotometric determination of nitrite in wastewater. *ChemistrySelect*. 5(20). 6216-6223.
- Amssayef, A. ve Eddouks, M. (2022). In vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic effects of l-tartaric acid. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*. 22(3). 185-198.
- Badoud, R. ve Pratz, G. (1986). Improved high-performance liquid chromatographic analysis of some carboxylic acids in food and beverages as their p-nitrobenzyl esters. *Journal of Chromatography A*. 360. 119-136.
- Baldo, A., Bezzola, P., Curatolo, S., Florio, T., Lo Guzzo, G., Lo Presti, M., Sala, G. P., Serra, F., Tonin, E., Pellicano, M. ve Pimpinelli, N. (2010). Efficacy of an alpha-hydroxy acid (AHA)-based cream, even in monotherapy, in patients with mild-moderate acne. *G Ital Dermatol Venereol*. 145(3). 319-322.
- Benassi, M. T. ve Cecchi, H. M. (2006). Method development for the simultaneous determination of carboxylic acids, phenolic compounds, and sorbic acid in white wines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 21(4). 491-501.
- Berg, J., Tymoczko, J. ve Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. (5th edition.). (s. 698-734) New York: W H Freeman.
- Berovic, M. ve Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology annual review*. 13. 303-343.
- Blanco, D., Quintanilla, M., Mangas, J. ve Gutiérrez, M. D. (1996). Determination of organic acids in apple juice by capillary liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 19(16). 2615-2621.
- Bravo, B., Chávez, G., Piña, N., Ysambertt, F., Márquez, N. ve Cáceres, A. (2005). Developing an on-line derivatization of FAs by microwave irradiation coupled to HPLC separation with UV detection. *Talanta*. 64. 1329-1334.
- Brittain, H. G. (2001). "Malic acid". H.G. Brittain (ed.) in: *Analytical profiles of drug substances and excipients*. (s. 153-195). Academic Press.
- Buratti, M., Pellegrino, O., Valla, C., Fustinoni, S., Brambilla, G. ve Colombi, A. (1999). Gas chromatography–electron-capture detection of urinary methylhippuric acid isomers as biomarkers of environmental exposure to xylene. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 723(1-2). 95-104.
- Büyüktuncel, E. K., Özlem Şahin, Emine (2017). Determination of organic acids in natural and commercial orange juices by HPLC/DAD. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 45(3). 411-416.
- Cai, R., Shoukat, C. A., Zhang, C., Gao, X., Li, H., Chen, J., Ji, Y. ve Wu, X. (2023). A colorimetric chemosensor for sensitive and selective detection of copper(II) ions based on catalytic oxidation of 1-naphthylamine. *Analyst*. 148(14). 3306-3311.
- Chahardoli, A., Jalilian, F., Memariani, Z., Farzaei, M. H. ve Shokoohinia, Y. (2020). "Chapter 26-analysis of organic acids". A. Sanches Silva, S. F. Nabavi, M. Saeedi & S. M. Nabavi (eds.). in: *Recent advances in natural products analysis*. (s. 767-823). Elsevier.
- Chen, S. F., Mowery, R. A., Castleberry, V. A., van Walsum, G. P. ve Chambliss, C. K. (2006). High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates. *Journal of Chromatography A*. 1104(1-2). 54-61.

- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C. ve Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(2). 121-130.
- Clayden, J., Greeves, N. ve Warren, S. (2012). *Organic chemistry*. USA: Oxford University Press.
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: Applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 43(4). 569-591.
- Coşkun, A. (2017). Farklı üretim lokasyonlarından temin edilmiş kayısı meyvelerinden üretilen pulpların organik asit bileşimleri ile bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Journal of New Results in Engineering and Natural Sciences* 6(7). 1-10.
- Cowden, J. D. 2002. *Changes in fruit flavor intensity in sucrose based model systems: Effects of pH level, acid type, and sourness*. Published master thesis, Oregon State University. Food Science and Technology.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O. ve Ferreira, I. (2002). HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. *European Food Research and Technology*. 214(1). 67-71.
- Czauderna, M., Kowalczyk, J., Niedźwiedzka, K. ve Mieczkowska, A. (2008). Efficient procedure for pre-column derivatization of fatty acids with emphasis on short-chain carboxylic acids. *Chemia Analityczna*. 53. 535-544.
- Çelik, F., Gündoğdu, M. ve Zenginbal, H. (2019). Bazı nar genotiplerine ait meyvelerin organik asit ve C vitamini profili. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 29(3). 489-495.
- Çelikyurt, G., Arıcı, M. (2008). "Gıda koruyucusu olarak mikrobiyal kaynaklı organik asitler ve önemi". *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Türkiye, 10, 21-23.
- De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., de Maesschalck, C., de Backer, P., Van Immerseel, F. ve Croubels, S. (2013). Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 80(1). 107-115.
- De Quiros, A. R., Lage-Yusty, M. A. ve Lopez-Hernandez, J. (2009). HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. *Talanta*. 78(2). 643-646.
- Doğrukol, D. (2011). "Yüksek performanslı sıvı kromatografisi". L. Genç (ed.) in: *Kromatografik sistemler*. (s. 1-34). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi.
- Doores, S., (2005). "Organic acids". P. Davidson, J. Sofos & A. L. Branen (eds.). in: *Antimicrobials in Food* (s. 91-142). Florida: CRC Press
- Dopico-Garcia, M. S., Valentao, P., Guerra, L., Andrade, P. B. ve Seabra, R. M. (2007). Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*. 583(1). 15-22.
- Dziezak, J. D. (2003). "Acids | natural acids and acidulants". B. Caballero (ed.) in: *Encyclopedia of food sciences and nutrition (second edition)*. (s. 12-17). Oxford: Academic Press.
- Eyeghe-Bickong, H. A., Alexandersson, E. O., Gouws, L. M., Young, P. R. ve Vivier, M. A. (2012). Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 885-886(1). 43-49.
- Fattahi, N., Ayubi, M. ve Ramazani, A. (2018). Amidation and esterification of carboxylic acids with amines and phenols by N,N'-diisopropylcarbodiimide: A new approach for amide and ester bond formation in water. *Tetrahedron*. 74(32). 4351-4356.

- Featherstone, S. (2015). "8 - ingredients used in the preparation of canned foods". S. Featherstone (ed.) in: *A complete course in canning and related processes (fourteenth edition)*. (s. 147-211). Oxford: Woodhead Publishing.
- Fernandez-Garcia, E. ve McGregor, J. U. (1994). Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*. 77(10). 2934-2939.
- Filip, M., Moldovan, M., Vlassa, M., Sarosi, C. ve Cojocaru, I. (2016). HPLC determination of the main organic acids in teeth bleaching gels prepared with the natural fruit juices. *Revista de Chimie*. 67(12). 2440-2445.
- Fitzhugh, O. G. ve Nelson, A. A. (1947). The comparative chronic toxicities of fumaric, tartaric, oxalic, and maleic acids. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*. 36(7). 217-219.
- Georgiana, I. B. ve Gabriel, L. R. (2018). "Introductory chapter: Carboxylic acids - key role in life sciences". *Carboxylic acid - key role in life sciences*. (s. 1-5). intech open.
- Ghassempour, A., Chalavi, S., Abdollahpour, A. ve Mirkhani, S. A. (2006). Determination of mono-and dichloroacetic acids in betaine media by liquid chromatography. *Talanta*. 68(4). 1396-1400.
- Gündüz, T. (2002). *İnstrümental analiz*. (6. Baskı). Ankara: Gazi Kitabevi, 595.
- Gürer, F., Kargl, R., Bračić, M., Makuc, D., Thonhofer, M., Plavec, J., Mohan, T. ve Kleinschek, K. S. (2021). Water-based carbodiimide mediated synthesis of polysaccharide-amino acid conjugates: Deprotection, charge and structural analysis. *Carbohydrate Polymers*. 267. 118226.
- Hazer, O., Akkik, M. ve Güngör, K. (2016). Simultaneous determination of the main organic acids in Anatolian Black Pine by HPLC with DAD detector. *Eurasian J. Anal. Chem*. 11. 181-195.
- Hou, D., Fan, J., Han, L., Ruan, X., Feng, F., Liu, W. ve Zheng, F. (2016). Determination of small halogenated carboxylic acid residues in drug substances by high performance liquid chromatography-diode array detection following derivatization with nitro-substituted phenylhydrazines. *Journal of Chromatography A*. 1438. 46-56.
- Huang, Y., Rasco, B. A. ve Cavinato, A. G. (2009). "Chapter 13 - fruit juices". D.-W. Sun (ed.) in: *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. (s. 355-375). San Diego: Academic Press.
- Ikeda, M., Shimada, K. ve Sakaguchi, T. (1983). High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids with 1-naphthylamine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 272. 251-259.
- Jayaprakasha, G. K. ve Sakariah, K. K. (2002). Determination of organic acids in leaves and rinds of *Garcinia indica* (Desr.) by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28(2). 379-384.
- Joye, I. J. (2019). "Acids and bases in food". L. Melton, F. Shahidi & P. Varelis (eds.). in: *Encyclopedia of food chemistry*. (s. 1-9). Oxford: Academic Press.
- Karadeniz, F. (2004). Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 28(4). 267-271.
- Kassaian, J. M. (2000). Tartaric acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Kemmei, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y. ve Hayakawa, K. (2015). Reversed phase liquid chromatographic determination of organic acids using on-line complexation with copper(II) ion. *Analytica Chimica Acta*. 886. 194-199.

- Kerem, Z., Bravdo, B. A., Shoseyov, O. ve Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A*. 1052(1-2). 211-215.
- Khosravi, F., rastakhiz, N., Iranmanesh, B., ve Jafari Olia, S. S. S. (2015). Determination of organic acids in fruit juices by UPLC. *International Journal of Life Sciences*. 9(5). 41-44.
- Kirimura, K., Honda, Y. ve Hattori, T. (2011). "Citric acid". *Industrial biotechnology and commodity products*. (s. 135-142). Elsevier Inc.
- Klimowska, A. ve Wielgomas, B. (2018). Off-line microextraction by packed sorbent combined with on solid support derivatization and GC-MS: Application for the analysis of five pyrethroid metabolites in urine samples. *Talanta*. 176(1). 165-171.
- Kohli, K., Prajapati, R. ve Sharma, B. K. (2019). Bio-based chemicals from renewable biomass for integrated biorefineries. *Energies*. 12(2). 233.
- Konanç, M. U. 2013. Fenollerin spektroskopik HPLC tayinleri Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, 91, Samsun.
- Konanç, M. U. 2017. Cu (II), Co (II) ve Ni (II)-bis(2-hidroksi-4-m etoksi benzaldehit) etilendiimin komplekslerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ayırımı ve çevre örneklerinde tayinleri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, 89, Samsun.
- Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L. ve Ochsenreither, K. (2020). Malic acid production from renewables: A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 95(3). 513-526.
- Kurzer, F. ve Douraghi-Zadeh, K. (1967). Advances in the chemistry of carbodiimides. *Chemical Reviews*. 67(2). 107-152.
- Lagoutte, D., Lombard, G., Nisseron, S., Papet, M. P. ve Saint-Jalm, Y. (1994). Determination of organic acids in cigarette smoke by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 684(2). 251-257.
- Lian, H. Z., Mao, L., Ye, X. L. ve Miao, J. (1999). Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19(3). 621-625.
- Lindsay, S. (1992). *High performance liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- Llorente, M., Villarroja, B. ve Gómez-Cordovés, C. (1991). Reverse-phase HPLC of organic acids in musts. *Chromatographia*. 32(11). 555-558.
- Manne, S. R., El-Faham, A., de la Torre, B. G. ve Albericio, F. (2021). Minimizing side reactions during amide formation using dic and oxymapure in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 85. 153462.
- Marcé, R. M., Calull, M., Olucha, J. C., Borrull, F. ve Rius, F. X. (1991). Optimization of the derivatization method for the liquid-chromatographic determination of carboxylic acids in wines. *Analytica Chimica Acta*. 242. 25-30.
- Mattey, M. ve Kristiansen, B. (1999). A brief introduction to citric acid biotechnology. *Citric acid biotechnology*. 1-10.
- Mei, X., Lu, D. ve Yan, X. (2022). Separation and determination of D-malic acid enantiomer by reversed-phase liquid chromatography after derivatization with (R)-1-(1-naphthyl) ethylamine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58.
- Meyer, V. R. (2013). *Practical high-performance liquid chromatography*. John Wiley & Sons.

- Miwa, H. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of mono-, poly- and hydroxycarboxylic acids in foods and beverages as their 2-nitrophenylhydrazides. *Journal of Chromatography A*. 881(1). 365-385.
- Miwa, H. ve Yamamoto, M. (1996). Determination of mono-, poly- and hydroxy-carboxylic acid profiles of beverages as their 2-nitrophenylhydrazides by reversed-phase ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography A*. 721(2). 261-268.
- Mojarradi, H. (2010). Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation.
- Moreira, M., Guido, L., Cruz, J. ve Barros, A. (2010). Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Open Chemistry*. 8(6). 1236-1243.
- Mortera, P., Zuljan, F. A., Magni, C., Bortolato, S. A. ve Alarcon, S. H. (2018). Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta*. 178. 15-23.
- Muthyala, R. (1995). "5.28 - functions with at least one nitrogen and no chalcogens". A. R. Katritzky, O. Meth-Cohn ve C. W. Rees (eds.). in: *Comprehensive organic functional group transformations*. (s. 1061-1089). Oxford: Elsevier Science.
- Nakajima, N. ve Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry*. 6(1). 123-130.
- Nauta, T. (1991). "Chelating agents". *Food additive user's handbook*. (s. 273-279). Springer.
- Nisperos-Carriedo, M. O., Buslig, B. S. ve Shaw, P. E. (1992). Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(7). 1127-1130.
- Nwosu, F. (2015). Production of citric acid from lemon and cassava waste peels.
- Omar, O. A. S. ve Khalifa, M. A. (2022). *High performance liquid chromatography: Theory, instrumentation and application in drug quality control*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Orlandin, A., Guryanov, I., Ferrazzano, L., Biondi, B., Biscaglia, F., Storti, C., Rancan, M., Formaggio, F., Ricci, A. ve Cabri, W. (2022). Carbodiimide-mediated beckmann rearrangement of oxyma-B as a side reaction in peptide synthesis. *Molecules*. 27(13). 4235.
- Pedrood, K., Bahadorikhalili, S., Lotfi, V., Larijani, B. ve Mahdavi, M. (2021). Catalytic and non-catalytic amidation of carboxylic acid substrates. *Molecular Diversity*. 1-34.
- Pellegrini, D., Onor, M., Degano, I. ve Bramanti, E. (2014). Development and validation of a novel derivatization method for the determination of lactate in urine and saliva by liquid chromatography with UV and fluorescence detection. *Talanta*. 130. 280-287.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V. ve Martín, J. (2004). High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1026(1). 57-64.
- Prezioso, D., Strazzullo, P., Lotti, T., Bianchi, G., Borghi, L., Caione, P., Carini, M., Caudarella, R., Gambaro, G., Gelosa, M., Guttilla, A., Illiano, E., Martino, M., Meschi, T., Messa, P., Miano, R., Napodano, G., Nouvenne, A., Rendina, D. ve Zattoni, F. (2015). Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU working group. *Archivio Italiano di Urologia Andrologia*. 87(2). 105-120.

- Quitmann, H., Fan, R. ve Czermak, P. (2014). "Acidic organic compounds in beverage, food, and feed production". H. Zorn ve P. Czermak (eds.). in: *Biotechnology of food and feed additives*. (s. 91-141). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Qureshi, M. S., Bhongale, S. S. ve Thorave, A. K. (2011). Determination of organic acid impurities in lactic acid obtained by fermentation of sugarcane juice. *Journal of Chromatography A*. 1218(40). 7147-7157.
- Rioux, V., Catheline, D., Bouriel, M. ve Legrand, P. (1999). High performance liquid chromatography of fatty acids as naphthacyl derivatives. *Analisis*. 27(2). 186-193.
- Rodrigues, C. I., Marta, L., Maia, R., Miranda, M., Ribeirinho, M. ve Máguas, C. (2007). Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(5). 440-448.
- Russell, I. J., Michalek, J. E., Flechas, J. D. ve Abraham, G. E. (1995). Treatment of fibromyalgia syndrome with super malic: A randomized, double blind, placebo controlled, crossover pilot study. *J Rheumatol*. 22(5). 953-958.
- Saltmarsh, M. (2020). "Food additive regulations in europe". *Saltmarsh's essential guide to food additives*. (s. 40-51). The Royal Society of Chemistry.
- Sanarico, D., Motta, S., Bertolini, L. ve Antonelli, A. (2003). HPLC determination of organic acids in traditional balsamic vinegar of reggio emilia. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 26(13). 2177-2187.
- Scherer, R., Rybka, A. C. P., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Filho, J. T. ve Godoy, H. T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*. 135(1). 150-154.
- Sheehan, J. C. ve Hess, G. P. (1955). A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society*. 77(4). 1067-1068.
- Shojaee AliAbadi, M. H., Karami-Osboo, R., Kobarfard, F., Jahani, R., Nabi, M., Yazdanpanah, H., Mahboubi, A., Nasiri, A. ve Faizi, M. (2022). Detection of lime juice adulteration by simultaneous determination of main organic acids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 105. 104223.
- Shui, G. ve Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 977(1). 89-96.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Mendes, G. C., Seabra, R. M. ve Ferreira, M. A. (2002). Study of the organic acids composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(8). 2313-2317.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. ve Crouch, S. R. (2018). *Principles of instrumental analysis*. (7. Edition). Boston: Cengage learning.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. ve Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of analytical chemistry* (9. Edition). Belmont: Cengage learning, 912-934.
- Smith, J. G. (2017). *Organic chemistry*. (5. Edition). New York: McGraw-Hill Education, 1052-1056.
- Soyer, Y., Koca, N. ve Karadeniz, F. (2003). Organic acid profile of turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16(5). 629-636.
- Spiller, G. A., Story, J. A., Furumoto, E. J., Chezem, J. C. ve Spiller, M. (2003). Effect of tartaric acid and dietary fibre from sun-dried raisins on colonic function and on bile acid

- and volatile fatty acid excretion in healthy adults. *British Journal of Nutrition*. 90(4). 803-807.
- Stevens, C. L., Singhal, G. H. ve Ash, A. B. (1967). Carbodiimides. Dehydration of ureas. *The Journal of Organic Chemistry*. 32(9). 2895-2895.
- Straub, D. (2007). Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 22. 286-296.
- Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. ve Sancho, M. T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 955(2). 207-214.
- Tang, S.-C. ve Yang, J.-H. (2018). Dual effects of alpha-hydroxy acids on the skin. *Molecules*. 23(4). 863.
- Taylor, M. B., Yanaki, J. S., Draper, D. O., Shurtz, J. C. ve Coglianese, M. (2013). Successful short-term and long-term treatment of melasma and postinflammatory hyperpigmentation using vitamin C with a full-face iontophoresis mask and a mandelic/malic acid skin care regimen. *Journal Drugs Dermatol*. 12(1). 45-50.
- TGK (2013, 30 Haziran). Türk gıda kodeksi gıda katkı maddeleri yönetmeliği. *Resmi Gazete*. Erişim: 29.Kasım.2022. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm>
- Theron, M. M. ve Lues, J. R. (2010). *Organic acids and food preservation*. CRC Press.
- Townsend, C. T., Yee, L. ve Mercer, W. A. (1954). Inhibition of the growth of Clostridium botulinum by acidification. *Journal of Food Science*. 19(1-6). 536-542.
- Trček, J., Mira, N. P. ve Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(15). 6215-6229.
- Tretter, L., Patocs, A. ve Chinopoulos, C. (2016). Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ros, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1857(8). 1086-1101.
- Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G. K., Nelson, S. D. ve Patil, B. S. (2011). Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in citrus using high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 83(3). 948-954.
- Ulrich, H. (2008). *Chemistry and technology of carbodiimides*. John Wiley & Sons.
- Uzhel, A. S., Borodina, A. N., Gorbovskaia, A. V., Shpigun, O. A. ve Zatirakha, A. V. (2021). Determination of full organic acid profiles in fruit juices and alcoholic beverages using novel chemically derivatized hyperbranched anion exchanger. *Journal of Food Composition and Analysis*. 95. 103674.
- Verma, D. K., Dewangan, Y. ve Verma, C. (2023). "Chapter 5-coupling reactions". D. K. Verma, Y. Dewangan ve C. Verma (eds.). in: *Handbook of organic name reactions*. (s. 299-327). Elsevier.
- Violeta, N., Ion, T. ve Mira Elena, I. (2010). HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38(1). 44-48.
- Walker, A., Marakis, G., Christie, S. ve Byng, M. (2003). Mg citrate found more bioavailable than other mg preparations in a randomised, double-blind study. *Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 10(5). 183-191.

- Walker, T. A. (1995). A liquid chromatographic assay for citric acid in over-the-counter carbamide peroxide products using indirect UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 13(2). 171-176.
- Wang, Z. A. ve Zheng, J.-S. (2022). "Chapter 4-advances in peptide synthesis". N. Qvit ve S. J. S. Rubin (eds.). in: *Peptide and peptidomimetic therapeutics*. (s. 73-97). Academic Press.
- Yu, C., Wang, Y., Cao, H., Zhao, Y., Li, Z., Wang, H., Chen, M. ve Tang, Q. (2020). Simultaneous determination of 13 organic acids in liquid culture media of edible fungi using high-performance liquid chromatography. *BioMed Research International*. 2020. 2817979.
- Zong, Y. Y., Lin, J., Xu, H., Jia, Z. H., Yang, X. P. ve Choi, M. M. F. (2015). Optimization and validation of an HPLC-photodiode array detector method for determination of organic acids in vinegar. *Journal of AOAC International*. 98(2). 422-430.
- Zotou, A., Loukou, Z. ve Karava, O. (2004). Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. 60(1). 39-44.

ÖZ GEÇMİŞ

Nada SIDDIK (İngilizce; Nada SEDDIQ), Halep Adham Mustafa Lisesi'ni bitirdikten sonra Halep Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya bölümünden 06.2004 tarihinde mezun oldu. 2007 yılında Halep Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi ve 2011 tamamladı. 2006-2012 arasında Halep Millî Eğitim Bakanlığı kimya öğretmeni olarak çalıştı. Aynı zamanda 2006-2008 arasında Halep Üniversitesinde yardımcı öğretim görevlisi olarak (part-time) çalıştı. 2018 yılından itibaren YTB Bursu kazandı ve OMÜ LEE doktora programına devam etmektedir. Nada SIDDIK anadili Arapça olup, İleri derecede Türkçe C1 ve İngilizce (Aptis:181/200) bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-0484-326X

Yayımlanmış Çalışmalar:

1. Seddiq, N. ve Asan, A. (2023). One-step pre-column derivatization method for HPLC-UV determination of organic acids in fruit juices. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 46(11-15). 192-199.
2. Asan A. ve Seddiq N. (2022). A Simple Spectrophotometric Determination of Amoxicillin in Drug samples. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 9(2), 423-432.

Kazanılan Burslar:

1. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı-Türkiye Bursları (Doktora Bursu)