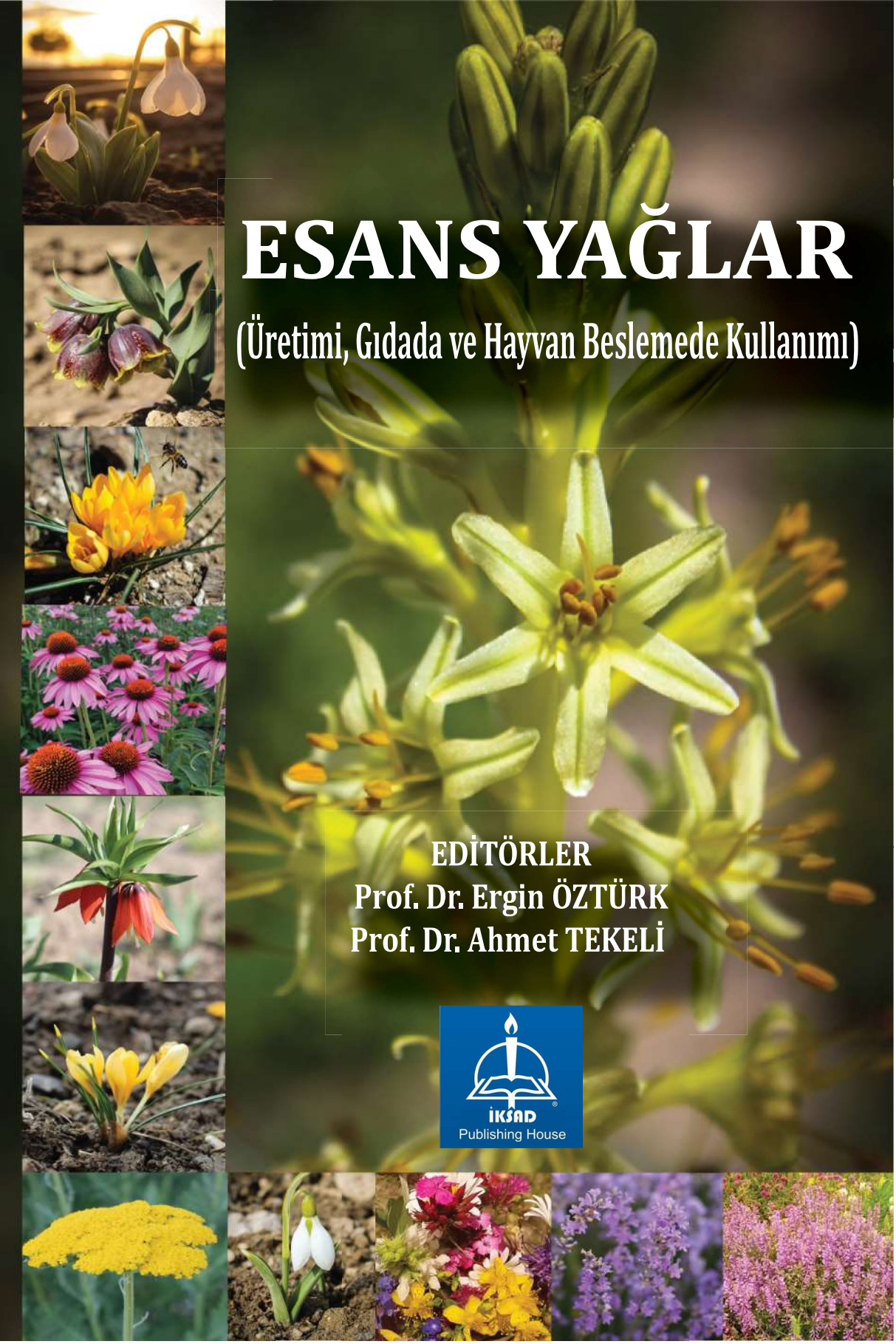


ESANS YAĞLAR

(Üretimi, Gıdada ve Hayvan Beslemede Kullanımı)

EDİTÖRLER

Prof. Dr. Ergin ÖZTÜRK

Prof. Dr. Ahmet TEKELİ

İKSAD

Publishing House

ESANS YAĞLAR

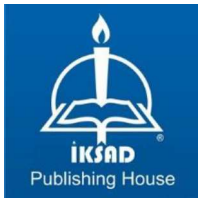
(Üretimi, Gıdada ve Hayvan Beslemede Kullanımı)

EDİTÖRLER

Prof. Dr. Ergin ÖZTÜRK
Prof. Dr. Ahmet TEKELİ

YAZARLAR

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Prof. Dr. Ahmet TEKELİ
Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ
Prof. Dr. Ergin ÖZTÜRK
Prof. Dr. Elvan OCAK
Prof. Dr. E. Sultan GİRAY
Prof. Dr. Fatih SEYİS
Prof. Dr. Figen KIRKPINAR
Prof. Dr. Fikret PAZIR
Prof. Dr. Gültekin YILDIZ
Prof. Dr. Hasan Rüştü KUTLU
Prof. Dr. Ladine BAYKAL ÇELİK
Prof. Dr. Mehmet ÇELİK
Prof. Dr. Murat TUNÇTÜRK
Prof. Dr. Rüveyde TUNÇTÜRK
Prof. Dr. Sabri YURTSEVEN
Prof. Dr. Saliha KIRICI
Prof. Dr. Semra DEMİR
Prof. Dr. Zümrüt AÇIKGÖZ
Doç.Dr. Ayhan BAŞTÜRK
Doç. Dr. Emre DEMİRER DURAK
Doç. Dr. Gökhan FİLİK
Doç. Dr. Mehmet BOZKURT
Doç. Dr. Uğur SERBESTER
Dr. Öğr. Üyesi Ali Eslem KADAK
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gül FİLİK
Dr. Öğr. Üyesi Emine YURTERİ
Dr. Öğr. Üyesi Hulusi AKÇAY
Dr. Öğr. Üyesi Özlem DURNA AYDIN
Dr. Engin ÜNAY
Dr. Onur ÖZDİKİCİERLER
Öğr. Gör. Uğur TEMİZ
Arş. Gör. Elif Gülşen KARABACAK
Arş. Gör. Haydar KÜPLEMEZ
Arş. Gör. Lütfi NOHUTÇU
Gıda Yük. Müh. Janan Hossein ZADEH
Zir. Yük. Müh. Muhammed İkbal COŞKUN
YÖK 100/2000 Bursiyeri Ezelhan ŞELEM



Copyright © 2021 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social Researches Publications®
(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)
TURKEY TR: +90 342 606 06 75
USA: +1 631 685 0 853
E mail: iksadyayinevi@gmail.com
www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
Iksad Publications – 2021©

ISBN: 978-625-8007-39-8
Cover Design: İbrahim KAYA
October / 2021
Ankara / Turkey
Size = 16 x 24 cm

İÇİNDEKİLER

EDİTÖRDEN

ÖNSÖZ

Prof. Dr. Ergin ÖZTÜRK

Prof. Dr. Ahmet TEKELİ.....1

BÖLÜM 1

DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE AROMATİK BİTKİLERİN ÜRETİMİ VE EKONOMİYE KATKISI

Prof. Dr. Murat TUNÇTÜRK

YÖK 100/2000 Bursiyeri Ezelhan ŞELEM

Prof. Dr. Rüveyde TUNÇTÜRK

Arş. Gör. Lütfi NOHUTÇU.....3

BÖLÜM 2

AROMATİK BİTKİLERDEN ESANS YAĞ ELDE ETMEDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. Saliha KIRICI

Prof. Dr. E. Sultan GİRAY…….27

BÖLÜM 3

ESANS YAĞLARDA ETKİCİL MADDE BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. Sultan GİRAY

Prof. Dr. Saliha KIRICI.....55

BÖLÜM 3

ESANS YAĞLARDA ETKİCİL MADDE BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. Sultan GİRAY[11]
Prof. Dr. Saliha KIRICI[2]

[1] Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Adana, Orcid: 0000-0002-2847-0747, e-posta: esgiray@cu.edu.tr
[2] Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Adana, Orcid: 0000-0002-5798-857X, e-posta: kirici@cu.edu.tr,

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler çok farklı kullanım alanlarına sahiptir. Geçmişten günümüze gelişen teknolojiye bağlı olarak, gıda, ilaç, kozmetik ve parfüm gibi kullanım alanları çeşitlenmiş ve doğrulanmıştır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, bileşimlerinde bulunan etkili maddelerinin tanımlanmasıyla birlikte farklı endüstrilerde önemli konuma gelmişlerdir. Tıbbi ve aromatik bitkilere önem kazandıran sekonder metabolit olarak adlandırılan etkili maddeleri olup, bileşimi, kalitesi ve miktarı; coğrafi orijini, mevsim, aynı türün varyantları, tarımsal uygulamalar, bitkinin yağının çıkartıldığı kısım, hasat zamanı, distilasyon yöntemi ve depolama süresi gibi bir çok faktöre göre değişmektedir (İnan ve ark., 2011); (Kızıl ve ark., 2016). Bununla beraber; Dünyada tıbbi ve aromatik bitkiler piyasası ve ilaç sektörü etken madde miktarı ve kalitesi yüksek ve bu yönleriyle "standart ürün" talep etmektedir (Kırıcı, 2015). Uçucu yağların kompozisyonu da iç (mevsimsel, ontogenetik, morfogenetik ve genetik varyasyonlar) ve dış (ekolojik ve çevresel) faktörlere göre değişir, kalitesi de güçlü bir şekilde bu faktörlere bağlıdır. Uluslararası Standart Örgütü (ISO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Analitik Avrupa Farmakopesi gibi çeşitli kurumlar tarafından tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen, özellikle ticarileşmiş uçucu yağların iyi kalitede olmaları için birçok kitap ve yönetmelikler yayınlamaktadır (Zzarte ve Salgueiro, 2015). Uçucu yağların kalite değerlendirmelerinde bileşimlerinin farmakopi ve kodekslerde belirtilen standartlara uygunluğu ve bileşenlerin tanımlanmasında analiz yöntemleri öne

çıkmaktadır. Uçucu yağlar (UY), pek çok alanda saf ve doğal moleküllere olan artan talepler nedeniyle dünya çapında geniş bir talep görmektedir. Böylece, büyük oranda kozmetik, aromaterapi ve fitoilaç alanının kapsayan sağlık ve koku endüstrisi için çok büyük miktarlarda UY üretimi yapılmaktadır (Do ve ark., 2015).

UY'ların tüm uygulamaları (endüstriyel, ticari değeri vs) onların doğrudan doğruya kimyasal kompozisyonu, fizikokimyasal özellikleri, biyolojik aktiviteleri, en bol bulunan veya bazen en az miktarda bulunan kimyasal bileşenine bağlı olarak değerlendirilir. Örneğin bir UY örneği monoterpen veya sesquiterpenlerce zenginse su-alkol ortamında düşük çözünürlük gösterir ve dolayısıyla parfüm endüstrisinde çok kabul görmez. Öte yandan, örneğin safrol, bilinen genetoksik ve kanserojen etkisi nedeniyle gıda ürünlerinde kullanılması sakıncalı iken, timol veya karvakrol'ce zengin UY'lar, antiseptik, antimikrobiyal özellikleri açısından tercih edilir UY molekülleridir (Mastelic´ ve ark., 2008).

UY'ların tanımlanması aşamalarını aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür:

1) Duyusal Değerlendirme: bir grup uzman ve deneğin, koku alma yoluyla yaptığı bir uygulamadır. Daha çok parfüm sanayii için uygulaması söz konusudur.
2) Fizikokimyasal özelliklerin saptanması: bu test içinde çeşitli uluslararası standartlara başvurulur (örneğin ISO, International

Organisation for Standardisation). UY'ın dokusu, rengi, akışkanlığı, yoğunluğu, refraktif indeksi, alkolde çözünürlüğü, optik çevirme açısı, peroksit indeksi, ester sayısı, asit sayısı, donma noktası, alevlenme noktası vb parametreler saptanır

3) Biyolojik özelliklerinin saptanması: UY'ların biyolojik özelliklerinin saptanması bunların endüstriyel kullanımlarında oldukça önemlidir. Bu özellikler arasında, antioksidant ve antimikrobiyal özellikleri veya ışık hassasiyetleri ve alerjik özelliklerinin saptanması gereklidir.
4) Kimyasal kompozisyonlarının saptanması: UY'kimyasal kompozisyonun saptanması en önemli analizden biridir. UY bileşenlerinin fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, kimyasal bileşenler ve bunların göreceli miktarlarının (%) saptanması gıda, ziraat, farmakoloji ve parfüm sanayii gibi alanlarda kullanımı ve onların market fiyatlarının saptanmasında çok belirleyici bir rol almaktadır (De Silva, 1995).

Uçucu Yağların Analiz Yöntemleri

UY'ların kimyasal kompozisyonun çok iyi saptanmasının, uygulamaları açısından önemi arttıkça bunların analiz yöntemlerinde de bir gelişme kaçınılmaz olmuştur. Literatürde yer alan çalışmalar, günümüzde kullanılan ve gelecekte de kullanılması mümkün olan tekniklere oldukça geniş bir yer vermektedir. UY'ların analizlerinde kromatografik ayırma yöntemleri öne çıkmaktadır.

1. KROMATOGRAFİ

Kromatografi herhangi bir karışımda yer alan bileşenleri, hareketli (taşıyıcı-mobil) bir faz yardımıyla sabit (durgun-adsorban) bir faz arasından bu fazlar arasındaki farklı etkileşimlerinden dolayı değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanarak bileşenlerin birbirlerinden ayrılması yöntemidir. Kromatografi esas olarak, durgun faz tarafından kuvvetle tutulan numune bileşenlerinin, hareketli fazın akısıyla çok yavas hareket etmesi ve fakat durgun faz tarafından zayıfça tutulan numune bilesenlerinin hızlı hareket etmesiyle ayrımın sağlanmasıdır. Böylece numune bilesenleri kalitatif ve/veya kantitatif tayin edilebilirler (Tonbul 2015).

Kromatografi ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine göre ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır.

A. Ayrılma Mekanizmalarına Göre

1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. Partisyon kromatografisi
3. İyon değiştirme kromatografisi
4. Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
5. İyon çifti kromatografisi
6. Afinite kromatografisi

B. Uygulama Biçimine Göre

1. Düzlemsel kromatografi
2. Kağıt kromatografisi
3. İnce tabaka kromatografisi (TLC)
4. Kolon kromatografisi
5. Gaz kromatografisi (GC)
6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

C. Faz Tiplerine Göre

1. Sıvı kromatografisi
2. Sıvı-Katı kromatografisi
3. Sıvı-Sıvı kromatografisi
4. Gaz kromatografisi
5. Gaz-Katı kromatografisi
6. Gaz-Sıvı kromatografisi

1.1. Gaz Kromatografisi

Kromatografik ayırmalarda örnek gaz, sıvı veya süperkritik akışkan olan bir mobil fazda çözülür. Bu mobil faz kendisiyle karışmayan (çözünmeyen, reaksiyon vermeyen), bir kolon içine veya katı yüzey üzerine yerleştirilmiş olan bir sabit fazda harekete zorlanır. Örnek bileşenleri sabit ve mobil fazlarda farklı derecede dağılım

gösterirler. Bileşenler sabit faz üzerinde alıkonurlarken mobil faz akışıyla yavaşça hareket ederler. Böylece sabit faz tarafından zayıf tutulan bileşenler daha hızlı hareket ederler. Hareket hızındaki bu farklılıktan dolayı örnek bileşenleri kalitatif veya kantitatif analiz edilebilecek bantlara ayrılırlar. Yöntemin basit oluşu, çalışma kolaylığı ve zamandan tasarruf sağlaması yönünden klasik ayırma yöntemlerine göre üstünlük sağlamaktadır. Kromatografik yöntemlerle kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkün olmaktadır. Kromatografinin diğer bir avantajı karışımdan hiçbir maddenin kaybolmaması ve yeni bir maddenin kimyasal reaksiyonlarla oluşmamasıdır (Şahin 2016).

Bir maddenin gaz kromatografi cihazıyla analizinin yapılabilmesi için;

a - Molekül yapısının sıcaklığa dayanıklı olması, sıcaklıkla bozunmaması,

b- Maddenin buharlaşabilir olması,

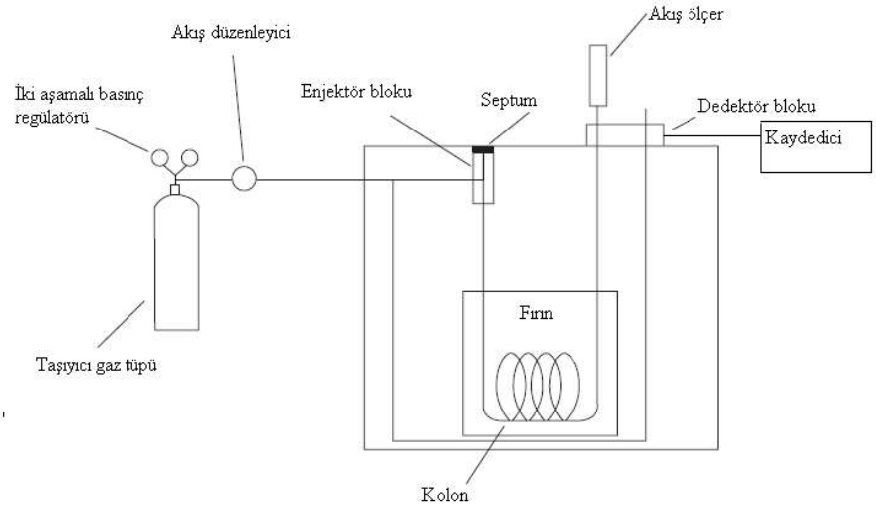
c- Molekül ağırlığının < 400 amu olması,

d- Gaz fazda stabil olması ve taşıyıcı gazlarla reaksiyona girmemesi,

e- Analiz edilen diğer maddelerle reaksiyona girmemesi gerekmektedir.

Gaz kromatografi cihazlarının çalışma prensipleri şu şekildedir;

1. Analiz edilecek numunenin uygun numune hazırlama yöntemlerine göre hazırlanarak cam viallere alınması ve cam viallerin cihaz üzerinde belirlenen kısma yerleştirilmesi,
2. Cihazın hangi numuneyi hangi metotta ve hangi hacimde çalışacağını belirten çalışma tablosunun yazılması,
3. Numune vialinden belirlenen miktarda numunenin otoenjektör vasıtasıyla alınması ve enjeksiyon bloğuna gönderilmesi,
4. Enjeksiyon bloğunda sıcaklıkla numunenin buharlaştırılması, gerekirse tercihe göre numunenin tamamının (splitless) veya bir kısmının (split) taşıyıcı gaz yardımıyla kapiler kolona taşınması ve elüsyon işleminin başlaması,
5. Numune bileşenlerinin kolonda tutunmalarına göre ilerleyerek (her bileşen partisyon katsayısı K'ya bağlı olarak farklı hızlarda hareket edecektir) dedektöre ulaşması ve dedektör sinyallerinin kaydediciye iletilerek pik yüksekliği veya pik alanı olarak kaydedilmesi, enjeksiyon başlangıcından dedektör sinyalinin kaydedilmesine kadar geçen zaman o bileşen için tutunma zamanı (retention time, tR) olarak kaydedilmektedir. Gaz kromatografi cihazlarında tutunma zamanlarına göre kalitatif analiz, pik alanları veya yüksekliklerine göre de kantitatif analizler yapılabilmektedir. Şekil 1 de gaz kromatografi cihazının bileşenleri gösterilmiştir (Şahin 2016)



Şekil 1. Gaz kromatografi cihazının bölümleri

Taşıyıcı Gaz

Gaz kromatografisinde mobil faz taşıyıcı gaz olarak adlandırılmaktadır. Taşıyıcı gaz inert olmalıdır. Taşıyıcı gaz olarak argon, azot ve hidrojen de kullanılabilmesine rağmen en çok helyum kullanılmaktadır. Taşıyıcı gaz olarak helyum tercih edilmesinin nedeni hidrojen gibi potansiyel patlama tehlikesinin olmaması ve diğer taşıyıcı gazlara göre hassasiyet düşmesine sebep olmamasıdır. Gaz kromatografi cihazlarında kullanılan bütün gazlar cihaza girmeden önce gaz filtrelerinden (moleküler elek) geçirilmelidir.

Taşıyıcı gaz akış hızı gaz kromatografi cihazlarında sabit akış (constantflow) ve sabit basınç (constantpressure) olmak üzere 2 farklı şekilde ayarlanabilmektedir. Basınç-akış değişikliği kullanıcı tarafından programlanmasına rağmen fırın programındaki sıcaklık

değişiklikleri nedeniyle sabit basınç altında akışın devamlı değişiklik göstermesi nedeniyle sabit akış modunda çalışma daha çok tercih edilmektedir (Şahin 2016).

Numune Girişi

Gaz kromatografi cihazlarında örnek cihaz üzerine monte edilmiş bir otoenjektör vasıtasıyla enjeksiyon bloğuna gönderilir. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı numunedeki en az uçucu bileşenin kaynama noktasının en az 50 ºC üzerinde olması ayrıca kolon girişinde yoğunlaşmaya sebep olmamak için metot başlangıç sıcaklığından düşük olması gerekmektedir. Örnek enjeksiyon bloğunun içinde sıcaklıkla buharlaşır, taşıyıcı gazla seyreltilir ve kolona girer. Yüksek kolon verimi ve örnekden örneğe taşınmanın engellenmesi açısından kolona giren miktar önemlidir. Örnek miktarının fazla olması ve/veya yavaş enjekte edilmesi (manuel enjeksiyonlarda) bant genişlemesine ve bileşenlerin ayrılmasının iyi olmamasına sebep olabilir. Çalışılan numunenin konsantrasyonuna göre bir kısmının (split) veya tamamının (splitless) cihaza enjekte edilmesi gerekebilir (Şahin 2016).

Kromatografik Kolon

Gaz kromatografi cihazlarında dolgulu ve kılcal (kapiler) olmak üzere 2 çeşit kolon kullanılmaktadır. Önceleri dolgulu kolon kullanılırken, günümüzde daha çok kapiler kolonlar tercih edilmektedir. Kolon yapımında çoğunlukla paslanmaz çelik ve

ergitilmiş silis, nadiren de cam ve teflon kullanılır. Kolonlar kolon fırınlarına sığmaları için bobinler halinde sarılır. Kolonların sabit fazı katı veya katı yüzeyine emdirilmiş bir sıvı olabilir. Kullanılan kolon tipine göre gaz kromatografisi, gaz-katı kromatografisi (sabit faz katı) ve gaz-sıvı kromatografisi (sabit faz sıvı) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şahin 2016). Gaz-katı kromatografisinde sabit faz olarak silikajel, alümina veya aktif kömür gibi maddelerin kullanıldığı, zayıf adsorbsiyon prensibine dayalı bu yöntemde birbirinden ayrılması zor ve kuyruklu pikler elde edilir. Bu yöntem daha çok küçük moleküllü maddelerin ayrılmasında kullanılır. Gaz-Sıvı kromatografisinde ise kolon çapı 0,3-0,5 mm olan kapiler kolonlar kullanılır. Bu kolonlarda gözenekli bir katı faz üzerine emdirilmiş büyük moleküllü özel bir sıvı faz bulunmaktadır. Sabit fazı veya dolgu maddesi özel bir sıvı ile kaplanmış kolonlar SCOT (supportcoatedopentubuler), iç yüzeyi özel bir sıvı ile kaplanmış kolonlar WCOT (wallcoatedopentubuler) olarak adlandırılmaktadır. WCOT kolonlar içleri boş ve açık uçlu kolonlardır. Kolonların iç yüzeyleri büyük moleküllü özel bir sıvı ile kaplıdır. Bu kolonlar bakır, alüminyum, paslanmaz çelik veya camdan yapılabilmektedir (Şahin 2016).

Kaynama noktası geniş bir aralıkta seyreden bileşenler için kolon fırınlarının sıcaklıkları programlanabilir olmalıdır. Bu şekilde ayrılma devam ederken sıcaklık sürekli olarak veya kademeli olarak değiştirilebilir. Kapiler kolonlarla çalışırken kolon içinde gaz akışı

yokken fırına yüksek sıcaklıklar vermemek ve cihazın çalışmadığı durumlarda kolonun belli bir kondüsyonda düşükte olsa gaz akışı olacak şekilde bekletilmesi tekrarlanabilir sonuçlar almak açısından önemlidir. Bu uygulama aynı zamanda kolon ömrünü de uzatmaktadır. Gaz kromatografi cihazlarında numune miktarı, kolon uzunluğu, çalışılan numuneye uygun kolon dolgu maddesi, sıcaklık programı, taşıyıcı gaz, taşıyıcı gaz akış hızı uygun bir şekilde seçilerek tatmin edici bir ayırma elde etmek mümkündür (Şahin 2016).

Sıcaklığın Etkisi ve Kontrolü

Gaz kromatografisinde amaç örnek bileşenlerinin kolon boyunca gaz fazında ilerlemesidir. Kaynama noktası en yüksek olan bileşenin taşıyıcı gaz içinde süratle buharlaşmasına olanak vermek için kolon sıcaklığının yeteri kadar yüksek olması gerekmektedir. Sıcaklık yeteri kadar yüksek değilse numune kolondan geçerken çok yavaş hareket edecek bu da analiz zamanının yükselmesine, piklerin genişlemesine ve hassasiyetin düşmesine neden olacaktır. Eğer kolon sıcaklığı çok yüksek olursa numune bileşenleri kolonu hızlıca terk edecek ve bu durumda da uygun bir ayrılma sağlanamayacaktır. Kolon sıcaklığını geniş bir aralık içinde ayarlayabilmek ve kontrol edebilmek bu nedenlerle çok önemlidir. Kaynama noktası geniş bir aralıkta değişen bileşenler için genellikle sıcaklık programlaması (gradient, kademeli) yapılarak piklerin daha iyi ayrılması sağlanabilir. Bu durumda ayrılma sürerken sıcaklık sürekli olarak veya basamaklar halinde arttırılır. İzotermal

çalışmalarda fırın sıcaklığı analiz boyunca sabit tutulmakta ve geç çıkan piklerde yüksek pik genişlemesi görülmektedir. Sıcaklık programı uygulandığında daha kısa süreli analizlerde daha düzgün pikler elde edilebilirken artan kolon kanamasıyla baseline kaymaları görülebilmektedir (Şahin 2016).

Gaz Kromatografi Dedektörleri

Dedektör kolonda ayrılan bileşenleri algılayan ve onları elektronik sinyallere dönüştüren elektronik birimdir. İdeal bir dedektör ilgilenilen maddelere karşı yeterince hassas, stabil ve tekrarlanabilirliği iyi olmalıdır. Çalışılacak madde konsantrasyonları için yeterli bir lineer aralıkta çalışabilmelidir. Oda sıcaklığından 400°C ye kadar çalışabilmelidir. Akış hızından bağımsız olarak algı-cevap süresi kısa olmalıdır. Geniş bir aralıkta maddeye karşı hassas olmalı ve örnekten olumsuz etkilenmemelidir. Uygulandıkları numune tiplerine göre gaz kromatografi dedektörleri Tablo 1'de gösterilmiştir (Şahin 2016).

Alev iyonlaşma dedektörü gaz kromatografide en yaygın ve uygulama alanı en geniş dedektörlerdendir. Kolondan gelen karışım hidrojen-hava alevine yönlendirilir. Organik bileşiklerin çoğu bu alevde piroliz edildiğinde elektronlar ve iyonlar üretirler. Oluşan bu elektron ve iyonlar alev boyunca elektrik iletkenliği sağlarlar. Gaz kromatografisi / kütle spektrometresi (GC/MS), karmaşık organik ve biyokimyasal karışımların analizi için kullanılan güçlü bir

sistemdir. Bu uygulamada kromatografik kolondan çıkan bileşikler için ayrı ayrı spektrumlar toplanır. Bu spektrumlar daha sonra islenmek üzere bir bilgisayarda depolanır. Kütle spektrometresi ayrıca uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin analizi için sıvı kromatografi ile de birlestirilmistir (LC/MS).

Tablo 1. Gaz Kromatografi Dedektörlerinin Uygulandığı Numune Tipleri (Skoog&Leary 1992)

Dedektör tipi	**Uygulanan numuneler**
Alev iyonlaşma (FID)	Hidrokarbonlar
Termal iletkenlik (TCD)	Her tip bileşik
Elektron yakalama (ECD)	Halojenli bileşikler
Kütle spektrometre (MS)	Her tür için ayarlanabilir
Termiyonik(NPD)	Azot ve fosfor bileşikleri
Elektrolitik iletkenlik (Hall)	Halojen,kükürt veya azot
Fotoiyonlaşma	UV ışınıyla iyonlaşan
Fourier dönüşümlü IR(FTIR)	Organik bileşikler

Her iki ikili yöntemin de geliştirilmesi sırasında çözülmesi gereken en büyük problem, kromatografi sisteminde taşıyıcı gaz yada sıvı ile büyük ölçüde seyrelmenin olması yani taşıyıcı miktarının numuneye göre çok olmasıdır. Bu nedenle, numuneyi kütle spektrometreye göndermeden önce bu gaz ya da sıvıyı uzaklaştırmak için yöntemler gerekir (Şahin 2016).

GC ile UY Bileşenlerinin Tanımlanması

Gaz kromatografi (GC), bilimin pek çok alanından olduğu gibi, UY'ların kimyasal kompozisyonunun saptanmasında en yaygın kullanılan temel analitik yöntemlerde biridir. Kromatografik bir işlemle bir örnek karışımının çok iyi bir şekilde birbirinden ayrılmasını sağlamak mümkündür. GC, bir sabit faz ve bir de hareketli faz arasında moleküllerin bu fazlardaki kalma sürelerine bağlı olarak gerçekleşen bir ayırma yöntemi olarak da kısaca tanımlanabilir. Ancak bu ayırma işleminin ardından her bir ayrılan molekülün kimyasal yapısının saptanması için, spektroskopik veye spektrometrik detektörler aracılığı ile ikinci analitik çalışma daha gereklidir. Bu aşamada da en yaygın kullanılan uygulama GC-MS (Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi) yöntemidir (Jennings ve Shibamoto,1980).

UY bileşenlerinin tam ve doğru tanımlanmasının yapılmasında uygulanan GC çalışımla koşullarının iyi saptanması oldukça önemlidir. Bu başarılı ayırma işleminde; kolon seçimi, fırın sıcaklık programı, hareketli fazın (gaz) akış hızı, enjeksiyon modu (split/kolona doğrudan/pulsed) ve dedektör sisteminin seçimleri oldukça önemlidir. Detektör sistemi olarak yaygın olarak tercih edilen kütle spektrometresi (MS), yeni veya bilinmeyen moleküllerin saptanması, geometrik izomerlerin ayırt edilebilmesi konusunda oldukça yardımcı bir analitik yöntemdir. Bunun yanı sıra, oldukça güçlü bir teknik olan nükleer magnetik rezonans spektrometresi

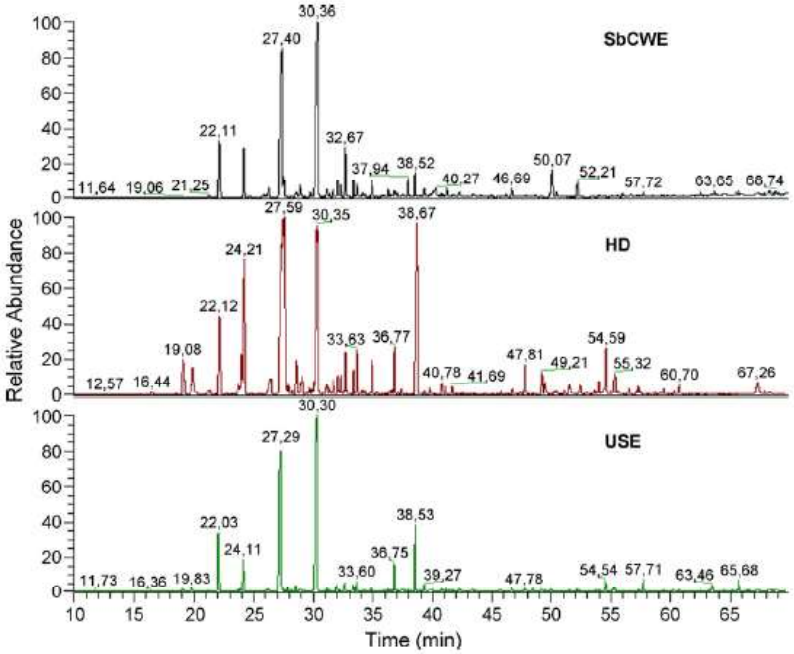
(NMR), Infrared (IR) ve Raman spektroskopi teknikleri de UY'ların saptanmasında kullanılmaktadır (Daferera ve ark., 2002); (Tomi ve Casanova, 2006); (Schulz ve Baranska, 2007); (Sparkman ve ark., 2011). Bu bölümde GC tekniklerinden bahsederken tek ve çok boyutlu teknikler olarak bir isimlendirme adı altında yapılacaktır.

Tek Boyutlu GC Tekniği

GC ile UY analizlerinde en temel çalışma, UY bileşenlerinin, spektrometirk bir dedektörün kullanılmadığı bir sistemde moleküllerin tanımlanması FID, TCD detektörlerden sağlanan kromatografik verilerden yararlanarak yapılır (Kovats indisi, Lineer alıkonma indisi, göreceli alıkonma(t_{RR}) zamanı, mutlak alıkonma süresi (t_R) gibi). Bu verilen standart moleküllerin verileriyle kıyaslanır. Bunun için UY moleküllerinin tüm kromatografik ayırma koşullarının (kolonun cinsi, fırın sıcaklık programı, hareketli fazın akış hızı, detektör) birebir, kıyaslanacağı standart molekülün ayırma koşulları ile aynı olması gereklidir. Bu teknik için en yaygın örnek GC-FID ve GC-TCD sitemidir.

GC sisteminde UY bileşenlerinin ayrılması, kromatografi kolunun içi yüzeyi (sabit faz) ve hareketli faz (gaz, N_2, He veya H_2) arasından dağılma oranlarına bağlı olarak gerçekleşir. Bu ayrılmanın öncesinde ise analiz örneğinin uçucu fazda olması gereklidir. Bu aşama, enjeksiyon kısmında sıcaklığın 200 °C veya üstünde tutulmasıyla sağlanır. Enjeksiyon portunda buharlaştırılan UY bileşenlerinin ~0.2

mm iç çapına sahip kolonun, dolgu materyali üzerinden (sabit faz; polar, apolar veya inert) hareketli faz (gaz) yardımıyla hareket ettirilerek biribirden ayrılırlar. Bu ayrılma, sıcaklık kontrollü bir işlemdir. Ayırma işlemi sırasından uygulanan sıcaklık programı işlem sırasından, kromatografi kolonun koşullarının değişmesini sağlar böylece ayırma başarıyla tamamlanır. Ayrılma sırasında detektöre ulaşan bileşenler, içinde bulunduğu karışımındaki miktarına göre bir göreceli bir miktar dağılımı gösterir (Şekil 1).



Şekil 1. *Lavandula stoechas* Çiçeklerinin Subkritik Su Ekstraksiyonu (Sbcwe), Hidrodestilasyon (HD) Ve Ultrases Destekli Ekstraksiyon (USE) Yöntemleri İle Hazırlanmış Uçucu Yağlarının GC–MS Kromatogramı (Giray ve ark., 2008)

Kromatografik ayırma, dört ana birimden oluşur: giriş, ayırma, dedeksiyon ve data toplama. Bir GC işlemi ile ayrılacak analiz örneğinin yeterince uçucu ve aynı zamanda termal olarak kararlı olması gereklidir. Bu nedenle, GC analizine uygun olmayan analitler arasında iyonik veya çok polar maddeler, ısıya dayanıklı veya yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler bulunur. GC ile analize uygun moleküller konusunda iyi birer kaynak olarak Handbook of Derivatives for Chromatography (Blau ve Helket (1993) ve Modern Derivatization Methods for Separation Sciences (Toyo'oka, 1999) verilebilir.

Tek Boyutlu GC Tekniğinde Kullanılan Kolonlar

UY'lar genellikle çok fazla sayıda bileşenden oluştuğu ve aynı zamanda çeşitli izomerik (geometrik, stereoizomerik, yapısal) formlarda olduğu için bunların ayrılmasında kolon seçimi önemlidir. Genel olarak uzun (50 - 60 m) ve iç çapı küçük (çoğunlukla 0.25 - 0.32 mm) olan kolonlar tercih edilir. Kolon çapı ve uzunluğunun yanı sıra, kolon dolgu maddesinin (sabit faz) film kalınlığı da (df) kromatografik ayırma sonucunu etkileyen önemli bir faktördür. Yaygın uygulama olarak -0.33 μm dir. Çok uçucu olan bileşenler için d_f : 5 μm olarak değişebilir. GC ayırma işleminde, sabit fazın kimyasal yapısı ise ayrılacak moleküllerin yapısına göre tercih edilmesi gerekir. Bunu analiz örneğinin polaritesi belirler. UY'ların hem polar hem de apolar bileşenler içerdiği göz önünde bulundurulduğunda, polar (polietilen glikol) ; apolar [% 100-poli(dimetilsiloksan) veya % 5–95-

fenil-poli(metil siloksan) karışımı kolonlar tercih edilir. GC ile ayırma işleminde, uçucu bileşenlerin analizi için kolon başlangıç sıcaklığı yaygın olarak 35–50 °C tercih edilir; UY'ların doğası gereği yüksek bir kolon son sıcaklığına ihtiyaç olmayabilir (200–250 °C). Bunların yanı sıra kolon ısınma hızı, kolonun uzunluğu ile ilişkili olmak üzere, uzun kolonlar için 3–4 °C/min, kısa kolonlar için (30 m) 5–7 °C/min veya biraz daha hızlı olabilir. Ancak hemen belirtmek gerekir ki, sıcaklık programı uygulanarak yapılan bu analitik çalışma için verilen bu değerler opsiyoneldir. UY moleküllerinin kimyasal kompozisyonu bu değerlerin değişmesine neden olabilir (Hinshaw ve Ettre, 1994).

Yıllar içinde cihazlarda ve geliştirilen analiz yöntemlerindeki hızlı ilerleyişler, kapiler kolonların kullanıldığı GC'lerde çok hızlı ve hassas çalışmalar yapılmasına olanak sağlamıştır. GC için kararlı kiral kolonların gelişmesiyle (bu sabit fazlar çoğunlukla siklodekstrin esaslıdır) enantiyomerik UY moleküllerinin tanımlanmasına da olanak sağlamaktadır. Bu şekilde tanımlamalar UY kalitesini kontrol etmede oldukça önemlidir. Ancak literatürde yer alan pek çok araştırma sonucundan tek bir "evrensel kirla kolon" çıkarımı yapabilmek mümkün değildir (König, 1998); (Bicchi ve D'Amato, 1999)

Tek Boyutlu GC Tekniğinde Kullanılan Enjeksiyon Sistemleri

Genel olarak uçucu maddelerin kromatografik analizinde tüm enjeksiyon sistemlerinden yararlanılır. UY analizlerinde ise klasik split/splitless enjeksiyon sistemi tercih edilir. Enjeksiyon portunun

sıcaklığı UY moleküllerinin buharlaştırılmasına yetecek düzeyde tutulur (200–250 °C). Split mod'da çalışıldığına, analiz örneğinin minimum deteksiyon limitinin üzerinde bir miktarda kolona transferi sağlanır. Splitless mod ise, çok miktarda bulunan ve bunların yan ısıra termal olarak kararlı olmayan bileşenlerin enjeksiyonu için uygun bir sistemdir (Grob, 1993). Bir diğer enjeksiyon sistemi sıcaklık-programlı enjeksiyonlardır (Programmed-temperature injectors PTV). Daha çok, çok derişik (örneğin ekstraksiyon ortamından doğrudan alınan UY moleküllerinin) örneklerin analizinde tercih edilir. Doğrudan kolona enjeksiyon (on-column injection) sistemi ise hem yüksek uçucu hem de termal olarak kararlı olmayan UY moleküllerin analizine uygun bir enjeksiyon sistemidir (Grob, 1987).

Tek Boyutlu GC Tekniğinde Kullanılan Detektörler ve GC-MS

GC sistemlerinde yer alan detektörler, analiz edilen moleküller için bir sinyal üretirken, taşıyıcı gaza cevap vermez. Kullanılan dedetörler, refraktif indeks, floresans, iyonik akım, ısıl iletkenlik (TCD) ve foton emisyon gibi fiziksel özelliklerden yararlanarak analiz örneklerine cevap verirler. TCD veya infrared (IR) detektörler genel olarak tüm moleküllerin saptanmasında kullanılabildikleri için bunlara "evrensel dedektörler" de denir. Bunların dışında, azot-fosfor detektör (NPD), elektron-yakalama (ECD), alev-fotometrik detektör (FPD), ısıl enerji analizör (TEA) ve atomik emisyon detektör (AED)de diğer özel dedektörler arasında yer alır. Bunların dışında en özel detektörlerden bir diğeri ise Kütle Spektrometresi (MS) dir (Dressler, 1986).

GC ve MS kombinasyonu, UY analizlerinde üç bağımsız parameterenin saptanmasını sağlar. Bunlar: analitin alıkonma zamanı (t_R), iyonlaşan analitin ayrılma zamanı ve MS detektöre ulaşan her bir molekülün miktarı (sinyal yüksekliği) (Scheinemann ve ark., 2012). Bunun yanı sıra, GC- MS kombinasyonunda headspace enjeksiyon mümkündür ve böylece; düşük deteksiyon limiti, iyi seçicilik, hızlı analiz süresi, atmosferik basınç altında çalışma ve analiz örneği için ön hazırlık gerektirmemek gibi avantajları vardır. UY'lar hakkındaki mevcut bilgiler, GC-MS tekniği kullanılarak sağlanmıştır (Daferera ve ark., 2000); (Giray ve ark., 2008); (Jiang ve ark., 2011). GC-MS sisteminde analiz, moleküllerin iyonlaştırılmasını gerektirir. Bu iyonlaşma ardından, elektron bombardımanı (EI, 70 eV, enerji, en eski ve yaygın elektron iyonlaştırması yöntemi) ile molekülde kovalent bağlarda kırılmalar ile molekülden parçalanma ürünleri elde edilir. Bir diğer iyonlaşması yöntemi de kimyasal iyonlaşmadır (KI). Bu yöntem, EI yöntemi ile moleküler iyon sinyali oluşturamayan moleküllerin iyonlaştırılmasında tercih edilir. Analiz örneğinin doğasına bağlı olarak, uygun bir reaktif gaz ile molekülden pozitif veya negatif iyonlar oluşur. KI sırasında protonlanmış (MH^+), deprotonlanmış ($M-H^-$) veya elektron almış ($M-$) moleküler iyonlar oluşur. Analitin molekül kütlesi bu modifiye edilmiş moleküler iyon kütlesinden saptanır. GC-MS ile elde edilen sonuçların yorumlanması sırasında, karışımlardaki maddelerin moleküler yapısının yüksek bir doğrulukla saptamak çok önemlidir. Özellikle tüm analitler için sertifikalı standart maddelerin temin edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda,

bu çalışmalar çok daha yüksek dikkat gerektirmektedir. Bu değerlendirmeler sırasında ticari olarak temin edilen veri tabanlarından (NIST, WILEY, vb) da yararlanılır.

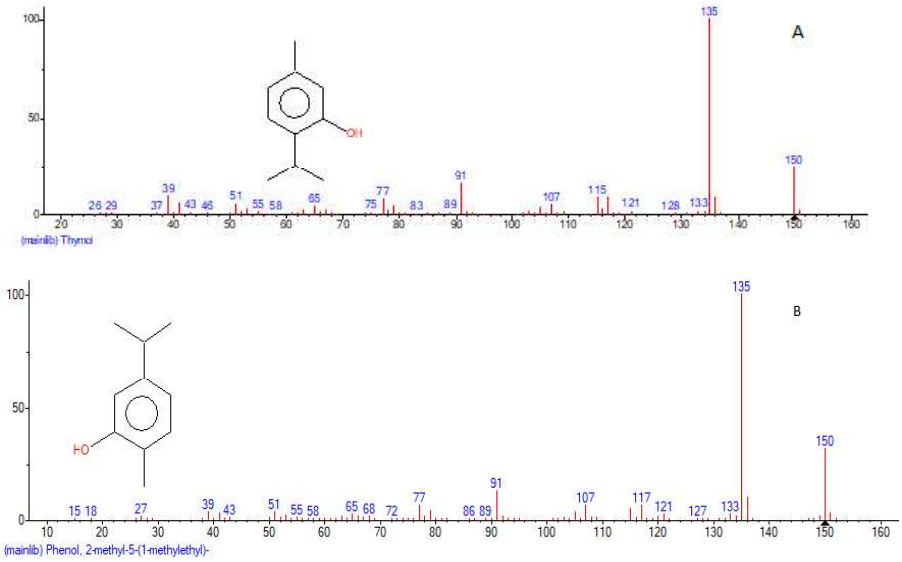
MS larının değerlendirilmesi işlemlerinde parçalanma ürünlerinin kütlesi (m/z) ve şiddeti (göreceli bolluğu), moleküldeki kovalat bağlarının gücüne göre değişkenlik gösterir. Parçalanma ürünleri denilen bu iyonların dağılımı, her bir moleküle özgü olduğu için yapının aydınlatılmasının hatasız olmasına olanak sağlar. Hatta bu izomerik moleküller için de geçerlidir. Örneğin karvakrol ve timol, yapı izomeri iki doğal monoterpen fenol bileşiğidir ve bunların MS'ları neredeyse birebir aynıdır. Ama GC-MS sisteminde, farklı polariteye sahip kolonlarda yapılan ayırma işlemlerinden elde edilen lineer alıkonma indislerinden (LRI) yararlanılarak ayırt edilmeleri mümkündür (Şekil 2).

İki ve Üç Boyutlu GC Tekniği

İki boyutlu GC tekniklerinden biri GC-GC tekniğidir. Bu sistemlerde iki farklı polariteye sahip kolon birbirinden bağımsız olarak peş peşe kullanılır. Genellikle ilk kolon düşük polariteye sahip bir sabit faz içerirken, ikinci kolonun dolgu maddesi daha polar bir materyal olarak seçilir. Ancak şunu da belirtmek gerekir ki; farklı moleküller farklı mekanizmalarla ayrılırlar, dolaysıyla kolon kombinasyonları konusunda kesin bir kural yoktur. Genel olarak birinci kolonda ayrılan moleküller, ikinci kolona aktarılarak orada da ikinci ayırma işlemi

gerçekleşir. Ancak, GC- GC tekniği, ilk kolon uygulama aşamasında yavaş ilerleyen bir sıcaklık programı gerektirmesi, data işleminin kolay olmayışı ve tercih edilebilir bir cihaz uygulaması olmaması gibi dezavantajlara sahiptir (Marriott ve ark., 2003); (Namara ve ark., 2007).

Üç boyutlu GC tekniğinin en güçlü örneği ise GC-GC -TOFMS teknolojisidir. Bu teknikle çok yüksek çözünürlükle UY moleküllerinin ayrılması ve tam kütle spektrumlarının sağlanabilmesi mümkündür. Bu teknikle lavander (*Lavandula angustifolia*) UY ve paçuli (*Pogostemon cablin*) UY 'nın kimyasal kompozisyonu tam olarak aydınlatılabilmiştir (Shellie ve ark.,2001); (Wu ve ark., 2004).



Şekil 2. İki İzomerik Fenolik Bileşiğin EI (70 eV) Kütle Spektrumu . A: Timol; B: Karvakrol

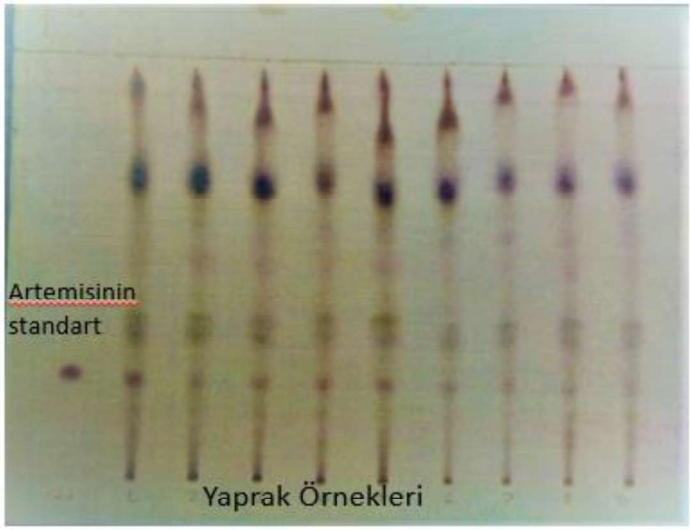
1.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC cihazı genel olarak 8 kısımdan oluşur; Mobil faz (çözücü) şişeleri, degasser (mobil faz içerisinde bulunan eriyik gazların giderilmesi için kullanılan bir sistem), pompa, enjektör, kolon fırını, kolon, dedektör, kaydedici, bu kısımlardan bazıları çalışılacak numuneye ve cihaz marka, modeline göre değişiklik gösterebilir (Eser & Dinçel, 2018) . UY analizlerinde, HPLC sistemi yaygın olarak UV detektörle birlikte kullanılır (HPLC-UV). Hassas ve seçimli olma özellikleri nedeniyle güvenilir bir yöntem olmasının yanı sıra, UY bileşenleri arasından uçuculuğu az olan moleküllerin analizlerinde tercih edilir (Bonaccorsi ve ark., 1999); (Marin ve ark., 2000). Piry ve Pribela, ters-faz HPLC-UV (reversed-phase HPLC-UV) tekniği ile frenk üzümü (*Ribes nigrum* L.) UY'larının başarılı bir ayrıma örneğinin vermektedir (Piry ve Pribela, 1991). Bonaccorsi ve ark., da narenciye (*Citrus*) UY'larının oksijenli hetereosiklik moleküllerinin HPLC tekniği ile ayrılmasına örnekler vermişlerdir (Bonaccorsi ve ark., 1999).

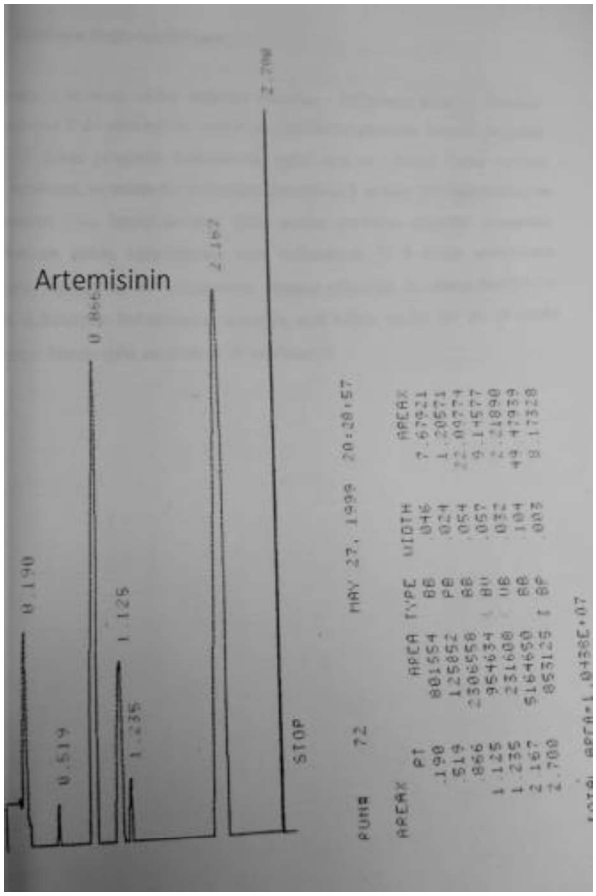
1.3. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Yapısına bağlı olarak tabaka moleküllerin ayırmasını (1) çözünenlerin çözeltiden, tabaka partiküllerinin yüzey aktif gruplarına fiziksel sorpsiyonuyla (adsorpsiyon), (2) tabaka üzerinde tutulan sabit sıvıda moleküllerin çözülmesiyle (dağılma), (3) iyonların tabakanın zıt yüklü kısımlarıyla etkileşmesiyle (iyon değiştirme) veya molekül

boyutlarına veya (4) şekillerine bağlı olarak çözünenlerin tutulması (boyut eleme) ile sağlar. İTK'da dahil olmak üzere tüm kromatografik tekniklerde temel amaç bir karışım içerisindeki bileşenleri ayırmaktır. Özellikle uzak doğuda malaryaya karşı kullanılan yıllık pelin otunda (*Artemisia annua*) seskuiterpen olan etkili maddesi artemisinin, ısıya maruz kaldığında artemisinin A ve B olarak ikiye ayrıldığı için hızlı ve güvenilir analizinde İTK ve TLC-densitometri kullanılmaktadır (Mert, 1999; Mert ve ark., 2002) (Şekil 3 ve 4).



Şekil. 3. Yıllık Pelin Otunda İTK Artemisinin Analizi (Çözücü: N-Heksan:Dietileter 1:1, Belirteç: Glasial Asetik Asit-Konsantre H_2SO_4-Anisaldehit 50:1:0.5).



Şekil 4. Yıllık Pelin Otu Yaprak Örneğinin İTK Densiogramı (Camag Scanner-II).

SONUÇ

Uçucu yağların kullanım alanları her geçen gün artmakta, endüstrinin farklı alanlarında yer almaktadır. Gerek doğal floradan gerekse tarımı yapılan bitkilerden elde edilen UY'ların oran ve bileşenleri çeşitli faktörlerin etkisiyle değişmekte, bununla beraber Dünya pazarları, kozmetik ve ilaç sektörü etken madde miktarı ve kalitesi yüksek ve bu yönleriyle "standart ürün" talep etmektedir. Uçucu yağların kalite

değerlendirmelerinde bileşimlerinin farmakopi ve kodekslerde belirtilen standartlara uygunluğu ve bileşenlerin tanımlanmasında, tahşiş de analiz yöntemleri öne çıkmaktadır. Kompleks organik ve biyokimyasal karışımlar olan UY'ların ayrılmasında seçilen yöntemin, UY'a uygun, hızlı, güvenilir ve ekonomik olması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Bicchi, C., D'Amato, A. & Rubiolo, P. (1999). Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *Journal of Chromatography A* 843(1-2):99-121.

Blau, K.B., & Halket, J. (1993). Handbook of Derivatives for Chromatography. John Wiley & Sons. New York.

Bonaccorsi, I.L, McNair, H.M., Brunner, L.A., Dugo, P. & Dugo, G. (1999). Fast HPLC for the analysis of oxygen heterocyclic compounds of citrus essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 4237–4239.

Daferera, D. Tarantilis, P., & Polissiou, M. (2002). Characterization of essential oils from lamiaceae species by fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(20): 5503–5507.

Daferera, D.J., Ziogas, B.N. & Polissiou, M.G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum.* *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48(6): 2576–2581.

De Silva, T.K. (1995). A Manual on the EO industry. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Vienna.

Do, T. K. T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S. & Fernandez, X. (2015). Authenticity of essential oils, *Trends in Analytical Chemistry* 66: 146–157) .

Dressler, M. (1986). Selective Gas Chromatographic Detectors. Elsevier, Amsterdam.

Eser, B. & Dinçel, A.S. (2018) Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education* 2(2): 51-57.

Giray, E.S., Kırıcı, S., Kaya, D.A., Türk, M., Sönmez, Ö. & İnan, M. (2008). Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional

extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta* 74 (4): 930-935.

Grob K. (1993). Split and Splitless Injection in Capillary GC, 3rd ed. Huthig Buch Verlag. . Heidelberg.

Grob, K. (1987). On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography, 2nd ed. Dr. Alfred Heuthig, Gmbh. Heidelberg.

Hinshaw, J.V. & Ettre, L.S. (1994). Introduction to Open-Tubular Column Gas Chromatography. Advanstar, Cleveland.

İnan, M., Kırpık, M., Kaya, D.A. & Kırıcı, S. (2011). Effect of harvest time on essential oil composition of *Thymbra spicata* L. Growing in Flora of Adıyaman. *Advances in Environmental Biology* 5(2): 356-358.

Jennings, W., & Shibamoto, T. (1980) Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York.

Jiang, M.H., Yang, L., Zhu, L., Piao, J.H. & Jiang, J.G. (2011). Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Food Science* 76(9):C1219-25.

Kırıcı, S. (2015). Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin genel durumu. *TÜRKTOB, Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*. 15: 4-11.

Kızıl, S., Güler, V., Kırıcı, S. & Türk, M. (2016). Some agronomic characteristics and essential oil composıtion of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under cultivation conditions. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 15(6) : 193-20.

König, W.A. (1998). Enantioselective capillary gas chromatography in the investigation of stereochemical correlations of terpenoids. *Chirality* 10:499-504.

Marin, C., Marchisio, G., Janinet, O. & Le, B.B. (2000). HPLC control of citrus essential oils. Application to lemon essential oils, *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique* 93(953):389–399.

Marriott, P.J., Haglund, P. & Ong R.C.Y. (2003). A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. *Clinica Chimica Acta* 328 (1-2):1-19.

Mastelic, J,, Jerkovic´I., Blaževic´, I., Poljak-Blaži, M., Borovic´, S., Ivanci-Bace´, I., Vilko Smreckı ˇ , Žarkovıc´, N., Kostic, K. B., Vikıc´-Topıc´D. & Müller, N. (2008). Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives Journal *of Agricultural Food Chemistry* 56 (11):3989–3996.

Mert, A. (1999). *Artemisia annua* L. da bazı agronomic uygulamaların verim ve verim komponentleri ile kalite üzerine etkileri (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Mert, A., Kırıcı, S. &Ayanoğlu, F. (2002). The effects of different plant densities on yield, yield components and quality of *Artemisia annua* L. ecotypes. In C.B. Johnson, C. Franz (eds.) Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants.pp: 413-418, The Haworth Press, New York.

Namara, K.M., Howell, J., Huang, Y. & Robbat Jr. (2007). A. Analysis of gin essential oil mixtures by multidimensional an one-dimensional gas chromatography/mass spectrometry with spectral deconvolution. *Journal of Chromatography A* 1164(1-2):281-290.

Piry, J. & Pribela A. (1991). Distribution of aromatic substances in black currants. *Biologia* 46(3): 185–192.

Scheinemann, A., Sielemann, S, Walter, J. & Doll T. (2012). Evaluation strategies for coupled GC-IMS measurement including the systematic use of parametrized ANN. *Open Journal of Applied Sciences* 2(4):257-266.

Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1): 13–25.

Shellie, R., Marriott, P. & Morrison, P. (2001). Concepts and preliminary observations on the triple-dimensional analysis of complex volatile samples by using GCxGC-TOFMS. *Analytical Chemistry* 73(6):1336- 1344.

Skoog, D.A. & Leary, J.J. (1992). Principles of Instrumental Analysis. 4th Edltion, Saunders College Publishing, Philadelphia.

Sparkman, O.D., Penton, Z., & Kitson, F.G. (2011) Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. Academic Press, Oxford.

Şahin M (2016). *GC/FID Cihazı ile Kantitatif MDMA Analizi Metot Validasyonu* (Yüksek Lisans Tezi) Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Tomi F. & Casanova, J. (2006). 13C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae – A review. *Acta Horticulturae*, 723: 185–192.

Tonbul, S. (2015). *İnce Tabaka Kromatografi* (Lisans Tezi) Yakın Doğu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

Toyo'oka, T. (1999). Modern Derivatization Methods for Separation Sciences. John Wiley & Sons. New York.

Wu, J., Lu, X., Tang, W., Kong, H., Zhou, S. & Xu, G. (2004). Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry in the analysis of volatile oil of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. 1034:199-205.

Zzarte, M. & Salgueiro, L. (2015). Essential oils chemistry. In D.P. de Sousa (ed.) Bioactive Essential Oils and Cancer. 19- 28. Springer International Publishing, Switzerland.